



دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

عنوان:

بررسی آزمایشگاهی بی‌مارگری ویروس
چندوجهی هسته‌ای *MbNPV* و پارازیتیسم
زنبور *Habrobracon hebetor* روی لارو پروانه
Spodoptera exigua برگخوار چغندر قند،

نگارنده:

محمد مهدی ربیعہ

استاد راهنما:

دکتر علی اصغر سراج

اساتید مشاور:

حسن رحیمی و رضا طلایی حسنلوی

زمستان 1387



چکیده پایان نامه

| |
|---|
| نام خانوادگی: ربیع |
| نام: محمد مهدی |
| عنوان پایان نامه: بررسی آزمایشگاهی بی‌مارگری ویروس چندوجهی هسته‌ای MbNPV و پارازی‌تسم زنبور <i>Habrobracon hebetor</i> روی لارو پروانه برگ‌خوار چغندر قند، <i>Spodoptera exigua</i> |

| |
|---|
| |
| استاد راهنما: دکتر علی اصغر سراج |
| درجه تحصیلی: کارشناسی ارشد گرایش: حشره‌شناسی کشاورزی |
| دانشگاه: شهید چمران اهواز |
| دانشکده: کشاورزی |
| تاریخ فـارغ التحصـیلی: تعداد صفحات: 99 |
| کلید واژه ها: <i>Spodoptera exigua</i> ، <i>Habrobracon hebetor</i> ، <i>MbNPV</i> ، بی‌مارگری، پارازی‌تیسم، ایندوکساکارب |
| <p>خلاصه فارسی:</p> <p>پروانه برگخوار چغندرقند، <i>Spodoptera exigua</i> Hub. یکی از مهم ترین آفات چغندرقند در ایران و بسیاری از کشورهای دنیاست که کشاورزان هر ساله چندی نوبت برای کنترل آن اقدام به سم پاشی می کنند. باکولوویروس ها از جمله عوامل بیولوژیک موثری هستند که می توانند به همراه عوامل دیگر در مدیریت تلفی این آفت مورد استفاده قرار گیرند. به این منظور، آزمایش های با استفاده از ویروس <i>Mamestra brassicae</i>NPV و سم ایندوکساکارب روی لاروهای سنین مختلف این آفت انجام شد. همچنین برهمکنش این ویروس و زنبور پارازی‌توئید <i>Habrobracon hebetor</i> (Hym., Braconidae) روی لاروهای پروانه برگخوار چغندرقند مورد بررسی قرار گرفت. لاروهای سنین مختلف این حشره روی برگ های چغندرقند به عنوان غذای طبیعی و در شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد و 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی پرورش داده شدند. اطلاعات مربوط به مرگ و میر لاروهای سن دوم با توجه به دزهای لگاریتمی ویروس <i>MbNPV</i> نشان دهنده حساسیت بالای لاروها به ویروس <i>MbNPV</i> است. LD_{50} و LD_{90} ویروس به ترتیب $51/4$ و $868/5$ پلی هدر بر میلی مترمربع سطح ماده غذایی محاسبه گردید و خط $y = 1/2539x + 2/8593$ مناسبتی خط پیش‌بینی کننده تلفات لاروهای سن دوم کرم برگخوار چغندرقند با توجه به دز ویروس <i>MbNPV</i> است. LT_{50} ویروس روی لاروهای سن دوم $5/32$ روز محاسبه شد. نتایج بررسی اثر ویروس روی لاروهای سنین مختلف نشان داد که بین تمام سنین مختلف لاروی پروانه برگخوار چغندرقند از نظر حساسیت به ویروس مورد نظر اختلاف معنی داری وجود دارد به طوری که با افزایش سن لاروی میزان حساسیت به ویروس کاهش می یابد در حالی که در مورد سم ایندوکساکارب با وجود کاهش حساسیت با افزایش سن لاروی، اختلاف معنی داری بین حساسیت دو سن لاروی متوالی وجود نداشت. دز ویروس و زمان بین آلودگی لاروها به ویروس و پارازیته شدن آن ها اثر معنی داری روی بقاء و پارازی‌تیسم زنبور <i>H. hebetor</i> دارد. آلودگی لاروهای پروانه برگخوار چغندرقند به ویروس <i>MbNPV</i> دارای اثر منفی روی بقاء و پارازی‌تیسم زنبور <i>H. hebetor</i> می باشد. با افزایش فاصله بین آلودگی به ویروس و پارازی‌تیسم زنبور <i>H. hebetor</i> درصد خروج حشرات کامل زنبور پارازی‌توئید به طور معنی داری افزایش می یابد. درصد خروج حشرات کامل زنبور پارازی‌توئید با افزایش دز ویروس به طور معنی داری کاهش می یابد. پارازی‌تیسم زنبور</p> |

H. hebetor روی لاروهای آلوده به ویروس با افزایش دز ویروس یا کاهش فاصله زمانی بین آلودگی به ویروس و پارازیته شدن لاروها به طور معنی داری کاهش می یابد.

فهرست مطالب

مقدمه.....

.....

.....

1

فصل اول: بررسی منابع

1-1- گیاه میزبان (چغندر قند)

.....

.....

5

1-2- حشره هدف (کرم برگخوار چغندر قند)

.....

.....

6

1-2-1

..... اهمیت

.....

.....

7

1-2-2- میزبان-ها

.....

.....

.....
8 .

پراکنندگی
درجهان
.....

8
شناسی ریخت
.....

9
حشره
.....

کامل
.....

9
تخم
.....

.....
.....

9
لارو
.....

10.
شفیره
.....

.....
.....

11.
خسارت
.....

.....
.....

12
زیست-
.....

..... شناسی

.....
12

1-2-7- عوامل مؤثر در طغیان کرم برگخوار چغندر
قند.....

15

1-2-8- مقاومت مراحل مختلف رشدی کرم برگخوار چغندر قند به
دماهای

پایین.....
1-8-2-1 تخم

.....
.....

16

1-8-2-2- لارو

.....
.....

16

1-8-2-3- شفیره

.....
.....

16

1-8-2-4- حشرات کامل

.....
.....

16

1-2-9- تأثیر نوسانات دما و فتوپریود بر تحمل سرما در کرم
برگخوار
چغندرقند.....

16 ...
1-3- دشمنان طبیعی کرم برگخوار
چغندرقند.....

.....
.....

17

1-3-1- زنبور پارازی‌توئید *Habrobracon hebetor* Say

20

1-3-1-1- دامنه میزبانی و پراکنش زنبور *Habrobracon*

21

1-3-1-2- ریخت شناسی زنبور *Habrobracon*

22

1-3-1-3- زیست‌شناسی زنبور

24

1-3-2- ویروس‌های بیماری‌ارگر حشرات

26

1-3-2-1- تاریخچه و اهمیت

26

1-3-2-2- رده‌بندی ویروس‌های بیماری‌ارگر حشرات

27

1-3-2-3- دامنه میزبانی باکولوویروس‌ها

30

1-3-2-4- ساختمان باکولوویروس‌ها

30

1-2-2-5- خصوصیات فیزیکی - شیمیایی باکولوویروس-
ها

32

1-3-2-6- زیستشناسی باکولوویروس-
ها

34

1-3-2-7- آسبشناسی و علائم ظاهری باکولوویروس-
ها

36

1-3-2-8- پایبندی باکولوویروسها در
محیط

39

1-3-2-8-1- نور خورشید
.....

39

1-3-2-8-2-
.....

دما
.....

40

1-3-2-8-3-
.....

رطوبت
.....

40

1-3-2-8-4- PH
.....

محیط
.....

40

1-3-2-9- مقاومت حشرات به باکولوویروس-
ها

.....
41 ..

1-3-2-10- تأثیر نوسانات جمعیت میزبان بر باکولوویروسها
.....
41

1-3-2-11- تأثیر گیاه میزبان بر حساسیت حشرات به
باکولوویروسها.....
42

1-3-2-12- تأثیر گذر دادن سریالی برکشندگی باکولوویروسها
.....
42

1-3-2-13- تأثیر باکولوویروسها بر دشمنان طبیعی آفات
.....
43

1-3-2-14- بی‌مارگر- حشره میزبان (ویروس NPV - لارو پروانه
برگخوار چغندر قند)
43

1-3-3-3- برهمکنش ویروسها و پارازیتوئید-
ها.....
.....
45

1-3-4- مقایسه اثر باکولوویروسها و حشره کش های
شیمیایی.....
47

1-4- س
ایندوکساکارب.....
.....
48

فصل دوم: مواد و روش ها

2-1- برورش کرم برگخوار
چغندر قند.....
.....
49

2-1-1- نگه داري
لاروها
.....
.....
49

2-1-2- نگه داري حش رات
کامل
.....
.....
50

2-1-3- نگه داري تخم-
ها
.....
.....
51

2-1-4- نگه داري ش فیره ه
.....
.....
51

2-2- مش کلات پ رورش
.....
.....
52

2-2-1- کاهش زنمده ماني و تفريخ تخم-
ها
.....
.....
52

2-2-2- اچ اساد اس ترس در لاروها
.....
.....
52

2-2-3- آلودگي کلي بي به عوام ل
بیماري
.....
.....
53

3-2- ضد عفونی مراحل مختلف زندگی کرم برگخوار چغندر قند و برگ
مورد تغذیه آن..... 54

2-3-1- ضد عفونی تخم

ها.....
.....

54

2-3-2- ضد عفونی

شفی ره.....
.....

54

2-3-3- ضد عفونی شاخ و برگ

.....
.....

54

2-4- اندازه گیری میزان تغذیه سنین مختلف لار و برگخوار چغندر قند
از برگ

چغندر..... 54

2-5- تهیه مایه تلقیح

ویروسی.....
.....

55

2-5-1- تهیه سوسپانسیون مادر

ویروس.....
.....

55

2-5-2- تعیین تراکم اجسام چند وجهی در واحد حجم

.....

57

2-6- بررسی اثرات مختلف ویروس MbNPV روی کرم برگخوار
چغندر قند.....

57

2-6-1- اثر دزهاي مختلف ويروس روي لارو سن دوم و تعيين LD₅₀
57

2-6-2- حساسيت لاروهاي سنين مختلف كرم برگخوار چغندر قند به ويروس
60

2-7- حساسيت لاروهاي سنين مختلف كرم برگخوار چغندر قند به سم ايندوكسكارب
60

2-8- بررسي برهمكنش ويروس و زنبور پارازيتوييد *Habrobracon hebetor*
62

2-8-1- بررسي ميزان پارازيتيسم زنبور هابروبراكون روي لاروهاي آلوده بيروس
62

2-8-2- بررسي بي-مارگري ويروس روي لاروهاي پارازي-ته شده برگخوار چغندر قند
63

2-9- تجزيه اطلاعات حاصل از آزمون ايشه ها
64

فصل سوم: نتايج و بحث

3-1- ميزان تغذيه سنين مختلف لارو برگخوار چغندر قند از برگ چغندر
65

3-2- اثرات مختلف ويروس *MbNPV* روي كرم برگخوار چغندر قند
66

3-2-1- تاثير دزهاي مختلف ويروس روي لاروهاي سن دوم
66

4 : Supprimé

4 : Supprimé

4 : Supprimé

4 : Supprimé

3-2-2-2- رابطه بین زمان و مرگ و میر ایجاد شده در لاروهای سن دوم
.....

70

4 : Supprimé

3-2-3- حساسیت لاروهای سنین مختلف به ویروس
.....

71

4 : Supprimé

3-3-3- حساسیت لاروهای سنین مختلف کرم برگخوار چغندر قند به سم
ایندوکساکارب.....

74

4 : Supprimé

3-4-4- برهمکنش ویروس MbNPV و زنبور پارازیتوئید
هابروبراکون.....

76

4 : Supprimé

3-4-1- میزان پارازیتیسیم زنبور روی لاروهای آلوده به
ویروس.....

76

4 : Supprimé

3-4-2- میزان بیماری‌گری ویروس روی لاروهای پارازیت‌ه شده
.....

81

منابع مورد استفاده.....

98

چکی انگلیسی.....

.....

مقدمه

افزایش آگاهی انسان از زیان‌های ناشی از استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی مانند تأثیر بر جانداران غیر هدف، ظهور و گسترش گونه‌های مقاوم آفات همچنین آفات ثانویه، تأثیر سموم بر سلامت انسان و حیوانات اهلی، آلودگی آب‌های زیرزمینی، کاهش تنوع زیستی و دیگر نگرانی‌های محیطی منجر به افزایش علاقه به استفاده از موارد جایگزین این آفت‌کش‌ها شده است.

در بین موارد جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی، بیماری‌گرهای حشرات که تحت نام عوامل کنترل میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند، جایگاه ویژه‌ای دارند. علم بیماری‌شناسی بی‌مهرگان به صورت حرفه‌ای قدمت زیادی ندارد. گرچه ریشه‌های آن را می‌توان در تاریخ باستان و در استفاده از محلول‌های برای پیشگیری از بیماری در زنبور عسل و کرم ابریشم یافت. محققین زیادی استفاده از قارچ‌ها را به عنوان عوامل کنترل میکروبی در اواخر قرن نوزدهم بررسی کردند. اما تا هنگامی که باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner به عنوان یک عامل میکروبی توسعه پیدا نکرده بود، استفاده از عوامل میکروبی برای کنترل حشرات آفت گسترش زیادی نیافته بود.

امروزه انواع مختلفی از بیماری‌گرهای حشرات برای کنترل آفات در گلخانه‌ها، باغ‌ها، مزارع، محصولات انباری، جنگل‌ها و حتی علی‌ه آفات و ناقلین بیماری‌ها در دامپزشکی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ارگانیسم‌های بیماری‌زای حشرات که به عنوان عوامل کنترل میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند، شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها، پروتوزوا و نماتدها هستند.

مقایسه عوامل بیماری‌زای حشرات با آفتکش‌های شیمیایی متداول، کارایی بالا و با صرفه بودن آن‌ها را از نظر اقتصادی نشان می‌دهد. این عوامل دارای فواید بسیاری مانند ایمنی برای انسان و جانداران غیر هدف، عدم وجود بقایای سمی در مواد غذایی، افزایش فعالیت دشمنان طبیعی و افزایش تنوع زیستی در اکوسیستم هستند. این عوامل همچنین دارای مزایایی نسبت به سایر عوامل بیولوژیک مانند امکان کاربرد آن‌ها با وسایل و ابزار معمول و امکان تولید آن‌ها در شرایط مصنوعی و همچنین امکان نگهداری آن‌ها برای مدت نسبتاً زیاد هستند.

همانند سایر دشمنان طبیعی، بیماری از عوامل بیماری‌زای حشرات برای گونه یا گونه‌های میزبان اختصاصی هستند و برخی از آن‌ها می‌توانند کنترل بلند مدتی ایجاد کنند. البته این عوامل نقاط ضعفی نیز دارند که بیشتر مربوط به عدم پایداری، سریع نبودن اثر روی میزبان، اختصاصی بودن (دامنه میزبانی خیلی محدود) و هزینه بالای تولید آنها نسبت به آفتکش‌های شیمیایی متداول است.

تمهیدات استفاده از ارگانیسم‌های بیماری‌زای حشرات به طور کلی مانند سایر عوامل کنترل بیولوژیک است. مانند دیگر دشمنان طبیعی، عوامل بیماری‌زای حشرات نیز می‌توانند کنترل مناسبی بر جمعیت‌های هدف داشته باشند. اپیدمی‌های طبیعی ایجاد شده به وسیله ویروس‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای حشرات اغلب می‌تواند باعث از بین رفتن جمعیت‌های طبیعی حشرات آفت شود. اپیدمی‌های ایجاد شده در جمعیت‌های طبیعی زنبورهای برگ‌خوار مانند *Neodiprion sp.* ، *Gilpinia hercyniae* H. و پروانه ابری‌شم باف

ناجور، *Lymantria dispar* L. و چندین آفت دیگر اغلب نیاز به دخالت عوامل دیگر را برطرف می‌کند.

با این وجود تکیه بر وقوع اپیدمی‌های طبیعی عوامل بیماری‌زای حشرات برای مدیریت حشرات آفت به دلیل غیر قابل پیش‌بینی بودن عوامل اداره کننده آن ریسک بزرگی است. همچنین به دلیل این که بسیاری از عوامل بیماری‌زای حشرات وابسته به انبوهی جمعیت می‌زبان هستند، اپیدمی آن‌ها بعد از گذشتن جمعیت آفت از آستانه اقتصادی رخ می‌دهد.

به طور کلی عوامل بیماری‌زای حشرات در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات که هدف آنها دسترسی به یک کنترل موثر، انتخابی و با حداقل اختلال در محیط زیست و سلامتی انسان است، از جمله ابزارهای ایده آل کنترل آفات به شمار می‌روند.

با وجود تنوع زیاد عوامل بیماری‌زای حشرات، هنوز تعداد کمی از آنها به عنوان حشره‌کش در سطح وسیع و تجارتي به کار رفته‌اند. تعداد زیادی از عوامل بیماری‌زا در سطح تجارتي قابل بهره‌برداری هستند، اما هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند. با وجود افزایش تولید تجاری حشره‌کش‌های میکروبی این گروه از حشره‌کش‌ها تنها 1-1/5 درصد از کل بازار آفت‌کش‌ها را تشکیل می‌دهند که بیشتر شامل فرآورده‌های تجارتي مختلف باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner است (68).

در آینده نزدیکی آفت‌کش‌های میکروبی رقابت نزدیکی با آفت‌کش‌های شیمیایی جدید و گیاهان دستکاری شده ژنتیکی (تراریخته) خواهند داشت. بهینه شدن تولیدات میکروبی، افزایش آگاهی‌ها از فواید کنترل میکروبی آفات و نیاز به توسعه جای‌گزین‌هایی برای ترکیبات

شیمی‌ای متداول، بسیاری از موانع پیش روی کنترل میکروبی آفات را برطرف می‌کند.

ویروس‌های بی‌مارگر حشرات یکی از مهم‌ترین گروه‌های عامل بی‌ماری در حشرات هستند که شامل خانواده‌های مختلفی می‌شوند. خانواده *Baculoviridae* که با ژنوم DNA حلقوی دو رشته‌ای و ویریون پوشش‌دار میله‌ای مشخص می‌شود، بزرگترین و اصلی‌ترین گروهی است که بیشترین مطالعه بر روی آنها انجام شده است. باکولوویروس‌ها به همراه حشرات میزبان خود یک سیستم مناسب برای بررسی برهمکنش‌های عاملی بی‌ماری‌زا - میزبان ایجاد می‌کنند.

برخی از باکولوویروس‌ها در نوسانات فصلی جمعیت میزبان‌های خود موثر هستند و می‌توانند به عنوان عوامل کنترل میکروبی در مدیریت حشرات آفت بکار گرفته شوند.

در این تحقیق سعی شده با بررسی قدرت بیمارگری یک گونه از باکولوویروس‌ها به نام *Mamestra brassicae* Nucleopolyhedrovirus روی کرم برگ‌خوار چغندر قند که یکی از مهم‌ترین آفات زراعی در دنیا و کشورمان است، و مقایسه آن با تأثیر یکی از سموم شیمیایی رایج و همچنین بررسی تأثیر این ویروس بر فعالیت یکی از زنبورهای پارازیتوئید این آفت، پتانسیل آن را برای استفاده

در برنامه‌های مدیریت تلفیقی کرم برگخوار چغندر قند ارزیابی کنیم.

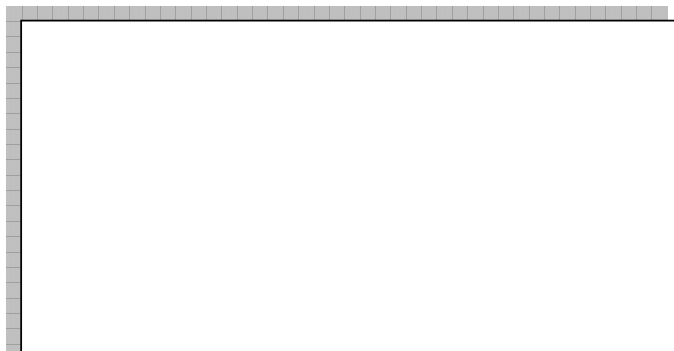
با توجه به این که کرم برگخوار چغندر قند گونه‌ای از خانواده *Noctuidae* می‌باشد و این خانواده به‌عنوان یکی از خانواده‌های میزبان ویروس *MbNPV* ذکر شده است. این تحقیق با اهداف زیر انجام شد:

1- تخمین زهراگینی ویروس روی کرم برگخوار چغندر قند در آزمایشگاه

2- تعیین حساسیت کرم برگخوار چغندر قند به سم ایندوکساکارب

3- تعیین برهمکنش ویروس و زنبور پارازیتوئید *Say*.

Habrobracon hebetor



1-1- گیاه میزبان (چغندر قند)

چغندر قند گیاهی است از خانواده *Chaenopodiaceae* با نام علمی *Beta vulgaris* L. که (همراه با نیشکر) یکی از دو محصول مهم تأمین کننده ساکارز می‌باشد. مبدأ این گیاه را اروپای مرکزی و مدیترانه و از گیاه *Beta maritima* می‌دانند. در این منطقه از حدود سه هزار سال قبل گونه‌های مختلفی از چغندر را جهت مصرف برگ آن می‌کاشتند (19). کشت این گیاه در اروپا از قرن پنجم و ششم میلادی در یونان و رومانی متداول شد. در آن زمان برگ این گیاه به عنوان سبزی و عصاره ریشه آن برای تهیه شربت‌هایی که شباهت به عسل داشته و عسل‌گیاهی نامیده می‌شود