

قارچ های بیمارگر حشرات گزیننه ای در کنترل

پسیل آسیایی مرکبات (*Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae)

هانا حاجی اللهوردی پور *

موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، بخش تحقیقات حشره شناسی، تهران، ایران

چکیده

پسیل آسیایی مرکبات *Diaphorina citri* Kuwayama، ناقل باکتری *Candidatus Liberibacter asiaticus* عامل بیماری گرینینگ مرکبات است. جمعیت این ناقل در سال های اخیر در کشورمان به شدت افزایش یافته است. از عواملی که ممکن است توانایی کاهش جمعیت این ناقل را داشته باشند، قارچ های بیمارگر حشرات هستند. به منظور برآورد اثر این عوامل روی حشرات کامل پسیل و تعیین رابطه بین سطح آلودگی به قارچ و میزان مرگ و میر در آزمایشگاه، دو جدایه DEMI 002 (*Metarrhizium anisoplia*) و DEPI 002 (*Isaria tenuipes*) بررسی شدند. چهار تکه برگ با هم در یک پتری دیش قرار گرفتند و روی یک، دو، سه یا هر چهار تکه برگ، سوسپانسیون قارچی با غلظت 7×10^5 کنیدی در میلی لیتر پاشیده شد و دو عدد حشره کامل پسیل در پتری دیش ها رها شدند. پس از پنج روز جدایه DEMI 002 و DEPI 002 به ترتیب ۷۱٪ و ۲۹٪ مرگ و میر ایجاد کردند و جدایه *Metarrhizium* مؤثرتر از جدایه *Isaria* بود اما تفاوت در سطوح آلوده به قارچ، اختلاف معنی داری در مرگ و میر نشان نداد که می توان آن را به انتقال افقی قارچ توسط پسیل نسبت داد. کاربرد قارچ های بیمارگر در مقادیر پایین همراه با سایر روش های کنترل، راهبردی مناسب در مدیریت تلفیقی پسیل آسیایی مرکبات است.

واژه های کلیدی: بیماری گرینینگ مرکبات، *Isaria tenuipes*، *Metarrhizium anisopliae*

مرگ و میر

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: allahverdi@iripp.ir

مقدمه

بیماری گرینینگ (میوه سبز) مرکبات که عامل آن باکتری *Candidatus Liberibacter asiaticus* است در کشور توسط پسیل آسیایی مرکبات *Diaphorina citri* Kuwayama انتقال می‌یابد. جمعیت حشره ناقل در سال‌های اخیر در کشورمان به شدت افزایش یافته است که قادر است این بیماری را به خسارت‌زا ترین بیماری درختان مرکبات در ایران تبدیل کند. در مناطق شیوع بیماری، درختان مرکبات پس از چند سال از بین می‌روند.

به‌محض آلوده‌شدن درخت به عامل بیمارگر، درمانی برای آن وجود ندارد و درختان آلوده اگر زنده بمانند می‌توانند منبع آلودگی برای گیاهان دیگر باشند. میوه‌های روی درخت کوچک، سخت، کم‌آب و با طعم تلخ هستند و رنگ غیر یکنواخت دارند (Culbert, 2005). کنترل در اغلب کشورها با حذف درختان آلوده و تیمار پسیل‌ها با حشره‌کش‌ها انجام می‌شود.

ثابت شده است مدیریت ناقل کارا ترین روش کنترل بیماری است (Brlansky et al., 2012). امروزه کنترل زیستی به جزء کلیدی حفاظت محصول در سرتاسر جهان تبدیل شده است. در میان عوامل کنترل زیستی آفت، با توجه به آلودگی طبیعی پسیل مرکبات به قارچ‌ها در باغات و اثبات تأثیر آنها روی دامنه وسیعی از آفات مرکبات و سازگاری با سایر بندپایان غیر هدف، قارچ‌های بیمارگر حشرات در مدیریت پسیل از اولویت برخوردارند. این قارچ‌ها به آسانی فرموله می‌شوند، هیچ باقیمانده مضرى به جای نمی‌گذارند و احتمال بروز مقاومت نسبت به آن‌ها خیلی کم است (Ibrahim et al., 2011).

مشخص شده که قارچ‌های بیمارگر حشرات عوامل مرگ و میر مهمی برای *D. citri* هستند. مرگ و میر حشرات کامل پسیل با *Isaria fumosoroseus* $4/9 \pm 0/21$ تا $6/1 \pm 0/37$ روز به دنبال پاشش قارچ مشاهده شد (Avery et al., 2009).

در ارزیابی بیمارگری تعدادی از قارچ‌ها، *Cordyceps bassiana*، *Metarrhizium* *I. fumosoroseus* و *Lecanicillium longisporum*، *Hirsutella thompsonii*، *anisopliae* روی پسیل بیمارگر بودند و جدایه Eslaq-PL63 (*C. bassiana*) بیمارگرترین بود که 72% مرگ و میر را ۷ روز پس از آلوده‌سازی ایجاد کرد (Padulla et al., 2009).

جستجوی عوامل کنترل زیستی پسیل آسیایی مرکبات منتج به جداسازی جدایه‌هایی از *C. bassiana* و *M. anisopliae* گردید که آفت‌کش زیستی براساس یکی از جدایه‌های *M. anisopliae* بیشترین تأثیر را داشت (Loc et al., 2010).

در پژوهش دیگری، تأثیر یک جدایه از *Metarrhizium* و سه جدایه از *Isaria* در آزمایشگاه برعلیه پسیل آسیایی مرکبات ارزیابی شد. جدایه Pf21 از *Isaria* با ایجاد مرگ و میر $90/72\%$ به عنوان بهترین جدایه شناسایی شد و $72/82\%$ مرگ و میر برای جدایه‌ای از *Metarrhizium* (Ma59) ثبت شد (Mellin-Rosas et al., 2011).

در اندونزی سوسپانسیون اسپوره های جدایه ای از *I. fumosoroseus* روی گیاهچه های مرکبات پاشیده شد و روی آنها حشرات کامل پسیل گذاشته شد. درصد آلودگی بعد از ۶ روز، بین ۱۰ تا ۵۵/۶٪ متغیر بود (Subandiyah et al., 2000).

در مطالعه ای روی جدایه *Ifr* AsCP از *I. fumosoroseus*، مقدار LC_{50} $10^5 \times 6/8$ کنیدی در میلی لیتر به دست آمد که نمایانگر تأثیر خوب و نسبتاً سریع جدایه مذکور روی حشرات کامل پسیل است (Hoy et al., 2010). حشرات کامل پسیل آسیایی مرکبات ۷۲ ساعت بعد از آلودگی توسط جدایه ای از *I. fumosoroseus* (*Pfr* AsCP) در آزمایشگاه از بین رفتند (Meyer et al., 2007).

با توجه به اینکه پسیل آسیایی مرکبات بیشتر روی شاخه و برگ درختان فعالیت دارد، به منظور کنترل آن، پاشش مایه تلقیح قارچی در این قسمت ها منطقی به نظر می رسد. روشن ساختن این مساله که آیا قسمت اعظم تاج درخت باید به سوسپانسیون قارچی آغشته شود یا پسیل ها از طریق انتقال افقی قارچ هم می توانند آلوده شوند یکی از اهداف این پژوهش است.

مواد و روش ها

در مرحله اول به منظور پرورش پسیل آسیایی مرکبات، حشرات کامل، پوره ها و تخم های پسیل از باغات مرکبات ارزوئیه کرمان جمع آوری شدند. مدت کوتاهی بعد از انتقال پسیل ها روی پایه های بذری لیموترش رقم Mexican lime در اتاقک رشد (۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰-۶۰٪) جمعیت بالایی از آنها برای انجام زیست سنجی فراهم شد. علاوه بر مقایسه زهرآگینی قارچ های بیمارگر، تأثیر میزان پوشش برگها توسط سوسپانسیون قارچی روی مرگ و میر پسیل ها، مورد مطالعه قرار گرفت. دو جدایه قارچی DEMI 002 (*M. anisopliae*) و DEPI 002 (*I. tenuipes*) موجود در کلکسیون قارچ های بیمارگر حشرات بخش تحقیقات حشره شناسی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور (جدول ۱)، روی حشرات کامل پسیل در آزمایشگاه اثر داده شدند.

جدول ۱- مشخصات جدایه های مورد آزمایش

Table 1. Characteristics of isolates used in the experiments

Species	Isolate Code	Host	Region of collection
<i>Metarhizium anisopliae</i>	DEMI 002	<i>Parandra</i> sp.	Mazandaran
<i>Isaria tenuipes</i>	DEPI 002	<i>Lymantria dispar</i>	Golestan

کنیدی های هوایی جدایه ها از پلیت های SDA استحصال گردید. برای مقایسه مرگ و میر ایجاد شده توسط قارچ ها از روش زیست سنجی برگ های بریده استفاده شد که چهار تکه برگ

(به طور تقریبی با عرض ۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۲ سانتی‌متر) با هم در یک ظرف پتری به شکل بعلاوه (+) به‌گونه‌ای که نوک تیز برگ‌ها به سمت مرکز پتری باشد، قرار گرفتند. در کف ظرف‌های پتری کاغذ صافی مرطوب شده با آب مقطر استریل قرار گرفت. سوسپانسیون از کنیدی‌های هوایی این قارچ‌ها با آب مقطر استریل حاوی Tween 80® ۰/۰۵٪ در غلظت 7×10^5 کنیدی در میلی‌لیتر روی یک تا چهار تکه برگ تا حدی که سوسپانسیون از سطح برگ روان نشود، پاشیده شد. اجازه داده شد تا سوسپانسیون کنیدی‌ها روی سطح برگ‌ها خشک شود و دو عدد حشره کامل پسپیل در ظرف‌های پتری رها شدند. هدف از قرار دادن فقط دو عدد حشره کامل در هر پتری، به حداقل رساندن اثر انتقال افقی قارچ توسط حشره کامل پسپیل بود که در منابع به آن اشاره شده است (Avery et al., 2009). در تیمار شاهد روی هر ۴ تکه برگ فقط مخلوط آب مقطر و توئین ۸۰، ۰/۰۵٪ پاشیده شد. پتری‌ها با پارافیلیم پوشانده و در درجه حرارت 27 ± 1 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵٪ (شرایط مشابه با پرورش پسپیل‌ها) نگهداری شدند. برای هر جدایه ۴ تیمار (تعداد تکه‌های برگ واجد سوسپانسیون) و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

طرح آزمایشی به‌صورت کاملاً تصادفی و در قالب فاکتوریل با دو فاکتور جدایه‌های قارچی و سطح آلوده به آنها اجرا شد. پایش حشرات کامل یک روز بعد از تیمار انجام گرفت و به فاصله زمانی یک روز تکرار شد. داده‌های حاصله از زیست‌سنجی توسط نرم‌افزار SAS نسخه 9.1. آنالیز گردید (ANOVA).

نتایج و بحث

جدایه‌های موردآزمایش طبق اصول کخ روی حشرات کامل پسپیل بیمارگر بودند (شکل ۱). دو روز بعد از آزمایش، همه پسپیل‌ها زنده بودند و مرگ و میر از روز سوم آغاز گردید. ۵ روز بعد از تیمار، DEMI 002 و DEPI 002 به ترتیب $0/097 \pm 0/071$ ٪ و $0/074 \pm 0/029$ ٪ مرگ و میر ایجاد کردند (شکل ۲) و DEMI 002 تأثیر بیشتری (اختلاف معنی‌دار) نسبت به DEPI 002 در سطوح مختلف پوشش قارچی داشت. نتایج آزمایش تأثیر خوب جدایه قارچ *Metarrhizium* را در شرایط آزمایشگاهی روی پسپیل آسیایی مرکبات نشان داد و جدایه قارچ *Metarrhizium* کشندگی بیشتری نسبت به *Isaria* داشت ($P < 0/001$, $df = 1$, $F = 19/70$) مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون T در سطح ۱٪ انجام گرفت.

اختلاف معنی‌داری بین سطوح متفاوت آلودگی به یک جدایه خاص (تعداد برگ‌های واجد سوسپانسیون) وجود نداشت ($P > 0/001$, $df = 3$, $F = 0/54$). این موضوع نشان می‌دهد میزان سطح آلوده به سوسپانسیون تأثیری روی میزان مرگ و میر ندارد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی در سطح ۱٪ انجام گرفت (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین (\pm SE) مرگومیر حشرات کامل پسیل در تکه های مختلف برگ آغشته به سوسپانسیون قارچ

Table 2. Mean of mortality (\pm SE) for adult psyllids on different number of sprayed leaf sections

Mean of mortality	Treatment
^a 0.17 \pm 33	1 leaf section sprayed
^a 0.20 \pm 58	2 leaf sections sprayed
^a 0.15 \pm 42	3 leaf sections sprayed
^a 0.15 \pm 58	4 leaf sections sprayed

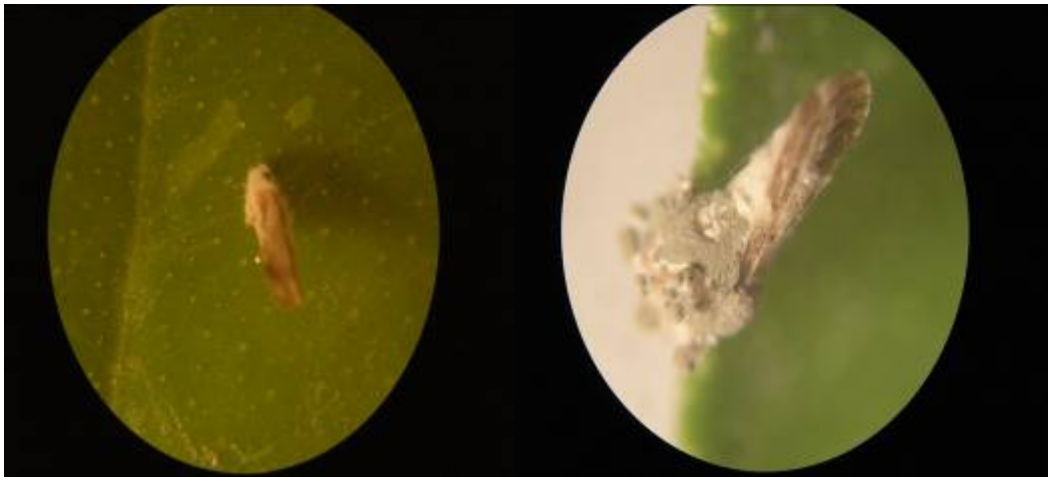
^aMeans followed by similar letters were not significantly different at 1% level (using Tukey's test)

مرگ و میر حشرات کامل از روز سوم بعد از آلودگی شروع گردید در حالی که در فرآورده فرموله شده *I. fumosoroseus* $6/1 \pm 0/37$ - $4/9 \pm 0/21$ روز پس از آلودگی مرگ و میر شروع می گردید (Avery et al., 2009).

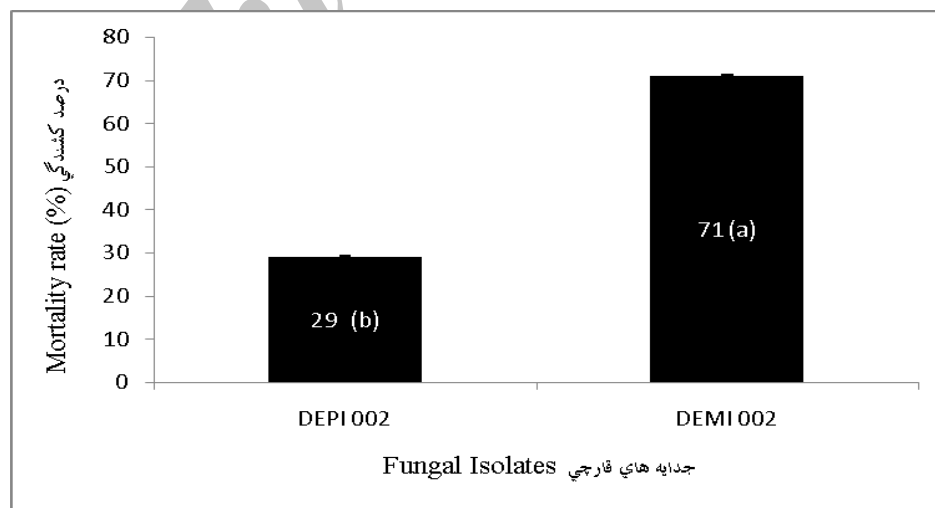
مقایسه نتایج مطالعات انجام شده در داخل و خارج از کشور در مورد کاربرد قارچ های بیمارگر حشرات برای پسیل آسیایی مرکبات نشان می دهد که با توجه به گوناگونی جدایه ها و شرایط آزمایش، نتایج یکنواخت نیستند و نمی توان یک اصل کلی از آنها استنباط کرد. بعضی مطالعات گونه های *Isaria* را نسبت به *Metarrhizium* مؤثرتر نشان می دهند اما در بررسی های دیگر تأثیر گونه های *Isaria* روی پسیل مرکبات بیشتر از *Metarrhizium* است. با در نظر گرفتن این پراکندگی و عدم یکنواختی نتایج، می توان اینطور نتیجه گیری کرد که در هر منطقه و موقعیتی باید جدایه مناسب آن شرایط را انتخاب و تولید انبوه نمود و به کار برد. به طور کلی نتایج این پژوهش، پتانسیل کاربرد قارچ های بیمارگر را نشان می دهد و به نظر می رسد به همراه سایر روش های کنترل مانند استفاده از سموم جدید و کم خطر، کارت های زرد، کائولن، روغن ها و ... گزینه ای ثمربخش در مدیریت تلفیقی پسیل آسیایی مرکبات باشد.

می توان تأثیر انتقال افقی قارچ توسط حشرات کامل را در مشابه بودن مرگ و میر در سطوح متفاوت آلودگی به قارچ مشاهده کرد طوری که پاشش سوسپانسیون روی ۴ تکه برگ تفاوت معنی داری در مرگ و میر، نسبت به پاشش روی یک تکه برگ ایجاد نکرد. این نکته که سطح پوشش برگ ها توسط سوسپانسیون تأثیر معنی داری روی مرگ و میر پسیل ها نداشت همچنین می تواند بیانگر این مساله باشد که با استفاده از تکنیک پخش مایه تلقیح قارچی توسط پسیل و یا کاربرد سوسپانسیون قارچی روی کارت های زرد به منظور جلب پسیل و آلوده ساختن آن، مقادیر کم مایه تلقیح قارچی نیز برای کنترل پسیل کافی است و احتیاجی به پوشش کامل تاج درختان با سوسپانسیون نیست. (Avery et al., 2009) نیز اظهار می دارند تأثیر نرخ کلونی شدن بلاستوسپوره های *I. fumosoroseus* تولید شده در محیط کشت مایع روی حشرات کامل درون پتری های حاوی تکه های برگ تیمار نشده و یک کارت زرد تیمار شده در القا مرگ و میر به اندازه پتری دیش های واجد یک تکه برگ تیمار شده ۸ روز بعد از کاربرد است. در پتری های با یک تکه برگ تیمار شده منفرد، حشرات کامل با بلاستوسپوره های

قارچ تماس پیدا می‌کنند و آنها را به برگ‌های تیمار نشده انتقال می‌دهند. پدیده مشابهی از آلودگی پسیل‌ها و پخش بعدی قارچ به برگ‌های تیمار نشده زمانی که پسیل‌ها درون پتری‌هایی با یک کارت زرد تیمار شده قرار گرفتند، مشاهده شد.



شکل ۱- پسیل‌های آلوده شده به *M. anisopliae* (DEMI 002) (راست) و *I. tenuipes* (DEPI 002) (چپ)
Figure 1. Infected psyllids by *I. tenuipes* (DEPI 002) (Left) and *M. anisopliae* (DEMI 002) (Right)



شکل ۲- مقایسه زهرآگینی دو جدایه‌ی قارچی روی پسیل آسیایی مرکبات
Figure 2. Comparison of virulence of two fungal isolates to Asian citrus psyllid

Means with different letter are significantly different at 1% level (using T test)

سیاسگزاری

این پژوهش با استفاده از امکانات موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور در بخش تحقیقات حشره‌شناسی کشاورزی انجام شده است که نویسنده مقاله از موسسه مذکور نهایت تقدیر و تشکر را می‌نماید.

منابع

- Avery, P.B., Hunter, W.B., Hall, D.G., Jackson, M.A., Powell, C.A. & Rogers, M.E. 2009. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) infection and dissemination of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitacea) under laboratory conditions. *Florida Entomologist*, 92(4): 608-618.
- Brlansky, R.H., Rogers, M.E., Stansly, P.A., Timmer, L.W. & Baut, G. 2012. Citrus greening (Huanglongbing) disease identification and management. Citrus Research and Education Centre, IFAS, University of Florida. Available online from URL: <http://www.epi.ufl.edu/?q=node/21> (accessed 1 August 2012)
- Culbert, D. 2005. Citrus greening—Another threat to agriculture. IFAS Extension, University of Florida. Available from URL: <http://okeechobee.ifas.ufl.edu/News%20columns/Citrus%20Greening%20Disease.htm> (accessed 1 August 2012)
- Hoy, M.A., Singh, R. & Rogers, M.E. 2010. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*, 93(1): 24-32.
- Ibrahim, L., Hamieh, A., Ghanem, H. & Ibrahim, S.K. 2011. Pathogenicity of entomopathogenic fungi from Lebanese soils against aphids, whitefly & non-target beneficial insects. *International Journal of Agriculture Sciences*, 3(3): 156-164.
- Koupi, N. 2010. Laboratory study of entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera, Thripidae). M.Sc. Thesis, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Iran.
- Lezama-Gutiérrez, R., Molina-Ochoa, J., Chávez-Flores, O., Ángel-Sahagún, C.A., Skoda, S.R., Reyes-Martínez, G., Barba-Reynoso, M., Rebolledo-Domínguez, O., Ruíz-Aguilar, G.M.L. & Foster, J.E. 2012. Use of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Cordyceps bassiana* and *Isaria fumosorosea* to control *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Persian lime under field conditions. *International Journal of Tropical Insect Science*, 32 (1): 39-44.
- Loc, N.T., Chi, V.T.B., Nhan, N.T., Hong, T.T.B., Chi, N.T.P. & Nghia, N.T. 2010. Exploitation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as potential biocontrol agents in integrated pest management (IPM) on citrus. *Omonrice*, 17: 152-163.
- Mellin-Rosas, M.A., Hernandez-Betancourt, I., Nunez-Camargo, M.C. & Arredondo-Bernal, H.C. 2011. Entomopathogenic fungi effectiveness in control citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Colima. *Proceedings of 2 Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psilido Asiatico de los Citricos y el Huanglongbing en Mexico*, pp. 367, 2011.
- Meyer, J., Hoy, M., Hall, D. & Boucias, D. 2007. Entomopathogenic fungi infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), in Florida. Society of

- Invertebrate Pathology. Available online from URL: http://www.floridagrower.net/forging Ahead/200051121_psyllid.html (accessed 27 February 2010)
- Nikpour, N. 2008. Study the effect of some *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates on onion thrips, *Thrips tabaci* under laboratory condition. M.Sc. Thesis, College of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Iran.
- Padulla, L.F.L. & Alves, S.B. 2009. Susceptibility of *Diaphorina citri* nymphs to entomopathogenic fungi. *Comunicaca Cientifica*, 76 (2): 297-302.
- SAS Institute. 2003. SAS user's guide, version 9.1. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Sedighi, N. 2011. Evaluation of pathogenicity of fungus, *Metarhizium anisopliae* Sorokin on Sunn pest *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae). M.Sc. Thesis, College of Agricultural Sciences, Shahed University, Iran.
- Subandiyah, S., Nikoh, N., Sato, H., Wagiman, F., Tsuyumu, S. & Fukatsu, T. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic fungi attacking *Diaphorina citri* (Homoptera, Psylloidea) in Indonesia. *Mycoscience*, 41: 509-513.

Archive of SID

Entomopathogenic fungi: An alternative in the control of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)

Hana HAJIALLAHVERDIPOUR

Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Entomology Research Department
(Corresponding author, E-mail: allahverdi@iripp.ir)

Abstract

The Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama, is a vector of *Candidatus Liberibacter asiaticus* that causes citrus greening disease. The vector population has increased drastically in our country, in recent years. Entomopathogenic fungi are among those agents which might have the potential to suppress its population. To study the effects of these agents on adult psyllids and the relationship between fungus-sprayed area and mortality, two isolates, DEMI 002 (*Metarrhizium anisopliae*) and DEPI 002 (*Isaria tenuipes*) were investigated in the laboratory. Four leaf sections were placed together in a Petri dish and one to four of them were sprayed by the fungal suspensions at a concentration of 7×10^5 spores/ml and two adult psyllids were released into Petri dishes. Five days after treatment, 'DEMI 002' and 'DEPI 002' caused 71% and 29% mortality, respectively. DEMI 002, an isolate of *Metarrhizium anisopliae*, was significantly more effective than DEPI 002 (*Isaria tenuipes*). However, there was no statistical difference between different leaf area coverage on mortality, showing the horizontal transfer of the fungi among the psyllids. Application of entomopathogenic fungi at low quantities combined with other control techniques is an appropriate option in an IPM approach against *D. citri*.

Key Words: Citrus greening disease, *Metarrhizium anisopliae*, *Isaria tenuipes*, Mortality