تقييم فعالية أربع عزلات من الفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. على يرقات جادوب أعشاش الصنوبر *Thaumetopoea pityocampa Schiff.*

محمد عبد الحي[1] ومحمد فائز مزيك[2] و وجيه دواليبي[2]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة إدلب، سورية.

(2) مركز البحوث العلمية الزراعية في حلب. ص. ب 4195، حلب، سورية.

الملخص

تم اختبار فعالية **4** عزلات من الفطر الممرض للحشرات ***Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil.** بتركيز **10^5 X1** بوغة كونيدية/مل على يرقات العمر الأخير من جادوب أعشاش الصنوبر ***Thaumetopoea pityocampa* Schiff.** تحت ظروف المختبر في مختبر الحشرات في مركز البحوث العلمية الزراعية بحلب. سجلت أولى اليرقات الميتة بتأثير الفطر بعد **5** أيام من العدوى، وتراوحت نسبة الموت بين **2–8%**، وبعد **7** و **10** أيام من العدوى ارتفعت نسبة الموت لتتراوح بين **24–42%** و **84–96%** على التوالي، وبعد **12** يوماً من العدوى وصلت نسبة الموت بالعزلتين **S1** و **S2** إلى **100%**، بينما لم تسجل أية حالة موت في حشرات الشاهد غير المعامل. كما اختبرت كميات مختلفة من المستحضر الحبيبي للعزلة **S1** على سطح تربة موضوعة في أصص ثم وضعت عليها يرقات مكتملة النمو لتتعذر في هذه التربة تراوحت نسبة الموت بين **59.44–94.72%**، وتراوحت نسبة النمو الفطري على السطح الخارجي للحشرات الميتة بين **41.11–77.13%**. تشير هذه النتائج إلى إمكانية استخدام الفطر الممرض للحشرات ***B. bassiana*** ضمن برنامج إدارة متكاملة لحشرة جادوب أعشاش الصنوبر ***T. pityocampa***.

كلمات مفتاحية: *Thaumetopoea pityocampa*، *Beauveria bassiana*، مكافحة حيوية، نسبة الموت، نمو فطري خارجي.

1- المقدمة:

تعتبر حشرة جادوب أعشاش الصنوبر ***Thaumetopoea pityocampa Schiff.*** من أكثر الحشرات ضرراً على أشجار الصنوبر، ولها أهمية اقتصادية كبيرة [**12**]. ورغم أن الحشرة نادراً ما تقتل الأشجار في الغابات الناضجة، لكنها تسبب خسائر كبيرة في الحجم والنمو العمودي للأشجار [**1**]. وقد تستهلك يرقات العمر الرابع والخامس كلّ الأوراق لبعض أنواع الصنوبر وتبدو الأشجار وكأنها محروقة [**10**].

استخدمت عدة طرائق لمكافحة هذه الآفة (ميكانيكية، كيميائية وحيوية)، لكن أية طريقة مكافحة لم تكن كافية وحدها لمنع فوران مجتمع الحشرة. وقد تكون طريقة المكافحة الحيوية هي الحل الأفضل لمكافحة فوران الحشرة [**11**].

لقد أصبحت الممرضات الفطرية للحشرات وسيلة مهمة من وسائل المكافحة المتكاملة (**IPM**) بسبب التقدم الذي تحقق في إمكانية إنتاجها بكميات كبيرة وتركيب كميات كبيرة من اللقاح بفعالية ثابتة ولأمد طويل نسبياً، وكذلك بسبب فهم آلية الإصابة بهذه الممرضات، والمركبات الجزيئية المؤثرة في عملية الاختراق [**2**]، كما تتوفر الآن معلومات أكثر عن الجينات التي تتحكم بإصابة الحشرات والعوامل التي تزيد أو تنقص من إنتاش الأبواغ الفطرية واختراقها للعائل الحشري [**6، 16**].

يعتبر الفطر ***Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales)** فطراً ممرضاً للحشرات، وقد أظهر قدرة كبيرة لإدراة العديد من الآفات الحشرية المختلفة [**8، 9**]، وهو يستخدم بشكل واسع كعامل مكافحة حيوية في العديد من الدول بسبب سهولة إنتاجه بشكل كمي وهو أمين على معظم الفقاريات [**3**].

ويتزايد الاهتمام الآن باستخدام الكائنات الحية الدقيقة كالفطور والبكتريا والفيروسات لمكافحة الآفات الزراعية، وبشكل خاص في المناطق التي يمنع فيها استخدام المبيدات الزراعية، أو حيث طورت الآفات الزراعية نظام مقاومة

للمبيدات الكيميائية، ويتزايد هذا الاهتمام خاصة بعد أن تم التحقق من أن بعض المبيدات الكيميائية تلوث المياه الجوفية وتدخل السلاسل الغذائية، كما يمكن أن تشكل المبيدات الكيميائية خطراً على الكائنات النافعة وعلى صحة الإنسان والحيوان.

2- أهمية البحث وأهدافه:

نظراً لخطورة هذه الآفة وصعوبة إدارتها فإنه يتحتم اللجوء إلى برنامج إدارة متكاملة يهدف إلى الاستخدام الأمثل لكافة وسائل المكافحة المتاحة ومنها الفطور الممرضة للحشرات التي قد تكون لها أهمية خاصة في مكافحة هذه الحشرة. لذلك فقد هدف هذا البحث إلى:

1. اختبار القدرة الإمراضـــية لأربع عزلات من الفطر ***Beauveria bassiana*** في مكافحة يرقات جادوب أعشاش الصنوبر تحت ظروف المختبر.
2. اختبار كميات مختلفة من المستحضر الحبيبي للعزلة **S1** على سطح تربة موضـــوعة في أصـــص ضـــد يرقات مكتملة النمو من جادوب أعشـــاش الصنوبر.

3- طريقة البحث:

3-1- اختبار القدرة الإمراضية لأربع عزلات من الفطر *Beauveria bassiana* في مكافحة يرقات جادوب أعشاش الصنوبر تحت ظروف المختبر.

3-1-1- زراعة الفطور الممرضة للحشرات وتحضير التراكيز المطلوبة:

1. تمت زراعة الفطور الممرضة للحشرات على بيئات قياسية مثل بيئة **PDA** أو **SDYA** باستخدام معلق بوغي تركيز **10^6 X1** بوغ/مل.
2. بعد نمو الفطور وتبوغ المزارع الفطرية تم حصاد الأبواغ باستخدام محلول **Tween 80** تركيز **0.01%**.

3. تم زراعة **0.1** مل من المعلق البوغي تركيز **1 × 10^6** بوغة كونيدية/مل على طبق بتري يحوي بيئة **PDA**، ثم حضن عند درجة حرارة **20 °س** لمدة **24** ساعة وتم تحديد نسبة إنبات الأبواغ بعدّ **100** بوغة ضمن كل ساحة مجهرية **4** مرات عند التكبير **× 40**. اعتبرت البوغة منتشة إذا أعطت أنبوبة إنبات طولها أكبر من عرض البوغة [7].

4. تم تعديل تراكيز المعلقات البوغية إلى التراكيز المطلوبة لتنفيذ التجربة وتم تعويض النقص في حيوية الأبواغ عند الحاجة.

3-1-2- اختبار فعالية العزلات المدروسة في المختبر:

1. تم جمع يرقات جادوب أعشاش الصنوبر من الأعشاش على أشجار الصنوبر ووضعت في مجموعات من **10** يرقات.

2. وضعت اليرقات في علب بلاستيكية بأبعاد **6 X9 X14** سم. موضوع فيها ورقة ترشيح تغطي كامل قعر العلبة.

3. أعديت كل علبة بـــ **2** مل من معلق بوغي بتركيز **X1 10^5** بوغ/مل، ثم وضعت اليرقات مع أوراق صنوبر من أجل التغذية وأغلقت العلب بأغطية بلاستيكية مثقبة من أجل التهوية.

4. أخذت قراءات موت اليرقات بعد **5، 7، 10 و12** يوماً.

5. وضعت اليرقات الميتة في أطباق بتري فيها أوراق ترشيح مرطبة وحضنت عند درجة حرارة **20 ± 2 °س**.

6. أخذت قراءات النمو الفطري الخارجي على اليرقات الميتة.

2- اختبار كميات مختلفة من المستحضر الحبيبي للعزلة S1 على سطح تربة موضوعة في أصص ضد يرقات مكتملة النمو من جادوب أعشاش الصنوبر.

2-1- تحضير المستحضر الحبيبي للفطر الممرض للحشرات:

1. تم تحضير المستحضر الحبيبي للعزلة **S1** من الفطر الممرض للحشرات ***B. bassiana*** في مختبر الفطور الممرضة للحشرات في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة إيكاردا.
2. وضع **200** مل سميد في كيس بلاستيكي قابل للتعقيم بالأوتوكلاف وتم تعقيمه عند درجة حرارة **120 °س**، لمدة **60** دقيقة.
3. بعد التعقيم أعديت الأكياس بـ **20** مل من معلق بوغي من الفطر تركيز **1 × 10^8** بوغة/مل.
4. نقلت الأكياس إلى غرفة التحضين عند درجة حرارة **2±22 °س**.
5. بعد أربعة أيام تم مزج محتويات الأكياس من أجل تقطيع الميسيليوم لتحفيز تشكيل الأبواغ والحصول على مستحضر حبيبي ذي حبيبات ناعمة ومتجانسة.
6. بعد اكتمال تشكل الأبواغ نقلت الأكياس إلى غرفة التجفيف لتجفيف المستحضر.
7. بعد جفاف المستحضر حسب تركيز الأبواغ الكونيدية/غ، تم تعديل التركيز بإضافة السميد المعقم للحصول على التركيز **1** × 10^9 بوغة/غ.

- تم ملأ **20** أصيصاً بتربة زراعية عادية من تربة محطة الكماري ثم وضع على سطح التربة مستحضر حبيبي للعزلة **S1** من الفطر ***B. bassiana*** بتركيز **1 × 10^9** بوغة/غ وبأربع كميات **0.5** و **1** و **2** و **4 غ**.
- تم جمع يرقات جادوب أعشاش الصنوبر من الأعشاش على أشجار الصنوبر بتاريخ **22** نيسان ووضعت في مجموعات من **10** يرقات. وضعت كل مجموعة يرقات على سطح التربة في نفس اليوم في الأصص المعداة بالمستحضر الحبيبي، ثم غطيت الأصص بأغطية بلاستيكية أسطوانية الشكل مزودة بفتحات دائرية مغطاة بالموسلين من أجل التهوية.

- نفذت التجربة بأربعة مكررات واتبع في تصـميم التجربة التصـميم العشـوائي الكامل.
- أخذت قراءات الموت لليرقات والعذارى المتشـــكلة بعد شـــهرين من تنفيذ التجربة.

وقد نفذت التجربة المخبرية في مخبر الحشرات في مركز البحوث العلمية الزراعية بحلب، ونفذت التجربة نصف الحقلية في محطة بحوث التربة في الكماري التابعة لمركز البحوث العلمية الزراعية بحلب.

3- النتائج والمناقشة

3-1- اختبار فعالية العزلات المدروسة في المختبر:

لوحظ تغير سلوك اليرقات المعاملة بعزلات الفطر بعد **3** أيام من العدوى، حيث لوحظ بطء حركة الحشرات وتوقفها عن التغذية بينما تابعت حشرات الشاهد سلوكها وتغذيتها الطبيعيين.

وقد سجلت أولى يرقات الجادوب الميتة بتأثير الفطر بعد **5** أيام من العدوى (جدول **1**). وتراوحت نسبة الموت بين **2-8%**، وبعد **7** و **10** أيام من العدوى ارتفعت نسبة الموت لتتراوح بين **24-42%** و **84-96%** على التوالي، وبعد **12** يوماً من العدوى وصلت نسبة الموت بالعزلتين **S1** و **S2** إلى **100%**، بينما لم تسجل أية حالة موت في حشرات الشاهد غير المعامل.

3-2- اختبار كميات مختلفة من المستحضر الحبيبي للعزلة S1 على سطح تربة موضوعة في أصص ضد يرقات مكتملة النمو من جادوب أعشاش الصنوبر.

بينت النتائج أن الكميات الأربعة المستخدمة من المستحضر الحبيبي للفطر ***B. bassiana*** سببت نسبة قتل ليرقات جادوب أعشاش الصنوبر في التربة عند احتكاكها بها قبيل نزولها إلى باطن التربة للتعذر (جدول **2**). وتراوحت نسبة موت اليرقات والعذارى بين **59.44-94.72%**، فيما بلغت نسبة الموت

عند حشرات الشاهد **12.5%** فقط. وتراوحت نسبة النمو الفطري على السطح الخارجي للحشرات الميتة بين 41.11–**77.13%**. في حين بلغت نسبة النمو الفطري على السطح الخارجي للحشرات الميتة في الشاهد **7.5%** فقط.

تظهر هذه النتائج الفعالية العالية لجميع العزلات المختبرة من الفطر ***B. bassiana*** في قتل يرقات جادوب أعشاش الصنوبر فبعد **12** يوماً من المعاملة تراوحت نسبة الموت بين **94-100%**، بينما لم تسجل أية حالة موت في حشرات الشاهد المعامل بمحلول **Tween 80** تركيز **0.01%**.

تتفق نتائج سلوك اليرقات وتغذيتها مع نتائج دراسات سابقة تشير إلى تغير في سلوك الحشرات المصابة بالفطور الممرضة للحشرات، فقد أظهرت الدراسات أنه مع أن الحشرات المقتولة بالفطور الممرضة للحشرات تستغرق غالباً وقتاً أطول لتموت مقارنة بمعاملتها بمبيدات الآفات الكيميائية، فإن الضرر للمحصول ينخفض خلال فترة حضانة المرض لأن الحشرات المصابة تأكل أقل من الحشرات السليمة **[15]**. أشارت دراسة سابقة إلى تخفيض معنوي في التغذية عند الحشرات المصابة بأنواع ***Beauveria* sp.** خلال الفترة بين اليوم الأول إلى الرابع من الإصابة **[18]**. لقد افترض أن انخفاض التغذية قد يعود، جزئياً على الأقل، إلى المواد السامة أو التعطيل الميكانيكي بهذه الفطور **[4]**.

كما أن نتائج القدرة الإمراضية لعزلات الفطر ***B. bassiana*** تتفق مع نتائج [5] الذي اختبر **13** عزلة من الفطور الممرضة للحشرات على يرقات جادوب أعشاش الصنوبر فوجد أن **11** عزلة من الفطور المختبرة كانت قادرة على النمو والتبوغ على يرقات الجادوب، وأن نسبة الموت تراوحت بين **16-100%**، وأشارت نتائج القدرة الإمراضية إلى أن عزلة من الفطر ***B. bassiana*** مع ثلاث عزلات من الفطر ***Paecilomyces fumosoroseus*** وعزلة من الفطر ***Metarhizium anisopliae*** سببت أعلى نسبة قتل ليرقات جادوب أعشاش الصنوبر.

تظهر نتائج موت اليرقات بالمستحضر الحبيبي للفطر ***B. bassiana*** إلى أن أعلى نسبة موت لليرقات نتجت عن تطبيق **4 غ**/الأصيص من المستحضر الحبيبي على سطح التربة حيث بلغت نسبة الموت **94.72%**، والتي تفوقت معنوياً على نسبة القتل التي سببتها الكميتين **0.5** و **1 غ** من المستحضر الحبيبي، لكنها لم تختلف معنوياً عن نسبة الموت التي سببتها الكمية **2 غ**/الأصيص والتي بلغت فيها نسبة الموت **77.68%**، كما لم تكن هناك فروق معنوية في نسبة قتل اليرقات التي سببتها الكميات **0.5**، **1** و **2 غ**/أصيص.

كما عكست نتائج النمو الفطري على السطح الخارجي لليرقات الميتة نتائج الموت وبالفروق المعنوية نفسها، حيث بلغت نسبة النمو الفطري على السطح الخارجي لليرقات الميتة التي نتجت عن تطبيق الكمية **4 غ**/أصيص **77.13%** متفوقة معنوياً على نسبة النمو الفطري التي نتجت عن تطبيق الكميتين **0.5** و **1 غ** من المستحضر الحبيبي، لكنها لم تختلف معنوياً عن نسبة النمو الفطري التي نتجت عن الكمية **2 غ**/الأصيص والتي بلغت فيها نسبة النمو الفطري **62.59%**، كما لم تكن هناك فروق معنوية في نسبة النمو الفطري التي نتجت عن الكميات **0.5**، **1** و **2 غ**/أصيص.

ويعتقد أن سبب عدم ظهور النمو الفطري الخارجي على اليرقات المقتولة بالفطر ***B. bassiana*** يعود إلى وجود كائنات حية دقيقة أخرى في التربة قد تنافس الفطر على استعمار الحشرات الميتة لأن التربة المستخدمة تربة طبيعية غير معقمة.

كما أن ظهور النمو الفطري على السطح الخارجي ليرقات الشاهد يعود لوجود الفطر ***B. bassiana*** في التربة المستخدمة في التجربة الذي يعتبر من قاطنات التربة وقد تم عزله من العديد من مناطق البيات الشتوي لحشرة السونة في سورية **[13، 14]**.

تشير نتائج المستحضر الحبيبي إلى إمكانية استخدام هذا الفطر لمكافحة يرقات جادوب أعشاش الصنوبر عند نزولها من أشجار الصنوبر إلى التربة للتعذر

4- الاستنتاجات:

بينت نتائج هذه الدراسة فعالية الفطر الممرض للحشرات ***B. bassiana*** في قتل يرقات جادوب أعشاش الصنوبر ***T. pityocampa***، وهذه النتائج تفتح الباب لإجراء العديد من الدراسات على هذا الفطر ضد هذه الحشرة وبمستحضرات وأشكال تطبيق مختلفة، وتعتبر هذه النتائج على قدر كبير من الأهمية لأنها ستمكن من الاستغناء عن استخدام مبيدات الآفات الكيميائية ضد هذه الآفة في غابات الصنوبر التي تعتبر مستودعاً حيوياً للأعداء الحيوية وتمكن من حماية البيئة والإنسان من ضرر تلك المبيدات الكيميائية.

5- References

1. Avtzis, N.D., **1998** - The use of Bacillus thuringiensis against Thaumetopoea pityocampa Schiff. (**Lepidoptera**: **Thaumetopoeidae**) in Greece. In: Proceedings of Population Dynamics, Impacts and Integrated Management of Forest Defoliating Insects, USDA Forest Service, General Technical Report NE-**247, 311-316**.
2. Bidochka, M. J. & Khachatourians, G. G. **1994**- Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to the host insect cuticle. Applied and Environmental Microbiology, (**54), 1795-1805**.
3. Boucias, D.G. and J.C. Pendland. **1998**- Entomopathogenic fungi: Fungi Imperfecti. Pages **321–364**. In: Principles of Insect Pathology. D.G. Boucias and J.C. Pendland (**Editors**). Klewer Academic Publishers, Boston. **537 pp.**
4. Cheung, P.Y.K. and E. A. Grula. **1982**- In vivo events associated with entomopathology of Beauveria bassiana for the corn earworm (Heliothes zea). Journal of Invertebrate Pathology, (**39), 303-313**.
5. Er, M.K., H. Tunaz and A. Gokce **2007**- Pathogenicity of entomopathogenic fungi to Thaumetopoea pityocampa (**Schiff**.) (**Lepidoptera**: **Thaumetopoeidae**) larvae in laboratory conditions. Journal of Pest Science, (**80), 235-239**.
6. Hajek, A. E. & Leger, R. J. St. **1994**- Interactions between fungal pathogens and insect host. Annual Review of Entomology, (**39**), **293-322.**
7. Hywell-Jones, N. L. and A. T. Gillespie. **1990**- Effect of temperature on spore germination in Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana. Mycological Researches, (**94), 389–392**.
8. Inglis, G.D., M.S. Goettel, T.M. Butt and H. Strasser. **2001**- Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. Pages **23–69**. In: Fungi as Biocontrol Agents: progress, problems and potential. T. M. Butt, C. W. Jackson and N. Magan (**Editor**). CABI Publishing, Wallingford**. 390 pp**.
9. Jaronski, S.T. and M.S. Goettel. **1997**- Development of Beauveria bassiana for control of grasshoppers and locusts. Memoirs of the Entomological Society of Canada, (**171**), **225-237**.

10. Kanat, M. and Alma, M.H. **2004**- Insecticidal effects of essential oils from various plants against larvae of pine Processionary moth, Thaumetopoea pityocampa (**Schiff**.) (**Lepidoptera**: **Thaumetopoeidae**). Pest Management Science, (**60**), **173-177**.
11. Kanat, M. and Özbolat, M. 2006- Mass Production and Release of Calosoma sycophanta L. (**Coleoptera: Carabidae**) Used against the Pine Processionary Moth, Thaumetopoea pityocampa (**Schiff**.) (**Lepidoptera**: **Thaumetopoeidae**), in Biological Control. Turk Journal of zoology, (**30**), **181-185**.
12. Kanat, M., Sivrikaya, F. and Serez, M. 2002- A research on damage of pine processionary moth (**Thaumetopoea pityocampa Schiff**.) on Pinus brutia Ten. trees, and the effect of tending activities on the diameter increment of Calabrian pine in Kahramanmaraş. In: Proceedings of Pine Processionary Moth Symposium (**Ed. M. Kanat**), Kahramanmaraş - Turkey, **44-51 pp**.
13. Parker, B. L., M. Skinner, M. Brownbridge and M. El Bouhssini. 2000- Control of insect pests with entomopathogenic fungi. Arab Journal of Plant Protection, (**18**),**133-138.**
14. Parker, B. L., M. Skinner, D. S. Costa., S. Gouli, W. Reid and M. El Bouhssini. **2003**- Entomopathogenic fungi of Eurygaster integriceps Puton (**Hemiptera: Scutelleridae**): collection and characterization for development. Biological Control, (**27**), **260-272**.
15. Roy, H.E., D.C. Steinkraus, J. Eilenberg, A.E. Hajek and J.K. Pell. 2006- Bizarre interactions and endgame: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. Annual Review of Entomology, (**51**), **331-357.**
16. Schreiter, G. T; Butt, M; Berkett, A; Verstergard, S & Moritz, G. 1994- Invasion and development of Verticillium lecanii in the western flower thrips, Frankliniella occidentalis. Mycological Research, (**98**), **1025-1034.**
17. Tefera, T. and K.L. Pringle. **2003**- Food consumption by Chilo partellus (**Lipedoptera: Pyralidae**) larvae infected with Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae and effects of feeding natural versus artificial diets on mortality and mycosis. Journal of Invertebrate Pathology, (**84), 220-225.**

جدول **1.** متوسط نسبة الموت (± الخطأ القياسي) ليرقات جادوب أعشاش الصنوبر ***Thaumetopoea pityocampa*** عند معاملتها بأربع عزلات من الفطر الممرض لحشرات ***B. bassiana*** بعد **5** و **7** و **10** و**12** يوماً من المعاملة تحت ظروف المختبر

العزلة	متوسط نسبة الموت ± SE			
	بعد 5 أيام	بعد 7 أيام	بعد 10 أيام	بعد 12 يوم
K3	1.79 ± 2b	7.48 ± 40a	6.07 ± 84c	3.58 ± 94b
S1	1.79 ± 2b	1.79 ± 42a	2.19 ± 96a	0 ± 100a
S2	3.35 ± 8a	7.16 ± 32b	4 ± 90b	0 ± 100a
T1	1.79 ± 2b	6.07 ± 24c	5.66 ± 90ab	1.79 ± 98ab
الشاهد	0b	0d	0d	0c

جدول **2**. متوسط نسبة الموت ومتوسط نسبة النمو الفطري الخارجي (± الخطأ القياسي) ليرقات جادوب أعشاش الصنوبر ***Thaumetopoea pityocampa*** عند معاملتها بأربع كميات من المستحضر الحبيبي للعزلة **S1** من الفطر الممرض لحشرات ***B. bassiana*** تحت الظروف نصف الحقلية

كمية المستحضر الحبيبي (غ)	متوسط نسبة الموت ± SE	متوسط نسبة النمو الفطري الخارجي ± SE
0.5	6.24 ± 59.86b	7.16 ± 41.11b
1	6.55 ± 59.44b	5.09 ± 45.83b
2	13.77 ± 77.68ab	17.61 ± 62.95ab
4	3.06 ± 94.72a	10.31 ± 77.13a
الشاهد	6.25 ± 12.50	4.79 ± 7.50c