Archive of SID

نقش زنبور عسل در پراکنش فرمولاسیون پودری باکتری *Pseudomonas fluorescens AQ* عامل بیوکنترل *Erwinia amylovora*

سعید حسینخانی[۱]، علیرضا معرفت[۲و*] و مصطفی ملایی[۱]

۱- دانشکده کشاورزی زنجان، ۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: marefat@znu.ac.ir

Role of honey bee on the distribution of powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* AQ, as a biocontrol agent *Erwinia amylovora*

S. Hosein khani[1], A. Marefat[2&*] and M. Mollaei[2]

1. College of Agricaltur, Zanjan University, 2. Department of Plant Protection, College of Agricaltur, Razi University of Kermanshah.

*Corresponding author, E-mail: marefat@znu.ac.ir

Abstract

Distribution of the biocontrol agents on the target zone has been a big challenge in previous studies of biological control. The purpose of this study was to assess the ability of bone powder, as a new formulation, and to compare its potential with some current formulation bases and also to study distribution by honey bee (Apis *mellifera* L). Bon, talk and perlite powder, also peat and wheat bran were used for formulation of *Pseudomonas fluorescens* AQ, survival of the biocontrol agent was studied and compared with the survival in various formulations after ninety days. The number of bacteria recovered from bone powder and wheat bran was highest in between formulations. To study the possibility of the distribution of the bone powder formulation by honey bee, the powder was placed on emery and was placed in front of the entrance of a hive in a suitable place. After three days, samples were collected from flower of various plants in a 100 meters radius. Isolated bacteria from the flowers were compared with the BCA using ERIC-PCR. The results showed the distribution of the bacteria by honey bee to various plants.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia amylovora*, *Apis mellifera* L, Formulation, biocontrol, distribution

چکیده

فرمولاسیون عوامل بیوکنترل و پراکنش آنها در منطقه هدف از بزرگترین دغدغه‌های مطالعاتی کنترل بیولوژیک می‌باشد. هدف از این مطالعه به منظور ارزیابی توانایی پودر استخوان، به عنوان یک فرمولاسیون جدید، و مقایسه پتانسیل آن با برخی از فرمولاسیون‌های پایه فعلی است و همچنین به مطالعه پراکنش آن توسط زنبور عسلف *Apis mellifera* L. پرداختیم. پودر استخوان، تالک، پرلیت و همچنین پیت و سبوس گندم برای فرمولاسیون *Pseudomonas fluorescens AQ* به عنوان عامل بیوکنترل *Erwinia amylovora* استفاده شدند. بقای عامل بیوکنترل در فرمولاسیون‌ها بعد از ۹۰ روز مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت تا فرمولاسیون مناسب برای پراکنش توسط زنبور عسل تعیین گردد و برای مطالعه قابلیت پراکنش پودر استخوان با زنبور عسل، فرمولاسیون پودری روی سنباده در جلوی دریچه پرواز کندو در محل مناسب قرار داده شد. بعد از سه روز نمونه‌هایی از گل‌های اطراف کندو تا شعاع ۱۰۰ متری جمع آوری شد. باکتری‌های جدا شده از گل‌ها با عامل بیوکنترل با استفاده از ERIC-PCR مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج حاکی از پراکنش فرمولاسیون پودری روی گل‌های گیاهان مختلف بود.

واژگان کلیدی: *Pseudomonas fluorescens*، *Erwinia amylovora*، *Apis mellifera* L، فرمولاسیون، بیوکنترل، پراکنش

مقدمه

آتشک به عنوان اولین بیماری باکتریایی گیاهان گزارش شده است(Baker, 1971) خطرناک ترین بیماری درختان میوه دانه‌دار است که عامل بیماری*Erwinia amylovora* از خانواده *Entrobacteriaceae* با دامنه میزبانی ۲۰۰ گونه گیاهی از ٤٠ جنس متعلق به خانواده *Rosaceae* می‌باشد(Vannest, 2000)، در کشور ایران فعالیت عملی در زمینه کنترل بیولوژیک این باکتری وجود ندارد و مطالعات انجام شده در حد آزمایشگاه و یا محیط کنترل شده بوده‌است. روش معمول برای فرمولاسیون باکتری‌های آنتاگونیست استفاده از پودر تالک است که توانایی چندانی برای نگهداری دراز مدت باکتری آنتاگونیست بهمراه نداشته‌اند. نکته مهم دیگر اینکه بیشترین آلودگی به این باکتری در زمان گلدهی است و با توجه به تدریجی بودن باز شدن گل‌های سیب وگلابی وهمچنین پراکنده شدن عامل بیماری توسط حشرات گرده افشان کار را برای کنترل بیماری سخت می-

www.SID.ir

Archive of SID

کند. باتوجه به مطالب ذکر شده این تحقیق شکل گرفت تا امکان پراکنش فرمولاسیون توسط زنبور عسل مطالعه گردد. در کنترل بیولوژیک همواره فرمولاسیون به عنوان عامل محدود کننده و تعیین کننده چه از نظر بقاء و چه از نظر رهایش باکتری در محل هدف، مطرح می‌باشد. از نکات مهم برای یک فرمولاسیون مناسب رساندن به موقع این عامل بیولوژیک توسط زنبور عسل به منطقه هدف در زمان مناسب می‌باشد، که همواره یکی از چالش‌های اصلی در کاربرد عوامل بیوکنترل بوده‌است. یکی از راه حل‌های مفید برای رساندن عامل بیوکنترل فرموله شده به محل هدف استفاده از برخی خصوصیات رفتاری در موجودات زنده است، حشرات گرده افشان از همه مهمتر زنبور عسل مقدار زیادی گرده و همچنین برخی عوامل بیماریزا مثل *E. amylovora* را در محیط پراکنده می‌کنند که با مطالعه رفتار حشرات می‌توان از آنها برای انتقال فرمولاسیون‌های پودری استفاده نمود. زنبور عسل و برخی زنبورها علیرغم انتقال عوامل بیماریزا می‌توانند به عنوان ناقل و ناشر عوامل بیوکنترل برای کنترل بیماری‌های گل و میوه مورد استفاده قرار گیرند(Sandhu & Waraich, 1985; Kevan *et al*.,2003) این روش نوآورانه منجر به کاربرد عامل کنترل بیولوژیک در زمان حساس و دقیق برای تاثیر زیاد می‌گردد(Thamson *et al*., 1992). بطور تقریبی یک زنبور در هر روز به ۳۰۰۰ گل سرکشی می‌کند. البته این بدان معنی نیست که روزانه ۳۰۰۰ سفر بین کندو و گل‌ها انجام می‌شود بلکه یک زنبور در هر پرواز به گل‌های زیادی سرکشی می‌کند. از لحاظ تئوریک اگر حداکثر مسافت طی شده توسط یک زنبور ۱۰ کیلومتر در یک پرواز مستقیم تخمین زده شود، یک کلنی زنبور عسل مساحتی در حدود ٤۰۰ کیلومتر مربع اطراف کندو را پوشش می‌دهد، اما عملاً زنبورهای کارگر در بیشتر پروازها بین ۲ تا ٤ کیلومتر اطراف کندو را پوشش می‌دهند، با در نظر گرفتن تعداد میانگین ۱۰۰ هزار زنبور کارگر در هر کندو تعداد گل‌های تیماری یک رقم قابل ملاحظه می‌باشد (Tautz, 2008). در برخی موارد کاغذهای آغشته به فرمولاسیون پودری رایزوباکترهای ارتقاء دهنده رشد گیاه یا عامل بیوکنترلی مورد نظر به کندو متصل می‌شود، زنبور کارگر درهنگام خروج از کندو، عامل آنتاگونیست را دریافت و در حالی که برای مکیدن شهد تلاش می‌کند عامل بیوکنترل را به محصول مورد نظر می‌رساند (Kovach *et al*., 2000). این تحقیق انجام شد تا اولاً کارایی چند فرمولاسیون پودری از *Pseudomonas fluorescens* AQ که قبلا به عنوان یک عامل موثر آنتاگونیست *E. amylovora* شناخته شده بود (Qulami *et al*., 2010) مقایسه گردد و ثانیا امکان پراکنده ساختن آنها توسط زنبور عسل مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

۱) باکتری‌های مورد استفاده

برای این آزمایش از جدایه*Pseudomonas fluorescens* AQ که در تحقیقات قبلی تاثیر آنتاگونیستی آن روی عامل آتشک به اثبات رسیده‌بود (Qulami *et al*., 2010) استفاده‌شد.

فرمولاسیون باکتری عامل بیوکنترل

۱-۲) مواد مورد استفاده

سدیم آلژینات و کلسیم کلراید از آزمایشگاه شیمی دانشگاه زنجان تهیه شد. پودر تالک، پرلیت، پیت، پودر استخوان و سبوس گندم(مواد پایه فرمولاسیون) از بازار تهیه گردید، تمامی مواد مورد استفاده در این آزمایش به جز سدیم آلژینات توسط اتوکلاو استریل شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

۲-۲) فرموله کردن باکتری آنتاگونیست

پودر استخوان، تالک، پرلیت، پیت، سبوس اتوکلاو شده و از هر یک ۱۰ گرم به عنوان ماده پایه استفاده شد و به طور جداگانه در پنج ظرف استریل ریخته شدن و سپس به مقدار ۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون از باکتری آنتاگونیست با جمعیت 10^9 (CFU/ml) و پس از آن ۲۵ میلی لیتر آب مقطر استریل به هر کدام از ظروف حاوی مواد پایه اضافه گردید. دو ساعت روی شیکر با دور ملایم قرار داده شد و به میزان ۰/۰۰۲ گرم سدیم آلژینات و۰/۰۰۲ گرم کلسیم کلراید به مخلوط اضافه و به مدت یک دقیقه ورتکس گردید و مخلوط حاصل در تشتک پتری استریل ریخته شد و به مدت ۱۲ ساعت در زیر هود در جریان هوا خشک گردید.

۲) مقایسه کارایی فرمولاسیون‌های مختلف در نگهداری باکتری آنتاگونیست

برای بررسی بقای باکتری در فواصل زمانی ۱۰، ۳۰، ٦۰ و ۹۰ روز بعد از تهیه فرمولاسیون ۰/۰۱۲ گرم از هر فرمولاسیون در داخل ظروف جداگانه استریل ریخته شد و ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به هر کدام اضافه گردید و به مدت یک ساعت روی شیکر با دور ملایم قرار داده شد جمعیت باکتری در سوسپانسیونهای به دست آمده از طریق تهیه سری رقت و کشت از هر سری به دست آمد.

۳) بررسی تاثیر وجود سدیم آلژینات و کلسیم کلراید در بقای باکتری

بر اساس نتایج آزمون قبل(بند۱ نتایج) برای این منظور فرمولاسیون پودر استخوان مورد بررسی قرار گرفت، بدین صورت که همانند بند(۲-۲) فرمولاسیونی از پودر استخوان یکبار شامل سدیم آلژینات و کلسیم کلراید و بار دیگر فاقد سدیم آلژینات و کلسیم کلراید تهیه شد. مثل (بند ۳) کارایی این دو فرمولاسیون در نگهداری باکتری آنتاگونیست مقایسه شد.

۴) بررسی امکان استفاده از زنبور عسل برای پراکنش فرمولاسیون باکتری آنتاگونیست

۵-۱) انتخاب مکان آزمایش

محل آزمایش باغ جنگلی واقع در دانشگاه زنجان در نظر گرفته‌شد، برای آزمایش منطقه‌ای فاقد درختان سیب و گلابی انتخاب گردید به چند دلیل: به دلیل حضور باکتری آنتاگونیست که به بصورت بومی در منطقه وجود دارد لذا ردیابی و تفکیک باکتری فرموله شده از باکتری‌های اپی‌فیت موجود امکانپذیر نبود. همچنین به دلیل تنوع گلها شامل درختان اقاقیا، زبان گنجشک، سرو و برخی گیاهان علفی شامل شقاق، خاک شیر، گل قاصدک و برخی گیاهان گلدار بود. قبل از شروع آزمایش از گیاهان موجود در این محدوده وجود باکتری آنتاگونیست مورد بررسی قرار گرفت که مورد مشابه مشاهده نگردید.

۵-۲) انتخاب کندو و آلوده سازی زنبورهای آن به فرمولاسیون حاوی باکتری آنتاگونیست

برای این آزمایش یک کندوی قوی انتخاب شد. برای قرار دادن پودر فرمولاسیون از کاغذ سنباده شماره ۱۵۰ به ابعاد (۱۰ سانتیمتر × ۵ سانتیمتر) در داخل کندو در مقابل دریچه پرواز قرار داده شد به طوری که زنبورهای کارگر هنگام خروج از کندو به فرمولاسیون آغشته گردند.

www.SID.ir

Archive of SID

۵-۳) ردیابی باکتری آنتاگونیست در گیاهان اطراف کندو

سه روز پس از قرار دادن فرمولاسیون در کندو، چند نمونه از گلهای گیاهان مختلف تا شعاع ۱۰۰ متری چیده شد و هر کدام از نظر رنگ و درختی یا علفی بودن به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند، بدین ترتیب که نمونه گل‌ها چیده شده وزن شدند و از هر کدام به میزان ۱۰۰ گرم در داخل ارلن حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل قوطه‌ور شدند و به آن یک قطره توئین ۲۰ (Tween 20) اضافه شد تا باکتری‌های سطحی به راحتی از سطح گل‌ها جدا شوند(شکل ۱). در مرحله بعد به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر بادور ملایم قرار داده شد و پس از شستشو از سوسپانسیون سری رقت تهیه و روی محیط نوترینت آگار به صورت گسترده کشت داده شد و آنهایی که از نظر ظاهر کلونی شبیه به عامل آنتاگونیست ما بودند شمارش شدند. شناسایی جدایه‌ها با به کارگیری یک جدایه از هر نمونه گل درآزمون rep-pcr و مقایسه آنها با جدایه *Pseudomonas fluorescens* AQ انجام شد.

۵-٤) آماده سازی DNA باکتری برای PCR

برای این منظور از روش لیز قلیایی استفاده شد به این صورت که باکتری نمونه آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* AQ و جدایه‌های مشابه جدا شده از هر گل به طور جداگانه در ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۳۵ درصدی KOH قرار داده شد و ظرف (ویال ۱/۵ میلی لیتری)حاوی این محلول به مدت ۱۰ دقیقه با قرار دادن در آب در حال جوش به صورت غیر مستقیم حرارت داده شد تا دیواره سلولی باکتری از بین برود. بعد از این مرحله به مدت سه دقیقه با دور ۸۰۰۰ مخلوط را سانتریوفوژ ، و از مایع رویی محصول سانتریوفیوژ دو ماکرولیتر به عنوان نمونه برای PCR استفاده شد.

۵-۵) ردیابی عامل بیوکنترل با روش ERIC-PCR

برای بررسی تشابه ژنتیکی نمونه‌ها از روش ERIC استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس(Master mix) (محصول شرکت تکاپوزیست)، ۲ میکرولیتر پرایمرهای فوروارد/ ریورز (Forward/Revers) ، ٦/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و۲میکرولیتر مستر میکس تمپلیت دی ان ای (Template DNA). مستر میکس حاوی بافر X 10 منیزیم کلراید ($MgCl_2$) ، dNTps و آنزیم تگ پلیمراز (Tag polymerase) می‌باشد، چرخه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از ۱- مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۲۴۰ ثانیه با یک دور ۲- مرحله تکثیر با ۳۵ دور شامل، واسرشت سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه، دورگه سازی در دمای ۵۰°C به مدت ۶۰ ثانیه و بسط در دمای ۶۸°C به مدت ۴۸۰ ثانیه ۳- مرحله بسط نهایی با یک دور در دمای ۶۸°C به مدت ۴۸۰ ثانیه ۴- مرحله سرد کردن با یک دور در دمای ۴°C به مدت ۶۰ ثانیه.

۵-۶) بررسی نتیجه (محصول) PCR

از ژل آگارز یک درصد برای الکتروفورز محصولات تکثیر شده توسط پرایمرهای ذکر شده استفاده شد بدین صورت که مقدار یک گرم پودر آگارز در بافر TBE 1x به میزان ۱۰۰سی سی مخلوط گردید و پس از ذوب کردن آن، در روی سینی ژل که روی آن شانه نصب شده بود ریخته شد. بعد از انعقاد ژل شانه خارج گردید و در دستگاه الکتروفورز قرار داده شد و محصول PCR در چاهک‌ها بارگذاری گردید. به این شکل که شش میکرولیتر از محصول با یک و نیم میکرولیتر از بافر باگذاری شده مخلوط شد و در چاهک‌ها قرار گرفت. بافر بارگذاری به دلیل دارا بودن گلیسرول سنگین بوده و منجر به

www.SID.ir

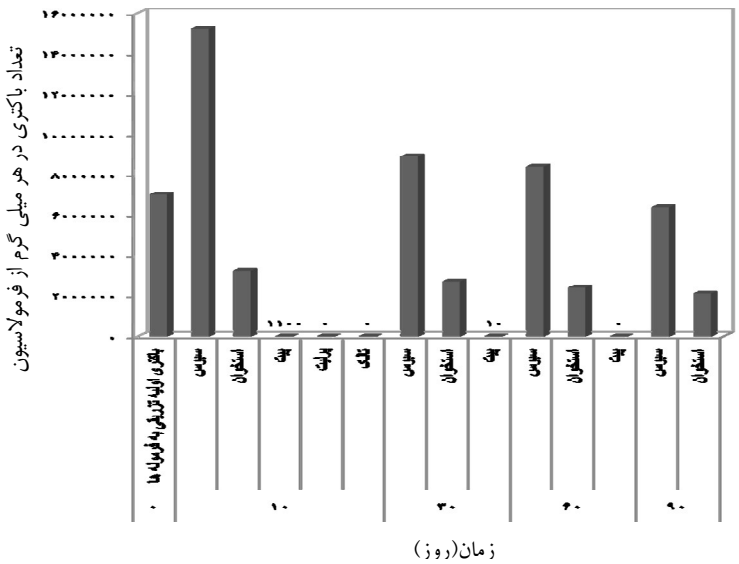
Archive of SID

قرارگیری راحتتر DNA در چاهک‌ها می‌شد و دیگر آنکه به دلیل داشتن رنگ بروموتیمول قابل رویت بود، و موجب ردیابی آسان محصول بارگذاری شده روی ژل می‌شد. الکتروفورز در بافر TBE 1x با ولتاژ ۸۵ ولت و به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. سپس ژل در اتیدیوم برماید به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد تا رنگ آمیزی انجام گیرد و سپس ژل به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر قرار داده شد. عکس برداری توسط ژل داک (GelDoc) انجام شد.(Rademaker & De Bruijn, 1997)

نتایج

مقایسه کارایی فرمولاسیون‌های مختلف در نگهداری باکتری آنتاگونیست

آزمون مربوط به مقایسه کارایی فرمولاسیون‌های مختلف در بقای باکتری آنتاگونیست نشان داد جمعیت باکتری آنتاگونیست در پودر تالک، پرلیت و پیت در همان روزهای اول به شدت کاهش یافت به طوری در فرمولاسیون تالک و پرلیت در همان ده روز اول جمعیت باکتری به صفر رسید. جمعیت باکتری در فرمولاسیون سبوس و استخوان بعد از سه ماه به ترتیب ۶/۴×۱۰۶ و ۲/۱×۱۰۶ در حد قابل قبول بود. از بین تمام فرمولاسیون‌ها فقط پودر استخوان به دلیل ماهیت پودری خود قابلیت استفاده در آزمایش پراکنش توسط زنبور را داشت (شکل ۱).



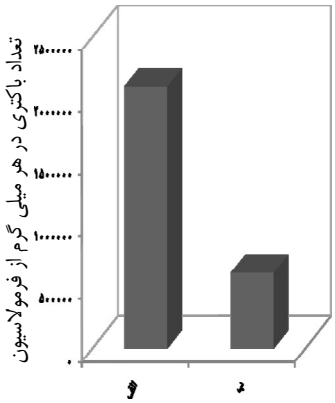
شکل ۱- مقایسه بقای باکتری *Pseudomonas fluorescens* AQ درفرمولاسیون ها.

بررسی تاثیر وجود سدیم آلژینات و کلسیم کلراید در بقای باکتری آنتاگونیست

برای این منظور ۹۰ روز پس از تهیه فرمولاسیون ها تست ماندگاری به صورت کشت از سوسپانسیون فرمولاسیون انجام گرفت که نتیجه حاکی از تاثیر چشمگیر وجود سدیم آلژینات و کلسیم کلراید در بقای باکتری آنتاگونیست در فرمولاسیون بود نتیجه نشان دهنده‌ی استقرار و ثابت شدن باکتری در منافذ پودر استخوان به کمک سدیم آلژینات بود که موجب کاهش تاثیرات محیطی روی باکتری فرموله شده می‌گردد(شکل ۲) .

www.SID.ir

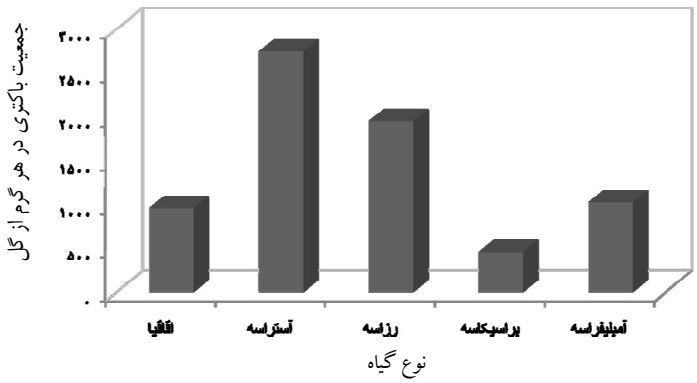
Archive of SID



شکل ۲- مقایسه بقای باکتری *Pseudomonas fluorescens* AQ در دو فرمولاسیون از پودر استخوان الف) حاوی سدیم آلژینات و کلسیم کلراید ب) فاقد سدیم آلژینات و کلسیم کلراید، بعد از گذشت ۹۰ روز.

ردیابی باکتری آنتاگونیست در اطراف کندو

بعد از پراکنده شدن فرمولاسیون توسط زنبور در اطراف کندو، اقدام به پایش مزرعه از نظر تراکم باکتری فرموله شده در گل‌های مختلف در مزرعه کردیم، برای این منظور گیاهان به سه گروه (اقاقیا) با ارتفاع بیش از ۲ متر، گل های خانواده آستراسه و گل های خانواده رزاسه علفی و بوته‌ای با ارتفاع کم تقسیم شدند و همچنین در این بین تعدادی دیگر از گیاهان اطراف کندو هم نمونه برداری شد. تقریباً از همه نمونه‌های جمع آوری شده باکتری آنتاگونیست جداسازی شد. که شناسایی دقیق با ERIC-PCR صورت گرفت. تراکم جمعیت باکتری آنتاگونیست فرموله شده در گل‌های آستراسه بیشتر از گل‌های رزاسه بود. و همچنین تراکم جمعیت در گل‌های گیاهان با ارتفاع کم بیشتر از گیاهان با ارتفاع ۲ متر بود. (شکل۳)

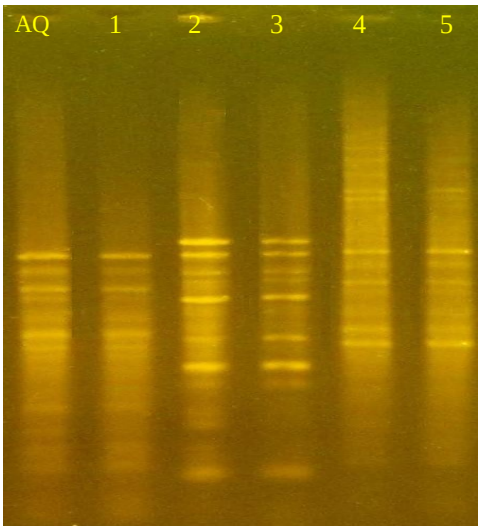


شکل ۳- میانگین تعداد باکتری *Pseudomonas fluoresce* AQ جداشده از هر گرم گل

نتایج حاصل از بررسی نقوش الکتروفورزی محصول بیانگر شناسایی کامل باکتری‌های جدا شده از گیاهان بود.(شکل٤)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- باکتری اصلی: AQ ، باکترجدا شده از ۱) گل قاصد(آستراسه) ۲) (آمبلیفراسه) ۳) گل جعفری (آستراسه) ۴) گل محمدی(رزاسه) ۵) خاکشیر (براسیکاسه)

بحث

زنبور عسل به عنوان یک حشره گرده افشان گل و سهل الوصول در سیستم‌های کشاورزی مطرح می‌باشد، لذا با در نظر گرفتن قابلیت گرده افشانی این حشره و بیمارگرهای مرتبط با گل در کشاورزی، می‌توان روشی را طراحی نمود که با جایگزین نمودن فرمولاسیون پودری عوامل بیوکنترل با گرده‌ی گل کاری کرد که زنبور عسل به جای حمل گرده از گل به کندو و همچنین از گل به گل، ناخواسته اقدام به پراکنش فرمولاسیون پودری از کندو به گل کند. در سال‌های اخیر یکی از مهمترین دغدغه‌های کنترل بیولوژیک، پراکنش و رهایش عوامل بیوکنترل و بقای آنها در منطقه هدف می‌باشد. در رابطه با بکارگیری عوامل بیوکنترل، مطالعه‌ای که روی کاربرد همزمان باکتری *P. fluorescens* و *Erwinia herbicola* انجام شده نشان می‌دهد این امر پتانسیل توسعه به عنوان یک روش کنترلی را دارد (Vanneste *et al.*, 1996) . در روش‌های رایج برای اطمینان از رسیدن مواد موثره به منطقه هدف نیازمند استفاده از یک فرمولاسیون مناسب و تکرار تعداد دفعات پاشش فرمولاسیون است، چنانچه *Pantoea agglomerans* به عنوان عامل بیوکنترلی با فرمولاسیون تالک در زمان گلدهی روی درختان اسپری شده است (Ozactan & Bora, 2004)، این روش‌ها موجب بالا رفتن هزینه و پراکنش بیش از حد مواد دخیل در فرمولاسیون می‌شود. در تحقیق حاضر از پودر استخوان استفاده شد این ماده به دلیل هزینه پایین و دارا بودن حالت فیزیکی ایده‌آل به خاطر وجود حفرات متعدد در ساختمان خود یک ماده پایه فوق العاده جهت فرمولاسیون برخی عوامل بیوکنترل با قابلیت پراکنش توسط زنبور عسل است و دیگر اینکه این ماده کاملاً تجزیه پذیر بوده و اثر سوء محیطی ندارد. با مقایسه فرمولاسیون پورد استخوان با سایر فرمولاسیون‌ها نشان داد که بعد از فرمولاسیون سبوس گندم که جمعیت بالایی از باکتری را نشان می‌داد و آن هم به دلیل تکثیر باکتری در سطح سبوس می‌تواند باشد، فرمولاسیون پودر استخوان در رتبه دوم قرار گرفت. از بین فرمولاسیون‌های مختلف، فقط فرمولاسیون بر پایه پودر استخوان قابلیت پودر شدن کامل را داشت و لذا آزمون پراکنش با زنبور عسل فقط برای این فرمولاسیون انجام شد. شکل فیزیکی و ماهیت آلی استخوان موجب تسهیل در چسبندگی به اندامهای تحتانی زنبور

www.SID.ir

Archive of SID

عسل و انتقال آن می‌گردد. تست پراکنش فرمولاسیون پودر استخوان با قرار گرفتن روی بستر مناسب تعبیه شده در محل دریچه پرواز انجام گرفت که این بستر به خاطر داشتن سوراخ های ریز مانع رانده شدن پودر فرموله از کندو می‌شد. در کنترل بیماری آتشک آنچه حائز اهمیت است کنترل عوامل بیماری در زمان حساس یعنی زمان گلدهی می‌باشد، بیماری از طریق گل و پیشروی در کلاله درختان سیب و گلابی آنها را آلوده می‌کند، تکثیر و استقرار عامل بیوکنترل در محل حساس توسط عوامل گرده افشان راهی برای جلوگیری از عفونت گل است. چون گل‌ها همزمان باز نمی‌شوند کنترل بیماری مشکل می‌باشد. لذا استفاده از حشراتی که به دنبال شهد می‌گردند مانند *Apis mellifera* برای استقرار عامل بیوکنترل می‌توان مورد استفاده قرار داد. در تحقیقات گذشته از زنبور عسل برای مدیریت کپک خاکستری توت فرنگی و تمشک استفاده شده است که موجب افزایش مقدار حجمی و عددی محصول می‌گردد (Peng *et al.*,1992;Sutton, 1995; Kovach *et al.*,2000) در شیوه کنترلی این تحقیق به دلیل سرکشی دائمی کلنی زنبور عسل به همراه فرمولاسیون عامل بیوکنترل به گل‌ها در دوره‌های مختلف، دیگر نباید نگران باز شدن گل‌ها در زمان‌های مختلف بود و همچنین زنبور عسل علیرغم انتقال گرده گل‌ها، به همان شیوه اقدام به پراکنش عامل بیوکنترل هم می‌کند و دیگر اینکه به دلیل قرار گرفتن عامل بیوکنترل در نقطه هدف توسط زنبور عسل، علاوه بر کنترل بیماری در مرحله و محل حساس از میزان کاربرد فرمولاسیون نیز به شدت کاسته می‌شود. امروزه در گلخانه‌ها برای گرده افشانی برخی گیاهان از زنبورهای مخملی (Bombus) استفاده می‌شود که می تواند به دلیل داشتن پرزهای فراوان بهترین جایگزین برای زنبور عسل برای پراکنش این فرمولاسیون در گلخانه باشد. این آزمون باید در منطقه‌ای با درختان سیب و گلابی تکرار شود که در حال اجرا می‌باشد.

منابع

Qulami, A., Marefat, A. & Ahmadi, E. (2010) The first reported of use polymeric materials for formulation biocontrol agents of *Erwinia amylovora* fire blight agent of pome fruit. Fifth Regional Conference on Agricultural Research findings West Country, Iran, Kurdistan, 177-182 pp.

Baker, K. F. (1971) Fire blight of pome fruit. *Hilgardia* 40, 603-633

Kevan, P. G., Al-Mazrawi, M. S., Sutton, J. C., Tam, L., Boland, G., Broadbent, B., Thompson, S. V., & Brewer, G. J. (2003) Using pollinators to deliver biological control agents against crop pests. In: *Pesticide Formulations and Delivery Systems: Meeting the Challenges of the Current Crop Protection Industry* (Downer, R.A., Mueninghoff, J.C. & Volgas, G.C. (Eds.) Amer. Soc. Testing and Materials Internat. West Conshohocken, PA.

Kovach, J., Petzoldt, R. & Harman, G. E. (2000) Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for Botrytis control. *Journal of Biological Control* 18, 235-/242.

Lisa, M., Keith, W. & Bender, C. L. (1999) AlgT (s22) Controls alginate production and tolerance to environmental stress in *Pseudomonas syringae. Journal of bacteriology* 181, 7176–7184

Ozactan, H. & Bora, T. (2004) Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* strain EH 24. *Brazillain Journal of microbiology* 35, 224-229.

Peng, G., Sutton, J. C. & Kevan, P. G. (1992) Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress Botrytis cinerea. *Can. J. Plant Pathology* 14, 117-188.

Rademaker, J. L. W. & De Bruijn, F. J. (1997) Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In *DNA markers: Protocols, Applications, and Overviews*. (Eds.) Caetano-Anolles ,G. & Gresshoff, P. M. John Wiley & Sons, Inc. New York. 151-171pp. (In press).

Sutton, J. C. (1995) Evaluating of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. Adv. *Plant Pathology* 11, 73-190.

www.SID.ir

Archive of SID

Sandhu, D. K. & Waraich, M. K. (1985) Yeasts associated with pollinating bees and flowers nectar. *Microbial Ecology* 11, 51-58.

Tautz, J. (2008) *The Buzz about Bees: Biology of a Superorganism*. Octavo, laminated boards. 284 pp.

Thomson, S. V., Hansen, D. R., Flint, K. M. & Van Den Berg, J. D. (1992) Dissemination of bacteria antagonistic to *Erwinia amylovoraby* honey bees. *Plant Disease* 76, 1052-1056.

Vanneste, J. L. & Yu, J. (1996) Biological control of fire blight using *E. herbicola* Eh252 and *Pseudomonas fluorescens* A506 separately or in combination. *Acta Horticulturae* 411, 351-353.

Vanneste, J. L., Yu, J., Harper, G. E. & Perry, J. H. (1996) International workshop on fire blight; Plugs of immature pear fruit to assess the virulence of *Erwinia amylovora* and to study in the laboratory the interaction between biological control agents and the fire blight pathogen. *ISHS Acta Hortic* 411, 303-305

Vanneste, J. L. (2000) Fire blight the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. 370 pp. CABI Publication.

www.SID.ir