نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران: ۲۱، (۱)، ۱۳۸۰

بررسی اثر *Bacillus thuringiensis* Ber. روی لاروهای *Ostrinia nubilalis* Hub. (Lep.: Pyralidae)

حسن عسکری[۱]، عزیز خرازی پاکدل[۲] و سید ابراهیم صادقی[۱]

چکیده

کرم ساقه خوار اروپایی ذرت زیر گونه‌ی Persica به عنوان آفتی چند خوار بـه بسـیاری از گیاهان زراعی نظیر ذرت، پنبه، برنج، نهالـهای صنوبـر و بیـد خسـارت می‌زنـد. بـرای زیسـت سنجی اثر هاگ و کریستال‌های سمی *B. thuringiensis* در جهت تعیین عامل کنترل بیولـوژیـک برای این آفت، پرورش آزمایشگاهی روی غذای مصنوعی صورت گرفت. لاروهای سن اول با غلظتهای مختلفی از دو واریته باکتری به نامهای Thuringiensis و Kurstaki تغذیه شـد و نتـایج زیست سنجی با اثر فرآورده‌ی تجارتی Dipel® مقایسه گردید. غلظتهای مختلف از ترکیب هـاگ و سم باکتری به غذای مصنوعی اضافه شد. پس از آغاز تغذیه‌ی لاروها، مرگ و میر آنها تـا ۷۲ ساعت شمارش و تا محاسبه ۵۰ درصد مرگ و میر در جمعیت (Lc50) ادامه یافت. نتایج نشان داد که واریته کورستاکی (پی‌پی‌ام ٤٢٠/٨ = Lc50) اثر کشـندگـی مشـابهی نسـبت بـه فـراورده تجارتی دایپل (پی پی ام ٤١٤/٢ = Lc50) دارد و هـر دو بـه طـور معنـی داری اثـر کشـندگـی بیشتری نسبت به واریته‌ی تورنژینسیس (پی پی ام ۳۸۹۲/۷ = Lc50) نشان دادند.

آزمایش دوم برای تعیین زمان موثر برای دریافت دز کشنده باکتری انجـام شـد. لاروهـای سن دوم از هاگ و سم باکتری با غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام از واریته کورستاکی تغذیه شـده بودنـد

۱- مؤسسه‌ی تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران .صندوق پستی ۱۱٦-۱۳۱۸۵، ایران.

۲- دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تهران، ایران.

این مقاله در تاریخ ۸۰/٤/۱۰ دریافت و چاپ آن در تاریخ ۸۰/۵/۱۳ به تصویب نهایی رسید.

که ۱۷/۲، ۵۰ و ۸۲ درصد از آنها به ترتیب بعد از ۲، ۱۰/۸ و ۷۲ ساعت تلف شدند.

آزمایش سوم برای تعیین حساسیت سنین مختلف حشره که از غلظت ثابت ۵۰۰ پی‌پی‌ام باکتری واریته کورستاکی تغذیه کرده بودند، انجام شد. نتایج نشان داد که سن اول حشره به طور معنی داری نسبت به سن سوم حساستر است. همچنین سن پنجم نسبت به سنین دیگر از حساسیت کمتری برخوردار بود (α= ۵ %).

واژگان کلیدی: *Bacillus thuringiensis*، *Ostrinia nubilalis* ، زیست سنجی، ذرت.

مقدمه

کرم ساقه خوار اروپایی ذرت حشره‌ای چند چیزخوار[1] است که به بسیاری از گیاهان ساقه ضخیم خسارت میزند. این حشره در درجه اول جزء آفات مهم ذرت محسوب می‌گردد. در شمال ایران علاوه بر ذرت به برنج، کنف، ساقه‌های جوان صنوبر در نهالستانها و در سایر نقاط ایران به پنبه، نیشکر و بیدّ خسارت وارد می‌آورد (٤، ٧ و ٩). خسارت آفت روی ذرت، در ابتدا روی برگها بوده و سپس با افزایش سن لارو و رشد جمعیت به ساقه‌ها و سایر اندامهای گیاه نیز حمله می‌کند (٩).

B. thuringiensis با تولید کریستالهای سمی و هاگ برای برخی از گونه‌های رآسته پروانه‌ها، دوبالان و سخت بالپوشان مسموم کننده و کشنده می‌باشد (١، ٣، ٦، ٨، ١٢، ١٥ و ٢٢). این عامل کنترل کننده طبیعی آفات، امروزه دارای فراورده‌های مختلفی است که به عنوان جایگزین برای بسیاری از حشره کشهای شیمیایی بکار می‌رود (١٥ و ٢٢). تمام سروتایپهای *B. thuringiensis* تولید هاگ و کریستال سمی می‌نمایند. اما هر کدام از اینها روی بعضی از گونه‌های حشرات فعال می‌باشند . بعضی از زیرگونه‌ها نیز اگزوتوکسین مقاوم به حرارت تولید می‌کنند (١٥ و ٢٤). هیمپل و آنگوس (١٦) لارو پروانه را از نظر حساسیت به *B. thuringiensis* به سه گروه تقسیم کردند. لاروهای گروه ۱ و۲ که توسط کریستال خالص باکتری و لاروهای

۱- Polyphage

گروه ۳ فقط توسط تغذیه از ترکیب هـاگ و کریستال کشته می‌شوند. مارتوره (۱۹) گروه چهارمی از لاروها را که در مقابل بلور سمی مقاومند پیشنهاد نمود. از نظر ژنتیک کریستالهای پروتئینی و دامنه میزبانی نیز بین واریته های مختلف تفاوتهای چشمگیری وجود دارد. در مطالعات ژنتیکی مشخص شده است که جدایه‌هایی که حاوی ژنهای گروه CryI می‌باشند روی لارو پروانه‌ها، گروه CryII روی لارو پروانه‌ها و دوبالان، گروه CryIII روی لارو سخت بالپوشان، گروه CryIV روی لارو دوبالان و گروه CryV روی لارو پروانه‌ها و سخت بالپوشان تاثیر دارند (۱۵). تناسب وجود اسپور و کریستال از نظر بیماریزایی نیز بسیار مهم است. لاروهای کرم ساقه خوار اروپایی ذرت در مقابل مخلوط اسپور و کریستال باکتری به نسبت مساوی حساس‌تر از زمانی هستند که این ترکیب به نسبتهای دیگر مورد تغذیه قرار بگیرد. بیشترین کاربرد از سروتاپیهای باکتری، روی لاروهای ساقه خوار اروپایی ذرت شامل واریته‌های کورستاکی و تورینژینسیس می‌باشد (۱۵، ۱۸ و ۲۱). تحقیقات مک وورتر و همکارانش (۲۱) اثر هر دو باکتری در کنترل لارو ساقه خوار اروپایی ذرت را در مقایسه با محول پاشی با دیازینون و ددت یکسان نشان داد. لینچ و همکارانش (۱۷) با تکنیکهای زیست‌سنجی[۱]، فراورده های تجارتی *B. thuringiensis* به نامهای دایپل[۲] و توریساید اچ. پی. سی[۳] را برای ساقه خوار اروپایی ذرت استاندارد نمود و در مطالعات خود فرمولاسیون گرانول را بهتر تشخیص داد. ناوون و همکاران (۲۶) روش انتخاب واریته های *B. thuringiensis* را بر اساس آزمایش زیست‌سنجی در محیط غذایی مصنوعی روی لاروهای سن ۱ و ۳ گونه‌های *Earias insulana, Heliothis armigera* و *Spodoptera littoralis* پیشنهاد نمود.

در تمام مطالعات مذکور هیچگونه گزارشی مبنی بر اثر باکتری مزبور روی لارو ساقه خوار اروپایی ذرت زیرگونه‌ی Persica که زیستگاه اختصاصی آن در شمال ایران است (۵ و ۲۵) وجود ندارد. لذا با استفاده از روش زیست سنجی اثر دو واریته از باکتری فوق روی لاروهای آفت ارزیابی و با فرآورده تجارتی رایج مقایسه گردید. این اقدام به عنوان اولین

۱-Bioassay

۲-Dipel®

۳-Thuricide HPC®

مرحله در یافتن یک جایگزین بیولوژیک به جای آفتکش شیمیایی برای کنترل آفت محسوب می‌گردد.

مواد و روش‌ها

پرورش لارو: لاروهای ساقه خوار اروپایی ذرت زیرگونه‌ی Persica از مزارع ذرت واقع در شمال ایران (دشت ناز مازندران) جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. نسلهای متوالی از حشره در شرایط کنترل شده آزمایشگاه با دمای ۱ ±۲۵ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۵ ±۷۰ درصد و نور ۱۶ ساعت و تاریکی ۸ ساعت روی محیط غذایی مصنوعی پرورش داده شد. محتویات این غذا بر گرفته از روش پووآتو و همکاران (۲۷) بود که با کمی تغییرات توسط عسکری و همکاران (۵) برای تکثیر انبوه این حشره در آزمایشگاه بکار گرفته شد. برای تشخیص سنین مختلف لاروی و اطمینان از بکارگیری افراد همسن در آزمایشهای زیست‌سنجی از عرض کپسول سر استفاده شد (۱۷). لاروهای همسن بر اساس تاریخ تفریخ تخمها جمع آوری و پس از تفکیک در ظروف آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه باکتری و غلظتهای آن: واریته‌های کورستاکی[1] و تورنژینسیس[2] که در آزمایشگاه تولید شده بودند (بدون فرمولاسیون) از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران و فرآورده تجارتی دایپل با قدرت ۱۷۶۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌گرم و با ۳/۵ درصد ماده‌ی موثره کورستاکی با فرمولاسیون امولسیون استفاده شد.

غلظتهای مختلف باکتری با فواصل لگاریتمی بین حداقل و حداکثر آن که با آزمایش مقدماتی تعیین شده بودند، تهیه و انتخاب گردید (۲ و ۸). غلظتهای وزنی از باکتری مورد نظر با افزودن به مقدار خاصی از وزن ماده‌ی غذای مصنوعی بدون آنتی بیوتیک و با pH = ۶-۷

۱- Kurstaki

۲- Thuringiensis

تهیه گردید. برای تعدیل pH ماده‌ی غذایی از سود نرمال[1] استفاده شد(۲۵). غذای مصنوعی به روش عسکری و همکاران (۵) و پووآتو و همکاران (۲۷) آماده و در اتوکلاو ضدعفونی گردید. زمانیکه دمای غذا به ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد رسید، غلظتهای مختلف باکتری به آن اضافه و با یک همزن الکتریکی بمدت ۳-۲ دقیقه بهم زده شد تا مخلوط کاملاً یکنواخت گردد.

آزمایشهای زیست سنجی: برای کلیه آزمایشها، لاروهای هم سن و هم اندازه از مجموعه ظروف پرورش انتخاب و با یک قلم موی مرطوب به ظرفهای آزمایش منتقل شد. برای رعایت تجانس فیزیولوژیک و رفتاری با لاروهای فعال در طبیعت، برای آزمایشها از لاروهای نسل اول و یا دوم پرورش یافته در آزمایشگاه استفاده شد. برای نمونه گیری از مرگ و میر لاروها مدت زمان در نظر گرفته شده حداکثر ۹۶-۷۲ ساعت بود. بعد از اتمام دوره‌ی تغذیه معیار مرگ برای لاروها سیاه شدن بدن و یا عدم پاسخ به ضربه‌ی سوزن درنظر گرفته شد.

الف) مقایسه واریته‌ها

برای مقایسه اثر واریته‌ها از لاروهای سن یک و به روش تعیین Lc50 استفاده گردید (۱۴ و ۲۰). آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۸ تیمار شامل ۷ غلظت (۵۰، ۱۱۰، ۲۴۷، ۵۴۸، ۱۲۱۷، ۲۷۰۳، ۶۰۰۰ و ۱۳۳۵۰ پی‌پی‌ام) و یک شاهد (غلظت صفر)، هر کدام با ۱۵ لارو و با سه بار تکرار آزمایش انجام گردید. تجزیه‌ی آماری نتایج به کمک تجزیه پروبیت و با استفاده از برنامه SAS (۱۰) انجام شد.

ب) اثر طول زمان تغذیه از باکتری در مرگ و میر لاروها

برای آزمایش از لارو سن ۲ حشره و واریته کورستاکی و با غلظت ثابت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام (غلظتی که در حدود ۸۰-۷۰ درصد مرگ و میر ایجاد می‌کند) در محیط غذای مصنوعی، استفاده شد. لاروها قبل از آزمایش ۳ ساعت در درون ظروف شیشه‌ای بدون تغذیه نگهداری شدند. هدف از این کار ایجاد یکنواختی و سرعت بخشیدن به استقرار لاروها روی محیط غذایی حاوی باکتری بود. آزمایش با ۸ تیمار زمان تغذیه از باکتری (به مدت ۲، ۳/۳، ۵/۴،

۱- NaOH

۹/۱، ۱۵/۳، ۲۵/۵، ٤۳ و ۷۲ ساعت) و یک تیمار شاهد با تغذیه از غذای سالم، هر کدام با ۱۰ لارو و مجموعاً در ۳ تکرار انجام شد. برای محاسبه‌ی فواصل زمانی تغذیه از روش لگاریتمی استفاده گردید. پس از سپری شدن مدت زمان تغذیه از محیط غذایی حاوی باکتری، لاروها به ظرفهای حاوی غذای معمولی منتقل شدند. بطوریکه لاروها مجموعاً ۷۲ ساعت تغذیه کرده و میزان مرگ و میر آنها شمارش و ثبت گردید. تجزیه‌ی آماری نتایج به کمک تجزیه پروبیت و با استفاده از برنامه SAS (۱۰) انجام شد.

ج) میزان حساسیت سنین مختلف لاروی به عامل بیماریزا:

آزمایش با دو متغیر «سن لارو» و «زمان نمونه برداری» بصورت کاملاً تصادفی انجام شد. لاروها بطور همزمان روی محیط غذایی آلوده به باکتری واریته‌ی کورستاکی با غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام (غلظت نزدیک به Lc50) تغذیه شدند. آزمایش شامل سه تیمار سنی لارو شامل سنین ۱، ۳ و ۵، چهار تیمار زمان نمونه برداری در ٢٤، ٤٨، ۷۲ و ۹٦ ساعت هر کدام با ۲۰ لارو و در سه تکرار بود. تجزیه نتایج بصورت فاکتوریل و مقایسه میانگینها به کمک آزمون دانکن و با استفاده از برنامه SAS (۱۰) انجام شد.

نتایج

الف) مقایسه‌ی واریته‌ها به روش زیست سنجی

نتیجه تجزیه اطلاعات مرگ و میر لاروها که ۷۲ ساعت از باکتری تغذیه کرده بودند نشان داد که Lc50 برای واریته‌ی کورستاکی (فراورده‌ی داخلی)، ٤۲۰/۳ میکروگرم و شیب خط آن ۱/٤ می‌باشد (جدول ۱). این نتایج برای فراورده‌ی تجارتی دایپل، ٤۱٤/۲ پی‌پی‌ام و شیب خط آن ۱/٦ بود، در حالیکه غلظت لازم برای ۵۰ درصد کشندگی برای واریته‌ی تورنژینسیس، ۳٦۹۲/۷ پی‌پی‌ام و شیب خط آن ۰/۸ ثبت گردید. غلظت لازم برای ایجاد ۵۰ درصد مرگ و میر در جمعیت میزبان برای واریته‌ی کورستاکی، ۸/۷ برابر کوچکتر از واریته تورنژینسیس و شیب خط آن ۱/۷۵ برابر تندتر از شیب خط واریته اخیر بود (شکل ۱).

ب) اثر طول زمان تغذیه از باکتری در ایجاد مرگ و میر

در این آزمایش مدت زمان لازم برای دریافت دز مؤثر باکتری که بتواند ۵۰ درصد مرگ و میر در لاروهای سن ۲ ایجاد کند محاسبه گردید. نتایج بدست آمده مانند آزمایشهای قبلی تجزیه پروبیت شد (جدول ۲). بر این اساس طول زمانی که لازم است تا لاروهای سن ۲ از محیط غذایی محتوی باکتری تغذیه کرده و ۵۰ درصد مرگ و میر داشته باشند ٦٤٨ دقیقه و یا ۱۰ ساعت و ٤٨ دقیقه بود (شکل ۲). جالب توجه است که پس از دو ساعت تغذیه ۱۷/۲ درصد و پس از ۷۲ ساعت ۸۲ درصد مرگ و میر مشاهده گردید. نتیجه‌ی بدست آمده در ۷۲ ساعت با آنچه که در آزمایش تعیین Lc50 با غلظت همسان پس از ۷۲ ساعت حاصل گردید، تقریباً مطابقت دارد. توجه به شیب ۰/۸ و عدد ثابت ۲/۵ نشان داد که خط دارای شیب ملایم و کمتر از ٤٥ درجه بود. لاروهایی که در طول زمان‌های متفاوت از باکتری تغذیه کرده و پس از ۷۲ ساعت (زمان مساوی برای نمونه‌برداری از تمام لاروها) زنده بودند، با گذشت زمان نسبت به لاروهای شاهد عقب ماندگی رشد داشتند، بطوریکه وقتی لاروهای شاهد به سن سوم رسیده بودند، لاروهای تیمار شده در همان سن ۲ باقی مانده بودند. این مسئله در لاروهایی که زمان بیشتری تغذیه کرده بودند مشهودتر بود ولی چون یک امر کیفی بوده و با معیارهای معمولی قابل سنجش نبود، مدنظر قرار نگرفت.

ج) تعیین حساسیت سنین مختلف لاروی نسبت به باکتری

نتایج بدست آمده از آزمایش بصورت فاکتوریل با دو متغیر «سن» و «زمان نمونه برداری» تجزیه و مقایسه میانگینها به کمک روش دانکن درجدول ۳ درج گردید. میانگین مرگ و میر در سنین لاروی ۱، ۳ و ۵ بترتیب ٤٥/٤، ۳۱/۲ و ۲۰ درصد و مقدار F برای اثر سن ٦۰/۹ و در سطح ۵ و ۱ درصد معنی دار بود. در سطح ۵ درصد هر سه سن با هم اختلاف معنی‌دار داشت در حالیکه در سطح ۱ درصد تنها بین سن ۱ و ۵ اختلاف وجود داشت (شکل ۳، جدول ۳ و ٤).

میانگین مرگ و میر در زمان‌های نمونه برداری ۲٤، ٤٨، ۷۲ و ۹٦ ساعت بترتیب ۹/٤، ۲۸/۳، ٤۰ و ۵۱/۱ درصد بود. مقدار F برای اثر زمان ۸۹/۳ بوده و در سطح ۵ و ۱ درصد

معنی‌دار بود. در سطح ۵ درصد بین تمام زمان‌های نمونه برداری اختلاف معنی‌دار وجود داشت (شکل ۳ جدول ۳ و ٤).

اثر متقابل بین سن لاروی و زمان نمونه‌برداری معنی دار نبود (جدول ۳). در نتیجه تنها به مقایسه بین میانگین تیمارها بطور مستقل از یکدیگر پرداخته و از مقایسه کلیه میانگینهای تیمارها خودداری گردید.

د) برآورد قدرت فراورده‌ها و مقایسه‌ی آنها

محاسبه قدرت فراورده برای مقایسه نمودن آن با فراورده استاندارد و یا تجارتی با استفاده از رابطه زیر انجام گرفت (۱۳). قدرت دایپل × سروتایپ آزمایشی Lc50/ دایپل Lc50 = میزان قدرت سروتایپ آزمایشی بر اساس اطلاعات بدست آمده از آزمایشهای زیست سنجی، قدرت تأثیر واریته کورستاکی و واریته تورنژینسیس روی لارو سن یک میزبان به ترتیب ۱۷۳٤۸/۷ و ۱۹۷٤/۵ واحد بین المللی در میلی گرم بدست آمد. قدرت واریته کورستاکی ۸/۷۸ برابر قدرت واریته تورنژینسیس بود.

بحث

کرم ساقه خوار اروپایی ذرت در شمال ایران شامل جمعیتی می‌باشد که به عنوان یک زیر گونه شناخته شده است. بنابراین تحقیق حاضر با میزبانی انجام شده است که از نظر ویژگیهای زیستی و نیازهای اکولوژیکی با جمعیتهای سایر مناطق متفاوت میباشد. از طرف دیگر، واریته‌ها و یا سروتایپهای مختلف عامل بیماریزا که خود حاصل تفاوت محیطهای اکولوژیک مختلف می‌باشند، اثرات متفاوتی را روی میزبان بجای می‌گذارند. واریته های کورستاکی و تورنژینسیس که در محیطهای ساده تولید شده بودند، با فراورده تجارتی دایپل مقایسه گردید. نتایج نشان داد که واریته کورستاکی با غلظت کشندگی ۵۰ درصد ٤۲۰/۲ پی‌پی‌ام، نسبت به واریته تورنژینسیس، با غلظت کشندگی ۵۰ درصد ۳٦۹۲/۷ پی‌پی‌ام، اثر قوی تری روی میزبان مورد آزمایش دارد. محاسبه قدرت کشندگی به کمک تخمین واحد بین المللی موثر موجود در فراورده، این نتایج را تایید می‌نماید. به بیان دیگر می‌توان گفت که در صورت استفاده از این

واریته نه تنها برای کشندگی احتیاج به غلظت کمتری از هاگ و کریستال سمی می‌باشد، بلکه شدت بیماریزایی آن نیز به مراتب بیشتر خواهد بود. نتایج اخیر برابری نسبی اثر واریته فوق را با فراورده تجارتی نشان می‌دهد. اگرچه میزان ماده موثره در فراورده تجارتی به مراتب کمتر از فراورده تولیدی در آزمایشگاه می‌باشد.

در بررسی اثر طول زمان تغذیه از ماده غذایی دیده شد که میزان ۱۰/۸ ساعت تغذیه، ۵۰ درصد مرگ و میر روی لاروهای سن ۲ ایجاد کرد. هر قدر طول زمان تغذیه برای دریافت دز موثر کوتاهتر باشد اثر باکتری سریعتر است. توجه به شیب خط و عدد ثابت نشان می‌دهد که افزایش زمان تغذیه در بیمایزایی و مرگ و میر لاروها روند تندی نداشته و از ۱۱ تا ۷۲ ساعت تغذیه، روند تاثیرگذاری کندتر می‌گردد (شکل ۲). به عبارت دیگر لاروها در همان ۱۰ تا ۱۲ساعت اولیه دز مؤثر را دریافت می‌کنند. از نقطه نظر کاربردی، دریافت غلظت موثر در کوتاهترین زمان ممکن بسیار مهم است. در این حالت لاروها با حداقل خسارت به گیاه از تغذیه خودداری کرده و دچار اختلال در دستگاه گوارش شده و در اثر بیماری تلف خواهند شد (٦، ۱۱ و ۲۹). نکته اساسی دیگر مربوط به حساسیت سموم در مقابل شرایط طبیعی می‌باشد. در این شرایط که هاگها و کریستال سمی در معرض اشعه‌ی ماوراء بنفش، بارندگی و غیره قرار می‌گیرند، بتدریج از اثر آنها کاسته می‌شود (۱۱، ۱۲، ۲۸ و ۲۹). همچنین میزبان نیز با گذشت زمان علاوه بر رشد به همان نسبت دز کمتری را در اثر تغذیه دریافت می‌دارد (١٤ و ۲۳). لذا از تاثیر باکتری بشدت کاسته می‌شود. درک و کاربرد این مسئله در مطالعات صحرایی از نظر شدت اثر باکتری و دوام و بقاء هاگ و کریستال در طبیعت و اثرش روی میزبان بسیار مهم و باید هنگام تهیه فراورده از روشهایی استفاده نمود که دوام عامل بیماریزا را در شرایط طبیعی بالا ببرد. به همین لحاظ روشهای متعددی نظیر قراردادن هاگ و کریستال در کپسول، پوشش دادن آنها به کمک کربن و یا سایر مواد رنگی ابداع شده است (۱۲و۳۰).

جدول ٤ و شکل ۳ نشان می‌دهد که تلفات لاروها با افزایش سن به شدت کاهش می‌یابد. این پدیده به دو عامل اساسی مربوط می‌گردد. نخست اینکه افزایش سن لارو با افزایش وزن آن همراه می‌باشد. این عامل موجب می‌گردد تا میزان دز لازم برای ایجاد مرگ و میر افزایش یابد. دومین عامل اساسی در ایجاد مقاومت و پایداری لاروهای سنین بالاتر در مقابل توکسین

باکتری، به تغییرات فیزیکی و بیو شیمیایی داخل سیستم گوارشی بخصوص در سلولهای پوششی معده و pH آن، تغییر در ساختار غشاء پریوتروفیک و بالاخره همولنف حشره بر می‌گردد (٦ و ٢٩). مطالعات نشان داده است که تولید مواد آنتی بیوتیکی و تکثیر باکتریو فاژها (٢٨ و ٢٩) در داخل دستگاه گوارش و ایجاد تغییرات در میزان ترشح پروتئاز درون معده (١٣) می‌توانند از سایر عوامل محدود کننده فعالیت باکتری به حساب آیند. کاهش حساسیت لاروها با افزایش سن آنها از نظر کاربردی و در سطح مزرعه نیز بسیار حائز اهمیت می‌باشد. کرم ساقه خوار اروپایی ذرت در سنین اولیه دارای رژیم غذایی برگخواری می‌باشد (١٧ و ١٨). در چنین حالتی دز مناسب به راحتی در اختیار حشره قرار خواهد گرفت. با افزایش سن و تغییر در نیاز غذایی، لارو به درون ساقه گیاه نفوذ کرده و در چنین وضعیتی باکتری به مقدار ناچیز در اختیار حشره قرار خواهد گرفت.

در آزمایشهای زیست سنجی که در این تحقیق انجام شده است، به ویژگیهای رفتاری و مرفولوژیک حشره میزبان در طول آزمایش و بعد از آن نیز توجه گردیده است. بطور کلی لاروهای آلوده با قطع تغذیه، عدم تحرک، تأخیر رشد، فلج شدن بدن و یا ناهنجاری مورفولوژیک و فیزیولوژیک (بالاخص در لاروهای سن پنجم و در هنگام شفیره شدن) نسبت به عامل بیماریزا عکس العمل نشان دادند. اما از آنجاییکه این فاکتورها امری کیفی بودند (٢٣ و ٢٤)، در آزمایشها لحاظ نگردیده و تنها به بروز آنها اشاره گردید. در مجموع از نتایج بدست آمده در این پژوهش چنین برداشت می‌شود که:

١- واریته کورستاکی اثر کشندگی قوی‌تر و سریعتر نسبت به واریته تورنژینسیس، روی لارو کرم ساقه خوار اروپایی ذرت دارد. بررسیهای تکمیلی برای انجام مطالعات صحرایی به منظور اطمینان از فورمولاسیون فراورده، الزامی می‌باشد.

٢- درجه‌ی حساسیت لارو به باکتری با بالارفتن سن، تضعیف می‌شود.

٣- حساسترین مرحله در مزرعه سنین یک و دو میزبان می‌باشد که از پارانشیم برگها تغذیه می‌کنند و باید در زمان کاربرد باکتری مورد توجه قرار بگیرد.

٤- با مطالعات وسیع می‌توان در جهت شناسایی نژادهای مختلف این باکتری در مناطق اکولوژیک کشور و بهره گیری مناسب از این عامل مفید طبیعی همت گماشت.

جدول ۱: مقایسه‌ی تجزیه‌ی پروبیت مرگ و میر لاروهای سن اول کرم ساقه خوار اروپایی ذرت پس از ۷۲ ساعت تغذیه از غلظتهای مختلف فرآورده های *B. thuringiensis*

منابع	Kurstaki	Thuringiensis	Dipel®
شیب	۱/۳± ۰/۳۰۲۰	۰/۸± ۰/۰۱۵	۱/٦± ۰/۰۲٦۳
عدد ثابت	۱/۵	۱/۸	۰/۷
کای اسکویر	۱/۲۰۹	۲/۷۵۹	۳/٦٦۸
Lc50	٤۲۰/۲۸	۳٦۹۲/۷۲۱	٤۱٤/۲۸۲
Lc50 حد بالا	٤۲٤/۰۷۳	۳۷۸۰/۰٦	٤۱۷/۲۰٤۸
Lc50 حد پایین	٤۱۵/٤۸٦	۳٦۰۱/٦٤	٤۱۱/۳۸۰۵

جدول ۲: مقایسه‌ی تجزیه‌ی پروبیت مرگ و میر لاروهای سن دوم کرم ساقه خوار اروپایی ذرت تغذیه کرده به مدت صفر، ۲، ۳/۳، ۵/٤، ۹/۱، ۱۵/۳، ۲۵/۵، ٤۳ و ۷۲ ساعت از غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام *B. thuringiensis* واریته کورستاکی. نمونه برداری از لاروها که در کل ۷۲ ساعت از غذای آلوده و سالم تغذیه کرده بودند، انجام شده است.

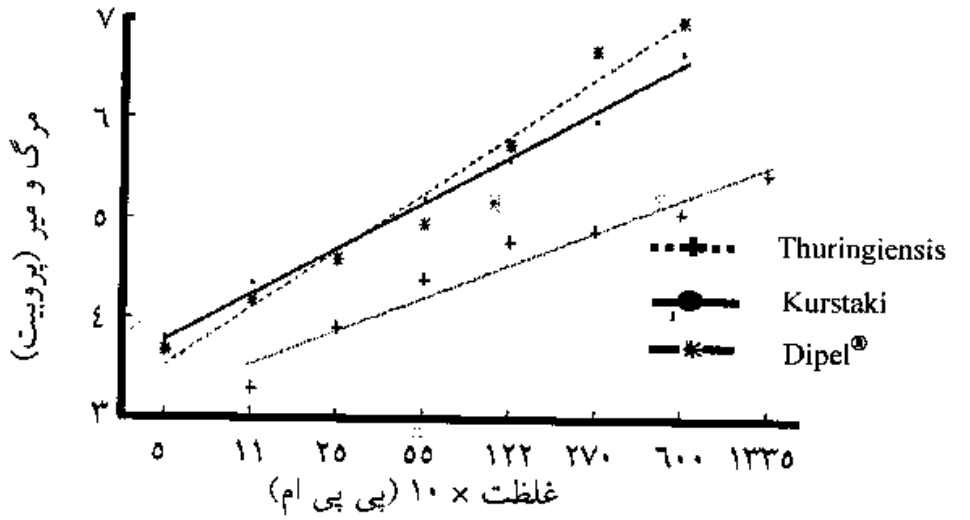
تجزیه پروبیت	
شیب (b)	۰/۸۷±/۰۳۰۸
عدد ثابت (a)	۲/۵٤
کای اسکویر	٦/۱۵
۵۰ درصد کشندگی	٦٤۸
حد بالای ۵۰ درصد کشندگی	٦٦۲
حد پائین ۵۰ درصد کشندگی	٦۳۲
فرمول خط	Y=۰/۸۷ X +۲/۵٤

جدول ۳: تجزیه‌ی واریانس (فاکتوریل) مرگ و میر در سنین اول، سوم و پنجم لاروی ساقه خوار اروپایی ذرت پس از ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت تغذیه روی غذای مصنوعی آغشته به B. t. var. Kurstaki (پانصد پی پی ام).

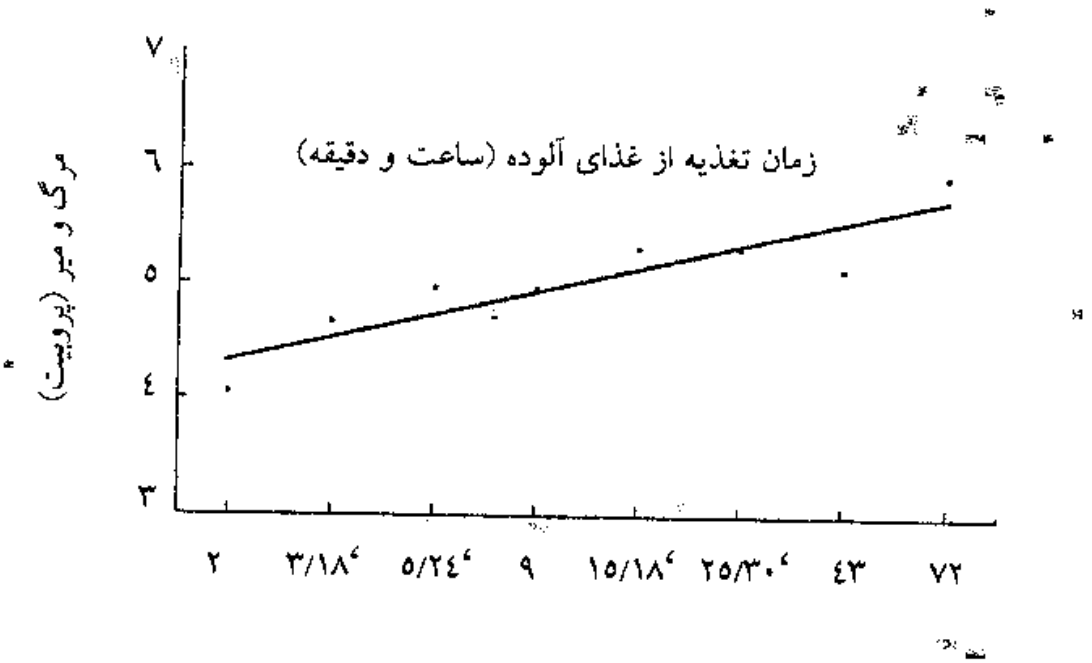
منابع	درجه آزادی	Ss	Ms	F	Prob.
A سن لاروی	۲	۳۸۹۳	۱۹٤٦/٥	٦۰/۹	۰/۰۱ S
B زمان نمونه برداری	۳	۸٥٦۱/۱	۲۸٥۳/۷	۸۹/۳۳	۰/۰۱ S
AB اثر سن و زمان	٦	٤٥۱/۳	۷٥/۲	۲/۳	۰/۰٦ NS
خطای آزمایشی	۲٤	۷٦٦/٦	۳۱/۹		
کل	۳٥	۱۳٦۷۲/۲			

جدول ٤: مقایسه میانگین‌های مرگ و میر در سنین اول، سوم و پنجم لاروی ساقه خوار اروپایی ذرت پس از ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت تغذیه روی غذای مصنوعی آغشته به B. t. var. Kurstaki (پانصد پی پی ام).

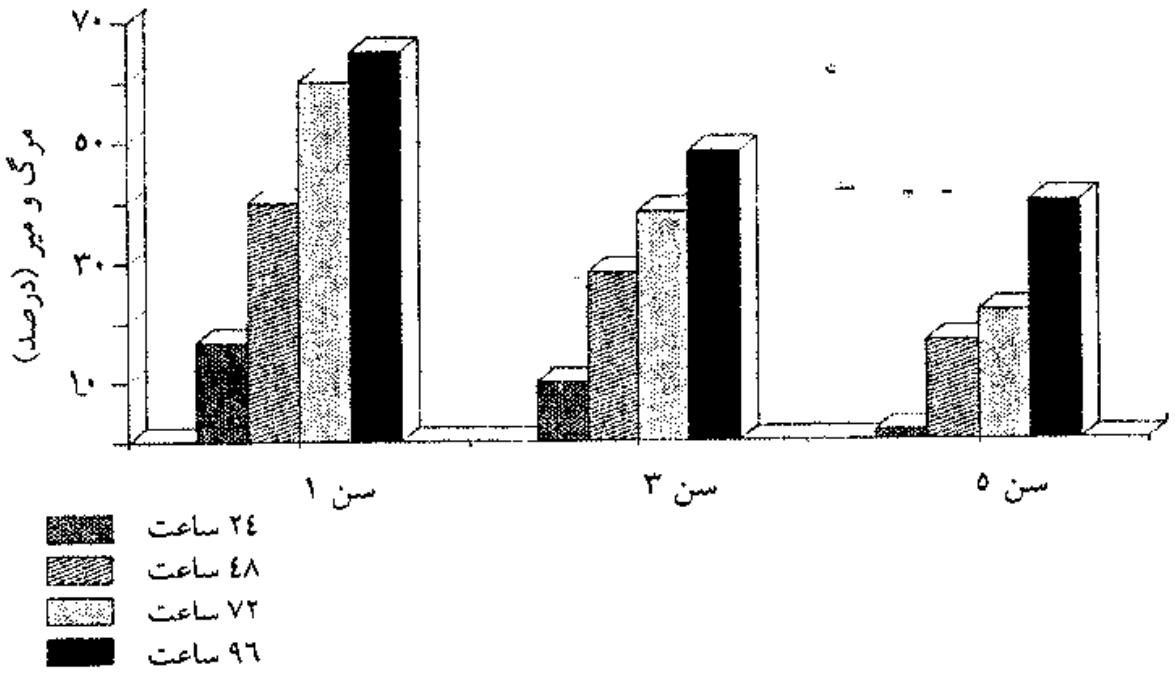
منابع تغییرات	میانگینها و اختلاف معنی دار بین آنها			
سن لاروی	لارو سن اول	لارو سن سوم	لارو سن پنجم	
(مستقل از زمان)	٤٥/٤ a	۳۱/۲ ab	۲۰ b	
زمان نمونه برداری	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹٦ ساعت
(مستقل از سن)	۹/٤ a	۲۸ /۳ b	٤۰cd	٥۱/۱ d



شکل ۱: نمودار مرگ و میر لاروهای سن اول کرم ساقه خوار اروپایی ذرت پس از ۷۲ ساعت تغذیه از غلظتهای مختلف فرآورده های *B. thuringiensis*.



شکل ۲: نمودار مرگ و میر لاروهای سن دوم کرم ساقه خوار اروپایی ذرت تغذیه کرده در زمان‌های مختلف از غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام *B. thuringiensis* واریته کورستاکی. نمونه برداری از لاروها که در کل ۷۲ ساعت از غذای آلوده و سالم تغذیه کرده بودند، انجام شده است.



شکل ۳: نمودار مرگ و میر سنین اول، سوم و پنجم لاروی ساقه خوار اروپایی ذرت پس از ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت تغذیه روی غذای مصنوعی آغشته به *B. t. var. Kurstaki* (۵۰۰ پی پی ام)

سپاسگزاری

از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران که واریته های باکتری و سایر امکانات را در اختیار قرار دادند، سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱- ایزدیار، س. ۱۳۸۱. زیست سنجی جدایه‌های بومی *Bacillus thuringiensis* روی کرم قوزه پنبه (*Helicoverpa armigera*) و ردیابی بتاگزوتوکسین در آنها. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، ۱۱۷صفحه.

۲- خواجه نوری، ع. ۱۳٤۷. آمار پیشرفته و بیومتری. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، ٥٦۷ صفحه.

۳- زارع، م.، م. س. مصدق، و م. جمشیدیان، ۱۳۷۹. بررسی اثر *Bacillus thuringiensis* در کنترل کرم برگخوار مصری پنبه *Spodoptera littoralis* (Lep: Noctuidae) در شرایط آزمایشگاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید چمران اهواز، ۱۷۰ صفحه.

٤- عبایی، م. و ا. عادلی، ۱۳٦۲. فهرست آفات درختان و درختچه‌های جنگلی و غیر مثمر ایران. چاپ ندا، مؤسسه‌ی تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، ۱٤۷ صفحه.

٥- عسکری، ح. ۱۳۷۳. بازنگری در رده بندی کرم ساقه خوار آزوپایی ذرت (Lep.- Pyralidae) *Ostrinia nubilalis* زیر گونه‌ی Persica, بیولوژی و تکثیر آن روی محیط غذای مصنوعی. پژوهش و سازندگی. شماره ۲۳، صفحه‌ی ۳۱-۲۰.

٦- عسکری، ح.، ع. خرازی پاکدل، ب. بهبودی شاهسون و ن. معظمی، ۱۳۷۲. آسیب شناسی بافت زوده‌ی میانی لاروهای *Ostrinia nubilalis* Hub. (Lep., Pyralidae) زیر گونه‌ی Persica تغذیه کرده از اسپور و سم باکتری *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki نامه‌ی انجمن حشره شناسی ایران. جلد ۱۲ و ۱۳، صفحه‌ی ۷۲-٦۱.

۷- فرحبخش، ق. ۱۳٤۰. فهرست آفات مهم نباتات و فراورده‌های کشاورزی ایران. نشریه شماره ۱، سازمان حفظ نباتات، وزارت کشاورزی، ۱٥۳ صفحه.

۸- مراد اسحاقی، م. ج. و ع. ا. پورمیرزا ، ۱۳٥۳. بررسی مقاومت سنین مختلف لارو شب پره هندی *Plodia interpunctella* در برابر حشره کش میکروبی *B. thuringiensis* . نامه‌ی انجمن حشره شناسی ایران. جلد ۲، صفحه‌ی ۳٤-۲٥.

۹-نعیم، ع. ۱۳٥۸. ذرت. انتشارات موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی. ۲۳٥ صفحه.

10- Anonymous, 1989. SAS/STAT User's Guide. Version 6, SAS Institute, Cary, NC, USA.

11- Behle, R. W., M. R. McGuire & B. S. Shasha, 1997. Effect of sunlight and simulated rain on residual activity of *B. thuringiensis* formulation. Journal of economic entomology. 90 (6): 1560-1566.

12- Burges, H. D. & A. Jones, 1998. Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects. pp. 33-127. (In: Formulation of Microbial - Biopesticides; Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments. Ed. Burges, H. D.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlans, 412 pp.

13- Cha-run, S. & B. Chen, 1982. Comparison of the effects of insect intestinal proteases on the crystals of *Bacillus thuringiensis*. Acta entomologica sinica, 45(3): 244-249.

14- Dulmage, H. T., O. P. Boening, C. S. Rehnborg & G. D. Hansen, 1971. A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based in the international unit. Journal of invertebrate pathology, 18: 240-245.

15- Glare, T. R. & M. O'Callaghan, 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. John Wiley & sons, Ltd. 350 pp.

16- Heimpl, A. M. & T. A. Angus, 1959. The site of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. Insect pathology, 1: 152-170.

17- Hudon, m. & E. J. Le Roux, 1986. Biology and population dynamics of the European corn Borer *Ostrinia nubilalis* with special reference to sweet corn in Quebec. 1. systematics, morphology, geographical distribution, host rang, economic importance. Phytoprotection, 67(1): 39-54.

18- Lynch, R. E., L. C. lewis, E. C. Berry & J. F. Robinson, 1977. European Corn Borer control with *Bacillus thuringiensis* standardized as Corn Borer international units. Journal of invertebrate pathology, 30: 169-174.

19- Martouret, D., 1967. Les toxines de *Bacillus thuringiensis* et leur processus d'action chez les larves de Lepidopteres. 12th symposium, phytopharmacy phytiat., chent, Belgium, 8: 1-14.

20- Matsumura, F., 1976. Toxicology of insecticides. Second edition, Plenum Press, New York, 503 PP.

21- Mc Whorter, G. M., E. C. Berry & L. C. Lewis, 1972. Control of *Ostrinia nubilalis* with two varieties of *B. thuringiensis*. Journal of economic entomology, Vol. 65(5): 1414-1417.

22- Milner, R. J., 1979. Bacteria. P. 59-69 (In: Microbial Control of Insect Pests. Ed.

Kalmakoff J. & J. F. Longworth), Research Bulletin, 228 Newzealand, Dep. Of Science and Industrial, 102 pp.

23- Mohd-Salleh, M. B. & L. C. lewis, 1982. Toxic effects of spore –crystal ratios of *Bacillus thuringiensis* on European Corn Borer larvae. Journal of invertebrate pathology, 39: 290-297.

24- Mohd-Salleh, M. B. & L. C. lewis, 1983. Comparative effects of spore-crystal complexes and thermostable exotoxins of six subspecies of *B. thuringiensis* on *Ostrinia nubilalis*. Journal of invertebrate pathology, 41: 336-340.

25- Mutuura, A. & E. Monroe, 1970. Taxonomy and distribution of the European Corn Borer and allied species: Genus *Ostrinia* (Lep.: pyralidae). The Entomological Society of Canada, Ottawa, 112 pp.

26- Navon, A., M. Klein & S. Braun, 1990. *Bacillus thuringiensis* potency bioassays against *Heliothis armigera*, *Earias insulana* and *Spodoptera littoralis* larvae Based on standardized diets. Journal of invertebrate pathology, 55: 387-393.

27- Poitout, S., R. Bues & C. Le Rumer, 1972. Elevage sur milieu artificial simple de deux noctuelles parasites du coton *Earias insulana* et *Spodoptera littoralis*. Entemologie expérimental appliquée, 15: 341–350.

28- Raun, E. S. & R. D. jackson, 1966. Encapsulation as a technique for formulating microbial and chemical insecticides. Journal of entomology, Vol. 59(3), 620-623.

29- Raun, E. S., G. R.Sutter & M. A. Revelo, 1966. Ecological factors affecting the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. thuringiensis to the European Corn Borer and fall armyworm. Journal of invertebrate pathology, 8: 365-375.

30- Taborsky, V. 1992. Small-scale processing of microbial pesticides. FAO, Agricultural services bulletin, Rome, 90 pp.

Journal of Entomological Society of Iran. 21 (1), 2001

Evaluation of *Bacillus thuringiensis* Ber. on *Ostrinia nubilalis* Hub. (Lep.: Pyralidae) Larvae

H. Askary[1], A. Kharazi pakdel[2], S. E. Sadeghi[1]

Abstract

European Corn Borer *Ostrinia nubilalis* Hűb. Sub sp. Persica (Lep.: Pyralidae) is known as a polyphagous insect, couse injury to corn, cotton, rice, poplar nursery and etc. Products of *Bacillus thuringiensis*, strains Kurstaki and Thuringiensis were evaluated on the host larval instars using spores and crystals. Bioassay was carried out the first larval star of the pest reared on different concentrations of strains added to the artificial diet. Seventy two hours after rearing, dead larvae were counted and lethal concentration to get 50 percent mortality in population (Lc50) was determined and compared with commercial product, Dipel®. Results indicated that *B. thuringiensis* var. Kurstaki (Lc50= 420.2 ppm) like Dipel® (Lc50= 414.2 ppm) were more effective than *B. thuringiensis* var. Thuringiensis (Lc50 = 3892.72 ppm).

The second bioassay was done to determine the effective time to get lethal dose of *B. thuringiensis* by second larval instar of the host which reared on artificial diet, containing 2000 ppm of spores and crystals of Kurstaki strain. The mortality rate was estimated 17.2%, 50% and 82% after 2, 10.8 and 72 hours, respectively.

The third bioassay was carried out to verify susceptibility of larval stages when they reared on 500 ppm of *B. thuringiensis* var. Kurstaki. Results indicated that the first larval instar was significantly more susceptible than third instar. The fifth instar was less susceptible compare to other instars at (α=5%).

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Bioassay, European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*.

1- Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box: 13185-343, Tehran, Iran.

2- Faculty of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran.