آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۷، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۸

ارزیابی سه جدایه از قارچ *Beauveria bassiana* روی شپشه دندانه‌دار *Oryzaephilus surinamensis* و اثر دماهای مختلف روی جوانه‌زنی و رشد میسلیوم آن‌ها

Evaluation of three *Beauveria bassiana* isolates on saw-toothed beetle *Oryzaephilus surinamensis* and the effect of different temperature on their germination and mycelium growth

مسعود لطیفیان[۱]*، ابراهیم سلیمان نژادیان[۲]، مهران غزوی[۳]، جمشید حیاتی[۲]، سید محمد سعید مصدق[۲] و پرستو نیکبخت[۱]

۱- مؤسسه تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری کشور، اهواز
۲- دانشگاه شهید چمران اهواز، ۳- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران
(تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۸۷؛ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸۷)

چکیده

قارچ *Beauveria bassiana* یکی از عوامل بیمارگر شپشه دندانه‌دار خرما، *Oryzaephilus surinamensis* می‌باشد. جهت ارزیابی این قارچ، اثر دماهای مختلف در جوانه‌زنی و رشد میسلیوم، و قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی مراحل لارو و حشره کامل آفت مطالعه گردید. نتایج نشان داد که از نظر قدرت جوانه زنی و رشد میسلیومی بین جدایه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد. همچنین اثر دما در بروز صفات مذکور در جدایه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد. کمینه دما برای جوانه زنی و رشد میسلیومی در تمام جدایه‌ها ۵ درجه سانتی‌گراد و بیشینه دما ۳۵ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. مناسب‌ترین دما برای فعالیت جدایه IRAN 441C و IRAN 403C، ۲۵ درجه سانتی‌گراد و برای جدایه IRAN 440C ۲۰ درجه

* Corresponding author: masoudlatifian@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

سانتی‌گراد بود. در میان سه جدایه مورد آزمایش کمترین LC_{50} مربوط به جدایه IRAN 441C روی حشرات کامل و لارو به ترتیب معادل ۲/۵۱e+۴ و ۲/۳۱e+۳ اسپور بود. بیشترین مقدار LC_{50} مربوط به جدایه IRAN 440C روی حشرات کامل و لارو و به ترتیب معادل ۳/۳۴e+۵ و ۹/۰۲e+۳ اسپور بود. نتایج بدست آمده از این آزمایشات نشان داد که جدایه قارچی IRAN 441C در طیف دمایی وسیع‌تر و بالاتری از قدرت رشد میسلیومی و جوانه‌زنی مناسب‌تری نسبت به دو جدایه دیگر برخوردار است. علاوه بر این دارای قدرت کشندگی بالاتری در مراحل رشد لاروی و حشره کامل آفت می‌باشد. لذا برای کاربرد در شرایط انبارداری خرما که اکثراً در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر واقع گردیده‌اند، مطلوب‌تر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Beauveria bassiana*، شپشه دندانه‌دار، قدرت بیماریزایی، جوانه‌زنی، رشد میسلیومی.

Abstract

Beauveria bassiana is one of the biocontrol agents of saw-toothed beetle *Oryzaephilus surinamensis*. For selection the best Iranian isolates of this fungus the effect of temperature and germination and radial growth and virulence of three isolates of this fungus were studied on larvae and adult stages. Results showed that there were significant differences in germination and radial growth at different temperatures. Minimum temperature for germination and radial growth was 5**ºC** and maximum of those was 35**ºC**. Optimum temperature for IRAN 441C and IRAN 403C activities was 25**ºC** and for IRAN 440C was 20**ºC**. Bioassay showed that the lowest LC_{50} belong to IRAN 441C for adult and larvae were 2.51e4 and 2.31e3 respectively. The highest LC_{50} belong to IRAN 440C for adult and larvae were 3.34e5 and 9.02e3 respectively. Results showed that isolate IRAN 441C had the best germination and radial growth at wide range of temperatures. It had also the higher mortality effect on adult and larvae stages, therefore it was suitable for application in date store in tropical and subtropical conditions.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Oryzaephilus surinamensis*, Germination, Radial growth, virulence.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

در کشور ما بطور متوسط سالیانه ۱۰ تا ۲۰ درصد محصولات کشاورزی در انبارها، بوسیله آفات از بین می‌روند. مسلم است که این خسارت در بعضی از نقاط کشور و در مورد پاره‌ای از محصولات به مراتب بیشتر از این مقدار است. یکی از مهم‌ترین آفات انباری خرما شپشه دندانه‌دار *Oryzaephilus surinamensis* L. می‌باشد. تغذیه لاروها و افراد کامل این حشره از خرما اهمیت آن را به عنوان یک آفت دو چندان نموده است (Latifian, 2004). یکی از عوامل بیمارگر این آفت قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemia (Deut., Moniliaceae) می‌باشد (James *et al*., 2003). مطالعات اولیه نشان داده است که در انبارهای محصولات کشاورزی علاوه بر فعال بودن زنبور پارازیتوئید *Cephalonomia tarsalis* امکان استفاده از این قارچ نیز بر علیه شپشه دندانه دار وجود دارد (Lord, 2001).

قارچ *B. bassiana* به نسبت ۳×۱۰^{۵} کنیدیوم در متر مکعب در شرایط انبارداری خرما بکار برده شده و تا ۹۶ درصد جمعیت *Carda cautella* را کاهش داده است (Jassim *et al*., 1998) قدرت قارچ *B. bassiana* برای کنترل انواع آفات انباری از جمله *O. surinamensis* بیشتر از سایر قارچ‌های حشره خوار از جمله *Metarhizium anisapliae* و *Nomuraea rileyi* می‌باشد (Padine *et al*., 1994).

از جمله خصوصیات مؤثر هر پاتوژن در بروز همه‌گیری قدرت بیماری‌زایی، توان بقاء و پراکنش پاتوژن است (Steinhaus, 1949). پارامترهای مزبور را با استفاده از میانگین مقدار کشنده (LC_{50}) و میانگین زمان مرگ و میر (LT_{50}) اندازه‌گیری می‌کنند. فاکتورهای مختلفی نظیر نوع میزبان، شرایط تغذیه‌ای میزبان حشره‌ای، مرحله رشد و نوع رقم میزبان گیاهی بر پارامترهای مزبور مؤثر می‌باشند. برای قارچ *Beauveria bassiana* این آزمایشات در رابطه با حشرات گوناگون و در شرایط مختلفی انجام شده است (Navon *et al*., 2000). در مطالعه دیگری برتری *B. bassiana* در کنترل *O. surinamensis* نسبت به قارچ *Mattasia oryzephili* ثابت شده است که یکی از عوامل مهم در بروز بیماری روی آفات انباری شرایط محیطی می‌باشد (Boucias *et al*., 1995). مطالعات اولیه نشان داده است که رطوبت نسبی ۷۰ درصد برای شروع همه‌گیری بیماری‌زایی *B. bassiana* روی *O. surinamensis* در شرایط انباری غلات ضرورت

Archive of SID

www.SID.ir

دارد. در چنین شرایطی چنانچه شرایط حرارتی مناسب فراهم باشد، می‌تواند تا ۹۱ درصد جمعیت لاروها و حشرات کامل آفت را در انبارهای غلات کاهش دهد (James *et al*., 2003). در مطالعه دیگری حرارت حداقل ۷ درجه سانتی‌گراد برای شروع آلودگی قارچ *B. bassiana* روی شپشه دندانه‌دار ضروری تشخیص داده شده است (Long *et al*., 2000). این تحقیق با هدف تعیین تأثیر دما به عنوان یک عامل مهم محیطی روی سه جدایه ایرانی انجام گردیده تا بتوان امکان استفاده از جدایه مناسب را در برنامه‌های کنترل بیولوژیک شپشه دندانه‌دار خرما فراهم نمود.

روش بررسی

الف- پرورش حشره: مراحل مختلف رشدی شپشه دندانه‌دار با نمونه‌برداری از خرمای آلوده از انبارهای خرمای استان خوزستان جمع‌آوری و به آزمایشگاه حشره‌شناسی مؤسسه تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری کشور انتقال داده شدند. حشرات کامل (ماده و نر) بوسیله آسپیراتور جداسازی شده و پرورش در دمای ۵ ± ۲۷ و رطوبت نسبی ۵± ۶۰ درصد درون اتاقک رشد و درون ظروف پلاستیکی استوانه‌ای درب‌دار به ابعاد ۸/۵×۷/۵ سانتی‌متر به مدت ۲ سال انجام شد.

ب- کشت جدایه‌های قارچی: جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق از طریق بخش تحقیقات حشره‌شناسی کشاورزی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه گردید. این جدایه‌ها شامل موارد زیر بودند.

۱- جدایه IRAN403C از منطقه فشند جمع‌آوری گردیده که رنگ پرگنه آن سفید بوده و پس از هاگ دهی به رنگ زرد کم رنگ دیده می‌شود.

۲- جدایه IRAN441C از منطقه سراوان جمع‌آوری گردیده که رنگ پرگنه آن سفید بوده و پس از هاگ دهی به رنگ صورتی کم رنگ دیده می‌شود.

۳- جدایه IRAN440C از منطقه آتشگاه (اصفهان) جمع‌آوری گردیده که رنگ پرگنه آن سفید بوده و پس از هاگ دهی به رنگ زرد کم رنگ دیده می‌شود. در این جدایه برخلاف جدایه اول لکه‌های قرمز رنگ در مرکز رشد پرگنه دیده می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

پس از آلوده نمودن حشرات کامل به هاگ‌های هر یک از جدایه‌ها نسبت به آلوده سازی متوالی و مکرر حشره میزبان به دفعات ۱۰ بار اقدام شد. آزمایشات نشان داده است که آلوده سازی متوالی و مکرر حشره میزبان نه تنها از زهرآگینی قارچ جلوگیری نمی‌کند بلکه به میزان زهرآگینی و خاصیت تهاجمی قارچ می‌افزاید (Daoust & Roberts, 1982).

پس از خالص‌سازی تمام جدایه‌های قارچی مورد نظر در محیط غذایی SDAY کشت گردیدند. بعد از اسپورزایی کامل (کشت ۱۴-۱۲ روزه) سطح محیط کشت بوسیله سوزن انتقال خراش داده شد و در داخل فلاسک‌های جداگانه که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل با محلول ۰/۰۲ درصد Tween 80 بود جمع‌آوری گردید. اسپورها به منظور پراکنده شدن یکنواخت در داخل محلول فوق به مدت ۵ دقیقه بطور پاندولی به هم زده شدند. با استفاده از لام گلبول شمار، غلظت 10^5 و 10^6 کنیدیوم در میلی‌لیتر تهیه گردید. برای تهیه محیط کشت SDAY از ترکیب آگار ۱۵ گرم، دکستروز ۲۰ گرم، باکتوپپتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۲ گرم و آب مقطر به میزان ۱۰۰۰ میلی‌لیتر استفاده گردید. پس از حل کردن مواد درون فلاسک و بوسیله همزن الکتریکی حرارتی فلاسک‌های حاوی محیط کشت جهت ضدعفونی به دستگاه اتوکلاو با فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه منتقل گردیدند.

اثر دما در جوانه‌زنی جدایه‌های قارچی: ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^5 کنیدیوم در میلی‌لیتر جدایه‌های قارچ روی محیط کشت SDA داخل تشتک پتری بصورت یک لایه نازک پوشش داده شد. درب تشتک پتری با پارافیلم بسته و تشتک‌های پتری در دماهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور در شرایط کاملاً تاریک قرار داده شدند. ۲۴ ساعت پس از تلقیح یک میلی‌لیتر فرمالدئید ۰/۵ درصد به منظور توقف جوانه‌زنی اسپورها به داخل هر تشتک ریخته شد. درصد جوانه زنی با شمارش ۱۰۰ اسپور از هر تشتک پتری با بزرگنمایی X ۴۰ (روش Lane *et al*., 1991) محاسبه شد. هر تیمار در ۳ تکرار انجام شد.

اثر دما در رشد شعاعی میسلیوم: برای تهیه توده میسلیومی جدایه‌های قارچی که بطور متوالی از بدن حشره میزبان عبور داده شده بودند، ابتدا سوسپانسیونی با غلظت 10^6 کنیدیوم در میلی‌لیتر به مقدار یک میلی‌لیتر داخل تشتک‌های پتری حاوی SDA ریخته شد. تشتک‌های پتری جهت تشکیل توده میسلیومی داخل انکوباتور در دمای (۱ ± ۲۵) درجه سانتی‌گراد به

Archive of SID

www.SID.ir

مدت ۳ روز در شرایط کاملاً تاریک قرار داده شدند. بعد از تشکیل پرگنه، حلقه‌هایی به قطر ۸ میلی‌متر از سطح SDA برداشته شد (Rapilly, 1968). هر حلقه در مرکز تشتک‌های حاوی SDA تازه قرار داده شد. درب تشتک پتری‌ها با پارافیلم بسته شد و در شرایط تاریکی کامل در دماهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار داده شدند. رشد شعاعی تا ۱۰ روز بوسیله خط‌کش در دو قطر عمود بر هم حلقه‌ها اندازه‌گیری گردید. این آزمایش در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

آزمون بیمارگری: برای انجام آزمون بیمارگری، از جمعیت لاروها (با اندازه متوسط ۲/۶±۰/۵ میلی‌متر) و حشرات کامل (نسبت جنسی ۵۰ درصد نر و ماده) شپشه دندانه‌دار خرما استفاده شد. برای تغذیه مراحل رشدی مورد آزمایش از بافت خرمای رقم سایر که در کف ظروف پرورش قرار داده می‌شد، استفاده گردید. برای آلوده‌سازی مراحل رشدی، آن‌ها را به مدت ۲۰ ثانیه درون سوسپانسیون هاگ فرو برده و پس از خروج درون انکوباتور با درجه حرارت ۲ ± ۲۵ و رطوبت نسبی ۵±۸۵ درصد برای دو روز نگهداری نموده و برای روزهای بعد در رطوبت نسبی ۶۰ درصد و دوره روشنایی/تاریکی (۱۲:۱۲) قرار گرفتند. در بازدید روزانه مراحل رشدی لارو و حشره کامل مرده مربوط به هر تیمار به صورت جداگانه جمع‌آوری و پس از ضدعفونی سطحی بدن آن‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد درون اتاقک مرطوب قرار داده شدند تا بار قارچ در سطح بدن آن‌ها ظاهر گردد. این قارچ‌ها مجدداً کشت داده شده و سوسک‌ها بوسیله آن آلوده گردیدند. بدین ترتیب از اصول کخ برای اثبات بیمارگری جدایه مورد آزمایش استفاده شد.

ج- زیست سنجی: برای محاسبه غلظت کشنده جدایه‌های مختلف، از آب مقطر استریل و Tween 80 ۰/۰۵ درصد به عنوان حامل استفاده شد. به این ترتیب که اجزاء هاگ در هر دما مربوط به هر جدایه از سطح تشتک پتری برداشته شده و درون محلول به حالت معلق در آمد و سپس سوسپانسیون حاصل از پارچه ململ دو لایه عبور داده شد تا قطعات میسلیوم از آن جدا گردند. برای جدا شدن هاگ‌ها از هم و عدم تشکیل زنجیر در هنگام شمارش، درون لوله‌های حاوی سوسپانسیون قارچ مهره‌های شیشه‌ای ریخته و برای چند دقیقه به شدت تکان داده شد. جهت شمارش اسپورها و تهیه تراکم‌های مختلف اسپور در واحد حجم از لام گلبول

Archive of SID

www.SID.ir

شمار (Improved neubar) استفاده شد. برای اندازه‌گیری زنده‌مانی هاگ‌ها روز قبل از آزمایش مقدار اندکی از اسپورهای مورد آزمایش به صورت استریل درون محلول ۰/۰۵ درصد Tween80 به حالت تعلیق در آمده و روی محیط SDA+Y کشت شد و روز بعد فقط از کشت‌هایی استفاده گردید که بیش از ۸۵ درصد هاگ‌های آن جوانه زده بودند (Jenkins *et al*., 1998). آزمون‌های مقدماتی با استفاده از طیف وسیعی از دزها و تعداد اندک میزبان صورت گرفته و سپس طیفی از دزها که مرگ و میری بین ۲۵ تا ۷۵٪ را نشان می‌دهند برای آزمون نهایی استفاده شد (Butt & Goettel, 2000). به این ترتیب پنج دز لگاریتمی شامل دزهای ۵×۱۰^{۲}، $۱۰^{۳}$، ۵×۱۰^{۳}، $۱۰^{۴}$ و ۵×۱۰^{۴} برای مرحله لارو و دزهای ۵×۱۰^{۳}، $۱۰^{۴}$ و ۵×۱۰^{۴}، $۱۰^{۵}$ و ۵×۱۰^{۵} در میکرولیتر برای مرحله حشره کامل تهیه و زیست سنجی‌ها با آن‌ها انجام شد. زیست سنجی‌ها با حشرات کامل و لاروهای پرورش یافته بر روی خرما در شرایط آزمایشگاهی به مدت دو سال انجام شد. برای هر تکرار ۲۰ عدد از هر مرحله رشدی استفاده شد و آزمایش‌ها در ۵ تیمار شامل دزهای مختلف در ۳ تکرار به همراه تیمار شاهد انجام گرفت. آلوده‌سازی حشرات مشابه روش قبل انجام گردید. سپس حشرات هر تکرار در قفس‌های مخصوص که به کمک تشتک‌های پتری درب دار ۹ سانتی‌متری که در قسمت درب آن‌ها سوراخ پوشش دار با تور برای تبادل حرارتی و رطوبتی قرار داده شده و کف آن‌ها برای تغذیه، خرما قرار داده شده بود، قرار گرفتند. این قفس‌ها به داخل اتاقک رشد در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد منتقل گردید. مرگ و میر حشرات هر روز و به مدت ۱۰ روز ثبت و جدول مرگ و میر تجمعی آن‌ها تهیه شد.

محاسبات آماری: برای هر جدایه در دماهای مختلف تجزیه آماری صورت گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. فاکتورها شامل دماها و جدایه‌ها بودند. بطوریکه فاکتور a مربوط به جدایه و فاکتور b مربوط به دما بود. مقایسه میانگین داده‌ها بوسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال یک درصد و ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SAS انجام گردید. برای تعیین دزهای کشنده از نرم‌افزار Priprobit (1998-2000) استفاده شد. با استفاده از آمار مرگ و میر تجمعی ترکیبی از پراکنش و مدل‌های رگرسیونی انتخاب گردید که کمترین AIC را داشته باشد. AIC یا معیار

Archive of SID

www.SID.ir

اطلاعاتی Akaike معیاری است که با استفاده از فرمول AIC=- 2L + 2M محاسبه می‌شود و هر چه مقدار آن کمتر باشد ترکیب مدل رگرسیونی و تابع پراکنش انتخاب شده، رفتار داده‌ها را به نحو مطلوب‌تری توصیه می‌نمایند. در این فرمول L حداکثر لگاریتم (maximum log-likelihood) و m تعداد پارامترها می‌باشند. برای رسم خط رگرسیون داده‌های که توسط نرم‌افزار اخیر پردازش شده بود به نرم افزار Excel منتقل و منحنی‌های خطی و سیگموئیدی مربوطه رسم گردید. LT_{50} جدایه‌های مختلف با کمک نرم افزار Curve Experts محاسبه شد.

نتیجه و بحث

اثر دما در جوانه‌زنی جدایه‌های قارچی: بررسی‌های انجام شده نشان داد که بین جوانه‌زنی جدایه‌های مختلف قارچی در دماهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($F= 100/45, df = 2, \alpha = 7.1$). بطوری که جدایه IRAN 441C دارای توانایی جوانه‌زنی بیشتری نسبت به دو جدایه IRAN 440C و IRAN 403C بود. همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان جوانه‌زنی جدایه‌های مختلف قارچی در حرارت‌های مختلف دیده شد ($F = 86.162, df = 20, \alpha = 7.1$). بیشترین جوانه‌زنی جدایه‌های IRAN 441C و IRAN 403C در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و برای جدایه IRAN 440C در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. کمینه دما برای جوانه‌زنی همه جدایه‌ها ۵ درجه سانتی‌گراد و بیشینه دما ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۱).

در میان جدایه‌های مورد بررسی جدایه IRAN 441C دماهای بالاتر را بیشتر تحمل کرد. تأثیر دماهای ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در کاهش جوانه‌زنی آن نسبت به دو جدایه دیگر کمتر بوده است. این یافته‌ها با کارهای بسیاری از محققین که روی قارچ‌های هیفومیست مطالعه می‌کنند مطابقت دارد (Hall & Papierok, 1982).

جوانه‌زنی قارچ *B. bassiana* در دمای بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد نیز گزارش گردیده است (Walsted *et al*., 1970). با توجه به مطالعات انجام شده جوانه‌زنی دو جدایه IRAN 440C و IRAN 403C به هم نزدیک بود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد جوانه زنی جدایه‌های *B. bassiana* در محیط کشت SDA در دماهای مختلف

Table 1- Comparison of the mean germination percentage of different isolates of *B. bassiana* on SDA medium in different temperatures

کد جدایه strain code	میانگین درصد جوانه‌زنی (Mean germination±SD%)						
	5ºC	10º C	15ºC	20ºC	25ºC	30ºC	35ºC
IRAN 441C	11.51±0.7I	89.33±0.7B	100 A	78.±0.3D	25.01±0.2FG	8.45±0.1I	0.37±0.03J
IRAN 440C	1.93 ±0.2J	75.22±1.8D	76.66±0.3D	89.03±0.6B	23.29±0.7G	1.27±0.08J	0.037±0J
IRAN 403C	1.5±0.2J	77.24±1.8D	82.98±0.3C	38.87±0.6E	27.56±0.7F	18.33±0.1H	0.03±0J

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level using Duncan Multiple Range test.

اثر دما در رشد شعاعی میسلیوم جدایه‌های قارچی: بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که بین رشد میسلیومی جدایه‌های مختلف در دماهای متفاوت اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($F= 66.61, df = 2, \alpha = 0.01$). بطوری که جدایه IRAN 441C دارای بیشترین رشد میسلیومی و جدایه IRAN 440C دارای کمترین رشد میسلیومی بوده است. همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان رشد میسلیومی جدایه‌های مختلف در دماهای متفاوت وجود دارد ($F = 937.16, df = 20, \alpha = 0/01$) بیشترین رشد میسلیومی جدایه‌های IRAN 441C و IRAN 403C در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و برای جدایه IRAN 440C در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. کمینه دما برای رشد میسلیومی همه جدایه‌ها ۵ درجه سانتی‌گراد و بیشینه دما ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۲).

جدایه IRAN 403C در دمای ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد دارای رشد میسلیومی بیشتری بود، در حالی که جدایه IRAN 441C در دماهای ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به دو جدایه دیگر رشد میسلیومی بالاتری نشان داد. Ferron (1977) دمای مناسب برای رشد قارچ *B. bassiana* را ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد گزارش کرده است. مطابق تحقیقات دیگری قارچ

Archive of SID

www.SID.ir

B. bassiana در دمای ۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد ولی دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد برای رشد میسلیومی مناسب عنوان گردید (Hussey & Tinsdey, 1981).

جدول ۲- مقایسه میانگین رشد شعاعی میسلیوم جدایه‌های *B. bassiana* در محیط کشت SDA در دماهای مختلف

Table 2- Comparison of the mean mycelial radial growth of isolates of *B. bassiana* on SDA medium in different temperatures

کد جدایه strain Code	میانگین رشد شعاعی میسلیوم (Mean of radial growth of mycelium±SD)						
	5ºC	10ºC	15ºC	20ºC	25ºC	30ºC	35ºC
IRAN 441C	0.035±0.04M	0.39±0.067K	1.53±0.86H	2.21±1.18CD	2.39±1.27B	2.62±1.33A	2.69±1.29A
IRAN 440C	0.07±0.06M	0.946±0.58J	1.44±0.89HI	1.89±1.18FG	2.11±1.18DE	1.99±1.14EF	1.82±1.1G
IRAN 403C	0.25±0.19L	1.39±0.75I	2.06±1.18E	2.86±0.78J	2.27±1.22BC	2.04±1.17E	1.98±1.12EF

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

Mean within a column follow by the same letter are not significantly different at the 5% level using Duncan multiple Range test.

این نتایج و اطلاعات بدست آمده از بررسی‌های جوانه‌زنی احتمالا مربوط به منشاء جدایه‌های قارچی می‌شود. جدایه IRAN 441C از شهرستان سراوان واقع در استان سیستان و بلوچستان با آب و هوای گرم بوده بنابر این حرارت‌های بالاتر را بیشتر تحمل می‌کند. در حالی که جدایه IRAN 403C مربوط به شهرستان فشند می‌باشد که دارای آب و هوای خنک است و دماهای کمتر را نسبت به دو جدایه دیگر بیشتر تحمل می‌کند. در مطالعه دیگری که بر روی جدایه‌های ایرانی Mcb1، Mcb6، Mcb8، Mcb11، Mcb12 و Mcb18 انجام شد، مشخص گردید که جوانه‌زنی جدایه Mcb11 که منشاء آن شهرستان آستانه با آب و هوای گرم‌تر بوده در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد درصد جوانه زنی آن بیشتر بود. در مقابل جدایه Mcb8 در دمای مزبور هیچ‌گونه فعالیت جوانه‌زنی نداشت (Majidi-Shilsar *et al*., 2003). مطالعات سایر محققین نشان داده‌اند که جدایه‌های قارچی با منشاء مناطق گرمسیری توانایی تحمل گرمایی بیشتری

Archive of SID

www.SID.ir

نسبت به جدایه‌های با آب و هوای مناطق معتدله هستند (Fargues *et al*., 1992).

قدرت بیماریزایی: سه جدایه ایرانی مورد بررسی، توانایی بیماریزایی روی مراحل رشدی لارو و حشره کامل مورد بررسی را داشتند. پس از آلوده ساختن مراحل رشدی لارو و حشره کامل با استفاده از سه جدایه مورد آزمایش و سپری شدن ۱۰ روز، سپس دز کشنده ۵۰ و ۹۹ درصد به تفکیک برای حشرات کامل و لارو محاسبه شد که در جدول ۳ منعکس شده است. در مورد داده‌های حاصل از کاربرد سه جدایه ایرانی *B. bassiana* کمترین AICها از ترکیب پراکنش لجستیک و نرمال با مدل همه یا هیچ با پاسخ طبیعی و مدل ترجیحی با پاسخ طبیعی حاصل گردید (شکل‌های ۱ و ۲).

در میان سه جدایه مورد آزمایش کمترین دز کشنده ۵۰ درصد مربوط به جدایه IRAN 441C روی حشرات کامل و لارو به ترتیب معادل ۲/۵۱e+۴ و ۲/۳۱e+۳ بود. بیشترین مقدار LC_{50} مربوط به جدایه IRAN 440C روی حشرات کامل و لارو و به ترتیب معادل ۳/۳۴e+۵ و ۹/۰۲e+۳ بود. بنابراین دز کشنده بسته به مرحله رشدی سوسک‌ها و جدایه‌های مورد آزمایش متفاوت بود. این دز در حشرات کامل به طور قابل توجهی بیشتر از لاروها می‌باشد. مقایسه نمودارهای دز- مرگ و میر لارو و حشرات کامل نشان می‌دهد که علاوه بر پایین بودن دز کشنده در لاروها شیب خط رگرسیون نیز تندتر می‌باشد و این مسئله نشان می‌دهد که لاروها در یک فاصله زمانی مشخص از حشرات کامل به دزهای فزاینده اسپور حساس‌تر هستند.

Archive of SID

www.SID.ir

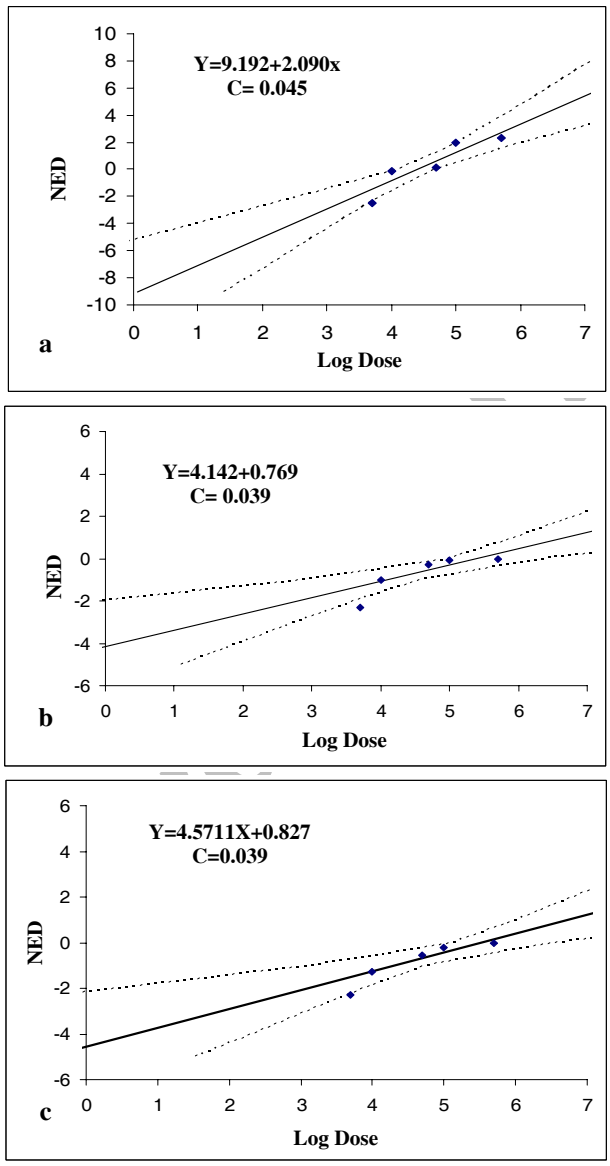
جدول ۳- دز کشنده جدایه‌های مختلف *B. bassiana* به تفکیک لارو و حشره کامل شپشه دندانه‌دار خرما

Table 3- Lethal doses of different isolates of *B.bassiana* regarding larvae and adults of saw-toothed beetle

مدل رگرسیونی Regression models	تابع پراکنش Distribution functions	لگاریتم LC_{50} در سطح 95٪ Log LC_{50} at 95% confidence level	لگاریتم LC_{90} در سطح 95٪ Log LC_{90} at 95% confidence level	χ	AIC	مرحله رشدی Developmental stages	کد جدایه Isolate code
6	Logestic	3.96e+6 (8.62e+5, 1.32e+8)	2.51e+4 (1.18e+4, 4.45e+4)	0.54	115.53	Adult	IRAN
6	Logestic	2.62e+5 (5.34e+4, 1.99e+7)	2.31e+3 (5.42e+2, 6.03e+3)	0.64	135.76	Larvae	441C
2	Normal	2.61e+8 (3.24e+6, 1.21e+11)	2.45e+5 (9.04e+4, 2.01e+6)	0.6	127	Adult	IRAN
2	Normal	7.87e+5 (9.21e+4, 7.06e+9)	6.65e+3 (1.65e+3, 3.38e+4)	0.68	142.2	Larvae	408C
2	Normal	2.17e+7 (1.14e+7, 1.01e+13)	3.34e+5 (1.24e+5, 3.19e+6)	0.56	119.74	Adult	IRAN
2	Normal	4.67e+7 (1.24e+7, 5.16e+14)	9.02e+3 (2.51e+3, 5.84e+4)	0.48	141.23	Larvae	440C

2: All / Nothing with Natural Response Rate
6: Preference with Natural Preference

www.SID.ir

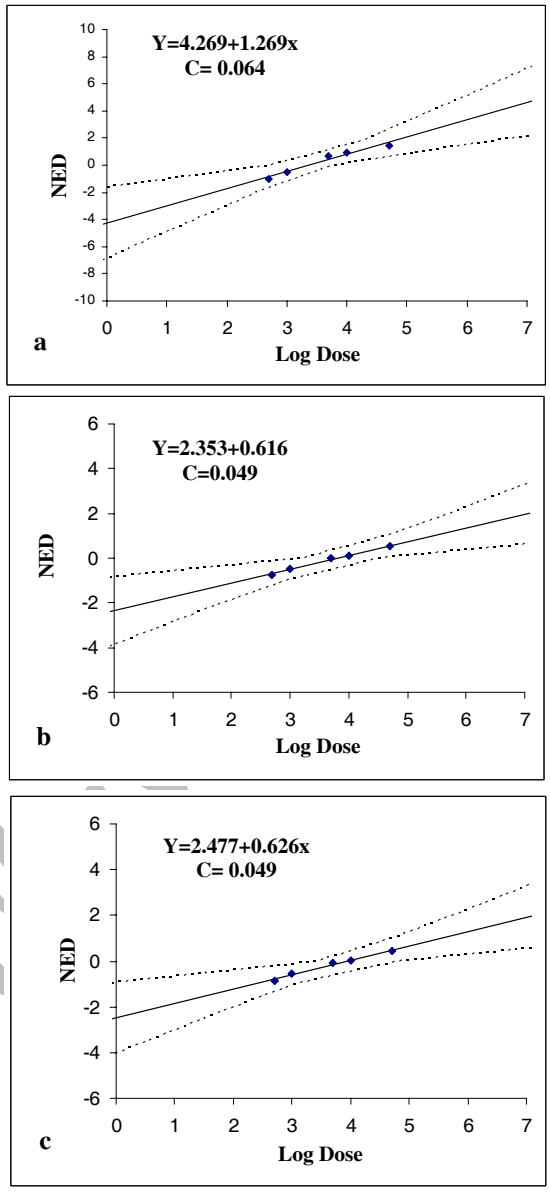


شکل ۱- نمودار دز - مرگ و میر[۱] برای حشرات کامل: a- جدایه IRAN 441C، b- جدایه IRAN 403C و c- جدایه IRAN 440C

Fig. 1- Dose-mortality curve in adults: a- isolate IRAN 441C, b- isolate IRAN 403C and c- isolate IRAN 440C

۱- The % response are converted to units of deviation from the mean or "normal equivalent deviations" = NED

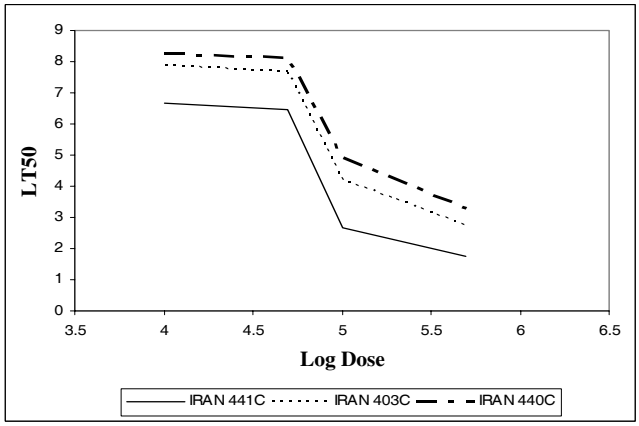
www.SID.ir



شکل ۲- نمودار دز – مرگ و میر برای لارو: a: جدایه IRAN 441C، b: جدایه IRAN 403C و c: جدایه IRAN 440C

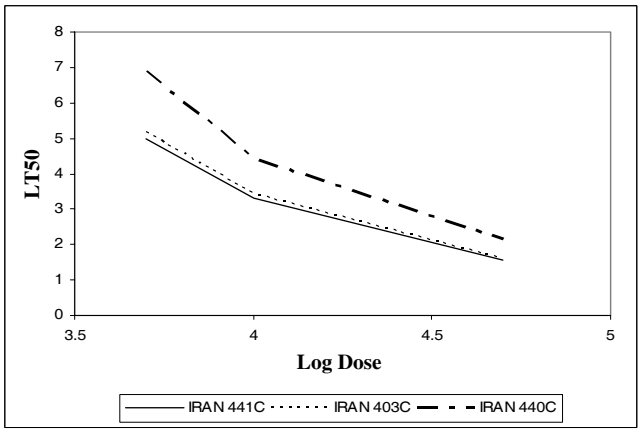
Fig. 2- Dose-mortality curve in larvae: a: isolate IRAN 441C, b: isolate IRAN 403C and c: isolate IRAN 440C

www.SID.ir



شکل ۷- زمان کشندگی ۵۰ درصد کشندگی جدایه‌های مختلف در دزهای متفاوت بر مرحله رشدی حشره کامل

Fig. 7- Lethal time of isolates at different dosages on adults



شکل ۸- زمان کشندگی ۵۰ درصد کشندگی جدایه‌های مختلف در دزهای متفاوت بر مرحله رشدی لارو

Fig. 8- Lethal time of isolates at different dosages on larvae

www.SID.ir

زمان کشندگی (LT_{50}) سه جدایه به تفکیک بر مراحل رشدی حشره کامل و لارو برای گروه‌های دزی که تا پایان آزمایش نیمی از حشرات تلف شدند، محاسبه گردید. بالاترین و پایین‌ترین زمان ۵۰ درصدکشندگی (LT_{50}) به ترتیب مربوط به جدایه IRAN 440C و IRAN 441C به ترتیب در دزهای $۱۰^{۴}$ و ۵×۱۰^{۵} برای حشرات کامل و جدایه IRAN 440C و IRAN 441C در دزهای ۵×۱۰^{۳} و ۵×۱۰^{۴} برای مرحله لاروی بود (شکل‌های ۷ و ۸).

مطالعات انجام گرفته با استفاده از سه جدایه مورد استفاده در این آزمایش بر روی مراحل مختلف رشدی ملخ *Locusta migratoria* (Balsamo) نیز نشان داد که جدایه بیشترین قدرت بیماری‌زایی مربوط به جدایه IRAN 403C و کمترین قدرت بیماریزایی مربوط به جدایه IRAN 441C بود. علت تفاوت را می‌بایست در خصوصیات میزبان‌های مورد آزمایش جستجو نمود (Ghazavi *et al*., 2002).

نتایج بدست آمده از این آزمایشات نشان داد که جدایه قارچی IRAN 441C در طیف دمایی وسیع‌تر و بالاتر دارای رشد میسلیومی و جوانه‌زنی مناسب‌تری نسبت به دو جدایه دیگر است. علاوه بر این دارای قدرت کشندگی بالاتری در مراحل رشدی لاروی و حشره کامل آفت می‌باشد. لذا برای کاربرد در شرایط انبارداری خرما که اکثراً در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر واقع گردیده‌اند، برای مطالعات بعدی مطلوب‌تر می‌باشد*.

منابع

BOUCIAS, D., G. I. MAZET, J. PENDLAND and S.Y. HUNG, 1995. Comparative analysis of the *in vivo* and *in vitro* metabolites produced by the entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Can. J. Bot.,* 73(1): 1092- 1 099.

DAOUST, R. A. and D. W. ROBERTS. 1983. Studies on the prolonged storage of

* **نشانی نگارندگان:** دکتر مسعود لطیفیان و مهندس پرستو نیکبخت، مؤسسه تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری کشور، اهواز، ایران؛ دکتر ابراهیم سلیمان نژادیان، دکتر جمشید حیاتی و دکتر سید محمد سعید مصدق، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران؛ دکتر مهران غزوی، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵، ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

Metarhizium anisopliae conidia effect of growth substrate on conidial survival and virulance againest mosquitoes. J. Inverteb. Path. 41: 161-170.

FAGGUS, J., N. K. MANIANIA, J. C. DELMAS and N. M. SMITH, 1992. Influence de la température sur la croissance in vitro d' hyphomycetes entomopathogenes. Agronomic, 12:557-567.

FERRON, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Ann. Rev. Entomol. 23: 409.

GHAZAVII, M., A. KHARAZI-PAKDEL, J. ERSHAD and E. BAGHERIZONOUZ, 2002. Effeciency of Iranian isolates of *Beauveria bassiana* againset *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). Appl. Ent. Phytopath. 69(2): 111-128.

HALL, R. A. and B. PAPIEROK, 1982. Fungi as biological agents of arthropods of agricultural and medical importance. Parasitoligy. 8:205-240.

HUSSEY, N. W. and T. W. TINSLEY, 1981. Impressions of insect pathology in the people Republic of China. In Burges, H. D. (ed). "Microbial control of pest and plant diseases". 1970-1980. Academic Press, London, PP. 785-795.

JAMES, E. T. and J. C. LORD, 2003. Tritrophic interactions and storage pest control: interaction of the fungus *Beauveria bassiana* with resistant oat varieties for control of *Oryzaephilus surinamensis*. Insect Pathology and Microbial Control. 4: 153-170.

JASSIM, H. K., L. M. ABDULLAH and I. ABD-AL-AHAD, 1998. Determination of the exact concentration of *Beauveria bassiana* to control the larvae of the Fig moth *Ephestia cautella* on stored dates in Iraq. Arab. J. Plant Prot. 6: 44-45.

JENKINS, N. E., G. HEVIEFO, J. LANGEWALD, A. J. Cherry and C. J. Lomer, 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information. Vol. 19 (1) 29-39

LANE, B. S., A. P. J. TRINCI and A. T. GILLESPIE, 1991. Endogenous reserves and survival of blastospore of *Beauveria bassiana* harvested from carbon and nitrogen limited batch cultures. Mycol. Res. 95: 821-828.

LATIFIAN, M. 2004. Date palm stored pests control technology. Hang Galam Publicher. Mashad. 100pp.

LONG, D. W., E. GRODEN and F. A. DRUMMOND, 2000a. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill Agricultural and Forest Entomology 2: 11-17.

LORD, J. C. 2001. Response of the wasp *Cephalonomia tarsalis* (Hymenoptera: Bethylidae)

Archive of SID

www.SID.ir

to *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as free conidia or infection in its host, the Saw-toothed Grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). Biol. Contr. 21(3): 300-304.

MAJIDI-SHILSAR, F., K. KAMALI, F. ALINIA and J. ERSHAD, 2003. Effect of temperature on germination, mycelial radial growth and virulence of *Beauveria bassiana* on *Chilo supressali*s Walker (Lep: Pyralidae). Appl. Ent. Phytopath. 71(1): 123-138.

NAVON, A. and K. R. S. ASCHER, 2000. Bioassay of entomophathogenic microbes and nematodes. CABI Publishing. 324pp.

PADIN, S. B., G. M. DAL BELLO and L. VASICEK, 1994. Bioinsecticide potential of entomopathogenic fungi in Stored Grain pests. Rev. Fac. Agron. Univ. Nac. La Plata. 15:1-7.

RAPILLY, P. 1968. Les technique de mycology en pathologie vegetale. Annals of Epiphytol. No 19, 102p.

STEINHAUS, E. A. 1949. Principles of insect pathology. NcGraw-Hill Book Company, New York Torento London. 757 pp.

WALSTED, J. D., R. F. ANDERSON and W. J. STAMBAUCH, 1970. Pathogenicity and host range of *Beauveria bassiana* a fungal pathogen of *Chilo infucatellus* Snellen. J. Biol. Cont. 4(1): 48-51.

YOSHINORI, T. and H. K. KAYA, 1992. Insect pathology. Academic Press. 666pp.

Address of the authors: Dr. M. LATIFIAN and Eng. P. NIKBAKHT, Date palm and tropical fruits research institute, Ahwaz, Iran; Dr. E. SOLEIMANNEJADIAN, Dr. J. HAYATI and Dr. S. M. MOSADEGH, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran; Dr. M. GHAZAVI, Iranian Research Institute of Plant Protection, P. O. Box 1454, Tehran 19395, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir