Archive of SID

بررسی آزمایشگاهی بیماری‌زایی قارچ *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas روی شته نخودفرنگی [*Acyrthosiphon pisum* (Harris)]

سیدعلی صفوی[۱]، غلامرضا رسولیان[۲]، حسن عسکری[۳] و عزیز خرازی پاکدل[۲]

چکیده

برای بررسی اثر بیماری‌زایی قارچ Verticillium lecanii روی شته نخودفرنگی (Acyrthosiphon pisum) از فرم تجارتی قارچ (ورتالک) استفاده گردید. پوره‌های سن دوم شته نخودفرنگی با غلظت‌های 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر قارچ و تیمار شاهد با آب مقطر و ماده خیس کننده Tween-80 محلول‌پاشی شد. هر غلظت با ۳۰ شته و در سه تکرار بررسی گردید. شته‌های تیمار شده در دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۳±۹۷٪ و دوره نوری ۸:۱۶ ساعت (نور : تاریکی) نگهداری و روی ساقه‌های یونجه پرورش یافتند. واحدهای آزمایشی به طور روزانه و به مدت ۱۲ روز نمونه‌برداری، و حشرات مرده و پوره‌های تازه متولد شده از روی گیاه حذف گردید.

فراوردهٔ ورتالک تلفات چشم‌گیری در شته‌های تیمار شده ایجاد کرد، به طوری که میانگین درصد مرگ و میر از ۶/۹۳±۴۵/۵۵٪ در غلظت 10^4 کنیدی در میلی‌لیتر به ۴/۴۵ ±۹۵/۵۵٪ در غلظت 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر افزایش یافت. LC_{50} محاسبه شده $5/14\times10^4$ کنیدی در میلی‌لیتر بود، که نشان دهنده بیماری‌زایی زیاد قارچ روی شته نخودفرنگی است. مقادیر LT_{50} با استفاده از آزمون بقا برای غلظت‌های 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر، به ترتیب ۱۰، ۸، ۶/۵ و ۵ روز محاسبه شد. برای غلظت 10^4 کنیدی در میلی‌لیتر مقدار LT_{50} در طول مدت بررسی به دست نیامد. مقادیر آهنگ تولید مثل ویژه (R_0) با افزایش غلظت کنیدی کاهش چشم‌گیری یافت. میانگین مقدار R_0 از ۵/۳۸±۲۸/۱۵ در شاهد به ۱/۸۱±۵/۱۵ در غلظت 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر کاهش پیدا کرد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که ورتالک می‌تواند به عنوان عامل کنترل کننده مؤثری برای شته نخودفرنگی محسوب گردد. پژوهش‌های تکمیلی در شرایط طبیعی، و نیز ارزیابی این فراورده علیه آفات دیگر توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *بیماری‌زایی، شته نخودفرنگی، قارچ Verticilium lecanii، آهنگ خالص رشد جمعیت (R_0)* ، LT_{50}، LC_{50}

---

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۲. دانشیار گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۳. استادیار گیاه‌پزشکی، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری‌هایی که در شته‌ها بروز می‌کنند بیش از یک قرن است شناخته شده‌اند، و بررسی‌های زیادی روی آنها صورت گرفته است (۱۹). قارچ‌ها با دارا بودن صفاتی چون ایجاد مرگ و میر سریع در میزبان، ایجاد آلودگی از طریق کوتیکول، همه‌گیری سریع در جمعیت (در صورت فراهم بودن شرایط محیطی) و سازگاری با اکثر آفت‌کش‌ها، مهم‌ترین عوامل کنترل کننده طبیعی شته‌ها محسوب می‌شوند (۱).

یکی از قارچ‌های مهم گونه *Verticillium lecanii* (Deutromycetes:Moniliales) می‌باشد. قارچ *V. lecanii* کم‌توقع بوده و در اکثر محیط‌های کشتی که دارای کربوهیدرات و یا کیتین باشد رشد می‌کند. با این حال، نوع محیط کشت تأثیرهای متفاوتی در رشد میسلیومی، میزان کنیدی‌زایی، آهنگ تندش کنیدی‌ها، و حتی مرگ و میر میزبان دارد (۱۳). نیاز رطوبتی این قارچ نیز مانند بیشتر قارچ‌های پاتوژن زیاد است، به طوری که برای رشد میسلیومی و تندش کنیدی‌ها نیازمند رطوبت نسبی بیش از ۹۳٪ می‌باشد (۷).

قارچ *V. lecanii* همانند اکثر قارچ‌های بیماری‌زای حشرات، شماری از متابولیت‌های ثانویه با وزن ملکولی پایین را تولید می‌کند که دارای فعالیت حشره‌کشی هستند (۱۰). از این ترکیبات می‌توان باسیانولید (Bassianolide) (۲۶) و دی‌پیکولینیک‌اسید (Dipicolinic acid) را نام برد. ترکیب اخیر مهم‌ترین فراورده متابولیتی قارچ *V. lecanii* است که دارای خاصیت حشره‌کشی می‌باشد (۱۰). یکی از مزایای مهم این قارچ امکان اختلاط و مصرف آن با اغلب آفت‌کش‌های رایج، به ویژه حشره‌کش‌ها و برخی قارچ‌کش‌ها است. قارچ‌کش‌های پلی‌اکسین (Polyoxin)، میرونیل (Mepronil)، گوگرد، هیدروکسید مس (۲۸)، آیپرودیون (Iprodione)، اکسی‌کاربوکسین (Oxycarboxin)، دینوکاپ (Dinocap) و دیکوفول (Dicofol) (۱۳) در محیط‌های کشت حاوی آگار برای قارچ *V. lecanii* بی‌ضرر بوده‌اند، ولی بنومیل (Benomyl)، کینومتیونات (Chinomethionat) و آنیلازین (Anilazin) از رشد ریسه جلوگیری نموده (۲۸)، و مشتقات دی‌تیوکاربامات‌ها (Dithiocarbamates) تندش کنیدی‌های قارچ را متوقف می‌کنند (۲۰). حشره‌کش‌های پریمیکارب (Primicarb)، کاربaryل (Carbaryl)، پرمترین (Permethrin) (۱۳) و دیفلوبنزوران (Diflobenzuron) (۲۹) می‌توانند به راحتی همراه قارچ *V. lecanii* مورد استفاده قرار گیرند.

قارچ *V. lecanii* نخست در جمعیت‌های متراکم شته‌های *Macrosiphoniella sanborni* Gillete، *Brachycaudus helichrysi* Nevsky و *Myzus persicae* (Sulzer)، در گلخانه‌های پژوهشی انگلستان مورد توجه قرار گرفت (۱۲). پس از آن آزمایش‌های بسیاری، به ویژه روی گونه اول صورت گرفت، و تأثیر زیاد استرین‌های متعدد این قارچ به اثبات رسید. بررسی‌ها در شش گونه از شته‌های غلات، بیماری‌زایی خوبی را روی آنها نشان داد، به طوری که کمترین مقدار LC_{50} ($۰/۸۲\times۱۰^{۵}$ کنیدی در میلی‌لیتر) برای شته روسی گندم [*Diuraphis noxia* (Mordvilko)] ، و بیشترین مقدار آن ($۳۲/۸۳\times۱۰^{۵}$ کنیدی در میلی‌لیتر) برای شته *Rhopalosiphum padi* L. به دست آمد (۹).

امروزه استفاده از قارچ *V. lecanii* در گلخانه‌های فلوریدای آمریکا علیه شته *Rhopalosiphum rufiabdominalis* (Sasaki) به صورت معمول درآمده، و جمعیت شته دو هفته پس از اسپورپاشی کاهش پیدا می‌کند (۸). هر چند قارچ *V. lecanii* عمدتاً به عنوان عامل بیماری‌زای شته‌ها شناخته شده است، با این حال از دیگر حشرات مانند شپشک‌ها (۲۷)، آلرودها (۱۲)، زنجرک‌ها (۳۰)، تریپس‌ها (۳۲)، پروانه‌ها (۲۲)، سخت‌بالپوشان (۵)، ملخ‌های شاخک کوتاه (۱۸)، و حتی کنه‌های گیاهی (۲) جداسازی شده است. هم‌چنین، استرین‌هایی از این قارچ توان آلوده‌سازی برخی عوامل بیماری‌زای گیاهی، از جمله سفیدک‌های پودری، زنگ‌ها، لکه‌برگی‌ها (۱۶) و نماتدهای انگل گیاهی (۲۱) را دارد.

بررسی‌های انجام شده در بیشتر موارد گویای عدم تأثیر یا تأثیر بسیار جزئی این قارچ در موجودات غیر هدف می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

زنبورهای پارازیتوئید *Encarsia formosa* (۱٤) و *Aphidius nigripes* (۳)، کنه شکارگر *Phytoseilus persimilis* (۱٤)، کفش‌دوزک *Hippodamia quinquesignata* (۱۵) و شماری از حشرات خانواده‌های Carabidae، Staphylinidae، Formicidae، Forficulidae و Syrphidae، که به صورت شکارگر یا هم‌سفره با شته‌ها زندگی می‌کنند (۳۱)، تلفات معنی‌داری در برابر قارچ *V. lecanii* نداشتند. هم‌چنین، به خاطر عدم رشد اکثر استرین‌های این قارچ در دمای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد، احتمال آلودگی مهره‌داران خون‌گرم، و به ویژه انسان، به وسیله این قارچ خیلی کم است (۱۳).

توانایی زیاد همه‌گیری و بیماری‌زایی قارچ *V. lecanii* علیه شماری از حشرات، به ویژه جوربالان، سبب تولید دو فراوردهٔ تجارتی از آن به نام ورتالک (Vertalec) و مایکوتال (Mycotal) شده است، که به ترتیب برای کنترل شته‌ها و آلرودها استفاده می‌شوند (۱٤). ورتالک به صورت پودر قابل تعلیق در آب حاوی 10^9 بلاستوسپور در هر گرم فرموله می‌شود (۲۳).

در این پژوهش اثر بیماری‌زایی قارچ *V. lecanii* در شته نخودفرنگی (*Acyrthosiphon pisum*) مورد بررسی قرار گرفت. عواملی مانند درصد تلفات، LC_{50} (غلظت لازم برای ایجاد ۵۰٪ تلفات در جمعیت مورد آزمایش)، LT_{50} (مدت زمان لازم برای بروز ۵۰٪ تلفات در جمعیت مورد آزمایش) و R_0 (میزان تولید مثل خالص) محاسبه و تفسیر گردید.

مواد و روش‌ها

از گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) واریته همدانی به عنوان بستر پرورش شته نخودفرنگی و انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی روی آن استفاده شد. بذر این گیاه در ماسه بادی سترون، درون گلدان‌های کوچک پلاستیکی (قطر دهانه ۱۰ سانتی‌متر) کاشته شد، و گلدان‌ها در دمای ۳±۲٤ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۱۰±٦۵٪، و ۱٦ ساعت روشنایی قرار گرفت.

شته نخودفرنگی از مزرعه یونجه دانشکده کشاورزی کرج (طول جغرافیایی ٥٤° و ٥٠′ شرقی، عرض جغرافیایی ۵۵° و ۳۵′ شمالی و ارتفاع ۱۳۱۲/۵ متر از سطح دریا) به روش ضربه زدن گیاهان جمع‌آوری، و در آزمایشگاه در دمای ۳±۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۱۰±۷۰٪ و ۱٦ ساعت روشنایی پرورش داده شد.

استرین مورد استفاده قارچ *V. lecanii* خالص شده فراورده ورتالک از جمهوری مولداوی بود. قارچ در محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) داخل تشتک‌های پتری شیشه‌ای به قطر ۹ سانتی‌متر کشت شد و در دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۱٦ ساعت روشنایی قرار گرفت.

پس از ۱۲ تا ۱۵ روز کنیدی‌ها و ریسه‌ها به وسیله ۱۰ تا ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵٪ ماده خیس کننده توین – ۸۰ (Tween-80) و با یک میله شیشه‌ای خمیده و سترون برداشت شد. مخلوط از یک پارچه ململ سترون چند لایه عبور داده شد تا کنیدی‌های خالص به دست آید. غلظت کنیدی با استفاده از لام گلوبول شمار یا هموسیتومتر (Haemocytometer) تعیین شد. ۲٤ ساعت پیش از آغاز هر آزمایش درصد جوانه‌زنی کنیدی‌ها در محیط کشت PDB (Potato Dextrose Broth) تعیین گردید.

برای انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی، نخست سینی‌های آلومینیومی به ابعاد ۳×٤۲×۷٦ سانتی‌متر انتخاب و حدود ۷۵٪ قسمت داخلی آن با صفحات یونولیت به ضخامت سه سانتی‌متر پوشانده شد، و بقیه برای افزایش رطوبت در اطراف واحدهای آزمایشی پر از آب گردید. سپس ورقه‌های اسفنج به صورت دوایری به قطر ۱۷ سانتی‌متر و کلفتی ۱/۵ سانتی‌متر تهیه، و با استفاده از سوزن ته‌گرد روی صفحه یونولیت ثابت شد، تا علاوه بر افزایش رطوبت زیاد مورد نیاز در اطراف گیاه و شته‌ها از طریق آزاد کردن رطوبت ذخیره شده، مانع فرار شته‌های مورد آزمایش، و به ویژه پوره‌های آنها از قسمت پایین واحدهای آزمایشی گردد.

ساقه‌هایی به طول ۱۸ تا ۲۰ سانتی‌متر از گیاه بریده شد و داخل آب مقطر در گلدان‌های شیشه‌ای کوچک به قطر ۲/۵

www.SID.ir

Archive of SID

سانتی‌متر و ارتفاع ۷/۵ سانتی‌متر قرار گرفت. دهانه این گلدان‌ها به وسیله صفحه کاغذی دو لایه پوشانده شد تا از سقوط شته‌ها به داخل آب جلوگیری شود، و فقط سوراخ کوچکی برای عبور ساقه گیاه در آن تعبیه گردید. هر کدام از این گلدان‌ها با ایجاد سوراخی در وسط ورقه اسفنج داخل واحد آزمایشی قرار گرفت. هر یک از واحدها توسط یک ظرف استوانه‌ای پلاکسی‌گلاس به قطر ۱۷ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۴/۵ سانتی‌متر پوشانده شد. در قسمت‌های جانبی هر ظرف استوانه‌ای ۳ سوراخ به قطر پنج سانتی‌متر ایجاد شد، و به وسیله توری با روزنه ۸۰ مش (Mesh) پوشانده شد تا تهویه به صورت مناسبی انجام گیرد. برای جلوگیری از نفوذ پوره‌ها به داخل ظروف اطراف، شیاری روی صفحه یونولیت ایجاد گردید. برای ایجاد هماهنگی سنی بین شته‌های مورد آزمایش، سه شته بالغ در هر واحد قرار گرفت تا به مدت ۱۲ ساعت پوره‌زایی کنند. سپس حشرات کامل برداشته شد و ۱۰ پوره در هر واحد نگهداشته شد و بقیه حذف گردید.

در هر آزمایش زیست‌سنجی ۱۸ واحد فراهم شد، که در آن پنج غلظت قارچی شامل 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کنیدی در هر میلی‌لیتر، و شاهد حاوی آب مقطر استریل همراه با ۰/۰۵٪ ماده خیس‌کننده، هر کدام در سه واحد آزمایشی، در چارچوب یک طرح کاملاً تصادفی به روش اسپورپاشی روی پوره‌های سن دوم شته نخودفرنگی مورد آزمایش قرار گرفت. اسپورپاشی با استفاده از یک محلول‌پاش معمولی (مدل نیلوفر) از فاصله ۲۵ سانتی‌متری، و به میزان ۲۰ میلی‌لیتر روی هر ساقه انجام شد تا سطح آن کاملاً خیس شود. شته‌های تیمار شده در دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و رطوبت نسبی ۳±۹۷٪ قرار گرفتند. رطوبت بالای مورد نیاز از طریق خیس کردن اسفنج و دیواره ظروف پلاکسی‌گلاس تأمین گردید. آزمایش سه بار تکرار شد. شته‌های مرده و پوره‌های تولید شده به وسیله افراد آلوده، روزانه و به مدت ۱۲ روز شمارش و از سطح گیاه حذف گردیدند. برای مشاهده بلاستوسپورها، لاشه حشرات مرده به وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (Statistics Analysis System) صورت گرفت. مقادیر R_0 از رابطه $R_0 = \Sigma l_x . m_x$ محاسبه شد، که در این رابطه l_x احتمال بازمانی از روز x تا روز x+1، و m_x میانگین شمار نتاج تولید شده به وسیله هر حشره ماده در روز x است. برای تحلیل داده‌های تلفات و R_0 از تجزیه واریانس (Anova) و مقایسات اورتوگونال، و برای محاسبه مقادیر LC_{50} و LT_{50} به ترتیب از تجزیه پروبیت (PROC PROBIT) و تجزیه بازمانی (PROC LIFETEST) استفاده شد.

نتایج و بحث

مشاهده رشد هیفی قارچ در سطح بدن حشره طی دوره پیش از مرگ، با استفاده از استریومیکروسکوپ و وسایل دیگر، به دلیل پایین بودن درشت‌نمایی آنها امکان‌پذیر نشد. رشد ریسه‌های قارچ *V. lecanii* دو تا سه روز پس از آلوده‌سازی به وسیله پژوهشگران مختلف دیده شده است (٤ و ٣١). با این حال، از نظر رفتاری تغییر محسوسی در شته‌های تیمار شده نسبت به شته‌های سالم وجود داشت. مهم‌ترین تغییر رفتار در شته‌های آلوده کاهش چشم‌گیر تحرک و تحریک‌پذیری آنها بود، به طوری که در مراحل حاد بیماری، بدن حشره، به ویژه پاها، در پاسخ به تحریکات لرزش داشت.

شمار حشرات مرده در هر تیمار، پس از اثبات این که آلودگی به وسیله قارچ مورد نظر بروز کرده، ثبت شد. برای اثبات آلودگی از روش مشاهده بلاستوسپورهای قارچی در همولنف حشره استفاده شد. این روش اثبات آلودگی قارچی نسبت به سایر روش‌ها، از جمله مشاهده رشد ریسه قارچ در سطح بدن حشره مرده مطمئن‌تر است، زیرا در حالت اخیر ممکن است مرگ حشره به وسیله عوامل زنده یا غیر زنده دیگر غیر از قارچ *V. lecanii* بروز کند، و قارچ به صورت ساپروفیتی در سطح بدن حشره رشد پیدا کند، و این باعث اشکال در نمونه‌برداری می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

درصد مرگ و میر در شاهد و غلظت‌های 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر به ترتیب ۳/۳۳±۶/۶۷٪، ۶/۹۳±۴۵/۷٪، ۸/۳۸±۶۸/۲٪، ۸/۸۱±۸۰٪ و ۴/۴۵±۹۵/۵٪ به دست آمد. تجزیه واریانس تلفات بیانگر معنی‌دار شدن مرگ و میر شته نخودفرنگی با افزایش غلظت قارچ *V. lecanii* بود ($F^{5و12}$=۶۱/۳۴، P<۰/۰۰۰۱). برای انجام مقایسهٔ میانگین‌ها از روش مقایسات مستقل یا متعامد استفاده شد، که نتایج آن در جدول ۱ آمده است.

برای محاسبه LC_{50}، درصد تلفات شته و غلظت‌های قارچ *V. lecanii* تحت تجزیه پروبیت قرار گرفت (P=۰/۰۰۰۱، $F^{1و12}$=۵۵/۸۴). به علت بروز ۱۰۰٪ تلفات در یکی از تکرارهای غلظت 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر، تجزیه آماری برای این غلظت فقط با دو تکرار انجام شد. مقدار LC_{50} محاسبه شده $5/14\times10^4$ کنیدی در میلی‌لیتر با حدود اطمینان ۱/۴۴ تا ۱۲/۹ ($\times10^4$ کنیدی در میلی‌لیتر) بود (P<۰/۰۰۰۱). با توجه به این که آزمون کای‌اسکور پیرسون (Pearson Chi-square) برای ناهمگنی خط رگرسیون معنی‌دار نبود (P=۰/۳۲)، آماره t استیودنت (=۱/۹۶) برای محاسبه حدود اطمینان در سطح ۹۵٪ مورد استفاده قرار گرفت. معادله خط رگرسیون برازش شده y=۳/۰۹+۰/۴۰x بود (شکل ۱). شیب خط رگرسیون در سموم شیمیایی و عوامل بیماری‌زایی که از طریق تولید زهرابه میزبان خود را از بین می‌برند (مانند *Bacillus thuringiensis*) تند است، ولی در مورد قارچ‌ها کمتر می‌باشد.

در آزمایشی که توسط هال (۱۱) صورت گرفت شیب خط رگرسیون حاکم بین غلظت‌های $1/25\times10^5$ تا 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر از قارچ *V. lecanii* و درصد مرگ و میر شته گل داوودی (*M. sanborni*)، ۲/۲۶ به دست آمد، که در مورد قارچ‌ها شیب زیادی به حساب می‌آید. علت زیاد بودن شیب خط پروبیت به برنامه استاندارد پرورش حشرات و روش‌های آزمایش نسبت داده شده است (۱۱). در آزمایش دیگری که اثر جدایه DNVL۸۷۰۱ قارچ *V. lecanii* روی چند گونه از شته‌های غلات بررسی شد، مقدار شیب خط رگرسیون ۰/۵۷ تا ۱/۰۲ به دست آمد. به طور نظری، هر اندازه غلظت‌های مورد استفاده از مقدار LC_{50} فاصله بیشتری داشته باشند، در شیب خط رگرسیون به دست آمده در سطح دقت معین تأثیر گذاشته و آن را پایین می‌آورند (۹).

برای محاسبه LT_{50}، میزان مرگ و میر به طور جداگانه برای غلظت‌های متفاوت قارچ و روزهای مختلف ثبت شد، که نتایج آن در شکل ۲ آمده است. بروز تلفات در شته‌های مورد آزمایش به صورت غیر وابسته به غلظت سوسپانسیون کنیدی از روز سوم آغاز شد. این مدت در آزمایش‌های بیشتر پژوهشگران روی شته‌های مختلف دیده می‌شود (۴ و ۳۱). به نظر می‌رسد که طی این مدت، قارچ مراحل مختلف بیماری‌زایی، شامل چسبیدن به کوتیکول، تندش کنیدی‌ها و رشد میسلیوم‌ها برای اشغال سطح بدن میزبان و نفوذ لوله‌های تندشی به کوتیکول و اشغال بافت‌ها و اندام‌های مختلف میزبان را سپری می‌کند (۴). با این حال، در آزمایشی با استفاده از جدایه ATCC۴۶۵۷۸ قارچ *V. lecanii* روی شته *Sitobion avenae*، تلفات از نخستین روز آزمایش آغاز شد (۲۵).

مقادیر محاسبه شده برای LT_{50} در غلظت‌های مختلف قارچ *V. lecanii* از طریق آزمون بازمانی تعیین گردید، که نتایج آن در جدول ۲ آمده است.

مقادیر محاسبه شده برای LC_{50}، و به ویژه LT_{50} در آزمایش‌های زیست‌سنجی، نشان دهندهٔ شدت بیماری‌زایی ماده مورد آزمایش است. با این حال، ایجاد بیماری و شدت آن در میزبان تحت تأثیر عوامل بسیاری قرار می‌گیرد. از این عوامل می‌توان به سرعت تندش کنیدی‌ها، میزان اسپورزایی و فعالیت آنزیم‌های برون سلولی، به ویژه کیتینازها (۴) اشاره کرد (۱۷). اندازه اسپور رابطه چندانی با شدت بیماری‌زایی قارچ ندارد (۱۷).

ویژگی‌های میزبان نیز در بروز و شدت بیماری ایجاد شده تأثیر دارد. نقش اسیدهای چرب آزاد با زنجیر کوتاه موجود در کوتیکول برخی حشرات در جلوگیری از تندش پروپاگول‌های (Propagule) قارچ‌ها به اثبات رسیده است. در کوتیکول شته

www.SID.ir

Archive of SID

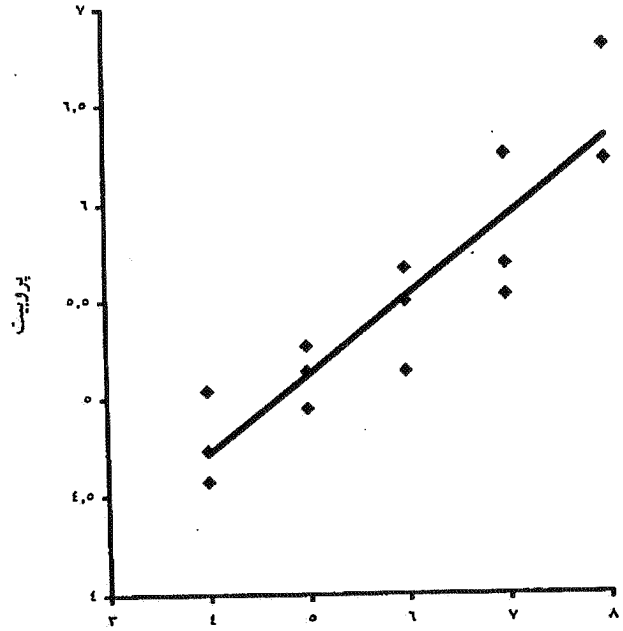
جدول ۱. مقایسه میانگین‌های درصد مرگ و میر شته نخودفرنگی (*A. pisum*) در غلظت‌های مختلف قارچ *V. lecanii*

مقایسات	درجه آزادی	آماره F	P
10^8 با 10^7	۱	۷/۷٤	۰/۰۱٦
10^7 با 10^6	۱	۳/۹۵	۰/۰۷۰
10^6 با 10^5	۱	۳/۹۵	۰/۰۷۰
10^5 با 10^4	۱	٤/۷۸	۰/۰٤۹
10^4 با شاهد	۱	٤۸/۳٦	۰/۰۰۰

جدول ۲. مقادیر LT_{50} محاسبه شده برای غلظت‌های مختلف قارچ *V. lecanii* (ورتالک) روی پوره‌های سن دوم شته نخودفرنگی (*A. pisum*)

غلظت (کنیدی در میلی‌لیتر)	LT_{50}	خطای استاندارد	حد پایین	حد بالا
10^4	–	–	۱۱	–
10^5	۱۰*	۰/۳۵	۸	–
10^6	۸	۰/۳۵	۷	۱۰
10^7	٦/۵	۰/۳٤	٦	۸
10^8	۵	۰/۲۸	٤	٦

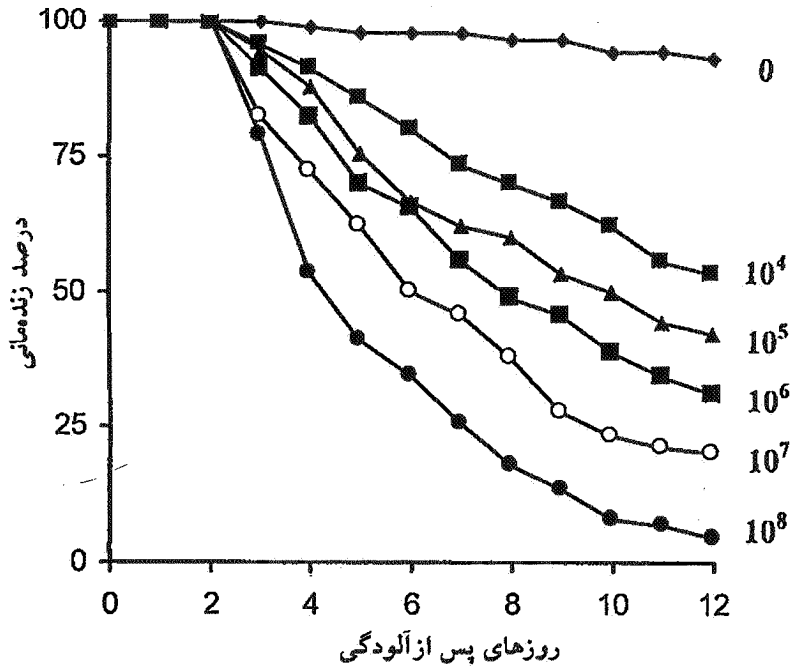
* : روز



شکل ۱. نمودار خط رگرسیون غلظت‌های قارچ *V. lecanii* (ورتالک) و پروبیت مرگ و میر پوره‌های سن دوم شته نخودفرنگی (*A. pisum*)، ۱۲ روز پس از آلوده‌سازی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. درصد تلفات ایجاد شده به وسیله قارچ *V. lecanii* (ورتالک) روی پوره‌های سن دوم شته نخودفرنگی (*A. pisum*) در مدت ۱۲ روز پس از آلوده‌سازی

نخودفرنگی تنها مقدار کمی اسید چرب با زنجیر کوتاه یافت شده است، ولی در ترشحات مایع کوتیکول و عسلک این شته اسیدهای آمینه آزاد و مونوساکاریدهایی پیدا شده است، که محیط مناسبی برای تشکیل لوله‌های تندشی جدایه‌های خاصی از قارچ *Conidiobolus obscurus* می‌باشد (٦). مقاومت میزبان نیز در بروز و شدت بیماری قارچی تأثیر بسزایی دارد، به طوری که قارچ *Entomophthora obscura* روی دو جمعیت مختلف شته نخودفرنگی تأثیر کاملاً متفاوتی نشان داده است (٢٤).

پوره‌هایی که به وسیله افراد تیمار شده طی روزهای آزمایش به دست آمد شمارش، و تعداد متوسط آن برای ۳۰ شته محاسبه گردید، که نتایج آن در شکل ۳ آمده است.

شته‌های مورد آزمایش به تدریج از روز چهارم آلوده‌سازی به سن بلوغ رسیده و تولید مثل کردند. با افزایش غلظت کنیدی‌های قارچ، تولید نتاج کاهش پیدا کرد. مقادیر میانگین R_0 برای شاهد و غلظت‌های 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر به ترتیب ۵/۳۸±۲۸/۱۵، ٤/٥١±٢٢/٧٦، ٤/٥١±١٧/٠١، ٣/٨٠±١٣/٨٢، ٢/٤٩±٧/٩١، و ١/٨١±٥/١٥ محاسبه گردید. تجزیه واریانس مقادیر R_0 گویای کاهش معنی‌دار آهنگ تولید مثل با افزایش غلظت قارچ بود ($P<0/0001$). نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها به روش مستقل یا متعامد در جدول ۳ خلاصه شده است.

هر چند افزایش غلظت کنیدی از 10^7 به 10^8 کنیدی در میلی‌لیتر باعث کاهش معنی‌داری در تولید نتاج نشد، ولی در مجموع، با افزایش غلظت قارچ، کاهش معنی‌داری در تولید پوره توسط شته‌های آلوده مشاهده گردید.

برازش خط رگرسیون بین غلظت قارچ و مقادیر R_0 با استفاده از لگاریتم اعداد صورت گرفت و داده‌های مربوط به شاهد از تجزیه حذف گردید. نتیجه این تجزیه نشان دهنده معنی‌دار بودن شیب خط رگرسیون بود ($P<0/0001$، $F^{1و13}=150/7$).

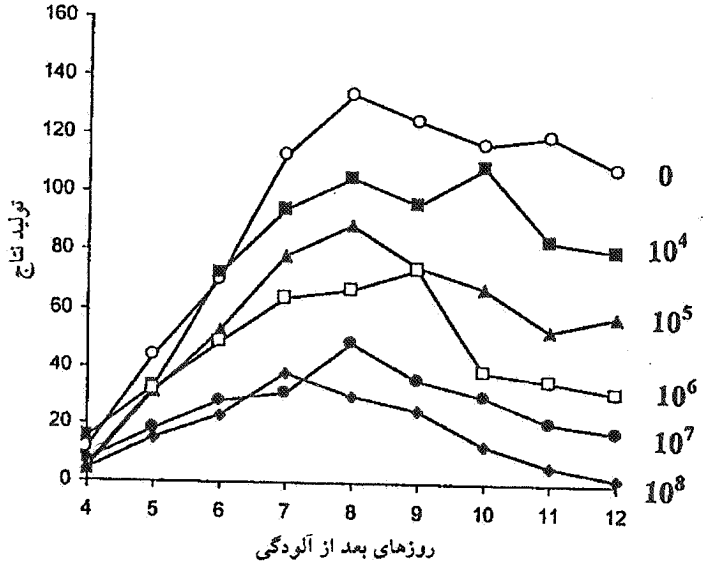
هر چند با افزایش غلظت کنیدی قارچ، کاهش معنی‌داری در شمار نتاج تولید شده مشاهده گردید، ولی مقادیر R_0 در طول انجام آزمایش‌ها به یک و یا پایین‌تر از آن کاهش پیدا

www.SID.ir

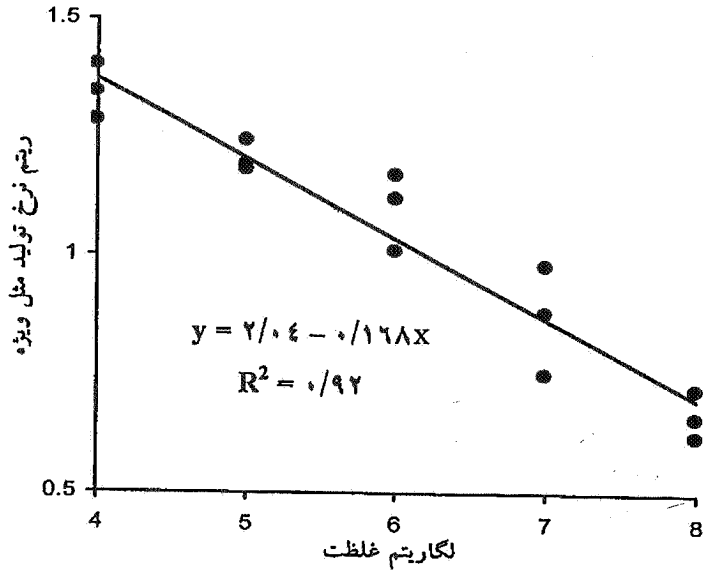
Archive of SID

جدول ۳. مقایسه میانگین‌های مقادیر R_0 شته نخودفرنگی (*A. pisum*) در غلظت‌های مختلف کنیدی قارچ *V. lecanii* (ورتالک)

مقایسات	درجه آزادی	آماره F	P
10^8 با 10^7	۱	۲/۰۷	۰/۱۵
10^7 با 10^6	۱	۷/۷٤	۰/۰۰۷۳
10^6 با 10^5	۱	۳/۸۲	۰/۰۵
10^5 با 10^4	۱	۸/۹٤	۰/۰۰٤
10^4 با شاهد	۱	۷/۸٦	۰/۰۰۷۷



شکل ۳. شمار پوره‌های تولید شده به وسیله ۳۰ شته نخودفرنگی (*A. pisum*)، طی ۱۲ روز پس از آلوده‌سازی با غلظت‌های مختلف قارچ *V. lecanii* (ورتالک)



شکل ٤. تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ *V. lecanii* (ورتالک) در کاهش آهنگ خالص رشد جمعیت (R_0) شته نخودفرنگی (*A. pisum*)

www.SID.ir

Archive of SID

نکرد، و این نشان می‌دهد که در محدودهٔ غلظت‌های مورد آزمایش قارچ *V. lecanii* باعث کاهش جمعیت در نسل بعد نشده، ولی روند افزایش جمعیت را کندتر می‌کند.

نتایج پژوهش بیانگر بیماری‌زایی شدید قارچ *V. lecanii* روی شته نخودفرنگی است، که افزون بر ایجاد مرگ و میر زیاد، تأثیر مثبتی در پایین نگهداشتن جمعیت آفت در نسل بعد نشان داده است. بنابراین، استفاده از این قارچ در چارچوب برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات، به ویژه علیه آفات گلخانه‌ای توصیه می‌شود. آلرودها که در گلخانه‌ها مشکل‌ساز هستند و در برابر بسیاری از سموم شیمیایی مقاوم شده‌اند، تا حدود زیادی به وسیله این قارچ کنترل می‌شوند، ولی پیش از استفاده گسترده از آن، باید از نظر تأثیر نگذاشتن در موجودات غیر هدف، به ویژه شکارگرها و پارازیتوییدها مطمئن شد. هم‌چنین، تلاش برای یافتن فرمولاسیون‌هایی که در شرایط مزرعه‌ای کارایی خوبی داشته باشند، ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

از جناب آقای مهندس شهرام فرخی کارشناس بخش تحقیقات مبارزه بیولوژیک مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، به خاطر در اختیار گذاشتن فراورده ورتالک قارچ *V. lecanii* سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. کاظمی، م. ح. ۱۳۷٤. *کنترل میکروبی آفات و بیماری‌های گیاهی*. انتشارات دانشگاه تربیت معلم تبریز. ۱٦۷ صفحه.

2. Andreeva, I. V. and M. V. Shternshis. 1995. Microbiological formulations against web mites in greenhouses. Zasch. Rast. (Mosco.) 11: 41-42.
3. Askary, H. and J. Brodeur. 1999. Suseptibility of larval stages of aphid parasitoid *Aphidius nigripes* to the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*. J. Invertebr. Pathol. 73: 129-132.
4. Askary, H., N. Benhamou and J. Brodeur. 1999. Ultrastructural and cytochemical characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. J. Invertebr. Pathol. 74: 1-13.
5. Barson, G. 1976. Laboratory studies on the fungus, *Verticillium lecanii*, a larval pathogen of the large elm bark beetle, *Scolytus scolytus*. Ann. Appl. Biol. 83: 207-214.
6. Brey, P. T., J. P. Latge and M. C. Prevost. 1986. Integumental penetration of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* by *Conidiobolus obscurus*. J. Invertebr. Pathol. 48: 34-41.
7. Drummond, J., J. B. Heale and A. T. Gillespie. 1987. Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. Ann. Appl. Biol. 111: 193-201.
8. Etzel, R. W. and F. L. Petitt. 1992. Association of *Verticillium lecanii* with population reduction of red rice root aphid, *Rhopalosiphum rufiabdominalis* on aeroponicaly growth squash. Florida Entomol. 75: 605-606.
9. Feng, M. G., J. B. Johnson and L. P. Kish. 1990. Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid derived isolate of *Beauveria bassiana* for six species of cereal-infesting aphids. Environ. Entomol. 19: 815-820.
10. Gillespie, A. T. and N. Claydon. 1989. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in phathogenesis. Pestic. Sci. 27: 203-215.
11. Hall, R. A. 1976a. A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* conidiospores on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. J. Invertebr. Pathol. 27: 41-48.
12. Hall, R. A. 1976b. *Verticillium lecanii* on the aphid *Macrosiphoniella sanborni*. J. Invertebr. Pathol. 28: 389-391.
13. Hall, R. A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. PP: 483-498 *In*: H. D. Burges. (Ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Academic Press, London.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Hall, R. A. 1982. A new insecticide against greenhouse aphids and whitefly: The fungus, *Verticillium lecanii*. Ohio Florist Assoc. Bull. 626: 3-4.
15. Harper, A. M. and H. C. Huang. 1986. Evaluation of the entomogenous fungus, *Verticillium lecanii* as a control agent for insects. Environ. Entomol. 15: 281-284.
16. Heintz, C. and R. Blaich. 1990. *Verticillium lecanii* as a hyperparasite of grapewine mildew, *Uncinula necator*. Vitis 29: 229-232.
17. Jackson, C. W., J. B. Heale and R. A. Hall. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. Ann. Appl. Biol. 106: 39-48.
18. Johnson, D. L., H. C. Huang and A. M. Harper. 1988. Mortality of grasshoppers inoculated with a canadian isolate of the fungus, *Verticillium lecanii*. J. Invertebr. Pathol. 52: 335-342.
19. Latge, J. P. and B. Papierok. 1988. Aphid pathogens. PP: 323-355, *In*: A. K. Minks and P. Harrewijin (Eds.), Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control. Elsevier Science, Amsterdam.
20. Majchrowicz, I. And T. J. Poprawski. 1993. Effects in vitro of nine fungicides on growth of entomopathogenic fungi. Biocontrol Sci. Techn. 3: 321-336.
21. Meyer, S. L. and R. J. Meyer. 1995. Effects of a mutant strain and a wild type strain of *Verticillium lecanii* on *Heterodera glycines* populations in the glasshouse. J. Nematol. 27: 409-417.
22. Mietkiewski, R. 1985. The mycoflora of dead larvae of the brown tail moth, *Euproctis chrysorrhoea* during winter diapause. Roczniki Nauk Rolniczych 15: 139-150.
23. Milner, R. J. 1997. Prospects for biopesticides for aphid control. Entomophaga 42: 227-239.
24. Milner, R. J. and R. S. Soper. 1981. Bioassay of *Entomophthora* against the Spotted Alfalfa Aphid, *Therioaphis trifolii* f. *maculata*. J. Invertebr. Pathol. 37: 168-173.
25. Miranpuri, G. S. and G. G. Khachatourian. 1995. Entomopathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* toward English grain aphid, *Sitobion avenae*. J. Insect Sci. 8: 34-39.
26. Powell, K. A. 1995. The production of chemicals by biological control agents. Pestic. Sci. 44: 395-397.
27. Russo, A., G. M. San Lio, S. O. Cacciola and C. Asero. 1988. *Verticillium lecanii* as a possible control agent of citrus black scale in Sicily. Bull. SROP 11: 56-61.
28. Saito, T. and M. Yabuta. 1996. Laboratory studies on effect of pesticides on entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*. Jap. J. Appl. Zool. 40: 71-76.
29. Sapieha, A. and R. Mietkiewski. 1992. The influence of chitin synthesis inhibitors on growth of entomopathogenic fungi in vitro. Acta Mycol. 27: 189-195.
30. Shashidhar, V., A. S. Vastrad and S. Lingappa. 1994. Incidence of the fungus, *Verticillium lecanii* on mango leafhoppers. Karnataka J. Agric. Sci. 7: 242-243.
31. Sitch, J. C. and C. W. Jackson. 1997. Pre-penetration events affecting host specificity of *Verticillium lecanii*. Mycol. Res. 10: 535-541.
32. Skinner, M., B. L. Parker and D. R. and D. R. Bergdahl. 1991. *Verticillium lecanii* isolated from larvae of pear thrips, *Taeniothrips inconsequens* in Vermont. J. Invertebr. Pathol. 58: 157-163.

www.SID.ir