تحقیقات آفات گیاهی
۱۳۹۳- ۴(۱): ۳۵-۴۶

برهمکنش عصاره چریش و قارچ *Beauveria bassiana* Vuillemin بر زنده‌مانی شپشه دندانه دار *Oryzaephilus surinaemnsis* L. در شرایط آزمایشگاهی

مسعود لطیفیان[1*]، بهار راد[2]، اسماعیل راه خدایی[3] و جهانشیر شاکرمی[4]

۱، ۲ و ۳ به ترتیب استادیار پژوهش، محقق و مربی پژوهش مؤسسه تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری کشور، اهواز، خرمشهر ۴. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۰)

چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی برهمکنش کشندگی عصاره چریش (*Azadirachta indica*) و قارچ *Beauveria bassiana* در جمعیت شپشه دندانه دار در شرایط تغذیه از میوه خرما بود. سازگاری عصاره گیاه چریش و قارچ، با بررسی رشد میسیلومی و درصد جوانه‌زنی قارچ *B. bassiana* به روش اختلاط عصاره با محیط کشت مطالعه شد. پس از آن قدرت کشندگی عصاره چریش به صورت جداگانه و در تلفیق با قارچ *B. bassiana* به روش زیست‌سنجی از طریق غوطه‌ورسازی روی مرحله رشد لارو و حشره‌کامل ارزیابی شد. نتایج نشان داد که قارچ *B. bassiana* در محیط حاوی عصاره چریش توانایی رشد میسیلومی و جوانه‌زنی را دارد. کم‌ترین درصد کاهش جوانه‌زنی و رشد میسیلیومی در غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در لیتر عصاره بوده و به ترتیب معادل ۲/۵ و ۳/۱ درصد کمتر از شاهد بود. کاهش ۵۰ درصدی قدرت جوانه‌زنی و رشد میسیلیومی قارچ به ترتیب در غلظت‌های ۱۹۴۹/۴ و ۳۶۶۷/۴ میکرولیتر در لیتر عصاره چریش اتفاق افتاد. بالاترین شاخص سازگاری قارچ در شرایط اختلاط با غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در لیتر عصاره چریش ایجاد شد که معادل ۷۶/۸۹ درصد بود. Lc_{50} قارچ و عصاره روی لارو و حشره کامل به ترتیب معادل $۱۰ \times ۳/۳۱^{۲}$ و $۱۰ \times ۲/۵^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر و ۳۸۶/۱ و ۶۹۶/۴ میکرولیتردر لیتر ثبت شد. با توجه به نتایج شاخص افزایش، استفاده توام عصاره چریش با قارچ *B. bassiana* اثر افزایشی در مرگ و میر هر دو مرحله رشدی حشره کامل و لارو شپشه دندانه‌دار به ترتیب با ضرایب ۱/۵۷ و ۱/۹۸ داشته است. بکارگیری تلفیق عصاره چریش و قارچ *B. bassiana* می‌تواند کارایی قارچ را افزایش داده و فرمولاسیون نهایی را به عنوان ابزاری مناسب در اختیار مدیریت تلفیقی آفات انباری خرما قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: قارچ *Beauveria bassiana* ، عصاره چریش، سازگاری، افزایشی

*نویسنده مسئول: masoud_latifian@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

شپشه دندانه‌دار *Oryzaephilus surinamensis* L. از آفات مهم انباری در جهان است که به خرما و سایر محصولات انباری خسارت وارد می‌سازد. این حشره مهم‌ترین آفت انباری خرما در استان خوزستان می‌باشد (Latifian, 2002). یکی از روش‌های مهم و عمومی کنترل این آفت استفاده از گازدهی با مواد شیمیایی است. اتیلن دی بروماید، اتیلن اکساید و متیل بروماید مهم‌ترین ترکیباتی هستند که در گازدهی علیه آن در محصولات خشک انباری از جمله خرما استفاده می‌شوند. از سال ۱۹۸۴ استفاده از اتیلن دی بروماید جهت ضدعفونی خرما در بسیاری از کشورهای مهم صادر کننده این محصول حذف شده است زیرا مشخص شده که این گاز دارای خاصیت سرطان‌زایی می‌باشد (Latifian, 2002; Moore *et al*., 2000). در میان عوامل بیمارگر حشرات، قارچ‌ها را می‌توان همراه با آفت‌کش‌های مصنوعی و گیاهی برای کنترل آفات به کار برد و میزان مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی را به میزان قابل توجهی کاهش داد (James & Elzen, 2001). نتایج تحقیقات لطیفیان و همکاران نشان داد جدایه ایرانی c ۴۴۱ قارچ *B. bassiana* توانایی بیمارگری روی مراحل مختلف رشدی شپشه دندانه‌دار را دارد به طوری که غلظت کشنده ۵۰ درصد مربوط به این جدایه روی حشرات کامل و لارو به ترتیب معادل $۲/۵۱\times۱۰^{۴}$ و $۳/۳۱\times۱۰^{۳}$ اسپور در میلی‌لیتر بود. همچنین این جدایه قارچی در طیف دمایی وسیع‌تر و بالاتر دارای رشد میسیلیومی و جوانه‌زنی مناسبی است. لذا برای کاربرد در شرایط انبارداری خرما که بیشتر در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر واقع شده‌اند، مطلوب‌تر می‌باشد (Latifian *et al.*, 2009).

کاربرد قارچ‌ها به تنهایی اغلب در کنترل آفات ناکافی بوده و وارد کردن مواد سازگار در فرمولاسیون‌های قارچی ممکن است اثرات قارچ را روی حشرات آفت افزایش دهد(Ying *et al.*, 2003).وارد کردن مواد شیمیایی و غیر شیمیایی سازگار در فرمولاسیون‌های قارچی اغلب اثرات قارچ را روی حشرات آفت افزایش می‌دهد (Ramakrishana *et al.*, 1999; Furlong & Groden, 2001; Ying *et al.*, 2003). از ترکیبات مختلفی برای افزایش کارایی قارچ *B. bassiana* استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به انواع عصاره‌های گیاهی و انواع پودرهای طبیعی نظیر خاک دیاتومه اشاره کرد(Jackson *et al.*, 2010).

در ارتباط با کاربرد ترکیبات مستخرج از چریش همراه *B. bassiana* گزارش‌های مختلفی وجود دارد. برخی اثرات منفی ترکیبات چریش را روی جوانه زنی و رشد میسیلیومی قارچ *B. bassiana* گزارش کردند (Bajan *et al.*, 1998). برخی دیگر نیز حتی در غلظت‌های بالا هیچ گونه اثرات قارچ کشی از ترکیب آن گزارش نکرده‌اند. به نظر می‌رسد که دو عامل در بروز واکنش‌های مختلف مؤثر باشند. عامل اول نوع جدایه می‌باشد. فیزیولوژی جدایه کاربردی در انتخاب فرمولاسیون تلفیقی عصاره چریش با *B. bassiana* مؤثر است. عامل دوم نیز انتخاب قسمت‌های مختلف گیاه برای عصاره‌گیری است. در مطالعاتی که از عصاره میوه چریش برای اختلاط استفاده نموده‌اند، بروز اثرات سمی بیش‌تر از مطالعاتی بوده که از برگ این درخت برای عصاره‌گیری استفاده شده است (Rodrigues - Lagunes *et al*., 1997).

گاهی اوقات برخی از سموم از طریق ایجاد تغییر رفتار حشره هدف اثرات افزایشی یا کاهشی روی قدرت بیمارگری قارچ *B. bassiana* ایجاد نموده‌اند. نظیر چنین شرایطی در هنگام کاربرد آفت کش ایمیداکلروپرید دیده شده که با تغییر رفتار لاروی باعث حذف کنیدی‌ها روی بدن به دلیل کاهش چسبندگی کنیدی روی بدن شده‌است و به این ترتیب دارای اثرات کاهشی هستند (Boucias & Pendland, 1991).

در مدیریت تلفیقی آفات انباری استفاده از تلفیق عوامل طبیعی از جمله عوامل بیمارگر و سموم گیاهی می‌توانند یک جایگزین مناسب متیل بروماید در ضدعفونی محصولات انباری باشند (Latifian, 2002). در این پژوهش میزان سازگاری قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* و عصاره

Archive of SID

www.SID.ir

چریش به منظور افزایش کارایی قارچ *B. bassiana* در کنترل شپشه دندانه‌دار بررسی شد.

مواد و روش‌ها

الف) تهیه جدایه قارچ و کشت آن در محیط کشت

در این پژوهش جدایه‌ای از قارچ *B. bassiana* با کد Iran 441c استفاده شد. پس از خالص سازی به روش تک اسپور، جدایه قارچی مورد نظر در محیط غذایی SDAY[1] کشت شد. بعد از اسپورزایی کامل (کشت ۱۲-۱۴ روزه) سطح محیط کشت بوسیله سوزن انتقال خراش داده شد. اسپورها در داخل ارلن‌های جداگانه‌ای که حاوی ۱۰ سی‌سی آب مقطر استریل با محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ بود، جمع-آوری شدند. سوسپانسیون فوق به‌منظور پراکنده شدن یکنواخت اسپورها در داخل آن به مدت ۵ دقیقه به طور پاندولی به هم زده شد. سپس سوسپانسیون حاصل سپس از پارچه ململ عبور داده شد.

ب) پرورش شپشه دندانه‌دار

مراحل مختلف رشدی شپشه دندانه‌دار با نمونه‌برداری از خرماهای آلوده از انبارهای خرمای استان خوزستان جمع‌آوری و به آزمایشگاه حشره‌شناسی موسسه تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری انتقال داده شدند. حشرات کامل (ماده و نر) به‌وسیله آسپیراتور جداسازی شدند. پرورش آفت در دمای ۵±۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵ ±۶۰ درصد درون ظروف پلاستیکی درپوش دار حاوی خرما به ابعاد ۸/۵ × ۷/۵ سانتی‌متر که در قسمت درپوش آن‌ها سوراخی جهت تهویه در نظر گرفته شد، انجام گرفت.

ج) عصاره‌گیری از گیاهان

گیاه چریش از بندر خمیر که در استان هرمزگان در موقعیت جغرافیایی ۲۶ درجه و ۵۷ دقیقه عرض شمالی و ۳۵ دقیقه طول شرقی نسبت به نصف النهار گرینویج و در ارتفاع ۱۵ متری از سطح دریا واقع شده‌است و از شمال به کوه و از جنوب به دریا و تنگه خوران، از شرق به دهستان پل و از غرب به دهستان دژگان منتهی می‌شود و حد فاصل حدود ۸۵ کیلومتری غرب بندرعباس و ۱۱۰ کیلومتری شرق بندرلنگه واقع شده‌است، به کمک متخصصین گیاه‌شناس منطقه از رویشگاه طبیعی جمع‌آوری شد. گیاه پس از جمع‌آوری با آب مقطر شستشو داده شد و در اتاق با دمای حدود ۲۸ درجه سلسیوس دور از تابش نور خورشید خشک و سپس در کیسه‌های نایلونی تیره نگهداری شد. پس از خشک شدن بافت گیاهی آسیاب شد. به منظور عصاره‌گیری ۲۰ گرم از پودر خیس شده گیاه داخل دستگاه سوکسله قرار داده شد. در بالن دستگاه ۱۲۰ میلی لیتر استون همراه ۳۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته شد. عصاره‌ای که در مدت ۲ ساعت کار دستگاه جمع‌آوری شد، توسط دستگاه تقطیر در خلا دوار در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه تغلیظ شد. به‌طوری‌که در پایان استخراج حجم عصاره نهایی تغلیظ شده به ۳۰ میلی لیتر رسید. عصاره تهیه شده درون ظروف شیشه‌ای تیره ریخته شده و دهانه آن با پوشش آلومینیوم پوشانده شد و درون یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Mahdavi Arab *et al.*, 2008).

تهیه محیط کشت PDB

فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDA پس از اتوکلاو، در دمای اطاق قرار داده شد تا دمای آن‌ها به ۴۵-۴۲ درجه سلسیوس تنزل یابد. سپس غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر عصاره در لیتر محیط کشت طبق روش (۲۰۰۴) به فلاکس‌های حاوی محیط کشت PDA اضافه و به هم زده شد تا امولسیون یکنواخت بوجود آید و به ترتیب به عنوان غلظت‌های MC, 0.5 MC و MC2 در نظر گرفته شد(Oliveira & Neves 2004). محیط‌های حاصل درون ظروف پتری به قطر ۸ سانتیمتری تقسیم (مقدار تقریبی ۱۰-۱۵ میلی لیتر) و اجازه داده شد تا محیط جامد شود.

تأثیر عصاره در رشد میسیلومی

برای بررسی اثر عصاره روی رشد میسیلومی قارچ *B. bassiana* از محیط کشت PDB استفاده شد. برای این منظور دیسک‌های قارچی به قطر ۵ میلی متر توسط چوب پنبه سوراخ کن از کشت‌های جوان قارچ *B. bassiana* تهیه و در قسمت وسط ظروف پتری دیش حاوی محیط کشت PDB قرار داده شد. برای هر یک از غلظت‌های محیط کشت PDB چهار تکرار در نظر گرفته شد. پتری‌دیش‌ها در انکوباتور در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت

[1] - Suberbed Dextrose Agar + Yeast extract

Archive of SID

www.SID.ir

نسبی۵± ۵۵ درصد و دوره روشنایی ۸ : ۱۶ قرار داده شدند. اندازه گیری از قطر رشد میسیلیومی هر یک از تیمارها به صورت روزانه انجام شد.

تأثیر عصاره در جوانه زنی اسپور

درصد جوانه زنی روی محیط کشت PDB بررسی شد. برای این منظور سوسپانسیونی از اسپورهای قارچ تهیه شد. ابتدا به وسیله یک اسکالپل استریل سطح محیط کشت را خراش داده در ارلن ریخته و مقدار ۱۰ میلی لیتر از محلول Tween 80 ۰/۰۵ درصد به آن افزوده و به هم زده شد و سوسپانسیون حاصله از پارچه ململ دو لایه عبور داده شد تا قطعات میسلیوم از آن جدا شوند. برای شمارش اسپورها و تعیین غلظت سوسپانسیون از لام نئوبار استفاده شد و سپس سوسپانسیونی با غلظت10^4 اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون روی محیط کشت PDB داخل ظرف پتری پخش شد. سوسپانسیون فوق به صورت یک لایه نازک روی PDB پوشش داده شد. درپوش ظرف پتری با پارافیلم بسته شدو در دمای ۵±۲۵ درجه سلسیوس داخل انکوباتور در شرایط کاملاً تاریک قرار داده شد. ۲۴ ساعت پس از تلقیح یک میلی‌لیتر فرمالدئید ۰/۵ درصد به منظور توقف جوانه‌زنی اسپورها به داخل هر ظرف پتری ریخته شد. درصد جوانه‌زنی با شمارش ۱۰۰ اسپور از هر ظرف پتری با بزرگ‌نمایی ۴۰ محاسبه شد. هر تیمار با ۴ تکرار انجام شد.

محاسبه سازگاری

درجه سازگاری بر اساس روش Alves و همکاران (Alves *et al.*, 1998) به شرح ذیل محاسبه شد.

$$T= [(20(M)+80(G)]/100$$

در این رابطه M متوسط رشد میسیلومی و G متوسط درصد جوانه‌زنی قارچ در شرایط اختلاط می‌باشد. پس از محاسبه مقدار پارامتر سازگاری بر اساس روش Alves و همکاران برآورد شد.

تعیین قدرت کشندگی (زیست‌سنجی)

الف- قارچ بیمارگر

جهت شمارش اسپورها و تهیه تراکم‌های مختلف اسپور در واحد حجم از لام نئوبار استفاده شد. برای اندازه‌گیری زنده‌مانی اسپورها روز قبل از آزمایش مقدار اندکی از اسپورهای مورد آزمایش به صورت استریل درون محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ به حالت تعلیق در آمده و روی محیط SDAY کشت شد. روز بعد فقط از کشت‌هایی استفاده می‌شد که بیش از ۸۵ درصد اسپورهای آن جوانه زده بود. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی و تعیین غلظت‌های حداقل و حداکثر، پنج غلظت لگاریتمی شامل غلظت‌های $10^2\times5$، 10^3، $10^3\times5$، 10^4 و $10^4\times5$ اسپور در میلی‌لیتر برای مرحله لارو و غلظت‌های $10^3\times5$، 10^4 و $10^4\times5$، 10^5 و $10^5\times5$ اسپور در میلی‌لیتر برای مرحله حشره‌کامل تهیه و آزمون‌های حیاتی با آن‌ها انجام شد. زیست‌سنجی‌ها با حشرات کامل و لاروهای پرورش یافته روی خرما در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. برای هر تکرار ۲۰ عدد از هر مرحله رشدی استفاده شد. آزمایش‌ها در ۶ تیمار (غلظتهای مختلف و شاهد) و ۴ تکرار انجام گرفت. برای آلوده ساختن حشرات از روش غوطه‌ورسازی استفاده شد. سپس حشرات هر تکرار در قفس‌های مخصوص (ظرف پتری پلاستیکی ضد عفونی شده)که کف آن‌ها برای تغذیه خرما قرار داده شده بود قرار گرفتند و به داخل اتاقک رشد مشابه روش قبل منتقل شدند. مرگ و میر حشرات هر روز و به مدت ۱۰ روز ثبت و جدول مرگ و میر تجمعی آن‌ها پس از مقایسه باشاهد و تصحیح توسط رابطه آبوت تهیه شد.

ب- ترکیبات گیاهی

عصاره مورد آزمایش درون محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ به حالت امولسیون درآمد. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی و تعیین غلظت‌های حداقل و حداکثر، پنج غلظت شامل غلظت‌های ۶۰۰، ۶۵۰، ۷۰۰، ۷۵۰ و ۸۰۰ میکرولیتر در لیتر برای حشره کامل و ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ میکرولیتر در لیتر برای لارو تهیه و آزمون‌های حیاتی با آن‌ها انجام شد. زیست‌سنجی‌ها با حشرات کامل و لاروهای پرورش یافته روی خرما در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. برای هر تکرار ۲۰ عدد از هر مرحله رشدی استفاده شد. آزمایش‌ها در ۶ تیمار (غلظت‌های مختلف و شاهد) و ۴ تکرار انجام گرفت. برای آلوده ساختن، نگهداری و آماربردای حشرات مشابه روش قبل اقدام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

ج- تلفیق ترکیب گیاهی و عامل بیمارگر

پس از تعیین LC_{50} عصاره چریش و عامل بیمارگر براساس روش الف و ب، LC_{50} عامل بیمارگر در تلفیق با LC_{50} عصاره چریش با استفاده از آب مقطر استریل و توئین ۸۰ به صورت مخلوط درآمده و آزمایش‌ها روی هریک از مراحل رشدی لارو و حشره کامل در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. برای آلوده ساختن و نگهداری حشرات مشابه روش قبل اقدام شد.

روش تحلیل داده‌ها

برای نرمال کردن توزیع پراکنش داده‌های درصد مرگ و میر طبیعی به‌دست آمده براساس روش آبوت به $ArcSin\sqrt{x}$ تبدیل شدند. متوسط زمان و غلظت ۵۰ درصد مرگ و میر LT_{50}، LC_{50} با استفاده از رگرسیون لجستیک و به کمک نرم افزار SAS تخمین زده شدند. برای تعیین اثرات افزایشی یا کاهشی شاخص SR مطابق رابطه زیر محاسبه شد.

$$SR=[LT_{50}(\text{تلفیقی})/LT_{50}(\text{عامل})]$$
$$[LT_{50}(\text{ترکیب گیاهی})+LT_{50}(\text{بیمارگر})]$$

چنانچه $SR<1$ باشد، آنگاه ترکیب گیاهی دارای اثرات کاهشی و اگر $SR>1$ باشد، آنگاه ترکیب گیاهی دارای اثر افزایشی بوده است. میانگین صفات براساس روش SNK[1] در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند(Schroeder, 2004) .

نتایج

قابلیت اختلاط ترکیبات گیاهی و عامل کنترل میکروبی

نتایج تجزیه واریانس صفات درصد جوانه‌زنی($ms=۳۴۳/۷۹$ و $df=۲$)، میزان رشد میسیلیومی ($ms=۲۲۱/۶۶$ و $df=۲$)و پارامتر تعیین کننده سازگاری (T) قارچ *B. bassiana* با عصاره چریش ($ms=۰/۱۸$ و $df=۲$) نشان داد که بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد . براساس نتایج تغییرات غلظت عصاره دارای اثرات معنی‌داری روی سه صفت تعیین کننده قابلیت اختلاط ترکیب گیاهی با عامل میکروبی داشته است. نتایج مقایسه میانگین درصد جوانه زنی اسپور قارچ *B. bassiana* در شرایط اختلاط با عصاره چریش در جدول ۱ درج شده است. براساس نتایج با افزایش غلظت به تدریج از توانایی جوانه‌زنی اسپور قارچ *B. bassiana* کاسته شده است. به طوری که کم‌ترین درصد کاهش در شرایط استفاده از غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در لیتر و معادل ۲/۵ درصد نسبت به شاهد بوده است.

نتایج زیست‌سنجی($\chi^2=۰/۸۲$ و$۰/۵۳\pm$ $SE=۱/۵۸\pm$ Slop) نشان داد عصاره چریش با غلظت معادل ۱۹۴۹/۴ میکرولیتر در لیتر، ۵۰ درصد کاهش در توانایی جوانه‌زنی اسپور قارچ *B. bassiana* می‌کند و در صورت افزایش غلظت تا ۳۷۴۲/۸ میکرولیتر در لیتر قدرت جوانه زنی قارچ را ۹۰ درصد کاهش می‌دهد.

نتایج مقایسه میانگین رشد میسیلیومی قارچ *B. bassiana* در شرایط اختلاط با عصاره چریش در جدول ۲ درج شده است. میزان رشد میسیلیومی قارچ *B. bassiana* در غلظت‌های مختلف متفاوت بوده است. از طرفی با افزایش غلظت به تدریج از رشد میسیلیومی قارچ *B. bassiana* کاسته شده است. کم‌ترین درصد کاهش در شرایط استفاده از غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در لیتر عصاره چریش و معادل ۳/۱ درصد بوده است.

نتایج زیست‌سنجی($\chi^2=۰/۸۹$ و$۰/۳۲\pm$ $SE=۱/۶۱\pm$ Slop) نشان داد. برای کاهش ۵۰ و ۹۰ درصدی رشد میسیلیومی قارچ توسط عصاره چریش به غلظتی به ترتیب معادل ۳۶۶۷/۴ و ۶۵۲۹/۶ میکرولیتر در لیتر نیاز است.

نتایج مقایسه میانگین شاخص سازگاری قارچ *B. bassiana* در شرایط اختلاط با عصاره چریش در جدول ۳ درج شده است.

نتایج نشان داد که شاخص سازگاری اسپور قارچ *B. bassiana* در تمام غلظت‌ها در شرایط اختلاط با عصاره چریش با افزایش غلظت به تدریج کاسته شده است. به طوری که بالاترین شاخص سازگاری با غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در لیتر عصاره چریش و معادل ۷۶/۸۹ بوده است. از طرفی بر اساس شاخص T کیفیت اختلاط به گونه‌ای است که کلیه غلظت‌های مورد آزمایش با سوسپانسیون قارچ *B. bassiana* سازگاری دارند.

[1] - Student–Newman–Keuls test

Archive of SID

www.SID.ir

زیست‌سنجی عامل کنترل میکروبی و ترکیبات گیاهی

قارچ *B. bassiana* و عصاره چریش توانایی ایجاد مرگ و میر روی مراحل رشدی لارو و حشره کامل شپشه دندانه‌دار را داشتند. آمار مرگ و میر تجمعی غلظت‌های کشنده ۵۰ و ۹۰ درصد هر تیمار به تفکیک برای حشره کامل و لارو در جدول ۴ درج شده است. متوسط غلظت کشنده ۵۰ درصد قارچ روی لارو و حشره کامل به ترتیب معادل $۱۰ \times ۳/۳۱^{۲}$ و $۱۰ \times ۲/۵^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر بود. متوسط غلظت کشنده ۵۰ درصد عصاره روی لارو و حشره کامل به ترتیب معادل ۳۸۶/۱ و ۶۹۶/۴ میکرولیتردر لیتر بود. زمان کشندگی مراحل رشدی حشره کامل و لارو برای گروه‌هایی که تا پایان آزمایش نیمی از حشرات تلف شده‌اند در جدول ۵ درج شده است. با توجه به نتایج پایین‌ترین زمان ۵۰ درصد کشندگی جمعیت حشره کامل مربوط به غلظت ۸۰۰ میکرولیتر بر لیتر عصاره چریش معادل ۴/۵۸ روز و بالاترین آن مربوط به غلظت ۱۰×۵^{۴} اسپور در میلی‌لیتر از قارچ *B. bassiana* و معادل ۹/۱۷ روز بود . از طرفی پایین‌ترین زمان ۵۰ درصدکشندگی جمعیت لارو مربوط به غلظت ۴۵۰ میکرولیتر بر لیتر عصاره چریش و معادل ۴/۵۸ روز و بالاترین آن مربوط به غلظت $۱۰^{۴}$ اسپور در میلی لیتر از قارچ *B. bassiana* و معادل ۷/۹۲ روز بود.

برهمکنش عامل کنترل میکروبی و ترکیبات گیاهی

نتایج تعیین زمان کشندگی تیمارهای تلفیقی، شاخص SR در جدول ۶ درج گردیده است. براساس نتایج ترکیب عصاره چریش و قارچ *B. bassiana* روی هر دو مرحله رشدی حشره کامل و لارو شپشه دندانه‌دار دارای اثرات افزایش دهنده مرگ و میر بوده‌اند. ضریب اثرات افزایشی مرگ و میر تلفیق قارچ و عصاره روی مرحله رشدی لارو بالاتر از حشره کامل و به ترتیب معادل ۱/۹۸ و ۱/۵۷ بود.

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره چریش مورد آزمایش قابلیت اختلاط با سوسپانسیون اسپور قارچ *B. bassiana* را دارد و کاملاً سازگار می‌باشد. زیست-سنجی‌های انجام شده به‌صورت جداگانه و در حالت ترکیبی نشان داد که عصاره چریش دارای اثرات افزایشی در قدرت بیمارگری قارچ *B. bassiana* روی هر دو مرحله رشدی لارو و حشره کامل شپشه دندانه‌دار در شرایط تغذیه از خرما می‌باشد. عصاره چریش به صورت هورمونی عمل نموده و از طریق تأثیر روی سنتزکیتین و جلد بدن حشره زمینه را برای نفوذپذیری قارچ فراهم می‌کند. تأثیر بیش‌تر این عصاره روی مرحله لارو نسبت به حشره کامل به همین دلیل می‌باشد. مطالعات سایر پژوهشگران نیز نتایج مشابهی نشان داده است. به‌عنوان مثال، در پژوهشی که درخصوص اثرات افزایشی سموم ضد سنتزکیتین در قدرت بیمارگری قارچ *B. bassiana* روی سوسک کلرادوی سیب زمینی انجام شد، مشخص شد که این ترکیبات نسبت به سایر سموم شیمیایی اثرات افزایشی بالاتری نشان داده‌اند. اثر این ترکیبات نیز روی مرحله لاروی این حشره بالاتر از سایر مراحل رشدی بوده است (Sirota and Grafius, 1994). قارچ *B. bassiana* و ترکیبات گیاهی مورد استفاده دارای روش تأثیر متفاوتی می‌باشد. بنابراین اثرات تلفیقی می‌بایست طی یکی از مراحل آلودگی شامل چسبندگی اسپور به بدن حشره، جوانه‌زنی اسپور، نفوذ به درون جلد و یا رشد میسلیوم قارچ درون هوموسل اتفاق بیفتد (Robertsn and Preisler 1992).

در مطالعه مشابهی قابلیت اختلاط قارچ *B. bassiana* و عصاره چریش در کنترل تریپس پیاز *Bemesia tabaci* روی بادمجان با استفاده از سه غلظت ۲۵ ، ۵ و ۱ درصد عصاره بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره چریش با غلظت‌های بالای قارچ شامل $۱۰^{۶}$، $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ اسپور در میلی-لیتر قابلیت اختلاط دارد. غلظت‌های بالای عصاره ویژگی-های مختلف قارچ شامل درصد جوانه‌زنی، رشد میسلیومی، توانایی اسپورزایی، میزان ماده زنده تولیدی و فعالیت آنزیمی ر ا به ترتیب به میزان ۱۲، ۱۳، ۳۵، ۳۸ و ۳۴ درصد کاهش می‌دهد اما در نهایت استفاده از شاخص قابلیت اختلاط مشابه پژوهش حاضر نشان داد که اختلاط عصاره و کنیدی قارچ برای کنترل تریپس پیار مؤثرتر می‌باشد (Islam *et al.*, 2010).

Archive of SID

www.SID.ir

اگر چه اثرات منفی عصاره چریش در جوانه‌زنی و رشد میسیلیومی به گونه‌ای بود که جزو ترکیبات سمی برای قارچ *B. bassiana* محسوب نمی‌شد. ولی اثرات افزایشی نیز از آن‌ها ملاحظه نشد. بنابراین اثرات افزایشی نمی‌تواند ناشی از تأثیر آن‌ها در افزایش جوانه زنی اسپور و رشد میسیلیومی قارچ درون هموسل حشره باشد. اما می‌توانند از طریق تضعیف بدن حشره مکانیسم‌های مقاومت در برابر نفوذ قارچ را کاهش داده و در مرحله نفوذ در بدن حشره مؤثر باشند. این شرایط به‌ویژه برای عصاره چریش که خواص ضد سنتز کیتین دارد، بارز بوده است. مطالعات سایر پژوهشگران با استفاده از میکروسکپ فلورسنت نشان داد که مراحل چسبندگی، جوانه‌زنی و رشد میسیلیومی قارچ *B. bassiana* در شرایط خالص و در ترکیب با سموم ضد سنتزکیتین تفاوت نشان نداده است (Boucias *et al.*, 1996, Quintela and mccoy 1997 a, 1997b, 1998a, 1998b). به طور کلی در مطالعات سایر پژوهشگران اثرات منفی و قارچ‌کشی عصاره چریش با غلظت کمتر از ۵ درصد گزارش نشده است (Sidhu *et al.*, 2004). اما در فرمولاسیون‌های تجاری که در آن‌ها در ترکیبات خاص موجود در عصاره چریش نظیر ترپنوئیدها همراه با امولسیون کننده‌ها و تثبیت‌کننده‌ها استفاده شده چنین اثرات منفی ثبت شده است (Hirose *et al.*, 2001).

مطالعات مشابه با سایر قارچ‌های بیمارگر حشرات نیز نتایج مشابهی داشته است. تلفیق قارچ *Metarhizium anisopline* با ترکیبات گیاهی مختلف اثرات متفاوتی بر رشد میسیلیوم و جوانه‌زنی اسپور آن داشته است. استخراج ترکیبات روغن نیم از میوه چریش به ترتیب باعث کاهش ۲۱/۲۸ و ۱۷/۲۶ درصدی جوانه زنی و رشد میسیلیوم شده است. (Gonzalez *et al.*, 1996; Aguda *et al.*, 1986).

در موارد مشابهی استفاده تلفیقی از *B. bassiana* و عصاره چریش توانسته است سرعت کنترل آفات را افزایش دهد. در مطالعه‌ای که در شرایط مزرعه‌ای کنترل *Bemesia tabaci* روی بادمجان انجام شد. نتایج نشان داد که تلفیق عصاره چریش با قارچ *B. bassiana* دارای اثرات افزایشی بوده و حداقل متوسط زمان کشنده (LT_{50}) در شرایط کاربرد تلفیقی اتفاق افتاده است (Touhidul *et al.*, 2009). نتایج این پژوهش نیز دارای نتایج مشابهی دال بر افزایش سرعت تاثیر قارچ عامل بیمارگر بوده است.

در نهایت بکارگیری تلفیق عصاره چریش و قارچ *B. bassiana* ترکیب مناسبی در فرمولاسیون نهایی برای مدیریت شپشه دندانه‌دار در شرایط انبارهای خرما قابل انتظار می‌باشد. این ترکیب می‌تواند کارایی قارچ *B. bassiana* را افزایش داده، ضمن کاهش غلظت مصرفی در شرایط انبار سرعت تأثیر را افزایش دهد و فرمولاسیون نهایی را به عنوان ابزاری مناسب در اختیار مدیریت تلفیقی آفات انباری خرما قرار دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱– مقایسه میانگین درصد جوانه زنی قارچ *Beauvaria bassiana* در شرایط اختلاط عصاره چریش

Table 1. Comparing the mean percentage germination of the fungus *Beauvaria bassiana* in combination with Neem extract

Concentrations(µL/L)	%Germination± SE	%reduction
250	95.5 ± 1.7 [a]	2.5
750	92.5 ± 0.9 [b]	5.6
1000	84.5 ± 0.7 [c]	13.8

جدول ۲– مقایسه میانگین رشد میسیلیومی قارچ *Beauvaria bassiana* در شرایط اختلاط با عصاره چریش

Table 2. Comparing the mean percentage mycelium growth of the fungus *Beauvaria bassiana* in combination with Neem extract

Concentrations(µL/L)	% mycelium growth± SE	%reduction
250	2.47 ± 0.21 [a]	3.1
750	2.33 ± 0.18 [b]	8.5
1000	2.07 ± 0.11 [c]	18.8

جدول ۳– مقایسه میانگین شاخص (T) قارچ *Beauvaria bassiana* در شرایط اختلاط با عصازه چریش

Table 3. Comparing the mean percentage index T of the fungus *Beauvaria bassiana* in combination with Neem extract

Concentrations(µL/L)	Index T	Compatible Quality
250	76.89 [a]	Co
750	74.31 [b]	Co
1000	68.01 [c]	Co

CO :Compatible

جدول۴– غلظت کشنده تیمارهای مختلف به تفکیک لارو و حشره کامل شپشه دندانه‌دار

Table 4. Lethal concentration of different treatments on Sawtoothed beetle larvae and adults

Treatments	Developmental stage	LC_{50} 95% confidence interval	LC_{90} 95% confidence interval	Slop± SE	(χ^2)
B. bassiana	Adult	2.5×10^4 ($1.8\text{-}4.45\times10^4$)	3.16×10^6 ($8.2\times10^5\text{-}1.32\times10^8$)	2.09±0.45	0.54
	Larvae	3.31×10^2 ($5.4\times10^2\text{-}6.03\times10^2$)	2.26×10^5 ($5.3\times10^4\text{-}1.99\times10^7$)	1.26±0.64	0.64
Neem extract	Adult	696.4 (624.1-768.7)	1568(1491.7-1597.4)	1.5±0.11	0.51
	Larvae	386.1(317.2-455.3)	1219.9(1193.9-1241.5	1.07±0.57	0.59

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- زمان کشندگی عامل کنترل میکروبی و ترکیبات گیاهی در جمعیت لارو و حشره‌کامل شپشه دندانه دار

Table 5. Lethal time of different treatments on Sawtoothed beetle larvae and adults

Treatments	Developmental stage	Concentration	LT_{10}	LT_{50}	LT_{90}
B. bassiana	Adult	5×10^4	8.22	9.17	11.07
	Larvae	10^4	7.06	8.53	9.24
		5×10^5	4.97	6.68	7.93
		10^4	5.84	7.92	9.41
		5×10^4	4.72	6.31	8.24
		10^5	3.61	4.69	6.54
Neem extract	Adult	750	4.3	9.67	17.92
	Larvae	800	3.7	5.58	16.44
		350	4.6	11.31	20.17
		400	3.06	6.67	18.35
		450	1.75	4.58	9.34

جدول ۶- زمان کشندگی و شاخص SR تیمارهای تلفیقی

Table 6. Time and SR index for integrated treatments

Developmental stages	LT_{10}	LT_{50}	LT_{90}	SR
Adult	0.84	1.93	5.18	1.57
Larvae	0.82	1.84	4.94	1.98

Archive of SID

References

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

Alves, S. B., Moino Jr., A. and Almeida, J. E. M. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In Alves S.B. (Ed.). Controle microbiano de insetos, Fealq, São Paulo, pp.217-238.

Bajan, C., Kmitowa, K. and Popowska Nowak, E. 1998. Reaction of various ecotypes of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the botanical preparation NEEM and pyrethroid Fastak. **Archives Of Phytopathology And Plant Protection** 31: 369-375.

Boucias, D. G., and J. C. Pendland. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event of mycoses in arthropod hosts. In G. T. Cole and H. C.Hoch [Eds.]. The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum, New York, pp. 101-128

Boucias, D. G., C. Stokes, G. Storey, and J. C. Pendland. 1996. The effects of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana.* Pßanzenschutz-Nachr. Bayer 49: 103-144.

Furlong, M. J. and Groden, E. 2001. Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleopteran: Chysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine. **Journal of Economic Entomology** 94:344 – 356.

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

www.SID.ir

Hirose, E., P. M. O. J. Neves, J. A. C. Zequi, L. H. Martins, C. H. Peralta and A. Moino Jr. 2001. Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok**. Brazilian Archives of Biology and Technology** 44: 409-423.

Islam, T. M. , A. Olleka and R. Shunxiang. 2010**.** Influence of neem on susceptibility of *Beauveria bassiana* and investigation of their combined efficacy against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* on eggplant. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 98(1): 45–49.

Jackson, M. A., A. D. Christopher. And S. T. Jarsonski. 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **Biocontrol** 55: 129-145.

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

Latifian, M. 2002. The technology of date palm stored pest control. Ahang ghalam publisher. Mashhad, Iran. 100pp. (in Farsi).

Latifian, M., M. Solymannejadian., M. Mosadegh.and J. Hayati. 2009. Pathogenesity of *Beauveria bassiana* on larvae and adult population of Sawtoothed beetle on different date palm cultivars. **Journal of scientific agriculture** 33(1): 21-28. (in Farsi)

Mahdavi Arab, N., Ebadi. R., Hatami. B. and Kh. Talebi jahromi. 2008. Insecticidal effects of some plant extracts on *Callosobrochus maculates* F. under laboratory conditions and Laphigma exigua H. in greenhouse. **Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources** 11:42.221-235.

Moore. D., Lord, J. C. and Smith. S. M. 2000. Pathogens. In : subramanyam, Bh. Agstrum, D. W. (Eds.) Alternatives to pesticides in Stored – product IPM. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, pp. 193-227.

Oliveira, R. C. and neves P. M. O. J 2004. Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. **Neotropical Entomology** 33(3):353-358.

Quintela, E. D., and C. W. McCoy. 1997a. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* Þrst instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. **Environmental Entomology** 26:1173-1182.

Quintela, E. D., and C. W. McCoy. 1997b. Effects of imidacloprid on development, mobility and survival of Þrst instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomolgy** 90: 988-995.

Quintela, E. D., and C. W. McCoy. 1998a. Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. **Journal of Economic Entomolgy** 91:110-122.

Quintela, E. D., and C. W. McCoy. 1998b. Conidial attachment of *Metarhizium aisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. **Journal of Invertebrate Pathology** 72: 220-230.

Ramakrishnan, R., Suiter, D. R., Nakatsu, C. H., Humber, R. A. and Bennett, G. W. 1999. Imidaclopridenhanced *Reticulitermes flavipes* (Isoptera rhinotermitidae) susceptibility to the entomopathogen metarhizium anisopliae. **Journal of Economic Entomology** 92:1125-1132.

Rodrígues Lagunes D. A . , A. L. Tejed o, D. R. Diaz, C. R. Maciel, J. V. Mendoza, E. B. Roman, S. R. Colorado, and E. P. Velasco . 1997. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* yractos acuosos de nim (*Azadirachta indica*) para el control de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*). **Agroecology** 44: 14–19.

Robertson, J. L., and H. K. Preisler. 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC, Boca Raton, FL. Sirota, J. M., and E. Grafius. 1994. Effects of cyromazine on larval survival, pupation and adult emergence of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomolgy**. 87: 577-582.

Schroeder J.W. 2004. Quality forage – storage, sampling and measuring. NDSU Extension Service Circular AS-1255.

Sidhu, O.P., V. Kumar and H. M. Behl. 2004. Variability in triterpenoids (nimbin and salanin) composition of neem among different provenances of India. **Industrial Crops and Products.** 19: 65-75.

Archive of SID

www.SID.ir

Touhidul M. d., Castle, S. J. and Ren , S. 2009. Compatability of insect pathogen fuhgus *Beauveria bassiana*. With neen against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, on egg plant. **Entomologia Experimentalis et applicata** 134(1): 28 – 34.

Ying, S. H., Feng, M. G. and Xu, S. T. 2003. Field efficacy of emulsifiable suspensions of *beauveria bassiana* conidia for control of mysus persicae population on cabbage. **China journal applied entomology** 14:545-548.

Schmale, I., Wackers, F. L., Cardona, C. and Dorn, S. 2001. Control potential of three hymenopteran parasitoid species against the bean weevil in stored beans: The effect of adult parasitoid nutrition on longevity and progeny production. **Biological Control** 21: 134-139.

Siekmann, G., Tenhumberg, B. and Keller, M. A. 2001. Feeding and survival in parasitic wasps: sugar concentration and timing matter. **Oikos** 95: 425-430.

Spafford Jacob, H. and Evans, E. W. 2004. Influence of different sugars on the longevity of *Bathyplectes curculionis* (Hym.: Ichneumonidae). **Journal of Entomology and Nematology** 128(4): 316-320.

Uckan, F. and Ergin, E. 2003. Temperature and food source effects on adult longevity of *Apanteles galleriae* Wilkinson (Hym.: Braconidae). **Environmental Entomology** 32(3): 441-446.

Wäckers, F. L. 2001. A comparison of nectar- and honeydew sugars with respect to their utilization by the hymenopteran parasitoid *Cotesia glomerata*. **Journal of Insect Physiology** 47: 1007-1014.

Wyckhuys, K. A. G., Strange-George, J. E., Kulhanek, Ch. A., Wacker, F. L. and Heimpel, G. E. 2007. Sugar feeding by the aphid parasitoid *Binodoxys communis*: How does honeydew compare with other sugar sources? **Journal of Insect Physiology** 54: 481-491.

Yazdanian, M., Haddad Irani Nejad, K. and Mashhadi Jafarloo, M. 2005. Determining the number of larval instars of the Mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera, Phycitidae) in laboratory conditions. **Agricultural Science** 15: 45-54. (in Farsi).

Archive of SID

www.SID.ir

Plant Pests Research
2014- 4(1): 35-46

Interaction between Neem and *Beauveria bassiana* on survival of sawtoothed beetle (*Oryzaephilus surinaemnsis*) in laboratory conditions

M. Latifian[1], B. Rad[2], I. Rahkhodaei[3] and J. Shakrmi[4]

1, 2 and 3. Assistant Professor, Researcher and Educator Respectively, Date Palm and Tropical Fruit Research Institute of Iran, 4. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Lorestan.

(Received: September 9, 2013- Accepted: November 11, 2013)

Abstract

The aim of this study was to evaluate application of Neem (*Azadirachta indica)* extract with *Beauveria bassiana* against sawtoothed beetle in the nutritional status of the dates. The compatibility between Neem and the fungus was evaluated based on mycellial growth and spore germination of *B. bassiana* by extract medium mixing method. The lethality of Neem extracts individually and in conjunction with *B. bassiana* in the adult and larval population were evaluated by dipping bioassay method. Studies revealed that mycelial growth and spore germination of *B. bassiana* in 250 µl/L concentration of Neem were 3.1 and 2.5% respectively less than control treatment. 50% decreasing in mycelial growth and spore germination was happened at 3679.4 and 1949.4 µl/L of Neem extract respectively. The highest Compatibility of *B. bassiana* was 76.89% recorded at 250 µl/L of Neem extract. The average of LC_{50} in larva and adult population for the fungus was 3.31×10^{2} and 2.5×10^{4} conidia/ml respectively and while with usage neem extract was 386.1 and 696.4 µl/L respectively. According to the results, usage both of Neem extract and *Beauveria bassiana* increases mortality rate of adult and larval population of sawtoothed beetle based on SR indeices with 1.57 and 1.98 reppectivaly. Combined usage of neem extract and fungus *B. bassiana* can increase performance and provide the final formulation as a means of pest management to store dates.

Keywords: *B. bassiana*, Neem, consistency, mortality

*Corresponding author: masoud_latifian@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir