

نگارش : محمد حسن صفر علیزاده (۱) (سازمان حفاظت محیط زیست)

بررسی اثر بیماری زائی باکتری *BACILLUS THURINGIENSIS*

روی لاروهای برگخوار بلوط (۲)

خلاصه

اثر باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای پروانه برگخوار بلوط (*L. wiltshirei*) در آزمایشگاه مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته و نحوه تأثیر آن بوسیله آزمایشهای سیتولوژیک دنبال شده است. سه سوش از باکتری و از محصول تجارتي آن در این آزمایشها مورد استفاده قرار گرفته اند که تا اندازه ای اثر مشابهی دارند و هر سه سوش مرگ و میر قابل توجهی در لاروهای برگخوار بلوط ایجاد میکنند. تکثیر باکتری در بدن لاروهای بیمار ۳۶ ساعت بعد از تغذیه از ماده غذائی آلوده مشاهده میشود. مرگ و میر حاصله در ساعت های اولیه در اثر ایجاد مسمومیت بوسیله توکسین های باکتری و در روزهای بعد در نتیجه تأثیر دوجانبه توکسین و تکثیر باکتری میباشد. از علائم بارز این بیماری قطع فوری تغذیه لاروها و فلج دستگاه گوارش است.

مقدمه

دشت ارژن با وسعت تقریبی ۱۹ هزار هکتار در غرب شیراز واقع شده و از لحاظ حیات وحش و پرندگان مهاجر غنی میباشد و بدین جهت از نظر فعالیت های محیط زیست محافظت شده اعلام گردیده است. مساحت قسمتهای محافظت شده در حال حاضر به حدود ۶۵۷۵۰ هکتار میرسد. پوشش گیاهی جنگلهای دشت ارژن از درختان جنگلی نظیر بلوط، بادام کوهی و پسته جنگلی تشکیل یافته که گونه غالب آنرا بلوط تشکیل میدهد.

(۱) دکتر محمد حسن صفر علیزاده - تهران، صندوق پستی ۱۴۳۰

(2) *Leucoma wiltshirei* Coll. (LEP. LYMANTRIIDAE)

بلندترین نقطه این منطقه ۳۰۴۱ متر و پست‌ترین آن ۸۵۰ متر از سطح دریا ارتفاع دارد بنابراین از نظر اقلیمی بدو منطقه سردسیر در شمال و گرمسیر در جنوب تقسیم‌میشود و میزان متوسط بارندگی آن در سال بین ۴۰۰ - ۶۰۰ میلی‌متر است.

بطور کلی در منطقه دشت ارژن بعثت چرای بی‌رویه و قطع نادرست شاخه‌ها و استفاده غذایی از میوه درختان بلوط زادآوری طبیعی در جنگلهای آن بخوبی صورت نگرفته و بیشتر جنگلهای آن تنک می‌باشند در صورتیکه اگر از این جنگلها بهره‌برداری صحیح انجام‌گیرد از نظر تعدیل آب و هوا، جلوگیری از فرسایش خاک و ایجاد فضای سبز و همچنین جلب حیوانات وحشی گوناگون اهمیت فوق‌العاده‌ای خواهد داشت.

گذشته از موارد فوق خطری که از سال ۱۳۵۲ درختان بلوط دشت ارژن رابیش از همه مورد تهدید قرار داده است پروانه‌ایست بنام *Leucoma wiltshirei*. از آنجائیکه کاربرد سموم شیمیائی در مناطق جنگلی و در مساحت زیاد پیش آمده‌های ناگواری در بر خواهد داشت و باعث نابودی حشرات مفید و طغیان مجدد آفت فوق و بروز سایر آفات خواهد شد بنابراین کاربرد عوامل میکربی بهترین و مؤثرترین روش پیکار خواهد بود.

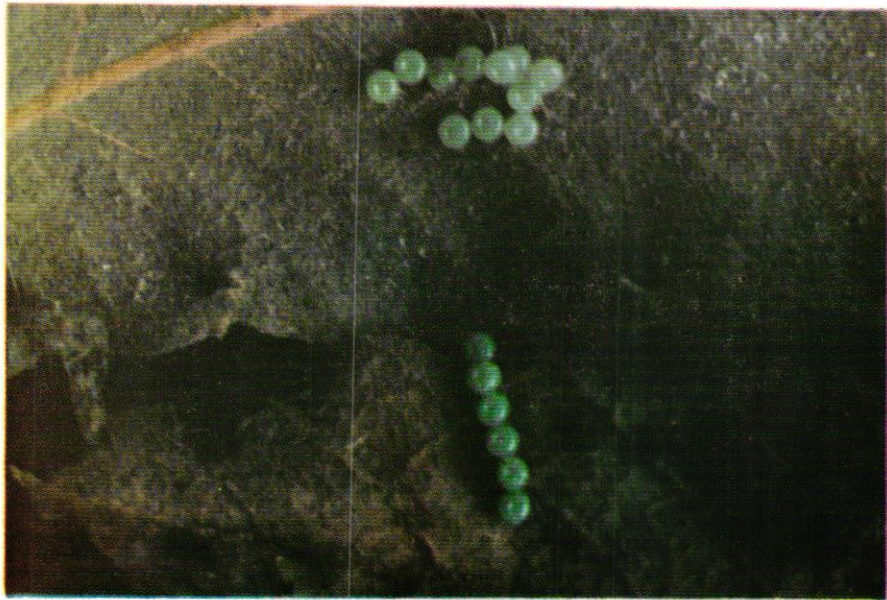
در این مقاله نحوه تأثیر و نتیجه چندین سوش باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای این حشره در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفته است.

شناسائی حشره *L. wiltshirei* Coll.

حشره مذکور پروانه‌ای است از خانواده *LYMANTRIIDEA* برنگ سفیدشیری که عرض آن با بالهای باز بین ۳۰ - ۳۸ میلی‌متر میباشد، پروانه‌های ماده ۲۴ ساعت بعد از جفت‌گیری شروع به تخم‌گذاری کرده و بعد از ۸ تا ۱۰ روز (در درجه حرارت ۲۵ - ۳۰ درجه) لاروهای ریزی بطول ۳ تا ۴ میلی‌متر برنگ سفید مایل بزرده نارنجی از آنها خارج میشوند که در آخر دوره رشد و نمو خود به ۱۸ - ۲۰ میلی‌متر میرسند (شکل ۱، ۲، ۳ و ۴)



شکل ۱ - خسارت شدید لاروهای برگ‌خوار بلوط روی درختان بلوط



شکل ۲ - تخم‌های پروانه برگ‌خوار بلوط



شکل ۳ - لاروهای برگ‌خوار بلوط در سنین مختلف



شکل ۴ - شفیره‌های برگ‌خوار بلوط

شکل شناسی و بیولوژی کامل این حشره توسط میرزایانس و عبائی در سال ۱۳۵۲ مورد مطالعه قرار گرفته است.

اطلاعات مختصری درباره باکتری *B. thuringiensis*

اثر *B. thuringiensis* روی تعدادی از آفات فرآورده‌های کشاورزی در سالهای اخیر موجب گردید که محصولات صنعتی این باکتری برای مبارزه علیه بعضی از آفات زراعی و جنگلی و درختان میوه توصیه شود.

بی‌اثر بودن این حشره کش میکربی روی حشرات انگل و شکاری که در تنظیم تعادل طبیعی اهمیت دارند و بالاخره بی‌ضرر بودن این حشره کش روی حیوانات خون‌گرم و انسان موجب گردیده که استعمال باکتری *B. thuringiensis* در شرایط مختلف مورد استفاده قرار گیرد (STEINHAUS 1959). علاوه بر این برای مبارزه با لاروهای برگ‌خوار درختان خیابانها و پارکها و مناطقی که تراکم جمعیت شهری در آنها زیاد است و یا در درختکاریهایی که در میان شهرها و یا مناطق مسکونی و یا جهانگردی وجود دارند بیشتر از این روش استفاده میگردد (VAN DER LEAN 1962 - GRISON 1961). در حال حاضر وارپته‌های متعددی از تیپ *B. thuringiensis* شناخته شده‌اند و مطالعاتی که توسط DE BARJAC et BONNEFOI 1961 انجام شده نشان داده‌است که تعداد ۲۶۴ سوش از این باکتری وجود دارند که از نظر بعضی از خواص مورفولوژی و بیوشیمیائی مشترک هستند.

(DE BARJAC et BONNEFOI 1973) در سال ۱۹۷۳ سوش‌های *B. thuringiensis* را برحسب خصوصیات آنتی ژنیک تاژک‌ها به ۱۲ سروتیپ (Serotype) تقسیم کرده‌است در هر سروتیپی سوش‌ها دارای خواص بیوشیمیائی مشترک هستند .

این واریته‌ها تشکیل گروه *B. thuringiensis* را میدهند که از *B. cereus* بوسیله تشکیل توکسین کریستالین در موقع اسپرلاسیون تشخیص داده میشوند .

باکتریهای *B. thuringiensis* بفرم باسیل ، بابعاد ۳ تا ۶ میکرون متحرک و گرام مثبت بوده و موقع اسپر دادن تولید توکسین‌های کریستالین میکنند که این توکسین‌ها برای اغلب لاروهای خانواده‌های مختلف پروانه‌ها سمی میباشند (تاکنون حدود ۱۴ گونه از لاروهای خانواده‌های مختلف پروانه‌ها به باکتری *B. thuringiensis* و محصولات صنعتی آنها حساس شناخته شده‌اند) . توکسین‌های کریستالین در لارو پروانه‌ها تولید مسمومیت حاد میکند که در نتیجه آن تغذیه لاروها قطع میشود (این خاصیت توکسین‌ها اهمیت حشره کشی این باکتری‌ها را در مبارزه با آفات بیشتر میکند) .

B. thuringiensis برای اولین بار در سال ۱۹۱۱ و ۱۹۱۵ بوسیله BERLINER کشف گردید و تا کنون پژوهش‌های زیادی درباره اثر این باسیل روی حشرات گوناگون انجام یافته و نتایج درخشان آن موجب شده است که کارخانه‌های زیادی این حشره کش میکروبی را بصورت تجارتنی ساخته و بازار عرضه کنند . در حال حاضر محصول تجاری این باکتری باسامی متفاوتی وجود دارد .

اثر باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای خانواده LYMANTRIIDAE

بررسی‌های انجام یافته بوسیله کارشناسان خارجی از جمله (BURGERJON et BIACHE 1967) نشان داده است که پروانه‌های *Euproctis chrysorrhoe* و *Lymantria dispar* L. باین باکتری حساس بوده و در مبارزه با این حشرات توصیه شده است .

حشرات خانواده LYMANTRIIDAE یکی از آفات مهم درختان جنگلی هستند پژوهش درباره بیماریهای باکتریائی و ویروسی در این خانواده جهت کاربرد آنها در مبارزه بیولوژیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است .

روش کار

جهت تشخیص اثر بیماری زائی سوش‌های مختلف باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای برگخوار بلوط از سه سوش *B. thuringiensis thuringiensis* ، *B. thuringiensis euxoae* ، *B. thuringiensis dendrolimus* که در محیط غذائی آگار کشت داده شده بودند و همچنین از محصول صنعتی این باکتری بنام « Bactospèie » در آزمایشگاه استفاده گردیده است . بدین ترتیب که محلولی از یک کشت ۷ روزه (محیط کاملاً اسپروله و کریستالیزه) از سوش‌های بالا و همچنین محلولهای نیم ، یک و دوهزار از فرآورده صنعتی Bactospèine تهیه شد و برگهای بلوط را باین محلول‌ها آغشته نموده و بعد از تبخیر رطوبت حاصله برگهای آغشته به آب معمولی بعنوان شاهد در نظر گرفته شده‌اند . بعد از ۳-۴ ساعت بجای برگهای آلوده برگهای سالم قرار داده‌ایم .

این آزمایشها روی لاروهای سن آخر و لاروهای سن دو انجام گرفته‌اند .

نتیجه

تعداد ۲۰ عدد لارو در سنین آخر هر گروه روی برگهای آلوده و شاهد قرار داده و در هر ۲ ساعت نتیجه آزمایش یادداشت میشده و نکته قابل توجه اینکه لاروها در اولین ساعتهای تماس با برگهای آلوده از تغذیه باز ایستاده و هیچگونه اشتعائی به تغذیه نداشته‌اند در صورتیکه لاروهای شاهد بطور عادی تغذیه کرده‌اند. مرگ و میر لاروهای آلوده بعد از ۱۸ ساعت شروع گردید و بطوریکه جدول ۱ نشان میدهد در ۲۴ ساعت اول تعداد ۷ تا ۷ درصد از لاروها مرده و در سوشهای مختلف درصد مرگ و میر در گروه‌ها متفاوت بودند در صورتیکه هیچگونه مرگ و میری در گروه شاهد مشاهده نشده است (جدول ۱ و ۲)

جدول ۱ - درصد مرگ و میر لاروهای برگخوار بلوط بعد از آلوده شدن با باکتریهای *B. thuringiensis* (سن آخر لاروی)

نوع باکتری	تعداد لارو در هر گروه	روز بعد از آلودگی (درصد تلفات لاروها)					درصد مرده در حالت شفیرگی	درصد زنده	جمع تلفات
		۱	۲	۳	۴	۵			
Bactospeine محصول صنعتی دو در هزار	۲۰	۷۵	۱۵	—	—	—	۱۰	—	۱۰۰
<i>B. thuringiensis thuringiensis</i>	۲۰	۵۰	—	—	—	—	۳۰	۲۰	۸۰
<i>B. th. dendrolimus</i>	۲۰	۷۰	—	۱۰	—	—	—	۲۰	۸۰
<i>B. th. euxoae</i>	۲۰	۴۰	—	۲۰	۱۰	—	—	۳۰	۷۰
Control	۲۰	—	—	—	—	—	—	۱۰۰	—

لاروهای آلوده و بیمار بسیار ضعیف شده و قدرت حرکت نداشته و رنگ آنها در ساعتهای اول مرگ تبدیل به قهوه‌ای مایل بسپاه میگردد. تعداد دیگری از لاروهای آلوده از روز دوم و سوم تبدیل بشفیره شده که بعضی از آنها در حالت شفیرگی در اثر بیماری مردند. آزمایش دیگری که روی لاروهای سن ۲ با نسبت دو، یک و نیم گرم در هزار سانتیمتر مکعب آب با Bactospeine انجام گرفت، نشان داد که این لاروها نسبت به باکتری *B. thuringiensis* نیز حساسیت زیادی نشان داده و مرگ و میر حاصله در هر سه نسبت قابل توجه بوده است و حساسیت لاروها در سنین ۲ بیشتر از سنین آخر است (جدول ۲ مرگ و میر حاصله را در سه روز اول آزمایش نشان میدهد).

جدول ۲ - درصد مرگ و میر لاروهای برگ‌خوار بلوط (سن ۲) بعد از آلوده شدن با باکتری (محصول صنعتی Bactospèine)

غلظت	تعداد لارو در هر گروه	درصد لاروهای مرده بعد از					
		۲۰ ساعت	۳۶ ساعت	۴۸ ساعت	۳ روز	۴ روز	۵ روز
۲ گرم در یک لیتر آب	۱۰	۵۰	۲۰	۱۰	۱۰	—	۱۰
۱ گرم در یک لیتر آب	۱۰	۵۰	۱۰	۱۰	—	—	—
نیم گرم در یک لیتر آب	۱۰	۳۰	—	۲۰	—	—	۱۰
شاهد	۱۰	—	—	—	—	۱۰	—

آزمایش‌های سیتولوژیک و بررسی فرویتی‌ها در مراحل مختلف بیماری صورت گرفته است بدین ترتیب بوسیله پیمپ پاستور نوک تیزی از خون و قسمتهای داخلی بدن لارو برداشت کرده و فرویتی‌های تهیه شده بعد از رنگ آمیزی بوسیله میکروسکپ مورد بررسی قرار گرفته‌اند. رشد و نمو باکتریها در بدن لارو در ساعتهای اولیه پس از آلودگی بسیار ناچیز است و حتی تعداد باکتری‌های موجود در بدن لاروهای مرده در روز اول آزمایش بسیار کم بوده است و باکتریها فرصت ازدیاد نداشته‌اند و مرگ و میر حاصله محقق‌آدر اثر توکسین باکتریها بوده است. در صورتیکه در آزمایش‌های سیتولوژیک روزهای بعد بدن لاروها حاوی تعداد زیادی باکتری *B. thuringiensis* بوده‌اند. بنابراین مرگ و میر اولیه لاروها در اثر توکسین کریستالین بوده و در مراحل بعدی تکثیر باکتری شروع شده و لاروها در اثر بیماری حاصله بوسیله این باکتریها از بین رفته‌اند. بطور کلی از این آزمایش‌ها میتوان نتیجه گرفت که لاروها بلافاصله پس از اولین تغذیه مسموم شده و دستگاه گوارشی آنها فلج میشود که متعاقب آن تغذیه لاروها قطع شده بتدریج ضعف عمومی و بالاخره پس از ۱۸ ساعت مرگ و میر لاروها شروع شده و بعد از ۳۶ ساعت در اثر تأثیر دوگانه توکسین و تکثیر باکتری لاروها میمیرند و در طی این مدت لاروها هیچگونه تغذیه نکرده و روی برگها فقط آثار جزئی خسارت مشاهده میشود درحالیکه لاروهای شاهد بطور عادی به تغذیه خود ادامه میدهند.

با توجه بمطالب بالا این امیدواری وجود دارد که محصولات صنعتی این باکتری را در سطح وسیع در مبارزه با این آفت مورد استفاده قرار داده بنحویکه کمترین صدمه‌ای به محیط وارد نشده و هیچگونه آلودگی بوجود نیآورد.

آزمایشهای مقدماتی که بوسیله آقایان دکتر شجاعی و دکتر خرازی گروه گیاه پزشکی دانشگاه تهران (گزارش مأموریت) انجام گرفته و همچنین مبارزه وسیعی که در سال ۱۳۵۴ توسط محققین مؤسسه بررسی آفات و بیماریهای گیاهی اوین با همکاری کارشناسان حفظ نباتات و دانشکده کشاورزی کرج بوسیله محصول تجارتي Dipel, Bactospèine صورت گرفته و نتایج درخشانی که از این مبارزه بدست آمده است مؤید

اثرات بسیار خوب این باکتری در طبیعت میباشد .

بحث و نتیجه

از نتایج آزمایشهای بعمل آمده چنین استنباط میشود که باکتریهای *B. thuringiensis* بر روی لاروهای برگخوار بلوط مؤثر و بیماریزا بوده و در مدت زمان کمی تعداد زیادی از لاروها در اثر مسمومیت و بیماری از بین میروند .

از خصوصیات بیماری زائی این باکتری تولید مسمومیت حاد و فلج دستگاه گوارشی است که در نتیجه آن تغذیه، رشد و نمو لاروها قطع شده و متعاقب آن فعالیت اسپرها و تکثیر و ازدیاد باکتری در بدن لاروها شروع میشود که منجر به بیماری شدید و مرگ و میر لاروها در اثر (عفونت) سپتیمی خونی میشود. بطور کلی تأثیر دو جانبه این باکتریها اهمیت زیادی در مبارزه بیولوژیکی و قطع فوری خسارت دارند .

علائم زیر بعد از تولید بیماری در لاروهای برگخوار بلوط مشاهده شده است : فلج دستگاه گوارشی که در نتیجه آن تغذیه لاروها قطع شده ، بعد از آن فلج عمومی بدن که در نتیجه آن لاروها قادر به جابجا شدن و حرکت نبوده و بالاخره در اثر عفونت (۱) از بین میروند

لاروهای سن ۲ حساس تر از سنین آخربوده و حتی با غلظت های کمتری مرگ و میر در آنها ایجاد میشود بهترین موقع مبارزه باید موقعی باشد که حداکثر لاروها به سن ۲ و ۳ رسیده باشند ، چه در این موقع بیشتر تخمهای موجود تفریخ شده و حداکثر لاروها از بین خواهند رفت .

نگارنده از راهنمائیهای صمیمانه آقایان دکتر صفوی و مهندس عبائی تشکر می نماید .

(1) Septicemie