

تأثیر باکتری *Bacillus thuringiensis var. tenebrionis* روی سنین مختلف لاروی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی (*Col. chry hrysomelidae*) *Leptinotarsa decemlineata* (Say) نقش سینرژست حنا در افزایش کارایی آن

اکبر قاسمی کهریزه^۱، محمد حسن صفرعلیزاده^۲ و علی اصغر پورمیرزا^۳
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۱۰/۴

خلاصه

در این تحقیق حساسیت سنین مختلف لاروی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی به باکتری *B. thuringiensis var. tenebrionis* به تنهایی و در اختلاط با پودر حنا مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور حشره در آزمایشگاه، در روی بوته‌های سیب‌زمینی کاشته شده در گلدان پرورش داده شد. سنین لاروی مورد نظر را با استفاده از اندازه‌گیری عرض کپسول سر جدا نموده و در آزمایشها به کار برده شدند. زیست‌سنجی با غلظت‌های مختلف فرمولاسیون تجارتي *B. thuringiensis* با عنوان "NOVODOR FC" روی لاروهای سنین اول، دوم، سوم و چهارم صورت گرفت و مقادیر LC₅₀ سنین لاروی مذکور به ترتیب ۲۶۱/۵۳۹، ۵۸۶/۶۹۶، ۱۵۸۵/۵۲۱ و ۴۰۹۳/۱۳۱ قسمت در میلیون تخمین زده شد. به منظور ارزیابی نقش سینرژستی پودر حنا روی *B. thuringiensis*، غلظت‌های معینی از حنا را با غلظت معینی از باکتری (۵۰۰ قسمت در میلیون) مخلوط و در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی روی مرحله سن سوم لاروی به کار برده شد. نتایج حاصله نشان داد که پودر حنا خاصیت سینرژستی بالایی در افزایش کارایی باکتری دارد. به طوری که مخلوط *B. thuringiensis* با غلظت ۵۰۰ قسمت در میلیون و پودر حنا با غلظت ۵۰۰۰ قسمت در میلیون بعد از ۶ روز، ۷۲/۵ درصد تلفات ایجاد نمود در صورتی که باکتری و حنا هر کدام به تنهایی به ترتیب ۱۷/۵ و ۲/۵ درصد تلفات ایجاد کردند.

واژه‌های کلیدی: باکتری *Bacillus thuringiensis var. tenebrionis*، *Leptinotarsa decemlineata* (Say)، اثر سینرژستی حنا.

مقدمه

مهاجرت حشرات بالغ، آفت فوق‌الذکر در برخی از مناطق دیگر کشور نیز خسارت وارد می‌کند (۳). سوسک کلرادوی سیب‌زمینی از آفات همه‌جایی^۱ محسوب شده و با در نظر گرفتن تنوع تغذیه آن از گیاهان تیره Solanaceae می‌تواند به صورت خطر جدی برای محصولاتی نظیر سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و بادنجان به حساب بیاید (۳). تغذیه حشره کامل و لارو آن از شاخ و برگ و ساقه‌های گیاهان سیب‌زمینی موجب کاهش راندمان محصول می‌گردد. به علاوه،

سیب‌زمینی *L. decemlineata* (Say) که جزو آفات بسیار مهم و خسارت‌زا در دنیا معرفی شده (۱۲) یکی از آفات مهم و تهدید کننده مزارع سیب‌زمینی کشور است که با وجود اعمال مقررات قرنطینه گیاهی شدید، در سال ۱۳۶۳ از طریق مرز جمهوری آذربایجان وارد ایران شد و به مزارع سیب‌زمینی اردبیل خسارت وارد کرد (۵). با انجام اقدامات قرنطینه داخلی چندین سال توانستند آفت مذکور را در اردبیل محصور کنند ولی متأسفانه در سال‌های اخیر به سبب انتقال غده‌های آلوده و

تا ۳۳ درجه ۱۰۰ درصد و در دمای ۱۸ درجه ۴۵ درصد بود (۸). در کانادا اثر این باکتری بر علیه لاروهای سنبل دوم، سوم و چهارم سوسک کلرادو ۷ روز بعد از اجرای سمپاشی در گلخانه به ترتیب ۸۰، ۵۰ و ۱۳ درصد گزارش شده است (۱۸). در صورتیکه فرمولاسیون Myx-1806 که حاوی توکسین این باکتری است موثرتر از فرمولاسیون M-one و سایر حشره‌کش‌ها توصیه شده است (۸). در سال ۱۹۹۱ در ایالت متحده امریکا در آزمایشی از یک فرمولاسیون نژاد جدید موسوم NovoBtt از باکتری *B. thuringiensis sup. sp. tenebrionis* روی سیب‌زمینی ۲/۵ لیتر در هکتار ۷۹ تا ۹۵ درصد سوسک کلرادو را کنترل می‌کند تاثیر این حشره‌کش در زمان تفریح ۴۰ درصد تخم‌ها بسیار قابل توجه بود (۱۳).

نقش سینترژیستی حنا با باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای برگخوار چغندر قند بوسیله نامور (۱۳۷۸) مطالعه شده و نامبرده نشان داده است که اضافه کردن پودر حنا به مقدار ۵۰۰۰ ppm به باکتری میزان تلفات از ۱۷/۵ به ۸۰ درصد افزایش پیدا می‌کند. نامبرده در بررسی‌های دیگری نقش دو ماده کاربراندوم و حنا را به عنوان دو ماده سینترژیست که باعث افزایش میزان تلفات شده است بطوریکه مخلوط پودر حنا به غلظت ۳۰۰۰ و کاربراندوم به غلظت ۵۰۰۰ ppm به باکتری *B. thuringiensis* موجب افزایش تلفات تا ۹۰ درصد شده‌اند. در صورتیکه این دو ماده با غلظت‌های فوق‌الذکر به صورت جداگانه با باکتری *B. thuringiensis* به ترتیب ۳۷ و ۲۷ درصد تلفات ایجاد می‌نمایند.

پودر حنای معمولی از برگ‌های گیاه حنا که بومی ایران و با نامی علمی *Lawsonia alba* از خانواده Litraceae است، حاصل می‌شود برگ حنا دارای ماده رنگی لاوسون و مواد چربی و تاننها می‌باشد (۱) به دلیل داشتن مقدار زیادی از انواع تاننها در صورت اختلاط با *B. thuringiensis* باعث بروز حالت سینترژیسم می‌شود، زیرا تانن‌های موجود در آن می‌تواند در سلول‌های پوششی معده میانی حشرات زخم‌های ریزی ایجاد نماید که این سبب می‌شود که اسپوره‌های باکتری که در درون معده رشد کرده‌اند به مقدار فراوان تری وارد حفره عمومی شده و در کل باعث افزایش تلفات لاروی شوند در حالی که زمان مرگ و میر لاروها را نیز به تأخیر می‌اندازند (۴).

حشره کامل سوسک کلرادو به اشاعه و گسترش تعدادی از بیماری‌های سیب‌زمینی نیز کمک می‌کند (۱۵). با توجه به تداخل نسل‌ها هر چهار مرحله بیولوژیکی آفت به طور همزمان در مرزعه دیده می‌شوند. لذا مبارزه با آن بسیار مشکل بوده و اگر اقدامات اساسی در مواقع ضروری در جهت مبارزه با آن انجام نگیرد خسارت جبران ناپذیری به مرزعه سیب‌زمینی وارد می‌شود (۱۶). استفاده بی‌رویه از سموم آفت‌کش در طول ۳۰ الی ۴۰ سال گذشته جهت کنترل این آفت علاوه بر ایجاد مشکلات و ناهنجاریهای متعدد باعث بروز مقاومت آن به همه حشره‌کش‌های مصرفی شده است (۲۱) و در چنین شرایطی راههای متعددی مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت روش کنترل تلفیقی جهت مبارزه با سوسک کلرادو برگزیده شده‌است (۱۶). در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات که هدف دسترسی به یک کنترل مؤثر، انتخابی با حداقل ایجاد اختلال در محیط زیست و تأمین نهایت سلامتی انسان است، حشره‌کش‌های میکروبی از وسایل ایده‌آل کنترل آفات به شمار می‌روند که از مهمترین آنها می‌توان به آفت‌کش‌های میکروبی بر پایه استرین‌های مختلف باکتری *B. thuringiensis* اشاره نمود (۲). *B. thuringiensis* یکی از آفت‌کش‌های بیولوژیکی موفق در امر مبارزه با برخی از آفات محسوب می‌شود، که در مبارزه با تعداد زیادی از حشرات آفت کاربرد گسترده‌ای پیدا نموده است (۲۰). امروزه تعداد زیر گونه‌هایی از این باکتری که در حشرات بیماریزا می‌باشند دایما افزایش یافته و تاکنون ۵۸ سروتیپ آن شناسایی شده است (۱۹). در سال‌های اخیر چند سروتیپ *B. thuringiensis* روی برخی از سخت‌بالپوشان از جمله سوسک کلرادو بیماریزا معرفی شده است که از جمله آنها می‌توان به واریته *B. thuringiensis var. tenebrionis* اشاره کرد (۷) طی تحقیقات انجام شده در آلمان، خاصیت حشره‌کش باکتری *B. thuringiensis sub, sp. tenebrionis* بر روی سوسک کلرادو ارزیابی گردیده و خاصیت حشره‌کش این پاتوتیپ بر روی کلرادو زیاد گزارش شده است (۱۷) در ایالت ماساچوست میزان تلفات حاصل شده در اثر غلظت‌های مختلف فرمولاسیون M-one علیه لاروهای سنبل مختلف سوسک کلرادو در دمای ۲۸

شاهد (آب مقطر) (۷ تیمار)^۳ و هر تیمار در سه تکرار و در مورد تمام سنین لاروی به طور مجزا به کار برده شد. لذا پس از تهیه شاخه‌های تیمار و آلوده‌سازی آنها با محلول‌های تهیه شده به روش اسپری‌پاشی، آنها را به طور جانبی در داخل ظروف مخصوص به ابعاد ۶×۱۷×۲۲ سانتی‌متر قرار داده و سپس در هر تیمار ۱۰ عدد لارو هم سن و هم اندازه از سنین مختلف را که با استفاده از روش اندازه‌گیری عرض کپسول سر تفکیک شده بودند به درون ظروف مزبور روی شاخه‌های تیمار شده رهاسازی شد. درب ظروف تیمار توسط پارچه‌های توری به نحوی مسدود شد که امکان فرار و خارج شدن برای لاروها وجود نداشت. شرایط نگهداری لاروهای آزمایش در مورد کلیه ظروف تیمار یکسان بوده و کاملاً مشابه شرایط پرورش بود و شمارش تلفات هر ۲۴ ساعت به مدت ۷ روز انجام شده است. معیار مرگ و میر با عکس‌العمل لاروها به ضربات سوزن به ابتدا و انتهای بدن آنها سنجیده شد. داده‌های حاصل بوسیله نرم‌افزار Mstac و برنامه Probit تجزیه واریانس شده و در نتیجه برای ۴ سن لاروی مقادیر LC_{۵۰} باکتری تعیین گردید. همچنین در تجزیه پروبیت داده‌ها از روش N.E.D. و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار ۹۷ Excel استفاده شد.

۲-۳- بررسی اثر سینترژیستی پودر حنا در اختلاط با باکتری روی لاروهای سن سوم^۴

جهت بررسی خاصیت سینترژیستی احتمالی پودر حنا در اختلاط با *B. thuringiensis* به منظور بالا بردن تأثیر باکتری و کاهش میزان مصرف آن، این آزمایش طراحی شد. پودر حنای مورد استفاده، پودر حنای معمولی موجود در بازار می‌باشد.

بدین منظور پس از تعیین LC_{۵۰} باکتری در برابر لاروهای سن سوم طی آزمایشاتی که قبلاً ذکر شد، غلظت ۵۰۰ قسمت در میلیون از باکتری جهت اختلاط با پودر حنا انتخاب شد.

برای تعیین غلظت‌های مناسب پودر حنا نیز یک سری آزمایش‌های اولیه انجام گرفته و در نهایت سه غلظت ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ قسمت در میلیون از آن جهت اختلاط با غلظت ۵۰۰ قسمت در میلیون باکتری انتخاب گردیدند. آزمایشات

لذا انجام بررسی‌ها و مطالعات لازم از نقطه نظر سنجش کارایی این باکتری روی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی، به خصوص نقش برخی از سینترژیست‌ها در افزایش کارایی آن ضروری بنظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

۱- میزبان

جهت انجام آزمایشات نیاز به تکثیر و انبوه‌سازی میزبان و لاروهای هم سن بود. بدین منظور پس از جمع‌آوری توده‌های تخم آفت از طبیعت آن‌ها را به آزمایشگاه منتقل نموده، و پس از تفریح توده تخم‌ها، پرورش لاروها روی گیاه سیب‌زمینی^۱ *Solanum tuberosum* (L.) و در شرایط دمایی ۴±۲۶ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵±۵۵ درصد و پرنود نوری ۱۵ ساعت انجام گرفت و سپس سنین مختلف لاروی برحسب اندازه‌گیری عرض کپسول سر از هم تفکیک و در آزمایش‌ها به کار برده شدند.

۲- عامل بیماریزا

۱-۲- باکتری مورد استفاده

در این بررسی از فرمولاسیون تجارتي *B. thuringiensis* بنام نوودور (Novodor FC) استفاده شده است. نوودور FC حشره‌کش بیولوژیک مبتنی بر *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* serotype H8a, 8b بوده که به صورت مایع قابل انتشار در آب فرموله شده است و هر گرم آن حاوی ۱۵۰۰۰ Bttu^۲ می‌باشد. این فرآورده توسط شرکت Novonordisk A/S برای کنترل سوسک کلرادوی سیب‌زمینی تولید و فرموله شده است.

۲-۲- بررسی حساسیت سنین مختلف لاروی

برای بررسی حساسیت سنین مختلف لاروی این حشره مقادیر LC_{۵۰} آن‌ها تخمین زده شد. آزمایشات مذکور روی سنین مختلف لاروی انجام گرفت. بدین منظور در طی یک سری آزمایش‌های مقدماتی، غلظت‌های حداقل و حداکثر که حدود ۱۰ و ۹۰ درصد تلفات روی لاروهای سنین مختلف داشتند را تعیین کرده و سپس در فاصله این دو غلظت، ۴ غلظت به روش فواصل لگاریتمی تعیین و در نهایت ۶ غلظت به همراه تیمار

۳. غلظت‌های بکار رفته عبارتند از: ۵۰، ۹۱، ۱۶۶، ۳۰۱، ۵۴۹ و ۱۰۰۰ قسمت

در میلیون

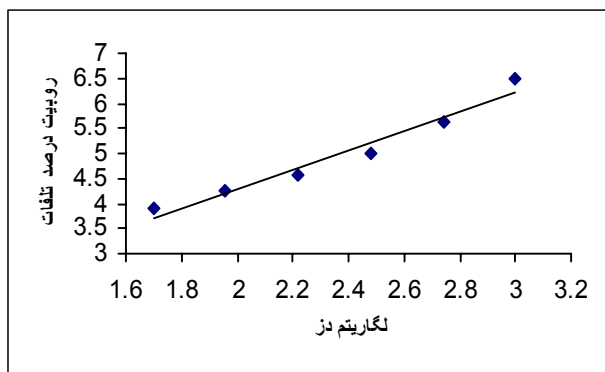
۴. بعلا حساسیت زیاد لاروهای سنین اول و دوم، این آزمایش فقط روی لاروهای سن ۳ انجام شد.

۱. رقم مورن

۲. مقدار ماده موثر در هر گرم

روی سنن لاروی نشانگر حساسیت سنن پایین و مقاومت سنن بالای لاروی می‌باشد که نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج حاصل از بررسی‌های سایرین (۲۲)، (۸)، (۱۸)، (۹) و (۱۰) مطابقت دارد.

در این تحقیق میزان LC_{50} محاسبه شده برای لاروهای سن اول که تنها پس از چند ساعت تغذیه از برگ‌های سالم به روی شاخه‌های تیمار شده منتقل شده بودند برابر ۲۶۱/۵۳۹ قسمت در میلیون بود که نشان دهنده حساسیت زیاد این سن لاروی به باکتری می‌باشد. میزان LC_{50} این باکتری در برابر لاروهای سن اول که تنها به طور متوسط یک میلی‌گرم وزن داشتند توسط Lopez و Ferro (۱۹۹۵) برابر ۱۷۸/۷۹ قسمت در میلیون محاسبه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود تفاوت موجود قابل ملاحظه نبوده و به نظر می‌رسد که تاحد زیادی مربوط به شرایط متفاوت حاکم بر بررسی و نیز متفاوت بودن فرمولاسیون‌های مورد استفاده باشد به طوری که این محققین از شرایط محیطی کاملا کنترل شده آزمایشگاهی و فرمولاسیون متفاوت از *B. thuringiensis* با عنوان M-one استفاده نمودند ولی در تحقیق حاضر، شرایط آزمایش تقریباً طبیعی بوده و از فرمولاسیون نوودور FC استفاده شده است.



شکل ۱- رابطه بین لگاریتم دز و پروبیت درصد تلفات لاروهای سن اول سوسک کلرادو تغذیه کرده از باکتری پس از ۹۶

اصلی در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۴ تکرار برای هر تیمار انجام شد. ۶ تیمار عبارت بودند از:

A - *B. thuringiensis* خالص (۵۰۰ قسمت در میلیون)

B - پودر حنا خالص (۵۰۰۰ قسمت در میلیون)

C - پودر حنا (۳۰۰۰ قسمت در میلیون) + *B. thuringiensis* (۵۰۰ قسمت در میلیون)

D - پودر حنا (۴۰۰۰ قسمت در میلیون) + *B. thuringiensis* (۵۰۰ قسمت در میلیون)

E - پودر حنا (۵۰۰۰ قسمت در میلیون) + *B. thuringiensis* (۵۰۰ قسمت در میلیون)

F - شاهد (آب مقطر + روغن سیتویت)

آلوده‌سازی شاخه‌های تیمار بوسیله اسپری دستی انجام گرفت. برای جلوگیری از ته‌نشین شدن پودر حنا درون محلول و نیز پخش یکنواخت آن در تمام سطوح شاخه‌ها از روغن سیتویت به غلظت ۱۰۰۰ قسمت در میلیون در تمام تیمارها استفاده شد. شاخه‌های تیمار شده در درون ظروف تیمار قرار گرفته و در هر تکرار ۱۰ عدد لارو سن سوم رهاسازی شد. تلفات حاصله هر ۲۴ ساعت تا مدت ۷ روز یادداشت‌برداری شده و بعد از اعمال دستور تبدیل $\text{Arcsin} \sqrt{x}$ بوسیله نرم‌افزار Mstatc و برنامه Anova-1 تجزیه واریانس گردید و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون جدید چند دامنه‌ای دانکن بهره گرفته شد.

نتایج و بحث

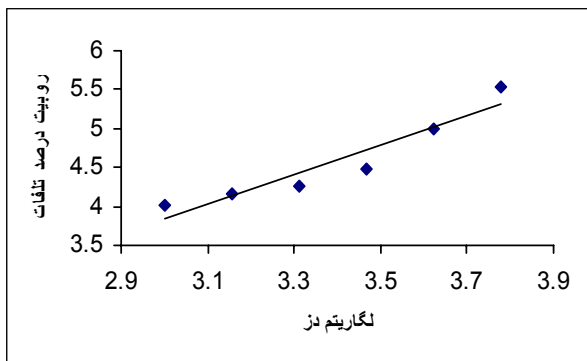
۱- بررسی حساسیت سنن مختلف لاروی به باکتری

مقادیر LC_{50} باکتری برای لاروهای سنن اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب ۵۳۹/۲۶۱، ۵۸۶/۶۹۶، ۱۵۸۵/۵۲۱ و ۴۰۹۳/۱۳۱ قسمت در میلیون تعیین گردیده که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود.

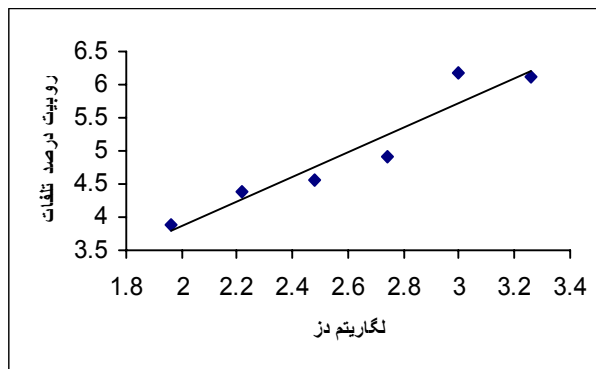
شکل‌های ۱ الی ۴ رابطه لگاریتم دز و پروبیت درصد تلفات لاروهای سنن مختلف که از غلظت‌های مختلف باکتری تغذیه کرده بودند را نشان می‌دهد. با بررسی شکل‌ها مشاهده می‌شود که در همه سنن لاروی، با افزایش غلظت باکتری مرگ و میر لاروها افزایش می‌یابد.

LC_{50} ‌های محاسبه شده حاصل از تأثیر غلظت‌های باکتری

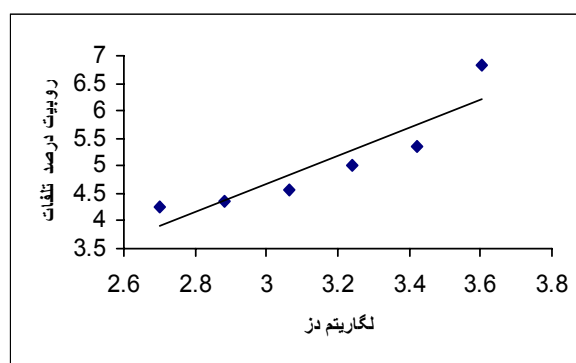
سوم سوسک کلرادو تغذیه کرده از باکتری پس از ۱۲۰ ساعت



شکل ۴- رابطه بین لگاریتم دز و پروبیت درصد تلفات لاروهای سن سوم سوسک کلرادو تغذیه کرده از باکتری پس از ۱۲۰ ساعت



شکل ۲- رابطه بین لگاریتم دز و پروبیت درصد تلفات لاروهای سن دوم سوسک کلرادو تغذیه کرده از باکتری پس از ۹۶ ساعت



شکل ۳- رابطه بین لگاریتم دز و پروبیت درصد تلفات لاروهای سن

جدول ۱ - تجزیه پروبیت داده‌های مربوط به تأثیر باکتری روی لاروهای سنین مختلف

منابع	لارو سن اول	لارو سن دوم	لارو سن سوم	لارو سن چهارم
شیب	۲/۰۱۲۹۷۱۱	۱/۵۷۲۹۴۱۲	۲/۶۱۹۹۷۸۰	۲/۰۵۱۵۰۳
عرض از مبدا	۰/۱۳۳۵۶۹۸	۰/۶۴۵۴۴۸۹	-۳/۳۸۴۳۸۰۸	-۲/۴۳۰۵۴۱۵
کای-اسکوئر	۱/۸۲۳۰۱۶۱	۲/۶۴۹۰۷۲۳	۵/۶۶۳۵۹۶۰	۲/۰۶۳۳۸۷۵
درجه آزادی	۴	۴	۴	۴
لگاریتم دز ۵۰ درصد تلفات	۲/۴۱۷۵۳۶۰	۲/۷۶۸۴۱۳۱	۳/۲۰۰۱۷۲۲	۳/۶۱۲۰۵۵۷
دزموثر ۵۰ درصد تلفات	۲۶۱/۵۳۸۷۴۸۶	۵۸۶/۶۹۵۹۷۵۷	۱۵۸۵/۵۲۱۶۳۴۰	۴۰۹۳/۱۳۱۲۸۳۶
معادل برآورد کننده درصد تلفات	$y = -0.1334 + 2/0.13 X$	$y = 0.6454 + 1/5729 X$	$y = 3/3844 + 2/62 X$	$y = 2/4305 + 0.572 X$

همان طوری که انتظار می‌رفت لاروهای سن سوم حساسیت کمتری داشته و لذا LC_{50} محاسبه شده آنها برابر $1585/522$ پی‌پی‌ام برآورد گردید. میزان LC_{50} این باکتری برای لاروهای سن سوم با میانگین وزن $15/6$ میلی‌گرم، توسط لوپز و فرو در سال 1995 برابر $1305/27$ پی‌پی‌ام محاسبه شده است که با LC_{50} محاسبه شده در این تحقیق تا حدودی مطابقت دارد. LC_{50} محاسبه شده برای لاروهای سن چهارم $4093/131$ پی‌پی‌ام بود که نشان دهنده مقاومت بالای لاروهای این سن به باکتری *B. thuringiensis* می‌باشد.

همچنین میزان LC_{50} باکتری برای لاروهای سن دوم $586/696$ پی‌پی‌ام محاسبه شده است که نشان می‌دهد حساسیت لاروهای سن دوم نسبت به لاروهای سن اول به نصف کاهش یافته است. لوپز و فرو در سال 1995 میزان LC_{50} باکتری مزبور در برابر لاروهای سن دوم زودرس با میانگین وزن 4 میلی‌گرم را 384 قسمت در میلیون بدست آوردند که با وجود شرایط کنترل شده آزمایشگاهی و متفاوت بودن فرمولاسیون‌های مورد استفاده و نیز وجود اختلاف در وزن لاروهای آزمایش شده، وجود این تفاوت قابل توجیه می‌باشد.

سن دوم می‌باشند و با توجه به انجام این آزمایش‌ها در شرایط آزمایشگاهی بایستی اذعان داشت که لاروهای سن سوم و به خصوص لاروهای سن چهارم این حشره دارای مقاومت بالایی نسبت به *B. thuringiensis* هستند و جهت کاربرد مؤثرتر *B. thuringiensis* در مزرعه، بایستی مصادف با تفریح تخم‌ها و حداکثر تا زمانی که ۳۰ درصد تخم‌ها تفریح شده باشند باکتری‌پاشی را انجام داد تا بهترین نتیجه در جهت کنترل لاروهای این آفت حاصل شود.

جدول ۲- نتایج حاصل از تأثیر تیمارها بر روی لاروهای سن سوم

تیمار	تعداد لارو								درصد تلفات
	کل ۴ تکرار	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰	۱۴۴	۱۶۸	
(A) <i>B. thuringiensis</i> (۵۰۰ ppm)	۴۰	۰	۰	۰	۴	۶	۷	۷	۱۷/۵
(B) H (۵۰۰۰ ppm)	۴۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۲/۵
(C) <i>B. thuringiensis</i> +H (۳۰۰۰ ppm)	۴۰	۰	۰	۰	۳	۸	۱۴	۱۸	۴/۵
(D) <i>B. thuringiensis</i> +H (۴۰۰۰ ppm)	۴۰	۰	۰	۱	۳	۸	۴۶	۲۱	۵۲/۵
(E) <i>B. thuringiensis</i> +H (۵۰۰۰ ppm)	۴۰	۰	۰	۰	۴	۱۰	۲۲	۲۹	۷۲/۵
(F) شاهد	۴۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۲/۵

جدول ۳- تجزیه واریانس درصد تلفات لاروهای سن سوم در اثر تأثیر تیمارها

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مجموع مربعات	F محاسبه شده	F جدول	
					٪۵	٪۱
تیمار	۵	۹۹۱۰/۰۰۶۱	۱۹۸۲/۰۱۲	۵۹/۲۲۸**	۲/۷۷	۴/۲۵
خطا	۱۸	۶۰۲/۳۵۸	۳۳/۴۶۴			
کل	۲۳	۱۰۵۱۲/۴۱۸				

CV = ٪۱۹/۰۶

در سطح ۹۵ درصد بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

۲- بررسی تأثیر توأم باکتری و حنا روی لاروهای سن سوم

نتایج حاصل از تأثیر تیمارهای مختلف آزمایش روی لاروهای سن سوم در جدول ۲ ارایه شده است. با بررسی این جدول مشخص می‌شود که در تیمارهای دارای مخلوط باکتری و پودر حنا، تلفات دیرتر ظاهر شده به طوری که عملاً در این تیمارها طی ۴۸ ساعت اول هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشده و تلفات از روز سوم شروع و تا روز هفتم ادامه یافته است، ضمن اینکه بیشترین تلفات نیز در این تیمارها صورت گرفته است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های تغییر یافته با استفاده از دستور تبدیل $\text{Arcsin} \sqrt{x}$ بعد از ۱۶۸ ساعت در

جدول ۳ ارایه شده است. این نتایج نشان می‌دهد که با اطمینان ۹۹ درصد بین میانگین تیمارها از لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار وجود دارد.

گروه‌بندی میانگین تیمارها براساس آزمون جدید چند دامنه دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد در جدول ۴ ارایه شده است. جدول ۴ نشان می‌دهد که تیمارهایی که دارای مخلوط *B. thuringiensis* و حنا هستند نسبت به تیمار *B. thuringiensis* تنها اختلاف معنی‌دار داشته و در ایجاد تلفات بیشتر مؤثر بودند و تیمار E که در آن حنا با غلظت ۵۰۰۰ پی‌پی‌ام با *B. thuringiensis* مخلوط شده است،

لاروهای تیمار شده می‌شوند. ضمن این که رشد و نمو لاروها را نیز به تأخیر می‌اندازند ولی کل تلفات حاصله از مخلوط این سینرژست‌ها و *B. thuringiensis* نسبت به حالت استفاده از *B. thuringiensis* تنها به مراتب بیشتر بوده و در عین حال، تغذیه لاروها نیز بسیار ناچیز می‌گردد (۱۱).

علت این پدیده به خواص شیمیایی تانن‌ها مربوط است. زیرا به طور کلی تانن‌ها ترکیبات شیمیایی غیر قابل تبلور بوده و با آب محلول‌های کلونیدی تولید نموده و واکنش آنها اسیدی است (۱)، خاصیت اسیدی باعث کاهش pH معده میانی حشرات شده و از فعالیت توکسین‌های باکتری کاسته شده و در نتیجه نمی‌توانند حشره را سریعاً از پای درآورند.

پودر حنا به عنوان یک ماده گیاهی بسیار ارزان قیمت و قابل دسترس می‌تواند به صورت یک سینرژست مؤثر و کارآمد در فرمولاسیون‌های *B. thuringiensis* به کار برده شود که ضمن افزایش کارایی آن، مقدار مصرف آن را نیز تا حد قابل توجهی کاهش می‌دهد که از نظر هزینه با توجه به گرانی *B. thuringiensis* بسیار حایز اهمیت می‌باشد.

بیشترین تأثیر را داشته و از بقیه تیمارهای مربوط به مخلوط حنا و *B. thuringiensis* مؤثرتر بوده و با آنها اختلاف معنی‌دار دارد.

جدول ۴- گروه‌بندی درصد میانگین‌های تیمارهای مربوط به تأثیر

حنا و باکتری بر روی لاروهای سن سوم						
تیمار	F	B	A	C	D	E
میانگین	۵/۲۸۵	۵/۲۸۵	۲۴/۵۳	۴۲/۱۱	۴۶/۴۴	۵۸/۴۵
گروه	d	d	c	b	b	A

تیمارهایی که دارای حروف مشابه هستند از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند.

با توجه به شواهد موجود در نقش مواد تانن‌دار در تخریب اپیتلیوم دستگاه گوارش حشرات (۶، ۱۱) و نیز نقش سینرژستی این مواد در افزایش کارایی محصولات میکروبی نظیر *B. thuringiensis* (۴، ۱۱) بررسی‌های انجام گرفته در این تحقیق نیز مؤید این موضوع می‌باشد، به طوری که اختلاط پودر حنا به عنوان یک ماده تانن‌دار با باکتری تلفات لاروی را به طور محسوسی افزایش داد. به عنوان مثال در حالی که غلظت ۵۰۰ قسمت در میلیون از باکتری در مدت ۶ روز، ۱۷/۵ درصد تلفات در لاروهای سن سوم ایجاد کرده بود، مخلوط همین غلظت از باکتری با پودر حنا با غلظت ۵۰۰۰ قسمت در میلیون در همان مدت، ۵/۷۲ درصد تلفات را در لاروهای سن سوم ایجاد نمود. در حالی که میزان تلفات تیمارهای شاهد و محلول ۵۰۰۰ قسمت در میلیون پودر حنا به تنهایی، در همین مدت هر کدام ۵/۲ درصد بود. یعنی تلفات حاصل از مخلوط فوق بیش از سه برابر مجموع تلفات مربوط به سه تیمار *B. thuringiensis* تنها (۵۰۰ قسمت در میلیون)، حنا (۵۰۰ قسمت در میلیون) و شاهد بود.

تانن‌های موجود در حنا می‌تواند در سلول‌های پوششی معده میانی حشرات زخم‌هایی را ایجاد نموده و سبب می‌شود، اسپورهای باکتری که در درون معده رشد نموده‌اند وارد حفره عمومی شده و باعث افزایش تلفات لاروی شوند.

اسید تانیک و تانن‌های گیاهی دیگر نیز وقتی که به عنوان سینرژست به کار می‌روند باعث تأخیر در بروز مرگ و میر

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

- آینه‌چی، ی. ۱۳۶۵. مفردات پزشکی و گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۱۸۷ صفحه.

۲. طالبی چایچی، پ. و ا. خرمشاهی. ۱۳۷۳. شناختی بر مدیریت تلفیقی آفات، انتشارات عمیدی، تبریز، ۳۰۰ صفحه.
۳. ملکشی، س. ح. ۱۳۷۷. مدیریت مبارزه تلفیقی با سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی، ماهنامه زیتون، ویژه‌نامه شماره ۶ کاهش مصرف سموم و کودهای شیمیایی، صفحه ۱۷-۱۵.
۴. نامور، پ. ۱۳۷۸. تأثیر باکتری *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* روی لاروهای کارادرینا، *Spodoptera exigua* و نقش سینترژیست‌ها در افزایش کارایی آن، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ۸۹ صفحه.
۵. نوری قنبلانی، ق. ۱۳۶۸. بررسی مقدماتی از زیست‌شناسی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی (*Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col. Chrysomelidae) در منطقه اردبیل، مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۲۰، شماره‌های ۱ و ۲، صفحه ۹-۱.
6. Bernays, E.A.; D. Chamberlain and P. McCarthy. 1980. The differential effects of ingested tannic acid on different species of acridoidea. *Entomol. Exp. Appl.* 28: 158-166.
7. Ferro, D.N. and W.D. Gelernter. 1989. Toxicity of a new strain of *Bacillus thuringiensis* to Colorado potato beetle (Col. Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 82(3):750-755.
8. Ferro, D.N. and S.M. Lyon. 1991. Colorado potato beetle (Col. Chrysomelidae) larval mortality: operative effects of *Bacillus thuringiensis* sub sp. san diego. *J. Econ. Entomol.* 84(3): 806-809.
9. Ferro, D.N.; Q.C. Yuan; A. Slocombe and A.F. Tuttle. 1993. Residual activity of insecticides under field conditions for controlling the Colorado potato beetle (Col. Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 86(2): 511-516.
10. Ghidui, G.M.; D.E. Collins and G.W. Kirfman. 1996. Laboratory and field studies of *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebrionis as a feeding deterrent to Colorado potato beetle (Col. Chrysomelidae). *J. Agric. Entomol.* 13(4): 349-357.
11. Gibson, D.M.; L.G. Gallo; S.B. Krasnoff and R.E.B. Ketchum. 1995. Increased efficacy of *B. t.* subsp. *kurstaki* in combination with tannic acid. *J. Econ. Entomol.* 88(1):270-277.
12. Hoy, C.W.; J.A. Wyman; T.T. Vaughn; D.A. East and P. Kaufman. 1996. Food, ground cover and Colorado potato beetle (Col. Chrysomelidae) dispersal in late summer. *J. Econ. Entomol.* 89(4): 963-969.
13. Langenbruch, G.A., A. Krieg, A.M. Huger and W. Schmetter. 1987. First field tests on the control of the Colorado potato Beetle with *Bacillus thuringiensis var Tenebrionis*. *Potato Abstracts* 12(5)76.
14. Lopez, R. and D.N. Ferro. 1995. Larviposition response of *Myiopharus doryphorae* (Dip. Tachinidae) to Colorado potato beetle (Col. Chrysomelidae) larvae treated with lethal and sublethal doses of *Bacillus thuringiensis berliner* subsp. tenebrionis. *J. Econ. Entomol.* 88(4): 870-874.
15. Pedigo, L.P. 1999. *Entomology and pest management*. 3th ed. Prentice Hall. N.J. U.S.A. 691 pp.
16. Ragsdale, D. and E.B. Radcliffe. 1999. Colorado potato beetle management. available: <http://ipm.world.umn.edu/aphidalert/CPB~DWR.htm>.
17. Schmidt, N.C.J. and G.W. Kirfman 1993. NOVOBTT-Anovel *Bacillus thuringiensis* sub. sp. *Tenebrionis* for saperior control of clorods potato Beetle and ather leaf-feeding Chrysomelidae. *Rev of Agric. Entomal.* 81(4)428.
18. Stewart, J.G.; J.E. Lund and L.S. Thompson. 1991. Factors affecting the efficacy of *Bacillus thuringiensis var. san diego* against larvae of the Colorado potato beetle. *Proceeding of the Entomological Society of Ontario.* 122: 21-25.
19. Surinder, K. and K. G. Mukerji. 1999. Bacteria as biocontrol agents of insects. In *biotechnological approaches in biocontrol of plant pathogens*. (edts. K.G. Mukerji, B.P. Chamola and R.K. Upadhyay.). Kluwer Academic, Plenum Publishers, New york. 99-114.
20. Tanada, Y. and H.K. Kaya. 1993. *Insect pathology*. Academic press, California. 666pp.
21. Trisyono, A. and M.E. Whalon. 1997. Fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Colorado potato beetle (Col. Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 90(2):267-271.
22. Zehnder, G.W. and W.D. Gelernter. 1989. Activity of the M-ONE formulation of a new strain of *Bacillus thuringiensis* against the Colorado potato beetle (Col. Chrysomelidae): relation ship between susceptibility and insect life stage. *J. Econ. Entomol.* 82(3): 756-761.

The Effect of *Bacillus Thuringiensis* Var. *Tenebrionis* on Colorado Potato Beetle Larvae, *Leptinotarsa Decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) and Role of Henna as a Synergist in Increasing Its Efficiency

A. GHASEMI KAHRIZEH¹, M. H. SAFARALIZADEH², A. A. POURMIRZA³
1, 2, 3, Former Graduate Student and Associate Professors, Faculty of Agriculture,
University of Uromiae, Iran.
Accepted Dec. 25, 2002

SUMMARY

In this study the susceptibility of different larval instars of Colorado potato beetle to *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Ber.) alone and in combination with henna was investigated. For this purpose the larvae were reared on potato plant in laboratory. Different larval instars were separated through head capsule diameter measurements. The experiments were conducted on 1st, 2nd, 3rd and 4th instar groups LC₅₀ values being found to be 261.539, 586.696, 1585.521 and 4093.131 ppm, respectively. To evaluate the synergistic effect of henna in combination with *B. thuringiensis* a known amount of henna was added to a certain concentration of *B. thuringiensis*. (500ppm) for 3rd instar larvae. The results revealed that there is a striking synergistic effect of this material on increasing efficiency of the strain. The larval mortality rate for a mixture of *B. thuringiensis* (500 ppm) with henna (5000 ppm), after six days, was 72.5%, whereas it was 17.5% and 2.5% for *B. thuringiensis* and henna each alone, respectively.

Key words: *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), Synergistic effect of henna.