دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ۴۶۶۸-۲۰۰۸
www.entomologicalresearch.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)

جلد ۳، شماره ۳، سال ۱۳۹۰، (۲۴۱-۲۵۲)

بررسی تاثیر چند جدایه از قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) روی شته جالیز *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) روی خیار گلخانه‌ای در شرایط آزمایشگاه

ریحانه عسگرپور[۱]*، ابراهیم سلیمانژادیان[۲]، شعبان شفیع زاده[۳]، مهران غزوی[۴]، مسعود لطیفیان[۵]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
۲- گروه حشره شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
۳- بخش تحقیقات گیاه پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان
۴- بخش حشره شناسی کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران)
۵- موسسه خرما و میوه های گرمسیری کشور، اهواز

Archive of SID

چکیده

بیمارگری چهار جدایه از قارچ *Beauveria bassiana* شامل DEBI 015، DEDI 002، DEDI 001 و DEBI 004 روی حشره کامل شته سبزجالیز *Aphis gossypii* بررسی شد. سپس این جدایه‌ها با غلظت‌های 10^2، 10^3، 10^4، 10^5 و 10^6 اسپور بر میلی لیتر مورد آزمایش قرارگرفت و غلظت کشندگی ۵۰٪ محاسبه گردید. در بین چهار جدایه کمترین LC_{50} مربوط به جدایه DEBI 015 با غلظت ۱۳/۴۸ اسپور بر میلی‌لیتر بود که بالاترین زهراگینی را نسبت به سایر جدایه‌ها نشان داد و بیشترین مربوط به جدایه DEBI 004 با ۲۶۹۵۳۸ اسپور بر میلی‌لیتر بود که دارای کمترین زهراگینی بود. زمان کشندگی بین جدایه‌های قارچ *B. bassiana* بر روی شته‌های بالغ، برای غلظت‌های 10^4، 10^5 و 10^6 اسپور بر میلی‌لیتر محاسبه شد. بالاترین و پایین‌ترین زمان کشندگی به ترتیب مربوط به جدایه DEBI 004 در غلظت 10^6 اسپور بر میلی‌لیتر به مدت۵/۶۶ روز و جدایه DEBI 015 در غلظت 10^6 اسپور بر میلی‌لیتر به‌مدت۳/۳۲ روز بود. در تمام غلظت‌های مورد آزمایش، جدایه DEBI 015 بالاترین میزان مرگ ومیر را در غلظت‌های ۱ تا 10^6 اسپور بر میلی‌لیتر، با دامنه کشندگی ۳۳/۵ تا ۹۶/۷ درصد نشان داد.

واژه‌های کلیدی: شته سبز جالیز، حشره، *Beauveria bassiana*، LC_{50}، LT_{50}

*نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *r.asgarpour@yahoo.com*

تاریخ دریافت مقاله (۸۹/۳/۳۰) – تاریخ پذیرش مقاله (۹۰/۲/۷)

www.SID.ir

مقدمه

تبدیل اکوسیستم‌های طبیعی به زمین‌های کشاورزی برای تهیه غذای بیشتر موجب بهم خوردن تعادل طبیعی و در نتیجه طغیان آفات و بیماری‌های گیاهی شده است. برای کنترل آین آفات عمدتا از سموم شیمیائی استفاده می‌شود. علاوه بر کنترل آفات و بیماری‌ها مصرف مواد شیمیائی باعث نابودی دشمنان طبیعی و طغیان بیشتر آفات می‌گردد. افزایش مصرف آفت‌کش‌های شیمیائی باعث بروز مقاومت در آفات، تبدیل آفات درجه دوم به درجه اول و آلودگی بیشتر محیط زیست گردیده است.

محصولات جالیزی در مزرعه و گلخانه به وفور مورد حمله آفات قرار می‌گیرند. گلخانه‌داران برای جلوگیری از خسارت آفات جالیز به‌طور مکرر از آفت‌کش‌های شیمیائی استفاده می‌کنند و این موضوع می‌تواند سلامت جامعه را به خطر اندازد. کاهش مصرف مواد شیمیایی از اهداف اصلی مدیریت آفات(IPM) است. یکی از راه‌های کاهش سمپاشی‌ها استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک می‌باشد.

استفاده از پارازیتوییدها، شکارگرها، پاتوژن‌ها، آنتاگونیست‌ها و یا رقابت‌کننده‌ها برای مهارآفات، بیمارگرهای گیاهی و علف‌های هرز تا زیرسطح آستانه اقتصادی را کنترل بیولوژیک گویند (Van Driesche & Bellows, 1996). کنترل میکروبیولوژیک شاخه‌ای از کنترل بیولوژیک است که در آن از انواع عوامل کنترل میکروبی نظیر قارچ‌ها، ویروس‌ها و باکتری‌ها استفاده می‌شود.

گونه‌های مختلفی از قارچ‌ها نظیر *Beauveria bassiana* Balsamo, *Lecanicillium lecanii* Zimmermann (Devi *et al*., 2003)، *Nomuraea rileyi* Farlow, *Paecilomyces* (Sha & feng, 2004) و *Metarhizium anisopliae* Metsch (Wright & Brooks, 2004)در موارد متعدد برای مبارزه با حشرات آفت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Deri *et al*., 2003).

قارچ *Beauvaria bassiana* (Balsamo) Vuillemin یکی از عوامل کنترل بیولوژیک است که برای کنترل حشرات آفت به‌کار می‌رود. این قارچ عامل بیماری موسکاردین سفید می‌باشد. وجه تسمیه آن، پوشش سفیدی است که پس از مرگ حشره، لاشه آن را می‌پوشاند. جدایه‌ها و سوش‌های مختلف این قارچ در طبیعت وجود دارند. به همین جهت می‌توان مناسب‌ترین جدایه را انتخاب و در قالب برنامه کنترل بیولوژیک استفاده نمود (Van *et al*., 2007). درطبیعت شته‌ها به ندرت توسط *B. bassiana* آلوده می‌شوند. با وجود این شته *Acyrthosiphon pisum* Harris در کشور شوروی و چهار گونه شته در آیداهو-آمریکا توسط *B. bassiana* آلوده شده‌اند (Ming *et al*.,1990).

شته جالیز *Aphis gossypii* Glover از آفات مهم خیار گلخانه‌ای در ایران بوده و باعث زردی بوته، پژمردگی شدید و خشک شدن گیاه می‌شود. همچنین این شته قادر است از طریق انتقال عوامل بیماریزای ویروسی (از جمله بیماری لکه گرد ویروسی) به‌صورت غیرمستقیم نیز به گیاه خسارت وارد کند. هدف از این بررسی یافتن جدایه‌هایی از قارچ *B. bassiana* است که به‌تواند به‌جای آفت‌کش‌های شیمیایی جمعیت شته جالیز را در گلخانه‌ها کنترل نماید.

Archive of SID

www.SID.ir

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری و پرورش شته جالیز

برای به‌دست آوردن شته‌های سبز جالیز *A. gossypii* ابتدا شته‌های بالدار و بدون بال به همراه تعدادی پوره‌های سنین مختلف از گلخانه‌های خیار پیربکران اصفهان از روی گیاه خیار در کیسه‌های پلاستیکی جمع‌آوری شد. سپس در همان روز از هر کیسه تعدادی شته سبز جالیز توسط قلم مو جدا و به روی بوته‌های خیار داخل قفس پرورش منقل شد.

جهت پرورش شته سبزجالیز از قفسهایی به ابعاد ۱۰۰×۱۰۰×۱۰۰سانت‌متر که اطراف آن با تور ارگانزا پوشیده شده بود استفاده شد. در داخل قفس‌ها گلدان‌های حاوی بوته‌های خیار ۴ تا ۵ برگی برای تغذیه شته‌ها قرارداده شد. قفس‌های پرورش در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۴- ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵- ۶۵ درصد قرار داده شدند.

برای به‌دست آوردن بالغین ۱ روزه از پتری‌های یک‌بار مصرف استریل به‌قطر ۸۰ mm که کف آن با کاغذ صافی استریل پوشانده شده بود، استفاده شد. یکی از برگ‌های کوچک خیار، شسته شده و انتهای آن با پنبه مرطوب پوشانده شد و در داخل لوله اپندورف قرار دادهشد. سپس بر روی برگ‌ها تعدادی شته که توانایی پوره‌زایی داشتند قرار دادهشد. روز بعد بالغین با قلم‌مو از پتری جدا شد و پوره‌های متولد شده نگهداری شدند. پس از ۱۲-۱۰ روز این پوره‌ها تبدیل به بالغین ۱ روزه شدند که آماده برای انجام آزمایش بودند (Antonio *et al.*, 1996).

۲-۲- مطالعات قارچ شناسی

جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق از موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه گردیدند. مشخصات جدابه‌های مورد استفاده در جدول (۲-۱) درج گردیده است (Ghazavii *et al.*, 2002).

جدول ۱: مشخصات جدایه های ایرانی مورد استفاده (Ghazavii *et al.*, 2002).

Table 1-characterics of the Iranian isolates of *B. bassiana* (Ghazavii *et al.*, 2002).

Isolate name	Isolate code	Source	Collecting site	Collectors
Grasshopper	DEBI 015	*Sphingonotus* sp.	….	Dr. Ghazavi
Ateshgah	DEDI 002	Soil (hiberanating site of sum pest)	Atashgah-Karaj	Dr. Ghazavi
Fashand	DEDI 001	soil	?Fashand, cherry	Dr. Ghazavi
Curculionid	DEBI 004	*Hypera postica*	Ghazvin	Dr. Ghazavi

برای مطالعه قارچ‌های جدا شده، ابتدا روی محیط کشت PDA، کشت و در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی قرار دادهشدند. زمان اسپوردهی برای قارچ مورد نظر از ۱۵ تا ۲۰ روز متغییر بود.

۲-۳- آزمون بیمارگری

ابتدا آزمایش اثبات بیمارگری انجام شد. برای انجام این آزمون تعداد ۴۰ عدد شته بالغ انتخاب و سوسپانسیونی از اسپور جدایه‌های مورد آزمایش *B. bassiana* با غلظت 10^{15} اسپور در میلی لیتر تهیه گردید. با تخلیه سوسپانسیون روی شته‌ها به‌صورت همزمان آلوده‌سازی انجام شد. شته‌ها در داخل ظروف مخصوص آزمایش درون ژرمیناتور با درجه

Archive of SID

www.SID.ir

حرارت ۱±۲۷ درجه سلسیوس ورطوبت نسبی ۵±۸۵ درصد ودوره روشنایی: تاریکی (۱۲:۱۲) به مدت دو روز نگهداری شدند. برای روزهای بعد رطوبت نسبی ۴۰ درصد در نظر گرفته شد. در بازدید روزانه حشرات مرده جمع‌آوری وپس از ضد عفونی سطحی بدن آن‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم یک در صد به‌مدت ۲ تا ۳ دقیقه و شست وشو با آب مقطر استریل در ۲ نوبت به‌مدت ۳ دقیقه، درون پتری‌های استریل یک‌بار مصرف قرار داده‌شدند. برای ایجاد رطوبت اشباع درون پتری از پنبه خیس استفاده گردید، تا بار قارچ در سطح بدن حشره ظاهر گردد. قارچ‌های جدا شده از لاشه‌ی شته‌ها مجددا کشت و با استفاده از سوسپانسیون تهیه شده از آنها مجدداً۴۰ عدد شته بالغ دیگر آلوده شد تا پس از مرگ و ظهور مجدد اسپورها در سطح بدن حشرات، اصول کخ برای اثبات بیمارگری جدایه مورد آزمایش کامل گردد (Van *et al.*, 2007; Antonio *et al.*, 1996).

۲-۴- زیست سنجی

از محلول Tween 80 با غلظت ۰/۰۲ درصد به‌عنوان ماده حامل برای محاسبه غلظت کشنده جدایه‌های مختلف استفاده شد. اسپورهای جدایه‌های *B. bassiana* پس از خراشیده شدن به‌وسیله اسکالپل استریل از سطح محیط کشت ۲۰ روزه، درون ماده حامل به حالت تعلیق در آورده شد (Spurgcon & Hudson, 2007). سپس سوسپانسیون حاصله از پارچه ململ دو لایه عبور داده و در شیشه‌های ارلن حاوی گلوله‌های شیشه‌ای جمع‌آوری گردید. غلظت سوسپانسیون توسط لام گلبول شمار (هموسیتومتر) تعیین وسری غلظت‌ها تهیه گردید (Alizadeh *et al.*, 2007). روز قبل از انجام آزمایش جهت اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی اسپورها، مقدار اندکی از اسپورهای مورد آزمایش به‌صورت استریل درون محلول Tween 80 با غلظت ۰/۰۲ درصد به حالت تعلیق در آمده و سپس با میکروپی‌پت حدود ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به‌صورت قطره قطره در سطح پتری حاوی محیط کشت SDA+Y قرار داده و به‌صورت دورانی حرکت داده شد تا سوسپانسیون کاملا در سطح پتری پخش شود. این سوسپانسیون در انکوباتور ۲۷ درجه سلسیوس قرار داده شد که درصد زنده‌مانی بیش از ۸۵ ٪ بود.

برای تعیین غلظت‌های حداقل وحداکثر، ابتدا هشت غلظت شامل غلظت‌های 10^{2}، 10^{3}، 10^{4}، 10^{5}، 10^{6}، 10^{7}و 10^{8} اسپور بر میلی‌لیتر تهیه وآزمون براکتینگ با آن‌ها انجام شد. زیست‌سنجی‌ها با حشرات بالغ شته سبز جالیز روی خیار گلخانه‌ای در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. برای هر جدایه ۴ تکرار و۴ شاهد و برای هر تکرار ۱۵ حشره‌بالغ در نظر گرفته شد. سپس مرگ‌ومیر روزانه حشرات به‌مدت ۱۰ روز ثبت شد. بعد از انجام آزمایش‌های مقدماتی و تعیین غلظت‌های حداقل (۲۵ ٪) وحداکثر (۷۵ ٪) کشندگی، پنج دز لگاریتمی مورد نظر در دامنه فوق انتخاب و زیست‌سنجی با آن‌ها انجام شد. زیست‌سنجی با استفاده از حشرات‌بالغ یک روزه شته سبز جالیز در داخل ظروف پرورش انجام گردید. آزمایشات هر جدایه در پنج غلظت شامل 10^{2}،10^{3}، 10^{4}، 10^{5}، 10^{6} اسپور بر میلی‌لیتر و ۴ تکرار (هر تکرار شامل ۱۵ حشره) به همراه تیمار شاهد انجام شد.

ابتدا حشرات هم سن به تعداد مورد نظر به‌وسیله قلم مو از ظروف پرورش جدا و به داخل لوله‌های اپندورف‌های ۲ سی‌سی منتقل شدند. لوله‌های فوق‌الذکر در انتها سوراخ شد و این سوراخ به‌وسیله توری (مش۲۲۵) پوشانده شده بود.

قیف بوخنر روی یک ارلن تخلیه نصب شد. سپس با دست اپندورف را درون آن نگه‌داشته، بعد از آن ۲ سی سی از سوسپانسیون مورد نظر که به‌وسیله هم‌زن خوب به‌هم‌زده شده بود، داخل اپندورف ریخته و بعد از ۳ ثانیه سوسپانسیون داخل اپندورف از قسمت تحتانی خارج شد. سپس ته اپندورف را روی یک دستمال کاغذی استریل به آرامی قرارداده تا

Archive of SID

www.SID.ir

ته مانده سوسپانسیون نیز خارج شود. حشرات مورد آزمایش درون اپندورف روی کاغذ صافی استریل قرارداده و حشرات زنده و فعال آن‌ها انتخاب شد و به‌داخل پتری های استریل که کف آن‌ها با کاغذ صافی استریل به ابعاد ته ظرف پوشانده شده بود و از قبل آماده شده بودند قرار داده شدند. برگ‌های کوچک خیار که انتهای آن با پنبه مرطوب پوشانده در داخل لوله اپندورف قرارداده و داخل پتری منتقل گردید. سپس ۱۵ حشره آلوده شده روی برگ خیار قرار داده و برای هر جدایه قیف بوخنر وکاغذ صافی تعویض گردید. این پتری‌ها درون ژرمیناتور با درجه حرارت ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۱۰±۷۰ قرارداده شد. برا ی تامین رطوبت بهتر درون پتری از پنبه مرطوب که به‌وسیله توری ارگانزا پوشیده شده بود استفاده شدند. مرگ‌ومیر روزانه حشرات به‌مدت ۱۰ روز ثبت و جدول مرگ و میر تجمعی آن‌ها تهیه شد. درصد مرگ و میر واقعی به‌وسیله آزمون ابوت با استفاده از تیمارهای شاهد تصحیح گردید (Van *et al.*, 2007).

۳-۶- محاسبات آماری

برای تعیین دزهای کشنده از نرم‌افزار priProbit (1998- 2000) استفاده شد. با استفاده از آمار و مرگ‌ومیر تجمعی ترکیبی از تابع پراکنش (توابعی طبیعی، logestic و CLL) و مدل‌های رگرسیونی (۴ مدل همه یا هیچ و ۴ مدل ترجیحی) انتخاب گردید که کمترین AIC را داشته باشد. AIC روشی برای نکوئی برازش مدل با داده‌های به‌دست آمده می‌باشد. [(Akaik s Information Criterion) با فرمول AIC=-2L+2M محاسبه می‌شود که در این فرمول L حداکثر لگاریتم و M تعداد پارامترها است]. هر چه مقدار آن کمتر باشد ترکیب مدل رگرسیونی و تابع پراکنش انتخاب شده، رفتار داده‌ها را به نحو مطلوب‌تری توصیه می‌نماید (Latifian *et al.*, 2009) داده‌های حاصل از کاربرد چهار جدایه ایرانی قارچ *B. bassiana* باکمترین AIC از پراکنش طبیعی (Normal) با مدل همه یا هیچ با پاسخ طبیعی برازش گردید (جدول ۳-۱). با استفاده از نرم‌افزار Biostat مقایسه میانگین‌ها در بین چهار جدایه انجام شد.

LT_{50} جدایه‌های مختلف با کمک نرم‌افزار Curve Expert 1.3 و نمودارهای آن با کمک نرم افزار Excel ترسیم شد.

۳- نتایج

۳-۱- زیست‌سنجی

نتایج حاصل از مرگ‌ومیر تجمعی شته‌های کامل جالیز با غلظت‌های مختلف چهار جدایه طی ۱۰ روز پس از آلوده‌سازی با ۸ مدل برازش و بر اساس کمترین مقدار AIC (Akaike's Information Criterion) در جدول ۳-۱ گزارش شده است. سپس غلظت کشنده ۵۰ و ۹۹ درصد برای حشرات‌کامل محاسبه شد. جدایه ملخ با غلظت‌های ۱۳/۴۸ و$۱/۹۲\times۱۰^{۷}$ اسپور بر میلی‌لیتر (کمترین غلظت در بین چهار جدایه) به ترتیب باعث ۵۰٪ و ۹۹٪ تلفات روی حشرات بالغ شته جالیز شوند.

بیشترین غلظت‌های کشنده مربوط به جدایه سرخرطومی با $۲/۶۹\times۱۰^{۵}$ و$۱/۶۲\times۱۰^{۱۱}$ اسپور بر میلی‌لیتر به ترتیب برای تلفات ۵۰ و ۹۹ درصد به‌دست آمد. دامنه مرگ و میر تجمعی حشرات‌بالغ پس از ۱۰ روز و اصلاح آن‌ها با فرمول ابوت ۷/۱۴٪ تا ۱۰۰٪ ، در بین چهار جدایه مورد آزمایش نوسان داشت که حداقل کشندگی مربوط به جدایه سرخرطومی در دز $۱۰^{۲}$ اسپور بر میلی‌لیتر و حداکثر کشندگی مربوط به جدایه ملخ در دز $۱۰^{۶}$ اسپور بر میلی‌لیتر بود (جدول۳-۲).

زمان کشندگی چهار جدایه برای حشرات‌بالغ، برای غلظت‌های $۱۰^{۴}$،$۱۰^{۵}$و $۱۰^{۶}$ اسپور بر میلی‌لیتر محاسبه شد (جدول۳-۳). از آن جایی که در برخی از گروه‌های مربوط به بعضی از غلظت‌ها تا پایان آزمایش نیمی از حشرات تلف

Archive of SID

www.SID.ir

نشدند لذا از محاسبه زمان کشندگی این غلظت‌ها صرف نظر گردید. بالاترین زمان کشندگی ۵۰٪مربوط به جدایه سرخرطومی در غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور بر میلی‌لیتر به‌مدت ۵/۶۶ روز و کمترین زمان کشندگی ۵۰٪ مربوط به جدایه ملخ در غلظت $۱۰^{۶}$ به مدت۳/۳۲ روز بود.

در تمام غلظت‌های مورد آزمایش، جدایه ملخ بالاترین میزان مرگ و میر در غلظت‌های ۱ ،۱۰ ، $۱۰^{۲}$، $۱۰^{۳}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۵}$و $۱۰^{۶}$ اسپور بر میلی‌لیتر را با دامنه کشندگی ۱۰۰٪ تا ۲۹/۹۴٪ (جدول۳-۲) و کوتاه‌ترین زمان کشندگی (LT_{50}) را ۳/۳۲ روز نشان داد (جدول۳-۳).

با توجه به قدرت بیمارگری بالاتر در جدایه ملخ برای تعیین دامنه ۷۵٪- ۲۵٪ کشندگی، از غلظت‌های پایین‌تر (۱۰و۱) اسپور بر میلی‌لیتر برای به‌دست آوردن LC_{50} استفاده شد.برای سایر جدایه‌ها غلظت ۱۰و۱ اسپور بر میلی‌لیتر استفاده نشد و در جدول با علامت (---) نشان داده شد.

جدول۳-۱ غلظت کشندگی ۵۰٪ و ۹۹٪ جدایه های مختلف *B. bassiana* روی شته‌های بالغ *Aphis gossypii* و برازش مدل بر روی داده‌های حاصل از تلفات

Table 3-1- 50 and 99 percent concentrations of different Isolates of *B. bassiana* on *Aphis gossypii* and fitting models on mortality date.

Isolates	Stages	AIC	X^2	%95 confidance limits of log. of LC_{50}	%95 confidance limits of log. of LC_{99}	dest function	Reg. model
Grasshopper	adult	208/44	0/52	13/5 4/11-34/27	$1/92\times10^{7}$ $2/20\times10^{6} - 5/04\times10^{8}$	Normal	1
Ateshgah	adult	168/27	0/43	$1/2\times10^{3}$ $4/15\times10^{2} - 2/85\times10^{3}$	$2/76\times10^{8}$ $2/51\times10^{7} - 1/61\times10^{10}$	Normal	1
Fashand	adult	190/24	0/5	$2/6\times10^{4}$ $1/07\times10^{4} - 7/07\times10^{4}$	$1/95\times10^{10}$ $7/67\times10^{8} - 5/78\times10^{12}$	Normal	1
Curculionid	adult	153/31	0/42	$2/69\times10^{5}$ $9/78\times10^{4} - 1/21\times10^{6}$	$1/62\times10^{11}$ $4/01\times10^{9} - 1/34\times10^{14}$	CLL	2

1: All or nothing = <a: Intercept, b: Regression Cofficient> , C=D=o
2: All or nothing = < a, b, C: Naturral Response Rate>, D=0
CLL = Complementary Log- Log

جدول۲- درصد مرگ‌ومیر اصلاح شده ۴ ایزوله *B. bassiana* روی شته جالیز به کمک فرمول ابوت

Table 3-2- Corrected percentage by Abbote formula of mortality of 4 isolates on *A. gossypii*

concentration Isolates	1	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}
Grasshopper	29/94	45/60	54/85	67/84	83/93	92/86	100
Ateshgah	---	---	21/48	40/38	63/45	71/22	90/38
Fashand	---	---	12/5	25	37/50	50	76/78
Curculionid	---	---	7/14	12/5	21/43	35/75	58/93

با توجه به قدرت بیمارگری بالاتر در جدایه ملخ برای تعیین دامنه ۷۵٪- ۲۵٪ کشندگی، از غلظت‌های پایین‌تر(۱۰و۱) برای بدست آوردن LC_{50} استفاده شد.برای سایر ایزوله‌ها غلظت ۱۰و۱ استفاده نشد و در جدول با علامت (---) نشان داده شد.

Because of the high pathogenicity of the grasshopper isolate, to obtain the lethal range of 25- 75% we used lower concentration of 1 and 10 to calculate LC_{50}. For other isolates the 1 and 10 concentration were not used and showed by ---- in the table.

Archive of SID

www.SID.ir

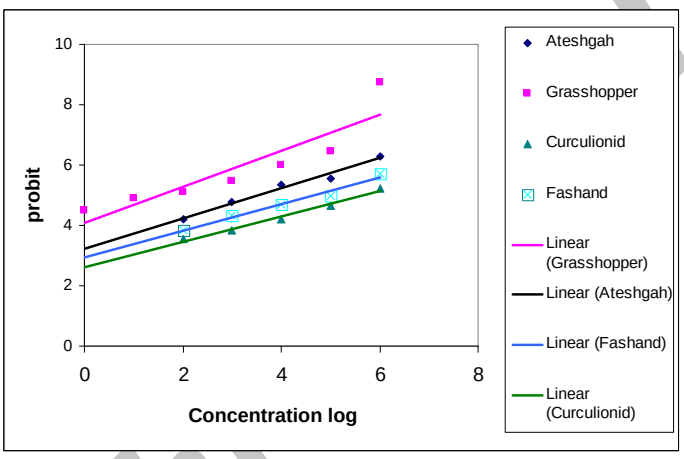
جدول۳- مقدار LT50 چهار جدایه از قارچ *B. bassiana* روی بالغین *A. gossypii*

Table 3-- Values of LT_{50} for 4 isolates of *B. bassiana* on adults of *A. gossypii*

Isolates	stages	Concentration (spores / mil)	LT50 (days)	Reg. model	r^2	SE
		10^4	4/26	logistic	0/999	1/26
Grasshopper	adult	10^5	3/6	logistic	0/998	1/84
		10^6	3/32	logistic	0/999	1/39
		10^4	4/88	logistic	0/999	1/31
Ateshgah	adult	10^5	4/14	logistic	0/999	1/64
		10^6	3/81	logistic	0/999	1/80
		10^4	---	logistic	---	---
Fashand	adult	10^5	7/01	logistic	0/999	0/9
		10^6	4/00	logistic	0/998	1/52
		10^4	---	logistic	---	---
Curculionid	adult	10^5	---	logistic	---	---
		10^6	5/66	logistic	0/999	1/19

(---) خانه‌های خالی جدول مربوط به غلظت‌هایی از جدایه‌ها می‌باشد که تعداد مرگ‌ومیر آنها تا پایان ۱۰ روز کمتر از نصف تعداد حشرات بود.

Those isolate concentrations which had mortality less than half initiating nambers of aphids after 10 days have been shown in cells with (---).



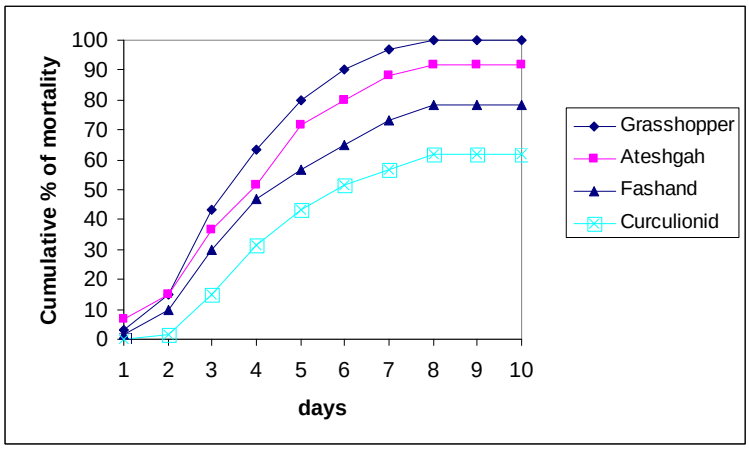
شکل ۱- مقایسه نمودارهای لگاریتم غلظت- پروبیت چهار ایزوله قارچ *B.bassiana*

Fig. 1-3- Comparison of Concentration log. – Probit of 4 isolates of *B. bassiana*.

در شکل ۱ با افزایش غلظت سوسپانسیون قارچ *B.bassiana* درصد مرگ ومیر افزایش یافته است. همچنین می‌توان از روی نمودارها، LC_{50} هر جدایه را با کمک معادله خط محاسبه نمود. همان‌طور که مشاهده می‌شود بالاترین درصد مرگ‌ومیر و LC_{50} مربوط به جدایه ملخ و پایین‌ترین آن مربوط به جدایه سرخرطومی می‌باشد. همچنین مقایسه بین خطوط رگرسیون چهار جدایه انجام شد. در این شکل بالاترین خط مربوط به جدایه ملخ می‌باشد که پراکنش نقاط نسبت به خط رگرسیون بیشتر از پراکنش نقاط در سایر جدایه‌ها می‌باشد. همچنین هیچ‌یک از خطوط با یکدیگر تداخل ندارد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- نمودار درصد مرگ‌ومیر تجمعی غلظت $۱۰^{۶}$ چهار ایزوله در روزهای اول تا دهم آزمایش

Fig. 2- Cumulative percentage of mortality curves of 4 isolates between days 1-10

شکل ۲ در صد مرگ ومیر تجمعی غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر چهار جدایه در روزهای مختلف آزمایش نشان داده شده است. به استثناء روزهای اول و دوم که درصد تلفات جدایه‌ها نزدیک به هم بودند، از روز سوم به بعد، منحنی درصد تلفات جدایه ملخ بالاترین و خط مربوط به جدایه سرخرطومی پایین‌ترین بوده‌اند.

بالاترین درصد مرگ‌ومیر اصلاح شده با فرمول ابوت در طول ۱۰ روز مربوط به روزهای سوم، چهارم و پنجم آزمایش بود. کمترین درصد مرگ‌ومیر در روزهای اول، دوم، نهم و دهم آزمایش بود. هرچه غلظت سوسپانسیون بالاتر باشد درصد مرگ و میر افزایش یافته و سرعت تلفات بیشتر می‌شود.

از آنجایی که هدف ما انتخاب جدایه قوی با غلظت مناسب که بتواند درصد بیشتری از حشرات را در زمان کمتر از بین ببرد، لذا جدایه ملخ با LC_{50}، ۱۳/۴۸ اسپور در میلی‌لیتر و LC_{99}، $۱/۹\times ۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر معرفی می‌گردد.

بحث

با وجود این که شته‌ها از آفات مهم کشاورزی هستند ولی در ایران تحقیقات کمی در مورد استفاده از قارچ‌های بیمارگر برای کنترل آن‌ها انجام شده است. بی‌شک سرعت و تاثیر جدایه‌های مختلف یک گونه قارچ به خصوص روی یک گونه شته متفاوت است. برای مثال مقایسه بیماری‌زایی چند گونه قارچ بیمارگر از قبیل *Lecanicillium lecanii*، *B.bassiana*، *Pacilomyces farinosus*، *Metarhizium anisopliae*، *Cordyceps scarabaeicola* و *Nomuraea rileyi* روی دو گونه شته *Myzus persicae* و *Aphis gossypii* در دمای ۲۵C° و رطوبت نسبی ۷۵٪ نشان داده که گونه 41185 *L. lecanii* بالاترین زهراگینی را روی این دو شته از خود نشان داده و تقریبا نزدیک به ۱۰۰٪ تلفات به وجود آورده است. LC_{50} این قارچ در حدود $۶/۵۵\times ۱۰^{۵}$ اسپور بر میلی‌لیتر بوده است (Van *et al.*, 2007). با وجود این که نمی‌توان دو گونه عامل بیماریزا را با هم مقایسه نمود ولی از نتایج این تحقیق می‌توان بیان داشت که برای ایجاد حدود ۱۰۰٪ تلفات روی شته سبز هلو و شته جالیز به سوسپانسیون غلیظ‌تری از قارچ *B. bassiana* نسبت به *L. lecanii* نیاز می‌باشد. ولی در تحقیق حاضر LC_{50} جدایه ملخ *B. bassiana* ۱۳/۴۸ اسپور بر میلی‌لیتر تعیین گردید. که نشان می‌دهد این جدایه قوی‌تر از جدایه 41185 *L. lecanii* می‌باشد. طی مطالعاتی که در انگلیس به‌عمل آمده، چهار جدایه از هر کدام از قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *M. Anisopliae* روی شته‌های بی‌بال کامل *Aphis craccivora* Koch. مورد آزمایش قرار

Archive of SID

www.SID.ir

گرفتند. با وجود این که تمام جدایه‌ها توانائی بیماری‌زایی داشتند ولی سه جدایه از قارچ *B. bassiana* از ۵۸ تا ۱۰۰درصد تلفات پس از ۷ روز وارد نمودند که به‌طور معنی‌داری زهراگینی بیشتری نسبت به بقیه داشتند (Ekesi *et al.*, 2000). این محققین نشان دادند که در بالاترین غلظت این سه جدایه (۱×۱۰^{۸} اسپور در میلی لیتر) LT_{50} بین ۳/۶-۳/۴ روز محاسبه شد. در تحقیق حاضر نیز از چهار جدایه قارچ مورد استفاده با وجود این که همگی باعث تلف شدن شته جالیز می‌شوند ولی جدایه ملخ از همه موثرتر بود. با وجود این که نوع شته در این تحقیق متفاوت بوده است ولی مدت زمانی که ۵۰٪ تلفات ایجاد نموده اند با این تحقیق همخوانی داشته است.

مطالعه روی قدرت بیماریزایی شش جدایه قارچ *B.bassiana* بر روی شته روسی گندم *Diuraphis noxia* نشان داد که هر شش نمونه قادر به آلوده کردن این شته بودند. کمترین میزان LC_{50} برابر $۵/۷\times۱۰^{۴}$ اسپور بر میلی‌لیتر بود (Feng & Johnson, 1990). اما در تحقیق حاضر با وجود تفاوت در جنس شته‌ها LC_{50} سه جدایه ملخ، آتشگاه و فشند کمتر از LC_{50} این بررسی به‌دست آمد..

در بررسی قارچ *Paecilomyces fomosoroseus* برای کنترل شته روسی گندم *Diuraphis noxia* مقادیر LC_{50} و LC_{99} این گونه به ترتیب $۱/۷۸\times۱۰^{۳}$ و $۱/۴۸\times۱۰^{۴}$ اسپور بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. LT_{50} برای این شته در غلظت‌های $۳/۷۵\times۱۰^{۴}$ و $۳/۷۵\times۱۰^{۵}$ اسپور بر میلی‌لیتر به ترتیب ۲/۰۶ و ۷/۵۰ روز محاسبه شد (Antonio *et al*,1996). با توجه به LC_{50} این بررسی و بررسی حاضر قدرت کشندگی هر دوقارچ تقریبا یکسان می‌باشد.

همچنین در مطالعه قدرت بیماریزایی هفت جدایه قارچ *B. bassiana* برای کنترل شپشک درخت پسته *Agonoscena pistaciae* Burck جدایه DEBI008 با غلظت $۳/۹۱\times۱۰^{۲}$ اسپور بر میلی‌لیتر پایین‌ترین و جدایه DEBI007 با غلظت $۳/۶۳\times۱۰^{۴}$ اسپور بر میلی‌لیتر بالاترین LC_{50} را دارا بود (Alizadeh *et al*., 2007). با توجه به تفاوت حشرات در این دو آزمایش و یکسانی قارچ مورد آزمایش قدرت جدایه در این تحقیق و جدایه ملخ در تحقیق حاضر تقریبا یکسان می‌باشند.

بنابراین زمان و غلظت قارچ بیمارگر دو عامل مهم در تاثیرعوامل کنترل کننده بیولوژیک میکروبی می‌باشد که در تمام تحقیقاتی که در این زمینه انجام شده مورد بررسی قرار گرفته است. این دو عامل در قالب دو پارامتر LT50و LC50 ارزیابی می‌شوند. در حشراتی نظیر شته‌ها که قدرت ذاتی افزایش جمعیت آن‌ها بالا است، زمان تاثیر یا زمان کشندگی ۵۰٪ جمعیت اهمیت زیادی دارد. بالا بودن این پارامتر به معنی فرصت بیشتر به شته جالیز برای ایجاد خسارت بیشتر است. لذا برای یافتن جدایه‌هایی که به سرعت جمعیت آفات و به خصوص شته‌ها را کاهش دهند باید ادامه داشته باشد. البته نباید از نظر دور داشت که قبل از مرگ حشره قارچ بیمارگر و متابولیت‌های آن روی فیزیولوژی میزبان تأثیر گذاشته و قدرت باروری میزبان را می‌تواند تحت تاثیر قرار دهد. علاوه بر این امکان انتقال بیماری به نتاج نیز وجود دارد. در میان چهار جدایه مورد مطالعه جدایه ملخ با کمترین زمان ایجاد مرگ‌ومیر انتخاب گردید. این جدایه به‌طور میانگین در غلظت‌های $۱۰^{۶}$-$۱۰^{۴}$ اسپور بر میلی‌لیتر در مدت ۳/۷ روز توانست ۵۰ ٪ شته‌ها را از بین ببرد که در مقایسه با جدایه آتشگاه ۱۶٪ و در مقایسه با دو جدایه فشند و سرخرطومی به ترتیب ۳۳ و ۳۴ درصد سریع‌تر عمل نماید (جدول۳-۳).

کشاورزان و گلخانه‌داران ترجیح می‌دهند تا عوامل کنترل کننده‌ای که اثرات آن‌ها به فوریت قابل ملاحظه هستند را به‌کار برند. به همین جهت ترجیح می‌دهند تا از مواد شیمیایی به‌جای عوامل کنترل بیولوژیک استفاده کنند. برای مثال طی آزمایشاتی در هندوستان سموم مختلف با میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا روی شته سبز هلو و شته جالیز مقایسه شده و نشان دادند که سمومی مثل Phorate بهتر از Bt و *B. bassiana* عملکرد محصول سیب‌زمینی را افزایش داد (Courasia *et al.*, 2004).ملاحظه چنین نتایجی توسط کشاورزان باعث سلب اطمینان از عوامل بیولوژیک شده و منجر به استفاده از سموم

Archive of SID

www.SID.ir

شیمیایی می‌شود. بی‌شک آموزش کشاورزان در این راستا می‌تواند بسیار ثمر بخش باشد. مقاومت آفات و آلودگی محیط زیست با کاربرد آفت‌کش‌ها و تاثیر بر روی دشمنان طبیعی از اثرات سوء کاربرد مواد شیمیایی است. طی مطالعاتی که روی تاثیر B. *bassiana* روی پارازیتویید شته جالیز مورد بررسی قرار گرفته است. مشخص گردیده که این قارچ روی دو پارازیتویید این شته (*Lysiphlebus testaceipes* و *Aphidius colemani*) تاثیر سوء نداشته و استفاده از این دو پارازیتویید و قارچ بیمارگر به‌طور همزمان می‌توانند جمعیت آفت را پایین آورند (Murphy, *et al*. 1999).

در این بررسی جدایه ملخ با حداکثر کارآیی از میان چهار جدایه مورد بررسی معرفی شد. بی تردید تعداد این جدایه‌ها در طبیعت وجود دارند و همزمان با آموزش کشاورزان می‌توان پیوسته جدایه‌های موثرتری را برای کنترل آفات خطرناکی مثل شته‌ها جستجو نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را به تمام افراد فرهیخته‌ای که در تعلیم و راهنمایی اینجانب زحمات زیادی را متقبل گردیدند، تقدیم می‌نمایم. اساتید بزرگوار آقای دکتر ابراهیم‌نژادیان، آقای دکتر رضا وفایی‌شوشتری، آقای دکتر شعبان شفیع‌زاده، آقای دکتر مهران غزوی و آقای دکتر مسعود لطیفیان که با مساعدت‌های علمی و الطاف بیکران خویش، راهنمایی اینجانب را بر عهده داشتند، از حضورشان تقاضا دارم بهترین سپاس‌ها و قدردانی مرا پذیرا باشند.

References

Alizadeh, A., Kharrazi- Pakdel, A., Talebi- Jahromi, K. H. and Samih, M.A. 2007. Effect of Some *Beauveria bassiana* (Bals.) Viull. Isolates on Common Pistachio Psylla *Agonoscena pistaciae* Burck. and Laut. International Journal of Agriculture & Biology. 1: 76-79.

Antonio, L. M., Mesquita, A. L., Lacey, G. M. and Francosi, L. 1996. Entomopathogenic activity of a whitefly- derived isolate of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae) with the description of an effective bioassay method. Europa Journal Entomological. USDA-ARS. 93: 69-75.

Chourasi, N., Mandal, S. and Konar, A. 2004. Efficacy of synthetic insecticides and biopesticides against potato aphids, *Myzus persicae* (Sulzer) and *Aphis gossypii* Glover in eastern gangetic plains. Journal-of-Entomological-Research. 28(4): 351-353.

Devi, P. S. V., Prasad, Y. G., Chowdary, Y. G. A., Rao, D. M. and Balakrishnan, L. K. 2003. Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. Journal Mycopathology. 156: 365-373.

Elkesi, S., Akpa, A. D., Onu, I. and Ogunlana, M. O.2000. Entomopathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the cowpea aphid, *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae), Phytopathology and Plant Protection. 33(2):171-180

Feng, M. G. and Johnson, J. B. 1990. Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homop: Aphididae). Entomological Society of America. 19: 785- 790.

Ghazavii, M., Kharazi- Pakdel, A., Ershad, J. and Bagherizonouz, E. 2002. Efficiency of Iranian isolates of *Beauveria bassiana* against *Locusta migratoria* (*Orthoptera: Acrididae*). Applied Entomology and Phytopathology. 69(2): 111- 128.

Latifian, M. 2009. the epizootiogy of *Beauveria bassiana* (balsamo) on population of *Oryzaephilus surinamensis* L. in the stored conditions of dried and commercial cultivars of date. A thesis Sunmitted in Partial Fulfilment of Requirement for the degree of Doctore of philosophy (Ph. D). Shahid Chamran University. 259.

Ming, G. F., James, B. J. and Leslie, P. K. 1990. Virulence of Verticillium lecanii and an Aphid- Derived Isolate of Beauveria bassiana (Fungi: Hyphomycetes) for Six Species of Cereal- Infesting Aphids (Homoptera: Aphididae). Entomological Society of America. 19(3): 815-820.

Archive of SID

www.SID.ir

Murphy, B, Damm-Kattari, D-von. And Parrella, M. 1999. Interaction between fungal pathogens and natural enemies: implication for combined biocontrol of greenhouse pests. Bulletin-OILB/SROP. 1999; 22(1): 181-184

Shia, W. B. and Feng, M. G. 2004. Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *and Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. Biological Control. 30: 165-173.

Spurgcon, D. and Hudson, N. 2007. *Beauvaria bassiana* activity against *Lygus hesperrus* at low temperatures. United States Department of Agriculture – ARS. 661-746.

Van, H. V., Suk, I. H. and Keun, K. 2007. Selection of Entomopathogenic Fungi for Aphid Control. Journal of Bioscience and Bioengineering. 104(6): 498- 505.

Van Driesche, R. G. and Bellows, T. S. 1996. Biological Control., Translated by M. Moosavi. (2001) Jahad Daneshgahi Mashad.pp486.

Wright, C., Brooks, A. and Wall, R. 2004. Toxicity of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anizopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to adult females of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Journal Pest Management Science., 60: 639- 644.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Entomological Research

Volume 3, Issue 3, pages: 241-252

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
www.entomologicalresearch.ir

Investigation on the effect of some isolates of *Beauveria bassiana* on the *Aphis gossypii* on greenhouse *Cucumis sativus* under laboratory conditions

R. Asgarpour[1], E. Soleyman-Nejadian[2], S. Shafizade[3], M. Ghazavi[4], M. Latifian[5]

1- Graduated student, Entomology Department, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran
2- Entomology Department, Agricultural faculty, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran
3- Department of Plant Protection Isfahan Research Center for Agriculture and Natural Resources
4- Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran. Iran
5- Date Palm and Tropical Fruits Research Institute

Abstract

The pathogenicity of four isolates of *Beauveria bassiana* fungus including DEBI 015, DEDI 002, DEDI 001 and DEBI 004 were studied on adults of *Aphis gossypii*. Concentrations of 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 and 10^6 spores /ml. applied on aphids and LC_{50} for each isolate was calculated. Results showed that the DEBI 015 isolate had the highest toxicity (lowest LC_{50}) with 13.5 spores/ml. and the DEBI 004 isolate had the lowest toxicity (highest LC50) with 269538 spores/ml. Lethal time (LT50) for all isolates was calculated only for three doses of 10^4, 10^5 and 10^6 spores/ml. The longest mortality time belonged to DEBI 004 isolate with 10^6 spores/ml. in 5.66 days and the shortest belonged to DEBI 015 isolate with 10^6 spores/ml. in 3.32 days. It is concluded that in all test concentrations, the DEBI 015 isolate had the highest rate of mortality in 1 – 10^6 spores/ml. with mortality range of 33.5- 96.7%.

Key Words: *Aphis gossypii*, Insecta, *Beauveria bassiana*, LC_{50}, LT_{50}

Archive of SID

*****Corresponding Author, E-mail: *r.asgarpour@yahoo.com*
Received: 20 Jun. 2010 – Accepted: 27 April 2011

www.SID.ir