

کنترل بید گوجه‌فرنگی با استفاده از باکتری *Bacillus thuringiensis* و نماتد بیمارگر حشرات

المیرا ابوترابی* و شهرام فرخی

۱ و ۲- بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش کشاورزی، تهران، ایران

پست الکترونیکی نویسنده مسئول: elabootorabi@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱

چکیده

بید گوجه‌فرنگی یکی از آفات مهم و اقتصادی گوجه‌فرنگی است که لاروهای آن با تغذیه از برگ، ساقه و میوه خسارت قابل توجهی به محصول وارد می‌آورند. به دلیل خطرات سموم شیمیایی در محیط زیست و همچنین ایجاد مقاومت در این آفت، لازم است راه‌های جایگزین کنترل این آفت که در صورت طغیان قادر است تا ۱۰۰ درصد محصول را از بین ببرد جستجو شود. در همین راستا، تاثیر عوامل کنترل کننده زیستی از جمله نماتد بیمارگر حشرات گونه *Steinernema feltiae* و باکتری *B. thuringiensis* روی سنین مختلف لارو بید گوجه‌فرنگی در شرایط گلدانی مورد بررسی قرار گرفت. نماتد با غلظت ۱۱۲۴ عدد لارو سن سوم در هر میلی‌لیتر آب و باکتری با غلظت ۲/۵ میلی‌لیتر در هر لیتر آب (۲/۵ در هزار) در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که هر دو عامل کنترل زیستی نقش موثر در از بین بردن آفت بید گوجه‌فرنگی داشتند. مقایسه‌ی دو عامل با هم نیز، نشان داد که، میانگین تلفات سنین مختلف لارو بید گوجه‌فرنگی تحت تاثیر نماتد ۷۷/۵ درصد و تحت تاثیر باکتری ۴۰ درصد در مقایسه با تیمار شاهد بوده است. بنابراین نماتد حدود دو برابر بیشتر از باکتری در میزان مرگ و میر آفت بید گوجه‌فرنگی نقش داشته است.

واژه‌های کلیدی: توتا، کنترل بیولوژیک، نماتد، پارازیت حشرات.

مقدمه

نماتدها از دسته کرم‌های لوله‌ای هستند که با چشم دیده نمی‌شوند و در بیشتر نقاط کره زمین وجود دارند (شکل ۲). نماتدها در روده‌ی خود، باکتری‌هایی دارند که در کیسه‌ای جمع شده و وقتی به آفت حمله‌ور می‌شوند این باکتری‌ها را در بدن آفت رها می‌کنند و باعث مرگ آن می‌شوند (شکل ۳).



شکل ۱- مراحل زندگی بید گوجه‌فرنگی از تخم تا بلوغ

باکتری B.t.K^۶ نیز که یک حشره‌کش موفق در کشاورزی است، در بدن آفت هدف باعث ایجاد عفونت خونی می‌شود (هیerson^۷، ۱۹۸۶). لذا، این دو عامل کنترل‌کننده می‌توانند همراه با هم نقش مؤثری در از بین بردن آفت بید گوجه‌فرنگی داشته باشند.

شب‌پره مینوز یا بید گوجه‌فرنگی^۱ از راسته پولک‌بالان که توتا نیز خوانده می‌شود، یکی از مهم‌ترین آفات گوجه‌فرنگی است. در ایران این آفت برای اولین بار در سال ۱۳۸۹ از ارومیه و پس از آن از ۲۴ استان کشور گزارش شد (بنی‌عامری و چراغیان، ۲۰۱۱). البته این آفت هم‌اکنون در اکثر مناطق گوجه‌کاری ایران وجود دارد و در واقع از یک آفت قرنطینه خارجی خطرناک به یک آفت با انتشار گسترده در کشور تبدیل شده است (صفوی و صفوی، ۱۳۹۰). توتا حشره‌ای است که قدرت تولیدمثل بالایی دارد و می‌تواند در سال ۱۰ تا ۱۲ نسل ایجاد کند (سانینو و اسپینوزا^۲، ۲۰۱۰) که مراحل رشدی آن به ترتیب شامل تخم، ۴ سن لاروی، شفیره و حشره کامل است (شکل ۱). یکی از روش‌های مؤثر در کنترل این آفت، استفاده از روشی است که بتوان تولید-مثل آن را کنترل کرد که تاکنون در بسیاری از کشورها انجام شده و یا در حال انجام است (بلوم و استر^۳، ۲۰۱۱). در ایران، تا کنون مطالعه‌ای جهت کنترل آفت بید گوجه‌فرنگی توسط نماتد بیمارگر حشرات^۴ یا به اصطلاح EPN صورت نگرفته است و بررسی حاضر برای اولین بار توسط گونه *Steinernema feltiae*^۵ به مرحله اجرا در آمده است.

^۱ *Tuta absoluta* Meyrick (Lep: Gelechiidae)

^۲ Saninno and Spinosa

^۳ Bloem and Esther

^۴ Entomopathogenic nematodes

^۵ *Steinernema feltiae* Filipjev

^۶ *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*

^۷ Heierson et al

تکثیر و پرورش نماتد

پس از جمع‌آوری نمونه‌های خاک از مناطق بکر و دست‌نخورده از جمله خاک مراتع و جنگل‌ها که احتمال وجود نماتد بیمارگر حشرات در آن‌ها بیشتر است و انتقال ۲۰۰ گرم از هر نمونه خاک به درون ظروف شیشه‌ای، تعداد ۱۰ عدد لارو سن آخر کرم شب-پره موم‌خوار زنبور عسل^۱ یا به اصطلاح گالریا، به عنوان تله درون ظروف، در شرایط آزمایشگاه (دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس) رهاسازی و تله‌گذاری شد. ۴۸ ساعت پس از آن، در نمونه خاک‌هایی که نماتد وجود داشت، لاروهای گالریا به وسیله نماتدهای درون خاک، آلوده و بی‌تحرك شدند. جهت استخراج و شناسایی نماتدهای آلوده کننده، لاشه‌ی لاروهای گالریا به تله مخصوصی به نام تله وایت، انتقال یافت (وایت^۲، ۱۹۲۷). تله وایت شامل ظروف آزمایشگاهی (پتری‌دیش) درب‌دار پوشیده از کاغذ صافی است که با انتقال لاشه لاروهای آلوده گالریا به آن و مرطوب نگه‌داشتن، پس از ۷۲ ساعت لاروهای نماتد که درون بدن لاروهای گالریا حضور دارند، در سطح بدن لاشه و همچنین روی سطح داخلی درب پتری‌دیش تجمع یافته که با شستشو جمع‌آوری و به یخچال با دمای 8 ± 2 درجه سلسیوس منتقل شدند (شکل ۴). پس از انتقال لاروهای سن سوم آلوده کننده نر و ماده‌ی نماتد به گلیسرین خالص (دگریس^۳، ۱۹۶۹) و تهیه اسلاید دائم از آن‌ها، با کمک مشخصات ریخت‌شناسی و



شکل ۲- لارو نماتد بیمارگر حشرات



شکل ۳- محل تجمع باکتری در کیسه‌ای در ابتدای روده نماتد

روش انجام آزمایش

به منظور بررسی نقش نماتد بیمارگر حشرات *S.feltiae* و باکتری B.t.K در کنترل آفت بید گوجه-فرنگی، مراحل زیر انجام شد:

¹ *Galleria mellonella* Linnaeus

² White

³ De Grisse

دستیابی به جمعیت مورد نیاز از لاروهای سنین اول تا چهارم آفت فراهم شد (شکل ۵).



شکل ۵- پرورش بید گوجه‌فرنگی در قفسه‌های توری

آلوده‌سازی بید گوجه‌فرنگی توسط نماتد و باکتری

به منظور آلوده‌سازی آفت بید گوجه‌فرنگی توسط عوامل بیمارگر، پس از کاشت بذر گوجه‌فرنگی و پرورش نشاء در گلدان، تعداد ۳۰ عدد لارو از سنین مختلف بید گوجه‌فرنگی (شکل ۶) روی سطح برگ‌ها به کمک قلم مو رهاسازی شدند. ۲ تا ۳ روز بعد این لاروها روی سطح برگ‌ها دالان ایجاد کردند (شکل ۷).

محلول‌پاشی نماتد به صورت دستی به تعداد ۱۱۲۴ لارو نماتد در هر میلی‌لیتر آب که برای هر بوته گوجه‌فرنگی، ۱۵ میلی‌لیتر محلول حاوی نماتد در نظر گرفته شد، صورت گرفت.



شکل ۶- سنین ۴-۱ لارو بید گوجه‌فرنگی

ریخت‌سنجی جمعیت‌ها با استفاده از میکروسکپ نوری گونه مورد نظر شناسایی شد. لازم به ذکر است، لارو گالریا آلوده به نماتدگونه‌ی *S. feltiae* به رنگ، کرم تا قهوه‌ای روشن خواهد بود و در صورت آلودگی گالریا به سایر گونه‌های نماتد بیمارگر حشرات، لاشه‌ی گالریا به رنگ‌های دیگر تظاهر خواهد کرد.

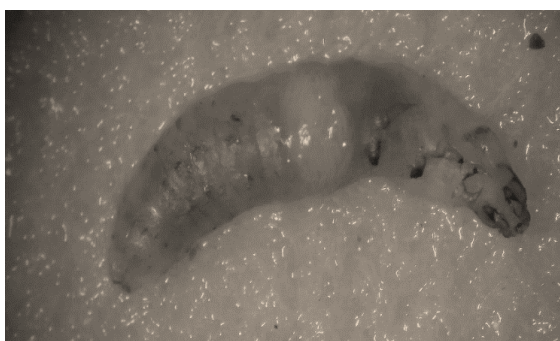


شکل ۴- لارو سن آخر پروانه موم خوار زنبور عسل (گالریا) آلوده به نماتد

پرورش آفت بید گوجه‌فرنگی

پس از جمع‌آوری حشرات بالغ نر و ماده بید گوجه‌فرنگی توسط آسپیراتور و تور حشره‌گیری از گلخانه‌های کشت گوجه‌فرنگی آلوده به بید، تعدادی از آن‌ها را روی بوته‌های سالم گوجه‌فرنگی درون قفس‌های توری در شرایط آزمایشگاه (دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس) رهاسازی نموده که پس از جفت‌گیری و تخم‌ریزی حشره‌ی ماده روی سطح برگ‌ها، امکان

شکل ۸- آلوده سازی برگ‌ها توسط نماتد به روش محلول‌پاشی



شکل ۹- لارو بید گوجه‌فرنگی آلوده‌شده توسط نماتد

به منظور آلوده‌سازی بید گوجه‌فرنگی توسط باکتری B.t.K، سطح برگ‌ها را با غلظت ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر از فرم تجاری باکتری (نام تجاری بلتورول^۱ از شرکت پروبلته کشور اسپانیا) محلول‌پاشی نموده و ۳۰ دقیقه پس از آن، سنبلین مختلف لارو بید گوجه‌فرنگی روی سطح برگ‌ها رهاسازی شدند. چهار روز بعد، لاروهای بیمار در سطح برگ جداسازی و بررسی شدند.

^۱. Beltorol (Problete CO.)



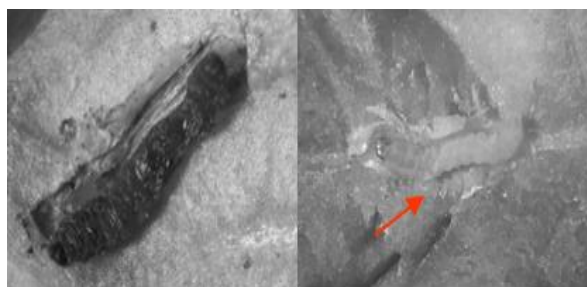
شکل ۷- رهاسازی لارو بید گوجه‌فرنگی و تشکیل دالان

از آنجاکه نماتدها به خشکی بسیار حساس هستند، به منظور مرطوب نگه داشتن سطح برگ‌ها و ممانعت از خشک شدن لارو نماتد، ضمن مرطوب نگه داشتن فضای گلخانه، طی چهار نوبت با فاصله زمانی هر شش ساعت یک‌بار، سطح زیرین و رویین برگ‌ها با محلول آماده‌سازی شده حاوی نماتد، محلول‌پاشی شد (شکل ۸)، پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت، با مشاهده لاروهای مرده و بی‌حرکت بید گوجه‌فرنگی روی سطح برگ (شکل ۹)، آن‌ها را جدا کرده و برای اطمینان از آلوده بودن به نماتد، لاشه‌ی لاروها به ظروف درب‌دار منتقل شده و پس از ۲۴ ساعت با مشاهده نماتدها در سطح بدن لاشه‌ها، جداسازی نماتدها انجام شد.



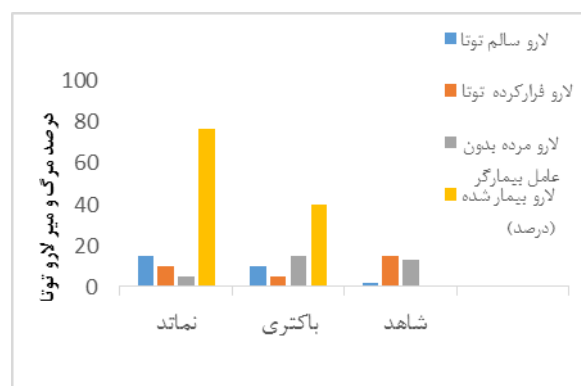
نتایج کاربردی

در این مطالعه، ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از محلول پاشی نماتد، اکثر لاروهای بید گوجه‌فرنگی در اثر آلودگی، بیمار شدند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- تجمع نماتد در سطح بدن بید گوجه‌فرنگی و خروج لارو از لاشه

صرف‌نظر از تعداد معدودی لارو زنده باقی مانده سالم در سطح برگ که احتمالاً از دسترس نماتد دور بوده‌اند و همچنین لاروهایی که پس از رها سازی، از سطح برگ فرار کرده بودند و یا به شفیره تبدیل شده بودند (شکل ۱۱)، کل میزان مرگ و میر بید گوجه‌فرنگی در تمام سنین لاروی آفت در گلدان‌های بیمار شده با نماتد، ۷۷ درصد بود.



شکل ۱۱- میانگین درصد مرگ و میر بید گوجه‌فرنگی در تمام

سنین لاروی توسط نماتد و باکتری در مقایسه با شاهد

نماتد قادر به بیمار نمودن تخم، لارو سن اول و شفیره‌ی بید گوجه‌فرنگی نبود چون منفذ ورودی روی سطح بدن یا نداشتند یا بسیار کوچک بود و نماتد قادر به ورود به داخل بدن آن‌ها نبود. با افزایش سن لاروها، میزان آلوده شدن آن‌ها نیز افزایش یافت و بیشترین سن لاروی بید گوجه‌فرنگی که مورد هدف نماتد قرار گرفت، لاروهای سنین سوم و چهارم بودند که به ترتیب ۸۵/۹ و ۷۵/۶ درصد مرگ و میر داشتند. طبق گزارش دودس و پیترز (۲۰۰۲)^۱، سنین بالاتر لارو بید گوجه‌فرنگی به دلیل داشتن جثه بزرگتر و منافذ طبیعی بزرگتر و قابل ورود برای نماتد، بیشتر مورد هدف قرار می‌گیرند. همچنین هالم و همکاران (۲۰۱۱)^۲ گزارش نمودند که چون در بدن لاروهای بزرگتر، سوخت و ساز بیشتر است، لذا موادی که برای جلب توجه نماتد ترشح می‌کنند، بیشتر است.

باکتری B.t. به صورت گوارشی عمل می‌کند و باعث عفونت خونی در بدن آفت می‌شود. در این بررسی، باکتری B.t. در مقایسه با نماتد که قادر بود ۸۵/۹ درصد لاروهای سن چهار را بیمار نماید، توانست ۷۶ درصد از این سن لاروی را مهار نموده و از طرفی، حدود ۶۷ درصد از لاروهای سن اول آفت را که نماتد قادر به نفوذ به داخل بدن آن‌ها نبود، بیمار نماید که بر این اساس طبق گزارش گویستولین و همکاران (۲۰۰۱)^۳ باکتری

¹ Dowds and Peters

² Hallem et al

³ Guistolin et al

توصیه‌های ترویجی

با توجه به تاثیر مکملی دو عامل بیمارگر نماتد *S. feltiae* و باکتری *B. thuringiensis* (B.t.) روی لاروهای سنین مختلف بید گوجه‌فرنگی، و از سوی دیگر ایمن و بی‌خطر بودن این ترکیبات برای محیط زیست، موجودات غیر هدف، انسان و منابع آب و خاک، کاربرد این دو ترکیب به صورت تلفیقی به کشاورزان و به ویژه گلخانه‌داران توصیه می‌شود. از این‌رو، استفاده از نماتد حشره‌خوار فوق در ترکیبات تجاری موجود با تراکم جمعیت ۱۱۲۴ عدد لارو سن سوم در هر میلی‌لیتر آب و باکتری B.t. از ترکیب تجاری بلتیرول با غلظت ۲/۵ میلی‌لیتر در هر لیتر آب (۲/۵ در هزار) قابل استفاده است.

B.t. قادر است آفت را حتی در مراحل اولیه زندگی و قبل از نفوذ به داخل بافت گیاه، مورد هدف قرار دهد. پس از برآورد درصد تلفات لارو بید گوجه‌فرنگی در هر یک از سنین لاروی تحت تاثیر دو عامل کنترل زیستی، در مجموع، میانگین درصد تلفات آفت بید گوجه‌فرنگی در تمام سنین لاروی تحت تاثیر نماتد و باکتری به ترتیب ۷۷/۵ و ۴۰ درصد تعیین شد. در بوته‌های گوجه‌فرنگی شاهد (بدون محلول‌پاشی نماتد و باکتری)، تنها ۱۲ درصد تلفات لاروها مشاهده شد که ناشی از شرایط محیطی بود.

به این ترتیب بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق مشخص شد که نماتد حشره‌خوار مورد مطالعه، لاروهای سنین سه و چهار آفت را که بیشترین خسارت را به میوه و برگ‌ها وارد می‌کنند؛ به خوبی کنترل می‌نماید و از سوی دیگر باکتری B.t. نیز لاروهای سن اول آفت را قبل از ورود به داخل بافت‌های گیاه و شروع خسارت هدف قرار می‌دهد، لذا تلفیق کاربرد این دو ترکیب به صورت توأم، می‌تواند بسیار موثر باشد.

منابع

صفوی، ا و صفوی، م. ۱۳۹۰. شب‌پره مینوز گوجه فرنگی، شکل‌شناسی، زیست‌شناسی، روش‌های ردیابی و مدیریت. کتابچه ترویجی. ۹۵ صفحه.

Baniameri, V. and Cheraghian, A. 2011. The current status of *Tuta absoluta* in Iran and Initial control strategies In: International symposium on management of *Tuta absoluta* (tomato borer) proceeding. Agadir, Morocco, November 16-18.

Bloem, S. and Esther, S. 2011. New pest response guidelines tomato leafminer (*Tuta absoluta*). USDA.

De Grisse, A. 1969. Redescription ou modifications de quelques techniques utilisees dans L' etude Nematodes Phytoparasitaires. Meded, Rijksfaculteit der landbouwe_ tenschappen. Gent, 34: 351-369.

Dowds, B.C.A. and Peters, A. 2002. Virulence mechanisms. Pp. 79-98 in R. Gaugler, ed. Entomopathogenic nematology. New York, NY: CABI.

Giustolin, T.A., Vendramim, J.D., Alves, S.B. and Vieira, S.A. 2001. Susceptibility of *Tuta absoluta* (Meyrick) Lep, Gelechiidae) reared on two species of Lycopersicon to *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. Journal of Applied Entomology.,125:551-556.

Hallem, E.A., Dillman, A.R., Hong, A.V., Zhang, Y., Yano, J.M., DeMarco, S.F. and Sternberg, P. W. 2011. A sensory code for host seeking in parasitic nematodes. Current Biology, 21: 377-383.

Heierson, A., Sidén, I., Kivaisi, A and Boman, H.G. 1986. Bacteriophage-resistant mutants of *Bacillus thuringiensis* with decreased virulence in pupae of *Hyalophora cecropia*. Journal of Bacteriology, 167(1): 18-24.

Sannino, L. and Espinosa, B. 2010. *Tuta absoluta*. Guida alla conoscenza e recenti acquisizioni per una corretta difesa. 113 pp.

White, G. F. 1927. A method for oB.t.aining nematode infected larvae from cultures. Science., 66: 302-303.