مجله علمي - پژوهشي زيست شناسي جانوري تجربي

سال اول، شماره چهارم، بهار ۱۳۹۲ (۵۵-۴۳)

بررسی تاثیر عصاره آبی آنغوزه و قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم درکنترل بیولوژیکی افات کلیدی مگس سفید و شته اقاقیا

*نویسنده مسئول: زهرا زمانی

Zahra.zamani86@gmail.com

دانشگاه پیام نور کرمان

چکیده

بمنظور ایمنی زیستی و کاهش اثرات سموم شیمیایی برای اولین بار در ایران استفاده از قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم و عصاره آبی آنغوزه *برای کنترل بیولوژیک تعدادی از افات کلیدی که سالانه خسارات زیادی به محصولات وارد می کنند، صورت گرفت.سویه* KB512 قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم از ایزوله های بومی استان جدا و شناسایی شد و تستهای آلوده سازی، با اسپری مستقیم بر روی دو آفات مهم دنیا شته اقاقیا *افیس فابا* و مگس سفید بمیزیا تاباسی صورت گرفت. تستهای آلوده سازی با استفاده از تلقیح ۱×۱۰^{۸} کنیدی بر میلی لیتر انجام شد و نمونه کنترل با ۰/۰۱ درصد توین *80* در آب مقطر، اسپری شد. بعد از اسپری کردن پلیتها در انکوباتور با دما ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد و *80*درصد رطوبت نسبی *RH* قرار داده شدند. حشرات تست شده هر روز برای ردیابی رشد قارچ بروی آنها بررسی می شوند بعد از ۹و۷و۵ روز، درصد مرگ ومیر با غلظت ۱×۱۰^{۸} گزارش شد. نتایج نشان دادند که کنترل بیولوژیکی افات هدف به خوبی صورت گرفت.

کلمات کلیدی: کنترل بیولوژیک ، مگس سفید، شته اقاقیا ، عصاره آبی آنغوزه، قارچ بیماریزا حشرات.

The effect of the enthomopathogenic fungi Lecanicillium muscarium and Ferula assafoetida extract az Biological control of Aphis fabae and Bemisia tabaci

z.zamani*

***Payame Noor University* , kerman,Iran**

Abstract:

For environmental safety and reduce the effect of pesticide, for the first report we used the enthomopathogenic fungi *Lecanicillium muscarium* and Ferula assafoetida extract for Biological control of key pest that have wide damages to our crops. We isolate the pathogenic strain KB512 of enthomopathogenic fungi *Lecanicillium muscarium* from the soil and recognized. The pathogencity test was carried out with direct insect spray. Bioassay with concentration 1×10^{8} conidi / ml were tested and the control were spraied by 0/01٪tween80 in distilled water after spraying the pest. Plat were placed in the incubator with temperature of 25±1c and 80٪RH. Tested pest were monitoring every day for checking the growth of the fungi ,after 9,7,5 days the percentage of mortality in treatment with (1×10^{8} conidi/ml) concentration was reported. The result shown that biological control can control our aim pests effectvely and stongly.

Keyword: *Aphis fabae- Bemisia tabaci- Biological control - Enthomopathogenic fungi - Ferula assafoetida- Lecanicillium muscarium*

مقدمه:

استفاده بی رویه وناآگاهانه از آفتکش ها با اصول اکولوژیکی مغایرت داشته ومی تواند منشاء مشکلات عدیده ای از قبیل ایجاد نژاد های مقاوم افات به سموم ، شیوع آفات درجه دوم ، اثرات نامطلوب روی موجودات غیر هدف مانند پارازیتوئیدها، باقیمانده سموم در محصولات کشاورزی ومسمومیت مستقیم برای مصرف کننده باشد. از طرفی کنترل بیولوژیکی به عنوان برنامه ای که برای حفظ محیط زیست سودمند است، مطرح می شود. زیرا در این روش باقی مانده سموم شیمیایی که اثرات مضر روی سلامت انسان و سایر موجودات زنده داشته باشد دیده نمی شود. یک کنترل بیولوژیکی موفق کنترل وسیع و پایدار آفات را با هزینه بسیار مناسب فراهم می کند (Amrine et al. 1993) . تا کنون ۴۳ ترکیب بیولوژیک در جهان (حشره کش ۶۸ درصد، قارچکش ونماتکش ۳۰ درصد وعلف کش ۲ درصد) به ثبت رسیده است (Butt& Jackson.*2001*). که در میان ایران سهم کمی در استفاده از افتکشهای بیولوژیکی دارد. در این تحقیق به بررسی تاثیر قارچ بیماریزا حشرات لکانیسیلیوم موسکاریوم جدا شده از ایزوله های بومی استان در کنترل تعدادی از آفات کلیدی استان کرمان که شامل شته اقاقیا و مگس سفید می باشد،پرداخته شد.

لکانیسیلیوم موسکاریوم یکی از قارچهای بیماریزا حشرات یا انتوموپاتوژن است که در همه جا موجود می باشد و می توان آنرا به طور گسترده از حشرات مختلف و از خاک جدا کرد(Barson.1976) . گونه های مختلف این جنس دارای توان بالای اسپورزایی و بیماریزایی در دامنه گسترده رطوبت نسبی و دامنه حرارتی وسیع ۲-۳۶ درجه سانتیگراد هستند بطوریکه Kope *et al.2007* گزارش می نماید که گونه های مختلف این جنس در رطوبت نسبی کمتر از ۱۲ درصد در شرایط آزمایشگاهی اسپورزایی و بیماریزایی دارند.

Andrew et al.2005))در *تحقیقات*خود به این نتیجه رسیدند که گونه های این جنس در دامنه ۵۳-۹۸/۵ درصد رطوبت نسبی بیماریزا می باشند. با توجه به نیمه عمر کنیدیهای این جنس، که در آب مقطر استریل و ۲ درجه سانتیگراد در محدوده ۱۶۰-۱۱۰ روز می باشد و در دما ۱۷- درجه سانتیگراد ۱۲۰-۶۰ روز است، گونه های این جنس را از مهمترین پاتوژنهای حشرات یا قارچهای انتوموپاتوژن می شناسند و از دیر باز بیماریزایی آنها بر روی گونه های مختلف حشرات نیز

گزارش شده است Cuthbertson et al. (2010.) . در سالهای ۱۹۴۱-۱۹۱۰ گزارشاتی از این گونه ها روی شته ها، شپشکها، تریپسها و مگس سفید عنوان شده است و از کنترل شته ها و شپشکها بمیزان ۱۰۰ درصد خبر داده اند (*CAPINERA. 2008*) . تستهای آلوده سازی، با اسپری مستقیم حشره با استفاده از تلقیح ۱×۱۰^{۸} کنیدی بر میلی لیتر انجام شد وکنترل با ۰/۰۱ توین *80* درصد در آب مقطر، اسپری شدند. بعد از اسپری کردن پلیتها در انکوباتور با دما ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی۸۰ درصد قرار داده شدند.حشرات تست شده هر روز برای ردیابی رشد قارچ بروی آنها بررسی شدند و بعد از ۹، ۵،۷ روز درصد مرگ ومیر با غلظت ۱×۱۰^{۸} به ترتیب۳۶%-۲۵%-۱۷/۲۶%برای شته اقاقیا و ۴۰/۶۶%-درصد۷۹/ -۲۸ ۲۴درصدبرای مگس سفید بود همچنین در این تحقیق از عصاره آبی آنغوز تهیه شده برای اولین بار بر روی این افات تست شد که در مورد شته اقاقیا ۴۰/۹۶%-۲۷/۰۶%- ۱۸/۶۲درصد و برای مگس سفید ۳۸/۹%-۳۵/۶۸%- ۳۲/۰۲درصدبود. این عصاره علاوه بر افت کش بودن به علت بوی خاصی که دارد بعنوان دافع خوبی برای حشرات مضر دیگر نیز می باشد که به حفاظت محصولات ما کمک می کند.

در اینجا به بررسی تعدادی از عوامل موثر دربازیافت بهینه و تولید انبوه قارچ و مروری بر تاثیرات جانبی و ایمنی ان می پردازیم . همچنین پیشنهاداتی در جهت تولید انبوه با مقیاس صنعتی و تولید تجاری آن ارائه شده است.

مواد و روشها:

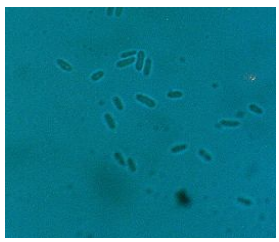
۱- روشهای تهیه سوسپانسیون قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم:

۱-۱ تک اسپور کردن ایزوله های قارچ:

لاروهای منتقل شده به آزمایشگاه و نگهداری شده در دمای ۲۰درجه سانتیگراد پس از ظهور بار قارچی و بررسی نمونه های حاوی بار قارچی توسط استریو میکروسکپ ، با استفاده از سوزنهای کشت استریل و یک قطره آب مقطر استریل ، سوزن را به کنیدیوفورها نزدیک کرده و کنیدی ها توسط قطره آب به محیط کشت سلکتیو مدیا لکانیسیلیوم یا *(LSM)* (۱۰)منتقل شد و در سطح محیط پخش گردید . پس از نگهداری محیط کشت در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد با بررسی میکروسکپی ، تک کنیدی های جوانه زده به محیط کشت سابرو دکستروز اگار یا *(SDA)* منتقل شد و پس از انکوباسیون در

دمای ۲۳ درجه سانتیگراد بمدت ۱۴ روز در دمای ۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

شکل۱ - *فیالید قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم* بر روی محیط*SDA*



شکل ۲ - *کنیدی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم* بر روی محیط*SDA*

۱-۲تهیه سوسپانسیون قارچی:

بعد از کشت ایزوله ها بر روی محیط کشت*SDA* پرگنه قارچ پس از ۱۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به ۲۵ سانتیمتر رسید. کلنی قارچ بدست آمده سفید، پنبه ای و سطح زیرین آن کرم رنگ تا زرد کمرنگ بود. فیالیدها مستقیما روی ریسه ها یا انشعابات ثانویه آنها تشکیل می شد. اندازه فیالیدها بطور متوسط ۱/۵-۲۰-۳۶×۱/۳ میکرومتر اندازه گیری شد (شکل۱). کنیدی ها در انتهای فیالیدها و در سرهای دروغین تشکیل می شد و اندازه آنها ۱/۷-۴-۶/۴×۱/۲ میکرومتر تعیین گردید.

درجه حرارت بهینه ۲۷-۲۱ درجه سانتیگراد ونگهداری در تاریکی در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد بمدت ۲۰ روز امکان پذیر است.(Qui et al. 2004). با اضافه نمودن ۵ میلی لیترآب مقطر استریل به پتری دیشهای کشت داده شده و پخش آن در سطح پتری و بهم زدن سطح پرگنه قارچ توسط میله شیشه ای در شرایط استریل و با استفاده از محلول ۰/۰۵درصدتوئین۸۰درصد و تنظیم رقت کنیدی سوسپانسیون (با استفاده از هموسیتومتر) ۱×۱۰^{۷} کنیدی در میلی لیتر تهیه گردید.جهت اطمینان از زنده بودن و قدرت جوانه زنی کنیدی ها ۰/۵ میلیمیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر روی محیط کشت *SDA* پخش شد و مجددا جوانه زدن کنیدی ها با میکروسکپ بررسی گردید(شکل۲).

بمنظور اثبات بیماریزایی پس از تهیه سوسپانسیون اسپور، لاروهای شته ومگس سفید را به مدت ۱۰ ثانیه در سوسپانسیون اسپور تهیه شده غوطه ور و پس از حذف سوسپانسیون اضافی، لاروها در ظروف استریل حاوی پنبه مرطوب در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. با بررسی روزانه لاروهای مرده پس از ضدعفونی با محلول ۳۰درصد H_2O_2 بمدت ۳ دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل ، در

پتریهای استریل حاوی کاغذ صافی و پنبه مرطوب قرار داده شدند و این پتریها در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد و در تاریکی نگهداری شده و بار قارچی حاصله از لحاظ خصوصیات تاکسونومی مورد بررسی قرار گرفت

۲- تاثیر سوسپانسیون کنیدی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم بر روی آفت مگس سفید :

به طریق لیف کیج:. گلدانهای ختمی ژاپنی را به قفسه های الومینیومی با ابعاد ۶۰×۸۰×۶۰ که با توری محصور شده بودند، منتقل گردیدند. پس از اطمینان از سلامت و عدم آلودگی گلدانها،. بر روی هر برگ پتری دیش پلاستیکی ۹ سانتی متری که جهت تعبیه هوا بروی درب آن محفظه ای دایره ای شکل به ابعاد ۲×۲ سانتی متر در آوردیم و بجای ان توری مشبک با سوراخهایی به سایز ۸۰ میکرومتر از جنس نایلون پوشانده و بوسیله چسب سیلیکونی مهر وموم گردید. (حتما باید چند روز از تهیه پتری دیشهای بگذرد و بعد آزاد سازی حشره انجام شود تا بوی چسب باعث کشتن حشره نگردد).

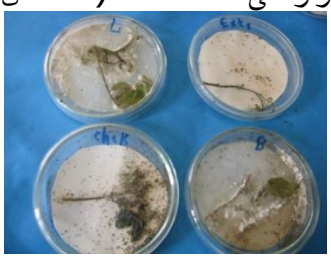
جمعیتی مگس سفید از مرکز تحقیقات گیاه پزشکی کرمان گرفته شد و بر اساس مشخصات تاکسونومیکی نوع گونه شناسایی و مورد تائید قرار گرفت که بمیزیا تاباسی بود، جمعیت مگس سفید پرورش داده شد و ۲۰عدد از آنها را که از عدم آلودگی اطمینان حاصل شده را با اسپیلاتور بر روی برگ ختمی در شرایط آزمایشگاهی(دما ۱±۲۵ درجه سانتیگراد و نسبت ۸ ساعت تاریکی و۱۶ساعت روشنایی) رها سازی کردیم(*Thungrabeab &, Tongma S. 2007*). سپس هر برگ حاوی پلیت با سوسپانسیون های تهیه شده از کنیدی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم بطوریکه ذکر شد، اسپری و نتایج بعد از ۵-۷-۹روز بررسی شدند.

به روش بیواسی: در کف هرپتری برای حفظ رطوبت ۱ میلی لیتر از محلول گلیسرین و آب مقطر استریل با نسبت ۵۰:۵۰ با پیپت پاستور افزوده و روی ان کاغذ صافی استریل شده در اتوکلاو (برای حفظ رطوبت) قرار داده شد ،سپس دو برگ ختمی بعنوان منبع تغذیه به پلیت ها افزوده ، پس از آنکه پلیتهای بصورت ذکر شده تهیه شدند ،۲۰ عدد مگس سفید با اسپیلاتور از روی برگ ختمی جدا سازی کرده و در شرایط ازمایشگاهی دما ۱±۲۵ درجه سانتی گراد و نسبت ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ساعت روشنایی در پلیتها رها سازی کردیم ، هر کدام از پلیت ها را با سوسپانسیون های تهیه شده از کنیدی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم بطوریکه ذکر شد، اسپری شدند.در همه تستها دو پتری بعنوان شاهد قرار داده شد که فقط آب مقطر استریل

حاوی ۰/۱ تویین ۸۰درصد پاشیده شد و نتایج بعد از ۵-۷-۹روز بررسی شدند.

۳- تاثیر سوسپانسیون کنیدی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم بر روی آفت شته اقاقیا :

برگ درختان اقاقیا آلوده به شته افیس فاباجمع آوری شده از سطح شهر را به آزمایشگاه آورده، با قلم موی۰۰ از سطح پشت برگ اقاقیاجدا کرده وبه پتری دیشهای ۹سانتی متری که کف آنها کاغذ صافی قرار داده شده، منتقل می کنیم. برای داشتن رطوبت مورد نیازچند قطره آب مقطر استریل افزوده، سپس از سوسپانسیون قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم با غلظت ۱×۱۰^{۸} اسپری کرده و نتایج بعد از ۵-۷-۹روز بررسی شدند.(شکل۳)



شکل ۳-تست های اولیه بیواسی و بیماریزایی درشته اقاقیا

۴-تهیه عصاره آبی آنغوزه:

ابتدا صمغ انغوزه را با استفاده از هاون به پودر تبدیل کردیم و به مقادیر بسیار کم شروع به حل کردن پودر در مقدار ۱۰ میلي گرم آب کردیم .در مراحل اولیه ساخت محلول با افزودن گرم هاي مختلفي از صمغ انغوزه به ۱۰ ميلي گرم آب متوجه شديم كه صمغ انغوزه به راحتي در آب حل نمي شود و همواره مقداري نا خالصي خواهد داشت و به دليل اينكه بعد از آب الكل بيشترين حلاليت را دارد تصميم گرفتيم كه از آب و الكل به نسبت يك به يك استفاده كنيم (۵ميلي گرم آب و ۵ميلي گرم الكل) و با افزودن گرم هاي مختلف از پودر صمغ انغوزه به۱۰ ميلي گرم مخلوط آب والكل به نسبت يك به يك (۵ميلي گرم آب و ۵ميلي گرم الكل) با اندازه هاي ۱/۱۰ ، ۲/۳ ، ۲/۵۴ و ... و با افزودن ۰/۱ ميلي گرم در هر مرحله متوجه شديم كه مقدار ۳/۳۷ گرم پودر در اين مقدار حلال (۵ ميلي گرم آب و ۵ ميلي گرم الكل) حل مي شود. لذا از همين محلول براي آزمايشات استفاده كرديم. اسپری عصاره آبی آنغوزه بر روی افات مورد نظر صورت گرفت و نتایج پس از بررسی در روزهای۵، ۷، ۹ گزارش شد.

۵- ارزیابی توانایی بقا اسپور :

اسپور تهیه شده را درلوله های سانتریفیوژ با *3000* دور در دقیقه ریخته و دو مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده و با افزودن آب مقطر، غلظت^{۵}۱۰ کنیدی برمیلی لیتر را تهیه شد . نمونه در دماهای ۷۰- ، ۲۰ - ، ۴ ، ۲۰، ۲۷ و ۳۷ درجه سانتیگراد قرار

داده شدند. حیات نسبی اسپورها برای چندین ماه با قرار دادن آنها به میزان *100* میکرو لیتردر محیط *YPG* آگار با پایه ضعیف تخمین زده می شودکه نتایج مورد بررسی قرار گرفتند. (Gam,&.Zare.2001)

۶- ارزیابی بقای کنیدی

برای ارزیابی بقا کنیدی **از** محلول **استوک** که شامل ۰/۳ درصد پدید پروپیدیوم وآب مقطراستریل (نسبت وزن /حجم)بود، می توان استفاده کرد اما برای استفاده سریع، از محلول استوک شامل ۱/۲ درصد پدیدپروپیدیوم حل شده در آب مقطر استریل بکار برده شد(*Uma et al 2001*). کنیدیها در ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۱ درصد مولار با (*PH=7*)حاوی۰/۰۱ توین ۸۰درصد حل شدند تا غلظت کنیدی معلق(شمارش با لام نئوبار) به 10^7 کنیدی بر میلی لیتر برای هر تست رسید. بعد از مخلوط کردن کامل ۷ میکرو لیتر از کنیدی معلق با حجم یکسان از استوک پدیدپروپیدیوم، روی لام قرار داده شد و یک لامل روی آن گذاشته شد. کنیدیها با رنگ پدیدپروپیدیوم در یک اتاق تیره آماده شدند. هر نمونه به یک محفظه تاریک که حاوی میکروسکوپ با نور فلورسنتی بود، منتقل شد .هر کنیدی تیمار شده معلق در زیر میکروسکوپ فلورسنتی *400x* دیده شد. حداقل ۱۰۰۰ کنیدی در ۴ مربع انتخاب شده مشاهده شد، کنیدی ها با درخشش فلورسنتی قرمز، غیره زنده هستند وآنهایی که تیره رنگ با هاله قرمز هستند، زنده می با شند. درصد زنده ماندن، با تقسیم تعداد کنیدی زنده بر تعداد همه کنیدی ها ضرب در ۱۰۰ محاسبه می شود .می توان صحت آن را با یک نشانگر فلورسنتی (از رنگهای حیاتی هم می توان برای نشان دادن حیات کنیدی استفاده کرد) و میکروسکوپ فلورسنتی و صفحه شمارش گر تائید کرد. با میکروسکوپ فلورسنتی می توان به سرعت و دقیق درصد کنیدیهای زنده را محاسبه کرد. تقریبا" ۲۰ دقیقه برای هر ایزوله زمان نیاز است، در صورتیکه در روش صفحه شمارش گر چندین روز برای جداسازی کنیدیهای زنده زمان لازم است و به علت آسیبی که به غشا سلول وارد می شود، کنیدیها متورم دیده می شوند و سلولهای غیر زنده مشابه سلولهای زنده بنظر می آیند. عصاره *5* ایزوله از کنیدیهای قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم بر این آفات کلیدی اسپری شد. بدینوسیله بطور غیر مستقیم در مجاورت کنیدیها قرار داده شدند وبقای آنها بعد از ۵ روز بررسی شد. برای بررسی وجود قارچ ، حشره مرده را روی محیط جامد تیمار شده با ۵۵درصددودیم و ۰/۰۰۰۵ تتراسیکلین دردمای ۲±۳۲ درجه سانتیگراد قرار داده تا زمانیکه قارچ از داخل بدن

حشره خارج شود که تائیدی بر بیماریزایی می باشد.

۷- اتصالات لکتینی :

۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^8 اسپور بر میلی لیتر روی لام قرار داده و ۵ دقیقه برروی لام باقی بماند تا به آن متصل شد . اسپور با دو قطره استون منجمد فیکس شد و اسپورهای اضافی که به لام نچسبیده اند، با *1* میلی لیترآب مقطرشسته شدند. اسپورهای چسبیده با آب مقطر برای ۳۰ ثانیه آبکشی شدند. و با ۴۰ میلی لیترمحلول لکتین (۲۰۰ میکرو گرم پروتئین / میلی لیتر نمک) برای ۳ دقیقه تیمار شدند.

نتایج:

یکی از افات مهم استان که در فارسی مگس سفید یا عسلک است که در دنیا از روي ۵۰۷ میزبان گیاهي که به ۷۴ خانواده تعلق دارند گزارش گردیده است. بیشترین تعداد میزبانها به ترتیب در خانوادة *Leguminoseae*، *Compositae*، *Malvaceae*، *Solanaceae*، *Euphorbiaceae* قرار دارد. در بین گیاهان زراعي، پنبه، گوجه فرنگي، کنجد، کنف، آفتابگردان اهمیت بیشتري دارد در اکثرنقاط کشور انتشار دارد و مخصوصا در گلخانه ها درپشت برگهای عده زیادی از گیاهان زینتی مانند گل کاغذی، شاه پسند و بعضی گیاهان زراعي فعالیت دارد. در این تحقیق ما توانستیم در تیمار با سوسپانسیون اسپورقارچ بیماریزا حشرات لکانیسیلیوم موسکاریوم در روز نهم از نظر مشاهده میانگین درصد تلفات با *40/66* درصد را گزارش دهیم. شته اقاقیا نیز از آفات مهم و درجه اول گیاهان صنعتی ، زینتی ، باغبانی ، سبزیکاری ، جنگلی و غیره بوده و از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار میباشند. شته با خرطوم خود از شیره گیاهی تغذیه می کنند ، علاوه بر تغذیه از شیره گیاهی در انتقال بیماریهای ویروسی نقش مهمی ایفا می کنند. عده ای از شته ها باعث پیچیدگی برگ و یا تغییر شکل شاخه ها گردیده و برخی بر روی قسمتهای گیاهان میزبان تشکیل گالهای گوناگونی را می دهند. ما در این تحقیق استفاده از قارچهای انتوموپاتوژن لکانیسیلیوم موسکاریوم را که ایزوله بومی وسازگار با شرایط محیطی است و در همه جا موجود می باشد و می توان آنرا به طور گسترده از حشرات مختلف و از خاک جدا کرد. را بعنوان یک عامل کنترل بیولوژیک بررسی می کنیم .چون علاوه بر مصون ماندن خاک و آب از استفاده سموم،از مزایای این قارچ دوام وتکثیر آن در خاک است. نخستین گزارش از جدا سازی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم از لارو زنبورساقه خوار گل محمدی و جدا سازی این قارچ از لارو سوسک چوبخوار

گل محمدی از ایران می باشد بر اساس نتایج و مقایسات اماری بین درصد تلفات حاصل از اسپری سوسپانسیون اسپور لکانیسیلیوم موسکاریوم روی شته اقاقیا در روز های پنجم و هفتم و نهم پس از اسپور پاشی براساس آزمون ($P; x^2$ < ۰/۰۱) تفاوت معنی داری در سطح ۹۹درصددیده شد. بین زمانهای پنجم و هفتم روز تفاوت معنی داری وجود ندارد، اما از نظر مشاهده ای میزان درصد تلفات روز هفتم با میانگین تلفات (۲۵درصد)۱۵عدد لارو بالاتر از روز پنجم (۱۷/۲۶درصد) ۱۰لاروبود، اما درصد تلفات روز نهم اختلاف معنی داری در حد ۹۹درصدبا روزهای پنجم و هفتم داشته ومیانگین درصد تلفات (۳۶ درصد) ۲۱ عدد لارو بدست آمد . بر اساس نتایج و مقایسات اماری بین درصد تلفات حاصل از اسپری سوسپانسیون ابی انغوزه در تیمارهای زمانی پنجم-هفتم-نهم اختلاف معنی داری در سطح ۹۹درصدو بیشترین تلفات در تیمار روز نهم با میانگین تلفات(۴۰/۹۶درصد)۱۲ عدد لارو دیده شد.

در تیمار روز هفتم مشخص شد که درصد تلفات تیمار با با میانگین(۲۷/۰۶درصد)و در تیمار روز پنجم مشخص شد که درصد تلفات تیمار با سوسپانسیون اسپور۱۸/۶۲ درصد را نشان می دهد .

در تیمار مگس سفید با لکانیسیلیوم موسکاریوم در روزهای مختلف تیمار روزهای پنجم، هفتم ،نهم اختلاف معنی داری در سطح ۹۹ درصد وجود دارد. بین زمانهای روز پنجم و هفتم تفاوت معنی داری وجود ندارد.اما از نظر مشاهده ای تیمار روزهفتم با میانگین تلفات(۲۸/۷۹ درصد)۹ عدد لارو بیشتر است.اما بین تیمار روزهای هفتم و پنجم اختلاف معنی داری وجود ندارد.در تیمار روز نهم با میانگین تلفات(۴۰/۶۶ درصد) ۱۲عدد لارو بیشتر است.از نظر مشاهده ای بین روزهای پنجم و نهم در سطح۹۹ درصد اختلاف معنی داری وجود دارد که در روز نهم بیشتر است.در تیمار پنجم روزه مگس سفید بالکانیسیلیوم موسکاریوم تفاوت معنی داری وجود ندارد.ولی از نظر مشاهده ای میانگین درصد تلفات در تیمار با سوسپانسیون اسپور لکانیسیلیوم موسکاریوم با ۲۴ درصد قرار دارد .در تیمار هفتم میانگین درصد تلفات با سوسپانسیون اسپور لکانیسیلیوم موسکاریوم لکانیسیلیوم موسکاریوم ۲۸/۷۹ درصد د قرار دارد .در تیمار روز نهم لکانیسیلیوم موسکاریوم از نظر مشاهده ای میانگین درصد تلفات در تیمار با سوسپانسیون اسپور لکانیسیلیوم موسکاریوم با(*40/66* درصد) ۱۲ عدد لارو قرار دارد. در تیمار سوسپانسیون ابی انغوزه در روزهای مختلف

تیمار پنجم،هفتم،نهم اختلاف معنی داری در سطح ۹۹ درصد وجود دارد. از نظر مشاهده ای تیمار هفت روزه با میانگین تلفات (*35/68* درصد)۱۱ عدد لارو بیشتر است. بین تیمارزمانهای روز پنجم و هفتم تفاوت معنی داری وجود ندارد.در تیمار نه روزه با میانگین درصد تلفات *38/0* درصد بیشتر است.از نظر مشاهده ای بین تیمار زمانی پنجم و نهم روزه در سطح ۹۹ درصد اختلاف معنی داری وجود دارد که در روز نهم بیشتر است.

در تیمار پنج روزه با لکانیسیلیوم موسکاریوم و سوسپانسیون ابی انغوزه تفاوت معنی داری وجود ندارد.ولی از نظر مشاهده ای

	3 day	*5 day*	*7 day*
Tween-80	***96.67± 3.33***	***90.00± 3.97***	***73.331±4.02***
1×10^4	***93.32 ± 4.08***	***86.66±2.72***	***73.331±3.64***
1×10^5	***89.99 ± 3.97***	***73.33± 1.26***	***69.99 ± 2.78***
1×10^6	***83.331±2.23***	***66.66 ± 3.33***	***63.33 ± 3.23***
1×10^7	***79.99 ± 1.08***	***66.66 ± 2.79***	***63.33 ± 3.33***
1×10^8	***76.66 ± 2.79***	***66.66 ± 3.26***	***60.00± 4.26***

میانگین درصد تلفات در تیماربا‌سوسپانسیون ابی انغوزه با(۳۲/۰۲ درصد)۱۰ عدد لارو بیشتر از تیمار با سوسپانسیون اسپور لکانیسیلیوم موسکاریوم با ۲۴ درصد قرار دارد .

در تیمار هفت روزه بین تیمار با لکانیسیلیوم موسکاریوم وسوسپانسیون ابی انغوزه تفاوت معنی داری و جود ندارد. ولی از نظر مشاهده ای میانگین درصد تلفات در تیماربا‌سوسپانسیون ابی انغوزه با ۳۵/۶۸ درصد)۱۱ عدد لارو بیشتر از تیمار با سوسپانسیون اسپور لکانیسیلیوم موسکاریوم با (۲۸/۷۹ درصد)۹ عدد لارو قرار دارد .

در تیمار روز نهم بین لکانیسیلیوم موسکاریوم وسوسپانسیون ابی انغوزه تفاوت معنی داری و جود ندارد.ولی از نظر مشاهده ای میانگین درصد تلفات در تیمار با سوسپانسیون اسپور لکانیسیلیوم موسکاریوم با(*40/6۶* درصد)۱۲ عدد لارو بیشتر از میانگین درصد تلفات در تیماربا‌سوسپانسیون ابی انغوزه با(*38/90* درصد)۱۱ عدد لارو قرار دارد.

جدول1- *بررسی میزان تاثیرسوسپانسیون برمگس سفید توسط روش اماری* one-way ANOVA*وبررسی سطح معنی داری* P (LSD Test, < 0.05)

نتایج نشانگر تاثیر بالا قارچ و عصاره انغوزه بر روی افات هدف است.

بحث:

.در طی دو سال بررسی تعداد ۱۸۴ جدایه از

قارچهای مختلف شناسایی گردید که ۲۲/۲۸درصد از این جدایه ها متعلق به قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم جدا شده از زنبور *H. cf trimaculata* ، ۱۵/۲۱درصد از این جدایه ها متعلق به قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم جدا شده از سوسک *A. cf aurichalerus* است. ۱۴/۶۷درصداز این جدایه ها متعلق به قارچ اکرومونیوم کیلنس جدا شده از زنبور *H. cf trimaculata* است. ۱۰/۳۲درصد از این جدایه ها متعلق به قارچ اکرومونیوم اجیپتیکام جدا شده از سوسک *A. cf aurichalerus* است. ۲۰/۶۵درصد از این جدایه ها متعلق به گونه های قارچ کلادوسپوریوم جدا شده از زنبور *Hftrimaculata* است. ۹/۲۳درصد از این جدایه ها متعلق به گونه های قارچ کلادوسپوریوم جدا شده از سوسک*A. cf aurichalerus* است و۷/۶۰درصد از این جدایه ها متعلق به قارچ *Alternaria sp* جدا شده از سوسک *A. cf aurichalerus* می باشد. در مجموع جدایه های قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم با فراوانی ۳۷/۵درصد بیشترین تکرار را در این مطالعات داشته است. (Fatiha et al. 2008). بیماریزایی(Kope, *et al.*۲۰۰۶) گونه های این جنس را بر روی کنه ها گزارش می نمایند و گونه های مختلف جنس لکانیسیلیوم را بعنوان کنترل کننده بیولوژیک سوسکها گزارش می نماید. و(*Andrew ,et al.*۲۰۰۵) گونه لکانیسیلیوم موسکاریوم را از روی *Pissodes strobi* گزارش می نماید و برای کنترل مگس سفید بکار برده است.به همین علت ما نیز از ایسن سویه استفاده کردیم که نتایج بسیار خوبی را هم علیه این افات مهم و کلیدی که سالانه خسارات بسیاری به محصولات در استان وارد می کند بدست اوردیم. ما توانستیم درصد تلفات روز نهم را که با اختلاف معنی داری در حد ۹۹درصدبا روزهای پنجم و هفتم داشته و با میانگین درصد تلفات(۳۶درصد) ۲۱ عدد لارو را گزارش کنیم.تحقیقات توسط (۱۹۹۶ *Greathead,*)نشان داد که علارغم دامنه گسترده میزبانی لکانیسیلیوم موسکاریوم کمترین اثر را بروی اورگانیسمهای غیر هدف دارد. تحقیقات انجام شده بروی کشتزارها نشان می دهد هیچ نشانه ای از تاثیرات منفی بر مهره داران ، زنبور عسل ،حشرات مفید ، کرم خاکی و گیاهان موجود نیست . ما نیز احتمال اثرات جانبی ان را بر روی کفشدوزک و بالتوری انجام دادیم و بی خطر بودن آن را برای موجودات غیر هدف گزارش کردیم.برای تهیه فورمولاسیون یک قارچ بیماریزای حشرات در نظر گرفتن مواردی است که قارچ بیماریزای حشرات را در حالت بهینه قرار می دهند، که یکی از انها زمان مورد نیاز برای

قرار گرفتن اجزا قارچ برویی حشره و تکنیک کاربرد انها ست .تعیین زمان مورد نیاز برای کنترل آفت باتوجه به تعداد روزی که حشره آفت باید در معرض قار چ قرار بگیرید و با توجه به در نظر گرفتن سایر عوامل موثر نظیر باد - باران- نور خورشید در نظر گرفته می شود. نکته مهمی که باید توجه شود، بخصوص اگر قارچ بیماریزای حشرات درطی فصول مرطوب بکار برده شوند ضروری است که یک ماده سورفکتانت به آن اضافه شود تادراثر باران شسته نشود (Butt & Jackson.*2001*). ما نیز با بررسی ارزیابی بقای کنیدی و ارزیابی توانایی بقا اسپورو اتصالات لکتینی در این تحقیق بدنبال ارزیابی پارامترهای تکاملی و بیماریزایی در روند تولید برای تهیه فرمولاسیون با ارزیابی توانایی بقا اسپور پرداختیم که باید ۵ معیار مهم در تهیه سویه ای که بهترین عملکرد را در طی پروسه تولید دارد در نظر گرفته شود:

۱-قدرت بیماریزایی بالا ۲ - قدرت تولید بالا در محیط مایع یا جامد ۳ - پایداری ژنتیکی بالا ۴ - پایداری فیزیولوژیکی بالا در هنگام نگهداری ۵- سازگاری بالا با اجزا کمکی در فرمولاسیون. .پس توصیه ما این است که در محصولات گلخانه ای که مصرف سم مشکلاتی برای سلامت انسانها ایجاد می کند،از این قارچ در *IPM*به همراه سموم بی خطر استفاده شود و با توجه به مزایا وکارایی بالا این قارچ امید است که در آینده گامی بسوی استفاده بیشتر از محصولات بیولوژیک و تولید انبوه آن برداریم

سپاسگزاری:

با تقدیر و تشکر از استاد راهنما جناب اقا دکتر خانیکی و مشاور محترم جناب اقا مهندس امینایی که در زمینه این تحقیق ما را از راهنماییهایشان بهرمند کردند ،مرکز تحقیقات کشاورزی کرمان و دانشگاه پیام نور واحدکرج که در پیشبرد این هدف نهایت همکاری ومساعدت را داشته اند

References

1-Amrine, Jr.J.w.Stasny,T. A. 1993. *Biological control of multiflora rose,*.In*McKnight,B. N.(ed.)*.Biological Pollution.*Indiana Academy of Science, Indianapolis, Indiana, USA. pp.9-21*

2- Andrew,G.,Cuthbertson, S. and Keith,F.A.2005.*Compatibility of the entomopathogeni fungus Lecanicillium muscarium and insecticides for eradication of Sweetpotato Whitefly Bemisiatabaci.Mycopathologia.160:35-4*

3- Butt,T.M. Jackson.C.W.*2001.Fungal az biocontrol agents ,Progress,Problems and Potential.CABA insecticide against aphids and scales.Microbial, control of Pest and Plant Diseases .PP.483-498.*

4-Barson,G.1976.*The fungus Verticillium lecanii as a microbial biocontrol agents aphid Rhopalosiphumpadi.J.Appl.Entoml.119:484-490*

5-CAPINERA LC. 2008. Encyclopaedia of entomology, 2nd, Edition. Vol. 1V, Springer Science and Business Media, pp. 1254-1256.

6- Cuthbertson A G S, Blackburn L F, Northing P, Luo W, Cannon R J C, Walters K F A. 2010. *virulence of Lecanicillium isolate. International Journal of Environmental Science and Technology***7:**405−409

7-Fatiha L, Zhen H, Ren SX, Ali S. 2008. Effect of *Lecanicillium muscarium* on biological characteristics and life table of *Serangium japonicum* (Coleopte Coccinellidae), a predator of whiteflies under laboratory conditions. Insect Science. 15: 327-333.

8-Gam,A.Zare,R.2001.*Arevision ofVerticilliumect.prosrata.III.Generic classification. Nova Hedwigia 72:4755*

9- Greathead, D.J., 1995. Benefits and risks of classical biocontrol. In H.M. Hokkanen and J.M. Lynch (eds.) Biological control: benefits and risks. Pp 53-63

10 - Kope,H.H.,Alfaro,R.L.Lavallee,R. 2007.*Effects of temperature and water activity on Lecanicillium spp.conidia germination and growth,and mycosis of pissodes strobe, , pp. 1254-1256*

11Kope,H.H.,Alfaro.R.L.Lavallee,R.2006 .*Virulence of the entomopathogenic fungus Lecanicillium Deuteromycota:Hyphomycetes)to Pissodesstrobi(Coleoptera:Curculionidae).Can.Enomo.138:253-262*

.12-Qui BL, Ren SX, Xiao Y, Mandour NS 2004. Effectiveness of *Eretmocerus* sp and *Aschersonia aleyrodis* in controlling *Bemisia tabaci* population. *Bulletin of Entomological Research*. 14:2251–2254.

12- Thungrabeab M, Tongma S. 2007. Effect of entomopathogenic fungi, Beauveria bassiana (Balsam) and Metarhizuim anisopliae(Metsch) on Bemesia tabaci. KMITL Sci Technol J. 7(S1).

13-Uma Devi K, Padmavathi J, Sharma HC,Seetharama N. 2001. Laboratory evaluation of the virulence of Lecanicillium isolate to the surghum shoot borer Chilo partellus. World Microbiol Biotechnol. 17:131–137.