

بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر در کارایی قارچ *Beauveria bassiana* در کنترل شب‌پره موم‌خوار بزرگ (*Galleria mellonella* L.) با روش سطح پاسخ

علی حیدری^۱ - شاهرخ قرنچیک^{۲*} - علی درخشان شادمهری^۳ - علیرضا شعبانی نژاد^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۴

چکیده

شب‌پره موم‌خوار بزرگ (*Galleria mellonella* L.) یکی از آفات بسیار مهم محصولات انباری و کندوهای عسل است که برای کنترل آن از سموم شیمیایی استفاده می‌شود. در این پژوهش روش سطح پاسخ به منظور تعیین نقاط بهینه غلظت‌های مختلف کنیدی قارچ *Beauveria bassiana* جهت دستیابی به بیشینه مرگ و میر مورد بررسی و تأثیر فاکتورهای دما (۲۵-۳۵ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت (۷۰-۸۰ درصد) و غلظت‌های 1×10^6 - 1×10^8 کنیدی/میلی‌لیتر بر روی میزان مرگ و میر لارو سن پنجم شب‌پره موم‌خوار مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش‌ها بر اساس طرح کامپوزیت مرکزی و روش سطح پاسخ، انجام شد. بر اساس آزمایش‌های انجام شده شرایط بهینه جهت دستیابی به بیشینه مرگ و میر لارو سن پنج به ترتیب دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۵ درصد و غلظت 1×10^8 کنیدی/میلی‌لیتر تعیین گردید. نتایج آزمایش، بیانگر تأثیرات خطی و درجه دوم غلظت مصرفی و دما روی مرگ و میر لارو سن پنج شب‌پره موم‌خوار بزرگ بود.

واژه‌های کلیدی: روش سطح پاسخ، *Beauveria bassiana*، *Galleria mellonella*

مقدمه

درجه اول موم زنبور عسل است (۱۲ و ۲۵). تمیجی و اکبرزاده (۳۵) میزان خسارت سالیانه این آفت را در ایران ۳۸ درصد برآورد نموده‌اند. کارن (۵) زیان سالانه وارده توسط این آفت را در آمریکا بالغ بر ۵ میلیون دلار تخمین زده است. چانگ و سی (۶) در تحقیقی نیز زیان این آفت را در تایوان بیش از ۴ میلیون دلار در سال برآورد کرده‌اند. با توجه به اهمیت اقتصادی زیان وارده توسط این آفت کنترل آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. عمده‌ترین روش کنترل این آفت در بیشتر کشورها استفاده از ترکیبات شیمیایی است. اما این ترکیبات دارای معایبی از جمله باقیمانده سموم در موم، بروز مقاومت در آفت و اثرات جبران ناپذیری روی محیط زیست و انسان هستند (۷ و ۱۳). کاهش مصرف مواد شیمیایی از اهداف اصلی مدیریت آفات است. یکی از راه‌های کاهش مصرف سموم، استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک می‌باشد که جایگزین مناسبی برای کاربرد وسیع آفت‌کش‌های شیمیایی محسوب می‌شود (۳۴). در میان عوامل میکروبی، قارچ‌ها به دلیل نحوه اثر تماسی دارای جایگاه ویژه‌ای هستند و علاقه بشر برای بکارگیری قارچ‌های بیماری‌زای حشرات جهت کنترل حشرات آفت افزایش یافته است (۳۲). بیش از ۷۰۰ گونه قارچ متعلق به ۹۰ جنس باعث ایجاد بیماری در حشرات می‌شوند

آفات انباری یکی از مشکلات اساسی در انبارداری محصولات کشاورزی هستند که خسارت حاصله باعث تغییر ترکیب شیمیایی، رنگ و مزه محصول شده در نتیجه نه تنها ارزش تجاری و مرغوبیت آن به شدت کاهش می‌یابد بلکه گاهی مشکلات بهداشتی قابل توجهی را نیز در مورد مصرف‌کنندگان، اعم از انسان، دام و طیور به بار می‌آورند. در ایران در انبارهای سنتی میزان این خسارت بین ۱۰ تا ۸۰ درصد گزارش شده است (۲).

شب‌پره موم‌خوار بزرگ (*Galleria mellonella*) (Lepidoptera: Pyralidae) یکی از آفات بسیار مهم محصولات انباری و کندوهای عسل است. این آفت در تمام دنیا و از جمله ایران در انبارهای مواد غذایی خسارت ایجاد می‌کند و در مرحله لاروی آفت

۱ و ۴- دانش‌آموخته گان کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و حشره‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

۲- استادیار ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، دانشگاه صنعتی شاهرود

*- نویسنده مسئول: (Email: gharanjik@shahroodut.ac.ir)

۳- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

DOI: 10.22067/jpp.v30i4.52462

۳۰×۱۵ سانتی‌متر حاوی مقداری موم قدیمی سیاه نگه‌داری شدند. با در نظر گرفتن طول کامل دوره لاروی، از لاروهای ۱۴-۱۳ روزه پس از تفریح به عنوان لاروهای سن آخر برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

نمونه‌برداری از خاک

در این تحقیق جهت جداسازی قارچ *B. bassiana*، از نمونه خاک جمع‌آوری شده از شهرستان اهواز در استان خوزستان با مختصات $31^{\circ}24'30.41''$ N و $48^{\circ}47'39.16''$ E استفاده شد.

جداسازی *B. bassiana* از لارو آلوده

جداسازی *B. bassiana* توسط روش طعمه حشره‌ای^۲ انجام شد، به این صورت که میزان ۲۰ گرم از هر نمونه خاک را با ال‌ک ۱ میلی‌متری غربال و در تشتک‌های پتری شیشه‌ای ۱۰ سانتی‌متری استریل ریخته شد. تعداد ۱۰ عدد لارو پروانه موم‌خوار بزرگ زنبور عسل *G. mellonella* در سنین ۳ یا ۴ را در هر تشتک پتری استریل قرار داده و تشتک‌های پتری را با استفاده از پارافیلیم درزگیری شده و این ظروف در دمای 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد و با رطوبت نسبی $5 \pm$ ۷۰ درصد داخل اطاقک رشد و در شرایط تاریکی نگهداری شد (۲۴). در روزهای اولیه نمونه‌ها جهت تماس بیشتر لاروها با خاک تکان داده شدند. لاروهای مرده (که دارا و یا فاقد رشد قارچی بودند) را با الکل اتیلیک ۹۶ درصد و کلراکس ۳ درصد به مدت ۱ دقیقه ضدعفونی سطحی و با آب مقطر استریل ۳ بار آبشویی شدند. لاروهای مرده ضدعفونی شده بطور جداگانه داخل تشتک‌های پتری شیشه‌ای استریل ۱۰ سانتی‌متر، حاوی کاغذ صافی استریل مرطوب قرار داده شده، سپس در دمای 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد و با رطوبت نسبی $5 \pm$ ۷۰ درصد داخل اطاقک رشد و در شرایط تاریکی انتقال داده شدند. بعد از اسپورزایی، جهت خالص‌سازی قارچ از روش تک اسپور کردن استفاده شد.

خالص‌سازی *B. bassiana* از لارو آلوده

برای این کار ابتدا مقداری از اسپورهای قارچ از سطح بدن لارو را به درون لوله آزمایش اتوکلاو شده حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون ۰/۰۲ درصد توئین ۸۰ انتقال داده شد و پس از دو دقیقه ورتکس، حجمی معادل ۱ میلی‌لیتر، به لوله دوم انتقال داده شد تا نسبت ۱ به ۱۰ بدست آید. بدین روش برای هر جدایه، سوسپانسیونی با 10^{-3} اسپور آماده گردید. اسپورها در زمینه میکروسکوپ به طور مجزا و قابل تشخیص بودند بطوری‌که تعداد ۱ تا ۲ عدد اسپور با بزرگنمایی $40 \times$

(۱۸). این قارچ‌ها قادر به آلوده کردن همه مراحل رشدی حشرات آفت در انبارها، گلخانه‌ها و شرایط مزرعه هستند (۴). رایج‌ترین گونه‌های قارچ‌های بیماری‌زای حشرات مربوط به جنس‌های *Beauveria*، *Metarhizium*، *Paecilomyces*، *Lecanicillium*، *Nomuraea*، از *Tolypocladium* هستند (۸). قارچ *Beauveria bassiana* یکی از عوامل بیماری‌زای حشرات است که مطالعات زیادی روی بیماری‌زایی آن انجام شده است. این قارچ در سراسر جهان پراکنش داشته و دارای طیف میزبانی وسیعی روی حشرات است (۳۶). مطالعات زیادی در مورد تأثیر جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* در حشرات انجام شده است. بررسی‌ها نشان داده است که این قارچ باعث مرگ و میر آفات محصولات انباری از جمله *G. mellonella* (۱۴)، *Tribolium castaneum* (۲۸)، *Sitophilus zeamais* (۱۵)، *Rhyzopertha dominica* (۲۳)، *Callosobruchus maculatus* (۲۲) و *Ephestia kuehniella* (۹) می‌شود. روش سطح پاسخ، مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است که در بهینه‌سازی فرآیندهایی به کار می‌رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در این روش از تحلیل‌های رگرسیونی جهت بدست آوردن معادلات بهینه برای تخمین مقادیر استفاده می‌شود. با کمک این طرح آماری، در حالی که کیفیت اجرای آزمایشات حفظ می‌شود، تعداد آزمایش‌ها کاهش می‌یابد. لذا این پژوهش با هدف ارزیابی روش سطح پاسخ به منظور تعیین نقاط بهینه غلظت‌های مختلف کنیدی قارچ *B. bassiana*، تأثیر فاکتورهای دما و رطوبت بر روی میزان مرگ و میر لارو سن پنجم شب‌پره موم‌خوار انجام شد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

لاروهای شب‌پره موم‌خوار بزرگ از کندوهای زنبور عسل روستاهای اطراف شاهرود به عنوان کلنی اولیه جمع‌آوری و به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود منتقل گردید. برای پرورش حشرات از ظرف‌های پلاستیکی با ابعاد $30 \times 15 \times 20$ سانتی‌متر حاوی موم قدیمی سیاه استفاده گردید. دهانه ظروف با پارچه‌های نسبتاً ضخیم پوشیده شده بود تا لاروهای این آفت به علت تحرکات زیاد و قطعات دهانی جویده قادر به سوراخ نمودن پارچه نباشند. پرورش انبوه این حشره در دمای 30 ± 1 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی $5 \pm$ ۸۵ درصد و دوره نوری ۱۴:۱۰ ساعت (تاریکی:روشنایی) انجام پذیرفت. برای اطمینان از همسان بودن لاروها دسته‌های متعدد تخم گذاشته شده به وسیله حشرات کامل این آفت توسط قلم مو برداشته شد و درون ظروف جداگانه با ابعاد $20 \times$

۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت یک لامل استریل را بر روی لام قرار داده و در محیط این لامل تعداد ۱۰۰ کنیدی که دارای لوله جوانه‌زنی با هر طولی که بودند و کنیدی‌هایی که فاقد لوله جوانه‌زنی بودند شمارش شدند و درصد جوانه‌زنی با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد (۲۹). برای صحت شمارش، این عمل سه بار تکرار شد.

$$\text{Germination (\%)} = (a / a + b) \times 100 \quad (\text{معادله ۱})$$

Germination (%) = درصد جوانه‌زنی

a = تعداد اسپور جوانه‌زده

b = تعداد اسپور جوانه‌نزده

آزمایشات زیست‌سنجی

آزمون مقدماتی برای تعیین دامنه غلظت، دما و رطوبت

برای تعیین محدوده اثربخشی غلظت‌های کشنده قارچ *B. bassiana*، آزمایشات زیست‌سنجی انجام شد. آلوده‌سازی لاروهای سن پنج با روش غوطه‌ور سازی به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت و نتایج پس از ۲۴ ساعت ثبت شد. آزمایشات زیست‌سنجی برای تعیین غلظت‌های کشنده قارچ *B. bassiana* که تلفات ۲۰٪ تا ۸۰٪ را ایجاد می‌کردند، انجام شد. غلظت‌های 1×10^6 - 1×10^8 کنیدی/میلی‌لیتر به ترتیب به عنوان حد بالا و حد پایین کشندگی مشخص شدند. دمای لازم برای فعالیت مناسب این قارچ بین ۱۸ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد متغیر (۲۱) و رطوبت مورد نیاز هم بین ۷۰ تا ۸۰ درصد مشخص شد (۱۹).

طراحی و اجرای آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

مهمترین مسئله این پژوهش بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای مورد بررسی بود، از این رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد. در این پژوهش اثر متغیرهای مستقل شامل X_1 دما، X_2 رطوبت و X_3 غلظت قارچ مصرفی مورد ارزیابی قرار گرفت که در جدول ۱ نشان داده شده است. شش تکرار نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش استفاده شد.

در ضمن، متغیرها بر اساس معادله ۲ کدگذاری شدند: X_i مقدار بدون بعد متغیر مستقل فرآیند، X_i مقدار واقعی متغیر مستقل فرآیند، X مقدار واقعی متغیر مستقل در نقطه مرکزی و ΔX_i تغییر پله‌ای است.

$$x_i = (X_i - x_{\square}) / \Delta X_i \quad (\text{معادله ۲})$$

$$X_{1=} (دما - ۳۰) / ۵$$

$$X_{2=} (رطوبت - ۷۵) / ۵$$

$$X_{3=} (۱ \times 10^7 - غلظت مصرفی) / ۱ \times 10^1$$

مشاهده شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به آب-آگار ۱/۲٪ انتقال یافت و پس از درزگیری تستک‌های پتری با پارافیلیم به انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳ روز منتقل شد. با مشاهده میسلیوم‌های تندش شده، با استفاده از مارکر این میسلیوم‌ها را در پشت تستک پتری مشخص نموده و هر کدام از این تک‌کلی‌ها به محیط کشت PDA (حاوی ۴۰ گرم دکستروز، ۱۵ گرم پپتون، ۱۰ گرم عصاره مخمر و ۱۲ گرم آگار با اسیدیته ۶/۳) انتقال داده شد. تستک‌های پتری مواد غذایی فوق در دمای 1 ± 27 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 5 ± 70 درصد در شرایط تاریک قرار گرفتند تا پرگنه قارچ تشکیل شود. پس از گذشت ۲ هفته، جدایه خالص بدست آمد (۱۰).

شناسایی میکروسکوپی جدایه *B. bassiana*

برای تشخیص گونه قارچ جداسازی شده، اقدام به تهیه‌ی اسلاید و رویت اسلاید با استفاده از میکروسکوپ نوری شد (۱۷). جهت شناسایی نمونه از چندین کلید تاکسونومی استفاده گردید (۳۳، ۳۱ و ۱۶). مشخصاتی که برای شناسایی مورد استفاده قرار گرفتند شامل اندازه، رنگ و شکل اسپور، اتصال آنها به هیف، وجود یا عدم وجود دیواره‌ی عرضی و اندام اتصالی می‌باشد. در این مطالعه از جدایه مورد بررسی اسلاید تهیه شد و در نهایت، جدایه بدست آمده *B. bassiana* تشخیص داده شد.

تکثیر قارچ

جدایه قارچ در محیط کشت انتخابی SDAY شامل ۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم پپتون، ۲۰ گرم دکستروز، ۱۲ گرم آگار، ۰/۵ گرم سیکلوهاگزامید، ۰/۲ گرم کلرامفنیکل، ۰/۲ گرم استرپتومایسین و ۰/۵ گرم دودین ۶۵ درصد در یک لیتر آب مقطر استریل کشت شدند (۳۷). کشت‌های قارچی در شرایط دمایی 1 ± 27 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 5 ± 70 درصد و دوره نوری ۸ : ۱۶ به مدت ۳ هفته نگهداری شدند. اسپورهای قارچ از کشت‌های تهیه شده با استفاده از یک لوپ استریل به یک لوله استریل منتقل شده و ۲۰ میلی‌لیتر آب استریل دارای ۰/۰۲ درصد توئین ۸۰ اضافه شد و پس از ورتکس، با استفاده از لام گلبول شمار، تعداد اسپورهای تولیدی شمارش گردید.

آزمون جوانه‌زنی اسپور

آزمون جوانه‌زنی اسپور برای این جدایه انجام شد و جوانه‌زنی اسپور ۹۸٪ را نشان داد. برای انجام آزمون جوانه‌زنی در ابتدا، اقدام به تهیه‌ی سوسپانسیون با غلظت 1×10^6 کنیدی/میلی‌لیتر با استفاده از لام گلبول شمار شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون را بر روی لام حاوی محیط کشت PDA انتقال داده شد و لام را در دمای

جدول ۱- نمایش متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آنها

Table 1- Independent variables of process and their values

متغیرهای مستقل Independent variables	نماد ریاضی Mathematical symbol	کد و سطح مربوطه Code and the relevant		
		-1	0	+1
دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)	X ₁	25	30	35
رطوبت (درصد) Humidity (%)	X ₂	70	75	80
غلظت مصرفی (کنیدی/میلی لیتر) Concentration(conidia/ ml)	X ₃	1×10 ⁶	1×10 ⁷	1×10 ⁸

نتایج و بحث

شناسایی میکروسکوپی جدایه *B. bassiana*

قارچ *Beauveria* بر روی جلد بیرونی حشره پوشش سفید رنگی از میسیلیوم را ایجاد می‌کند (شکل ۱) و در سطح محیط کشت SDAY پشم مانند، کرک‌دار و پودری سفید رنگ به نظر می‌رسد. رشته‌های میسیلیومی این قارچ استوانه‌ای، بی‌رنگ و دارای دیواره عرضی بوده، رنگ پرگنه ابتدا سفید بوده سپس به رنگ زرد کم‌رنگ در می‌آید (شکل ۲) (۱۷).

کنیدی‌های قارچ *B. bassiana* شفاف، گرد تا تخم‌مرغی شکل، یک سلولی و به صورت انفرادی بر روی زواید کوچکی تشکیل می‌شوند (شکل ۳) (۱۷).

گزینش مدل مناسب و تجزیه مدل برازش یافته

به طور متداول جهت بررسی صحت مدل از آزمون عدم برازش^۲، ضریب تبیین^۳ (R²) و ضریب تبیین تعدیل شده (R²adjusted) استفاده می‌شود (۳). معنی‌دار بودن آزمون عدم برازش برای یک مدل بیانگر این است که نقاط به خوبی اطراف مدل قرار نگرفته‌اند و نمی‌توان از مدل برای پیش‌گویی مقادیر متغیرهای تابع استفاده نمود. بنابراین با عدم معنی‌داری آزمون عدم برازش، می‌توان دریافت که مدل به خوبی می‌تواند بر داده‌های مورد بررسی برازش شود. مطابق جدول ۲ آزمون عدم برازش معنی‌دار نیست که بیانگر این است که مدل به خوبی روند داده‌ها را نشان می‌دهد. از طرفی ضریب تبیین تعدیل شده (R²adjusted) نیز به منظور اطمینان از این مسئله که مدل می‌تواند به خوبی جواب‌ها را تخمین بزند محاسبه شد. هر چه (R²) به یک نزدیک باشد، قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می‌باشد (۳).

طرح آزمایشی گزینش شده و رابطه مدل مورد استفاده برای پیش‌بینی، برازش شده و مورد ارزیابی قرار گرفت. در روش سطح پاسخ بر اساس نتایج حاصل از آزمایش برای هر متغیر مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید، شکل کلی مدل به صورت زیر می‌باشد:

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{11} X_1^2 + B_{22} X_2^2 + B_{33} X_3^2 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{23} X_2 X_3$$

Y پاسخ پیش‌بینی شده، B₀ ضریب ثابت، B₁، B₂، B₃ اثرات خطی، B₁₁، B₂₂، B₃₃ اثرات مربعی و B₁₂، B₁₃، B₂₃ اثرات متقابل می‌باشد. از نرم افزار Design Expert 7.0.0 جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ و همچنین از آنالیز واریانس (ANOVA) به عنوان روش آماری آنالیز پاسخ‌ها استفاده شد.

در این تحقیق از طرح کامپوزیت مرکزی^۱ با سه متغیر مستقل شامل دما، رطوبت، غلظت مصرفی، و شش تکرار در نقطه مرکزی طرح (برای محاسبه تکرارپذیری فرآیند) به منظور بررسی افزایش مرگ و میر و کاهش غلظت مصرفی استفاده شد. تعداد آزمایشات ۲۰ بود و متغیر وابسته (پاسخ)، میزان مرگ و میر لارو سن پنجم شب‌پره موم‌خوار بزرگ بود. برای هر آزمایش تعداد ۱۰ عدد لارو سن آخر شب‌پره موم‌خوار بزرگ به صورت تصادفی انتخاب شد و سپس ۱۰ ظرف تشتک پتری استریل که در هر ظرف یک عدد لارو سن آخر آلوده به قارچ به همراه موم استریل برای تغذیه آفت آماده شد و در نهایت تمامی ظروف به اتاقک رشد انتقال داده شدند و پس از ۴ روز میزان مرگ و میر این آفت شمارش و ثبت شد. مرحله آخر شامل ارائه گرافیکی رابطه‌ی مدل و تعیین شرایط عملیاتی بهینه بود که به وسیله نمودار سه بعدی سطح پاسخ انجام پذیرفت.

2- Lack of Fit
3- Coefficient of Determination

1- Central Composite Design

میر نشان داده شده است. وجود انحنای در شکل به دلیل معنی‌داری جمله درجه دوم است. افزایش مرگ و میر با افزایش غلظت به این دلیل است که در غلظت‌های بالایی از کنیدی این قارچ، تعداد کنیدی بیشتری با بدن لارو سن پنجم شب‌پره موم‌خوار بزرگ تماس داشته و خیلی سریعتر لارو را آلوده و نابود می‌کند (۲۷). در تحقیقی که به بررسی تأثیرگذاری قارچ *B. bassiana* روی سوسک ریز غلات *R. dominica* صورت گرفته، مشخص شده است که با افزایش غلظت کنیدی‌های این قارچ میزان مرگ و میر این حشره بیشتر خواهد شد (۲۲). همچنین کاربرد این قارچ روی سوسک لوبیا *C. maculatus* در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که با افزایش غلظت، مرگ و میر حشرات بالغ نیز افزایش یافت (۲۳).

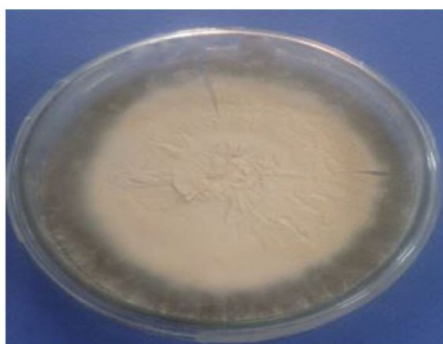
بر اساس جدول ۲ برای فاکتور مرگ و میر لارو سن پنجم شب‌پره موم‌خوار بزرگ، مدل درجه دوم از نظر آماری معنی‌دار ($P \leq 0.001$) و همچنین مقدار بالای R^2 و متناسب بودن R^2 adjusted بیانگر قدرت بالای مدل در پیش‌بینی می‌باشد.

تأثیر متغیرهای مستقل بر پاسخ‌ها

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود جملات خطی و درجه دوم غلظت مصرفی و دما معنی‌دار است. تأثیر غلظت مصرفی بر روی میزان مرگ و میر لارو سن پنجم شب‌پره موم‌خوار بزرگ بدون لحاظ نمودن تغییرات سایر متغیرها، به صورت خطی و درجه دوم بود که با افزایش تدریجی غلظت مصرفی میزان مرگ و میر افزایش یافت. در شکل ۴ اثر هم‌زمان غلظت مصرفی و رطوبت بر روی میزان مرگ و

لارو آلوده به قارچ *Beauveria*
Larva infected to fungus *Beauveria*

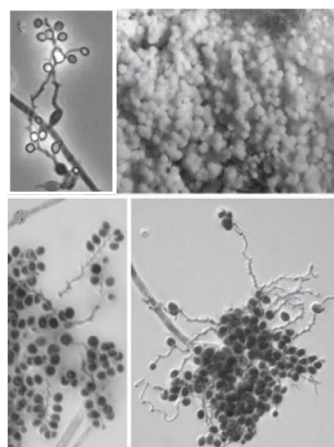
لارو آلوده به قارچ *Metarhizium*
Larva infected to fungus *Metarhizium*



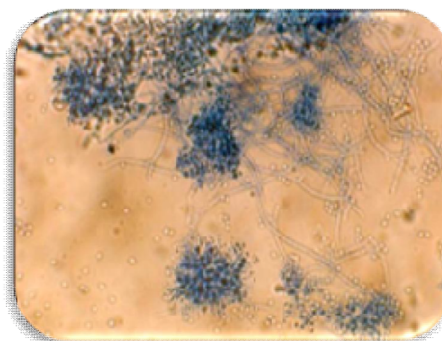
شکل ۲- پرگنه قارچ *B. bassiana* در محیط کشت SDAY
Figure 2- Colony of fungus *B. bassiana* in medium SDAY



شکل ۱- رهاسازی لارو شب‌پره موم‌خوار بر روی محیط خاک
Figure 1- Release of larva wax-eater on soil environment

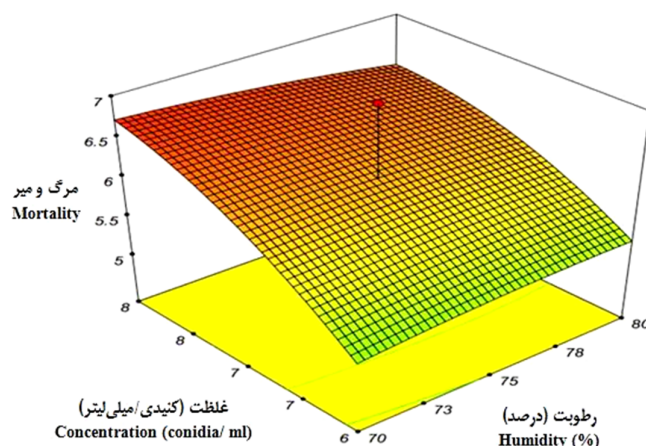


شکل ۳- شمایی از قارچ *B. bassiana* در زیر میکروسکوپ
Figure 3- Pictorial of fungus *B. bassiana* under microscope



جدول ۲- آنالیز واریانس (ANOVA) برای مدل درجه دوم سطح پاسخ
Table 2- Variance analysis (ANOVA) for the response surface quadratic model

منابع تغییرات Sources of Variation	مجموع مربعات Sum of Squares	درجات آزادی Degrees of Freedom	میانگین مربعات Mean of Squares	F-value	P-value	
مدل Model	40.29	9	4.48	16.82	0.0001	معنی دار Significant
درجه حرارت (A) (A) Temperature	27.58	1	27.58	86.52	0.0001	
رطوبت (B) (B) Humidity	0.034	1	0.034	0.13	0.7280	
غلظت (C) (C) Concentration	5.12	1	5.12	19.25	0.0014	
AB	0.12	1	0.12	0.47	0.5087	
AC	0.12	1	0.12	0.47	0.5087	
BC	0.12	1	0.12	0.47	0.5087	
A ²	6.92	1	6.92	26.02	0.0005	
B ²	0.013	1	0.013	0.064	0.8052	
C ²	5.38	1	5.38	25.44	0.009	
عدم برازش مدل Lack of Fit	2.61	5	0.52	3.13	0.1178	عدم معنی داری Not significant
باقیمانده Residual	3.44	16	0.21			
خطای خالص Pure Error	0.83	5	0.17			
R ² adjusted	0.9211					
R ²	0.9430					



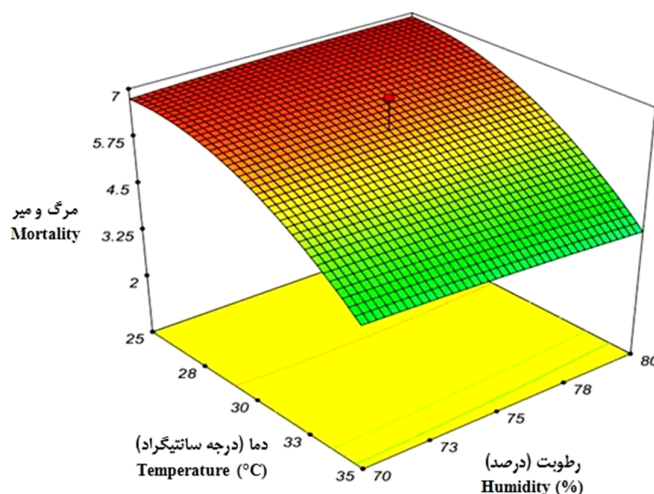
شکل ۴- اثر غلظت مصرفی کنیدی قارچ و رطوبت بر روی مرگ و میر لارو سن پنجم شب پره موم خوار بزرگ
Figure 4- Effects of fungus conidia concentration and humidity on mortality of fifth instar greater wax-eater larva

هم‌زمان دما و رطوبت بر روی میزان مرگ و میر نشان داده شده است که وجود انحنای در شکل به دلیل معنی‌داری جمله درجه دوم دما می‌باشد. بر این اساس با افزایش دما میزان مرگ و میر این آفت

تأثیر دما بر روی میزان مرگ و میر لارو سن پنجم شب پره موم‌خوار بزرگ بدون لحاظ نمودن تغییرات سایر متغیرها، به گونه‌ای بود که با افزایش دما میزان مرگ و میر کاهش یافت. در شکل ۵ اثر

مطابقت داشت. لازم به ذکر است جهت بررسی اثر رطوبت بر روی مرگ و میر لارو سن پنجم شب‌پره موم‌خوار بزرگ رطوبت از ۷۰ تا ۸۰ درصد بررسی شد، نتایج جدول ۲ بیانگر عدم تأثیر این فاکتور بر روی مرگ و میر بود. در مورد اثرات خطی برای فاکتورهای مورد بررسی، ضریب رگرسیون خطی مربوط به فاکتور دما و غلظت مصرفی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود.

کاهش یافت. علت کاهش مرگ و میر با افزایش دما احتمالاً این است که یکی از خصوصیات مهم این قارچ رابطه فعالیت آن با درجه حرارت است، به این ترتیب که در دامنه دمایی ۲۵-۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه در این آزمایش نیز، دمای پایین‌تر تأثیر بیشتری بر میزان مرگ و میر داشته است. این نتیجه با مطالعات فرون (۱۱) و فم (۳۰) مبنی بر افزایش اثرگذاری قارچ در دمای‌های پایین



شکل ۵- اثر دما و رطوبت مصرفی بر روی مرگ و میر لارو سن پنجم شب‌پره موم‌خوار بزرگ
Figure 5- Effects of humidity and temperature on mortality of fifth instar greater wax-eater larva

دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۵ درصد و غلظت 1×10^4 کنیدی/میلی‌لیتر تعیین گردید. با توجه به اینکه شرایط بهینه توصیه شده توسط مدل در آزمایشات ما وجود داشت نیازی به مرحله اعتبارسنجی مدل نبود. با توجه به قدرت تأیید شده پیش‌بینی مدل این مدل می‌تواند کارایی قارچ را در محدوده سطوح تعریف شده برای هر فاکتور شبیه‌سازی و مشخص نماید.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از پژوهش بیانگر کارایی بالای این روش در بهینه‌سازی مصرف این قارچ بیماری‌زای حشرات بود. از میان شرایطی که بر روی مرگ و میر اعمال شد، مشخص شد که افزایش مرگ و میر از رابطه مستقیم و درجه دوم غلظت مصرفی و دما تأثیر می‌پذیرد، به طوری که افزایش غلظت مصرفی افزایش مرگ و میر را در پی دارد. از طرفی افزایش دما باعث کاهش مرگ و میر شد.

با بکارگیری روش آماری سطح پاسخ، معادله ۴ که نشان دهنده ارتباط تجربی متغیرهای آزمایش و میزان مرگ و میر به صورت کدگذاری شده است، به صورت زیر به دست آمد:

$$Y = 40.29 - 1.42X_1 + 0.61X_3 - 0.75X_1^2 - 0.22X_3^2 \quad (\text{معادله ۴})$$

بهینه‌سازی

شرایط عملیاتی بهینه برای بیشترین مرگ و میر لارو سن پنجم شب‌پره موم‌خوار بزرگ، با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی^۱ جست و جو شد (۲۰). بدین منظور، در ابتدا اهداف بهینه‌سازی را مشخص کرده و سپس سطوح پاسخ متغیرهای مستقل را تنظیم و با استفاده از تکنیک فاین تیونینگ^۲ بهترین جواب‌ها به دست آمد (۱) و (۲۶). تنظیمات اعمال شده بر فرآیند بهینه‌سازی، شامل مرگ و میر پیشینه بود. نتایج فرآیند بهینه‌سازی نشان داد شرایط بهینه جهت دستیابی به بیشینه مرگ و میر لارو سن پنج (۷/۲ لارو) به ترتیب

1- Numerical Optimization
2- Fine tuning

- 1- Atkinson A.C., and Donev A.N. 1992. Optimum experimental designs. Oxford University Press, 5: 132-189.
- 2- Bagheri-Zenouz E. 2014. Pests and harmful factors warehouse and they control management: Bioecology insects, ticks and microorganisms. University of Tehran Press, pp. 476. (in Persian).
- 3- Baldini M., Danuso F., Turi M., and Vannozzi G.P. 2004. Evaluation of new clones of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for inulin and sugar yield from stalks and tubers. *Industrial Crops and Products*, 19: 25-40.
- 4- Barbarin A.M., Jenkins N.E., Rajotte E.G., and Thomas M.B. 2012. A preliminary evaluation of the potential of *Beauveria bassiana* for bed bug control. *Journal of Invertebrate Pathology*. 111: 82-85.
- 5- Caron D.M. 1992. Wax moth, *Journal of American Bee*, 132: 647-649.
- 6- Chang C.P., and Hsieh F.K. 1992. Morphology and bionomics of *Galleria mellonella* Linnaeus, *China Journal of Entomology*, 12: 121-129.
- 7- Colter D. 1995. Those pesky wax moths controls, *Journal of American Bee*, 135: 647-649.
- 8- Devi P.S.V., Prasad Y.G., Chowdary D.A., Rao L.M., and Balakrishnan K. 2003. Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) samson for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Journal of Mycopathology*. 156(4): 365-373.
- 9- Draganova S., and Markova E. 2006. Bioassays with isolates of entomopathogenic fungi against *Ephestia kuehniella* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 12: 637-643.
- 10- El Damir M. 2006. Variation in germination, virulence and conidial production of single spore isolates of entomopathogenic fungi in response to environmental heterogeneity. *Journal of Biological Sciences*. 6(2): 305-315.
- 11- Ferron P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*. 23: 409-442.
- 12- Goldansaz H. 1992. Biological study of *Galleria mellonella* Linnaeus under laboratory conditions and controlled storage conditions, M. Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran (in Persian).
- 13- Goodman R.D., Williams P., Oldroyd B.P., and Hoffman J. 1990. Studies on the use of phosphine gas for the control of greater wax moth (*Galleria mellonella*) in stored honey bee comb, *Journal of American Bee*, 130(7): 473-477.
- 14- Heidari A., Gharanjik Sh., and Derakhshan Shadmehri A. 2014. Introduction and study pathogenicity of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against larva wax-eater honey bee (*Galleria mellonella*) in laboratory conditions. The First Electronic Conference New Findings in the Environment and Egricultural Ecosystems, New Energies and Environment Research Institute University of Tehran, Iran. (in Persian).
- 15- Hidalgo E., Moore D., and Patourel G. L. 1998. The effect of different formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais* in stored maize. *Journal of Stored Products Research*. 34(2): 171-179.
- 16- Humber R.A. 1997. Fungi: identification. In *Manual of Techniques in Insect Pathology* Edited by Lacey L. A., pp. 409.
- 17- Humber R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi, second edit. Academic Press: Elsevier.
- 18- Inglis G.D., Goettle M.S., Butt T.M., and Strasser H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. pp. 23-69. In: Butt T.M., Jackson C., and Magan N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI International/AAFC, Wallingford, United Kingdom.
- 19- James E.T., and Lord J.C. 2003. Tritrophic interactions and storage pest control: interaction of the fungus *Beauveria bassiana* with resistant oat varieties for control of *Oryzaephilus surinamensis*. *Insect Pathology and Microbial Control*. 4: 153-170.
- 20- Joglekar A.M., and May A.T. 1987. Product excellence through design of experiments, *Cereal Food World*, 32: 857-868.
- 21- Latifian M., Soleymannezhadian E., Ghazavi M., Hayati j., Mosadegh S.M.S., and Nikbakht P. 2009. Evaluation of three *Beauveria bassiana* isolates on saw-toothed beetle *Oryzaephilus surinamensis* and the effect of different temperature on their germination and mycelium growth. *Journal of Entomology and Phytopathology*. 77(1): 151-168. (in Persian).
- 22- Lord J.C. 2005. Low humidity, moderate temperature, and desiccant dust favor efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Biological Control*. 34: 180-186.

- 23- Mahdneshtin Z., Vojoudi S., Ghosta Y., Safaralizade M.H., and Saber M. 2011. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungi, Iranian isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin against the control of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). African Journal of Microbiology Research. 5(29): 5215-5220.
- 24- Meyling N.V. 2007. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. In Department of Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen Denmark, pp. 1-18.
- 25- Mohandass S., Arthur F.H., Zhu K.Y., and Throne J.E. 2007. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. Journal of Stored Products Research. 43: 302-311.
- 26- Myers R.H., Montgomery D.C., and Anderson-cook, Ch.M. 2009. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. Third Edition. Wiley, New York. pp. 704.
- 27- Navon A., and Ascher K.R.S. 2000. Bioassay of entomopathogenic microbes and nematodes. CABI publishing. pp. 324.
- 28- Padin S., Dal Bello G., and Fabrizio M. 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. Journal of Stored Products Research. 38(1): 69-74.
- 29- Petlamul W., and Prasertsan P. 2012. Evaluation of Strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. Mycobiology 40(2): 111-116.
- 30- Pham T.A., Kim J.J., and Kim K. 2010. Optimization of solid-state fermentation for improved conidia production of *Beauveria bassiana* as a mycoinsecticide. The Korean Society of Mycology, 38: 137-143.
- 31- Poinar G.O., and Thomas G.M. 1984. Laboratory guide to insect pathogens and parasites. Plenum Press, New York, pp. 392.
- 32- Roy H.E., Brodie E.L., Chander D., Goettel M.S., Pell J.K., Wajnberg E., and Vega F.E. 2010. Deep space and hidden depths: understanding the evolution and ecology of fungal entomopathogens. BioControl. 55: 1-6.
- 33- Samson R.A., Evans H.C., and Latge J.P. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, The Netherlands, pp 187.
- 34- St Leger R.J., Frank D.C., Robert D.W., and Staples R.C. 1992. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. European Journal of Biochemistry. 204(3): 991-1001.
- 35- Tamiji Y., and Akbarzadeh M. 1983. Bee and diseases. Khod kafai Press, Tehran, Iran. pp. 149. (in Persian).
- 36- Wraight S.P., Carruthers R.I., Jaronski S.T., Braddedly C.A., Garaz C.J., and Galanini-Wraight S. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Biological Control. 17: 203-217.
- 37- Shin T.Y., Choi J.B., Bae S.M., Koo H.N., and Woo S.D. 2010. Study on selective media for isolation of entomopathogenic fungi. International Journal of Industrial Entomology. 20(1): 7-12.