

دستنامه علمی شماره

عوامل میکروبی کنترل زیستی آفات، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز

نویسندگان:

دکتر غلامرضا صالحی جوزانی

استاد پژوهش بخش تحقیقات زیست فناوری میکروبی، پژوهشگاه زیست فناوری کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج
کشاورزی، کرج، ایران

دکتر مژگان کوثری

استادیار پژوهش بخش تحقیقات زیست فناوری میکروبی، پژوهشگاه زیست فناوری کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج
کشاورزی، کرج، ایران

انتشارات:

کمیته زیست فناوری وزارت جهاد کشاورزی

ستاد توسعه زیست فناوری

با حمایت مالی " صندوق حمایت از سرمایه گذاری زیست فناوری "

این دستنامه علمی به شمارهدر تاریخ

در مرکز فناوری اطلاعات و اطلاع رسانی کشاورزی به ثبت رسیده است

۱۳۹۶

سرشناسه:	صالحی جوزانی، غلامرضا.
عنوان و پدیدآور:	عوامل میکروبی کنترل زیستی آفات، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز / غلامرضا صالحی جوزانی، مژگان کوثری.
ناشر	انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۱۳۹۶. با مشارکت: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کمیته زیست فناوری وزارت جهاد کشاورزی، ستاد توسعه زیست فناوری، صندوق حمایت از سرمایه گذاری زیست فناوری
مشخصات نشر	ص.
مشخصات ظاهری	
شابک	
موضوع	عوامل میکروبی کنترل زیستی آفات، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز.
موضوع	زیست مهارگرها. زیست فناوری.
شناسه افزوده	کوثری، مژگان، نویسنده همکار.
رده‌بندی کنگره	
رده‌بندی دیویی	



..... خدمات نشر انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه، سازمان مرکزی جهاد دانشگاهی

ص. پ. ۱۳۷۶ - ۹۱۷۷۵ تلفن: ۳۸۸۳۲۳۶۷ دفتر پخش: ۳۸۸۴۲۲۳۰

www.jdmppress.com info@jdmppress.com

عوامل میکروبی کنترل زیستی آفات، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز

مؤلفین: غلامرضا صالحی جوزانی، مژگان کوثری

لینوگرافی مشهد اسکنر / چاپ و صحافی چاپخانه دانشگاه فردوسی

چاپ اول ۱۳۹۶ / نسخه

شابک

فصل اول: کنترل زیستی آفات و بیماری‌ها: معرفی، اهمیت و وضعیت موجود

مقدمه: سموم شیمیایی آفت‌کش
مشکلات و معضلات سموم شیمیایی
کنترل زیستی آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز
وضعیت تولید عوامل کنترل زیستی در دنیا و ایران
راهکارهای کنترل زیستی
انواع موجودات زنده مورد استفاده در کنترل زیستی
چارچوب کلی توسعه فرآورده‌های میکروبی کنترل زیستی

فصل دوم: عوامل میکروبی کنترل کننده حشرات آفت کشاورزی

مقدمه: وضعیت گذشته و حال تولید و کاربرد عوامل میکروبی کنترل آفات
باکتری‌های پاتوژن حشرات آفت
ویروس‌های پاتوژن حشرات
قارچ‌های پاتوژن حشرات
نماتدهای پاتوژن حشرات
پروتوزوآهای پاتوژن حشرات (میکروسپوریده)

فصل سوم: عوامل میکروبی کنترل کننده بیماری‌های قارچی گیاهی

مقدمه: مکانیسم‌های عمل عوامل میکروبی کنترل کننده بیمارگرهای قارچی گیاهی
باکتری *Bacillus subtilis* به عنوان عامل کنترل زیستی بیمارگرهای قارچی گیاهی
باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* به عنوان عامل زیستی بیمارگرهای قارچی گیاهی
کاربرد باکتری‌های *Pseudomonas* در کنترل زیستی
استرپتومایسس‌ها به عنوان عوامل کنترل زیستی بیمارگرهای قارچی گیاهی
قارچ تریکودرما به عنوان عامل کنترل زیستی بیمارگرهای قارچی گیاهی
قارچ *Pythium oligandrum* به عنوان عامل کنترل زیستی بیمارگرهای قارچی گیاهی

فصل چهارم: عوامل میکروبی کنترل کننده علف‌های هرز

مقدمه: کنترل زیستی علف‌های هرز، راهکارها و مزایا
مکانیسم عمل علف‌کش‌های زیستی میکروبی
قارچ‌ها به عنوان علف‌کش‌های زیستی

باکتری‌ها به عنوان علف‌کش‌های زیستی
ویروس‌ها به عنوان علف‌کش‌های زیستی
چالش‌ها و چشم‌اندازهای علف‌کش‌های زیستی

فصل پنجم: چارچوب توسعه و ارزیابی ایمنی عوامل میکروبی کنترل زیستی

مقدمه

چارچوب کلی توسعه فرآورده‌های میکروبی کنترل زیستی
دستورالعمل فائو در خصوص ارزیابی ایمنی عوامل کنترل زیستی آفات و بیماری‌ها

پیشگفتار

زیست فناوری یا زیست فناوری به فناوری اطلاق می شود که از موجودات زنده برای ساخت یا تغییر محصولات، ارتقاء کیفی گیاهان یا حیوانات و تغییر صفات میکروارگانیسم ها برای بهبود رفاه بشر و کاربردهای ویژه استفاده می کند. به طور کلی هرگونه فعالیت هوشمندانه بشر درخلق، بهبود و عرضه محصولات گوناگون با استفاده از موجودات زنده به ویژه از طریق مهندسی ژنتیک، در حوزه زیست فناوری قرار می گیرد. زیست فناوری یکی از محورهای اساسی توسعه در بسیاری از کشورها قلمداد شده است. در زیست فناوری کشاورزی حوزه های مختلفی همچون کشت بافت گیاهان زینتی و درختان مثمر و غیرمثمر، مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان و حیوانات اصلاح شده ژنتیکی با تراریخته برای ایجاد صفات برتر، تهیه کیت های تشخیصی گیاهی، دام، طیور و آبزیان به منظور شناسایی مولکولی بیماری های مختلف، تولید کودهای زیستی برای افزایش حاصلخیزی خاک و کاهش مصرف کودهای شیمیایی، تولید داروها و واکسن های نو ترکیب به منظور تأمین سلامت و بهداشت دام، طیور و آبزیان، استفاده از زیست مهارگرها برای کنترل و مدیریت آفات و بیماری های گیاهی، اصلاح مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در شناسایی ژنوتیپی گیاهان یا حیوانات برتر و موارد بسیار دیگر مطرح و به کار گرفته می شود. آفات و بیماری های مختلف سالانه میلیاردها دلار خسارت به محصول گیاهان زراعی و باغی در سطح جهان وارد می کنند. برای کنترل این عوامل مضر در قرن گذشته به طور وسیعی از سموم شیمیایی کنترل کننده آفات و بیماری ها استفاده شده و هنوز هم استفاده می شود. تأثیرات منفی این قبیل سموم بر موجودات غیر هدف، سلامت انسان و محیط زیست، خسارات جبران ناپذیری را به وجود آورده است. در این راستا، در چند دهه اخیر روش کنترل زیستی که در آن از خود طبیعت برای کنترل آفات و بیماری های مختلف استفاده می شود، به عنوان یک روش ایمن و کارا توسعه یافته و کاربرد آن روز به روز افزایش یافته است. خوشبختانه به دلیل درک صحیح از مزایای این روش در کشورهای دنیا میزان مبادلات تجاری این قبیل سموم بیولوژیک در حال گسترش است بنحوی که تاکنون صدها فرمولاسیون مختلف تجاری به عنوان سموم و کودهای بیولوژیک در بازار جهانی عرضه شده اند. این موضوع در کشور ما نیز با تاخیری چند ساله شروع شده است و در حال حاضر نیز توسعه و کاربرد آن ها در جریان است. دستنامه حاضر با هدف معرفی عوامل میکروبی کنترل زیستی آفات و بیماری ها و علف های هرز و پتانسیل آن ها تهیه شده است. در این راستا، در خصوص کلیات کنترل زیستی، روش های کنترل زیستی، انواع عوامل میکروبی مورد استفاده در کنترل حشرات آفت، عوامل باکتریایی و قارچی بیماریزای گیاهی و همچنین عوامل میکروبی کنترل کننده علف های هرز و نحوه عمل و تفاوت های آن ها در فصول مختلف توضیح داده شده است. امید است دستنامه حاضر قدمی کوتاه در راستای آشنایی هر چه بیشتر جامعه محققین کشاورزی کشور و همچنین کشاورزان عزیز و زحمتکش با عوامل مفید و ایمن کنترل زیستی آفات و بیماری های گیاهی و همچنین توسعه کاربرد آن ها باشد. در پایان لازم می دانم از همکاری ستاد توسعه زیست فناوری معاونت علمی محترم ریاست جمهوری برای حمایت از این کمیته در انتشار نشریات و نیز به خاطر کمک های ایشان به وزارت جهاد کشاورزی در اجرایی کردن برنامه های زیست فناوری تشکر و قدردانی نمایم.

دکتر عبدالرضا باقری

رئیس کمیته بیوتکنولوژی وزارت جهاد کشاورزی

فصل ۱:

کنترل زیستی^۱ آفات و بیماری‌ها: معرفی، اهمیت و وضعیت موجود

مقدمه: سموم شیمیایی آفت‌کش

در طول تاریخ و از زمانی که بشر به کشاورزی روی آورد، مشکلات ناشی از آسیب آفات مختلف از قبیل حشرات آفت، عوامل بیماری‌زای محصولات کشاورزی، علف‌های هرز و جوندگان، بشر را در پی یافتن راه حلی مناسب برای کنترل آن‌ها به تلاشی مستمر واداشت. در این راستا، بعد از جنگ جهانی دوم اولین گروه از سموم شیمیایی آفت‌کش سنتزی به بازار عرضه شدند که همگام با توسعه علم شیمی بود. از آن زمان تاکنون ده‌ها خانواده مواد شیمیایی، صدها ماده موثره شیمیایی و هزاران فرمولاسیون مختلف به عنوان حشره‌کش، علف‌کش، قارچ‌کش، نماتدکش و سموم کشنده جوندگان توسعه یافته و بطور گسترده استفاده شده‌اند. بازار جهانی سموم شیمیایی آفت‌کش در سطح جهانی در سال ۲۰۱۱ حدود ۵۰ میلیارد دلار و در سال ۲۰۱۶ نزدیک به ۶۰ میلیارد دلار بوده است و این میزان بازار هر ساله رو به رشد بوده است. میزان مصرف سالانه سموم شیمیایی در ایران بر اساس آمار سازمان حفظ نباتات در سال‌های اخیر بین ۱۲۰ تا ۱۵۰ میلیون دلار متغیر بوده است که چیزی کمتر از یک درصد بازار جهانی این سموم را به خودش اختصاص داده است. میزان مصرف جهانی سموم شیمیایی در دنیا یک کیلوگرم در هکتار است که این میزان در کشور ما حدود ۵۶۰ گرم در هکتار است که دلیل آن گرانی سم و عدم توانایی مالی برخی کشاورزان برای خرید سموم مورد نیاز است. مصرف سموم شیمیایی در طی دهه‌های اخیر کمک شایانی به افزایش تولید محصولات کشاورزی نموده است بنحوی که ارزش میزان افزایش تولید محصولات کشاورزی در نتیجه کنترل شیمیایی و سایر روش‌ها حدود ۵۰۰ میلیارد دلار است. بنابراین می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که مصرف سموم شیمیایی در برخی مواقع از بروز قحطی نیز جلوگیری کرده است.

مشکلات و معضلات سموم شیمیایی

اگرچه کنترل‌کننده‌های شیمیایی آفات در اکثر موارد کارایی خوب و سریعی دارند، اما اثرات نامطلوبی بر سلامت انسان و محیط زیست داشته، باعث مقاوم شدن آفات به سم، آسیب به حشرات مفید و غیر هدف و باقی ماندن بقایای آن در محصولات را در پی دارند. یکی از معضلات سموم شیمیایی آفت‌کش، مقاوم شدن آفات به این سموم در طی زمان است. مشخص شده است که تاکنون بیش از ۵۸۶ گونه حشرات به حداقل یکی از ۳۲۵ سم شیمیایی مورد کاربرد در کشاورزی مقاوم شده‌اند. علاوه براین، وجود بقایای سموم شیمیایی در بخش‌های مختلف محیط زیست مثل مواد غذایی، علوفه، آب، خاک و حتی هوا منجر به بروز نگرانی‌های زیادی شده است. این نگرانی‌ها مزایای این مواد شیمیایی را تحت الشعاع قرار داده است. بر اساس گزارش مشترک سازمان بهداشت جهانی (WHO) و برنامه محیط زیست سازمان ملل (UNEP) در اثر مسمومیت حاد ناشی از سموم آفت‌کش، سالانه حدود ۲۲۰ هزار نفر کشته و حدود سه میلیون نفر هم دچار مسمومیت می‌شوند. در خصوص اثرات مزمن سموم شیمیایی متأسفانه مستندات کمتری وجود دارد و ابهامات بیشتری نیز دیده می‌شود. اما آنچه مسلم است اثرات بلند مدت سموم شیمیایی در نتیجه در معرض بودن طولانی مدت انسان در ایجاد

¹ Biological control

سرطان‌های ریه، پروستات و خون، تخریب سیستم ایمنی، تنفسی، اعصاب و روان و سیستم گوارش و غدد و سیستم‌های تولید مثل به اثبات رسیده است.

کنترل زیستی آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز

با توجه به مسائل و مشکلات کاربرد سموم آفت‌کش شیمیایی که در قسمت قبلی به آن‌ها اشاره شد، در حال حاضر به منظور تولید محصولات کشاورزی سالم و عاری از باقی مانده سموم، استفاده از روش‌های مدیریت تلفیقی مبارزه با آفات^۱ (IPM) تنها راه‌کار توصیه شده توسط متخصصان این امر است. در روش مدیریت تلفیقی کنترل آفات، از تلفیق روش‌های کنترل زیستی (کنترل بیولوژیک)، مدیریت به‌زراعی، به‌زادی و کنترل شیمیایی استفاده می‌شود. مهم‌ترین و اصلی‌ترین ابزار مدیریت تلفیقی مبارزه با آفات، استفاده از روش‌های کنترل زیستی آفات شامل حشرات آفت، عوامل بیماری‌زا، جوندگان و علف‌های هرز است. عوامل کنترل زیستی آفات را دشمنان طبیعی و یا عوامل مفید هم می‌نامند. این موضوع بدان معنا است که آن‌ها بصورت طبیعی در محیطی که آفت زندگی می‌کند، وجود دارند و از طریق کنترل آفت می‌توانند به کشاورزان سود برسانند. بطور کلی، کنترل زیستی به معنی استفاده از موجودات زنده یا فرآورده‌های آن‌ها به منظور کاهش خسارات ناشی از آفات مختلف از قبیل حشرات، عوامل میکروبی بیماری‌زای گیاهی (باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها)، جوندگان و علف‌های هرز است. تعریف دیگر کنترل زیستی، کنترل آفات (شامل حشرات، کنه‌ها، علف‌های هرز و بیماری‌های گیاهی) با استفاده از موجودات زنده به روش‌های شکارگری، پارازیتسم، بیمارگری، آنتاگونیسم، گیاهخواری (کنترل علف‌های هرز) یا دیگر مکانیسم‌های طبیعی است. همچنین می‌توان کنترل زیستی یا مبارزه بیولوژیکی را به مفهوم به کارگیری دشمنان طبیعی به منظور تقلیل جمعیت آفت در نظر گرفت. کنترل زیستی می‌تواند در راستای اهداف مدیریت جامع آفات، تأثیر بسزایی در حفظ تنوع زیستی و پایداری اکوسیستم و سلامت مواد غذایی تولیدی داشته باشد. از مهمترین مزایای روش‌های مبارزه زیستی در مقایسه با کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی، می‌توان به اختصاصی بودن اثر دشمنان طبیعی بر روی یک و یا گروهی مشخص از آفات، سازگاری کامل با طبیعت و محیط زیست و ایمن بودن برای سلامت انسان و سایر موجودات زنده اشاره کرد. علاوه بر این، به دلیل استقرار و تکثیر بعدی عوامل زیستی در طبیعت، اثر آن می‌تواند پایدار باشد و یا در طول زمان میزان کمتری استفاده شود. همچنین این عوامل از دیدگاه بلند مدت اقتصادی، ارزان‌تر و در عین حال سودآورتر هستند.

وضعیت تولید عوامل کنترل زیستی در دنیا و ایران

در حال حاضر در دنیا ده‌ها عامل زیستی مختلف در قالب فرمولاسیون‌های مختلف به شکل تجاری تولید و در بخش کشاورزی استفاده می‌شوند. بازار جهانی سالانه عوامل کنترل زیستی (ماکرو (حشرات مفید) و میکرو (عوامل میکروبی مفید)) در حال حاضر حدود ۳/۳ میلیارد دلار در سال است و دارای رشد سالانه ۱۸/۸ درصد است. در ایران نیز کنترل زیستی حداقل از ۳۰ تا ۴۰ سال قبل به شکل جدی مطرح بوده است، اما متأسفانه بدلائل و مشکلات مختلف، جایگاه واقعی خود را پیدا نکرده است. در زمینه توسعه و کاربرد عوامل کنترل زیستی ماکرو مثل دشمنان طبیعی (سن‌های شکارگر) و پارازیتوئیدها (زنبو تریکوگراما و براکون)، کارهای خوبی صورت گرفته، اما هنوز اول راه هستیم. در زمینه عوامل میکرو نیز وضع به همین منوال است. یکی از مهمترین عوامل میکروبی کنترل زیستی در ایران باکتری *Bt* است، اما میزان مصرف آن در کشاورزی بسیار محدود بوده است.

¹Integrated Pest Management

طبق سند ملی زیست فناوری کشور که در سال ۸۴ به تصویب هیئت دولت رسید در سال مذکور میزان تولید کودها و سموم زیستی کشاورزی در حد کمتر از ۱ درصد کل سموم و کودهای مورد مصرف کشور بوده است. مطابق با سند مذکور مقرر بوده است که طی برنامه‌های کوتاه مدت (تا پایان سال ۸۵)، میان مدت (تا پایان برنامه چهارم ۸۸-۸۳) و بلند مدت (تا پایان برنامه پنجم ۹۳-۸۸) به ترتیب میزان سهم تولید و مصرف این فرآورده‌های زیستی به ۱/۵، ۳ و ۱۰ درصد برسد (سند سبز (سند ملی زیست فناوری ایران، ۱۳۸۴)). اما متأسفانه بودجه در نظر گرفته شده در راستای اجرای سند به هیچ وجه تحقق نیافته و بنا به دلایل مختلف برنامه در نظر گرفته شده محقق نشده است.

راهکارهای کنترل زیستی

بطور کلی چهار روش عمده برای استفاده از دشمنان طبیعی در کنترل زیستی وجود دارد که شامل حفاظت از دشمنان طبیعی^۱، معرفی دشمنان طبیعی به محیط‌های جدید^۲، کنترل تلقیحی^۳ و انبوه‌سازی^۴ یا افزون‌سازی جمعیت موجود دشمنان طبیعی است.

حفاظت از دشمنان طبیعی:

در این روش تلاش می‌شود تا با انجام برخی فعالیت‌ها، جمعیت و فعالیت دشمنان طبیعی موجود در طبیعت را برای کاهش جمعیت آفات، حفظ و یا افزایش دهند. برای دستیابی به این هدف بایستی رفتارهای مخرب را شناسایی و از اعمال آن‌ها جلوگیری نموده و مزرعه و سایر مکان‌ها را برای زندگی دشمنان طبیعی مساعد ساخت.

معرفی دشمنان طبیعی به محیط‌های جدید:

یکی از مشکلات بخش کشاورزی در سراسر دنیا، شیوع آفات و بیماری‌های غیر بومی و مهاجر است. معمولاً درصد بالایی از آفات و عوامل بیماری‌زا از نوع قرنطینه‌ای و غیربومی هستند که این موضوع موجب مشکل شدن کنترل آن‌ها می‌شود. برای این گونه آفات غیربومی روش‌های حفاظت کافی نیستند، زیرا عموماً دشمنان طبیعی این آفات جدید در محل بروز آفت وجود ندارند. در چنین مواردی روش وارد نمودن دشمنان طبیعی که بر علیه آفت مؤثر هستند، از ضروریات بوده و اقدامی است که سابقه موفقیت‌های درخشانی دارد. معمولاً با جستجو و شناسایی، دشمنان طبیعی را در موطن اصلی آفت یافته، سپس این دشمنان طبیعی جمع‌آوری و به محل مورد نظر منتقل و پس از اعمال مقررات قرنطینه‌ای و اطمینان یافتن از بی‌زیان بودن آن‌ها می‌شوند.

کنترل تلقیحی:

در این روش، معرفی یا افزودن یک یا چند عامل کنترل زیستی برای مدت کوتاه و در زمان‌های مورد نیاز صورت می‌گیرد بنحوی‌که عامل کنترل زیستی برای مدت طولانی مدت باقی نماند. برای مثال در شرایط گلخانه، می‌توان زنبور *Encarsia formosa* را به صورت هفتگی یا هر چهار شب یک بار به گیاهان آلوده به مگس اضافه کرد تا در زمان کوتاه عامل خسارت‌زا را کنترل کند.

روش انبوه‌سازی (تکثیر):

در مواردی که جمعیت دشمنان طبیعی در محل وجود ندارد و یا کم است و یا گونه‌های مفید دیر هنگام ظاهر می‌شود، لازم است تا جمعیت دشمنان طبیعی از طریق تکثیر و رهاسازی افزایش داده شوند. اهداف این روش می‌تواند در محل‌های مختلف متفاوت باشد. ممکن است هدف از اجرای روش انبوه‌سازی تقویت یک دشمن طبیعی در اوایل فصل برای افزایش جمعیت اولیه به امید تکثیر

¹Conservation or Preservation Biological Control

² Introduction

³ Inoculative control

⁴ Inundative control

خودبخودی و طبیعی آن‌ها باشد که منجر به کنترل اتوماتیک نسل‌های بعدی آفت در آینده می‌شود. علاوه بر این، ممکن است جمعیت اولیه دشمن طبیعی کم بوده و قابلیت تکثیر در مزرعه را نداشته باشد، بنابراین در اینجا هدف از انبوه‌سازی، تکثیر و افزایش جمعیت به حدی است که بتواند آفت را کنترل کند.

انواع موجودات زنده مورد استفاده در کنترل زیستی

بطور کلی موجودات زنده مورد استفاده در کنترل زیستی از نظر اندازه به دو گروه عمده ماکرو (موجودات با اندازه درشت) و میکرو (میکروسکوپی) تقسیم می‌شوند. اما از نظر مکانیسم فعالیت، این عوامل به شکارگرها^۱ (پرداتورها)، پارازیتوئیدها^۲، بیمارگرها^۳ (باکتری، قارچ و ویروس)، آنتاگونیست‌ها^۴ (باکتری و قارچ) و گیاهخواران^۵ تقسیم می‌شوند. در دستنامه حاضر تلاش شده است به معرفی عوامل میکروبی مورد استفاده در برنامه‌های کنترل زیستی و پتانسیل آن‌ها اشاره شود.

^۱ Predators

^۲ Parasitoids

^۳ Pathogens

^۴ Antagonists

^۵ Herbivores

فصل دوم:

عوامل میکروبی کنترل کننده حشرات آفت کشاورزی

مقدمه: وضعیت گذشته و حال تولید و کاربرد عوامل میکروبی کنترل حشرات آفت

یکی از مهمترین گروه‌های مورد استفاده در کنترل زیستی آفات، بیماری‌گرهای حشرات هستند که قسمت عمده‌ای (حدود ۸۰-۷۰ درصد) از بازار جهانی عوامل میکروبی کنترل زیستی را به خود اختصاص داده‌اند. با توجه به مزایای عوامل میکروبی بیماری‌گر حشرات از قبیل ایمن بودن، اختصاصی بودن و کارایی بالای آن‌ها، تاکنون بیش از ۵۰ میکروارگانیسم مفید از گروه‌های باکتری‌ها، قارچ‌ها، میکروسپوریده، اومیس‌ها، ویروس‌ها و نماتدهای پاتوژن حشرات به عنوان عوامل کنترل زیستی در برنامه‌های کنترل زیستی حشرات آفت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. عوامل میکروبی کنترل زیستی تجاری شده در دنیا شامل باکتری‌ها (*Bacillus thuringiensis* (Bt)، *Bacillus popilliae* و *Bacillus sphaericus*)، ویروس‌های حشرات (شامل گرانولوویروس‌ها و ویروس‌های هسته‌ای چندوجهی (NPV))، قارچ‌ها (*Nomuraea*، *Paecilomyces*، *Verticillium*، *Metarhizium*، *Beauveria*)، نماتدهای بیماری‌گر حشرات (*Heterorhabditis* و *Steinernema*)، میکروسپوریده (*Vairimorpha* و *Thelohania*، *Nosema*) و پروتوزوا هستند که در این بین باکتری *Bt* بیشترین استفاده در سطح جهانی را به خود اختصاص داده است. برآورد شده است که در سال ۲۰۲۰ میزان بازار جهانی عوامل میکروبی کنترل کننده حشرات آفت از ۸۰۰ میلیون دلار فعلی به بیش از یک میلیارد دلار خواهد رسید. از این بازار، حدود ۶۰ درصد (حدود ۵۰۰ میلیون دلار) متعلق به باکتری *Bt* است که بطور گسترده‌ای در کنترل آفات پروانه‌ای، دوبرالان و سخت-بال‌پوشان کاربرد دارد. رتبه‌های بعدی متعلق به قارچ‌های پاتوژن حشرات (حدود ۱۵ درصد)، باکتری‌های دیگر (۱۰ درصد)، ویروس‌ها (۱۰ درصد) و نهایتاً نماتدهای پاتوژن حشرات (حدود ۵ درصد) است. این سرعت رشد نشانگر این موضوع است که در آینده‌ای نزدیک با توجه به روند کند رشد تولید و مصرف سموم شیمیایی و ممنوع شدن برخی از سموم شیمیایی پایدار در کشورهای مختلف، این قبیل فرآورده‌های میکروبی جایگاه بسیار ویژه‌تری در کنترل آفات خواهند داشت.

باکتری‌های پاتوژن حشرات آفت

باکتری‌های پاتوژن‌های حشرات تاکنون در چارچوب سه راهکار کنترل زیستی شامل حفاظت، معرفی و تولید انبوه مورد کاربرد قرار گرفته‌اند. اما مهمترین راهکار کاربردی استفاده از پاتوژن‌های حشرات، تکثیر و تولید انبوه آن‌ها در بیوراکتورهای مناسب و سپس پخش و اسپری نمودن آن‌ها در سطح مزارع شبیه سموم شیمیایی است. مهمترین باکتری‌های پاتوژن حشرات شامل *Bacillus thuringiensis*، *Bacillus sphaericus*، *Bacillus popilliae*، *Paenibacillus entomophila*، *Serratia* و *Chromobacterium subtsugae* هستند که ذیلاً به آن‌ها پرداخته می‌شود.

الف. باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt)

باکتری *Bt* و سموم حشره‌کش تولید شده توسط آن یک روش ایمن و مؤثر برای کنترل آفات نباتی هستند. این باکتری در جهان باکتری‌ها تقریباً "منحصر بفرد بوده به‌طوری‌که سموم تجاری حاصل از این باکتری کارایی سموم شیمیایی را داشته و علاوه بر اختصاصی بودن بالای آن‌ها، به‌دلیل تولید پروتئین‌های مؤثر بر آفات خاص، دارای مزیت ایمنی زیست‌محیطی نیز است. در حال حاضر این باکتری مهمترین عامل میکروبی تجاری مورد استفاده برای کنترل آفات بوده و حدود ۶۰ درصد بازار جهانی عوامل میکروبی کنترل

زیستی آفات و بیماری‌ها (حدود ۵۰۰ میلیون دلار) را شامل می‌شود. باکتری *Bt* بطور گسترده‌ای در کنترل آفات پروانه‌ای، دوبالان و سخت‌بال‌پوشان مختلف کاربرد دارد. هم‌اکنون ده‌ها شرکت زیست فناوری تولید کننده فرآورده‌های مختلف *Bt* (به صورت پودر و تابل، سوسپانسیون و یا گرد) برای کنترل آفات مختلف کشاورزی و بهداشتی در حال فعالیت هستند. برای مثال شرکت‌های متعدد ایرانی و خارجی فرمولاسیون‌هایی از زیر گونه *Bt. subsp. kurstaki* را ارائه داده است که به میزان نیم تا یک و نیم کیلویی آن در هکتار قادر به کنترل انواعی از آفات پروانه‌ای نظیر کرم قوزه پنبه، کرم ساقه خوار برنج، پروانه پشت الماسی کلم و بوده و بطور گسترده‌ای در ایران و جهان مورد استفاده قرار گرفته است. این باکتری، یک باکتری گرم مثبت، اسپورزا، متحرک و هوازی است که بطور طبیعی در خاک زندگی می‌کند. باکتری *Bt* در فاز سکون که رشد باکتری متوقف شده است (مرحله اسپورزایی)، یک یا چند پروتئین کریستالی پارا-اسپورال تولید می‌کند. این پروتئین‌های کریستالی که از زیر مجموعه‌های پروتوکسین^{۳۸} ساخته شده اند، دلتا-اندوتوکسین^{۳۹} نامیده می‌شوند (شکل ۱-۲). در واقع باکتری در هنگام تشکیل اسپور، بطور همزمان تولید نوعی پروتئین کریستالی می‌کند که در صورت وارد شدن آن به داخل بدن حشرات، این پروتئین بوسیله آنزیم‌های موجود در روده میانی حشرات محلول شده و پروتئین‌های پروتوکسین آزاد می‌شوند. پروتئین‌های دلتا-اندوتوکسین توسط آنزیم‌های مختلف شکسته شده و بصورت فرم فعال خود در می‌آیند که تعدادی از این پروتئین‌ها موجب مرگ لارو یا حشرات بالغ می‌شوند. بسته به نوع پروتئین‌های کریستالی تولید شده در هر زیرگونه یا سویه این باکتری، حشره‌کش‌های *Bt* می‌توانند به شکل اختصاصی گونه‌های خاصی از حشرات در راسته‌های دوبالان، سخت‌بال‌پوشان و بالپولکداران را کنترل کنند. گزارشات جدیدی از *Bt* وجود دارد که نژادهایی از آن در برابر راسته‌های دیگر حشرات (جوربالان، راست‌بالان، مالوفاگا، نیم‌قاب‌بالان)، نماتدها و پروتوزوئرها نیز اثر کشندگی دارند.

مشخص شده است که این باکتری علاوه بر دارا بودن خصوصیت حشره‌کشی، دارای سمیت بر علیه نماتدهای پاتوژن گیاهان و جانوران نیز است. باکتری *Bt* در تلفیق با سایر عوامل کنترل میکروبی نیز نتایج رضایت بخشی در کنترل آفات داشته است. علی‌رغم گذشت حدود یک قرن از زمان شناسایی این باکتری و گسترش روز افزون تعداد سویه‌ها و ژن‌های شناسایی شده و همچنین فرمولاسیون‌های متعدد بیولوژیک حاصل از آن، همچنان تحقیقات در خصوص شناسایی سویه‌ها و ژن‌های جدید با خصوصیات جدید آن و همچنین فرآیند فرمنتاسیون و فرمولاسیون آن در سطح جهانی ادامه دارد.

38. Parasporal Crystal

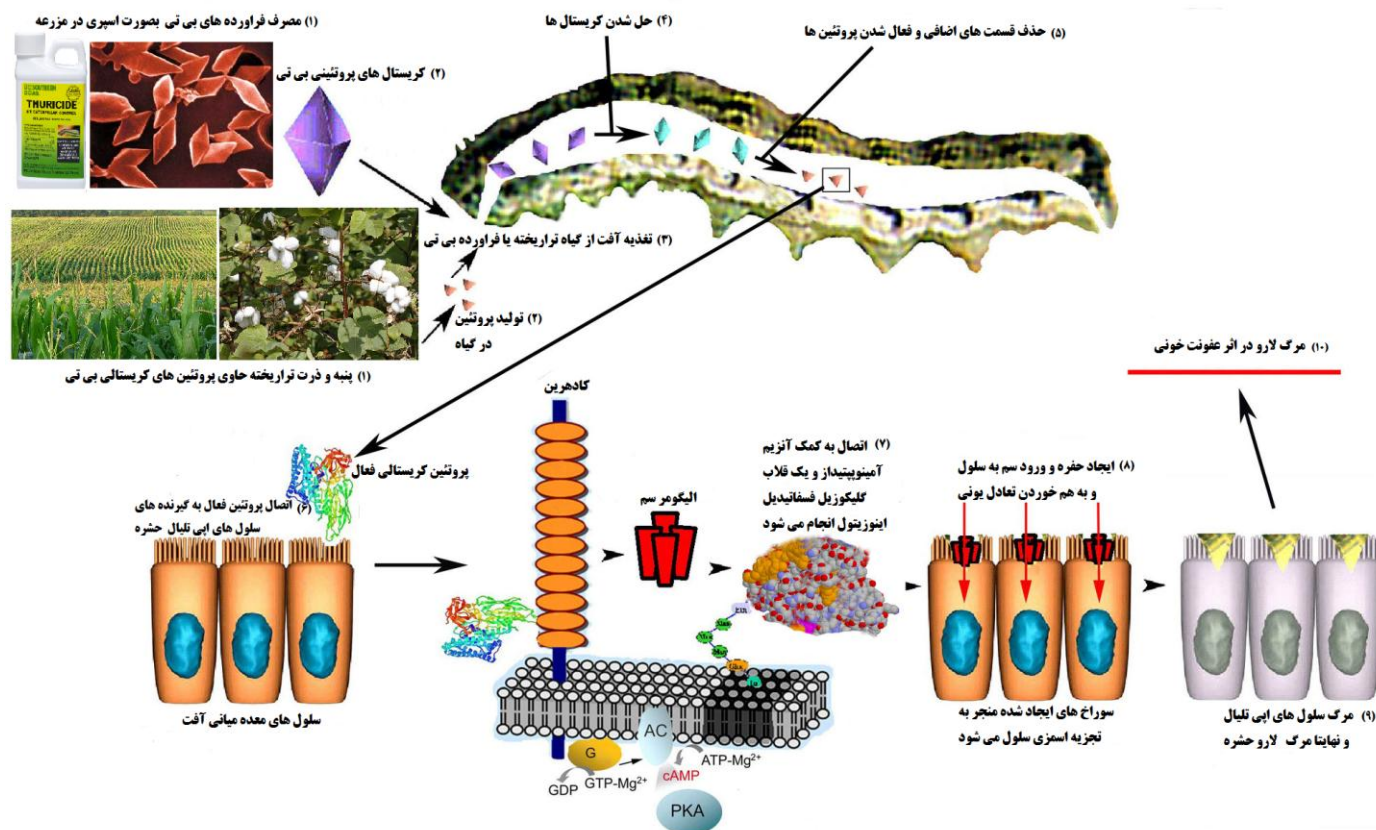
39. Protoxin

40.δ-Endotoxin



شکل ۱-۲- معرفی باکتری *Bt* و فرآورده‌های آن: الف: سلول‌های مادری، اسپور و کریستال باکتری *Bt* (رنگ آمیزی گرم)، ب: کریستال‌های *Bt* (میکروسکوپ الکترونی)، ج: یک فرآورده تجاری *Bt*

ژن‌های رمز کننده پروتئین‌های کریستالی اکثراً بر روی پلاسمیدهای بزرگی وجود دارند که در کنار کروموزوم اصلی باکتری قرار دارند و هر پروتئین کریستالی محصول یک ژن منفرد است، اما هر کریستال ممکن است از میلیون‌ها پروتئین کریستالی تشکیل شده باشد که از یک یا چند نوع مختلف باشند. برای مثال پروتئین‌های خانواده Cry1 بر روی بالپولکداران، Cry2 بر روی دویالان و بالپولکداران، Cry3 بر روی سخت‌بالپوشان، Cry4 بر روی دویالان، Cry5 بر روی بالپولکداران و سخت‌بالپوشان یا نماتدها، Cry6 بر روی نماتدها و عمل می‌کنند. در شکل ۲-۲ نیز بطور خلاصه مکانیسم عمل پروتئین‌های کریستالی *Bt* اشاره شده است.



شکل ۲-۲- مکانیسم عمل پروتئین های کریستالی در روده حشرات

همان‌طور که اشاره شد، این باکتری مهمترین فرآورده میکروبی مورد استفاده در کنترل زیستی آفات کشاورزی است و بیش از ۵۰ درصد بازار کنترل زیستی آفات در دنیا را شامل می‌شود. در حال حاضر از فرآورده‌های مختلف این باکتری برای کنترل گونه‌های مختلف آفات از راسته‌های مختلف از قبیل بال‌پولکداران (کرم قوزه پنبه، کرم ساقه خوار برنج، مینوز گوجه فرنگی و)، سخت بال‌پوشان (سوسک کلرادوی سیب زمینی، سرخرطومی یونجه، سوسک برگ‌خوار نارون و ...) و دوبالان (پشه آنوفل، مگس خانگی و) استفاده شده است. شکل ۲-۳ نحوه کاربرد باکتری *Bt* در مزرعه را نشان می‌دهد.



شکل ۲-۳- کاربرد فرآورده *Bt* در مزرعه برای کنترل آفات. همان‌طور که مشاهده می‌شود نحوه کاربرد عوامل میکروبی کنترل زیستی شبیه سم پاشی با سموم شیمیایی متداول است.

ب. باکتری *Bacillus sphaericus* (*Lysinibacillus sphaericus*)

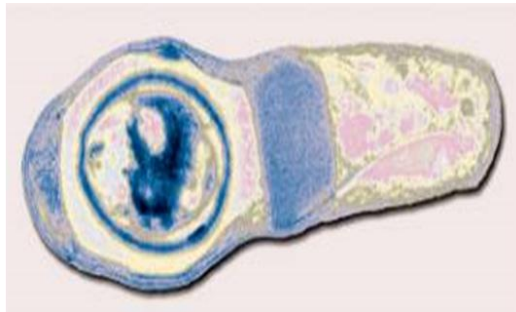
باکتری *Bacillus sphaericus*، یک باکتری هوازی، گرم مثبت و اسپورزا است که در خاک و آب زندگی می‌کند. این باکتری در فاز رویشی و مرحله اسپورزایی خود گروه‌های مختلفی از پروتئین‌های حشره‌کش را تولید می‌کند. یک گروه که به نام پروتئین‌های پشه‌کش^۱ (*mtx*) هستند در مرحله رشد رویشی تولید می‌شوند و گروه دیگر، پروتئین دوتایی^۲ (*bin*) است که در مرحله اسپورزایی تولید می‌شود. پروتئین دوتایی شامل دو نوع پروتئین کریستالی است که با اندازه ۵۱ و ۴۲ کیلودالتون تولید می‌شوند. هر دو پروتئین در ساختار کریستال قابل مشاهده زیر میکروسکوپ به کار می‌روند (شکل ۲-۴-الف و ب).

^۱Mosquitocidal toxins

^۲Binary toxin



ب



الف



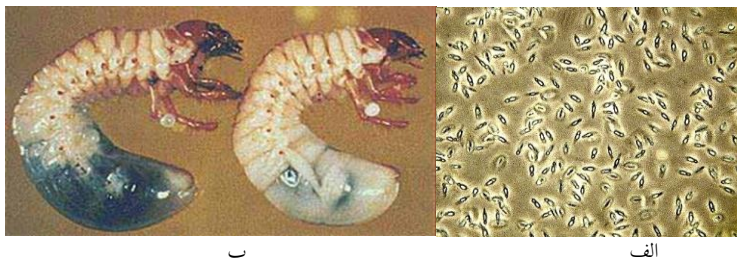
شکل ۲-۴- ساختار سلولی و رنگ کلنی باکتری *Bacillus sphaericus* الف: ساختار سلول مادری حاوی کریستال و اندوسپور، ب: کلونی‌های باکتری، ج: کاربرد این باکتری بصورت گرانوله در کشور گامبیا برای کنترل پشه آنوفل (عامل مالاریا)

پروتئین دوتایی دارای اثر حشره‌کشی شدیدی بر حشرات دوبال است بطوریکه ظرف ۲۴ تا ۴۸ ساعت لارو حشره از بین می‌رود. پروتئین‌های کریستالی تولید شده در این باکتری بطور اختصاصی فقط حشرات راسته دوبالان مثل پشه آنوفل را کنترل می‌کنند و به طور معمول میزان سمیت آن‌ها بیش از پروتئین‌های باکتری *Bt* است. این باکتری بطور گسترده و تجاری در برخی کشورها مثل هند و گامبیا برای کنترل پشه‌های مختلف از قبیل آنوفل استفاده شده است (شکل ۲-۴-ج). برای مثال شرکت هوبی کانگزین (Hubei Kangzin) در چین یک نوع فرآورده مبتنی بر این باکتری را بصورت تجاری برای کنترل پشه‌ها و مگس‌ها برای افزایش بهداشت عمومی ارائه داده است.

ج. باکتری *Bacillus popilliae* (*Paenibacillus popilliae*)

باکتری *Bacillus popilliae*، یک باکتری هوازی، گرم مثبت و اسپورزا است که برای حشرات راسته سخت‌بال‌پوش (سوسک‌ها) مثل سوسک ژاپنی (*Popillia japonica*) که آفت برخی گیاهان زراعی و زینتی است، اثر حشره‌کشی داشته و در آن‌ها بیماری شیری اسپور^۱ را ایجاد می‌کند (شکل ۲-۵). این باکتری برخلاف دو باکتری قبلی، پروتئین‌های سمی تولید نمی‌کند. پس از ورود اسپورها به سیستم گوارش لارو حشرات سخت‌بال‌پوش، ابتدا در طی یک تا دو روز اسپورها در معده میانی شروع به رشد کرده، و ظرف سه تا ۵ روز تکثیر باکتری در سیستم گوارش حشره به اوج خود می‌رسد. وقتی جمعیت باکتری به اوج می‌رسد، بعضی سلول‌های باکتری شروع به نفوذ در دیواره معده میانی می‌کنند و در لنف‌های خونی شروع به رشد می‌کنند. طی ۵ تا ۱۰ روز جمعیت باکتری در لنف‌های خونی بسیار زیاد می‌شود و عفونت خونی منجر به مرگ می‌شود.

از نکات جالب توجه در خصوص این باکتری، پایداری زیاد آن در خاک است. ضمن اینکه تولید و تکثیر تجاری این باکتری بدلیل اینکه پاتوژن اجباری است، مشکل است و برای تکثیر نیاز به میزبان (سوسک‌های خانواده اسکارابیده) دارند. برای استفاده در سطح تجاری، اسپورهای آن‌ها در فرمولاسیون‌های مختلف به بازار عرضه می‌شود. تاکنون ایمنی این باکتری برای موجودات غیر هدف به اثبات رسیده است و باکتری بطور اختصاصی فقط بر روی برخی آفات راسته سخت‌بال‌پوشان است.



ب

الف



ج

شکل ۲-۵- معرفی باکتری *B. popilliae* و فرآورده‌های تجاری آن. الف) شکل سلول‌های باکتری *B. popilliae*، ب) بیماری شیری اسپور در سوسک ژاپنی (اسکارابیده)، ج) فرآورده تجاری مورد استفاده برای کنترل سوسک ژاپنی

^۱Milky Spore Disease

د. باکتری *Serratia entomophila*

باکتری *Serratia entomophila* غیر اسپورزا بوده و از گروه باکتری‌های انتروباکتریاسه است که اولین بار در کشور نیوزیلند کشف شد، و به شکل تجاری برای کنترل سوسک گراب چمن و مراتع (*Costelytra zealandia*) در نیوزیلند استفاده می‌شود. با تغییر کاربری مراتع و انجام کشت و کار در مراتع، میزان جمعیت این باکتری کم شده و در نتیجه میزان خسارت ناشی از این سوسک افزایش یافته است. در این راستا بمنظور کنترل این سوسک خطرناک، سویه‌های موثر باکتری *S. entomophila* انتخاب و بعد از تکثیر و تهیه فرمولاسیون برای کنترل این آفت استفاده می‌شود. این باکتری موجب ایجاد بیماری کهربایی در سوسک مراتع می‌شود (شکل ۲-۶). پس از ورود باکتری به سیستم گوارش سوسک، شروع به تولید سم می‌کند که منجر به تغییر شکل سیستم گوارش و عدم تولید آنزیم‌های گوارشی می‌شود و در نتیجه سوسک از تغذیه کردن دست بر می‌دارد و بعد از مدتی از بین می‌رود. حشره پیش از مرگ رنگ کهربایی می‌گیرد که به همین دلیل اسم این بیماری را بیماری کهربایی گذاشته‌اند. محصول تجاری این باکتری بصورت گرانوله خشک در حال حاضر در نیوزیلند تولید و استفاده می‌شود.



ب

الف

شکل ۲-۶- الف. لارو سالم سوسک گراب چمن (*Costelytra zealandia*)، ب. لاروهای سوسک گراب چمن که دارای بیماری کهربایی ایجاد شده توسط *S. entomophila* هستند.

ه. باکتری *Chromobacterium subtsugae*

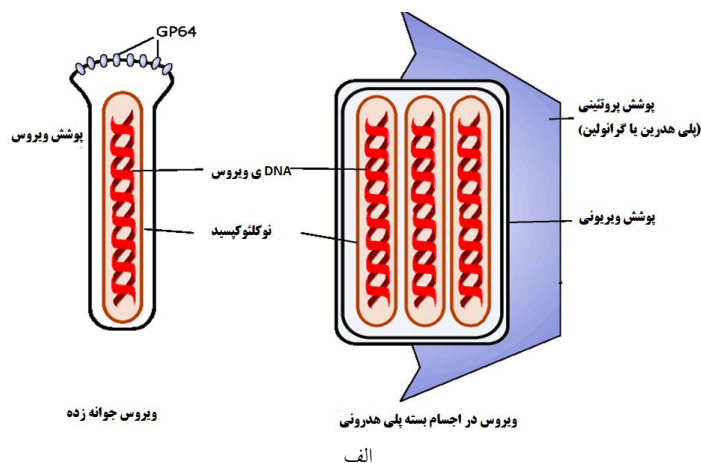
این باکتری گرم منفی و متحرک است و دارای سمیت بر علیه برخی سخت‌بال پوشان و بال‌پولکداران است. سمیت این باکتری برای سوسک کلرادوی سیب زمینی (*Leptinotarsa decemlineata*)، کرم ریشه ذرت (*Diabrotica spp.*) و ساس سیب (*Nezara viridula*) به اثبات رسیده است. فرمولاسیون‌های جدید آن برای کنترل شته‌ها، پشه‌ها، تریپس‌ها و برخی آفات دیگر توصیه شده است. ژن‌های رمز کننده سموم و همچنین پروتئین‌های رویشی حشره‌کش (VIPs) این باکتری کاندیدای خوبی برای انتقال ژن به گیاهان برای ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به آفات هستند.

علاوه بر باکتری‌های فوق، در سال‌های اخیر خصوصیات حشره‌کشی چندین جنس و گونه باکتری دیگر از قبیل *Brevibacillus laterosporus* (موثر بر بال‌پولکداران، سخت‌بال پوشان و دویالان)، *Clostridium bifermentans* (موثر بر دویالان)، *Photorhabdus spp.* و *Xenorhabdus spp.* (همزیست نماتدهای حشره‌کش هستند که با آن‌ها در خصوصیت حشره‌کشی اثر سینرژیستی دارند)، *Pseudomonas entomophila* (موثر بر دویالان)، و *Burkholderia spp.* (بر علیه بال‌غشائیان (مثل *Riptortus pedestris*) و بال‌پولکداران مثل (*Spodoptera*)) نیز مشخص شده است.

ویروس‌های پاتوژن حشرات (باکالوویروس‌ها (Baculoviruses))

مشخص شده است که حدود ۲۵ خانواده ویروسی به عنوان بیمارگر حشرات عمل کرده و حشرات را از بین می‌برند. از این میان، تنها ویروس‌های خانواده باکالوویریده^۱ (حدود ۶۰۰ گونه) با توجه به پتانسیل و خصوصیات مفیدشان به عنوان حشره‌کش‌های زیستی تجاری استفاده شده‌اند. این ویروس‌ها از حشرات راسه بال‌پولکداران، دویالان، بال‌غشائیان و سخت‌بال‌پوشان تاکنون جداسازی شده‌اند. این عوامل در خارج از بدن میزبان در داخل پوشش مخصوص (نوکلئوکسپیدی) و پوشش پروتئینی قابلیت ماندگاری زیادی دارند، البته تشعشعات خورشیدی به ماندگاری آن‌ها آسیب شدیدی وارد می‌کند (شکل ۲-۷). از خصوصیات مهم این ویروس‌ها، می‌توان به ایمن بودن آن‌ها برای محیط زیست، انسان، سایر مهره‌داران، گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و دشمنان طبیعی آفات (مخصوصاً، شکارگرها و پارازیتوئیدها) اشاره نمود. این ویروس‌ها بسیار اختصاصی عمل کرده و گاهی حتی بطور اختصاصی تنها بر روی یک گونه آفت موثر هستند. در حال حاضر ده‌ها فرمولاسیون مختلف از این ویروس‌ها به صورت تجاری برای کنترل آفات مختلف کشاورزی و جنگلی (با تاکید بر کنترل آفات پروانه‌ای) تولید و استفاده می‌شوند. این ویروس‌ها می‌توانند در شرایط مناسب تا ۱۰۰٪ کارایی نشان دهند. دو مشکل اساسی این عوامل، کند بودن فرآیند تاثیر آن‌ها بر آفات و دوم سخت بودن تولید تجاری آن‌ها، بدلیل پاتوژن اجباری بودن آن‌ها است، یعنی برای تولید آن‌ها نیاز به میزبان واسطه است. در سال‌های اخیر در خصوص بهینه سازی و اقتصادی کردن روش‌های تولید آن‌ها و استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک برای افزایش کارایی آن‌ها تحقیقات زیادی صورت گرفته است. با توجه به اختصاصی عمل کردن این ویروس‌ها، هیچ‌گونه اثری بر موجودات غیر هدف نداشته و ایمنی محیط زیستی آن به اثبات رسیده است و کاربرد تجاری آن‌ها به عنوان عامل کنترل زیستی حشرات روز بروز در حال گسترش است.

^۱ Baculoviridae



شکل ۲-۷- ویروس های پاتوژن حشرات. الف: ساختار باکولوویروس ها در حالت جوانه زده^۱ و اجسام بسته^۲. ب: یک نمونه محصول تجاری باکولوویروس

باکولوویروس ها دارای دو نوع فنوتیپ در طی چرخه زندگی خود هستند که شامل اجسام بسته (OB) و حالت ویروس جوانه زده (BV) است (شکل ۲-۷). زمانی که لارو حشره شروع به تغذیه از گیاه می کند، حالت اجسام بسته باکولوویروس ها وارد سیستم گوارش آن می شود. با ورود اجسام بسته (پلی هدرین یا گرانولین) به معده میانی لارو حشره، در اثر اسیدیته قلیایی موجود در آن، این اجسام حل شده و ویریون ها از داخل آن ها آزاد می شوند. ویریون ها با اتصال به گیرنده های موجود در سلول های معده میانی حشره، وارد آن ها می شوند. ویریون ها بدون پوشش پروتئینی هستند، لذا پس از ورود به هسته سلول، به کمک سیستم همانندسازی سلول های حشره، همانندسازی خود را انجام می دهند. حالت ویروس جوانه زده در مراحل اولیه فاز ایجاد عفونت در میزبان ایجاد

^۱Budded virus

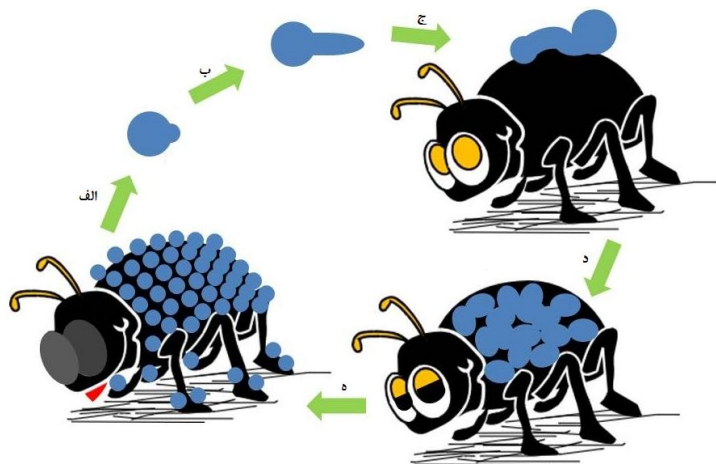
^۲Occlusion body

می‌شود. حالت ویروس جوانه زده برای پخش شدن سیستماتیک (از یک سلول به سلول دیگر) و عفونت‌زایی در میزبان ضروری است. بطور معمول DNAی حلقوی باکالوویروس‌ها در داخل پروتئین‌های کوچکی پوشش داده می‌شود و نهایتاً نوکلئوکپسید را می‌سازد (شکل غیرفعال ویروس). حالت اجسام بسته (OB)، در زمان‌های پایانی عفونت زایی توسط ویروس و زمانی که لازم است ویروس از یک لارو به لارو دیگر منتقل شود، ایجاد می‌شود. در اصل این مرحله، مرحله غیرفعال ویروس است که در فرآیند انتقال ویروس از یک لارو به لارو دیگر عمل می‌کند. جالب اینکه کلیه این فرآیند بطور اختصاصی تنها برای تعداد خاصی از آفات اتفاق می‌افتد.

قارچ‌های پاتوژن حشرات

با توجه به رشد و گسترش استفاده از آفت‌کش‌های میکروبی، در حال حاضر بازار آفت‌کش‌های میکروبی مبتنی بر قارچ‌های بیمارگر حشرات حدود ۲۰ درصد این محصولات را شامل می‌شود. تحقیقات گذشته نشان داده است که بیش از ۱۰۰۰ گونه قارچ توانایی بیماری‌زایی در حشرات و عنکبوتیان را دارند. با این حال تعداد محدودی از آن‌ها تاکنون به عنوان عامل کنترل زیستی به صورت تجاری برای کنترل حشرات آفت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. عموماً آلودگی حشرات به قارچ از طریق پوست کوتیکولی بدن آن‌ها انجام می‌گیرد و برخلاف باکتری‌ها و ویروس‌های پاتوژن حشرات، از راه دستگاه گوارش بیماری‌زایی ایجاد نمی‌کنند. بنابراین می‌توان گفت که این که قارچ‌ها، آفت‌کش زیستی تماسی هستند که با نفوذ از طریق کوتیکول و مصرف مواد غذایی حشره، آن‌را از بین می‌برند (شکل ۲-۸). این نوع قارچ‌ها در تمام راهکارهای کنترل زیستی از قبیل حفاظت، معرفی و تلقیح کاربرد دارند و لذا می‌توانند در برنامه‌های مختلف کنترل تلفیقی آفات موثر باشند.

چرخه زندگی اکثر قارچ‌های پاتوژن حشرات با چرخه زندگی حشرات میزبان آن‌ها در تطابق و همزمان است. بطور معمول اسپور یا کنیدی‌های قارچ‌های پاتوژن در طبیعت رها شده و با پیدا کردن حشرات آفت به عنوان میزبان روی سطح پوست آن‌ها می‌چسبند (شکل ۲-۸). با اتصال کنیدی و شروع به نفوذ در کوتیکول، یک سری واکنش‌های آنزیمی از طرف قارچ (حمله کننده) و میزبان (مدافع) صورت می‌گیرد. در شرایط محیطی مناسب، اسپور جوانه زده و تولید لوله رویشی^۱ می‌کند. سپس ایجاد یک اندام مکنده به خصوصی بهنام اپرسوریوم^۲ می‌کند که به لایه‌های اپی کوتیکول و پروکوتیکول پوشش حشره میزبان نفوذ می‌کند. پس از نفوذ و رشد هیف به داخل لُنف‌های خونی، قارچ شروع به تغذیه از مواد مغذی میزبان می‌کند. با کاهش مواد غذایی در میزبان، حشره طی ۳ تا ۷ روز در اثر گرسنگی فیزیولوژیک و عفونت قارچی از بین می‌رود (شکل ۲-۸). البته باید به این نکته توجه داشت که بعد ورود قارچ به بدن میزبان، برخی قارچ‌های پاتوژن با تولید بلاستوسپور، تولید سموم مختلفی می‌کنند. برای مثال قارچ *B. bassisana* ترکیبی از زهرابه‌های بیوورسین، باسیانوسید و اوسپورین تولید می‌کند. به طور قطع این زهرابه بسیار مخرب بوده و مرگ سریع حشرات را فراهم می‌کنند. پس از مرگ حشره، قارچ از بدن حشره خارج شده و فرآیند اسپورزایی یا تولید کنیدی در محیط بیرون از بدن حشره صورت می‌گیرد. پس از پخش شدن در محیط، کنیدی‌ها و اسپورها توسط باد یا حشرات دیگر حمل می‌شوند. اگر اسپورها و کنیدی‌ها نتوانند میزبان مطلوب را پیدا کنند به شکل فرم‌های دیگر کنیدی یا اسپور در می‌آیند تا بتوانند زمان بیشتری بصورت غیرفعال بقا یابند.



شکل ۲-۸- مکانیسم عمل فعالیت قارچ‌های بیماری‌زای حشرات. (الف): آزاد شدن کنیدیوم قارچی موجود در فرآورده تجاری یا جداشده از یک حشره مرده، (ب): جوانه زنی کنیدیوم قارچ و ایجاد لوله رویشی برای نفوذ در لایه کوتیکول حشره جدید، (ج): اتصال به لایه کوتیکول، ایجاد اپرسوریوم برای نفوذ به داخل لایه کوتیکول، (د): ورود به داخل لایه‌های خونی حشره و تکثیر قارچ از طریق هیف (ریسه) و ایجاد عفونت خونی در حشره، (ه): مرگ حشره و خروج کنیدیوم‌های قارچی برای عفونت‌زایی در سایر حشرات.

برخی از قارچ‌های پاتوژن حشرات مثل *Beauveria spp.*, *Metarhizium spp.*, *Isaria spp.* (*Paecilomyces*) و *Lecanicillium spp.* (*Verticillium*) که عمدتاً از گروه آسکومیست‌ها هستند، در کنار زندگی انگلی، دارای زندگی ساپروفیتی نیز هستند که در تسهیل تولید و تجاری‌سازی آن‌ها برای کنترل زیستی آفات نقش بسیار موثری دارد. این توانایی کمک می‌کند تا این قارچ‌ها را بدون نیاز به میزبان واسطه، تولید کنیم. لذا به دلیل هزینه کمتر تولید این نوع قارچ‌ها، تولید تجاری آن‌ها در برنامه‌های کنترل زیستی گسترش یافته است. اما برای تولید انبوه قارچ‌های Entomophthorales نیاز به میزبان واسطه است که موجب هزینه‌بر شدن و زمان‌بر شدن تولید تجاری آن‌ها می‌شود. ذیلاً برخی قارچ‌های مهم پاتوژن حشرات که در حال حاضر به شکل تجاری در کنترل حشرات آفت کاربرد دارند توضیح داده شده‌اند.

الف. قارچ *Beauveria bassiana*

قارچ *B. bassiana* که یک قارچ خاک‌زی و همه‌جازی است، به عنوان پاتوژن اختیاری بر روی دامنه وسیعی از بندپایان راسته‌های مختلف و حتی عنکبوت‌ها موثر است (شکل ۲-۹). این قارچ حدود ۴۰ درصد فرآورده‌های قارچی حشره‌کش موجود در بازار جهانی را شامل می‌شود. مهمترین گونه در جنس *Beauveria* گونه‌ی *bassiana* است. اما در سال‌های اخیر گونه‌های دیگری نیز از این جنس شناسایی شده‌اند که شامل *B. brongniartii*، *B. album*، *B. amorpha*، *B. caledonica*، *B.*

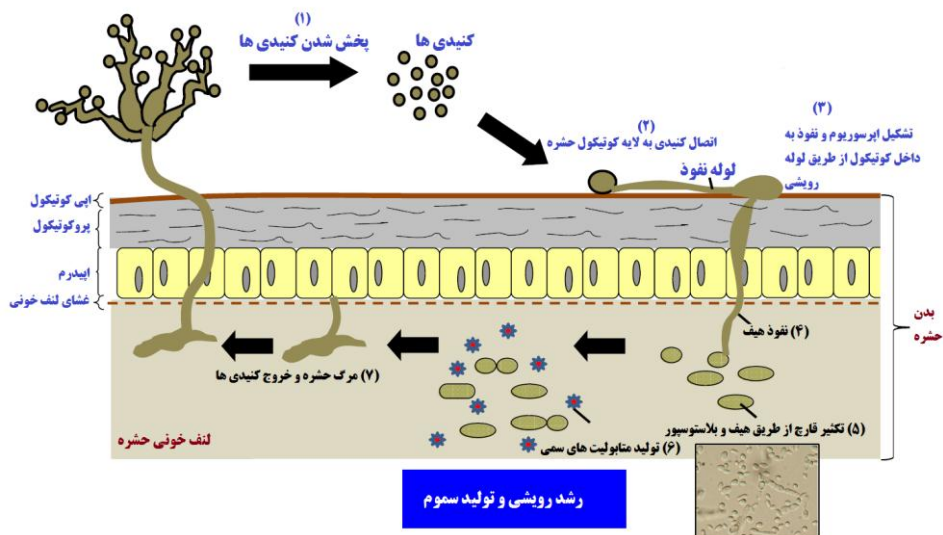
B. vermiconi و *velata* هستند. مکانیسم بیماری‌زایی قارچ *B. bassiana* تقریباً به همان سبک عمومی که در قسمت قبلی توضیح داده شد، است (شکل ۲-۹). در شکل ۲-۱۰ نیز مکانیسم عمل این قارچ بر علیه حشرات آورده شده است.



شکل ۲-۹- تاثیر قارچ *B. bassiana* بر روی آفات مختلف. الف: *Anastrepha fraterculus*. ب: *Hyphomenes hampei*. ج: سرخرطومی موز (*Metamasius hemipterus*)، د: پوره عسلک پنبه (*Bemisia tabaci*)، ه: عنکبوت (*Tetranychus urticae*)، و: سن سویا (سن سبز پنبه) (*Nezara viridula*)، ز: پسیل مرکبات (*Diaphorina citri*)، ر: *Thaumastocoris peregrinus*.

در حال حاضر بیش از ۹۰ درصد محصولات تجاری این قارچ از نوع فرآورده حاوی کنیدی هوایی هستند و کمتر از ۱۰ درصد آن‌ها حاوی بلاستوسپور است. شرکت کوپرت در برزیل این قارچ را به روش فرمنتاسیون بستر جامد^۱ بر روی برنج خیسانده شده تولید و بصورت کنیدی خالص برای اسپری کردن در حدود ۵۰ هزار هکتار قهوه و اوکالیپتوس عرضه می‌کند. این محصول برای کنترل عنکبوت‌ها (*Tetranychus urticae*)، مگس‌ها (*B. tabaci*) و سوسک‌ها (*Gonipterus* و *Hypothenemus hampei*) استفاده می‌شود. مگس‌های سفید سویا در برزیل بازاری حدود ۳۰ میلیون هکتاری دارند. سه محصول GHA، بوتانی گارد و مایکوتروپ اصلی‌ترین فراورده‌های مبتنی بر قارچ *B. bassiana* هستند که برای کنترل انواعی از مگس‌ها، تریپس‌ها، شته‌ها، سن‌ها، برگ‌خواران و سخت‌بال‌پوشان استفاده می‌شوند. فراورده‌های این قارچ بطور عمده بصورت مایع (امولسیون) یا پودر رطوبت‌پذیر تولید می‌شود. میزان مصرف آن در هکتار بین یک تا دو کیلوگرم پودر قارچ (حاوی ۱۰^۹ کنیدی در گرم) در هکتار است.

^۱Solid State Fermentation



شکل ۲-۱۰- مکانیسم بیماریزایی قارچ *B. bassiana* در لایه‌های پوستی و سیستم گوارش حشرات میزبان.

ب-قارچ *Metarhizium anisopliae*

این قارچ یک قارچ همه جازی (در تمام مکان‌ها یافت می‌شود) است که در اکثر مناطق دنیا مشاهده و جداسازی شده است. جنس *Metarhizium* توانایی کنترل حشرات مختلف از حداقل ۷ راسته را دارد. نام بیماری که توسط این قارچ در حشرات ایجاد می‌شود موسکاردین سبز^۱ است که دلیل این نام، وجود کنیدی‌های سبز رنگ قارچ در بدن حشره است (شکل ۲-۱۱). این قارچ بدلیل خاکزی بودن می‌تواند در شرایط وجود رطوبت بالا، با رشد ریشه‌ها و تولید اسپورهای فعال که کنیدی نامیده می‌شوند، به شکل اختصاصی حشرات خاکزی خاص مثل برخی سوسک‌ها و عنکبوت‌ها را از بین ببرد. قارچ *M. anisopliae* اولین قارچی بود که به عنوان حشره‌کش در بیش از ۱۰۰ سال پیش به شکل تجاری استفاده شد و در حال حاضر نیز مهمترین گونه تجاری این جنس محسوب می‌شود. از انواع تجاری شده آن می‌توان به فرآورده‌هایی از قبیل کالچاکرا^۲ تولید شده توسط شرکت اینترنشنال پاناسیا^۳ بصورت پودر و تابل و موتی^۴ از شرکت پیک هندی که بصورت امولسیون تولید می‌شود، اشاره نمود. در حال حاضر این قارچ بیش از ۳۰ درصد بازار قارچ‌های حشره‌کش را شامل می‌شود و از نظر میزان بازار بعد از *B. bassiana* در رده دوم قرار دارد. برای مثال در برزیل هر ساله آفات مختلف بیش از ۱۰۰ هزار هکتار نیشکر از قبیل زنجره نیشکر (*Mahanarva fimbriolata*)، توسط فراوده‌های مبتنی بر این قارچ کنترل می‌شوند. این قارچ برای کنترل گونه‌های ناقل مالاریا بسیار مطلوب است.

^۱Green Muscardine

^۲Kalichakra

^۳International Panaacea

^۴Moti

^۵ Peak Chemical Industry



ب

الف

شکل ۲-۱۱- الف: قارچ *Metarhizium anisopliae*. ب. بیماری موسکاردین سبز ایجاد شده توسط این قارچ در حشرات

قارچ *M. anisopliae* انواعی از آنزیم‌های هیدرولاز (کتیناز، پروتئاز و لیپاز) و توکسین‌ها را تولید می‌کند که منجر به ایجاد بیماری موسکاردین سبز و در نهایت مرگ حشره می‌شود. عموماً تاثیر این قارچ بر حشرات از مرحله شروع حمله تا مرگ بین ۱۰ تا ۲۰ روز طول می‌کشد. مشخص شده است که این سموم تولیدی برای محیط زیست و موجودات غیر هدف مخاطراتی ندارند. یکی از سموم مهم این قارچ‌ها، دستروکسین‌ها^۱ هستند که ترکیبات آلفا هیدروکسی اسید و قطعات آمینواسیدی هستند. مشخص شده است که این سموم در حین بیماری‌زایی و مرگ حشره از اهمیت زیستی فراوانی برخوردار هستند و هر چقدر میزان غلظت آن‌ها در قارچ بیشتر باشد، میزان شدت بیماری‌زایی در حشرات آفت افزایش می‌یابد.

نماتدهای پاتوژن حشرات

یکی از عوامل مهیج در تولید فرآورده‌های میکروبی حشره‌کش، نماتدهای پاتوژن حشرات هستند. دو جنس مهم نماتدهای پاتوژن حشرات شامل *Heterorhabditis* و *Steinernema* هستند (شکل ۲-۱۲). این نماتدها بطور معمول به ترتیب همراه دو جنس باکتری‌های *Photorhabdus* و *Xenorhabdus* هستند و بر حشرات تاثیر می‌گذارند. این باکتری‌ها متعلق به گروه باکتری‌های بنفش از باکتری‌های انتروپاکتریاسه هستند که به عنوان منبع غذایی این نماتدها با آن‌ها همزیست هستند. تاکنون بیش از ۳۰ گونه مختلف از این دو جنس شناسایی شده‌اند که اثر کشندگی بر حشرات مختلف دارند. نکته جالب توجه این است که برای کنترل زیستی حشرات آفت، وجود کمپلکس نماتد و باکتری الزامی است. در طی حدود سی سال گذشته تلاش شده است تا با اسپری کردن لاروهای برخی از نماتدها در سطح مزرعه، آفات را کنترل کنند.

^۱Destruxins



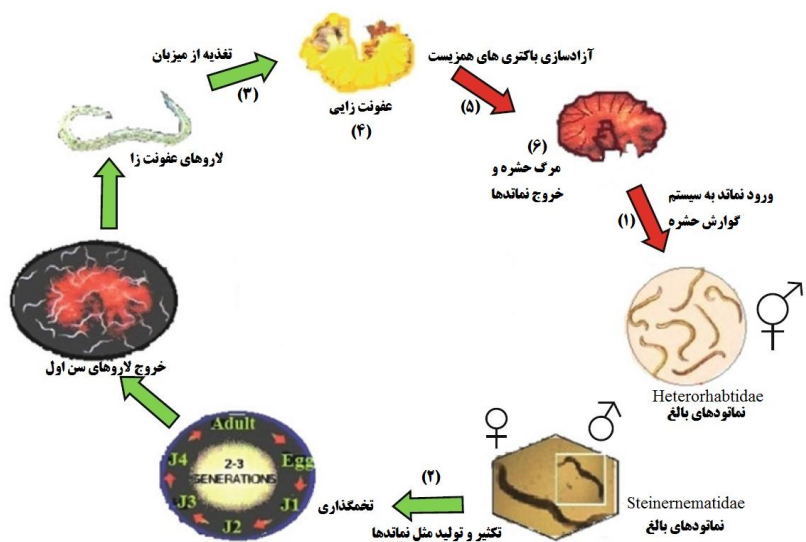
شکل ۲-۱۲- حشره آلوده شده به نماتد *Heterorhabditis bacteriophora*

نماتدهای پاتوژن حشرات در مراحل رشد و نمو حشراتی که در خاک توسعه می‌یابند، وارد سیستم حشره شده و از طریق تکثیر سریع باکتری‌های پاتوژن، ظرف ۴۸ ساعت حشره را از بین ببرند (شکل ۲-۱۲ و ۲-۱۳). پس از ورود باکتری‌ها به داخل لنف خونی شروع به تولید انواع سموم و متابولیت‌های مختلف می‌کنند که موجب از کار افتادن سیستم دفاعی حشره و مرگ نهایی آن طی دو روز می‌شوند. در طی مدت حضور نماتد در بدن حشره، تعداد ۲ تا ۳ نسل نماتد در بدن حشره تولید می‌شود. بعد از اینکه حشره مرد، لاروهای عفونت‌زای نماتد به مرحله بلوغ رسیده و با تولید مثل، نسل جدیدی از لاروهای عفونت‌زا مجدداً ایجاد می‌شود. مشخص شده است که گونه‌های *Heterorhabditis spp* در صورت عدم حضور باکتری *P. luminescens* قادر به ایجاد بیماری‌زایی در حشره نیست، اما برخی نماتدهای جنس *Steinernema spp* سمومی تولید می‌کنند که باعث افزایش میزان بیماری‌زایی توسط باکتری‌های همزیست خود می‌شوند. نقش این باکتری‌ها در ایجاد شرایط مناسب برای رشد و نمو و تکثیر نماتدها است. نماتد از سلول‌های باکتریایی به عنوان غذا استفاده کرده و رشد و نمو پیدا کرده و در نهایت با تولید مثل تکثیر می‌شود. بسته به این که چه میزان در بدن حشره غذا ایجاد می‌شود، تعداد نسل‌های ایجاد شده نماتد متفاوت خواهد بود (شکل ۲-۱۳). زمانی که غذا تمام شده و حشره بطور کامل نابود می‌شود، نماتدها به شکل لاروهای سن سوم که شکل غیرفعال دارای باکتری در روده‌ی خود هستند، وارد محیط می‌شوند.

این نوع نماتدها بصورت اختصاصی دارای اثر کشندگی بر روی گروهی از حشرات راسته دوبالان، سخت‌بال پوشان، بال-پولکداران، ملخ‌ها و تریپس‌ها هستند. تحقیقات کارایی این نماتدها را در کنترل حشرات آفت در خانواده‌های مختلف از قبیل پیرالیده^۱ و کورکولیونیده^۲ نشان داده است. همچنین حساسیت برخی آفات انباری مثل پروانه آرد (*Ephestia kuehniella* Zeller) و *Tenebrio molitor* L. به این نماتدها اثبات شده است. نحوه مصرف آن‌ها در مزرعه از طریق اسپری کردن هوایی، آبیاری و یا تزریق در خاک و یا از طریق اسپری به کمک هواپیما صورت می‌گیرد.

^۱Pyralidae

^۲Curculionidae



شکل ۲-۱۳- چرخه زندگی نماتدهای پاتوژن حشرات

پروتوزوآهای پاتوژن حشرات (میکروسپوریده)

تقریباً حدود ۱۰۰۰ گونه پروتوزوآ به حشرات از گروه‌های مختلف حمله می‌کنند. اما مهمترین گونه‌های مد نظر برای کنترل زیستی آفات شامل *Nosema spp.* و *Vairimorpha necatrix* هستند. پروتوزوآها بطور معمول تولید اسپورهای می‌کنند که عامل ایجاد عفونت در حشرات آفت هستند. پس از ورود اسپورها به بدن حشرات حساس، آنها رشد کرده و سلول‌های حشره را مورد تهاجم قرار می‌دهند که نهایتاً منجر به از بین رفتن و تخریب برخی بافت‌های داخلی حشره می‌شود. پس از مرگ حشره، دوباره این اسپورها در محیط پخش شده و توسط ناقلینی از قبیل شکارگرها و پارازیتوئیدها به حشرات آفت دیگر منتقل می‌شوند. استفاده از این موجودات به عنوان عامل کنترل زیستی حشرات آفت از قبیل ملخ‌ها در برخی موارد موفق آمیز بوده است، با این حال هنوز در مراحل اولیه است. گونه *Nosema locustae* مهمترین گونه‌ای است که برای کنترل ملخ‌ها ثبت و تجاری شده است.

فصل سوم:

عوامل میکروبی کنترل کننده بیماری‌های قارچی گیاهی

مقدمه: مکانیسم‌های عمل عوامل میکروبی کنترل کننده بیمارگرهای قارچی گیاهی

بطور کلی عوامل کنترل‌زیستی قارچ‌های پاتوژن گیاهی به دو گروه باکتری‌ها و قارچ‌ها تقسیم می‌شوند. تاکنون فرآورده‌های مبتنی بر ۱۴ گونه قارچ و باکتری به عنوان عوامل کنترل‌زیستی پاتوژن‌های گیاهی در اروپا تجاری شده‌اند که مهمترین آن‌ها باکتری *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas spp* و قارچ *Trichoderma sp* است. در زیر به مهمترین مکانیسم‌ها اشاره شده است.

الف- آنتاگونیسم مستقیم

در آنتاگونیسم مستقیم، تماس مستقیم عامل کنترل‌زیستی با بیمارگر و قدرت انتخابی آن مطرح است. که شامل چندین روش عمل از قبیل هایپر-پارازیتسم^۱، تولید آنزیم‌های هیدرولاز، تولید آنتی بیوتیک‌ها و متابولیت‌های ثانویه و است.

ب- آنتاگونیسم غیر مستقیم

در این روش، عامل کنترل‌زیستی از طریق رقابت برای مواد غذایی با بیمارگرها و یا با تحریک سیستم دفاعی گیاه و همچنین تقویت بنیه گیاه باعث ایجاد مقاومت در مقابل پاتوژن می‌شود. مثل باکتری‌های محرک رشد گیاه^۲ که باعث رشد و افزایش مقاومت گیاه می‌شوند. به عوامل میکروبی که همزمان باعث کنترل پاتوژن‌ها و رشد بیشتر و استحکام گیاه می‌شوند، پروبیوتیک نیز گفته می‌شود. مهمترین مکانیسم‌های عمل عوامل کنترل‌زیستی بیمارگرهای گیاهی در زیر اشاره شده‌اند:

مایکوپارازیتسم^۳ (هایپرپارازیتسم):

در این مکانیسم، عامل کنترل‌زیستی به طور مستقیم به بیمارگر حمله کرده و با تغذیه از منابع غذایی موجود در بیمارگر آن‌را از بین می‌برد. از این گروه برای مثال می‌توان به *Pasteuria*، *Lysobacter enzymogenes*، *Ampelomyces quisqualis* و *Trichoderma virens* اشاره داشت. این عوامل به چهار گروه هیپوپارازیت‌ها^۴، پارازیت‌های اختیاری^۵، پاتوژن‌های باکتریایی اجباری^۶ و شکارگرها تقسیم می‌شوند.

آنتی بیوز:

بعضی از میکروارگانیسم‌ها یک یا چند ترکیب آنتی‌بیوتیکی تولید می‌کنند. آنتی‌بیوتیک‌های بطور کلی ترکیبات سمی هستند که قادرند در مقدار کم میکروارگانیسم‌های دیگر را از بین ببرند. مشخص شده است که برخی از عوامل میکروبی آنتی‌بیوتیک‌هایی تولید می‌کنند که عوامل بیمارگر گیاهی را بطور کارایی کنترل و از ایجاد بیماری توسط آن‌ها جلوگیری می‌کنند. برای کنترل کارآمد

¹Hyper-parasitism

²Plant Promoting Growth Rhizobacteria

³ Myco-parasitism

⁴Hypoparasites

⁵ Facultative Parasites

⁶ Obligate Bacterial pathogens

بیمارگرهای گیاهی لازم است تا آنتی‌بیوتیک موثر به میزان کافی در نزدیکی عامل بیمارگر وجود داشته باشد. از این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به شامل فنازین^۱ و فلوروگلوسینول^۲ اشاره نمود.

تولید متابولیت‌های مختلف:

برخی از عوامل میکروبی کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی تولید متابولیت‌هایی می‌کنند که قادرند از رشد بیمارگرها جلوگیری کنند. آنزیم‌های هیدرولیز کننده که قادرند ترکیبات پلیمری مثل کیتین، پروتئین، سلولز، همی سلولز و DNA را تجزیه کنند، از این قبیل ترکیبات هستند. مطالعات نشان داده‌اند که حتی برخی از این مواد قادرند به تنهایی از رشد پاتوژن جلوگیری کنند. برای مثال آنزیم کیتیناز تولید شده توسط *Serratia marcescens* قادر است به تنهایی قارچ *Sclerotium rolfsii* را بطور کامل کنترل کند. همچنین کیتوزان تولید شده از تجزیه دیواره سلولی کیتینی قارچ، موجب تقویت سیستم دفاعی گیاه در مقابل *Fusarium f. sp. radialis-lycopersicis oxysporum* در گوجه فرنگی شده است. علاوه بر آنزیم‌های هیدرولاز، مشخص شده است که ترکیبات دیگری از قبیل هیدروژن سیانید (HCN)، آمونیاک، سیدروفور و نیز قادرند در کنترل بیمارگرهای گیاهی نقش داشته باشند. برای مثال هیدروژن سیانید قادر است فرایند سیتوکروم اکسیداز را در سلول‌های بیمارگرها متوقف کند و از طرفی برای میکروارگانیسم‌های هوازی فوق العاده سمی است.

رقابت:

با توجه به اینکه مواد مغذی موجود در خاک و ریزوسفر محدود است، لذا میکروارگانیسم‌های مختلف برای کلونیزه کردن ریشه و سطح گیاه باید با یکدیگر برای مواد غذایی رقابت کنند. مشخص شده است که رقابت بیمارگرهای گیاهی با سایر میکروارگانیسم‌های غیر بیماری‌زا برای دسترسی به مواد غذایی موضوع بسیار مهمی است. مخصوصاً رقابت برای عوامل بیمارگر خاک‌زادی مثل فوزاریوم‌ها و پیتیوم‌ها که از طریق میسلیم گیاه را آلوده می‌کنند در مقایسه با قارچ‌های حمله کننده به اندام‌های هوایی (از طریق اپرسوریوم) خیلی مهم است. مشخص شده است که میکروارگانیسم‌های غیرپاتوژن همراه گیاهان بطور معمول بدلیل کلونیزه کردن سریع سطح ریشه و حتی اندام‌های هوایی و جذب سریع مواد غذایی قادرند گیاه را در مقابل حمله بیمارگرها محافظت کنند. بنابراین بدلیل مواد غذایی قابل دسترس کمتر، بیمارگرها قادر به رشد بر روی گیاه نخواهند بود. برای مثال مشخص شده است که باکتری *Enterobacter cloacae* با مکانیسم رقابت می‌تواند *Pythium ultimum* را کنترل کند. از طرف دیگر این میکروارگانیسم‌های مفید با تولید متابولیت‌های مختلف از رشد بیمارگرهای موجود جلوگیری می‌کنند. رقابت برای جذب عناصر غذایی میکرو مثل آهن که به میزان کم وجود دارند ولی برای رشد ضروری هستند، نیز بسیار اهمیت دارد. در محیط‌هایی که میزان آهن کم است، عوامل کنترل زیستی با تولید ترکیبات متصل شونده به آهن که سیدروفور نام دارند، آهن موجود در محیط را جذب می‌کنند. ارتباط تولید سیدروفور با قابلیت و توانایی کنترل زیستی در سودوموناس‌ها بر علیه قارچ *F. oxysporum* نیز به اثبات رسیده است.

تحریک مقاومت گیاه:

تحریک سیستم دفاعی گیاه توسط عوامل کنترل زیستی و سایر میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا می‌تواند به دو شکل اتفاق بیفتد. یک مکانیسم به نام مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR)^۳ است که به واسطه اسید سالیسیلیک ایجاد می‌شود. این اسید زمانی که

^۱ Phenazine

^۲ Phloroglucinol

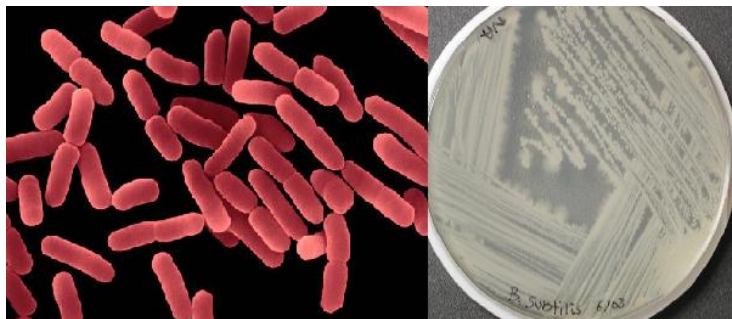
^۳ Systemic Acquired Resistance (SAR)

گیاه مورد حمله بیمارگرها واقع می‌شود، به میزان زیاد تولید شده و تولید زیاد آن منجر به افزایش تولید پروتئین‌های دفاعی PR (پروتئین مرتبط با بیماری‌زایی)^۱ می‌شود. این پروتئین‌ها عمدتاً شامل آنزیم‌هایی هستند که به شکل مستقیم دیواره سلولی سلول‌های گیاهی مورد حمله را از بین می‌برند یا دیواره سلول‌های گیاهی مورد حمله را تقویت می‌کنند تا در مقابل حمله مقاومت داشته باشند. علاوه بر این این آنزیم‌ها می‌توانند در صورت نیاز موجب مرگ سلول‌های مورد حمله بیمارگر شوند. دومین مکانیسم تحریک دفاعی به نام مقاومت سیستمیک تحریک شده (ISR) است که به واسطه جاسمونیک اسید و یا اتیلن در گیاهان اجرا می‌شود. این مواد پس از کاربرد عوامل کنترل زیستی یا باکتری‌های غیر بیمارگر تولید می‌شوند.

در اینجا به شرح انواع مهم عوامل زیستی کنترل کننده بیمارگرهای گیاهی می‌پردازیم:

الف-باکتری *Bacillus subtilis* به عنوان عامل کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی

باکتری *B. subtilis* یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل، تولید کننده اندوسپور و خاک‌زی است که در ریزوسفر اغلب گیاهان یافت می‌شود (شکل ۳-۱). این باکتری به عنوان محرک رشد گیاه بوده و رشد گیاه را افزایش می‌دهد و از طرفی موجب کنترل بسیاری از بیماری‌های گیاهی ایجاد شده توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌شود. سویه‌های تجاری *B. subtilis* کنترل کننده‌های قوی بیماری‌های گیاهی هستند. قارچ‌کش تجاری سریند^۲ حاوی این باکتری روی باکتری‌های بیمارگر مانند برخی سویه‌های *Erwinia Pseudomonas* و *Xanthomonas* موثر شناخته شده است. برخی از مکانیسم‌های ضدباکتری *B. subtilis* ناشناخته باقی مانده اما این عامل قادر به تولید متابولیت‌های ضدباکتری متنوعی مانند سورفکتین^۳ است. سورفکتین یک بیوسورفکتانت قوی و مهم برای نگهداری ساختار بیوفیلم به شمار می‌رود.



ب

الف

شکل ۳-۱- باکتری *B. subtilis*. الف- کلونی باکتری، ب- سلول‌های باکتری

این باکتری‌ها طیف وسیعی از متابولیت‌های ضد قارچی و آنتی‌بیوتیکی تولید می‌کنند که نقش اساسی در کنترل زیستی دارند برای مثال، تولید آنتی‌بیوتیک‌های لیپوپپتیدی غیرریبوزومی مثل سورفکتین، ایتورین و فنجاسین در گونه *B. subtilis* به میزان زیادی

^۱Pathogenesis Related Proteins (PR)

^۲Serenade

^۳Surfactin

دیده شده است. سورفکتین یک بیوسورفکتنت قوی بوده و با خاصیت دترجنتی خود منجر به تخریب غشاهای زیستی می‌شود. فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد مایکوپلاسمایی این ترکیب گزارش شده است. لنتی‌بیوتیک‌ها و پپتیدهای مشابه لنتی‌بیوتیک‌ها به طریق سنتز ریبوزومی و با تشکیل روزنه درون غشا سیتوپلاسمی یا جلوگیری از سنتز دیواره سلولی موجبات مرگ سلول را فراهم می‌آورند. تعداد آنتی‌بیوتیک‌های ریبوزومی تولید شده توسط گونه‌های جنس *Bacillus* به ۱۶۷ می‌رسد که بیشتر علیه باکتری‌های گرم مثبت موثر هستند.

باکتری *B. subtilis* علاوه بر تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف قادر به القاء مقاومت در گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا است. همچنین نقش این گونه باکتری در تحریک رشد گیاهان به اثبات رسیده است. دانشمندان اعتقاد دارند که تولید بیوفیلم و سورفکتین در میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست در توانایی کنترل بیولوژیک بیماری‌ها نقش مهمی دارد. گونه *B. subtilis* به صورت موفقیت آمیزی برای کنترل طیف وسیعی از پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی شامل *Botrytis cinerea*، *Fusarium*، *S. sclerotiorum*، *R. solani*، *graminearum* و *Xanthomonas oryzae* و *Pseudomonas solanacearum* استفاده شده است.

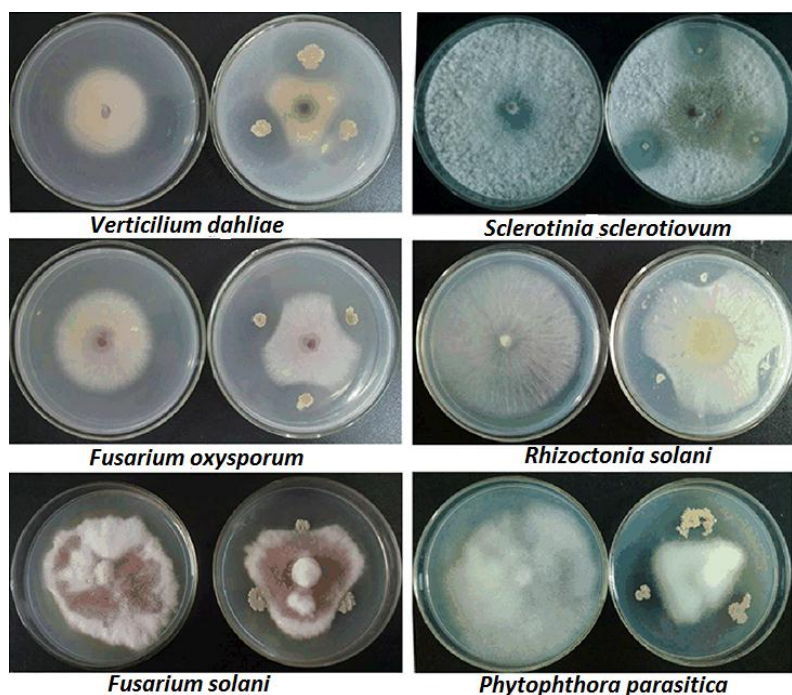
ب. باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* به عنوان عامل کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی

باکتری *B. amyloliquefaciens* یک باکتری گرم مثبت و میله‌ای شکل است که کلنیزه کننده ریشه بوده و دارای خاصیت کنترل کنندگی عوامل بیمارگر ریشه گیاهی در کشاورزی، آبی‌زی پروری و هیدروپونیک است (شکل ۳-۲). از نظر فیلوژنی بسیار نزدیک به *B. subtilis* است. اسم گونه این باکتری به دلیل تولید آنزیم آمیلاز که تجزیه کننده ترکیبات نشاسته‌ای گذاشته است. بدلیل تولید اندوسپور، توانایی ماندگاری بالایی در شرایط نامناسب دارد. علاوه بر این، باکتری *B. amyloliquefaciens* تولید متابولیت‌هایی از قبیل سوبتیلین می‌کند که خصوصیت ضد میکروبی دارند. این باکتری توانایی کنترل باکتری‌ها و قارچ‌های پاتوژن را از طریق تولید ترکیبات ضد میکروبی و همچنین رقابت برای مواد غذایی را دارد.



شکل ۳-۲. باکتری *B. amyloliquefaciens*. الف-کلنی‌های باکتری، ب-سلول‌های باکتری

این باکتری ترکیبات ضد باکتری و ضد قارچی از قبیل زوئترمایسین ¹A، کانوزامین ²، و لیپوپتیدهایی از قبیل ایتورین، سورفکتین و فنجایسین تولید می‌کند. اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی این ترکیبات قبلاً بطور کامل به اثبات رسیده است. از طرف دیگر مثل *B. subtilis* این باکتری توانایی تحریک دفاع سیستمیک و همچنین تحریک رشد گیاه را دارد. تاکنون کنترل برخی عوامل بیمارگر گیاهی مثل *Pythium* و *Ralstonia solanacearum* در گوجه فرنگی، *Rhizoctonia solani* در کاهو، *Alternaria tenuissima* در گیاهان گلخانه ای، *Podosphaera fusca* عامل ایجاد بیماری در برگ‌های خربزه و هندوانه و *Fusarium* در موز و خیار به اثبات رسیده است. این باکتری خصوصاً تحریک رشد گیاه را داشته و تحمل تنش‌های محیطی مثل خشکی و شوری را در گیاه بالا می‌برد (شکل ۳-۳).



شکل ۳-۳- کنترل زیستی قارچ‌های بیمارگر مختلف توسط باکتری *B. amyloliquefaciens*. در تصاویر، در یک پتری فقط قارچ کشت شده است (کنترل) که رشد کامل قارچ بصورت دایره کامل دیده می‌شود، و در یک پتری هم، هم‌کشتی باکتری و قارچ وجود دارد که در آن سه لکه باکتری در اطراف کلنی قارچ کشت داده شده است و اثر بازدارندگی آن بر روی قارچ‌های مختلف قابل مشاهده است.

¹ Zwittermicin A

²Kanosamin

ج. کاربرد باکتری‌های *Pseudomonas* در کنترل زیستی

جنس *Pseudomonas* از گونه‌های متعدد و متنوعی تشکیل شده است. باکتری‌های این جنس گرم منفی، به دلیل اینکه قادرند از منابع مختلف به عنوان منبع انرژی استفاده کنند، می‌توانند در هر جایی رشد کنند. به همین دلیل، این باکتری‌ها را می‌توان در خاک، آب، سطح گیاه، آب دریای آلوده به نفت و حتی معده حشرات دیده شود. برخی از آن‌ها به صورت ساپروفیت هستند، برخی همزیست و برخی نیز پاتوژن گیاهی و یا انسانی هستند (شکل ۳-۴).



ب

الف

شکل ۳-۴- باکتری *P. fluorescens*. الف. سلول‌های باکتری، ب. کلنی‌های باکتری

سه گونه مهم این جنس شامل *P. fluorescens*، *P. protegens* و *P. chlororaphis* هستند که به عنوان عوامل مفید برای کنترل زیستی عوامل بیماری‌گر بصورت تجاری کاربرد پیدا کرده‌اند. برخی گونه‌های *P. syringae* برای گیاهان بیماری‌زا هستند، اما برخی دیگر بیماری‌زا نبوده و قابلیت استفاده به عنوان عامل کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی کاربرد دارد. مهمترین فرآورده‌های تجاری کنترل زیستی مبتنی بر سودوموناس‌ها، حاوی یک یا دو تا از این چهار گونه هستند.

یکی از مهمترین گونه‌های این جنس، گونه *P. fluorescens* است که در خاک و آب زندگی می‌کند و دارای زندگی همزیستی با گیاهان است و با کلنیزه کردن ریشه آن‌ها با گیاهان همزیستی دارد. این باکتری‌ها در محیط ریشه با پاتوژن‌ها برای مواد غذایی رقابت کرده و بر آن‌ها اثر آنتاگونیستی دارند، ضمن اینکه با گیاه ارتباط همزیستی دارند. برخی از سویه‌های این باکتری (مثل CHA0 یا Pf-5) دارای خصوصیت کنترل زیستی بر علیه برخی عوامل قارچی از قبیل *Gaeumannomyces*، *Thielaviopsis*، فوزاریوم‌ها، رایزوکتونیا، فیتیوم‌ها و برخی نماتدهای پاتوژن گیاهی دارند. مکانیسم عمل این باکتری شامل تولید آنزیم‌ها (مثل پروتئازها)، تولید متابولیت‌ها و آنتی بیوتیک‌ها (مثل فنازین^۱، پیولوترین^۲، پیرول نیترین^۳، دی استیل فلورگلونول^۴ (2,4-DAPG)، و سیانید هیدروژن)، تحریک مقاومت سیستمی (با تحریک سیگنال‌های جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید) و یا تولید ترکیبات محرک رشدی مثل سیدروفور و حل کننده‌های فسفات باشد. علاوه بر این مشخص شده است که برخی سویه‌های سودوموناس

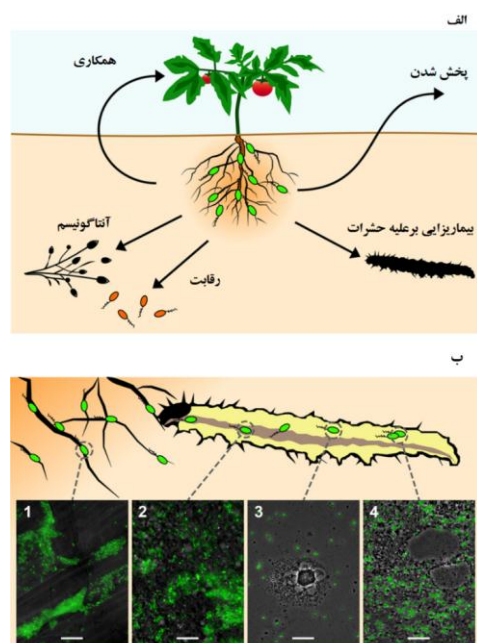
^۱Phenazine

^۲Pyoluteorin

^۳Pyrolnitrine

^۴2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG)

دارای فعالیت ضد حشرات بوده و قادرند حشرات آفت مثل شته‌ها، سوسک‌ها و همچنین عنکبوت‌ها را نیز کنترل کنند (شکل ۳-۵).



شکل ۳-۵- مکانیسم کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی و حشرات آفت توسط باکتری‌های *Pseudomonas*

مشخص شده است که دلیل خصوصیت حشره‌کش آن‌ها تولید متابولیت‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های سمی اشاره شده فوق است. ریزوباکترهای متعلق به گونه‌های *P. putida* و *P. fluorescens* قادر به کلونیزاسیون سریع ریشه بوده و با تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و سیدروفورهای موثر، گیاهان را در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا حفاظت می‌کنند. این باکتری‌ها با تولید اسیدهای آلی از قبیل سالیسیلیک و لاکتیک اسید به صورت غیرمستقیم منجر به افزایش رشد گیاه می‌شوند. به علاوه تاثیر مثبت این باکتری‌ها روی سایر میکروارگانیسم‌های مفید خاک و میکوریزا و همچنین کمک به جذب مواد معدنی (به خصوص فسفر و ازت) توسط گیاه از دیگر مکانیسم‌های موثر در افزایش رشد گیاه می‌باشند.

د. استرپتومایسس‌ها به عنوان عوامل کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی

استرپتومایسس‌ها به طور گسترده در محیط‌های آبی و خاکی طبیعی وجود دارند و گاهی بیش از ۱۰ درصد فلور میکروبی خاک را نیز شامل می‌شوند. این باکتری‌های گرم مثبت که تولیدکننده میسیلیوم هستند، قادر به سازگاری با محیط‌های خاکی بوده و به دلیل

تولید آنزیم‌های مختلف قادر به تجزیه کیتین و لیگنین هستند (شکل ۳-۶). استرپتومایسس‌ها، اغلب گند روی^۱ هستند، اما انواع انگل^۲ آن برای حیوانات و گیاهان نیز وجود دارد. این باکتری‌ها اغلب قادر به تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی هستند که در جهت حفاظت از خود و منابع غذایی خود تولید می‌کنند. استرپتومایسس‌ها قادرند برای مدت‌های طولانی به صورت آرتروسپور^۳ (سلول‌های شبیه اسپور در برخی قارچ‌های آسکومیست) در خاک باقی بمانند. این باکتری‌ها اگرچه به عنوان باکتری-های خاک‌زی مطرح هستند، اما برخی از آن‌ها قادر به کلونیزه کردن بافت‌های گیاهی و یا ریشه‌های (هیف) قارچ‌ها نیز هستند. میسلیوم‌های آن‌ها قادر است انواعی از قارچ‌های پاتوژن را کلنیزه کنند و لذا از آن‌ها قابل جداسازی هستند. بعضی از استرپتومایسس‌ها قادر به کلونیزه کردن ریشه گیاه و ایجاد زندگی اندوفایتی با گیاه هستند. این نوع زندگی ممکن است موجب تحریک رشد گیاه و یا ایجاد بیماری در گیاه شود.



الف ب

شکل ۳-۶- شکل ظاهری باکتری‌های استرپتومایسس. الف- شکل کلنی و ب. شکل سلول‌های استرپتومایسس‌ها

مشخص شده است که برخی گونه‌های استرپتومایسس از قبیل *S. griseoviridis* دارای خصوصیت کنترل زیستی بر علیه برخی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی مثل *Phytophthora*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Alternaria brassicicola*, *Sclerotium rolfsii* و *Pyricularia oryzae* هستند. گونه‌های مختلف استرپتومایسس بدلیل توانایی بالا در تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌های هیدرولاز و همچنین تحریک سیستم دفاعی گیاه و همچنین دارا بودن خصوصیت محرک رشدی در شرایط تنش‌های غیرزنده مثل شوری و خشکی، می‌تواند به عنوان کاندیداهای خوبی برای استفاده در کنترل زیستی عوامل بیماری‌زا و همچنین به عنوان کودهای زیستی باشند.

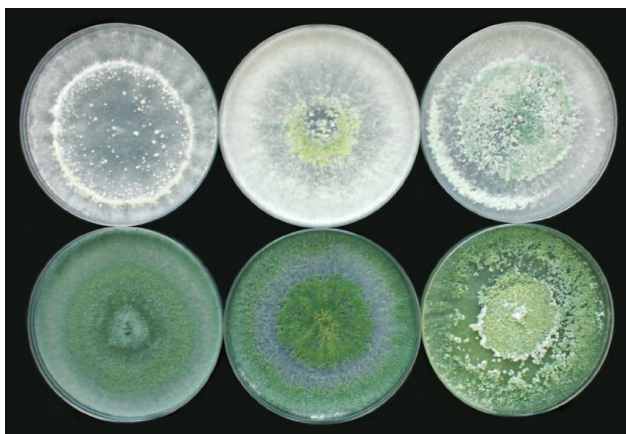
ه. قارچ تریکودرما به عنوان عامل کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی

¹Saprophyt

²Parasite

³Arthrospore

در میان عوامل کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی، قارچ *Trichoderma spp.* تلومورف آن (*Hypocrea spp.*) به عنوان یکی از مهمترین و موثرترین عوامل کنترل زیستی شناخته شده و برای مدت طولانی است که در کنترل تلفیقی بیمارگرهای گیاهی کاربرد دارد. تقریباً ۶۰ درصد قارچ‌های مورد استفاده در کنترل زیستی عوامل بیمارگر فرآورده‌های مبتنی بر قارچ *تریکودرما* هستند که برای کنترل انواع بیماری‌های گیاهان زراعی، باغی و زینتی استفاده می‌شوند. در حال حاضر به منظور مبارزه با طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و انومسیت‌ها و همچنین بهبود تولید محصولات کشاورزی، بیش از ۱۰۰ نوع فرآورده‌های مختلف قارچ *تریکودرما* در سراسر دنیا به بازار عرضه شده است. گونه‌های جنس *تریکودرما*، غالباً خاک‌زی هستند و می‌توان آن‌ها را در لایه هوموسی خاک‌های جنگلی و نیز در خاک‌های کشاورزی با مورفولوژی متنوع مشاهده کرد (شکل ۳-۷).



شکل ۳-۷- تنوع ظاهری گونه‌های مختلف *تریکودرما*. ردیف بالا (از راست به چپ): *T. viride*، *T. longipile* و *T. cremeum*. ردیف پایین (از راست به چپ): *T. citrinoviride*، *T. atroviride* و *T. citrinoviride*.

ویژگی‌های منحصر به فرد گونه‌های قارچ *تریکودرما* موجب برتری این قارچ‌ها در محیط ریزوسفر نسبت به دیگر گونه‌های قارچی می‌شود. قارچ *تریکودرما* نه تنها به عنوان عامل کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی عمل می‌کند، بلکه می‌تواند با کلنیزه کردن ریشه و برقراری ارتباط همزیستی با گیاه و همچنین تولید مواد و متابولیت‌های مختلف باعث تحریک رشد گیاه و تحریک سیستم دفاعی گیاه شده و نهایتاً نقش کودهای زیستی را بازی کند. لذا این قارچ در حال حاضر علاوه بر تولید به عنوان عامل کنترل زیستی، برخی سویه‌های آن به عنوان کود زیستی و اصلاح کننده خاک در بازار عرضه می‌شوند. همچنین این قارچ به عنوان منبع تولید بسیاری از آنزیم‌های صنعتی از قبیل سلولازها، گلوکونازها و زایلاناز مطرح است (شکل ۳-۸).

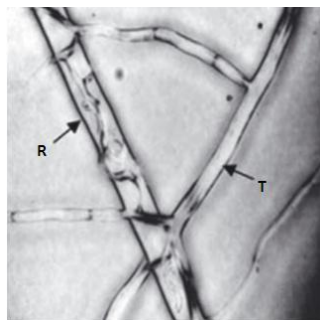


شکل ۳-۸- مکانیسم ها و نحوه عمل قارچ تریکودرما در کنترل عوامل بیماریزا

قارچ تریکودرما به عنوان عوامل موثر کنترل بیولوژیک دارای ظرفیت آنتاگونیستی بالا در برابر طیف وسیعی از قارچ‌های بیمارگر گیاهی است. مکانیسم بکاربرده شده توسط تریکودرما برای حمله به بیمارگر یک فرایند پیچیده است که شامل اتفاقات پی‌درپی و زنجیروار است، از جمله رشد شیمیایی مثبت در میزبان، تماس مستقیم با بیمارگر و پیچیدن اطراف هیف میزبان. علاوه بر این، تغییراتی مورفولوژیکی نیز در هیف‌های قارچ تریکودرما به وقوع می‌پیوندد که شامل تشکیل اندام آپروسوریوم مانند که یک ساختار نفوذی است و تولید آنزیم تجزیه کننده دیواره سلولی است که این امر اجازه نفوذ به هیف‌های قارچ میزبان را می‌دهد و در نهایت مرگ میزبان می‌شود (شکل ۳-۹).

[M] Commented [۱]: تکراری است. حذف

[M] Commented [۱]: این یعنی چه؟



شکل ۳-۹- فرایند آنتاگونیستی تریکودرما در برابر قارچ *Rhizoctonia solani* با ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده و ورود تریکودرما به درون ریشه پاتوژن R – *R. solani*; T – *T. harzianum*.

مطالعات مختلف توان کنترل زیستی گونه‌های مختلف این قارچ از قبیل *T. harzianum*، *T. viride* و *T. virens* را در کنترل بسیاری از بیمارگرهای گیاهی از قبیل *Rhizopus*، *Pythium*، *Phytophthora*، *Rhizoctonia solani*، *Sclerotium rolfsii*، *Botrytis cinerea*، *Leptosphaeria maculans* و *Fusarium sp.* به اثبات رسانده اند.

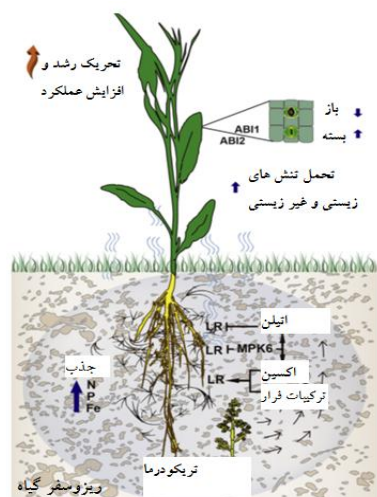
تریکودرما با تولید آنزیم‌های هیدرولاز مثل کیتیناز، سلولاز، گلوکوناز، لیپاز، آمیلاز، پکتیناز، آرابیناز، پروتئاز و زایلاناز دیواره سلولی پاتوژن را تجزیه می‌کنند. همچنین قارچ تریکودرما قادر است با ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک بافت‌های بسیار محکم بیمارگرهای گیاهی مانند سختینه‌ها (اسکلروت‌ها) را نیز تحت تاثیر قرار داده و به داخل آن‌ها نفوذ نماید.

از دیگر ویژگی‌های گونه‌های تریکودرما که موجب برتری این قارچ در محیط رایزوسفر نسبت به دیگر گونه‌های قارچی می‌شود، قدرت رقابت بسیار بالای این قارچ به عنوان رقابت‌کننده بر سر فضا و مواد مغذی در محیط رایزوسفر است. سویه‌هایی از تریکودرما که در جذب مواد غذایی کارا تر هستند و به عنوان رقیب در محیط رایزوسفر نسبت به سایر رقبای خود رشد سریع‌تری دارند، توانایی کلونیزاسیون ریشه در آن‌ها بسیار بالاتر بوده و می‌توانند در کنج‌های اکولوژیکی مختلف بی‌رقیب زنده بمانند. در فرایند کلونیزاسیون ریشه، تریکودرما به صورت بین سلولی در خلال سلول‌های اپیدرم، پوست و آوند رشد می‌کند بدون اینکه تغییرات زیادی در ساختار آن‌ها ایجاد کند. زمانی که هیف وارد ریشه گیاه می‌شود، قارچ در خلال فضای داخل سلولی اپیدرم‌ها شروع به رشد می‌کند. طی کلونیزاسیون ریشه، قارچ تریکودرما با سیستم دفاعی گیاه نیز ارتباط برقرار می‌کند، تریکودرما با کلنیزه کردن ریشه گیاهان با تحریک تولید پیروکسیدازها، کیتینازها، بتا ۱، ۳ گلوکاناز، فنیل آلانین و هیدروپروکسیداز، موجب تجمع ترکیبات فیتوالکسین و فعال کردن فرایندهای دفاعی گیاه می‌شوند.

استقرار موفقیت‌آمیز تعامل تریکودرما و گیاه طی مراحل اولیه کلونیزاسیون ممکن است با فعال شدن سم‌زدایی سلولی و مکانیسم‌های دفاعی همراه باشد. بنابراین، این قارچ‌ها باید یک سیستم موثر را پردازش کنند که بطور موثر موجب حذف ترکیبات مضر برای سلول شوند. در یک محیط طبیعی درون خاک، میکروارگانیسم‌های مفید و مضر در اطراف گیاهان وجود دارند. سیستم‌هایی برای تشخیص این میکروارگانیسم‌ها بکار می‌برند شامل مجموعه‌ای از فرایندهای بسیار هماهنگ است. مکانیسم‌های سلولی با توجه به نوع ارتباط گیاه و میکروب عمل می‌کند (مانند پارازیتسم، همیاری و همزیستی). گیاهان برای مقابله با یک عامل بیمارگر طیف وسیعی از پاسخ‌های دفاعی بیوشیمیایی و مولکولی را فعال می‌کنند. پاسخ به میکروارگانیسم‌ها شامل تولید ROS، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی طی واکنش فوق حساسیت (HR)، سنتز متابولیت‌های ثانویه با فعالیت ضد میکروبی (فیتوالکسین‌ها)، ضخیم شدن دیواره سلولی از طریق رسوب لگنین و فعال شدن پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) است. راه‌اندازی مقاومت سیستمیک در گیاهان منحصر به عوامل بیمارگر نیست. تقابل گیاهان با میکروارگانیسم‌های غیربیمارگر نیز می‌تواند مقاومت سیستمیک را القا کند. القاء مقاومت سیستمیک به وسیله تریکودرما شامل تشخیص قارچ به وسیله گیاه در خلال مقاومت سیستمیک القایی (ISR) است که به واسطه هورمون‌های گیاهی جاسمونیک اسید (JA) و اتیلن (ET) اتفاق می‌افتد. علاوه بر این تریکودرما، بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) را به واسطه هورمون سالیسیلیک اسید القا می‌کند. این پاسخ به عنوان مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) شناخته شده است.

یکی از مکانیسم‌های مهم تریکودرما در مقابله با پاتوژن‌ها تولید متابولیت ضد میکروبی (آنتی بیوز) است که این مواد اثر کشندگی یا بازدارندگی بر روی پاتوژن‌ها دارند. تاکنون نزدیک به ۲۰۰ نوع متابولیت مختلف با خصوصیات ضد میکروبی در گونه‌های مختلف تریکودرما شناسایی شده است. این ترکیبات در قالب سه گروه آنتی‌بیوتیک‌های فرار، ترکیبات محلول در آب و پیتابیول‌ها

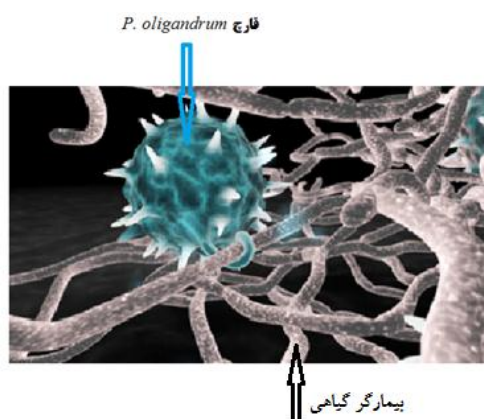
تقسیم‌بندی می‌شوند. سه گونه *T. harzianum*، *T. viride* و *T. koningii* قادرند آنتی بیوتیکی به نام ۶-پنتیل آلفا پیرون را تولید کنند که از گروه آنتی‌بیوتیک‌های فرار است و در کنترل بسیاری از قارچ‌ها مثل *R. solani*، *B. cinerea* و *F. oxysporum* نقش دارد. سایر ترکیبات آنتی بیوتیکی قارچ‌های تریکودرما که دارای خصوصیات ضد قارچی (*F. R. solani*)، *Botrytis alli*، *Penicillium expansum*، *Aspergillus niger* و ضد باکتریایی (*P. aeruginosa*، *E. coli*) و شامل کونینگین‌ها، ویریدین، درمادین، تریکوویریدین، لیگنورن، و اسید کونینجیک هستند که توسط *Bacterioides fragilis*) گونه‌های *T. koningii*، *T. harzianum*، *T. aureoviride*، *T. viride*، *T. virens*، *T. hamatum* و *T. lignorum* تولید می‌شوند.



شکل ۳-۱۰ ویژگی‌های محرک زیستی تریکودرما در ارتباط قارچ و ریشه. متابولیت‌های تریکودرما مثل ترکیبات فرار، اتیلن و اکسین باعث نمو ریشه و تشکیل ریشه‌های جانبی (LR) می‌شود. تماس تریکودرما با ریشه و متابولیت‌های حاصل از آن باعث افزایش جذب عناصر غذایی شده و نهایتاً افزایش سلامت گیاه، افزایش محصول و افزایش تحمل نسبت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی را به دنبال خواهد داشت.

قارچ *Pythium oligandrum* به عنوان عامل کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی

قارچ *Pythium oligandrum* از گروه اومیست‌ها است که به عنوان یک قارچ غیر بیمارگر عمدتاً از ریزوسفر گیاهان جداسازی می‌شود. این قارچ می‌تواند بصورت مستقیم و یا غیر مستقیم در کنترل بیمارگرهای گیاهی نقش داشته باشد. مکانیسم عمل این قارچ نیز دقیقاً شبیه تریکودرما بوده و از طریق مکانیسم میکوپارازیتسم (شکل ۳-۱۱)، آنتی بیوز، رقابت برای مواد غذایی و فضا، تحریک سیستم دفاعی گیاه و همچنین تولید متابولیت‌های محرک رشد گیاه می‌تواند در کنترل پاتوژن‌های گیاهی نقش واقعی داشته باشد. این قارچ بسته به نوع پاتوژن و نوع گیاه میزبان می‌تواند تعداد زیادی از پاتوژن‌های گیاهی را بین ۱۵ تا ۱۰۰ درصد در سطح گلخانه یا مزرعه کنترل می‌کند. تعداد زیادی از قارچ‌ها و باکتری‌های پاتوژن گیاهی تاکنون توسط این قارچ کنترل شده‌اند. این قارچ با تولید زئوسپورانژیوم^۱ که در آن بین ۸ تا ۴۰ زئوسپور متحرک قرار دارد، می‌تواند به قارچ‌های پاتوژن گیاهی حمله کنند (شکل ۳-۱۱). نکته قابل توجه در خصوص این قارچ، این موضوع است که قارچ به مقدار کمی در اپیدرم گیاه نفوذ می‌کند و ریشه را کلنیزه می‌کند، اما برعکس تریکودرما نمی‌تواند در آنجا بصورت زنده باقی بماند. با نفوذ قارچ، سیستم دفاعی گیاه تحریک شده و عوامل پاتوژن دیگر نمی‌توانند به گیاه حمله کنند. در هر صورت با توجه به عدم شناخت کافی از این قارچ و ایمنی آن، هنوز مصرف تجاری آن در دنیا آنچنان گسترش پیدا نکرده است.



شکل ۳-۱۱- مکانیسم میکوپارازیتسم قارچ *P. oligandrum* بر علیه قارچ *R. solani*

^۱Zoosporangium

فصل چهارم:

عوامل میکروبی کنترل کننده علف‌های هرز

کنترل زیستی علف‌های هرز، راهکارها و مزایا

یکی از عوامل زنده تأثیرگذار در کاهش عملکرد گیاهان زراعی و باغی، علف‌های هرز هستند. حضور علف‌های هرز در مزرعه می‌تواند تا ۱۰۰ درصد محصول را از بین ببرد. علف‌های هرز به دو صورت کمی و کیفی به محصول خسارت وارد می‌کنند. این عوامل مضر از یک طرف می‌توانند باعث کاهش کیفیت و ارزش غذایی ویا مسمومیت محصول شوند، و از طرف دیگر می‌توانند باعث کاهش مقدار تولید در واحد سطح شوند. نحوه بروز خسارت آن‌ها بطور مختصر در زیر توضیح داده شده است:

۱- رقابت با محصول اصلی در جذب رطوبت، مواد غذایی، اشغال فضا و نهایتاً کاهش محصول اصلی

۲- خسارت از طریق ترشح مواد سمی در داخل خاک و آلوده کردن محصول و گیاهان زراعی

۳- ایجاد مسمومیت در دام و طیور و حتی خود انسان توسط بعضی از علف‌های هرز سمی به صورت مختلف

۴- علف‌های هرز به عنوان پناهگاه و میزبان حد واسط برخی از عوامل بیماری و آفات گیاهان زراعی محسوب می‌شوند

۵- صرف هزینه، زمان و انرژی برای کنترل علف‌های هرز و کم رنگ شدن اقتصاد تولید محصول

برای کنترل این عوامل خسارت‌زا، بطور معمول از علف‌کش‌های شیمیایی استفاده می‌شود که دارای همان معایب و مضرات ذکر شده برای سموم شیمیایی هستند. لذا استفاده از راهکارهای کم خطر و دوست‌دار محیط زیست می‌تواند دارای اهمیت بسیاری باشد. در کنترل زیستی علف‌های هرز، مهمترین کاربردها مربوط به استفاده از باکتری‌ها و قارچ‌ها است. هر چند استفاده از ویروس‌ها نیز در مواردی مد نظر بوده و مطالعه شده است. بطور کلی کنترل زیستی علف‌های هرز مثل کنترل زیستی سایر آفات هر چهار استراتژی را شامل می‌شود، اما بیشتر دو استراتژی کنترل زیستی کلاسیک و تولید انبوه عوامل کنترل زیستی^۱ مد نظر قرار می‌گیرند. در روش کنترل زیستی کلاسیک، یک عامل شکارگر یا پاتوژن علف هرز در طبیعت رها می‌شود به این امید که این عامل کنترل زیستی در طبیعت مستقر شده و بصور پایدار در یک سطح مناسبی علف‌های هرز را کنترل می‌کند. البته در این روش کنترل صد درصد نیست و همیشه درصدی خسارت وجود دارد. در روش دوم که روش تولید انبوه یا علف‌کش زیستی^۲ است، عامل کنترل زیستی (اسپورهای قارچ یا سوسپانسیون باکتری) به شکل انبوه و با جمعیت زیاد تولید و در یک منطقه مشخص با هدف از بین بردن کامل علف هرز پخش می‌شود (بیش از آن چیزی که در طبیعت اتفاق می‌افتد). این روش برای کنترل علف‌های هرز در مزارع و چمن‌زارها مناسب است چون عامل کنترل زیستی مثل علف‌کش‌ها در مزرعه اسپری می‌شود. کشورهای آمریکا، نیوزیلند، کانادا، استرالیا و آفریقای جنوبی به همراه کشورهای آمریکای مرکزی و جنوبی مثل برزیل، آرژانتین و شیلی در زمینه کنترل زیستی علف‌های هرز فعالیت‌های زیادی انجام داده‌اند. تاکنون تعداد زیادی باکتری و قارچ در آمریکا، نیوزیلند، کانادا، استرالیا و برای کنترل زیستی ثبت و تجاری سازی شده‌اند، اما در اتحادیه اروپا هنوز این اتفاق نیفتاده است. سهم علف‌کش‌های زیستی از بازار جهانی عوامل میکروبی کنترل زیستی کمتر از ۱۰ درصد است.

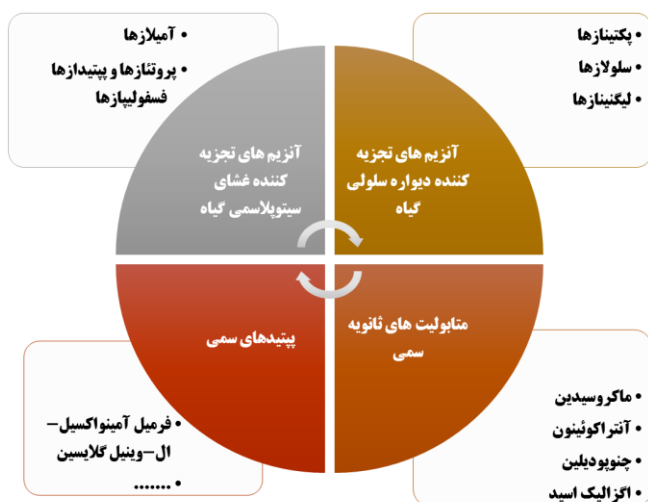
¹Inoculative and Inundative biocontrol

²Bioherbicide

استفاده از علف‌کش‌های زیستی در مقایسه با علف‌کش‌های شیمیایی دارای مزایای متعددی برای کشاورزان، تولید کنندگان سموم و مردم است. مهمترین مزیت محیط زیست دوستانه بودن این استراتژی و کم بودن اثرات منفی آن بر محیط زیست است. این مزیت بدلیل اختصاصی عمل کردن علف‌کش‌های زیستی و تجزیه شدن سریع آن‌ها در محیط است. از طرف دیگر این عوامل بدون دخالت انسان در تولید آن‌ها، نمی‌توانند در محیط تکثیر و استقرار یابند. یعنی اگر این عوامل بصورت ناخواسته در محیط زیست پخش شوند، نمی‌توانند بدون وجود میزبان‌شان استقرار یافته و تکثیر شوند، لذا خیلی سریع از بین می‌روند. از طرف دیگر هزینه تولید علف‌کش‌های زیستی بطور معمول پایین‌تر از علف‌کش‌های شیمیایی است. از طرف دیگر بدلیل این‌که مردم نسبت به سموم شیمیایی دیدگاه منفی دارند، با معرفی راه‌کارهای محیط زیست دوستانه و با ریسک کمتر، با اشتیاق بیشتری آن‌ها را پذیرفته و حتی اگر هزینه بالاتری نیز داشته باشند، آن‌ها را می‌پذیرند. پیش‌بینی می‌شود که علف‌کش‌های زیستی در برنامه‌های آبی تلفیقی کنترل علف‌های هرز به همراه علف‌کش‌های شیمیایی کم خطر به منظور جلوگیری از ایجاد علف‌های هرز مقاوم جایگاه خوبی پیدا کنند. بنابراین انتظار می‌رود که این روش در آینده نزدیک جایگاه بسیار ویژه‌ای در بازار جهانی آفت‌کش‌ها پیدا کند.

مکانیسم عمل علف‌کش‌های زیستی میکروبی

مکانیسم عمل علف‌کش‌های زیستی میکروبی شبیه مکانیسم بیماری‌زایی عوامل بیمارگر در گیاهان و آلوده‌ای است. در این راستا، پاتوژن‌های علف‌های هرز سیستم دفاعی علف هرز را تضعیف کرده و بعد حمله نهایی را انجام می‌دهند. بطور معمول برای هر گیاه پاتوژن یا پاتوژن‌های اختصاصی وجود دارد، به همین دلیل برای علف‌کش‌های زیستی نیز معمولاً یک یا چند گیاه محدود را مورد حمله قرار می‌دهند. در علف‌کش‌های زیستی بطور معمول یک یا چند فاکتور بیماری‌زایی مستقیم و یا غیر مستقیم در کنترل علف هرز نقش دارند که در شکل ۴-۱ ذکر شده‌اند.



شکل ۴-۱- مکانیسم‌های عمل علف‌کش‌های زیستی میکروبی

قارچ‌ها به عنوان علف‌کش‌های زیستی

بدلیل کارایی بالاتر قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها و ویروس‌ها در کنترل علف‌های هرز، در حال حاضر مهمترین علف‌کش‌های زیستی تجاری شده در دنیا بر پایه قارچ‌ها هستند. به هر حال از بین تعداد زیادی از عوامل میکروبی کاندید به عنوان علف‌کش زیستی تعداد کمی با موفقیت همراه بوده اند. برای مثال علف‌کش زیستی بیومال^۱ حاوی *Colletotrichum gloeosporioides f.sp. malvae* است برای کنترل پنیوک (گل خطمی) کولگو^۲ که حاوی *C. gloeosporioides f.sp. malvae* است برای کنترل ماشک وحشی (*Aeschynomene virginica*) در آمریکا ثبت و تجاری شده‌اند. همچنین علف‌کش زیستی ساریتور^۳ که حاوی قارچ *Sclerotinia minor* است برای کنترل علف هرز قاصدک (*Taraxacum officinale*)، شیدر سفید (*Trifolium repens*)، و بارهنگ برگ پهن (*Plantago major*) در چمن‌زارها ثبت و تجاری سازی شده است.

در خصوص جنس *Colletotrichum*، علاوه بر دو گونه فوق، گونه‌ی *C. truncatum* برای کنترل شاهدانه وحشی^۴ (*Sesbania exaltata*) و گونه‌ی *C. orbiculare* برای کنترل توف خاردار^۵ (*Xanthium spinosum*) استفاده شده‌اند. سه گونه از جنس *Phoma* هم به عنوان علف‌کش‌های زیستی کاندید توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. این گونه‌ها شامل *P. P. herbarum*، *macrostoma* و *P. chenopodicola* هستند. گونه *P. herbarum* که اولین بار از برگ‌های بیمار قاصدک در آمریکا جدا شد، برای کنترل همین علف هرز در چمن‌زارها مورد کاربرد قرار گرفته است. گونه *P. macrostoma* نیز به همین منظور بکار برده شده است چون بطور اختصاصی گیاهان دولپه ای را مورد حمله قرار می‌دهد لذا برای چمن‌زارها و مزارع غلات می‌تواند مفید باشد. این قارچ‌ها تولید ماده رنگ برنده ماکروسیدین^۶ می‌کنند که برای پهن برگ‌ها سمی است ولی بر تک لپه‌ای‌ها اثری ندارد. بنابراین، می‌توان گفت که این علف‌کش زیستی در مزارع زیر کشت گیاهان زراعی باریک برگ مثل غلات قابلیت استفاده دارد. پس از حمله قارچ به علف هرز، این ماده از طریق آوندهای آبکش به سراسر گیاه منتقل می‌شود و گیاه را از پای در می‌آورد. مکانیسم عمل این سم هنوز مشخص نشده است. علاوه بر ماکروسیدین، یک رنگیزه دیگری به نام آنتراکونینون^۷ از این گونه جداسازی شده است که می‌تواند در بیماری‌زایی و ایجاد نکروز در گیاهان موثر باشد. علاوه بر دو گونه فوق، مشخص شده است که گونه *P. chenopodicola* نیز می‌تواند در کنترل برخی علف‌های هرز مثل سلمه تره^۸ (*Chenopodium album*)، خارلته^۹ یا کنگر وحشی (*Cirsium arvense*)، چسبک یا گاورس سبز^{۱۰} (*Setaria viridis*) و شنگرفی یکساله^{۱۱} (*Mercurialis annua*) کاربرد داشته باشد (شکل ۴-۲). این قارچ تولید ماده‌ای دیتروپنی و سمی به نام چنوپودیلین می‌کند که موجب ایجاد نکروز در گیاهان فوق می‌شود.

¹Biomal

²Collego

³Sarritor

⁴Hemp sesbania

⁵Spiny Cocklebur

⁶Photobleaching Macrocin

⁷Anthraquinone

⁸Lambs Quarters

⁹Creeping Thistle

¹⁰Green Foxtail

¹¹Annual Mercury



ب

الف

د

ج

شکل ۴-۲- علف‌های هرز کنترل شده با استفاده از گونه‌های قارچ *Phoma*. الف. قاصدک، ب. سلمه تره، ج. گاورس و د. شنگرفی یکساله

یکی دیگر از جنس‌های مهم در کنترل علف‌های هرز، جنس زنگ‌ها (*Puccinia*) است. گونه‌های مختلف این جنس بر روی علف‌های هرز مختلف از قبیل سمج‌دایرزوود^۱ (*Isatis tinctoria*)، قندرون (*Chondrilla juncea*)، *Impatiens glandulifera*، *Asparagus asparagoides*، *Baccharis halimifolia*، *Carduus nutans*، *Carduus tenuiflorus* و *Carduus pycnocephalus* خصوصیت علف‌کشی نشان داده‌اند.

^۱Dyer's woad

در جنس *Sclerotinia* نیز دو گونه به عنوان کاندید برای کنترل علف‌های هرز مد نظر قرار گرفته اند. گونه *Sclerotinia minor* قادر است بطور موثری علف هرز قاصدک را در چمن‌زارها کنترل کند. سویه IMI 344141 این گونه تحت نام ساریتور^۱ در کانادا در سال ۲۰۱۰ ثبت شده است. این گونه و گونه دیگر (*S. sclerotiorum*) توانایی کنترل خارلته را دارند. علاوه بر چهار جنس مهم فوق، قارچ‌های دیگری نیز در سطح تحقیقاتی یا پایلوت به عنوان علف‌کش‌های زیستی ارزیابی و ثبت شده‌اند که از آن‌ها می‌توان به *Chondrostereum purpureum* برای کنترل رشد دوباره درختان و گیاهان خزان دار در بین سوزنی برگان، *Alternaria destruens* برای کنترل گیاه انگل سس (*Cuscuta spp.*) و *Phytophthora palmivora* برای کنترل علف هرز کاتوس^۲ (*Morrenia odorata*) اشاره کرد.

باکتری‌ها به عنوان علف‌کش‌های زیستی

گروهی از باکتری‌ها نیز به عنوان کاندید برای کنترل علف‌های هرز در چند سال اخیر مطرح شده‌اند. از این بین، دو گونه *P. fluorescens* و *Xanthomonas campestris* اشاره کرد. مهمترین مزایای باکتری‌های علف‌کش نسبت به قارچ‌ها، رشد سریع آن‌ها، تولید انبوه راحت‌تر و ساده‌تر بودن اصلاح ژنتیکی آن‌ها از طریق موتاسیون یا مهندسی ژنتیک است. یکی از گونه‌های مهم مطرح به عنوان علف‌کش زیستی گونه *P. fluorescens* است. برخی سویه‌های این گونه خصوصیت کود زیستی و عامل کنترل زیستی برای گیاهان دارند، اما برخی از سویه‌های آن بطور اختصاصی اثرات منفی بر رشد گیاهان دارند. برای مثال سویه D7 که از گندم زمستانه و علف هرز جومیش یا علف پشمکی (*Bromus tectorum*) در کانادا جداسازی شده است، توانسته است بطور کارا از جوانه‌زنی و رشد علف‌های هرز چمنی و مخصوصا جومیش جلوگیری کند. عامل علف‌کشی در این سویه، پلی پپتیدها و لیپوپلی ساکاریدهای خارج سلولی هستند. باکتری دیگر که در زمینه خصوصیت علف‌کشی به کاربرده شده است گونه *X. campestris* است که سویه JT-P482 آن اولین بار در ژاپن در سال ۱۹۹۷ با نام تجاری کمپریکو^۳ برای کنترل علف هرز بلوگراس یک‌ساله^۴ (*Poa annua*) ثبت و تجاری شد. این علف‌کش زیستی تنها بر روی علف‌های هرز چمنی (علف‌های هرز از خانواده گراس‌ها) موثر بوده است و روی سایر علف‌های هرز اثری ندارد. سویه دیگر این باکتری با نام LVA-987 بر روی علف اسب^۵ (*Conyza canadensis*) اثر علف‌کشی دارد. در خصوص ترکیبات موثر در علف‌کشی این سویه‌ها هنوز اطلاعات کاملی وجود ندارد.

ویروس‌ها به عنوان علف‌کش‌های زیستی

برخی ویروس‌ها نیز به عنوان کاندیدهای استفاده به عنوان علف‌کش زیستی برای کنترل علف‌های هرز مهاجم در مناطق وسیعی از اکوسیستم‌های طبیعی مطرح شده‌اند. هنوز در خصوص کاربرد آن‌ها در مزارع مطالعات وسیعی انجام نشده است. با توجه به تنوع ژنتیکی و عدم اختصاصیت میزبانی، ویروس‌ها می‌توانند در برنامه‌های کنترل زیستی با هدف پخش جمعیت زیاد عامل کنترل

¹Sarritor

²Strangler Vine

³Camperico

⁴Annual Bluegrass

⁵Horseweed

زیستی و کنترل سریع علف هرز^۱ استفاده شوند. برای مثال، ویروس موزاییک خفیف سبز توتون^۲ (TMGMV) برای کنترل علف هرز تاجریزی^۳ (*Solanum viarum*)، ویروس موزاییک آروچیا^۴ برای کنترل علف هرز *Araujia hortorum* و ویروس جغجغه‌ای توتون جهت کنترل علف هرز *Impatiens glandulifera* که از علف‌های هرز مهاجم و نگران کننده در اروپای غربی و مرکزی است، پیشنهاد شده است. فعالیت‌های زیستی ویروس‌ها بسیار متمایز از بیماری‌زایی ایجاد شده توسط باکتری‌ها یا قارچ‌ها است و ممکن است در برخی شرایط فرصت‌های جدیدی را برای کنترل زیستی علف‌های هرز فراهم نمایند. با این حال استفاده از ویروس‌ها به عنوان عامل کنترل زیستی علف‌های هرز، به شکل تجاری انجام نشده و لازم است با بررسی‌های بیشتر جوانب کارایی، اقتصادی و اثرات زیست محیطی احتمالی در خصوص آن‌ها تصمیم‌گیری کرد.

چالش‌ها و چشم اندازهای علف‌کش‌های زیستی

علی‌رغم نشان داده شدن پتانسیل تعدادی از عوامل قارچی، باکتریایی و ویروسی در کنترل زیستی علف‌های هرز مختلف، تعداد کمی از عوامل اشاره شده توانسته‌اند در بازار جایی برای خود جا باز کنند. دلیل این امر عدم کارایی بلند مدت برخی از این عوامل و پیچیدگی عوامل محیطی و عوامل زنده موثر بر کارایی این علف‌کش‌های زیستی است. برای مثال، تنها تعداد بسیار کمی از علف‌کش‌های زیستی مثل علف‌کش زیستی لاکداون^۵ که حاوی قارچ *C. gloeosporioides f.sp. aescynomene* است، توانسته‌اند در بازار باقی بمانند. در مورد علف‌کش زیستی بیومال (*C. gloeosporioides f.sp. malvae*) بدلیل اختصاصیت بیش از حد که فقط بر روی علف هرز پنیرک (گل خطمی) موثر است، نتوانست در بازار جایگاه ویژه‌ای پیدا کند و تولید آن متوقف شد. برخی دیگر نیز بدلیل عدم تطابق نتایج آن‌ها در کنترل کنندگی علف‌های هرز بعد از مرحله تولید انبوه با نتایج مشاهده شده در مراحل تحقیق و توسعه کنار گذاشته شدند. همین مسائل و مشکلات برای علف‌کش ساریتور (*S. minor IMI344141*) نیز به وجود آمده است و تا حدودی با شکست مواجه شده است. در کشور ما نیز متأسفانه تاکنون کار علمی و جامعی صورت نگرفته است و محصول بومی در بازار وجود ندارد. در خصوص تحقیقات در این زمینه نیز کار علمی جامعی صورت نگرفته است. با توجه مشکلات فوق، در آینده محققین و شرکت‌های دانش بنیان فعال در این زمینه باید تلاش کنند تا با یافتن عوامل میکروبی جدیدتر با کارایی بالاتر چالش‌های موجود را رفع نمایند. از طرف دیگر نظر به اینکه مکانیسم عمل بسیاری از عوامل میکروبی قبلی خیلی کامل شناسایی نشده است، بنابراین لازم است تا در آینده مطالعات عمیق‌تری در خصوص مکانیسم عمل و راهکارهای افزایش کارایی آن‌ها انجام شود. ضمن اینکه با بررسی مکانیسم عمل این عوامل، امکان شناسایی ترکیبات علف‌کش جدید برای غلبه بر مقاومت احتمالی علف‌های هرز نسبت به علف‌کش‌ها نیز وجود خواهد داشت. از طرف دیگر لازم است تا مخاطرات احتمالی این عوامل بر سلامت انسان و همچنین محیط زیست مورد بررسی قرار گیرد.

تاکنون تعداد محدودی از جنس‌های قارچی و باکتریایی به عنوان عوامل کنترل زیستی علف‌های هرز توسعه یافته‌اند. در آینده لازم است تا از منابع جدیدتر و متنوع‌تر، عوامل میکروبی قویتر با خصوصیت علف‌کشی بهتر و کارا تر جداسازی شوند. برای مثال مشخص شده است که باکتری‌ها و قارچ‌های محرک رشد که بصورت اندوفیت با گیاهان همزیست دارند، می‌توانند منجر به رشد

¹Inundative Biocontrol

²Tobacco Mild Green Mosaic Virus (TMGMV)

³ Tropical Soda Apple

⁴Araujia Mosaic Virus

⁵Lockdown

سریع گیاهان و در نتیجه جلوگیری از رشد علف‌های هرز شوند. در نهایت می‌توان این‌طور جمع بندی کرد که اگرچه مشکلات زیادی در توسعه و تولید علف‌کش زیستی میکروبی وجود دارد، اما بروز مشکلات زیاد مربوط به ایجاد علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش‌های شیمیایی و همچنین مشکلات سلامت و مخاطرات زیست محیطی سموم علف‌کش، محققین و شرکت‌های دانش بنیان را به سمت تلاش بیشتر برای توسعه علف‌کش‌های زیستی ایمن و کارا سوق می‌دهد. از طرف دیگر با توجه به تنوع وسیع ویروس‌های گیاهی و تغییرات زیاد ژنتیکی در آنها، احتمال تغییر در دامنه میزبانی آنها در طی کاربرد در مزارع وجود خواهد داشت، لذا لازم است در آینده در خصوص مخاطرات احتمالی زیست محیطی و همچنین احتمال اثرات منفی آنها بر گیاهان زراعی و باغی مطالعات جامع‌تر و عمیق‌تری صورت پذیرد.

فصل ۵:

چارچوب توسعه و ارزیابی ایمنی عوامل میکروبی کنترل زیستی

مقدمه

همانطور که در صفحات قبل اشاره شد، مهمترین مزیت عوامل کنترل زیستی، ایمنی بالای آنها برای محیط زیست، سلامت انسان و سلامت دام و جانوران غیرهدف و همچنین کاهش مصرف سموم آفت کش است. از طرف دیگر، خوشبختانه تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر اثرات منفی بر محیط زیست و سلامت انسان، دام گیاهان منتشر نشده است. این عوامل از یک طرف به شکل اختصاصی تنها بر گروه خاصی از آفات تاثیر دارند و لذا موجودات غیرهدف مورد حمله آنها واقع نمی شوند، و از طرف دیگر این عوامل بطور معمول در مکان های مختلف و جمعیت های مختلف در طبیعت و مزارع وجود دارند. این موضوع باعث شده است تا تعداد عوامل میکروبی کنترل زیستی هر سال افزایش یافته و میزان بازار آنها نیز گسترش داشته باشد. با این حال با توجه به گستردگی انواع عوامل کنترل زیستی، ممکن است برخی از آنها بر روی عوامل غیر هدف مثل انسان، جانوران، گیاهان و حشرات غیر هدف اثر داشته باشند. به منظور اطمینان از ایمنی این عوامل، در دنیا مقررات ضوابطی برای تولید و تجاری سازی آنها تدوین شده که کشور ما نیز تقریباً کاربرد پیدا کرده اند. در این فصل تلاش شده است تا به چارچوب کلی فرآیند توسعه و تجاری سازی فرآورده های میکروبی کنترل زیستی و همچنین فرآیند ارزیابی ایمنی آنها از نظر تاثیر بر سلامت انسان و محیط زیست ارائه شود.

چارچوب کلی توسعه فرآورده های میکروبی کنترل زیستی

با توجه به گسترش اهمیت و استفاده از عوامل میکروبی کنترل آفات و بیماری ها، اجرای صحیح فرآیند تحقیق و توسعه و تجاری سازی این فرآورده ها برای رسیدن به محصول با کارایی بالا دارای اهمیت فراوانی است. فرآیند توسعه یک فرآورده زیستی برای کنترل کارآمد آفات و بیماری ها دارای چند مرحله بسیار مهم است که هر کدام دارای اهمیت خاص خود هستند. در صورتی که هر کدام از این مراحل درست انجام نشود، می تواند منجر به شکست محصول نهایی شود. یک فرآورده نهایی باید دارای خصوصیات زیستی، تکنولوژیکی و سم شناسی مناسبی باشد تا بتواند شرایط لازم برای حضور موفق در مزرعه کشاورزان را داشته باشد. یک عامل کنترل زیستی مناسب باید در غلظت پایین دارای کارایی بالایی در کنترل آفات هدف داشته باشد. فرآیندهای تولید و فرمولاسیون ارزان قیمت با ماندگاری بالا برای آن وجود داشته باشد، حمل و نقل آسان داشته باشد، روش

کاربرد و استفاده در مزرعه راحت باشد، با روش‌های معمول سم پاشی و همچنین عملیات زراعی سازگاری داشته باشد، از نظر ژنتیکی پایدار باشد، برای انسان، گیاه و سایر موجودات غیر هدف مضر نباشد، و نهایتاً اینکه در محیط‌های با شرایط نامناسب هم توانایی ماندگاری و کارایی داشته باشد.

فرآیند توسعه عوامل زیستی شامل مراحل هدف‌گذاری و مطالعه بازار جهت انتخاب عامل کنترل زیستی هدف (آینده پژوهشی)، نمونه‌برداری و غربال‌گری، جداسازی، شناسایی، ارزیابی آزمایشگاهی، گلخانه ای و مزرعه ای، ارزیابی‌های در سطح پایلوت، ثبت سویه‌های برتر، بهینه سازی فرآیند تولید انبوه (فرمنتاسیون)، بهینه‌سازی فرمولاسیون، ارزیابی زیستی، مطالعات سم‌شناسی و ارزیابی مخاطرات احتمالی بر محیط زیست و سلامت، مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی برای شناخت مکانیسم عمل عامل کنترل زیستی، ثبت فرآورده برای عرضه به بازار و نهایتاً تولید انبوه و تجاری آن است. لذا، فرآیند توسعه یک فرآورده کنترل زیستی فرآیندی پیچیده، زمان‌بر و نیروبر است که حدود ۳ تا ۵ سال طول می‌کشد و مراحل ثبت و تجاری‌سازی نیز ممکن است همین میزان وقت لازم داشته باشد. این فرآیند شامل آزمایشات زیستی، تکنولوژیکی، مقرراتی و بازاریابی است. لذا لازم است یک تیم متشکل از متخصصین فرآورده‌های میکروبی کنترل زیستی، افراد فنی و متخصص مهندسی فرآیندهای زیستی، متخصص حقوقی و مالکیت فکری و مقررات ثبت، کارشناس آشنا به امور بازاریابی و ... در این کار دخیل باشند تا پول و سرمایه در این راه هدر نرود.

فرآیند شناسایی، ارزیابی و مراحل ثبت تجاری عوامل میکروبی کنترل زیستی با هدف افزایش کارایی و کاهش احتمال اثرات منفی بر محیط زیست و سلامت به شرح زیر است.

مرحله اول: انتخاب هدف و ارزشیابی

قبل از هر عملی در برنامه کنترل بیولوژیک باید هدف مشخص شود. مسایل زیستی، اقتصادی و اجتماعی مورد بررسی قرار گیرد و همچنین منشأ آفت مشخص شود. اگر آفت منشأ خارجی دارد می‌توان فرض کرد که گونه‌هایی از دشمنان طبیعی را بر علیه آن معرفی نمود و اگر معلوم شود که آفت بومی است، پیش از معرفی عامل کنترل زیستی باید دلایلی که آن را بصورت آفت نمایان ساخته جستجو کرد و اگر دخالت‌های انسانی در امر آفت شدن نقش داشته باشد باید به اقدامی که می‌تواند در رفع این اثرات موثر باشد، اندیشید. گونه‌هایی که در زیستگاه اصلی خود حالت آفت ندارند، کاندیدای بهتری برای مبارزه زیستی در مقایسه با گونه‌هایی هستند که در تمام مناطق حالت آفت دارند. در مراحل اولیه انتخاب دشمنان طبیعی باید در نظر داشت که هرگاه عامل کنترل زیستی مورد نظر میزبان‌های دیگری داشته باشند که آن‌ها میزبان‌های مفید محسوب شوند، لازم است اثر عامل کنترل زیستی بر چنین گونه‌هایی نیز مورد بررسی قرار گیرد و سپس این تاثیر نامطلوب با فواید رهاسازی سنجیده و مقایسه شود.

مرحله دوم: رده بندی و پژوهش مقدماتی

بررسی مشخصات تاکسونومیک گونه‌ها به منظور تعیین مناطق انتشار، بیولوژی، دامنه میزبانی، وضعیت آفت و دشمنان طبیعی آفت مورد نظر و گونه‌های مشابه ضرورت دارد. گونه‌های نزدیک به آفت باید تعیین شود زیرا اگر تشخیص میزبان‌های مشترک درست انجام نشود، ممکن است منجر به اشتباه در تشخیص و جمع‌آوری یا تکثیر دشمنان طبیعی مربوط به گونه‌های میزبان دیگری شود. لذا اطلاعات رده بندی اساس انتخاب خط مشی در انتخاب درست مناطق مورد جستجو خواهد بود.

مرحله سوم: انتخاب محل برای جستجوی عامل کنترل زیستی

غالباً مناسب‌ترین منطقه جستجو را باید با توجه به شواهد جغرافیای طبیعی، جانورشناسی و اکولوژیکی مشخص ساخت. برای جستجو باید شاخص‌هایی از قبیل گستره پراکندگی آفت بصورت بومی و یا مشخص نمودن دشمنان طبیعی آن‌ها را در نظر گرفت. زمانی که چنین مناطقی معلوم شد، می‌توان نواحی ویژه‌ای را بر اساس شرایط آب و هوایی از نظر تشابه با منطقه‌ای که عامل کنترل زیستی باید رها شود، قابل دسترس بودن و وجود خدمات حمایتی محلی انتخاب نمود.

مرحله چهارم: انتخاب نوع عامل کنترل زیستی برای جمع‌آوری

در بسیاری از موارد، انتخاب کنترل زیستی بستگی به هدف مورد نظر دارد. بسیاری از آفات، دشمنان طبیعی محدودی دارند، بنابراین عامل کنترل زیستی باید از میان این تعداد کم انتخاب شود. ارزیابی توان عوامل کنترل زیستی فاکتور بسیار مهمی است و انتخاب درست اولیه می‌تواند در استقرار دشمنان طبیعی و در نهایت مهار آفت و بیماری موثر باشد. مطالعه عوامل کنترل زیستی و میزبان‌های آن‌ها می‌تواند راهنمایی مناسبی برای پی بردن به عمق روابط بین‌گونه‌ای از جمله تفاوت‌هایی باشد که از نظر تکاملی، آب و هوایی و فصلی بین دسته‌های مختلف از گونه‌ها وجود دارد. بنابراین می‌توان با توجه به نیازهای اکولوژیک تخمین زد که چه گونه‌هایی برای چه مناطقی مناسب‌ترند. افراد یک گونه کنترل زیستی ممکن است از نظر توان کنترل دارای ویژگی‌های متفاوت باشند. توده‌های مختلفی از یک گونه کنترل زیستی که از نظر مورفولوژیکی قابل تفکیک نیستند، ممکن است از نظر خصوصیات زیستی بصورت معنی‌دار ولی پنهان با یکدیگر تفاوت داشته باشند. توده‌هایی که دارای تفاوت‌های زیستی ثابت و توارثی باشند، بیوتیپ، زیر گونه یا نژاد خوانده می‌شوند. چنین توده‌هایی ممکن است از نظر انتخاب محل زندگی، ترجیح یا دامنه میزبانی، فیزیولوژی، ویژگی‌های دوره زندگی یا رفتار با یکدیگر اختلاف داشته باشند. چون هر یک از ویژگی‌ها می‌تواند در تناسب یک عامل برای یک هدف یا محیط به خصوص موثر باشد، لازم است توده‌های مختلفی از یک گونه معرفی شوند.

مرحله پنجم: قرنطینه و حذف عوامل نا مطلوب

برای بکارگیری یک عامل کنترل زیستی در مناطق مختلف باید ضوابط خاصی رعایت شود. آزمایشگاه‌های کنترل و قرنطینه برای معرفی عوامل کنترل زیستی، به دو طریق در خدمت برنامه‌های مبارزه بیولوژیکی قرار دارد. آزمایشگاه‌ها محلی برای ورود عوامل زنده محسوب شده که می‌توان چنین عواملی را آنجا نگهداری و انواع نامطلوب را تفکیک و موجودات مفید را پرورش داد. همچنین این آزمایشگاه‌ها محل مناسبی برای بررسی موجودات مناسب برای مبارزه بیولوژیکی خواهد بود. بنابراین هدف اصلی این مرحله پیشگیری از ورود ناخواسته عوامل بیگانه است پس باید محیطی فراهم شود که بتوان عامل کنترل زیستی و میزبان آن را به راحتی پرورش داد و در عین حال از فرار آن‌ها جلوگیری کرد. برای اثبات مفید بودن، عامل کنترل زیستی باید بتواند دوره زندگی خود را بر روی میزبان اولیه کامل سازد. آزمایش‌هایی که تأیید کننده این موضوع باشد، می‌تواند دال بر پارازیتوئید، شکارگر یا عامل بیماری‌زا بودن گونه منتخب بوده و هیپرپارازیت نبودن یا گندخوار نبودن آن به اثبات برسد. هر جا آفت مورد نظر (مثل یک علف هرز) با موجودات مطلوب (مثل سایر گیاهان) مرتبط باشد، آزمایش‌های مونوفازی نیز ضرورت پیدا می‌کند. در مورد بندپایان گیاهخوار یا عوامل بیماری‌زای گیاهی که قرار است بعنوان دشمنان طبیعی مورد استفاده قرار گیرند، بررسی‌ها در

زمینه تعیین دامنه میزبانی آن‌ها به منظور جلوگیری از احتمال آسیب آن‌ها به گیاهان مطلوب، در محیط جدید لازم خواهد بود. برای کار با عوامل میکروبی شرایط ویژه‌ای را همانند آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی، فیلترهای مخصوص تصفیه هوا، نگهداری و تیمار کلیه فاضلاب‌ها و وجود آوردن شرایط کشت مساعد برای پیشگیری از هر گونه آلودگی محیط کشت، ضروری است.

مرحله ششم: بررسی بی‌زیانی عوامل کنترل زیستی

معمولا هدف از این بررسی‌ها تعیین اثرات منفی احتمالی عامل کنترل زیستی بر موجودات غیرهدف مثل گیاهان زراعی است. بنابراین توان آن‌ها در آلوده سازی، تغذیه، و تکثیر روی تعدادی از گیاهان بررسی می‌شود. اگر عامل بر روی علف‌های هرز اثر داشته باشد و بتواند میزان حضور آن‌ها را به زیر آستانه اقتصادی برساند، بسیار مناسب خواهد بود. گیاهان دیگر، از جمله گیاهان زراعی که خویشاوندی خاصی با علف هرز نداشته ولی در منطقه پرورش داده می‌شوند، از این جنبه مورد بررسی قرار می‌گیرند. تعیین توان زیستی عامل زنده، معیار خوبی برای ارزیابی واکنش آن در مزرعه نخواهد بود. ولی اطلاعاتی را از نظر دامنه میزبانی آن در اختیار می‌گذارد. رهاسازی از قرنطینه، زمانی مجاز خواهد بود که دامنه میزبانی کنترل زیستی از نظر اکولوژیکی در محیط جدید در حد قابل قبولی پیش بینی شده باشد. این حد در هر برنامه یا هر منطقه، حتی برای یک گونه مشخص باید متفاوت باشد. بطور معمول زمانی رهاسازی صورت می‌گیرد که از بی‌خطر بودن آن برای گیاهان با ارزش (یا جانوران) در منطقه رهاسازی و یا محیط‌های اطراف که احتمال انتشار موجود رها شده به آنجا وجود داشته باشد، اطمینان حاصل شده باشد. تغذیه‌های مختصر از گیاهان غیرهدف، معمولا بعنوان خطری برای رهاسازی تلقی نمی‌شود و دشمنان طبیعی با پلی‌فاژی مختصر (الیگوفازی) برای رهاسازی مناسب قلمداد می‌شوند. بندپایان پارازیت و شکارگر به چند دلیل کمتر تحت بررسی‌های دامنه میزبانی قرار می‌گیرند. از جمله، بسیاری از عوامل کنترل زیستی بر علیه آفات غیربومی که به تعداد کم و یا بدون خویشاوندی تاکسونومیکی در محل مورد نظر به کار می‌روند، در چنین وضعیتی، عامل کنترل زیستی معرفی شده ممکن است آنقدر اختصاصی عمل کنند که در محیط جدید هیچگونه اثر قابل ملاحظه‌ای بر گونه‌های غیر هدف نداشته باشد. دامنه میزبانی بسیاری از حشرات پارازیت و در درجاتی کمتر بعضی از بندپایان شکارگر، محدود به گونه‌ها یا جنس‌هایی از یک خانواده است. این میزبان‌ها معمولا در خطر نابودی قرار ندارند و معرفی عوامل کنترل زیستی جدید بندرت ممکن است تلفاتی جدی به میزبان‌های غیر هدف وارد سازند. بطور کلی عوامل کنترل زیستی که از نظر میزبانی اختصاصی‌تر عمل می‌کنند، چون تاثیر بهتری در کنترل میزبان داشته و خطری برای عوامل غیر هدف محسوب نمی‌شوند، ارجحیت دارند.

مرحله هفتم: تمرکز در مزرعه و تعیین کارایی

قدم اساسی در معرفی عوامل کنترل زیستی جدید پس از ایجاد جمعیت خالص و مجاز شمردن رهاسازی، تمرکز عامل جدید در مزرعه است. توانایی استقرار یک موجود زنده در مزرعه به چند عامل مختلف از جمله عوامل اکولوژیکی، انسانی، تکنیکی و مالی بستگی دارد. بسیاری از عدم موفقیت‌هایی که در استقرار عوامل کنترل زیستی پیش می‌آید، به دلیل انتخاب نامناسب عوامل زنده برای هدف مورد نظر است که یا قادر به زندگی در شرایط آب و هوایی محلی نیستند و یا هیچگونه ترجیح میزبانی در حمله به آفت مورد نظر را ندارند. ممکن است برخی از دشمنان طبیعی یافت شوند که آفت مورد نظر را مورد حمله قرار می‌دهند، اما این حمله بصورت تصادفی و احتمالی صورت می‌گیرد. هرگاه عامل کنترل زیستی از آفت مورد نظر بر روی محصول اصلی جمع

آوری شده باشد، مناسب گیاه میزبان برای عامل مشخص خواهد بود. اما هرگاه، آفت مورد نظر بر روی گونه‌ها یا ارقام مختلف گیاهی که از نظر خصوصیات فیزیکی یا شیمیایی متفاوتند، فعالیت کند، احتمال دارد عوامل کنترل زیستی یافت شده از نظر کارایی با یکدیگر اختلاف داشته باشند. مطلب قابل توجه دیگر در استقرار عوامل کنترل زیستی منتخب، شباهت شرایط آب و هوایی بین منطقه جمع‌آوری و منطقه رهاسازی است. احتمال استقرار عوامل کنترل زیستی را می‌توان با ارتقای کیفی چندین عامل در طول اجرای برنامه رهاسازی افزایش داد. از جمله این موارد، عوامل ژنتیکی، سلامتی افراد در یک کلنی، تعداد و مرحله زیستی رها شده، بکارگیری روش مناسب رهاسازی و حفاظت مناطق رهاسازی است. پس از رهاسازی عامل کنترل زیستی، باید از جمعیت آن آماربرداری شود تا از استقرار آن اطمینان حاصل شود. معمولاً استقرار عامل کنترل زیستی را پس از گذشت ۱۲ ماه یا بیشتر از زمان رهاسازی با تعیین حضور یک جمعیت در حال تکثیر مشخص می‌کنند.

مرحله هشتم: ارزشیابی عامل کنترل زیستی

زمانی که قابلیت استقرار عامل کنترل زیستی در محیط مورد تایید قرار گرفت، مرحله ارزشیابی کارایی عامل کنترل زیستی فرا می‌رسد. این اقدام اثر عامل کنترل زیستی را بر آفت مورد نظر در محیط جدید نشان می‌دهد. هر گاه عامل کنترل زیستی در کاهش جمعیت آفت و یا تکثیر آن موثر بوده است، می‌توان آن را در سایر نقاط آلوده نیز رهاسازی کرد و اگر عامل کنترل زیستی موثر واقع نشده است می‌توان منابع را برای عامل دیگری صرف کرد. برای اینکه جمعیت‌ها در محیط جدید به تعادل برسند، باید چند نسل بگذرد. پس از گذشت این دوره می‌توان از درجه مهار آفت توسط عامل کنترل زیستی معرفی شده، مورد ارزیابی قرار گیرد. البته باید در طی بررسی‌ها تلاش نمود تا اثر احتمالی عامل جدید بر عوامل مفید موجود در مزرعه نیز بررسی شود. در حقیقت مبارزه بیولوژیکی از طریق معرفی گونه‌های جدید دشمنان طبیعی نوعی تنظیم تعادل اکولوژیکی است که بصورت کنترل شده انجام می‌شود. بطور کلی اثرات پیش‌بینی نشده منفی بر موجودات خارج از هدف در اثر بکارگیری عوامل کنترل زیستی بسیار نادر است و با توجه به اثرات مثبتی که در کاهش تراکم آفت و بهبود شرایط محیط دارد، قابل اغماض است. برای پیشگیری از اثرات سوء احتمالی رهاسازی‌های انبوه عوامل کنترل زیستی، لازم است موسسات دولتی پیش از صدور مجوز برای رهاسازی، بررسی‌های لازم را در مورد اثرات احتمالی آن بر محیط انجام دهند. اگر دولت مقررات خاصی را در این باره وضع نکرده باشد، می‌توان از دستورالعمل سازمان خوار و بار و کشاورزی ملل متحد (فائو) در این خصوص پیروی کرد. در قسمت بعدی دستورالعمل فائو بطور مختصر توضیح داده شده است.

دستورالعمل فائو در خصوص ارزیابی ایمنی عوامل کنترل زیستی آفات و بیماری‌ها

مستندات مورد نیاز بر اساس دستورالعمل فائو برای عوامل میکروبی کنترل زیستی عمدتاً حداقل داده‌های ارزیابی مخاطرات زیست محیطی و سلامت این نوع عوامل را شامل می‌شود. البته باید توجه داشت که در واقع، برای عوامل میکروبی که سابقه طولانی در استفاده ایمن در محیط‌های کشاورزی را دارند و مراجع ذی‌صلاح با ایمنی آن‌ها آشنایی دارند این نوع داده‌های مورد نیاز کمتر می‌شوند، چون مراجع مذکور با رفتار و خصوصیات آن‌ها تا حدود زیادی آشنایی دارند. داده‌های مورد نیاز عموماً حول سلامت انسانی و بیماری‌زایی برای گیاهان می‌چرخند. در طی تاریخ عوامل میکروبی زیادی به عنوان عوامل بیماری‌زای انسانی و گیاهی شناخته شده‌اند. اگر سویه میکروبی مورد استفاده در کنترل زیستی، از نظر تاکسونومیکی در گروه این عوامل بیماری‌زای

انسانی و یا گیاهی قرار می‌گیرند، آزمایشات، اطلاعات و مستندات مورد نیاز برای آن‌ها، نسبت به سایر عوامل میکروبی خیلی بیشتر می‌شود. اخذ مستندات علمی جهت ثبت و مجوز دهی کلیه عوامل میکروبی کنترل زیستی چه آن‌هایی بصورت وحشی و بدون اصلاح ژنتیکی استفاده می‌شوند و چه آن‌هایی که مهندسی شده ژنتیکی (تراریخته) هستند، لازم و ضروری است. ضمناً، هر نژاد یا زیرگونه جدید یک عامل میکروبی که قبلاً به عنوان عامل کنترل زیستی ثبت شده است، باید مجدداً ارزیابی شود و ممکن است مستندات اضافی برای آن‌ها درخواست شود. مستندات مورد نیاز برای عوامل میکروبی کنترل زیستی به شرح زیر است:

الف: یکنواختی فرآورده

۱- قسمت فعال فراورده (سلول یا اسپور میکروبی، پروتئین و یا سموم)

- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی
- نام سیستماتیک و نام سویه (باکتری، قارچ، پروتوزوا، ویروس)
- نام عمومی
- محل طبیعی زندگی موجود زنده مورد استفاده
- ارتباط عامل میکروبی با سایر گونه‌ها
- تاریخچه شناسایی عامل
- فرآیند تولید محصول و عامل میکروبی مورد استفاده
- فرآورده‌ها و شاخص‌های استفاده شده برای شناسایی عامل (فنوتیپی، بیوشیمیایی، سرولوژیکی و مولکولی)
- ترکیب مواد و یا موجودات ناخواسته موجود در فرآورده (ماهیت، ساختار و خصوصیات)
- روش‌های آنالیز و ارزیابی موجود زنده مورد استفاده

۲- محصول یا فرآورده نهایی

- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی
- کمیت عامل فعال (سویه میکروبی یا متابولیت‌های آن)
- نام و نوع فرمولاسیون
- طبیعت و ماهیت و میزان ترکیبات اضافی (از قبیل ترکیبات ضد اشعه ماورای بنفش، نگهدارنده آب، پرکننده‌ها، خوشمزه سازها و)
- پایداری محصول نهایی و اثرات دما و شرایط انبارداری بر فعالیت زیستی فرآورده
- روش‌های ارزیابی و آنالیز

ب. خصوصیات زیستی عامل فعال

اطلاعات در خصوص اینکه عامل کنترل زیستی چه گونه (گونه‌هایی) را مورد حمله قرار می‌دهد؟، درجه اختصاصیت عامل کنترل زیستی چقدر است؟، میزان ثبات ژنتیکی عامل، مناطق و شرایطی که بطور معمول عامل کنترل زیستی در آن مشاهده می‌شود، و اثرات زیستی احتمالی ناشی از مصرف عامل در مزارع باید ارائه شوند. این اطلاعات بطور معمول شامل موارد زیر هستند:

- مناطق طبیعی زندگی عامل، و روش توزیع عامل در شرایط آب و هوایی متفاوت
- گونه(های) آفت هدف و روش تاثیر بر آفت مد نظر (آنتاگونیسم، بیماریزایی یا)

- میزان دز و غلظت مورد نیاز برای تاثیر مناسب
- قابلیت انتقال و روش تاثیر
- میزان نزدیکی یا خویشاوندی عامل زیستی با گونه‌های پاتوژن انسانی، دامی یا گیاهی
- نوع گیاهان زراعی یا باغی که از بیماری یا آفت محافظت خواهند شد
- دستورالعمل نحوه، میزان و تعداد دفعات مصرف

ج. داده‌های سمیت شناسی

نکته بسیار مهم در زمان توسعه یک عامل کنترل زیستی، این موضوع است که عامل مذکور نباید به عنوان یک پاتوژن شناخته شده‌ی انسان و یا سایر پستانداران باشد و از طرف دیگر فرآورده و یا محلول نهایی نباید بصورت آلودگی یا از طریق موتاسیون حاوی این‌گونه عوامل بیماری‌زا به میزان بیش از حد مجاز باشد.

۱-اطلاعات اولیه سمیت‌شناسی

عامل زیستی فعال

- مسمومیت‌زایی/بیماری‌زایی حاد در صورت مصرف دهانی (مسمومیت)
- سمیت حاد پوستی
- سمیت/بیماری‌زایی تنفسی و ششی
- حساسیت‌زایی یا آلودگی چشمی
- آلرژی‌زایی

فرآورده نهایی

- قابلیت سمیت/بیماری‌زایی حاد در صورت مصرف دهانی (مسمومیت)
- سمیت حاد پوستی
- مسمومیت/بیماری‌زایی تنفسی
- حساسیت‌زایی یا آلودگی چشمی
- آلرژی‌زایی

۲-اطلاعات سمیت شناسی تکمیلی

بطور کلی در زمانی که عامل زیستی فعال یا فرآورده نهایی اثرات مسمومیت‌زایی، عفونت‌زایی یا پایداری غیرمعمول نشان دهند، اطلاعات تکمیلی مورد نیاز خواهد بود. مثال‌هایی از این نوع مطالعات در زیر آورده شده است.

- اطلاعات سمیت شناسی یا بیماری‌زایی در شرایط تکرار مصرف در چند دفعه^۱ (اگر پایداری غیرمعمول مشاهده شود)
- اثرات بر سیستم‌های تولید مثلی
- مطالعات در خصوص ایجاد ضعف ایمنی^۲ (برای ویروس‌ها)
- مطالعات بیماری‌زایی و یا عفونت‌زایی بر روی جانوران^۳ (برای پارازیت‌های درون سلولی پستانداران)

^۱ Subchronic toxicity/pathogenesis

^۲Immunodeficiency

^۳Primate Infectivity/pathogenesis

د. اطلاعات در خصوص بقا و اثرات اکولوژیکی عامل کنترل زیستی

در خصوص عوامل میکروبی کنترل زیستی که سم تولید می‌کنند، لازم است اطلاعات در خصوص میزان ماندگاری سم و همچنین روش ارزیابی و اندازه‌گیری بقایای این سموم در محصولات کشاورزی خوراکی ارایه شود. ارزیابی مخاطرات احتمالی اکولوژیکی عوامل میکروبی کنترل زیستی دارای اهمیت فراوانی است. به منظور انجام این بررسی‌ها، لازم است تا میزان اختصاصیت این عوامل بر روی گونه‌های هدف و همچنین میزان احتمال تاثیر بر روی گونه‌های غیر هدف ارزیابی شود. به منظور دستیابی به این اطلاعات، لازم است ارزیابی‌های زیر صورت پذیرد:

- ارزیابی سمیت برای ماهیان
- انجام مطالعات بررسی اثرات احتمالی بر گیاهان غیرهدف
- انجام مطالعات بررسی اثرات احتمالی بر روی حشرات غیرهدف
- بررسی اثرات سمیت و بیماری‌زایی احتمالی بر طیور با مصرف خوراکی یک دز از عامل زیستی
- مطالعات بیماری‌زایی تنفسی در طیور

اگر در مطالعات فوق، مخاطرات عامل کنترل زیستی مشاهده شود، لازم خواهد بود تا میزان دز حداقلی که در شرایط میدانی منجر به ایجاد اثرات منفی بر موجودات غیرهدف می‌شود، مشخص شود.

منابع

- Alexandratos, N. and Bruinsma, J., 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision, 12-03, p. 4. Rome, FAO: ESA Working paper.
- Barreto, R. W., Ellison, C. A., Seier, M. K., & Evans, H. C. 2012. 11 Biological control of weeds with plant pathogens: Four Decades On. Integrated Pest Management: Principles and Practice, 299.
- BCC Research Report., 2015. Biopesticides: The Global Market, CHM029E
- Bhushan, C., Bhardwaj, A., Misra, S.S., 2013. State of Pesticide Regulations in India. Centre for Science and Environment, New Delhi.
- Blair, A., Ritz, B., Wesseling, C., & Freeman, L. B. 2015. Pesticides and human health. Occupational and environmental medicine, oemed-2014
- Błaszczyk, L., Siwulski, M., et al., 2014. *Trichoderma spp.*—application and prospects for use in organic farming and industry. Journal of Plant Protection Research, 54(4), 309-317.
- Bucioa, J. L., -Floresa, R. P., Estrella, A. H. 2015. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multi level properties of a plant beneficial fungus. Scientia Horticulturae.1-15.
- Bukhari, T., Takken, W., & Koenraadt, C. J. 2011. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. Parasites & vectors, 4(1): 1.
- Cordeau, S., Triolet, M., Wayman, S., Steinberg, C., et al., 2016. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. Crop Protection, 87, 44-49.
- Ehlers, R. U. (2001). Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Applied microbiology and biotechnology, 56(5-6), 623-633.
- FAO/WHO, 2000. Pesticide residues in food — 1999 evaluations. Part II — toxicological. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. World Health Organization, Geneva.

- Federici, B. A., Bonning, B. C., & St Leger, R. J. 2008. Improvement of insect pathogens as insecticides through genetic engineering. *PathoBiotechnology*. Landes Bioscience, Austin, 15-40.
- George N. Agrios (2005) – Plant Pathology, Fifth Edition. Academic Press. 952 pages
- Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C., & Rey, P. 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7), 4847-4860.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., & Stewart, A. 2012. Have biopesticides come of age?. *Trends in biotechnology*, 30(5), 250-258.
- Green, J. M., and Owen, M. D. K. 2011. Herbicide-resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5819–5829.doi:10.1021/jf101286h
- Gul, H. T., Saeed, S., & Khan, F. Z. A. 2014. Entomopathogenic fungi as effective insect pest management tactic: a review. *Appl. Sci. Bus. Econ*, 1(1), 10-18.
- Harding, D. P., & Raizada, M. N. 2015. Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. *Frontiers in plant science*, 6.
- Hasanloo T., Kowsari M., et al., 2010. Study of Different *Trichoderma* Strains on Growth Characteristics and Silymarin Accumulation of Milk Thistle Plant. *Journal of Plant Interactions*. 5(1):45-49.
- Hayes, L., Fowler, S. V., Paynter, Q., Groenteman, R., Peterson, P., Dodd, S. & Dymond, J. R. 2013. Biocontrol of weeds: achievements to date and future outlook. *Ecosystem services in New Zealand—conditions and trends*. Manaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand, 375-385.
- Heap, I. 2016. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Available at: www.weedscience.org (accessed June 16, 2016).
- Helyer, N., Cattlin, N. D., & Brown, K. C. 2014. Biological control in plant protection. CRC Press.
- Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., & Bhat, M. A. 2013. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, 1(2), 39-57.
- Kamala T. H., Indira S., Gourashyam T. H., Bharat G. S. 2013. Genetic diversity and species pattern of *Trichoderma* and *Hypocrea* in Manipur using in silico analysis. *Bioinformation*. 9(2):106–111.
- Kamita, S. G., Kang, K. D., Hammock, B. D., & Inceoglu, A. B. 2010. 10 Genetically Modified Baculoviruses for Pest Insect Control. *Genetically Modified Baculoviruses for Pest Insect Control*.
- Karimi, E., Sadeghi, A., Abbaszade Dehaji, P., Dalvand, Y., Omidvari, M., & Kakuei Nezhad, M. 2012. Biocontrol activity of salt tolerant *Streptomyces* isolates against phytopathogens causing root rot of sugar beet. *Biocontrol Science and Technology*, 22(3), 333-349.
- Kowsari, M., Motallebi, M. Zamani, M. R. 2014. Construction of new GFP-tagged fusants for *Trichoderma harzianum* with enhanced biocontrol activity. *The Journal of Plant Protection Research*. 54 (2):122-131.
- Kowsari Mojegan, Mostafa Motallebi, Mohammad Reza Zamani. 2014. Protein engineering of chit42 towards improvement of chitinase and antifungal activities *Current Microbiology*. 68: 495-502.
- Kowsari, M., Zamani M. R., Motallebi. M. 2014. Improvement of *Trichoderma harzianum* antagonistic activity against *Sclerotinia sclerotiorum* by overexpression of *chit42*. *Iranian Journal of Biotechnology*. 12 (2): 26-31
- Kupferschmied P, Maurhofer M., Keel C., 2013. Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities, *Front. Plant Sci.* 284-287.
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J Invertebr Pathol*, 132, 1-41.
- Leger, R. J. S., & Wang, C. 2010. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 901-907.

- Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., & Zhang, R. 2014. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in microbiology*, 5, 636.
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 177.
- Massart, S., & Jijakli, H. M. 2007. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: a review. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 229-241.
- McDougall P., 2016. The cost of new agrochemical product discovery, development and registration in 1995, 2000 and 2005–8 and 2010 to 2014. R&D Expenditure in 2014 and Expectations for 2019. Final Report for Crop Life America and the European Crop Protection Association.
- Moscardi, F., de Souza, M. L., et al., 2015. Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. *Critical reviews in biotechnology*, 35(3), 334-341.
- Mukherjee, P. K., Horwitz B. A., Estrella A. Herrera., Schmoll, M., and Kenerley, C. M. 2013. *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:105–29.
- Nazarian Amirani A., Jahangiri R, Salehi Jouzani Gh, 2009. Coleopteran-specific and putative novel *cry* genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection, *J. Inverteb. Pathol*, 102: 101–109.
- Pal, K. K. and B. McSpadden Gardener, 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Pearson, D. E., & Callaway, R. M. 2008. Weed- biocontrol insects reduce native- plant recruitment through second- order apparent competition. *Ecological Applications*, 18(6), 1489-1500.
- Qiao JQ , Wu HJ, Huo R, Gao W, Borris R, 2014. Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1:12.
- Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P. A., Javid, M. G., Dalvand, Y., & Askari, H. 2012. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1503-1509.
- Salehi Jouzani Gh, Valijanian E., Sharafi R. 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings, *Applied Microbiology and Biotechnology* (Online First).
- Salehi Jouzani Gh, Pourjan Abad A, Seifinejad A, 2008. Distribution and diversity of dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35 (2): 83-94.
- Salehi Jouzani Gh, Seifinejad Ali, Saeedizadeh Abbas, et al., 2008. Molecular detection of nematocidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free living and plant parasitic nematodes, *Canadian Journal of Microbiology*, 54(10): 812–822.
- Schrey, S. D., & Tarkka, M. T. 2008. Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(1), 11-19.
- Seifinejad A., Salehi Jouzani Gh, Bihamta MR, 2007. Functional Genomics of *Bacillus thuringiensis* and *cry* genes, *Iranian Journal of Modern Genetics*. NO 2, 17-23.
- Seifinejad A., Salehi Jouzani Gh, Hosseinzadeh A., Abdmishani C. 2008. Characterization of Lepidoptera-active *cry* and *vip* genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection, *Journal of Biological Control*. 44: 216–26.
- Senthil-Nathan, S. 2015. A review of biopesticides and their mode of action against insect pests. In *Environmental Sustainability* (pp. 49-63). Springer India.
- Shapiro-Ilan DI., et al., 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control*, 38(1): 124-33.
- Shimizu, M. 2011. Endophytic actinomycetes: biocontrol agents and growth promoters. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* (pp. 201-220). Springer Berlin Heidelberg.
- Sparks TC, Nauen R., 2014. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic Biochem Physiol*, 122: 121-28

- Suryadi, B. F., et al., 2016. Evaluation of entomopathogenic *Bacillus sphaericus* isolated from Lombok beach area against mosquito larvae. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6(2), 148-154.
- Szewczyk, B. 2011. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In Microbes and microbial technology (pp. 415-445). Springer New York.
- Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I., & De Souza, M. L. 2006. Baculoviruses—re-emerging biopesticides. Biotechnology advances, 24(2), 143-160.
- Tanner, R. A., Pollard, K. M., Varia, S., Evans, H. C., & Ellison, C. A. 2015. First release of a fungal classical biocontrol agent against an invasive alien weed in Europe: biology of the rust, *Puccinia komarovii* var. *glanduliferae*. Plant Pathology, 64(5), 1130-1139.
- Van Wilgen, B. W., Moran, V. C., & Hoffmann, J. H. 2013. Some perspectives on the risks and benefits of biological control of invasive alien plants in the management of natural ecosystems. Environmental management, 52(3), 531-540.
- Vashisth, S., et al., 2013. Entomopathogenic nematodes-a review. Agricultural Reviews, 34(3).
- Velivelli SL, De Vos P, Kromann P, et al. 2014. Biological control agents: from field to market, problems, and challenges. Trends Biotechnol, 32, 493-496.
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., Valero, J.R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. Biochemistry Engineering Journal 37, 1-20.
- World Agricultural Pesticides, 2016. Industry Study with Forecasts for 2016 & 2021, Freedonia Group.
- Yadav, I. C., Devi, N. L., Syed, J. H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., & Jones, K. C. 2015. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review of India. Science of The Total Environment, 511, 123-137.
- Yang, N. W., Zang, L. S., Wang, S., Guo, J. Y., Xu, H. X., Zhang, F., & Wan, F. H. 2014. Biological pest management by predators and parasitoids in the greenhouse vegetables in China. Biological Control, 68, 92-102.