مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال دوم، شماره اول، بهار ۱۳۹۲ (۸-۱)

بررسی تأثیر عصاره آبی انغوزه و قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم در کنترل بیولوژیکی آفات کلیدی مگس سفید و شته اقاقیا

زهرا زمانی*
دانشگاه پیام نور کرمان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۵، تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۲/۱۱)

چکیده

به منظور ایمنی زیستی و کاهش اثرات سموم شیمیایی برای اولین بار در ایران استفاده از قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم و عصاره آبی انغوزه برای کنترل بیولوژیک تعدادی از آفات کلیدی که سالانه خسارات زیادی به محصولات وارد می‌کنند، صورت گرفت. سویه KB512 قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم از ایزوله‌های بومی استان جدا و شناسایی شد و تست‌های آلوده‌سازی، 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 میلی‌لیتر انجام شد و نمونه کنترل با ۰/۰۱ درصد توین۸۰ در آب مقطر، اسپری شد. بعد از اسپری کردن پلیت‌ها در انکوباتور با دما ۱±۲۵ درجه سانتی گراد و ۸۰ درصد رطوبت نسبی RH قرار داده شدند. حشرات تست شده هر روز برای ردیابی رشد قارچ بروی آنها بررسی می‌شوند بعد از ۹ و ۷ و ۵ روز، درصد مرگ ومیر با غلظت ۱×۱۰^{۸} گزارش شد . نتایج نشان دادند که کنترل بیولوژیکی آفات هدف به خوبی صورت گرفت.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، مگس سفید، شته اقاقیا، عصاره آبی انغوزه، قارچ بیماریزا حشرات

The Effect of the Enthomopathogenic Fungi *Lecanicillium muscarium* and *Ferula assafoetida* extract as Biological Control of Aphis Fabae and Bemisia Tabaci

Z. Zamani*
Payame Noor University, Kerman
(Received: May. 25, 2012; Accepted: Mar. 1, 2013)

Abstract

For environmental safety and reduce the effect of pesticide, for first time 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 sprayed by 0/01٪tween 80 in distilled water after spraying the pest. Plats were placed in the incubator with temperature of 25±1°C 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 effectively and strongly.

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

*نویسنده مسئول: زهرا زمانی E-mail: Zahra.zamani86@gmail.com

مقدمه

استفاده بی‌رویه و ناآگاهانه از آفتکش‌ها با اصول اکولوژیکی مغایرت داشته و می‌تواند منشاء مشکلات عدیده‌ای از قبیل ایجاد نژادهای مقاوم آفات به سموم، شیوع آفات درجه دوم، اثرات نامطلوب روی موجودات غیرهدف مانند پارازیتوئیدها، باقیمانده سموم در محصولات کشاورزی و مسمومیت مستقیم برای مصرف‌کننده باشد. از طرفی کنترل بیولوژیکی به عنوان برنامه‌ای که برای حفظ محیط زیست سودمند است، مطرح می‌شود. زیرا در این روش باقی مانده سموم شیمیایی که اثرات مضر روی سلامت انسان و سایر موجودات زنده داشته باشد دیده نمی‌شود. یک کنترل بیولوژیکی موفق کنترل وسیع و پایدار آفات را با هزینه بسیار مناسب فراهم می‌کند (Amrine *et al*. 1993). تا کنون ۴۳ ترکیب بیولوژیک در جهان (حشره کش ۶۸ درصد، قارچکش و نماتدکش ۳۰ درصد و علف‌کش ۲ درصد) به ثبت رسیده است (Butt and Jackson, 2001). که در میان ایران سهم کمی در استفاده از آفتکش‌های بیولوژیکی دارد. در این تحقیق به بررسی تأثیر قارچ بیماریزا حشرات لکانیسیلیوم موسکاریوم جدا شده از ایزوله‌های بومی استان در کنترل تعدادی از آفات کلیدی استان کرمان که شامل شته اقاقیا و مگس سفید می‌باشد، پرداخته شد.

لکانیسیلیوم موسکاریوم یکی از قارچ‌های بیماریزا حشرات یا انتوموپاتوژن است که در همه جا موجود می‌باشد و می‌توان آنرا به طور گسترده از حشرات مختلف و از خاک جدا کرد (Barson, 1976). گونه‌های مختلف این جنس دارای توان بالای اسپورزایی و بیماریزایی در دامنه گسترده رطوبت نسبی و دامنه حرارتی وسیع ۳۶-۲ درجه سانتی‌گراد هستند به‌طوری‌که Kope *et al*. (2007) گزارش می‌نماید که گونه‌های 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 گونه‌های این جنس در دامنه ۹۸/۵-۵۳ درصد رطوبت نسبی بیماریزا می‌باشند. با توجه به نیمه عمر کنیدی‌های این جنس، که در آب مقطر استریل و ۲ درجه سانتی‌گراد در محدوده ۱۶۰-۱۱۰ روز می‌باشد و در دما ۱۷- درجه سانتی‌گراد ۱۲۰-۶۰ روز است، گونه‌های این جنس را از مهمترین پاتوژن‌های حشرات یا قارچ‌های انتوموپاتوژن می‌شناسند و از دیر باز بیماریزایی آنها بر روی گونه‌های مختلف حشرات نیز گزارش شده است (Cuthbertson *et al*., 2010). در سال‌های ۱۹۴۱-۱۹۱۰ گزارش‌هایی از این گونه‌ها روی شته‌ها، شپشک‌ها، تریپس‌ها و مگس سفید عنوان شده است و از کنترل شته‌ها و شپشک‌ها به میزان ۱۰۰ درصد خبر داده‌اند (CAPINERA, 2008). تست‌های آلوده‌سازی، با اسپری مستقیم حشره با استفاده از تلقیح 1×10^{8} کنیدی بر میلی‌لیتر انجام شد و کنترل با ۰/۰۱ توین ۸۰ 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، ۷، ۵ روز درصد مرگ‌ومیر با غلظت 1×10^{8} به ترتیب ۳۶٪ - ۲۵٪ - ۱۷/۲۶٪ برای شته اقاقیا و ۴۰/۶۶٪- درصد ۲۸/۷۹-۲۴ درصد برای مگس سفید بود همچنین در این تحقیق از عصاره آبی آنغوز تهیه شده برای اولین بار بر روی این آفات تست شد که در مورد شته اقاقیا ۴۰/۹۶٪ - ۲۷/۰۶٪ - ۱۸/۶۲درصد و برای مگس سفید ۳۸/۹٪ - ۳۵/۶۸٪ - ۳۲/۰۲ درصد بود. این عصاره علاوه بر آفتکش بودن به علت بوی خاصی که دارد به‌عنوان دافع خوبی برای حشرات مضر دیگر نیز می‌باشد که به حفاظت محصولات ما کمک می‌کند.

در اینجا به بررسی تعدادی از عوامل مؤثر در بازیافت بهینه و تولید انبوه قارچ و مروری بر تأثیرات جانبی و ایمنی آن می‌پردازیم. همچنین پیشنهاداتی در جهت تولید انبوه با مقیاس صنعتی و تولید تجاری آن ارائه شده است.

مواد و روش‌ها

روش‌های تهیه سوسپانسیون قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم

تک اسپور کردن ایزوله های قارچ

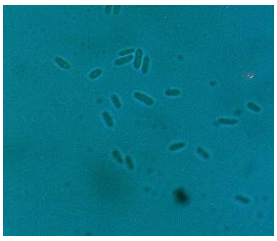
لاروهای منتقل شده به آزمایشگاه و نگهداری شده در دمای ۲۰درجه سانتی‌گراد پس از ظهور بار قارچی و بررسی نمونه‌های حاوی بار قارچی توسط استریو میکروسکپ، با استفاده از سوزن‌های کشت استریل و یک قطره آب مقطر استریل، سوزن را به کنیدیوفورها نزدیک کرده و کنیدی‌ها توسط قطره آب به محیط کشت سلکتیو مدیا لکانیسیلیوم یا (LSM) (Kope *et al*. 2007) منتقل شد و در سطح محیط پخش گردید. پس از نگهداری محیط کشت در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد با بررسی میکروسکپی، تک کنیدی‌های جوانه زده به محیط کشت سابرو دکستروز اگار یا (SDA) منتقل شد و پس از انکوباسیون در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه 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 به دست آمده سفید، پنبه‌ای و سطح زیرین آن کرم‌رنگ تا زرد کمرنگ بود. فیالیدها مستقیما روی ریسه‌ها یا انشعابات ثانویه آنها تشکیل می‌شد. اندازه فیالیدها به‌طور متوسط ۱/۵-۱/۳×۳۶-۲۰ میکرومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۱). کنیدی‌ها در انتهای فیالیدها و در سرهای دروغین تشکیل می‌شد و اندازه آنها ۱/۷-۱/۲×۶/۴-۴ میکرومتر تعیین گردید.

شکل ۱. فیالید قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم بر روی محیط SDA

درجه حرارت بهینه ۲۷-۲۱ درجه سانتی‌گراد ونگهداری در تاریکی در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ روز امکان‌پذیر است (Qui *et al*., 2004). با اضافه نمودن ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به پتری‌دیش‌های کشت داده شده و پخش آن در سطح پتری و به هم زدن سطح پرگنه قارچ توسط میله شیشه‌ای در شرایط استریل و با استفاده از محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ درصد و تنظیم رقت کنیدی سوسپانسیون (با استفاده از هموسیتومتر) 1×10^{7} کنیدی در میلی‌لیتر تهیه گردید.جهت اطمینان از زنده بودن و قدرت جوانه‌زنی کنیدی‌ها ۰/۵ میلی‌متر از سوسپانسیون تهیه شده بر روی محیط کشت SDA پخش شد و مجدداً جوانه زدن کنیدی‌ها با میکروسکپ بررسی گردید (شکل ۲).



شکل ۲. کنیدی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم بر روی محیط SDA

به منظور اثبات بیماریزایی پس از تهیه سوسپانسیون اسپور، لاروهای شته و مگس سفید را به مدت ۱۰ ثانیه در سوسپانسیون اسپور تهیه شده غوطه‌ور 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 ۳۰ درصد H_2O_2 به مدت 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.

تأثیر سوسپانسیون کنیدی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم بر روی آفت مگس سفید

به طریق لیف کیج: گلدان‌های ختمی ژاپنی را به قفسه‌های 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 پتری‌دیش پلاستیکی ۹ سانتی‌متری که جهت تعبیه هوا بروی درب آن محفظه‌ای دایره‌ای شکل به ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر در آوردیم و به جای آن توری مشبک با سوراخ‌هایی به سایز ۸۰ میکرومتر از جنس نایلون پوشانده و بوسیله چسب سیلیکونی مهر و موم گردید. (حتماً باید چند روز از تهیه پتری‌دیش‌های بگذرد و بعد آزادسازی حشره انجام شود تا بوی چسب باعث کشتن حشره نگردد).

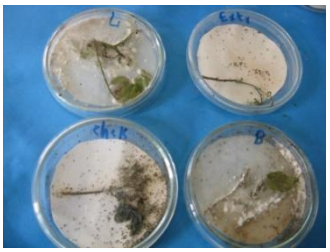
جمعیتی مگس سفید از مرکز تحقیقات گیاه پزشکی کرمان گرفته شد و بر اساس مشخصات تاکسونومیکی نوع گونه شناسایی و مورد تائید قرار گرفت که بمیزیا تاباسی بود، جمعیت مگس سفید پرورش داده شد و ۲۰ عدد از آنها را که از عدم آلودگی اطمینان حاصل شده را با اسپیلاتور بر روی برگ ختمی در شرایط آزمایشگاهی (دما ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی) رهاسازی کردیم (Thungrabeab and Tongma, 2007). سپس هر برگ حاوی پلیت با سوسپانسیون‌های تهیه شده از کنیدی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم به طوری که ذکر شد، اسپری و نتایج بعد از ۵-۷-۹ روز بررسی شدند.

به روش بیواسی: در کف هرپتری برای حفظ رطوبت ۱ میلی‌لیتر از محلول گلیسرین و آب مقطر استریل با نسبت ۵۰:۵۰ با پیپت پاستور افزوده و روی آن کاغذ صافی استریل شده در اتوکلاو (برای حفظ رطوبت) قرار داده شد،سپس دو برگ ختمی به‌عنوان منبع تغذیه به پلیت‌ها افزوده، پس از آنکه پلیت‌های به صورت ذکر شده تهیه شدند،۲۰ عدد مگس سفید

با اسپیلاتور از روی برگ ختمی جداسازی کرده و در شرایط آزمایشگاهی دما ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی در پلیت‌ها رهاسازی کردیم، هر کدام از پلیت‌ها را با سوسپانسیون‌های تهیه شده از کنیدی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم به‌طوری‌که ذکر شد، اسپری شدند. در همه تست‌ها دو پتری به‌عنوان شاهد قرار داده شد که فقط آب مقطر استریل حاوی ۰/۱ توین ۸۰ درصد پاشیده شد و نتایج بعد از ۵–۷–۹ روز بررسی شدند.

تأثیر سوسپانسیون کنیدی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم بر روی آفت شته اقاقیا

برگ درختان اقاقیا آلوده به شته افیس فابا جمع‌آوری شده از سطح شهر را به آزمایشگاه آورده، با قلم‌موی ۰۰ از سطح پشت برگ اقاقیا جدا کرده وبه پتری‌دیش‌های ۹ سانتی‌متری که کف آنها کاغذ صافی قرار داده شده، منتقل می‌کنیم. 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 ۵–۷–۹ روز بررسی شدند (شکل۳).



شکل ۳. تست‌های اولیه بیواسی و بیماریزایی در شته اقاقیا

تهیه عصاره آبی انغوزه

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 میلی‌گرم آب کردیم. در مراحل اولیه ساخت محلول با افزودن گرم‌های مختلفی از صمغ انغوزه به ۱۰ میلی‌گرم آب متوجه شدیم که صمغ انغوزه به راحتی در آب حل نمی‌شود و همواره مقداری نا خالصی خواهد داشت و به دلیل اینکه بعد از آب الکل بیشترین حلالیت را دارد تصمیم گرفتیم که از آب و الکل به نسبت یک به یک استفاده کنیم (۵ میلی‌گرم آب و ۵ میلی‌گرم الکل) و با افزودن گرم‌های مختلف از پودر صمغ انغوزه به۱۰ میلی‌گرم مخلوط آب و الکل به نسبت یک به یک (۵ میلی‌گرم آب و ۵ میلی‌گرم الکل) با اندازه‌های ۱/۱۰، ۲/۳، ۲/۵۴ و ... و با افزودن ۰/۱ میلی‌گرم در هر مرحله متوجه شدیم که مقدار ۳/۳۷ گرم پودر در این مقدار حلال (۵ میلی‌گرم آب و ۵ میلی‌گرم الکل) حل می‌شود. لذا از همین محلول برای آزمایشات استفاده کردیم. اسپری عصاره آبی انغوزه بر روی آفات مورد نظر صورت گرفت و نتایج پس از بررسی در روزهای ۹، ۷، ۵ گزارش شد.

ارزیابی توانایی بقا اسپور

اسپور تهیه شده را در لوله‌های سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه ریخته و دو مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده و با افزودن آب مقطر، غلظت $۱۰^{۵}$ کنیدی بر میلی‌لیتر 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 ۱۰۰ میکرولیتر در محیط YPG آگار با پایه ضعیف تخمین زده می‌شود که نتایج مورد بررسی قرار گرفتند (Gam and Zare, 2001).

ارزیابی بقای کنیدی

برای ارزیابی بقا کنیدی از محلول استوک که شامل ۰/۳ درصد یدید پروپیدیوم و آب مقطر استریل (نسبت وزن/ حجم) بود، می‌توان استفاده کرد اما برای استفاده سریع، از محلول استوک شامل ۱/۲ درصد یدید پروپیدیوم حل شده در آب مقطر استریل به کار برده شد (Uma *et al*., 2001). کنیدی‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۱ درصد مولار با (PH=7) حاوی ۰/۰۱ توین ۸۰ درصد حل شدند تا غلظت کنیدی معلق (شمارش با لام نئوبار) به $۱۰^{۷}$ کنیدی بر میلی‌لیتر برای هر تست رسید. بعد از مخلوط کردن کامل ۷ میکرولیتر از کنیدی معلق با حجم یکسان از استوک یدیدپروپیدیوم، روی لام قرار داده شد و یک لامل روی آن گذاشته شد. کنیدی‌ها با رنگ یدید پروپیدیوم 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 ۴۰۰X دیده شد. حداقل ۱۰۰۰ کنیدی در ۴ مربع انتخاب شده مشاهده شد، کنیدی‌ها با درخشش فلورسنتی قرمز، غیرزنده هستند وآنهایی که تیره رنگ با هاله قرمز هستند، زنده می‌باشند. درصد زنده ماندن، با تقسیم تعداد کنیدی زنده بر تعداد همه کنیدی‌ها ضرب در ۱۰۰ محاسبه می‌شود. 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 شمارش‌گر تائید کرد. با میکروسکوپ فلورسنتی می‌توان به سرعت و دقیق درصد کنیدی‌های زنده را محاسبه

کرد. تقریباً ۲۰ دقیقه برای هر ایزوله زمان نیاز است، در صورتی که در روش صفحه شمارش‌گر چندین روز برای جداسازی کنیدی‌های زنده زمان لازم است و به علت آسیبی که به غشا سلول وارد می‌شود، کنیدی‌ها متورم دیده می‌شوند و سلول‌های غیر زنده مشابه سلول‌های زنده به نظر می‌آیند. عصاره ۵ ایزوله از کنیدی‌های قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم بر این آفات کلیدی اسپری شد. بدینوسیله به طور غیرمستقیم در مجاورت کنیدی‌ها قرار داده شدند و بقای آنها بعد از ۵ روز بررسی شد. برای بررسی وجود قارچ، حشره مرده را روی محیط جامد تیمار شده با ۵۵ درصد دودیم و ۰/۰۰۰۵ تتراسیکلین دردمای ۲±۳۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا زمانی که قارچ از داخل بدن حشره خارج شود که تائیدی بر بیماریزایی می‌باشد.

اتصالات لکتینی

۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^8 اسپور بر میلی‌لیتر روی لام قرار داده و ۵ دقیقه بر روی 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 ۱ میلی‌لیتر آب مقطر شسته شدند. اسپورهای چسبیده با آب مقطر برای ۳۰ ثانیه آبکشی شدند. و با ۴۰ میلی‌لیتر محلول لکتین (۲۰۰ میکروگرم پروتئین/ میلی‌لیتر نمک) برای ۳ دقیقه تیمار شدند.

نتایج

یکی از آفات مهم استان که در فارسی مگس سفید یا عسلک است که در دنیا از روی ۵۰۷ میزبان گیاهی که به ۷۴ خانواده تعلق دارند گزارش گردیده است. بیشترین تعداد میزبان‌ها به ترتیب در خانوادهٔ Leguminoseae، Compositae، Malvaceae، Solanaceae، Euphorbiaceae قرار دارد. در بین گیاهان زراعی، پنبه، گوجه‌فرنگی، کنجد، کنف، آفتابگردان اهمیت بیشتری دارد در اکثر نقاط کشور انتشار دارد و مخصوصاً در گلخانه‌ها درپشت برگ‌های عده زیادی از گیاهان زینتی مانند گل کاغذی، شاه‌پسند و بعضی گیاهان زراعی 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 ۴۰/۶۶ 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 می‌کنند، علاوه بر تغذیه از شیره گیاهی در انتقال بیماری‌های ویروسی نقش مهمی ایفا می‌کنند. عده‌ای از شته‌ها باعث پیچیدگی برگ و یا تغییر شکل شاخه‌ها گردیده و برخی بر روی قسمت‌های گیاهان میزبان تشکیل گالهای گوناگونی را می‌دهند. ما در این تحقیق استفاده از قارچ‌های انتوموپاتوژن لکانیسیلیوم موسکاریوم را که ایزوله بومی و سازگار با شرایط محیطی است و در همه‌جا موجود می‌باشد و می‌توان آن را به‌طور گسترده از حشرات مختلف و از خاک جدا کرد، را به‌عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک بررسی می‌کنیم. چون علاوه بر مصون ماندن خاک و آب از استفاده سموم، از مزایای این قارچ دوام و تکثیر آن در خاک است. نخستین گزارش از جداسازی قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم از لارو زنبور ساقه‌خوار گل محمدی و جدا سازی این قارچ از لارو سوسک چوبخوار گل محمدی از ایران می‌باشد. بر اساس نتایج و مقایسات آماری بین درصد تلفات حاصل از اسپری سوسپانسیون اسپور لکانیسیلیوم موسکاریوم روی شته اقاقیا در روزهای پنجم و هفتم و نهم پس از اسپور پاشی بر اساس آزمون ($P<$ ۰/۰۱؛ x2) تفاوت معنی‌داری در سطح ۹۹ درصد دیده شد. بین زمان‌های پنجم و هفتم روز تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، اما از نظر مشاهده‌ای میزان درصد تلفات روز هفتم با میانگین تلفات (۲۵ درصد) ۱۵عدد لارو بالاتر از روز پنجم (۱۷/۲۶ درصد) ۱۰ لارو بود، اما درصد تلفات روز نهم اختلاف معنی‌داری در حد ۹۹ درصد با روزهای پنجم و هفتم داشته ومیانگین درصد تلفات (۳۶ درصد) ۲۱ عدد لارو به دست آمد. بر اساس نتایج و مقایسات آماری بین درصد تلفات حاصل از اسپری سوسپانسیون آبی انغوزه در تیمارهای زمانی پنجم – هفتم – نهم اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۹ درصد و بیشترین تلفات در تیمار روز نهم با میانگین تلفات (۴۰/۹۶ درصد) ۱۲ عدد لارو دیده شد.

در تیمار روز هفتم مشخص شد که درصد تلفات تیمار با با میانگین (۲۷/۰۶ درصد) و در تیمار روز پنجم مشخص شد که درصد تلفات تیمار با سوسپانسیون اسپور ۱۸/۶۲ درصد را نشان می‌دهد.

در تیمار مگس سفید با لکانیسیلیوم موسکاریوم در روزهای مختلف تیمار روزهای پنجم، هفتم، نهم اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۹ درصد وجود دارد. بین زمان‌های روز پنجم و هفتم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. اما از نظر مشاهده‌ای تیمار روزهفتم با میانگین تلفات (۲۸/۷۹ درصد) ۹ عدد لارو بیشتر است. اما بین تیمار روزهای هفتم و پنجم اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. در تیمار روز نهم با میانگین تلفات (۴۰/۶۶ درصد) ۱۲ عدد لارو بیشتر است. از نظر مشاهده‌ای بین روزهای پنجم و نهم در سطح ۹۹ درصد

اختلاف معنی‌داری وجود دارد که در روز نهم بیشتر است. در تیمار پنجم روزه مگس سفید بالکانیسیلیوم موسکاریوم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. ولی از نظر مشاهده‌ای 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 قرار دارد. در تیمار روز نهم لکانیسیلیوم موسکاریوم از نظر مشاهده‌ای میانگین درصد تلفات در تیمار با سوسپانسیون اسپور لکانیسیلیوم موسکاریوم با (۴۰/۶۶ درصد) ۱۲ عدد لارو قرار دارد. در تیمار سوسپانسیون آبی انغوزه در روزهای مختلف تیمار پنجم، هفتم، نهم اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۹ درصد وجود دارد. از نظر مشاهده‌ای تیمار ۷ روزه با میانگین تلفات (۳۵/۶۸ درصد) ۱۱ عدد لارو بیشتر است. بین تیمار زمان‌های روز پنجم و هفتم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در تیمار نه روزه با میانگین درصد تلفات ۳۸/۰ درصد بیشتر است. از نظر مشاهده‌ای بین تیمار زمانی پنجم و نهم روزه در سطح ۹۹ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد که در روز نهم بیشتر است.

در تیمار پنج روزه با لکانیسیلیوم موسکاریوم و سوسپانسیون آبی انغوزه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. ولی از نظر مشاهده‌ای میانگین درصد تلفات در تیمار با سوسپانسیون آبی 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 آبی انغوزه تفاوت معنی‌داری و جود ندارد. ولی از نظر مشاهده‌ای میانگین درصد تلفات در تیمار با سوسپانسیون آبی 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 و سوسپانسیون آبی انغوزه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. ولی از نظر مشاهده‌ای میانگین درصد تلفات در تیمار با سوسپانسیون اسپور لکانیسیلیوم موسکاریوم با (۴۰/۶۶ درصد) ۱۲ عدد لارو بیشتر از میانگین درصد تلفات در تیمار با سوسپانسیون آبی انغوزه با (۳۸/۹۰ درصد) ۱۱ عدد لارو قرار دارد.

جدول ۱. بررسی میزان تأثیر سوسپانسیون بر مگس سفید توسط روش آماری one-way ANOVA و بررسی سطح معنی‌داری (LSD Test, P< 0.05)

	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	00± 4.26 . 60

نتایج نشانگر تأثیر بالا قارچ و عصاره انغوزه بر روی آفات هدف است.

بحث

در طی دو سال بررسی تعداد ۱۸۴ جدایه از قارچ‌های مختلف شناسایی گردید که ۲۲/۲۸ درصد از این جدایه‌ها متعلق به قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم جدا شده از زنبور *H. cf trimaculata*، ۱۵/۲۱ درصد از این جدایه‌ها متعلق به قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم جدا شده از سوسک *A. cf aurichalerus* است. ۱۴/۶۷ درصد از این جدایه‌ها متعلق به قارچ اکرومونیوم کیلنس جدا شده از زنبور *H. cf trimaculata* است. ۱۰/۳۲ درصد از این جدایه‌ها متعلق به قارچ اکرومونیوم اجیپتیکام جدا شده از سوسک *A. cf aurichalerus* است. ۲۰/۶۵ درصد از این جدایه‌ها متعلق به گونه‌های قارچ کلادوسپوریوم جدا شده از زنبور *Hftrimaculata* است. ۹/۲۳ درصد از این جدایه‌ها متعلق به گونه‌های قارچ کلادوسپوریوم جدا شده از سوسک *A. cf aurichalerus* است و۷/۶۰درصد از این جدایه‌ها متعلق به قارچ *Alternaria* sp. جدا شده از سوسک *A. cf aurichalerus* می‌باشد. در مجموع جدایه‌های قارچ لکانیسیلیوم موسکاریوم با فراوانی ۳۷/۵ درصد بیشترین تکرار را در این مطالعات داشته است (Fatiha *et al*., 2008). Kope *et al*. (2006) بیماریزایی گونه‌های این جنس را بر روی کنه‌ها گزارش می‌نمایند و گونه‌های مختلف جنس لکانیسیلیوم را به‌عنوان کنترل‌کننده بیولوژیک سوسک‌ها گزارش می‌نماید. و Andrew *et al*. (2005) گونه لکانیسیلیوم موسکاریوم را از روی *Pissodes strobi* گزارش می‌نماید و برای کنترل مگس سفید به کار برده است.

به همین علت ما نیز از این سویه استفاده کردیم که نتایج بسیار خوبی را هم علیه این آفات مهم و کلیدی که سالانه خسارات بسیاری به محصولات در استان وارد می‌کند به دست آوردیم. ما توانستیم درصد تلفات روز نهم را که با اختلاف معنی‌داری در حد ۹۹ درصد با روزهای پنجم و هفتم داشته و با میانگین درصد تلفات (۳۶درصد) ۲۱ عدد لارو را گزارش کنیم. تحقیقات توسط Greathead (1996) نشان داد که علی‌رغم دامنه گسترده میزبانی لکانیسیلیوم موسکاریوم کمترین اثر را بروی اورگانیسم‌های غیرهدف دارد. تحقیقات انجام شده بروی کشتزارها نشان می‌دهد هیچ نشانه‌ای از تأثیرات منفی بر مهره‌داران، 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 بی‌خطر بودن آن را برای موجودات غیرهدف گزارش کردیم. برای تهیه فورمولاسیون یک قارچ بیماریزای حشرات در نظر گرفتن مواردی است که قارچ بیماریزای حشرات را در حالت بهینه قرار می‌دهند، که یکی از آنها زمان مورد نیاز برای قرار گرفتن اجزا قارچ بروی حشره و تکنیک کاربرد آنهاست. تعیین زمان مورد نیاز برای کنترل آفت باتوجه به تعداد روزی که حشره آفت باید در معرض قارچ قرار بگیرید و با توجه به در نظر گرفتن سایر عوامل مؤثر نظیر باد، باران و نور خورشید در نظر گرفته می‌شود. نکته مهمی که باید توجه شود، بخصوص اگر قارچ بیماریزای حشرات درطی فصول مرطوب به کار برده شوند ضروری است که یک ماده سورفکتانت به آن اضافه شود تا در اثر باران شسته نشود (Butt and Jackson, 2001). ما نیز با بررسی ارزیابی بقای کنیدی و ارزیابی توانایی بقا اسپور و اتصالات لکتینی در این تحقیق به دنبال ارزیابی پارامترهای تکاملی و بیماریزایی در روند تولید برای تهیه فرمولاسیون با ارزیابی توانایی بقا اسپور پرداختیم که باید ۵ معیار مهم در تهیه سویه‌ای 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 گلخانه‌ای که مصرف سم مشکلاتی برای سلامت انسان‌ها ایجاد می‌کند، از این قارچ در IPM به همراه سموم بی‌خطر استفاده شود و با توجه به مزایا و کارایی بالا این قارچ امید است که در آینده گامی بسوی استفاده بیشتر از محصولات بیولوژیک و تولید انبوه آن برداریم.

سپاسگزاری

از استاد راهنما جناب آقای دکتر خانیکی و مشاور محترم جناب آقای مهندس امینایی که در زمینه این تحقیق ما را از راهنمایی‌هایشان بهره‌مند کردند و مرکز تحقیقات کشاورزی کرمان و دانشگاه پیام نور واحد کرج که در پیشبرد این هدف نهایت همکاری و مساعدت را داشته‌اند، قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

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

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

Butt TM, Jackson CW (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.

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

CAPINERA LC (2008) Encyclopaedia of entomology, 2ndEdition. Vol. 1V, Springer Science and Business Media, pp. 1254-1256.

Cuthbertson AGS, Blackburn LF, Northing P, Luo W, Cannon RJC, Walters KFA (2010) Virulence of Lecanicillium isolate. International Journal of Environmental Science and Technology, **7**: 405−409.

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.

Gam A, Zare R (2001) Arevision of Verticilliumect. prosrata. III. Generic classification. Nova Hedwigia. 72: 4755.

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

Kope HH, Alfaro RL, Lavallee R (2007) Effects of temperature and water activity on *Lecanicillium* spp. conidia germination and growth, and mycosis of pissodes strobe, pp. 1254-1256.

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

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.

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).

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.