کنترل بیولوژیک شب‌پره‌ی مینوز گوجه فرنگی *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) با استفاده از عوامل قارچی و باکتریایی بیماریزای حشرات

فریبا سهرابی[1*] و فاطمه جمالی[1]

استادیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر.

*مسئول مکاتبه fsohrabi@pgu.ac.ir; f.sohrabi1361@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۶

چکیده

شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* (Meyrick) یکی از آفات مهم گوجه‌فرنگی در ایران است. در این مطالعه، بیماریزایی جدایه‌های *Beauveria bassiana* IRAN 1395C و *Metarhizium anisopliae* IRAN 1018C و یک فرمولاسیون تجاری از باکتری *Bacillus thuringiensis* روی لاروهای سن دوم این آفت مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌های زیست‌سنجی با روش غوطه‌وری برگ در سوسپانسیون اسپور در دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵ ± ۷۰ درصد و دوره نوری ۸ :۱۶ ساعت (روشنایی به تاریکی) تحت شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت. نتایج نشان داد که قارچ *B. bassiana* به صورت مجزا و نیز در ترکیب با قارچ *M. anisopliae*، بیش از ۸۰ درصد مرگ و میر در لاروهای آفت پس از گذشت هفت روز از زمان اعمال تیمار را بوجود آورد. کمترین میزان LT_{50} ، به ترتیب ۳۵/۸۴ و ۲۸/۲۵ ساعت، در این دو تیمار مشاهده شد. باکتری *B. thuringiensis* حدود ۶۵ درصد مرگ و میر در لاروهای آفت پس از هفت روز ایجاد نمود که با مرگ و میر ایجاد شده توسط قارچ *B. bassiana* از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. با این حال، جدایه قارچ *M. anisopliae* IRAN 1018C به طور معنی‌دار تاثیر کمتری نسبت به جدایه IRAN 1395C قارچ *B. bassiana* و باکتری *B. thuringiensis* در کنترل لاروهای *T. absoluta* نشان داد.

واژه‌های کلیدی: مینوز گوجه‌فرنگی، *Bacillus thuringiensis*، *Beauveria bassiana*، *Metarhizium anisopliae*.

مقدمه

شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) یکی از مهم‌ترین آفات گوجه‌فرنگی در بسیاری از نقاط جهان از جمله ایران می‌باشد که خسارت زیادی به گوجه‌فرنگی در مناطق مورد حمله وارد می‌کند (گرمین و همکاران ۲۰۰۹، اپو ۲۰۱۰، دسنیوکس و همکاران ۲۰۱۰، بنی‌عامری و چراغیان ۲۰۱۱). این آفت به برگ‌ها، گل‌ها، ساقه‌ها و به ویژه میوه‌ها حمله نموده و می‌تواند ۱۰۰-۸۰ درصد کاهش عملکرد ایجاد نماید (اپو ۲۰۰۵).

در حال حاضر کنترل شب‌پره‌ی مینوز در ایران و کشورهای حوضه‌ی مدیترانه عمدتاً بر اساس حشره‌کش‌های شیمیایی است، اگرچه کارایی آنها به دلیل نوع رفتار تغذیه‌ای حشره (دالان زنی)، فقدان یک آستانه‌ی عمل و توانایی آنها در ایجاد نژادهای مقاوم به حشره‌کش، محدود است (سیکویرا و همکاران ۲۰۰۰، ۲۰۰۱، لیتی و همکاران ۲۰۰۵). بنابراین، تلفیق کنترل شیمیایی با دیگر روش‌های کنترل (روش‌های زراعی، بیولوژیکی و بیوتکنولوژی) ضروری می‌باشد. بعلاوه، کاربرد مکرر حشره‌کش‌های شیمیایی می‌تواند به موجودات غیر هدف (دسنیوکس و همکاران ۲۰۰۷، لندگرین و همکاران ۲۰۰۹) و محیط زیست آسیب وارد نماید.

قارچ‌های بیماریزای حشرات به عنوان عوامل زیستی به ویژه از دهه ۱۹۷۰ موضوع تحقیقات قابل توجهی بوده‌اند. حدود ۷۵۰ گونه قارچ از ۵۶ جنس، بندپایان را آلوده می کنند که بر خلاف دیگر عوامل میکروبی، به علت نفوذ

مستقیم از طریق کوتیکول میزبان، نیازی به بلعیده شدن توسط حشرات برای ایجاد بیماری در آنها ندارند (رایت و رموس ۲۰۰۲). از جمله مهمترین این قارچها می توان به *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokinin و *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin اشاره کرد که دارای شدت بیماریزایی بالا و جوانه زنی و اسپورزایی سریع بوده و همین ویژگی‌ها این دو قارچ را به عنوان عوامل بیوکنترل حشرات جالب توجه ساخته است (الدقیری ۲۰۰۸). در تحقیقی، بیماریزایی چندین ایزوله *M. anisopliae* و *B. bassiana* علیه تخم‌های شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی تحت شرایط آزمایشگاهی با اسپری کردن مستقیم سوسپانسیون با غلظت 10^7 کنیدی/میلی‌لیتر از هر ایزوله روی تخم‌ها از طریق برج پاشش بررسی و معلوم شد که مرگ و میر و تولید کنیدی روی تخم‌ها به طور معنی‌دار با ایزوله‌های *M. anisopliae* Qu-M558، *B. bassiana* Qu-B911، *B. bassiana* Qu-B912 و *B. bassiana* Qu-B928 بیشتر بود (مارتا رادریجز و همکاران ۲۰۰۶). در مطالعه-ی دیگری، اینانلی و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که *M. anisopliae* تاثیر خوبی روی هر دو مرحله‌ی تخم و لارو سن اول *T. absoluta* دارد ولی *B. bassiana* فقط روی مرحله‌ی تخم آفت موثر است. در مقابل، شالابی و همکاران (۲۰۱۳) بیماریزایی این دو قارچ را روی مرحله تخم و لاروهای *T. absoluta* گزارش نمودند بطوریکه بیشترین درصد مرگ و میر را روی لاروهای سن اول (نئونات) مشاهده کردند.

باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Btk*) نیز از جمله عوامل بیمارگر حشرات است که تاکنون موفقیت‌های زیادی در کنترل آفات پروانه‌ای، سخت بالپوشان و دوبالان برای آن گزارش شده است (فیتلسون و همکاران ۱۹۹۲، شنیف و همکاران ۱۹۹۸). اگرچه ۳۰۰ گونه، متعلق به ۱۶ راسته از حشرات به عنوان حساس به *B. thuringiensis* گزارش شده‌اند (هوانگ و همکاران ۲۰۰۴)، ولی تعداد مطالعات در مورد کارایی *B. thuringiensis* روی *T. absoluta* محدود بوده است. فرمولاسیون‌های تجاری بر مبنای این باکتری چندین دهه است که علیه حشرات آفت به عنوان جایگزینی برای حشره‌کش های شیمیایی به کار برده می‌شوند. بیشتر مطالعات صورت گرفته در زمینه‌ی اثر *B. thuringiensis* روی *T. absoluta* در منطقه منشأ این آفت اجرا شده‌اند (جیستالین و همکاران ۲۰۰۱، تئودولز و همکاران ۲۰۰۳، نیدمن و مزا باسو ۲۰۰۶). جیستالین و همکاران (۲۰۰۱) در تحقیقی گزارش نمودند که *Btk* می‌تواند در همه سنین لاروی *T. absoluta* مرگ و میر ایجاد کند و استفاده از *Btk* برای ژنوتیپ‌های مقاوم گوجه‌فرنگی، اثرات سینرژیستی یا افزاینده دارد. بعلاوه، تحقیقات انجام شده در شیلی بیماریزایی دو نژاد بومی *B. thuringiensis* را روی *T. absoluta* نشان داده است و این دو نژاد حتی از نژاد جداسازی شده از دیپل فرموله شده سمی‌تر بوده‌اند (نیدمن و مزا باسو ۲۰۰۶).

هدف از این تحقیق ارزیابی حساسیت لاروهای *T. absoluta* به *B. thuringiensis*، *M. anisopliae* و *B. bassiana* و اثرات سینرژیستی این عوامل میکروبی در کاربرد ترکیبی علیه آفت بوده است.

مواد و روش‌ها

پرورش گیاه میزبان و شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *T. absoluta*

به منظور تشکیل یک کلنی مناسب از شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی جهت انجام آزمایشات، ابتدا پرورش بوته گوجه فرنگی به عنوان گیاه میزبان برای حشره انجام شد. بذور گوجه‌فرنگی (رقم سانسید) ابتدا در خزانه درون سینی نشأ در کوکوپیت کشت شدند. پس از جوانه‌زنی، زمانی که ارتفاع بوته‌ها به ۲۰-۱۸ سانتی‌متر رسید، نشاها به گلدان‌های پلاستیکی حاوی مخلوطی از ورمی‌کمپوست، خاک مزرعه و خاک برگ منتقل شده و در اتاقک رشد با دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی در دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

حشرات کامل *T. absoluta* در اسفند ماه ۱۳۹۴ توسط تور حشره‌گیری از مزارع گوجه فرنگی آلوده به آفت در شهرستان دشتستان واقع در استان بوشهر

جمع‌آوری شدند. شب‌پره‌های مینوز در داخل قفس‌های آلومینیومی با ابعاد ۶۰×۶۰×۱۲۰ سانتی متر روی بوته‌های رشد یافته گوجه‌فرنگی درون گلدان رهاسازی شدند. دیواره‌ی این قفس‌ها به وسیله‌ی توری با مش ۱۲۰ پوشیده شده بود و سقف آنها نیز شیشه‌ای بود تا عبور نور به راحتی صورت گیرد. این قفس‌ها در یک آزمایشگاه با شرایط دمایی ۲۵-۱۶ درجه‌ی سانتی گراد و رطوبت ۵۰-۴۰ درصد نگهداری شدند. طول دوره‌ی نوری در این قفس‌ها به صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بود. هر هفته گلدان‌های حاوی گیاهان گوجه فرنگی به کلنی پرورش حشرات اضافه می شد تا گیاهان شاداب و سالم برای تخمریزی شب‌پره‌های کامل و تغذیه لاروها همواره در کلنی موجود باشد. پس از تشکیل یک کلنی قوی از حشره در شرایط آزمایشگاهی، از حشرات موجود برای انجام آزمایشات استفاده می‌گردد.

تهیه‌ی قارچ‌ها و باکتری بیمارگر حشرات

جدایه‌های IRAN 1395C قارچ *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* IRAN 1018C از موسسه‌ی تحقیقات گیاهپزشکی کشور دریافت گردیدند. قارچ‌ها در آزمایشگاه با استفاده از محیط کشت جامد سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) به مدت ۱۶-۱۴ روز در دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی گراد در انکوباتور رشد داده شدند. کنیدی‌های تولید شده در محیط پس از افزودن ۱۵ میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی توئین ۸۰ به میزان ۰/۰۲ درصد با استفاده از اسکالپل استریل از روی محیط خراش داده شدند و برای حذف میسلیوم‌های قارچ، سوسپانسیون اسپور از پارچه ململ عبور داده شد. پس از شمارش اسپورها با استفاده از لام گلبول شمار در سوسپانسیون پایه، سوسپانسیون اسپور با غلظت میلی‌لیتر/ ۳×۱۰^{۷} کنیدی تهیه شد.

در این بررسی فرمولاسیون تجاری باکتری *B. thuringiensis* زیرگونه *kurstaki* (تعداد اسپور سلول زنده ۳×۱۰^{۹} (CFU) در هر کیلوگرم و ۸۴ درصد کائولین) به صورت پودر وتابل ساخت شرکت موررا کشور اسپانیا تهیه و غلظت مزرعه‌ای توصیه شده آن برای کنترل لارو پروانه‌ها، معادل ۱/۵ کیلوگرم در هکتار، در آزمایشات استفاده گردید.

ارزیابی اثر عوامل بیمارگر روی مرحله‌ی لاروی آفت

برای زیست‌سنجی مرحله‌ی لاروی شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی *T. absoluta*، ابتدا گلدان‌های گوجه‌فرنگی جهت آلوده‌سازی به مدت ۲۴ ساعت در داخل قفس‌های حاوی شب پره‌ی مینوز نگهداری شدند. سپس گیاهان مورد آزمایش در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵ ± ۷۰ درصد و دوره نوری ۸ :۱۶ ساعت (تاریکی به روشنایی) تا زمان تفریخ تخم‌ها و رسیدن لاروها به مرحله‌ی سن دوم لاروی برای تیمار نگهداری شدند. ۷ تیمار عوامل بیمارگر شامل *B. bassiana*، *M. anisopliae*، *B. thuringiensis*، *B. bassiana+ M. anisopliae*، *B. bassiana+ B. thuringiensis*، *M. anisopliae+ B. thuringiensis* و *B. bassiana+ M. anisopliae+ B. thuringiensis* استفاده شدند. برای زیست‌سنجی روی مراحل نابالغ آفت از روش غوطه‌وری برگ[1] استفاده شد. هر برگ جداگانه به مدت ۲۰ ثانیه در محلول سمی مورد نظر غوطه‌ور شد. برگ‌های شاهد در آب مقطر استریل به همراه ۰/۰۲ توئین ۸۰ غوطه‌ور شدند. برگ‌های تیمار شده پس از یک ساعت خشکانده شدن در محیط آزمایشگاه، به ظروف پلاستیکی با درپوش تهویه‌دار با ابعاد ۳ × ۶ × ۱۰ سانتی‌متر منتقل و لاروهای سن دو مینوز با قلم‌موی بسیارظریف به روی برگ‌ها انتقال داده شدند. ظروف آزمایش تا زمان ارزیابی مرگ و میر درون اتاقک رشد با شرایط ذکر شده در بالا نگهداری شدند. برای جلوگیری از پژمردگی برگ‌ها و حفظ رطوبت آنها در مدت آزمایش، دمبرگ آن ها در پنبه مرطوب قرار داده شده و با کیسه فریزر اطراف پنبه پوشیده شد تا از تبخیر آب جلوگیری شود. ۴۸ ساعت پس از در معرض قراردادن لاروها با برگ‌های تیمار شده، تعداد لاروهای مرده شمارش و

[1]- Leaf dipping

لاروهای زنده مانده به برگ‌های سالم گوجه‌فرنگی منتقل شدند. برای هر غلظت سمی و شاهد چهار تکرار (برگ) و در هر تکرار ۱۵-۱۰ عدد لارو آفت در نظر گرفته شد. مرگ و میر لاروها تا هفت روز پس از تیمار به صورت روزانه بررسی و تعیین شد.

تجزیه آماری داده ها

داده‌های مربوط به درصد مرگ و میر آفت در تیمارهای مختلف بر مبنای تلفات شاهد با استفاده از فرمول آبوت (آبوت ۱۹۲۵) تصحیح شدند. قبل از انجام تجزیه واریانس، تست نرمالیته روی داده‌ها انجام و در صورت نیاز تبدیل داده‌ها صورت گرفت. در ابتدا یک تجزیه واریانس فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی برای بررسی تاثیر دو فاکتور نوع حشره‌کش زیستی (هفت سطح) و زمان (شش سطح) روی درصد مرگ و میر لارو با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. سپس یک تجزیه واریانس جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی نیز برای تعیین اختلاف بین میانگین‌های مرگ و میر در تیمارهای مختلف حشره‌کشی در هر بازه زمانی انجام شد و میانگین‌ها بر اساس آزمون توکی در سطح ۵ درصد گروه‌بندی شدند. همچنین تعیین زمان کشندگی (LT_{50}) مربوط به هر حشره‌کش روی مرحله‌ی لاروی مینوز برگ گوجه‌فرنگی با استفاده از روش پروبیت و با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس با طرح فاکتوریل نشان داد که اثر دو فاکتور نوع حشره‌کش ($F = 74.25$; $df = 6, 126$; $P < 0.0001$) و مدت زمان در معرض قراردهی ($F = 45.04$; $df=5, 126$; $P < 0.0001$) هر کدام به تنهایی روی درصد مرگ و میر *T. absoluta* معنی‌دار بود. بر اساس گروه‌بندی آزمون توکی، از بین حشره‌کش‌های مورد آزمایش نیز قارچ *B. bassiana* و ترکیب دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* بیشترین و قارچ *M. anisopliae* کمترین تاثیر را بر لارو سن دو آفت داشتند (جدول ۱). همچنین بر اساس گروه‌بندی آزمون توکی، بیشترین میزان تلفات آفت در مدت زمان ۱۲۰ ساعت پس از در معرض قراردهی رخ داد (جدول ۲). اثر متقابل دو عامل مدت زمان در معرض قراردهی و نوع سم نیز روی درصد مرگ و میر آفت معنی‌دار بود ($F = 2.97$; $df = 30, 126$; $P < 0.0001$).

جدول ۱- میانگین درصد مرگ و میر لاروهای سن دوم ***T. absoluta*** توسط حشره‌کش‌های زیستی.

حشره‌کش	میانگین درصد مرگ و میر
B. bassiana	۷۸/۵۵ a
M. anisopliae	۱۳/۰۰ d
B. thuringiensis	۲۹/۲۳ bc
B. bassiana+ M. anisopliae	۷۱/۷۶ a
B. bassiana+ B. thuringiensis	۱۷/۰۶ cd
M. anisopliae+ B. thuringiensis	۲۰/۰۷ cd
B. bassiana+ M. anisopliae+ B. thuringiensis	۳۹/۳۵ b

* میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون در سطح پنج درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۲- اثر زمان در معرض قرارگیری بر میانگین درصد مرگ و میر لاروهای سن دوم ***T. absoluta***[*].

زمان (ساعت)	میانگین درصد مرگ و میر
۴۸	۱۹/۳۶ **c**
۷۲	۲۳/۶۴ **bc**
۹۶	۲۹/۷۵ **b**
۱۲۰	۴۷/۹۱ **a**
۱۴۴	۵۱/۴۸ **a**
۱۶۸	۵۸/۴۳ **a**

* میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون در سطح پنج درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

میانگین درصد مرگ و میر لاروهای شب پره مینوز در زمان‌های مختلف در معرض قرارگیری پس از تیمار در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، بین تیمارهای مختلف حشره‌کشی از نظر درصد تلفات لاروهای سن دو در مدت زمان ۴۸ ساعت (= F 24.91; df = 6, 21; P < 0.0001)، ۷۲ ساعت (= F 14.85; df = 6, 21; P < 0.0001)، ۹۶ ساعت (= F 26.18; df = 6, 21; P < 0.0001)، ۱۲۰ ساعت (= F 12.16; df = 6, 21; P < 0.0001)، ۱۴۴ ساعت (= F 27.20; df = 6, 21; P < 0.0001) و ۱۶۸ ساعت (= F 10.62; df = 6, 21; P < 0.0001) پس از کاربرد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). بررسی درصد مرگ و میر حشره‌کش‌ها روی آفت در فواصل زمانی ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از کاربرد نشان داد که بیشترین میزان مرگ و میر آفت (۷۷/۶۷-۵۸/۸۳ درصد) مربوط به *B. bassiana* و ترکیب دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* بود ولی در مورد سایر حشره‌کش‌ها، کارایی روی لاروهای مینوز در فواصل زمانی مذکور بسیار پایین بوده و میانگین درصد تاثیر کمتر از ۲۰ درصد بود (جدول ۳). بر اساس نتایج بدست آمده، حشره‌کش‌های *B. bassiana*، *M. +B. bassiana* *B. bassiana+ M. anisopliae+ B.* ،*anisopliae* *thuringiensis* و *B. thuringiensis* به ترتیب با ۸۸/۷۸، ۸۳/۳۳، ۷۵ و ۶۴/۸۱ درصد مرگ و میر، بیشترین تاثیر را روی لاروهای شب پره‌ی مینوز در مدت زمان ۱۶۸ ساعت پس از کاربرد داشتند (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین درصد تلفات ± خطای معیار ایجاد شده در لاروهای سن دوم ***T. absoluta*** در اثر حشره‌کش‌های مختلف در زمان‌های ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت پس از کاربرد[*].

حشره‌کش	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰	۱۴۴	۱۶۸
B. bassiana	۵۸/۸۳Aa	۷۳/۹۷Aa	۷۷/۶۷Aa	۸۵/۱۱Aa	۸۶/۹۴Aa	۸۸/۷۸Aa
M. anisopliae	۲/۷۸Ab	۶/۴۷Ab	۱۲/۹۴Ab	۱۴/۸۱Ac	۱۶/۶۷Ac	۲۴/۰۸Ad
B. thuringiensis	۱/۶۷Bb	۱/۶۷Bb	۱/۶۷Bb	۵۱/۸۶Aab	۵۳/۹۴Ab	۶۴/۸۱Aabc
B. bassiana+ M. anisopliae	۶۱/۱۱Aa	۶۱/۱۱Aa	۷۲/۲۲Aa	۶۹/۴۴Aa	۸۳/۳۳Aa	۸۳/۳۳Aa
B. bassiana+ B. thuringiensis	۰Bb	۵/۵۵ABb	۱۴/۱۱ABb	۲۵/۲۲ABbc	۲۵/۲۲ABc	۳۲/۲۶Acd
M. anisopliae+ B. thuringiensis	۸/۳۳Bb	۸/۳۳Bb	۱۸/۵۳Bb	۲۲/۲۵Bbc	۲۲/۲۵Bc	۴۰/۷۵Abcd
B. bassiana+ M. anisopliae+ B. thuringiensis	۲/۷۸Bb	۸/۳۳Bb	۱۱/۱۱Bb	۶۶/۶۷Aa	۷۲/۲۲Aab	۷۵/۰۰Aab

[*]حروف لاتین بزرگ متفاوت در هر ردیف نشانگر تفاوت معنی‌دار بین زمان‌ها در تیمار مربوطه و حروف لاتین کوچک متفاوت در هر ستون نشانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای حشره‌کش می‌باشد (**P** < ۰/۰۵).

بر اساس نتایج، کمترین مقدار LT_{50} محاسبه شده مربوط به *B. bassiana* و *M. +B. bassiana anisopliae* بود که نشان می‌دهد زمان لازم برای کشتن ۵۰ درصد حشرات آفت در مورد این دو حشره‌کش به طور معنی‌دار کمتر از سایر حشره‌کش‌های بکار برده شده است (جدول ۴).

جدول ۴- مقادیر LT_{50} حشره‌کش‌های مختلف روی لاروهای سن دوم ***T. absoluta***.

حشره‌کش	Slope ± SE	LT_{50} (ساعت)	حدود اطمینان ۹۵ درصد		X^2(df=۴)	P-alue
			حد پایین	حد بالا		
B. bassiana	۱/۷۴±۰/۴۳	۳۵/۸۴	۱۴/۰۳	۵۱/۱۹	۰/۳۹	۰/۹۸
M. anisopliae	۲/۸۳±۰/۹۹	۲۹۴/۷۸	۲۰۴/۶۵	۱۸۴۸	۱/۵۸	۰/۸۱
B. thuringiensis	۳/۸۷±۰/۶۷	۱۳۹/۱۹	۱۲۵/۶۸	۱۵۹/۷۴	۴/۳۶	۰/۳۶
B. bassiana+ M. anisopliae	۱/۳۴±۰/۵۶	۲۸/۲۵	۰/۱۲	۵۱/۶	۰/۹۷	۰/۹۱
B. bassiana+ B. thuringiensis	۳/۷۲±۱/۰۳	۲۰۹/۰۰	۱۶۹/۴۵	۳۷۹/۶۸	۳/۸۴	۰/۴۳
M. anisopliae+ B. thuringiensis	۲/۴۱±۰/۷۶	۲۴۳/۸۲	۱۸۰/۶۶	۷۵۸/۷۸	۲/۴۰	۰/۶۶
B. bassiana+ M. anisopliae+ B. thuringiensis	۷/۴۱±۱/۰۶	۱۲۰/۲۰	۱۰۹/۸۴	۱۳۰/۳۲	۷/۵۴	۰/۱۱

بحث

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، جدایه IRAN 1018C قارچ *M. anisopliae* تاثیر کمی در کنترل لاروهای *T. absoluta* داشت به نحوی که پس از گذشت هفت روز از زمان در معرض قراردهی، فقط ۲۴ درصد مرگ و میر در لاروهای آفت مشاهده شد (جدول ۳). با این حال، بعضی از محققین تاثیر خوب این قارچ در کنترل مراحل لاروی و شفیرگی شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی را گزارش نموده‌اند (اینانلی و همکاران ۲۰۱۲، کانتریرس و همکاران ۲۰۱۴). این اختلاف در نتایج می‌تواند به دلیل تفاوت در جدایه قارچی باشد. در واقع، حتی یک جدایه از منابع مختلف می تواند در تولید توکسین و شدت بیماریزایی متفاوت بوده و بنابراین نتایج مختلفی بدست آید (تی لاک و همکاران ۲۰۰۴، کنان و همکاران ۲۰۰۸، ماکاکا ۲۰۰۸). سرعت از بین بردن حشره توسط قارچ نیز متغیر بوده و ویژگی تخصیص میزبانی بین گونه‌های قارچ و حتی در میان جدایه‌های یک گونه متفاوت است (پل و همکاران ۲۰۰۱). در مطالعه‌ی دیگری، کارایی سه عامل میکروبی شامل قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* و باکتری *B. thuringiensis* در کنترل شب-پره‌ی مینوز گوجه فرنگی *T. absoluta* مورد بررسی قرار گرفت که بر اساس نتایج این تحقیق آزمایشگاهی، قارچ-های *B. bassiana* و *M. anisopliae* نسبت به باکتری *B. thuringiensis* در کنترل لاروهای *T. absoluta* موثرتر بوده و تاثیر خوبی علیه هر دو مرحله‌ی تخم و لارو نئونات (لاروهای تازه تفریخ شده) آفت نشان دادند و باکتری *B. thuringiensis* تاثیر متوسطی روی مرحله نئونات و لاروهای سن سوم آفت داشت (شالابی و همکاران ۲۰۱۳). با این حال، حساسیت بالای لاروهای *T. absoluta* به توکسین‌های *B. thuringiensis* نیز گزارش

شده است (گنزالز کبریرا و همکاران ۲۰۱۱). در مطالعه‌ی حاضر، باکتری *B. thuringiensis* حدود ۶۵ درصد مرگ و میر در لاروهای آفت پس از هفت روز ایجاد نمود که اگرچه از مرگ و میر ایجاد شده توسط قارچ *B. bassiana* کمتر بود، ولی از نظر آماری تفاوت آنها معنی-داری نبود (جدول ۳). با این حال، مقدار LT_{50} برای *B. bassiana* به طور مشخص پایین‌تر از باکتری *B. thuringiensis* بود (جدول ۴). وقتی اسپورهای قارچ *B. bassiana* با کوتیکول حشره تماس برقرار می کنند قارچ از طریق تماسی به کوتیکول نفوذ کرده و بیماریزایی قارچی عمدتا با ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی کوتیکول آغاز می‌شود (رایت و رموس ۲۰۰۲، خان و همکاران ۲۰۱۲) در حالیکه بیمارگرهای باکتریایی از نوع تماسی نیستند و باید توسط حشره میزبان بلعیده شوند تا تاثیر بگذارند (براوو و همکاران ۲۰۰۷).

قارچ‌ها و باکتری‌های بیماریزای حشرات برای استفاده در برنامه های مدیریت تلفیقی آفات (IPM) بسیار مطلوب هستند، زیرا استفاده از آنها نسبتا ایمن بوده و دارای طیف فعالیت محدودتری نسبت به حشره‌کش‌های شیمیایی هستند. موجودات زنده میکروسکوپی مانند قارچ *B. bassiana* از طریق رابطه‌ی پویای خود با حشرات، در برنامه های IPM پایدار می‌باشند. این موضوع موجب افزایش کارایی کنترل، کاهش مقدار حشره‌کش مورد نیاز و به حداقل رساندن خطرات ناشی از آلودگی های زیست محیطی و ایجاد مقاومت به آفات می‌گردد. از طرف دیگر، این عوامل برای استفاده به عنوان حشره‌کش‌های زیستی مناسب به نظر می رسند چرا که دارای دامنه میزبانی نسبتا محدودتری بوده و بر تنوع زیستی یا دشمنان طبیعی اثر منفی ندارند (بات و همکاران ۲۰۰۱). یکی دیگر از مزایای مهم استفاده از بیمارگرهای حشرات در برنامه‌های IPM نسبت به آفت‌کش‌های شیمیایی، پتانسیل آنها برای تکثیر و افزایش جمعیت پاتوژن است (فوکسا ۱۹۸۷).

به طور خلاصه، نتایج این مطالعه آزمایشگاهی نشان داد که قارچ *B. bassiana* و باکتری *B. thuringiensis* قادرند به طور موثر *T. absoluta* را کنترل کنند. بنابراین، طراحی برنامه‌های کنترل بر اساس این عوامل بیماریزا که بطور موفقیت آمیز آفت را کنترل کرده و در عین حال، اثرات منفی ناچیزی روی موجودات غیر هدف و محیط زیست دارند، امکان‌پذیر است. بعلاوه، تلفیق این تکنولوژی با دیگر عوامل کنترل زیستی مانند سن‌های شکارگر یا پارازیتوئیدها، می‌تواند استفاده از مواد شیمیایی را کاهش داده و در نتیجه بقایای این مواد روی محصول را کاهش داده و به تولید محصول سالم‌تر با کیفیت بهتر منجر شود. نتایج حاصله در این تحقیق می‌تواند راه‌گشای تلاش‌های بیشتر به سوی کاربرد عملی قارچ‌ها و باکتری‌های بیماریزای بومی ایران به عنوان عوامل کنترل زیستی شب-پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی باشد. لذا پیشنهاد می‌شود سایر ایزوله‌های قارچ و باکتری بیماریزای بومی نیز در وحله اول در شرایط آزمایشگاهی روی این آفت آزمایش شوند و پس از انجام مطالعات تکمیلی در شرایط مزرعه، به صورت انبوه تولید شده و در قالب مبارزه تلفیقی در کنار سموم شیمیایی علیه آفت بکار برده شوند. هر چند نمی-توان این عوامل را کاملا جایگزین سموم شیمیایی نمود ولی می‌توان تعداد دفعات سمپاشی را کم کرد یا اسپورهای بیمارگر را مخلوط با سموم شیمیایی بکار برد. همچنین انجام مطالعات تکمیلی در مورد فرموله کردن و بهبود روش‌های کاربرد این عوامل زیستی مورد نیاز است.

سپاسگزاری

نگارندگان از پارک علم و فناوری خلیج فارس (استان بوشهر) به خاطر تامین اعتبار لازم جهت اجرای این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

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

Al-Deghairi MA, 2008. Bioassay evaluation of the entomophatogenic fungi *Beauveria bassiana* Vuellemin against eggs and nymphs of *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera:Aleyrodidae). Pakistan Journal of Biological Sciences 11(12): 1551-1560.

Baniameri V and Cheraghian A, 2011. The current status of *Tuta absoluta* in Iran. Pp 16-18. International Symposium on Management of *Tuta absoluta* (tomato leafminer), Agadir, Morocco.

Bravo A, Gill SS and Soberon M, 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon 49(4): 423-435.

Butt TM, Jackson CW and Magan N, 2001. Fungi as biocontrol agents: Progress, Problems and Potential. Wallingford, Oxon, CAB International.

Contreras J, Mendoza JE, Martínez-Aguirre MR, Garcia-Vidal L, Izquierdo J and Bielza P, 2014. Efficacy of enthomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal of Economic Entomology 107(1): 121-124.

Desneux N, Decourtye A and Delpuech JM, 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annual Review of Entomology 52: 81–106.

Desneux N, Wajnberg E, Wyckhuys KAG, Burgio G, Arpaia S, Narvaez-Vasquez CA, Gonzalez-Cabrera J, Ruescas DC, Tabone E, Frandon J, Pizzol J, Poncet C, Cabello T and Urbaneja A, 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, history of invasion and prospects for biological control. Journal of Pest Science 83: 197–215.

EPPO, 2005. Data sheets on quarantine pests, *Tuta absoluta*. OEPP/EPPO Bulletin 35: 434-435.

EPPO, 2010. Archives of the EPPO Reporting Service. Available at:

http://archives.eppo.org/EPPOReporting/Reporting_Archives.htm. Accessed 11February 2010.

Feitelson JS, Payne J and Kim L, 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. Biotechnology 10: 271-275.

Fuxa JR, 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. Annual Review of Entomology 32: 225-251.

Germain JF, Lacordaire AI, Concquempot C, Ramel JM and Oudard E, 2009. Un nouveau ravageur de la tomate en France: *Tuta absoluta*. PHM-Revue Horticole 512: 37 – 41.

Giustolin TA, Vendramim JD, Alves SB, Vieira SA and Pereira RM, 2001. Susceptibility of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae) reared on two species of *Lycopersicon* to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Journal of Applied Entomology 125: 551–556.

González-Cabrera J, Mollá O, Montón H and Urbaneja A, 2011. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae). BioControl 56(1): 71-80.

Huang Z, Guan C and Guan X, 2004. Cloning, characterization and expression of a new cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* WB9. Biotechnology Letters 26: 1557–1561.

Inanli C, Yoldaş Z and Birgücü AK, 2012. Effects of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Bals.) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) on larvae and egg stages of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 49(3): 239-242.

Kannan SK, Murugan K, Naresh Kumar A, Ramasubramanian N and Mathiazhagan P, 2008. Adulticidal effect of fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* on malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). African Journal of Biotechnology 7(6): 838-841.

Khan S, Guo L, Maimaiti Y, Mijit M and Qiu D, 2012. Entomopathogenic fungi as microbial agent. Molecular Plant Breeding 3(7): 63-79.

Landgren O, Kyle RA, Hoppin JA, Beane Freeman LE, Cerhan JR, Katzmann JA, Rajkumar SV and Alavanja MC, 2009. Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study. Blood 113: 6386–6391.

Lietti MMM, Botto E and Alzogaray RA, 2005. Insecticide resistance in Argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Neotropical Entomology 34(1): 113-119.

Makaka C, 2008. The efficacy of two isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschin) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the adults of the black maize beetle *Heteronychus licas* Klug (Coleoptera: Scarabidae) under laboratory conditions. African Journal of Agricultural Research 3(4): 259-265.

Marta Rodríguez S, Marcos Gerding P and Andrés France I, 2006. Entomopathogenic fungi isolates selection for egg control of tomato moth, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) eggs. Agricultura Técnica (Chile) 66 (2): 151-158.

Niedmann LL and Meza-Basso L, 2006. Evaluacio´n de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de manejo integrado de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. Agricultura Tecnica 66: 235–246.

Pell JK, Eilenberg J, Hajek AE and Steinkraus DC, 2001. Biology, ecology and pest management potential of entomophthorales. Pp. 71-154 In: Butt TM, Jackson CW and Magan N (eds.), Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK.

SAS Institute, 2003. The SAS system for Windows, Release 9.0. SAS, Institute, Cary, NC.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler D and Dean D, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 775–806.

Shalaby HH, Faragalla FH, El-Saadany HM and Ibrahim AA, 2013. Efficacy of three entomopathogenic agents for control the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Natural Science 11(7): 63-72.

Siqueira HA, Guedes RN and Picanço MC, 2000. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae). Agricultural and Forest Entomology 2: 147-153.

Siqueira HA, Guedes RN, Fragoso DB and Magalhães LC, 2001. Abamectin resistance and synergism in brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). International Journal of Pest Management 47: 247-251.

Thi Loc N, Bich Chi VT, Nhan NT, Thanh ND, Be Hong TT and Hung PQ, 2004. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* against coconut beetle, *Brontispa longissima*. Omonrice 12: 85-91.

Theoduloz C, Vega A, Salazar M, Gonza´lez E and Meza-Basso L, 2003. Expression of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin cry1Ab gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mills). Journal of Applied Microbiology 94: 375–381.

Wright SP and Ramos ME, 2002. Application parameters affecting field efficacy of *Beauveria bassiana* foliar treatments against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. Biological Control 23: 164–178.

Biological Control of Tomato Leafminer Moth, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) Using Entomopathogenic Fungi and Bacteri

Fariba Sohrabi[*1] and Fatemeh Jamali[1]

[1]Assistant Professors, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.

*Corresponding Author: fsohrabi@pgu.ac.ir; f.sohrabi1361@gmail.com.

Received:28 August 2016 Accepted: 10 October 2017

Abstract

Tuta absoluta (Meyrick) is one of the most important pests of tomato crops in Iran. In this study, the pathogenecity of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* isolate Iran 1395C and *Metarhizium asisopliae* isolate Iran 1018C and a commercial formulation of *Bacillus thuringiensis* was evaluated against 2nd instar larvae of this pest. The experiments were performed by leaf dipping bioassay method at 25 ± 1°C and 70 ± 5% R.H. under laboratory conditions. The results showed that *B. bassiana* alone and in combination with *M. anisopliae*, caused more than 80% mortality in *T. absoluta* larvae seven days after treatment. The lowest LT_{50}, 35.84 and 28.25 h, was observed in these two treatments, respectively. The mortality rate for *B. thuringiensis* was about 65%, seven days after treatment. There was no significant difference between mortality caused by *B. tharingiensis* and *B. bassiana*. However, *M. asisopliae* isolate Iran 1018C showed significantly lower effect than *B. bassiana* Iran 1395C and *B. thuringiensis* against *T. absoluta* larvae.

Keywords: Tomato leafminer, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium asisopliae*.