بررسی بیمارگری دو گونه‌ی *Steinernema carpocapsae* و *Heterorhabditis bacteriophora* روی شب‌پره‌ی مینوز گوجه فرنگی، *Tuta absoluta*

فرزانه دامنی زمانی[۱]، سید محمد رضا موسوی[۱]، راحیل اسدی[۲]

۱- گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت

۲- گروه حشره‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت

مسئول مکاتبات: سید محمدرضا موسوی، پست الکترونیک: rmmoosavi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۴ ۳ (۱) ۱۹-۳۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۳/۲۳

چکیده

شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* یکی از آفات خطرناک مزارع گوجه‌فرنگی می‌باشد که در صورت طغیان تا ۱۰۰٪ محصول را از بین می‌برد. در این بررسی به نقش بیمارگری لاروهای سن سوم (IJs) دو گونه‌ی *Steinernema carpocapsae* و *Heterorhabditis bacteriophora* روی سنین مختلف لاروی آفت مذکور درون ظرف پتری و درون برگ‌های جدا شده‌ی گوجه‌فرنگی پرداخته شده و نماتد کارآمدتر انتخاب شد. توانایی گونه‌ی مؤثرتر در آلوده کردن لارو سن آخر و شفیره آفت در ظرف پتری (با سه غلظت ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ IJs نماتد در هر ظرف پتری) و حساسیت شفیره در خاک (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ IJs در هر سانتی‌متر مربع) مورد بررسی قرار گرفت. در گلخانه نیز توانایی گونه‌ی مؤثرتر در کنترل مراحل مختلف لاروی شب‌پره بررسی و با سم ایندوکساکارب (با غلظت یک در هزار) مقایسه شد. در آزمایشگاه توانایی نماتد *H. bacteriophora* در کنترل لارو آفت تقریباً ۱/۷ برابر *S. carpocapsae* بود و برای آزمایشات تکمیلی انتخاب گردید. تعداد ۵۰ IJs نماتد در هر پتری باعث مرگ ۸۴ درصد از لاروهای سن آخر آفت شد. بیشترین درصد مرگ و میر شفیره‌ها در ظرف پتری (۴۰٪) زمانی مشاهده شد که ۲۰۰ IJs نماتد در هر پتری استفاده گردید و جمعیت ۲۰۰ IJs/cm^2 باعث مرگ ۲۸٪ از شفیره‌های درون خاک گردید. افزایش جمعیت نماتد باعث افزایش درصد آلودگی شفیره‌ها شد. در شرایط گلخانه‌ای، لاروهای سن چهار *T. absoluta* بیشترین حساسیت را نسبت به بقیه سنین لاروی نشان دادند و کاربرد سم تأثیر چندانی در کنترل این آفت نداشت. با توجه به نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد نماتد *H. bacteriophora* بتواند باعث کاهش خسارت شده و به مهار زیستی آفت منتهی گردد.

واژه‌های کلیدی: شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی، کنترل بیولوژیک، نماتد بیمارگر حشرات، آوانت

مقدمه

شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی، *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) یکی از خطرناک‌ترین آفات گیاهی شناخته شده است که به میزبان‌های مختلفی حمله می‌کند. مهمترین میزبان این آفت که خسارت زیادی به آن وارد می‌شود، گوجه‌فرنگی است، اما گیاهان دیگری مانند سیب‌زمینی، بادمجان، توتون و لوبیا نیز مورد حمله قرار می‌گیرند (Urbaneja *et al.*, 2013). لاروهای این آفت با حفر تونل دراندام‌های هوایی گیاه، از بافت پارانشیمی تغذیه کرده و خسارت‌های شدیدی را موجب می‌شوند. ترجیح غذایی لاروها، بافت برگ و میوه‌ی گیاه گوجه‌فرنگی است اما از ساقه، جوانه و گل نیز تغذیه نموده (Desneux *et al.*, 2010) و در صورتی که هیچ اقدام کنترلی انجام نشود، تا ۱۰۰٪ محصول را از بین می‌برند (Gabarra *et al.*, 2014; Terzidis *et al.*, 2014).این آفت هم‌اکنون یکی از تهدیدهای اصلی تولید گوجه‌فرنگی در گلخانه‌ها و مزارع دنیا محسوب شده و این توانایی را دارد که در آینده میزان تولید سالانه گوجه‌فرنگی را به‌شدت کاهش دهد (Desneux *et al.*, 2011).

در حال حاضر کنترل این آفت به‌طور عمده از طریق استفاده مکرر از حشره‌کش‌های شیمیایی می‌باشد، هرچند که استفاده‌ی پیاپی از این ترکیبات نیز به‌دلیل پنهان بودن لاروها در تونل‌های حفر شده در بافت گیاهی و مقاوم شدن حشره، با موفقیت کامل همراه نیست (Lietti *et al*., 2005). آفت کش‌های شیمیایی ایندوکساکارب و کلرپیریفوس طلایی از جمله سمومی هستند که در استان فارس و بوشهر علیه این آفت استفاده می‌شوند، هرچند استفاده از ایندوکساکارب بیشتر است (مشاهدات شخصی نگارندگان). استفاده گسترده از حشره کش‌های شیمیایی باعث آلودگی‌های فراوان زیست محیطی، کاهش امنیت غذایی انسان‌ها (Půža, 2015) و تأثیر سوء بر حشرات مفید و دشمنان طبیعی (Desneux *et al*., 2006, 2007; Arnó & Gabarra, 2011; Zappalà *et al*., 2012b) می‌شود. این موضوع باعث شده که محققان با جدیت به دنبال راه حل‌های جایگزین برای کنترل شیمیایی باشند (Moosavi & Zare, 2012; Moosavi & Askary, 2015). مهار زیستی یکی از راه‌هایی است که امید زیادی به آن بسته شده است و پژوهشگران امیدوارند که بتوانند به کمک این نوع روش قدم‌های مهمی را در راستای کشاورزی پایدار برداشته و میزان مصرف آفت‌کش‌های سموم شیمیایی در کنترل آفت مینوز گوجه‌فرنگی را به حداقل برسانند. کنترل زیستی آفات توسط نماتدهای بیمارگر حشرات یکی از موضوعاتی است که در دهه‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب نموده است (Hunt, 2007; Půža, 2015). گونه‌هایی از نماتدهای متعلق به دو خانواده‌ی Steinernematidae و Heterorhabditidae از اکثر نقاط دنیا گزارش شده (Hominick, 2002; Adams *et al*., 2006) و دارای توانایی بالایی در کنترل آفات هستند (Koppenhöfer, 2000; Sharma *et al*., 2011). از ویژگی‌های مطلوب نماتدهای بیمارگر حشرات می‌توان به مرگ سریع حشره، جستجوی میزبان، کاربرد آسان، تأثیر طولانی مدت، عدم تأثیر روی موجودات مفید و غیر هدف و قابلیت اختلاط با اکثر حشره‌کش‌ها اشاره کرد (Koppenhöfer & Kaya, 2002; Vashisth *et al*., 2013). بیشترین موارد موفقیت این نماتدها در کنترل آفات خاکزی است (Divya & Sankar, 2009). با توجه به اینکه لاروهای سن سوم و عفونت‌زای (infective juveniles =IJs) این نماتدها نسبت به خشکی، دماهای بالا یا پایین و نور فرابنفش حساس هستند، کاربرد آن‌ها روی اندام‌های هوایی با موفقیت کمتری همراه بوده است (Begley, 1990; Arthurs *et al*., 2004; Lacey & Georgis, 2012).

هدف از انجام این آزمایش مقایسه‌ی بیماری‌زایی گونه‌های *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 و *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mráček, Gerdin & Bedding, 1982 روی مینوز گوجه‌فرنگی و بررسی توانایی آن‌ها در کنترل مراحل مختلف لاروی آفت درون ظرف پتری و درون برگ‌های جدا شده‌ی گیاه گوجه فرنگی (leaf bioassay) و پس از آن قابلیت گونه‌ی برتر در آلوده کردن لارو سن آخر و شفیره درون ظروف پتری، شفیره در خاک و مراحل مختلف شب‌پره‌ی مینوز در گلخانه بود.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی زادمایه‌ی نماتدهای بیمارگر حشرات

نماتدهای *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* از مجموعهٔ نماتدهای زنده‌ی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تهیه شدند و در ادامه به اختصار با Hb و Sc به آن‌ها اشاره خواهد شد. این نماتدها اهدایی از دکتر جواد کریمی (گروه گیاه پزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد) هستند که از استان خراسان جمع‌آوری و شناسایی شده است. به‌منظور دستیابی به جمعیت مورد نیاز، نماتدها روی لارو پروانه موم خوار بزرگ (*Galleria mellonella* L.) تکثیر شدند. لاروهای این پروانه از کندوهای آلوده‌ی زنبور عسل جمع‌آوری و روی جیرهٔ غذایی مصنوعی (آرد گندم ۳۵۰ گرم، آرد ذرت ۲۰۰ گرم، شیرخشک ۱۳۰ گرم، مخمر ۷۰ گرم، عسل ۱۰۰ میلی لیتر و گلیسرین ۱۵۰ میلی لیتر) پرورش داده شدند (Metwally *et al*., 2012).

دو برگ کاغذ صافی درون ظروف پتری (۱۵ × ۱۰۰ میلی متر) قرار داده شد و توسط ۳-۲ میلی‌لیتر آب حاوی

۳۰۰-۲۰۰ لارو عفونت‌زای (IJs) نماتد (هر گونه در ظروف پتری جداگانه) مرطوب شد. تعداد ۱۰ عدد لارو سن آخر پروانه موم خوار بزرگ روی کاغذ صافی در معرض لاروهای بیماری‌زای نماتد قرار گرفتند (Nguyen, 2007). لاشه‌ی لاروهای مرده‌ی حشره به تله‌ی وایت حاوی آب مقطر استریل منتقل شده و لاروهای عفونت‌زای خارج شده از جسد آن‌ها جمع‌آوری شد (White, 1927; Ehlers & Shapiro-Ilan, 2005). لاروهای عفونت‌زای نماتد در دمای ۱۲ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شده (Stock & Goodrich-Blair, 2012) و یک ساعت قبل از استفاده در دمای اتاق قرار گرفتند تا با شرایط محیطی منطبق شوند. زنده بودن IJs در سوسپانسیون نماتد در زیر میکروسکوپ تشریح تأیید شد.

جمع‌آوری و تکثیر *T. absoluta*

پس از جمع‌آوری بوته‌های گوجه فرنگی آلوده به توتا، نمونه‌های برگ آلوده، درون ظرف‌های پتری قرار گرفت و دمبرگ آن‌ها به کمک پنبه مرطوب نگه داشته شد. ظروف پتری در اتاقک رشدی با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد. پروانه‌های بالغ خارج شده، روی ۵۰ گلدان که هر کدام حاوی یک بوته‌ی گوجه‌فرنگی بوده و به کمک طلق‌های پلاستیکی محصور شده بودند، رها سازی و تکثیر شدند.

آزمون بیماری‌زایی

شرایط کنترل شده‌ی آزمایشگاهی

در بخش ابتدایی آزمایش، تأثیر لاروهای سن سوم از دو گونه‌ی *H. bacteriophora* و *S. carpocapsae* نماتد بر سنین اول تا چهارم لاروی شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی بررسی و گونه‌ای که توانایی بیشتری در آلوده کردن این آفت داشت، برای آزمون‌های بعدی انتخاب شد. بدین منظور ۲ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۲۰۰ لارو عفونت‌زا از هر گونه‌ی نماتد در ظروف پتری (۱۵ × ۱۰۰ میلی متر) حاوی کاغذ صافی مرطوب ریخته شده و سپس ۱۲ لارو (سه لارو از هر چهار مرحله‌ی مختلف لاروی) شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی به هر ظرف پتری منتقل شد. ظرف‌های شاهد حاوی نمونه‌های لارو آفت بوده و فقط آب مقطر استریل (بدون نماتد) دریافت کردند. ظروف پتری به کمک پارافیلم عایق شده و به‌مدت ۳ روز در دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سیلیسیوس در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شد. لاروهای مرده پس از شستشو با آب، جداگانه به تله‌های وایت منتقل شدند تا مرگ آن‌ها توسط نماتد تأیید شد (Kaya & Stock, 1997). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و هر تیمار آن ۵ تکرار داشت.

برای اطمینان از صحت انتخاب و برای نزدیک کردن شرایط آزمایش با شرایط طبیعی، آزمایشی نیز با برگ‌های گوجه‌فرنگی آلوده به توتا انجام شد. بدین منظور ۱۵ برگ گوجه‌فرنگی که به‌طور طبیعی در مزرعه آلوده شده و هر برگ دارای حدود ۷-۵ لارو شب‌پره‌ی مینوز بودند، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. هر برگ به‌طور جداگانه درون یک ظرف پتری حاوی کاغذ صافی استریل گذاشته شده و با پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون نماتد با غلظت ۱۰۰۰ IJs/ml مایه‌زنی گردید. مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون روی برگ و ۲/۵ میلی‌لیتر آن زیر برگ محلول‌پاشی (Batalla-Carrera *et al*., 2010) و در دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. پس از ۷۲ ساعت، مرگ و میر لاروها با انتقال جداگانه‌ی جسد آن‌ها به تله وایت ثبت شد. هر تیمار شامل پنج تکرار بوده وآزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. ظروف پتری شاهد به جای سوسپانسیون نماتد، آب مقطر استریل دریافت کردند.

پس از انتخاب اولیه‌ی گونه‌ی مؤثرتر، حساسیت لارو سن آخر و شفیره‌ی شب‌پره‌ی مینوز به غلظت‌های مختلف گونه‌ی مؤثرتر درون ظروف پتری مورد بررسی قرار گرفت. دو قطعه کاغذ صافی درون ظروف پتری (۱۵ × ۱۰۰ میلی‌متر) قرار گرفته و توسط دو میلی‌لیتر آب مقطر حاوی سه غلظت مختلف نماتد (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ IJs در هر ظرف پتری) مرطوب گردید. تعداد ۱۰ عدد لارو سن آخر و شفیره شب‌پره مینوز به صورت جداگانه به ظروف پتری منتقل و ۷۲ ساعت در دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. لاروهای مرده و شفیره‌ها جداگانه به تله‌ی وایت منتقل شده تا آلودگی و مرگ آن‌ها توسط نماتد تأیید

گردد. در نمونه‌های شاهد از آب مقطر استریل استفاده گردید. هر تیمار پنج تکرار داشته و آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

از آنجا که بیشتر شفیره‌های این شب‌پره در خاک تشکیل می‌شوند (Urbaneja *et al.*, 2013)، توانایی گونه‌ی منتخب در آلوده کردن شفیره ها در خاک نیز مورد بررسی قرار گرفت. ظروف پتری (قطر ۱۰ سانتی متر) با ۵۰ گرم خاک مرطوب لومی شنی غیر سترون (ماسه ۶۷/۳٪، رس ۱۲/۱٪، سیلت ۲۰/۶٪، ماده‌ی آلی ۳/۵٪ با اسیدیته‌ی ۷/۵) پر شدند و ۱۰ عدد شفیره‌ی حشره روی سطح خاک یا با عمق کم در زیر خاک قرار گرفتند. تعداد ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ IJs در هر سانتی‌متر مربع (معادل ۳۹۲۵، ۷۸۵۰ و ۱۵۷۰۰ IJs در هر پتری) روی سطح خاک اضافه شد. رطوبت خاک به گونه‌ای تنظیم شد که پس از اضافه کردن نماتد، مقدار رطوبت نهایی خاک ۱۰٪ (وزنی) باشد (Batalla-Carrera *et al.*, 2010). ظروف پتری در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سلسیوس درون انکوباتور قرار گرفته و بعد از یک هفته، شفیره‌ها جداگانه به تله وایت منتقل و درصد مرگ و میر شفیره‌ها سنجیده شد. این آزمایش دارای پنج تکرار بود و نمونه شاهد به جای سوسپانسیون نماتد فقط آب مقطر استریل دریافت کرد.

در شرایط گلخانه

نشاءهای گوجه فرنگی (رقم Early Urbana) در گلدان‌های یک کیلوگرمی رشد داده شده و پس از این‌که بوته‌های گوجه‌فرنگی به اوایل میوه‌دهی رسیدند، در تیمارهای جداگانه با چهار مرحله‌ی مختلف لاروی شب‌پره‌ی مینوز (لارو سن اول تا چهارم) آلوده شدند. آزمایش ۵ تکرار داشت و هر تکرار شامل یک بوته گوجه‌فرنگی در هر گلدان و ۱۰ عدد از هر کدام از مراحل لاروی آفت (۵۰ عدد از هر سن لاروی آفت برای هر تیمار) بود. مراحل مختلف لاروی حشره‌ی آفت به‌صورت جداگانه از منبع آلودگی جدا شده و به‌وسیله‌ی قلم‌مو روی برگ‌های هر گلدان قرار گرفت. محل قرار گرفتن لاروها علامت‌گذاری شد و ۲ روز به آن‌ها مهلت داده شد تا در بافت گیاه تونل حفر کنند. بوته‌ها طی دو مرحله با فاصله‌ی زمانی ۲۴ ساعت و هر بار با ۱۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون نماتد *H. bacteriophora* (۱۰۰۰ IJs در هر میلی لیتر) توسط محلول‌پاش دستی، محلول پاشی شد و پس از چهار روز، مرگ و میر لاروها ثبت شد (Batalla-Carrera *et al.*, 2010). لاروهای مرده‌ی آفت برای تأیید مرگ توسط نماتد به تله وایت منتقل شدند.

در این بررسی گلدان‌های شاهد شامل بوته‌های آلوده به سنین مختلف آفت بود که تنها با آب محلول پاشی شدند. در کنار نمونه‌های آزمایشی، تیمار مقایسه‌ای شامل گلدان‌های آلوده به توتا بود که با حشره‌کش ایندوکساکارب (آوانت)، که آفت‌کش غالب مورد استفاده در منطقه است، با غلظت یک در هزار محلول‌پاشی شد و ۴ روز بعد نمونه‌های سم پاشی شده مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد.

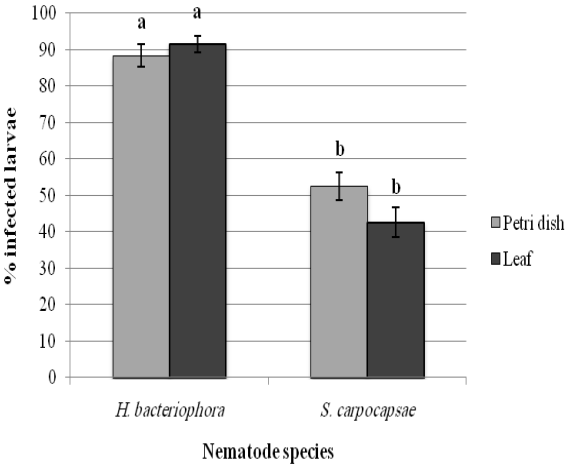
تجزیه و تحلیل داده‌ها

درصد مرگ ومیر توتا با استفاده از فرمول آبوت (Abbott, 1925) تصحیح شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. بهترین مدل رگرسیونی که نشان دهنده‌ی ارتباط میان غلظت نماتد و درصد مرگ و میر لارو سن چهارم آفت در ظرف پتری و درصد مرگ و میر شفیره در ظرف پتری و خاک بود توسط رگرسیون چند جمله‌ای (polynomial regression) با توان یک تا ۵ و به کمک نرم افزار SigmaPlot 11 تعیین شد. سپس در بخش‌هایی که نتایج به‌دست آمده اجازه می‌داد و با توجه به مدل رگرسیونی که بالاترین R^2 را دارا بود، جمعیتی از نماتد که باعث مرگ و میر ۵۰٪ (LC_{50}) یا ۹۰٪ (LC_{90}) از توتا می‌شد نیز محاسبه شد.

نتایج

توانایی دو گونه نماتد در پارازیته کردن مراحل مختلف لاروی شب پره‌ی مینوز گوجه فرنگی در ظرف پتری با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشت ($F=51.8$; $df_t=1$; $P< 0.0001$). درصد لاروهایی که توسط

گونه‌ی Hb آلوده شده بودند (۸۸/۴٪) تقریباً ۱/۷ برابر درصد لاروهای آلوده شده توسط Sc (۵۲/۶٪) بود (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه‌ی توانایی *Heterorhabditis bacteriophora* و *Steinernema carpocapsae* در پارازیته کردن لاروهای آفت (چهار مرحله لاروی) شب‌پره مینوز در ظرف‌های پتری (با غلظت ۲۰۰ لارو در هر ظرف پتری) و درون تونل‌های حفر شده در بافت برگ (با غلظت ۵۰۰۰ لارو در هر ظرف پتری). میله‌های روی هر ستون نشان دهنده‌ی خطای استاندارد بوده و ستون‌هایی که روی آن‌ها حروف مشابهی قرار گرفته از لحاظ آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند ($P< 0.05$).

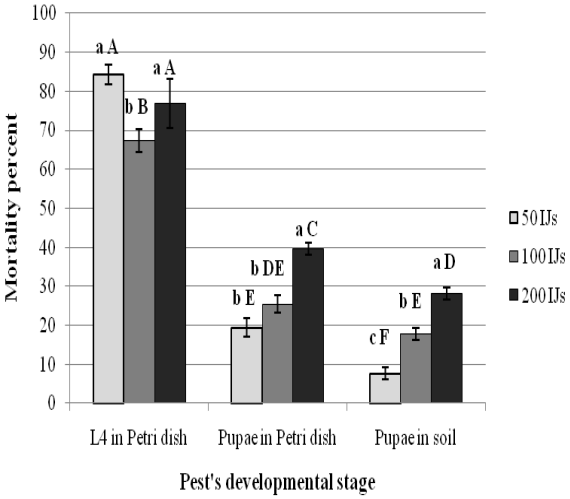
Fig. 1. Percentage of infected larvae (all instars) of *T. absoluta* exposed to *S. carpocapsae* and *H. bacteriophora* in Petri dishes (200 IJs / Petri dish) and inside galleries in the leaves (5000 IJs / Petri dish). Same letters above bars (mean ± SE) indicate no statistical significance ($P < 0.05$).

گونه‌ی Hb قدرت بیشتری در پارازیته کردن لاروهای آفت در درون بافت برگ از خود نشان داد و درصد لاروهای از بین رفته توسط این گونه (۹۱/۶٪) بیش از دو برابر لاروهای از بین رفته توسط Sc (۴۲/۶٪) بود ($F=115.3;\ df=1;\ P< 0.0001$). میان درصد لاروهای از بین رفته‌ی آفت توسط هر گونه‌ی نماتد در ظرف پتری و برگ تفاوت آماری وجود نداشت ($F=0.7;\ df=1;\ P< 0.4$ برای Hb و $F=3.3;\ df=1;\ P< 0.1$ برای Sc) هر چند که از نظر عددی (نه به‌صورت آماری) کارآیی گونه‌ی Hb در بافت برگ و کارآیی گونه‌ی Sc در ظرف پتری بهتر بود (شکل ۱). با توجه به نتایج به‌دست آمده گونه‌ی Hb به‌عنوان جدایه‌ی کارآمدتر انتخاب شده و برای آزمون‌های بعدی (تأثیر غلظت‌های مختلف روی لارو سن آخر و شفیره‌ی آفت و آزمایش گلخانه‌ای) مورد استفاده قرار گرفت.

توانایی غلظت‌های مختلف نماتد Hb در از بین بردن لارو سن آخر (L_4) شب پره‌ی مینوز متفاوت بود ($F=3.9;\ df=2;\ P< 0.05$). بالاترین درصد مرگ و میر زمانی مشاهده شد که غلظت IJs نماتد ۵۰ یا ۲۰۰ عدد (به ترتیب ۸۴ و ۷۷ درصد) به ازای هر پتری بود (شکل ۲). توانایی نماتد در آلوده کردن شفیره‌های آفت بسیار کمتر از آلوده کردن لارو سن آخر بوده و بیشترین درصد آلودگی زمانی مشاهده شد که تعداد IJs نماتد ۲۰۰ عدد به ازای هر پتری بود ($F=23.6;\ df=2;\ P< 0.0001$). با افزایش تعداد IJs نماتد، درصد شفیره‌های پارازیته افزایش یافت، هر چند که بین جمعیت ۵۰ و ۱۰۰ لارو نماتد به ازای هر پتری اختلاف معنی داری مشاهده نشد (شکل ۲). افزایش غلظت IJs درون خاک (درون ظرف پتری) با افزایش درصد آلوده شدن شفیره‌های آفت همراه بود ($F=45.2;\ df=2;\ P< 0.0001$) (شکل ۲).

بهترین ضریب تبیین (R^2) برای تعیین مدل رگرسیونی ارتباط میان جمعیت‌های مختلف نماتد و درصد مرگ و میر لارو سن چهارم در ظرف پتری، شفیره در ظرف پتری و شفیره در خاک در فرمول حاصله با توان ۲ به‌دست آمد. حداقل درصد آلودگی تخمین زده شده برای لارو سن چهارم توتا در ظرف پتری ۶۴ درصد بود که توسط ۱۳۴ عدد لارو عفونت‌زای نماتد ایجاد می‌شد. بر اساس این مدل رگرسیونی، LC90 لارو سن چهارم توتا در ظرف پتری معادل ۳۹ و ۲۲۸ عدد لارو عفونت‌زای نماتد برآورد شد. طبق مدل رگرسیونی محاسبه شده، هنگامی که غلظت لاروهای عفونت‌زای نماتد ۲۶۲ عدد در هر ظرف پتری باشد، ۵۰٪ شفیره‌های آفت در ظرف پتری از بین می‌روند. حداکثر درصد مرگ و میر تخمین زده شده برای شفیره در

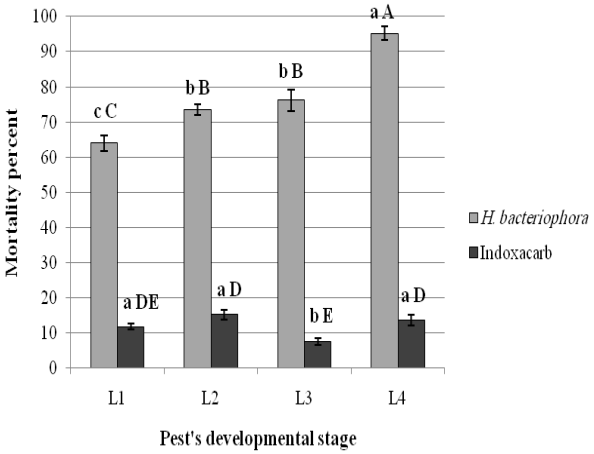
خاک ۳۰٪ بود که توسط ۲۲۸ تعداد لارو عفونت‌زای نماتد ایجاد می‌شد (جدول ۱).



شکل ۲- مقایسه‌ی میانگین درصد مرگ و میر اصلاح شده‌ی لارو سن آخر (L_4) و شفیره‌ی آفت درون ظرف پتری و درصد اصلاح شده‌ی از بین رفتن شفیره درون خاک توسط غلظت‌های متفاوت نماتد *H. bacteriophora*. غلظت‌های ذکر شده‌ی نماتد به ازای هر ظرف پتری و برای آزمایش انجام شده در خاک، به ازای هر سانتی مربع خاک است. میله‌های روی هر ستون نشان دهنده‌ی خطای استاندارد است. حروف کوچک روی ستون‌ها نشان‌گر تفاوت آماری بین تیمارهای هر آزمایش بوده و حروف بزرگ نشان دهنده‌ی اختلاف آماری بین همه‌ی تیمارها در هر سه آزمایش است.

Fig. 2. Corrected mortality percent of final instar larvae (L_4) and pupae in Petri dishes; and pupae in soil by different concentrations of *H. bacteriophora*. The mentioned concentrations were per Petri dish or per cm^2 soil. Small letters above bars (mean±SE) point to statistical significance ($P < 0.05$) among treatments of each experiment while capital letters indicate statistical significance among all treatments.

برخلاف نماتد Hb، آفت کش ایندوکساکارب موفقیت چندانی در کنترل لاروهای سنین مختلف آفت نداشت به گونه‌ای که میانگین لاروهای از بین رفته (میانگین لاروهای مرده‌ی سن اول تا چهارم) ۱۲٪ بود (شکل ۳). سنین مختلف لاروی به سم واکنش متفاوتی نشان دادند و حساسیت آن‌ها با هم متفاوت بود ($F=6.6$; $df=3$; $P<0.004$). کاربرد نماتد Hb روی گیاه گوجه‌فرنگی در گلخانه باعث مرگ ۷۷٪ لاروهای آفت (میانگین لاروهای مرده‌ی سن اول تا چهارم) شد. حساسیت سنین مختلف لاروی آفت به نماتد متفاوت بوده ($F=34.7$; $df=3$; $P<0.0001$) و بیشترین حساسیت در لارو سن چهارم دیده شد (۹۵ درصد). بیماری‌زایی نماتد روی لاروهای سن دوم و سوم آفت یکسان بود (شکل ۳). توان نماتد در کنترل لارو سن چهارم آفت هفت برابر بیشتر از آفت کش شیمیایی ایندوکساکارب بود.



شکل ۳- حساسیت سنین مختلف لاروهای شب پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی به نماتد *H. bacteriophora* و آفت‌کش شیمیایی ایندوکساکارب در گلخانه. میله‌های روی هر ستون نشان دهنده‌ی خطای استاندارد است. حروف کوچک روی ستون‌ها نشان‌گر تفاوت آماری بین تیمارهای هر آزمایش بوده و حروف بزرگ نشان‌دهنده‌ی اختلاف بین همه‌ی تیمارها است.

Fig. 3. Vulnerability of different larval stages of tomato leafminer moth to *H. bacteriophora* and a chemical pesticide, indoxacarb at greenhouse condition. Small letters above bars (mean±SE) point to statistical significance difference ($P < 0.05$) among treatments of each experiment while capital letters indicate statistical significance difference among all treatments.

جدول ۱- بهترین مدل رگرسیونی که ارتباط بین غلظت‌های مختلف لاروهای عفونت‌زای نماتد *H. bacteriophora* و درصد مرگ و میر لارو سن چهارم و شفیره‌ی توتا را نشان می‌دهد. در مدل‌هایی که امکان داشته است، LC_{50} و LC_{90} محاسبه شده است.

Table 1. The best regression model that shows the correlation between IJs concentration of *H. bacteriophora* and percentage of death in L4 and pupae of *Tuta absoluta*. The LC_{50} and LC_{90} have been calculated whenever the regression model allowed.

Growth stage	Regression model	R^2	LC_{50}	LC_{90}
L4 in Petri dish	$Y = 115.867 – (0.774 \times X) + (0.00289 \times X^2)$	0.4	–	39 & 228
Pupae in Petri dish	$Y = 14.133 – (0.098 \times X) + (0.000147 \times X^2)$	0.8	262	–
Pupae in soil	$Y = –5.933 + (0.304 \times X) + (0.000667 \times X^2)$	0.9	–	–

R^2 نشان دهنده‌ی ضریب تبیین مدل رگرسیونی است.

R^2 shows the coefficient of determination for fitting data in each regression model.

بحث

در سال‌های اخیر تلاش‌های فراوانی برای کنترل زیستی شب‌پره‌ی مینوز انجام گرفته است (Urbaneja *et al.*, 2012). از جمله موجودات استفاده شده در این روش، می‌توان به باکتری‌های (Sabbour & Soliman, 2014)، قارچ‌ها (Sabbour, 2014)، پارازیتوییدها (Zappalà *et al.*, 2012b; Do Thi Khanh *et al.*, 2012)، شکارگرها (Nannini *et al.*, 2012; Ghoneim, 2014) و نماتدهای انگل حشرات (Batalla-Carrera *et al.*, 2010; Garcia-del-Pino *et al.*, 2013) اشاره کرد.

نماتدهای پارازیت حشرات خصوصاً گونه‌های مختلف جنس‌های *Heterorhabditis* و *Steinernema* به‌عنوان عوامل کنترل کننده‌ی زیستی موفق و امیدبخش آفات مهم گیاهی در نظر گرفته می‌شوند (Sharma *et al.*, 2011; Půža, 2015). این نماتدها دارای ویژگی‌های منحصر به فردی هستند که آن‌ها را برای مبارزه با آفات، مناسب می‌نماید.

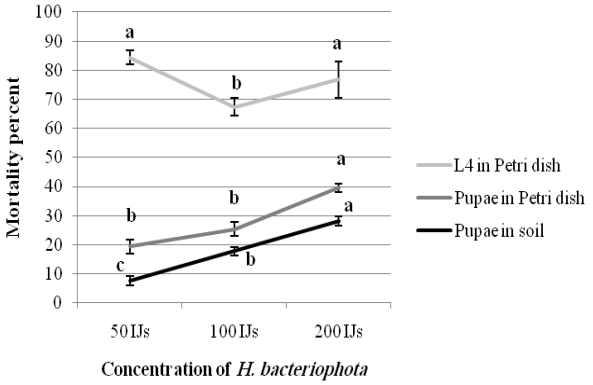
گونه‌ی *H. bacteriophora* دربررسی آزمایشگاهی (درون ظرف پتری) در مقایسه با گونه‌ی *S. carpocapsae* قابلیت بیشتری از خود در کنترل *T. absoluta* نشان داد و درصد مرگ و میر لاروهای توتا توسط Hb حدود ۱/۷ برابر بیشتر از گونه‌ی Sc بود. البته گونه Hb توانایی بیشتری نیز در از بین بردن لاروهای آفت درون بافت برگ داشت (شکل ۱). قرار داشتن لارو در درون تونل‌های حفر شده داخل بافت برگ (در شرایط آزمایشگاهی) وضعیت را بیشتر به شرایط طبیعی و مزرعه‌ای نزدیک‌تر می‌کرد. با توجه به این‌که عمده خسارت این آفت توسط لاروهایی که به برگ و میوه‌ی گیاه حمله می‌کنند ایجاد می‌شود (Desneux *et al.*, 2010)، گونه‌ای که توانایی بیشتری در آلوده کردن آفت داشته باشد، از نظر مهار زیستی از اهمیت بیشتری برخوردار است.

راهبردهای پیدا کردن حشره‌ی میزبان در دو گونه‌ی Hb و Sc با یکدیگر متفاوت بوده و در تلفیق با روش زندگی و میزان حرکت حشره‌ی آفت، می‌تواند باعث افزایش یا کاهش سطح آلودگی میزبان گردد (Griffin *et al.*, 2005). لاروهای بیماری‌زای نماتد Sc معمولاً از استراتژی کمین کردن استفاده می‌کنند (Campbell & Gaugler, 1993) در حالی که لاروهای بیماری‌زای نماتد Hb به دنبال میزبان گشته و خودشان را به میزبان می‌رسانند (Lewis, 2002). این موضوع می‌تواند باعث پراکنش بهتر و یکنواخت‌تر نماتد Hb و به دنبال آن بیشتر شدن آلودگی لاروهای آفت با این نماتد شود. جستجوی میزبان به ویژه در زمانی که لاروها در محل‌های مخفی وجود دارند (مثل کانال‌های درون برگ)، می‌تواند در یافتن میزبان به نماتد کمک فراوانی کند. در آزمایش دیگری که با جدایه‌های اسپانیایی این دو گونه نماتد روی لارو و شفیره‌ی شب پره‌ی مینوز انجام شده بود، توانایی گونه‌ی Hb در آلوده کردن لاروهای آفت هنگامی که نماتدها با جمعیت ۵۰ لارو در هر سانتی‌متر مربع خاک (در ظرف پتری) استفاده شد، بیشتر از Sc بود. اگر چه در همین جمعیت، توانایی Sc در آلوده کردن شفیره بیشتر بود

(Batalla-Carrera *et al*., 2010). در آزمایش دیگری، توانایی این دو نماتد در از بین بردن آفت شب‌پره‌ی مینوز هنگامی که نماتدها با جمعیت ۵۰ لارو در هر سانتی‌متر مربع خاک (در ظرف پتری) استفاده شد، با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشت (Garcia-del-Pino *et al*., 2013).جدایه‌ی ایرانی *Steinernema feltiae* صد در صد لاروهای شب پره مینوز را در ظرف پتری آلوده کرد (Abootorabi, 2014). درصد از بین رفتن لاروهای موجود در برگ زمانی که در آزمایشگاه بررسی شدند، کاملاً شبیه آزمایشی بود که با جمعیت مشابهی از جدایه‌ی اسپانیایی نماتد Hb روی این آفت انجام گرفت (Batalla-Carrera *et al*., 2010).

بررسی تأثیر جمعیت‌های مختلف لاروهای بیماری‌زای نماتد Hb روی لارو سن چهارم و شفیره نشان داد که حساسیت لارو سن چهارم از شفیره بیشتر است. حساسیت شفیره زمانی که روی کاغذ صافی و درون پتری بود از زمانی که در محیط خاک قرار داشت بیشتر بود (شکل ۲). لاروهای بیماری‌زای *Heterorhabditis* spp. از طریق کوتیکول و منافذ طبیعی به بدن حشره و سپس به درون هموسل نفوذ می‌کنند (Griffin *et al*., 2005). بسته شدن تعدادی از منافذ طبیعی بدن در شفیره می‌تواند باعث کاسته شدن آسیب پذیری آن به نماتد شود. در بدن شفیره، فقط اسپیراکل‌ها باز باقی می‌مانند و دهان و مخرج بسته می‌شود. از سوی دیگر، کوتیکول شفیره ضخیم‌تر از کوتیکول لارو است و باعث مقاومت بیشتر شفیره به نماتد می‌شود (Dowds & Peters, 2002). شفیره‌ها به‌عنوان یک مرحله‌ی تقریباً غیر فعال در چرخه‌ی زندگی حشره در نظر گرفته می‌شوند که دارای حداقل سوخت و ساز است. در این مرحله آزاد شدن محرک‌های فرار (مثل CO_2) از بدن شفیره که باعث جلب نماتد می‌شوند، بسیار کم شده و دلیل دیگری برای کمتر آلوده شدن شفیره‌ها می‌باشد (Lewis *et al*., 1993, 1995). حساسیت بیشتر لاروها در مقایسه با شفیره در آزمایشات متعددی گزارش شده است (Shannag *et al*.,1994; Jackson & Brooks, 1995; Kim *et al*., 2004; Ebssa & Koppenhöfer, 2012).

بیشترین درصد لارو سن چهارم آلوده شده در ظرف پتری زمانی دیده شد که جمعیت نماتد ۵۰ یا ۲۰۰ IJs در هر ظرف پتری بود و هنگامی که جمعیت نماتد ۱۰۰ IJs بود، درصد آلودگی لاروهای آفت کاهش پیدا کرد. در مورد شفیره‌ها (هم در ظرف پتری و هم در خاک)، افزایش جمعیت نماتد با افزایش درصد آلودگی همراه بود (شکل ۲ و ۴).



شکل ۴- بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نماتد *H. bacteriophora* روی لارو سن چهارم و شفیره‌ی شب‌پره‌ی مینوز گوجه فرنگی درون پتری دیش و خاک. غلظت‌های ذکر شده‌ی نماتد به ازای هر ظرف پتری و برای آزمایش انجام شده در خاک، به ازای هر سانتی‌متر مربع خاک است. میله‌ها نشان‌دهنده‌ی خطای استاندارد است. تیمارهایی که دارای حرف مشترک هستند از لحاظ آماری با یکدیگر تفاوت معنی داری ندارند.

Fig. 4. Effect of different concentrations of *H. bacteriophora* on 4th instar larvae and pupae of tomato leafminer moth in Petri dish and in soil. The mentioned concentrations were per Petri dish or per cm^2 soil. Bars correspond to standard errors. Treatments with similar small letters have no statistical significance.

به‌نظر می‌رسد که افزایش جمعیت نماتدهای به‌کار رفته علیه لاروهای حشره‌ی آفت، می‌تواند باعث کاهش توانایی تشخیص میزبان و به دنبال آن کاهش درصد مرگ و میر لاروهای آفت گردد (Lewis, 2002). پس از آن با افزایش جمعیت نماتد، شانس برخورد تصادفی نماتد با آفت

بیشتر شده و درصد آلودگی افزایش می‌یابد. در مورد شفیره نیز افزایش تعداد می‌تواند شانس برخورد و نفوذ نماتد به درون حشره را افزایش دهد.

حساسیت سنین مختلف لارو آفت به سم شیمیایی در آزمایش حاضر در گلخانه تقریباً یکسان بود و به جز لارو سن سوم، بقیه‌ی سنین لاروی با یکدیگر تفاوتی نداشتند. لاروهای بیماری‌زای نماتد Hb باعث از بین رفتن ۷۷٪ از لاروهای آفت (سن اول تا چهارم) شدند در حالی که سم شیمیایی ایندوکساکارب فقط ۱۲٪ از لاروهای درون بافت برگ را از بین برد. با افزایش سن لاروها درصد آلوده شدن آن‌ها نیز افزایش یافت، هرچند که تفاوت درصد لاروهای آلوده‌ی سن دوم و سوم با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل ۳). متفاوت بودن آسیب پذیری سنین مختلف لاروی را می‌توان به اندازه‌ی آن‌ها مربوط دانست. لاروهای سنین بالاتر دارای اندازه‌ی بزرگتر و به‌دنبال آن دارای منافذ طبیعی بزرگتری (دهان، اسپیراکل‌ها و مخرج) نیز هستند (Dowds & Peters, 2002). از سوی دیگر لاروهای بزرگتر، نماتدهای بیشتری را به سوی خود جلب می‌کنند (Smits *et al*., 1994). به واسطه‌ی سوخت و ساز بیشتر، مقدار تولید محرک‌هایی فراری که باعث جلب نماتد می‌شوند، در لاروهای بزرگتر بیشتر است (Hallem *et al*., 2011). بزرگتر بودن اندازه‌ی لاروها احتمال دستیابی نماتد یا برخورد نماتد به آن‌ها را افزایش می‌دهد. لاروهای بزرگ‌تر به غذای بیشتری نیز احتیاج داشته و سطح تونل حفر شده توسط آن‌ها بیشتر است (Urbaneja *et al*., 2013). بنابراین زمانی که نماتد روی گیاه محلول پاشی می‌شود، اگر وسعت تونل‌های ایجاد شده بیشتر باشد احتمال نفوذ نماتد به درون تونل و یافتن لارو حشره‌ی آفت بیشتر می‌شود. در آزمایشی که در گلخانه و روی همین آفت انجام شد، جدایه‌ی اسپانیایی Hb توانست حدود ۹۲٪ از لاروهای درون بافت برگ را (بدون توجه به سن آن‌ها) پارازیته کند (Batalla-Carrera *et al*., 2010).

کاربرد سم آبامکتین، triflumuron و chlorfenapyr در روزهای اول و سوم پس از کاربرد روی بوته‌ی گوجه‌فرنگی باعث مرگ ۱۰۰-۸۳ درصدی لاروهای آفت شب‌پره‌ی مینوز گردید (Riquelme *et al*., 2006)، اگر چه وجود مقاومت به سموم دلتامترین، متامیدوفوس و آبامکتین و کاهش اثر سم روی لاروهای حشره در اثر استفاده‌ی پیاپی گزارش شده است (Lietti *et al*., 2005). این موضوع باعث شده که در آرژانتین هفته‌ای دوبار علیه این آفت سمپاشی صورت گیرد (Lietti *et al*., 2005). در آزمایش حاضر نیز سم ایندوکساکارب تأثیر زیادی در مرگ لاروهای آفت نداشت. این موضوع باعث شده که در مزارع گوجه‌فرنگی شهرستان مرودشت گاهی سمپاشی به‌صورت یک روز در میان انجام پذیرد (مشاهدات شخصی نگارندگان). عدم تأثیر سم ایندوکساکارب روی لارو حشره‌ی آفت می‌تواند در اثر مقاوم شدن آفت پدید آمده باشد یا در اثر پایین بودن کیفیت سم مصرف شده باشد. نشان داده شده است که تلفیق استفاده از نماتد Hb با آفت کش‌هایی که علیه شب‌پره‌ی مینوز استفاده می‌شود می‌تواند افزایش کنترل آفت را باعث شود (Urbaneja *et al*., 2012; Garcia-del-Pino *et al*., 2013; Sabino *et al*., 2014).

نتایج آزمایش حاضر نشان داد که لاروهای آفت به نماتد بسیار حساس بوده و کاربرد سوسپانسیون نماتد روی اندام هوایی می‌تواند به کاهش خسارت و کنترل آفت منتهی گردد. استفاده از نماتدها در کنترل آفاتی که به بخش‌های هوایی گیاهان (خصوصاً در گلخانه) حمله کرده و از بخش‌های بیرونی یا درونی گیاه تغذیه می‌کنند، مرسوم است (Tomalak *et al*., 2005; Lacey & Georgis, 2012). قرار گرفتن این آفت درون تونل‌های حفر شده در بافت گیاه، محیط مناسبی برای نماتد را پدید می‌آورد که آن را از اثرات زیان‌بار محیطی (مثل خشکی یا اشعه‌ی فرا بنفش) حفظ می‌کند (Arthurs *et al*., 2004). کاربرد نماتد *H. bacteriophora* در خاک نیز به آلوده شدن شفیره‌ها منتهی شد. بنابراین به نظر می‌رسد که کاربرد این نماتد به صورت محلول پاشی روی اندام هوایی و استفاده در خاک، می‌تواند دو استراتژی باشد که آفت را بدون آسیب به محیط زیست، در حد قابل قبولی کنترل کند. کاربرد نماتد *H. bacteriophora* روی اندام هوایی می‌تواند باعث کنترل لاروها و کاربرد این نماتد در خاک می‌تواند باعث کنترل

لاروهای سن آخر که برای شفیره شدن روی خاک می‌افتند و خود شفیره‌ها در رو یا زیر سطح خاک شود. آزمایش‌های بیشتر در شرایط مختلف و با جدایه‌های متفاوت آفت، می‌تواند راهگشای استفاده‌ی تجاری از این نماتد باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دکتر جواد کریمی برنگ (گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد) بابت اهدای نماتدهای بیمارگر حشرات تشکر می‌کنند. همچنین از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت بابت تهیه امکانات و تقبل هزینه‌ی پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌گردد.

References

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 265–276.

Abootorabi, E. 2014. Report of native isolate pathogenicity of *Steinernema feltiae* on tomato leafminer, *Tuta absoluta*. Biocontrol in Plant Protection, 1: 107–109.

Adams, B.J., Fodor, A., Koppenhöfer, H.S., Stackebrandt, E., Stock, S.P. & Klein, M.G. 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. Biological Control, 37: 32–49.

Arnó, J. & Gabarra, R. 2011. Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). Journal of Pest Science, 84: 513–520.

Arthurs, S., Heinz, K.M. & Prasifka, J.R. 2004. An analysis of using entomopathogenic nematodes against above ground pest. Bulletin of Entomological Research, 94: 297–306.

Batalla-Carrera, L., Morton, A. & García-del-Pino, F. 2010. Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. BioControl, 55: 523–530.

Begley, J.W. 1990. Efficacy against insects in habitats others than soil. pp. 215–231. In: Gaugler, R. & Kaya, H.K. (eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton.

Campbell, J.F. & Gaugler, R. 1993. Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). Behaviour, 126: 155–169.

Desneux, N., Ramirez-Romero, R. & Kaiser, L. 2006. Multistep bioassay to predict recolonization potential of emerging parasitoids after a pesticide treatment. Environmental Toxicology and Chemistry, 25: 2675–2682.

Desneux, N., Decourtye, A. & Delpuech, J.M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annual Review of Entomology, 52: 81–106.

Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys., K.A.G., Burgio., G., Arpaia, S., Narvaez-Vasquez, C.A., Gonzalez-Cabrera, J., Ruescas, D.C., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T. & Urbaneja, A. 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. Journal of Pest Science, 83: 197–215.

Desneux, N., Luna, M.G., Guillemaud, T. & Urbaneja, A. 2011. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. Journal of Pest Science, 84: 403–408.

Divya, K., Sankar, M. 2009. Entomopathogenic nematodes in pest management. Indian Journal of Science and Technology, 2: 53–60.

Do Thi Khanh, H., Chailleux, A., Tiradon, M., Desneux, N., Colombel, E. & Tabone, E. 2012. Using new egg parasitoids (*Trichogramma* spp.) to improve integrated management against *Tuta absoluta*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 42: 249–254.

Dowds, B.C.A. & Peters, A. 2002. Virulence mechanisms. pp. 79–98. In: Gaugle, R. (ed.), Entomopathogenic Nematology. CAB International, Wallingford.

Ebssa, L. & Koppenhöfer, A.M. 2012. Entomopathogenic nematodes for the management of *Agrotis ipsilon*: effect of instar, nematode species and nematode production method. Pest Management Science, 68: 947–957.

Ehlers, R.U., Shapiro-Ilan, D.I. 2005. Mass production. pp. 65–78. In: Grewal, P.S., Ehlers, R.U. & Shapiro-Ilan, D.I. (eds.), Nematodes as Biocontrol Agents. CAB International, Wallingford.

Gabarra, R., Arnó, J., Lara, L., Verdú, M.J., Ribes, A., Beitia, F., Urbaneja, A., Téllez, M. Del M., Mollá & O., Riudavets, J. 2014. Native parasitoids associated with *Tuta absoluta* in the tomato production areas of the Spanish Mediterranean Coast. Biocontrol, 59: 45–54.

Garcia-del-Pino, F., Alabern, X. & Morton, A. 2013. Efficacy of soil treatments of entomopathogenic nematodes against the larvae, pupae and adults of *Tuta absoluta* and their interaction with the insecticides used against this insect. BioControl, 58: 723–731.

Ghoneim, K. 2014. Predatory insects and arachnids as potential biological control agents against the invasive tomato leafminer, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), in perspective and prospective. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2: 52–71.

Griffin, C.T., Boemare, N.E. & Lewis, E.E. 2005. Biology and behavior. pp. 47–64. In: Grewal, P.S., Ehlers, R.U. & Shapiro-Ilan, D.I. (eds.), Nematodes as Biocontrol Agents. CAB International, Wallingford.

Hallem, E.A., Dillman, A.R., Hong, A.V., Zhang, Y., Yano, J.M., DeMarco, S.F. & Sternberg, P.W. 2011. A sensory code for host seeking in parasitic nematodes. Current Biology, 21: 377–383.

Hominick, W.M. 2002. Biogeography. pp. 115–143. In: Gaugler, R. (ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford.

Hunt, D.J. 2007. Introduction. pp. 1–26. In: Nguyen, K.B. & Hunt, D.J. (eds.), Hunt, D.J. & Perry, R.N. (Series eds.), Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts, Nematology Monographs and Perspectives. Koninklijke Brill NV, Leiden.

Jackson, J.J., Brooks, M.A. 1995. Parasitism of western corn rootworm larvae and pupae by *Steinernema carpocapsae*. Nematology, 27: 15–20.

Kaya, H.K. & Stock, S.P. 1997. Techniques in insect nematology. pp. 281–324. In: Lacey, L. (ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, San Diego.

Kim, H.H., Choo, H.Y., Kaya, H.K., Lee, D.W., Lee, S.M. & Jeon, H.Y. 2004. *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) as a biological control agent against the fungus gnat *Bradysia agrestis* (Diptera: Sciaridae) in propagation houses. Biocontrol Science and Technology, 14: 171–183.

Koppenhöfer, A.M. 2000. Nematodes. pp. 283–301. In: Lacey, L.A. & Kaya, H.K. (eds.), Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer, Dordrecht.

Koppenhöfer, A.M. & Kaya, H.K. 2002. Entomopathogenic nematodes and insect pest management. pp. 258–313. In: Koul, O. & Dhaliwal, G.S. (eds.) Microbial Biopesticides. Taylor & Francis, Abingdon.

Lacey, L.A. & Georgis, R. 2012. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. Journal of Nematology, 44: 218–225.

Lewis, E.E. 2002. Behavioural ecology. pp. 205–223. In: Gaugle, R. (ed.), Entomopathogenic Nematology, CAB International, Wallingford.

Lewis, E.E., Gaugler, R. & Harrison, R. 1993. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. Canadian Journal of Zoology, 71: 765–769.

Lewis, E.E., Grewal, P.S. & Gaugler, R. 1995. Hierarchical order of host cues in parasite foraging strategies. Parasitology, 110: 207–213.

Lietti, M.M.M., Botto, E. & Alzogaray, P.A. 2005. Insecticide Resistance in Argentine Populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotropical Entomology, 34: 113–119.

Metwally, H.M.S., Hafez, G.A., Hussein, M.A., Hussein, M.A., Salem, H.A. & Saleh, M.M.E. 2012. Low cost artificial diet for rearing the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) as a host for entomopathogenic nematodes. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 22: 15–17.

Moosavi, M.R. & Zare, R. 2012. Fungi as biological control agents of plant-parasitic nematodes. pp: 67–107. In: Merillon, J.M. & Ramawat, K.G. (eds.), Plant Defence: Biological Control, Progress in Biological Control 12. Springer Science + Business Media, Dordrecht.

Moosavi, M.R. & Askary, T.H. 2015. Nematophagous fungi- Commercialization. pp: 187–202. In: Askary, T.H. & Martinelli, P.R.P. (eds.), Biocontrol Agents of Phytonematodes. CABI Publishing, Wallingford.

Nannini, M., Atzori, F., Murgia, G., Pisci, R. & Sanna, F. 2012. Use of predatory mirids for control of the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) in Sardinian greenhouse tomatoes. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 42: 255–259.

Nguyen, K.B. 2007. Methodology, morphology and identification. pp. 59–119. In: Nguyen, K.B. & Hunt, D.J. (eds.) Hunt, D.J. & Perry, R.N. (series eds.), Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts, Nematology Monographs and Perspectives. Koninklijke Brill NV, Leiden.

Poinar, G.O. Jr. 1976. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae n. fam.). Nematologica, 21:463–470.

Půža, V. 2015. Control of insect pests by entomopathogenic nematodes. pp. 175–183. In: Lugtenberg, B. (ed.), Principles of Plant-Microbe Interaction. Springer International Publishing, Bern.

Riquelme, V.M., Botto, E.N. & Lafalce, C. 2006. Efficacy of insecticides against the "Tomato moth", *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) and their residual effects on the parasitoid *Trichogrammatoidea bactrae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 65: 57–65.

Sabbour, M.M. 2014. Biocontrol of the tomato pinworm *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Egypt. Middle East Journal of Agriculture Research, 3: 499–503.

Sabbour, M.M. & Soliman, N. 2014. Evaluations of three *Bacillus thuringiensis* against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Egypt. International Journal of Science and Research, 3: 2067–2073.

Sabino, P.H.S., Sales, F.S., Guevara, E.J., Moino, A. Jr. & Filgueiras, C.C. 2014. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with insecticides used in the tomato crop. Nematoda, 1: e03014. Doi: 10.4322/nematoda.03014

Shannag, H.K., Webb, S.E. & Capinera, J.L. 1994. Entomopathogenic nematode effect on pickleworm (Lepidoptera: Pyralidae) under laboratory and field conditions. Journal of Economic Entomology, 87: 1205–1212.

Sharma, M.P., Sharma, A.N. & Hussaini, S.S. 2011. Entomopathogenic nematodes, a potential microbial biopesticide: Mass production and commercialisation status – a mini review. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44: 855–870.

Smits, P.H., Wiegers, G.L. & Vlug, H.J. 1994. Selection of insect parasitic nematodes for biological control of the garden chafer, *Phyllopertha horticola*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 70: 77–82.

Stock, S.P. & Goodrich-Blair, H. 2012. Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. pp. 373–426. In: Lacey, L.A. (ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. 2nd ed. Academic Press, San Diego.

Terzidis, A.N., Wilcockson, S. & Leifert, C. 2014. The tomato leaf miner (*Tuta absoluta*): Conventional pest problem, organic management solutions? Organic Agriculture, 4: 43–61.

Tomalak, M., Piggott, S. & Jagdale, G.B. 2005. Glasshouse applications. pp 147–166. In: Grewal, P.S., Ehlers, R-U. & Shapiro-Ilan, D.I. (eds), Nematodes as Biocontrol Agents. CABI Publishing, Oxon.

Urbaneja, A., González-Cabrera, J., Arnó, J. & Gabarra, R. 2012.Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. Pest management Science, 68: 1215–1322.

Urbaneja, A., Desneux, N., Gabarra, R., Arnó, J., González-Cabrera, J., Mafra Neto, A., Stoltman, L., Pinto, A. de S. & Parra, J. R. P. 2013. Biology, ecology and management of the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. pp. 98–125. In: Peña, J.E. (ed.), Potential Invasive Pests of Agricultural Crops. CAB International, Wallingford.

Vashisth, S., Chandel, Y.S. & Sharma, P.K. 2013. Entomopathogenic nematodes - A review. Agricultural Reviews, 34: 163–175.

Weiser, J. 1955. *Neoplectana carpocapsae* n.sp. (Angullulinata: Steinernematidae) novy, cizopasnic housenik obalece jableneho, *Carpocapsa pomonella* L. Věstník Československé zoologické společnosti, 19: 44–52.

White, G.F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science, 66: 302–303.

Wouts, W.M., Mracek, Z., Gerdin, S. & Bedding, R.A. 1982. *Neoplectana* Steiner, 1929 a junior synonym of Steinernema Travassos, 1927 (Nematoda: Rhabditida). Parasitology, 4: 147–154.

Zappalà, L., Bernardo, U., Biondi, A., Cocco, A., Deliperi, S., Delrio, G., Giorgini, M., Pedata, P., Rapisarda.C., Tropea Garzia, G. & Siscaro, G. 2012a. Recruitment of native parasitoids by the exotic pest *Tuta absoluta* in Southern Italy. Bulletin of Insectology, 65: 51–61.

Zappalà, L., Siscaro, G., Biondi, A., Mollá, O., González-Cabrera, J. & Urbaneja, A. 2012b. Efficacy of sulphur on *Tuta absoluta* and its side effects on the predator *Nesidiocoris tenuis*. Journal of Applied Entomology, 136: 401–409.

Study on the pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* on tomato leafminer, *Tuta absoluta*

Farzane Damani Zamani[1], Mohammad Reza Moosavi[1], Rahil Asadi[2]

1. Department of Plant Pathology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

2. Department of Entomology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

Corresponding author: Mohammad Reza Moosavi, email: rmmoosavi@yahoo.com

Received: Feb., 03, 2015 3 (1) 19-32 Accepted: June, 13, 2015

Abstract

Leafminer moth *Tuta absoluta* is a serious insect pest of tomato crops which could impose upto 100% yield loss. This study was conducted to study the pathogenicity of third stage juveniles (IJs) of *Steinernema carpocapsae* (Sc) and *Heterorhabditis bacteriophora* (Hb) on different instars of pest larvae in Petri dish and in a leaf bioassay. The most virulent nematode was selected for the following tests. The ability of different concentrations of the more efficient species in parasitizing the last instar larvae (L_4), pupae in Petri dish (50, 100 and 200 IJs/Petri dish) and pupae in soil (50, 100 and 200 IJs/cm^2 soil) was determined. In the greenhouse experiment, the efficacy of the selected species against different larval stages was examined and compared with chemical pesticide, indoxacarb. Hb was selected as the most effective species since its controlling ability was approximately 1.7 times more than Sc. 50 IJs of Hb per Petri dish parasitized 84% of pest' L_4. The highest mortality of pupae in Petri dishes (40%) and soil (28%) was achieved when IJs were respectively applied at a rate of 200 IJs/Petri dish and 200 IJs/cm^2 soil. Increase in IJs' concentrations resulted in higher mortality of pupae. In the greenhouse, the most susceptible stage of thr insect pest to Hb was L_4, while the chemical pesticide had less effect on pest's larvae. According to the overall results of the study, it seems that Hb could alleviate the damage and produce acceptable control level of the insect pest.

Keywords: Avaunt insecticide, biological control, entomopathogenic nematodes, tomato leafminer moth