



Biopesticides from Entomopathogenic Nematodes

HADI KARIMIPOUR FARD¹ & KARIM SAEIDI²

1. Department of Plant Protection Researches, Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Yasouj, Iran
(✉Corresponding author: karimipourfard@yahoo.com)

2. Department of Plant Protection Researches, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran

Received: 16.01.2019

Accepted: 18.06.2019

Karimipour Fard H. and Saeidi K. 2019. Biopesticides from entomopathogenic nematodes. *Plant Pathology Science* 8(1): 60-73. DOI: 10.2982/PPS.8.1.60.

Abstract : In the recent decade, biopesticides with entomopathogenic nematodes (EPNs) have been developed with using different methods and materials. But the production of such biopesticides has always accompanied by some limitations such as low quality of the final product, and reducing the efficacy under field conditions. Recently, significant progress has been made in increasing in the survival time of these products. Applying two types of formulations, water dispersible granules and calcium alginate capsules, has increased the EPN survival time from 7 days to 180 days. As compare to aqueous formulation, the formulations based on the use of insect cadavers with EPNs, showed higher efficiency in pest control. New methods of the mass production of EPNs, using automated production lines and the use of new additives with better properties for field applications and methods in increasing the infectivity of these nematodes in pests are discussed in this article.

Key words: *Heterorhabditis, Melanoplus, Steinernema*

آفت‌کش‌های زیستی از نماتدهای بیمارگر حشرات

هادی کریمی‌پور فرد^۱ و کریم سعیدی^۲

۱. بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کهگیلویه و بویراحمد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

۲. بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۸

دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶

کریمی‌پور فرد ه. و سعیدی ک. ۱۳۹۷. آفت‌کش‌های زیستی از نماتدهای بیمارگر حشرات. *دانش*

بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۱): ۶۰-۷۳. DOI: 10.2982/PPS.8.1.60.

✉مسئول مکاتبه: karimipourfard@yahoo.com

چکیده: آفت‌کش‌های زیستی از نماتدهای بیمارگر حشرات به روش‌ها و با مواد مختلفی در یک دهه اخیر تولید شده‌اند. اما تولید چنین آفت‌کش‌هایی همواره به دلیل کیفیت کم محصول نهایی، کارایی پایین آنها در کاربرد مزرعه‌ای با محدودیتهایی همراه بوده است. اخیراً پیشرفتهای قابل توجهی در زمینه افزایش زمان بقای فرمولاسیونهای حاوی نماتدهای بیمارگری حشرات به دست آمده است. فرمولاسیونهای گرانول قابل پخش در آب و کپسولهای آلجینات کلسیم، بقای این نماتدها را از هفت روز به ۱۸۰ روز افزایش داده‌اند. همچنین فرمولاسیونهای مبتنی بر استفاده از اجساد حشرات میزبان که حاوی نماتدهای بیمارگر حشرات هستند، نسبت به محلولهای آبی حاوی این گروه از نماتدها کارایی بالاتری در کنترل آفات نشان داده‌اند. روشهای نوین تولید انبوه آفت‌کشهای زیستی از نماتدهای بیمارگر حشرات با استفاده از خطوط تولید خودکار و به‌کارگیری افزودنیهای جدید با خواص بهتر برای کاربردهای مزرعه‌ای و افزایش میزان عفونت‌زایی این نماتدها در آفات، در این مقاله شرح داده شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: *Steinernema*، *Melanoplus*، *Heterorhabditis*

مقدمه

مصرف بیش از اندازه آفت‌کش‌های شیمیایی در عرصه‌های کشاورزی آسیب‌های جدی به خاک، هوا، آب، مجموعه‌های گیاهی و جانوری و انسان‌ها وارد کرده است. نماتدهای بیمارگر حشرات (Entomopathogenic Nematodes) از تیره‌های *Heterorhabditidae* و *Steinernematidae*، نماتدهای انگل اجباری حشرات هستند که به طور بالقوه توانایی بالایی در کنترل آفات کشاورزی دارند (Tofangsazi *et al.* 2014). نماتدهای مربوط به این دو تیره قادرند به‌صورت انتخابی روی بسیاری از حشرات و برخی از بندپایان تأثیرگذارند، بدون این‌که اثر سویی بر پستانداران یا گیاهان داشته باشند (عبداللهی ۱۳۹۱). نماتدهای این دو تیره در خاک‌های اکثر نقاط دنیا یافت می‌شوند و از عوامل انگلی طیف وسیعی از حشرات هستند. دو جنس معروف نماتدهای بیماری‌زای حشرات با دو جنس باکتری همراهی و همزیستی منحصر به فردی دارند، به طوری‌که جنس *Heterorhabditis* با باکتری جنس *Photorhabdous* و جنس *Steinernema* با باکتری جنس *Xenorhabdus* همزیستی دارند و همراهی این باکتری‌ها با نماتدهای مذکور منجر به مرگ حشرات میزبان آنها می‌گردد. زمانی‌که این نماتدها با میزبان مناسب مواجه می‌شوند، لاروهای آزادی و عفونت‌زای آنها که تغذیه‌ای از میزبان ندارند، از طریق منافذ طبیعی مانند دهان، منافذ تنفسی و مخرج وارد بدن آنها شده و باکتری‌های همراه آنها به سرعت در همولنف غنی از مواد غذایی حشرات رشد کرده و توکسین‌ها و سایر متابولیت‌های کشنده حشرات میزبان را تولید می‌کنند که این مواد باعث ایجاد عفونت در همولنف حشرات و مرگ آنها بین ۲۴ تا ۴۸ ساعت

می‌گردد. جنس *Heterorhabditis* توانایی سوراخ کردن دیواره بدن حشره و ورود به آن را نیز دارد. علی‌رغم دامنه میزبانی وسیع نماتدهای بیمارگر حشرات، برای بهره‌داران بی‌خطر بوده و با روش‌های تکثیر به‌صورت تجاری و روش‌های استفاده عملی از آنها جهت کنترل حشرات، سازگاری دارند (Cruz-Martinez et al. 2017). محصولات تجارتي نماتدهای بیمارگر حشرات نسبت به سایر ترکیبات شیمیایی مورد استفاده برای کنترل حشرات، از لحاظ زیست محیطی ایمن هستند. شناخت بیشتر زیست‌شناسی، روش‌های تولید و ذخیره‌سازی فرمولاسیون‌های مربوط به نماتدهای بیمارگر حشرات جهت بهبود و توسعه کاربرد آنها ضروری است. همچنین این‌گونه محصولات علاوه بر این که قابلیت اختلاط با بیشتر آفت‌کش‌ها را دارند، در کشورهایی مانند آمریکا معاف از ثبت هستند. تولید و بهره‌برداری نماتدهای بیمارگر حشرات به منظور کنترل حشرات آفت در مقیاس مزرعه‌ای و سطح وسیع اقدامی در راستای کشاورزی پایدار بوده که به کاهش مسائل و نگرانی‌های جهانی پیرامون انقراض گونه‌ها، زیست‌بوم و تنوع زیستی کمک می‌نماید (Le Vinex and Malan 2013).

بروز مقاومت در حشرات آفت گیاهان نسبت به حشره‌کش‌های شیمیایی، یکی از عوامل مؤثر در تغییر نگرش پژوهشگران در جهت استفاده از روش‌های متفاوت مدیریت حشرات آفات می‌باشد. سازمان‌های نظارتی دولتی در کشورهای مختلف مواردی همچون ایمن بودن از لحاظ زیستی، سمیت کم، دوام کم، و تأثیرات حداقلی ترکیبات شیمیایی بر موجودات غیر هدف در ترکیبات شیمیایی را از ملزومات ثبت آفت‌کش‌ها قرار داده‌اند. مهار زیستی یکی از قوی‌ترین و مهم‌ترین ابزارهای جایگزین سموم شیمیایی در کنترل حشرات آفات است که هم از لحاظ زیست‌محیطی ایمن می‌باشد و هم در راستای کشاورزی پایدار است. نماتدهای بیماری‌زای حشرات با دارا بودن خصوصیات همچون قدرت بیماری‌زایی بالا، قابلیت کشتن میزبان در زمان کم و سادگی کشت و تکثیر در شرایط زنده (*In vivo*) و شرایط درون شیشه‌ای (*In vitro*)، ایمن بودن برای بهره‌داران غیر هدف و محیط زیست اخیراً مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. همچنین در پژوهش‌های اخیر هزینه‌های تولید این نماتدها به دلیل توسعه روش‌های تولید انبوه آنها در محیط‌های مایع نیز کاهش یافته و امکان کاربرد آنها به صورت پاشش روی گیاهان و امکان مخلوط کردن آنها با تعداد زیادی سموم شیمیایی وجود دارد. کاربرد نماتدهای بیماری‌زای حشرات از اوایل ۱۹۸۰ میلادی آغاز شد و به تدریج روند توسعه علمی و فن‌آوری را طی نموده است. تولید انبوه این نماتدها نقش کلیدی در توسعه تجاری آنها برای کنترل حشرات آفت دارد (Mahmoud 2016).

در حال حاضر عامل‌هایی که بر کاربرد نماتدهای بیمارگر حشرات تأثیر گذار هستند، شامل بازار این‌گونه محصولات، گیاهان و حشرات هدف، فرمولاسیون و عمر مفید آنها، دستورالعمل‌های کاربرد آنها و پشتیبانی‌های تکنیکی می‌باشد (Georgis *et al.* 2006, Lacey & Georgis 2012). فرمولاسیون‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در کاربرد موفقیت‌آمیز نماتدهای بیمارگر حشرات به عنوان یک حشره‌کش میکروبی به شمار می‌آید. فرمولاسیون‌های نماتدهای بیمارگر حشرات به فرایندی اطلاق می‌گردد که طی آن نماتدهای زنده به محصولی قابل کاربرد در مصارف عملی تبدیل می‌شوند. نماتدهای بیمارگر حشرات جهت سهولت در نگهداری، انتقال و کاربرد فرموله می‌شوند (Grewal 2002). این فرمولاسیون‌ها بر اساس اصل حفظ انرژی، استوار می‌باشد که برای این منظور محدودیت در حرکت یا کاهش مصرف انرژی مدنظر است. یک فرمولاسیون بهینه می‌بایست خصوصیتی همچون کیفیت پایدار، سهولت در انتقال و کاربرد و تأثیر بالا در کنترل آفات حشره‌ای داشته باشد و به راحتی قابل استفاده در مزرعه باشد (Cruz-Martinez *et al.* 2017).

۱- فرمولاسیون نماتدهای بیمارگر حشرات

عموماً اجزای فرمولاسیون‌ها شامل یک جزء فعال، یک حامل و افزودنی‌ها است. جزء فعال این فرمولاسیون‌ها، نماتدهای بیمارگر حشرات هستند؛ مواد حامل شامل مواد جامد، مایعات، ژل‌ها و جسد حشرات هستند. افزودنی‌ها، مواد مختلفی با عملکردهای متفاوت از قبیل انواع جاذب‌ها، امولسیفایرها، سورفاکتانت‌ها، غلیظ‌کننده‌ها، روان‌کننده‌ها، پخش‌کننده‌ها، مواد ضد میکروب و محافظت‌کننده‌ها در مقابل اشعه ماوراء بنفش می‌باشند (Grewal 2002). هدف اصلی کاربرد افزودنی‌ها در این فرمولاسیون‌ها، افزایش بقا و حفظ بیماری‌زایی نماتدهای بیمارگر حشرات است (Cruz-Martinez *et al.* 2017). اگرچه مرحله‌ی بالغ برخی از حشرات نیز به فرمولاسیون‌های حاوی نماتدهای بیمارگر حشرات حساس هستند، اما این فرمولاسیون‌ها معمولاً برای مراحل لاروی و شفیره‌گی حشراتی که خاک‌زی هستند کاربرد بیشتری دارند و علت آن به رطوبت کافی در خاک برای حرکت نماتد و آلوده کردن حشرات برمی‌گردد. از این رو اغلب فرمولاسیون‌ها از جمله تمامی موارد نامبرده شده در بخش بعدی در زیر خاک و به صورت ریختن آفت‌کش حاوی نماتدهای بیمارگر در اطراف گیاه، استفاده از نوارهای حاوی این نماتدها یا پخش و پاشش روی خاک در سطح وسیع استفاده می‌شوند. نحوه کاربرد آفت‌کش‌های حاوی نماتدهای بیمارگر متناسب

با نوع فرمولاسیون صورت می‌گیرد و این مهم به شدت در یافتن میزبان توسط نماتد، ایجاد آلودگی و کنترل تأثیر خواهد گذاشت (Devi and George 2018).

۲- انواع فرمولاسیون‌ها جهت ذخیره و انتقال نماتدهای بیمارگر حشرات

۲-۱- سوسپانسیون قابل تعلیق در آب: رایج‌ترین فرمولاسیون نماتدهای بیمارگر حشرات که عمدتاً برای ذخیره، حمل و نقل و کاربرد آنها مورد استفاده قرار می‌گیرد، سوسپانسیون قابل تعلیق در آب است (Chen and Glazer 2005). ذخیره‌سازی در دمای بین ۴ تا ۱۵ درجه سلیسیوس این فرمولاسیون‌ها منجر به ۶ تا ۱۲ ماه بقای گونه‌های *Steinernema* و همچنین بین ۳ تا ۶ ماه بقای گونه‌های *Heterorhabdus* می‌گردد (Hazir et al. 2003). عوامل متعددی بر مدت زمان بقای نماتدهای بیمارگر حشرات تأثیر دارند که می‌توان به مواردی همچون ایجاد رسوب در فرمولاسیون‌ها، نیاز به اکسیژن زیاد، کاهش واکنش برخی گونه‌ها به دمای پایین، حساسیت به آلودگی‌های میکروبی، شرایط نگهداری خاص و غلظت مناسب برای هر یک از این گونه‌ها اشاره نمود (Grewal and Petress 2005). همچنین علاوه بر افزایش هزینه‌ها، تأمین برودت لازم نیز مانعی برای حمل و نقل به شمار می‌آید (Grewal 2002).

۲-۲- اسفنج مصنوعی: این نوع فرمولاسیون شامل به‌کارگیری اسفنج پلی‌یورتان (Polyurethane) در یک سوسپانسیون آبی است که حاوی ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ لاروهای عفونت‌زا در هر سانتی‌متر مربع آن است. بنابراین هر اسفنج حاوی پنج تا ۲۵ میلیون لارو سن دوم است که جهت نگهداری در یک کیسه پلاستیکی قرار داده می‌شود. نماتدهایی که به‌صورت اسفنج فرموله می‌شوند، در دمای بین ۵ تا ۱۰ درجه سلیسیوس، بین یک تا سه ماه بقا می‌یابند و برای آزاد سازی نماتدها، اسفنج‌ها در یک ظرف حاوی آب قرار داده می‌شوند. این نوع فرمولاسیون برای پخش انبوه نماتدها مناسب نیست؛ چرا که برای نگهداری نیاز به تأمین برودت دارد و زمان و نیروی کار زیادی مصرف می‌شود و در نهایت مقادیر زیادی ضایعات اسفنجی تولید می‌گردد. بنابراین در حال حاضر این فرمولاسیون‌ها صرفاً جهت ذخیره‌سازی و انتقال مقادیر کم نماتدهای بیمارگر حشرات در جهت کنترل زیستی آفات برای مصارف خانگی مانند باغچه‌های خانگی در اروپا و شمال آمریکا به‌کار می‌روند (Cruz-Martinez et al. 2017).

۲-۳- ورمی‌کولایت: این فرمولاسیون نسب به اسفنج برتری‌هایی از جمله متراکم‌تر بودن محصول، پایداری بیشتر در انبار و کاربرد آسان‌تر، دارد. معمولاً سوسپانسیون آبی به صورت همگن با ورمی‌کولایت

میکرونیزه، مخلوط و این مخلوط در کیسه‌های پلی‌اتیلنی نگه‌داری می‌گردد. با این فرمولاسیون نماتد *Steinernema feltiae* Filipjev ۴ تا ۵ ماه و نماتد *Heterorhabdus megidis* Poinar تا ۳ ماه در دمای ۳ تا ۵ درجه‌ی سلسیوس قابل نگه‌داری است. مخلوط نماتد ورمی‌کولایتی مستقیماً به مخزن سمپاش اضافه، با آب مخلوط و با کاهش فشار سمپاش و استفاده از نازل‌هایی با منفذ درشت، مورد استفاده قرار می‌گیرد. تنها ایراد این فرمولاسیون عدم پایداری محیطی است و می‌بایست پس از خروج از یخچال مورد استفاده قرار گیرد. به دلیل بالا بودن نیاز به آب در این فرمولاسیون، امکان آلودگی به قارچ و باکتری وجود دارد (Grewal and Petress 2005).

۲-۴- ژل‌ها: در ادامه تحقیقات سامانه‌ای برای ذخیره‌سازی و حمل و نقل نماتدهای بیمارگر حشرات ارائه شد که در آن، نماتدها به‌صورت همگن با مواد جاذب مانند پودر کربن فعال شده، مخلوط می‌شوند و به‌صورت کرم در می‌آیند (Yukawa and Pitt 1985). اما این فرمولاسیون معایبی دارد؛ که از آن جمله می‌توان به هزینه بالا و پایداری کم در دمای اتاق اشاره نمود. متعاقباً موادی با استفاده از پلی‌اکریل‌آمید تولید شد، که نماتدهای بیمارگر حشرات را به میزان کمی آب‌گیری و خشک می‌کرد. اما در این روش مدت زمان بقای نماتدها در دمای اتاق کم و مشکلاتی در زمینه حلالیت فرمولاسیون‌ها وجود داشت (Grewal 2002; Cruz-Martinez et al. 2017). پیشرفت قابل ملاحظه دیگری که برای ذخیره‌سازی و نگهداری نماتدهای بیمارگر حشرات صورت پذیرفت، استفاده از ورق‌های آلجینات کلسیم بود که روی صفحات پلاستیکی پخش شده بودند. در تحقیقات دیگری با استفاده از خمیرهای روغنی گیاهی هیدروژنه حاوی مونوگلیسیرید و دی‌گلیسیرید، کپسول‌هایی فرموله شد که به طور معناداری باعث افزایش بقای نماتدهای بیمارگر حشرات گردیدند. در تحقیقات تکمیلی یک فرمولاسیون خمیری ابداع شد که در آن گونه *S. carpocapsae* با روغن هیدروژنه و پلی‌اکریل‌آمید مخلوط شد، این فرمولاسیون منجر به بقای ۸۰ درصدی این گونه پس از ۳۵ روز در دمای ۲۴-۳۵ درجه سلسیوس گردید. با توجه به اینکه این مدت زمان زنده‌مانی و ماندگاری فرمولاسیون از لحاظ تجاری غیر قابل قبول بود، دستیابی و استفاده از کپسول‌های حاوی آلجینات پیشرفت مهمی محسوب می‌شد؛ به طوری که با قرار دادن گونه *S. feltiae* در معرض یک محیط اسمزی و کپسوله کردن آنها در آلجینات باعث زنده‌مانی و درصد بقای ۹۹/۸ درصدی این گونه بعد از ۶ ماه در دمای ۲۳ درجه سلسیوس گردید؛ اما هزینه‌های بالای تهیه این فرمولاسیون، کاربرد آن را برای استفاده در مقیاس وسیع محدود می‌ساخت (Cruz-Martinez et al. 2017).

۲-۵- رس و سایر پودرهای به صورت قرص: در فرمولاسیون‌هایی که به نام فرمولاسیون ساندویچی معروف شدند، نماتدهای بیمارگر حشرات بین دو لایه رس ذخیره می‌شدند. در این فرمولاسیون رس جاذب رطوبت بود ولی علی‌رغم عرضه این فرمولاسیون به بازار، به علت برخی اشکالات از جمله پایداری ضعیف و گرفتگی نازل‌های سم‌پاش و همچنین نسبت پایین نماتد به رس، موفقیتی در بازار نداشت (Grewal 2002). پودرهای دیگری که در این راستا مورد استفاده قرار گرفتند، شامل مخلوطی از آرد یونجه، آرد گندم، روغن ذرت و آب و در مواردی آرد گندم بصورت پاستا بود که جهت جلوگیری از رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها در این نوع فرمولاسیون‌ها فرم‌آلدهید علاوه بر افزودنی‌های پایه که قبلاً اشاره گردید، به مخلوط اضافه گردید. همچنین جهت بهبود عملکرد فرمولاسیون کائولین نیز بعنوان ماده حامل، به فرمولاسیون اضافه شد. هم‌زمان با تولید فرمولاسیون حاوی رس، فرمولاسیونی تولید شد که حاوی مخلوطی از یونجه، آرد گندم، سبوس گندم، روغن ذرت، آب و نماتد *S. feltiae* بود. این فرمولاسیون باعث مرگ و میر ۷۸ درصدی حشرات آفت گونه‌های *Melanoplus spp.* گردید. متعاقباً فرمولاسیونی با گرانول‌های آرد گندم و گونه *S. carpocapsae* تولید شد که پس از ۶ هفته نگهداری در دمای ۲۱ درجه سلیسیوس نرخ بقای پایینی داشت و علت آن رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها به علت وجود رطوبت و آرد گندم در فرمولاسیون بود. این نقیصه با افزودن دو درصد فرمالدهید به مخلوط آرد گندم، بنتونایت (Bentonite)، کائولین و پیت برطرف شد؛ به طوری که گونه مذکور تا ۲۶ هفته با بقای ۹۰ درصدی در دمای ۲۱ درجه سلیسیوس حفظ و باعث مرگ ۱۰۰ درصدی لارو پروانه موم‌خوار گردید. همچنین استفاده از این گرانول در شرایط گلخانه باعث مرگ و میر ۹۰ درصدی کرم ریشه ذرت و لارو سوسک سیب‌زمینی شد. در فرمولاسیون‌هایی که نماتدهای بیمارگر حشرات به صورت قرص یا حبه (Pellet) فرموله می‌شوند، موارد زیر در مدت بقا و حفظ توانایی آلوده‌سازی این نماتدها بسیار با اهمیت است:

(الف) خواص محیط مایعی که این نماتدها در آنها فرموله می‌شوند، به خصوص میزان ویسکوزیته (Viscosity) و pH سوسپانسیون، (ب) خواص بخش گرانولی شامل اندازه و نحوه پخش ذرات، pH و تراکم، (ج) پدیده‌های فیزیکی موجود در قطعات شامل چگونگی انتقال اکسیژن و رطوبت، (د) شرایط نگهداری فرمولاسیون‌ها (چگونگی بسته‌بندی حبه‌ها، فشردگی و فشارهای مکانیکی). تمامی موارد ذکر شده می‌توانند در فرآیند کپسوله کردن این نوع فرمولاسیون‌ها به لحاظ فراهم آوردن نرخ تولید کافی، قابلیت دسترسی، کاهش هزینه‌ها و کیفیت بالا نقش داشته باشند (Cruz-Martinez et al. 2017).

۲-۶- گرانول قابل پخش در آب: با استفاده از گرانول‌های قابل پخش در آب از جنس خاک حاوی دیاتومه پس از ۵ ماه نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، نرخ بقا به بالای ۸۰ درصد و قدرت آلوده‌سازی حشرات به بالای ۶۰ درصد ارتقاء یافت. اخیراً کارایی فرمولاسیون‌ها با کپسوله کردن گونه *Steinernema glaseri* Steiner با استفاده از خاک دیاتومه مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این تحقیقات نشان داده، بقای این نماتد در این فرمولاسیون پس از گذشت ۱۴ روز، ۵۶ درصد است و در ادامه این تحقیقات اثر میزان تبخیر از قطعات دیاتومه روی زمان بقا و آلوده‌کنندگی این گونه در دمای اتاق و مدل انتقال محتوای رطوبتی قطعات دیاتومه از طریق انتشار و تبخیر تشریح گردید. بررسی ریز ساختارهای قطعات حاوی دیاتومه با میکروسکوپ الکترونی نشان داد شکل و اندازه ذرات و خصوصیات حفرات موجود در آنها یکنواخت نیست. زمانی که قطعات حاوی دیاتومه کاهش رطوبت تدریجی دارند، نماتدهای بیمارگر حشرات قادر به ورود به قسمت‌هایی هستند که رطوبت وجود داشته و زمان بقای آنها افزایش می‌یابد. بنابراین محتوای رطوبتی و نرخ کاهش رطوبت قطعات حاوی دیاتومه می‌تواند به پایداری این گونه فرمولاسیون‌ها در دمای اتاق با حفظ توانایی کنترل زیستی نماتدهای بیمارگر حشرات، کمک نماید (Cortes-Martinez et al. 2016, Cruz-Martinez et al. 2017).

۳- فرمولاسیون‌های قابل استفاده در مزرعه

۳-۱- ژل: به منظور حذف معایب ناشی از آزادسازی نماتدهای بیمارگر حشرات از گرانول‌های آلجینات، کایا و نلسن (۱۹۸۵) نماتدهای بیمارگر حشرات گونه *S. feltiae* را در گرانول‌های آلجینات کلسیم با پوشش یک لایه لیپیدی بصورت کپسول شده تهیه کردند. با تغذیه لاروهای پروانه (Huebner) *Spodoptera exigua* از این کپسول میزان مرگ و میر نزدیک به ۱۰۰ درصد بود. در مطالعه دیگر گرانول‌های آلجینات سدیم حاوی *S. feltiae* تولید شد که به صورت مخلوط با بذور گوجه‌فرنگی عرضه گردید. در این فرمولاسیون بذور گوجه‌فرنگی پس از قرار گرفتن در معرض رطوبت جوانه زده و ساختار گرانول را تخریب کرده و متعاقباً نماتدهای بیمارگر حشرات آزاد و باعث مرگ و میر صد در صدی لاروهای پروانه موم‌خوار شدند همچنین قرار دادن نماتد گونه *Steinernema riobravis* Cabanillas در ژل آلجینات کلسیم به همراه عصاره مخمر با افزایش تغذیه لارو حشره گونه *Spodoptera littoralis* (Boisduval) سبب کنترل صد در صدی این گونه گردید. با توجه به علاقه‌مندی پژوهشگران به کاربرد مستقیم نماتدهای بیمارگر حشرات در سطح مزارع، تحقیقی در زمینه فرموله کردن نماتدهای بیمارگر

حشرات با فرموله کردن آنها در یک پوسته آلجینات انجام شد. در این روش محلولی با غلظت بالای یون-های Ca^{2+} به آلجینات اضافه شد و فرمولاسیون حاصله پوسته‌ای کروی بود که هسته مایع درونی را احاطه کرده بود. هسته مایع درونی شامل مخلوطی از آب مقطر با گلوکونولاکتیت (Gluconolactate) و نماتد *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar بود. جهت افزایش ویسکوزیته صمغ زانتان (Xanthan gum) به محلول اضافه شد. این فرمولاسیون مؤثرتر از کاربرد نماتد به صورت پاشش روی سطح خاک علیه کرم ریشه غربی ذرت *Diabrotica virgifera* LeConte بود (Hiltpold *et al.* 2012). اشکال این فرمولاسیون‌ها این بود که نماتدها طی چند روز پس از کپسوله شدن به آسانی در دمای اتاق از کپسول‌ها خارج شدند. این مسئله از لحاظ تجاری‌سازی این فرمولاسیون مشکل‌ساز بود. این مشکل با اتخاذ تدابیری همچون تیمار ثانویه کپسول‌ها با یون Ca^{+2} اصلاح شد و شکل‌گیری و اصلاح این فرمولاسیون یک گام رو به جلو در کاربرد نماتدهای بیمارگر حشرات در مزرعه بود (Kim *et al.* 2015). جهت دستیابی به محصول قابل عرضه به بازار باید فرمولاسیون به گونه‌ای باشد که تا زمان مورد نیاز به آن در کپسول زنده بماند، در طول مدت انبارداری فرمولاسیون، خاصیت بیماری‌زایی و ایجاد عفونت را حفظ و مدت زمان بقای نماتدها در گرانول افزایش یابد. چگونگی و روش‌های تولید انبوه گرانول‌ها، ارزیابی روش‌هایی که نماتدهای بیمارگر حشرات بتوانند از گرانول‌ها در خاک آزاد شوند و همچنین امکان افزایش تعداد این نماتدها در هر گرانول از جنبه‌های پیش رو جهت تکامل این فرمولاسیون‌ها به منظور کاربرد عملی آنها در سطح مزرعه است. اخیراً نیز فرمولاسیون جدیدی بنام گرانول آلجینات هیلتپولد (Hiltpold-alginate granulation) به منظور کاربرد مزرعه‌ای نماتدهای بیمارگر حشرات معرفی شده است (Cruz-Martinez *et al.* 2017).

۲-۳- استفاده از لاشه حشرات آلوده به نماتدهای بیمارگر حشرات : استفاده از لاشه حشرات آلوده به نماتدهای بیمارگر حشرات یکی از راه‌های کاربرد نماتدهای بیمارگر حشرات در مزرعه است (Shapiro-Ilan *et al.* 2008, Lacey *et al.* 2010, Raja *et al.* 2015). در این نوع فرمولاسیون اجساد حشرات به‌عنوان منبع ذخیره نماتدهای بیمارگر حشرات استفاده و اجساد حشرات حاوی نماتد جهت کنترل حشرات آفت در سطح مزرعه پخش می‌شوند. بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داده که این روش نسبت به استفاده از محلول‌های مایع حاوی نماتد، کارایی بهتری در پخش نماتدهای بیمارگر حشرات در سطح مزرعه دارد. البته استفاده از این روش نیز اشکالاتی از جمله شکستن و تخریب اجساد لاروهای حشرات در طول انبارداری و حین حمل و نقل را به‌دنبال دارد که می‌تواند باعث کاهش کارایی و

تأثیرگذاری نماتدهای بیمارگر حشرات گردد. جهت حل این مشکل و حفظ اجساد حشرات به منظور سهولت در انبارداری و حمل و نقل، پوشش اجساد حشرات با مخلوطی از چند ماده از جمله کائولین و نشاسته و یا ژلاتین بی‌بو (Del Valle *et al.* 2009, Ansari 2009, Cruz-Martinez *et al.* 2017) به‌عنوان یک پوشش حفاظتی استفاده می‌گردد. با ابداع یک روش بسته‌بندی ماشینی خودکار روش جایگزین دیگری جهت جلوگیری از تخریب اجساد حشرات حاوی نماتدهای بیمارگر حشرات ارائه گردیده، که طی آن اجساد حشرات در نوار مخصوصی پیچانده می‌شوند (Shapiro-Ilan *et al.* 2010, Morales-Ramos *et al.* 2013). جهت ارزیابی این روش بسته‌بندی، اجساد حشره در این نوار پیچانده شد و نتایج بررسی آنها نشان داد که نماتدهای بیمارگر حشرات موجود در اجساد این حشره هیچ آسیبی ندیدند. استفاده از این دستگاه مکانیکی و الکترونیکی که به‌عنوان یک نمونه اولیه ارائه شده، امکاناتی را فراهم آورده که با بسته‌بندی حشرات حاوی نماتد، ضمن سهولت تولید، منجر به استاندارد شدن محصول نهایی نیز گردید. اسپنسن و همکاران (۲۰۱۱) فن‌آوری را معرفی کردند که با آبگیری و خشک کردن لاروهای پروانه موم‌خوار، سهولت حمل و نقل و کار با اجساد حاوی نماتدهای انگل حشره را فراهم آورده است. متعاقباً روش‌های دیگری از جمله استفاده از محیط کشت [®]Miracle-Gro جهت کاربرد مستقیم اجساد حشرات آلوده به نماتدهای بیمارگر حشرات (Deol *et al.* 2011) و یا تکنیک آبگیری و نگهداری در دمای سرد (Wang *et al.* 2014) جهت بهبود و تولید انبوه اجساد حشرات آلوده به نماتد و کاربرد آن در مزرعه ارائه گردید. جدیدترین روش ارائه شده برای کاربرد مزرعه‌ای نماتدهای بیمارگر حشرات، استفاده و رهاسازی حشرات زنده میزبان این نماتدها است، به طوری که قبل از رهاسازی دارای آلودگی اولیه به این نماتدها هستند (Cruz-Martinez *et al.* 2017). طراحی و تولید فرمولاسیون‌هایی از نماتدهای بیمارگر حشرات که حاوی حشرات زنده و آلوده به نماتدهای انگل حشرات بوده و بتوان آنها را برای استفاده در بخش‌های هوایی گیاه، رهاسازی نمود، از جنبه‌های مهم مطالعات فعلی پیرامون فرمولاسیون‌های نماتدهای بیمارگر حشرات است (Devi and George 2018).

هرچند تولید فرمولاسیون‌های نماتدهای بیمارگر حشرات، پیشرفت بزرگی در کنترل آفات در مزرعه محسوب می‌گردد، اما موفقیت این روش به چند عامل ضروری بستگی دارد که شامل تأثیرات اشعه ماوراء بنفش، رطوبت کافی خاک، رطوبت نسبی و دما بر نماتدهای بیمارگر حشرات می‌باشد. بهبود کارایی و بقای نماتدهای بیمارگر حشرات می‌تواند از طریق بهبود ژنتیکی نیز به وقوع بپیوندد. ویژگی‌های مفید مد نظر در استرین‌های بهبود یافته نماتدهای بیمارگر حشرات شامل تحمل در مقابل شرایط زیست محیطی،

توانایی بیماری‌زایی بالا و ظرفیت تولیدمثلی بالا است. همچنین استفاده از استرین‌های بومی مقاوم به شرایط خاص دمایی و رطوبتی از راهکارهای افزایش کارایی کاربرد نماتدهای بیمارگر حشرات در سطح مزرعه است (Shapiro-Ilan *et al.* 2012, Cruz-Martinez *et al.* 2017).

چندین محصول تجارتي از نماتدهای بیمارگر حشرات که در آمریکای شمالی و اروپا تولید و به بازار عرضه شده اند در جدول ۱ آورده شده‌اند. بیشتر این محصولات نیاز به یخچال جهت نگهداری و تجهیزات سم‌پاشی جهت کاربرد در مزرعه دارند.

نتیجه‌گیری

کاربرد نماتدهای بیمارگر حشرات به عنوان آفت‌کش‌های زیستی جدید به منظور کنترل حشرات آفت در سال‌های اخیر رشد قابل توجهی داشته است. از اواخر ۱۹۷۰ میلادی بیشترین تمرکز تحقیقات بر افزایش زمان انبارداری و حفظ خاصیت آلوده‌کنندگی نماتدهای بیمارگر حشرات در مزرعه بوده است. در این مقاله دو نوع فرمولاسیون نماتدهای بیمارگر حشرات شرح داده شده‌اند که شامل: ۱- فرمولاسیون‌هایی که

جدول ۱. فرمولاسیون‌های مختلف نماتدهای بیمارگر حشرات تولید و عرضه شده در اروپا و آمریکا (Cruz-Martinez *et al.* 2017).

Table 1. Different formulations of entomopathogenic nematodes produced in Europe and USA (Cruz-Martinez *et al.* 2017).

نماتد*	فرمولاسیون	شرکت سازنده	کشور
Ph, Sf, Sc, Hb, Sk,	پلیمر، رس	BASF	آلمان
Sf, Hb, Sc,	پلیمر، رس	e-nema GmbH	آلمان
Hb, Sc, Sf	رس	Andermatt Biocontrol	سوئیس
Sf, Hb, Sc, S sp.	پلیمر، رس	Koppert	هلند
Sc, Sf	رس	Asa Jung Laboratory	آمریکا
Sc, Sf, Hb	گرانول قابل پخش در آب، اسفنج، گرانول	BioLogic	آمریکا
Sc, Sf, S sp., H sp.	اسفنج	Hydro-Gardens	آمریکا
Sc, Sf, Hb	اسفنج	M & R Durango	آمریکا

* Ph=*Phasmarhabditis hermaphrodita*, Sf=*Steinernema feltiae*, Sc=*Steinernema carpocapsae*, Hb=*Heterorhabditis bacteriophora*, Sk=*Steinernema kraussei*, S sp.=*Steinernema* sp., H sp.=*Heterorhabditis* sp.

به منظور ذخیره و انتقال توسعه یافته‌اند و پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در زمینه افزایش زمان بقای این نماتدها از ۷ به ۱۸۰ روز با استفاده از گرانول‌های قابل پخش در آب و کپسول‌های آلجینات کلسیم هستند. ۲- فرمولاسیون‌هایی که جهت کاربرد مستقیم در مزرعه تولید می‌شوند. این فرمولاسیون‌ها قابلیت کاربرد مستقیم نماتدهای بیمارگر حشرات را به‌عنوان یک آفت‌کش زیستی برای کنترل حشرات آفت در مزرعه فراهم می‌آورند و شامل اجساد حشرات حاوی نماتدهای بیمارگر حشرات و گرانول‌های آلجینات می‌باشند. این در حالی است که همچنان امکان بهبود گرانول‌ها (به‌صورت حبه‌های حاوی رس و پودر) به عنوان فرمولاسیون‌هایی که بتوانند ریز ساختارهای بهینه‌ای جهت نگهداری و حمل و نقل حشرات را فراهم آورند، وجود دارد. پژوهش‌های انجام شده در زمینه افزایش زمان انبارداری و بهبود شیوه حمل و نقل فرمولاسیون اجساد حشرات حاوی نماتدهای بیمارگر حشرات نشان داده‌اند که پوشش‌دهی و خشک کردن اجساد حشرات حاوی نماتدهای بیمارگر، پیچاندن اجساد حشرات در نوار مخصوص و معرفی فرمولاسیون جدیدی بنام گرانول آلجینات هیلتپولد، را برای تسهیل کاربرد مزرعه‌ای این آفت‌کش‌های زیستی پیشنهاد کرد.

References

منابع

۱. عبدالهی م. ۱۳۹۱. نماتدهای مرتبط با حشرات با تاکید بر گونه‌های بیمارگر. *دانش بیماری شناسی گیاهی*. ۲(۱): ۳۴-۴۹.
2. Ansari M.A., Hussain M.A., Moens M. 2009. Formulation and application of entomopathogenic nematode-infected cadavers for control of *Hoplia philanthus* in turfgrass. *Pest Management Science* 65: 367–374.
3. Chen S., Glazer I. 2005. A novel method for long-term storage of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* at room temperature. *Biological Control* 32: 104–110.
4. Cortés-Martínez C.I., Ruiz-Vega J., Matadamas-Ortiz P.T., Lewis E.E., Aquino-Bolanos T., Navarro-Antonio J. 2016. Effect of moisture evaporation from diatomaceous earth pellets on storage stability of *Steinernema glaseri*. *Biocontrol Science and Technology* 26: 305–319.
5. Cruz-Martinez H., Ruiz-Vega J., Matadamas-Ortiz P.T., Cortés-Martínez C.A. and Rosas-Díaz J. 2017. Formulation of Entomopathogenic nematodes for crop pest control – a review. *Plant Protection Science* 53(1): 15–24.
6. Del Valle E.E., Dolinski C., Barreto E.L.S., Souza R.M. 2009. Effect of cadaver coatings on emergence and infectivity of the entomopathogenic nematode

- Heterorhabditis baujardi* LPP7 (*Rhabditida: Heterorhabditidae*) and the removal of cadavers by ants. *Biological Control* 50: 21–24.
7. Deol Y.S., Jagdale G.B., Canas L., Grewal P.S. 2011. Delivery of entomopathogenic nematodes directly through commercial growing media via the inclusion of infected host cadavers: a novel approach. *Biological Control* 58: 60–67.
 8. Devi G. and George J. 2018. Formulation of Insecticidal Nematode. *Annual Research & Review in Biology* 24 (5): 1-10.
 9. Georgis R., Koppenhöfer A.M., Lacey L.A., Bélair G., Duncan L.W., Grewal P.S., Samish M., Tan L., Torr P., van Tol R.W.H.M. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological Control* 38: 103–123.
 10. Grewal P.S. 2002. Formulation and application technology. Pp. 265–287. In: R. Gaugler (ed.). *Entomopathogenic Nematology*. Oxfordshire, CABI.
 11. Grewal P.S., Peters A. 2005. Formulation and quality. Pp. 79–90. In: P.S Grewal., R.U Ehlers., D.I. Shapiro-Ilan (eds.): *Nematodes as Biocontrol Agents*. Oxfordshire, CABI.
 12. Hazir S., Kaya H.K., Stock S.P., Keskin N. 2003. Entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology* 27: 181–202.
 13. Hiltbold I., Hibbard B.E., French B.W., Turlings T.C.J. 2012. Capsules containing entomopathogenic nematodes as a Trojan horse approach to control the western corn rootworm. *Plant and Soil* 358: 11–25.
 14. Kaya H.K., Nelsen C.E. 1985. Encapsulation of *Steinernematid* and *Heterorhabditid* nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environmental Entomology* 14: 572–574.
 15. Kaya H.K., Aguilera M.M., Alumai A., Choo H.Y., de la Torre M., Fodor A., Ganguly S., Hazir S., Lakatos T., Pye A., Wilson M., Yamanaka S., Yang H., Ehlers R.-U. 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control* 38: 134–155.
 16. Kim J., Jaffuel G., Turlings T.C.J. 2015. Enhanced alginate capsule properties as a formulation of entomopathogenic nematodes. *BioControl*, 60: 527–535.
 17. 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.
 18. Le Vieux P. & Malan, A.P. 2013. Entomopathogenic nematodes for the control of the vine mealybug (*Planococcus ficus*) in South African wine and table grapes: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 34, 108-118.
 19. Mahmoud M.F. 2016. Biology and use of entomopathogenic nematodes in insect pests biocontrol, a generic view. *Cercetări Agronomice în Moldova*, Vol. XLIX , No. 4 (168): 85-105.

20. Morales-Ramos J.A., Tedders W.L., Dean C.B., Shapiro-Ilan D.I., Rojas M.G. 2013. Apparatus for packaging arthropods infected with entomopathogenic nematodes. U.S. Patent No. US 8,505,236.
21. Raja R.K., Hazir C., Gümüş A., Asan C., Karagözü M., Hazir S. 2015. Efficacy of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* using different application methods in the presence or absence of a natural enemy. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39: 277–285.
22. Shapiro-Ilan D.I., Tedders W.L., Lewis E.E. 2008. Application of entomopathogenic nematode-infected cadavers from hard-bodied arthropods for insect suppression. U.S. Patent No. 7,374,773.
23. Shapiro-Ilan D.I., Morales-Ramos J.A., Rojas M.G., Tedders W.L. 2010. Effects of a novel entomopathogenic nematode-infected host formulation on cadaver integrity, nematode yield, and suppression of *Diaprepes abbreviatus* and *Aethina tumida*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 103–108.
24. Shapiro-Ilan D.I., Han R., Dolinski C. 2012. Entomopathogenic nematode production and application technology. *Journal of Nematology* 44: 206–217.
25. Spence K.O., Stevens G.N., Arimoto H., Ruiz-Vega J., Kaya H.K., Lewis E.E. 2011. Effect of insect cadaver desiccation and soil water potential during rehydration on entomopathogenic nematode (*Rhabditida: Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) production and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 268–273.
26. Tofangsazi N., Cherry R.H., Arthurs S.P. 2014. Efficacy of commercial formulations of entomopathogenic nematodes against tropical sod webworm, *Herpetogramma phaeopteralis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Applied Entomology* 138: 656–661.
27. Wang X., Wang H., Feng Q.-Z., Cui X.-Y., Liu R.-Y., Sun Y.-B., Li G.-C., Tan H., Song D.-M., Liu W., Ruan W.B., Harvey J.A. 2014. Desiccation and cold storage of *Galleria mellonella* cadavers and effects on in vivo production of *Steinernema carpocapsae*. *Pest Management Science* 70: 895–904.