بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی

گروه گیاه‌پزشکی

(گرایش حشره‌شناسی کشاورزی)

اثر ایمیداکلوپرید و نماتودهای بیمارگر حشرات، *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda : Heterorhabditidae) **و** *Steinernema carpocapsae* (Nematoda : Steinernematidae) **روی زنبور برگ‌خوار رز** *Arge ochropus* (Hymenoptera : Argidae)

از:

هادی شیخ‌نژاد

استاد راهنما:

دکتر محمد قدمیاری

استادان مشاور:

دکتر جواد کریمی و دکتر سالار جمالی

دی ۹۲

تقدیم به

آنان که وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر. توانشان رفت تا به توانایی برسم. آنان که فروغ نگاهشان، گرمی کلامشان سرمایه جاویدان زندگی من است.

اسطوره های زندگیم، پناه خستگی ام و امید بودنم

پدر و مادر عزیزم

سپاس بی‌کران پروردگار یکتا را که هستی‌مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمودمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

گذراندن مراحل اجرایی و تدوین این پایان نامه پس از الطاف الهی مدیون راهنمایی و همفکری بزرگوارانی است که بی تردید بدون همراهی آنان طی این طریق با مشکلات فراوانی همراه بود، لذا بر خود لازم می دانم مراتب سپاس خود را به کلیه کسانی که در مراحل مختلف این پژوهش مرا یاری نمودند، اعلام دارم.

تحت از خانواده عزیز، پدر و مادر دلسوز و مهربانم که همواره مشوق من در کسب مدارج علمی بوده اند تقدیر و تشکر می کنم.

از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر محمد قدمیاری که با صبر و شکیبایی راهنمایی های اینجانب را در انجام این پایان نامه بر عهده داشتند کمال تشکر و قدردانی را دارم. از استادان مشاور گرامی، دکتر جواد کریمی و سالار حمالی که در طول این تحقیق مرا از نظرات خود بهره مند نمودند کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر احد صحرا گرد و آقای دکتر رضا حسینی که زحمت باز خوانی متن و داوری این پایان نامه را متقبل شدند صمیمانه سپاسگزارم. هم چنین از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر محسن زواره سپاسگزارم.

از کلیه اساتید محترم گروه گیاهپزشکی، جناب آقای دکتر جلیل حاجی زاده، دکتر جلال جلالی سندی و دکتر آرش زیبایی که افتخار شاگردی شان را داشته ام تشکر و قدردانی می کنم.

از تمامی دوستان عزیزم به ویژه آقایان سید محمد عادلی (سید آل نبی)، محسن شمسی و حسام امینی و خانم ها سودابه امینی، محبوبه شریفی، نرگس معماری زاده، جمیله الوندی و شکوفه کمالی که مرا در این راه یاری نمودند، بسیار سپاسگزارم و همواره روزهایی سرشار از موفقیت و سربلندی برایشان آرزومندم.

هادی شیخ نژاد

دی ۱۳۹۲

عنوان..... صفحه
چکیده فارسی ..... د
چکیده انگلیسی..... ذ
مقدمه..... ۲
فصل اول: کلیات و مرور منابع ۴
۱-۱- معرفی زنبور برگ‌خوار رز *Arge ochropus* Gmelin1790 وخسارت اقتصادی..... ۵
۱-۲- کنترل زنبور برگ‌خوار رز..... ۶
۱-۳- نماتودهای بیمارگر حشرات..... ۶
۱-۳-۱- تاریخچه رده بندی نماتودهای بیمارگر حشرات..... ۸
۱-۳-۲- زیست شناسی نماتودهای بیمارگر..... ۸
۱-۳-۳- باکتری‌های همزیست نماتودهای بیمارگر حشرات..... ۱۰
۱-۳-۳-۱- رابطه همزیستی و بیماری‌زایی باکتری‌ها با نماتودهای بیمارگر حشرات..... ۱۰
۱-۳-۴- نماتودهای خانواده Steinernematidae ۱۲
۱-۳-۵- نماتودهای خانواده Heterorhabditidae ۱۳
۱-۳-۶- فرمولاسیون و تولید تجاری ۱۳
۱-۳-۷- پرورش و تکثیر نماتودها در موجودات زنده ۱۵
۱-۳-۸- روش‌های کاربرد نماتودهای بیمارگر حشرات در مبارزه بیولوژیک ۱۶
۱-۳-۸-۱- استفاده از نماتودهای بیمارگر در کود ۱۶
۱-۳-۸-۲- استفاده از نماتودهای بیمارگر روی شاخ و برگ گیاهان ۱۶
۱-۳-۸-۳- استفاده از نماتودهای بیمارگر در خاک ۱۷
۱-۳-۹- واکنش دفاعی حشرات به نماتودها ۱۷
۱-۳-۱۰- سینرژیستی نماتودها و آفت‌کش‌ها ۱۸
۱-۳-۱۱- حشره کش ایمیداکلوپرید ۱۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۲۱

۲-۱- جمع آوری لارو زنبور برگ‌خوار رز ۲۲

۲-۲- پرورش زنبور برگ‌خوار رز در آزمایشگاه ۲۲

۲-۳- پرورش پروانه موم‌خوار بزرگ ۲۲

۲-۴- نماتودهای بیمارگر ۲۲

۲-۴-۱- تکثیر نماتودهای بیمارگر ۲۳

۲-۵- آزمون‌های زیست‌سنجی ۲۳

۲-۵-۱- زیست‌سنجی توسط نماتودهای بیمارگر ۲۳

۲-۵-۲- زیست‌سنجی ایمیداکلوپرید ۲۵

۲-۵-۳- زیست‌سنجی ایمیداکلوپرید به‌همراه نماتودهای بیمارگر ۲۵

۲-۶- آزمون‌های پاسخ ایمنی ۲۶

۲-۶-۱- تلقیح نماتودها و پروسه‌ی کپسوله شدن ۲۶

۲-۶-۲- شمارش کلی سلول‌ها ۲۶

۲-۷- آزمون‌های بیوشیمیایی ۲۷

۲-۷-۱- اندازه‌گیری غلظت پروتئین کل ۲۷

۲-۷-۲- اندازه‌گیری فعالیت استرازی ۲۷

۲-۷-۳- اندازه‌گیری فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز ۲۸

۲-۷-۴- اندازه‌گیری فعالیت میزان لیپید و کربوهیدرات ۲۸

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری ۲۹

فصل سوم: نتایج و بحث ۲۹

۳-۱- اثر نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* ۳۲

۳-۲- اثر ایمیداکلوپرید روی *Arge ochropus* ۳۶

۳-۳- اثر تلفیقی ایمیداکلوپرید و نماتودهای بیمارگر *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* ۳۷

۳-۳-۱- تلفیق LD_{30} ایمیداکلوپرید همراه *S. carpocapsae* و *H. bacteriophora* ۳۷

۳-۳-۲- تلفیق LD_{50} ایمیداکلوپرید به‌همراه *S. carpocapsae* و *H. bacteriophora* ۳۷

۳-۴- بررسی اثر سینرژیسمی، افزایشی و یا آنتاگونیسمی تلفیق ایمیداکلوپرید با دو نماتود*S. carpocapsae* و *H. bacteriophora* ۳۹

۳-۵- برهمکنش سلول‌های خونی *A. ochropus* با نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* ۴۴

۳-۶- تاثیر نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae*، ایمیداکلوپرید و تلفیق آنها بر ذخایر انرژی (پروتئین، کربوهیدرات و لیپید) لارو زنبور برگ‌خوار رز ۵۱

۳-۶-۱- تاثیر روی میزان لیپید کل ۵۱

۳-۶-۲- تاثیر روی میزان کربوهیدرات ۵۲

۳-۶-۳- تاثیر روی میزان گلیکوژن ۵۳

۳-۶-۴- تاثیر بر مقدار پروتئین کل ۵۴

۳-۶-۵- اثرات تیمارنماتدها، سم ایمیداکلوپرید وترکیب آن‌ها روی فعالیت آنزیم‌های استرازی و گلوتاتیون اس ترانسفراز ۵۵

۳-۶-۵-۱- تاثیر روی فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز ۵۶

۳-۶-۵-۲- تاثیر روی فعالیت آنزیم استراز ۵۷

نتیجه‌گیری کلی ۶۰

پیشنهادها ۶۱

ضمائم ۶۲

منابع ۶۶

شکل ۲-۱- تکثیر نماتودها در *Galleria mellonella* روی تله وایت ۲۳

شکل ۲-۲- ظروف ۲۴ خانه‌ای جهت تست‌های مقدماتی نماتودها ۲۴

شکل ۳-۲- چگونگی تعیین اثرات سینرژیسمی، افزایشی و آنتاگونیستی ۳۰

شکل ۳-۱- خطوط دز - پاسخ نماتود *H. bacteriophora* علیه لارو سن پنجم زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus* ۳۲

شکل ۳-۲- خطوط دز - پاسخ نماتود *S. carpocapsae* علیه لارو سن پنجم زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus* ۳۳

شکل ۳-۳- لاروهای آلوده شده به *S. carpocapsae* و *H. bacteriophora* ۳۴

شکل ۳-۴- خطوط دز - پاسخ حشره‌کش ایمیداکلوپرید علیه لارو سن پنجم زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus*..... ۳۶

شکل ۳-۵- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر میزان مرگ و میر زنبور برگ‌خوار رز ۳۹

شکل ۳-۶- تشخیص لاروهای عفونت‌زای، *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* در هموسیت‌های لارو زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus* ۴۵

شکل ۳-۷- مقایسه واکنش هموسیت‌های لارو زنبور برگ‌خواز رز به دو نماتود *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* ۱۸ تا ۲۴ ساعت بعد از تزریق ۴۶

شکل ۳-۸- مقایسه واکنش‌های سلولی لارو زنبور برگ‌خوار رز و پروانه موم‌خوار بزرگ با نماتود *H. bacteriophora* ۱۸ تا ۲۴ ساعت بعد از تزریق نماتود ۴۶

شکل ۳-۹- مقایسه واکنش‌های سلولی لارو زنبور برگ‌خوار رز و پروانه موم‌خوار بزرگ با نماتود *S. carpocapsae* ۱۸ تا ۲۴ ساعت بعد از تزریق نماتود ۴۷

شکل ۳-۱۰- شمارش کلی سلول‌ها در لارو زنبور برگ‌خوار رز و پروانه موم‌خوار بزرگ بعد از تزریق هردو نماتود در بازه‌های زمانی مختلف ۴۸

شکل ۳-۱۱- میزان لیپید در لاروهای زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus* بعد از تیمار با LD_{50}ی ایمیداکلوپرید، LDهای نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* و تلفیق آنها ۵۲

شکل ۳-۱۲- میزان گلوکز در لاروهای زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus* بعد از تیمار با LD_{50}ی ایمیداکلوپرید، LDهای نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* و تلفیق آنها ۵۳

شکل ۳-۱۳- میزان گلیکوژن در لاروهای زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus* بعد از تیمار با ایمیداکلوپریدLD_{50} ، نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* و تلفیق آنها ۵۴

شکل ۳-۱۴- میزان پروتئین در لاروهای زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus* بعد از تیمار با LD_{50}ی ایمیداکلوپرید ، نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* و تلفیق آنها ۵۵

شکل ۳-۱۵- میزان گلوتاتیون اس-ترانسفراز در لاروهای زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus* بعد از تیمار با ایمیداکلوپرید LD_{50}، نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* و تلفیق آنها ۵۶

شکل ۳-۱۶- میزان آلفا-نفتیل استرازها در لاروهای زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus* بعد از تیمار با ایمیداکلوپریدLD_{50} ، نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* و تلفیق آنها ۵۸

شکل ۳-۱۷- میزان بتا-نفتیل استرازها در لاروهای زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus* بعد از تیمار با ایمیداکلوپریدLD_{50} ، نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* و تلفیق آنها ۵۸

جدول ۲-۱- میزان LCهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* با حدود اطمینان ۹۵ درصد ۲۵

جدول ۲-۲- میزان LDهای ایمیداکلوپرید با حدود اطمینان ۹۵ درصد ۲۵

جدول ۳-۱- واکنش لاروهای سن ۵ زنبور برگ‌خوار رز به *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* و برآورد LCهای (نماتود بر لارو) مورد نیاز برای آزمایش تلفیق آفت‌کش و نماتد ۳۲

جدول ۳-۲- درصد مرگ و میر اصلاح شده لاروهای سن ۵ زنبور برگ‌خوار رز در LCهای مختلف نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. Carpocapsae* ۳۳

جدول ۳-۳- واکنش لاروهای سن ۵ زنبور برگ‌خوار رز به ایمیداکلوپرید و برآورد LC_{30} و LC_{50} برحسب پی پی ام..... ۳۶

جدول ۳-۴- درصد مرگ و میر اصلاح شده توسط ایمیداکلوپرید ۳۷

جدول ۳-۵- درصد مرگ و میر اصلاح شده تلفیق دو گونه نماتود با LD_{30} ایمیداکلوپرید ۳۷

جدول ۳-۶- درصد مرگ و میر اصلاح شده تلفیق دو گونه نماتود با LD_{50} ایمیداکلوپرید ۳۸

جدول ۳-۷- اثر سینرژیسمی و افزایشی، تلفیق ایمیداکلوپرید با دو نماتود *S. carpocapsae* و *H. bacteriophora*.. ۴۰

جدول ۳-۸- واکنش‌های سلولی *A. ochropus* و *G. mellonella* در مقابل نماتودهای بیمارگر حشرات *S. carpocapsae* و *H. bacteriophora* از ۳۰دقیقه تا ۲۴ ساعت بعد از تزریق..... ۴۵

چکیده

اثر ایمیداکلوپراید و نماتودهای بیمارگر حشرات، *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda : Heterorhabditidae) و *Steinernema carpocapsae* (Nematoda : Steinernematidae) روی زنبور برگ‌خوار رز *Arge ochropus* (Hymenoptera : Argidae)

هادی شیخ‌نژاد

در این تحقیق اثر کشندگی ایمیداکلوپرید و بیماری‌زایی نماتودهای *Heterorhabditis bacteriophora* و *Steinernema carpocapsae* روی زنبور برگ‌خوار رز (*Arge ochropus*) در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی (دمای ۲± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰± ۷۰ و دوره نوری ۸ : ۱۶ ساعت (تاریکی : روشنایی)) تعیین شد. همچنین کاربرد توام دُزهای زیر کشنده ایمیداکلوپرید با غلظت‌های مختلفی از این دو نماتود روی لارو این آفت بررسی شد. براساس آزمون‌های زیست‌سنجی مقدار LCهای ۱۰، ۲۵، ۳۰، ۵۰ و ۷۵ برای نماتود *S. carpocapsae* برابر ۵، ۹، ۱۱، ۲۱ و ۴۶ نماتود بر لارو و برای *H. bacteriophora* برابر با ۳، ۸، ۱۱، ۳۲ و ۱۳۰ نماتود بر لارو تخمین زده شد. همچنین مقدار LD_{30} و LD_{50} برای ایمیداکلوپرید به‌ترتیب ۵/۶۵ و ۹/۶۳ پی‌پی‌ام برآورد شد. لارو سن ۵ آفت حساسیت بالایی به هر دو نماتود و ایمیداکلوپرید نشان داد و درصد مرگ‌ومیر با افزایش دز هر یک از دو عامل کشنده، افزایش یافت. براساس LCهای به‌دست آمده برای هر یک از نماتودها، می‌توان نتیجه گرفت که، زهرآگینی *S. carpocapsae* نسبت به *H. bacteriophora* روی لارو آفت بیشتر است. در ترکیب نماتودها و ایمیداکلوپرید، اثر بخشی و مرگ‌ومیر معنی‌دار، نسبت به زمانی‌که به تنهایی بکار برده شدند، مشاهده شد. در تلفیق این دو عامل اثرات سینرژیستی و افزایشی در نرخ مرگ‌ومیر زنبور برگ‌خوار رز ثبت شد، به‌طوری‌که میزان مرگ‌ومیر درغلظت LD_{30}ی ایمیداکلوپرید ۳۹٪ و LC_{50}ی نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* به‌ترتیب ۵۵٪ و ۵۸٪ بود، در حالی‌که در ترکیب ایمیداکلوپرید با این دو غلظت از نماتودها، میزان مرگ‌ومیر به‌ترتیب به ۸۸٪ و ۹۸٪ رسید. در این تحقیق هیچ اثر آنتاگونیستی بین تیمارهای تلفیق شده، مشاهده نشد. همچنین در این تحقیق اثر این نماتودها روی پاسخ سلولی ایمنی و تلفیق حشره‌کش و نماتود روی برخی از پارامترهای بیوشیمیایی و ذخایر انرژی این آفت نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان چربی، کربوهیدرات و گلایکوژن در لاروهای تیمار شده با حشره‌کش ایمیداکلوپرید، نماتودهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* و تلفیق آنها، با افزایش غلظت نماتودها و نماتود+ایمیداکلوپرید کاهش می‌یابد. نتایج واکنش‌های سلولی لارو*A. ochropus* به این دو نماتود نشان دهنده‌ی یک پاسخ ایمنی قوی از جانب لارو این آفت در برابر *H. bacteriophora* بود، در صورتی‌که این واکنش‌ها برای *S. carpocapsae* ضعیف بود که این امر خود یکی از دلایل سینرژیسم کمتر تلفیق *H. bacteriophora* با ایمیداکلوپرید است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که *S. carpocapsae* توانایی بیشتری در غلبه بر سیستم دفاعی میزبان دارد.

واژه‌های کلیدی : ایمیداکلوپرید، پاسخ ایمنی، سینرژیسم، زنبور برگ‌خوار رز و نماتودهای بیمارگر حشرات

Abstract

Effect of imidacloprid and entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* on the rose sawfly, *Arge ochropus* (Hym. : Argidae)

Hadi Sheykhnejad

In this study, the lethal effects of imidacloprid and pathogensities of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* were determined on rose sawfly larvae, *Arge ochropus* in laboratory conditions (25±2ºC, 70±10% R.H. and 16 light: 8 dark hours). The concomitant uses of sublethal doses of imidacloprid with different concentrations of both nematodes on this pest were also investigated. Based on bioassay tests, the amount of LC_{10}, LC_{25}, LC_{30}, LC_{50} and LC_{75} for *S. carpocapsae* were 5, 9, 11, 21 and 46 and for *H. bacteriophora* were equal to 3, 8, 11, 32 and 130 nematodes per larvae. Also, the LD_{30} and LD_{50} values for imidacloprid were estimated as 5.65 and 9.63 ppm, respectively. Fifth instar larvae of *A. ochropus* showed high susceptibility to imidacloprid and entomopathogenic nematodes and the percentages of mortality was increased with increasing of dose of imidacloprid and nematodes. Based on the LC_s values for each nematode, it can be concluded that the *S. carpocapsae* is higher virulence than *H. bacteriophora*. Combination of nematodes and imidacloprid increased efficacy and mortality than when they used alone against *A. ochropus*. Synergistic and additive affects in rose sawfly mortality were recorded in combination of two agents. So that, mortalities of larvae treated with LD_{30} of imidacloprid and LC_{50}s of *H. bacteriophora* and *S. carpocapsae* were 39, 55 and 58%, respectively, while, the combination of imidacloprid with nematodes increased mortality by 88% and 98%, respectively. No antagonistic effects were observed in combination of imidacloprid with nematodes in this investigation. The effects of these nematodes were also evaluated on immune cellular response and their combination with imidacloprid on some biochemical parameters and energy reserves of this pest. As concentrations of imidacloprid and entomopathogenic nematods increase, the lipid, crbohydrate and glycogen contents in the treated larvae with imidacloprid, *H. bacteriophora* and *S. carpocapsae* and their combination with imidacloprid decreased. The results of cellular reactions of rose sawflye larvae to these nematodes showed strong immune responses against *H. bacteriophora*, while these reactions weaked for *S. carpocapsae*. So, this is one of the reasons for less synergistic combination of *H. bacteriophora* with imidacloprid. Therefore, it can be concluding that *S. carpocapsae* has more ability to overcome the host defense system.

Key words: Entomopathogenic nematodes, Imidacloprid, Immune response, Rose sawfly, Synergism

مقدمه

زنبور برگخوار رز[۱] *Arge ochropus* (Gmelin, 1790) یکی از آفات مهم گیاهان زینتی از جمله انواع رز و رزهای وحشی (نسترن) و گل محمدی در شمال کشور است. این آفت به دلیل داشتن نرخ باروری بالا در مدت کوتاهی خسارت غیر قابل تحملی به گیاهان وارد می کند. نحوه‌ی خسارت آفت به شکلی است که لاروها ابتدا به صورت دسته جمعی از برگ و غنچه گل‌ها می‌خورند و در مراحل بعدی به شکل پراکنده و انفرادی روی برگ‌های میزبان تغذیه می‌کنند.در اثر شدت حمله آفت، سرشاخه‌های انتهایی عاری از برگ شده و خسارت قابل ملاحظه‌ای به اندام‌های گل‌دهنده، وارد می‌شود [صحراگرد و حیدری، ۱۳۸۰]. این حشره در استان‌های گیلان، مازندران و گلستان فعالیت دارد.

ایمیداکلوپرید، حشره‌کشی نئونیکوتینوئیدی و سیستمیک است. این حشره کش روی سیستم عصبی مرکزی حشرات اثر می‌گذارد. این ترکیب به منظور کنترل حشرات مکنده مثل زنجرک برنج، شته ها، تریپس ها، سفیدبالک‌ها، موریانه ها، حشرات خاک و چمن به کار می‌رود [Guan et al., 2010]. ایمیداکلوپرید، حشره‌کش طیف وسیع است که پتانسیل نابودی و کنترل آفات حشره‌ای چمن را دارد، اگر چه تاثیر به‌نسبت کمی روی بی‌مهرگان مفید دارد [کانکل و همکاران، ۱۹۹۹]. روش‌های شیمیایی می‌توانند عوارض جانبی مانند آلوده کردن خاک، محصولات کشاورزی و آب‌های آشامیدنی و غیرآشامیدنی را همراه داشته باشند. همچنین استفاده از سموم شیمیایی در دراز مدت و مقیاس وسیع می‌تواند باعث کاهش حشرات شکارگر، بیمارگرها، موجودات مفید خاک و سایر حشرات مفید شودکه این امر سبب افزایش وابستگی به کنترل شیمیایی می‌شود.

عوامل بیولوژیک نقش مهمی در کنترل آفات داشته و یکی از بازوهای مدیریت تلفیقی آفات می‌باشد. بنابراین بررسی کارایی عوامل بیوکنترل این آفت می‌تواند گامی مثبت برای کنترل آفات بوده و راه را برای تحقیقات بعدی هموار سازد. نماتودهای بیمارگر حشرات به‌دلیل داشتن دامنه میزبانی وسیع، توانایی کشتن میزبان در کوتاه مدت، ظرفیت بالای تکثیر در محیط‌های کشت و ذخیره آسان مرحله عفونی آن، به‌عنوان یک عامل کلیدی کنترل کننده جمعیت آفت به‌شمار می-آیند. این نماتودها در دهه اخیر به‌طور گسترده به‌عنوان آفت‌کش زیستی در کنترل بیولوژیک آفات بکار برده می شوند [Lacey and Kaya., 2007]، به‌طوری‌که به‌علت کاربرد آسان آن پس از *Bt*، بیشترین سهم را درصنعت تولید آفت‌کش بیولوژیکی به خود اختصاص داده‌اند [Gaugler et al., 1997]. از بین نماتودهایی که در مبارزه‌ی بیولوژیک حشرات مورد مطالعه بوده، به گونه‌های مربوط به دو جنس *Steinernema* و *Heterorhabditis* توجه بیشتری معطوف شده، چون دارای بسیاری از صفات موثر عوامل مبارزه بیولوژیکی می‌باشند.

[۱]. Rose sawfly

طی تحقیقات انجام شده به‌منظور کنترل تلفیقی نماتودهای بیمارگر حشرات با آفت‌کش‌ها، آفت‌کش‌های نئونیکوتینیدی[۱] بهترین عملکرد را با نماتودها نشان دادند و از میان این گروه از آفت‌کش‌ها، ایمیداکلوپرید دارای بیشترین سازگاری، بازده و اثر سینرژیستی را با نماتدهای بیمارگر حشرات نشان داده است. با توجه به استفاده از گیاهان رز در پارک‌ها و منازل به عنوان گیاه زینتی، کنترل شیمیایی این آفت با استفاده از آفت‌کش‌های سنتزی با محدودیت‌هایی همراه است. همچنین مسائل و مشکلات کنترل شیمیایی آفات در جهان، نگرش جدید در روش‌های مدیریت آفات را اجتناب ناپذیر کرده است. ازطرفی چنان‌چه آفت‌کش زیستی همانند آفت‌کش‌های شیمیایی به مقدار زیاد استفاده شود، ممکن است در جمعیت حشره آفت مقاوت ایجاد شود. در حقیقت، حشراتی که به بیمارگرها حساس هستند، می‌توانند به انواع آن‌ها مقاوم شده و این مقاومت به‌صورت مورفولوژیک، رفتاری، فیزیولوژیک، تغذیه‌ای و بیوشیمیایی ایجاد می-شود[Koppenhöfer et al., 2000b; Li et al., 2007]. به منظور جلوگیری از مقاومت آفات به سموم شیمیایی و عوامل میکروبی کنترل آفات و همچنین به‌دلیل محدودیت در استفاده گسترده از عوامل بیوکنترل علیه آفات و عدم ایجاد کنترل صد درصدی توسط این عوامل، ضرورت تلفیق کنترل بیولوژیک و شیمیایی مشخص می‌شود. به همین دلیل در این تحقیق اثر همزمان ایمیداکلوپرید و نماتدهای بیمارگر حشرات روی زنبور برگ‌خوار رز بررسی شد. تاکنون اثر ایمیداکلوپرید و نماتدهای بیمارگر حشرات روی زنبوران زیرراسته Symphyta مورد بررسی قرار نگرفته است، به همین دلیل در این تحقیق سعی شد تا اثرات زیرکشندگی ایمیداکلوپرید روی لاروهای زنبور برگ‌خوار رز مورد بررسی قرار گرفته و اثرات سینرژیستی غلظت‌های LC_{50} و LC_{30} این ترکیب با غلظت‌های مختلف نماتودهای *Heterorhabditis bacteriophora* Poinarو *Steinernema carpocapsae* Weiser نیز بررسی شود. هم‌چنین اثر این نماتودها روی پاسخ سلولی ایمنی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

[۱]. Neonicotinoids

کلیات و مرور منابع

۱-۱- معرفی زنبور برگ‌خوار رز *Arge ochropus* Gmelin 1790 و خسارت اقتصادی

زنبور برگخوار رز با نام علمی *Arge ochropus* Gmelin 1790 (Hymenoptera: Argidae) قرار دارد. در منابع مختلف نام‌های مترادفی برای این گونه از جمله *Arge rosae* Linnause 1758 و *Tenthredo ochropa* Gmelin 1790 ذکر شده است [Smith, 1989].

حشرات کامل به رنگ زرد طلایی است. در حشرات ماده تخمریز مشخص و در انتها سیاه رنگ است. حشرات ماده بزرگ‌تر از حشرات نر هستند. تخم‌ها زردرنگ، لاروها سبز تیره، دارای ۳ جفت پای سینه‌ای بلند و ۸ جفت پای شکمی کاذب هستند که ۵ جفت اول بلند، برجسته و مشخص و ۳ جفت دیگر به صورت لکه‌های برجسته و مودار دیده می‌شوند. شفیره داخل پیله ابریشمی پوشیده از ذرات ماسه و در خاک تشکیل می‌شود. حشرات کامل پس از خروج از شفیره‌های زمستانگذران جفت‌گیری کرده با ایجاد شکاف طولی در زیر پوست ساقه‌های جوان رز تخم‌ها را به صورت ردیفی در جهت طول ساقه قرار می‌دهند. حشرات ماده بدون جفت‌گیری و به صورت بکرزایی قادر به تخم‌ریزی هستند، اما نتاج آن همگی زنبورهای نر خواهند بود [صحراگرد و حیدری، ۱۳۸۰].طی نمونه‌برداری‌های انجام شده ۵ تا ۶ نسل از این حشره مشاهده شد.

زنبور برگ‌خوار رز یکی از مهم‌ترین آفات گیاهان زینتی از جمله انواع رز و رزهای وحشی (نسترن وحشی) در استان گیلان است. این آفت به دلیل داشتن نرخ باروری بالا در مدت کوتاهی خسارت غیر قابل تحملی به گیاهان وارد می کند [صحراگرد و حیدری، ۱۳۸۰].

نحوه‌ی خسارت آفت به شکلی است که حشرات ماده در بهار پس از خروج از شفیره‌های زمستان گذران جفت‌گیری کرده و با ایجاد شکافی به طول متوسط ۲۰ میلی‌متر در زیر پوست ساقه‌های جوان رز، تخم‌های زردرنگ خود را به تعداد ۱۰-۱۳ عدد در هر شکاف قرار می‌دهند. شکاف‌های تخم گذاری شده به رنگ قهوه ای تیره تا سیاه تغییر رنگ داده که یکی از علایم تشخیص آلودگی رز به آفت است. لاروها ابتدا به صورت دسته جمعی از برگ و غنچه گل‌ها می‌خورند و در مراحل بعدی به شکل پراکنده و انفرادی روی برگ‌های میزبان تغذیه می‌کنند. در اثر شدت حمله آفت، سرشاخه‌های انتهایی عاری از برگ شده و خسارت قابل ملاحظه‌ای به اندام‌های گل‌دهنده، وارد می‌شود [Wang et al., 1987].

بر اساس مطالعات انجام شده در استان گیلان فعالیت حشرات کامل از هفته اول اردیبهشت ماه به‌صورت پراکنده و انفرادی روی شاخ و برگ رز و نسترن مشاهده شده است. جمعیت لاروها در نسل های دوم و چهارم دارای بیشترین تراکم و در نسل های اول و سوم از تراکم کمتری برخوردار بود [صحراگرد و حیدری، ۱۳۸۰].

۱-۲- کنترل زنبور برگ‌خوار رز

زنبور برگ‌خوار رز اغلب با روش‌های مکانیکی (جمع آوری لاروها با دست) و حشره‌کش‌های شیمیایی کنترل می‌شود. اما تحقیقات نشان داده است که استفاده از حشره‌کش‌ها ، سمیت زیادی برای انسان و محیط زیست بوجود آورده و هم‌چنین اثر زیان‌باری روی میکروارگانیسم‌های مفید دارد [Talebi et al., 2011].

۱-۳- نماتودهای بیمارگر حشرات

نماتودها یا کرم های لوله‌ای از شاخه نماتودا[۱] ، نیز مانند سایر موجودات زنده در محیط زندگی خود با انواع مهره‌داران، بی مهرگان و موجودات زنده دیگر در ارتباط هستند. نماتودها تنها گروه انگل‌های پرسلولی حشرات هستند که در زمینه مبارزه میکروبی با آفات مطالعات وسیع و جامعی در مورد آن‌ها انجام گرفته است[به نقل از نصراصفهانی و احمدی، ۱۳۸۲] . انگلی بودن نماتودهای بیمارگر حشرات باعث شده تا اثرات مخرب و متغیری روی میزبان‌های خود داشته باشند. اثر نماتودها روی حشرات شامل عقیم شدن، کاهش باروری، کاهش طول عمر، تاخیر در تکامل یا عمل غیرطبیعی رفتاری، فیزیولوژیکی، مرفولوژیکی و در مواردی منجر به مرگ سریع میزبان می‌شود [Lacey and Kaya, 2007]. گونه‌ی نماتود *Paraiotonchium autumnale* Nickle برای مبارزه با مگس *Musca autumnalis* De Geer در ایالت غربی آمریکا به‌کار برده شده است. این نماتود جمعیت مگس را کاهش نمی‌دهد، بلکه رفتار مگس‌های آلوده تغییر یافته، به طوری‌که‌چنین مگس‌هایی بی ضرر می‌شوند. نماتود *Beddingia siricidicola* Bedding در استرالیا زنبور چوب *Sirex noctilio* Fabricius را کنترل و میزبان خود را عقیم می‌سازد و در نتیجه جمعیت آن را کاهش می‌دهد (به نقل از پورجعفری، ۱۳۹۰). در مطالعه انجام شده در سال ۱۳۹۱ نماتودهای بیمارگر *Heterorhabdtis bacteriophora* و *Steinernema carpocapsae* باعث بیماریزایی در مراحل نابالغ بید سیب زمینی شده و به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در مدیریت *Phthorimaea operculella* Zeller پیشنهاد شده است [حسنی کاخکی و همکاران، ۱۳۹۱]. یکی از خصوصیات نماتودهای بیمارگر حشرات این است که آن‌ها برخی ویژگی‌های شکارگری و بیمارگری را باهم دارند. به طور مثال، این نماتودها قادرند فعالانه به جستجوی شکار پرداخته و

۱. Nematoda

میزبان خود را مورد حمله قرار دهند. به طور کلی سرعت مرگ و میر میزبان در اثر حمله نماتودها بیشتر از آن است که رابطه میزبان و انگل به طور کامل شکل بگیرد. گاهی اوقات عوامل بیمارگر نظیر قارچها باعث کاهش فعالیت نماتودها می‌شود [به نقل از نصراصفهانی و احمدی ۱۳۸۲].

حدود ۴۰ گونه از نماتودها در ارتباط با حشرات هستند، اما گونه‌های نماتودهای بیمارگر متعلق به دو خانواده Steinernematidae و Heterorhabditidae از مهمترین نماتودهای بیمارگر آفات هستند [Rechcigl and Rechcigl, 2000]. این نماتودها می‌توانند از طریق نفوذ به هموسل باعث بیماری در آفات با خسارت اقتصادی شوند [Poinar, 1990]. این عوامل بیوکنترل می‌توانند به صورت فراورده‌های تجاری سال‌های متمادی بدون ایجاد خطر، بروز مشکل حاد، آلودگی محیطی، دوره کارنس و تهدید کمتر برای محیط زیست نسبت به سموم شیمیایی، به‌طور اختصاصی مورد استفاده قرار بگیرند [Ehlers and Hokkanen, 1996]. از دیگر عواملی که باعث شده تا آن‌ها به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرار گیرند، می‌توان دامنه میزبانی وسیع، توانایی کشتن میزبان در مدت کم، امکان پرورش در محیط‌های غذایی مصنوعی، امکان نگهداری در انبار با حفظ خاصیت آلوده سازی، عدم مقاومت در میزبان و بی ضرر بودن در محیط را نام برد. همانند سایر عوامل بیمارگر اکثر گونه‌های نماتود، محیط‌های سرد و مرطوب را برای زندگی ترجیح می‌دهند. به علاوه دامنه میزبانی نسبتا وسیع آن‌ها بیانگر آن است که با به‌کارگیری نماتودها ممکن است موجودات غیر هدف تحت تاثیر قرار بگیرند هرچند تاکنون اثر منفی آن‌ها بر میزبان‌های غیرهدف مشاهده نشده است [Koppenhofer, 2007]. برخی از مزایای نماتودهای بیمارگر حشرات عبارتند از کارایی بالا علیه بعضی حشرات خاکزی و سازگاری با آفت‌کش‌های شیمیایی. این بیمارگرها قادر به پیداکردن میزبان بوده و میزبان خود را به سرعت نابود کرده و از طریق روش‌های ژنتیکی مشخصات زیستی عوامل بیمارگر را می‌توان بهبود بخشید. نماتودهای بیمارگر معایبی نیز دارند که از آن جمله می‌توان به کوتاه بودن دوره ماندگاری، محدودیت تحمل به شرایط محیطی، نیاز به رطوبت و حرارت و حساسیت شدید به نور ماورای بنفش، دوام مزرعه‌ای ضعیف و گران قیمت بودن نماتودها در مقایسه با آفت‌کش‌های شیمیایی را نام برد[به نقل از نصراصفهانی و احمدی۱۳۸۲]. طی مطالعات انجام شده کوپنهوفر و همکاران [Koppenhöfer et al., 2008] که در آن از نماتودهای بیمارگر حشرات برای کنترل کرم سفید ریشه استفاده شد، گونه‌ی *S. scarabaei* Stock and Koppenhöfer به عنوان عامل بسیار موثر برای تنظیم جمعیت کرم سفید ریشه معرفی شد و اثر بیماری‌زایی گونه‌های دیگر نماتودها نیز مورد بررسی قرار گرفت. در کشور ژاپن نیز روی چند آفت از جمله *Popillia japonica* Newman اثر بیماری‌زایی نماتودهای بیمارگر آزمایش شد. در چین نیز مطالعات مشابهی انجام شده است [Gaugler, 2002]. در مطالعه‌ی دیگری عوامل بیولوژیک کنترل کننده

کرم سفید ریشه مورد بررسی قرار گرفته و در بین آن‌ها نماتودهای *S. glaseri* Steiner، *H. bacteriophora* و *S. kushidia* Mamiya با سموم شیمیایی قابل مقایسه بوده و می‌توان به‌عنوان جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی استفاده نمود [Koppenhöfer et al., 2000]. میزان کارایی نماتودهای گونه *H. bacteriophora* و *S. scarabaei* علیه دو گونه از کرم‌های سفید ریشه نیز مورد مقایسه قرار گرفت و گونه‌ی *S. scarabaei* اثر بیماری‌زایی بالاتری از خود نشان داد و مرگ و میر بسیار بالاتری را در لاروهای کرم سفید ریشه نشان داد [Cappaert and Koppenhöfer, 2003].

۱-۳-۱- تاریخچه رده‌بندی نماتودهای بیمارگر حشرات

استاینر[1] در سال ۱۹۲۳ اولین نماتود بیماریزای حشرات را با نام *Aplectana kraussei* Steiner گزارش کرد. تراواساس در سال ۱۹۲۷ این گونه را دوباره با نام *Steinernema* نامگذاری کرد (به نقل از پورجعفری، ۱۳۹۰). بیماریزایی این نماتود روی لاروهای سوسک ژاپنی *P. japonica* بررسی شد [Glaser and Fox, 1930].

نماتودهای بیمارگر حشرات که به صورت فراورده‌های تجاری در برنامه‌های کنترل بیولوژیک آفات نقش دارند، متعلق به راسته Rabditida که شامل دو خانواده Steinernematidae و Heterorhabditidae هستند. خانواده Steinernematidae شامل جنس *Steinernema* Travassos و ۶۵ گونه است [Travassos,1927]. خانواده Heterorhabditidae شامل جنس *Heterorhabditis* Poinar که دارای ۱۴ گونه می‌باشد [Poinar, 1975]. گونه‌های هر دو خانواده در طبیعت به عنوان بیمارگرهای اجباری عمل می‌کنند. در سال ۱۹۸۴ جنس جدیدی بنام *Neosteinernema* Nguyen and Smart به خانواده Steinernematidae اضافه شد [Nguyen and Smart, 1984].

شناسایی و بررسی نماتودهای بیمارگر حشرات در ایران از سال 2000 آغاز شد[پرویزی، ۱۳۷۹]. در سال ۱۳۸۳ دو گونه از خانواده Steinernematidae از خاک‌های استان تهران و مازندران گزارش شد [تنهامعافی و همکاران، ۱۳۸۳]. طی مطالعه‌ای در استان تهران روی لاروهای سنین مختلف کرم سفید ریشه *Polyphylla olivieri* Laporte که از مناطق مختلف جمع‌آوری شده بودند، ۸ جدایه از ۳ گونه از نماتودهای بیمارگر حشرات جداسازی و شناسایی شدند [Karimi and Kharazi, 2007].

۱-۳-۲- زیست شناسی نماتودهای بیمارگر

[1]. Steiner