زهراگینی چهار جدایه از قارچ *Beauveria bassiana* روی جمعیّت‌های تابستان‌گذران و زمستان‌گذران سن گندم، *Eurygaster integriceps*

زینب قمری زارع [۱]، حسن عسکری [۲]، حبیب عباسی پور [۱]، عزیز شیخی گرجان [۲]، آیت الله سعیدی زاده [۱]

۱- دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شاهد، تهران

۲- موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

مسئول مکاتبات: حسن عسکری، پست الکترونیکی: askary2@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۵/۱۶ ۲(۱)۳۱-۴۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۴/۰۹

چکیده

در این تحقیق زهراگینی چهار جدایه‌ی ایرانی *Beauveria bassiana* روی نمونه‌های تابستان‌گذران و زمستان‌گذران حشرات کامل سن گندم به‌روش زیست سنجی از طریق اسپری کردن غلظت‌های مختلف و نمونه‌برداری در طول زمان، مورد بررسی قرار گرفت. سن‌های کامل زمستان‌گذران حساسیّت بیشتری را نسبت به‌سن‌های کامل تابستان‌گذران نشان دادند (F= 69.99; df= 31, 1; P-value= 0.0001). مقادیر LC_{50} برای جدایه‌ی فشند در مرحله‌ی تابستان‌گذران و مرحله‌ی زمستان‌گذران به‌ترتیب ۱×۱۰^{۸} و ۲×۱۰^{۵} اسپور بر میلی‌لیتر محاسبه شد. مقدار LC_{50} برای جدایه‌ی Spt-566 روی سن‌های زمستان‌گذران، ۳×۱۰^{۷} اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد. زمان لازم برای ایجاد مرگ و میر ۵۰ درصد سن‌ها (LT_{50}) برای جدایه‌ی فشند با $۱۰^{۹}$ اسپور در میلی‌لیتر در دو مرحله‌ی رشدی سن تابستان‌گذران و زمستان‌گذران به‌ترتیب ۱۳ و ۷ روز و برای جدایه‌ی Spt-566 در مرحله‌ی زمستان‌گذران ۱۹ روز محاسبه گردید. جدایه‌ی فشند با کمترین زمان لازم جهت مرگ و میر سن‌ها و پایین‌ترین LC_{50} به‌عنوان جدایه‌ی زهراگین مؤثر روی سن گندم تعیین شد. همچنین افزودن روغن به سوسپانسیون قارچ باعث افزایش شدت بیمارگری قارچ روی دو جمعیت سن گندم در همه‌ی جدایه‌ها شد.

واژه‌های کلیدی: زیست‌سنجی، *Beauveria bassiana*، سن گندم، مکان زمستان‌گذرانی، *Eurygaster integriceps*

مقدمه

سن گندم (*Eurygaster integriceps* Put. (Hem.: Scutelleridae) آفت جدّی گندم و جو در ایران و برخی کشورها می‌باشد (Anonymous, 1997). خسارت این حشره سبب کاهش کیفی و کمی محصول گندم می‌شود (Rajabi, 2000). معمولاً عملیات کنترل سن گندم در مزارع و با سن مادری انجام می‌گردد (Rajabi, 2000). مصرف گسترده‌ی آفت‌کش‌های شیمیایی برای کنترل این آفت، علاوه بر کاهش جمعیت دشمنان طبیعی و آلودگی‌های محیط زیست، باعث کاهش حساسیت حشره‌ی آفت در مقابل حشره‌کش‌ها نیز می‌شود. عوامل میکروبی به‌ویژه قارچ‌های بیماری‌زای حشرات به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل تنظیم کننده‌ی جمعیت سن گندم به‌حساب می‌آیند. در برنامه‌ی کنترل بیولوژیک آفات، گونه‌ها و جدایه‌هایی از این قارچ‌ها وجود دارند که در دو دهه‌ی اخیر نتایج موفقیت‌آمیزی در زمینه‌ی کاربرد آن‌ها کسب شده است. یکی از این عوامل، قارچ *Beauveria bassiana* می‌باشد که به‌دلیل سهولت تولید انبوه و عملکرد خوب روی میزبان از اهمیّت خاصّی برخوردار می‌باشد (Burges, 1998).

در میان قارچ‌های بیمارگر حشرات، قارچ *B. bassiana*، وسیع‌ترین و متنوع‌ترین طیف میزبانی حشرات را داراست (Inglis *et al.*, 2001). این گونه برای کاهش جمعیّت آفات مکنده‌ی زیادی در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه به‌کار گرفته شده است و فن‌آوری تولید انبوه و فرموله کردن آن به‌سرعت در حال پیشرفت است (Wraight *et al.*, 2001; Feng *et al*, 1994). یکی از محدودیت‌های استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات در کنترل بیولوژیک، تأثیر کم آن‌ها در شرایط طبیعی به‌دلیل رطوبت نسبی پایین محیط

می‌باشد. نتایج نشان داده است که افزودن مواد روغنی به سوسپانسیون اسپورهای قارچ، کارآیی آن‌ها را برای بیمار کردن حشره‌ی میزبان در شرایط رطوبت نسبی پایین افزایش می‌دهد (Burges, 1998).

طلایی حسنلویی بیماری‌زایی چهار جدایه از قارچ *B. bassiana* را با استفاده از دو روش زیست‌سنجی غوطه‌وری و پاششی روی حشره‌ی کامل سن گندم بررسی کرد (Talaei-Hassanloui, 1999). حاجی‌اللهوردی‌پور و همکاران زهرآگینی چهار جدایه را روی پوره‌های سن پنجم سن گندم به‌روش زیست‌سنجی غوطه‌وری آزمایش نمود و مؤثرترین جدایه را روی حشرات کامل معرفی کرد (Haji Allahverdi pour *et al.*, 2008). رستگار (۱۳۸۵) زهرآگینی جدایه‌های مختلف را به‌روش زیست‌سنجی غوطه‌وری روی حشرات کامل سن گندم مورد بررسی قرار داد (Rastegar, 2007). عبداللهی و همکاران بیمارگری ۱۱ جدایه از قارچ *B. bassiana* را روی سن زمستان‌گذران مورد بررسی قرار دادند. در مطالعات انجام شده جدایه‌ی SPSH-1 پس از گذشت ۱۲ روز با میانگین کشندگی ۱۰۰٪ مؤثرترین جدایه شناخته شد (Abdulhi *et al.*, 2010).

میزان رشد کلنی و تولید اسپور چند جدایه‌ی قارچ *B. bassiana* و همچنین بیمارگری آن‌ها روی سن گندم مورد مطالعه قرارگرفت. در این آزمایشات جدایه‌های spt 22 و Ir-k-40 با میانگین مرگ و میر ۹۴/۴-۹۱/۷ درصد بیشترین تلفات را در سن گندم ایجادکرد (Moore *et al.*, 2004). ایشان یکی از راهبردهای کنترل سن گندم را استفاده از قارچ‌ها به‌ویژه *B. bassiana* به‌عنوان آفت‌کش میکروبی برای حشرات کامل در مکان زمستان‌گذران می‌داند (Moore & Edgington, 2006). امّا به‌نظر می‌رسد سن‌های کامل در شرایط فیزیولوژیکی مختلفی به‌سر می‌برند که عکس‌العمل متفاوتی در مقابل قارچ ایجاد می‌نمایند. بنابراین مهمترین هدف این تحقیق، بررسی حساسیت حشرات کامل سن گندم که در حال دیاپوز می‌باشند، در مقابل قارچ *B. bassiana* می‌باشد. به‌همین دلیل زهرآگینی این قارچ روی نمونه‌های تابستان‌گذران و زمستان‌گذران سن گندم و همچنین تأثیر مواد افزودنی در افزایش بیمارگری قارچ بررسی شده است تا با شناخت ابعاد مربوط به‌حساسیت‌های مراحل رشدی و نحوه‌ی استفاده از مواد افزودنی، امکان کاربرد آن در شرایط طبیعی مهیا شود.

روش تحقیق

الف- کشت قارچ و تهیه‌ی غلظت‌ها

چهار جدایه از قارچ *B. bassiana* در آزمایشات زیست‌سنجی حشرات کامل تابستان‌گذران و زمستان‌گذران با یکدیگر مقایسه شدند. قارچ‌ها از کلکسیون ملی قارچ‌های زنده‌ی موسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه شد. محل جمع‌آوری و میزبان‌های جدایه‌ها در جدول ۱ معرفی شده است.

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

Table 1- *B. bassiana* isolates used for bioassays on Sunn pest.

Collection Place	Host origin	Place origin	Isolates
IRIPP	Soil	Karaj	Fashand (DEBI001)
IRIPP	Sunn pest	Esfahan	Spt-566
IRIPP	Sunn pest	Kermanshah	Ir-K-40
IRIPP	Sunn pest	Turkey	Spt-22

IRIPP: Iranian Research Institute of Plant Protection

محیط کشت PDA درون تشتک‌های پتری با استفاده از کشت خالص‌شده‌ی جدایه‌های قارچ تلقیح شد. دو هفته پس از نگهداری این کشت در شرایط کنترل شده (دمای ۲۲±۲ درجه‌ی سلسیوس و ۱۶ ساعت روشنایی) اسپورهای تولید شده با آب مقطر استریل حاوی ۰/۴ درصد توئین-۸۰ خراشیده و جمع‌آوری شد. پس از شمارش اسپورها به‌کمک لام گلبول شمار و تهیه غلظت پایه 10^9 اسپور در میلی‌لیتر، سایر غلظت‌ها برمبنای زیست‌سنجی اولیه، به‌میزان 10^8، 10^7، 10^6، 10^5 و 10^4 برای هرجدایه تهیه گردید. زیست‌سنجی اولیه با استفاده از دو غلظت حداقل و حداکثرکه مرگ و میری معادل ۲۰-۱۰ درصد و ۹۰-۸۰ درصد به‌ترتیب روی سن‌ها ایجاد نمایند، به‌همراه شاهد، انجام شد.

ب- زیست سنجی

در این آزمایش سوسپانسیون اسپور جدایه‌های قارچ با غلظت‌های 10^4، 10^5، 10^6، 10^7، 10^8 و 10^9 اسپور در میلی‌لیتر از هرجدایه در آب مقطر استریل حاوی ۰/۴ درصد توئین-۸۰ تهیه شد. سن‌های کامل در دو مرحله (اواخر تابستان و در اواخر زمستان) از مکان‌های زمستان‌گذرانی واقع در کوه‌های قره‌آغاج منطقه‌ی حمامک جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. سن‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط مناسب دمایی ۲۳ تا ۲۵ درجه‌ی سلسیوس در ظروف پلکسی‌گلاس تمیز به ابعاد ۴۰×۴۰×۴۰ سانتی‌متر نگهداری شده و پس از حذف تنش‌های محیطی، برای آزمایش انتخاب می‌شدند. سن‌ها داخل قیف چینی مشبک که روی یک بشر قرار داشت، قرارگرفته و سپس با استفاده از یک محلول‌پاش دستی، ۶ میلی‌لیتر از هرغلظت از فاصله‌ی ۱۵ سانتی‌متری روی سن‌ها پاشیده می‌شد. آزمایش با تیمار شاهد آغاز و سایر غلظت‌ها از کم به زیاد روی سن‌ها پاشیده می‌شدند. برای هر جدایه ۶ غلظت با ۴ تکرار و در هرتکرار ۱۰ عدد سن گندم کامل درنظرگرفته شد. شاهد نیز با آب مقطر دارای ۰/۴٪ توئین-۸۰ تیمار گردید. سپس سن‌ها به‌ظروف زیست‌سنجی از جنس پلکسی‌گلاس مستطیلی شکل به‌ابعاد ۱۶×۱۰×۵ سانتی‌متر منتقل شده و برای تغذیه‌ی سن‌ها دانه‌های گندم و پنبه‌ی مرطوب داخل آن قراردادهشد. در ظروف را بسته و به اتاق پرورش با دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰-۶۵ درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شده و مرگ و میر سن‌ها به‌مدت ۲۰ روز ثبت شد. مرگ سن‌ها زمانی محرز می‌شد که پاسخی به تحریکات انجام شده، نمی‌دادند.

درآزمایش دیگر، تأثیر افزودن روغن به سوسپانسیون قارچی و ایجاد بیماری روی سن‌ها بررسی شد. برای این کار از تمام جدایه‌های قارچی و هر دو نمونه‌ی جمعیّت سن گندم استفاده شد. در ابتدا سوسپانسیون قارچ با غلظت 10^9 اسپور بر میلی‌لیتر (مانند قبل) تهیه شد. سپس روغن EC® و ADDIT® به‌نسبت سه در هزار به شیشه مک‌کارتی دارای گلوله‌های پلاستیکی که حاوی سوسپانسیون بود اضافه گردید. سوسپانسیون به‌شدت تکان داده شد تا روغن با اسپورها به‌طور یکنواخت مخلوط شود. سایر مراحل آزمایش مانند آزمایشات زیست سنجی قبل و تحت شرایط رطوبت نسبی محیط ۶۰ درصد انجام شد. در این آزمایش علاوه بر استفاده از مخلوط آب و روغن به‌عنوان شاهد، از سوسپانسیون اسپور بدون روغن و بر اساس میزان مرگ و میر سن‌ها با غلظت 10^9 اسپور بر میلی‌لیتر تا روز بیستم نیز استفاده شد. جهت اثبات مرگ سن‌ها توسط قارچ، ابتدا سطح بدن سن‌های مرده با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۴ درصد و سپس شست‌وشو با آب مقطر استریل و توین-۸۰، ضدعفونی سطحی شده و سپس به درون پتری‌های استریل حاوی پنبه مرطوب منتقل می‌شد. آلودگی سن‌ها با تشکیل پوشش سفید رنگ قارچ روی سطح بدن آن‌ها نشانگر مرگ آن‌ها در اثر قارچ بود. درصد مرگ و میر مشاهده شده در تیمارها براساس شاهد و با استفاده از فرمول Abbott (1925) تصحیح گردید.

نتایج به‌دست آمده از تیمارهای مختلف آزمایش به‌کمک نرم افزار SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه‌ی واریانس شده و سپس میانگین‌ها به‌روش دانکن مقایسه گردید. همچنین برای محاسبه LC_{50} و اثر متقابل جدایه‌ها و مرحله‌ی زیستی سن گندم از نرم افزار SAS استفاده شد. به‌منظور محاسبه‌ی LT_{50} از نرم افزار Curve Expert 1.3 استفاده شد و نمودار LT_{50} با برنامه Excel برای همه‌ی غلظت‌ها رسم گردید.

نتایج

نتایج نشان داد که جدایه‌های قارچ *B. bassiana* روی نمونه‌های سن‌های تابستان‌گذران و زمستان‌گذران بیمارگر بوده و یکی از جدایه‌ها، مرگ و میر نسبتاً بالایی را در جمعیّت تیمارها ایجاد کرد. همچنین افزودن روغن به سوسپانسیون قارچ باعث افزایش زهرآگینی قارچ روی هر دو نمونه‌ی جمعیّتی سن گندم در همه‌ی جدایه‌ها شد. علایم آلودگی پیشرفته با قارچ روی سن‌ها به‌شکل رشد میسلیوم‌های سفید رنگ روی سطح بدن حشره، خشک شدن و تغییر رنگ بدن به قرمز متمایل به قهوه‌ای مشاهده‌شد.

نتایج نشان داد که بیشترین میانگین مرگ و میر ایجاد شده توسط جدایه‌ی فشند در نمونه‌های تابستان‌گذران سن گندم، با غلظت 10^9 اسپور بر میلی‌لیتر به‌میزان ۷/۴۰±۷۳/۵۳ درصد (F= 27.38; df= 27, 6; P-value= 0.0001) و در نمونه‌های زمستان‌گذران ۵/۱۲±۹۴/۸۷ درصد (F= 7.41; df= 23, 5; P-value= 0.0006) بود که تلفات معنی‌داری را نسبت به جدایه‌ها و غلظت‌های دیگر ایجاد نمود. جدایه‌های فشند و Spt-22 در غلظت 10^4 اسپور بر میلی‌لیتر روی نمونه‌های تابستان‌گذران سن گندم مرگ و میری ایجاد نکردند. کمترین درصد مرگ و میر در غلظت 10^4 اسپور بر میلی‌لیتر، برای نمونه‌های زمستان‌گذران متعلق به جدایه‌ی Ir-k-40 با میانگین ۲/۲۱±۳/۸۴ درصد بود (F= 5.34; df= 23, 5; P-value= 0.003).

نتایج کلی به‌دست آمده براساس درصد تلفات ایجاد شده توسط قارچ *B. bassiana* نشان می‌دهد که مرحله‌ی زمستان‌گذران سن گندم نسبت به‌مرحله‌ی تابستان‌گذران حساس‌تر است (F= 69.99; df= 31, 1; P-value= 0.0001). براساس محاسبات انجام شده میزان LC_{50} برای جدایه‌ی فشند علیه جمعیت تابستان‌گذران سن گندم $1/6\times10^8$ اسپور در میلی‌لیتر به‌دست آمد. میزان LC_{50} محاسبه شده برای جدایه‌ی فشند در مرحله‌ی زمستان‌گذران حشره 2×10^5 اسپور در میلی‌لیتر و برای جدایه‌ی Spt-566 در همین مرحله‌ی زندگی حشره، $3/9\times10^7$ اسپور در میلی‌لیتر تعیین گردید (جدول ۲). میانگین مرگ و میر دیگر جدایه‌ها و برای نمونه‌های تابستان‌گذران کمتر از ۵۰٪ بود، در نتیجه LC_{50} برای آن‌ها محاسبه نشد.

محاسبه LT_{50} (مدت زمان لازم برای ایجاد مرگ و میر در ۵۰٪ از جمعیت سن گندم) برای جدایه‌ی فشند در نمونه‌های تابستان‌گذران فقط در غلظت 10^9 اسپور در میلی‌لیتر قابل محاسبه بود. در حالی که برای همین جدایه در نمونه‌های زمستان‌گذران LT_{50} برای غلظت‌های 10^5، 10^6، 10^7، 10^8 و 10^9 اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شده و برای جدایه‌ی Spt-566 نیز در این نمونه‌ها فقط غلظت 10^9 اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد (جدول۳). این نتایج نیز موید آن است که جدایه‌ی فشند نسبت به‌جدایه‌ی spt-566 زهرآگینی بیشتری داشته و در عین حال نمونه‌های سن گندم که در روزهای پایانی زمستان جمع‌آوری شدند، بسیار حساس‌تر از جمعیت سن‌هایی هستند که در تابستان جمع‌آوری و تیمار شده بودند.

مقایسه‌ی LC_{50} بین جدایه‌ها روی دو نمونه از جمعیت تابستان‌گذران و زمستان‌گذران سن گندم به‌روش Overlapping نشان داد که بین جدایه‌ی فشند در نمونه‌های زمستان‌گذران با جدایه‌ی Spt-566 در نمونه‌های زمستان‌گذران و جدایه‌ی فشند در نمونه‌های تابستان‌گذران، اختلاف معنی‌دار وجود دارد (شکل ۴). مقایسه‌ی میانگین تلفات ایجاد شده بین نمونه‌های جمعیت تابستان‌گذران و زمستان‌گذران سن گندم که توسط جدایه‌های قارچ ایجاد شده بود، نشان داد که نمونه‌های زمستان‌گذران با میانگین کلی ۴۳/۷۴ درصد تلفات، حساسیت بیشتری در مقایسه با نمونه‌های تابستان‌گذران با میانگین کلی ۱۹/۷۲ درصد دارند (F= 69.99; df= 31, 1; P-value= 0.0001).

جدول۲- LC_{50} محاسبه شده برای دو جدایه از *B. bassiana* روی حشره‌ی کامل سن گندم.

Table 2- LC_{50} for two *B. bassiana* isolates on Sunn pest adults.

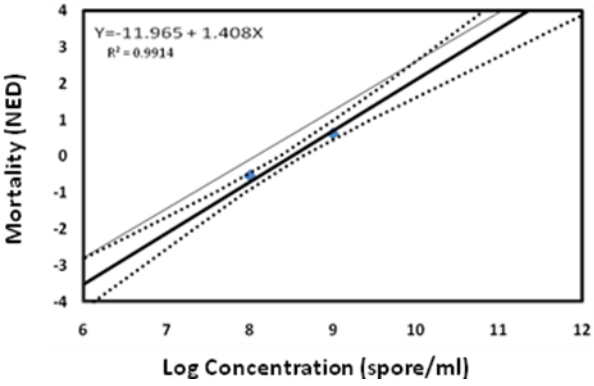
Df	Pr	Chi-square	Slope	(spore/ml) LC_{50} (Lower-Upper)*	Population	Isolates
8	0.90	3.41	1.06±0.35	1.6×10^8 (1.6×10^7-5×10^8)	Aestivating	Fashand
10	0.99	2.04	0.52±0.09	2×10^5 (3.8×10^4-6.6×10^5)	Hibernating	Fashand
10	0.96	3.47	0.37±0.08	3.9×10^7 (8.4×10^6-3.9×10^8)	Hibernating	Spt-566

* Lc50 for other isolates was unable to estimate. * برای سایر جدایه‌ها مقدار LC50 قابل محاسبه نبوده است.

جدول ۳- LT_{50} محاسبه شده برای قارچ *B. bassiana*، جدایه‌های فشند و Spt-566 روی حشره‌ی کامل سن گندم.

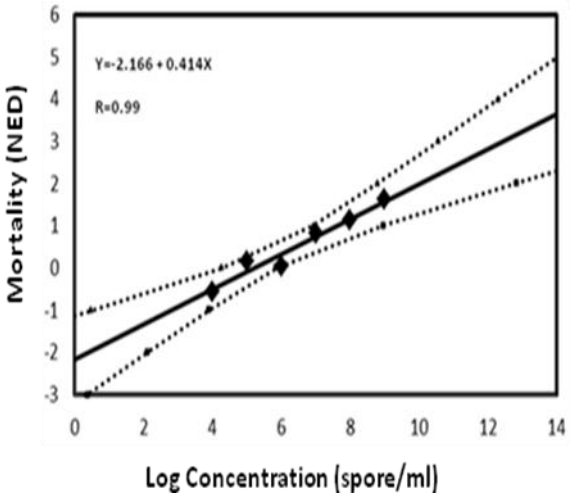
Table 3- LT_{50} for *B. bassiana* isolates (Fashand and Spt-566), on Sunn pest adults.

LT_{50} (Days)	Concentrations (spore/ml)	Population	Isolates
13	10^9	Aestivating	Fashand
7	10^9	Hibernating	Fashand
10	10^8	Hibernating	Fashand
11	10^7	Hibernating	Fashand
19	10^6	Hibernating	Fashand
19	10^9	Hibernating	Spt-566



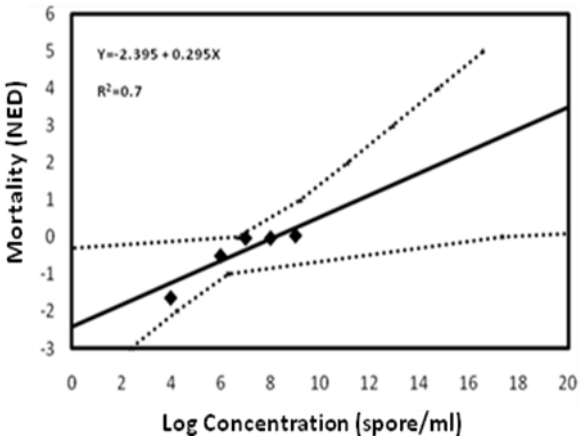
شکل ۱- غلظت-مرگ و میر جدایه‌ی فشند روی نمونه‌های تابستان‌گذران سن گندم.

Fig. 1- Concentration-mortality for *B. bassiana* (isolate Fashand) on aestivating population of Sunn pest.



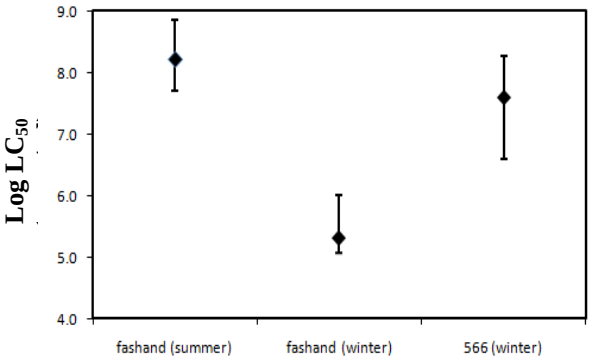
شکل ۲- غلظت-مرگ و میر جدایه‌ی فشند روی نمونه‌های زمستان‌گذران سن گندم.

Fig. 2- Concentration-mortality for *B. bassiana* (isolate Fashand) on hibernating population of Sunn pest.



شکل۳- غلظت-مرگ و میر جدایه‌ی Spt-566 روی نمونه‌های زمستان‌گذران سن گندم.

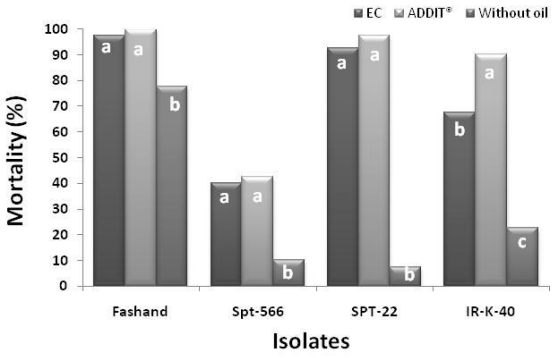
Fig. 3- Concentration-mortality for *B. bassiana* (isolate Spt-566) on hibernating population of Sunn pest.



شکل ۴- مقادیر LC_{50} محاسبه شده برای دو جدایه‌ی فشند و Spt-566 روی نمونه‌های تابستان‌گذران و زمستان‌گذران.

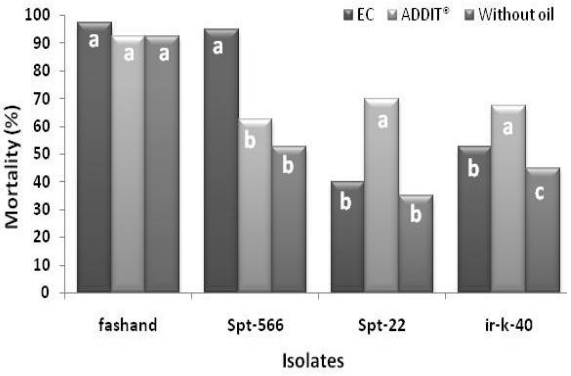
Fig. 4- LC_{50} for *B. bassiana* isolates (Fashand and Spt-566) on hibernating and aestivating population of Sunn pest.

نتایج آزمایش دوم نشان داد که افزودن روغن EC® و ADDIT® به سوسپانسیون قارچ باعث افزایش بیمارگری قارچ روی دو مرحله‌ی زیستی سن گندم در همه‌ی جدایه‌ها شد. به‌طوری که تجزیه‌ی واریانس نتایج حاصل از این آزمایشات نشان داد که بین تأثیر روغن‌ها و جدایه‌های مورد استفاده در سن‌های تابستان‌گذران و زمستان‌گذران اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد.



شکل ۵- مقایسه‌ی میانگین تلفات در اثر افزودن مواد روغنی به اسپور قارچ *B. bassiana* روی نمونه‌های تابستان‌گذران سن گندم ۲۰ روز پس از آلوده‌سازی.

Fig 5- Mean comparison for mortality rate of sunn pest aestivating population due to suspended spores of *B. bassiana* in oils, 20 days after inoculation.



شکل ۶- مقایسه‌ی میانگین تلفات در اثر افزودن مواد روغنی به اسپور قارچ *B. bassiana* روی نمونه‌های زمستان‌گذران سن گندم ۲۰ روز پس از آلوده‌سازی.

Fig 6- Mean comparison for mortality rate of sunn pest hibernating population due to suspended spores of *B. bassiana* in oils, 20 days after inoculation.

میانگین آزمون فاکتوریل برای مرگ و میر ایجاد شده توسط جدایه‌های Ir-k-40, Fashand، Spt-22 و Spt-566 در مرحله‌ی تابستان‌گذران برای مجموع اثر هر دو روغن به ترتیب (a) ۹۸/۷۵، (a) ۹۴/۹۳، (b) ۷۸/۷۰ و (c) ۴۰/۹۴ و در مرحله‌ی زمستان‌گذران به‌ترتیب (a) ۹۴/۹۵، (c) ۵۹/۵۷، (c) ۵۴/۹۷ و (b) ۷۸/۴۵ محاسبه شد. همچنین مقایسه‌ی روغن‌ها با یکدیگر نشان داد که در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری، بین روغن‌های EC و ADDIT® در مرحله‌ی تابستان‌گذران وجود داشته و روغن ADDIT® عملکرد بهتری را نشان داد (شکل‌های ۵ و ۶). در مرحله‌ی زمستان‌گذران سن گندم بین دو روغن اضافه شده به‌قارچ، تفاوتی از نظر تأثیرگذاری مشاهده نشد. نتایج مربوط به‌تأثیرگذاری روغن روی بیمارگری جدایه‌های قارچ در جدول‌های ۴ تا ۹ آمده است.

جدول ۴- LT_{50} محاسبه شده برای قارچ *B. bassiana* (جدایه‌ی فشند) همراه با مواد روغنی پس از ۲۰ روز.

Table 4- Estimated LT_{50} for *B. bassiana* (isolate Fashand) with oils, 20 days after inoculation.

LT_{50} (Days)	Concentrations (spore/ml)	Oils	Population	Isolate
7	10^9	EC	Aestivating	Fashand
15	10^7	EC	Aestivating	Fashand
11	10^9	EC	Hibernating	Fashand
18	10^7	EC	Hibernating	Fashand
7	10^9	ADDIT®	Aestivating	Fashand
20	10^7	ADDIT®	Aestivating	Fashand
9	10^9	ADDIT®	Hibernating	Fashand
12	10^7	ADDIT®	Hibernating	Fashand

جدول ۵- LT_{50} محاسبه شده برای قارچ *B. bassiana* (جدایه‌ی Spt-566) همراه با مواد روغنی پس از ۲۰ روز.

Table 5- Estimated LT_{50} for *B. bassiana* (isolate Spt-566) with oils, 20 days after inoculation.

LT_{50} (Days)	Concentrations (spore/ml)	Oils	Population	Isolate
12	10^9	EC	Hibernating	Spt-566
15	10^7	EC	Hibernating	Spt-566
16	10^9	ADDIT®	Hibernating	Spt-566
19	10^7	ADDIT®	Hibernating	Spt-566

جدول ۶- LT_{50} محاسبه شده برای قارچ *B. bassiana* (جدایه‌ی Spt-22) با مواد روغنی پس از ۲۰ روز.

Table 6- Estimated LT_{50} for *B. bassiana* (isolate Spt-22) with oils, 20 days after inoculation.

LT_{50} (Days)	Concentrations (spore/ml)	Oils	Population	Isolate
7	10^9	EC	Aestivating	Spt-22
20	10^7	EC	Aestivating	Spt-22
6	10^9	ADDIT®	Aestivating	Spt-22
13	10^7	ADDIT®	Aestivating	Spt-22
15	10^9	ADDIT®	Hibernating	Spt-22

جدول ۷- LT_{50} محاسبه شده برای قارچ *B. bassiana* (جدایه‌ی Ir-k-40) با مواد روغنی پس از ۲۰ روز.

Table 6- Estimated LT_{50} for *B. bassiana* (isolate Ir-k-40) with oils, 20 days after inoculation.

LT_{50} (Days)	Concentrations (spore/ml)	Oils	Population	Isolate
17	10^9	EC	Aestivating	Ir-k-40
20	10^9	EC	Hibernating	Ir-k-40
12	10^9	ADDIT®	Aestivating	Ir-k-40
13	10^9	ADDIT®	Hibernating	Ir-k-40

جدول ۸- میانگین مرگ و میر ایجاد شده به‌وسیله‌ی قارچ *B. bassiana* همراه با روغن روی جمعیت سن‌های تابستان‌گذران.

Table 8- Mean mortality of sunn pest aestivating population due to suspended spores of *B. bassiana* in oils.

Means of mortality (%)	Oils	Isolates
100	ADDIT®	Fashand
97.5±2.5	EC	
97.47±2.52	ADDIT®	Spt-22
92.38±3.26	EC	
89.97±4.08	ADDIT®	Ir-k-40
67.43±3.17	EC®	
42.5±3.22	ADDIT®	Spt-566
39.39±4.12	EC	

جدول ۹- میانگین مرگ و میر ایجاد شده به‌وسیله قارچ *B. bassiana* همراه با روغن روی جمعیت سن‌های زمستان‌گذران.

Table 9- Mean mortality of sunn pest hibernating population due to suspended spores of *B. bassiana* in oils.

Means of mortality (%)	Oils	Isolates
97.47±5.05	EC	Fashand
92.42±5.05	ADDIT®	
95±0.77	EC	Spt-566
61.91±9.81	ADDIT®	
52.15±8.55	EC	Ir-k-40
66.99±6.64	ADDIT®	
39.57±6.71	EC	Spt-22
69.76±4.1	ADDIT®	

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* زهرآگینی متفاوتی را روی نمونه‌های زمستان‌گذران و تابستان‌گذران سن گندم دارد. برخی محققین دیگر نیز زهرآگینی جدایه‌هایی از قارچ *M. anisopliae* و یا *B. bassiana* را روی مراحل مختلف رشدی سن گندم نشان داده‌اند. گرچه مور و همکاران (۲۰۰۴) یکی از راهبردهای کنترل سن گندم را استفاده از قارچ‌ها به‌ویژه *B. bassiana* برای کنترل حشرات کامل می‌داند (Moore *et al.*, 2004)، ولی مطالعه‌ای در مورد میزان حساسیت آن‌ها در مراحل تابستان‌گذرانی و زمستان‌گذرانی نسبت به قارچ‌های بیمارگر انجام نشده بود.

اثرات بیمارگری قارچ *B. bassiana* روی شته‌های بالغ برگ برنج، در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از روش زیست‌سنجی پاششی مورد بررسی قرار گرفت (Sedighi *et al.*, 2012). در این تحقیق جدایه‌ی DEBI001 (فشند) مؤثرترین جدایه با LT_{50} هفت روز معرفی شد. با توجه به‌اینکه سن گندم دارای سپرچه‌ی سخت و کیتینی می‌باشد، در مقایسه با شته که دارای بدن حساس‌تری است، رشد و جوانه زنی قارچ به‌داخل بدن سن کندتر و سخت‌تر انجام می‌شود، لذا نتایج حاضر، بیانگر کیفیت بالای بیمارگری جدایه‌ی فشند روی سن گندم می‌باشد.

عبداللهی و همکاران (۲۰۱۰) بیمارگری ۱۱ جدایه از قارچ *B. bassiana* را روی سن زمستان‌گذران مورد بررسی قرار دادند. در مطالعات انجام شده جدایه‌ی SPSH-1 پس از گذشت ۱۲ روز با میانگین کشندگی ۱۰۰٪ مؤثرترین جدایه شناخته شد.

مطالعات Kazemi Yazdi, (2010) برای تعیین میزان رشد کلنی و تولید اسپور چند جدایه قارچ *B. bassiana* و همچنین بیمارگری آن‌ها روی سن گندم نشان داد که جدایه‌های SPT 22 و Ir-k-40 با میانگین مرگ و میر ۹۱/۷–۹۴/۴ درصد بیشترین تلفات را علیه سن گندم داشته و این جدایه‌ها برای مطالعات بعدی انتخاب شدند. در حالی که در تحقیق حاضر جدایه‌های SPT 22 و Ir-K-40 با کمترین میانگین مرگ و میر (به‌ترتیب ۹/۸۹ و ۱۹/۸۹) روی نمونه‌های تابستانه و زمستانه‌ی سن گندم ضعیف‌ترین جدایه‌ها معرفی شدند. در تحقیقات انجام شده روی سن گندم (برخلاف تحقیق حاضر) از روش زیست سنجی غوطه‌وری و رطوبت نسبی بالاتر از ۹۰٪ استفاده شده است. احتمال می‌رود که در روش غوطه‌وری اسپورهای بیشتری در تماس با اندام‌های حساس حشره قرار گرفته و بیمارگری قارچ بیشتر شود. روش اسپری کردن به‌شرایط طبیعی

نزدیک‌تر است، بنابراین احتمال برخورد اسپور با نقاط حساس بدن حشره کمتر می‌شود. همچنین آزمایشات انجام شده در تحقیق حاضر در رطوبت نسبی ۷۵٪ انجام شد تا قدرت بیمارگری قارچ در رطوبت پایین‌تر بررسی شود. طبق مطالعات محققین رطوبت نسبی بالا موجب رشد، اسپورزایی، جوانه زنی بالاتر قارچ و در نهایت موجب اپیدمی شدن بیماری ناشی از قارچ *Beauveria* می‌گردد (Milner & Lutton, 1986). با توجه به این شرایط جدایه‌ی فشند با میانگین کلی ۶۶/۰۷ درصد مرگ و میر در جمعیت سن‌های تابستانه و زمستانه جدایه‌ی مؤثری شناخته شد.

با مقایسه‌ای که بین مرحله‌ی تابستان‌گذران و مرحله‌ی زمستان‌گذران سن گندم در مقابل جدایه‌های مختلف قارچ انجام شد، مرحله‌ی زمستان‌گذران با میانگین کلی ۴۳/۷۴ درصد تلفات، حساسیت بیشتری را در مقایسه با سن‌های تابستانه با میانگین کلی ۱۹/۷۲ درصد تلفات نشان داد. در مناطق زمستان‌گذران، سن گندم با تراکم زیاد در زیر بوته‌های گیاهان زندگی کرده و در تماس با سرما و خاک مرطوب هستند. این حشرات به‌دلیل عدم تغذیه، طی چهار ماه ضعیف‌تر از سن‌های تابستان‌گذران بوده و با کمبود انرژی مواجه می‌شوند. در چنین حالتی میزان مقاومت سن‌ها کم شده و شرایط برای حمله‌ی قارچ‌های بیمارگر به آن‌ها فراهم می‌باشد. با توجه به‌نتایج بدست آمده از این تحقیق، به‌نظر می‌رسد استفاده از قارچ *Beauveria* برای کنترل سن‌ها در مکان‌های زمستان‌گذران، باید قبل از مهاجرت آن‌ها به مزارع انجام شود. هر چند که نتایج نشان می‌دهد که بررسی‌های تکمیلی در خصوص بهبود فرمولاسیون قارچ ضروری است. استفاده از مواد روغنی در سوسپانسیون قارچ مزایای زیادی داشته و مانند فرمولاسیون‌های روغنی عمل می‌کند، بنابراین مزایای استفاده ازافزودن مواد روغنی و فرمولاسیون‌های روغنی برای قارچ‌های بیمارگر از نظر محققین زیر توجیه می‌شود.

استفاده از فرمولاسیون‌های روغنی، اسپور قارچ‌ها را در برابر عوامل محیطی از قبیل اشعه‌ی ماوراء بنفش و از دست دادن رطوبت، محافظت می‌کند (Edgington *et al.*, 2000; Edgington *et al.*, 2007). برخی محققین معتقدند که روغن‌ها باعث می‌شوند لیپیدها در مجاری روکوتیکولی به خارج هجوم آورده و به‌دنبال آن‌ها مایعی آبگون خارج گردد و بدین‌ترتیب سطح کوتیکول از قطرات آب پوشیده شود (Locke, 1984). این رطوبت باعث مرطوب و فعال شدن اسپورهای قارچ می‌گردد. طبیعت آب‌گریزی اسپورهای هوایی، ساخت فرمولاسیون‌های بر اساس روغن برای کاربرد ULV در مناطق خشک را امکان‌پذیر می‌سازد (Bateman *et al.*, 1993; Burges, 1998).

بندانی و اسماعیل پور (۲۰۰۶) تأثیر روغن در افزایش بیمارگری قارچ *B. bassiana* را به‌روش غوطه‌وری روی سن گندم آزمایش کردند. نتایج نشان داد که روغن باعث افزایش بیمارگری قارچ می‌شود (Bandani & Esmailpour, 2006). در آزمایشات Skrobek (2001) پتانسل مواد افزودنی PA1، ADDIT® و Agrocer® به‌منظور افزایش اثر بیمارگری قارچ‌های *M. anisopliae* var. *anisopliae* V245 و *P. fumosoroseus* علیه سفیدبالک *Bemisia argentifolii* روی گیاه پنبه ارزیابی شد. افزایش مرگ و میر لاروها به‌میزان ۸۰٪ در تیمار همراه با روغن ADDIT® پس از ۲ روز در مقایسه با مرگ و میر ۴۰٪-۳۰٪ در سایر فرمولاسیون‌ها مشاهده شد. پس از ۳ روز ۱۰۰٪ لاروها در تیمار ADDIT® مردند. در آزمایشاتی که در این تحقیق انجام شد، استفاده از روغن ADDIT® در سوسپانسیون قارچ، پس از گذشت ۲۰ روز باعث ۱۰۰٪ مرگ و میر در سن گندم شد. روغن، سطح آبگریز و لیپوفیل بدن حشرات و برگ گیاهان را خیس کرده و در مواجه با این سطح، قبل از جذب شدن به کوتیکول سریعاً پخش می‌شود. نقش کلیدی روغن‌ها، توزیع گسترده و درنتیجه پخش اسپورها در فضای غشائی بین بندهای بدن حشره است. این قسمت از کوتیکول نرم و نازک بوده و دارای محیط نسبتاً مرطوبی می‌باشد. درچنین شرایطی جوانه‌زنی اسپورها و نفوذ میخ رخنه به‌داخل کوتیکول آسان‌تر می‌شود (Askary *et al.*, 1999).

Reference

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of insecticides. Journal of Economical Entomology, 18: 265-267.

Abdulhi, M., El-Bohssini, M., Jmil, M., Trissi, A.N., Sayyadi, Z., Skiiner M. & Parker, B.L. 2010. *Beauveria bassiana* characterization and efficacy vs. sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). Pakistan Journal of Biological Science, 13(21): 1052-1056.

Anonymous, 1997. An integrated approach to saving wheat from sunn pest. ICARDA- CIMMYT- Turkey wheat improvement program.

Askary, H., Benhamou, N. & Brodur, J. 1999. Ultrastructural and characterization of aphid invasion by the hyphomycete *Verticillium lecanii*. Journal of Invertebrate Pathology 74: 1-13.

Bandani, A. & Esmailpour, N. 2006. Oil formulation of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, against Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Heteroptera: Scutelleridae). Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 71 (2 Pt B): 443-448.

Bateman, R.P., Carey, M., Moore, D. & Prior, C. 1993. The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviridae* in oil formulation to desert locusts at low humidity. Annales of Applied Biology. 122: 145-52.

Burges, H. D. 1998. Formulation of myco-insecticides. pp. 131-185. In: Burges, H. D. (ed.), Formulation of Microbial Biopesticides. Kluwer Academic Publishes, Dordrecht.

Edington, S., Segura, H., de la Rosa, W. & Williams, T. 2000. Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulation for control of the coffee berry borer. International Journal of Pest Management, 46: 169-179.

Edgington, S., Moore, D., Kutuk, H., Satar H. & EL-bouhssini, M. 2007. Progress in the development of a myco-insecticide for biological control of sunn pest. pp. 237-243), In: Parker, B.L., Skinner, M., El-Bouhssini, M. & Kumari S.G. (eds.), Sunn Pest Management, A Decade of Progress 1994-2004. Arab Society for Plant Protection.

Feng, M.G., Poprawski T.J. & Khachatourians, G.G. 1994. Production formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. Bio-control Science & Technology, 4: 3-34.

Haji Allahverdi Pour, H., Ghazavi, M. & Kharazi-Pakde, **A. 2008**. Comparison of the virulence of some Iranian isolates of *Beauveria bassiana* to *Eurygaster integriceps* (Hem.: Scutelleridae) and production of the selected isolate. Journal of Entomological Society of Iran, 28(1): 13-26

Inglis, G. D., Goettel, M.S., Butt, T.M. & Strasser, H. 2001. Use of Hyphomacetous fungi for managing insect pests. pp. 23-70. In: Butt, T. M., Jackson, C. W. & Magan, N. (eds.), Fungi as Bio-control Agents: Progress, Problems Potential. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Kazemi Yazdi, F. 2010. Isolation and biological characterization of *Beauveria bassiana* from overwintering sites of Sunn Pest, *Eurygaster integriceps*, in Kermanshah Province, Iran. Research project report, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

Locke, C.S. 1984. An exact confidence interval from untransformed data for the ratio of two formulation means. Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, 12(6): 649-655.

Miliner, R.J. & Lutton, G.G. 1986. Dependence of *Verticillium lecanii* on high humidity for infection and sporulation using *Myzus persicae* as host. Environmental Entomology, 15: 380-382.

Moore, D., Edgington, S., Kutuk, H. & EL-Bouhssini, M. 2004. The development of a myco-insecticide for the biological control of sunn pest. 29-30. In: El-Bouhssini, M., Parker, B., Skinner, M., Reid W. & Kumari, S. (eds.), Abstracts book of Second International Conference on Sunn Pest. July 19-22, ICARDA, Allepo, Syria.

Moore, D. & Edgington, S. 2006. The sunn pest- a grain of hope for its control. CABI Bioscience, Silwood Park, Ascot, Berks, SL57TA UK.

Radjabi, G.R. 2000. Ecology of Wheat and Barley Sunn Pests in Iran. Agricultural Research, Education and Extention Organization, Nashr Amozesh Keshavarzi, 343p. (In Persian).

Rastegar, G. 2007. Study of pathogenicity on some strains of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. On the sunn pest adults and the best strain formulation. Ph.D thesis in Agricultural Entomology. Tehran (Iran), Science and Research Unit, Islamic Azad University of Tehran. (In Persian with English summary)

Sedighi, A., Ghazavi, M., Haji Allahverdipour, H. & Ahadiyat, A. 2012. Study on the effects of some Iranian isolates of the fungus *Beauveria bassiana* (Balsomo) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) (Hemiptera: Aphididae), under laboratory. Munis Entomology & Zoology, 7(1): 267-273.

Skrobek, A. 2001. Investigation on the effect of entomopathogenic fungi on whiteflies. Ph.D. D. Dissertation, Department of plant Diseases, Rhein. Friedrich–Wilhelms–Universitate, Bonn.

Talaei-Hassanloui, R. 1999. Laboratory investigation into pathogenicity of *Beauveria bassiana* on sunn pest *Eurygaster integriceps*. M.Sc. Thesis, University of Tehran, Iran. (In Persian with English summary)

Wraight, S. P., Jackson, M.A. & Kock, S.L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal bio-control agents. pp. 253-287. In: Butt, T.M., Jackson, C. & Magan N. (eds.), Fungi as Bio-control Agents: Progress, Problems and Potential. CABI Publishing, Wallingford.

Virulence of four *Beauveria bassiana* isolates on aestivating and overwintering populations of *Eurygaster integriceps*

Zeinab Ghamari Zare[1], Hassan Askary[2], Habib Abbasipour[1], Aziz Sheikhi Gorjan[2], Ayatollah Saeidi Zadeh[1]

1- Shahed University, Tehran, Iran

2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

Corresponding author: Hassan Askary, E-mail: askary2@gmail.com

Received: Aug. 07, 2012 **2 (1) 31-41** **Accepted: June. 30, 2013**

Abstract

In this study, virulence of four *Beauveria bassiana* isolates on aestivating and overwintering populations of Sunn pest (*Eurygaster integriceps*) adults was investigated. Bioassays were conducted and performed by spraying fungal spore suspension on adult sunn pest. Obtained data was analyzed to compare mortality in different treatments and to estimate LC50 and LT_{50}. The results showed that overwintering adults of Sunn pest were more susceptible than the summer population. According to the results, LC_{50} of Fashand isolate was 1×10^8 and 2×10^5 spore/ml on aestivation and overwintering populations, respectively. LC_{50} of Spt-566 isolate was 3×10^7 spore/ml on the overwintering population. Estimated LT_{50} for Fashand isolate (10^9 spore/ml) on aestivating and overwintering populations were 13 and 7 days, respectively, whereas, estimated LT_{50} for Spt-566 isolate was 19 days on overwintering population. On the basis of this study, Fashand isolate was more effective than Spt-566 on two physiological stages of Sunn pest adult. The results also showed that adding oils to the suspension of the spores increase virulence of the isolates on all stages of sunn pest.

Keywords: Bioassay, *Beauveria bassiana*, *Eurygaster integriceps*, Sunn pest, Overwintering site