تحقیقات آفات گیاهی
۶۰-۵۱ :(۳) ۴- ۱۳۹۳

بیمارگری چهار جدایه قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin روی لارو پروانه برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis* Walker(Lep.; Pyralidae) در شرایط آزمایشگاهی

رویا خسروی[*۱]، جلال جلالی سندی [۲] و آرش زیبائی[۳]

۱، ۲ و ۳ به ترتیب دانشجوی دکتری حشره شناسی کشاورزی، دانشیار و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۱۳)

چکیده

پروانه برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis* Walker یکی از آفات مهم و اختصاصی درختان توت است که به شکل گسترده در استان گیلان پراکنده است. این آفت به صورت اختصاصی از توت تغذیه کرده و خسارت سنگینی را به درختان توت در این منطقه وارد می‌نماید. این تحقیق به منظور ارزیابی کارآیی جدایه‌های قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) روی لاروهای پروانه برگ‌خوار توت *G. pyloalis* انجام شد. آزمایش زیست‌سنجی به روش غوطه‌وری با غلظت‌های 10^{4}، 10^{5}، 10^{6}، 10^{7} و 10^{8} کنیدی/ میلی‌لیتر در آب مقطر حاوی ۰/۰۳ درصد توئین-۸۰، هر غلظت با ۴ تکرار و هر تکرار با ۱۰ عدد لارو سن پنجم صورت گرفت. لاروهای شاهد با آب مقطر حاوی ۰/۰۳ درصد توئین-۸۰، تیمار شدند. نتایج این بررسی نشان داد که تمام جدایه‌های قارچ مذکور قادر به آلوده کردن لاروهای *G. pyloalis* بودند و درصد مرگ و میر لاروها با افزایش غلظت افزایش یافت. برای جدایه‌های IRAN 403C، SPT 22، SP 566 و IR-K-40 مقدار LC_{50} به ترتیب $1/6\times10^{5}$، $4/8\times10^{5}$، $8/1\times10^{5}$ و $1/1\times10^{5}$کنیدی/میلی‌لیتر برآورد شد. نتایج نشان داد که جدایه IRAN 403C در مقایسه با سایر جدایه‌ها، بالاترین میانگین درصد مرگ و میر (۹۵٪) را در لاروهای پروانه برگ‌خوار توت ایجاد کرد. همچنین غلظت‌های مختلف این جدایه‌ها درصد خروج حشرات کامل را به شدت کاهش دادند. کم‌ترین میزان ظهور حشرات کامل (۰/۳۴±۲۵٪) در مورد جدایه IRAN 403C غلظت 10^{7} کنیدی/میلی‌لیتر مشاهده شد. در بالاترین غلظت (10^{8} کنیدی/میلی‌لیتر) هیچ حشره کاملی ظاهر نشد. تمام جدایه‌های استفاده شده باعث مرگ و میر در لارو پروانه برگ‌خوار توت شدند و جدایه IRAN 403C مؤثرترین جدایه در میان جدایه‌های مورد بررسی بود.

واژه‌های کلیدی: پروانه برگ‌خوار توت، زیست سنجی، قارچ بیمارگر حشرات، زهرآگینی

[*]نویسنده مسئول: khosravi.roya@yahoo.com

مقدمه

با وجود توسعه روش‌های مختلف، کنترل آفات در بیشتر موارد با استفاده از سموم شیمیایی انجام می‌شود. ولی تمایل به استفاده از سموم شیمیایی به دلیل مشکلاتی از قبیل مسمومیت حاد و مزمن برای فروشندگان، کارگران مزرعه و مصرف‌کنندگان محصولات کشاورزی، از بین رفتن دشمنان طبیعی، آلودگی آب‌های زیرزمینی و گسترش مقاومت به سموم در جمعیت آفات، در حال کاهش است. آفت‌کش‌های شیمیایی در سال‌های اخیر به یکی از مشکلات مهم محیط‌زیست و سلامتی بشر تبدیل شده‌اند (Kelly-Hope *et al.*, 2008). استفاده گسترده از آفت‌کش‌های شیمیایی مشکلات وسیعی را در پی داشته است، که منجر به تغییر در راهبردهای کنترل شیمیایی و استفاده از روش‌های جایگزین شده است. کاهش مصرف مواد شیمیایی از اهداف اصلی مدیریت آفات است. یکی از راه‌های کاهش سمپاشی‌ها، استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک می‌باشد. عوامل مورد استفاده برای کنترل بیولوژیک آفات متنوع بوده و کنترل بیولوژیک به عنوان یک علم کاربردی به خوبی شناخته شده است و جایگزینی برای کاربرد وسیع آفت کش های شیمیایی محسوب می-شود (St. Leger *et al.*, 1996). در میان عوامل میکروبی، قارچ‌ها به دلیل نحوه اثر تماسی دارای جایگاه ویژه‌ای هستند و علاقه بشر برای بکارگیری قارچ‌های بیمارگر حشرات جهت کنترل حشرات آفت افزایش یافته است (Roy *et al.*, 2010).

بیش از ۷۰ گونه قارچ متعلق به ۹۰ جنس باعث ایجاد بیماری در حشرات می‌شوند (Inglis *et al.*, 2001)، و قادر به آلوده کردن همه مراحل رشدی حشرات آفت در انبارها، گلخانه‌ها و شرایط مزرعه هستند (Barbarin *et al.*, 2012). رایج‌ترین قارچ‌های بیمارگر حشرات متعلق به جنس‌های *Beauveria*، *Metarhizium*، *Paecilomyces*، *Lecanicillium*، *Nomuraea*، *Tolypocladium* هستند (Devi *et al.*, 2003). قارچ *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin یکی از عوامل بیماریزای حشرات است که مطالعات زیادی روی بیماریزایی آن انجام شده است و یک ماده فعال در بسیاری از فرآورده‌هایی است که در حال حاضر در سراسر جهان استفاده می‌شوند. این قارچ بیماریزای حشرات در سراسر جهان پراکنش گسترده داشته و دارای طیف میزبانی وسیع روی حشرات است. این قارچ از ۷۰۰ گونه حشره جداسازی شده و همچنین در خاک به عنوان یک قارچ ساپروفیت وجود دارد (Wraight *et al.*, 2000). پوشش سفیدی که پس از مرگ حشره، روی لاشه آن ایجاد می کند سبب شده تا نام موسکاردین سفید به بیماری حاصل از قارچ *B. bassiana* داده شود. جدایه‌ها و سوش‌های مختلف این قارچ در طبیعت وجود دارند. به همین دلیل می‌توان مناسب‌ترین جدایه را انتخاب و در قالب برنامه کنترل بیولوژیک استفاده کرد (Vu *et al.*, 2007). مطالعات زیادی در مورد تاثیر جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* در حشرات انجام شده است. بررسی‌ها نشان داده است که این قارچ باعث مرگ و میر در مراحل لاروی و شفیرگی پروانه *Condylorrhiza vestigialis* Guen به میزان بیش از ۶۰٪ شده است (Pogetto *et al.*, 2012). در *Spodoptera litura* Hubner تیمار با *B. bassiana* باعث کاهش وزن شفیرگی و درصد خروج پروانه از شفیره‌ها و بدشکلی همه پروانه‌ها شد (Basker *et al.*, 2012).

پروانه برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis* یکی از آفات مهم و اختصاصی درختان توت است که به شکل گسترده در بخش‌هایی از آسیا پراکنده شده است. این آفت خسارت سنگینی را به درختان توت در شمال ایران وارد کرده و برای صنعت پرورش کرم ابریشم یک مشکل جدی محسوب می‌شود. لاروهای سن چهارم و پنجم از کل برگ تغذیه می‌کنند و تنها رگبرگ‌ها را باقی می‌گذارند (Khosravi and Jalali Sendi, 2010).

با توجه به این‌که درختان توت علاوه بر تغذیه کرم ابریشم در زیباسازی فضای شهری نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند و همچنین محدودیت کاربرد ترکیبات شیمیایی

برای توتستان‌ها و مناطق جنگلی وجود دارد، معرفی عامل کنترل بیولوژیک آفت پروانه برگ‌خوار توت ضروری به نظر می‌رسد. لذا با در نظر گرفتن دامنه میزبانی، سهولت تولید و کاربرد قارچ *B. bassiana*، و نیز از آنجا که شرایط آب و هوایی استان گیلان به لحاظ بالا بودن رطوبت برای رشد و تکثیر این قارچ مناسب است، ارزیابی چهار جدایه از این قارچ بیماریزای حشرات مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

لاروهای پروانه برگ‌خوار توت *G. pyloalis* از توتستان‌های موجود در شهر رشت، مرکز تحقیقات کرم ابریشم کشور واقع در پسیخان و توتستان‌های پرند و پرنیان واقع در شهرستان صومعه‌سرا جمع‌آوری شدند. سن‌های مختلف لاروی به آزمایشگاه منتقل شدند و پرورش آن‌ها در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی در اتاقک رشد با دمای ۲± ۲۴ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰± ۷۵ درصد و دوره نوری ۸ : ۱۶ (تاریکی: روشنایی) ساعت، انجام گرفت. برای پرورش لاروها از ظروف پلاستیکی درپوش‌دار شفاف با ابعاد ۷×۱۵×۱۸ سانتی‌متر استفاده شد، که روی درپوش آن‌ها جهت تهویه توری ارگانزا تعبیه شده بود. لاروها در شرایط کنترل شده تا زمان شفیره شدن، روی برگ توت (واریته کن‌موچی) پرورش یافتند. پس از ظهور حشرات کامل مراحل جفت‌گیری و تخم‌ریزی در ظروف شفاف استوانه‌ای به ابعاد ۷×۱۸ سانتی‌متر انجام گرفت. برای تخم‌ریزی داخل ظروف استوانه‌ای یک عدد برگ توت تازه و برای تغذیه آن‌ها پنبه آغشته به محلول آب عسل ۱۰ درصد قرار داده شد. برای هم‌سن سازی لاروها (ایجاد cohort) برگ‌های حاوی تخم‌هایی که در طی ۲۴ ساعت گذاشته شده بودند به ظروف شفاف پلاستیکی منتقل شدند و جهت تأمین رطوبت مورد نیاز تخم‌ها یک تکه پنبه مرطوب داخل ظروف قرار گرفت. پس از تفریخ تخم‌ها، از برگ توت تازه جهت تغذیه لاروها استفاده شد و در آزمایش‌های زیست سنجی از مرحله لاروی استفاده شد.

جدایه‌های قارچی مورد استفاده

چهار جدایه قارچ *B. bassiana* از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور با مشخصات ارائه شده در جدول ۱ برای زیست سنجی ها تهیه و در یخچال نگهداری شدند.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های قارچ *Beauveria bassiana* استفاده شده در آزمایش‌های زیست‌سنجی

Table 1. Details of *Beauveria bassiana* isolates used in bioassay experiments

Accession Number (Iranian Research Institute of Plant Protection)	Substrate	Location (Country)	Reference
IRAN 403C	Soil (with trapping method)	Karaj (Iran)	Ghazavii *et al.*, 2002
SPT 22	*Eurygaster integriceps*	Yavuzeli (Turkey)	Parker *et al.*, 2003
SP 566	*E. integriceps*	Esfahan (Iran)	Parker *et al.*, 2003
IR-K-40	*E. integriceps*	Tappeh Maran (Iran)	Parker *et al.*, 2003

کشت قارچ و تهیه غلظت‌ها

تشتک‌های پتری (به قطر ۸ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت PDA با استفاده از کشت خالص شده‌ی قارچ تلقیح شد. دو هفته پس از نگهداری این کشت در شرایط کنترل شده (دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و ۱۶:۸ ساعت (تاریکی: روشنایی) کنیدیوم‌های تولید شده با ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر

استریل حاوی ۰/۰۳٪ توئین -۸۰ شستشو و جمع‌آوری شد. پس از شمارش کنیدیوم‌ها با استفاده از لام نئوبار و تهیه غلظت پایه 10^8 کنیدی/میلی‌لیتر، سایر غلظت‌ها از طریق رقیق سازی غلظت پایه تهیه شد. از آب مقطر حاوی توئین-۸۰ به میزان ۰/۰۳ درصد به عنوان شاهد استفاده شد.

آزمایش‌های زیست‌سنجی

قبل از زیست‌سنجی، تست زنده‌مانی کنیدی‌ها برای اطمینان از حفظ خاصیت جوانه‌زنی اسپورها انجام گرفت. بدین صورت که سوسپانسیون خیلی رقیقی از هر کدام از قارچ‌ها روی تشتک‌های پتری حاوی آب-آگار در شرایط استریل پخش شد. کشت‌ها در دمای اتاق نگهداری شدند و پس از گذشت۱۸-۱۶ ساعت اقدام به شمارش اسپورهای جوانه زده در بین ۱۰۰ اسپور تصادفی در یک گوشه لام شد. برای هر جدایه سه گوشه لام به صورت تصادفی بررسی شد. اگر درصد جوانه‌زنی بالا تر از ۸۵٪ بود، زیست سنجی انجام می‌شد.

در آلوده‌سازی لاروهای سن پنجم از روش غوطه‌ورسازی به مدت ۱۰ ثانیه استفاده شد. ابتدا آزمایش‌های مقدماتی به منظور تعیین محدوده غلظت‌های مؤثر انجام شد، در این آزمایش‌ها غلظت 10^4 کنیدی/میلی‌لیتر نزدیک به ۲۰٪ و غلظت 10^8 حدود ۸۰٪ مرگ و میر در لاروها ایجاد کردند. برای تعیین غلظت‌های حداقل و حداکثر، ابتدا هشت غلظت شامل غلظت‌های 10^2، 10^3، 10^4، 10^5، 10^6، 10^7و 10^8 کنیدی/میلی‌لیتر تهیه و آزمون براکتینگ با آن‌ها انجام شد. برای هر جدایه ۴ تکرار و برای هر تکرار ۱۰ عدد لارو در نظر گرفته شد. سپس مرگ و میر روزانه حشرات ثبت شد. بعد از انجام آزمایش‌های مقدماتی و تعیین غلظت‌های حداقل (۲۵٪) و حداکثر (۸۰٪) کشندگی، پنج دز لگاریتمی مورد نظر در دامنه فوق انتخاب و زیست‌سنجی با آن‌ها انجام شد. آزمایش‌های هر جدایه در پنج غلظت شامل 10^4، 10^5، 10^6، 10^7و 10^8 کنیدی/میلی‌لیتر و ۴ تکرار، هر تکرار با ۱۰ لارو به همراه تیمار شاهد انجام شد. لاروها پس از آلوده‌سازی در اتاق رشد با دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰±۷۵ درصد و دوره نوری ۸ : ۱۶ (تاریکی: روشنایی) قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت تلفات لاروها به مدت ۱۴ روز به طور روزانه ثبت شد و لاروهای مرده از ظروف اصلی جدا شدند و پس از ضدعفونی کردن سطح بدن آنها با اتانول ۷۰٪ درون ظروف مرطوب گذاشته شدند تا پوشش قارچی در سطح بدن آن‌ها تشکیل شود. مرگ و میر هر کدام از تکرار ها با فرمول ابوت (Abbot, 1925) اصلاح شد.

ظهور حشرات بالغ

درصد حشرات بالغ ظاهر شده بر اساس تعداد حشرات کامل ظاهر شده از تعداد کل شفیره‌ها در هر تیمار محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی[1] در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس طرح پایه کاملا تصادفی با نرم افزار SAS (SAS Institute, 1997) انجام شد. به منظور بررسی‌های زیست‌سنجی و محاسبه LC_{50} و حدود بالا و پائین، از نرم‌افزار POLO-PC استفاده شد.

نتایج

در این مطالعه کلیه جدایه‌های قارچی استفاده شده سبب مرگ و میر لارو سن پنجم پروانه برگ‌خوار توت شدند، اما میزان تلفات لاروها بر اساس غلظت قارچ‌ها متفاوت بود. ارتباط خطی بین غلظت کنیدی‌های هر جدایه قارچی و مرگ و میر لاروها با استفاده از آنالیز پروبیت نشان داده شد. مقادیر LC_{20} و LC_{50}، محدوده اطمینان و شیب خط جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* علیه لاروهای پروانه برگ‌خوار توت *G. pyloalis* در جدول ۲ آورده شده است. جدایه IRAN 403C و SP 566 به ترتیب بالاترین و پائین‌ترین میزان مرگ و میر را در لاروهای پروانه برگ‌خوار توت سبب شدند. پایین‌ترین مقدار LC_{50} ($1/6\times10^5$ کنیدی/میلی‌لیتر) در مورد جدایه IRAN

[1] Tukey's test

403C مشاهده شد. بر اساس مقادیر LC_{50}، جدایه IRAN 403C مؤثرترین جدایه روی لاروهای *G. pyloalis* بود و بعد از آن جدایه‌های ، SPT 22، IR-K-40 وSP 566 قرار گرفتند.

جدول ۲- برآورد LC_{20} و LC_{50} همراه با محدوده اطمینان ۹۵٪ جدایه‌های *Beauveria bassiana* روی لارو پروانه برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis*

Table 2. Estimation of LC_{20} and LC_{50} values with 95% confidence limit of *Beauveria bassiana* isolates on larvae of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*

Isolates	LC_{20} (95% C.L.)	LC_{50} (95%C.L.)	Slope±S.E.	X^2 (df)
IRAN 403C	5×10^3 (2×10^3-3.3×10^4)	1.6×10^5 (9.8×10^4-5.1×10^5)	0.58±0.8	1.19 (3)
SPT 22	9×10^3 (2.3×10^4-4.1×10^4)	4.8×10^5 (2.1×10^5-1.1×10^6)	0.49±0.7	0.98 (3)
IR-K-40	2.2×10^4 (1.1×10^4 -4.2×10^4)	8.1×10^5 (5.4×10^5-1.2×10^6)	0.54±0.71	0.57 (3)
SP 566	1.5×10^4 (2.1×10^4-3.8×10^5)	1.1×10^6 (1.6×10^5-7.7×10^6)	0.45±0.6	0.64 (3)

C.L. 95% Confidence limits is considered significantly different when the 95% C.L. fail to overlap

مرگ و میر در گروه شاهد بسیار کم بود و هیچ‌گونه علائم رشد قارچ روی لاروهای مرده مشاهده نشد. تمام جدایه‌های قارچی قادر به آلوده کردن لاروهای *G. pyloalis* بودند و درصد مرگ و میر لاروها با افزایش غلظت افزایش یافت. درصد مرگ و میر ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف هر جدایه در انتهای آزمایش به صورت شکل نشان داده شده است (شکل ۱). حداقل و حداکثر مرگ و میر تجمعی در لاروهای پروانه برگ‌خوار توت برای جدایه IRAN 403C ۲۲/۵ و ۹۵٪، برای جدایه SPT 22 ۱۷/۵ و ۸۷/۵٪، برای جدایه IR-K-40 ۱۵ و ۸۶٪، برای جدایه SP 566 ۱۲/۵ و ۷۵٪ بود.

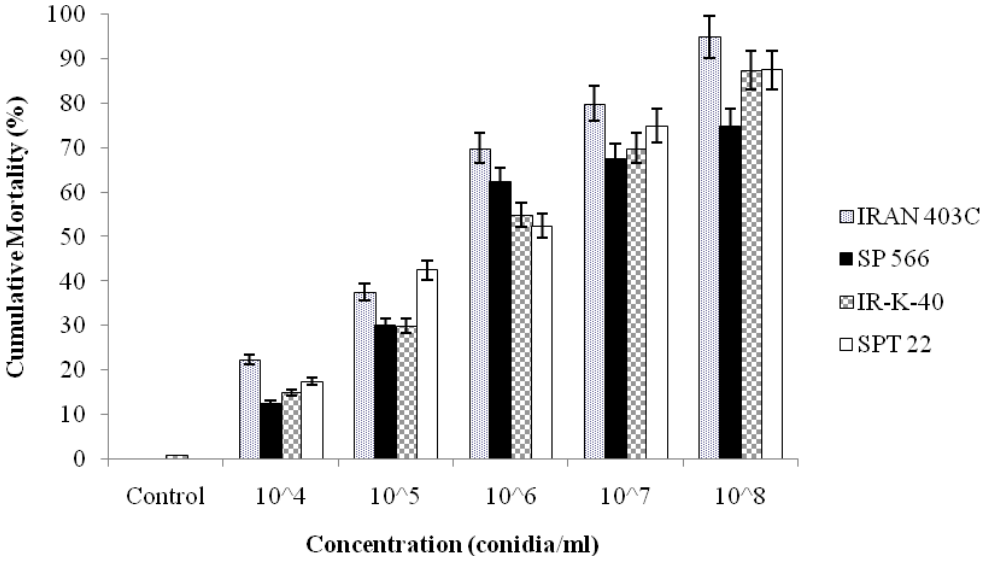
ظهور حشرات کامل *G. pyloalis* زمانی که لاروها با جدایه‌های مختلف *B. bassiana* تیمار شدند کاهش یافت. کمترین میزان ظهور حشرات کامل (۰/۳۴±۲۵٪) در مورد جدایهIRAN 403C غلظت 10^7 کنیدی/میلی‌لیتر مشاهده شد و در بالاترین غلظت هیچ حشره کاملی ظاهر نشد (جدول ۳). بیشترین تعداد حشرات کامل ظاهر شده در مورد جدایه SP 566 در غلظت 10^4 کنیدی/میلی‌لیتر به‌دست آمد.

جدول ۳- درصد ظهور حشرات کامل پروانه برگ‌خوار توت، *Glyphodes pyloalis* بعد از تیمار با جدایه‌های مختلف قارچ *Beauveria bassiana*

Table 3. Adult emergence (%) of *Glyphodes pyloalis* after treatment with different isolates of *Beauveria bassiana*

Concentration / Isolates	10^4 (Conidia/ml)	10^5 (Conidia /ml)	10^6 (Conidia /ml)	10^7 (Conidia /ml)
IRAN 403C	60.66±0.21 b	63.06±0.23 a	49.33±0.42 b	25±0.34 b
SPT 22	82.33±0.14 a	73.70±0.37 a	36.14±0.65 b	40.8±0.31 b
IR-K-40	74.4±0.54 ab	63.06±0.21a	44.06±0.39 b	30.76±0.28 b
SP 566	82.8±0.43 a	72.85±0.85 a	60.4±0.19 b	37.06±0.42 b
Control	91.66±0.04 a	91.66±0.04 a	91.66±0.04 a	91.66±0.04 a

Within columns, means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey, $P\leq0.05$).



شکل ۱- مرگ و میر تجمعی (٪) ± خطای استاندارد لاروهای *Glyphodes pyloalis* به شیوه غوطه‌وری در محلول‌های کنیدی جدایه‌های قارچ *Beauveria bassiana*

Figure 1. Cumulative mortality (%) ± S.E. of *Glyphodes pyloalis* larvae after immersion in conidial suspensions of *Beauveria bassiana* isolates.

بحث

نتایج تحقیق حاضر تائید بیماری‌زایی قارچ *B. bassiana* روی لاروهای سن پنجم پروانه‌ی برگ‌خوار توت *G. pyloalis* در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی بود. هرچند که درصد آلودگی ایجاد شده و سرانجام میزان تلفات تحت تأثیر جدایه‌های مختلف متغیر بود. در این تحقیق جدایه IRAN 403C بیشتر از سایر جدایه‌ها اثر زهرآگینی داشت. بسیاری از حشرات به قارچ *B. bassiana* حساس هستند. چنانکه اثر بیماریزایی قارچ *B. bassiana* بر پروانه سفید اشجار *Hyphantria cunea* Drury (Ajamhassani *et al.,* 2011)، پروانه *Condylorrhiza vestigialis* Guen (Pogetto and Wilcken, 2012)، پروانه *Chilo partellus* Swinhoe (Tefera *et al.,* 2004) گزارش شده است.

در تحقیق حاضر درصد مرگ و میر آفت با غلظت کنیدی‌های هر جدایه نسبت مستقیم داشت که با یافته‌های سایر محققین منطبق بود (Feng *et al.,* 1985; Uhlik, 1999; Safavi *et al.,* 2010). استفاده از غلظت‌های بالای سه جدایه از قارچ *B. bassiana* روی شته‌های بی‌بال کامل *Aphis craccivora* Koch سبب ۵۸ تا ۱۰۰٪ تلفات شد (Elkesi *et al.,* 2000). همچنین کاربرد این قارچ روی سوسک لوبیا *Callosobruchus maculatus* F. در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که با افزایش غلظت، مرگ و میر حشرات بالغ نیز افزایش یافت (Mahdneshin *et al.,* 2011). اسدالله‌پور و همکاران (Asadollah Pour *et al.,* 2011) نیز گزارش کردند که دو جدایه از قارچ *B. bassiana* روی سوسک کلرادو *Leptinotarsa decemlineata* L. ایجاد بیماری می‌کنند و با افزایش غلظت اسپور قارچ‌ها درصد مرگ و میر لاروها افزایش یافت (Asadollah Pour *et al.,* 2011). مرگ و میر لاروهای پروانه برگ‌خوار توت از روز سوم شروع می‌شود و در روزهای بعد متناسب با غلظت، افزایش می‌یابد که

نشان دهنده نیاز قارچ به مدت زمانی در حدود ۴۸ ساعت برای تندش و نفوذ در کوتیکول حشره می‌باشد (Alcides *et al.*, 2002).

گوناگونی قدرت بیماریزایی در جدایه‌های مختلف *B. bassiana* به ویژگی‌های فیزیولوژیک و تولید آنزیمی هر جدایه مربوط می باشد. همچنین این اختلاف در زهرآگینی جدایه‌ها می‌تواند به منشأ جداسازی جدایه‌ها و گونه‌های میزبان مرتبط باشد. تاثیر منشأ جدایه‌ها روی بیماریزایی قارچ *B. bassiana* قبلا گزارش شده است (Vandenberg, 1996). جدایه‌هایی که محل زیستگاه آن‌ها و یا گونه‌های میزبان آن‌ها به هم نزدیک‌تر باشد قدرت بیماریزایی مشابهی دارند. در میان جدایه‌های *B. bassiana* تیمار شده بر ساقه‌خوار اروپایی ذرت، جدایه‌ای که از خاک (زیستگاه گونه میزبان یا گونه‌های نزدیک) جدا شده بود بیماریزایی بالاتری نسبت به جدایه هایی داشت که از سخت‌بالپوشان و راست‌بالان جداسازی شده بودند (Safavi *et al.*, 2010).

در این بررسی قارچ بیماریزای *B. bassiana* ظهور حشرات بالغ را در حشره میزبان در تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد کاهش داد. باسکار و همکاران (Baskar *et al.*,2012) گزارش کردند که سه نوع قارچ بیماریزای مختلف درصد خروج حشرات کامل را در *S. litura* به طور معنی‌داری کاهش دادند. همچنین دو جدایه *B. bassiana* خروج حشرات کامل از شفیره را تا حد ۵۰٪ کاهش دادند (Ahmed and El-Katatny, 2007). در پروانه موم‌خوار *Galleria mellonella* نیز ظهور حشرات کامل زمانی که لاروها با *B. bassiana* همراه با اشعه گاما تیمار شدند، کاهش یافت (El-Sinary and Rizk 2007).

علاوه بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی قارچ و منشأ آن، عوامل دیگری نیز در پدیده بیماریزایی یک قارچ بیمارگر مهم هستند. به عنوان مثال جوانه‌زنی کنیدی‌ها می‌تواند تحت تاثیر شرایط کلیمایی به ویژه دمای پیرامون کوتیکول حشره، رطوبت نسبی، در دسترس بودن غذا در سطح کوتیکول برای مصرف قارچ، درصد بازدارندگی ترکیبات سطح کوتیکول و سن حشره میزبان باشد (Cabanillas and Walker, 2009). با توجه به پتانسیل بالای قارچ‌های بیمارگر حشرات در کنترل آفات، پیشنهاد می‌شود جدایه‌های مناطق مختلف کشور جمع‌آوری و روی لاروهای پروانه برگ‌خوار توت مورد آزمایش قرار گیرند تا از این طریق بتوان جدایه یا جدایه‌هایی را برای کنترل بهتر این آفت معرفی کرد. علاوه بر این باید شرایطی فراهم شود تا عوامل برتر به صورت تجاری تولید و عرضه شوند.

با در نظر گرفتن شرایط اقلیمی استان گیلان، استفاده از این قارچ بیمارگر می‌تواند در برنامه‌های مدیریت این آفت مهم جایگاه ارزشمندی داشته باشد. بنابراین ضروریست آزمایش‌هایی در سطح عرصه برای تعیین بیمارگری این قارچ‌ها صورت پذیرد تا در کنار نتایج آزمایشگاهی این تحقیق و موارد مشابه، بتوان راهکاری مناسب برای کنترل این آفت ارائه کرد.

سپاسگزاری

نگارندگان مراتب قدردانی خود را از موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور جهت در اختیار گذاشتن جدایه‌های قارچ و دانشگاه گیلان که زمینه انجام این تحقیق را فراهم کرده است ابراز می‌دارند.

References

Ahmed, A. M. and El-Katatny, M . H. 2007. Entomopathogenic fungi as biopesticides against the Egyptian cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*: Between biocontrol-promise and immune-limitation. **Journal of Egyptian Society of Toxicology** 37: 39-51.

Ajamhassani, M., Jalali Sendi, J., Farsi, M. J. and Mehrabi, A. 2011**.** Pathogenecity of different isolates of *Beauveria bassiana* and *Isaria farinosae* on fourth instar larvae of *Hyphantria cunea* (Lep.: Arctiidae). **Iranian Journal of Forest and Range Protection Research** 9: 1-13.

Alcides, M. J., Sérgio Batista, A., Rogério Biaggioni, L., Pedro Manuel, O. J. N., Roberto Manoel, P., and Solange Aparecida, V. 2002**.** External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*.**Scientica Agricola** 59 (2): 267-273.

Asadollah Pour, M., Zafari, D. and Zare, R. 2011**.** Isolated hyphomysetes fungi and their pathgenecitic effects on Colorado potato beetle in Hamedan Province. **Journal of Plant Protection** 24 (4): 465-470.(In Persian with Englisg summary)

Barbarin, A. M., Jenkins, N. E., Rajotte, E. G. and Thomas, M. B. 2012**.** A preliminary evaluation of the potential of *Beauveria bassiana* for bed bug control. **Journaol of Invertebrate Pathology** 111: 82-85.

Baskar, K., Raj, G., Mohan, P., Lingathurai, S., Ambrose, T. and Muthu, C. 2012**.** Larvicidal and growth inhibitory activities of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against Asian army worm, *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomology** 9(3): 155- 162.

Cabanillas, H. and Walker, A. 2009**.** Pathogenicity of *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) against the sweet potato whitefly B biotype, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Crop Protection** 28: 333–337.

Devi, P. S. V., Prasad, Y. G., Chowdary, Y. G. A., Rao, D. M. and Balakrishnan, L. K. 2003**.** Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Journal of Mycopathology** 156: 365- 373.

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). **Phytopathology and Plant Protection** 33(2):171-180.

El-Sinary, N. H. and Rizk, S. A. 2007**.** Entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. and gamma irradiation efficiency against the greater wax moth, *Galleria melonella* (L.). **American- Eurasian Journal of Scientific Research** 2: 13-18.

Ghazavii, M., Kharazi- Pakdel, A., Ershad, J. and Bagherizonouz, E. 2002. Efficiency of Iranian isolates of *Beauveria bassiana* against *Locusta migratoria* (*Orthoptera: Acrididae*). **Applied Entomology and Phytopathology** 69(2): 111- 128.

Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M. and Strasser, H. 2001**.** Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. pp. 23-69. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (Eds.), Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CABI International/AAFC, Wallingford, United Kingdom.

Kelly-Hope, L., Ranson, H. and Hemingway, J. 2008**.** Lessons from the past: managing insecticide resistance in malaria control and eradication programmes. **Lancet Infection Disease** 8:387-398.

Khosravi, R. & Sendi, J.J. 2010. Biology and demography of *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) on mulberry. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 13: 273-276.

Mahdneshin, 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.

Parker, B. L., Skinner, M., Scott, D. C., Gouli, S., Reid, W. and El Bouhssini, M. 2003**.** Entomopathogenic fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae): collection and characterization for development. **Biological Control** 27: 260–272.

Pogetto, M. and Wilcken, F. 2012**.** The effect of *Beauveria bassiana* on Brazilian Poplar moth *Condylirrhiza vestigialis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Plant Protection** 52(1): 10-14.

Roy, H. E., Brodie, E. L., Chandler, D., Goettel, M. S., Pell, J. K., Wajnberg, E. and Vega, F. E. 2010. Deep space and hidden depths: understanding the evolution and ecology of fungal entomopathogens. **BioControl** 55, 1–6.

Safavi, S. A., Kharrazi, A., Rasoulian, 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 Technollogy** 12: 13-21.

SAS Institute. 1997. SAS/STAT User`s Guide for Personal Computers, SAS Institute, Cary, NC.

St. Leger, R. J., Frank, D. C., Roberts, D. W. and Staples, R. C. 1992**.** Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **European Journal of Biochemistry** 204: 991- 1001.

Tefera, T. and Pringle, K. L. 2004**.** Evaluation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Controlling *Chilo partellus* (Lepidoptera: Crambidae) in Maize. **Biocontrol Science and Technology** 14(8): 849-853.

Vandenberg, J. D. 1996**.** Standardized bioassay and screening of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology** 89: 1418-1423.

Vu, V. H., Hong, S. I. and Kim, K. 2007**.** Selection of entomopathogenic fungi for aphid control. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 104(6): 498- 505.

Wraight, S. P., Carruthers, R. I., Jaronski, S. T., Bradley, C. A., Garza, C. J. & Galaini-Wraight, S. 2000**.** Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. **Biological Control** 17: 203–217.

Plant Pests Research
2014- 4 (3): 51-60

Pathogenecity of four isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on larvae of lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep.; Pyralidae) in laboratory conditions

R. Khosravi[1*], J. Jalali Sendi[2] and A. Zibaee[3]
1, 2 and 3 respectively, Ph.D. Student of Entomology, Associate professor and Assistant professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: March 3, 2014- Accepted: May 3, 2014)

Abstract

Lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep.; Pyralidae) is one of the most important pests of mulberry trees which is widely distributed in Guilan province. This pest is monophagous and has caused severe damages on mulberry trees in north of Iran. In order to evaluate the effect of *Beauveria bassiana* isolates on this insect pest this study was undertaken. The bioassays were performed by immersion method with concentrations ranging from 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 and 10^8 conidia ml^{-1} in distilled water containing 0.03% Tween-80. For each concentration, forty 5th instar larvae were immersed into the conidial suspension for 10 seconds. Each experiment was replicated four times of 10 insects in each replicate. Control larvae were treated with distilled water containing 0.03 percent Tween-80 alone in the same way. The results showed that all fungal isolates were able to infect *G. pyloalis* larvae and larval mortality increased with increasing concentrations. The LC_{50} value was estimated 1.6×10^5, 4.8×10^5, 8.1×10^5, and 1.1×10^6 conidia ml^{-1} for IRAN 403 C, SPT 22, SP 566, and IR-K-40 isolates, respectively. Results showed that IRAN 403C isolate caused the highest mortality compared to other isolates with a mean of 95 percent mortality using 10^8 conidia ml^{-1}. Also, different concentrations of these isolates reduced adult emergence significantly. The lowest adult emergence (25%±0.34) was observed in case of IRAN 403C isolate at 10^7 conidia ml^{-1} concentration and no adult emergence was observed at10^8 conidia ml^{-1} concentration. All used isolates caused mortality in larvae of lesser mulberry pyralid and IRAN 403C was the most efficient isolate among investigated isolates.

Key words: Bioassay, Entomopathogenic fungi, Lesser mulberry pyralid, LC_{50}

*Corresponding author: khosravi.roya@yahoo.com