تحقیقات آفات گیاهی
۱۴۰۲ -۱۳(۱): ۱۵ -۲۴

علمی پژوهشی

بررسی تاثیر حشره‌کشی سه سویه باکتری محرک رشد گیاهی از گروه سودوموناس در کنترل بید آرد *Anagasta keuhniella* و تاثیر لاروهای بیمار روی فرایند انتخاب میزبان زنبور پارازیتوئید *Habrabracon hebetor*

رقیه آذرنوش، فاطمه یاراحمدی*، وحید کشاورز توحید و علی رجب‌پور
گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، باوی، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱/۳۰)

چکیده

باکتری‌های سودوموناس دارای گونه‌های بسیار زیادی بوده که دارای خصوصیات مختلف می‌باشند. برخی از گونه‌های این جنس به عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاهی شناخته می‌شوند. به تازگی توانایی این باکتری‌ها در کنترل حشرات آفت شناخته شده است. در این مطالعه تاثیرات کشندگی سه سویه *Pseudomonas protegens* CHA0، *P. soli* VF16 و *P. persica* VKh13 روی تخم و لارو شب‌پره بید آرد *Anagasta keuhniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) به عنوان یک آفت مهم انباری مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور، سوسپانسیونی از سویه‌های یاد شده در دو غلظت با چگالی نوری ۰/۲ و ۰/۵ OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد. لاروهای سن پنجم و تخم‌های شب‌پره بید آرد توسط سوسپانسیون‌های تهیه شده مایه‌زنی شدند و درصد تلفات آنها ۲۴ ساعت پس از تیمار ثبت شد. بررسی‌های آماری نشان داد که سویه *P. protegens* CHA0 دارای بیشترین اثر کشندگی بر روی لارو بید آرد است (۷۹/۱۶ درصد) و سویه *P. soli* VF16 (۶۴/۱۵ درصد) در جایگاه بعد قرار گرفت. همچنین، مشخص شد سویه *P. persica* VKh13 فاقد اثر حشره‌کشی بود. میزان اثربخشی این سویه‌ها در غلظت ۰/۵ OD به صورت معنی-داری بیشتر از غلظت ۰/۲ OD ارزیابی شد. تفاوت معنی‌داری بین حساسیت لاروها و تخم‌های این حشره نسبت به سویه‌های مختلف مورد بررسی در این تحقیق مشاهده نشد. بیشترین ماهیت کشندگی در کاربرد غلظت ۰/۵ OD سویه *P. protegens* CHA0 روی لاروهای این آفت مشاهده شد. نتایج بویایی‌سنجی نشان داد زنبورهای پارازیتوئید ماده *Habrabracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) از بوی لاروهای تیمار شده توسط هر سه سویه به صورت معنی‌داری اجتناب می‌کنند. از نتایج این تحقیق برای توسعه برنامه کنترل میکروبی این آفت می‌توان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آفات انباری، دشمنان طبیعی، کشندگی، کنترل میکروبی

*نویسنده مسئول: yarahmadi@asnrukh.ac.ir

مقدمه

بیش از ۷۰۰ گونه بال‌پولکدار به‌عنوان آفت انباری موجب خسارت اقتصادی سنگینی به محصولات انباری می‌شود (Hill, 1990). از بین این آفات، بید آرد *Anagasta kuhniella* (Zeller) (Lep.: Pyralidae) یکی از آفات مهم و خسارت‌زای محصولات کشاورزی در شرایط انباری می‌باشد. شب‌پره آرد آفتی همه‌جازی است که لارو آن به بسیاری محصولات انباری حمله می‌نماید (Johnson *et al.*, 2002).

یکی از راهکارهای جایگزین برای کنترل آفات انباری، استفاده از عوامل کنترل زیستی می‌باشد. استفاده از عوامل میکروبی در قالب برنامه کنترل میکروبیولوژیک یکی از راهکارهایی است که در سال‌های اخیر با توجه به کم‌خطر بودن روی موجودات غیرهدف، مورد توجه زیادی قرار گرفته است (Khetan, 2000).

باکتری‌های گرم منفی گروه سودوموناس فلورسنس[1] (*Pseudomonas fluorescens* group) بیشتر با خصوصیات مفیدشان برای گیاهان شناخته می‌شوند. این خصوصیات شامل مقابله با بیماری‌های گیاهی، ایجاد مقاومت در گیاهان نسبت به آفات و بیماری‌های گیاهی و حل کردن و در دسترس قرار دادن مواد معدنی به‌منظور جذب هرچه بیشتر توسط ریشه‌های گیاهان، می‌باشد. با وجود این، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد ریشه گیاهان تنها محیطی نیست که توسط این باکتری‌ها کلونیزه[2] می‌شود (Péchy- Tarr *et al.*, 2008). در واقع، بسیاری از سویه‌های جداسازی شده گروه سودوموناس فلورسنس، توانایی کلونیزه کردن حشرات را دارند (Péchy- Tarr *et al.*, 2008). در واقع، بسیاری از سویه‌های جداسازی شده گروه سودوموناس فلورسنس، توانایی کلونیزه کردن حشرات را دارند (Péchy- Tarr *et al.*, 2008). بررسی‌های تبارشناختی صورت‌گرفته نشان داد که باکتری‌های این گروه در سه زیرگروه تباری[3] شماره یک تا سه قرار می‌گیرند (Péchy- Tarr *et al.*, 2008). از بین این سه گروه تباری، باکتری‌ها و سویه‌های موجود در زیرگروه یک و سه توانایی بیماری‌زایی در حشرات دارند؛ به ویژه سویه‌های موجود در زیر گروه یک که شامل سویه‌های *Pseudomonas protegens* و *P. chlororaphis* هستند، ماهیت حشره‌کشی بالایی از خود نشان می‌دهند. این باکتری‌ها هنگام تزریق به حشرات بسیار کشنده هستند و برخی زمانی که توسط لارو حشرات بلعیده می‌شوند دارای خصوصیت کشندگی می‌باشند. بررسی‌های صورت گرفته نشان داد این سویه‌ها حاوی ژن‌های تولیدکننده آنزیم‌هایی نظیر کیتیناز و فسفولیپاز C[4] می‌باشند، ولی اینکه چگونه سودوموناده‌ای مرتبط با گیاهان دقیقاً حشرات را کلونیزه می‌کنند و کدام عوامل برای عفونت‌های کشنده تعیین‌کننده هستند، هنوز تا حد زیادی ناشناخته است (Flury *et al.*, 2016).

سویه‌های باکتری *P. protegens* CHA0، *P. soli* VF16 و *P. persica* VKh13 از باکتری‌های محرک رشد گیاهی بومی ایران هستند که توانایی آنتاگونیستی آنها در مقابل عوامل بیماری‌زای گیاهی به اثبات رسیده است (Keshavarz-Tohid *et al.*, 2016; Keshavarz-Tohid *et al.*, 2019). اگرچه اثرات مطلوب برخی سویه‌های باکتری سودوموناس نظیر *Pseudomonas syringae* در کنترل میکروبی سوسک کشیش *Rhyzopertha dominica* F. (Col.: Bustrichidae) (Guechi *et al.*, 2011)، شپشه گندم *Sitophilus granarius* L. (Col.: Curculionidae) و شپشه دندانه‌دار *Oryzaephilus surinamensis* L. (Col.: Silvanidae) به عنوان آفات مهم انباری اثبات شده است، ولی هیچ مطالعه منتشر شده‌ای در خصوص تاثیر این سویه‌ها روی مرگ و میر آفات نشد. بنابراین، در این تحقیق اثرات حشره‌کشی این سه سویه در کنترل شب‌پره بید آرد و اثر روی رفتار زنبور پارازیتوئید *Habrabracon hebetor* Say (Hym.: Braconidae) به عنوان دشمن طبیعی آن بررسی شد.

[1]. Fluorescent
[2]. Colonization
[3]. Sub-clade
[4]. Chitinase and phospholipase

مواد و روش‌ها

حشرات مورد آزمایش

پرورش حشرات و تمام آزمایش‌ها، در آزمایشگاه حشره‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان صورت گرفت. یک‌ونیم کیلو آرد گندم به علاوه نیم کیلو سبوس به همراه مقدار کمی مخمر به عنوان جیره لاروی بید آرد استفاده شد (Shams-Salehi *et al.*, 2016). این ترکیب جیره داخل تشت‌هایی به قطر ۴۰ و عمق ۱۰ سانتی‌متر ریخته شدند و بعد از مخلوط کردن، یک گرم تخم شب‌پره آرد روی آن ریخته و با پارچه‌ای تمیز روی تشت پوشانده شد. تشت‌های پرورش در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰ درصد و در شرایط بدون نور قرار داده شد. بعد از حدود ۴۰ روز و طی مرحله لاروی و شفیرگی، به تدریج اولین شب پره‌ها مشاهده شدند. ظروف تخم‌گیری از قیف‌های بزرگی که یک طرف دهانه توسط پارچه توری نازک پوشانده شده بود، تشکیل می‌شد. شب پره‌ها از ته باریک به داخل قیف وارد شده و درب آن مسدود شد و قیف‌ها روی کاغذ روغنی گذاشته شد تا پروانه‌ها تخم خود را روی سطح قرار دهند (Shams-Salehi *et al.*, 2016). برای انجام زیست‌سنجی لاروهای سنین آخر (سن پنجم) تا دو روزه از تشت‌های پرورش مورد اشاره، به صورت مستقیم با یک پنس ظریف جداسازی شد.

زنبورهای بالغ *H. hebetor* از انسکتاریوم تجاری تولید این عامل کنترل زیستی در شهرستان اندیمشک تهیه شد و به صورت مستقیم در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

منابع تهیه سویه‌های باکتری *Pseudomonas*

به منظور بررسی تاثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه از گروه سودوموناس در کنترل بید آرد، از سویه‌های *P. protegens* CHA0، *P. soli* VF16 و *P. persica* VKh13 تهیه شده از کلکسیون گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان استفاده شد. سویه *P. protegens* CHA0 یک سویه استاندارد بین‌المللی با خصوصیات آنتاگونیستی و محرک رشد گیاهی می‌باشد و سویه‌های *P. soli* VF16 و *P. persica* VKh13 از خاک اطراف ریشه گیاه لوبیا به ترتیب از استان‌های فارس و خراسان رضوی جمع‌آوری، شناسایی و ثبت شدند (Keshavarz-Tohid *et al.*, 2019).

مایه‌زنی لاروها و تخم‌های شب‌پره بید آرد با سوسپانسیون باکتری

به منظور بررسی تاثیر کشندگی سویه‌ها بر تخم و لارو بید آرد از دو غلظت با چگالی نوری ۰/۲ و ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD_{600}) استفاده شد. انتخاب این غلظت‌ها براساس آزمایش‌های اولیه صورت گرفت. به منظور اندازه گیری غلظت‌های مورد اشاره از دستگاه اسپکتروفتومتری استفاده شد. در هر آزمایش تعداد ۱۰ عدد تخم یا لارو بید آرد در ظروف پتری به قطر ۱۰ سانتی‌متر و عمق ۱ سانتی‌متر قرار داده شد. سپس غلظت‌های مورد آزمایش با استفاده از یک افشانه دستی (ساخت شرکت مونکو مدل ۵۰۰ میلی-لیتری) از فاصله ۲۰ سانتی‌متری به ظروف مورد نظر به تعداد دو اسپری، پاشیده شد، به صورتی که طی این دو اسپری، حدود یک میلی‌لیتر از غلظت مورد نظر در ظرف پتری حاوی تخم یا لارو بید آرد به صورت یکنواخت قرار گرفت. در تیمار شاهد از آب مقطر استریل به روی مشابه استفاده شد. ظروف پتری حاوی تخم یا لارو حشرات تیمار شده درون انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و تاریکی به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد و پس از ۲۴ ساعت تلفات لاروها ثبت شد. ملاک مرگ لاروهای مورد آزمایش عدم تحرک بعد از تحریک با یک سوزن ظریف بود. همچنین، تخم‌هایی که تغییر شکل و تغییر رنگ داده و عمل تفریخ بعد از مدت زمان مشخص صورت نگرفته بود، به عنوان مرده لحاظ شدند (Bahmani *et al.*, 2020; Sohrabi *et al.*, 2021). برای هر سویه باکتری و هر غلظت سه تکرار و در هر تکرار ۱۰ عدد لارو سن پنجم و یا تخم شب‌پره بید آرد در نظر گرفته شد.

بررسی تاثیر لاروهای بیمار روی فرایند انتخاب میزبان سویه‌های مورد مطالعه باکتری *Pseudomonas* روی زنبور *H. hebetor*

در این آزمایش دستگاه بویایی‌سنج Y شکل پلاستیکی طراحی شد که قطر پایه آن یک سانتی‌متر و طول هشت

سانتی‌متر و دو سر بازوی آن با قطر ۳ سانتی‌متر و طول ۱۵ سانتی‌متر بود. سر هر یک از بازوها درون یک لیوان پلاستیکی درپوش‌دار (به عنوان محفظه نمونه) قرار داده شد. جریان هوا با استفاده از یک پمپ هوا به هر یک از بازوها فرستاده شد. در انجام آزمایش ابتدا کل دستگاه با الکل ۷۰ درصد و پنبه تمیز شد. بعد از استریل محفظه‌نمونه، برای مدتی در معرض هوا قرار داده شد تا باقیمانده الکل درون محفظه تبخیر شود. در هر بار آزمایش، یک عدد لارو سن آخر بید آرد تیمار شده با غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ (به روش توصیف شده در بخش قبل) درون یک محفظه و یک عدد لارو تیمار شده با آب مقطر (به عنوان شاهد) در محفظه دیگر قرار داده می‌شد. سپس، پمپ هوا روشن شد و یک عدد زنبورهای پارازیتوئید ماده جفت‌گیری کرده که تا ۲ روز عمر داشتند و به مدت ۸ ساعت بدون غذا بوده‌اند، جداگانه در قسمت پایه لوله Y شکل رهاسازی شدند. پس از رهاسازی، پارازیتوئیدهای مورد نظر ردیابی شدند تا در نهایت یکی از محفظه‌های نمونه را انتخاب نمایند. پاسخ بویایی پارازیتوئیدها تنها در صورتی که در مدت زمان کمتر از ۱۰ دقیقه یکی از بازوهای فرعی را انتخاب می‌کردند، مورد قبول قرار می‌گرفت. ماده‌هایی که در این مدت هیچ‌کدام از رایحه تیمارها را انتخاب نکردند، به عنوان بی‌پاسخ لحاظ شدند. این آزمون در سه تکرار صورت گرفت. پس از ارزیابی پاسخ بویایی هر تکرار یک غلظت هر سویه، دستگاه الفکتومتر با الکل ۷۰ درصد شسته می‌شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تلفات مشاهده شده برای هر تیمار قبل از تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از فرمول ابوت تصحیح شد (Abbot, 1925). نرمال بودن توزیع داده‌ها با کمک آزمون Shapiro–Wilk ارزیابی شد. از آزمون فاکتوریل (شامل سویه‌های باکتری سودوموناس در دو سطح × غلظت سوسپانسیون باکتری در ۲ سطح به عنوان اثرات اصلی) در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از روش GLM به منظور بررسی تأثیر اثرات اصلی و برهمکنش آنها در تلفات رخ داده توسط سویه‌های مختلف این باکتری، روی مراحل رشدی تخم و لارو سن پنجم بید آرد استفاده شد. مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن انجام شد. تجزیه و تحلیل اثرات دورکنندگی سویه‌های مورد آزمایش روی رفتار زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* با استفاده از آزمون کای اسکوئر انجام پذیرفت. تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری اشاره شده با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه 9.2 صورت پذیرفت. هر آزمون شامل ۳ تکرار بود.

نتایج و بحث

تاثیر کشندگی سویه‌های مختلف مورد مطالعه روی بید آرد

نتایج تجزیه واریانس اثرات کشندگی غلظت‌های مورد استفاده از سویه‌های مختلف باکتری سودوموناس مورد مطالعه روی تخم و لارو بید آرد به ترتیب در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. این آزمایش نشان داد که میزان کشندگی سویه‌های مختلف مورد مطالعه سودوموناس روی تخم بید آرد، اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (جدول ۱). بیشترین میزان تخم‌کشی مربوط به سویه *P. protegens* CHA0 (۷۱/۶۶ درصد) بود که به صورت معنی‌داری بیشتر از سویه *P. soli* VF16 (۵۵ درصد) بود. سویه *P. persica* VKh13 هیچ اثر تخم‌کشی روی این حشره از خود نشان نداد. تحلیل واریانس میان دو غلظت به کار رفته ۰/۲ و ۰/۵ OD سوسپانسیون سویه‌های به کار رفته نشان داد، اختلاف معنی داری در مرگ و میر ناشی از کاربرد این دو غلظت باکتری سودوموناس وجود ندارد (جدول ۱). اگرچه برهمکنش بین سویه‌های سودوموناس × غلظت باکتریال روی مرگ و میر تخم بید آرد معنی‌دار نبود (جدول ۱)، ولی مقایسه میانگین برهمکنش سویه‌ها × غلظت‌های سوسپانسیون باکتری سودوموناس نشان داد در بین دو سویه *P. protegens* CHA0 و *P. soli* VF16 که برای بید آرد توانایی بیماری‌زایی داشتند، بیشترین مرگ و میر مربوط به غلظت ۰/۵ OD سویه *P. protegens* CHA0 (۷۳/۳۳ درصد) و کمترین آن مربوط به غلظت ۰/۲ OD در سویه *P. soli* VF16 بود (۵۰ درصد)؛ البته در سویه *P. soli* VF16، اختلاف معنی‌داری بین دو غلظت به کار رفته ۰/۲ و ۰/۵ OD وجود نداشت (شکل ۱).

جدول ۱- پارامترهای آزمون تحلیل واریانس برای اثرات اصلی موثر در تلفات ناشی از سویه‌های مختلف باکتری‌های *Pseudomonas* sp. مورد آزمایش و برهمکنش آن‌ها روی تخم شب‌پره‌ی آرد. (داده‌ها قبل از تجزیه و تحلیل به $\log_{10}$ تبدیل شده است).

Table 1. ANOVA parameters for main effects and interactions for *Anagasta keuhniella* egg mortality by various *Pesudomonas* sp. strains (data were $\log_{10}$ transformed prior to analysis)

Source	df	Mean Square	*F* value
S*	2	833.33	6.25**
C	2	133.33	1.00ns
S × C	4	33.33	0.25ns

*S: Bacterial strain; C: Concentration
** indicates significant difference at 0.05 (Duncan test); ns indicates non-significant difference at 0.05 (Duncan test)

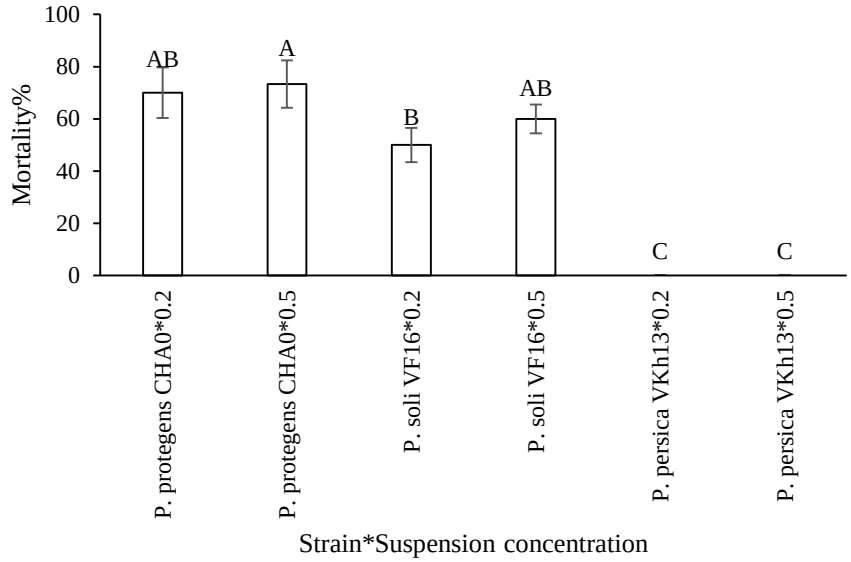
جدول ۲- پارامترهای آزمون تحلیل واریانس برای اثرات اصلی موثر در تلفات ناشی از سویه‌های مختلف باکتری‌های *Pseudomonas* sp. مورد آزمایش و برهمکنش آن‌ها روی لارو شب‌پره‌ی آرد. (داده‌ها قبل از تجزیه و تحلیل به $\log_{10}$ تبدیل شده است).

Table 2. ANOVA parameters for main effects and interactions for *Anagasta keuhniella* larval mortality by various *Pesudomonas* sp. strains (data were $\log_{10}$ transformed prior to analysis)

Source	df	Mean Square	*F* value
S*	2	533.33	10.67**
C	2	33.33	0.67ns
S × C	4	33.33	0.67ns

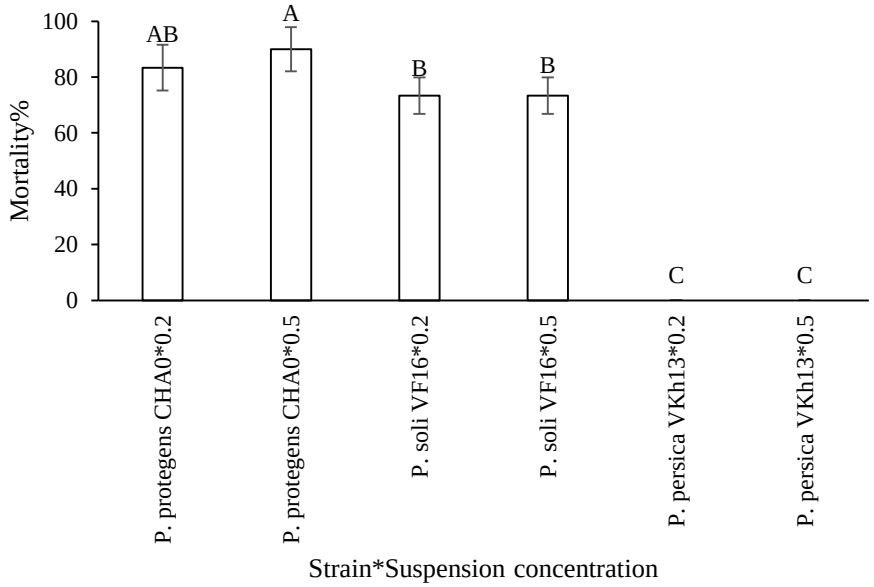
*S: Bacterial strain; C: Concentration
** indicates significant difference at 0.05 (Duncan test); ns indicates non-significant difference at 0.05 (Duncan test)

میزان ماهیت لاروکشی سویه‌های مختلف این باکتری نیز اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند (جدول ۲). بیشترین میزان لاروکشی در سویه *P. protegens* CHA0 (۸۶/۶۶ درصد) مشاهده شد که به صورت معنی‌داری بیشتر از سویه *P. soli* VF16 (۷۳/۳۳ درصد) بود. سویه *P. persica* VKh13 ماهیت لاروکشی نداشت. این نتایج نشان داد مرگ و میر لاروهای این آفت در اثر کاربرد غلظت ۰/۲ OD (۷۸/۳۳) و ۰/۵ OD (۸۱/۶۶)، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین برهمکنش سویه‌های مختلف باکتری سودوموناس × غلظت سوسپانسیون باکتری مورد کاربرد نشان داد کاربرد غلظت ۰/۵ OD سویه *P. protegens* CHA0 موجب ۹۰ درصد مرگ و میر در لارو بید آرد شد که به صورت معنی‌داری بیشتر از کاربرد غلظت‌های مختلف سویه‌های دیگر بود. این میزان مرگ و میر ۷/۴۱ درصد بیشتر از کاربرد غلظت ۰/۲ OD همین سویه و ۱۸/۵ درصد بیشتر از کاربرد غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ OD سویه *P. soli* VF16 بود (شکل ۲).



شکل ۱- میانگین±خطای معیار درصد میزان تلفات ناشی از غلظت‌های مختلف سوسپانسیون سویه‌های مورد مطالعه باکتری‌های سودوموناس روی تخم بید آرد (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است-آزمون دانکن)

Figure 1. Mean±SE of mortality percentage due to different suspension concentrations of *Pseudomonas* sp. strains on *Anagasta kuehniella* eggs (same letters indicate non-significant difference at 0.05-Duncan test)



شکل ۲- میانگین±خطای معیار درصد میزان تلفات ناشی از غلظت‌های مختلف سوسپانسیون سویه‌های مورد مطالعه باکتری‌های سودوموناس روی لارو بید آرد (حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد است-آزمون دانکن)

Figure 2. Mean±SE of mortality percentage due to different suspension concentrations of *Pseudomonas* sp. strains on *Anagasta kuehniella* larvae (same letters indicate non-significant difference at 0.05-Duncan test)

عامل ایجادکننده بیماری و تلفات توسط این باکتری‌ها مربوط به سم پروتئینی فیت[1]است که مشابه سم MCf1 تولید شده توسط مورد مطالعه در برابر حشرات سموم خوراکی مانند Mcf1 که مخفف Makes caterpillars floppy است که توسط باکتری همزیست *Photorhabdus luminescens* در نماتدهای انگل حشرات تولید می‌شود. جهش‌هایی که باعث کاهش تولید این سم در سویه‌های CHA0و Pf-5 شوند، باعث می‌شود زمانی‌که به همولنف لارو *Galleria mellonella* L. (Lep.: Pyralidae) یا *Manduca sexta* L. (Lep.: Sphingidae) تزریق شوند، سمیت کمتری از خود نشان دادند (Péchy-Tarr *et al.*, 2008). بررسی‌های دیگر نشان داد که جهش‌های ایجاد شده در سویه‌های *P. protegens* CHA0 و *P. chlororaphis* PCL1391 موجب شد که سموم ترشح‌شده توسط آنها هنگامی که از طریق خوراکی در اختیار لاروهای *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lep.: Noctuidae) قرار گرفتند، میزان تلفات کمتری نشان دادند (Ruffner *et al.*, 2013). با این حال، تمام جهش‌های صورت گرفته در ژن‌های تولیدکننده‌ی سم پروتئینی Fit در سویه *P. protegens* Pf-5 نشان داد که سموم ناشی از این ژن‌ها توانایی کشندگی خود را علیه مگس سرکه حفظ کردند (Loper *et al.*, 2016). همچنین، نقش کیتیناز تولید شده در سویه‌های *P. protegens* CHA0 و Pf-5 در فعالیت حشره‌کشی روی لاروهای *Plutella xylostella* L. (Lep.: Plutellidae) (Flury *et al.*, 2019) و *Drosophila melanogaster* L. (Dip.: Drosophilidae) به اثبات رسیده است (Loper *et al.*, 2016). به طور کلی، احتمالاً ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط سویه‌های زیر گروه تباری *P. chlororaphis*، مانند ۲،۴-دی استیل فلوروگلوسینول[2]، پیرولنیترین[3]، سیانید هیدروژن[4]، فنازین‌ها[5]و لیپوپتیدهای حلقوی[6]عوامل مؤثر در ماهیت حشره‌کشی این باکتری هستند. این ترکیبات اثرات سمی را نسبت به طیف وسیعی از موجودات زنده نشان می دهند (Ramette *et al.*, 2011) و تولید آنها توسط ژن Gac تنظیم می‌شود (Hassan *et al.*, 2010; Kidarsa *et al.*, 2013). توانایی سویه *P. protegens* CHA0 در تولید ۲،۴-دی استیل فلوروگلوسینول (Phl)، پیرولنیترین (Prn)، پیولوتئورین (Plt)، سیانید هیدروژن (Hcn) پیش از این اثبات شده است (Keshavarz-Tohid *et al.*, 2017) که می‌تواند از دلایل موفقیت این سویه در مرگ لارو سن پنجم و تخم شب پره بید آرد باشد. همچنین، سویه *P. soli* VF16 توانایی تولید کیتیناز و زانتولایسین[7]را دارا می‌باشد که اثر حشره‌کشی آنها پیش از این اثبات شده است (Oni *et al.*, 2022).

تاثیر لاروهای بیمار روی فرایند انتخاب میزبان زنبور *H. hebetor*

نتایج تجزیه واریانس تاثیر لاروهای بیمار روی فرایند انتخاب میزبان زنبورهای ماده این پارازیتوئید در جدول ۳ نشان داده شده است. در تمام سویه‌ها، هیچ زنبوری به سمت محفظه نمونه‌ای که حاوی لاروهای تیمار شده با سوسپانسیون باکتری‌های سودوموناس بودند، حرکت ننمودند. این رفتار اجتنابی برای هر دو غلظت مورد مطالعه سوسپانسیون دیده شد. این نتایج دلالت بر اثرات دورکنندگی بالای تدخینی ناشی از این تیمارها روی رفتار این زنبور پارازیتوئید داشت که می‌تواند اثرات آنتاگونیستی در کاربرد همزمان این دو عامل کنترل زیستی را نشان دهد.

[1]. Fit toxin
[2]. 2,4-diacetylphloroglucinol
[3]. Pyrrolnitrin
[4]. Hydrogen cyanide
[5]. Phenazine
[6]. Cyclic lipopeptide
[7]. xantholysin

جدول ۳- تاثیر لاروهای بیمار توسط سویه‌های مختلف *Pseudomonas* sp. روی فرایند انتخاب میزبان زنبور پارازیتوئید *Habrabracon hebetor* بر اساس آزمون کای اسکوئر

Table 3. Effect of infected larvae by different strains of *Pseudomonas* sp. on the host selection behavior of *Habrabracon hebetor* according to chi-square test

Strain	Treatment	Observed	Test Proportion	Expected	df	*P*-value
P. protegens CHA0	Bacterial treated	0	0.5	4.5	1	0.003
	Control	9	0.5	4.5		
P. soli VF16	Bacterial treated	0	0.5	4.5	1	0.003
	Control	9	0.5	4.5		
P. persica VKh13	Bacterial treated	0	0.5	4.5	1	0.003
	Control	9	0.5	4.5		

نشان داده شده است که باکتری *Pseudomonas fluorescens* WCS417r اطراف ریشه گیاه رَشادی گوش موشی *Arabidopsis thaliana* L. از تیره کلمیان موجب القای سینومون‌های تدخینی توسط این گیاه می‌شود که این مواد به نوبه خود باعث جلب زنبور پارازیتوئید ماده *Microplitis mediator* Haliday (Hym.: Braconidae) به عنوان عامل مهم کنترل زیستی لاروهای *Mamestra brassicae* L. (Lep.: Noctuidae) می‌شود. این سینومون‌ها حاوی ترکیباتی ترپنی مخصوصی هستند (Pangesti *et al.*, 2015). بررسی نوشته‌های صورت گرفته نشان داد تحقیق مشابهی روی تاثیر سودوموناس‌های بیمارگر حشرات روی زنبورهای پارازیتوئید تاکنون صورت نگرفته است. بنابراین، نتایج این مطالعه قابلیت مقایسه با پژوهش‌های قبلی را ندارد. به صورت مشخص، با توجه به تاثیر لاروهای بیمار روی فرایند انتخاب میزبان زنبور پارازیتوئید مورد تحقیق، می‌بایست بین تیمار با این سویه‌ها و رهاسازی با زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* یک فاصله زمانی مشخصی وجود داشته باشد تا از اثرات تداخلی این دو عامل کنترل زیستی خودداری شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت مالی از انجام این مطالعه سپاسگزاری می‌نماییم.

References

Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology** 18(2): 265-267.

Bahmani, N., Latifian, M., Ostovan, H. and Hesami, S. 2020. Pathogenic effects of *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* on the population dynamics of *Ephestia kuehniella*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 30: 1-9.

Flury, P., Aellen, N., Ruffner, B., Péchy-Tarr, M., Fataar, S., Metla, Z. and Maurhofer, M. 2016. Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: phylogenetic distribution and comparative genomics. **The ISME Journal** 10(10): 2527-2542.

Flury, P., Vesga, P., Dominguez-Ferreras, A., Tinguely, C., Ullrich, C. I., Kleespies, R. G. and Maurhofer, M. 2019. Persistence of root-colonizing *Pseudomonas protegens* in herbivorous insects throughout different developmental stages and dispersal to new host plants. **The ISME Journal** 13(4): 860-872.

Guechi, A. and Mebarkia, A. 2011. Control of grain borer in stored wheat by Pseudomonas syringae. In *4ème Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives en Protection des Cultures. Evolution des cadres réglementaires européen et français. Nouveaux moyens et stratégies*

Innovantes, Nouveau Siècle, Lille, France, 8-10 mars 2011 (pp. 678-684). Association Française de Protection des Plantes (AFPP).

Hassan, K. A., Johnson, A., Shaffer, B. T., Ren, Q., Kidarsa, T. A. and Elbourne, L. D. 2010. Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences. **Environmental Microbiology** 12: 899–915.

Hill, D. S. 1990. Pests of stored products and their control. Belhaven Press.

Johnson, J. A., Vail, P. V., Brandl, D. G., Tebbets, J. S. and Valero, K. A. 2002. Integration of nonchemical treatments for control of postharvest pyralid moths (Lepidoptera: Pyralidae) in almonds and raisins. **Journal of Economic Entomology** 95(1): 190-199.

Keshavarz-Tohid, V., Taheri, P., Taghavi, S. M. and Tarighi, S. 2016. The role of nitric oxide in basal and induced resistance in relation with hydrogen peroxide and antioxidant enzymes. **Journal of Plant Physiology** 199: 29-38.

Keshavarz-Tohid, V., Vacheron, J., Dubost, A., Prigent-Combaret, C., Taheri, P., Tarighi, S. and Muller, D. 2019. Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the *Pseudomonas putida* clade supports the delineation of *Pseudomonas alloputida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology** 42(4): 468-480.

Khetan, S. 2000. Microbial pest control. CRC Press.

Kidarsa, T. A., Shaffer, B. T., Goebel, N. C., Roberts, D. P., Buyer, J. S. and Johnson, A. 2013. Genes expressed by the biological control bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 on seed surfaces under the control of the global regulators GacA and RpoS. **Environmental Microbiology** 15: 716–735.

Loper, J. E., Henkels, M. D., Rangel, L. I., Olcott, M. H., Walker, F. L., Bond, K. L. and Taylor, B. J. 2016. Rhizoxin analogs, orfamide A and chitinase production contribute to the toxicity of *Pseudomonas protegens* strain Pf- 5 to Drosophila melanogaster. **Environmental Microbiology** 18(10): 3509-3521.

Mignon, J., Haubruge, E. and Gaspar, C. 1998. Effect of ice-nucleating bacteria (Pseudomonas syringae Van Hall) on insect susceptibility to sub-zero temperatures. **Journal of Stored Products Research** 34(1): 81-86.

Oni, F. E., Esmaeel, Q., Onyeka, J. T., Adeleke, R., Jacquard, C., Clement, C. and Höfte, M. (2022). Pseudomonas Lipopeptide-Mediated Biocontrol: Chemotaxonomy and Biological Activity. **Molecules** 27(2): 372.

Pangesti, N., Weldegergis, B. T., Langendorf, B., van Loon, J. J., Dicke, M. and Pineda, A. 2015. Rhizobacterial colonization of roots modulates plant volatile emission and enhances the attraction of a parasitoid wasp to host-infested plants. **Oecologia** 178(4): 1169-1180.

Péchy- Tarr, M., Bruck, D. J., Maurhofer, M., Fischer, E., Vogne, C., Henkels, M. D. and Keel, C. 2008. Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant- associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. **Environmental Microbiology** 10(9): 2368-2386.

Ramette, A., Frapolli, M., Fischer-Le Saux, M., Gruffaz, C., Meyer, J. M., Défago, G. and Moënne-Loccoz, Y. 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. **Systematic and Applied Microbiology** 34(3): 180-188.

Shams-Salehi, S., Rajabpour, A., Rasekh, A. and Farkhari, M. 2016. Repellency and some biological effects of different ultrasonic waves on Mediterranean flour moth, *Anagasta kuehniella*(Zeller)(Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Products Research** 69: 14-21.

Sohrabi, F., Jamali, F. and Michaud, J. P. 2021. Sublethal concentrations of spinosad synergize the pathogenicity of fungi to larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **European Journal of Entomology** 118: 142-147.

Plant Pest Research
2023- 13 (1): 15-24

Open access
doi: 10.22124/iprj.2023.24115.1513

Research paper

An investigation on insecticidal effects of three growth stimulant bacteria belong to *Pseudomonas* sp. to control *Anagasta kuehniella* and the infected larvae on the host selecting by the parasitoid wasp, *Habrabracon hebetor*

R. Azarnoosh, Fatemeh Yarahmadi*, V. Keshavarz Tohid and A. Rajabpour
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Bavi, Iran

(Received: March 15, 2023- Accepted: April 19, 2023)

Abstract

The *Pseudomonas* bacteria include many species with different characteristics. Some species of the genus are considered as the plant growth stimulants. Recently, the potentials of the bacteria to insect pest control has been documented. In this study, the lethal effects of three strains, *Pseudomonas protegens* CHA0, *P. soli* VF16, and *P. persica* VKh13 to eggs and larvae of *Anagasta keuhniella* (Zeller) (Lep., Pyralidae) as an important stored product pest was studied. For this purpose, two concentrations of each strain, 0.2 and 0.5 OD at the wavelength of light of 600 nm, were provided and the 5th instar larvae and eggs of *A. keuhniella* were treated and the mortalities were recorded after 24h. Statistical investigations indicated that the strain *P. protogens* CHA has the highest mortality rate (79.16%) and after that, the strain *P. soli* VF16 (64.15%). Furthermore, it is demonstrated that the strain *P. persica* VKh13 has not the insecticidal property. The bacterial efficacy at suspension concentration 0.5 OD was significantly more than 0.2 OD. No significant difference was observed between susceptibility of the pest larva and eggs to different investigated strains in the study. The highest mortality was observed in application of the concentration 0.5 OD of *P. protogens* CHA on the pest larvae. Olfactory trials indicated that the female parasitoid wasps, *Habrabracon hebetor*, significantly avoided from treated larvae by all of the three strains. The results can be used for developing the microbial control of the pest.

Key words: Microbial control, mortality, natural enemies, stored product pest

* Corresponding author: yarahmadi@asnrukh.ac.ir

CC BY