دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ٤٦٦٨-٢٠٠٨
www.entomologicalresearch.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد٥ ، شماره ٤، سال ١٣٩٢، (٣٤٣-٣٣٤)

بررسی اثر سه اسانس گیاه دارویی بر رشد میسلیومی، جوانه‌زنی و تولید کنیدیوم سه گونه قارچ بیمارگر حشرات در شرایط آزمایشگاهی

امید پناهی[1]، جعفر حسین‌زاده[1]، سید علی صفوی[1]، حسین فرازمند[2]*

١- دانشجویان سابق کارشناسی ارشد، استادیار و عضو هیئت علمی گروه حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
٢- دانشیار و عضو هیئت علمی بخش تحقیقات حشره‌شناسی کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران، ایران.

چکیده

خطرات زیست محیطی و بهداشتی آفت‌کش‌های شیمیایی، موجب توجه به روش‌های جایگزین در کنترل آفات، مانند بکارگیری اسانس‌های گیاهی، آفت‌کش‌های بیولوژیک در کشاورزی پایدار و تولید محصول سالم گردیده است. بدین منظور اثر اسانس سه گونه گیاه دارویی، نعناع *Mentha spicata* L. (Spearmint)، زیره‌سبز *Cuminum cyminum* L. (Umbelliferae) و لیموترش *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle بر رشد میسلیومی، جوانه‌زنی و میزان تولید کنیدیوم قارچ‌های بیمارگر حشرات *Lecanicillium longisporum*، *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae*جهت استفاده هم‌زمان از اسانس‌ها و قارچ‌ها برای کنترل آفات، مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به انجام رسید و اثر هر کدام از اسانس‌ها در پنج غلظت که هر غلظت شامل سه تکرار بود، به همراه تیمار شاهد در دمای ١±٢٧ درجه سلسیوس روی محیط کشت SDA بررسی شد. نتایج نشان داد در غلظت ٢٠ میکرولیتر قارچ‌های *L. longisporum* و *B. bassiana* با میانگین ٤١/٠٦ درصد مهار رشد و *M. anisopliae* با میانگین ٢٠/٤٤ درصد مهار رشد به‌ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین گونه در برابر اسانس‌های گیاهی مورد آزمایش بودند. هم‌چنین مشخص شد که اسانس *C. cyminum* با ٤١/٠٦ درصد مهار رشد میسلیومی قارچ‌های مورد مطالعه، بیش‌ترین اثر و *C. aurantifolia* با ٢٠/٤٤ درصد مهار رشد، کم‌ترین تأثیر را داشته‌اند. در غلظت ٢٠ میکرولیتر، اسانس گیاهان *C. cyminum* و *C. aurantifolia* باعث بیش‌ترین و کم‌ترین درصد مهار جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ‌های مورد مطالعه شده‌اند. نتایج نشان داده است که با افزایش درصد مهار رشد میسلیومی قارچ‌ها، میزان تولید کنیدیوم در هر تشتک پتری به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: اسانس‌های گیاهی، قارچ‌های بیمارگر حشرات، کنترل غیرشیمیایی، سازگاری

نویسنده رابط، پست الکترونیکی:: *Jafar.entomologist@gmail.com*
تاریخ دریافت مقاله (٩٠/١٢/٦) - تاریخ پذیرش مقاله (٩٢/٤/٢٤)

مقدمه

امروزه کاربرد ترکیبات شیمیایی به‌عنوان ارزان‌ترین و متداول‌ترین روش کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی مورد توجه است، امّا این مواد معمولاً در طبیعت به کندی تجزیه می‌شوند و به همین دلیل باعث ایجاد مسمومیت برای انسان، جانوران اهلی و سایر موجودات می‌شوند (Alvares-Castellanos *et al*., 2001).

بررسی‌هایی که روی فعالیت کنه‌کشی اسانس نعناع علیه بالغین کنه‌های تترانیکوس[1]، (Aslan *et al*., 2004) ، تأثیر اسانس گیاهان دارویی از جمله نعناع جهت کنترل جمعیت سفیدبالک گلخانه[2] (Wang *et al*., 2006)، اثر اسانس سه گونه گیاهی شامل *Satureja hortensis* L.، *Ocimum basilicum* L. و *Thymus vulgaris* L. روی حشرات بالغ و پوره‌های عسلک پنبه[3] (Aslan *et al*., 2004)، فعالیت حشره‌کشی اسانس گیاهی زیره سبز علیه بالغین شپشه‌ی آرد[4] (Chaubey, 2008) انجام شده است، نشان می‌دهد که اسانس‌های گیاهی دارای مواد شیمیایی گوناگونی بوده و دارای اثر آفت‌کشی بالایی هستند.

استفاده از این گونه ترکیبات با خاصیت انتخابی، یکی از راهکارهای مهم در برنامه‌ی مدیریت تلفیقی آفات محسوب می‌شود. در برخی موارد، کاربرد تلفیقی برخی از ترکیبات با قارچ‌های بیمارگر حشرات ممکن است سبب افزایش بازدهی کنترل آفات شود (Moino & Alves, 1998; Quintela & McCoy, 1998).

یکی از روش‌های مدرن جهت تولید فرآورده‌های غذایی کم‌خطر برای انسان استفاده از کشاورزی ارگانیک می‌باشد. تولید غذا و فرآورده‌های ارگانیک مورد نیاز جامعه، نیازمند استفاده از روش‌هایی است که در آن‌ها از مواد غیرشیمیایی استفاده شود. در این سیستم تولید، جمعیت آفات اقتصادی و مهم از طریق کاربرد عوامل کنترل بیولوژیک، از جمله قارچ‌های بیمارگر حشرات همانند *Lecanicillium longisporum* (Petch) Zare & Gams، *Beauveria bassiana* (Metsch.) Sorok و *Metarhizium anisopliae* (Bals.) Vuill. کنترل می‌شوند. با این وجود ضروری به نظر می‌رسد که جهت کنترل آفات به‌وسیله قارچ‌های بیمارگر، آن‌ها را در برابر عوامل طبیعی محافظت نمود (Oliveira *et al*., 2003).

یکی از این قارچ‌ها، *L. longisporum* است که سازگاری زیادی با اغلب آفت‌کش‌های رایج، مانند پریمیکارب، کاربریل، پرمترین، دیفلوبنزوران، مپرونیل، هیدروکسید مس، آیپرودیون، دینوکاپ و دیکوفول دارد. این قارچ را می‌توان همراه با آفت کش‌های مصنوعی و گیاهی و یا به تنهایی برای مبارزه با آفات کلیدی از قبیل پسیل معمولی پسته[5] (Alizadeh *et al*., 2007)، سفیدبالک برگ نقره‌ای[6]، (James & Elzen, 2001) استفاده کرد. هم‌چنین، استرین‌هایی از این قارچ، توان آلوده‌سازی برخی عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله سفیدک‌های سطحی، زنگ‌ها، لکه‌برگی‌ها و نماتدهای انگل گیاهی را نیز دارد (Lacey *et al*., 1999). بنابراین برای حفاظت از آن‌ها، باید قابلیت سازگاری این بیمارگرها را با سایر عواملی که جهت کنترل آفات بکار برده می‌شوند، سنجیده و در کاربرد آن‌ها در راستای کنترل آفات بکار گرفته شوند.

گیاهان برای مقابله با حمله عوامل خسارت‌زا، از موادی که به نام متابولیت‌های ثانویه معروفند و شامل موادی مانند آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، استروئیدها و مواد آروماتیک دیگرهستند، استفاده می‌کنند (Bourgaud *et al*., 2001).

طی پژوهش‌های انجام گرفته، محققین به این نتیجه رسیده‌اند که از این مواد برای کنترل آفات مختلف می‌توانند استفاده نمایند (Lentz *et al*., 1998). شرکت‌های تجاری با توجه به نتایج تحقیقات محققین مختلف، در مورد خواص آفت‌کشی اسانس‌های گیاهی، از این مواد حشره‌کشهای مختلفی را ساخته‌اند.

1- *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval
2- *Trialeurodes vaporariorum* Westwood
3- Bemisia tabaci (Gennadius)
4- *Tribolium castaneum* (Herbst)
5- *Aganiscena pistaciae* Burck & Laut.
6- *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring

با توجه به تحقیقات انجام گرفته روی قدرت حشره کشی قارچ‌ها، شرکت‌های مختلفی در راستای کنترل بیولوژیک آفات از این قارچ‌ها موادی را با نام‌های تجاری متفاوت برای کنترل آفات تولید و برای مبارزه و کنترل آفات استفاده نموده‌اند. شرکت Mycotech فرآورده‌ای را تحت نام Cinnamite™ را به عنوان یک قارچ‌کش برای استفاده در گلخانه‌ها و فرآورده Valero™ را به عنوان یک ترکیب کنه‌کش و قارچ‌کش برای استفاده در گیاهانی همانند انگور و مرکبات و میوه‌های خشک عرضه نموده است (Liu *et al*., 2001).

اسانس‌های گیاهی با توجه به مواد موجود در داخل آنها باعث تاثیر مثبت یا منفی روی عملکرد حشره کشی قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌شوند. استفاده بدون بررسی این اسانس‌های گیاهی در راستای کنترل آفات ممکن است مانع تاثیر مناسب قارچ‌های بیمارگر حشرات روی آفات گردند (Duarte *et al*., 1992; Malo, 1993). از سوی دیگر استفاده از این گونه ترکیبات با خاصیت انتخابی یکی از راهکارهای مهم در برنامه مدیریت تلفیقی آفات محسوب می‌شود. در برخی موارد نیز کاربرد تلفیقی برخی از ترکیبات با قارچ‌های بیمارگر حشرات ممکن است سبب افزایش راندمان کنترل آفات شود (Moino and Alves, 1998; Quintela and McCoy, 1998).

با توجه به موارد گفته شده مطالعه در مورد سازگاری اسانس‌ها با قارچ‌های بیمارگر حشرات ضروری به نظر می‌رسد. در تحقیق حاضر سازگاری سه گونه قارچ بیمارگر حشرات از جمله *L. longisporum*، *M. anisopliae* و *B. bassiana* که به‌طور وسیع جهت کنترل آفات در نقاط مختلف دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرند، با سه گونه اسانس گیاهی شامل نعناع *Mentha spicata* L. (Spearmint)، زیره سبز *Cuminum cyminum* L. (Umbelliferae) و لیمو ترش *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

اسانس و قارچ‌های مورد نظر:

قارچ‌های مورد مطالعه در این تحقیق، *L. longisporum* جدایه LRC 190 و *M. Anisopliae*، جدایه V 245، هر دو از کشور انگلستان و *B. bassiana* جدایه BEH، از استان مازندران بودند. قارچ‌های نام برده شده روی محیط کشت SDA (Sabouraud's Dextrose Agar) در شرایط دمایی ۱±۲۷ درجه سیلیسیوس و دوره روشنایی ۱۲ ساعت مورد پرورش قرار گرفتند.

از کنیدیوم‌های حاصل از رشد میسلیومی قارچ جهت انجام آزمایشات استفاده شد. اسانس‌های تهیه شده برای انجام آزمایشات این تحقیق، از گیاهان ***M. spicata* (*Lamiaceae*)**، ***C. cyminum* (*Apiaceae*)** و ***C. aurantifolia* (*Rutaceae*)** که از شهرستان ارومیه جمع‌آوری شده بودند تهیه شدنداز گیاهان خشک شده با دستگاه خرد کن برقی خرد شده و با دستگاه اسانس گیر شیشه ای مدل clearenger هر بار به مقدار ۱۰۰ گرم همراه با ٦۰۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوساسانس گیری شده است .و با دستگاه اسانس‌گیر شیشه‌ای مدل Cleavenger، (به مقدار ۱۰۰ گرم همراه با ٦۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس و در مدت زمان ۹۰ دقیقه به دست آمده بودند.

اسانس‌های به دست آمده با دستگاه Rota Evaporator- Buchi(R-3000)، آب‌گیری و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای به حجم ۲ میلی‌لیتر به رنگ قهوه‌ای تند با روپوش آلومینیومی در یخچال نگهداری شدند. این اسانس‌ها در پنج غلظت (۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر اسانس داخل درب هر پتری) و تیمار شاهد، که بر اساس تست‌های اولیه، محاسبات آماری و شرایط آزمایشگاه به دست آمده بودند، تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند.

اثر مهارکنندگی اسانس روی رشد میسلیومی قارچ‌ها:

از قارچ‌های کشت شده روی محیط کشت SDA که به مدت ۱۵ روز در دمای ۱±۲۷ درجه سیلیسیوس پرورش داده شده بودند، به‌عنوان ماده تلقیح استفاده گردید. محیط‌های کشت SDA در اتوکلاو استریل شده و تا دمای ۵±۴۵ درجه سیلیسیوس خنک شدند. پس از انعقاد محیط‌های کشت، نمونه‌های قارچ (به‌صورت دیسک‌هایی با قطر ۵ و ضخامت ۱ میلی‌متر تهیه شده از حاشیه کشت‌های پرورش یافته قارچ‌ها روی محیط SDA) در شرایط سترون مایه‌زنی شد. با کمک میکروپیپت، مقدار ۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر از اسانس به همراه تیمار شاهد داخل درب پتری‌های (پتری‌ها به قطر ۸ سانتی‌متر و ارتفاع ۲/۵ سانتی‌متر استفاده شد) حاوی قارچ ریخته شد و پس از قرار دادن درب آنها، پتریها به صورت وارونه در انکوباتور در دمای ۱±۲۷ درجه سیلیسیوس نگه‌داری شدند (Alvares-Castellanos *et al*., 2001).

برای جلوگیری از خروج ترکیبات فرار اسانس، با کمک پارافیلم، اطراف تشتک پتری کاملاً مسدود گردید. قطر رشد میسلیوم قارچ‌های مورد آزمایش در تیمارهای مختلف هر سه روز یک‌بار به مدت ۱۵ روز با استفاده از خط‌کش مدرج بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری و ثبت گردید. اندازه‌گیری در دو جهت مختلف انجام شده و میانگین حاصله برای انجام محاسبات آماری استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ٦ تیمار (شامل ۵ غلظت مختلف از اسانس با شاهد) و ۳ تکرار انجام گرفت. برای محاسبه درصد مهار رشد میسلیوم قارچ در تیمارهای مختلف از فرمول I=[(C-T)/C]×100 استفاده شد که در آن C قطر رشد میسلیوم در پتری شاهد، T قطر رشد قارچ در تیمار حاوی حشره‌کش و I درصد مهار رشد میسلیوم قارچ در تیمار مربوطه را نشان می‌دهد (Alizadeh *et al*., 2007).

برآورد میزان کنیدیوم تولید شده قارچ‌ها:

هر سه گونه قارچ استفاده شده در این تحقیق حداکثر کنیدیوم را پس از گذشت ١٤ تا ۱۵ روز به وجود می‌آورند (Hirose *et al*., 2001; Jeong and Kyu, 2007). جهت به دست آوردن تعداد کنیدیوم تولید شده توسط هر گونه قارچ، با توجه به‌روش ذکر شده در بالا ابتدا یک دیسک دایره‌ای شکل از کشت‌های هر قارچ در قسمت وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت SDA جامد شده، قرار گرفته می‌شد. پس از گذشت ۱۵ روز از قارچ‌های مورد نظر و تیمار نمودن هر یک از آن‌ها با غلظت‌های مشخصی از اسانس (۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر اسانس داخل درب هر پتری) با استفاده از یک اسکالپل استریل تمامی کنیدیوم‌های تولید شده در سطح محیط کشت خراش داده شده و در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به همراه دو صدم درصد توین۸۰ ریخته شد. به‌مدت ۱۰ دقیقه سوسپانسیون حاصله به‌طور کامل با دستگاه Shaker RPN-250 مخلوط گشته و سپس با استفاده از یک لام هموسیتومتر و به کمک میکروسکوپ نوری تعداد کنیدیوم تولید شده توسط هر گونه قارچ شمارش و ثبت شد. برای اطمینان از تعداد صحیح کنیدیوم شمارش شده، شمارش کنیدیوم‌ها در دو نوبت انجام گرفت. از میانگین حاصله دو شمارش جهت انجام محاسبات آماری استفاده شد.

اثر مهارکنندگی اسانس روی درصد جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ‌ها:

برای انجام این آزمایش، با استفاده از روش علی‌زاده و همکاران، با اندکی تغییر، محیط کشت‌های آماده در ظروف پتری هشت سانتی‌متری ریخته شدند و سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسون حاوی 10^4 کنیدیوم در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل با دو صدم درصد توین-۸۰ تهیه شده بود، روی محیط کشت‌های آماده ریخته و به‌طور یکنواخت پخش گردید. پس از آن با کمک میکروپیپت مقدار مشخصی از اسانس (۰/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرولیتر اسانس داخل درب هر پتری) به همراه تیمار شاهد، برداشته و در قسمت درب پتری‌ها قرار داده می‌شد. سپس با پارافیلم اطراف پتری‌ها به طور کامل مسدود گردید. محیط کشت‌های آماده در انکوباتور در دمای ۱±۲۷ درجه سیلیسیوس به‌مدت ٢٤ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. پس از

این مدت، دایره‌هایی به قطر نیم سانتی‌متر در قسمت زیرین ظروف پتری کشیده شد. در هر یک از این دایره‌ها یک‌صد کنیدیوم به‌طور تصادفی انتخاب و تعداد کنیدیوم‌های جوانه‌زده و نزده با میکروسکوپ نوری مورد شمارش قرار گرفت. شمارش کنیدیوم‌ها دوبار تکرار شد و از داده‌های حاصله جهت محاسبه درصد جوانه‌زنی کنیدیوم استفاده شد (Alizadeh *et al*., 2007).

آنالیز داده‌ها:

آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. داده‌های مربوط به درصد مهار رشد قارچ قبل از تجزیه آماری با تبدیل به Arcsin√x نرمال شد. داده‌ها با نرم‌افزار آماری IBM SPSS Statistics 20 تجزیه و تحلیل شده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال آماری یک درصد انجام گرفت.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها کاهش معنی‌داری در جوانه‌زنی، رشد رویشی و میزان کنیدیوم تولید شده در قارچ *L. longisporum* در تمامی تیمارها نشان می‌دهد. اسانس گیاه زیره سبز بیشترین تأثیر منفی را روی این قارچ بیمارگر داشته است، به‌طوری‌که این اسانس جوانه‌زنی کنیدیوم را ۲۹/٦۸ درصد، رشد رویشی کلنی را ٤۱/۰٦ درصد و میزان کنیدیوم تولید شده را ۷۳/۸۹ درصد کاهش داده است. اسانس گیاهان نعناع و لیمو ترش پس از اسانس مزبور بیش‌ترین تأثیر بازدارنده را روی رشد میسلیومی و درصد جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ مورد نظر داشتند. با توجه به نتایج کاهش میزان رشد میسلیومی قارچ، موجب کاهش چشم‌گیر میزان تولید کنیدیوم در هر کلنی گردید. اسانس گیاه زیره سبز با کاهش ۷۳/۸۹ درصدی بر میزان تولید کنیدیوم قارچ مربوطه بیش‌ترین تأثیر منفی را روی قارچ *L. longisporum* داشته است. ولی با این وجود تفاوت معنی‌داری بین میزان کنیدیوم تولید شده پس از گذشت پانزده روز وجود ندارد (جدول ۱).

جدول۱-میانگین جوانه زنی کنیدی،میانگین رشد کنیدی(tse)میانگین و تعداد کلنی قارچ جدا شده L.longisporiom در تیمار های مختلف در شرایط ۱±۲۷ دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی

Table 1- Conidial germination (mean ± standard error), colony growth (mean ± standard error) and conidial number (mean) of fungi isolated *Lecanicillium longisporum* LRC 190 with different treatments at a temperature of 1 ± 27 degrees Celsius and a photoperiod of 12 hours light and 12 hours darkness.

Treatment	Conidial germination		Growth of colonies		Conidial numbers per colony	
	Percent	Percent	Centimeter	Percent	number× 10^7	Percent
The control	94.33±1.20 a*	-	5.26±0.08 a	-	2.03±10^7 a	-
Mentha spicata	69.67±1.76 bc	+26.14	3.66±0.12 c	+30.41	0.69±10^7 b	+66.01
Cuminum cyminum	66.33±0.88 c	+29.68	3.13±0.12 bc	+41.06	0.53±10^7 b	+73.89
Citrus aurantifolia	74.67±0.88 b	+20.84	3.93±0.08 b	+25.28	0.75±10^7 b	+63.05

- Statistically significant difference in the level of one percent.
-

در مورد قارچ *M. anisopliae* اسانس گیاه زیره سبز با کاهش ۳٦/٦۳ درصدی رشد میسلیومی بیش‌ترین تأثیر منفی را روی این قارچ داشته است. بین اسانس گیاهان نعناع با کاهش ۲۳/۵۸ درصدی و لیمو ترش با کاهش ۲۰/٤٤ درصدی رشد میسلیومی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اسانس گیاهان زیره سبز، نعناع و لیموترش با کاهش ۳۱/٦٦، ۲٦/۹۷ و ۲۱/۵۸ درصدی میزان جوانه‌زنی کنیدیوم به ترتیب بیش‌ترین تأثیر را روی قارچ مربوطه داشته‌اند. اسانس زیره سبز بیش‌ترین تاثیر معنی‌دار (۳٦/٦۳ درصد) را در کاهش رشد رویشی کلونی قارچ *M. anisopliae* در میان سایر اسانس‌ها داشته است. در بین اسانس‌های گیاهی مورد استفاده تفاوت معنی‌داری بر میزان تولید کنیدیوم مشاهده نمی‌شود (جدول ۲).

Table 2- Conidial germination (mean ± standard error), colony growth (mean ± standard error) and conidial number (mean) of fungi isolated *Metarhizium anisopliae* V 245 with different treatments at a temperature of 1 ± 27 degrees Celsius and a photoperiod of 12 hours light and 12 hours darkness.

Treatment	Conidial germination		Growth of colonies		Conidial numbers per colony	
	Percent	Percent	Centimeter	Percent	number× 10^7	Percent
The control	92.67±1.20 a*	-	6.36±0.03 a	-	2.21±10^7 a	-
Mentha spicata	67.67±0.88 bc	+26.97	4.86±0.12 c	+23.58	0.86±10^7 b	+61.08
Cuminum cyminum	63.33±0.88 c	+31.66	4.03±0.12 bc	+36.63	0.75±10^7 b	+66.06
Citrus aurantifolia	72.67±0.88 b	+21.58	5.06±0.03 b	+20.44	0.91±10^7 b	+58.82

*Statistically significant difference in the level of one percent.

اسانس گیاهان زیره سبز، نعناع و لیمو ترش به‌ترتیب بیش‌ترین تأثیر منفی را بر رشد میسلیومی، درصد جوانه‌زنی و میزان تولید کنیدیوم قارچ *B. bassiana* داشته‌اند. با این وجود اسانس گیاه زیره سبز با کاهش ٤١/٠٦ درصدی رشد میسلیومی، کاهش ٢٥/٦٨ درصدی میزان جوانه‌زنی و اسانس گیاه نعناع با کاهش ٤٤/٠٦ درصدی میزان تولید کنیدیوم بیش‌ترین تأثیر منفی را روی قارچ ذکر شده داشته‌اند. اسانس هر سه گیاه مورد آزمایش موجب کاهش درصد رشد رویشی کلونی، درصد تعداد کنیدیوم و درصد جوانه‌زنی کنیدی‌ها نسبت به شاهد شدند، ولی اختلاف معنی‌داری بین میزان بازدارندگی و کاهش در بین اسانس‌ها دیده نشد (جدول ٣).

Table 3- Conidial germination (mean ± standard error), colony growth (mean ± standard error) and conidial number (mean) of fungi isolated *Beauveria bassiana* BEH with different treatments at a temperature of 1 ± 27 degrees Celsius and a photoperiod of 12 hours light and 12 hours darkness.

Treatment	Conidial germination		Growth of colonies		Conidial numbers per colony	
	Percent	Percent	Centimeter	Percent	number× 10^7	Percent
The control	97.33±0.88 a*	-	4.03±0.08 a	-	11.80±10^7 a	-
Mentha spicata	76±1.01 b	+21.91	3.10±0.17 b	+30.41	6.60±10^7 b	+44.06
Cuminum cyminum	72.33±1.20 b	+25.68	3.23±0.06 b	+41.06	6.70±10^7 b	+43.22
Citrus aurantifolia	80.33±1.85 b	+17.46	3.33±0.06 b	+25.28	7.20±10^7 b	+38.98

*Statistically significant difference in the level of one percent.

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از گروه‌های آفت‌کش‌های زیستی که در حال حاضر به طورگسترده‌ای در سطح جهان در حال کاربردی شدن است، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی هستند (Katooli *et al*., 2011). اسانس‌های گیاهی و آفت‌کش‌های شیمیایی جدید می‌توانند مراحل مختلف رشد و نمو قارچ‌های بیمارگر حشرات را تحت تأثیر قرار دهند (Asi *et al*., 2010). نتایج تحقیق حاضر با نتایج مطالعات انجام گرفته توسط هیروس و همکاران (٢٠٠١) و همچنین آلوارز کاستیلانوس و هم‌کاران (٢٠٠١) به لحاظ تاثیر اسانس‌های مختلف بر رشد میسلیومی و جوانه‌زنی و تولید کنیدیوم مطابقت دارد (Hirose *et al*., 2001; Alvares-Castellanos *et al*., 2001). نتایج تحقیق این محققین نشان داد که با افزایش غلظت مواد شیمیایی میزان رشد میسلیومی قارچ‌های بیمارگر به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. قارچ‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر، در برابر اسانس‌های گیاهی به‌لحاظ رشد میسلیومی و جوانه‌زنی و تولید کنیدیوم، با هم اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد داشتند. با افزایش غلظت‌های اسانس‌های مورد بررسی، درصد مهار رشد میسلیوم در قارچ‌های مورد مطالعه افزایش نیافت.

مشاهده می‌شود که بین درصد مهار رشد میسلیومی قارچ و میزان تولید کنیدیوم رابطه مستقیمی وجود دارد، به‌طوری‌که با کاهش رشد میسلیومی کلنی میزان تولید کنیدیوم در هر تشتک‌پتری به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های هیروس و هم‌کاران (٢٠٠١) مطابقت دارد (Hirose *et al*., 2001). طبق نظر این افراد با افزایش غلظت روغن چریش میزان رشد میسلیومی قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *M. anisopliae* به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته و با کاهش رشد میسلیومی از میزان تولید کنیدیوم در هر کلنی به طور معنی‌داری کاسته می‌شود. در بین قارچ‌های مورد مطالعه در این تحقیق، قارچ بیمارگر *M. anisopliae* مقاوم‌ترین گونه و قارچ‌های بیمارگر *L. longisporum* و *B. bassiana* حساس‌ترین گونه‌ها در

برابر اسانس‌های گیاهی مورد استفاده بودند. نتایج به دست آمده از این پژوهش با نتایج هیروس و همکاران (۲۰۰۱) که گونه قارچ *B. bassiana* را حساس‌ترین گونه در برابر روغن چریش معرفی نموده‌اند، مغایرت دارد (Hirose *et al*., 2001). گریفن (۱۹۹٤) مشاهده نمود که اثر بسیاری از مواد شیمیایی آفت‌کش بر رشد میسلیومی قارچ‌ها پس از گذشت زمان کاهش می‌یابد (Griffin, 1994). یکی از جنبه‌های مهم در سازگاری بین قارچ‌های بیمارگر حشرات و موادی که به عنوان آفت‌کش مورد استفاده قرار می‌گیرند، میزان درصد جوانه‌زنی کنیدیوم می‌باشد (Hirose *et al*., 2001; Neves *et al*., 2001). دلیل اهمیت این موضوع به‌خاطر سیستم و عملکرد قارچ‌ها در ایجاد بیماری است، زیرا اولین قدم برای ایجاد آلودگی و تشکیل اپیدمی توسط قارچ‌های بیمارگر با جوانه‌زنی کنیدیوم آن‌ها صورت می‌گیرد (Oliveira *et al*., 2003).

آگودا و هم‌کاران (۱۹۸٦) و گونزالس و هم‌کاران (۱۹۹٦) گزارش نمودند که روغن چریش تأثیر منفی بر رشد میسلیومی و میزان جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ *M. anisopliae* داشته است (Aguda *et al*., 1986; Gonzalez *et al*., 1996). بورگیو و همکاران (۲۰۰۸) اثر اسانس *Ocimum sanctum* را بر روی قارچ بیمارگر *M. anisopliae* مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها اعلام نمودند که اسانس استخراج شده از برگ و ریشه گیاه *O. sanctum* سازگاری قابل ملاحظه‌ای با قارچ مورد نظر داشته و می‌توان آن‌ها را به طور هم زمان جهت کنترل آفات در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات به کار برد (Borgio *et al*., 2008).

در نهایت با توجه به نتایج باید بیان نمود که از اختلاط قارچ‌ها با اسانس‌های گیاهی در کنترل آفات می‌توان استفاده نمود اما باید قبل از این استفاده از اثرات اسانس روی قارچ به لحاظ رشد میسلیومی و جوانه‌زنی و تولید کنیدیوم مطمئن شد، زیرا اگر میسلیوم و کنیدیوم قارچ رشد نکند، قارچ قدرت حمله و تاثیر خود روی آفات را از دست خواهد داد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که قارچ بیمارگر *M. anisopliae* به دلیل مقاومت بالا در برابر تاثیر اسانس‌های مورد مصرف قابلیت اختلاط با این اسانس‌ها را دارد اما قارچ‌های بیمارگر *L. longisporum* و *B. bassiana* به دلیل حساسیت بالا در برابر این اسانس‌ها نمی‌توانند در اختلاط با این اسانس‌ها برای کنترل تلفیقی آفات مورد استفاده قرار گیرند. هم‌چنین مشخص شد که اسانس *C. cyminum* و *C. aurantifolia* در مهار رشد میسلیومی و مهار جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ‌های مورد مطالعه، به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تأثیر را داشته‌اند.

References

Aguda, R. M., Rombach, M. C. and Shepard, B. M. 1986. Effect of "neem" oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. International Rice Research Newsletter. 11: 34-35.

Alizadeh, A., Samih, M. A. & Izadi, H. 2007. Compatibility of *Verticillium lecanii* (Zimm.) with several pesticides. Communication in Agricultural and Applied Biological Science. 72(4), 1011-1015. (In Farsi).

Alvares-Castellanos, P. P., Bishop, C. D. and Pascual-Villaobos, M. J. 2001. Antifungal activity of the essential oil of flower heads of garland Chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. Phytochem. 57: 99-102.

Asi, M. R., Bashir, M. H., Afzal, M., Ashfaq, M. and Sahi, S. T. 2010. Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* with selective insecticide. Pakistan Journal of Botany. 42(6): 4207-4214.

Aslan, İ., Özbek, H., Çalma, Ö. & Sahin, F. 2004. Toxicity of essential oil vapors to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. Industrial Crops and Products. 19, 167–173.

Borgio, J. F., Bency, B. J. and Sharma, N. 2008. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. with *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) (Lamiaceae) Extracts. Ethnobotanical Leaflets. 12: 698-704.

Chaubey, M. K. 2008. Toxicity of essential oils from *Cuminum cyminum* (Umbelliferae), *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Foeniculum vulgare* (Umbelliferae) against stored-product beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 1719- 1727.

Duarte, A., Menendez, J. M. and Triguero, N. 1992. Estudio preliminary sobre la compatibilidad de *Metarhizium anisopliae* com algunos plaguicidas quimicos. Revista Baracoa. 22: 31-39.

Gonzalez, D. M. E., Valbuena, P. B. F., Rivera, M. A., Bustillo, P. A. E. and Chaves, B. 1996. Viabilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* en mezcla con agroquimicos, Revista Colombiana de Entomologia. 22: 31-36.

Griffin, D. H. 1994. Fungal Physiology. 2nd ed. Wiley-Liss, New York, USA.

Hirose, E., Neves, P. M. O. J. Zequi, J. A. C. Martins, L. H. Peralta, C. H. and Moino, J. A. 2001. Effect of biofertilizers and Neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. Brazilian Archives of Biology and Technology. 44(4): 419-423.

James, R. R. & Elzen, G. W. 2001. Antagonism between *Beauveria bassiana* and imidaclopridae when combinated for *Bemisia argentifolii* (Hom.: Aleyrodidae) control. Journal of Economic Entomology. 94, 357-361.

Jeong, J. K. and Kyu, C. K. 2007. Compatibility of Entomopathogenic fungus *Lecanicillium attenuatum* and Pesticides to control Cotton Aphid, *Aphis gossypii*. International Journal of Industrial Entomology. 14(2): 143-146.

Katooli, N., Maghsodlo, R. and Razavi, S. E. 2011. Evaluation of eucalyptus essential oil against some plant pathogenic fungi. Journal of Plant Breeding and Crop Science. 3(2): 41-43.

Lacey, L. A., Horton, D. R., Chauvin, R. L. & Stocker, J. M. 1999. Comparative efficacy of *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, and aldicarb for control of Colorado potato beetle in an irrigated desert agroecosystem and their effects on biodiversity. Entomologia Experimentalis ET Application. 93(2), 189-200.

Lentz, D. L., Clark, A. M. Hufford, C. D. Grimes, B. Passreiter, C. M. Cordero, J. Ibrahimi, O. and Okunade, A. 1998. Antimicrobial properties of Hunduran medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 63: 253-263.

Liu, C. H., Zou, W. X. Lu, H. and Tan, R. X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. Journal of Biotechnology. 88: 277-282.

Malo, A. R. 1993. Estudio sobre la compatibilidad hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Con formulaciones comerciales de fungicidas e insecticidas. Revista Colombiana de Entomologia.19: 151-158.

Moino, J. A. & Alves, S. B. 1998. Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. E no Comportamento de Limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 27, 611-619.

Neves, P. M. O. J., Hirose, E. Techujo, P. T. and Moino, J. A. 2001. Compatibility of entomopathogenic fungi with Neonicotinoid insecticides. Neotropical Entomology. 3: 263-268.

Oliveira, C. N., Neves, P. M. O. J. and Kawazoe, L. S. 2003. Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. Scientia Agricola. 60: 663-667.

Quintela, E. D. and McCoy, C. W. 1998. Synergistic Effect of Imidacloprid and Two Entomopathogenic Fungi on the Behavior and Survival of Larvae of *Diaprepes abbreviates* (Coleoptera: Curculionidae) in Soil. Journal of Economic Entomology. 91: 110-122.

SPSS. 1993. SPSS for Windows User's Guide Release 6. SPSS Inc. Chicago.

Wang, T. C., Si, L. S., Xu, K., & Tong, E. J. 2006. Aromatic plants repellant whiteflies as companion plants of tomato. ***Chinese vegetarian*.** 7, 21-22.

Journal of Entomological Research

Volume 5, Issue 4, pages: 334-343

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
www.entomologicalresearch.ir

Investigation on the effect of three medicinal plant essential oils on mycelia growth, conidia production and germination of three species of entomopathogenic fungi in laboratory conditions

Omid Panahi[1], Jafar Hosseinzadeh[*1], Seyed Ali Safavi[1], Hossein Farazmand[2]

1- Students Ex of MSc and Assistant Professor, Department of Entomology, Faculty of Agriculture Science, Urmia University, Urmia, Iran,
2- Associate Professor, Department of Agricultural Entomology, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

Abstract

Due to healthy and environmental hazards of chemical pesticides, it is important to change the methods in durable and Organic agriculture by using bio pesticides and essential oils. The effects of essential oils of three aromatic plants, *Mentha spicata*, *Cuminum cyminum* and *Citrus aurantifolia* was studied on mycelial growth, germination and conidial production rate of three entomopathogenic fungi *Lecanicillium longisporum*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. This study was done in a completely randomized design with five treatments (five concentrations of essential oils) and three replicates on SDA medium in 27±1°C. Results showed that *L. longisporum* and *B. bassiana* were the most susceptible with 41.06% colony growth prevention and *M. anisopliae* was the most resistant to the essential oils. Also the essential oil of *C. cyminum* with 41.06% had the most effect and *C. aurantifolia* with 20.44% had the least effect on mycelial growth. In concentration of 20 µl, the essential oils of *C. cyminum* and *C. aurantifolia* showed the most and the least preventive effect in conidial germination, respectively.

Key word: Essential oils, Entomopathogenic fungi, Nonchemical control and compatibility

[*] Corresponding Author, E-mail: *Jafar.entomologist@gmail.com*
Received:25 feb 2012 - Accepted:15 july 2013