

کنترل بیولوژیک شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) با استفاده از عوامل قارچی و باکتریایی بیماری‌زای حشرات

فریبا سهرابی^{۱*} و فاطمه جمالی^۱

استادیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر.

*مسئول مکاتبه fsohrabi@pgu.ac.ir; f.sohrabi1361@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۶

چکیده

شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta* (Meyrick) یکی از آفات مهم گوجه‌فرنگی در ایران است. در این مطالعه، بیماری‌زایی جدایه‌های *Beauveria bassiana* IRAN 1395C و *Metarhizium anisopliae* IRAN 1018C و فرمولاسیون تجاری از باکتری *Bacillus thuringiensis* روی لاروهای سن دوم این آفت مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌های زیست‌سنجی با روش غوطه‌وری برگ در سوسپانسیون اسپور در دمای 1 ± 25 درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 5 ± 70 درصد و دوره نوری ۸:۱۶ ساعت (روشنایی به تاریکی) تحت شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت. نتایج نشان داد که قارچ *B. bassiana* به صورت مجزا و نیز در ترکیب با قارچ *M. anisopliae* بیش از ۸۰ درصد مرگ و میر در لاروهای آفت پس از گذشت هفت روز از زمان اعمال تیمار را بوجود آورد. کمترین میزان LT_{50} ، به ترتیب ۲۵/۸۴ و ۲۸/۲۵ ساعت، در این دو تیمار مشاهده شد. باکتری *B. thuringiensis* حدود ۶۵ درصد مرگ و میر در لاروهای آفت پس از هفت روز ایجاد نمود که با مرگ و میر ایجاد شده توسط قارچ *B. bassiana* از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. با این حال، جدایه IRAN 1018C قارچ *M. anisopliae* به طور معنی‌دار تاثیر کمتری نسبت به جدایه IRAN 1395C قارچ *B. bassiana* و باکتری *B. thuringiensis* در کنترل لاروهای *T. absoluta* نشان داد.

واژه‌های کلیدی: مینوز گوجه‌فرنگی، *Bacillus thuringiensis*، *Beauveria bassiana*، *Metarhizium anisopliae*

مقدمه

رفتار تغذیه‌ای حشره (دالان زنی)، فقدان یک آستانه‌ی عمل و توانایی آنها در ایجاد نژادهای مقاوم به حشره-کش، محدود است (سیکویرا و همکاران ۲۰۰۰، ۲۰۰۱، لیتی و همکاران ۲۰۰۵). بنابراین، تلفیق کنترل شیمیایی با دیگر روش‌های کنترل (روش‌های زراعی، بیولوژیکی و بیوتکنولوژی) ضروری می‌باشد. بعلاوه، کاربرد مکرر حشره‌کش‌های شیمیایی می‌تواند به موجودات غیر هدف (دسنیوکس و همکاران ۲۰۰۷، لندگرن و همکاران ۲۰۰۹) و محیط زیست آسیب وارد نماید.

قارچ‌های بیماری‌زای حشرات به عنوان عوامل زیستی به ویژه از دهه ۱۹۷۰ موضوع تحقیقات قابل توجهی بوده‌اند. حدود ۷۵۰ گونه قارچ از ۵۶ جنس، بندپایان را آلوده می‌کنند که بر خلاف دیگر عوامل میکروبی، به علت نفوذ

شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) (Meyrick) یکی از مهم‌ترین آفات گوجه‌فرنگی در بسیاری از نقاط جهان از جمله ایران می‌باشد که خسارت زیادی به گوجه‌فرنگی در مناطق مورد حمله وارد می‌کند (گرمین و همکاران ۲۰۰۹، اپو ۲۰۱۰، دسنیوکس و همکاران ۲۰۱۰، بنی‌عامری و چراغیان ۲۰۱۱). این آفت به برگ‌ها، گل‌ها، ساقه‌ها و به ویژه میوه‌ها حمله نموده و می‌تواند ۱۰۰-۸۰ درصد کاهش عملکرد ایجاد نماید (اپو ۲۰۰۵).

در حال حاضر کنترل شب‌پره‌ی مینوز در ایران و کشورهای حوضه‌ی مدیترانه عمدتاً بر اساس حشره-کش‌های شیمیایی است، اگرچه کارایی آنها به دلیل نوع

باکتری چندین دهه است که علیه حشرات آفت به عنوان جایگزینی برای حشره‌کش‌های شیمیایی به کار برده می‌شوند. بیشتر مطالعات صورت گرفته در زمینه‌ی اثر *B. thuringiensis* روی *T. absoluta* در منطقه منشأ این آفت اجرا شده‌اند (جیستالین و همکاران ۲۰۰۱، تئودولز و همکاران ۲۰۰۳، نیدمن و مزا باسو ۲۰۰۶). جیستالین و همکاران (۲۰۰۱) در تحقیقی گزارش نمودند که *Btk* می‌تواند در همه سنین لاروی *T. absoluta* مرگ و میر ایجاد کند و استفاده از *Btk* برای ژنوتیپ‌های مقاوم گوجه‌فرنگی، اثرات سینرژیستی یا افزایشده دارد. بعلاوه، تحقیقات انجام شده در شیلی بیماریزایی دو نژاد بومی *B. thuringiensis* را روی *T. absoluta* نشان داده است و این دو نژاد حتی از نژاد جداسازی شده از دیپل فرموله شده سمی‌تر بوده‌اند (نیدمن و مزا باسو ۲۰۰۶).

هدف از این تحقیق ارزیابی حساسیت لاروهای *T. absoluta* به *B. thuringiensis* و *M. anisopliae* و اثرات سینرژیستی این عوامل میکروبی در کاربرد ترکیبی علیه آفت بوده است.

مواد و روش‌ها

پرورش گیاه میزبان و شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی

T. absoluta

به منظور تشکیل یک کلنی مناسب از شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی جهت انجام آزمایشات، ابتدا پرورش بوته گوجه‌فرنگی به عنوان گیاه میزبان برای حشره انجام شد. بذور گوجه‌فرنگی (رقم سانسید) ابتدا در خزانه درون سینی نشأ در کوکوپیت کشت شدند. پس از جوانه‌زنی، زمانی که ارتفاع بوته‌ها به ۲۰-۱۸ سانتی‌متر رسید، نشاها به گلدان‌های پلاستیکی حاوی مخلوطی از ورمی‌کمپوست، خاک مزرعه و خاک برگ منتقل شده و در اتاقک رشد با دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای 25 ± 1 درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

حشرات کامل *T. absoluta* در اسفند ماه ۱۳۹۴ توسط تور حشره‌گیری از مزارع گوجه‌فرنگی آلوده به آفت در شهرستان دشتستان واقع در استان بوشهر

مستقیم از طریق کوتیکول میزبان، نیازی به بلعیده شدن توسط حشرات برای ایجاد بیماری در آنها ندارند (رایت و رموس ۲۰۰۲). از جمله مهمترین این قارچها می‌توان به *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin و *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin اشاره کرد که دارای شدت بیماریزایی بالا و جوانه زنی و اسپورزایی سریع بوده و همین ویژگی‌ها این دو قارچ را به عنوان عوامل بیوکنترل حشرات جالب توجه ساخته است (الدقیری ۲۰۰۸). در تحقیقی، بیماریزایی چندین ایزوله *M. anisopliae* و *B. bassiana* علیه تخم‌های شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی تحت شرایط آزمایشگاهی با اسپری کردن مستقیم سوسپانسیون با غلظت 10^7 کنیدی/میلی‌لیتر از هر ایزوله روی تخم‌ها از طریق برج پاشش بررسی و معلوم شد که مرگ و میر و تولید کنیدی روی تخم‌ها به طور معنی‌دار با ایزوله‌های *M. bassiana* Qu-B911 *anisopliae* Qu-M558 و *B. bassiana* Qu-B928 و *B. bassiana* Qu-B912 بیشتر بود (مارتا رادریجز و همکاران ۲۰۰۶). در مطالعه‌ی دیگری، اینانلی و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که *M. anisopliae* تاثیر خوبی روی هر دو مرحله‌ی تخم و لارو سن اول *T. absoluta* دارد ولی *B. bassiana* فقط روی مرحله‌ی تخم آفت موثر است. در مقابل، شالابی و همکاران (۲۰۱۳) بیماریزایی این دو قارچ را روی مرحله تخم و لاروهای *T. absoluta* گزارش نمودند بطوریکه بیشترین درصد مرگ و میر را روی لاروهای سن اول (نئونات) مشاهده کردند.

باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Btk*) نیز از جمله عوامل بیمارگر حشرات است که تاکنون موفقیت‌های زیادی در کنترل آفات پروانه‌ای، سخت‌بالپوشان و دوبالان برای آن گزارش شده است (فیتلسون و همکاران ۱۹۹۲، شنیف و همکاران ۱۹۹۸). اگرچه ۳۰۰ گونه، متعلق به ۱۶ راسته از حشرات به عنوان حساس به *B. thuringiensis* گزارش شده‌اند (هوانگ و همکاران ۲۰۰۴)، ولی تعداد مطالعات در مورد کارایی *B. thuringiensis* روی *T. absoluta* محدود بوده است. فرمولاسیون‌های تجاری بر مبنای این

کشور اسپانیا تهیه و غلظت مزرعه‌ای توصیه شده آن برای کنترل لارو پروانه‌ها، معادل ۱/۵ کیلوگرم در هکتار، در آزمایشات استفاده گردید.

ارزیابی اثر عوامل بیمارگر روی مرحله‌ی لاروی آفت
برای زیست‌سنجی مرحله‌ی لاروی شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی *T. absoluta*، ابتدا گلدان‌های گوجه‌فرنگی جهت آلوده‌سازی به مدت ۲۴ ساعت در داخل قفس‌های حاوی شب پره‌ی مینوز نگهداری شدند. سپس گیاهان مورد آزمایش در اتاقک رشد با شرایط دمایی 25 ± 1 درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 70 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت (تاریکی به روشنایی) تا زمان تفریح تخم‌ها و رسیدن لاروها به مرحله‌ی سن دوم لاروی برای تیمار نگهداری شدند. ۷ تیمار عوامل بیمارگر شامل *B. M. anisopliae*، *B. bassiana*، *B. B. bassiana + M. anisopliae thuringiensis*، *M. anisopliae + B. bassiana + B. thuringiensis*، *B. thuringiensis + M. anisopliae* و *B. thuringiensis* استفاده شدند. برای زیست‌سنجی روی مراحل نابالغ آفت از روش غوطه‌وری برگ^۱ استفاده شد. هر برگ جداگانه به مدت ۲۰ ثانیه در محلول سمی مورد نظر غوطه‌ور شد. برگ‌های شاهد در آب مقطر استریل به همراه ۰/۰۲ توئین ۸۰ غوطه‌ور شدند. برگ‌های تیمار شده پس از یک ساعت خشکانده شدن در محیط آزمایشگاه، به ظروف پلاستیکی با درپوش تهویه‌دار با ابعاد $3 \times 6 \times 10$ سانتی‌متر منتقل و لاروهای سن دو مینوز با قلم‌موی بسیار ظریف به روی برگ‌ها انتقال داده شدند. ظروف آزمایش تا زمان ارزیابی مرگ و میر درون اتاقک رشد با شرایط ذکر شده در بالا نگهداری شدند. برای جلوگیری از پژمردگی برگ‌ها و حفظ رطوبت آنها در مدت آزمایش، دم‌برگ آن‌ها در پنبه مرطوب قرار داده شده و با کیسه فریزر اطراف پنبه پوشیده شد تا از تبخیر آب جلوگیری شود. ۴۸ ساعت پس از در معرض قراردادن لاروها با برگ‌های تیمار شده، تعداد لاروهای مرده شمارش و

جمع‌آوری شدند. شب‌پره‌های مینوز در داخل قفس‌های آلومینیومی با ابعاد $60 \times 60 \times 120$ سانتی متر روی بوته‌های رشد یافته گوجه‌فرنگی درون گلدان رهاسازی شدند. دیواره‌ی این قفس‌ها به وسیله‌ی توری با مش ۱۲۰ پوشیده شده بود و سقف آنها نیز شیشه‌ای بود تا عبور نور به راحتی صورت گیرد. این قفس‌ها در یک آزمایشگاه با شرایط دمایی ۱۶-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰-۵۰ درصد نگهداری شدند. طول دوره‌ی نوری در این قفس‌ها به صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بود. هر هفته گلدان‌های حاوی گیاهان گوجه‌فرنگی به کلنی پرورش حشرات اضافه می‌شد تا گیاهان شاداب و سالم برای تخم‌ریزی شب‌پره‌های کامل و تغذیه لاروها همواره در کلنی موجود باشد. پس از تشکیل یک کلنی قوی از حشره در شرایط آزمایشگاهی، از حشرات موجود برای انجام آزمایشات استفاده می‌گردد.

تهیه‌ی قارچ‌ها و باکتری بیمارگر حشرات

جدایه‌های IRAN 1395C قارچ *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* IRAN 1018C از موسسه‌ی تحقیقات گیاهپزشکی کشور دریافت گردیدند. قارچ‌ها در آزمایشگاه با استفاده از محیط کشت جامد سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) به مدت ۱۶-۱۴ روز در دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور رشد داده شدند. کنیدی‌های تولید شده در محیط پس از افزودن ۱۵ میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی توئین ۸۰ به میزان ۰/۰۲ درصد با استفاده از اسکالپل استریل از روی محیط خراش داده شدند و برای حذف میسلیم‌های قارچ، سوسپانسیون اسپور از پارچه لمل عبور داده شد. پس از شمارش اسپورها با استفاده از لام گلبول شمار در سوسپانسیون پایه، سوسپانسیون اسپور با غلظت میلی‌لیتر/ 3×10^7 کنیدی تهیه شد.

در این بررسی فرمولاسیون تجاری باکتری *B. thuringiensis* زیرگونه *kurstaki* (تعداد اسپور سلول زنده 3×10^9 CFU) در هر کیلوگرم و ۸۴ درصد کائولین) به صورت پودر و تابل ساخت شرکت موررا

^۱- Leaf dipping

کشدگی (LT_{50}) مربوط به هر حشره‌کش روی مرحله‌ی لاروی مینوز برگ گوجه‌فرنگی با استفاده از روش پروبیت و با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس با طرح فاکتوریل نشان داد که اثر دو فاکتور نوع حشره‌کش ($F = 74.25$; $df = 6, 126$; $P < 0.0001$) و مدت زمان در معرض قراردگی ($F = 45.04$; $df=5, 126$; $P < 0.0001$) هر کدام به تنهایی روی درصد مرگ و میر *T. absoluta* معنی‌دار بود. بر اساس گروه‌بندی آزمون توکی، از بین حشره‌کش‌های مورد آزمایش نیز قارچ *B. bassiana* و ترکیب دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* بیشترین و قارچ *M. anisopliae* کمترین تاثیر را بر لارو سن دو آفت داشتند (جدول ۱). همچنین بر اساس گروه‌بندی آزمون توکی، بیشترین میزان تلفات آفت در مدت زمان ۱۲۰ ساعت پس از در معرض قراردگی رخ داد (جدول ۲). اثر متقابل دو عامل مدت زمان در معرض قراردگی و نوع سم نیز روی درصد مرگ و میر آفت معنی‌دار بود ($F = 2.97$; $df = 30, 126$; $P < 0.0001$).

لاروهای زنده مانده به برگ‌های سالم گوجه‌فرنگی منتقل شدند. برای هر غلظت سمی و شاهد چهار تکرار (برگ) و در هر تکرار ۱۵-۱۰ عدد لارو آفت در نظر گرفته شد. مرگ و میر لاروها تا هفت روز پس از تیمار به صورت روزانه بررسی و تعیین شد.

تجزیه آماری داده‌ها

داده‌های مربوط به درصد مرگ و میر آفت در تیمارهای مختلف بر مبنای تلفات شاهد با استفاده از فرمول آبوت (آبوت ۱۹۲۵) تصحیح شدند. قبل از انجام تجزیه واریانس، تست نرمالیتیه روی داده‌ها انجام و در صورت نیاز تبدیل داده‌ها صورت گرفت. در ابتدا یک تجزیه واریانس فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی برای بررسی تاثیر دو فاکتور نوع حشره‌کش زیستی (هفت سطح) و زمان (شش سطح) روی درصد مرگ و میر لارو با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. سپس یک تجزیه واریانس جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی نیز برای تعیین اختلاف بین میانگین‌های مرگ و میر در تیمارهای مختلف حشره‌کشی در هر بازه زمانی انجام شد و میانگین‌ها بر اساس آزمون توکی در سطح ۵ درصد گروه‌بندی شدند. همچنین تعیین زمان

جدول ۱- میانگین درصد مرگ و میر لاروهای سن دوم *T. absoluta** توسط حشره‌کش‌های زیستی.

میانگین درصد مرگ و میر	حشره‌کش
۷۸/۵۵ a	<i>B. bassiana</i>
۱۳/۰۰ d	<i>M. anisopliae</i>
۲۹/۲۳ bc	<i>B. thuringiensis</i>
۷۱/۷۶ a	<i>B. bassiana</i> + <i>M. anisopliae</i>
۱۷/۰۶ cd	<i>B. bassiana</i> + <i>B. thuringiensis</i>
۲۰/۰۷ cd	<i>M. anisopliae</i> + <i>B. thuringiensis</i>
۳۹/۳۵ b	<i>B. bassiana</i> + <i>M. anisopliae</i> + <i>B. thuringiensis</i>

* میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون در سطح پنج درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۲- اثر زمان در معرض قرارگیری بر میانگین درصد مرگ و میر لاروهای سن دوم *T. absoluta*.

میانگین درصد مرگ و میر	زمان (ساعت)
۱۹/۳۶ c	۴۸
۲۳/۶۴ bc	۷۲
۲۹/۷۵ b	۹۶
۴۷/۹۱ a	۱۲۰
۵۱/۴۸ a	۱۴۴
۵۸/۴۳ a	۱۶۸

* میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون در سطح پنج درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار ندارند.

۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از کاربرد نشان داد که بیشترین میزان مرگ و میر آفت (۵۸/۸۳-۷۷/۶۷ درصد) مربوط به *B. bassiana* و ترکیب دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* بود ولی در مورد سایر حشره‌کش‌ها، کارایی روی لاروهای مینوز در فواصل زمانی مذکور بسیار پایین بوده و میانگین درصد تاثیر کمتر از ۲۰ درصد بود (جدول ۳). بر اساس نتایج بدست آمده، حشره‌کش‌های *B. bassiana*، *B. bassiana + M. anisopliae*، *B. thuringiensis* و *B. thuringiensis* به ترتیب با ۸۸/۷۸، ۸۳/۳۳، ۷۵ و ۶۴/۸۱ درصد مرگ و میر، بیشترین تاثیر را روی لاروهای شب پرهی مینوز در مدت زمان ۱۶۸ ساعت پس از کاربرد داشتند (جدول ۳).

میانگین درصد مرگ و میر لاروهای شب پره مینوز در زمان‌های مختلف در معرض قرارگیری پس از تیمار در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، بین تیمارهای مختلف حشره‌کشی از نظر درصد تلفات لاروهای سن دو در مدت زمان ۴۸ ساعت ($F = 24.91; df = 6, 21; P < 0.0001$)، ۷۲ ساعت ($F = 14.85; df = 6, 21; P < 0.0001$)، ۹۶ ساعت ($F = 26.18; df = 6, 21; P < 0.0001$)، ۱۲۰ ساعت ($F = 12.16; df = 6, 21; P < 0.0001$)، ۱۴۴ ساعت ($F = 27.20; df = 6, 21; P < 0.0001$) و ۱۶۸ ساعت ($F = 10.62; df = 6, 21; P < 0.0001$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). بررسی درصد مرگ و میر حشره‌کش‌ها روی آفت در فواصل زمانی

جدول ۳- میانگین درصد تلفات \pm خطای معیار ایجاد شده در لاروهای سن دوم *T. absoluta* در اثر حشره‌کش‌های مختلف در زمان‌های ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت پس از کاربرد.*

حشره‌کش	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰	۱۴۴	۱۶۸
<i>B. bassiana</i>	۵۸/۸۳Aa	۷۳/۹۷Aa	۷۷/۶۷Aa	۸۵/۱۱Aa	۸۶/۹۴Aa	۸۸/۷۸Aa
<i>M. anisopliae</i>	۲/۷۸Ab	۶/۴۷Ab	۱۲/۹۴Ab	۱۴/۸۱Ac	۱۶/۶۷Ac	۲۴/۰۸Ad
<i>B. thuringiensis</i>	۱/۶۷Bb	۱/۶۷Bb	۱/۶۷Bb	۵۱/۸۶Aab	۵۳/۹۴Ab	۶۴/۸۱Aabc
<i>B. bassiana + M. anisopliae</i>	۶۱/۱۱Aa	۶۱/۱۱Aa	۷۲/۲۲Aa	۶۹/۴۴Aa	۸۳/۳۳Aa	۸۳/۳۳Aa
<i>B. bassiana + B. thuringiensis</i>	۰Bb	۵/۵۵ABb	۱۴/۱۱ABb	۲۵/۲۲ABbc	۲۵/۲۲ABc	۳۲/۲۶Acd
<i>M. anisopliae + B. thuringiensis</i>	۸/۳۳Bb	۸/۳۳Bb	۱۸/۵۳Bb	۲۲/۲۵Bbc	۲۲/۲۵Bc	۴۰/۷۵Abcd
<i>B. bassiana + M. anisopliae + B. thuringiensis</i>	۲/۷۸Bb	۸/۳۳Bb	۱۱/۱۱Bb	۶۶/۶۷Aa	۷۲/۲۲Aab	۷۵/۰۰Aab

* حروف لاتین بزرگ متفاوت در هر ردیف نشانگر تفاوت معنی‌دار بین زمان‌ها در تیمار مربوطه و حروف لاتین کوچک متفاوت در هر ستون نشانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای حشره‌کش می‌باشد ($P < 0.05$).

۵۰ درصد حشرات آفت در مورد این دو حشره‌کش به طور معنی‌دار کمتر از سایر حشره‌کش‌های بکار برده شده است (جدول ۴).

بر اساس نتایج، کمترین مقدار LT_{50} محاسبه شده مربوط به *B. bassiana* و *M. anisopliae* بود که نشان می‌دهد زمان لازم برای کشتن

جدول ۴- مقادیر LT_{50} حشره‌کش‌های مختلف روی لاروهای سن دوم *T. absoluta*

P-value	$X^2(df=4)$	حدود اطمینان ۹۵ درصد		LT_{50} (ساعت)	Slope \pm SE	حشره‌کش
		حد بالا	حد پایین			
۰/۹۸	۰/۳۹	۵۱/۱۹	۱۴/۰۳	۳۵/۸۴	۱/۷۴ \pm ۰/۴۳	<i>B. bassiana</i>
۰/۸۱	۱/۵۸	۱۸۴۸	۲۰۴/۶۵	۲۹۴/۷۸	۲/۸۳ \pm ۰/۹۹	<i>M. anisopliae</i>
۰/۳۶	۴/۳۶	۱۵۹/۷۴	۱۲۵/۶۸	۱۳۹/۱۹	۳/۸۷ \pm ۰/۶۷	<i>B. thuringiensis</i>
۰/۹۱	۰/۹۷	۵۱/۶	۰/۱۲	۲۸/۲۵	۱/۳۴ \pm ۰/۵۶	<i>B. bassiana</i> + <i>M. anisopliae</i>
۰/۴۳	۳/۸۴	۳۷۹/۶۸	۱۶۹/۴۵	۲۰۹/۰۰	۳/۷۲ \pm ۱/۰۳	<i>B. bassiana</i> + <i>B. thuringiensis</i>
۰/۶۶	۲/۴۰	۷۵۸/۷۸	۱۸۰/۶۶	۲۴۳/۸۲	۲/۴۱ \pm ۰/۷۶	<i>M. anisopliae</i> + <i>B. thuringiensis</i>
۰/۱۱	۷/۵۴	۱۳۰/۳۲	۱۰۹/۸۴	۱۲۰/۲۰	۷/۴۱ \pm ۱/۰۶	<i>B. bassiana</i> + <i>M. anisopliae</i> + <i>B. thuringiensis</i>

متغیر بوده و ویژگی تخصیص میزبانی بین گونه‌های قارچ و حتی در میان جدایه‌های یک گونه متفاوت است (پل و همکاران ۲۰۰۱). در مطالعه‌ی دیگری، کارایی سه عامل میکروبی شامل قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* و باکتری *B. thuringiensis* در کنترل شب-پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی *T. absoluta* مورد بررسی قرار گرفت که بر اساس نتایج این تحقیق آزمایشگاهی، قارچ-های *B. bassiana* و *M. anisopliae* نسبت به باکتری *B. thuringiensis* در کنترل لاروهای *T. absoluta* موثرتر بوده و تاثیر خوبی علیه هر دو مرحله‌ی تخم و لارو نئونات (لاروهای تازه تفریخ شده) آفت نشان دادند و باکتری *B. thuringiensis* تاثیر متوسطی روی مرحله نئونات و لاروهای سن سوم آفت داشت (شالابی و همکاران ۲۰۱۳). با این حال، حساسیت بالای لاروهای *T. absoluta* به توکسین‌های *B. thuringiensis* نیز گزارش

بحث

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، جدایه IRAN 1018C قارچ *M. anisopliae* تاثیر کمی در کنترل لاروهای *T. absoluta* داشت به نحوی که پس از گذشت هفت روز از زمان در معرض قراردادی، فقط ۲۴ درصد مرگ و میر در لاروهای آفت مشاهده شد (جدول ۳). با این حال، بعضی از محققین تاثیر خوب این قارچ در کنترل مراحل لاروی و شفیرگی شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی را گزارش نموده‌اند (اینانلی و همکاران ۲۰۱۲، کانتیریس و همکاران ۲۰۱۴). این اختلاف در نتایج می‌تواند به دلیل تفاوت در جدایه قارچی باشد. در واقع، حتی یک جدایه از منابع مختلف می‌تواند در تولید توکسین و شدت بیماری‌زایی متفاوت بوده و بنابراین نتایج مختلفی بدست آید (تی لاک و همکاران ۲۰۰۴، کنان و همکاران ۲۰۰۸، ماکاکا ۲۰۰۸). سرعت از بین بردن حشره توسط قارچ نیز

به طور خلاصه، نتایج این مطالعه آزمایشگاهی نشان داد که قارچ *B. bassiana* و باکتری *B. thuringiensis* قادرند به طور موثر *T. absoluta* را کنترل کنند. بنابراین، طراحی برنامه‌های کنترل بر اساس این عوامل بیماریزا که بطور موفقیت آمیز آفت را کنترل کرده و در عین حال، اثرات منفی ناچیزی روی موجودات غیر هدف و محیط زیست دارند، امکان‌پذیر است. بعلاوه، تلفیق این تکنولوژی با دیگر عوامل کنترل زیستی مانند سن‌های شکارگر یا پارازیتوئیدها، می‌تواند استفاده از مواد شیمیایی را کاهش داده و در نتیجه بقایای این مواد روی محصول را کاهش داده و به تولید محصول سالم‌تر با کیفیت بهتر منجر شود. نتایج حاصله در این تحقیق می‌تواند راه‌گشای تلاش‌های بیشتر به سوی کاربرد عملی قارچ‌ها و باکتری‌های بیماریزای بومی ایران به عنوان عوامل کنترل زیستی شب-پرهی مینوز گوجه‌فرنگی باشد. لذا پیشنهاد می‌شود سایر ایزوله‌های قارچ و باکتری بیماریزای بومی نیز در حله اول در شرایط آزمایشگاهی روی این آفت آزمایش شوند و پس از انجام مطالعات تکمیلی در شرایط مزرعه، به صورت انبوه تولید شده و در قالب مبارزه تلفیقی در کنار سموم شیمیایی علیه آفت بکار برده شوند. هر چند نمی‌توان این عوامل را کاملاً جایگزین سموم شیمیایی نمود ولی می‌توان تعداد دفعات سمپاشی را کم کرد یا اسپورهای بیمارگر را مخلوط با سموم شیمیایی بکار برد. همچنین انجام مطالعات تکمیلی در مورد فرموله کردن و بهبود روش‌های کاربرد این عوامل زیستی مورد نیاز است.

سپاسگزاری

نگارندگان از پارک علم و فناوری خلیج فارس (استان بوشهر) به خاطر تامین اعتبار لازم جهت اجرای این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

شده است (گنزالز کبریرا و همکاران ۲۰۱۱). در مطالعه‌ی حاضر، باکتری *B. thuringiensis* حدود ۶۵ درصد مرگ و میر در لاروهای آفت پس از هفت روز ایجاد نمود که اگرچه از مرگ و میر ایجاد شده توسط قارچ *B. bassiana* کمتر بود، ولی از نظر آماری تفاوت آنها معنی‌داری نبود (جدول ۳). با این حال، مقدار LT_{50} برای *B. bassiana* به طور مشخص پایین‌تر از باکتری *B. thuringiensis* بود (جدول ۴). وقتی اسپورهای قارچ *B. bassiana* با کوتیکول حشره تماس برقرار می‌کنند قارچ از طریق تماسی به کوتیکول نفوذ کرده و بیماریزایی قارچی عمدتاً با ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی کوتیکول آغاز می‌شود (رایت و رموس ۲۰۰۲، خان و همکاران ۲۰۱۲) در حالیکه بیمارگرهای باکتریایی از نوع تماسی نیستند و باید توسط حشره میزبان بلعیده شوند تا تاثیر بگذارند (براوو و همکاران ۲۰۰۷).

قارچ‌ها و باکتری‌های بیماریزای حشرات برای استفاده در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات (IPM) بسیار مطلوب هستند، زیرا استفاده از آنها نسبتاً ایمن بوده و دارای طیف فعالیت محدودتری نسبت به حشره‌کش‌های شیمیایی هستند. موجودات زنده میکروسکوپی مانند قارچ *B. bassiana* از طریق رابطه‌ی پویای خود با حشرات، در برنامه‌های IPM پایدار می‌باشند. این موضوع موجب افزایش کارایی کنترل، کاهش مقدار حشره‌کش مورد نیاز و به حداقل رساندن خطرات ناشی از آلودگی‌های زیست محیطی و ایجاد مقاومت به آفات می‌گردد. از طرف دیگر، این عوامل برای استفاده به عنوان حشره‌کش‌های زیستی مناسب به نظر می‌رسند چرا که دارای دامنه میزبانی نسبتاً محدودتری بوده و بر تنوع زیستی یا دشمنان طبیعی اثر منفی ندارند (بات و همکاران ۲۰۰۱). یکی دیگر از مزایای مهم استفاده از بیمارگرهای حشرات در برنامه‌های IPM نسبت به آفت‌کش‌های شیمیایی، پتانسیل آنها برای تکثیر و افزایش جمعیت پاتوژن است (فوکسا ۱۹۸۷).

منابع مورد استفاده

Abbott WS, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18: 265-267.

- Al-Deghairi MA, 2008. Bioassay evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* Vuillemin against eggs and nymphs of *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera:Aleyrodidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(12): 1551-1560.
- Baniameri V and Cheraghian A, 2011. The current status of *Tuta absoluta* in Iran. Pp 16-18. *International Symposium on Management of Tuta absoluta* (tomato leafminer), Agadir, Morocco.
- Bravo A, Gill SS and Soberon M, 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49(4): 423-435.
- Butt TM, Jackson CW and Magan N, 2001. *Fungi as biocontrol agents: Progress, Problems and Potential*. Wallingford, Oxon, CAB International.
- Contreras J, Mendoza JE, Martínez-Aguirre MR, Garcia-Vidal L, Izquierdo J and Bielza P, 2014. Efficacy of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology* 107(1): 121-124.
- Desneux N, Decourtye A and Delpuech JM, 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52: 81-106.
- Desneux N, Wajnberg E, Wyckhuys KAG, Burgio G, Arpaia S, Narvaez-Vasquez CA, Gonzalez-Cabrera J, Ruescas DC, Tabone E, Frandon J, Pizzol J, Poncet C, Cabello T and Urbaneja A, 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, history of invasion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science* 83: 197-215.
- EPPO, 2005. Data sheets on quarantine pests, *Tuta absoluta*. *OEPP/EPPO Bulletin* 35: 434-435.
- EPPO, 2010. Archives of the EPPO Reporting Service. Available at: http://archives.eppo.org/EPPOReporting/Reporting_Archives.htm. Accessed 11 February 2010.
- Feitelson JS, Payne J and Kim L, 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Biotechnology* 10: 271-275.
- Fuxa JR, 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. *Annual Review of Entomology* 32: 225-251.
- Germain JF, Lacordaire AI, Conquempot C, Ramel JM and Oudard E, 2009. Un nouveau ravageur de la tomate en France: *Tuta absoluta*. *PHM-Revue Horticole* 512: 37 - 41.
- Giustolin TA, Vendramim JD, Alves SB, Vieira SA and Pereira RM, 2001. Susceptibility of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae) reared on two species of *Lycopersicon* to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Journal of Applied Entomology* 125: 551-556.
- González-Cabrera J, Mollá O, Montón H and Urbaneja A, 2011. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl* 56(1): 71-80.
- Huang Z, Guan C and Guan X, 2004. Cloning, characterization and expression of a new cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* WB9. *Biotechnology Letters* 26: 1557-1561.
- Inanli C, Yoldaş Z and Birgücü AK, 2012. Effects of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Bals.) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) on larvae and egg stages of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 49(3): 239-242.
- Kannan SK, Murugan K, Naresh Kumar A, Ramasubramanian N and Mathiazhagan P, 2008. Adulticidal effect of fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* on malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *African Journal of Biotechnology* 7(6): 838-841.
- Khan S, Guo L, Maimaiti Y, Mijit M and Qiu D, 2012. Entomopathogenic fungi as microbial agent. *Molecular Plant Breeding* 3(7): 63-79.

- Landgren O, Kyle RA, Hoppin JA, Beane Freeman LE, Cerhan JR, Katzmann JA, Rajkumar SV and Alavanja MC, 2009. Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study. *Blood* 113: 6386–6391.
- Lietti MMM, Botto E and Alzogaray RA, 2005. Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology* 34(1): 113-119.
- Makaka C, 2008. The efficacy of two isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschin) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the adults of the black maize beetle *Heteronychus licas* Klug (Coleoptera: Scarabidae) under laboratory conditions. *African Journal of Agricultural Research* 3(4): 259-265.
- Marta Rodríguez S, Marcos Gerding P and Andrés France I, 2006. Entomopathogenic fungi isolates selection for egg control of tomato moth, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) eggs. *Agricultura Técnica (Chile)* 66 (2): 151-158.
- Niedmann LL and Meza-Basso L, 2006. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de manejo integrado de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. *Agricultura Técnica* 66: 235–246.
- Pell JK, Eilenberg J, Hajek AE and Steinkraus DC, 2001. Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. Pp. 71-154 In: Butt TM, Jackson CW and Magan N (eds.), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford, UK.
- SAS Institute, 2003. *The SAS system for Windows, Release 9.0*. SAS, Institute, Cary, NC.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler D and Dean D, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775–806.
- Shalaby HH, Faragalla FH, El-Saadany HM and Ibrahim AA, 2013. Efficacy of three entomopathogenic agents for control the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Natural Science* 11(7): 63-72.
- Siqueira HA, Guedes RN and Picanço MC, 2000. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agricultural and Forest Entomology* 2: 147-153.
- Siqueira HA, Guedes RN, Fragoso DB and Magalhães LC, 2001. Abamectin resistance and synergism in brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *International Journal of Pest Management* 47: 247-251.
- Thi Loc N, Bich Chi VT, Nhan NT, Thanh ND, Be Hong TT and Hung PQ, 2004. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* against coconut beetle, *Brontispa longissima*. *Omonrice* 12: 85-91.
- Theoduloz C, Vega A, Salazar M, González E and Meza-Basso L, 2003. Expression of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin cry1Ab gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mills). *Journal of Applied Microbiology* 94: 375–381.
- Wright SP and Ramos ME, 2002. Application parameters affecting field efficacy of *Beauveria bassiana* foliar treatments against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Biological Control* 23: 164–178.

Biological Control of Tomato Leafminer Moth, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) Using Entomopathogenic Fungi and Bacteri

Fariba Sohrabi^{*1} and Fatemeh Jamali¹

¹Assistant Professors, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.

*Corresponding Author: fsohrabi@pgu.ac.ir; f.sohrabi1361@gmail.com.

Received: 28 August 2016

Accepted: 10 October 2017

Abstract

Tuta absoluta (Meyrick) is one of the most important pests of tomato crops in Iran. In this study, the pathogenicity of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* isolate Iran 1395C and *Metarhizium anisopliae* isolate Iran 1018C and a commercial formulation of *Bacillus thuringiensis* was evaluated against 2nd instar larvae of this pest. The experiments were performed by leaf dipping bioassay method at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and $70 \pm 5\%$ R.H. under laboratory conditions. The results showed that *B. bassiana* alone and in combination with *M. anisopliae*, caused more than 80% mortality in *T. absoluta* larvae seven days after treatment. The lowest LT_{50} , 35.84 and 28.25 h, was observed in these two treatments, respectively. The mortality rate for *B. thuringiensis* was about 65%, seven days after treatment. There was no significant difference between mortality caused by *B. thuringiensis* and *B. bassiana*. However, *M. anisopliae* isolate Iran 1018C showed significantly lower effect than *B. bassiana* Iran 1395C and *B. thuringiensis* against *T. absoluta* larvae.

Keywords: Tomato leafminer, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.