آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۶۳، شماره‌های ۱ و ۲، بهمن ۱۳۷۴

تأثیر تشعشعات خورشیدی در کارآئی ویروس گرانولوزیس کرم سیب *Cydia pomonella* Granulosis Virus

Effects of solar radiation on efficacy of *Cydia pomonella* Granulosis Virus

محمدرضا رضاپناه[۱]، هوشنگ بیات اسدی[۱]، مرتضی اسماعیلی[۲] و قدیر نوری قنبلانی[۳]
موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی[۱]، دانشکده کشاورزی کرج[۲] و
دانشکده کشاورزی اردبیل[۳]

چکیده:

ویروس گرانولوزیس کرم سیب (CpGV) دارای پتانسیل مناسبی برای کنترل خسارت کرم سیب میباشد. اما این ویروس در برابر تشعشعات خورشیدی (بخصوص طیف ماوراءبنفش) حساس بوده و کارآئی آن کاهش می‌یابد. از این رو میزان کارآئی و ماندگاری نمونه‌ای از ویروس گرانولوزیس کرم سیب (CpGV) با نام تجارتی گرانوپوم (Granupom) در شرایط آزمایشگاه و محیط طبیعی تحت تشعشعات خورشیدی مورد ارزیابی قرار گرفت.

میزان کارآئی و ماندگاری این نمونه CpGV در شرایط آزمایشگاه با شیب ۰/۵- کاهش یافت و نیمه عمر آن ۱۸/۵ ثانیه ارزیابی گردید. در شرایط محیط طبیعی با استفاده از روش دیسک برگی و زیست سنجی نیمه عمر ویروس ۴ ساعت آفتابی و شیب خط رگرسیون (بین پروبیت و لگاریتم ساعات آفتابی تجمعی) ۱- ارزیابی شد.

با توجه به کاهش تدریجی کارآئی CpGV در اثر تشعشعات خورشیدی در فاصله ویروس‌پاشی‌ها می‌بایست برای جلوگیری از خسارت کرم سیب، غلظت کاملا کشنده‌ای از ویروس روی سطح میوه موجود باشد.

مقدمه:

ویروس گرانولوزیس کرم سیب (*Cydia pomonella* Granulosis Virus) اولین بار توسط تانادا (Tanada, 1964) به عنوان عامل بیماریزا در کرم سیب *Cydia pomonella* L. معرفی شد. در طول سه دهه اخیر در زمینه تولید، کاربرد و ارزیابی آن در کشورهای ایالات متحدهٔ آمریکا (Falcon, *et al.*, 1968; Sheppared and Stairs, 1976)، کانادا (Jaques, *et al.*, 1987)، شوروی سابق (به نقل از Lipa, 1991) و آلمان (Huber, 1991, Dickler and Huber, 1988) تحقیقات

زیادی انجام شده است. روشن است که توصیه این فرآورده بیولوژیک و توسعه کاربرد آن در کشور نمی‌تواند صرفا بر مبنای نتایج تحقیقات فوق الذکر باشد، چراکه میزان خسارت کرم سیب در این کشورها و موقعیت مکانی (عرض جغرافیائی) آنها با کشور ما متفاوت است.

مشکل اصلی در به کارگیری ویروسهای بیماریزای حشرات حساسیت قابل توجه آنها به تشعشعات خورشیدی میباشد (Jaques, 1967 & 1985). کارآئی CpGv نیز به مرور زمان در برابر تشعشعات خورشیدی کاهش می یابد (Jaques, *et al.*, 1987 ; Krieg, *et al.*, 1980). این مطالعه به ارزیابی تاثیر تشعشعات خورشیدی بر میزان کارآئی و ماندگاری این فرآورده پرداخته است.

روش بررسی:

الف- لاروهای نئونات کرم سیب جهت ارزیابی کارآئی CpGV از طریق پرورش آزمایشگاهی تامین شد (Esmili, 1969; Rezapanah, 1995).

ب- ویروس گرانولوزیس کرم سیب با فرمولاسیون مایع در بسته های نیم لیتری با نام تجارتی گرانوپوم (Granupom) از کمپانی آگروو (Agr-Evo) تهیه و مطابق روش هوبر (Huber, 1981) پس از کنترل کمی (شمارش گرانول ویروس در واحد حجم) و کیفی (زیست سنجی اولیه)، در این مطالعات مورد استفاده قرار گرفت.

ج- آزمایش های ارزیابی کارآئی CpGV تحت تشعشعات خورشید:

۱- در آزمایشگاه:

کارآئی CpGV تحت تاثیر تشعشعات لامپهای اولتراویتالوکس (Ultra-vitalux) مطابق روش کریگ و همکاران (Krieg, *et al.*, 1980) و مستقل از درجه حرارت (Fritsch & Huber, 1985) ارزیابی شد. از این رو از یک کادر مربع شکل چوبی با اضلاع ۲۵ سانتیمتر که در چهارگوشه آن لامپهای اولتراویتالوکس نصب شده استفاده شد. لامپها در فاصله ۵۰ سانتیمتری در بالای پتری دیش‌های (قطر ۹ سانتیمتر) محتوی ویروس قرار داده شد. در داخل هر پتری دیش ۰/۰۵ میلی‌لیتر، بصورت ۱۰ قطر کوچک، از سوسپانسیون ویرس با غلظت $۶/۶\times۱۰^{۶}$ گرانول در هر میلی‌لیتر از بافر Tris-HCL (ph=8) قرار داده شد. پس از خشک شدن قطره‌ها لامپها روشن گردید. پتری دیش‌ها پس از سپری شدن ۰، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰، ۳۶۰ و ۴۸۰ ثانیه از معرض تابش لامپها خارج گردید. به محتویات هر پتری ۱۰ میلی لیتر از همان بافر اضافه شد و ۵ میلی لیتر از هر یک برای زیست سنجی در نظر گرفته شد.

۲- در محیط طبیعی:

ارزیابی کارآئی CpGV تحت تشعشعات خورشیدی در محیط طبیعی مطابق روش کریگ و همکاران (Krieg, *et al.*, 1980) انجام شد. ویروس پاشی به میزان توصیه شده توسط کارخانه سازنده (۳۰ میلی لیتر از گرانوپوم در صد لیتر آب معادل $۶/۶\times۱۰^{۶}$ گرانول در هر میلی‌لیتر) بوسیله سمپاش تراکتوری و به روش معمولی روی دو درخت سیب عاری از باقیمانده سموم

درمنطقه کرج در تاریخ ۲۵ مرداد ۱۳۷۳ انجام گرفت. در مدت آزمایش اطلاعات و داده‌های هواشناسی از نزدیکترین ایستگاه هواشناسی، واقع در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران در کرج، اخذ شد. زمان نمونه برداری از برگها براساس میزان تجمعی ساعات آفتابی تعیین گردید. در هر نمونه برداری از برگهای ویروس پاشی شده هر چهار سمت و مرکز درخت در دو سطح بالا و پائین نمونه برداری شد. میزان کارآئی CpGV موجود در سطح این برگها بر روی لاروهای نئونات کرم سیب در دو مرحله با روشهای دیسک برگی و زیست سنجی ارزیابی گردیدند.

د- روشهای ارزیابی:

۱- زیست سنجی (Bioassay):

زیست سنجی‌ها در هر یک از سه مرحلهٔ ذیل با لحاظ کردن تغییرات لازم در دمای ۱°C±۲۷، رطوبت نسبی ۵±۵۵٪ و روشنائی ۱۶/۵ ساعت در شبانه روز انجام و پس از ۱۲ روز میزان تلفات لاروها تعیین و بوسیله فرمول ابوت (Abbott) و نرم‌افزار کامپیوتری پروبیت مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (Busvin, 1971).

زیست سنجی بمنظور کنترل کیفی ویروس، طبق روش هوبر (Huber, 1981) با استفاده از غذای مصنوعی (مکاتبه شخصی با هوبر) انجام شد.

در آزمایش اول (در آزمایشگاه)، زیست سنجی طبق روش فریتش و هوبر (Fritsh & Huber, 1985) با مخلوط نمودن ۵ میلی لیتر از هر نمونه با ۹۵ میلی لیتر از غذای مصنوعی انجام شد.

در آزمایش دوم (در محیط طبیعی)، زیست سنجی طبق روش کریگ و همکاران (Krieg, *et al.*, 1985) پس از روش دیسک برگی، روی غذای مصنوعی عاری از ویروس انجام شد.

۲- روش دیسک برگی (Leaf disk method):

در آزمایش در محیط طبیعی، قبل از مرحله زیست سنجی، نمونه های برگ جمع‌آوری شده بمدت ۲۴ ساعت در معرض تغذیه لاروهای نئونات کرم سیب قرار گرفت. برای انتخاب مناسبترین شکل روش دیسک برگی (Rezapanah, 1995)، از میان اشکال مختلف دیسک برگی منجمله سه شکل از روش کریگ و همکاران (Krieg, *et al.*, 1980) براساس آزمون آماری تجزیه واریانس و گروه بندی بروش LSD در سطح ۵٪، روش ذیل مناسب ارزیابی شد. در این روش از دو صحفه پلکسی گلاس به ابعاد ۱۰×۸×۰/۵ سانتیمتر استفاده شد. در صفحه رویی ۵ سوراخ بقطر ۶ میلی‌متر ایجاد و یک طرف سوراخها با پلاستیک (دارای منافذ ریز برای عبور هوا) مسدود شد. در هر یک از حفره‌ها با قلم موی سه صفر ضدعفونی شده یک لارو نئونات کرم سیب قرار داده شد. از برگهای نمونه برداری شده، تکه‌هایی به ابعاد یک سانتیمتر مربع بریده شد و با کمی چسب بر روی سمت دیگر حفره قرار داده شد. به منظور تامین رطوبت برگها کاغذ صافی مرطوبی در فاصله بین دو صفحه پلکسی گلاس قرار داده شد و صفحات بوسیله گیره به

یکدیگر محکم شد. پس از ۲۴ ساعت، لاروهای زنده وارد مرحله زیست سنجی شد.

نتیجه و بحث:

کنترل کمی و شمارش تعداد گرانولهای ویروس در واحد حجم نشان داد که در هر لیتر از فرآوردهٔ گرانوپوم $۲/۱\times۱۰^{۱۳}$ گرانول وجود داشته است.

کنترل کیفی این فرآورده با زیست سنجی دوازده روزه وتعیین معادله خط رگرسیون بین لگاریتم تعداد گرانول در هر میلی لیتر از غذای مصنوعی (X) و پروبیت (Y) نشان داد که LC50 ویروس، ۹۵۱ گرانول در هر میلی لیتر غذای مصنوعی میباشد.

معادله ۱: $Y= ۱/۳۶X+۰/۹۵$ ، $(SE=۰/۱۳)$

در مقایسه با نتایج زیست سنجی چهارده روزهٔ فریتش و هوبر (Fritsh & Huber, 1985) که LC50 را ۳۰۸ ارزیابی نمودند علت کاهش کارآئی مشاهده شده در این فرآورده، احتمالا فاصله زمان تولید تا مصرف، نحوه نگهداری یا فرمولاسیون این فرآورده بوده است.

کارآئی این فرآورده در مدت تابش لامپهای اولتراویتالوکس (بر مبنای معادله خط رگرسیون بین لگاریتم زمان تابش لامپها برحسب ثانیه (X) و پروبیت (Y) کاهش یافت (شکل ۱) و نیمه عمر آن ۱۸/۵ ثانیه ارزیابی شد.

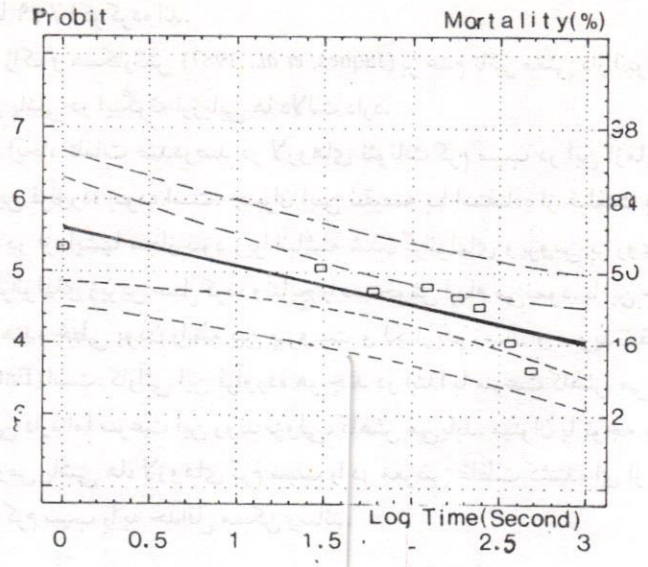
معادله ۲: $Y= -۰/۴۷X+۵/۴۴$ ، $(SE=۰/۱۸)$

فریتش و هوبر (Fritsh & Huber, 1985) با در نظر گرفتن شرایط متفاوت دمائی، مقاومت حرارتی قابل توجهی را برای CpGV گزارش نمودند. بعلاوه آنها در شرایط ۲۵°C، شیب کاهش کارآئی ویروس را ۰/۵۵- و نیمه عمر آنرا ۵۱ ثانیه و در شرایط ۷۵°C، شیب را ۱/۵- و نیمه عمر را ۲۰ ثانیه گزارش نمودند. آزمایش فوق نیز به همین استناد مستقل از درجه حرارت انجام شد.

کارآئی این فرآورده در آزمایش انجام شده در محیط طبیعی (برمبنای معادله خط رگرسیون بین ساعات آفتابی تجمعی (X) و پروبیت (Y) در طول سه هفته به آرامی کاهش یافت (شکل ۲) و نیمه عمر آن ۴ ساعت آفتابی تعیین گردید.

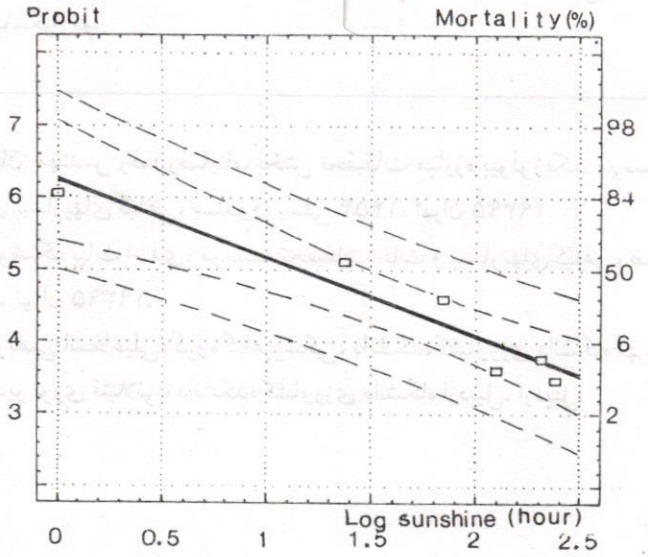
طول روز در منطقه کرج در ابتدای تابستان ۱۴/۵ ساعت، در ۲۵ مرداد (شروع آزمایش) ۱۳/۵ ساعت و در ۲۰ شهریور ۱۲/۵ ساعت میباشد. در روزهای آزمایش حداکثر و حداقل ساعات آفتابی به ترتیب ۱۲/۷ و ۲/۸ ساعت و متوسط ساعات آفتابی در ۶ روز اول ۱۱/۶۵ بوده است.

هگلی (Hagley, 1973) دوام حشره‌کش های بکار گرفته شده علیه کرم سیب را برای مدت ۱۰ تا ۱۴ روز مناسب ارزیابی نموده است. هوبر و دیکلر (Huber & Dickler, 1975) تا دو هفته ماندگاری بحد کافی برای CpGV (در شرایطی که مجموع هفتگی ساعات آفتابی در سال ۱۹۷۴، ۳۵ ساعت و در سال آفتابی ۱۹۷۵، ۴۸ ساعت بوده) گزارش کرده اند. کریگ و همکاران



شکل ۱-کارآئی نمونه از CpGV در آزمایشگاه در زیر لامپهای اولتراویتالوکس

Fig. 1. Activity of a CpGV preparation under the Ultra-vitalux lamps.



شکل ۲-کارآئی نمونه‌ای از CpGV در آزمایش در محیط طبیعی

Fig. 1. Activity of a CpGV preparation in the field.

(Krieg, *et al.*, 1980) در آزمایشی با سه تیمار CpGV پس از صد ساعت آفتابی، تلفات لاروها را بمیزان ۵۷ تا ۷۹٪ ذکر کرده اند.

یافته های ژاک و همکارانش (Jaques, *et al.*, 1987) بر عدم تاثیر معنی دار انبوهی درخت و تاریخ ویروس پاشی در اینگونه ارزیابی ها دلالت دارد.

علت عدم ایجاد تلفات صددرصد در لاروهای نئونات کرم سیب در این آزمایش، احتمالا نقصان کیفی این فرآورده بوده است. جبران این نقیصه با استفاده از غلظت بیش از حد (Over dose) در آزمایشها مجاز نبود زیرا انباشته شدن گرانولهای ویروس بر روی هم مانند حفاظی برای گرانولهای زیرین عمل کرده ونتایج را دستخوش ابهام می‌نمود. با این حال شکلهای ۱ و ۲ نشان دهنده خطی بودن رابطه بین پروبیت و لگاریتم زمان و موید نظر انتویستل (Entwistle, 1983) است. کارآئی این فرآورده هر چند در ابتدا با سرعت کاهش می‌یابد و ظاهرا نیمه عمر اندکی دارد اما سرعت این روند نزولی، کاهش می‌یابد. میتوان با توجه به این ویژگی در فاصله ویروس پاشی ها، لاروهای کرم سیب را در معرض غلظت کشنده ای از ویروس قرار داد و خسارت کرم سیب را به حداقل ممکن رساند.

سپاسگزاری:

از راهنمائیهای ارزشمند آقای دکتر هوبر (Dr. J. Huber) و از همکاریهای بیدریغ مسئولین ایستگاه هواشناسی واقع در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران در کرج و شرکت آگروو (Agr-Evo) سپاسگزاریم.

نشانی نگارندگان: مهندس رضا رضاپناه، بخش تحقیقات مبارزه بیولوژیک، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵.

دکتر هوشنگ بیات اسدی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵.

دکتر مرتضی اسماعیلی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

دکتر قدیر نوری قنبلانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه اردبیل، اردبیل.