آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۵، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۶

مقایسه زهرآگینی چند جدایهٔ *Beauveria bassiana* روی حشره کامل سن گندم و تأثیر روغن‌های گیاهی بر جوانه‌زنی اسپورهای مؤثرترین جدایه

Comparison of the virulence of some isolates of *Beauveria bassiana* on adult sunn pests and the effect of plant oils on conidial germination of the most virulent one

ژینوس رستگار[۱]*، مهران غزوی[۲]، کریم کمالی[۳] و جعفر ارشاد[۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
۲- مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران
۳- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی

(تاریخ دریافت: مهر ۱۳۸۵، تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸۵)

چکیده

در این تحقیق زهرآگینی هشت جدایه ایرانی و یک جدایه خارجی (GHA کد ARSEF201) از قارچ *Beauveria bassiana* روی حشرات کامل سن گندم *Eurygaster integriceps* Put. مورد بررسی قرار گرفت. LC_{50} جدایه‌های DEBI001، DEBI002، DEBI003، DEBI004، DEBI006، DEBI007، DEBI008، DEBI009 و GHA بترتیب عبارت بودند از: $۴/۴۵\times۱۰^{۴}$، $۳/۷۸\times۱۰^{۳}$، $۵/۵۰\times۱۰^{۵}$، $۴/۳۸\times۱۰^{۴}$، $۷/۴۳\times۴،۱۰^{۷}/۹۹\times۱۰^{۴}$، $۵/۰۶\times۱۰^{۵}$، $۴/۶۹\times۱۰^{۴}$ و $۴/۷۶\times۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر و Tween استریل و LT_{50} آن‌ها نیز به ترتیب: ۹/۴۰، ۸/۵۵، ۸/۵۵، ۸/۹۲، ۱۰/۹۱، ۱۴/۵۵، ۱۲/۹۹، ۱۱/۲۵ و ۱۰/۸۰ روز محاسبه گردید. جدایه DEBI002 با کمترین زمان تأثیر و پایین‌ترین LC_{50} بعنوان زهرآگین‌ترین

* Corresponding author: Jinoosrastegar@yahoo.com

و جدایه DEBI007 با بیشترین زمان تأثیر و بالاترین LC_{50} به عنوان ضعیف‌ترین جدایه تعیین شدند.

بررسی تأثیر روغن‌های گیاهی (بعنوان حامل) روی بیماریزاترین جدایه نشان داد که در بین ۵ روغن گیاهی شامل روغن‌های پالم (نخل روغنی)، کلزا، سویا، آفتابگردان و کنجد، روغن پالم مناسب‌ترین آن‌ها برای پایداری قارچ می‌باشد. مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی اسپورهای قارچ پس از فرموله شدن با روغن‌های مذکور نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بین روغن‌های مورد استفاده و همچنین زمان پایداری اسپورها در روغن وجود دارد. اثر متقابل دو عامل نوع روغن و زمان پایداری اسپورها نیز نشان داد که از بین ۵ زمان نگهداری اسپورها (۲، ٤، ۸، ١٦ و ٢٤ ساعت)، ١٦ ساعت بیشترین زمان پایداری اسپورها در روغن پالم می‌باشد. از این نظر روغن کنجد نامناسب‌ترین روغن‌ها شناخته شد.

واژه‌های کلیدی: *Beauveria bassiana*، زیست سنجی، سن گندم، روغن‌های گیاهی، بقای اسپورها

مقدمه

دستیابی به یک حشره‌کش قارچی (Mycopesticide) جهت استفاده در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات به سه مرحله جمع‌آوری جدایه‌های قارچ، آزمون بیماریزایی (Bioassay)، تولید و فرمولاسیون آن‌ها نیاز دارد (Butt & Goettel, 2000).

در برنامه مشترکی بین آزمایشگاه تحقیقاتی حشره‌شناسی دانشگاه ورمونت در آمریکا و ICARDA در سوریه چندین جدایه از قارچ‌های بیمارگر در اماکن زمستانگذرانی سن گندم در ترکیه، سوریه، قزاقستان، قرقیزستان، ازبکستان و روسیه جداسازی و روی این آفت آزمایش شدند. چند جدایه از آن‌ها ۸۰–۱۰۰ درصد مرگ و میر در مدت ۱۰ روز ایجاد کردند. زیست سنجی جدایه مؤثرتر به دو روش یکی تیمار بقایای گیاهی با جدایه قارچ و رهاسازی سن گندم روی آن‌ها و یکی تیمار بوته‌های گندم و رهاسازی سن روی آن‌ها انجام شد. گرچه مرگ و میر سن گندم در بقایای گیاهی سریع‌تر اتفاق افتاد ولیکن در روز پانزدهم، مرگ و میر سن گندم روی بوته‌ها نیز بطور مساوی بالا بود. این نتایج پتانسیل بالای قارچ‌های پارازیت حشرات را در IPM سن گندم نشان داد (Anonymous, 2002).

Parker *et al.* (2003) بررسی‌هایی را در ایران، سوریه، ترکیه، ازبکستان، قزاقستان، قرقیزستان و روسیه به منظور یافتن قارچ‌های بیمارگر سن گندم انجام دادند. جدایه‌هایی از جنس‌های *Lecanicillium*، *Beauveria* و *Paecilomyces* جمع آوری گردید که از بین نمونه‌های بدست آمده *B. bassiana* گونه غالب بود. آزمایش قارچ‌ها روی بوته‌های گندم و بقایای شاخ و برگ کاج در شرایط گلخانه‌ای و به منظور سنجش بیماریزایی آن‌ها روی سن گندم صورت پذیرفت. مرگ و میر سن‌ها با غلظت مشخصی از اسپور قارچ‌ها برای بیشتر جدایه‌ها در بقایای گیاهی زودتر از روی گیاه اتفاق افتاد. چندین جدایه از *B. bassiana* و یک جدایه از *Metarhizium anisopliae* بیماریزایی بالایی روی سن گندم نشان دادند. نتایج، توانایی قارچ‌های بیمارگر حشرات را برای مدیریت سن گندم در اماکن زمستانگذرانی و مزارع گندم نشان داد.

Moore *et al.* (2004) یکی از راهبردهای کنترل سن گندم را استفاده از قارچ‌ها بویژه *B. bassiana* به عنوان آفت‌کش قارچی برای کنترل حشرات کامل زمستانگذران و نسل تابستانه روی محصول می‌دانند. جدایه‌هایی از *B. bassiana* از حشرات کامل زمستانگذران جداسازی و مؤثرترین آن‌ها را با کیفیت بالا تولید انبوه کردند. در تابستان ۲۰۰۳، فرمولاسیون‌های روغنی این جدایه را روی محصول گندم در ترکیه و سوریه با استفاده از سم پاش‌های دستی ULV به کار بردند. علی‌رغم ایجاد پوشش خوب قارچ روی محصول و حشره، هیچ مرگ و میر معنی‌داری در مقایسه با شاهد مشاهده نشد. در نمونه‌های جمع‌آوری شده از حشرات کامل تابستانه از هر دو کشور ۷ جدایه *B. bassiana* از ۳۵۰۰ لاشه سن گندم بدست آمد. این امیدواری وجود داشت که جدایه‌های تابستانه در کنترل جمعیت‌های تابستانه مؤثرتر باشند. تیمار حشرات کامل سن گندم با *B. bassiana* در سال ۲۰۰٤ هیچ نشانی از کنترل آن‌ها نداشت اما تیمار پوره‌ها با قارچ پس از ۵ روز ۹٤٪ مرگ و میر را در مقایسه با ٤۰٪ شاهد و همچنین رهاسازی پوره‌ها روی گندم تیمار شده با *B. bassiana*، ٤٦٪ مرگ و میر را نسبت به شاهد (۸٪) نشان داد. Kassa (2003) ارزیابی آزمایشگاهی و مزرعه‌ای فرمولاسیون‌های مختلف از کنیدی‌های هوایی و اسپورهای غوطه‌ور *M. anisopliae* var. *acridum* را جهت کنترل ملخ‌های بومی و مهاجر انجام داد. ۲ فرمولاسیون بر پایه آب و ۳ فرمولاسیون با استفاده از روغن‌های Telmion، سویا و گازوئیل تهیه گردید و علیه *Hieroglyphus daganensis* Krauss

(Orthoptera: Acrididae) و *Locusta migratoria* (R. & F.) (Orthoptera: Acrididae) به کار رفتند. هم اثر مستقیم پاشش فرمولاسیون‌ها روی ملخ‌ها و هم اثر پاشش فرمولاسیون روی گیاه و سپس رهاسازی ملخ‌ها در مزرعه‌ای در نیجریه در کرت‌های یک هکتاری و با استفاده از تکنیک ULV آزمایش شدند. هم در ارزیابی مستقیم فرمولاسیون‌ها و هم در بررسی اثر غیر مستقیم آن‌ها، کنیدی‌های هوایی فرموله شده در گازوئیل در شرایط مزرعه‌ای بیش از ۹۵٪ مرگ و میر و ۸–۳ روز کاهش در متوسط زنده‌مانی حشره هدف را نشان دادند. نتایج با امولسیون اسپورهای غوطه ور با دامنه مرگ و میر ۹۲– ٥٦٪ و متوسط زمان زنده مانی ١٦– ٨ روز برای اثر مستقیم فرمولاسیون‌ها و دامنه مرگ و میر ۹۷–۹۰٪ و متوسط زنده‌مانی ١٢– ٧ روز در حشره هدف برای اثر غیر مستقیم آن‌ها به دست آمد. این نتایج بکارگیری حامل‌های روغنی را برای حفاظت اسپورها در برابر استرس‌های محیطی تأیید می‌کنند.

Consolo *et al*. (2003) بیمارگری، نحوه فرمولاسیون و دمای مناسب ذخیره‌سازی تعدادی از قارچ‌های هیفومیست را علیه *Diabrotica speciosa* Germar (Coleoptera: Chrysomelidae) را بررسی کردند. از بین ١٦ جدایه، جدایه (FHD13) از قارچ *B. bassiana* بیشترین بیماریزایی را داشت و ۷۰٪ مرگ و میر در لاروهای سن سوم *D. speciosa* ایجاد کرد. بکارگیری روغن‌های گیاهی ذرت، آفتابگردان و کلزا به نسبت ۹۵٪ همراه با ٥٪ نفت بی‌بو بعنوان حامل قارچ در دماهای ٤°C، ١٧ و ٢٦ تأثیر معنی‌داری در قدرت جوانه‌زنی کنیدی‌ها نشان نداد.

توسعه حشره‌کش‌های قارچی بستگی به انتخاب جدایه زهرآگین، تولید انبوه و فرمولاسیون‌های متناسب با شرایط آب و هوایی منطقه دارد. مهم‌ترین عوامل محدود کننده کاربرد قارچ‌ها به عنوان یک حشره‌کش، اشعه ماوراء بنفش خورشید، دما و رطوبت محیط پس از پاشش آن‌ها در سطح گیاه و خاک می‌باشد. وجود روغن در فرمولاسیون، اسپورهای قارچ را در برابر استرس‌های دمایی محیط حفظ نموده همچنین چسبندگی و گسترش آن‌ها را روی سطح آبگریز برگ‌ها و کوتیکول حشرات افزایش می‌دهد. روغن‌های گیاهی ارزان‌تر از روغن‌های معدنی بوده و به فراوانی در ایران یافت می‌شوند. لذا امکان فرمولاسیون قارچ *B. bassiana* جدایه DEBI002 (که توانایی بیمارگری بالایی برای سن گندم داشت) با ٥ روغن گیاهی کلزا، سویا، پالم، آفتابگردان و کنجد بررسی گردید.

روش بررسی

هشت جدایه بومی از قارچ *B. bassiana* و جدایه غیربومی Grass Hopper Active (GHA) از نظر زهرآگینی روی حشرات کامل سن گندم با یکدیگر مقایسه شدند. نام جدایه‌ها و محل جمع آوری آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- جدایه‌های *B. bassiana* استفاده شده در آزمایش بیماریزایی روی سن گندم

Table 1- Used isolates of *B. bassiana* in bioassay experiment on *Eurygaster integriceps*

جدایه **Isolate**	محل جمع آوری **Locality**	جدا شده از **Matrix**
DEBI001	کرج (فشند) Karaj (Fashand)	خاک Soil
DEBI002	کرج (آتشگاه) Karaj (Atashgah)	خاک Soil
DEBI003	بلوچستان (سراوان) Baloochestan(Saravan)	شفیره سرخرطومی حنایی Pupa of *Rhynchophorus ferrugineus*
DEBI004	قزوین Ghazvin	سرخرطومی یونجه *Hypera postica*
DEBI006	گلستان (کردکوی) Golestan (Cordcooy)	سخت بالپوش Coleoptera
DEBI007	تهران Tehran	خاک Soil
DEBI008	تهران Tehran	ملخ *Chortipus brunneus*
DEBI009	گرگان (نهارخوران) Gorgan (Noharkhoran)	سرخرطومی Weevil
GHA	آمریکا USA	ملخ شاخک کوتاه Grasshoppers

جداسازی جدایه‌های موجود در خاک با قرار دادن لاروهای پروانه موم خوار *Galleria mellonella* در خاک مرطوب و انتقال اجساد ضد عفونی شده آن‌ها به اتاقک مرطوب انجام گرفت (Ghazavi, 2002).

الف- کشت جدایه‌ها: جهت تولید اسپور به مقدار زیاد از محیط کشت‌های PDA (Potato Dextrose Agar) و SDA +Y (Sabouraud Dextrose Agar+Yeast Extract) و برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌ها از محیط کشت PCA (Potato Carrot Agar) در دمای ۱۰°C استفاده گردید. سوسپانسیون غلیظی از جدایه‌ها تهیه و از پارچه ململ ٤ لایه عبور داده شد تا میسیلیوم‌های آن جدا گردد. مقداری از اسپورهای حاصله روی محیط کشت SDA+Y یا PDA ریخته و با یک میله شیشه‌ای در تمام سطح تشتک پتری پخش گردید. پس از ۱۵ روز، اسپورها توسط سوزن سرنیزه‌ای از سطح محیط کشت خراشیده و در آزمایش‌ها به کار رفتند.

ب- مقایسه جدایه‌ها از نظر زهرآگینی: سوسپانسیون‌هایی با غلظت‌های 10^{2}، 10^{3}، 10^{4}، 10^{5}، 10^{6} و 10^{7} اسپور در هر میلی‌لیتر از هر جدایه در آب مقطر حاوی ۰/۰۵٪ Tween 80 تهیه شد و آلوده سازی سن‌های کامل در قیف بوخنر (Buchner funnel) انجام گرفت. ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر غلظت با یک میله شیشه‌ای کاملاً مخلوط و روی سن‌های درون قیف ریخته شد و پس از ۵ ثانیه، سوسپانسیون به وسیله پمپ مکش تخلیه گردید. برای هر جدایه ٦ غلظت با ۳ تکرار و در هر تکرار ۱۰ عدد سن گندم کامل در نظر گرفته شد. شاهد نیز با آب مقطر دارای ۰/۰۵٪ Tween 80 تیمار گردید. سپس سن‌ها به ظروف زیست‌سنجی از جنس پلکسی گلاس استوانه‌ای با قطر ۷/۵ و ارتفاع ۸ سانتی‌متر که حاوی کاغذ آکاردئونی شده به همراه دانه‌های گندم و ظرف کوچک آب بودند، منتقل شدند. ظروف در اتاق پرورش با دمای ۲۵ ±۲°C و رطوبت نسبی ۵۵-۵۰٪ قرار گرفته و مرگ و میر سن‌ها تا ۱۵ روز، بطور روزانه ثبت و جدول مرگ و میر تجمعی آن‌ها تهیه شد. سن‌های مرده به ظروف حاوی پنبه مرطوب جهت تشکیل پوشش قارچی در سطح بدن حشره منتقل شدند. درصد مرگ و میر مشاهده شده در زیست سنجی با توجه به تلفات مشاهده شده در شاهد بر اساس فرمول Abbott (1925) تصحیح گردید.

ج- بررسی تأثیر روغن‌های حامل بر قارچ: جدایه DEBI002 که بیشترین مرگ و میر و

کوتاه‌ترین زمان مرگ را در سن‌ها ایجاد کرد، انتخاب و برای تهیه فرمولاسیون بـه کـار رفـت. جدایه مورد نظر به مقدار زیاد در تشتک‌های SDA+Y کشـت و پـس از اسـپورزایی (۱۵ روز)، محتویات آن‌ها زیر هود استریل با دمای ۲۵°C به مدت ٤ روز خشک شد. ۵ نوع روغن گیاهی شامل پالم، کلزا، سویا، آفتابگردان و کنجد فـاقد آنتی اکسیـــدان کـه هنـوز عملیـات تصـفیه و پالایش روی آن‌ها انجام نشده بود، از شرکت مارگارین[1] تهیه گردیده و بعنوان حامـل بـه کـار رفتند. اسپورهای خشک شده قـارچ در روغن‌ها فرموله و با دستگاه ورتکس بـه شـدت تکـان داده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. از آنجایی که حفـظ قابلیـت زیسـتی بیمـارگر طـی مراحـل کشت، ذخیره‌سازی و فرمولاسیون آن از اهمیت بسزایی برخـوردار اسـت، پایـداری قـارچ در فرمولاسیون با تعیین درصد جوانه‌زنی اسپورها در طول زمان ذخیره‌سازی سنجیده شد.

۷ میلی‌لیتر از غلظت‌های 10^2، 10^4 و 10^6 اسپور در میکرولیتـر هر یک از روغن‌ها تهیـه و تا ٢٤ ساعت در دمای ٢٦°C نگهداری شد. در تیمار شاهد، از آب مقطـر دارای ۰/۰۵٪ Tween 80 استفاده شد. جهت جلوگیری از آلودگی محیط کشت آگار آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسـین و پنی‌سیلین به نسبت‌های ۰/۰۸٪ و ۰/۰۳٪ به ازای هر ۱ لیتر محیط کشت در ۱ میلـی‌لیتـر آب مقطر حل شده و با فیلتر غشایی سترون گردید. ۱۰۰µl از سوسپانسیون‌های حاوی اسپور روی تشتک حاوی آب آگار و آنتی بیوتیک به کمک یک میله شیشه‌ای کاملاً گسترده شد و برای ٢٤ ساعت در دمای ۲۵°C نگهداری گردید. سپس به وسیله میکروسکوپ درصد اسپورهای جوانه زده در بزرگنمایی ۴۰۰ اندازه‌گیری شد. از هر غلظت ۲ تشتک و از هر تشتک ۳ مرتبه و در هر مرتبه ۱۰۰ اسپور؛ ۲، ٤، ۸، ١٦ و ٢٤ ساعت پس از تهیه فرمولاسیون شمارش و میانگین درصد جوانه‌زنی آن‌ها بـا اسـتفاده از فرمـول ۱۰۰× (تعـداد اسـپورهای جوانـه زده در شـاهد/تعـداد اسپورهای جوانه زده در روغن) تصحیح شد. اسپورهایی جوانه زده محسوب شدند کـه طـول لوله تندش آن‌ها برابر طول اسپور بود.

د- محاسبات آماری: برای تعیین غلظت‌های کشنده ۵۰٪ (LC_{50}) جدایه‌هـــای مختلـف از نـرم‌افـزار Priprobit Ver 1.63 و برای رسم خط رگرسیون داده‌های پردازش شـده، از نـرم‌افـزار

۱- شهر ری، کیلومتر ۳ جاده ورامین.

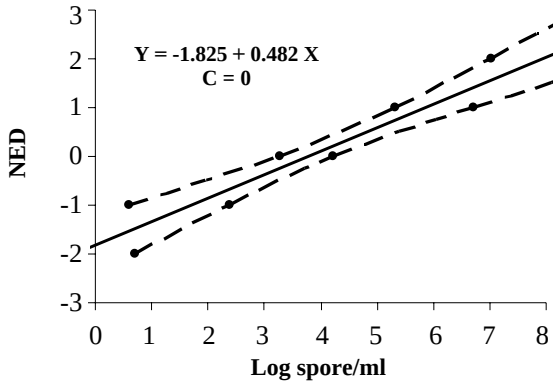
Excel استفاده شد.

داده‌های مربوط به مرگ و میر تجمعی نیز توسط نـرم‌افـزار Curve Expert 1.3 پـردازش و بهترین مدل رگرسیون بر اساس بالاترین ضریب همبستگی برای هر مرحلـه انتخـاب و سـپس زمان کشندگی ۵۰٪ (LT_{50}) محاسبه گردید.

داده‌های حاصل از درصد جوانه زنی اسپورها قبل از انجام محاسبات بـه جـذر ۱+X/۱۰۰ تبدیل و محاسبات آماری با کمک نرم افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

نتیجه و بحث

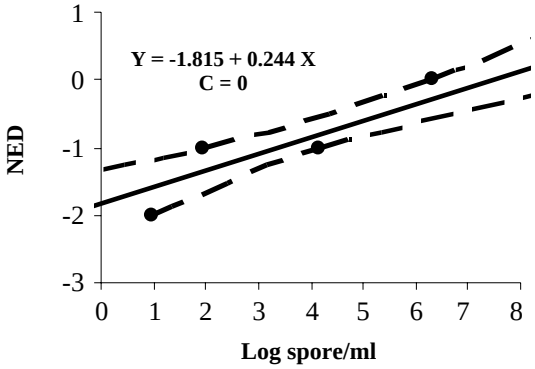
پس از تیمار حشرات کامل سن گندم با غلظت‌های مختلف جدایه‌های مورد آزمـایش، بـا استفاده از آمار مرگ و میر تجمعی ترکیبی از تـابع پـراکنش و مـدل‌هـای رگرسـیونی انتخـاب گردید که بیشترین برازش را داشته باشد. سپس غلظت کشنده ۵۰٪ و ۹۹٪ جدایه‌های مختلـف *B. bassiana* محاسبه شد کـه در جـدول ۲ مـنعکس مـی‌باشـد. کمتـرین غلظـت کشـنده ۵۰٪، $۳/۷۸ \times ۱۰^{۳}$ اسپور در میلی‌لیتر و مربوط به جدایه DEBI002 (شکل ۱)، بیشترین غلظت کشنده ۵۰٪، $۷/۴۳ \times ۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر و متعلق به جدایه DEBI007 (شکل ۲) بـود و در جدایـه GHA این مقدار $٤/٧٦ \times ١٠^{٤}$ اسپور در میلی‌لیتر به دست آمد.



شکل ۱- نمودار غلظت - مرگ و میر جدایه DEBI002

Fig. 1– Concentration-Mortality curve of isolate DEBI002

محل قرارگیری جدول ۲



شکل ۲- نمودار غلظت – مرگ و میر جدایه DEBI007

Fig. 2- Concentration-Mortality curve of isolate DEBI007

در نمودارهای غلظت – مرگ و میر رابطه بین NED[1] و درصد مرگ و میر سن گندم به صورت زیر بیان می‌شود:

= NED	۳-	۲-	۱-	۰	۱	۲	۳
درصد مرگ و میر=	۰/۱	۲	۱٦	٥۰	۸٤	۹۸	۹۹/۹

کمترین زمان کشنده ۵۰٪ در جدایه‌های DEBI002 و DEBI003 (۸/۵۵ روز)، بیشترین زمان کشنده ۵۰٪ در جدایه DEBI007 ۱٤/٥٥ روز و در جدایه GHA ۱۰/۸۰ روز، محاسبه گردید. مرگ و میر در سایر غلظت‌های برخی از جدایه‌ها کمتر از ۵۰٪ بود، لذا از آن‌ها صرفنظر شد. زمان کشنده ۵۰٪ تمام جدایه‌ها در ۳ غلظت $۱۰^{۵}$، $۱۰^{٦}$ و $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر در جدول ۳ قابل مشاهده است.

به این ترتیب جدایه DEBI002 با پایین‌ترین زمان تأثیر و کمترین غلظت کشنده ۵۰٪ زهرآگین‌ترین جدایه و جدایه DEBI007 با بالاترین زمان تأثیر و بیشترین غلظت کشنده ۵۰٪ کم اثرترین جدایه برای حشرات کامل سن گندم معرفی گردید.

۱- Normal Equivalent Deviate: انحراف از حالت تعادل در یک توزیع نرمال با میانگین صفر و انحراف معیار ۱ می باشد. مقدار پروبیت به طور بارزی در مقابل مبنای ده لگاریتم غلظت روند کاهنده‌ای دارد.

جدول ۳- زمان کشنده جدایه‌های مختلف *B. bassiana* در غلظت‌های $۱۰^{۵}$، $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ اسپـور در میلی لیتر

Table 3- Lethal Time of different isolates of *B. bassiana* at concentrations of 10^5, 10^6, 10^7 spore/ml

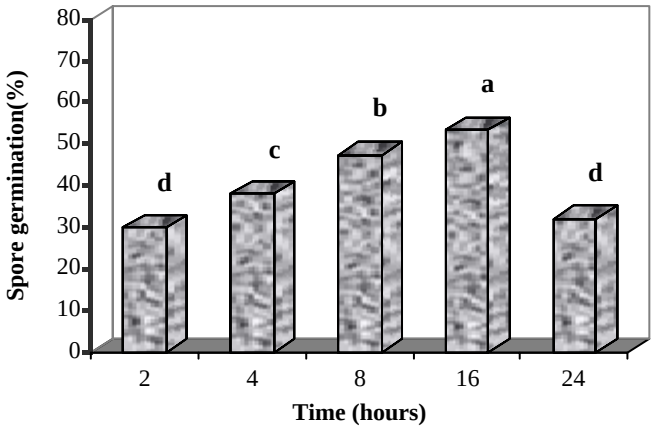
نام جدایه Isolate	LT_{50} (Day)		
	10^5 spore/ml	10^6 spore/ml	10^7 spore/ml
DEBI001	13.14	9.40	8.36
DEBI002	10.94	9.41	8.55
DEBI003	15.78	14.55	8.55
DEBI004	13.81	11.12	8.92
DEBI006	14.11	13.29	10.91
DEBI007	19.68	17.18	14.55
DEBI008	12.99	12.55	13.79
DEBI009	11.25	11.01	13.72
GHA	10.80	12.63	14.05

Haji Allahverdipour (2005) بیمـاریزایی ۴ جدایـه ایرانـی و یـک جدایـه غیـر ایرانـی از *B. bassiana* همراه با یک جدایه از *B. brongniartii* را روی حشرات کامل سن گندم مقایسـه و اثبات کرد. وی جدایه DEBI002 را با LC_{50}= ۳/۲× $۱۰^{٤}$ اسپور بر حشـره و LT_{50} = ۱۱/۰٦ روز مؤثرترین جدایه روی حشرات کامل معرفی کرد.

دوام کافی، آزاد شدن و انتشار قارچ *B. bassiana* در خاک از مهم‌ترین مکانیزم‌هـای انتقـال آن توسط حشرات آلوده زمستانگذران به طور پایدار از سالی به سال دیگر می‌باشـد. دوام ایـن قارچ در خاک بیشتر از زمانی است که روی شاخ و برگ گیاهان قرار دارد، زیرا خـاک آن را از نور مستقیم خورشید، خشکی و حرارت محافظت می‌کنـد. جدایـه DEBI002 کـه از خـاک در محل زمستانگذرانی سن گندم جداسازی شده بود بیشترین بیماریزایی را روی حشـرات کامـل سن گندم نشان داد. تحقیقات Ignoffo & Hostetter (1977) نیز ثابت مـی‌کنـد کـه خـاک مخـزن

طبیعی بسیاری از عوامل بیماریزای حشرات بوده و به دلیل جلوگیری از تأثیر سوء عوامل محیطی، نیمه عمر آن‌ها در خاک بیشتر از سایر محیط‌ها می‌باشد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس درصد جوانه زنی اسپورها در فرمولاسیون‌ها نشان داد که مدت پایداری اسپورها در حامل‌های روغنی، نوع روغن و تأثیر متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۱٪ با هم تفاوت معنی‌داری دارند. مقایسه میانگین‌ها نیز در سطح احتمال ۵٪ مبین آن است که ۵ زمان پایداری اسپورها با یکدیگر متفاوت بوده و از این نظر در ٤ گروه مجزا جای می‌گیرند. در نتیجه بیشترین میزان جوانه زنی اسپورها، ١٦ ساعت پس از فرمولاسیون آن‌ها بوده و زمان‌های ۸ و ٤ ساعت به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند این در حالی است که بین زمان‌های ۲ و ٢٤ ساعت اختلاف معنی‌داری ملاحظه نگردید (شکل ۳).

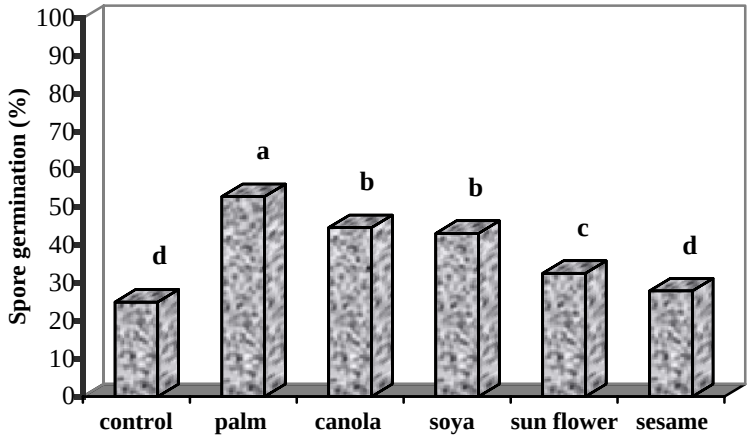


شکل ۳- اثر زمان بر بقاء اسپورها در روغن‌های گیاهی

Fig. 3- Effect of incubation time on survival of spores in plant oils

مقایسه میانگین اثر روغن‌های مورد استفاده بعنوان مواد حامل روی درصد جوانه زنی اسپورها در سطح احتمال ۵٪ نشان داد که آن‌ها در ٤ گروه آماری مختلف قرار می‌گیرند که به ترتیب عبارت بودند از روغن پالم در گروه اول، روغن‌های سویا و کلزا در گروه دوم، روغن آفتابگردان در گروه سوم و روغن کنجد همراه تیمار شاهد در گروه چهارم (شکل ٤).

اثر دوجـانبه عـامل‌های زمـان پایداری اسپورها و نوع روغن‌های گیاهی (ماده حامـل) در سطح احتمـال ۵٪ نشان داد که ١٦ ساعت، بهترین زمـان برای پایداری اسپورها در روغـن پالم با بالاتـرین میانگین بوده و به همراه زمـان‌های ٢٤ و ٨ ساعت در روغن پالم در گروه اول قرار می‌گیرند. ١٦ ساعت در روغن سویا، ٨ و ١٦ سـاعت در روغـن کلـزا بـه ترتیـب در گـروه بعدی قرار گرفتند. بالاخره میزان پایداری ٨ ساعت در روغن سویا، ٤ ساعت در روغـن پـالم، ١٦ ساعت در روغن آفتابگردان و ٢٤ ساعت در روغن سویا به ترتیب اولویت متعلق به گـروه سوم بودند. بر همین منـوال کمترین درصد جوانه زنی اسپورها در روغن کنجـد همـراه تیمـار شاهد و پس از سپری شـدن ٢٤ ساعت از تهیه فرمولاسیون مشاهده شد.



شکل ٤- اثر روغن‌های مختلف روی پایداری قارچ

Fig. 4- Effect of oils (carrier) on survival of fungi

فرمولاسیون قارچ با روغن پالم بیشترین پایداری را نسـبت بـه فرمولاسـیون آن بـا سـایر روغن‌ها و شاهد نشان داد و این روغن حامل مناسبی جهت فرمولاسیون قارچ *B. bassiana* بود در حالیکه روغن کنجـد با پایین‌ترین میانگین درصد جـوانه زنی اسپورها، نامناسب‌ترین حامل ارزیابی شد. با اینکه هیدروکربن‌های موجود در روغن خـام و بعضـی از اسـیدهای چـرب بـا زنجیره طولانی منبع کربن- انرژی خوبی برای تندش قارچ هستند اما سایر ترکیبات موجود در

روغن نیز بر رشد رویشی قارچ اثر می‌گذارند. مثلاً ترکیبات غیرصابونی منحصر بفرد سزامول، سزامین و سزامولین در روغن کنجد می‌تواند یکی از عوامل بازدارنده رشد رویشی قارچ باشد.

در دمای ۲۶°C پس از ۱۶ ساعت، جوانه زنی اسپورها کاهش یافت لذا به لحاظ آماری بهترین زمان نگهداری فرمولاسیون‌ها در دمای محیط، ۱۶ ساعت بود و پس از این مدت، قابلیت زیستی جدایه در برنامه‌های کنترلی سن گندم مطلوب نیست. پس از تولید انبوه قارچ می‌توان اسپورها را از محیط کشت جدا و خشک نمود سپس پودر اسپورها را در دمای مناسب نگهداری و در زمان پاشش با روغن فرموله کرد. روغن ذرات پودری اسپور را مرطوب ساخته و اسپورها به راحتی در روغن سوسپانسیون می‌شوند. انتقال اسپورهای قارچ توسط روغن در میکروکلیمای مرطوب بین بندهای بدن حشره عامل مهمی در موفقیت فرمولاسیون‌های روغنی در مناطق خشک می‌باشد. به این ترتیب هم قدرت جوانه زنی اسپورها در طی زمان ذخیره سازی حفظ می‌شود هم تحمل جدایه قارچ در برابر عوامل محیطی مانند دما، رطوبت و نور خورشید پس از پاشش فرمولاسیون روغنی افزایش می‌یابد.

اسکن‌های تهیه شده از اسپورهای قارچ *M. anisopliae* در سطح بدن ملخ‌ها با میکروسکوپ الکترونی توسط Bateman *et al.* (1993) مؤید همین نکته است. آن‌ها لوله تندشی، اپرسوریوم و ساختارهای نفوذ را در حضور یک لایه نازک روغنی مشاهده کرده و نتیجه گرفتند که روغن مانع از آلودگی نمی‌شود و حضور آن باعث شکستن لایه مومی کوتیکول حشره و حفاظت اسپورها از خشکی خواهد شد.

مطالعات Lomer & Lomer (1999) حاکی از آن است که روغن‌های چریش، پنبه، نارگیل و پالم برای اسپورهای *M. anisopliae* سمی هستند ولیکن روغن‌های بادام زمینی، آفتابگردان، ذرت و سویا سمیتی برای اسپورهای این قارچ ندارند. روغن‌های پارافینی سبک مثل نفت بی‌بو، Shellsol T، گازوئیل و سوخت جت A1 نیز غیر سمی هستند.

در آزمایش‌های Skrobek (2001) تأثیر Tween80 و روغن‌های آلی ، PA1، PA2 و Stockosorb®Agro بر قدرت جوانه زنی اسپورهای *M. anisopliae* var. *anisopliae* 27 در دو دمای ٤ و ٢٦ درجه سانتی‌گراد مقایسه و درصد جوانه زنی اسپورها پس از ۷، ۳۵ و ۱۲۰ روز اندازه‌گیری شد. درصد جوانه زنی اسپورها در فرمولاسیون دارای روغن PA1 و دمای ٤°C

بطور معنی‌داری بیش از فرمولاسیون دارای Tween80 بوده و اغلب کنیدی‌ها پس از ٤ ماه قادر به جوانه زنی بودند. در حالیکه قدرت جوانه زنی کنیدی‌ها در فرمولاسیون دارای Tween80، ٤٠٪ کاهش یافته بود. اما در دمای ٢٦°C کاهش شدیدی در جوانه زنی کنیدی‌ها مشاهده شد که پس از یک هفته فقط ٢٠٪ اسپورها و پس از ٤ ماه فقط ٢٪ آن‌ها در فرمولاسیون دارای Tween80 و پس از ٤ ماه نیمی از اسپورها در فرمولاسیون دارای PA1 قادر به جوانه زنی بودند. لذا توصیه می‌شود که در برنامه‌های مدیریت تلفیقی سن گندم، امکان استفاده از قارچ‌های بیمارگر مناسب با فرمولاسیون‌های روغنی مد نظر قرار گیرند.

سپاسگزاری

این مقاله نتایج بخشی از رساله دکتری نگارنده اول بوده و بدین وسیله از مدیریت مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات این تحقیق، استادان گرانقدر راهنما آقای دکتر مهران غزوی و دکتر کریم کمالی و آقای دکتر جعفر ارشاد مشاور این تحقیق همچنین آقای مهندس علی محمدی پور کارشناس بخش تحقیقات حشره‌شناسی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تشکر و قدردانی می‌نمایم.

نشانی نگارندگان: دکتر ژینوس رستگار و دکتر کریم کمالی، دانشگاه آزاد اسلامی، بخش حشره‌شناسی، پونک، حصارک، کدپستی ٧٧٥/١٤١٥٥، تهران، ایران؛ دکتر مهران غزوی و دکتر جعفر ارشاد، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، صندوق پستی ١٤٥٤، تهران ١٩٣٩٥، ایران.