تحقیقات آفات گیاهی
۱۳۹۳ -۴(۲): ۴۷-۵۸

ارزیابی مزرعه‌ای بی‌تورین، یک فرمولاسیون تجارتی از باکتری *Bacillus thuringiensis* روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج (*Chilo suppressalis* Walker)

فرزاد مجیدی شیل‌سر[۱*]
۱، استادیار پژوهش بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، موسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۹)

چکیده

باکتری *Bacillus thuringiensis* (Berliner) var. kurstaki از عوامل بیمارگر حشرات می‌باشد که امروزه برای کنترل حشرات زیان‌آور به دو صورت پاشش مخلوط اسپور با کریستال و انتقال ژن کریستال سمی دلتا آندوتوکسین به ژنوم گیاه میزبان کاربرد دارد. این بررسی به‌منظور ارزیابی تاثیر بی‌تورین روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) در شرایط مزرعه‌ای در سال ۱۳۸۹ در شهرستان رشت انجام شد. در این پژوهش از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو فاکتور مقدار محلول‌پاشی (۰/۵، ۱ و ۱/۵ لیتر در هکتار از باکتری باسیل و تیمار شاهد آب‌پاشی) و تعداد محلول پاشی (یک، دو و سه بار) استفاده شد. قبل از آلوده‌سازی مصنوعی مزرعه با کرم ساقه‌خوار برنج، محلول پاشی با مقادیر مختلف این باکتری انجام شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در بین تیمارهای آزمایشی، دو و سه بار محلول‌پاشی بی‌تورین به میزان ۱/۵ لیتر در هکتار با دو و سه بار کم‌ترین درصد آلودگی جوانه‌های مرکزی مرده را در مقایسه با تیمار شاهد داشت و نیز بیش‌ترین کارایی در تیمار با سه بار محلول‌پاشی مشاهده شد. همچنین مصرف سه بار محلول‌پاشی بی‌تورین با مقدار یک لیتر در هکتار در مرحله‌ی رویشی گیاه برنج آلودگی جوانه‌های مرکزی مرده را به ۰/۵۲ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. در مرحله‌ی زایشی گیاه برنج در مزرعه، کم‌ترین درصد آلودگی خوشه‌های سفید شده در نسل دوم آفت در تیمار ۱/۵ لیتر در هکتار با دو و سه بار محلول‌پاشی به ترتیب ۰/۷۸ و ۰/۸۳ درصد به دست آمد. همچنین محلول‌پاشی بی‌تورین با ۱/۵ لیتر در هکتار با دو و سه بار مصرف در مرحله‌ی زایشی گیاه برنج از کارایی (۴۲/۹۳ و ۴۸/۴۸ درصد) بیش‌تری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بود. بنابراین در مناطقی که آلودگی بیش از یک دسته تخم و یا یک عدد پروانه ساقه خوار در مترمربع وجود داشته باشد، تا سه بار محلول پاشی قابل توصیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کرم ساقه‌خوار برنج، باکتری Bt، بی‌تورین، جوانه های مرکزی مرده، خوشه های سفید شده

*نویسنده مسئول: majidi14@yahoo.com

مقدمه

برنج پس از گندم بیش‌ترین سطح زیر کشت اراضی کشاورزی را در جهان به خود اختصاص داده و نقش بارز و چشمگیری در تغذیه، درآمد و اشتغال مردم دنیا و ایران دارد. این گیاه در اکوسیستم زراعی برای حشرات هم به عنوان منبع غذایی مناسبی محسوب می‌شود، به طوری‌که در حال حاضر بیش از ۲۰ گونه ساقه‌خوار در مزارع برنج دنیا یافت می‌شوند که بسیاری از آن‌ها دارای اهمیت اقتصادی بوده و سبب کاهش عملکرد محصول برنج می‌شوند. درمیان ساقه‌خوارها، کرم ساقه‌خوار نواری برنج (*Chilo suppressalis* Walker) از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (Dale, 1994). با توجه به مخفی بودن مرحله‌ی خسارت‌زای آفت (لاروهای سنین بالا داخل ساقه) استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی برای کنترل این آفت با مشکل همراه است. از طرفی استفاده‌ی طولانی مدت از حشره‌کش‌های شیمیایی، مشکلاتی از قبیل بقایای غیر قابل تجزیه‌ی مواد شیمیایی در محیط، به هم خوردن تعادل جمعیت حشرات، از بین بردن عوامل کنترل کننده‌ی طبیعی، ظهور آفات ثانویه و مقاومت حشرات در برابر حشره‌کش‌های شیمیایی را به دنبال داشته و همواره توجه حشره‌شناسان را به استفاده از روش‌های غیرشیمیایی معطوف داشته است (Alam *et al*., 1972; Frutos *et al*., 1999). بنابراین با توجه به چنین مشکلاتی همواره راه‌کارهای گوناگون و متعددی مورد بررسی قرار گرفته است. یکی از این روش‌ها، آفت‌کش‌های بیولوژیکی می‌باشند که امروزه به عنوان عوامل کنترلی موثر در مدیریت تلفیقی آفات تلقی می‌شوند.

باکتری *Bacillus thuringiensis* (Berliner) یکی از عوامل بیولوژیکی است که در دنیا به طریق مهندسی ژنتیک و با انتقال سم باکتری به داخل گیاه موجب مقاومت گیاه و یا با استفاده از ترکیبات تولید شده از این باکتری موجب کاهش خسارت آفت ساقه‌خوار برنج شده است. این باکتری اغلب در مرحله‌ی نابالغ و علیه لاروهای نئونات[1] (نوزاد) به کار می‌رود و آفت قبل از این که موجب خسارت شود، با تغذیه از گیاه آلوده دچار مرگ می‌شود. از مزایای استفاده از این باکتری و ترکیبات مربوط به آن، حفظ سلامت محیط زیست می‌باشد. همچنین این ترکیبات روی دشمنان طبیعی مزارع برنج از قبیل شکارگرها و پارازیتوییدها سمیتی ندارند و بی‌اثر می‌باشند، و نیز امتیاز دیگر این آفت‌کش میکروبی قابلیت اختلاط آن با حشره‌کش‌های شیمیایی می‌باشد (Hodgson, 2007). فیوزا و همکاران (Fiuza *et al*., 1996) سمیت پروتئین‌های کریستال باکتری *B. thuringiensis* را روی لاروهای سن دوم کرم ساقه‌خوار نواری برنج مشاهده کردند و نشان دادند که LC_{50} برای CrylAc روی لاروهای سن دوم ۲/۲۴ میکروگرم بر سانتی‌متر مربع بود. منگ و همکاران (Meng *et al*., 2003) با بررسی میزان حساسیت کرم ساقه‌خوار نواری برنج نسبت به توکسین‌های Cry1Ac و Cry1Ab باکتری مذکور نشان دادند که مقدار LC_{50} در لاروهای نئونات به توکسین‌های فوق به ترتیب از ۱۵تا ۱۵۷ میلی‌گرم بر لیتر و ۲ تا ۳۴ میلی‌گرم بر لیتر بوده است. مقدار، مکان و زمان مناسب به کارگیری این باکتری در مدیریت تلفیقی آفات بسیار ضروری و حائز اهمیت می‌باشد. نایاک و همکاران (Nayak *et al*., 1978) نشان دادندکه اسپورپاشی با پودر تورساید[2] یک درصد باکتری *B. thuringiensis* در شرایط مزرعه‌ای تا ۷۶ درصد جمعیت لاروهای زنده را کاهش داده و نیز درصد جوانه‌ی مرکزی آلوده در مرحله‌ی رویشی به همان مقدار کاهش یافته است. همچنین خوشه‌های سفید شده در مرحله‌ی زایشی گیاه برنج تا ۶۷ درصد کاهش داشته است. بریتلر و همکاران (Breitler *et al*., 2001) نشان دادند که با انتقال ژن Cry1B با غلظت ۰/۲ درصد پروتئین کریستال به ژنوم گیاه برنج، بعد از مدت ۱۲ تا ۱۴ ساعت قابلیت کنترل نشان داده شد و لاروهای ساقه‌خوار آلوده از تغذیه باز ماندند. آن‌ها همچنین اظهار داشتند که هیچ گونه فعالیتی از این ژن در گرده و بذر برنج وجود ندارد. زیست سنجی آزمایش مذکور نشان داد که لاروهای سن دوم ساقه‌خوار برنج که دارای ژن فوق بودند ۱۰۰ درصد بعد از

1. Neonate

1. Thuricide

تغذیه تلف شدند. کریمی و عباسی پور (Karimi and Abbasipour, 2000) در بررسی توانایی باکتری *B. thuringiensis* var. kurstaki در کنترل سنین اولیه‌ی کرم ساقه‌خوار برنج در غرب مازندران نشان دادند که غلظت ۲۰ گرم در لیتر به عنوان مناسب‌ترین غلظت و زمان ۲۴ ساعت به عنوان مناسب‌ترین زمان تاثیر باکتری روی سنین اولیه‌ی کرم ساقه‌خوار برنج می‌باشد. شنف و همکاران (Schnepf *et al*., 1998) اظهار داشتند انتخاب غلظت مناسب سم و اسپور باکتری، روش به کارگیری آن و انتخاب وسیله‌ی مناسب برای مصرف در افزایش کارایی آن نقش بسزایی دارد به طوری که توصیه کردند که استفاده از اسپور و سم کریستال با فرمولاسیون مناسب به منظور چسبیدن و حفاظت در مقابل اشعه‌ی فرابنفش خورشید بسیار مفید می‌باشد. برگس (Burges, 1998) در بررسی تاثیر باکتری روی حشرات نشان داد که اسپورهای جوان باکتری در طبیعت خیلی سریع تخریب می‌شوند و برای حفظ پایداری آن، در تهیه‌ی فرمولاسیون مناسب باید به طور کامل دقت شود.

امروزه Bt به دلیل تخصص یافتگی و سمیت کم برای ارگانیسم‌های غیر هدف به‌ویژه دشمنان طبیعی (شکارگرها و پارازیت‌ها) یکی از موفق‌ترین حشره‌کش‌های میکروبی در کنترل آفات می‌باشد (Frankenhuyzen, 1993). از آن‌جا که حشره‌کش‌های شیمیایی از اهمیت ویژه‌ای در کنترل حشرات زیان‌آور محصولات کشاورزی برخوردار هستند، به کارگیری آفتکش‌های جدیدکم خطر، امکان تناوب در استفاده ازآفتکش‌های شیمیایی را فراهم می‌آورد و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Majidi-Shilsar and Amouoghlitabari, 2011).

تعدادی از ترکیبات تجاری این باکتری شامل باکتور[1]، باکتوسپین[2]، دیپل[3]، جولین[4] و تاپسید[5] می‌باشند که همگی با نام عمومی آفت‌کش میکروبی Bt توسط شرکت‌های مختلف تولید و به بازار عرضه شده است.

1. Bactur
2. Bactospeine
3. Dipel
4. Javelin
5. Topside

از اهداف این پژوهش: الف- بررسی تاثیر بی‌تورین برای کنترل آفت ساقه‌خوار نواری برنج، ب-تعیین غلظت مناسب در کنترل این آفت بر اساس ماده موثره‌ی بی‌تورین، ج-تعیین تعداد دفعات محلول‌پاشی در کنترل این آفت بر اساس بی‌تورین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به منظور تاثیر باکتری *B. thuringiensis* (بی‌تورین) روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج در شرایط مزرعه‌ای سال ۱۳۸۹ در موسسه‌ی تحقیقات برنج کشور، رشت انجام شد.

پرورش حشره و تهیه‌ی دسته تخم

در این آزمایش برای تهیه‌ی دسته‌های تخم ساقه‌خوار برنج در دهه‌ی اول اردیبهشت دو تله‌ی نوری در مزرعه‌ی تحقیقاتی موسسه‌ی تحقیقات برنج، رشت نصب شد. در این روش حشرات کامل زنده‌ی کرم ساقه‌خوار که در شب در تله‌ها جلب می‌شدند، صبح هر روز جمع‌آوری و به ظروف پلاستیکی استوانه‌ای منتقل شدند و سپس به آزمایشگاه بخش تحقیقات گیاهپزشکی انتقال یافتند. برای تخم‌گذاری تعداد ۱۰ جفت افراد نر و ماده داخل ارلن مایر به حجم یک لیتر منتقل شدند. قابل ذکر است که در اوایل اردیبهشت که هنوز گیاه برنج رشد کافی ندارد از علف‌هرز بندواش (*Paspalum dictichum* L.) که هم خانواده‌ی برنج (خانواده‌ی گرامینه) است، استفاده شد. سپس علف‌هرز بندواش و یا برگ برنج (بعد از رشد کافی) از قسمت دمبرگ بریده و داخل ارلن‌های استریل قرار داده شدند. در این روش به منظور حفظ و دوام برگ‌ها، قسمت بریده شده (دمبرگ‌ها) داخل پنبه‌ی آغشته به آب مقطر استریل قرار گرفت و درب ارلن با آن بسته شد، همچنین به منظور تهویه‌ی داخل ارلن با نی نوشابه به بیرون ارتباط داده شد. تخم‌ریزی روی برگ‌ها بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت انجام گرفت. در این مرحله تخم‌های گذاشته شده با قیچی که از قبل ضدعفونی شده بود، بریده شد و هر دسته‌ی تخم هم‌سن داخل لوله‌ی آزمایش تا مرحله‌ی سر سیاهی در دمای محیط آزمایشگاه قرار داده شدند. پس از سیاه شدن سر تخم‌ها به یخچال در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس منتقل و نگهداری شدند. برای

آزمایش همواره سعی می‌شد که از دستجات تخم هم‌سن و تازه برای آلودگی مصنوعی استفاده شود. لازم به ذکر است که این کار در دو مرحله‌ی رویشی و زایشی گیاه برنج صورت گرفت. در این ارتباط، در مرحله‌ی رویشی گیاه برنج، بر اساس رفتار و بیولوژی این آفت دستجات تخم رو و زیر برگ‌های برنج نصب شدند (شبیه شرایط طبیعی) ولی در مرحله‌ی زایشی دستجات تخم در غلاف برگ (محل بین ساقه و برگ) گیاه برنج قرار گرفتند. قبل از آلوده‌سازی مصنوعی، محلول‌پاشی با مقادیر مختلف این باکتری انجام شد.

تهیه‌ی باکتری

باکتری مورد نظر از ترکیب تجارتی بی‌تورین و از شرکت فن‌آوری زیستی مهر آسیا (مایکو) تهیه شد. این فرمولاسیون تجارتی حاوی باکتری *B. thuringiensis* var. kurstaki و شامل ۳/۶ درصد ماده موثر و ۹۶/۴ درصد مواد همراه می‌باشد. ماده موثر شامل مخلوط اسپور (تعداد اسپور سلول زنده $۱۰^{۸}$ (CFU) در هر میلی‌لیتر) و کریستال باکتری می‌باشد.

تیمارها، تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش از تجزیه و تحلیل فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو فاکتور، A در چهار سطح با مقادیر ۰/۵، ۱ و ۱/۵ لیتر در هکتار از محلول باکتری و تیمار شاهد (بدون عملیات سمپاشی، فقط آب‌پاشی) و فاکتور B در سه سطح شامل: یک بار محلول‌پاشی قبل از رهاسازی حشره، دوبار محلول‌پاشی (قبل از رهاسازی و ۷ روز بعد از آن) و سه بار محلول‌پاشی (قبل از رهاسازی، ۷ روز بعد از رهاسازی و ۱۴ روز بعد از رهاسازی) استفاده شد. در مزرعه قفس‌هایی به ابعاد ۱×۱ متر داخل کرت‌ها برای جلوگیری از ورود و خروج سایر حشرات هدف و غیر هدف با تور پارچه‌ای کاملا محصور شده بودند. نمونه‌برداری نیز در مرحله‌ی رویشی و زایشی گیاه برنج به طور جداگانه انجام شد. در مزرعه در مرحله‌ی رویشی با مشاهده و شمارش ساقه‌های آلوده، درصد جوانه‌های مرکزی مرده تعیین شد. در ادامه‌ی کار، ساقه‌های آلوده داخل قفس، کف بر شده و داخل کیسه‌های پلاستیکی درب‌دار برای شمارش لاروها به آزمایشگاه انتقال داده شدند. بقیه‌ی بوته‌های داخل قفس به همان صورت تا مرحله‌ی زایشی باقی ماندند. از همین قفس‌ها برای ادامه تحقیق درمرحله زایشی و نسل دوم آفت استفاده شد. البته بوته و ساقه‌های آلوده از داخل این قفس‌ها حذف شدند. نمونه‌برداری در مرحله‌ی زایشی و بعد از مشاهده‌ی خوشه‌های سفید شده و شمارش ساقه‌ها و بوته‌های آلوده، مشابه مرحله‌ی قبل صورت گرفت. برای تعیین درصد جوانه‌های مرکزی آلوده[1] و خوشه‌های سفید شده[2] از فرمول گومز و گومز (Gomez and Gomez, 1984) استفاده شد. همچنین درصد کارایی حشره‌کش مذکور از طریق فرمول هندرسون- تیلتون (Henderson and Tilton, 1955) محاسبه شد. همچنین مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از برنامه‌ی SAS, GLm., 2004 انجام شد.

فرمول(۱)

$$\%D.h \text{ یا } \%W.h = \frac{\text{تعداد ساقه‌های آلوده}}{\text{تعداد ساقه در بوته‌های آلوده}} \times \frac{\text{تعداد بوته‌های آلوده}}{\text{تعداد کل بوته‌ی مورد آزمایش}} \times ۱۰۰$$

فرمول(۲)

$$\text{درصد کارایی سم} = \left(۱ - \frac{Ta \times Cb}{Ca \times Tb}\right) \times ۱۰۰$$

Tb و Ta: میزان آلودگی در کرت های تیمار شده قبل و بعد از سمپاشی، Cb و Ca: میزان آلودگی در کرت‌های شاهد قبل و بعد از سمپاشی

نتایج و بحث

تجزیه‌ی آماری تاثیر مقادیر و دفعات مختلف محلول‌پاشی بی‌تورین در مرحله‌ی رویشی و زایشی گیاه برنج در کاهش جوانه‌های مرکزی مرده و خوشه‌های سفید شده به ترتیب در نسل های اول و دوم آفت ساقه‌خوار نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد وجود دارد. بر این اساس (شکل ۱) مشخص شد که بیش‌ترین

1. Dead hearts
2. White heads

جوانه‌های مرکزی مرده مربوط به تیمار شاهد با ۵/۵۶ درصد آلودگی بود. تیمار ۰/۵ لیتر در هکتار با یک بار مصرف محلول بی‌تورین بعد از تیمار شاهد مقدار ۱/۶۴ درصد آلودگی جوانه‌های مرکزی را نشان داد. آلودگی جوانه‌های مرکزی مرده در تیمار ۰/۵ لیتر در هکتار با دو و سه بار مصرف و تیمار یک لیتر در هکتار با یک بار مصرف با همدیگر اختلاف نداشته به ترتیب (۱/۱۱، ۱/۱۴و۱/۱۵ درصد) در گروه بعد جای گرفتند، اما تاثیر تیمار یک لیتر در هکتار با دو بار محلول‌پاشی بی‌تورین در ایجاد جوانه‌های مرکزی مرده، بیش‌تر از تیمار یک بار مصرف بوده و در گروه بعدی (۰/۸۰درصد) جای گرفت. تاثیر تیمار یک لیتر در هکتار با سه بار محلول پاشی با تیمار ۱/۵ لیتر در هکتار بایک بار محلول پاشی در ایجاد جوانه‌های مرکزی در مرحله رویشی گیاه برنج با هم دیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند و همگی در یک گروه (۰/۵۲) قرار گرفتند. همچنین در بین تیمارهای آزمایشی بیش‌ترین تاثیر محلول بی‌تورین در کاهش خسارت کرم ساقه‌خوار در نسل اول، مربوط به تیمار ۱/۵ لیتر در هکتار با دفعات مختلف (دو و سه بار محلول پاشی) مشاهده شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بین تیمار سه بار استفاده‌ی بی‌تورین در مقایسه با دو بار محلول پاشی بی‌تورین اختلاف معنی‌داری وجود ندارد بنابراین به منظور هم‌پوشانی بیش‌تر مخلوط اسپور و کریستال باکتری، در نسل اول آفت سه بار استفاده قابل توصیه می‌باشد. شکل ۲ تاثیر باکتری بی‌تورین روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج در مرحله‌ی زایشی گیاه برنج و نسل دوم آفت را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که درصد آلودگی خوشه‌های سفید شده از ۵/۰۱ درصد در تیمار شاهد تا ۰/۷۸ درصد در تیمار دو بار محلول‌پاشی به میزان ۱/۵ لیتر در هکتار متغیر بود. در حقیقت در مرحله‌ی زایشی گیاه برنج و نسل دوم آفت ساقه‌خوار دو تا سه بار محلول‌پاشی با بی‌تورین به مقدار ۱/۵ لیتر در هکتار نتایج قابل قبول را در کنترل آفت داشت. از آن جا که بین دو بار مصرف با سه بار مصرف به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. توصیه می‌شود، در مناطقی که آلودگی مزرعه ای بیش از یک دسته‌ی تخم و یا یک عدد پروانه‌ی ساقه‌خوار در یک متر مربع اتفاق افتد، سه بار محلول‌پاشی بی‌تورین انجام گیرد. توصیه‌ی مذکور به این دلیل است که در پژوهش حاضر فقط یک دسته‌ی تخم داخل قفس رهاسازی شد در حالی که در شرایط طبیعی آفت ساقه‌خوار از انبوهی بیش‌تری برخوردار است، بنابراین برای پوشش دادن تاثیر بیش‌تر بی‌تورین در مراحل تخم و لاروهای جوان و بر اساس نتایج آزمایش، سه بار محلول‌پاشی با مقدار ۱/۵ لیتر در هکتار به جای دو بار محلول‌پاشی موفق‌تر باشد. یاد آوری این نکته ضروری می‌باشد که براساس نتایج حاصل از این تحقیق، محلول‌پاشی بی‌تورین علیه آفت ساقه‌خوار برنج باید بر اساس بیولوژی، رفتار جفت‌گیری و زمان تخم‌گذاری آفت، زمان حداکثری جمعیت لاروی (سن اول و گاهی سن دوم لاروی) با فنولوژی گیاه در مراحل رویشی و زایشی مطابقت داشته باشد تا بیش‌ترین تاثیر را از خود نشان دهد. به طوری که پاتاک (Pathak, 1965) گزارش کرد کرم ساقه‌خوار نواری برنج در مرحله‌ی رویشی گیاه برنج در قسمت رویی و پایینی برگ برنج تخم‌گذاری می‌کند، اما در مرحله‌ی زایشی گیاه برنج بیش‌ترین تخم‌گذاری در بخش غلاف برگ صورت می‌گیرد و دلیل این موضوع را گرم شدن هوا در تیر و مرداد بویژه در قسمت‌های بالایی گیاه برنج دانست. بنابراین به نظر می‌رسد که زمان محلول‌پاشی در کارایی این روش تاثیر بسزایی دارد. تحقیق حاضر نشان داد که محلول‌پاشی باید در مرحله‌ی لاروی به‌ویژه برای لاروهای جوان صورت گیرد زیرا لاروهای جوان تا پنج روز بیرون از گیاه برنج زندگی کرده و از پارانشیم برگ تغذیه می‌کنند. از طرف دیگر از آن جا که تمام مراحل زندگی کرم ساقه‌خوار از قبیل حشره‌ی بالغ، تخم، لارو و شفیره مربوط به نسل اول آفت در شرایط مزرعه‌ای از دهه‌ی سوم فروردین ماه تا اواخر دهه‌ی دوم خرداد ماه به طور هم زمان در شرایط استان گیلان (به طور تقریبی به مدت۶۰ تا ۷۰ روز) فعال هستند، بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به زیست‌شناسی آفت ساقه‌خوار در نسل اول و نتایج پژوهش حاضر اگر چنانچه سه بار محلول‌پاشی شامل یک هفته قبل از اوج پرواز پروانه‌ی ساقه‌خوار و یک هفته بعد از اوج پرواز و در مرحله‌ی سوم یک هفته بعد از دومین محلول‌پاشی بی‌تورین انجام گیرد، نتیجه‌ی بهتری حاصل

می‌شود. به همین ترتیب در مرحله‌ی زایشی گیاه برنج نیز که مصادف با نسل دوم این آفت است، سه بار محلول‌پاشی بی‌تورین (۱/۵ لیتر در هکتار) بر اساس زیست‌شناسی آفت، استفاده از تله‌های نوری و مشابه نسل اول آفت ساقه‌خوار نتایج مطلوبی به دنبال خواهد داشت. نکته‌ی قابل ذکر این است که با توجه به این که آستانه‌ی خسارت بر حسب آلودگی جوانه‌های مرکزی مرده در مرحله‌ی رویشی گیاه و در نسل اول ساقه‌خوار برنج نباید از دو درصد تجاوز کند (Khosrowshahi *et al*., 1979)، لازم است کنترل آفت ساقه‌خوار برنج در این مرحله با دیگر روش‌های کنترل مثل رهاسازی زنبور تریکوگراما و نیز محلول‌پاشی بی‌تورین تلفیق شود تا جمعیت آفت در حد تعادل قرار گیرد زیرا در این مرحله به دلیل استقرار سایر دشمنان طبیعی در ابتدای فصل زراعی در شالیزار محلول‌پاشی با حشره‌کش‌های شیمیایی توصیه نمی‌شود. همچنین در مرحله‌ی زایشی آلودگی خوشه‌های سفید شده در مزرعه نباید از یک درصد تجاوز کند (Khosrowshahi *et al*., 1979) در غیر این صورت توصیه می‌شود که حشره‌کش‌های شیمیایی گرانول برای کنترل این آفت مصرف شود. خرازی پاکدل و همکاران (Kharazi-Pakdel *et al.,* 1983) در بررسی تاثیر حشره‌کش‌های میکروبی بر مبنای (باکتری Bt) شامل سلکزین[1]، تورساید[2]، باکتوسپین[3]، دیپل[4] و حشره‌کش‌های شیمیایی دیازینون[5]، دیمیکرون[6]، فوردان[7]، سومیتیون[8] و داکموکس[9] و بالاخره کاربرد توام حشره‌کش‌های میکروبی با سموم تخم‌کش مثل فاندال[10] و آمیتراز[11] روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج نشان دادند که باکتری Bt به لحاظ تلفات مرگ و میر با دیگر روش‌های مبارزه از قبیل سمپاشی اختلاف معنی‌داری نداشت. نتایج حاصل از یک بررسی مزرعه‌ای نشان داد تیمار یک لیتر در هکتار با سه بار سمپاشی و ۱/۵ لیتر در هکتار با دو یا سه بار سمپاشی به ترتیب ۱۰/۶۹، ۱۱/۸۳ و ۱۳/۲۳ مرتبه نسبت به شاهد بدون سم گرانول دیازینون در نسل اول کرم ساقه‌خوار نواری برنج موجب کاهش جوانه‌های مرکزی شده است. همچنین در نسل دوم آفت، یک لیتر با سه بار محلول‌پاشی و ۱/۵ لیتر در هکتار با دو و سه بار محلول‌پاشی به ترتیب ۶/۵،۵/۲۸ و ۶/۱۱ مرتبه نسبت به شاهد بدون سم گرانول دیازینون درصد آلودگی خوشه‌های سفید شده را کاهش داده است (Majidi-Shilsar and Rahimi-Moghadam, 2010). نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس کارایی حشره‌کش میکروبی بی‌تورین روی کرم ساقه‌خوار طی دو نسل در موسسه‌ی تحقیقات برنج کشور نشان داد که تیمارها در سطح احتمال یک و پنج درصد با هم اختلاف معنی‌داری دارند (شکل ۳). به طوری که بیش‌ترین کارایی در نسل اول ساقه‌خوار مربوط به تیمار با مقدار ۱/۵ لیتر در هکتار با سه بار محلول‌پاشی (۶۱/۲۲ درصد) مشاهده شد. بعد از آن تیمار ۱/۵لیتر در هکتار با دو بار محلول پاشی با کارایی ۵۲/۴۴ درصد نزدیک به تیمار سه بار محلول پاشی بوده است. با توجه به این‌که محلول‌پاشی دو و سه بار با مقدار ۱/۵ لیتر در هکتار در کاهش جوانه‌های مرکزی مرده (شکل۱) به لحاظ آماری اختلافی با یکدیگر نداشتند، می‌توان چنین بیان نمود که کارایی حشره‌کش میکروبی بی‌تورین بر اساس تعداد لاروهای زنده‌ی داخل ساقه تعیین شده است، لذا در مواردی مشاهده شد که داخل یک ساقه به جای یک لارو پنج تا شش لارو ساقه‌خوار وجود داشت ودر نتیجه فقط و فقط یک ساقه‌ی آلوده محاسبه شد. در حقیقت وجود چند لارو داخل ساقه به اندازه‌ی یک لارو می‌تواند یک ساقه را آلوده کند. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کمترین کارایی حشره‌کش میکروبی بی‌تورین در نسل اول مربوط به تیمار ۰/۵ لیتر در هکتار با یک بار محلول‌پاشی (۱۵/۵۳ درصد) بوده است. علاوه بر این بیش‌ترین کارایی این حشره‌کش روی لاروهای ساقه‌خوار برنج در نسل دوم مربوط به تیمار

1. Seleczin
2. Thuricide
3. Bactospeine
4. Dipel
5. Diazinon
6. Dimicron
7. Furadan
8. Sumithio
9. Dacmox
10. Fundal
11. Amitraz

۱/۵ لیتر در هکتار با دو و سه بار محلول‌پاشی به ترتیب (۴۲/۹۳ و ۴۸/۴۸ درصد) مشاهده شد. این موضوع با درصد خوشه‌های سفید به‌طور کامل مطابقت دارد (شکل ۳). نکته‌ی قابل ذکر این است که استفاده از این حشره‌کش در مرحله‌ی رویشی برنج که مطابق با نسل اول ساقه‌خوار است نسبت به مرحله‌ی زایشی گیاه برنج و نسل دوم آفت ساقه‌خوار از درصد کارایی بیش‌تری برخوردار بوده است. به نظر می‌رسد که علت کاهش کارایی محلول بی‌تورین در نسل دوم آفت ساقه‌خوار از یک طرف به دلیل افزایش دما، تشدید اشعه‌ی ماورای بنفش خورشید، کاهش رطوبت و افزایش خشکی محیط و از طرف دیگر افزایش جمعیت آفت ساقه‌خوار در نسل دوم باشد،که همگی تاثیر منفی در کارایی باکتری داشتند. در همین ارتباط مطالعات رامباخ و همکاران (Rambach *et al*., 1994) نشان داد که باکتری Bt می‌تواند برای کنترل کرم ساقه‌خوار برنج با شرط این که چهار تا پنج مرتبه در یک دوره‌ی دو ماهه‌ی رشد گیاه در مزرعه استفاده شود، تاثیرگذار باشد. آن‌ها همچنین اظهار داشتند که یکی از عوامل باز دارنده‌ی محیطی که روی اسپورهای این باکتری به شدت تاثیر می‌گذارد اشعه‌ی ماورای بنفش نور خورشید بوده که باعث کاهش طول عمر عامل بیولوژیکی مذکور می‌شود. به طوری که در شرایط مزرعه‌ای اسپور و کریستال‌های این باکتری به سرعت توسط اشعه‌ی ماورای بنفش خورشید از بین می‌روند بنابراین توصیه کردند که برای این که اسپورهای این باکتری روی لاروهای نوزاد تاثیر بگذارند و آن‌ها را بکشند لازم است به‌طور هفتگی علیه این آفت باکتری‌پاشی صورت گیرد که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد. در همین ارتباط پاندا و نایاک (Panda and Nayak, 1994) که فرمولاسیون تجارتی *B. thuringiensis* var. kurstaki را به مقدار دو کیلوگرم در هکتار علیه ساقه‌خوارهای برنج استفاده کرده بودند بعد از ۱۲، ۴۲، ۶۴ و ۷۲ ساعت تاثیر این عامل بیولوژیکی را مشاهده کردند و نشان دادند که بیش‌ترین اثرگذاری مربوط به ساعت اولیه‌ی آزمایش بوده است. همچنین فوکسا (Fuxa, 1989) درباره‌ی مدت زنده مانی اسپور، اختصاصی عمل کردن، حفظ، نگهداری و فعالیت کریستال‌های سمی این باکتری اظهار داشت چنانچه این عامل بیولوژیکی در مزرعه اسپری شود فعالیت آن به مقدار زیادی کاهش می‌یابد به طوری که در شرایط کاملا باز وقتی که اسپورها و کریستال‌ها در معرض اشعه‌ی فرابنفش خورشید قرار گرفتند، عموما منجر به کاهش طول عمر آن‌ها شد. علاوه بر این اظهار داشت که نیمه‌عمر باکتری در شرایط مزرعه‌ای یک تا دو روز ولی در شرایط جنگل پنج تا ده روز می‌باشد.

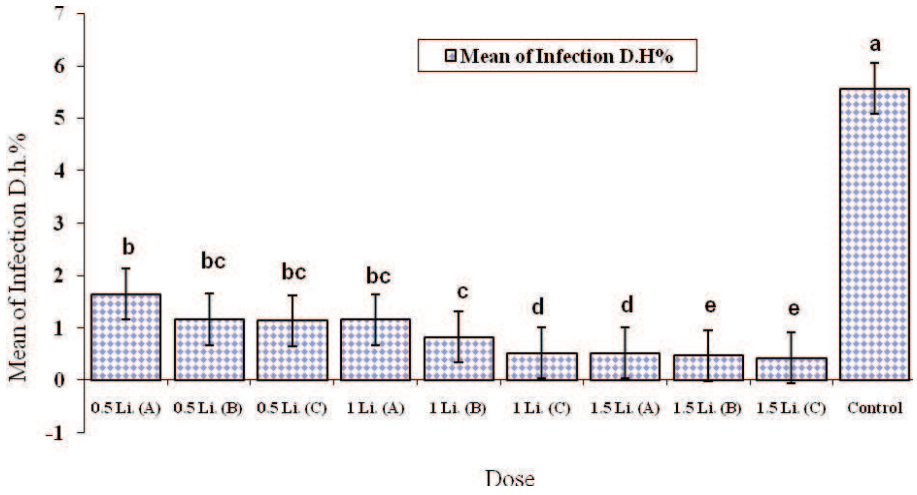
نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با به کارگیری عامل بیولوژیکی (باکتری Bt) امکان کاهش مصرف حشره‌کش‌های شیمیایی، حفظ محیط زیست و اکوسیستم زراعی در شالیزار وجود دارد. باغچه‌سرایی و همکاران (Baghchehsaraee *et al*., 2004) در بررسی کارایی فرمولاسیون‌های مختلف Bt علیه کرم سبز برگ‌خوار *Naranga aenescens* (Moore) در مزرعه نشان دادند که باکتری‌پاشی دو فرمولاسیون پودر وتابل Lp 1 و Lp (مخلوط اسپور و کریستال باکتری) روی لاروهای رهاسازی شده در مزرعه باعث کاهش جمعیت آفت به میزان ۶۲٪ شد. بررسی‌های رضایی‌پور (Rezaiepoor, 2011) روی دو نمونه فرآورده‌ی این باکتری به صورت پودر و مایع بعد از شش روز نشان داد که تجزیه‌ی آماری مرگ و میر ناشی از این باکتری روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج در آزمایشگاه تفاوت معنی‌داری بین تیمارها در سطح پنج درصد داشت. به طوری‌که نسبت میانگین تلفات حاصل از کشت پودر به کشت مایع ۱/۵ مرتبه بیش‌تر بود. به علاوه کشت آزمایشگاهی حاصل از دو فرآورده با اندک تمهیداتی اثر کشندگی بالایی نسبت به فرآورده‌ی اصلی نشان داد و حتی فرآورده‌ی تازه‌تر موثرتر بود. حتی توسعه‌ی آزمون‌ها به گلخانه و قفس‌های نصب شده در مزرعه و امکان برآورد تلفات مشهود و غیر مشهود در قیاس با شاهد، تفاوت‌ها را بهتر نشان داد و کارایی باکتری را روی این آفت اثبات کرد. همچنین نسبت میانگین تلفات حاصل از کشت پودر و کشت مایع روی آفت مذکور در گلخانه ۱/۸۳ مرتبه بیش‌تر بود. رضایی‌پور و همکاران (Rezaiepoor *et al*., 2011) در ارزیابی فرآورده‌های حاصل از باکتری Bt روی کرم سبز

برگخوار و کرم ساقه‌خوار نواری برنج در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای نشان دادند که ۵۰ درصد لاروهای این دو آفت نسبت به تیمار شاهد تلف شدند. میانگین تلفات کرم سبز برگ‌خوار برنج در شرایط گلخانه‌ای از تعداد ۲۰ عدد لارو با کشت پودر باکتری ۹/۶ عدد و با کشت مایع چهار عدد بود. همچنین این تلفات در مزرعه به ترتیب ۱۰/۳ و ۳/۳ بود. همچنین آن‌ها نشان دادند که تاثیر فرآورده‌های فوق روی لارو ساقه‌خوار نواری برنج در شرایط مزرعه (۲۷/۳) بیش‌تر از گلخانه (۲۳ عدد) می‌باشد. رضاپناه و مجیدی شیل‌سر (Rezapanah and Majidi-Shilsar, 2011) در بررسی‌های خود در کنترل کرم ساقه‌خوار نواری برنج در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای به وسیله‌ی باکتری Bt نشان دادند که این عامل بیولوژیکی نه تنها روی شب پره‌هایی که به برگ‌های مورد آزمایش حمله کردند، موثر بود بلکه لاروهایی که از ساقه‌های برنج تغذیه کردند نیز تا ۸۵/۵ ٪ تلف شدند. تحقیق فوق تاییدی بر این آزمایش در موسسه تحقیقات برنج می‌باشد.

نتایج کلی این تحقیق نشان داد که مناسب‌ترین تیمار، محلول‌پاشی بی‌تورین مقدار ۱/۵ لیتر در هکتار در دو تا سه مرحله می‌باشد. برای این منظور لازم است اولین مرحله‌ی مصرف هم‌زمان با فعالیت بیش‌ترین تعداد پروانه‌ی ساقه‌خوار، دومین مرحله یک هفته بعد از اولین محلول‌پاشی و سومین مرحله یک هفته بعد از دومین محلول‌پاشی صورت گیرد. همچنین مشخص شد که کارایی محلول‌پاشی مخلوط اسپور و کریستال باکتری Bt روی آفت ساقه‌خوار نواری برنج در مرحله‌ی تخم و در مرحله‌ی رویشی گیاه برنج بیش‌تر از مرحله‌ی زایشی آن داخل قفس می‌باشد. به طور کلی حشره‌کش میکروبی بی‌تورین در کاهش آلودگی جوانه‌های مرکزی مرده و درصد کارایی آن در مرحله‌ی رویشی گیاه برنج که مصادف با نسل اول آفت ساقه‌خوار است موثرتر از مرحله‌ی زایشی و نسل دوم آفت می‌باشد.

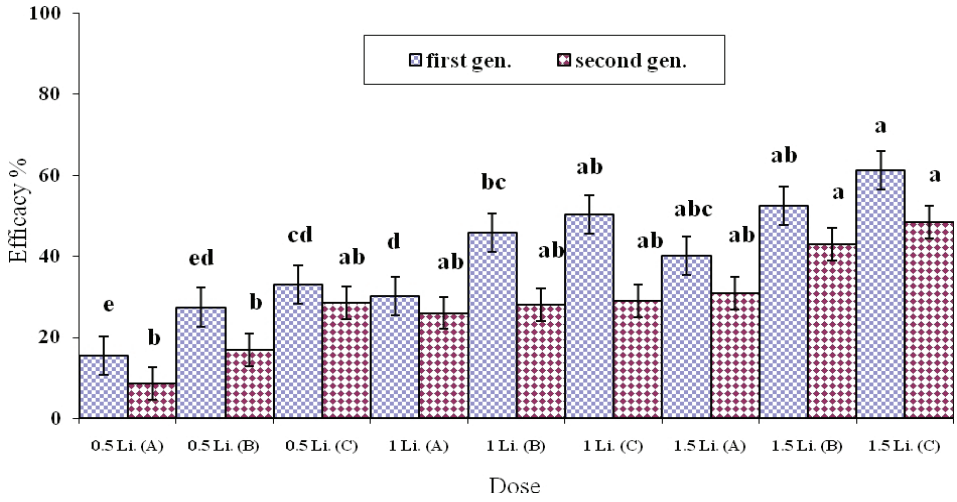
سپاسگزاری

تحقیق حاضر نتایج پروژه‌ی تحقیقاتی است که با حمایت مالی موسسه‌ی تحقیقات برنج کشور و شرکت فنآوری زیستی مهر آسیا در رشت انجام شده است که بدین وسیله سپاسگزاری می‌شود.



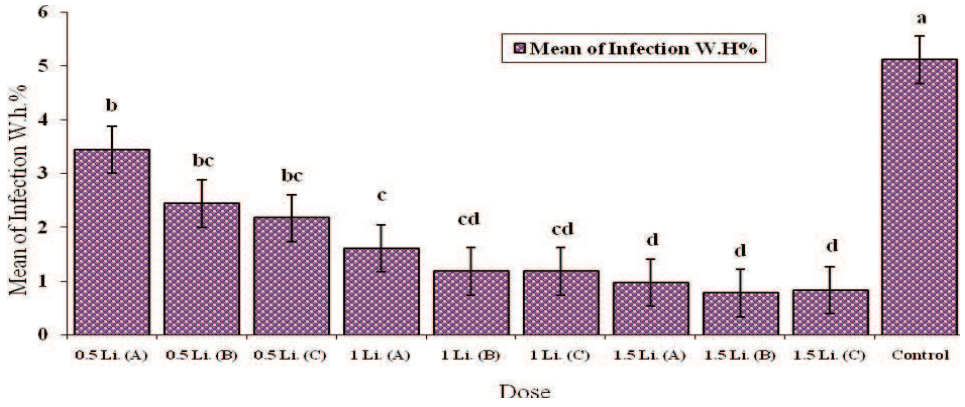
شکل ۱- میانگین درصد جوانه‌های مرکزی مرده متاثر از فرآورده باکتری Bt روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج در مزرعه؛ A یک بار سمپاشی، B دوبار سمپاشی، C سه بار سمپاشی

Figure 1. Average of Dead hearts percent impressed by Bt on striped stem borer in the rice field; (A) one time spraying, (B) two times sprying, (C) three times sprying



شکل ۲- میانگین درصد خوشه‌های سفید شده متاثر از فرآورده باکتری Bt روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج در مزرعه؛ A یک بار سمپاشی، B دوبار سمپاشی، C سه بار سمپاشی

Figure 2. Average white heads percent impressed by Bt on striped stem borer in the rice field; (A) one time spraying, (B) two times sprying, (C) three times sprying



شکل۳- کارایی حشره‌کش بیولوژیکی بی‌تورین روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج در نسل های اول و دوم در مزرعه؛ A یک بار سمپاشی، B دوبار سمپاشی، C سه بار سمپاشی

Figure 3. Efficacy of bioinsecticide on striped stem borer for first and second generations in the rice field(A) one time spraying, (B) two times sprying, (C) three times sprying

References

Alam, M. Z., Alam, M. S. and Abbas. M. 1972. Status of different stemborers as pests of Bangladesh. **International Rice Common Newsletter** 21(92): 729.

Baghchehsaraee, B., Moosavi, M. and Alizadeh, S. 2004. The effect of different formulations of *Bacillus thringiensis* on *Naranga aenescens* in the field. Proceeding of the 16th Iranian Plant Protection Congress. 28 August-1 September, Iran. pp. 84.

Breitler, J. C., Corder, M., Royer, J., Meynard, M., Sansegundo, D. B. and Guiderdoni, E. 2001. The region of the maize protease inhibitor gene directs high level wound- inducible expression of the Cry 1B gene which protects transgenic rice plants from stem borer attack. **Molecular Breeding** 7: 259-274.

Burges, H. D. 1998. Formulation of microbial biopesticide beneficial microorganisms and nematodes. Kluwer Academic Dordrecht.

Dale, D. 1994. Insect pest of rice plants-their biology and ecology. In Heinrichs, E A. (Ed.)**.** Biology and Management of Rice Insects. International Rice Research Institute. Los Banos Philippines, Wiley Eastern Ltd. pp.363-485.

Fiuza, L. M., Nielsen-Leroux, C., Goze, R., Frutos, R. and Charles, J. F. 1996. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush bordes membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Evidence of Shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology** 62(1): 1544-1549.

Frankenhuzen K. V. 1993**.** The challenge of *Bacillus thuringiensis*. John Wiley publication, New York.

Frutos, R., Rang, C. and Royer, M. 1999. Managing insect resistance to Plants producing *Bacillus theringiensis* toxins. **Critical Reviews of Biotechnology** 19: 227-276.

Fuxa, J. R. 1989. Fate of released entomopathogens with reference to risk assessment of genetically engineered microorganisms. **Bulletin of the entomological Society of America** 35: 12-24.

Gomez, K. A. and Gomez, A. A. 1984 .Crop Loss Assessment in Rice. Manila (Philippines): International Rice Research Institute. In P.T. Walker (ed.) Statistical Procedures for Agricultural research. Wiley, London and New York, pp. 55-65.

Henderson, C. F. and Tilton, E. W. 1955. Tests with acaricides against the brow wheat mite. **Journal of Economic Entomology** 48: 157-161.

Hodgson, E. 2007. Using microbial pesticides. Utah Pests News Spring.

Karimi, J. and Abbasipour, H. 2000. Potential of *Bacillus thuringiensis* subsp *Kurstaki* (3a3b) on young larval instars of rice stem borer (*Chilo suppressalis* Walker). Proceedings of 14th Iranian Plant Protection Congress, 5-8 September. Iran. pp. 229.

Kharazi-Pakdel, A., Oloumi-Sadeghi, H., Djafari, H. A. and Malaeke, F. 1983. Etudes comparatives de L' influence insecticides microbiens et chimiques sur La pyrole du riz (*Chilo suppressalis* Walker) (Lep., Pyralidae) et discussions analyyiques de leurs Problemes en Iran. Proceedings of 7th Plant Protection Congress of Iran,12-16 September. Iran. pp. 23-24.

Khosrowshahi, M. Nikkhoo, F., Dezfulian, A., Banihashemian, B. 1979. Assessment of rice loss caused by rice stem borer. **Applied Entomology and Phytopathology** 47(2): 107-117.

Majidi-Shilsar, F. and Rahimi-Moghadam, A. 2010. Study of effect Bithirin biological compound on striped stem borer, *Chilo suppressalis*. Proceedings of 19th Iranian Plant Protection Congress, 31 July- 3 August, Iran. pp. 88.

Majidi-Shilsar, F. and Amouoghlitabari, M. 2011. Investigation on efficiency of Fipronil as granular and concentrated suspension formulations against *Chilo suppressalis* Walker in North of Iran. Final Report of a Research Projects. Rice Research Institue of Iran. Rasht (In Farsi).

Meng, F., Wu, K., Gao, X., Peng, Y. and Guo, Y. 2003. Geographic variation in susceptibility of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins in China. **Journal of Economic Entomology** 96(6): 1838-1842.

Nayak, P., Rao, P. S. and Padmanabham, S. Y. 1978. Effect of Thuricide on rice stem borers. **Proceeding of Indian Acadimic Science** 87: 59-62.

Panda, S. K., Nayak, V. K. 1994**.** Field efficacy of commercial formulation of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki against rice stem borers and leaf folder. **Pest Management and Zoology** 7(2): 143-146.

Pathak, M. D. 1965. Ecology of common insect pests of rice. **Annual Review of Entomology** 13: 257-294.

Rambach, M. C., Roberts, D. W. and Aguda, R. M. 1994. Pathogen of rice insects. In Heinrichs, E, A. (Ed.). Biology and Management of Rice Insects. International Rice Research Institute. Los Banos Philippines.Wiley Eastern Ltd. pp .613-656.

Rezaiepoor, A. 2011. Comparative evaluation of efficiency of *Bacillus thringiensis* on *Naranga aenescens* Moore and *Chilo supressalis* Walker. MSc. thesis. Islamic Azad University of Arak Branch. **Rezaiepoor, A., Rezapanah, M., Majidi-Shilsar, F, Hoda, H., Amoghli-Tabari, M., Hasanzadeh, M., Abdolahi-Ahi, Gh. and Dadpour-Moghanloo, H.** 2011**.** Comparaative effectiveness evaluation of *Bacillus thuringiensis* preparations on main pests of rice, *Naranga*

aenescens and *Chilo suppressalis*, in north of Iran. Proceeding of 3th International Entomopathogens and Microbial Control Symposium. 18- 22 September, Turkey. 62 pp.

Rezapanah, M., Majidi-Shilsar, F. 2011. The recent improvement in microbial control of rice stem borer, *Chilo suppressalis* in North of Iran. Proceeding of 3th International Entomopathogens and Microbial Control Symposium. 18- 22 September, Turkey. 39 pp.

SAS Institute. 2004**.** SAS/STAT user's guide, version 9.1. Statistical analysis system Institute, Electronic version, Cary, NC. USA.

Schnepf, E., Crickmore, N., Vanrie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. and Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and MolecularBiology Reviews** 62: 775- 806.

Plant Pests Research
2014 – 4(2): 47-58

Field evaluation of Bithurin, a commercial formulation of *Bacillus thuringiensis* against stripped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker

F. Majidi-Shilsar[1*]
1. Assistant Professor of Entomology and Member of Scientific board of Rice Research Institute of Iran, Rasht

(Received: October 23, 2013- Accepted: January 29, 2014)

Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) is widely used in two forms, toxic crystal and a mix of spores and crystal for controlling of harmful insects. This research carried out in order to evaluate the effect of Bithurin on striped stem borer, *Chilo suppresslis* (SSB) under field conditions in Rasht during 2010. The experiment was conducted in a complete randomized design with two factors including: Dose and usage times with 3 replications. Results showed that 1.5 and 1 liter per hectare with two and three application times of Bithurin had the most effect on SSB and reduced the percentage of dead hearts to 0.42 and 0.47 %, respectively. Also, the highest efficacy in first generation of SSB was observed in the treatment of 1.5 liter per hectare with three times spraying (61.22%). In this study, spraying of one liter Bithurin with three times per hectare in the rice vegetative stage reduced the percentage of dead hearts to 0.52% in comparison with control. In reproductive stage of rice, percentage of the lowest infection white heads observed in 1.5 liter per hectare in plots with two and three times application, 0.78 and 0.83%, respectively. Also, the highest efficacy observed in plots with 1.5 liter per hectare with two and three times application in comparison with control (42.93 and 48.48%), respectively. Infection of white heads reduced by 3.84% in comparison with control in rice field. Therefore, if in a field infection is higher than the norm, 2-3 times of spraying can be recommended.

Key words: *Chilo suppressalis*, Bt, Bithurin, Dead hearts,White heads

*Corresponding author: majidi14@yahoo.com