مجله کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
شماره اول، ۱۳۹۱ (۳۸-۲۹)

اثر چند پودر وتابل تهیه‌شده از بلاستوسپور قارچ *Beauveria bassiana* (Asc., Cordycipitaceae) روی تریپس پیاز، *Thrips tabaci* (Thys.: Thripidae) در شرایط آزمایشگاهی

ریحانه عزتی تبریزی، رضا طلایی حسنلویی*، عزیز خرازی پاکدل و خلیل طالبی
گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۵ تاریخ تصویب: ۹۱/۱/۲۵)

چکیده

تهیه فرمولاسیون از بلاستوسپورهای قارچ‌های بیمارگر حشرات، امکان استفاده از آنها را به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در شرایط نامساعد محیطی میسر و سبب افزایش کارایی آنها می‌گردد. در پژوهش حاضر، فرآورده‌های مختلف پودر وتابل از بلاستوسپور جدایه‌های *Beauveria bassiana* EUT105 و *B. bassiana* EUT116 تهیه و در دو دمای متفاوت یخچال (۱±۴ درجه سلسیوس) و آزمایشگاه (۳±۲۴ درجه سلسیوس) ذخیره شدند. بعد از یک دوره ذخیره‌سازی (۲۴ ساعته و ۳۰ روزه)، اثر آنها روی لاروهای سن دوم تریپس پیاز مورد ارزیابی قرارگرفت. درصد تلفات لارو تریپس برای هریک از تیمارهای بلاستوسپور نگهداری شده در دمای آزمایشگاه، تیمارهای بلاستوسپور نگهداری شده در دمای یخچال، تیمارهای بلاستوسپور تازه فرموله شده و تیمارهای بلاستوسپور بدون فرمولاسیون در غلظت 10^8 اسپور در میلی‌لیتر در جدایه *B. bassiana* EUT105 به ترتیب برابر با ۶۶، ۸۹/۴، ۹۲/۷ و۹۱ درصد و در جدایه *B. bassiana* EUT116 به ترتیب برابر با ۷۰، ۹۳، ۸۹/۸ و۹۱ درصد بود. نتایج، نشان دهنده اثر مثبت دمای پایین ذخیره‌سازی روی پایداری فرآورده‌های نگهداری شده در دمای یخچال نسبت به فرآورده‌های نگهداری شده در دمای آزمایشگاه بود. همچنین نتایج ارائه شده در این بررسی می‌تواند پایه‌ای ارزشمند برای پژوهش‌های مربوط به افزایش مدت زمان پایداری فرمولاسیون و بیمارگری اسپورهای قارچی و نیز تغییرات لازم در نسبت، مقادیر یا اجزای تشکیل دهنده مواد همراه در کشور باشد.

واژه‌های کلیدی: بلاستوسپور، تریپس پیاز، پودر وتابل، فرمولاسیون، *Beauveria bassiana*

مقدمه

تهیه فرمولاسیون قارچ‌های بیمارگر که امر الزامی زنده‌مانی اسپورها در طول مدت نگهداری است، امکان استفاده از آنها را به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک موفق در شرایط متنوع محیطی فراهم می نماید (Luz *et al.* 1999). البته هنوز محدودیت‌هایی در استفاده از این محصولات میکروبی در کنترل بیولوژیک وجود دارد که می‌توان به دوام پایین مزرعه‌ای در مقابل عوامل محیطی به‌ویژه اشعه فرابنفش (UV) خورشید و دوره انبارداری کوتاه مدت آنها اشاره نمود. این موضوع یکی از چالش‌های مهم تولید صنعتی و تجاری این عوامل به شمار می‌آید. بنابر این، یکی از اولویت‌های پژوهشی در جهت کاربرد تجاری بیمارگرهای قارچی در سیستم‌های مدیریتی آفات، تهیه فرمولاسیون‌هایی از این عوامل می‌باشد که بتواند دوام کافی در دوره ذخیره‌سازی، پایداری مطلوب در شرایط مزرعه و نیز کنترل مؤثر روی میزبان هدف داشته باشد. در بین فرمولاسیون‌های خشک ترکیبات بیولوژیک، پودر وتابل

* نویسنده مسئول: رضا طلایی حسنلویی تلفن: ۰۲۶۳۲۸۱۸۷۰۵ E-mail: rtalaei@ut.ac.ir

به علت داشتن نیمه عمر طولانی‌تر در طی دوره نگهداری، قابلیت حل‌شدن در آب و کاربرد آسان، بیشتر مورد توجه واقع شده است (Burges 1998, Lacey and Kaya 2007). نتایج محققین در اکثر موارد بیانگر اثر مطلوب فرموله‌کردن افزایه‌های قارچی در حفظ زنده‌مانی و پایداری آنها می‌باشد که این خود مستلزم کاربرد مواد همراه مناسب و سازگار در فرآوری این ترکیبات می‌باشد (Edgington *et al.* 2000, Shah *et al.* 2000, Hong *et al.* 2005, Shi *et al*, 2006, Jackson & Erhan, 2006, Guijarro *et al*. 2007, Larena *et al*. 2007). اما تا به حال پژوهش‌های انجام یافته در راستای فرموله‌کردن بلاستوسپور قارچ‌ها در مقایسه با نوع کنیدی این قارچ‌ها به ویژه به صورت پودر وتابل کمتر بوده است.

قارچ *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota, Cordycipitaceae) با پتانسیل بیمارگری بالا روی طیف وسیعی از حشرات، یکی از گزینه‌های مطلوب برای تهیه فرمولاسیون و استفاده از فرآورده‌های آن در مدیریت تلفیقی آفات می‌باشد (Goettel *et al.* 1995, Luz *et al.* 1999). تریپس پیاز *Thrips tabaci* Lindman (Thys., Thripidae) با داشتن بیش از ۳۰۰ میزبان گیاهی از مهم‌ترین آفات گیاهان زراعی و گلخانه‌ای در سراسر دنیا است (Lewis 1997).

در مزرعه بیشترین خسارت تریپس پیاز روی پیاز و در درجه بعدی روی کلم و پنبه (Capinera 2001) و در گلخانه‌ها نیز روی خیار و گوجه‌فرنگی دیده می‌شود (Sanchez *et al.* 2000). کنترل تریپس‌ها به علت داشتن خصوصیاتی مثل سرعت تولیدمثل بالا، مقاومت به حشره‌کش‌های شیمیایی (Jensen 2000, Herron and James 2005) و زندگی مخفی در سطح زیرین برگ‌ها و داخل جوانه‌ها مشکل است و همین ویژگی‌های رفتاری موجب ایجاد زمینه برای کاربرد قارچ‌های بیمارگر حشرات علیه تریپس‌ها گردیده است (Ugine *et al.* 2005). تاکنون مطالعات زیادی برای کنترل تریپس پیاز به‌وسیله قارچ‌های بیمارگر حشرات، توسط محققین مختلف صورت گرفته است و بیمارگری قارچ‌های مختلف نیز به اثبات رسیده است (Frantz and Mellinger 1998, Jacobson *et al.* 2001, Ugine *et al.* 2005, Sengonca *et al.* 2006, Thurgrabeab *et al*. 2006) که بیانگر پتانسیل این عوامل و فرآورده‌های آن در مدیریت تلفیقی تریپس‌ها می‌باشد.

بنابر این، با توجه به چشم‌انداز روشن کاربرد قارچ‌های بیمارگر در مدیریت تلفیقی آفات، مطالعات آزمایشگاهی در زمینه تولید فرآورده‌های بیولوژیک از این بیمارگرها ضروری به نظر می‌رسد. پژوهش‌های مرتبط روی کنیدی‌های هوایی این قارچ (Ezzati-Tabrizi *et al.* 2009) حاکی از اثربخش بودن نقش مواد اضافه‌شده درحفظ زنده‌مانی کنیدی‌ها در طولانی مدت بوده است. لذا این تحقیق با هدف تهیه فرآورده‌های پودر وتابل از بلاستوسپورهای قارچ *B. bassiana* و ارزیابی اثر آنها روی تریپس پیاز انجام گردید.

مواد و روش‌ها

پرورش تریپس پیاز

برای پرورش تریپس پیاز، از روش Sengonca *et al.* (2006) با اندکی تغییرات (Pourian *et al.* 2008) استفاده شد. کلنی تریپس پیاز جمع‌آوری شده از گلخانه‌های خیار اطراف کرج روی دیسک برگی خیار *Cucumeris sativus* Var. *sultan* در ظروف هشت ضلعی به قطر ۱۱ سانتی‌متر و ارتفاع ۴ سانتی‌متر در روی آب آگار یک درصد در انکوباتور در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده شدند.

تعداد ۳۰-۲۵ عدد حشره کامل تریپس پیاز روی هر یک از دیسک‌های برگی قرار داده شدند. برای ایجاد یک گروه همسان از لاروها، ۱۲ ساعت پس از تخم‌ریزی، حشرات کامل ماده از ظروف اول حذف و به ظروف جدید انتقال داده شدند.

کشت جدایه‌های قارچ

در این پژوهش، دو جدایه‌ی *B. bassiana* EUT105 (از خاک به روش تله با شب‌پره بزرگ موم‌خوار) و *B. bassiana* EUT116 (جداشده از لارو یک بال‌پولک‌دار) انتخاب (داده‌های منتشر نشده) و

استفاده گردید. جدایه‌های قارچ در محیط Sabouraud's Dextrose Agar با یک درصد عصاره مخمر (SDAY) در ظروف پتری پلاستیکی (۹۰ میلی‌متری) کشت داده شدند و در داخل انکوباتور با شرایط ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

تهیه پودر وتابل از بلاستوسپور قارچ *B. bassiana*

برای تهیه فرآورده پودری از بلاستوسپور، از پروتکل Balacher *et al* (1973) و Lisanskey *et al.* (1993) (به نقل از Burges, 1998)، با اعمال تغییراتی در افزودن برخی مواد و نسبت‌ها و نحوه فرموله‌کردن آنها استفاده شد. برای به‌دست آوردن بلاستوسپور قارچ، از محیط کشت مایع Sabouraud's Dextrose Broth استفاده گردید. پس از اتوکلاو و تلقیح‌کردن محیط‌ها با کنیدی قارچ، در روی شیکر با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه در دمای آزمایشگاه (۳±۲۴ درجه سلسیوس) به مدت پنج روز قرار داده شدند.

مایع حاوی بلاستوسپور بعد از عبور از پارچه ململ به مدت هشت دقیقه در سرعت ۵۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد.

سپس خمیر بلاستوسپور حاصل از سانتریفوژ به نسبت وزنی ۱:۱ با پودر سیلیکاژل (۱۰ گرم خمیر و ۱۰ گرم پودر سیلیکاژل) مخلوط شد و مواد همراه دیگر با نسبت‌های ذکر شده در جدول ۱ به مخلوط خمیر و پودر سیلیکاژل اضافه گردیدند. لازم به توضیح است که برای ساختن غلظت‌های مورد نیاز جهت انجام زیست سنجی قبلاً تعداد بلاستوسپور در هر گرم خمیر تعیین گردید (داده های منتشر نشده). پودرهای حاصله در هر حالت پس از وزن کردن، به دو قسمت مساوی تقسیم گردیدند و در دو دمای یخچال (۱±۴ درجه سلسیوس) و دمای معمولی آزمایشگاه (۳±۲۴ درجه سلسیوس) در داخل لوله‌های پلاستیکی فالکون به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند.

برای ارزیابی اثر مواد همراه روی قدرت بیمارگری اسپورها پس از ۳۰ روز، قارچ تازه بدون فرمولاسیون (بدون نگهداری) و قارچ فرموله شده تازه (نگهداری به مدت ۲۴ ساعت) نیز تهیه گردید. چهار تیمار مختلف از فرآورده‌های بلاستوسپور به صورت زیر برای آزمون زیست سنجی در نظر گرفته شد: فرآورده بلاستوسپور نگهداری شده در دمای آزمایشگاه (BML)، فرآورده بلاستوسپور نگهداری شده در دمای یخچال (BMR)، بلاستوسپور تازه فرموله شده (NFB) و بلاستوسپور تازه فرموله نشده (NB). آزمون زنده‌مانی بلاستوسپورهای فرموله شده و فرموله نشده با دستگاه برج پاشش طبق روش Goettel and Inglis (1997) انجام شد.

اثر فرآورده‌ها روی تریپس پیاز

برای انجام اثر فرآورده‌های حاصل روی تریپس پیاز، از یک روش جدید بررسی موسوم به Thrips Entomopathogenic Bioassay System (TEBS) استفاده شد (Pourian *et al.* 2008). در این روش از قوطی‌های فیلم عکاسی محتوی آب آگار یک درصد و دیسک برگی خیار به قطر ۲/۵ سانتی‌متر استفاده گردید. ۱۵ عدد لارو سن دوم داخل هر ظرف گذاشته شد و با شش غلظت (10^3 تا 10^8 اسپور در میلی‌لیتر) از هر تیمار با فشار ۰/۷ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع و نازل با قطر ۰/۲۵ میلی‌متر از ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر دستگاه برج پاشش پاشیده شدند و پس از تلقیح، ظروف داخل انکوباتور (دمای۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) گذاشته شدند. ۲۴ ساعت پس از تلقیح، میزان مرگ و میر روزانه به مدت ۷ روز ثبت شد.

تجزیه آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج آزمایش با نرم‌افزار SYSTAT10 انجام گرفت. درصد تلفات لاروها به‌وسیله فرمول Schneider-Orelli (Püntener 1981) اصلاح گردید.

برای تجزیه واریانس و تعیین وجود یا عدم وجود اختلاف بین تیمارها از مدل خطی GLM (General Liner Model) و برای مقایسه میانگین‌ها در بین تیمارها از آزمون Tukey HSD استفاده شد.

برای مقایسه بین حالت‌های دوتایی از آزمون t استفاده گردید. علاوه بر درصد مرگ و میر کل که معیار اصلی مقایسه بین تیمارها بود، مقادیر LC_{50} نیز برای هر یک از جدایه‌ها با نرم‌افزار آماری Polo-PC (Leora Software 1987) محاسبه و به صورت یک جدول

ضمیمه لحاظ شد تا در صورت لزوم مبنای مقـــایسه‌هـا در پژوهـــش‌هـــای آتـــی بـــاشـــد.

جدول ۱- میزان مواد همراه افزوده شده به خمیر بلاستوسپور قارچ *Beauveria bassiana*

مواد همراه	نسبت مواد در هر گرم یا واحد حجمی
پارافین مایع	معادل ۲۰ درصد حجمی مخلوط خمیر بلاستوسپور و پودر سیلیکاژل
ساکارز مونوهیدرات	معادل ۲ درصد وزنی مخلوط خمیر بلاستوسپور و پودر سیلیکاژل
گلوتامات سدیم	معادل ۲۰ درصد حجمی مخلوط خمیر بلاستوسپور و پودر سیلیکاژل
آلجینات سدیم	معادل ۲ درصد وزنی مخلوط خمیر بلاستوسپور و پودر سیلیکاژل
آرد غلات	معادل ۲/۵ درصد وزنی مخلوط خمیر بلاستوسپور و پودر سیلیکاژل
نشاسته	معادل ۲۰ درصد وزنی مخلوط خمیر بلاستوسپور و پودر سیلیکاژل
کازئین	معادل ۲۰ درصد وزنی مخلوط خمیر بلاستوسپور و پودر سیلیکاژل
توین ۸۰	۰/۱ میلی‌لیتر
پودر شیر بدون چربی	به نسبت ۱: ۱ (خمیر بلاستوسپور: پودر شیر)
پودر کائولن	به مقدار موردنیاز

نتایج و بحث

تجزیـــه آمـــاری آزمـــون قابلیـــت زیـــست بلاستوسپورهای فرموله شده و نـشده، نـشان داد کـه در هر دو جدایه بین چهار تیمار بلاستوسپور (BML ,BMR ,NFB ,NB) اختلاف معنی‌داری وجـود دارد: EUT105 *B. bassiana* ($F_{۳و۸}$=۴۱/۲۵ ،*P*<۰/۰۱) و *B. bassiana* EUT116 ($F_{۳و۸}$=۳۰/۸۵،*P*<۰/۰۱). تیمـــار BML در مقایسه با سه تیمار دیگر در هر دو جدایه تندش کمتری را نشان داد، به طـوری کـه قابلیـت زیـست NB , NFB وBMR حـدود ۹۵-۹۰ درصـد و BML حـدود ۷۵-۷۰ درصد بود. در ابتدا نتـایج حاصـل از بررسـی زهرآگینـی بلاستوسپور خالص روی لارو سن دوم تریپس پیاز نشان داد کـه بـین دو جدایـه *B. bassiana* EUT105 و *B. bassiana* EUT116 تفـاوت معنـی‌داری وجـود نـدارد (t = 0.462 ; df = 46 ; *P* = 0.646). سـپس بـا تجزیـه داده‌هـای بیمـارگری بلاستوسـپورهای فرمولـه شـده و بلاستوسپور بدون فرمولاسـیون مـشخص شـد کـه بـین چهار تیمار در هر دو جدایه تفاوت معنی‌داری وجود دارد [($F_{۳و۷۲}$=۰/۶۵ ،*P*<۰/۰۱) *B. bassiana* EUT105] و [($F_{۳و۷۲}$=۴۵/۲۸ ،*P*<۰/۰۱) *B. bassiana* EUT116]. در هـر دو جدایـه، در BML بیمـارگری پـایین‌تـری در مقایسه با NFB، BMR و NB مشاهده شد (جدول۲).

جدول ۲- میانگین درصد مرگ و میر (±SE) ایجاد شده توسط فرمولاسیون‌های مختلف از دو جدایه قارچ *Beauveria bassiana* در غلظت $۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر علیه لاروهای سن دو تریپس پیاز

	درصد مرگ و میر (±SE)	
تیمارها	***B. bassiana* EUT105**	***B. bassiana* EUT116**
NB	**۹۱ (±۴/۳) a**	**۸۹/۸ (±۱/۷) a**
NFB	**۹۲/۷ (±۲/۹) a**	**۹۱ (±۴/۳) a**
BMR	**۸۹/۴ (±۲/۱) a**	**۹۳ (±۲/۹) a**
BML	**۶۶ (±۳/۷) b**	**۷۰ (±۳/۵) b**

حروف متفاوت در ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد (توکی، P<0.05). NB: بلاستوسپور تازه فرموله نشده ؛ NFB: بلاستوسپور تازه فرموله شده؛ BMR: فرآورده بلاستوسپور نگهداری شده در دمای یخچال ؛ BML: فرآورده بلاستوسپور نگهداری شده در دمای آزمایشگاه.

قضاوت‌های آماری برای مقایسه اختلاف بین تیمارها در این تحقیق بر اساس مقادیر مرگ و میر کل بوده است، اما نتایج تجزیه پروبیت با استفاده از برنامه Polo-PC، برای به‌دست آوردن مقادیر LC_{50} و حدود

اطمینان ۹۵٪ برای همه ترکیبات فرموله شده و فرموله نشده بلاستوسپور به‌صورت اطلاعات ضمیمه در جدول ۳ آمده است. در برنامه‌های بهبود و توسعه حشره‌کش‌های بیولوژیک برای کاربرد مؤثر فرم‌های مختلف از اسپور قارچ‌های بیمارگر حشرات در شرایط مزرعه‌ای، حفظ و نگهداری آنها به‌صورت پودر خشک، یکی از روش‌های پیشنهادی می‌باشد (Moore *et al.*1995, Stephan and Zimmerman 1998). در این پژوهش پس از تهیه فرآورده پودر وتابل از بلاستوسپور قارچ، قابلیت‌زیست اسپورها از نظر تأثیر دما و مدت زمان ذخیره‌سازی مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان داد در سه حالت نگهداری شده در دمای یخچال (BMR)، فرموله شده تازه (NFB) و همچنین بلاستوسپور تازه فرموله نشده (NB)، تندش اسپورها بین ۹۵-۹۰ درصد و در حالت نگهداری شده در دمای آزمایشگاه (BML)، بین ۷۵-۷۰ درصد بود. این کاهش تندش بلاستوسپورها در فرآورده مذکور پس از ۳۰ روز ذخیره‌سازی نسبت به سه حالت دیگر به شرایط نگهداری آنها برمی‌گردد، زیرا شرایط ذخیره‌سازی فراورده نگهداری شده در دمای آزمایشگاه احتمالاً برای از دست دادن محتوای آبی اسپورها و یا تندش زود هنگام اسپورها مساعد بوده و در طی این مدت، مواد همراه افزوده شده نتوانسته زنده‌مانی اسپورها را حفظ کند. البته برای تایید این موضوع مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری است. در واقع در طی تندش زود هنگام اسپورها، اسپورهای جوانه‌زده قدرت زیستی خود را تا زمان کاربرد (زیست سنجی) از دست داده بودند که تاییدی است بر این که زنده‌مانی و تندش اسپورهای قارچی به ویژه در طی ذخیره‌سازی وابستگی کاملاً مستقیمی به دما دارد. این موضوع با برخی تحقیقات انجام شده در این رابطه مطابقت دارد (Altre and Vandenberg 2001).

جدول ۳- (ضمیمه). مقادیر محاسبه شده LC_{50} ترکیبات فرموله شده و نشده بلاستوسپور قارچ *Beauveria bassiana* با استفاده از برنامه POLO-PC

جدایه‌ها	تیمارها*	Slope± SE	X^2	LC_{50}	حدود اطمینان ۹۵ درصد	
					حد پایین	حد بالا
B.bassiana EUT105	BML	۰/۳۱۵±۰/۰۵۳	۵/۱۱	۸/۳×۱۰^۵	۳/۲×۱۰^۴	۱/۲×۱۰^۷
	BMR	۰/۴۱۸±۰/۰۵۰	۰/۶۹	۷/۱×۱۰^۴	۲/۳×۱۰^۴	۱/۷×۱۰^۵
	NB	۰/۳۷۸±۰/۰۵۰	۱/۰۸	۷/۵×۱۰^۴	۱/۹×۱۰^۴	۱/۱×۱۰^۵
	NFB	۰/۴۳۵±۰/۰۵۲	۲/۹۴	۱×۱۰^۵	۳/۳×۱۰^۴	۲/۲×۱۰^۵
B.bassiana EUT116	BML	۰/۳۱۰±۰/۰۴۷	۰/۹۲	۱/۵×۱۰^۶	۴/۳×۱۰^۵	۶/۲×۱۰^۶
	BMR	۰/۴۲۳±۰/۰۵۱	۲/۰۲	۸/۸×۱۰^۴	۲/۹×۱۰^۴	۲/۲×۱۰^۵
	NB	۰/۳۷۷±۰/۰۵۰	۰/۲۸	۴/۲×۱۰^۴	۱×۱۰^۴	۱/۲×۱۰^۵
	NFB	۰/۳۵۸±۰/۰۴۸	۰/۴۵	۴/۵×۱۰^۴	۱/۱×۱۰^۴	۱/۳×۱۰^۵

*: تعداد افراد آزمایش شده برای هر تیمار ۳۶۰ لارو سن دوم تریپس پیاز بود (درجه آزادی=۴). NB: بلاستوسپور تازه فرموله نشده ؛NFB: بلاستوسپور تازه فرموله شده ؛ BMR: فرآورده بلاستوسپور نگهداری شده در دمای یخچال ؛ BML: فرآورده بلاستوسپور نگهداری شده در دمای آزمایشگاه

کاهش قدرت زیستی ممکن است مستقیماً روی شدت بیمارگری ترکیبات نیز تاثیر بگذارد، به‌طوری‌که مقایسهٔ بیمارگری سه فرآورده فرموله شده بلاستوسپور (NFB, BMR, BML) با حالت فرموله نشده آنها (NB) روی لارو سن دوم تریپس پیاز نشان داد که در هر دو جدایه، تیمار نگهداری شده در دمای آزمایشگاه نسبت به سه تیمار دیگر درصد تلفات خیلی کمی روی آفت هدف ایجاد می‌کرد. این درحالی است که علیرغم اینکه مواد حامل اضافه شده برای سه حالت فرموله شده، یکسان و به یک نسبت بوده ولی شرایط دمای نگهداری تیمار

نگهداری شده در دمای آزمایشگاه با بقیه متفاوت می‌باشد. پس با توجه به این مطلب می‌توان گفت که تفاوت در بیمارگری این فرآورده (نگهداری شده در دمای آزمایشگاه) با بقیه تیمارها در درجه اول مربوط به دمای ذخیره بوده است، یعنی دمای پایین نقش تعیین‌کننده‌ای در پایداری ترکیب و حفظ بیمارگری در طی دوره ذخیره‌سازی دارد که در مطالعات مختلف از جمله (Moore *et al.* 1996, Alves *et al.* 1996, Stephan and Zimmermann 1998, Sandoval-Coronado *et al.* 2001, Kucuk and Kivanc 2005, Jackson and Erhan, 2006) نیز این نتیجه ارائه شده است. در مورد حالت‌های تازه فرموله شده و فرموله نشده که هر دو ترکیب، ۲۴ ساعت پس از تهیه علیه آفت به کار برده شدند و تفاوت معنی‌داری از نظر بیمارگری و قابلیت زیست ندارند می‌توان گفت که احتمالاً مواد همراه در این فرآورده‌ها در حفظ قدرت زیستی اسپورها در کوتاه‌مدت تأثیر خود را نشان نداده است بلکه این تأثیر در طولانی مدت نمایان می‌شود، این نتیجه با نتایج Farsi-RahimAbadi (2003) مطابقت دارد که او نیز در کاربرد دو حالت قارچ تازه فرموله شده و فرموله نشده *Verticillium lecanii* روی شته‌ی جالیز، *Aphis gossypi* مشاهده کرد میزان بیمارگری این دو ترکیب روی شته یکسان می‌باشد. برابر بودن میزان بیمارگری این دو ترکیب از *Beauveria bassiana* در این آزمایش و *Verticillium lecanii* در مطالعات Farsi-RahimAbadi (2003) تایید کننده اثربخش بودن نقش مواد اضافه‌شده در حفظ زنده‌مانی اسپورها در طولانی‌مدت است.

از سوی دیگر، عدم تفاوت معنی‌دار بین دو حالت مذکور می‌تواند از این نظر هم مهم باشد که در فرآورده فرموله شده، مواد همراه روی اسپورها اثر سویی نداشته است. با توجه به تاثیر مواد همراه چنین استنباط می‌شود که به طور کلی مواد همراه مورد استفاده در این آزمایش از نظر حفاظت بلاستوسپورهای فرموله و نگهداری شده در دو دمای یخچال و آزمایشگاه درحد مطلوبی عمل کرده و لذا، انتخاب مواد مذکور جهت فرمولاسیون در این آزمایش‌ها در شروع تحقیقات فرآوری قارچ‌های بیمارگر حشرات تقریباً مناسب بوده، هر چند که مطالعات تکمیلی‌تر در رابطه با برهمکنش این مواد در ترکیب مورد نیاز است. در مقایسهٔ تیمار نگهداری شده در دمای یخچال با تیمار فرموله شده تازه، علیرغم این‌که میزان بیمارگری در هردو حالت، تفاوتی با هم ندارد ولی با توجه به مدت زمان ذخیره‌سازی (به ترتیب ۳۰ روز در دمای ۱±۴ درجه سلسیوس و یک روز در ۱±۴ درجه سلسیوس) تأثیر مثبت مواد همراه در حالت نگهداری شده در دمای یخچال مشخص می‌شود. مطالعات صورت گرفته در رابطه با اثر مواد همراه بر حفظ ویژگی‌های زیستی بلاستوسپور نیز بر این دلالت دارند که نوع و سازگاری مواد به‌کار رفته در فرآورده بلاستوسپور از عوامل تعیین کننده در بیمارگری فرآورده‌های تجاری بلاستوسپور می‌باشد (Altre *et al.* 1999, Altre and Vandenberg, 2001).

در حالت کلی، اثر مواد همراه را در نگهداری و حفظ اسپورها در دمای آزمایشگاه می‌توان مثبت ارزیابی کرد زیرا وقتی اسپورهای فرموله نشده در شرایط مشابه فرآورده موجود در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند، قابلیت زیست آنها بعد از ۳۰ روز به شدت کاهش یافت (حتی به صفر رسید) و این موضوع با نتایج دکال و همکاران مطابقت دارد (DeCal *et al.* 2002) که در آن قدرت زنده‌مانی کنیدی‌های تازه قارچ *Penicillium frequentans* بعد از ۳۰ روز ذخیره در دمای اتاق کاهش یافت و این بیانگر تأثیر مثبت مواد همراه است که در مدت ۳۰ روز، جدا از تأثیر دمای نگهداری، از نابود شدن اسپورها با توجه به ماهیت بیوشیمیایی‌شان حفاظت نموده‌اند.

به طور کلی، بیمارگری زیاد بلاستوسپور در حالت‌های مختلف فرموله شده (BMR, NFB) و نشده (NB) را شاید بتوان به ویژگی‌های خاص بلاستوسپورها از جمله سرعت تندش بیشتر ارتباط داد. در واقع، این تندش سریع‌تر یک مزیت اکولوژیک برای بلاستوسپورها به شمار می‌آید که باعث ایجاد بیماری در شرایط نامطلوب می‌شوند زیرا به رطوبت کمتری برای تندش و نفوذ در بدن حشره نیاز دارند (Vega *et al.* 1999). سرعت تندش اسپورهای فرموله شده نقش بسیار مهمی در موفقیت قارچ‌های بیمارگر به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در کنار سایر صفات فرآورده‌های بیولوژیک از جمله پایداری و ذخیره بیشتر و تحمل خشکی دارد

(Vega *et al.* 1999, 2003). لازم به ذکر است که در فرآوری ترکیبات بیولوژیک، روش‌ها و مواد همراهی باید انتخاب گردد که علاوه بر مقرون به صرفه بودن، نگهداری آنها در فاصله تولید تا انقضا، معطوف به شرایط محیطی خیلی خاص از جمله دمای کم نباشد. برای رسیدن به این امر به مطالعات بیشتر نیاز است تا با استفاده از فناوری‌های پیشرفته و مواد همراه مناسب، بتوان فرآورده‌ای تولید کرد که طی دوره ذخیره‌سازی حداقل ۶ ماه در دمای معمولی انبار (۳۰-۲۰ درجه سلسیوس)، ویژگی‌های حفاظتی و زیستی مواد همراه تحت تاثیر این دما قرار نگیرد و در زمان کاربرد، پتانسیل بیمارگری پروپاگول‌های قارچی در حد مطلوب باقی بماند. چون فراوری ایده‌آل ترکیبات بیولوژیک (از جمله قارچ‌های بیمارگر) یک فرآیند پیچیده و زمان‌بر است و از طرفی اطلاعات علمی منتشرشده در زمینه روش‌های تولید انبوه و فرمولاسیون این ترکیبات بسیار محدود و به صورت ثبت (Patent) می‌باشد، بنابر این، نتایج ارائه شده در این بررسی می‌تواند پایه‌ای ارزشمند برای پژوهش‌های مربوط به افزایش طول دوره حفظ مطلوب زنده‌مانی و بیمارگری اسپورهای قارچی و یا تغییر مقادیر یا جایگزینی مواد همراه در کشور باشد.

REFERENCES

Altre JA and Vandenberg JD (2001) Comparison of blastospores of two *Paecilomyces fumosoroseus* isolates: In vitro traits and virulence when injected in to fall armyworm, *Spodoptera frugiperda.* Journal of Invertebrate Pathology 78: 170-175.

Altre JA, Vandenberg J D and Cantone FA (1999) Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamond back moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed and attachment to cuticule. Journal of Invertebrate Pathology 73: 332-338.

Alves SB, Pereira RM, Stimac JL and Vieira SA (1996) Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. Biocontrol Science and Technology 6: 575-582.

Burges, HD (1998) Formulation of mycoinsecticides. *In*: Formulation of Microbial Biopesticides". (H D Burges, ed.), Kluwer Academic Publishes, Dordercht. pp. 131-185.

Capinera JL (2001) Hand book of vegetable pest. 1st ed. Academic Press, 729 pp.

DeCal A, Larena I, Guijarro B and Melgarejo P (2002) Solid state fermentation to produce conidia of *Penicillium frequentans*, a biocontrol agent against brown rot on stone fruits. Biocontrol Science and Technology 12: 715–725.

Edgington S, Segura H, Dela Rosa W and Williams T (2000) Photoprotection of *Beauveria bassiana*: testing simple formulations for control of the berry borer. Journal of Pest Management 46: 169-176.

Ezzati-Tabrizi R, Talaei-Hassanloui R and Pourian H (2009) Effect of formulating of *Beauveria bassiana* conidia on their viability and pathogenicity to the onion thrips, *Thrips tabaci* Lind (Thys.: Thripidae). Journal of Plant Protection Research 49: 97-104.

Farsi-RahimAbadi MJ (2003) Evaluation of nutritional media and environmental conditions for production and formulation of *Verticillium lecanii*. Ph.D. Dissertation in Agricultural Entomology, College of Agriculture, University of Tehran (In Persian).

Frantz G and Mellinger HC (1998) Potential use of *Beauveria bassiana* for biological control of thrips in peppers. Florida Entomologist 75: 400-408.

Goettel MS, Johnson DL and Inglis GD (1995) The role of fungi in the biological control of grasshoppers. Canadian Journal of Botany 73: 1-75.

Goettle MS and Inglis GD (1997) Fungi: Hyphomycetes. *In*: Manual of Techniques in Insect Pathology. (L. A. Lacey, ed.), Academic Press, San Diego, pp. 213-249.

Guijarro B, Melgarejo P and DeCal A (2007) Effect of stabilizers on the shelf-life of *Penicillium frequentans* conidia and their efficacy as a biological agent against peach brown rot. Journal of Food and Microbiology 113: 117-124.

Herron GA and James TM (2005) Monitoring insecticide in Australian *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) detects fipronil and spinosad resistance. Australian Journal of Entomology 44: 299-303.

Hong TD, Edgingron S, Ellis RH, Aquino de Muro M and Moore D (2005) Saturated salt solutions for humidity control and the survival of dry powder and oil formulations of *Beauveria bassiana* conidia. Journal of Invertebrate Pathology 89: 136-143.

Jackson MA and Erhan S (2006) Influence of formulation additives on the desiccation tolerance and storage stability of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Biocontrol Science and Technology 16: 61-75.

Jacobson R J, Chandler D, Fenlon J and Russell KM (2001) Compatibility of *Beauveria bassiana* with *Amblyseius cucumeris* to control *Frankliniella occidentalis* on cucumber plants. Biocontrol Science and Technology 11: 391-400.

Jensen SE (2000) Insecticide Resistance in the Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis*. Integrated Pest Management Review 5: 131-146.

Kucuk C. and Kivanc M (2005) Effect of formulation on the viability of biocontrol agent, *Trichoderma harzianum* conidia. African Journal of Biotechnology 4: 483-486.

Lacey L and Kaya H (2007) Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and other Invertebrate Pests. Second edition. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Larena I, DeCal A and Melgarejo P (2007) Effect of stabilizers on shelf-life of *Epicoccum nigrum* formulations and their relationship with biocontrol of post harvest brown rot by *Monilinia* of peaches. Journal of Applied Microbiology 102: 570-582.

Leora Software (1987) POLO-PC a user's guide to Probit or Logit analysis. Leora Software, Berkeley, CA.

Lewis T (1997) Thrips as crop pest. CAB International, Oxon, United Kingdom.

Luz Ch, Silva IG, Magalhaes B P, Cordeiro C MT and Tigano M S (1999) Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.: Preliminary assays on formulation and application in the field. Annual Society of Entomology in Brazil 28: 101-110.

Moore D, Bateman RP, Crey M and Prior C (1995) Long term of storage of *Metarhizium flavoviridae* conidia in oil formulation for the control of locusts and grasshoppers. Biocontrol Science and Technology 5: 193-199.

Moore D, Douro-kpindou K, Jenkins NE and Lomer CJ (1996) Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. Biocontrol Science and Technology 6, 51-61.

Pourian HR, Ezzati-Tabrizi R and Talaei-Hassanloui R (2008) An improved cage system for the bioassay of *Metarhizium anisopliae* on *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). Biocontrol Science and Technology 18: 745-752.

Püntener W (1981) Manual for field trials in Plant Protection. second edition. Agricultural Division, Ciba-Geigy Limited.

Sanchez JA, Alkazar A, Lacasa A, Llamas and Bielzap A (2000) Integrated pest management in sweet pepper plastic houses in the southeast of Spain. IOBC/WPRS Bulletin 23: 21-30.

Sandoval-Coronado CF, Luna-Olvera HA, Arevalo-Nino K, Jackson MA and Poprawski TJ (2001) Drying and formulation of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* produced in two different liquid media. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17: 423-428.

Sengonca C, Thungrabeab M and Blaeser P (2006) Potential of different isolates of entomopathogenic fungifrom Thailand as biological control agents against western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). Journal of Plant Disease and Protection 113: 74-80.

Shah PA, Aebi M and Tuor U (2000) Drying and storage procedures for formulated and unformulated mycelia of the aphid-pathogenic fungus *Erynia neoaphidis.* Mycological Research 104: 440-446.

Shi Z, Li M and Zhang L (2006) Effects of nutrients on germination of *Verticilium lecanii* conidia and infection of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). Biocontrol Science and Technology 16, 599-606.

Stephan D and Zimmermann G (1998) Development of a spray-drying technique for submerged spores of entomopathogenic fungs. Biocontrol Science and Technology 8: 3- 11.

SYSTAT (2000) Chicago, IL: SPSS Science Marketing Department SPSS Inc.

Thungrabeab M, Blaeser P and Sengonca C (2006) Effects of temperature and host plant on the efficacy of different entomopathogenic fungi from Thailand against *Frankliniella occidentalis* and *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) in the laboratory. Journal of Plant Disease and Protection 113: 181-187.

Ugine TA, Wright SP and Sanderson JP (2005) Acquisition of lethal doses of *Beauveria bassiana* conidia by western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* exposed to foliar spray residues of formulated and unformulated conidia. Journal of Invertebrate Pathology 90: 10-23.

Vega FE, Jackson MA and McGuires MR (1999) Germination of conidia and blastospores of *Paecilomycas fumosoroseus* on the cuticale of the silver leaf white fly, *Bemisia argentifolii*. Mycopathologia 147: 33-35.

Vega FE, Jackson, MA, Mercadier G and Poprawski TJ (2003) The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. Journal of Microbiology and Biotechnology 19: 363-368.

Biological Control of Pests and Plant Diseases,
No. 1, 2012

Effect of Prepared Wettable Powder Based on *Beauveria bassiana* (Asc., Cordycipitaceae) Blastospores Against the Onion Thrips, *Thrips tabaci* (Thys., Thripidae)

EZZATI-TABRIZI, R., TALAI-HASSANLOUI R., KHARAZI-PAKDEL A. and TALEBI KH.
Plant Protection Dept., University of Tehran
(Received: December 16, 2011 - Accepted: April 13, 2012)

ABSTRACT

Formulation of blastospores of entomopathogenic fungi may help to overcome unfavorable climatic conditions and may increase their effectiveness. In the present study, different products of wettable powder of blastospores were prepared for two isolates of *Beauveria bassiana* and were stored at two different temperature regimes, refrigerator (4±1°C) and laboratory (24±3°C) conditions. After storage durations (24 hours and 30 days), their effects were investigated against second instar larvae of the onion thrips. Results indicated that mortality percent of thrips larvae in blastospore's treatments maintained in laboratory (BML), blastospore's treatments maintained in refrigerator (BMR), new formulated blastospore (NFB) and new blastospore (NB) in 10^8 spore/ml concentration were 66, 89.4, 92.7 & 91% in *B. bassiana* EUT105 and 70, 93, 89.8 & 91 % in *B. bassiana* EUT116, respectively. These results indicated positive effects of storing at low temperature on preserving high viability in treatments maintained in refrigerator than those maintained in the laboratory. The results of this study can be valuable base for research on increasing stability and efficacy of fungal spores, changing or replacement of carrier ingredients in our country.

Keywords: *Beauveria bassiana*, blastospore, wettable powder, formulation, onion thrips

* Corresponding author:TALAI-HASSANLOUI, R. E-mail: rtalaei@ut.ac.ir