

بررسی اثر بیماری‌زایی قارچ بیمارگر

Beauveria bassiana (Balsomo) Vuillemin علیه حشرات کامل*Callosobruchus maculatus* (Col., Bruchidae) در شرایط آزمایشگاهیفرانک ابراهیمی^۱، علیرضا جلالی‌زند^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه حشره‌شناسی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه حشره‌شناسی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

چکیده

سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات یکی از مهمترین آفات محصولات انباری در سراسر جهان و ایران است که با تغذیه از دانه‌های حبوبات موجب خسارت‌های سنگین می‌شود. این پژوهش با هدف بررسی میزان کارایی جدایه MZ قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* (Balsomo) Vuillemin در کنترل سوسک چهار نقطه‌ای *Callosobruchus maculatus* (Col., Bruchidae) در آزمایشگاه و انتخاب مناسب‌ترین غلظت قارچ بیمارگر در کنترل بیولوژیک سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات انجام گرفت. بدین منظور سوسپانسیون کنیدی از قارچ‌ها با تیمارهایی به غلظت 10^4 و 10^5 و 10^6 و 10^7 کنیدی در میلی‌لیتر به همراه شاهد آب مقطر حاوی ترتیون به میزان $0/05$ درصد تهیه و استفاده شد. کلیه تیمارها در ۴ تکرار و در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی به روش اسپری کردن اجرا گردید. برای ارزیابی میزان تلفات حشرات بالغ، ۴ روز پس از پاشیدن قارچ تیمارها مورد بازدید قرار گرفت و میزان مرگ و میر تمامی غلظت‌ها تعیین گردید. میزان مرگ و میر در شاهد با استفاده از فرمول آبوت تصحیح شد. اطلاعات به دست آمده با استفاده از برنامه SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین‌ها به روش دانکن گروه‌بندی شدند. مقدار غلظت‌های کشته‌دهنده یا 50٪ (LC₅₀) و ۹۰٪ (LC₉₀) از جمعیت آفت محاسبه گردید. براساس محاسبه آماری انجام شده، ما بین تیمارهای آزمایش در سطوح ۱٪ و ۵٪ به ترتیب اختلاف معنی‌دار وجود داشت. غلظت 10^7 با ۹۱ درصد مرگ و میر بیش‌ترین تاثیر و تیمار شاهد (آب مقطر و توئین) و غلظت 10^4 به ترتیب با میانگین ۴ و ۲۸ کم‌ترین مرگ و میر را در سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات نشان داد. غلظت کشته‌دهنده برای ۵۰٪ و ۹۰٪ از جمعیت آفت توسط قارچ *B. bassiana* محاسبه گردید که به ترتیب $10^4 \times 5/4888$ و $10^6 \times 5/493071$ اسپور در میلی‌لیتر بود.

واژه‌های کلیدی: سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، *Beauveria bassiana*، کنترل بیولوژیک

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: arjalalizand@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۲/۱۷ - تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸/۵/۱۶



اروپا، سرخرطومی غوزه پنبه *Anthonomus grandia* (Boheman, 1843) و مگس سفید *Bemisia tabaci* در ایالات متحده آمریکا، سن گندم *Eurygaster spp* در خاورمیانه، بید کلم *Plutella xylostella* در کشور مالزی، سوسک چوبخوار کاج *Monochamus alternatus* در کشور ژاپن، کرم کاج *Dendrolimus punctatus* و کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت *Ostrinia nubilis* در کشور چین استفاده شده است. (Asadollah pour et al., 2011).

با توجه به گسترش روز افزون استفاده از قارچ *Beauveria bassiana* (Balsomo) vuillemin در این تحقیق اثر بیماری‌زای قارچ علیه حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات (*Callosobruchus maculatus* (Col: Bruchidae) در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت قارچ بیمارگر و تهیه غلظت‌های مختلف آن

در این آزمایش از جدایه Mz قارچ *Beauveria bassiana* تهیه شده از موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور استفاده گردید. برای تهیه محیط کشت SDAY¹ در آب مقطر مخلوط و حرارت داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو استریل گردید و آنگاه در پتری دیش‌های پلاستیکی به قطر ۸ سانتی‌متر منتقل و پس از کشت جدایه فوق در پتری‌ها، اطراف درب پتری‌هایی به قطر ۸ سانتی‌متر ریخته شد. پس از آماده کردن پتری‌های محیط کشت، قارچ در پتری‌های حاوی محیط کشت منتقلو اطراف درب پتری‌ها توسط پارافیلیم عایق شد.

سپس پتری‌ها داخل آون در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از اسپورزایی قارچ‌ها (حدود ۳ هفته بعد از کشت) در شرایط استریل و در زیر هود، سطح کشت را با اسکالپل خراش داده و به لوله فالکون ۲۰ میلی‌لیتری حاوی آب مقطر استریل منتقل و سپس Tween 80 ۰/۰۵ درصد اضافه شد. مخلوط تهیه شده پس از ورتکس کردن، در نهایت به حجم مخلوط ۲۰ میلی‌لیتر رسید و مجدداً مخلوط به دست آمده ورتکس گردید. به منظور پراکنده شدن یکنواخت اسپورها، محلول فوق به مدت ۵ دقیقه توسط شیکر^۲ به هم زده شد. سپس از لام گلبول شمار^۳ برای تعیین غلظت سوسپانسیون حاصله استفاده شده و در نهایت با رقیق کردن توسط آب مقطر استریل، سایر غلظت‌های مورد نظر از کنیدی شامل (۱۰^۴ و ۱۰^۵ و ۱۰^۶ کنیدی در میلی‌لیتر) تهیه شد.

برای اطمینان از حفظ خاصیت جوانه‌زنی اسپورها تست زنده مانی کنیدی‌ها انجام گرفت. بدین منظور سوسپانسیون خیلی رقیقی از قارچ روی تشت‌های پتری حاوی آب، آگار در شرایط استریل پخش شد. کشت‌ها در دمای اتاق نگه‌داری شدند و پس از گذشت ۱۶-۱۸ ساعت، به شمارش اسپورهای جوانه زده در بین ۱۰۰ اسپور تصادفی در یک گوشه لام اقدام شد. سه گوشه لام به طور تصادفی بررسی شد. در این آزمون بلاستوسپورهایی جوانه زده محسوب می‌شدند که حداقل به اندازه نصف قطرشان جوانه زده بودند. در تمامی آزمایش‌ها در صد جوانه‌زنی حدود ۹۵ درصد بود.

پرورش سوسک چهار نقطه‌ای

سوسک‌های چهار نقطه‌ای حبوبات *C. maculatus* از روی محصولات انباری آلوده جمع‌آوری گردیدند و در شرایط آزمایشگاهی روی دانه‌های لوبیا چشم‌بلبلی در تاریکی و شرایط دمایی ۱ ± ۲۷ سلسیوس در اتاقک شیشه‌ای پرورش داده شدند.

1. Suberbed Dextrose Agar +Yeast extract
2. Shaker
3. Hemocytometer

آلوده‌سازی به صورت پاشش مستقیم قارچ روی کاغذ صافی

حشرات کامل هم سن شده (۲۴ ساعته) به داخل پتری آزمایشگاه (۱۰ حشره در هر پتری) قرار داده شدند هر پتری مخصوص یک تکرار از هر تیمار بود، قبلا کاغذ صافی هر پتری دیش با غلظت معینی از کنیدی آلوده شده بود. غلظت 10^7 کنیدی در میلی‌لیتر به عنوان غلظت حداکثر انتخاب شد. آنگاه سایر غلظت‌ها شامل 10^6 و 10^5 و 10^4 کنیدی در میلی‌لیتر از غلظت پایه تهیه شده محلول آب مقطر استریل به همراه ۰/۰۵ درصد از توئین ۸۰ به‌عنوان شاهد استفاده گردید.

تاثیر جانبی قارچ بیمارگر *Beaurveria bassiana* روی مرحله بالغ سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات

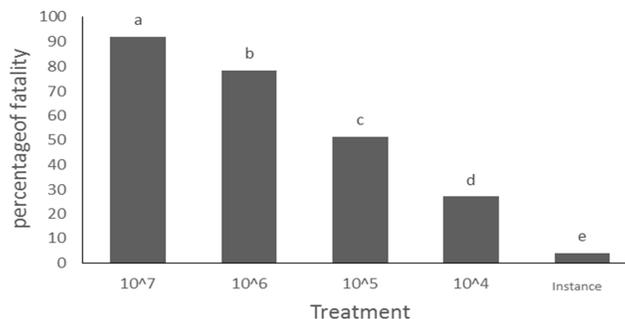
سوسپانسیون کنیدی از قارچ‌ها با تیمارهایی به غلظت 10^4 و 10^5 و 10^6 و 10^7 کنیدی در میلی‌لیتر به همراه شاهد آب مقطر حاوی ترتیون با میزان ۰/۰۵ درصد تهیه و استفاده شد. حشرات بالغ نر و ماده به مدت نیم دقیقه به روش پاشش در معرض غلظت‌ها قرار گرفتند. برای ارزیابی میزان تلفات حشرات بالغ ۴ روز بعد مورد بازدید قرار گرفت و میزان مرگ و میر تمامی غلظت‌ها پس از ۱۵ روز ثبت گردید. هر تیمار چهار بار تکرار شد و هر تکرار شامل ۱۰ حشره بود.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی اثر بیماری زایی قارچ بیمارگر تست شده در آزمایشگاه، داده‌های مرگ و میر توسط فرمول آبتوت تصحیح شده و سپس توسط تجزیه واریانس SAS تجزیه گردید. هم چنین مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد براساس طرح پایه کاملا تصادفی با نرم افزار SAS انجام شد. پروبیت اثر قارچ بیمارگر نیز بر درصد تلفات در محیط Minitab مشخص گردید. به‌منظور بررسی‌های زیست‌سنجی و محاسبه $Lc50, Lc90$ و حدود بالا و پایین از نرم‌افزار SAS استفاده شد. و رسم نمودارها در محیط excel انجام شد.

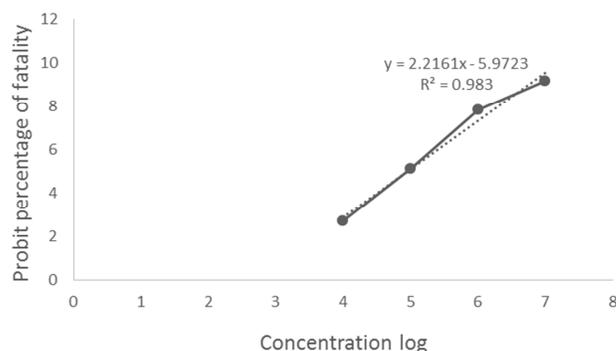
نتایج

براساس نتایج به‌دست آمده مطابق شکل ۱ مشخص گردید که بین تیمارهای مختلف از لحاظ درصد تلفات بالغین تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ وجود دارد به طوری که غلظت 10^7 با میانگین ۹۱ درصد بیشترین و تیمار شاهد آب مقطر و توئین ۸۰ درصد و غلظت 10^4 به ترتیب با میانگین ۴ و ۲۸ درصد کمترین درصد تلفات را داشتند.



نمودار ۱- مقایسه میانگین تیمارها بر درصد تلفات سوسک چهار نقطه‌ای

Fig. 1- Comparison of Mean of treatments on the mortality percentage of *Callosobruchus maculatus*



نمودار ۲- پروبیت اثر قارچ بیمارگر بر درصد تلفات سوسک چهارنقطه‌ای

Fig. 2- Probit of the effect of pathogenic fungi on mortality percentage of *Callosobruchus maculatus*

با استفاده از نرم‌افزار SAS مقدار غلظت کشنده برای ۵۰٪ (LC50) و ۹۰٪ (LC90) از جمعیت آفت محاسبه گردید و حدود بالا و پایین آن مشخص گردید. LC50 و LC90 جمعیت آفت به ترتیب $10^4 \times 4888$ و $10^6 \times 49307$ محاسبه گردید. / ۵

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق، نشان داد قارچ‌های بیماری زای حشرات دارای تاثیرات متفاوت و معنی داری روی مرگ و میر حشرات بالغ سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات در آزمایشگاه می‌باشند که با مطالعات وو و همکاران مطابقت داشت (Vu et al., 2007)

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که درصد مرگ و میر آفت با غلظت کنیدی‌های هر جدایه نسبت مستقیم داشت که این نتیجه با مطالعات صفوی و همکاران مطابقت داشت (Safavi et al., 2010).

اسدالله پور و همکاران گزارش کردند که دو جدایه از قارچ *B.bassiana* روی سوسک کلرادو *Leptinotarsa L. decemlineata* ایجاد بیماری می‌کنند و با افزایش غلظت اسپور قارچ‌ها درصد مرگ و میر لاروها افزایش یافت. (Asadollah pour et al., ۲۰۱۱).

الکسی و همکاران نیز گزارش کردند که استفاده از غلظت‌های بالای سه جدایه از قارچ *B.bassiana* روی شته‌های بی بال کامل *Aphis craccivora koch* سبب ۵۸ تا ۱۰۰٪ تلفات شد. (Elkesi et al., 2000).

همچنین نتایج حاصل از مطالعات مهد نشین و همکاران که نشان داد در میان غلظت‌های مورد آزمایش در آزمایشگاه غلظت 10^7 بیش‌ترین تاثیر را در کنترل سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات داشت (Mahdneshtin et al., 2011) که همه موارد فوق با نتایج تحقیق حاضر که نشان داد با افزایش غلظت این قارچ روی سوسک چهارنقطه‌ای *Callosobruchus maculatus* در شرایط آزمایشگاهی، مرگ و میر حشرات بالغ نیز افزایش یافت، مطابقت داشت.

References

- Asadollah Pour, M., Zafari, D. and Zare, R. 2011.** Isolated hyphomycetes fungi and their pathogenic effects on Colorado potato beetle in Hamedan Province. *Journal of Plant Protection* 24 (4): 465-470.
- Bagheri Zenouz, E. 2008.** pests of Products and Management to Maintain. *Bioecology of Insects, Acari and Microorganism*. University of Tehran Press, Tehran. 499pp.
- Chaubey, M. k. 2006.** Toxicity. of essential oils from *Cuminum cuminum* (nombellifereae) , *Piper nigrum* (piperaceae) and *Foeniculum vulgare* (nombellifereae) against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera : Tenebrionidae) . *Electronic journal of Environmental. Agricultural and food chemistry*, 34:1779-1727.
- Elkesi, S., Akpa, A. D., Onu, I. and Ogunlana, M. O. 2000.** Entomopathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the cowpea aphid, *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae). *Journal of Phytopathology and Plant Protection* 33(2):171-180.
- Jarahi ,A., and safavi, A. 2015.** Sublethal effect of *Metarhizium anisopliae* on life table parameters of *Habrobracon hebetor* parasitizing *Helicoverpa. A. migrera* larvae at different time intervals. *Biocontrol*. Do I 10, 1007/s 10526-075- 9707-y.
- Latifian, M., Soleyman nejadian, E., Ghazavi, M., Hayati, J., Mosadegh, S. M., Nikbakht. 2009.** Evaluation of three *Beauveria bassiana* isolates on saw-toothed beetle *Oryzaephilus surinamensis* and the effect of different temperature on their germination and mycelium growth. *Journal of APPLIED ENTOMOLOGY AND PHYTOPATHOLOGY* .Vol. 77.N.1, Page(s) 151 To 168.
- Latifian, M., Soleyman nejadian, E., Ghazavi, Mosadegh, M. S., Hayati, J. 2010.** The pathogenesis of *Beauveria bassiana* on larval and adult stages of the saw-toothed beetle *Oryzaephilus surinamensis* reared on different date cultivars. *Pant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 33(1): 21-30.
- Majidi Shil Sar, F., Padasht Dehkayi, F., Nahvi, M. 2012.** Biological of Control Wintering Population of *chilo suppressalis* After picking up By *Beaureria* in vivo condition. *Journal of Plant Protection*. 25: 186-193.
- Mahdnezhin, Z., Vojoudi, S., Ghosta, Y., Safaralizade, M. H. and Saber, M. 2011.** Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungi, Iranian isolates of *Beauveria bassiana* (*Balsamo*) *Vuillemin* and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin against the control of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). *African Journal of Microbiology Research* 5 (29): 5215-5220.
- Marouf, A., Shayesteh, N., Bagheri Zenouz, A., Hwydari, R. 2004.** effects of food Ingredients on Moisture Seed on food Preferences of Beetles Cowpa *Pests Journal of Plant Disease*. 71: 37-41.
- Mathews, G. A. 1993.** Insecticide application in stores. IN : mathews, G. A & Hislor , E.C.(Eds), *Application technology for crop protection* (eds) .CAB. International, uk.Pp.231-245.
- Minitab.2000.** MINITAB Users Guide, version 13.1. MINITAB Ltd., UK.
- Sabouri, SH., Marouj, GH., Sadeghi Nameghi, H. Mohebi, M. 20018.** Microwave Waves effects on Adult of Beetles Cowpa *Callosobruchus maculates* Fabricius (Coleoptera : Bruchidae). *Journal of Plant Protection* 31 (1): 20-28.
- Safavi, S. A., Kharrazi, A., Rasouljan, G. H. and Bandani, A. 2010.** Virulence of some isolates of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. *Journal of Agricultural Science and Technology* 12: 13-21.
- Sahaf, B., Mahrami Pour., S. 2008.** The effect of Essential Oil of two Plants *Carumcopticum*.C.B.Clarke & *Vitex pseudo-negundo*(Hausskn.)Hand.-Mzt on laying deterrence of Beetles Cowpa *Callosobruchus maculates* in Vitro condition. *Iranian Quarterly Journal of Medicinal and Aromatic herbs Reasearch*.23 (4): 53-523.
- SAS Institute. 2001.** PROC user's manual, version 9.01 Institute, Cray, NC.
- Vu, V. M. H, Hong, S. I. and kim, k. 2007.** selection of entomopathogenic fungi for aphild control. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104 (6) : 498 – 505 .

Investigating the Pathogenicity of Pathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (*Balsomo*) Vuillemin against Adult of *Callosobruchus maculatus* (*Col., Bruchidae*) in Laboratory Conditions.

A. Jalalizand^{1*}, F. Ebrahimi²

1- MSc. Student, Department of Plant protection, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2- Associate Professor, Department of Plant protection, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Abstract

Cowpea seed beetle *Callosobruchus maculatus* is one of the most important pests of storage products around the world and Iran which causes heavy damage due to feeding beans. The aim of this study was to evaluate the efficacy of MZ isolate of *Beauveria bassiana* in control of *Callosobruchus maculatus* and selecting the most appropriate concentration of pathogenic fungus in the biological control of *Callosobruchus maculatus* in laboratory condition. For this purpose conidia suspension from fungi with treatments at a concentration of 10^4 , 10^6 , 10^7 conidia/ml with distilled water containing tartine 0.5 % prepared. All treatments were carried out in 4 replications and in the completely randomized block design by spraying method were performed. For evaluation of mold mortality rates, 4 days after spraying, the mortality rates of all concentrations was determined and mortality in control was corrected with using of Abbott formula. . Data were analyzed with SAS program and the meanings were grouped by Duncan method .The amount of lethal concentration or (LC90) and (LC50) was calculated. Based on the statistical analysis, there is a significant difference between treatments at 1% and 5% levels respectively. The concentration of 10^7 with 91% mortality was the deadliest and control treatment (distilled water and tween) and 10^4 concentrations with 4 and 28%, were the lowest mortality, respectively. LC50 and LC90 of *B.bassiana* were $5/4888 \times 10^4$ and $5/493071 \times 10^6$ spore/ml respectively.

Keyword: *Callosobruchus maculatus*, *Beauveria bassiana*, biological control

* Corresponding Author, E-mail: arjalalizand@gmail.com

Received: 7 May 2019– Accepted: 7 Aug. 2019

