نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۳، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (۴۰-۳۱)

بررسی بیمارگری قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Lecanicillium muscarium* در کاربرد هم‌زمان روی *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae)

۱. حسن عسکری*؛ ۲. کیمیا کوهستانی؛ ۳. مهدی ضرابی؛ ۴. احمد بغدادی
۱. ۲. ۳. دانشیار، دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران ۴. استادیار، دانشگاه پیام نور
(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۸ - تاریخ تصویب: ۹۳/۷/۱۲)

چکیده

بیمارگری دو قارچ *Beauveria bassiana* و *Lecanicillium muscarium* و مخلوط آن‌ها علیه پوره‌های سن دوم و حشرات کامل سفیدبالک پنبه، *Bemisia tabaci* در شرایط آزمایشگاهی (در اتاقک رشد، در دمای ۱±۲۳ $^{\circ C}$، رطوبت ۵±۹۵ درصد و دورهٔ روشنایی ـ تاریکی ۱۶:۸) بررسی شد. پنج غلظت به همراه شاهد (توئین ـ ۸۰) در سطح زیرین برگ‌های بادمجان پاشیده شد. تأثیر قارچ بر حشرات کامل با کاربرد مستقیم غلظت‌ها روی آن‌ها و رهاسازی حشرات روی برگ گیاه بررسی شد. Lc_{50} محاسبه‌شده برای قارچ‌های *B. bassiana*، *L. muscarium* و مخلوط هر دو روی پوره‌های سن دوم بـه‌ترتیب $۴/۴\times۱۰^{۵}$، $۱/۸\times۱۰^{۵}$ و $۷/۹\times۱۰^{۵}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر بود. مقدار Lt_{50} محاسبه‌شـده برای غلظت‌های $۱۰^{۶}$، $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر از قارچ *B. bassiana* به‌ترتیب معادل ۸/۳، ۶ و ۴/۸ روز؛ برای قارچ *L. muscarium* معادل ۷/۲، ۵/۵ و ۳/۹ روز و برای مخلوط آن‌ها ۶/۷، ۵/۱ و ۴ روز برآورد شد. حشرات کاملی که در تماس با برگ‌های آغشته به عوامل قارچی، شیوهٔ غیرمستقیم، آلوده شدند، نسبت به تیمار شاهد مرگ و میر بالایی نشان دادند. حداکثر مرگ و میر حشرات کامل بر اثر قارچ *B. bassiana* (۸ روز بعد از رهاسازی، در تیمار بلافاصله پس از پاشش و ۵ روز پس از پاشش قارچ؛ به‌ترتیب ۸۹/۳۳ درصد و ۹۶/۲۵ درصد بود؛ اما بر اثر قارچ *L. muscairum* حداکثر مرگ و میر در تیمارهای مشابه ۷۸/۳۳ درصد و ۹۳/۷۵ درصد بود. استفاده از هریک از قارچ‌های مذکور و مخلوط آن‌ها برای کنترل سنین پورگی و حشرات کامل سفیـدبالک پنبه مؤثر هستند. مرگ و میر حشرات کاملی که با پاشش مستقیم قارچ آلوده شده بودند، به مراتب کمتر از میزانی بود که آلودگی از طریق برگ‌های آلوده به قارچ ایجاد شده بود، میانگین کلی برای قارچ *B. bassiana* ۵۱/۱ درصد و برای قارچ *L. muscairum* ۳۸/۳۲ درصد با غلظت $۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر بود.

واژه های کلیدی: سفیدبالک پنبه، قارچ‌های بیمارگر حشرات، کنترل بیولوژیک.

مقدمه

سفیدبالک پنبه *Bemisia tabaci* (Genadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) آفتی جهانی است (Oliveira *et al.* 2001, Nomikou *et al.* 2001) که عملکرد بسیاری از محصولات مهم کشاورزی را کاهش می‌دهد و بر محصولات مختلف در گلخانه و مزرعه تأثیر می‌گذارد (Byrne *et al.* 1990, Gerling and Mayer 1995). سفیدبالک پنبه دو نوع خسارت را به گیاه میزبان وارد می‌سازد: خسارت مستقیم و ضعیف‌کردن میزبان با مکیدن شیرهٔ نباتی که باعث کاهش رشد و ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی در میزبان گیاهی می‌شود. خسارت غیرمستقیم این حشره انتقال ویروس‌های گیاهی به میزبان و همچنین، تولید عسلک است که محیط مناسبی را برای رشد قارچ‌های ساپروفیت فراهم می‌کند (Byrnes and Bellows 1992; Jones 2003). خسارت ناشی از این آفت به ۲۰ تا ۱۰۰ درصد کاهش محصول بین منجر می‌شود(Brown & Bird, (1992. استفادهٔ وسیع از حشره‌کش‌ها به ایجاد و گسترش جمعیت‌های

*تلفن: ۰۲۱۲۲۴۰۳۰۱۲
E-mail: askary2@gmail.com

مقاوم، گیاه‌سوزی و مشکلات باقیماندهٔ مواد شیمیایی روی سبزیجات منجر شده است (Quinlan, 1988). بنابراین، توسعهٔ روش‌های تلفیقی، با استفاده از بیمارگرها به‌عنوان روش کنترل بیولوژیکی، ضروری به نظر می‌رسد (Lacey *et al.* 1996). قارچ‌های بیمارگر حشرات تنها بیمارگرهایی هستند که احتمالاً در کنترل سفیدبالک‌ها استفاده می‌شوند، زیرا آن‌ها می‌توانند در کوتیکول میزبان‌هایشان نفوذ کنند، در حالی که، سایر بیمارگرها باید توسط حشرات خورده شوند تا بتوانند میزبان را از پای در آورند. لاسی و همکاران استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات را علیه سفیدبالک‌ها گزارش کردند (Lacey *et al.* 1996). بیشتر قارچ‌های بیمارگر سفیدبالک‌ها به جنس‌های *Aschersonia*، *Beauveria*، *Lecanicillium* و *Paecilomyces* تعلق دارند(Leger *et al.* 1996). در تحقیقی که برای تعیین تأثیرات کشندگی قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* روی تخم‌ها، پوره‌های جوان و مسن سفیدبالک پنبه، *B. tabaci* انجام شده است، درصد مرگ و میر با مرحلهٔ سنی *B. tabaci* و غلظت کنیدی *B. bassiana* تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد (Deghairi 2008). کاتبرتسون و همکاران اعلام کردند که قارچ *L. muscarium* هم تحت شرایط گلخانه‌ای و هم در شرایط آزمایشگاهی بالاترین میزان مرگ و میر را در پورهٔ سن دوم*B. tabaci* ایجاد می‌کند (Cuthbertson *et al.* 2005). این تحقیق با هدف ارزیابی اثر *B. bassiana*، *L. muscarium* به تنهایی و مخلوط با یکدیگر به منظور تعیین اثر سینرژیستی و آنتاگونیستی دو قارچ در کاربرد هم‌زمان روی آفت مذکور روی درصد مرگ و میر پورهٔ سن دوم و حشرات کامل *B. tabaci* در شرایط کنترل‌شده انجام شد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

حشرات کامل *Bemisia tabaci* از گلخانهٔ مؤسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور جمع‌آوری و شناسایی شدند. سفید بالک‌های کامل در قفس‌هایی با ابعاد (۶۰×۶۰×۷۰ cm) روی برگ‌های بادمجان (*Solanum melongena*) واریتهٔ ورامین و توتون واریتهٔ کوکر ۳۴۷ در شرایط گلخانه ۲۳±۱°C، ۶۰±۵٪RH و دورهٔ روشنایی ـ تاریکی ۱۶:۸ پرورش یافتند.

کشت قارچ‌های بیمارگر و تهیهٔ غلظت‌های مختلف

جدایهٔ DAOM 198499 قارچ *L. muscarium* از طریق بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک و جدایهٔ DEBI001 قارچ *B. bassiana* از بخش تحقیقات حشره‌شناسی کشاورزی مؤسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور فراهم شد. قارچ‌ها در پتری‌دیش‌های حاوی SDA (Sabrause Dextrose Agar) از شرکت مرک (Merck) آلمان کشت داده شدند. ظرف‌های حاوی قارچ به‌مدت ۱۲ـ۱۰ روز در دمای ۲۵±۲°C با دورهٔ روشنایی ـ تاریکی ۱۸:۴ نگه‌داری شدند. سوسپانسیون‌های کنیدی توسط محلول آب مقطر استریل به همراه ۰/۴درصد توئین ـ۸۰ از (Tween-80) سطح پتری‌دیش‌ها شسته و جمع‌آوری شدند. شمارش کنیدی‌ها با لام گلبول‌شمار Neubauer (hemocytometer) انجام شد.

برای آزمایش‌های زیست‌سنجی از بلاستوسپورهای قارچ‌ها استفاده شد. ابتدا، کنیدی‌ها از محیط کشت جامد SDA جمع‌آوری و برای تلقیح محیط کشت مایع استفاده شدند که از عصارهٔ سیب‌زمینی تهیه شده بود. محیط کشت‌ها به‌مدت ۴ روز روی شیکر در دمای ۲۲±۲°C قرار گرفتند تا به اندازهٔ کافی بلاستوسپور تولید شود. برای انجام آزمایش‌ها ابتدا، میزان جوانه‌زنی بلاستوسپورها اندازه‌گیری شد. سپس، بلاستوسپورها از توری ململ عبور داده شدند تا میسلیوم‌ها جدا شوند.

سپس، سوسپانسیون یکنواختی با غلظت 10^6 بلاستوسپور در میلی‌لیتر از قارچ مورد نظر تهیه و در سطح پتری حاوی آب ـ آگار ۱/۵ درصد قرار داده شد. ظرف‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵±۱°C به‌مدت ۱۸ـ۱۶ ساعت قرار داده شدند. سپس، با میکروسکوپ فازکنتراست در بزرگنمایی ۴۰۰ با شمارش ۱۰۰ اسپور به‌طور تصادفی، درصد زنده‌مانی محاسبه شد. در این آزمون بلاستوسپورهایی جوانه‌زده محسوب می‌شدند که حداقل به اندازهٔ نصف قطرشان جوانه‌زده بودند. در تمام آزمایش‌ها درصد جوانه‌زنی بالغ بر ۹۵ درصد بود. غلظت‌های مورد استفاده در آزمایش‌های زیست‌سنجی طی یک آزمایش اولیه تعیین شد. غلظت‌های 10^4 و

10^8 بلاستوسپور در میلی‌لیتر به‌عنوان غلظت‌های حداقل و حداکثر انتخاب شدند. آنگاه، سایر غلظت‌های حد واسط شامل 10^5 و 10^6 و 10^7 بلاستوسپور در میلی‌متر از غلظت پایه تهیه شد. محلول آب مقطر استریل به همراه ۰/۴ درصد از توئین ـ۸۰ به‌عنوان شاهد استفاده شد.

زیست‌سنجی روی پوره‌ها

به منظور همسن‌سازی سفیدبالک‌ها تعدادی گلدان کاملاً سالم، از صبح به‌مدت ۶ الی ۷ ساعت در داخل قفس‌های مخصوص پرورش سفیدبالک‌ها قرار داده شد و با تکاندن حشرات روی گیاهان سالم، حشرات روی گیاه مستقر شدند و تخم‌ریزی انجام شد. پس از گذشت زمان مورد نظر، گلدان‌ها از قفس‌های پرورش خارج و تمام حشرات کامل از روی آن‌ها حذف شدند. سپس، گیاهان حاوی تخم سفیدبالک در شرایط گلخانه با دمای $23\pm3^{\circ C}$ به‌مدت ۱۵ـ۱۰ روز تا رسیدن به سن دوم پورگی نگه‌داری شدند. سطح زیرین برگ‌های بادمجان که حاوی ۵±۱۵پوره‌های سن دوم سفیدبالک پنبه بودند، با محلول‌پاش دستی حدود ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون بلاستوسپور اسپری شدند. هر برگ از هر گلدان به‌عنوان یک تکرار از یک غلظت در نظر گرفته شد. در هر تکرار اسپری‌کردن با تیمار شاهد آغاز و سایر تیمارها از غلظت کم به زیاد از فاصلهٔ ۲۰ سانتی‌متر اسپری شدند. آنگاه، گیاهان برای مدت حدود ۱۰ـ۵ دقیقه در مجاورت هوای آرام قرار گرفتند تا سطح آن‌ها خشک شود. سپس، در اتاقک رشد با دمای $23\pm1^{\circ}C$ و رطوبت ۵±۹۵ درصد و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. گیاهان روزانه به‌مدت ۱۰ روز زیر استریومیکروسکوپ بررسی می‌شدند و تعداد پوره‌های مرده ثبت و به کمک سوزن ظریف حذف می‌شدند.

زیست‌سنجی روی حشرات کامل

برگ‌های بادمجان کـه حاوی شفیره بودند از گلدان‌های داخل قفس‌های پرورش سفیـدبالک موجـود در گلخانه جمع‌آوری و به‌مدت ۲۴ ساعت در داخل ظروف پلکسی گلاس مربعی شکل به ابعاد ۷×۱۴×۲۰ سانتی‌متر همراه با قطعه‌ای پنبهٔ مرطوب در اتاق پرورش با دمای $25\pm5^{\circ}C$ قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، حشرات خارج‌شده از شفیره‌ها به کمک لوله‌های شیشه‌ای به طول ۱۰ و قطر ۱/۵ سانتی‌متر جمع‌آوری و برای آزمایش استفاده شدند.

آلوده‌سازی به‌صورت پاشش مستقیم قارچ روی حشرات کامل

حشرات کامل همسن‌شده (۲۴ساعته) به روش ذکرشده در بالا در داخل لوله‌های آزمایش (۲۰ حشره به ازای هر لوله) قرار داده شدند. هر لولهٔ مخصوص یک تکرار از هر تیمار بود. سپس، به ازای هر تکرار یک برگ سالم در نظر گرفته شد. ظروف آزمایش از دو لیوان یک‌بار مصرف شفاف به ارتفاع ۸/۵ و قطر ۸/۵ سانتی‌متر و یک مقوای سیاه رنگ دایره‌ای شکل تشکیل شد. هدف از به‌کاربردن مقوای سیاه رنگ تشخیص آسان سفیدبالک‌های افتاده روی آن‌ها بود. لیوان زیرین حاوی آب همراه با مادهٔ مغذی فوسامکو به میزان ۱ گرم در لیتر بود. روی سطح این لیوان مقوای سیاه که در وسط آن سوراخی برای قرارگرفتن دمبرگ تعبیه شده بود، چسبانده شد. برگ سالم از طریق دمبرگ در این لیوان قرار گرفت. آنگاه، حشرات کامل جمع‌آوری‌شده درون لوله‌های شیشه‌ای با گاز Co_2 بیهوش شدند. حشرات روی یک قطعه کاغذ صافی کوچک (برای جذب رطوبت اضافی از سطح بدن حشرات) قرار داده شدند. سپس، غلظت‌های مورد نظر قارچ مانند روش ذکرشده در مورد پوره‌ها، قبل از به‌هوش‌آمدن حشرات روی آن‌ها اسپری شدند. پس از استقرار حشرات روی برگ‌ها و محصورشدن در ظروف مخصوص، در اتاق رشد با دمای $23\pm1^{\circ}C$ و رطوبت ۵±۹۵ درصد و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. تمام حشرات مرده پس از ۸ روز شمارش و ثبت شدند.

آلوده‌سازی حشرات کامل از طریق قرارگرفتن روی برگ‌های آلوده به قارچ

هدف از انجام این آزمایش بررسی میزان آلودگی حشرات کامل از طریق برگ‌های آلوده به قارچ در غلظت‌های مختلف و همچنین، در زمان‌های مختلف پس از آلوده‌سازی گیاه میزبان بود. آزمایش همانند قبل انجام شد با این تفاوت که پاشش قارچ روی برگ‌ها و رهاسازی حشرات بعد از خشک‌شدن برگ‌ها انجام شد. به این

ترتیب حشرات قارچ را به‌طور غیرمستقیم و از طریق برگ‌ها دریافت کردند. این آزمایش علاوه بر تیمار غلظت‌ها دارای دو تیمار زمان نیز بود. نخست رهاسازی حشرات بلافاصله بعد از خشک‌شدن سطح برگ صورت گرفت. در تیمار دیگر حشرات ۵ روز پس از پاشیدن قارچ، روی برگ‌ها رها شدند. در طی مدت ۵ روز تیمارها درون انکوباتوری با دمای $۲۳\pm۱^{\circ C}$ و رطوبت ۵± ۹۵ درصد و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. تمامی آزمایش‌های شرح‌داده‌شده در مورد هر دو قارچ بیمارگر در شرایط کاملاً یکسان انجام شد.

بررسی اثر تلفیقی قارچ‌های *B. bassiana* و *L. muscarium* روی میزبان

به منظور بررسی اثر توأم دو قارچ روی میزبان، مقدار مساوی از هریک از غلظت‌های دو قارچ با هم مخلوط شدند. در این آزمایش از همان غلظت‌هایی که در آزمایش‌های جداگانهٔ هریک از قارچ‌ها استفاده شده بود ($۱۰^{۴}$ تا $۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر به همراه شاهد)، استفاده شد. برای تهیهٔ غلظت‌ها ابتدا، ۵۰cc از غلظت $۱۰^{۸}$ از هریک از قارچ‌ها به‌طور جداگانه تهیه و سپس، کاملاً با هم مخلوط شدند. بدین ترتیب ۱۰۰cc غلظت $۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر از تلفیق قارچ‌ها حاصل شد. آنگاه، سایر غلظت‌ها مانند حالتی تهیه شد که در آزمایش‌های جداگانه قارچ‌ها ذکر شد. کاربرد تلفیقی قارچ‌ها روی پورهٔ سن دوم و حشرات کامل انجام شد.

از طریق کشت حشرات روی محیط غذایی، آلودگی آن‌ها بررسی شد.

برای این کار بدن حشرهٔ مرده با الکل ۷۰ درصد، آب مقطر، هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، و سپس، در سه مرحله قراردادن در آب مقطر استریل در زیر هود، ضدعفونی شدند. آنگاه، حشرات در داخل پتری حاوی آب ـ آگار قرار داده و روی محیط کشت نگه‌داری شدند. اطراف پتری با پارافیلم پوشانده شد و در انکوباتوری با دمای $۲۵^{\circ}C$ قرار داده شد. در صورتی که، قارچ در سطح محیط آب ـ آگار از داخل بدن حشره رشد می‌کرد، بیمارگری آن ثابت می‌شد.

تجزیهٔ آماری

درصد مرگ و میر در تیمارها و شاهد طبق فرمول آبوت تصحیح شد (Abbott 1925). همهٔ آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شدند. تمامی تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (Version 9.0 Inc., cary, NC, USA 2002). برای تجزیهٔ واریانس مرگ و میر از روش آنووا (ANOVA) استفاده شد. مقدار LC_{50} با روش پروبیت محاسبه شد (ProcProbit 1996-2000 Massayuki SAKUMA, Ver. 1.63) و رابطهٔ بین لگاریتم غلظت‌های مختلف قارچ و پروبیت مرگ و میر از روش تجزیه رگرسیون ارزیابی شد. همچنین، برای محاسبهٔ مقدار Lt_{50} برای هریک از غلظت‌های قارچ از نرم‌افزار Curve expert 1.3 استفاده شد. برای تعیین وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر LC_{50} و یاLT_{50} از هم‌پوشانی حدود اطمینان بالا و پایین ۹۵ درصد آن‌ها استفاده شد (Tabashnick & Cushing 1987, Askary *et al.* 1998).

نتایج

زیست‌سنجی روی پوره‌ها

هر دو قارچ *B. bassiana* و *L. muscarium* برای پوره‌های سن دوم *B. tabaci* بیمارگر بودند. مقدار LC_{50} محاسبه‌شده برای قارچ *B. bassiana* و *L. muscarium* به‌ترتیب برابر با $۴/۴\times۱۰^{۵}$ و $۷/۴\times۱۰^{۴}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر بود. کاربرد مخلوط دو قارچ نیز برای پوره‌ها بیمارگر بودند و LC_{50} آن معادل با $۷/۹\times۱۰^{۵}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد. نتایج تجزیهٔ واریانس برای مرگ و میر ایجادشده نشان داد که غلظت‌های مختلف قارچ‌ها روی پوره‌های سن دوم تفاوت معنی‌داری را ایجاد می‌کنند (برای قارچ *B. bassiana*: P=<۰/۰۰۰۲, F=۱۱/۷۵)، (برای قارچ *L. muscarium*: P=۰/۰۴, F=۳/۶۴) و (برای مخلوط دو قارچ: P=۰/۰۰۴, F=۸/۵). در مقایسهٔ حدود اطمینان بالا و پایین برای LC_{50} محاسبه‌شده برای هر قارچ به تنهایی و کاربرد مخلوط آن‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). در غلظت‌های بالاتر ($۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر) برای هر دو قارچ، مرگ و میر پوره‌ها دو

روز پس از تیمارکردن مشاهده شد و بعد از آن به‌سرعت افزایش یافت (شکل ۱؛ a، b و c).

حشرات کامل

حشرات کامل *B. tabaci* بر اثر قارچ‌های *B. bassiana* و *L. muscarium* به روش آلوده‌شدن غیرمستقیم، مرگ و میر داشتند. مقادیر LC_{50} در رهاسازی حشرات کامل بلافاصله و ۵ روز پس از آلوده‌سازی برگ‌ها به‌ترتیب برای قارچ *B. bassiana*، $۲/۷\times۱۰^{۶}$ و $۶/۷\times۱۰^{۵}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر، برای قارچ *L. muscarium*، $۳/۹\times۱۰^{۶}$ و $۲/۴\times۱۰^{۶}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر و برای مخلوط دو قارچ، $۵/۸\times۱۰^{۵}$ و $۱/۶\times۱۰^{۵}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر به‌دست آمد. علاوه بر این، مقادیر LC_{50} در روش آلوده‌سازی مستقیم از طریق پاشش قارچ روی حشرات کامل به‌ترتیب برای قارچ *B. bassiana*، *L. muscarium* و مخلوط آن‌ها $۱/۱\times۱۰^{۸}$، $۱/۴\times۱۰^{۸}$ و $۹/۱\times۱۰^{۷}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد.

تجزیهٔ واریانس میانگین مرگ و میر ایجادشده توسط غلظت‌های مختلف از هر قارچ تفاوت معنی‌داری علیه حشرات کامل *B. tabaci* نشان داد؛ اما بین تأثیر ترکیب دو قارچ در مقایسه با زمانی که هریک به تنهایی به‌کار رفتند، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲، ۳ و ۴). این نتایج برای قارچ‌های *B. bassiana*، *L. muscarium* و مخلوط‌شان در کاربرد پاشش غیرمستقیم و رهاسازی حشرات کامل بلافاصله بعد از پاشش قارچ و ۵ روز پس از آن به‌ترتیب برابر بود با F= ۱۰/۶۲، P=۰/۰۰۰۹ و F=۱۲/۴۸ وP=۰/۰۰۰۳ و F=۴/۸۳، P=۰/۰۱۴۸ و F=۶/۳۵، P=۰/۰۰۴۶ و (F=۲۵/۴۱، P<۰/۰۰۰۱ و F=۴۳/۴۶، P<۰/۰۰۰۱. علاوه بر این، نتایج برای روش آلوده‌سازی مستقیم حشرات بالغ با *B. bassiana*، *L. muscarium* و مخلوط‌شان به‌ترتیب برابر بود با F=۷/۱۳، P=۰/۰۰۳۵، F=۵/۶، P=۰/۰۱۰۳ و F=۱۰/۸۶، P=۰/۰۰۰۴.

بحث

هرچند برخی تحقیقات نشان می‌دهد که قارچ *B. bassiana* بیمارگر غیرمتعارفی علیه سفیدبالک‌هاست (Fransen 1990, Humber 1992)، این تحقیق بیماریزایی بالایی از این بیمارگر را روی پوره‌های سن دوم و حشرات کامل *B. tabaci* نشان داد.

مرگ پوره‌های آلوده‌شدهٔ سفیدبالک ۴۸ ساعت بعد از کاربرد شروع شد. رایت و همکاران بیان کردند که مرگ و میر در پوره‌های سن چهارم *B. argentifolli* ۳ روز پس از عفونی‌شدن با قارچ آغاز شد (Wraight *et al.*1998). در این تحقیق، پوره‌های آلوده‌شده با *B. bassiana* خشک شدند و اجساد آن‌ها به رنگ متمایل به قرمز در آمدند که احتمالاً در نتیجه تولید ااسپورین (Oosporein) است. (Eyal, *et al.* 1994, Wraight *et al.* (1998, Vicentini *et al.* 2001. این قارچ خصوصیات آنتی‌بیوتیکی دارد که احتمالاً به روند آلودگی میزبان کمک می‌کند (Eyal *et al.* 1994). این رنگدانه یک دی‌بنزوکوئینین است که از برخی گونه‌های آسکومیست گزارش شد و توسط بسیاری از جدایه‌های*B. bassiana* و *B. brongniartii* (*B. tenella*) تولید می‌شود (El-Basyouni *et al.* 1968).

مخلوط دو قارچ تأثیرات منفی روی نسبت مرگ و میر پوره‌ها نشان نداد. کراس و همکاران نیز نتایج مشابهی در محیط آزمایشگاهی به‌دست آوردند. آن‌ها نشان دادند کارایی قارچ *B. bassiana*، به‌عنوان بیمارگر حشرات، همراه با *Lecanicillium longisporum*، به‌عنوان آنتاگونیست قارچ‌های بیمارگر گیاهی، در طی کاربرد هم‌زمان آن‌ها در شرایط طبیعی (in vivo) تحت تأثیر قرار نگرفت، گرچه موفقیت جداسازی دوبارهٔ بیمارگرهای حشرات می‌توانست به‌طور معنی‌داری کاهش یابد (Krauss *et al.* 2004).

در این تحقیق، حشرات کامل سفیدبالک در کاربرد مستقیم اسپور روی آن‌ها مرگ و میر پایینی داشتند، اما در نتیجهٔ کاربرد غیرمستقیم قارچ، مرگ و میر بالایی دیده شد. ولز نتایج مشابهی به‌دست آورد و نشان داد که بقای *Aphidiolestes aphidimyza* از طریق کاربرد مستقیم قارچ *Lecanicillium longisporum* تحت تأثیر منفی قرار نگرفت، در حالی که، هنگام تغذیه از شته‌های آلوده به قارچ *L. longisporum* تحت تأثیر منفی قارچ قرار گرفت. این موضوع از طریق چند فاکتور می‌تواند توجیه شود (Velez 2008): نخست اینکه راه‌های نفوذ قارچ به داخل بدن حشرات متفاوت است. هرچند

معمول‌ترین مسیر حملهٔ قارچ بـه میزبان از طریق جلد است، گزارش‌هایی وجود دارد که نشان‌دهندهٔ بیمارگری *B. bassiana* از طریق گوارشی است (Goettel & Inglis 1997). زمانی که شرایط در لولهٔ گوارشی مناسب است، ممکن است اندام‌های قارچی در این محیـط رشد کنند (Tanada and Kaya 1993). (Poprawski *et al.* 1998). بر همین اساس، مقدار زیادی از هیف‌ها در رودهٔ زنبور پارازیتوئید، *Aphidius nigripes* بعد از تغذیه از شته‌های آلوده‌شده به قارچ *L. muscarium* یافت شدند (Askary and Brodeur 1999). این امر اذعان می‌دارد که پارازیتوئید در حین تغذیه از روی میزبان آلوده‌شده، بلاستوسپورها و نیز هیف‌هایی را دریافت می‌کنـد که این‌ها می‌توانند در حین دخول و عبور از سیستم گوارشی فرصت بیشتری را برای ابتلا به آلودگی قارچی کشنده ایجاد کنند. نفوذ از طریق جلد میزبان زمانی مورد انتظار است که قارچ به‌طور مستقیم روی حشرات کامل سفیدبالک‌ها اسپری شود. هرچند نفوذ از طریق مسیر تغذیه‌ای نیز می‌تواند اتفاق بیفتد. هنگامی که، سفیدبالک‌های کامل از شبنم ایجادشده روی برگ‌های آلوده تغذیه می‌کنند، دستیابی از مسیر تغذیه‌ای می‌تواند شانس عفونت قارچی کشنده را بالا ببرد (Askary and Brodeur 1999).

دوم اینکه لاروهای شکارگر با تغذیه از شته‌های آلوده، در معرض اندام‌های (Propagules) قارچی قرار می‌گیرند که می‌توانند بیمارگری متفاوتی در پی داشته باشند. برای مثال، حشرات کامل سفیدبالک که به‌طور مستقیم با قارچ آلوده شده بودند، تنها در معرض بلاستوسپورها، آن هم فقط در زمان اسپری‌شدن قرار گرفتند (Shah and Pell 2003).

در مقایسه، حشرات کامل سفیدبالک که از برگ‌های آلوده تغذیه می‌کنند، می‌تواننـد هم از بلاستوسپورها و هم از میسلیوم‌هایی تغذیه کنند که در طی فرایند کلنی‌زایی روی برگ‌های آلوده تولید می‌شوند. (Askary *et al.* 1999).

جدول ۱. LC_{50} محاسبه‌شده برای بیمارگری *B. bassiana* (Bb)، *L. muscarium* (Lm) و مخلوط آن‌ها (Bb+Lm) روی پورهٔ سن دوم *B. tabaci*.

Fungus	LC_{50} (95% fiducial limits)	Intercept±SE	Slope±*SE	X^2	Pr
Bb	4.4×10^5 (2.1×10^5-8×10^5)	-3.5±0.44	0.62±0.07	1.9	0.59
Lm	1.8×10^5(7.7×10^4-3.7×10^5)	-2.93±0.43	0.56±0.08	0.3	0.96
Bb+Lm	7.9×10^5(2.8×10^3-9.2×10^6)	-3.2±0.85	0.54±0.13	9.4	0.02

*SE: Standard error.

جدول ۲. LC_{50} محاسبه‌شده برای بیمارگری *B. bassiana* (Bb)، *L. muscarium* (Lm) و مخلوط آن‌ها (Bb+Lm) در کاربرد مستقیم روی حشرهٔ بالغ *B. tabaci*.

Fungus	LC_{50} (95% fiducial limits)	Intercept±SE	Slope±*SE	X^2	Pr
Bb	1.1×10^8 (2.6×10^7-2.1×10^9)	-3.3±0.59	0.41±0.1	0.9	0.83
Lm	1.4×10^8(3.1×10^7-3×10^9)	-3.97±0.7	0.49±0.1	0.02	0.99
Bb+Lm	9.1×10^7(3.6×10^7-4.5×10^8)	-5.16±0.86	0.65±0.12	0.18	0.98

*SE: Standard error.

جدول ۳. LC_{50} محاسبه‌شده برای بیمارگری *B. bassiana* (Bb)، *L. muscarium* (Lm) و مخلوط آن‌ها (Bb+Lm) در کاربرد غیرمستقیم روی حشرهٔ بالغ *B. tabaci*، بلافاصله پس از اسپری‌کردن قارچ روی برگ

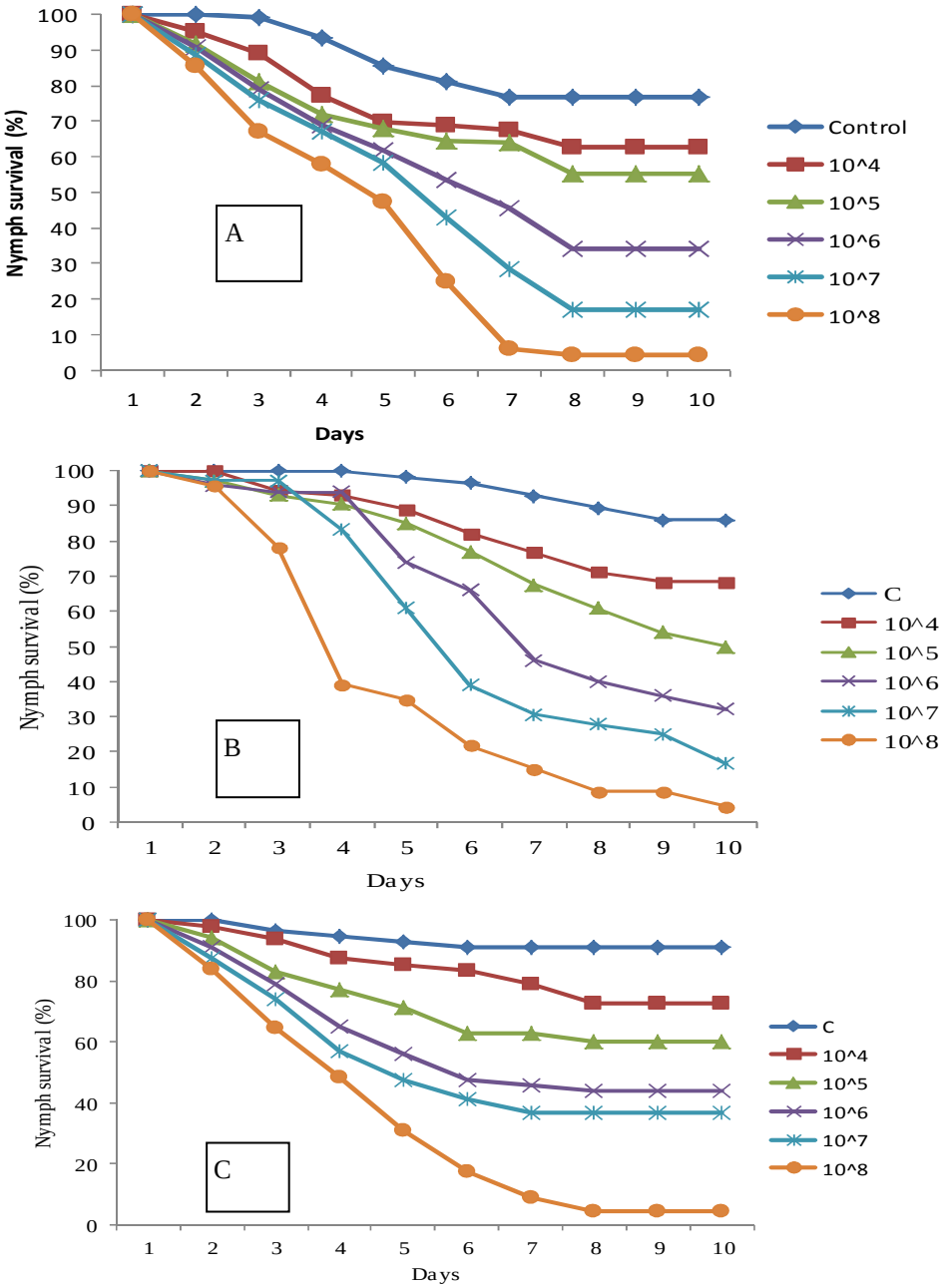
Fungus	LC_{50} (95% fiducial limits)	Intercept±SE	Slope±*SE	X^2	Pr
Bb	2.7×10^6 (9×10^4-8.4×10^8)	-2.75±0.68	0.43±0.11	6.98	0.07
Lm	3.9×10^6(1.5×10^6-1.02×10^7)	-3.9±0.67	0.59±0.1	0.6	0.9
Bb+Lm	5.8×10^5(1.6×10^5-1.5×10^6)	-3.9±0.5	0.7±0.08	2.6	0.46

*SE: Standard error.

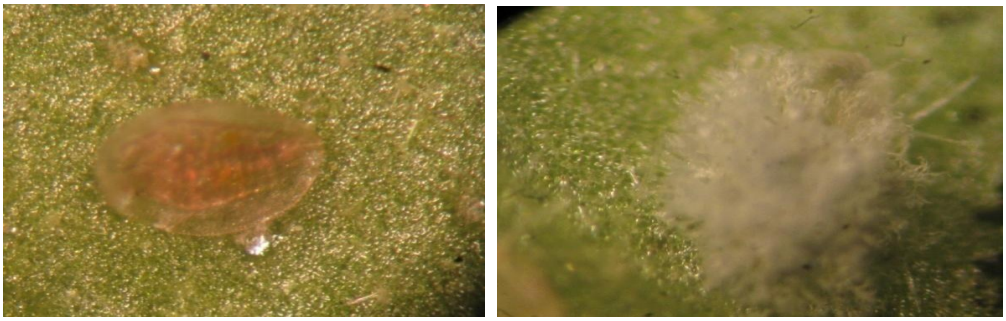
جدول ۴. LC_{50} محاسبه‌شده برای بیمارگری *B. bassiana* (Bb)، *L. muscarium* (Lm) و مخلوط آن‌ها (Bb+Lm) در کاربرد غیرمستقیم روی حشرهٔ بالغ *B. tabaci*، ۵ روز پس از اسپری‌کردن قارچ روی برگ

Fungus	LC50 (95% fiducial limits)	Intercept±SE	Slope±*SE	X2	Pr
Bb	6.7×105 (1.7×105 -2.2×106)	-4.9±0.71	0.84±0.12	4.33	0.23
Lm	2.4×106(1.5×105-1.7×107)	-4.17±0.95	0.65±0.14	3.93	0.27
Bb+Lm	1.6×105(3.3×104-5.5×105)	-3.5±0.5	0.7±0.09	2.8	0.42

*SE: Standard error.



شکل ۱. مرگ و میر روزانهٔ پوره‌های سن دوم *B. tabaci* تیمارشده با غلظت‌های مختلف قارچهای بیمارگر (A): Bb، (B): Lm، (C): Bb+Lm) در مقایسه با شاهد (توبین ـ ۸۰)



شکل ۲. سمت چپ: پورهٔ *B. tabaci* که بر اثر قارچ آلوده شده و در آن رنگدانه‌های تیره (قرمز) تولید شده است، (سمت راست: پورهٔ سن دوم *B. tabaci* که با قارچ *B. bassiana* آلوده شده است و میسیلیوم‌های قارچ روی آن رشد کرده‌اند.

بر همین اساس، بیمارگری برای اندام‌های قارچ که روی برگ‌های آلوده‌شده از طریق شبنم و ترشحات حشره تولید می‌شود، می‌تواند بالاتر باشد و به افزایش توان بیمارگری (Virulance) منجر شود (Taborsky 1992). همچنین، مرگ و هضم ساختارهای بدن حشره توسط قارچ ممکن است به‌علت مرگ ناشی از مسمومیت با زهرآبه‌های قارچی (Toxicosis) باشد تا بیماری قارچی (Mycosis) (Tanada and Kaya 1993). به عبارتی مرگ حشرات کامل سفیدبالک ممکن است به‌علت در معرض قرارگرفتن با توکسین‌های قارچی موجود در میسلیوم‌ها باشد، که بلاستوسپورها فاقد آن توکسین‌ها هستند. سوم اینکه مدت زمان تماس قارچ با حشره می‌تواند نقش مهمی را در بیماری قارچی بازی کند. حشرات کامل سفیدبالک تنها یک‌بار و آن هم در زمان پاشش اسپورها در معرض قارچ بودند و برگ‌های میزبان که اسپورپاشی نشده‌اند، اسپور ندارند و حشرهٔ امکان دریافت مجدد اسپور را پس از زدوده‌شدن اسپورهای سطح بدنش نداشته است. در حالی کـه، در روش آلوده‌سازی غیرمستقیم، اسپور روی برگ‌های گیاه میزبان به‌طور مداوم در معرض آلوده‌سازی حشرات هستند که به‌رغم عادت‌های خاص، زدودن اسپورها از سطح بدن و تحرک زیاد، آلودگی را در سطح بدنش گسترش و شانس ابتلا به بیماری را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، در روش پاشش مستقیم روی حشرات کامل سفیدبالک‌ها امکان زدودن اسپورها از طریق شاخک‌ها وجود داشت (مشاهدهٔ شخصی)؛ بنابراین، تعداد اسپورها برای ایجاد بیماری کافی نبودند. این رفتار در مورد حشرات دیگر نیز دیده شده است. برای مثال موریانه‌ها کنیدی‌های چسبیده به سطح بدنشان را عمدتاً از طریق تمیزکردن دوطرفه می‌زدایند (Yanagawa and Shimizu 2005). موریانه‌های دارای شاخک، نسبت به موریانه‌های بدون شاخک کنیدی‌ها را به‌طور مؤثرتری از سطح بدن پاک می‌کنند (Yanagawa *et al*. 2009). همچنین، مقایسهٔ حدود بالا و پایین LC_{50} به‌دست‌آمده در روش آلوده‌سازی غیرمستقیم و رهاسازی حشرات کامل در دو زمان صفر و ۵ روز پس از اسپورپاشی نشان داد که تفاوت معنی‌داری از لحاظ زمانی در میزان تأثیر قارچ یافت نمی‌شود. به عبارتی می‌توان مطمئن بود که اسپوری که ۵ روز قبل از حضور آفت روی برگ‌های میزبان قرار گرفته است با اسپوری که بلافاصله در زمان حضور آفت روی برگ پاشیده شده است، از نظر میزان پایداری، حفظ زهرآگینی و جوانه‌زنی تفاوتی ندارد. با توجه به زیست‌شناسی این حشره که در زمان واحد مراحل رشدی مختلف آن روی گیاه میزبان حضور دارند، این احتمال وجود دارد که حشرات خارج‌شده از شفیره در زمان‌های مختلف، آلوده شوند. در همهٔ آزمایش‌های انجام‌شده روی حشرات کامل حدود بالا و پایین LC_{50} آن‌ها با یکدیگر مقایسه شدند و به‌علت هم‌پوشانی حدود بالا و پایین LC_{50}، تفاوت معنی‌داری در استفاده از دو قارچ روی حشرات کامل در سطح ۹۵ درصد یافت نشد. بنابراین، با توجه به نتایج فوق می‌توان دو موضوع مهم را مد نظر داشت. نخست اینکه در صورت استفاده از جدایهٔ مناسب (از نظر بیمارگری) می‌توان از هریک از جدایه‌ها به تنهایی برای کنترل سفیدبالک استفاده کرد. دوم اینکه این تحقیق نشان داد که کاربرد مخلوط جدایه‌های دو قارچ بیمارگر روی یکدیگر اثر منفی و کاهشی ندارند.

هرچند که کاربرد مخلوط آن‌ها اثر سینرژیستی نیز ایجاد نمی‌کند، اما در موارد خاص نظیر کاربرد مخلوط جدایه‌ها برای کنترل دو آفت مختلف می‌تواند اتفاق بیفتد.

سپاسگزاری

ازمؤسسهٔ تحقیقات‌گیاه‌پـزشکی کشور که امکانات اجرای این تحقیق را فراهم کرده است، سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

Abbott WS (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology. 18: 265-267.

Askary H, Carrier Y, Belonger RR, Brodeur J (1998). Pathogencity of the fungus, *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. Biocontrol Science and Technology 8(1): 23-32.

Askary H, Brodeur J (1999). Susceptibility of larval stages of the aphid parasitoid *Aphidius nigripes* to the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. Journal of Invertebrate Pathology 73 (1): 129- 132.

Brown JK, Bird J (1992). Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americans and the Caribbean Basin. Plant Disease 76(3): 220-225.

Byrne DN, Bellows TS, Parella, MP (1990). Whiteflies in agricultural systems. *In*: Gerling D. (ed.), Intercept Ltd, Andover, pp. 227-261.

Cuthbertson AGS, Keith, FAW (2005a). Pathogenicity of the entomopathogenic fungus, *Lecanicillium muscarium*, against the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* under laboratory and glasshouse conditions. Mycopathologia 160(4): 315-319.

Cuthbertson AGS, Keith FAW, Carola D (2005b). Compatibility of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and insecticides for eradication of sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. Mycopathologia 160(1): 35-41.

Cuthbertson AGS, Walters KFA, Northing P (2005c). The susceptibility of immature stage of *Bemisia tabaci* to the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* on tomato and Verbena foliage. Mycopathologia 159(1): 23-29.

Deghairi MAAL (2008). Bioassay evaluation of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* Vuelleminagainsteggs and numphs of *Bemisia tabaci* Genadius (Homoptera: Aleyrodidae). Pakistan Journal of Biological Sciences 11(12): 1551-1560.

El-Basyouni SH, Brewer D, Vining LC (1968). Pigments of the genus *Beauveria*. Canadian journal of Botany 46: 441-448.

Eyal J, Mabud MDA, Fischbein KL, Walter, JF Osborne LS, Landa Z (1994). Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. Eo-1 strain, which produces a red pigment for microbial control. Applied Biochemistry Biotechnology 44(1): 65-80.

Fransen JJ (1990) Natural enemies of whiteflies, Fungi. *In*: Gerling D (ed.), Whiteflies, Their bionomics, Pests status and management Intercept Limited, Andover, UK. pp. 187-210.

Gerling D, Mayer RT (1996). *Bemisia*: 1995 Taxonomy, biology, damage and management. Intercept Limited, Andover, UK.

Goettle MS, Inglis GD (1997). Fungi: Hyphomycetes. *In*: Lacey L. (Ed.), Manual of techniques in insect pathology. Academic press, San Diego. pp. 214- 249.

Humber RA (1992). Collection of entomopathogenic fungal cultures, Catalog of strains. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS-110, 177.

Jones D (2003) Plant viruses transmitted by whiteflies. European Journal of Plant pathology 109(3): 197-221.

Nomikou M, Janssen A, Schraag R, Sabelis MW (2001). Phytoseiidae predators as potential biological control agents for *Bemisia tabaci*. Experimental Applied Acarology 25(4):271-291.

Oliveira MRV, Henneberry TJ, Anderson P (2001). History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. Crop protection 20: 709-723.

Poprawski TJ, Legaspi JC, Parker P (1998). Influence of entomopathogenic fungi on *Serangium parcesetosum* (Coleoptera: Coccinellidae), an important predator of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae). Environmental Entomology 27 (3): 785-795.

Quinlan RJ (1988). Use of fungi to control insects in glasshouses. *In*: Burge MN (Ed.), Fungi in biological control systems. Manchester University Press, Manchester, UK. pp. 19-36.

SAS (2002). Version 9. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

Shah PA, Pell JK (2003). Enthomopathogenic fungi as biological control agents. Applied Microbiology and Biotechnology 61 (5/6): 413- 423.

Tabashnick BE, Cushing NL (1987). Quantitative genetic analysis of insecticide resistance: variation in fenvalerate tolerance in a diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) population. Journal of Economic Entomology 82: 5-10.

Taborsky V (1992). Small- scale processing of microbial pesticides. FAO Agricultural services Bulletin. 96: 45- 48.

Tanada Y, Kaya HK (1993). Fungal infections. *In*: Insect pathology. Academic press, San Diego. pp. 318-362.

Van Lenteren JC, Noldus PJJ (1990). Whitefly plant relationships, Behavioral and Ecological Aspects. *In*: Gerling D (ed.), Whitefies: Their bBionomics, pest status and management, Intercept Andover Hants. 47-89.

Velez MPJ (2008). Compatibility of the entomopathogenic fungi *Lecanicillium longisporum* (Petch) Zare & Gams with the predatory midge *Aphidolestes aphidimyza* Rondani (Diptera: Cecidomyiidae). Thesis submitted for the degree of Master of Science, Simon Fraser University, Canada.

Vicentini S, Faria M, Olivera MRV (2001). Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Isolates against nymph of *Bemisia tabaci* (Genn.) Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay method. Neotropical Entomology 30(1): 97-103.

Wraight SP, Carruthers RI, Bradley CA Jaronski ST Lacey LA, Wood P, Galaini-Wraight S (1998). Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silver leaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Journal of Invertebrate Pathology 71(3): 217-226.

Yanagawa A, Shimizu S (2005). Defense strategy of the termite, *Coptotermes foumosanus* Shirakito entomopathogenic fungi. Japanese. Journal of Applied Entomology and Zoology 16: 17-22.

Yanagawa A, Yokohari F, Shimizu S (2009). The role of antennae in removing entomopathogenicfungi from cuticle of the termite, *Coptotermes formosanus*. Journal of Insect Science 9(6): 1-9.