آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۰، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۱

زیست سنجی فرمولاسیون پودر قابل تعلیق از بلاستوسپور قارچ *Lecanicillium muscarium* روی شته جالیز *Aphis gossypii*

محمد جعفر فارسی[۱]، حسن عسکری[۲]✉، خلیل طالبی جهرمی[۳] و عزیز خرازی پاکدل[۳]
۱- موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
۲- موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران؛ ۳- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۰؛ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۰)

چکیده

فرمولاسیون پودر قابل تعلیق از قارچ *L. muscarium* روی پوره سن دوم شته جالیز *A. gossypii*، مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمارها شامل بلاستوسپور تازه تولید شده و بلاستوسپور فرموله شده‌ی تازه بود. آزمایش یک ماه و هفت ماه بعد با بلاستوسپور فرموله شده و نگهداری شده در قفسه‌ی آزمایشگاه (دمای۲ ±۲۲ درجه سانتی‌گراد) و یخچال (دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد) به صورت جداگانه تکرار شد. تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که شش نمونه‌ی قارچ و غلظت‌های بکار رفته با همدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند ($p<0.01$). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که قارچ فرموله شده (نگهداری در یخچال به‌مدت یک ماه) با ۷/۲۸±۵۶/۱۹ درصد بیشترین و قارچ فرموله شده (نگهداری در قفسه‌ی آزمایشگاه یه‌مدت هفت ماه) با ۱/۸۳± ۱۵/۱۵ درصد کمترین درصد تلفات را داشتند. مقایسه حدود بالا و پایین LC_{50} نشان داد که فقط قارچ فرموله شده‌ای که هفت ماه در قفسه آزمایشگاه نگهداری شده بود با ۵ نمونه دیگر اختلاف معنی‌دار داشت. مقایسه حدود بالا و پایین LT_{50} نشان داد که تنها در غلظت 10^8 بلاستوسپور در میلی‌لیتر قارچ فرموله شده که یک ماه در یخچال نگهداری شده بود با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت. بطور کلی نتایج آزمایش‌های اخیر نشان داد که بلاستوسپور تولید شده در عصاره‌ی سیب زمینی و فرمولاسیون انتخاب شده، روی شته جالیز زهرآگینی داشت.

کلمات کلیدی: *Lecanicillium muscarium*، شته جالیز، زیست سنجی، فرمولاسیون، کنترل بیولوژیک.

Bioassay of wettable powder formulation of *Lecanicillium muscarium* blastospore on *Aphis gossypii*

M. J. FARSI[1], H. ASKARY[2]✉, KH. TALEBI JAHROMI[3] and A. KHARRAZI PAKDEL[3]
1- Research Institute of Forests and Rangelands, P. O. Box: 13185-116, Tehran, Iran
2- Iranian Research Institute of Plant Protection, P. O. Box: 19395-1454, Tehran, Iran
3- Pardis of agriculture and Natural Resources of Tehran University, Iran

Abstract

Wettable powder formulation of *L. muscarium* blastospore was evaluated on second nymphal instars of *A. gossypii* (Glover) in six experiments. Treatments consisted of fresh blastospores and fresh formulated blastospores with six concentrations and distilled water as control, arranged in a completely randomized design with three replications. The experiments were separately repeated one and seven months later, with previous formulated blastospore stored in laboratory conditions (22±2°C temperature) and in refrigerator (4±1°C temperature) at similar conditions. Variance analysis of experiments demonstrated significant differences among treatments and concentrations ($p<0.01$). Comparing means showed that 1 month formulated blastospore stored in refrigerator with 56.19±7.28% and 7 months formulated blastospore stored on laboratory shelf with 15.15±1.83 % had the highest and the lowest mortality percent, respectively. Comparison of lower and upper confidence limits of LC_{50}s showed significant differences only between 7 months formulated blastospore stored on laboratory condition and the other treatments. Comparison of lower and upper confidence limits of LT_{50}s showed significant difference only between 10^8 spore/ml. of 1 month formulated blastospore stored in refrigerator and the others. Result of recent experiments illustrated that produced blastospores on potato extract, and prepared formulation was virulent on *A. gossypii*.

Key words: *Lecanicillium muscarium, Aphis gossypii,* bioassay, formulation, biological control.

✉ **Corresponding author:** askary@iripp.ir

مقدمه

ظهور پدیده مقاومت در حشرات و کنه‌ها نسبت به حشره‌کش‌های شیمیایی، آثار سوء و زیانبار ترکیبات شیمیایی در محیط زیست و بهداشت انسانی، انگیزه‌ای بسیار قوی برای تولید عوامل کنترل کننده‌ی میکروبی و استفاده از آن‌ها در مدیریت تلفیقی آفات ایجاد کرده‌است. عوامل بیوکنترل می‌توانند در مواردی که کاربرد برخی آفت‌کش‌ها مانند سموم کلره و مشتقات آنها محدود و یا ممنوع شده‌است و یا در مناطقی که مقاومت حشرات در مقابل سموم مصرفی ظاهر شده‌است، مورد استفاده قرارگیرند. در حال حاضر گیاهپزشکی با دو چالش مهم یکی افزایش تعداد ترکیبات شیمیایی ممنوع شده و دیگری کمبود جایگزین‌های کافی، بی‌خطر و مناسب مواجه است (Butt *et al.*, 2001).

در بین قارچ‌ها، کوشش قابل ملاحظه‌ای روی تولید و بهره‌برداری از قارچ‌های بیمارگر هیفومیست متمرکز شده است. مثال‌های متعددی از تأثیر مطلوب این گروه از میکروارگانیسم‌ها در کنترل حشرات آفت وجود دارد که نشان دهنده پتانسیل قابل ملاحظه قارچ‌ها به عنوان عوامل کنترل کننده بیولوژیک (BCAs[1]) می‌باشد، هر چند که کاربرد آن‌ها همیشه با کنترل موثر حشرات آفت همراه نبوده است. عوامل موثر در ایجاد و توسعه همه‌گیری در جمعیت حشرات بسیار پیچیده و شامل روابط متقابل بیمارگر(ها)، حشره میزبان، محیط و زمان می‌باشد. درک این روابط متقابل پویا (Dynamic) مهم است. شناخت عواملی که ایجاد و توسعه بیماری را در جمعیت حشرات محدود می‌کنند، به ما اجازه غلبه بر مشکلات را داده و دستیابی به کنترل حشرات آفت را فراهم می‌سازد (Inglis *et al.*, 2001).

پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در زمینه‌ی عوامل بیوکنترل صورت گرفته‌است ولی در زمینه‌های تکنیکی اقدامات گسترده‌تری باید صورت گیرد. این موضوع جمع‌آوری و شناسایی جدایه‌هایی را طلب می‌کند که در غلظت کمتر، اثر بیشتر و سریع‌تر داشته باشند. کیفیت اسپور تولید شده همراه با کمیت آن می‌بایست مدنظر قرار داده شود. در این راستا هزینه‌های تولید باید کاهش یابد تا محصول تولیدی از نظر قیمت قابل رقابت باشد. با دستکاری‌های اکوفیزیولوژیک باید در جهت افزایش مواد مفید مثل قند و قند الکل (Polyol) در داخل اسپور اقدام نمود تا سازگاری اکولوژیکی آن در جهت تحمل تغییرات آب و هوایی (دما و رطوبت نسبی، UV)، تغییرات مربوط به خاک (انواع خاک‌ها) و تغییرات عوامل بیوتیک (آنتاگونیست‌ها) بهبود یابد. قارچ رشد یافته روی حشره دارای اریتریتول، مانیتول و گلوکز بیشتر و ترهالوز کمتر نسبت به قارچ‌هایی است که در محیط غذایی غنی از مواد فوق‌الذکر رشد کرده‌اند. بنابراین غنی‌سازی محیط غذایی که معمولاً مورد توجه است ممکن است که بهترین راه برای تولید BCAs نباشد.

متأسفانه تحقیقات نسبتاً کمی در زمینه تولید میکروارگانیسم‌ها در مقایسه با ترکیب‌های شیمیایی آفت‌کش وجود دارد. دو دلیل اصلی آن، دامنه میزبانی محدود و دیگری کنترل ناپایدار آن‌ها در شرایط صحرایی می‌باشد. بنابراین توجه بیشتر به انتخاب عوامل بیوکنترل با دامنه اثر وسیع، چگونگی تولید و روش‌های فرمولاسیون و کاربرد آنها معطوف شده‌است (Butt *et al.*, 2001).

قارچ *Verticillium lecanii* یکی از قارچ‌های هیفومیست و متشکل از جدایه‌های ناهمگون با گسترش جهانی است. این قارچ در ابتدا به عنوان بیمارگر جوربالان، عمدتاً شته‌ها و شپشک‌های نباتی شناخته شده بود، اما از راسته‌های دیگر حشرات، عنکبوتیان و کنه‌ها نیز جدا شده‌است. این قارچ هیپرپارازیت زنگ‌ها و قارچ‌های بیمارگر گیاهی دیگر مثل سفیدک‌های سطحی نیز می‌باشد. علیرغم پراکنش این قارچ در مناطق مختلف اطلاعات دقیق از تخصص میزبانی آن وجود ندارد (Askary *et al.*, 1998). گستردگی و ناهمگونی جدایه‌های این قارچ باعث بازنگری و تجدید نظر در رده‌بندی جنس *Verticillium* sect. *Prostrata* در سال‌های اخیر گردید

1- Biological Control Agents

(Zare and Gams, 2001). بطوری که جدایه DAOM 198499 این قارچ توسط آقای دکتر رسول زارع به نام *Lecanicillium muscarium* (Zare & Gams) شناسایی گردید.

قارچ *L. muscarium* می‌تواند همزمان شته‌ها و سفیدک‌های سطحی را کنترل نماید. به عبارت دیگر با استفاده از این جدایه با یک بار اسپورپاشی می‌توان دو عامل خسارتزا را هدف قرار داده و کنترل نمود. این امر مورد توجه اکولوژیست‌ها قرار گرفته (Brodeur, 1998) و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است (Wraight *et al.*, 2001). بیمارگری این قارچ روی پروانه دم‌قهوه‌ای بلوط (Farsi *et al.*, 2003) شته سبز هلو (Ashouri *et al.*, 2003) سفید بالک *Trialeurodes vaporariorum* (Mehrasa, 2003) اثبات شده‌است و امکان کاربرد همزمان آن نیز با سایر عوامل بیولوژیک وجود دارد (Ashouri *et al.*, 2003; Helyer, 1993; Stirmanova, 1994) ضمن اینکه رشد این جدایه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کند شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد متوقف می‌شود بنابراین برای انسان هم خطری ندارد (Hall, 1981).

با توجه به ویژگی‌های قارچ مورد نظر و فراهم بودن شرایط محیطی مناسب برای رشد و اسپورزایی قارچ در مناطق مرطوب و گلخانه‌ها و متفاوت بودن عکس‌العمل عوامل بیولوژیک نسبت به عوامل محیطی نه تنها در سطح گونه‌ها، بلکه در سطح جدایه‌ها، بررسی محیط‌های غذایی و شرایط محیطی برای تولید و فرمولاسیون این جدایه به منظور دستیابی به یک عامل بیوکنترل موثر و منحصر به فرد مورد توجه قرارگرفت و نتایج بدست آمده در محیط‌های جامد و مایع به صورت جداگانه منتشر گردید (Farsi *et al.*, 2005a; 2005b). در این تحقیق قدرت بیمارگری بلاستوسپور تازه قارچ و فرمولاسیون تهیه شده از آن روی شته جالیز، اثر زمان روی فراورده تولید شده و زهرآگینی آن روی شته جالیز *Aphis gossypii* (Glover) مورد بررسی قرارگرفت. این شته دامنه میزبانی وسیعی داشته و خسارت آن از طریق تغذیه از شیره نباتی و انتقال ویروس انجام می‌شود. در اثر تغذیه شته برگ‌ها زرد و رشد متوقف می‌شود. حشرات کامل شیره ترشح کرده که باعث رشد قارچ دوده می‌گردد. کنترل این شته به دلیل داشتن دوره زندگی کوتاه، قدرت تولید مثلی زیاد، انتقال ویروس و مقاومت نسبت به بسیاری از آفت‌کش‌ها مشکل می‌باشد. قارچ‌ها از مهم‌ترین بیمارگرهایی هستند که به تمام مراحل زندگی این شته حمله می‌کنند. با توجه به اهمیت این شته ارزیابی زهرآگینی قارچ *L. muscarium* و فرمولاسیون تهیه شده از بلاستوسپور تولید شده در محیط مایع که در شرایط مختلف نگهداری شده بود روی آن مورد بررسی قرارگرفت.

روش بررسی

پرورش شته: شته *A. gossypii* از بوته‌های خربزه در مجتمع تحقیقاتی البرز کرج جمع‌آوری و در آزمایشگاه روی بوته‌های خیار (بذر شرکت Nickerson-Zwaan هلند) منتقل گردید. از کلنی فوق شته‌های بالغ و بکرزا جدا و در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد به تعداد ٤-۳ عدد، روی برگ جدا شده خیار منتقل گردید تا پوره‌زایی انجام شود. ٢٤ ساعت بعد، شته‌های بکرزا حذف گردید. بعد از اولین پوست‌اندازی پوره‌های سن یک، پوره‌های سن ۲ تولید شده برای انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی مورد استفاده قرارگرفت.

زیست‌سنجی قارچ روی شته به روش برگ جدا شده انجام گردید. بدین ترتیب که برگ خیار از بوته آن جدا و انتهای دمبرگ آن با کمی پنبه مرطوب پوشیده شده و داخل ظرف پلکسی گلاس (به شکل ۸ ضلعی منتظم با ابعاد و ارتفاع ۴/۵ سانتی‌متر وقطر ۱۱ سانتی‌متر) که با پنبه، مرطوب نگهداشته می‌شد قرارگرفت. روی پنبه یک صفحه کاغذ صافی به اندازه سطح داخلی ظرف مورد استفاده قرار داده شد تا از چسبیدن و یا گیر افتادن شته‌ها در داخل پنبه جلوگیری شود. برای تهویه مناسب ظرف ها سوراخی به قطر دو سانتی‌متر در دهانه آنها ایجاد و با پارچه توری ریز پوشانده‌شد.

کشت قارچ و تهیه فرمولاسیون: برای کشت قارچ از عصاره سیب‌زمینی به روش استاندارد و رایج استفاده گردید. به

این ترتیب که عصاره استخراج شده، پس از سرد شدن به ارلن‌های یک لیتری شیاردار منتقل و پس از استریل نمودن آنها، با قارچ تلقیح گردیدند. ارلن‌ها روی شیکر دوار با ۱۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز قرار داده شد. لازم به ذکر است که در این مدت زمان بیشترین تولید بلاستوسپور در محیط کشت اتفاق می‌افتد (Farsi *et al*., 2005). جداسازی بلاستوسپورها از سایر اندام‌های قارچی با عبور دادن آن‌ها از پارچه ململ دو لایه انجام و سپس برای جداسازی بلاستوسپورها از محیط غذایی از سانتریفوژ یخچال‌دار با سرعت ۱۰/۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. بلاستوسپورها از رسوب باقیمانده در انتهای لوله‌های سانتریفوژ جمع‌آوری گردید.

برای فرموله کردن خمیر حاصل، از روش اصلاح شده Balachere *et al*. (1973) و Lisanskey *et al*. (1993) (نقل از Burges, 1998) با تغییرات اندکی استفاده گردید. بدین ترتیب که در ۱۰۰ گرم خمیر حاصل از سانتریفوژ، ۱۰ گرم پودر سیلیکاژل، ۲۲ میلی‌لیتر پارافین مایع، ۲۲ میلی‌لیتر محلول سوکروز ۸۰ درصد، ۲/۲ گرم گلوتامات سدیم، ۲/۲ گرم آلژینات سدیم اضافه گردید. به مخلوط فوق ۲۳۰ گرم پودر کائولن اضافه شده و پس از اختلاط ۲۲ گرم پودر شیر، اضافه شد. در پایان مجموعاً ۳۰۰ گرم پودر که حاوی ۱۰۰ گرم بلاستوسپور ($۳/۵\times۱۰^{۱۲}$ بلاستوسپور) به عنوان ماده موثره بود، بدست آمد.

پودر حاصل بر اساس تیمارهای مورد نظر بسته بندی و در داخل قفسه آزمایشگاه (دمای متغیر و رطوبت نسبی حدود ۲۰٪) و یا در داخل یخچال (دمای ٦-۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۲٪) نگهداری و برای آزمایش‌های زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفت.

روش تهیه غلظت‌ها: ابتدا غلظت‌های پایه از هر تیمار قارچی تهیه گردید. برای زیست‌سنجی قارچ تازه تولید شده، یک گرم از خمیر اولیه قارچ ($۳/۵\times۱۰^{۱۰}$ عدد بلاستوسپور در هر گرم) برداشت و در ۳۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر معلق گردید و غلظت پایه ۱×۱۰^{۸} بلاستوسپور در میلی‌لیتر بدست آمد. برای زیست سنجی های قارچ فرموله شده با توجه به میزان مواد اضافه شده به خمیر حاصل از سانتریفوژ، سه گرم از هر یک از پودرها را برداشته و در ۳۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سوسپانسیون شده و به عنوان غلظت پایه ۱×۱۰^{۸} مورد استفاده قرارگرفت. سایر غلظت‌های مورد نیاز از طریق رقیق کردن غلظت پایه اولیه حاصل شد.

روش اندازه‌گیری میزان تندش: برای اندازه‌گیری میزان تندش از روش شمارش کلنی استفاده گردید. بدین ترتیب که در داخل طشتک پتری با قطر نه سانتی‌متر ۱۰ میلی‌لیتر PDA ریخته و پس از سرد و منجمد شدن، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۳}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر را روی آن پخش و در انکوباتور با دمای ۱±۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ٤۸ ساعت تعداد کلنی‌ها شمارش و ثبت گردید. میزان تندش اندازه‌گیری شده در چندین مورد و در زمان‌های مختلف عمدتاً در حد ۹۵-۹۰ درصد بوده است، به طوری که با اطمینان می‌توان گفت که قارچ تازه تولید شده در حد بیشتر از ۹۰ درصد قدرت تندش داشت.

آزمایش‌های زیست‌سنجی و تعیین LC_{50} و LT_{50}: در زیست‌سنجی مقدماتی که با غلظت‌های مختلف قارچ تازه و قارچ تازه فرموله شده روی پوره سن دوم شته جالیز انجام گرفت، غلظت $۱۰^{۳}$ حدود ۲۰٪ و غلظت $۱۰^{۸}$ حدود ۹۰ درصد مرگ و میر ایجاد کردند. لذا این غلظت‌ها به عنوان غلظت حداقل و حداکثر انتخاب و در حد فاصل آن‌ها چهار غلظت با فاصله لگاریتمی $۱۰^{٤}$، $۱۰^{٥}$، $۱۰^{٦}$ و $۱۰^{٧}$ برای زیست‌سنجی انتخاب گردید. برای آزمایش‌های زیست‌سنجی از هر فراورده قارچی شش غلظت به همراه شاهد در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با نمونه‌های نامساوی در هر واحد آزمایشی (حداقل ۱۵ و حداکثر ۳۰ عدد شته) مورد بررسی قرار گرفت.

تیمارها عبارت بودند از: N = قارچ تازه، FN = قارچ فرموله شده تازه، FR(1) = قارچ فرموله شده نگهداری شده در

یخچال به مدت یک ماه، FL(1) = قارچ فرموله شده نگهداری شده در قفسه آزمایشگاه به مدت یک ماه، FR(7) = قارچ فرموله شده نگهداری شده در یخچال به مدت هفت ماه، وFL(7) = قارچ فرموله شده نگهداری شده در قفسه آزمایشگاه به مدت هفت ماه.

برای پاشیدن غلظت‌های مختلف روی پوره‌های سن ۲ شته روی برگ خیار از سمپاش دستی معمولی استفاده گردید. بدین ترتیب که برگ خیار در فاصله حدود ۲۵ سانتی‌متری از نازل سمپاش به صورت عمودی نگهداشته و سوسپانسیون مورد نظر به صورت یکنواخت روی آن پاشیده شد. پس از اسپورپاشی، برگ‌ها به همراه شته‌ها در داخل ظرف آزمایش، روی کاغذ صافی قرارگرفت، و مدتی در داخل آزمایشگاه نگهداری شد تا آب اضافی کاملاً خشک گردد. سپس درب ظرف بسته شد و در اتاق رشد با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت.

واحدهای آزمایشی به صورت روزانه بازدید و میزان مرگ و میر شته‌ها تا ۱۰ روز ثبت گردید. ضمناً روزانه پوسته‌های پورگی و پوره‌های تازه متولد شده نیز با دستگاه مکنده به آرامی جمع‌آوری و از محیط آزمایش حذف گردید. برای اثبات بیمارگری قارچ، شته‌های مرده با استفاده از لام و لامل و آب مقطر استریل در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. وجود بلاستوسپور داخل بدن شته، بیماریزایی را اثبات نمود.

روش تجزیه آماری: با توجه به تلفات مشاهده شده در تیمارهای شاهد، مرگ و میر مشاهده شده در سایر تیمارها، بر اساس فرمول آبوت اصلاح گردید. داده‌های اصلاح شده از جنبه هموژن بودن و داشتن توزیع نرمال واریانس‌ها با نرم‌افزار رایانه‌ای SAS مورد آزمون بارتلت وتجزیه باقیمانده (Residual) قرار گرفت.

نتایج بدست آمده از شش آزمایش ابتدا به صورت مستقل و سپس با همدیگر در قالب طرح فاکتوریل با دو عامل در طرح پایه کاملاً تصادفی با نرم‌افزار SAS مورد تجزیه آماری قرارگرفت. میانگین‌ها نیز بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند. برای محاسبه LC_{50} از نرم افزار priprobit ver.1.63 استفاده شد. برای محاسبه LT_{50} از برنامه LIFE TEST به کمک نرم‌افزار رایانه‌ای SAS استفاده شد.

نتیجه و بحث

نتایج حاصل از تجزیه آماری شش آزمایش زیست‌سنجی روی شته جالیز در قالب آزمون فاکتوریل در طرح پایه کاملاً تصادفی نشان داد که تیمارهای قارچ مورد استفاده ($F_{5,84}$=548.4) و غلظت‌های بکار رفته در هر آزمایش ($F_{6,84}$=1921.77) با یکدیگر در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار دارند و اثر متقابل آنها نیز در سطح یک درصد معنی‌دار است ($F_{30,84}$=50.7).

جدول مقایسه میانگین‌ها و سطوح عوامل مورد مطالعه نشان داد که بلاستوسپور قارچ فرموله‌شده یک ماه نگهداری‌شده در یخچال با میانگین ۵۶/۱۹ درصد تلفات، بیشترین (سطحA) و بلاستوسپور فرموله شده هفت ماه نگهداری شده در آزمایشگاه با میانگین ۱۵/۰۵ کمترین (سطح F) میزان تلفات را ایجاد کرده‌اند (جدول ۱).

برای محاسبه LC_{50} و LT_{50} تلفات مشاهده شده در سه تکرار هر آزمایش جمع و سپس مجموع آنها به روش پروبیت و LIFE TEST مورد تجزیه قرارگرفت.

نتایج بدست آمده از تجزیه پروبیت برای شش نمونه قارچ مورد آزمایش در جدول ۱ و نتایج بدست آمده از آزمون بقا و LT_{50} محاسبه شده در شش آزمایش در غلظت‌های مختلف در جدول ۲ ارائه شده است. نمودار خط رگرسیون بین لگاریتم غلظت و پروبیت تلفات شش آزمایش زیست سنجی در شکل ۱، ارائه گردیده‌است.

در هر گرم از ماده خمیری شکل بدست آمده از سانتریفوژ محیط کشت مایع، تعداد بلاستوسپور شمارش شده $۳/۵\times۱۰^{۱۰}$ عدد بود.

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد تلفات در جمعیت شته جالیز تیمار شده با قارچ *L. muscarium* و LC_{50} محاسبه شده

Table 1. Means of mortality percent in *A. gossypii* population treated with *L. muscarium* and estimated Lc_{50s}

تیمار قارچ Treatments	نمونه‌ها Speciments	میانگین (٪) Mean±SE	LC_{50}	حد پایین Lower fiducial limit	حد بالا Upper fiducial limit
N	21	47.05±7.50D	1.35×10^{5}	1.95×10^{4}	7.03×10^{5}
FN	21	52/95±7.05B	3.61×10^{4}	1.41×10^{3}	5.69×10^{5}
FL(1)	21	49/81±6.99C	8.48×10^{4}	6.99×10^{4}	2.4×10^{5}
FL(7)	21	15.05±1.83F	5.67×10^{13}	1.58×10^{10}	4.99×10^{37}
FR(1)	21	56.19±7.28A	2.09×10^{4}	1.35×10^{3}	1.17×10^{5}
FR(7)	21	40.88±7.53E	4.17×10^{5}	7.74×10^{4}	2.35×10^{6}

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می باشد. (آزمون دانکن در سطح یک درصد)

N= بلاستوسپور تازه، FN = بلاستوسپور فرموله شده تازه

FL(1) = بلاستوسپور فرموله شده یکماه نگهداری شده در قفسه آزمایشگاه

FL(7)= بلاستوسپور فرموله شده هفت ماه نگهداری شده در قفسه آزمایشگاه

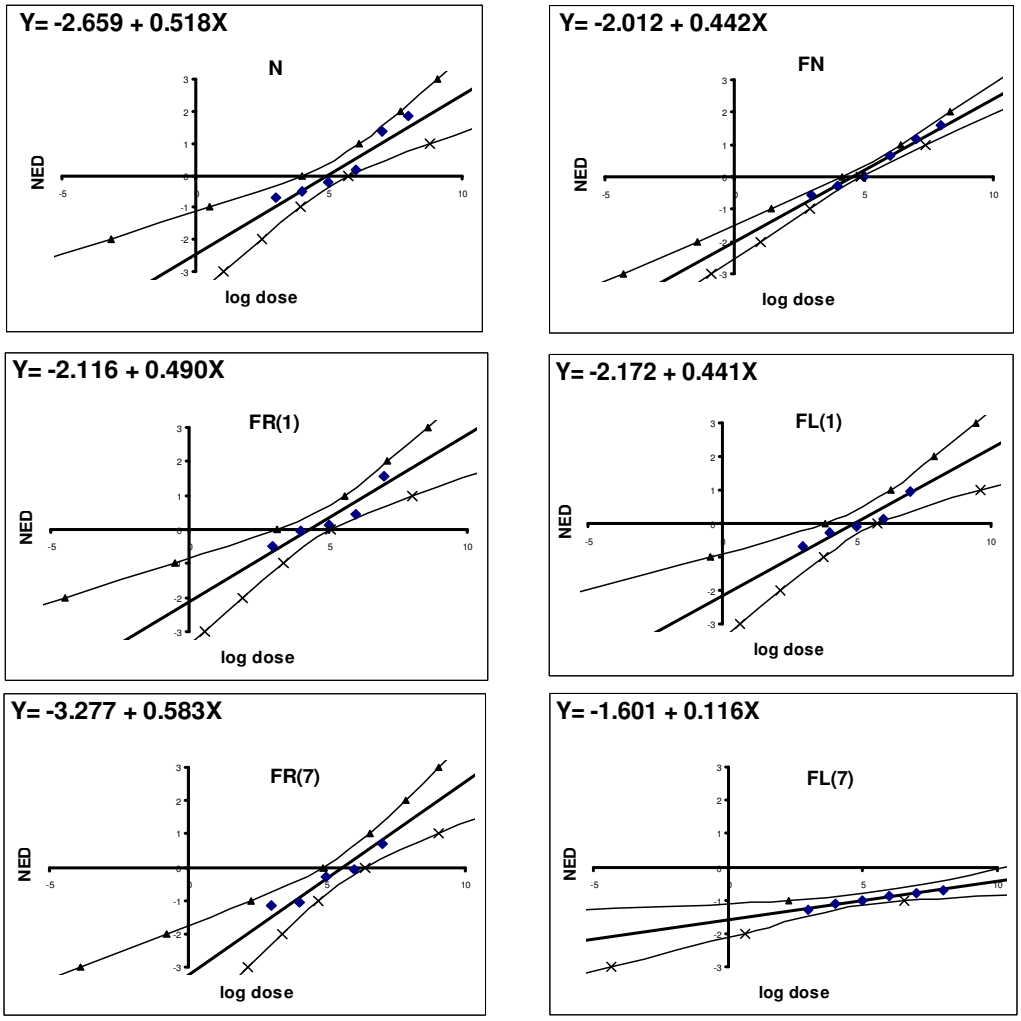
FR(1)= بلاستوسپور فرموله شده یکماه نگهداری شده در یخچال

FR(7)= بلاستوسپور فرموله شده هفت ماه نگهداری شده در یخچال

جدول ۲- مقادیر LT_{50} محاسبه شده برای غلظت‌های مختلف فرمولاسیون پودری قارچ *L. muscarium* روی پوره سن دوم شته جالیز *A. gossypii*

Table 2. Estimated LT_{50} values for different concentrations of powdery formulation of *L. muscarium* on 2nd nymphal instar of *A. gossypii*

غلظت Concentrations	10^6			10^7			10^8		
تیمارها Treatments	حد پایین Lower fiducial limit	برآورد LT_{50} Estimated LT_{50}	حد بالا Upper fiducial limit	حد پایین Lower fiducial limit	برآورد LT_{50} Estimated LT_{50}	حد بالا Upper fiducial limit	حد پایین Lower fiducial limit	برآورد LT_{50} Estimated LT_{50}	حد بالا Upper fiducial limit
N	10	9	–	8	8	9	7	8	8
FN	9	8	9	–	7	–	7	8	8
FL(1)	9	9	–	8	8	9	–	7	–
FL(7)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FR(1)	9	8	10	7	8	8	–	6	–
FR(7)	–	10	–	7	7.5	9	6	7	7



شکل ۱- نمودار غلظت-مرگ و میر در۶ آزمایش زیست سنجی فرمولاسیون پودری قارچ *L. muscarium* روی پوره سن ۲ شته جالیز *A. gossypii*

Fig. 1. Concentration-mortality linear regression of powdery formulations for *L. muscarium* on second nymphal instar of *A. gossypii*

نتایج بدست آمده از زیست‌سنجی شش نمونه قارچ مورد نظر روی پوره سن دوم شته جالیز در شرایط آزمایشگاهی، زهرآگینی قارچ را روی این میزبان اثبات نمود. این امر با یافته‌های بسیاری از محققین داخلی (Ashouri *et al.*, 2003; Safavi *et al.*, 2002) و خارجی (Hall, 1981 and 1976; Askary *et al.*, 1998) در مورد بیمارگری این قارچ روی شته‌ها به صورت عام و بخصوص روی شته جالیز (Helyer *et al.*, 1992; Pinna, 1992; Karindah *et al.*, 1996) مطابقت دارد. جدول مقایسه میانگین تیمارها (جدول ۱) در هر شش نمونه قارچ مورد آزمایش افزایش تلفات را متناسب با افزایش غلظت در سطح یک درصد نشان داد. تلفات بیشتر از ۵۰ درصد در طول مدت آزمایش (۱۰ روز) فقط در غلظت‌های $۱۰^{۶}$، $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ مشاهده گردید که با گزارش Hincapie *et al.* (1990) در خصوص اثر این قارچ روی شته سبز هلو هماهنگی دارد.

با توجه به حدود اطمینان بالا و پایین محاسبه شده برای LC_{50} و رویهم افتادگی آن‌ها، اختلاف معنی‌دار بین پنج نمونه مورد آزمایش مشاهده نمی شود و تنها نمونه فرموله شده هفت ماه نگهداری شده در قفسه آزمایشگاه با دیگران تفاوت معنی دار دارد. LC_{50} محاسبه شده برای قارچ‌های فرموله شده کمتر از قارچ تازه بوده، که نشان دهنده مثبت بودن اثر فرمولاسیون می‌باشد. در بین قارچ‌های فرموله شده نیز، LC_{50} قارچ فرموله شده یک ماه نگهداری شده در یخچال تقریبا چهار برابر کمتر

از همان قارچ نگهداری شده در قفسه آزمایشگاه و حدود دو برابر کمتر از قارچ تازه فرموله شده است که ناشی از اثرات مثبت مواد غذایی و نگهدارنده موجود در فرمولاسیون و شرایط مناسب محیط نگهداری قارچ می‌باشد (Burges, 1998). LC_{50} قارچ فرموله شده هفت ماه نگهداری شده در یخچال تقریبا ۳ برابر بیشتر از قارچ تازه و ۱۶ برابر بیشتر از همان قارچ فرموله شده یک ماه نگهداری شده در یخچال می‌باشد. بزرگترین LC_{50} مربوط به فورمولاسیونی است که بمدت هفت ماه در شرایط آزمایشگاه نگهداری شده و موجب مرگ و میر کمتری روی شته ها شده‌است.نتایج فوق نشان‌دهنده تاثیر مثبت کاهش درجه حرارت محیط انبار در زنده‌مانی و حفظ کارآیی اسپور قارچ می‌باشد (Burges, 1998). LC_{50} محاسبه شده در این آزمایش‌ها با نتایج بدست آمده روی شته سبز هلو (Ashouri *et al.*, 2003)، روی شته نخود فرنگی(Safavi *et al.*, 2002)، روی شته جالیز (Karindah *et al.*,1996)، و شته *Macrosiphum euphorbiae* (Askary *et al.*,1998) مطابقت دارد.

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۲ و حدود اطمینان بالا و پایین محاسبه شده برای LT_{50}، تنها در غلظت 10^8 بلاستوسپور در میلی‌لیتر بین تیمار قارچ فرموله شده یکماه نگهداری شده در یخچال با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود دارد. در تیمار قارچ فرموله شده هفت ماه نگهداری شده در قفسه آزمایشگاه تلفات ۵۰ درصد مشاهده نگردید. بین سایر تیمارها در غلظت‌های مختلف به دلیل رویهم افتادگی حدود اطمینان اختلاف معنی‌دار مشاهده نمی‌شود، هر چند که در برآورد میزان LT_{50} تفاوت مشاهده می‌شود. این نتایج با یافته‌های Ashouri *et al.*, (2003) و Safavi *et al.* (2002) سازگاری دارد.

معادله خط رگرسیون بین لگاریتم غلظت‌های بکار رفته و پروبیت مرگ و میر در شش آزمایش زیست‌سنجی در شکل ۱ ارائه شده است. شیب خطوط رگرسیون در محدوده ۰/۱ تا ۰/۵ قرار دارد، که نشان دهنده شیب ملایم است که از ویژگی‌های عوامل بیولوژیک می‌باشد. شیب ۰/۱ مربوط به قارچ فرموله شده هفت ماه نگهداری شده در آزمایشگاه بوده که نشان دهنده تاثیرپذیری منفی بلاستوسپور و کاهش زنده مانی قارچ در اثر نگهداری در شرایط نامساعد می‌باشد.

نمودارهای درصد زنده‌مانی در هر شش مورد آزمایش نشان می‌دهد که تلفات در شته‌ها ٤-٥ روز بعد از اسپورپاشی شروع شده و در روزهای بعد افزایش می‌یابد. این امر نشان می‌دهد که برای تاثیر قارچ روی شته مدت زمانی در حد ٤-٥ روز لازم است تا بلاستوسپور جوانه زده و از کوتیکول عبور کرده و در همولنف شته تکثیر یابد. Askary *et al.* (1998) و Safavi *et al.* (2002) این زمان را برای شته‌های مورد آزمایش سه تا چهار روز ذکر کرده‌اند. این مدت زمان با توجه به درجه حرارت و رطوبت نسبی محیط می‌تواند کم یا زیاد گردد، ضمن اینکه پوست اندازی سریع شته مورد آزمایش، نیز در کند کردن تاثیر قارچ، موثر می‌باشد.

در مجموع نتایج بدست آمده از زیست‌سنجی قارچ روی پوره سن دو شته جالیز، زهرآگینی بلاستوسپور قارچ *Lecanicillium muscarium* تولید شده در عصاره سیب زمینی فاقد هرگونه ماده غذایی دیگر، و فرمولاسیون انتخاب شده را روی شته جالیز اثبات می‌کند. ضمن این که می‌توان با دستکاری در محیط غذایی، زمینه بهبود کیفی بلاستوسپور تولید شده، سازگاری اکولوژیکی بهتر اسپور در محیط و در نتیجه دستیابی به نتایج بهتر در کنترل آفات و بیماری‌ها را فراهم کرد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی و موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور می‌باشد. نگارندگان مراتب سپاسگزاری خود را از آقای دکتر رسول زارع برای شناسائی جدایه قارچ مورد آزمایش و مسئولین محترم موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور برای تامین اعتبار و ملزومات مورد نیاز طرح اعلام می‌دارند.

References

ASHOURI, A., N. ARZANIAN and H. ASKARY, 2003. Interactions of *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas and *Adonia variegata* (Col.: Coccinellidae), pathogen and predator of aphids. Colloque international tomate sous abri, protection integree– agriculture biologique, Avignon, France, pp. 158-162.

ASKARY, H., Y. CARRIER, R. R. BELANGER and J. BRODEUR, 1998. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildow. Biocontrol science and technology. 8: 23-32.

BRODEUR, J. 1998. Un champignon pour remplacer les pesticides. Available at: http://www. cyberscience. com/cyber/3.0/n887.asp.

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

BUTT, T. M., C. JACKSON and N. MAGAN, 2001. Introduction-fungal biological control agents progress, problems and potential. In: Fungi as biocontrol agents, progress, probloems and potentials. T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds.). CABi publishing U.K. pp. 1-8.

FARSI, M. J., H. ASKARY, KH. TALEBI and A. KHARRAZI PAKDEL, 2005a. Effect of important ecological factors on blastospore production of *Verticillium lecanii* DAOM 198499 in liquid medium. Iranian Journal of Agricultural Sciences. 36(1), 109-119. (in Persian with English summary).

FARSI, M. J., H. ASKARY, KH. TALEBI and A. KHARRAZI PAKDEL, 2005b. Ecological factors affecting growth and sporulation of fungus *Lecanicillium muscarium* in solid media. Iranian Journal of forest and rangeland protection research. 3(1), 1-21 (in Persian with English summary).

FARSI, M. J., H. ASKARY, KH. TALEBI and A. KHARRAZI PAKDEL, 2003. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* (=*Lecanicillium muscarium*) on brown tail moth *Euproctis chrysorrhoea* (L.) larvae. at laboratory condition. Pajoohesh &Sazandegi in Natural Resources. 60, 52-58. (in Persian with English summary).

HALL, R. A. 1976. A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* conidiospore on the aphid, *Macrosiphoniella sanbornii.* Journal of Invertebrate pathology, 27: 41-48.

HALL, R. A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphid and scale. In: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. H. D Burges. (ed.) Academic Press, London. pp. 483-498.

HELYER, N. 1993 *Verticillium Lecanii* for control of aphids and thrips on cucumber. Bulletin OILB-SROP. 16:2, 63-66.

HELYER, N., G. GILL and A. BYWATER, 1992. Control of *Chrysanthemum* pests with *Verticillium lecanii*. Phytoparasitica. 20:suppl., 5-9.

HINCAPIE, V. R., Z. H. A. OSPINA, P. A. E. BUSTILLO and V. A. SALDARRIAGA, 1990. Evaluation of the entomopathogen *Verticillium lecanii* in the control of the aphid *Myzus persicae* on chrysanthemum. Revista Colombiana de Entomologia. 16: 2, 21-27.

INGLIS, G. D., M. S. GOETTEL, T. M. BUTT and H. STATHERS, 2001. Use of hyphomycetous fungi for insect pests. In: T. M. Butt, C. Jackson and N. Magon (eds.). Fungi as biocontrol agents. CABI publishing, UK. pp. 23-69.

KARINDAH, S., B. RAHARDJO, T. SUDAKIR and S. SANTOSO, 1996. Virulence of the fungus *Verticillium lecanii* Zimmermann. against *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). Agrivita. 19:1, 30-34.

MAGAN, N. 2001. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. In: Fungi as biocontrol agents. T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds.). CABI Publishing U. K. pp. 239-251.

MEHRASA, A. 2003. Interaction study of *Encarsia formusa* and fungus *Verticillium lecanii* on *Trialeurodes vaporariorum*. Agricultural entomology MS. Thesis. Tehran university. Agricultural faculty. (in Persian with English summary)

PINNA, M. 1992. Use of *Verticillium lecanii* (zimm.) for the

STIRMANOVA, N. I. 1994. New commercial form of fungal preparations. Zashchita Rastenii Moskova. 9: 7-8.

WRAIGHT, S. P., M. A. JACKSON and S. L. De KOCK, 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Fungi as biocontrol agents. T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds.). CABI, PP. 233-287.

ZARE, R. and W. GAMS, 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. Nova Hedvigia. 73: 1-2, 1-50.

biological control of *Aphis gossypii* (Glover) on cucumber in protected cultivation. Informatore Fitopatologico. 42:10, 56-58.

SAFAVI, S. A., G. RASOLIAN, H. ASKARY and A. KHARAZI PAKDEL, 2002.Pathogenisity study of *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas on *Acyrtosiphon pisum* in laboratory conditions. Journal of Sciences and Technology of Agricultural and Natural Resources. 6(1), 245-255. (in Persian with English summary)