

بررسی اثر بیماری‌زایی باکتری *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* روی سنین مختلف لاروی سوسک کلرادوی سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (say) و اثر تشدیدکننده‌های گیاهی در افزایش کارایی آن در شرایط آزمایشگاه

الهام جوئی، محمدحسن صفرعلیزاده و علی اصغر پورمیرزا^۱

چکیده

در این بررسی اثر باکتری *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* Strain EG2424 روی سنین مختلف لاروی سوسک کلرادوی سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (say)، و امکان افزایش کارایی آن توسط دو ماده گیاهی کافئین و عصاره آبی چریش در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها در دمای 25 ± 4 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت در شبانه روز انجام شد. لاروهای مورد نیاز برای انجام آزمایش‌ها از کلنی پرورشی ایجاد شده روی غذای طبیعی تأمین شد. سنین لاروی مورد نظر با استفاده از اندازه‌گیری عرض کپسول سرتفکیک گردید. در بررسی حساسیت لاروهای سنین اول، دوم، سوم و چهارم سوسک کلرادوی سیب زمینی مقادیر LC₅₀ برای سنین مزبور به ترتیب $183/86$ ، 377 ، $1297/03$ و 3096 پی پی ام محاسبه گردید. اثر تشدیدکنندگی کافئین و چریش به تفکیک در اختلاط با باکتری و در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۴ تکرار روی لارو سن سوم سوسک کلرادو بررسی شد.

نتایج به دست آمده نشان دادند که کافئین و چریش خاصیت تشدیدکنندگی بالایی در افزایش کارایی باکتری دارند و مخلوط حداقل غلظت مؤثر باکتری (۶۱۸ پی پی ام) و کافئین با غلظت ۴۰۰۰ پی پی ام بعد از ۱۴۴ ساعت ۸۰ درصد تلفات ایجاد نمود در حالی که کافئین و باکتری هر کدام به تنهایی به ترتیب ۱۰ و ۲۰ درصد تلفات را باعث شدند. علاوه بر این مرگ و میر در تیمارهای حاوی کافئین سریع‌تر ظاهر گردید. اختلاط غلظت ۶۱۸ پی پی ام از باکتری با عصاره آبی حاصل از چریش با غلظت ۳۵۰۰۰ پی پی ام بعد از ۱۴۴ ساعت موجب ۷۷/۵ درصد تلفات شد. در صورتی که باکتری و عصاره آبی چریش هر یک به تنهایی به ترتیب ۲۲/۵ و ۲۵ درصد تلفات ایجاد کردند. مشخص گردید که میانگین وزن لاروهای که از غذای حاوی کافئین خالص و چریش خالص تغذیه کرده بودند با اطمینان ۹۵ درصد کمتر از وزن لاروهای تیمار شاهد بود.

واژه‌های کلیدی: *Bacillus thuringiensis*، *Leptinotarsa decemlineata*، زیست‌سنجی و تشدید کننده

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشیار گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

مقدمه

سوسک کلرادوی سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say)، یکی از ۱۵ آفت مهم محصولات کشاورزی جهان محسوب می‌شود (۱۶) در حال حاضر این حشره جزء آفات همه جایی است که می‌تواند به طور جدی گیاهان تیره Solanaceae را تهدید نماید (۱۶ و ۱۷). در بین گیاهان میزبان این آفت، سیب زمینی با توجه به ارزش اقتصادی بیشتر و سطح کشت بالاتر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲۳). در سال‌های اخیر این محصول به شدت مورد حمله سوسک کلرادو قرار گرفته است که از نظر کمی و کیفی عملکرد محصول را به میزان قابل توجهی کاهش داده است (۱۶ و ۱۷). خسارت این حشره به دلیل تغذیه لارو و حشره کامل از برگ، گل و ساقه سیب زمینی بسیار سنگین است. هم‌چنین حشرات کامل می‌توانند برخی بیماری‌ها مانند بیماری ویروئیدی غده دوکی سیب زمینی، بیماری پژمردگی باکتریایی و پوسیدگی ریشه را اشاعه دهند (۱۷ و ۱۶). استفاده بی‌رویه از حشره‌کش‌های شیمیایی در کنترل این آفت علاوه بر آلودگی محیط زیست منجر به مقاومت آفت مزبور در برابر حشره‌کش‌ها شده است (۲۳). در چنین شرایطی کاربرد سیستم‌های کنترل تلفیقی و روش‌های غیر آلوده کننده و ایمن‌تر برای کنترل آفات، خصوصاً تأکید بر استفاده از سیستم‌های طبیعی مانند عوامل بیولوژیک که کاهش عوارض زیست محیطی را به همراه دارد منطقی و ضروری به نظر می‌رسد (۱۶ و ۴). در حال حاضر با توجه به موفقیت‌های شگرف تکنولوژی و تحولات مربوط به مدیریت مبارزه با آفات، روش‌های غیر شیمیایی بالاخص مبارزه بیولوژیک در سرلوحه برنامه‌های تحقیقاتی و اجرایی کشورهای پیشرفته قرار گرفته است به طوری که استفاده از مبارزه بیولوژیک در کنار سایر روش‌ها می‌تواند نقش عمده‌ای در مبارزه با آفات داشته باشد (۲۳). در چنین شرایطی برای کنترل سوسک کلرادوی سیب زمینی کنترل تلفیقی مورد پذیرش محققین قرار گرفته است (۱۶ و ۲۳). در این راستا، حشره‌کش‌های میکروبی بر پایه استرین‌های مختلف باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner، یکی از

مهم‌ترین موارد مطلوب کنترل این آفت به شمار می‌آیند که می‌توانند در یک برنامه کنترل تلفیقی این آفت مورد استفاده قرار گیرند. تاکنون بیماری‌زایی چندین سروتیپ باکتری *Bacillus thuringiensis* از قبیل *B. t. sandiego* و *B. t. tenebrionis* روی سوسک کلرادوی سیب زمینی مورد تأیید قرار گرفته است و تحقیقات گسترده‌ای در زمینه استفاده از آنها علیه این آفت صورت گرفته است (۱۸، ۲۲ و ۲۳). در سال‌های اخیر مشکل مقاومت سوسک کلرادو به این باکتری در آزمایشگاه و در شرایط مزرعه طنین انداز شده است و متخصصین استراتژی مدیریت آفات را به تفکر و داشته است که یکی از تفکرات قوی در این زمینه، استفاده از خاصیت مواد دگرآسیب (آلوشیمیال) گیاهان در ترکیب با فرمولاسیون‌های مختلف *Bacillus thuringiensis* به منظور افزایش کارایی آن در کنترل این آفت می‌باشد (۲۱ و ۱۲). مواد دگر آسیب خود از عوامل کنترل آفات به شمار می‌روند (۱۹). این مواد ممکن است در افزایش کارایی عوامل کنترل بیولوژیک کاملاً مفید باشند (۱۴). آلکالوئیدها و ترپنوئیدها از جمله مواد دگرآسیب هستند که تعداد و تنوع آنها در حال توسعه است (۳ و ۲۱). آلکالوئیدها گروهی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که تنوع وسیع دارند (۳). کافئین (۱، ۳ و ۷ - تری متیل گزانتین) یک ماده آلکالوئید پورینی و متعلق به گروهی از ترکیبات گیاهی موسوم به متیل گزانتین می‌باشد که به‌طور طبیعی در بسیاری از گیاهان متعلق به خانواده‌های Theaceae، Rubiaceae و Streptuliaceae یافت می‌شود (۲، ۳ و ۵). این ماده به عنوان حشره کش علیه تعداد زیادی از حشرات عمل می‌نماید (۳ و ۵). کافئین به دلیل شباهت ساختمانی به ملکول آدنوزین به عنوان گیرنده ATP عمل می‌کند و با افزایش فعالیت عصبی منجر به ناتوانی دستگاه‌های حساس بدن حشره و در نتیجه ضعف و مرگ حشره می‌گردد (۸). این ماده به علت داشتن آثار سمی نقش بازدارندگی تغذیه و تولید مثل را دارا می‌باشد (۲، ۳ و ۵). از مواد دگر آسیب دیگر که توجه محققین را به خود جلب کرده است آزادیراختین می‌باشد که یک ترانوری ترپنوئید است و به عنوان

در آزمایش‌ها به کار برده شدند.

۲. عامل بیماری‌زا

در این بررسی از فرمولاسیون تجاری باکتری با عنوان Jack POT BFC حشره کش بیولوژیک مبتنی بر *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* استفاده شد. این حشره‌کش به صورت مایع روغنی قابل انتشار در آب فرموله شده و حاوی ۹۷/۷۵ درصد توکسین مؤثر روی حشرات راسته سخت بالپوشان و ۰/۲۵ درصد توکسین مؤثر روی راسته بالپولکداران است. این فرآورده برای کنترل سوسک کلرادوی سیب زمینی ساخته شده و کمپانی Intrachem ایتالیا آن را عرضه می‌نماید.

۲.۱. بررسی حساسیت سننین مختلف لاروی سوسک کلرادوی

سیب زمینی به باکتری

به منظور بررسی حساسیت سننین مختلف لاروی سوسک کلرادو، قسمت انتهایی ساقه‌های سیب زمینی کاشته شده در یک مزرعه ایزوله که هیچ گونه عمل سم پاشی در آن انجام نشده بود به طول تقریبی ۲۰ الی ۳۰ سانتی متر از بوته جدا و به آزمایشگاه منتقل شد. سپس ساقه‌های جدا شده سیب زمینی به طور مجزا درون یک ظرف شیشه‌ای کوچک به ابعاد ۷×۴ سانتی‌متر که دارای دهانه تنگ و حاوی آب قرار داده شد و با استفاده از پنبه هیدروفیل ساقه مورد نظر داخل شیشه ثابت گردید. در تمام مراحل اجرای آزمایش محلول‌های باکتری مورد نیاز از محلول مادر تهیه شد. پس از یک سری آزمایش‌های مقدماتی با غلظت‌های مختلف باکتری، براساس روش ارائه شده توسط روبرتسن و پریسلر (۲۰) غلظت‌های حداقل و حداکثر که تقریباً ۲۵٪ و ۷۵٪ تلفات روی لاروهای سننین مختلف داشتند تعیین گردید و سپس در فاصله این دو غلظت، ۴ غلظت به روش فواصل لگاریتمی تعیین و در نهایت ۶ غلظت به همراه تیمار شاهد و هر تیمار در سه تکرار برای سننین لاروی مورد نظر به کار برده شد. در تیمار شاهد از آب مقطر استفاده گردید. پس از تهیه شاخه‌های تیمار و آلوده‌سازی آنها با محلول‌های

مختل کننده رشد، ضد تغذیه و کشنده حشرات عمل می‌کند و از میوه درخت چریش به دست می‌آید (۲۱ و ۲۲). مواد حشره کش با منشأ گیاهی بدون این که لطمه‌ای به محیط زیست و تعادل اکوسیستم وارد کند نقش مؤثری در کنترل آفات ایفا می‌نمایند (۲۰). استفاده از این مواد در کنترل آفات باعث کاهش هزینه‌های مدیریتی آفات گردیده و آثار سوء به محیط و انسان را کمتر می‌نماید و بروز مقاومت به حشره کش را به دلیل نحوه عمل متعدد به تأخیر می‌اندازد (۲۱). زیرا هر یک از این ترکیبات مکانیسم عمل متفاوت از یکدیگر داشته و جایگاه هدف آنها متمایز از یکدیگر است. بنابراین حشره در طولانی مدت قادر به نشان دادن مقاومت به کلیه این ترکیبات خواهد شد (۳، ۱۲ و ۲۱). پژوهش حاضر به منظور بررسی حساسیت سننین مختلف لاروی سوسک کلرادو به یک فرمولاسیون جدید از باکتری *Bacillus thuringiensis* تحت عنوان Jack pot BFC که یک حشره کش بیولوژیک مبتنی بر *B.t.var.kurstaki* Strain EG2424، و ویژه کنترل سوسک کلرادوی سیب زمینی است انجام شد. امکان افزایش توانمندی باکتری مزبور در اختلاط با ترکیبات گیاهی کافئین و عصاره آبی چریش نیز مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

این بررسی در سال‌های ۱۳۸۱-۱۳۷۹ در دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه به شرح زیر انجام شد.

۱. تهیه حشره میزبان

برای تهیه حشره دستجات تخم سوسک کلرادو از طبیعت جمع‌آوری گردید و به ظروف یک‌بار مصرف به ابعاد ۲۳×۱۸×۶ سانتی‌متر در آزمایشگاه منتقل و تعدادی از توده‌های تخم بر حسب نیاز پرورش یافت و بقیه جهت انجام آزمایش‌های بعدی در یخچال در دمای 4 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از تفریح تخم‌ها، لاروها روی برگ سیب زمینی و در شرایط دمایی 25 ± 4 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و مدت روشنایی ۱۶ ساعت در شبانه روز پرورش یافتند. سننین مختلف لاروی بر حسب اندازه‌گیری عرض کپسول سر از هم تفکیک و

ساعت جوشیدن، ۲۰۰ سانتی متر مکعب کلروفورم به مجموعه اضافه گردید. ۱۰۰ گرم از نمونه مذکور در بشر ریخته شد تا کلروفورم آن تبخیر و به رنگ سبز در آید. سپس به آن ۲۰۰ سانتی متر مکعب اتر و ۲۵۰ سانتی متر مکعب اسید کلریدریک اضافه شد. بعد از آن به داخل دکانتور منتقل و خوب به هم زده شد و با باز کردن شیر آن گازهای موجود در دکانتور تخلیه شد. سپس دکانتور به حال خود گذاشته شد تا دو لایه تشکیل شود. پس از حل شدن کافئین در فاز پائین، محلول حاصل به دکانتور دوم منتقل گردید و روی آن ۱۵۰ سانتی متر مکعب اتر ریخته شد و بعد از به هم زدن و خارج کردن گازها دو فاز مجزا تشکیل شد، مجدداً فاز پایین در دکانتور سوم ریخته شد و روی آن تا حد اشباع آمونیاک اضافه گردید و به این مجموعه کلروفورم (۲۵۰ سانتی متر مکعب) اضافه شد و فاز پائین به دکانتور دیگری انتقال یافت. سپس کلروفورم محتوی کافئین در ظرف دیگری ریخته شد که بعد از تبخیر کلروفورم، کافئین به صورت رسوب سفید رنگ نمایان گردید. میزان کافئین استحصال شده با این روش ۱۰ گرم بود.

۱.۱.۳. بررسی اثر تشدید کنندگی کافئین در اختلاط با باکتری

در این آزمایش حداقل غلظت مؤثر باکتری روی لاروهای سن سوم که در بررسی اثر بیماری زایی ۲۵ درصد تلفات ایجاد کرد (۶۱۸ پی پی ام)، جهت اختلاط با غلظت‌های ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ پی پی ام کافئین انتخاب شد. آزمایش‌های اصلی در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با ۶ تیمار در ۴ تکرار اجرا شد. ۶ تیمار آزمایش عبارت بودند از:

الف) B.t. خالص (کمترین غلظت مؤثر)

ب) کافئین (۲۰۰۰ پی پی ام) + B.t. (کمترین غلظت مؤثر)

ج) کافئین (۳۰۰۰ پی پی ام) + B.t. (کمترین غلظت مؤثر)

د) کافئین (۴۰۰۰ پی پی ام) + B.t. (کمترین غلظت مؤثر)

ه) کافئین (۴۰۰۰ پی پی ام)

و) شاهد (آب مقطر)

آلوده‌سازی شاخه‌های تیمار به وسیله سم پاش دستی پلاستیکی انجام گرفت و برای پخش یک‌نواخت مواد روی

تهیه شده با سم‌پاش دستی پلاستیکی، آنها را به‌طور جانبی در داخل ظروفی به ابعاد ۲۳×۱۸×۶ سانتی متر قرار داده و سپس ۱۰ عدد لارو هم سن و هم اندازه از هر سن به درون ظروف مزبور رهاسازی گردید. دهانه ظروف تیمار توسط پارچه‌های توری به نحوی مسدود شد که امکان خروج لاروها وجود نداشت. شرایط نگهداری لاروهای آزمایش در کلیه ظروف تیمار یکسان بود و کاملاً مشابه شرایط پرورش بود. شمارش تلفات هر ۲۴ ساعت یک‌بار تا ورود لاروهای تیمار به مرحله شفیرگی انجام شد. معیار مرگ و میر لاروها عدم پاسخ‌دهی به ضربات سوزن به ابتدا و انتهای بدن و سیاه شدن بدن آنها بود.

۲.۲. بررسی نقش میزان چربی در حساسیت لارو نسبت به باکتری

به منظور تعیین مقدار چربی لاروها از دستگاه سوکسله استفاده گردید. برای این منظور تعداد زیادی لارو از سنین مختلف به تفکیک توزین شد. سپس لاروهای مربوط به هر یک از سنین با استفاده از یک مخلوط کن کاملاً له گردید و به‌طور جداگانه داخل کارتوش‌های مربوطه ریخته شد و سپس کارتوش‌ها روی دستگاه سوکسله نصب و با استفاده از اتر چربی موجود در آنها استخراج گردید. پس از اتمام کار، میزان چربی حاصل با استفاده از یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد و متوسط میزان چربی برای هر یک از لاروهای سنین مختلف به‌طور جداگانه محاسبه گردید.

۳. تشدید کننده‌ها

۳.۱. استخراج کافئین

به منظور استخراج کافئین از روش ارائه شده توسط کانیف (۹) استفاده گردید. کافئین مورد استفاده در آزمایش‌ها از چای معمولی (گلستان) موجود در بازار استخراج شد. برای این کار ۲۰۰ گرم چای مورد نظر کاملاً آسیاب گردیده و به شکل پودر در آمد. ۵۰ گرم اکسید منیزیم جهت جدا کردن تانن‌ها به آن اضافه گردید. سپس محتویات بالن با ۱۰۰ سانتی متر مکعب آب مقطر خیس و با به هم زدن به صورت یک‌نواخت درآمد. بعد از مدت زمان ۲ ساعت، به مبرد برگردان وصل شد. پس از یک

سطوح شاخه‌ها از روغن سیتوویت به غلظت ۲۵۰ پی پی ام در تمام تیمارها استفاده گردید. شاخه‌های تیمار، درون ظروف تیمار مشابه ظروف پرورش قرار داده شد و در هر تکرار ۱۰ عدد لارو سن سوم رهاسازی گردید. سپس ظروف توسط پارچه توری کاملاً مسدود شدند و در شرایط پرورش قرار گرفتند و تلفات حاصل، هر ۲۴ ساعت شمارش گردید که اصولاً باید تا ورود تیمار شاهد به مرحله شفیرگی ادامه می‌یافت ولی با توجه به ثابت ماندن تلفات، به مدت ۱۴۴ ساعت انجام شد.

۲.۳. تهیه عصاره آبی چریش

برای تهیه عصاره آبی چریش از روش ارائه شده توسط ارومچی (۱)، استفاده گردید. در تهیه این سوسپانسیون از دانه‌های چریش، برای ۱۰ لیتر آب ۵۰۰ گرم دانه چریش مورد نیاز است. به همین منظور ۵۰ گرم از دانه‌های چریش به وسیله آسیاب کاملاً خرد گردید. دانه‌های خرد شده در ۱ لیتر آب مخلوط گردید و چند بار خوب به هم زده شد. این مخلوط به مدت چند ساعت به حال خود گذاشته شد تا مواد مؤثر حشره‌کش موجود در آن به خوبی وارد گردد. قطعات درشت و پوست دانه‌ها از سوسپانسیون توسط یک پارچه توری ریز جدا شد.

۱.۲.۳. بررسی اثر تشدیدکنندگی عصاره آبی چریش در اختلاط با باکتری

در این بررسی حداقل غلظت مؤثر باکتری روی لارو سن سوم (۶۱۸ پی پی ام) برای اختلاط با سه غلظت ۱۵۰۰۰، ۲۵۰۰۰ و ۳۵۰۰۰ پی پی ام عصاره آبی چریش استفاده شد. آزمایش‌های اصلی در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی با ۶ تیمار در ۴ تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایش عبارت بودند از:

الف) *B.t.* خالص (کمترین غلظت مؤثر)

ب) عصاره آبی چریش (۱۵۰۰۰) پی پی ام) + *B.t.* (کمترین غلظت مؤثر)

ج) عصاره آبی چریش (۲۵۰۰۰ پی پی ام) + *B.t.* (کمترین

غلظت مؤثر)

د) عصاره آبی چریش (۳۵۰۰۰ پی پی ام) + *B.t.* (کمترین غلظت مؤثر)

ه) عصاره آبی چریش (۳۵۰۰۰ پی پی ام)

و) شاهد (آب مقطر)

نحوه آلوده‌سازی شاخه‌های تیمار مشابه آزمایش مربوط به بررسی اثر تشدیدکنندگی کافئین بود.

۴. تأثیر تشدیدکننده‌ها روی وزن لاروی حشره

در این بررسی اثر تشدیدکننده‌های کافئین (۴۰۰۰ پی پی ام) و چریش (۳۵۰۰۰ پی پی ام) روی وزن لاروهای سن سوم تحت تیمار مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش بر اساس آزمون T-test طراحی گردید. برای اجرای آزمایش ۳۰ عدد لارو سن سوم سوسک کلرادو به عنوان تیمار شاهد و ۳۰ عدد نیز با غلظت ذکر شده برای هر تشدیدکننده، به مدت ۱۲۰ ساعت تیمار شد. سپس میانگین وزن لاروی برای هر یک از تیمارها جداگانه محاسبه گردید.

۵. تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج به دست آمده از بررسی حساسیت به وسیله نرم افزار SAS و برنامه پروبیت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقادیر LC باکتری برای سنین مختلف لاروی سوسک کلرادو تعیین گردید. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excell بهره‌گیری شد. هم چنین به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تأثیر تشدیدکننده‌ها از \sqrt{x} Arcsin داده‌ها جهت همگن کردن آنها و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده گردید. هم چنین به منظور مقایسه متوسط وزن لاروها از آزمون T-test و نیز از نرم افزار MSTAT-C استفاده گردید.

نتایج و بحث

۱. بررسی حساسیت سنین ۱ الی ۴ لاروی سوسک کلرادو به باکتری مقادیر ۵۰ LC باکتری برای سنین اول، دوم، سوم و چهارم سوسک کلرادو در جدول ۱ دیده می‌شود.

جدول ۱. تجزیه پروبیت داده‌های مربوط به تأثیر باکتری روی سنین اول الی چهارم لارو سوسک کلرادو

سنین لاروی	معادله برآوردکننده درصد تلفات برحسب مقادیر معینی از باکتری	واریانس شیب خط رگرسیون	LC _{۵۰} (ppm)	فاصله بین حد بالا و پایین LC _{۵۰}
سن اول	$y=0/2157+2/5397x$	۰/۵۷۲۳	۱۸۳/۸۶	۷۳/۱
سن دوم	$y=-1/828+2/6503x$	۰/۵۵۸۸	۳۷۷/۰۳	۵۸۰/۶۵
سن سوم	$y=-0/531+1/707x$	۰/۴۶۷۵	۱۲۹۷	۸۱۴/۹
سن چهارم	$y=-2/504+2/1498x$	۰/۵۱۳۴	۳۰۹۶	۲۹۳۲

شکل‌های ۱ الی ۴ رابطه لگاریتم غلظت و پروبیت درصد تلفات لاروهای سنین اول، دوم، سوم و چهارم سوسک کلرادوی را که از غلظت‌های مختلف باکتری تغذیه کرده‌اند، نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت باکتری تلفات لاروها نیز افزایش می‌یابد.

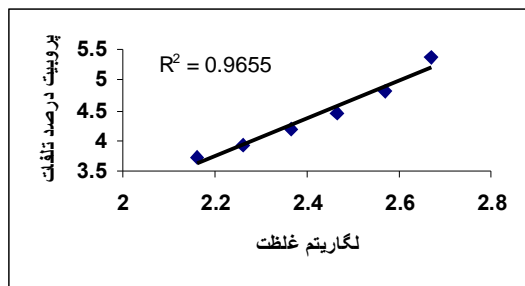
مقادیر LC_{۵۰} محاسبه شده حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری روی سنین مختلف لاروی سوسک کلرادو نشان می‌دهد که سنین پائین‌تر نسبت به باکتری حساسیت بیشتری دارند به طوری که لارو سن چهارم تقریباً ۱۷ مرتبه مقاوم تر از لارو سن اول، ۸ مرتبه مقاوم تر از لارو سن دوم و ۲/۵ مرتبه مقاوم تر از لارو سن سوم می‌باشد و لارو سن سوم نیز حساسیت کمی داشته به طوری که LC_{۵۰} لارو سن سوم تقریباً ۷ برابر لارو سن اول و بیش از ۳ برابر لارو سن دوم است. بنابراین لاروهای سنین سوم و چهارم این حشره دارای مقاومت نسبتاً بالایی هستند.

فرو و لوپز (۱۰)، این مقادیر را برای لاروهای سنین ۱ الی ۳ به ترتیب ۱۷۸/۷۹، ۳۸۴ و ۱۳۰۵/۲۷ پی پی ام برآورد کردند که نتایج حاضر تا حد زیادی با نتایج آنها مطابقت دارد و اختلافات موجود با توجه به بیوتیپ‌های متفاوت حشره و نیز متفاوت بودن فرمولاسیون‌های باکتری قابل توجه است.

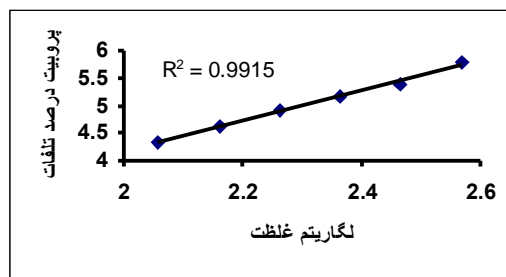
شکل ۵ مقادیر LC_{۵۰} باکتری را به ازای هر لارو و واحد وزن بدن لارو نشان می‌دهد. به طوری که معلوم است در ۹۹ درصد موارد مقادیر LC_{۵۰} به دست آمده به سن لاروی مربوط می‌شود و لاروهای سنین بالا به دلیل داشتن وزن بیشتر در برابر

یک دز معین مقاومت بیشتری را به ازاء هر لارو نشان می‌دهند و با افزایش وزن به مقاومت لارو در برابر باکتری افزوده می‌شود و در ۹۹ درصد موارد مقادیر LC_{۵۰} برآورد شده به وزن لارو بستگی داشته و درصد باقی‌مانده به عواملی غیر از وزن مربوط می‌شود. برای حذف اثر وزن بدن در افزایش مقاومت در برابر باکتری مقادیر LC_{۵۰} محاسبه شده بر حسب واحد وزن بدن لارو مورد بررسی قرار گرفت و معلوم گردید که به ازای واحد وزن بدن، لاروهای مسن‌تر حساس‌تر از لاروهای جوان‌تر می‌باشند و این مطلب در شکل ۵ دیده می‌شود.

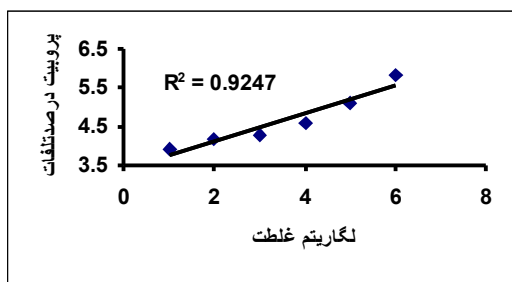
نتایج کلیه تحقیقات انجام شده در این بررسی نشان داد که مقادیر LC_{۵۰} برآورد شده به ازای هر لارو در سنین بالاتر بیشتر از سنین پایین‌تر می‌باشد. به عبارت دیگر ظاهراً لاروهای مسن‌تر در برابر باکتری نسبت به لاروهای جوان‌تر حساسیت کمتری دارند ولی اگر حساسیت به ازای واحد وزن بدن تعیین شود، نتیجه عکس می‌شود و لاروهای جوان‌تر در واحد وزن بدن، نسبت به لاروهای مسن‌تر حساسیت کمتری به باکتری نشان می‌دهند و دلیل حساس‌تر بودن لاروهای سنین بالا نسبت به سنین پایین‌تر، کمتر بودن میزان چربی آنها در واحد وزن می‌باشد به طوری که با اندازه‌گیری میزان چربی لاروهای سنین مختلف مشخص گردید که میزان درصد چربی موجود در لاروهای سنین اول، دوم، سوم و چهارم سوسک کلرادوی سیب زمینی به ترتیب ۸/۲، ۵/۶، ۳ و ۱/۸ درصد واحد وزن بدن لارو می‌باشد. با توجه به این که آنزیم‌های مؤثر در سم زدایی مانند (MFO) منشأ استروئیدی دارند (۱۳) بنابراین هر اندازه میزان چربی در



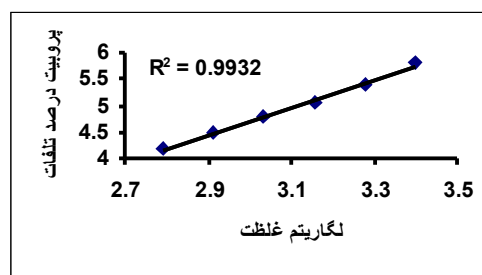
شکل ۲. رابطه بین لگاریتم غلظت و پروبیت درصد تلفات سن دوم



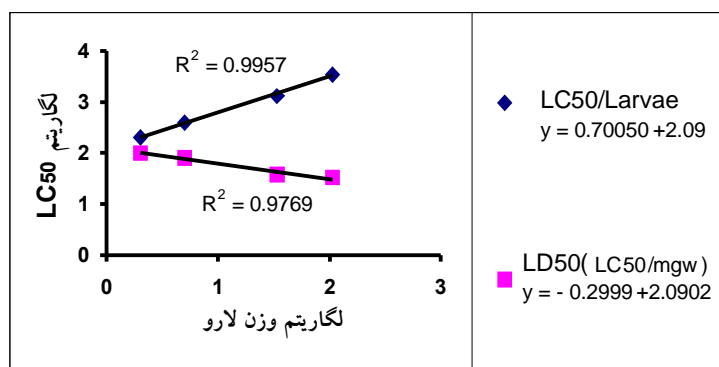
شکل ۱. رابطه بین لگاریتم غلظت و پروبیت درصد تلفات سن اول



شکل ۴. رابطه بین لگاریتم غلظت و پروبیت درصد تلفات سن چهارم



شکل ۳. رابطه بین لگاریتم غلظت و پروبیت درصد تلفات سن سوم



شکل ۵. رابطه بین لگاریتم وزن لارو و لگاریتم LC_{50} باکتری برای سنین ۱ الی ۴ لاروی بر حسب واحد وزن لاروی و واحد حشره

ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد به علاوه در این تیمارها مرگ و میر لاروها سریع‌تر بروز می‌کند.

نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل داده‌های تبدیل شده به $\text{Arc sin } \sqrt{x}$ بعد از ۱۴۴ ساعت در جدول ۳ ارائه شده است.

این نتایج نشان می‌دهد که در سطح اطمینان ۹۹ درصد بین تیمارها از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود دارد.

برای گروه‌بندی میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد که نتیجه آن در جدول ۴ ارائه شده است.

$S\bar{X} = 2/223 =$ درصد احتمال ۵ درصد

واحد وزن بدن بیشتر باشد نقش آنزیم‌ها در بی اثر کردن مواد سمی مانند توکسین باکتری بیشتر می‌شود و در نتیجه حساسیت حشره در واحد وزن به دلیل وجود چربی بیشتر، کمتر خواهد بود.

۲. بررسی تأثیر توام باکتری و کافئین روی لارو سن سوم

نتایج به دست آمده از تأثیر تیمارهای مختلف روی لارو سن سوم در جدول ۲ ارائه شده است. مشخص است که در تیمارهای دارای مخلوط باکتری و کافئین تلفات به طور قابل

جدول ۲. روند تلفات لاروهای سن سوم با تغذیه از باکتری مخلوط با کافئین در زمان‌های مختلف

تیمار	تعداد لارو		تلفات در زمان (ساعت)						درصد تلفات
	تکرار	کل	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰	۱۴۴	
<i>Bt.</i> (الف)	۱۰	۴۰	۰	۱	۳	۶	۸	۸	۲۰
<i>B.t.</i> + caffe(۲۰۰۰ ppm) (ب)	۱۰	۴۰	۱	۶	۱۲	۱۵	۱۶	۱۶	۴۰
<i>B.t.</i> + caffe(۳۰۰۰ppm) (ج)	۱۰	۴۰	۴	۱۳	۱۹	۲۳	۲۵	۲۶	۶۵
<i>B.t.</i> + caffe(۴۰۰۰ppm) (د)	۱۰	۴۰	۸	۱۷	۲۴	۲۷	۳۱	۳۲	۸۰
caffe(۲۰۰۰ppm) (ه)	۱۰	۴۰	۰	۰	۰	۰	۱	۴	۱۰
شاهد (و)	۱۰	۴۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۲/۵

جدول ۳. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف مربوط به تأثیر کافئین و باکتری روی لاروهای سن سوم

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مجموع مربعات	F - محاسبه شده
تیمار	۵	۹۵۷۶/۸۵۳	۱۹۱۵/۳۷۱	۹۶/۸۷۵**
خطا	۱۸	۳۵۵/۸۸۸	۳۵۵/۷۷۲	
کل	۲۳			

CV = ۱۲/۸۴

جدول ۴. گروه‌بندی میانگین تیمارهای مربوط به تأثیر کافئین و باکتری روی لاروهای سن سوم

تیمار	و	ه	الف	ب	ج	د
میانگین	۵/۸۸۳ ^f	۱۸/۴۳ ^e	۲۶/۵۶ ^d	۳۹/۲۳ ^c	۵۳/۷۸ ^b	۶۳/۸ ^a

می‌تواند در این خصوصیت شیمیایی مواد آکالوئید پورین نهفته باشد (۳). هم‌چنین این ماده باعث تسریع در ظهور مرگ و میر لاروها می‌شود. در این بررسی درحالی که غلظت ۶۱۸ پی پی ام باکتری در مدت ۶ روز ۲۰ درصد تلفات را در لاروهای سن سوم سوسک کلرادو ایجاد کرد مخلوط همین غلظت از باکتری با کافئین ۴۰۰۰ پی پی ام در همان مدت ۸۰ درصد تلفات را در لاروهای مذکور ایجاد نمود. همان طوری که در جدول ۲ دیده شد. تلفات حاصل ۴ مرتبه بیشتر از باکتری خالص می‌باشد. میران تلفات تیمارهای شاهد و محلول ۴۰۰۰ پی پی ام کافئین به تنهایی در همین مدت هر کدام به ترتیب ۲/۵ و ۱۰ درصد بود یعنی تلفات حاصل از مخلوط فوق بیش از ۲/۵ برابر دو تیمار باکتری خالص و کافئین خالص بود روند مرگ و میر لاروها

همان‌طوری که دیده می‌شود همه تیمارها از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند. تیمارهای دارای کافئین نسبت به تیمار *B.t.* دارای اختلاف معنی‌دار هستند و در ایجاد تلفات بیشتر مؤثر بودند و تیمار (د) که کافئین با غلظت ۴۰۰۰ پی پی ام می‌باشد بیشترین تأثیر را داشته و از سایر تیمارها مؤثرتر بوده و با آنها اختلاف معنی‌دار دارد. کافئین یک متابولیت ثانویه گیاهی از ترکیبات متیل‌گزنانتین واز دسته آکالوئیدهای پورین و دارای خاصیت قلیایی می‌باشد (۳ و ۵) قلیائیت بالا حلالیت دلتا اندوتوکسین باکتری را در روده میانی حشره افزایش می‌دهد (۱۵ و ۱۶). نتایج به دست آمده از این پژوهش نیز مؤید این موضوع است به طوری که در جدول ۲ دیده شد در مدت ۴۸ ساعت تلفات لاروی افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد و این پدیده

چریش تغذیه نمایند موفق به پوست اندازی نشده و از بین می‌روند (۲۱). در یک بررسی انجام شده روی عصاره‌های آبی و الکلی چریش در اختلاط با تورساید یک فرمولاسیون تجاری از *B.t.* هر دو به میزان قابل توجهی باعث افزایش کارایی باکتری گردیدند (۱۲). نتایج حاصل از این پژوهش نیز مؤید این موضوع بود به طوری که عصاره آبی حاصل از مغز دانه چریش به غلظت ۳۵۰۰۰ پی پی ام در اختلاط با غلظت ۶۱۸ پی پی ام باکتری اثر سینرژیستی بالایی نشان داد. در این بررسی در حالی که این غلظت باکتری در مدت ۶ روز ۲۲/۵ درصد تلفات را در لاروهای سن سوم سوسک کلرادو ایجاد کرد مخلوط همین غلظت از باکتری با عصاره آبی حاصل از چریش (۳۵۰۰۰ پی پی ام) در همان مدت، ۷۷/۵ درصد تلفات را در لاروهای مزبور ایجاد نمود. میزان تلفات تیمارهای شاهد و محلول ۳۵۰۰۰ پی پی ام چریش به تنهایی در همان مدت زمان هر کدام به ترتیب ۲/۵ و ۲۵ درصد بود. همان طوری که در جدول ۵ مشاهده شد حداکثر تلفات در ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از تیمار کردن یعنی هنگام تغییر جلد لاروها دیده می‌شود و به دلیل عدم توانایی در تغییر جلد فشار مضاعفی بر حشره وارد می‌گردد و سبب افزایش تأثیرگذاری باکتری به علت ضعیف شدن و ناتوانی لاروها در نتیجه اختلالات فیزیولوژیکی می‌شود (۲۱). در این بررسی روند تلفات تا ۱۴۴ ساعت ادامه داشت و بروز حالت سینرژیسم در تمام تیمارهای حاوی چریش مشاهده گردید.

۴. بررسی اثر تشدیدکننده‌ها روی وزن لارو

طی بررسی انجام شده در پژوهش حاضر، کافئین و چریش رشد و نمو حشره را به تأخیر می‌اندازد و در لاروهای زنده تحت تیمار این ترکیبات، در مقایسه با تیمار شاهد افزایش وزن اندکی مشاهده می‌شود. جدول ۸ نتایج به دست آمده از تأثیر تیمارهای مختلف روی وزن لاروهای تغذیه کرده از آنها را پس از ۱۲۰ ساعت نشان می‌دهد. همان طوری که دیده می‌شود هر دو ماده با اطمینان ۹۵ درصد

بعد از ۴۸ ساعت همچنان ادامه یافته و در ۱۴۴ ساعت ثابت ماند. موریس و همکاران (۱۵) اثر سینرژیستی تعدادی از ترکیبات متیل‌گزانترین از جمله کافئین را در اختلاط با Dipel که یک فرمولاسیون تجاری از *B.t.* است روی *Mamestra configurata* گزارش کردند و ناتانسون (۱۵) نیز اثر سینرژیستی کافئین را روی *Manduca sexta* گزارش نموده است. در پژوهش حاضر نیز کافئین به عنوان یک ماده متیل‌گزانترین علاوه بر تسریع در ظهور تلفات سبب بروز اثر سینرژیستی بالا در اختلاط با باکتری گردید.

۳. بررسی تأثیر توأم باکتری و عصاره آبی چریش روی لارو

سن سوم

نتایج به دست آمده از تأثیر تیمارهای مختلف روی لارو سن سوم در جدول ۵ ارائه شده است. با بررسی این جدول مشخص می‌شود که در تیمارهای دارای مخلوط باکتری و چریش تلفات به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های تبدیل شده به $\text{Arcsin}\sqrt{x}$ بعد از ۱۴۴ ساعت در جدول ۶ ارائه شده است. این نتایج نشان می‌دهد که در سطح اطمینان ۹۹ درصد بین تیمارها از نظر آماری تفاوت معنی‌دار وجود دارد.

برای گروه‌بندی میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد که نتیجه آن در جدول ۷ ارائه شده است.

تیمارهایی که دارای حروف مشابه‌اند از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند. جدول ۷ نشان می‌دهد که تیمارهای دارای چریش نسبت به تیمار *B.t.* دارای اختلاف معنی‌دار هستند و در ایجاد تلفات، بیشتر مؤثر بوده‌اند و تیمار (د) که غلظت ۳۵۰۰۰ پی پی ام چریش می‌باشد بیشترین تأثیر را داشته است. با توجه به نتایج جدول ۵ مشاهده می‌شود که به دلیل تغییر جلد لاروها حداکثر تلفات در ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تیمار حادث می‌شود و تا ۱۴۴ ساعت ادامه دارد. طبق بررسی‌های صورت گرفته لاروهایی که از مواد آلوده به

جدول ۵. روند تلفات لاروهای سن سوم با تغذیه از باکتری مخلوط با چریش در زمان‌های مختلف

تیمار	تعداد لارو		تلفات در زمان (ساعت)						درصد تلفات
	تکرار	کل	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰	۱۴۴	
Bt. (الف)	۱۰	۴۰	۰	۱	۴	۶	۸	۹	۲۲/۵
B.t.+ neem(۱۵۰۰۰ ppm)(ب)	۱۰	۴۰	۰	۲	۵	۱۱	۱۵	۱۶	۴۰
B.t.+ neem(۲۵۰۰۰ ppm)(ج)	۱۰	۴۰	۰	۳	۸	۱۶	۱۹	۲۲	۵۵
B.t.+ neem(۳۵۰۰۰ ppm)(د)	۱۰	۴۰	۰	۵	۱۳	۲۳	۲۸	۳۱	۷۷/۵
neem(۳۵۰۰۰ ppm)(ه)	۱۰	۴۰	۰	۰	۱	۶	۹	۱۰	۲۵
شاهد (و)	۱۰	۴۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۲/۵

جدول ۶. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف مربوط به تأثیر چریش و باکتری روی لاروهای سن سوم

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مجموع مربعات	F - محاسبه شده
تیمار	۵	۷۲۷۱/۶۶۲	۱۴۵۴/۳۳۲	۷۴/۰۸۱**
خطا	۱۸	۳۵۳/۳۷۱	۱۹/۶۳۲	
کل	۲۳			

$$CV = \% ۱۲/۴۹$$

جدول ۷. گروه بندی میانگین تیمارهای مربوط به تأثیر چریش و باکتری روی لاروهای سن سوم

تیمار	و	الف	ه	ب	ج	د
میانگین	۵/۸۸۳ ^f	۲۸/۲۲ ^d	۲۹/۸۸ ^d	۳۹/۲۳ ^c	۴۷/۸۹ ^b	۶۰/۴۴ ^a

جدول ۸. نتایج حاصل از تأثیر تیمارهای کافئین و چریش روی وزن لاروها با تغذیه از غذای حاوی آنها پس از ۱۲۰ ساعت

تیمار	تعداد	درجه آزادی	$\bar{x} \pm SE$ شاهد	$\bar{x} \pm SE$ تیمار	T - محاسبه شده	T - جدول
کافئین	۲۸	۲۷	۰/۰۸۲±۰/۰۰۷	۰/۰۳۴±۰/۰۰۵	۴۳/۳۵۱۸	۲/۰۴۸
چریش	۲۴	۲۳	۰/۰۸۳±۰/۰۰۸	۰/۰۳۸±۰/۰۰۸	۳۷/۳۲۷	۲/۰۶۹

کافئین یک ماده طبیعی است که در مقادیر بسیار بالا از قهوه و چای به دست می‌آید بنابراین تولید آن ارزان است (۳) و می‌توان آن را از ضایعات چای کارخانجات تولید کننده این فرآورده استخراج نمود. چریش نیز گیاهی است که در کشور ما در نواحی گرم و جنوب مانند بندرعباس، چاه بهار و میناب می‌روید. این مواد به عنوان ترکیبات گیاهی قابل دسترس و ارزان می‌توانند به صورت یک تشدیدکننده مؤثر و کارآمد در

باعث کاهش معنی‌دار وزن لاروها می‌شوند. نتیجه حاصل در مورد کافئین با نتایج موریس و همکاران (۱۵) که عصاره‌های چای و قهوه و مشتقات آنها از قبیل ترکیبات متیل گزانتین را به عنوان بازدارنده تغذیه معرفی کرده بودند مطابقت دارد. هم‌چنین نتایج این بررسی در مورد خاصیت ضدتغذیه‌ای آزادیراختین موجود در چریش با نتایج شوماتر (۲۱) مطابقت دارد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین محترم دانشکده کشاورزی و پرسنل گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ارومیه به خاطر فراهم آوردن امکانات لازم برای انجام این تحقیق و نظریات ارزنده جناب آقای دکتر شایسته و جناب آقای دکتر ارومچی تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

اختلاط با باکتری به کار برده شوند که علاوه بر کاهش تغذیه و خسارت وارده به شاخ و برگ، سبب افزایش کارایی باکتری شده و مقدار مصرف آن را نیز تا حد قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد که از نظر اقتصادی با توجه به قیمت باکتری حائز اهمیت است.

منابع مورد استفاده

۱. ارومچی، س. ۱۳۷۴. کنترل آفات در مزرعه و انبار با حشره‌کش طبیعی از چریش. انتشارات مدیریت آموزش و ترویج سازمان کشاورزی. استان آذربایجان غربی، صفحه ۴-۱۴.
۲. جعفری، ک. ۱۳۷۶. درون یک فنجان چای دلنشین چیست؟ زیتون ۱۳۳: ۲۲-۲۵.
۳. رحمانی، ف. ۱۳۷۹. بررسی آثار آللوپاتیکی کافئین و مکانسیم‌های آن بر جوانه‌زنی دانه و رشد گیاهیچه ذرت. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه.
۴. زرنگار، ع. ۱۳۷۴. امکان مبارزه فیزیولوژیکی با سن گندم (*Eurygaster integriceps* Put). پایان نامه کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
۵. صمصام شریعت، ه. ۱۳۶۸. تجزیه شناسایی مواد دارویی گیاهی به روش میکروسکوپی و کروماتوگرافی. انتشارات مشعل، تهران.
۶. کاظمی، م. ح. و ژ. اردبیلی. ۱۳۷۹. بررسی وضعیت بیواکولوژیک سوسک کلرادو (*Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col. Chrysomelidae) از سال ۱۳۶۳ تا ۱۳۶۹ در منطقه اردبیل. دانش کشاورزی ۹: ۴۱-۵۶.
7. Bernays, E. A., D. Chamberlain and P. McCarthy. 1980. The differential effects of ingested tannic acid on different species of acridoidea. *Entomol. Exp. Appl.* 128:158-166.
8. Clark, W. G., D. C., Brater and A. R. Johnson. 1999. *Medical Pharmacology*. Appleton and Lange Pub., U.S.A.
9. Cunniff, P. 1998. *Official Methods of Analysis of AoAc International*. 16th ed., AoAc International Pub., Florida, American.
10. Ferro, D. N. and R. Lopez. 1995. Larviposition response of *Myiopharus doryphora* to Colorado potato larvae treated with lethal and sublethal doses of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *tenebrionis*. *J. Econ. Entomol.* 88 (4): 870-874.
11. Gould, F., A. Anderson, A. Reynolds, L. Bumgartner and W. Moar. 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 88(6): 1554-1559.
12. Jacobson, M. 1990. Review of neem research in the United States. *In: J. C. Locke and R. H. Lawson* (Eds.), *Proceedings of a Workshop on Neem's Potential in Pest Management Programmes*, CRC Press Inc., Maryland, American.
13. Matsumura, F. 1985. *Toxicology of Insecticides*. 2nd ed., Plenum Press Pub., New York.
14. Morris, O. N., M. Tottier, N. B., Mc Laughlin and V. Converse. 1994. Interaction of caffeine and related compounds with *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in bertha armyworm. *J. Econ. Entomol.* 87(3): 610-617.
15. Morris, O. N., V. Converse and P. Kanagrathnam. 1995. Chemical additive effects on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against *Mamestra configurata*. *J. Econ. Entomol.* 88(3): 815-824.
16. Pawinska, M. 1992. *The Use of Novodor FC in Mixture With Fungicides and Insecticides Against Colorado Potato Beetle*. CAB Int. Press, London.
17. Pedigo, L. P. 1999. *Entomology and Pest Management*. 3rd ed., Prentice Hall. N. J. U.S.A. 691PP.
18. Priest, F. and B. Austin. 1993. *Modern Bacteria Taxonomy*. 2nd ed., Chapman and Hall, London. 228p.
19. Rizvi, S.J.H. and V. Rizvi. 1992. *Allelopathy: Basic and Aspects*. 1st Ed., Chapman and Hall, London.
20. Robertson, J.L. and H.K. Preisler. 1992. *Pesticide Bioassays with Arthropods*. CRC Press, London.

21. Schmutterer, H. 1990. Future tasks of neem research in relation to agricultural needs world. *In*: J.C. Locke and R.H. Lawson. (Eds.), Proceedings of a Workshop on Neem's Potential in Pest Management Programmes. USDA-ARS, Beltsville, MD. ARS-86.15-27.
22. Zehnder, G. W. and W. D. Gelernter. 1989. Activity of the M-ONE formulation of a new strain of *Bacillus thuringiensis* against the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): relationship between susceptibility and insect life stage. *J. Econ. Entomol.* 82(3): 756-761.