آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۱، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۲

اثر دما در جوانه‌زنی، رشد شعاعی میسلیوم 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[۳]

۱- مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، ۲- دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ۳- موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران

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

چکیده

اثر طیف دمایی ۳۸۰۳ درجه سانتی‌گراد در جوانه‌زنی، رشد میسلیومی 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 میسلیوم و فعالیت بیماری‌زایی برای همهٔ جدایه‌ها از ۲۰ تا ۳۰°C lahini an. از نظر صفات مذکور به جز در دمای بهینه (۳۰-۲۵°C) در سایر دماها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. جوانه‌زنی اسپورها در دمای۵، ۱۰، ۱۵ و ۳۵°C برای همهٔ جدایه‌ها عموماً در سطح پائین بود در دمای۳ و۳۸°C هیچگونه جوانه‌زنی اسپورها برای جدایه‌های مختلف مشاهده شد. پائین‌ترین سرعت رشد

[۱] این مقاله براساس نتایج پایان‌نامه دورهٔ دکتری نگارنده اول ارایه گردیده است.

میسلیومی در ۵ ،۱۰ و ۳۵°C برای جدایه‌های قارچی صورت گرفت. میانگین میزان رشد رویشی بر حسب روز برای جدایه‌های Mcb1 ، Mcb11 و Mcb18 در ۲۰ ، ۲۵ و۳۰°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 دراثر 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 bassianna*، 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 شیمیائی تنها حربه برای کنترل کرم ساقه‌خوار نواری برنج محسوب می‌شدند. با گذشت زمان و بکارگیری روش‌های مختلف مدیریتی در قالب برنامه‌های IPM (روش‌های زراعی، اگروتکنیکی، 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 میکروارگانیسم‌های 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 N'Doye (1976) 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 ۵۱/۴۷ تا ۶۵/۲ درصد آلودگی را داشته‌اند، همچنین او اظهار می‌دارد که مرگ و میر لاروها با افزایش سن لاروی و یا 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 10^8 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) کارآیی 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 تری‌کلرفون (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 اروپایی ذرت، *Ostrinia nubilalis* (Hubner) در مزارع ذرت تکزاس در قالب برنامه IPM آلودگی لاروهای این آفت تا ۲۷/۸ درصد گزارش شده است (Gagne and Jaronski, 1998).

استفاده طولانی از سموم شیمیائی برای کنترل کرم ساقه‌خوار نواری برنج ضرورت استفاده از روش‌های نوین مبارزه بخصوص مبارزه 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 استفاده کنندگان (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 آب‌شوئی 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 تفریخ در اطاقک رشد(Growth chember) در دمای °C (۱ ± ۲۵) قرار داده شدند. در دمای فوق بعد از ۵ تا ٦ روز تخم‌ها به مرحله سرسیاه(Black head) رسیدند. در این زمان با مرطوب کردن دسته‌های تخم، تخم‌ها تفریخ شده و لاروهای نئونات خارج شدند. در این مرحله رطوبت یکی از فاکتورهای مهم برای تفریخ تخم‌های ساقه‌خوار نواری برنج می‌باشد. لاروهای نئونات بعد از خروج به داخل ظروف پلاستیکی استوانه‌ای شفاف به ابعاد ۱۵ × ۱۵ × ۲۵ 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°C (۱±۲٤) و رطوبت ۵±۷۰ درصد در شرایط ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اطاقک رشد صورت گرفت. در این بررسی مشخص شد ساقه‌خوار نواری برنج دارای ٦ 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 وارسی ۲٤۰۰ 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	تاریخ جداسازی	جدایه
Sampling site	**Date of isolation**	**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 ۱٤-۱۲ روزه) سطح محیط کشت SDAY (Sabouraud Dextrose Agar Yeast Extract) بوسیله سوزن انتقال خراش داده شد و در

داخل ارلن‌های جداگانه که شامل 10^{cc} آب مقطر استریل با محلول Tween 80 ۰/۰۲درصد جمع‌آوری شد. اسپورها به منظور پراکنده شدن یکنواخت در داخل محلول فوق به مدت ۵ 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، باکتوپپتون 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 ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱°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 ۰/۵ 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 پارافیلم 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. ۲٤ ساعت پس از تلقیح، یک میلی‌لیتر فرمالدئید۰/۵ درصد به منظور توقف جوانه‌زنی اسپورها به داخل هر تشتک پتری ریخته شد. درصد جوانی‌زنی با شمارش ۱۰۰ اسپور از هر پتری با بزرگنمایی X٤٠ (روش Lane *et al.*, 1991) محاسبه شد. هر تیمار با ٤ تکرار انجام شد.

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

برای تهیه توده میسلیومی 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 میسلیومی در داخل انکوباتور در دمای °C (۱±۲۵) به مدت ۳ روز در شرایط کاملاً تاریک قرار داده شدند. بعد از تشکیل پرگنه، حلقه‌هایی به قطر ۸

---

[۲۰] Haemocytometer

میلی‌لیتر از سطح SDA برداشته شد(Rapilly, 1968). هر حلقه در مرکز تشتک‌های پتری حاوی SDA تازه قرار داده شد. سپس درب پتری‌ها با پارافیلم 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 ٤ تکرار برای هر تیمار انجام شد.

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

ده میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچی با غلظت 1×10^{7} کنیدی در میلی‌لیتر از هر جدایه درون تشتک پتری ریخته، لاروهای سن پنجم ساقه‌خوار نواری برنج به مدت ٦٠ -٥٠ 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 دورهٔ ٤ 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 ضدعفونی 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 ٤ تکرار با تعداد ۱۰ لارو سن پنجم ساقه‌خوار نواری برنج برای هر تیمار (جدایه قارچی) انجام شد. در تیمارهای شاهد، لاروهای سن پنجم ساقه‌خوار نواری برنج در محلول Tween 80 ۰/۰۲ درصد به مدت ٦٠-٥٠ 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 قارچی بود. تغییر و تبدیل داده‌ها برای درصد جوانه‌زنی، درصد مرگ و میر و درصد اسپورزایی روی لاروهای مرده بوسیله sqr [Arcsin ($^{X}/_{100}$)] و رشد شعاعی میسلیوم 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.

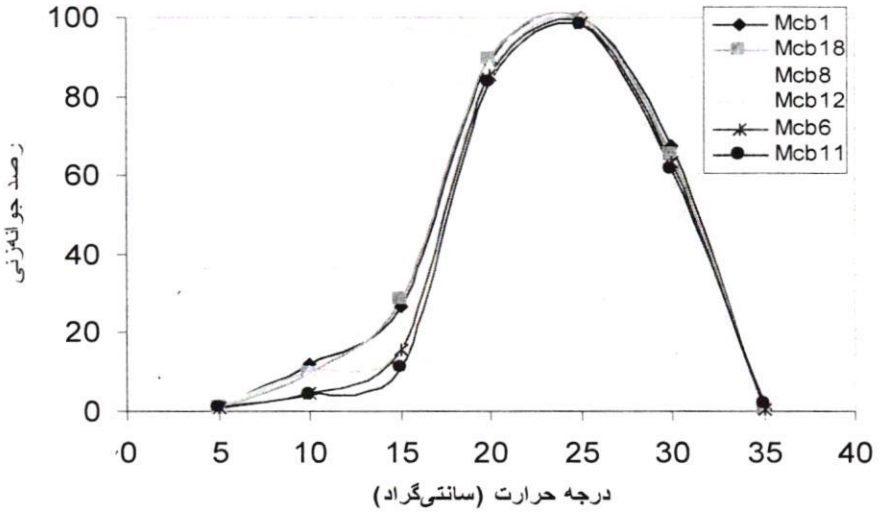
نتیجه و بحث

- 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 همهٔ دماها به استثنای ۳ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. کمینه دما برای جوانه‌زنی همه جدایه‌ها°C۵، بهینه دما °C ۲۵ و بیشینه دما °C ۳۵ 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 °C۲۵ 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°C ۳۵ 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 °C۲۰ پائین بوده است. اما در همین جدایه با افزایش دما، جوانه‌زنی اسپورها نیز افزایش یافته و در دمای °C ۳۵ 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 °C ۳۵ هیچگونه فعالیت جوانه‌زنی نداشت. این جدایه در دمای ۵ و °C۱۰ بیشترین فعالیت جوانه‌زنی و در دمای °C ۳۰ نسبت به دیگر جدایه‌ها کمترین درصد جوانه‌زنی را به خود اختصاص داد. جدایه M cb8 مربوط به شهرستان هشتپر 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 جوانه‌زنی جدایه‌های 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

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

* 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 Arcsin (sqr($x/_{100}$)) است، اما مقادیر موجود در جدول درصد واقعی جوانه‌زنی قارچ بووریا در محیط کشت SDA را نشان می‌دهد.

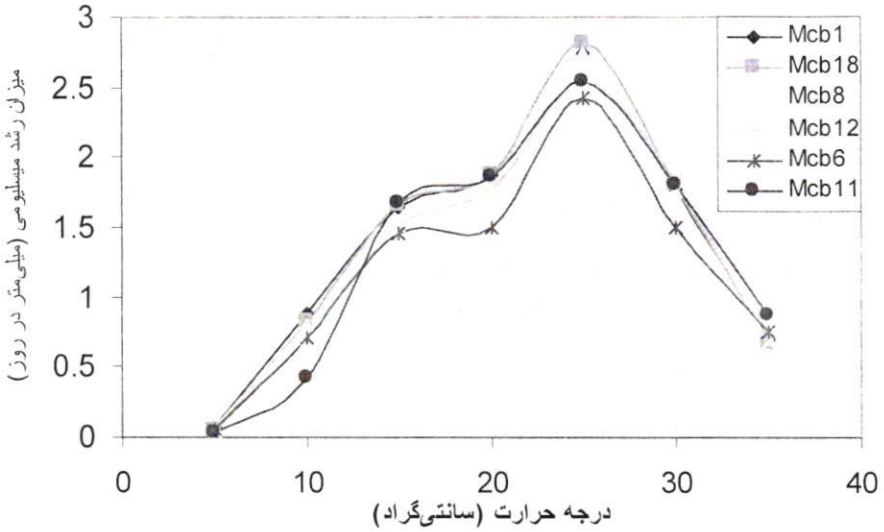
a=Sd، انحراف معیار بین میانگین‌ها می‌باشد.

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 besed on Arcsin (sqr($x/_{100}$)), but is showed values represent actual germination percentage on SDA.

a= Values means ± standar deviation

- اثر دما در رشد شعاعی میسلیومی جدایه‌های قارچی

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



شکل ۲، اثر دما روی رشدمیسلیومی‌شش‌جدایه قارچ *Beauveria bassiana* درمحیط کشت SDA

Fig. 2, Effect of temperature on mycelial growth of six isolates of *Beauveria bassiana* on SDA medium.

اختلاف معنی‌داری بین همه جدایه‌های قارچی و در تمام دماها بجزء جدایه‌های قارچی Mcb1 و Mcb18 مشاهده گردید. میانگین میزان رشد شعاعی میسلیوم 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 میسلیومی 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 میسلیومی در محیط کشت SDA در مقایسه با سایر جدایه‌ها مربوط به جدایه Mcb12 و در دمای ۲۰ و ۳۰ درجه سانتی گراد بود. حداکثر و حداقل میزان رشد رویشی در دمای ۲۵°C مربوط به جدایه‌های Mcb18 و Mcb6 به ترتیب با ۲/۸۱ و ۲/۴۳میلی‌متر در روز بود (جدول ۳).

رشد شعاعی میسلیومی همه جدایه‌های قارچی طبق جدول (۳) به جز دمای ۳ و ۳۸ مشاهده گردید. رشد شعاعی میسلیومی جدایه Mcb11 در دمای ۵ و ۱۰ °C نسبت به سایر جدایه‌ها کمتر بود. اما رشد میسلیومی این جدایه در محیط کشت SDA با افزایش دما افزایش یافت. جدایه Mcb8 در دمای ۳۵ °C کمترین فعالیت رشد میسلیومی را از خود نشان داد که این موضوع احتمالاً به منشأ جدایه قارچ مربوط می‌گردد. میانگین میزان رشد میسلیومی جدایه از ۰/۰۳ تا ۰/۸۸ میلی‌متر در روز در دمای ۵، ۱۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۳-۱ 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 میسلیومی جدایه‌های مختلف قارچ *Beauveria bassiana* روی محیط کشت SDA در دماهای مختلف

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

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

* 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 Log(x+1) ست، اما مقادیر موجود در جدول میزان رشد میسلیومی واقعی را در محیط کشت SDA نشان می‌هد.

* 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 besed on Arcsin ($sqr(x/_{100})$), but is showed values represent actual mycelial growth on SDA.

a= Values means ± standar deviation

حشرات را °C ۲۵ گزارش کرده‌اند. با توجه بـه نتـایج بدسـت آمـده جدایـه Mcb1 و Mcb18 بیشترین سرعت رشد میسلیومی را در دمای ۲۰ تا °C ۲۵ از خود نشان دادند.

Fargues *et al.* (1992) اظهار می‌دارند که جدایه‌های قارچی با منشأ منـاطق گرمسـیری تحمل گرمایی بیشتری از جدایه‌های با آب و هوای معتدله را دارا هستند. این موضوع در مـورد جدایه Mcb11 و Mcb12 به ترتیب با رشد میسـلیومی ۱/۸۱ و ۱/۸۳ میلی‌مـتر در روز در دمـای °C ۳۰ صادق است.Ferron (1977) دمای مناسب برای رشد قارچ *B. bassiana* را ۲۳ تـا °C ۲۵ گزارش کرده است.Hussey and Tinsley (1981) اظهار داشته‌اند که قارچ *B. bassiana* را می‌توان در دمای ۸ تا °C۳۰ پرورش داد اما دمای مناسب برای رشد میسلیومی ایـن قـارچ را ٢٤ درجـه سانتی‌گراد عنوان کرده‌اند.

-اثر دما در بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی روی لارو سن پنجم ساقه‌خوارنواری برنج

جدایه‌های قارچی در مرگ و میر لاروها در دماهای مختلف اختـلاف معنـی‌داری در سطح احتمال ۱٪ از خود نشان دادند. اختلاف معنی‌دار در مرگ و میر لاروها برای جدایـه‌ها از ۳ تا°C۳۰ مشاهده گردید.

فعالیت جدایه‌های قارچی Mcb1 و Mcb6 و Mcb18 از ۱۰ تا °C ۳۰ در مـرگ و مـیر لاروها بیشتر از دیگر جدایه‌ها بوده است. مرگ و میر بالای لاروها در بین جدایه‌های قـارچـی در دمای ۳۵ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد احتمالاً مربوط به افزایش دما بوده است. کمینـه دمـا بـرای مرگ و میر لاروها توسط جدایه‌های قارچی °C ۳ ، بهینه دما ۲۰ تا °C ۲۵ و بیشینه دما °C ۳۰ بود (جدول ٤).

با توجه به درصد مرگ و میر لاروها در دماهای مختلف مشخص گردید اسـپورزایی جدایه‌های مختلف روی لاروهای مرده در دمای °C ۲۵ تفاوت معنی‌داری نـدارد. اسـپورزایی جدایه‌ها روی لاروهای مرده در دمای ۳، ۵ و °C ۳۸ انجام نگرفت. بنـابراین کمینـه دمـا بـرای فعالیت قارچ و اسپورزایی روی لاروهای ساقه‌خوار نواری برنج °C ۱۰، بهینه برای اسـپورزایی روی لاروهای مرده برای همه جدایه‌ها °C ۲۵ و بیشینه دما برای فعـالیت اسـپورزایی جدایـه‌ها روی لاروهای مرده °C ۳۰ بود.

روی لاروهای مرده برای همه جدایه‌ها ۲۵ °C و بیشینه دما برای فعـالیت اسـپورزایی جدایـه‌ها روی لاروهای مرده ۳۰ °C بود.

جدول ٤، اثـر دمـا در بیمـاری‌زایی جدایـه‌های مختلـف *Beauveria bassiana* روی لاروهـای ساقه‌خوار نواری برنج

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

جدایه	* 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
Mcb1	100±0.0a	100±0.0a	100±0.0a	100±0.0a	87.5±0.83a	5±0.71c	5±0.71b
Mcb18	100±0.0a	100±0.0a	100±0.0a	100±0.0a	87.5±0.83a	7.5±0.83b	7.5±0.83a
Mcb8	95±0.71a	100±0.0a	100±0.0a	92.5±0.83b	87.5±0.83a	10±0.0a	5±0.71b
Mcb12	97.5±0.49a	100±0.0a	100±0.0a	100±0.0a	82.5±0.83a	7.5±0.83b	5±0.71b
Mcb6	90±0.0b	100±0.0a	100±0.0a	97.5±0.43a	85±0.44a	7.5±0.83b	7.5±0.93a
Mcb11	85±1.12b	100±0.0a	100±0.0a	95±0.44a	82.5±1.79a	7.5±0.83b	5±0.71b
Check	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

* میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمـال P<%5 بـر مبنـای آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می‌باشد. مقادیر میانگین بر اساس تغییـر و تبدیـل داده‌هـا(Arcsin(sqr(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 Arcsin (sqr(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 اسـپورزایی در دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵ ، ۳۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دیگـر جدایـه‌ها بودنـد. همـهٔ جدایـه‌های قارچی بیشترین فعالیت اسپورزایی روی لاروهای مرده را از دمای ۱۰ تا ۳۰ °C از خود نشـان دادند(جدول ۵). نتایج حاصل ار بررسی‌ها نشان داد لاروهایی کـه در دماهـای ۳ و ۵ °C مـرده بودند، وقتی در دمای ۲۵ °C در انکوباتور قرار گرفتند، رشد میسلیوم و اسـپورزایی روی آن‌هـا انجام گردید. بنابراین در دماهای پائین‌تر از ۱۰ °C، قارچ قادر به اسپورزایی روی لاروها نبـوده 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 همهٔ 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 strians of *Beauveria bassiana* on dead larvae of *Chilo suppressalis*

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

* میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال P<%5 بر مبنای آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می‌باشد. مقادیر میانگین بر اساس تغییر و تبدیل داده‌ها($Arcsin(sqr(x/_{100}))$) 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 Arcsin ($sqr(x/_{100})$), but values represent is showed actual percentage sporulation on dead larvae.

a= values means ± Standard deviation

قارچ Mcb18 با میانگین ۵/۳۵ روز کمترین LT50 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 ٦).

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 ۳، ۵ و ۳۸ °C روی لاروهای مرده ساقه‌خوار نواری برنج صورت نگرفت (جدول ۵). توسعه بیماری در ۳ و

۵ درجه سانتی‌گراد به پائین‌ترین حد خود رسید. Ferron (1978) بیان می‌کند که دماهای پائین‌تر از اپتیمم رشد و نمو قارچ را بدون اینکه به مجموع مرگ و میر حشره اثر داشته باشد کند می‌کند. مرگ و میر لاروهای ساقه‌خوار نواری آلوده به جدایه‌های قارچ *B. bassiana* با افزایش دما، افزایش یافت. اما دردمای ۳۵ و ۳۸ °C صرفاً افزایش دما موجب‌مرگ و میر لاروها گردید.

جدول ٦، مقایسه میانگین مدت زمان ۵۰ درصد مرگ و میر لاروها توسط جدایه‌های مختلف *Beauveria bassiana*

Table 6, Mean Comparison of LT_{50} of different isolates of *Beauveria bassiana*

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

* 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 براساس Log (x+1) است.

Sd=a ، انحراف استاندارد بین میانگین‌ها می‌باشد.

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

Pathak (1975) اظهار می‌دارد که لاروهای ساقه‌خوار نواری برنج در دمای بالا و در طبیعت زنده نمی‌مانند. دمای ۲۰ و ۲۵ °C برای رشد اکثر جدایه‌ها بخصوص جدایه Mcb1 و Mcb18 روی لاروهای ساقه‌خوار نواری برنج مناسب بوده است. بررسی‌های Luz and Fargues (1998) نشان دادند که طیف دمایی برای تولید کنیدی قارچ *B. bassiana* روی سن خونخوار *Rhodnius prolixus* ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد بوده است. اما در دمای ۲۸ تا ۳۰ °C فعالیت کنیدی‌ها کاهش یافته و در دمای ۳۵ °C اسپورزایی کاملاً متوقف گردید. اسپورزایی جدایه‌های قارچی در محیط کشت SDA و روی لاروهای مرده ساقه‌خوار نواری برنج از دمای ۱۰ تا ۳۰ °C اتفاق افتاد. در دمای ۱۰°C جدایه قارچی Mcb8 (جدایه هشتپر) کمترین LT50 با ۱۲/۸۳ روز را به

می‌یابد آلودگی نیز زیاد می‌شود.(1991) Alghli دمای اپتیمم برای جوانه‌زنی، رشد میسلیومی 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 کارآیی خوبی برخوردار هستند. از میان ٦ 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.