

آفات و بیماری‌های گیاهی

جلد ۷۱، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۲

اثر دما در جوانه‌زنی، رشد شعاعی میسلیم و بیماری‌زایی

جدایه‌های قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

(Deut., Moniliaceae) روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج^۱

Chilo suppressalis Walker (Lep., Pyralidae)

Effect of temperature on germination, mycelial radial growth and virulence of

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin (Deut., Moniliaceae) on

Chilo suppressalis Walker (Lep., Pyralidae) under laboratory condition

فرزاد مجیدی شیلسر^۱، کریم کمالی^۲، فرامرز علی‌نیا^۱، جعفر ارشاد^۲

۱- مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، ۲- دانشکده کشاورزی،

دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ۳- مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران

(تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۱، تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۸۲)

چکیده

اثر طیف دمایی ۳۸۰۳ درجه سانتی‌گراد در جوانه‌زنی، رشد میسلیمی و فعالیت بیماری‌زایی شش جدایه قارچ *B. bassiana* که از لاروهای ساقه‌خوار نواری برنج در استان گیلان جدا شده بود در شرایط آزمایشگاهی مطالعه گردید. جوانه‌زنی، رشد شعاعی میسلیم و فعالیت بیماری‌زایی برای همه جدایه‌ها از ۲۰ تا ۳۰°C. از نظر صفات مذکور به جز در دمای بهینه (۲۵-۳۰°C) در سایر دماها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. جوانه‌زنی اسپورها در دمای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۳۵°C برای همه جدایه‌ها عموماً در سطح پائین بود در دمای ۳ و ۳۸°C هیچگونه جوانه‌زنی اسپورها برای جدایه‌های مختلف مشاهده شد. پائین‌ترین سرعت رشد

^۱ این مقاله براساس نتایج پایان‌نامه دوره دکتری نگارنده اول ارائه گردیده است.

میسلیومی در ۱۰، ۵ و ۳۵°C برای جدایه‌های قارچی صورت گرفت. میانگین میزان رشد رویشی بر حسب روز برای جدایه‌های Mcb1، Mcb11 و Mcb18 در ۲۰، ۲۵ و ۳۰°C بیشتر از سایر جدایه‌ها بود. مرگ و میر لاروها توسط جدایه‌های قارچی در دماهای مختلف اختلاف معنی‌دار داشت. مرگ و میر لاروهای ساقه‌خوار نواری برنج در اثر جدایه‌های قارچی از ۱۰ تا ۳۰°C اتفاق افتاد.

بیشترین مقدار LT50 در میان جدایه‌های قارچی مربوط به جدایه قارچ Mcb11 با میانگین ۱۵/۱۲ روز در دمای ۱۰°C و کمترین مقدار LT50 مربوط به جدایه قارچ Mcb18 با میانگین ۵/۳۵ روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود.

جدایه‌های قارچی Mcb1 و Mcb18 از لحاظ فعالیت جوانه‌زنی، رشد میسلیومی و فعالیت بیماری‌زایی برتر از جدایه‌های دیگر بودند.

واژه‌های کلیدی: قارچ *Beauveria bassiana*، دما، زهرآگینی، جوانه‌زنی، رشد شعاعی میسلیومی، مرگ و میر، کرم ساقه‌خوار نواری برنج

مقدمه

از زمان ظهور کرم ساقه‌خوار نواری برنج در شالیزارهای مازندران و گیلان بالغ بر سی سال می‌گذرد. در سال‌های اولیه طغیان این آفت سموم شیمیایی تنها حربه برای کنترل کرم ساقه‌خوار نواری برنج محسوب می‌شدند. با گذشت زمان و بکارگیری روش‌های مختلف مدیریتی در قالب برنامه‌های IPM (روش‌های زراعی، آگروتکنیکی، بیولوژیکی و...)، حشره‌کش‌های مصرف شده برای مبارزه با کرم ساقه‌خوار نواری برنج در شالیزارهای استان گیلان در سال ۱۳۸۱ به ۲۲۰۰ تن رسید، در صورتیکه این مقدار سم مصرفی در ابتدای مبارزه با این آفت ۱۵۰۰۰ تا ۱۶۰۰۰ تن در سال بوده است. از میکروارگانسیم‌های فعال مزارع برنج می‌توان قارچ *B. bassiana* را نام برد که روی جمعیت لاروهای زمستان‌گذران ساقه‌خوار نواری برنج در شرایط طبیعی ایجاد آلودگی می‌کند. رضوانی و شاه‌حسینی (۱۳۵۵)، فعالیت این قارچ را روی لارو و شفیره‌های ساقه‌خوار نواری برنج موجود در مزارع برنج مازندران گزارش کرده‌اند.

مطالعات (1976) N'Doye نشان داد زنده‌مانی تخم‌های ساقه‌خوار نواری برنج (*Chilo suppressalis*) که به قارچ *Beauveria* آلوده شده بودند کاهش یافته و این قارچ موجب تلفات تخم حشره گردید، همچنین او اظهار می‌دارد که لاروهای کامل، شفیره‌ها و افراد بالغ که در شرایط آزمایشگاهی به این قارچ آلوده شده بودند ۵۳ تا ۸۷ درصد تلفات دادند.

Sivasankaran et al. (1990) بیماری‌زایی قارچ *B. bassiana* در لاروهای ساقه‌خوار نیشکر (*Chilo infuscatellus* Snellen) را در شرایط آزمایشگاهی مطالعه نمود. او نشان داد که حساسیت لاروهای سن دوم و سوم این آفت به غلظت 10^5 یا 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر بیشتر از لاروهای سن بعدی بوده است، و از $51/47$ تا $65/2$ درصد آلودگی را داشته‌اند، همچنین او اظهار می‌دارد که مرگ و میر لاروها با افزایش سن لاروی و یسا با کاهش غلظت اسپورهای قارچ کاهش می‌یابد. Maniania (1991) نشان داد که دستجات تخم ساقه‌خوار ذرت، *Chilo partellus* (Swinhoe) با استفاده از جدایه (ICIPE4) از قارچ *B. bassiana* با غلظت 10^4 کنیدی در میلی‌لیتر تا صد در صد تلفات می‌دهند. مطالعات این محقق نشان داد که تخم‌های این آفت مرحله مناسب و حساس برای آلودگی بوسیله قارچ *B. bassiana* می‌باشد.

بیماری‌گری جدایه (ICIPE 4) قارچ *B. bassiana* با غلظت 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر روی لارو سن دوم ساقه‌خوار ذرت (*C. partellus*) در شرایط آزمایشگاهی از ۳ تا ۱۰۰ درصد سبب مرگ و میر لاروها شده است (Maniania, 1992).

Maniania (1993) کارایی قارچ *B. bassiana* در شرایط مزرعه‌ای روی ساقه‌خوار ذرت (*C. partellus*) با فرمولاسیون‌های مختلف (اسپورپاشی قارچ با غلظت 10^{13} کنیدی در میلی‌لیتر و گرانول قارچی 10^{13} کنیدی در هکتار در مقایسه با سم تری‌کلروفون (Trichlorfon)) بررسی نمود. او در بین فرمولاسیون‌های مختلف، فرمولاسیون گرانول قارچی را برای کنترل ساقه‌خوار ذرت توصیه نمود. وی اظهار داشت که تأثیر این قارچ روی این آفت بیشتر از تأثیر سم بوده است.

در ارزیابی قارچ *B. bassiana* برای کنترل نسل دوم ساقه‌خوار اروپسایی ذرت، *Ostrinia nubilalis* (Hubner) در مزارع ذرت تک‌زاس در قالب برنامه IPM آلودگی لاروهای این آفت تا $27/8$ درصد گزارش شده است (Gagne and Jaronski, 1998).

استفاده طولانی از سموم شیمیایی برای کنترل کرم ساقه‌خوار نواری برنج ضرورت استفاده از روش‌های نوین مبارزه بخصوص بیولوژیک در قالب مدیریت تلفیقی آفات مهم برنج (IPM) را ایجاب می‌کند. کاربرد عوامل کنترل بیولوژیک از قبیل قارچ *B. bassiana* به جای سموم شیمیایی به جهت جلوگیری از مشکلات زیست محیطی و تخریب زنجیره غذایی موجودات زنده اکوسیستم زراعی برنج و نهایتاً حفظ سلامتی استفاده‌کنندگان (انسان‌ها) بسیار با اهمیت می‌باشد.

روش بررسی

الف: پرورش حشره

حشرات کامل (نر و ماده) ساقه‌خوار نواری برنج بوسیله تور حشره‌گیری و تله‌های نوری دارای لامپ فلورسنت جمع‌آوری و به آزمایشگاه بیولوژیک مؤسسه تحقیقات برنج انتقال داده شدند. حشرات نر و ماده به تعداد ۱۰ جفت در داخل ارلن‌مایر شیشه‌ای یک لیتری به منظور تخم‌ریزی روی برگ‌های تازه گیاه برنج و یا روی علف هرز *Paspalum dilatatum* L. منتقل شدند. حشرات ماده بعد از مستقر شدن روی گیاهان فوق تخم‌ریزی نمودند. بعد از تخم‌گذاری دستجات تخم از روی برگ‌ها جدا و بعد از ضدعفونی سطحی شدن با الکل اتیلیک ۷۵ درصد به مدت ۱۵ تا ۳۰ ثانیه و کلراکس ۵٪ به مدت ۵ دقیقه و سه بار آب‌شویی با آب مقطر استریل به منظور گرفتن آب اضافی روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند و بطور جداگانه در داخل لوله‌های به طول ۱۰ سانتی‌متر و قطر ۱ سانتی‌متر قرار داده شدند. در ارلن‌ها و لوله‌ها با پنبه آغشته به آب مقطر استریل جهت زنده ماندن برگ برنج و تخم‌ها مسدود گردید. لوله‌های حاوی دسته‌های تخم ساقه‌خوار نواری برنج جهت تفریح در اطاقک رشد (Growth chamber) در دمای $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ قرار داده شدند. در دمای فوق بعد از ۵ تا ۶ روز تخم‌ها به مرحله سرسیاه (Black head) رسیدند. در این زمان با مرطوب کردن دسته‌های تخم، تخم‌ها تفریح شده و لاروهای نئونات خارج شدند. در این مرحله رطوبت یکی از فاکتورهای مهم برای تفریح تخم‌های ساقه‌خوار نواری برنج می‌باشد. لاروهای نئونات بعد از خروج به داخل ظروف پلاستیکی استوانه‌ای شفاف به ابعاد $15 \times 15 \times 25$ سانتی‌متر حاوی برگ‌های تازه و ساقه‌های نرم و لطیف برنج انتقال داده شدند. برای رسیدن به سنین لاروی مورد نظر

برای انجام آزمایشات، پرورش در داخل این ظرف‌ها انجام گردید. پرورش لاروها در درجه حرارت 24 ± 1 °C و رطوبت 70 ± 5 درصد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اطاقک رشد صورت گرفت. در این بررسی مشخص شد ساقه‌خوار نواری برنج دارای ۶ سن لاروی است که این عمل با اندازه‌گیری عرض کپسول سر امکان پذیر گردید. اثر جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* در دماهای مختلف روی لارو سن پنجم ساقه‌خوار نواری برنج انجام شد.

ب- کشت جدایه‌های قارچ

جدایه‌های قارچ *B. bassiana* که برای آزمایشات استفاده شدند حاصل نتایج واریسی ۲۴۰۰ عدد لارو مرده ساقه‌خوار نواری برنج در زمان‌های نمونه‌برداری از مناطق مختلف استان گیلان بوده است (۷۸-۱۳۷۷). بعد از جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی قارچ *B. bassiana* انجام شد. در نتیجه شش جدایه به شرح جدول ۱ در این بررسی بکار برده شده کدهای نسبت داده شده به هر جدایه مربوط به اولین حرف از کلمه‌های Beauveria, Chilo, Majidi و می‌باشد.

جدول ۱، مشخصات جدایه‌های مورد بررسی

Table 1, The isolates' specifications

محل نمونه برداری Sampling site	تاریخ جداسازی Date of isolation	جدایه Isolate
Anzali	1998-99	Mcb1*
Fooman	1998-99	Mcb6
Hashtpar	1998-99	Mcb8
Astaneh	1998-99	Mcb11
Lahijan	1998-99	Mcb12
Rasht	1998-99	Mcb18

*= M=Majidi, c=Chilo, b=Beauveria

1= the first of letter of Anzali name

پس از خالص‌سازی و تک‌اسپور کردن جدایه‌های مختلف برای تهیه مایه تلقیح، تمام جدایه‌های قارچی مورد نظر در محیط‌های غذایی PDA یا SDAY کشت گردیدند. بعد از اسپورزایی کامل (کشت ۱۴-۱۲ روزه) سطح محیط کشت (Sabouraud Dextrose Agar Yeast Extract) SDAY بوسیله سوزن انتقال خراش داده شد و در

داخل ارلن‌های جداگانه که شامل 10^{CC} آب مقطر استریل با محلول Tween 80 0.2% درصود جمع‌آوری شد. اسپورها به منظور پراکنده شدن یکنواخت در داخل محلول فوق به مدت 5 دقیقه بطور پاندولی به هم زده شدند. سپس با استفاده از لام گلبول‌شمار^{۲۰} غلظت 10^6 و 10^7 کنیدی در میلی‌لیتر تهیه گردید. برای تهیه محیط کشت S DAY از ترکیبات زیر استفاده شد. آگار ۱۵ گرم، دکستروز ۲۰ گرم، باکتوپیتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۲ گرم و آب مقطر به میزان ۱۰۰۰ میلی‌لیتر. این مواد در داخل ارلن حاوی آب مقطر مخلوط و روی اجاق قرار داده شد تا کاملاً حل شوند، پس از حل شدن، این مواد به ارلن‌های کوچکتر منتقل و به جهت ضدعفونی شدن در اتوکلاو با فشار $1/5$ اتمسفر و دمای $121^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از تهیه، این محیط درون تشتک‌های پتری مورد نظر ریخته شد.

- اثر دما در جوانه‌زنی جدایه‌های قارچی

اثر دما در جوانه‌زنی با پخش کردن 0.5 میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر روی محیط کشت SDA (بدون yeast) داخل تشتک پتری بررسی شد. سوسپانسیون فوق بصورت یک لایه نازک روی SDA پوشش داده شد. درب تشتک پتری با پارافیلیم بسته و در دمای ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور در شرایط کاملاً تاریک در زمان‌های مختلف قرار داده شدند. ۲۴ ساعت پس از تلقیح، یک میلی‌لیتر فرمالدئید 0.5% درصود به منظور توقف جوانه‌زنی اسپورها به داخل هر تشتک پتری ریخته شد. درصود جوانی‌زنی با شمارش 10^4 اسپور از هر پتری با بزرگنمایی $\times 40$ (روش Lane et al., 1991) محاسبه شد. هر تیمار با ۴ تکرار انجام شد.

- اثر دما در رشد شعاعی میسلیموم (Mycelial radial growth)

برای تهیه توده میسلیمومی جدایه‌های قارچی، ابتدا سوسپانسیونی با غلظت 10^7 کنیدی در میلی‌لیتر به مقدار ۱ میلی‌لیتر داخل تشتک‌های پتری حاوی SDA ریخته شد. تشتک‌های پتری به جهت تشکیل توده میسلیمومی در داخل انکوباتور در دمای $(25 \pm 1)^{\circ}C$ به مدت ۳ روز در شرایط کاملاً تاریک قرار داده شدند. بعد از تشکیل پرگنه، حلقه‌هایی به قطر ۸

میلی لیتر از سطح SDA برداشته شد (Rapilly, 1968). هر حلقه در مرکز تشتک‌های پتری حاوی SDA تازه قرار داده شد. سپس درب پتری‌ها با پارافیلیم بسته شدند و در شرایط "تاریکی کامل در دمای ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار گرفتند. رشد شعاعی تا ۱۲ روز بوسیله خط‌کش در دو قطر عمود بر هم حلقه‌ها اندازه‌گیری گردید. این آزمایش با ۴ تکرار برای هر تیمار انجام شد.

- اثر دما در بیماری‌زایی جدایه‌های فارچی روی لاروهای ساقه‌خوار نواری برنج

ده میلی‌لیتر از سوسپانسیون فارچی با غلظت 1×10^7 کنیدی در میلی‌لیتر از هر جدایه درون تشتک پتری ریخته، لاروهای سن پنجم ساقه‌خوار نواری برنج به مدت ۶۰-۵۰ ثانیه درون این سوسپانسیون فرو برده شدند و همزمان از مایه فوق بوسیله قیف دارای توریسمی استریل خارج شدند. سپس به ظرف‌های پرورش مناسب و در دمای ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. مرگ و میر برای یک دوره ۴ هفته‌ای هر روز ثبت گردید. لاروهای مرده از تشتک پتری خارج و مجدداً ضد عفونی سطحی شدند. ضد عفونی ابتدا با اتانول ۷۵٪ به مدت ۱۵ تا ۳۰ ثانیه و سپس هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۱۵ تا ۳۰ ثانیه انجام شد. نمونه‌ها ۳ بار توسط آب مقطر استریل آبشویی شدند. نمونه‌های ضد عفونی شده به تشتک‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب و استریل انتقال یافته و به مدت ۲ تا ۳ هفته در انکوباتور در دماهای مختلف و رطوبت نسبی ۷۵ تا ۸۵ درصد نگهداری شدند تا آلودگی ظاهر و اسپورزایی امکان‌پذیر گردد. زیست‌سنجی مورد نظر با ۴ تکرار با تعداد ۱۰ لارو سن پنجم ساقه‌خوار نواری برنج برای هر تیمار (جدایه فارچی) انجام شد. در تیمارهای شاهد، لاروهای سن پنجم ساقه‌خوار نواری برنج در محلول Tween 80 ۰/۰۲ درصد به مدت ۶۰-۵۰ ثانیه فرو برده شدند. برای هر جدایه در دمای مختلف تجزیه آماری صورت گرفت. درصد مرگ و میر بوسیله فرمول Abbott (1925) با استفاده از تیمارهای شاهد تصحیح گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. فاکتورها شامل، دماها و جدایه‌ها بودند، بطوریکه فاکتور (a) مربوط به دما و فاکتور (b) مربوط به جدایه‌های فارچی بود. تغییر و تبدیل داده‌ها برای درصد جوانه‌زنی، درصد مرگ و میر و درصد اسپورزایی روی لاروهای مرده بوسیله $\text{sqr}[\text{Aresin} (\times/100)]$ و رشد شعاعی میسلیم به

کمک $\log(x+1)$ صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها بوسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و با استفاده از ANOVA به کمک نرم‌افزار IRRISTAT انجام گردید.

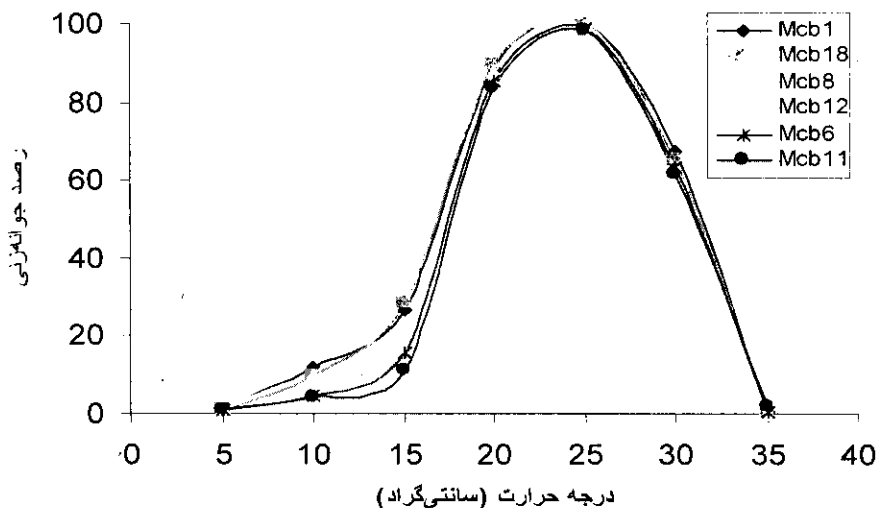
نتیجه و بحث

- اثر دما در جوانه‌زنی جدایه‌های قارچی

بررسی‌های بعمل آمده نشان داد که جدایه‌های Mcb1 و Mcb18 در دماهای مورد آزمایش میزان جوانه‌زنی یکسانی داشتند. اختلاف معنی‌داری در میزان جوانه‌زنی جدایه‌های قارچی در ۵، ۱۰، ۱۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد وجود داشت، در واقع در این دماها کمترین جوانه‌زنی را داشتند. جوانه‌زنی اسپورها برای همه جدایه‌های قارچی در همه دماها به استثنای ۳ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. کمینه دما برای جوانه‌زنی همه جدایه‌ها ۵°C، بهینه دما ۲۵°C و بیشینه دما ۳۵°C بوده است (شکل ۱ و جدول ۲).

جوانه‌زنی اسپورها براساس منحنی شکل ۱ در دمای ۳ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد صفر بوده است. درجه حرارت مناسب برای جوانه‌زنی اسپورها برای اکثر جدایه‌ها ۲۵°C بوده است. این یافته با کارهای بسیاری محققین که روی قارچهای هیفومیست مطالعه می‌کنند مطابقت دارد (Roberts and Campbell, 1977; Hall and Papierok, 1982).

(Walstad et al. (1970 جوانه‌زنی قارچ *B. bassiana* در دمای بالاتر از ۳۵°C را گزارش کرده‌اند. با توجه به نتایج بدست آمده از جدایه‌های قارچ *B. bassiana*، جوانه‌زنی جدایه‌های Mcb1 و Mcb18 نزدیک به هم بوده است. جوانه‌زنی جدایه قارچ Mcb11 در دمای ۱۰، ۱۵ و ۲۰°C پائین بوده است. اما در همین جدایه با افزایش دما، جوانه‌زنی اسپورها نیز افزایش یافته و در دمای ۳۵°C در مقایسه با سایر جدایه‌ها درصد جوانه‌زنی کنیدی‌های آن بیشتر بود. این مسئله احتمالاً به منشأ جدایه قارچ که در شهرستان آستانه با آب و هوای گرم‌تر بوده مربوط می‌شود. در مقابل Mcb8 در ۳۵°C هیچگونه فعالیت جوانه‌زنی نداشت. این جدایه در دمای ۵ و ۱۰°C بیشترین فعالیت جوانه‌زنی و در دمای ۳۰°C نسبت به دیگر جدایه‌ها کمترین درصد جوانه‌زنی را به خود اختصاص داد. جدایه Mcb8 مربوط به شهرستان هشتر با آب و هوای سردتر بود.



شکل ۱، اثر دما روی جوانه زنی شش جدایه قارچ *Beauveria bassiana* در محیط کشت SDA
 Fig. 1, Effect of temperature on conidial germination of six isolates of *Beauveria bassiana* on SDA medium

جدول ۲، مقایسه میانگین درصد جوانه زنی جدایه های مختلف *Beauveria bassiana* در محیط کشت SDA در دماهای مختلف

Table 2, Mean comparison of germination percentage of different isolates of *Beauveria bassiana* on SDA medium in different temperature

(mean±sd) ^a Germination % * میانگین درصد جوانه زنی							جدایه
35°C	30°C	25°C	20°C	15°C	10°C	5°C	Strian
0.68±0.86b	67.5±7.12a	100±0.0a	88.75±1.78a	26.75±1.92a	11.75±2.86a	0.75±0.43a	Mcb1
0.68±0.86b	65.25±2.34a	100±0.0a	89.5±1.11a	28.5±2.98a	9.5±2.5a	0.75±0.43a	Mcb18
0±0.0c	58±3b	99.75±0.45ab	87.5±1.11ab	16±2.34b	10.25±2.16a	1.25±0.8a	Mcb8
0.68±0.86b	63.75±5.62ab	99.75±0.45ab	86±2.54ab	15.5±1.11bc	10±2.91a	0.75±0.43a	Mcb12
0.68±0.86b	63.25±7.24ab	98.75±1.29bc	85.5±1.6ab	15.5±1.47bc	4.75±1.85b	0.75±0.43a	Mcb6
1.75±2.85a	61.25±6.23ab	98±1.87c	83.5±3.2b	11±2.12c	4±0.43b	0.75±0.43a	Mcb11

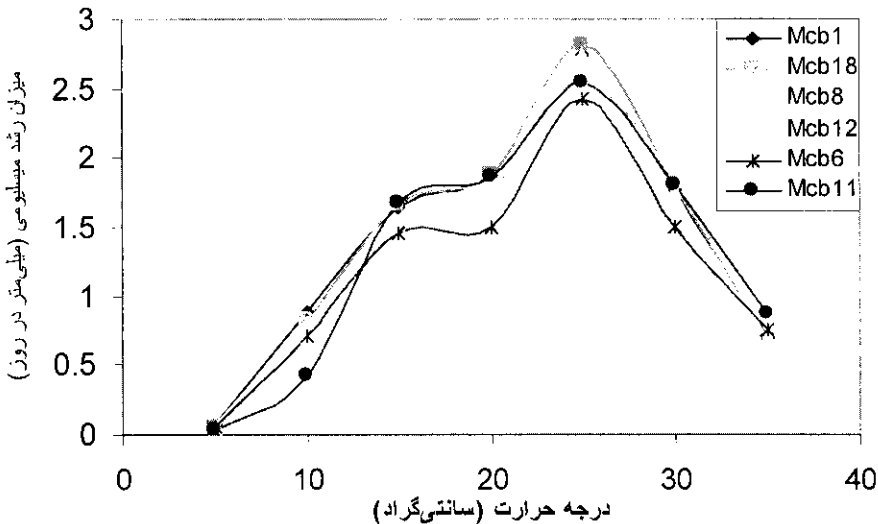
* میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال 5% P < بر مبنای آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می باشد. تغییر و تبدیل داده ها بر اساس Arcsin (sqrt(x/100)) است، اما مقادیر موجود در جدول درصد واقعی جوانه زنی قارچ بووریا در محیط کشت SDA را نشان می دهد.
 Sd=a، انحراف معیار بین میانگین ها می باشد.

Mean within a column follow by the same letter are not significantly different at the 5% level using Duncan Multiple Range Test. Means were angularly transformed based on Arcsin (sqrt(x/100)), but is showed values represent actual germination percentage on SDA.

a= Values means ± standar deviation

- اثر دما در رشد شعاعی میسلیمی جدایه‌های قارچی

رشد میسلیمی جدایه‌ها در همه دماها به جز ۳ و ۳۸°C مشاهده گردید. کمینه دما برای رشد میسلیمی جدایه‌ها ۵°C، بهینه دما ۲۵°C و بیشینه دما ۳۵°C بوده است (شکل ۲).



شکل ۲، اثر دما روی رشد میسلیمی شش جدایه قارچ *Beauveria bassiana* در محیط کشت SDA
 Fig. 2, Effect of temperature on mycelial growth of six isolates of *Beauveria bassiana* on SDA medium.

اختلاف معنی داری بین همه جدایه‌های قارچی و در تمام دماها بجز جدایه‌های قارچی Mcb18 و Mcb1 مشاهده گردید. میانگین میزان رشد شعاعی میسلیم بر حسب روز برای جدایه‌های قارچی Mcb1، Mcb11 و Mcb18 در ۲۰، ۲۵ و ۳۰°C بیشتر از سایر جدایه‌ها بود و میزان رشد شعاعی میسلیمی در دمای ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای جدایه قارچی Mcb18 در مقایسه با دیگر جدایه‌ها بیشتر بوده است.

کمترین رشد شعاعی میسلیمی در محیط کشت SDA در مقایسه با سایر جدایه‌ها مربوط به جدایه Mcb12 در دمای ۲۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. حداکثر و حداقل میزان رشد رویشی در دمای ۲۵°C مربوط به جدایه‌های Mcb18 و Mcb6 به ترتیب با ۲/۸۱ و ۲/۴۳ میلی‌متر در روز بود (جدول ۳).

رشد شعاعی میسلومی همه جدایه‌های قارچی طبق جدول (۳) به جز دمای ۳ و ۳۸ مشاهده گردید. رشد شعاعی میسلومی جدایه Mcb11 در دمای ۵ و ۱۰ °C نسبت به سایر جدایه‌ها کمتر بود. اما رشد میسلومی این جدایه در محیط کشت SDA با افزایش دما افزایش یافت. جدایه Mcb8 در دمای ۳۵ °C کمترین فعالیت رشد میسلومی را از خود نشان داد که این موضوع احتمالاً به منشأ جدایه قارچ مربوط می‌گردد. میانگین میزان رشد میسلومی جدایه از ۰/۰۳ تا ۰/۸۸ میلی‌متر در روز در دمای ۵، ۱۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۱-۳ میلی‌متر در روز در دمای ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. براساس مطالعات (Fargues et al. 1992) میانگین میزان رشد جدایه‌های قارچ *B. bassiana* در روز از ۱ تا ۲ میلی‌متر در دمای ۱۵ تا ۳۵ °C، ۲ تا ۵ میلی‌متر در دمای ۲۵ و ۳۰ °C بوده است. این محققین دمای مناسب برای رشد همه جدایه *B. bassiana* بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده کردند. این پژوهشگران دمای مناسب برای رشد رویشی جدایه‌های مناطق گرمسیر قارچ‌های هیفومیست بیماری‌زای

جدول ۳، مقایسه میانگین میزان رشد شعاعی میسلومی جدایه‌های مختلف قارچ *Beauveria*

bassiana روی محیط کشت SDA در دماهای مختلف

Table 3. Mean comparison of mycelial growth rate of different strains of *Beauveria bassiana* on SDA medium in different temperature

میانگین میزان رشد شعاعی میسلوم (میلی‌متر در روز)							جدایه
Mean radial mycelial growth rate (mm/day) (mean±sd) ^a							Strain
35°C	30°C	25°C	20°C	15°C	10°C	5°C	
0.69±0.12ab	1.78±0.06a	2.74±0.1a	1.88±0.26a	1.64±0.06a	0.88±0.04a	0.07±0.10a	Mcb1
0.67±0.5ab	1.80±0.03a	2.81±0.12a	1.87±0.14a	1.66±0.52a	0.82±0.02a	0.05±0.02ab	Mcb18
0.58±0.06c	1.76±0.01a	2.47±0.09b	1.84±0.03a	1.44±0.09b	0.8±0.6a	0.07±0.41a	Mcb8
0.68±0.06ab	1.83±0.16a	2.56±0.2ab	1.78±0.05ab	1.52±0.06b	0.69±0.06b	0.05±0.02ab	Mcb12
0.75±0.6b	1.50±0.15b	2.43±0.03b	1.5±0.71b	1.45±0.19b	0.71±0.05b	0.06±0.02b	Mcb6
0.87±0.87a	1.81±0.03a	2.54±0.08ab	1.86±0.41a	1.67±0.10a	0.42±0.33c	0.03±0.02c	Mcb11

* میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $P < 5\%$ بر مبنای

آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می‌باشد. تغییر و تبدیل داده‌ها بر اساس $\text{Log}(x+1)$ است، اما مقادیر موجود

در جدول میزان رشد میسلومی واقعی را در محیط کشت SDA نشان می‌دهد.

* $Sd=a$ ، انحراف استاندارد بین میانگین‌ها می‌باشد.

Mean within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level using Duncan Multiple Range Test. Means were angularly transformed based on $\text{Arcsin}(\sqrt{x/100})$, but is showed values represent actual mycelial growth on SDA.

a= Values means ± standar deviation

حشرات را 25°C گزارش کرده‌اند. با توجه به نتایج بدست آمده جدایه Mcb18 و Mcb1 بیشترین سرعت رشد میسلیمی را در دمای 20°C تا 25°C از خود نشان دادند. (1992) Fargues et al. اظهار می‌دارند که جدایه‌های قارچی با منشأ مناطق گرمسیری تحمل گرمایی بیشتری از جدایه‌های با آب و هوای معتدله را دارا هستند. این موضوع در مورد جدایه Mcb11 و Mcb12 به ترتیب با رشد میسلیمی $1/81$ و $1/83$ میلی‌متر در روز در دمای 30°C صادق است. Ferron (1977) دمای مناسب برای رشد قارچ *B. bassiana* را 23°C تا 25°C گزارش کرده است. Hussey and Tinsley (1981) اظهار داشته‌اند که قارچ *B. bassiana* را می‌توان در دمای 8°C تا 30°C پرورش داد اما دمای مناسب برای رشد میسلیمی این قارچ را 24°C درجه سانتی‌گراد عنوان کرده‌اند.

- اثر دما در بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی روی لارو سن پنجم ساقه‌خوار نواری برنج
جدایه‌های قارچی در مرگ و میر لاروها در دماهای مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 1% از خود نشان دادند. اختلاف معنی‌دار در مرگ و میر لاروها برای جدایه‌ها از 3°C تا 30°C مشاهده گردید.

فعالیت جدایه‌های قارچی Mcb1 و Mcb6 و Mcb18 از 10°C تا 30°C در مرگ و میر لاروها بیشتر از دیگر جدایه‌ها بوده است. مرگ و میر بالای لاروها در بین جدایه‌های قارچی در دمای 35°C و 38°C درجه سانتی‌گراد احتمالاً مربوط به افزایش دما بوده است. کمینه دما برای مرگ و میر لاروها توسط جدایه‌های قارچی 3°C ، بهینه دما 20°C تا 25°C و بیشینه دما 30°C بود (جدول ۴).

با توجه به درصد مرگ و میر لاروها در دماهای مختلف مشخص گردید اسپورزایی جدایه‌های مختلف روی لاروهای مرده در دمای 25°C تفاوت معنی‌داری ندارد. اسپورزایی جدایه‌ها روی لاروهای مرده در دمای 3°C ، 5°C و 38°C انجام نگرفت. بنابراین کمینه دما برای فعالیت قارچ و اسپورزایی روی لاروهای ساقه‌خوار نواری برنج 10°C ، بهینه برای اسپورزایی روی لاروهای مرده برای همه جدایه‌ها 25°C و بیشینه دما برای فعالیت اسپورزایی جدایه‌ها روی لاروهای مرده 30°C بود.

روی لاروهای مرده برای همه جدایه‌ها ۲۵ °C و بیشینه دما برای فعالیت اسپورزایی جدایه‌ها روی لاروهای مرده ۳۰ °C بود.

جدول ۴، اثر دما در بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *Beauveria bassiana* روی لاروهای ساقه‌خوار نواری برنج

Table 4, Effect of temperature on virulence of different strains of *Beauveria bassiana* on larvae of *Chilo suppressalis*

* میانگین درصد مرگ و میر ایجاد شده توسط قارچ							Strian
% Mortality caused by fungus (mean±sd)							
30°C	25°C	20°C	15°C	10°C	5°C	3°C	
100±0.0a	100±0.0a	100±0.0a	100±0.0a	87.5±0.83a	5±0.71c	5±0.71b	Mcb1
100±0.0a	100±0.0a	100±0.0a	100±0.0a	87.5±0.83a	7.5±0.83b	7.5±0.83a	Mcb18
95±0.71a	100±0.0a	100±0.0a	92.5±0.83b	87.5±0.83a	10±0.0a	5±0.71b	Mcb8
97.5±0.49a	100±0.0a	100±0.0a	100±0.0a	82.5±0.83a	7.5±0.83b	5±0.71b	Mcb12
90±0.0b	100±0.0a	100±0.0a	97.5±0.43a	85±0.44a	7.5±0.83b	7.5±0.93a	Mcb6
85±1.12b	100±0.0a	100±0.0a	95±0.44a	82.5±1.79a	7.5±0.83b	5±0.71b	Mcb11
7.5±0.83c	7.5±0.83b	7.5±0.83b	7.5±0.83c	5±0.71b	5±0.71c	5±0.71b	Check

* میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% P بر مبنای

آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می‌باشد. مقادیر میانگین بر اساس تغییر و تبدیل داده‌ها ($\text{Arcsin}(\sqrt{x/100})$)

انجام شده است، اما مقادیر موجود در جدول درصد واقعی مرگ و میر را نشان می‌دهد.

Sd=a، انحراف استاندارد بین میانگین‌ها می‌باشد.

Mean within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level DMRT. Means were angularly transformed based on $\text{Arcsin}(\sqrt{x/100})$, but is showed values represent actual percentage mortality.

a= values means ± Standard deviation

جدایه‌های قارچی Mcb1 و Mcb18 دارای طیف دمایی وسیع‌تری برای اسپورزایی در دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دیگر جدایه‌ها بودند. همه جدایه‌های قارچی بیشترین فعالیت اسپورزایی روی لاروهای مرده را از دمای ۱۰ تا ۳۰ °C از خود نشان دادند (جدول ۵). نتایج حاصل از بررسی‌ها نشان داد لاروهای که در دماهای ۳ و ۵ °C مرده بودند، وقتی در دمای ۲۵ °C در انکوباتور قرار گرفتند، رشد میسلیم و اسپورزایی روی آن‌ها انجام گردید. بنابراین در دماهای پائین‌تر از ۱۰ °C، قارچ قادر به اسپورزایی روی لاروها نبوده اما نفوذ هیف به داخل بدن لاروها در ۳ و ۵ °C بوسیله جدایه‌های قارچی امکان‌پذیر می‌باشد.

اختلاف معنی‌داری در مقدار LT_{50} در میان جدایه‌ها از ۱۰ تا ۳۰ °C مشاهده گردید. بیشترین مقدار LT_{50} در دمای ۱۰ °C برای همه جدایه‌ها بوده است. بطوریکه جدایه Mcb11 در این دما بیشترین LT_{50} با میانگین ۱۵/۱۲ روز را به خود اختصاص داد. کمترین مقدار LT_{50} برای اکثر جدایه‌ها در دمای ۲۵ °C بوده است، در این دما جدایه جدول ۵، اثر دما در اسپورزایی جدایه‌های مختلف *Beauveria bassiana* روی لاروهای مرده ساقه‌خوار نواری برنج

Table 5, Effect of temperature on sporulation of different strains of *Beauveria bassiana* on dead larvae of *Chilo suppressalis*

جدایه Strain	* میانگین درصد اسپورزایی Mean of % sporulation (mean±sd) ^a				
	30°C	25°C	20°C	15°C	10°C
Mcb1	82.5±0.83a	100±0.0a	100±0.0a	100±0.0a	80±0.0a
Mcb18	82.5±0.83a	100±0.0a	97.5±0.43a	92.5±0.83ab	82.5±1.23a
Mcb8	67.5±1.09bc	100±0.0a	95±0.36ab	87.5±1.09b	82.5±1.93a
Mcb12	77.5±1.48ab	100±0.0a	97.5±0.43a	92.5±0.83ab	72.5±0.83b
Mcb6	85±2.06a	100±0.0a	95±0.36ab	100±0.0a	75±0.87ab
Mcb11	57.5±1.30c	100±0.0a	90±0.0b	85±0.30b	72.5±0.83b
Check	0.0.0d	0.0.0b	0.0.0c	0.0.0c	0.0±0.0c

* میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% $P < 5\%$ بر مبنای

آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می‌باشد. مقادیر میانگین بر اساس تغییر و تبدیل داده‌ها ($\text{Arcsin}(\sqrt{x/100})$)

انجام شده است، اما مقادیر موجود در جدول درصد واقعی اسپورزایی روی لاروهای مرده را نشان می‌دهد.

Sd=a، انحراف استاندارد بین میانگین‌ها می‌باشد

Mean within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level DMRT. Means were angularly transformed based on $\text{Arcsin}(\sqrt{x/100})$, but values represent is showed actual percentage sporulation on dead larvae.

a= values means ± Standard deviation

قارچ Mcb18 با میانگین ۵/۳۵ روز کمترین LT_{50} را از خود نشان داد. واضح است که با کاهش دما تأثیر جدایه‌های قارچی روی مرگ و میرها لاروهای ساقه‌خوار نواری به کندی انجام می‌گیرد و مدت زمان بیشتری لازم است تا آلودگی لاروها توسط قارچ اتفاق افتد (جدول ۶). جدایه‌های قارچی از نظر بیماری‌زایی در دمای ۱۰ تا ۳۰ °C روی لاروهای سن پنجم ساقه‌خوار برنج بیشترین فعالیت را داشته‌اند. اسپورزایی جدایه‌ها در دمای ۵، ۳ و ۲۸ °C روی لاروهای مرده ساقه‌خوار نواری برنج صورت نگرفت (جدول ۵). توسعه بیماری در ۳ و

۵ درجه سانتی گراد به پائین ترین حد خود رسید. (Ferron 1978) بیان می کند که دماهای پائین تر از اپتیمم رشد و نمو قارچ را بدون اینکه به مجموع مرگ و میر حشره اثر داشته باشد کند می کند. مرگ و میر لاروهای ساقه خوار نواری آلوده به جدایه های قارچ *B. bassiana* با افزایش دما، افزایش یافت. اما در دمای ۳۵ و ۳۸ °C صرفاً افزایش دما موجب مرگ و میر لاروها گردید. جدول ۶، مقایسه میانگین مدت زمان ۵۰ درصد مرگ و میر لاروها توسط جدایه های مختلف

Beauveria bassiana

Table 6. Mean Comparison of LT₅₀ of different isolates of *Beauveria bassiana*

جدایه	میانگین مدت زمان ۵۰٪ مرگ و میر لاروها (روز)				
	Mean LT 50 %±sd(day)				
Strian	30°C	25°C	20°C	15°C	10°C
Mcb1	6.57±0.27a	5.74±0.36a	7.45±0.36a	11.69±0.13a	14.35±0.35a
Mcb18	6.54±0.1a	5.35±0.29a	7.75±0.83a	12.27±0.55a	14.49±0.79a
Mcb8	6.95±0.77ab	5.52±0.36a	7.58±0.42a	11.33±0.82a	12.83±0.5a
Mcb12	6.63±0.27a	5.78±0.28a	8.14±0.28a	11.28±0.38a	14.18±0.78a
Mcb6	6.81±0.22b	6.45±0.25b	7.0.7±0.22a	10.33±0.37a	14.49±0.9a
Mcb11	8±0.71c	8.24±0.73c	8.18±0.32a	12.11±0.64a	15.12±0.22a

* میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال P<5% بر مبنای آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می باشد. تغییر و تبدیل داده ها بر اساس Log (x+1) است.

Sd=a، انحراف استاندارد بین میانگین ها می باشد.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level DMRT. The data transformed based on log(x+1).

a= values means ± Standard deviation

(1975) Pathak اظهار می دارد که لاروهای ساقه خوار نواری برنج در دمای بالا و در طبیعت زنده نمی مانند. دمای ۲۰ و ۲۵ °C برای رشد اکثر جدایه ها بخصوص جدایه Mcb1 و Mcb18 روی لاروهای ساقه خوار نواری برنج مناسب بوده است. بررسی های Luz and Fargues (1998) نشان دادند که طیف دمایی برای تولید کنیدی قارچ *B. bassiana* روی سن خونخوار *Rhodnius prolixus* تا ۲۵ درجه سانتی گراد بوده است. اما در دمای ۲۸ تا ۳۰ °C فعالیت کنیدی ها کاهش یافته و در دمای ۳۵ °C اسپورزایی کاملاً متوقف گردید. اسپورزایی جدایه های قارچی در محیط کشت SDA و روی لاروهای مرده ساقه خوار نواری برنج از دمای ۱۰ تا ۳۰ °C اتفاق افتاد. در دمای ۱۰ °C جدایه قارچی Mcb8 (جدایه هشتمین) کمترین LT50 با ۱۲/۸۳ روز را به

می‌یابد آلودگی نیز زیاد می‌شود. (Alghli 1991) دمای اپتیمم برای جوانه‌زنی، رشد میسلومی و فعالیت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *B. bassiana* را روی تریپس گل حبوبات از ۲۵ تا ۳۰ °C ذکر می‌کند.

نتایج بدست آمده از این آزمایش‌ها نشان داد که جدایه‌های قارچی *Mcb1* و *Mcb18* در طیف وسیع تغییرات دمایی از کارایی خوبی برخوردار هستند. از میان ۶ جدایه آزمایش شده جدایه *Mcb18* برای مطالعات بعدی مطلوب‌تر به نظر می‌رسد. هدف از مطالعات آینده توسعه و امکان استفاده از قارچ *B. bassiana* در مدیریت تلفیقی کرم ساقه‌خوار نواری برنج در شرایط مزرعه‌ای می‌باشد.

سپاسگزاری

هزینه انجام این تحقیق از محل اعتبارات مؤسسه تحقیقات برنج و سازمان تحقیقات آموزش کشاورزی تأمین شده است. نگارندگان مراتب قدردانی خود را از مسئولین محترم سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی ابراز می‌دارند. همچنین از آقای مهندس مجید نحوی محقق محترم بخش اصلاح بذر مؤسسه تحقیقات برنج که با مساعدت بی‌دریغشان در انجام تجزیه و تحلیل آماری ما را یاری نمودند تشکر می‌نمائیم.

نشانی نگارندگان : مهندس فرزاد مجیدی شیلسر و دکتر فرامرز علی‌نیا، مؤسسه تحقیقات برنج

کشور، رشت، دکتر کریم کمالی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و دکتر

جعفر ارشاد، بخش تحقیقات رستنی‌های مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های

گیاهی، تهران.