تحقیقات آفات گیاهی
۱۲(۳): ۵۷ -۷۰ -۱۴۰۱

علمی پژوهشی

امکان استفاده از برخی جدایه‌های ایرانی قارچ بیمارگر *Akanthomyces* برای کنترل میکروبی شپشک آردآلود پنبه *Phenacoccus solenopsis*

ناهید للری سردارآبادی؛ فاطمه یاراحمدی*، نوشین زندی سوهانی؛ محمدحامد قدوم پاریزی‌پور و علی رجب‌پور

گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، شهرستان باوی، خوزستان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۲۱)

چکیده

شپشک آردآلود پنبه *Phenacoccus solenopsis* Tinsely (Hemiptera: Pseudococcidae) یکی از آفات مهم بسیاری از گیاهان در اکوسیستم‌های کشاورزی و فضاهای سبز شهری می‌باشد. در این مطالعه، امکان به کارگیری سه جدایه ایرانی از قارچ *Akanthomyces lecanii* (جدایه‌های PAL6، PAL7 و PAL8) و یک جدایه ایرانی از گونه *A. muscarius* (جدایه GAM5) در کنترل میکروبی این آفت در شرایط گلخانه‌ای و روی گیاه حسن یوسف (به عنوان میزبان گیاهی شپشک) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، گیاهان آلوده به پنج پوره‌های سن آخر شپشک توسط غلظت‌های مختلف ($۱۰^۴$، $۱۰^۵$، $۱۰^۶$، $۱۰^۷$ و $۱۰^۸$ کنیدی در هر میلی‌لیتر) هر جدایه تیمار شده و میزان مرگ و میر شپشک‌ها تا هشت روز و به صورت روزانه ثبت شد. میزان مرگ و میر از ۱۴/۳ درصد (در جدایه PAL7) تا ۱/۷۹ درصد (در جدایه PAL8) متغیر بود. بیشترین میزان مرگ و میر در غلظت $۱۰^۸$ کنیدی در هر میلی‌لیتر بیمارگرهای مزبور دیده شد. بیشترین مرگ و میر ناشی از بیماری‌زایی جدایه‌ها در روز ششم پس از تیمار ثبت شد. به طور کلی، سوسپانسیون کنیدی جدایه PAL7 قارچ *A. lecanii* با غلظت $۱۰^۸$ کنیدی در هر میلی‌لیتر بهترین گزینه بین بیمارگرهای مورد مطالعه برای کنترل میکروبی شپشک آردآلود پنبه بود که در شش روز پس از تیمار موجب ۵۶/۱۷ درصد مرگ و میر در جمعیت این آفت شد. از نتایج این تحقیق می‌توان برای توسعه کنترل میکروبی شپشک آرد آلود پنبه به ویژه در محیط‌های گلخانه‌ای استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آفات گلخانه‌ای، بیماری‌زایی، کنترل میکروبی، مدیریت تلفیقی آفات

نویسنده مسئول: yarahmadi@asnrukh.ac.ir؛ fa_yarahmadi@yahoo.com

مقدمه

شپشک آردآلود پنبه *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) از آفات جدی محصول پنبه و برخی گیاهان مهم زراعی، باغی و زینتی در مناطق گرمسیری دنیا محسوب می‌شود که اولین بار توسط مقدم و باقری در میناب و بندرعباس از روی درختچه‌های ختمی‌چینی شد (Moghadam and Bagheri, 2010). شپشک آردآلود پنبه در ایران دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و از روی ۲۱۹ گونه میزبان‌های گیاهی متعلق به ۱۵۹ سرده از ۷۰ تیره شامل درختان، درختچه‌ها، گیاهان زراعی و غیر زراعی جمع‌آوری و شناسایی شده است (Mossadegh *et al.*, 2012). این حشره یکی از رایج‌ترین آفات گیاهان زینتی است و از مهم‌ترین آفات گلخانه‌ای نیز به شمار می‌رود که در صورت عدم کنترل در تمام سال فعال است و خسارت شدیدی به محصولات گلخانه‌ای وارد می‌کند. در شرایط آب‌وهوایی مساعد، این حشره در طول سال به شکل‌های مختلف تخم، پوره و حشره کامل دیده می‌شود (Rosdar *et al.*, 2019). خسارت این آفت روی گیاهان زینتی موجود در فضای سبز به‌ویژه در خوزستان به صورتی است که منجر مرگ کامل و قطع درختان و درختچه‌های مورد حمله (در خسارت‌های شدید) شده است (Mossadegh *et al.*, 2012).

با توجه به سرعت رشد جمعیت و خسارات جدی این آفت، سم‌پاشی‌هایی با استفاده از سموم حشره‌کش مختلف، به ویژه سموم سیستمیک، توصیه می‌شود (Nazar *et al.*, 2020). این در حالی است که مطالعات نشان می‌دهد توسعه مقاومت به سموم حشره‌کش شیمیایی از جمله ارگانوفسفره‌ها و پایرتیروئیدها در این آفت به سرعت انجام می‌شود (Saddigh *et al.*, 2014; Nazar *et al.*, 2020) و این سموم اثرات به شدت مخربی روی جمعیت و فعالیت شکارگران و پارازیتوئیدهای این حشره دارند (Sahito *et al.*, 2011). همچنین، کاربرد سموم شیمیایی در محیط‌هایی مانند فضای سبز شهری که محل تردد روزانه شهروندان می‌باشد، می‌تواند تهدید جدی برای سلامت آنها باشد (Rajabpour and Yarahmadi, 2012).

کنترل میکروبی یکی از روش‌های کنترل زیستی آفات کشاورزی است که با اثرات تخریبی کم روی محیط زیست، به عنوان جایگزینی بالقوه برای سموم شیمیایی آفت‌کش شناخته می‌شود (Wraight *et al.*, 2017). قارچ‌های بیمارگر حشرات عمده‌ترین عوامل بیماری‌زای حشرات هستند (Liu *et al.*, 2009). قارچ‌های بیمارگر حشرات برخلاف سایر بیمارگرها نظیر باکتری‌ها و ویروس‌ها که گوارشی بوده و باید حتماً توسط میزبان بلعیده شوند، قادرند به صورت مستقیم در تماس با کوتیکول میزبان‌های خود به بدن آن‌ها نفوذ کنند (Ortiz-Urquiza and Keyhani, 2013). از این رو، قارچ‌ها به عنوان عوامل بیمارگر مؤثر در مهار طیف وسیعی ازآفات زننده-مکنده به‌ویژه در فضاهای بسته و گلخانه شناخته می‌شوند.

از میان گونه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر حشرات، گونه‌های جنس *Akanthomyces* Lebert (Ascomycota: Cordycipitaceae) برای کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی در کشاورزی استفاده می‌شوند (Kirk *et al.*, 2008). در طول سه دهه گذشته، گونه‌ها و جدایه‌های مختلف قارچ‌های این جنس به عنوان یک مدل مفید برای مطالعه تخصص میزبانی و همچنین، یک مدل فعال به عنوان عامل مهار زیستی آفات گیاهی مطرح بوده است (Liu *et al.*, 2003). این جنس پیش‌تر با نام‌های *Verticillium* و *Lecanicillium* شناخته می‌شد، ولی به‌تازگی بر اساس بررسی‌های تبارزایی مولکولی به جنس *Akanthomyces* انتقال یافت (Kepler *et al.*, 2017). جدایه‌های مختلف قارچ‌های این جنس توانایی بیماری‌زای برای بندپایان، نماتدها، گیاهان و قارچ‌ها را دارند. برخی از جدایه‌های این قارچ، به عنوان عوامل کنترل میکروبی توانمند برای مهار جمعیت آفات مکنده به‌ویژه جوربالان شناخته می‌شوند (Broumandnia *et al.*, 2021). اگرچه کارایی این بیمارگر در کاهش جمعیت برخی آفات جوربال نظیر سفیدبالک‌ها (Cuthbertson *et al.*, 2005; Broumandnia *et al.*, 2021) و شته‌ها (Kim *et al.*, 2007; Soltani *et al.*, 2022) گزارش شده است، ولی هیچ مطالعه‌ای در خصوص بیماری‌زایی جدایه‌های این قارچ

روی شپشک آرد آلود پنبه منتشر نشده است. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی اثرات بیماری‌زایی چهار جدایه ایرانی قارچ جنس *Akanthomyces* روی شپشک آرد آلود پنبه در شرایط کنترل‌شده بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش شپشک آردآلود

به‌منظور تشکیل کلنی آزمایشگاهی، ماده‌های کامل شپشک آردآلود پنبه از روی درختچه‌های زینتی ختمی چینی (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) در محوطه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در شهرستان باوی (31°35'45.9"N 48°53'04.7"E) جمع‌آوری شده و برای پرورش به انسکتاریوم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل شد. از غده‌های سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) جوانه‌زده به عنوان میزبان گیاهی برای پرورش شپشک آردآلود پنبه استفاده شد. برای این منظور، غده‌های سیب‌زمینی پس از شستشو و به منظور شکستن دوره خواب و جوانه‌زنی در یخچال در دمای ۵ الی ۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از جوانه زدن برای تغذیه و تولیدمثل در اختیار شپشک‌ها قرار گرفتند. در این حالت، ماده‌های آماده تخم‌ریزی شپشک در کنار جوانه‌های سیب‌زمینی قرارداده شدند تا پس از تخم‌ریزی و ظهور پوره‌های سن یک، این پوره‌ها به روی جوانه‌های سیب‌زمینی منتقل شوند. کلنی شپشک‌ها در ظروف پرورش که درپوش آن‌ها به منظور تهویه با توری مش ریز پوشیده شده بود، قرار داده شد. پس از استقرار و تکثیر کلنی آزمایشگاهی، شپشک‌های آردآلود برای آغاز پژوهش به گلدان‌های گیاه حسن‌یوسف (*Coleus blumei* Benth) منتقل شدند و آلوده‌سازی گلدان‌ها صورت پذیرفت.

جدایه‌های قارچی

از قارچ *A. muscarius* (جدایه GAM5) و قارچ *A. lecanii* (جدایه PAL6، PAL7 و PAL8) که پیش‌تر از روی برخی از آفات جوربال (شته سبز جالیز *Aphis gossypii* Glover و بالشک مرکبات *Pulvinaria aurantii* Cockerell) روی درختان مرکبات در مرکز تحقیقات مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری شهرستان رامسر (استان مازندران) جمع‌آوری و شناسایی شده بود (Broumandnia *et al.*, 2021)، برای انجام آزمایش‌های بیماری‌زایی استفاده شد. کشت این جدایه‌ها در محیط کشت آگار، دکستروز و عصاره سیب‌زمینی (PDA) در انکوباتور (در دمای ۱±۲۳ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) انجام پذیرفت.

سنجش بیماری‌زایی

به منظور بررسی تاثیر جدایه‌های قارچی مورد مطالعه روی مرگ و میر شپشک‌آردآلود پنبه، گیاه آپارتمانی حسن یوسف به عنوان میزبان گیاهی حشرات آفت استفاده شد. برای ایجاد یکنواختی لازم در زمان آزمایش، در این پژوهش ابتدا قلمه‌هایی هم‌اندازه از گیاه حسن‌یوسف تهیه و برای ریشه‌دار شدن، قلمه‌ها به مدت دو تا سه هفته در مخلوط پیت و پرلیت (به نسبت مساوی) قرار داده شد. پس از ریشه‌زایی، هر کدام از بوته‌ها در داخل گلدان‌های پلاستیکی هم‌اندازه (به حجم دو لیتر) با نسبت مناسب از خاک رس، پیت‌موس یا خاک برگ و ماسه شسته شده قرار داده شدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه‌ای، در دمای ۵ ± ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰ ± ۶۵ درصد تا زمان آغاز آزمایش نگهداری شدند. رطوبت مورد نیاز، به‌وسیله دستگاه بخارساز سرد تأمین شد. در این مدت از هرگونه سم‌پاشی و استفاده از آفت‌کش روی گلدان‌ها خودداری شد. بعد از گذشت مدت زمان لازم و رشد کافی قلمه‌ها، گلدان‌ها شماره‌گذاری شده و به گلخانه‌ی مورد نظر برای شروع پژوهش انتقال داده شدند.

تعیین غلظت‌های مختلف قارچ در آزمایش‌های زیست سنجی

برای تهیه مایه تلقیح از کشت‌هایی که در آن‌ها کنیدی‌زایی به طور کامل صورت می‌گیرد (۱۴ تا ۱۶ روز پس از کشت دادن) استفاده شد (Broumandnia and Rajabpour, 2020; Broumandnia *et al.*, 2021). برای تهیه سوسپانسیون، حدود ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر محلول آب مقطر و Tween-80 (۰/۱ درصد)، روی محیط ریخته شده و با استفاده از پیپت پاستور سترون (با نوک خمیده)، سطح

محیط کشت پارو شد تا کنیدیوم‌ها از کنیدیوفور جدا شده و سوسپانسیون اولیه از کنیدی‌ها تشکیل شد. با توجه به احتمال جدا شدن میسلیوم‌های قارچ همراه کنیدی‌ها، سوسپانسیون اولیه از کاغذ صافی سترون عبور داده شده تا جداسازی میسلیوم‌ها از سوسپانسیون تهیه شده صورت پذیرد و سوسپانسیون خالص از کنیدی‌ها به دست آید (Broumandnia *et al.*, 2021). برای تهیه غلظت‌های مختلف از قارچ مورد نظر از لام گلبول شمار (Neubauer HGB) استفاده شد. غلظت کنیدیوم در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون، با استفاده از فرمول زیر تعیین شد (Hayashi *et al.*, 2009):

$$Y=(X\times 50)\times 1000$$

در این فرمول، X تعداد کل کنیدی‌های شمارش‌شده در ۵ مربع بزرگ لام گلبول شمار و Y تعداد کل کنیدی‌ها و تعیین غلظت اصلی سایر غلظت‌ها بر اساس فرمول زیر مشخص شد:

غلظت مورد نظر /غلظت به دست آمده از شمارش = فاکتور رقیق‌کنندگی

از روش تشریح شده توسط برومندنیا و همکاران (Broumandnia *et al.*, 2021) به‌منظور اندازه‌گیری درصد جوانه‌زنی بودن کنیدیوم‌ها، استفاده شد. به صورت خلاصه در این روش، پیش از انجام آزمایش یک قطره سوسپانسیون حاوی کنیدیوم قارچ مورد نظر روی محیط کشت PDA ریخته شد تا در صورتی‌که جوانه‌زنی کنیدی‌ها بیش از ۹۰٪ باشد، آزمایش صورت بپذیرد.

از آزمایش‌های اولیه برای تعیین دامنه غلظت مؤثر روی شپشک آرد آلود پنبه استفاده شد. بر اساس این آزمایش‌ها، غلظت‌های 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 کنیدی در هر میلی‌لیتر برای هر جدایه به منظور آزمایش‌های زیست‌سنجی انتخاب شدند. بعد از تهیه غلظت‌های موردنظر، سطح شاخ و برگ گیاهان حسن‌یوسف در مرحله ۱۵ برگی که سه هفته از آلوده‌سازی آن‌ها توسط ۵ ماده بالغ گذشته بود و حاوی پوره‌های سن آخر (تا ۵ روزه) و در شرایط گلخانه ذکر شده در بالا قرار داده شدند، توسط اسپری دستی تیمار شد. فاصله و میزان پاشش توسط اسپری دستی به گونه‌ای بود که تمام سطح فولیاژ توسط حجم مشخصی از محلول (۵ میلی‌لیتر به ازای هر بوته) پوشش داده شد. برای تیمار شاهد، گیاهان حسن یوسف آلوده به شپشک توسط آب و ۰/۱ درصد توین ۸۰ به روش مشابه سایر تیمارها محلول‌پاشی شد.

گیاهان تیمارشده در شرایط گلخانه‌ای ذکر شده در بالا نگهداری شده و در زمان‌های ۱ تا ۸ روز پس از تیمار، میزان مرگ و میر پوره‌ها و حشرات کامل به تفکیک به صورت روزانه ثبت شد. تائید و ثبت مرگ و میر براساس شاخص‌هایی مانند تغییر رنگ، فلج شدن و در نتیجه، سهولت جدا شدن از سطح و مشاهده میسلیوم‌های قارچی در زیر لوپ دستی صورت گرفت (Cuthberson *et al.*, 2005).

تحلیل داده‌ها

مرگ و میر مشاهده‌شده برای هر تیمار قبل از تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از فرمول ابوت تصحیح شد (Abbott, 1925). همچنین، نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون Shapiro–Wilk بررسی شد و از تبدیل داده‌ها به $\sqrt{X+1}$ برای نرمال‌سازی استفاده شد. از آزمون فاکتوریل (شامل جدایه قارچ بیمارگر در ۴ سطح × مرحله نموی حشره در ۲ سطح × غلظت در ۵ سطح به عنوان اثرات اصلی) در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از روش GLM، به منظور بررسی تأثیر اثرات اصلی و برهمکنش آن‌ها در مرگ و میر رخ‌داده توسط قارچ‌های بیمارگر، استفاده شد. مقایسه میانگین توسط آزمون LSD انجام شد. تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری فوق با نرم‌افزار SAS نسخه 9.2 صورت پذیرفت. هر آزمون شامل ۷ تکرار (هر تکرار شامل ۵ حشره) بود.

نتایج

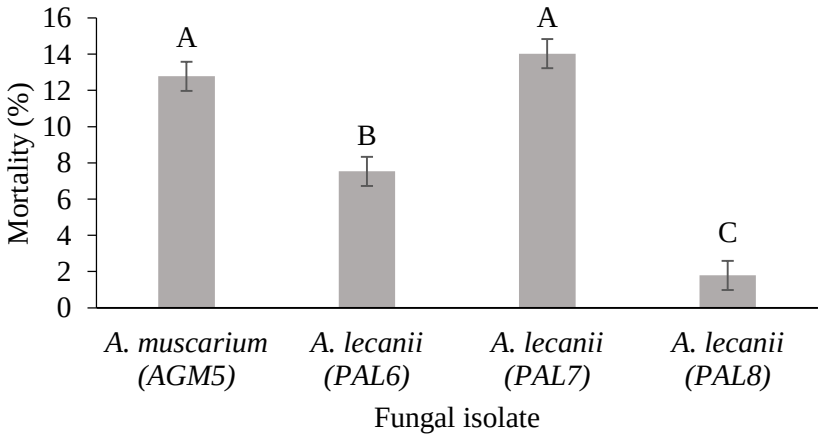
نتایج آزمون تحلیل واریانس فاکتورهای اصلی و برهمکنش بین آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. این آزمون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری در میزان مرگ و میر ایجاد شده توسط جدایه‌های مختلف مورد آزمایش بود (جدول ۱). میزان مرگ و میر ایجاد شده در جدایه‌های PAL7 قارچ *A. lecanii* (۱۴ درصد) و GAM5 گونه *A. muscarius* (۱۲/۷ درصد)، به صورت معنی‌داری بیشتر از مرگ و میر ناشی از جدایه‌های PAL6 و PAL8 گونه *A. lecanii* بود (شکل ۱).

جدول ۱- پارامترهای آزمون تحلیل واریانس برای بررسی عوامل مؤثر در مرگ و میر ناشی از قارچ‌های بیمارگر حشرات مورد آزمایش و برهمکنش آن‌ها روی شپشک آرد آلود پنبه (داده‌ها قبل از تجزیه و تحلیل به $(X+1)^{0.5}$ تبدیل شده است؛ درجه آزادی خطا ۸۴۰).

Table 1. ANOVA parameters for main effects and interactions for *Phenacoccus solenopsis* mortality by the entomopathogenic fungi (data were $(X+1)^{0.5}$ transformed prior to analysis; error df=840)

Source	df	Square mean	F value
EPF*	3	7652.14	107.22**
C	4	10311.32	114.48**
DAT	6	7593.19	106.4**
EPF × C	12	1575.34	22.07**
EPF × DAT	18	815.47	11.43**
C × DAT	24	652.87	9.15**
EPF × C × DAT	72	298.05	298.05**

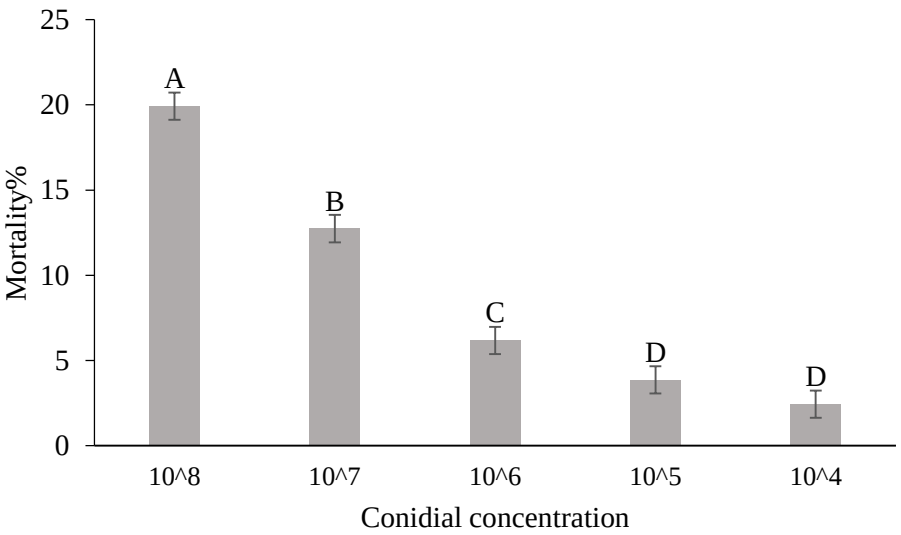
* EPF: Entomopathogenic fungi; C: Concentration; DAT: Day after treatment
** indicates significant difference at 0.01 level (LSD test)



شکل ۱- میانگین مرگ و میر شپشک آردآلود پنبه در نتیجه آلودگی با جدایه‌های مختلف قارچ *Akanthomyces*

Figure 1. Mean of mortality in *Phenacoccus solenopsis* caused by different isolates of *Akanthomyces*.
Different letters indicate significant difference at 0.01 level (LSD post-hoc test)

میزان مرگ و میر ناشی از بیماری‌زایی تمامی جدایه‌های مورد مطالعه‌ی جنس *A. lecanii* و *A. muscarium* روی شپشک آردآلودپنبه، با افزایش غلظت سوسپانسیون کنیدی به کاررفته، به صورت معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۱) به صورتی که بیشترین میزان مرگ و میر در غلظت $۱۰^{۸}$ کنیدی/میلی‌لیتر (۱۹/۹۲ درصد) و کمترین آن در غلظت $۱۰^{۴}$ کنیدی در میلی‌لیتر (۲/۴۴ درصد دیده شد) (شکل ۲). بنابراین میزان مرگ و میر در غلظت‌های پایین ($۱۰^{۴}$ و $۱۰^{۵}$) ناچیز بود.

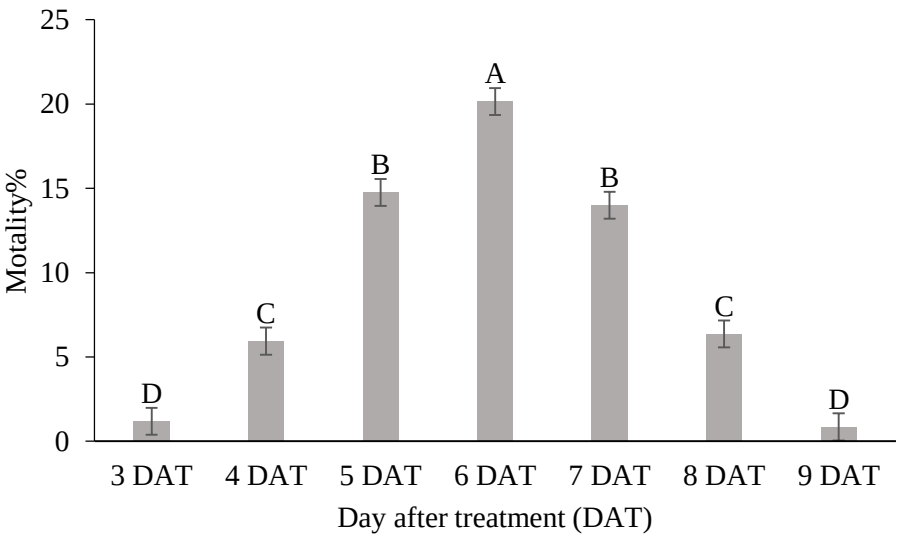


شکل ۲- میانگین مرگ و میر شپشک آردآلود پنبه در نتیجه آلودگی با غلظت‌های مختلف سوسپانسیون کنیدی تمامی جدایه-های مورد مطالعه قارچ *Akanthomyces* (برحسب کنیدی/میلی‌لیتر).

Figure 2. Mean of mortality in *Phenacoccus solenopsis* at different conidial suspension concentrations by *Akanthomyces* (Conidia/mL).
Different letters indicate significant difference at 0.01 level (LSD post-hoc test).

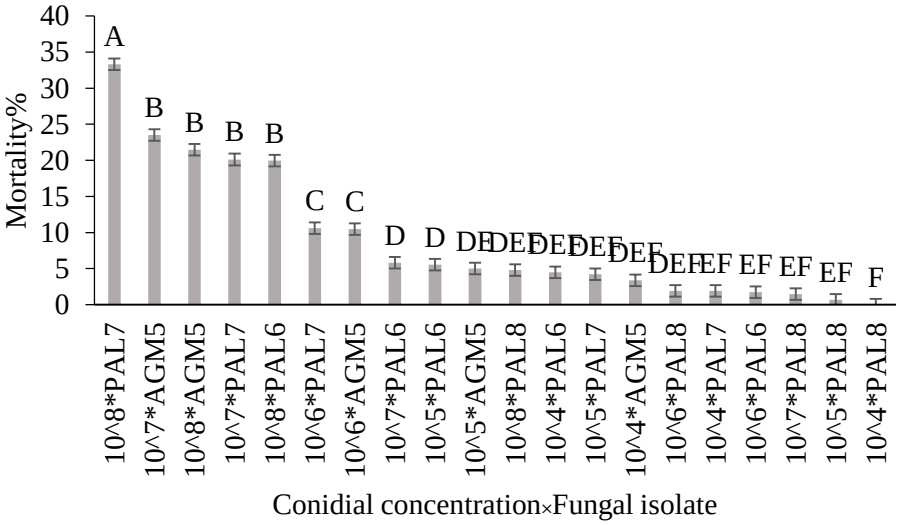
مرگ و میر ناشی از آلودگی به قارچ‌های بیمارگر مورد مطالعه از روز سوم بعد از تیمار شروع شد (به میزان ۱/۱۸ درصد). از روز سوم تا روز ششم پس از آلودگی، روند میزان مرگ و میر در شپشک آردآلود پنبه افزایشی بود و بیشترین میزان مرگ و میر در روز ششم بعد از آلودگی مشاهده شد (۲۰/۱۴ درصد). بعد از روز ششم، مجدداً میزان مرگ و میر ناشی از آلودگی به جدایه‌های مورد مطالعه کاهش یافت به صورتی که هشت روز پس از آلودگی، میزان مرگ و میر به کمتر از یک درصد رسید (شکل ۳).

برهمکنش میان جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر مورد مطالعه و غلظت‌های مختلف سوسپانسیون کنیدی به کاررفته، معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین میزان مرگ و میر شپشک آرد آلود پنبه در جدایه PAL7 گونه *A. lecanii* و در بالاترین غلظت کنیدی در سوسپانسیون ($۱۰^{۸}$ کنیدی در میلی‌لیتر) مشاهده شد (۳۳/۳۲ درصد) که به صورت معنی-داری بیشتر از سایر جدایه‌ها در غلظت مشابه بود. برای سایر جدایه‌ها نیز میزان بیماری‌زایی در بالاترین غلظت سوسپانسیون کنیدی به صورت معنی‌داری بیشتر از سایر غلظت‌ها بود (شکل ۴).



شکل ۳- میانگین مرگ و میر شپشک آردآلود پنبه ناشی از آلودگی به جدایه‌های مختلف قارچ جنس *Akanthomyces* در روزهای مختلف بعد از تیمار (DAT).

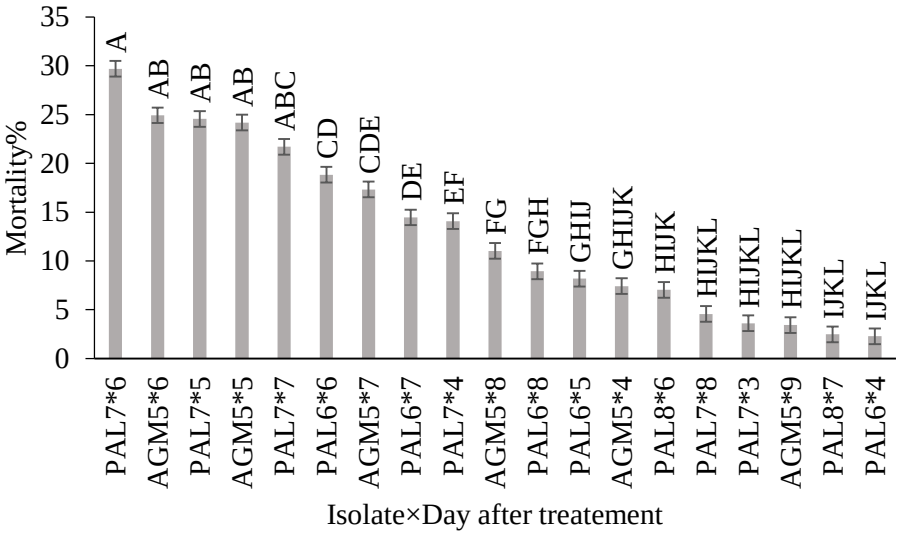
Figure 3. Mean of mortality in *Phenacoccus solenopsis* by genus *Akanthomyces* at different days after treatments (DAT).
Different letters indicate significant difference at 0.01 level (LSD post-hoc test).



شکل ۴- میانگین مرگ و میر شپشک آردآلود پنبه در برهم‌کنش بین جدایه‌های مختلف قارچ *Akanthomyces* و غلظت‌های مختلف سوسپانسیون کنیدی (برحسب کنیدی در میلی‌لیتر).

Figure 4. Mean of mortality in *Phenacoccus solenopsis* in interaction between the isolates of *Akanthomyces* and different conidial suspension concentrations (conidia/mL).
Different letters indicate significant difference at 0.01 level (LSD post-hoc test).

در بین برهمکنش‌های مختلف، برهمکنش میان جدایه‌های مختلف و عامل زمان (روز پس از تیمار) نیز تأثیر معنی‌داری در شدت بروز بیماری‌زایی و میزان مرگ و میر در شپشک آرد آلود پنبه توسط قارچ‌های مورد مطالعه جنس *Akanthomyces* داشت (جدول ۱). بیشترین و کمترین میزان مرگ و میر مشاهده شده شپشک به ترتیب در جدایه PAL7 گونه *A. lecanii* در ۶ روز پس از تیمار (۲۹/۶۹ درصد) و جدایه PAL6 همین گونه در ۴ روز پس از تیمار (۲/۲۸ درصد) مشاهده شد (شکل ۵).

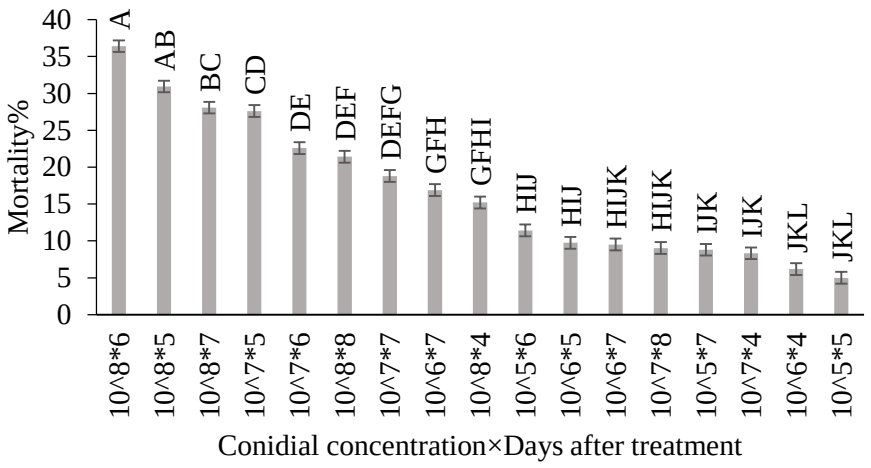


شکل ۵- میانگین مرگ و میر شپشک آردآلود پنبه در برهم‌کنش بین جدایه‌های مختلف قارچ *Akanthomyces* و روزهای مختلف پس از تیمار (عامل زمان).

Figure 5. Mean of mortality in *Phenacoccus solenopsis* in interaction between the isolates of *Akanthomyces* and different days after treatment (time factor).
Different letters indicate significant difference at 0.01 level (LSD post-hoc test).

برهمکنش میان غلظت سوسپانسیون کنیدی و عامل زمان نیز اثر معنی‌داری در مرگ و میر ناشی از بیماری‌زایی جدایه‌های مورد مطالعه قارچ‌های *Akanthomyces* داشت. به صورتی که میزان مرگ و میر کاربرد غلظت 10^8 سوسپانسیون قارچی در ۶ روز پس از کاربرد (۳۶/۴۱ درصد) به صورت معنی‌داری بیشتر از موارد دیگر بود. کمترین میزان مرگ و میر (۴/۹۹ درصد) هم در ۵ روز پس از کاربرد 10^5 کنیدی در میلی‌لیتر این بیمارگرها دیده شد (شکل ۶).

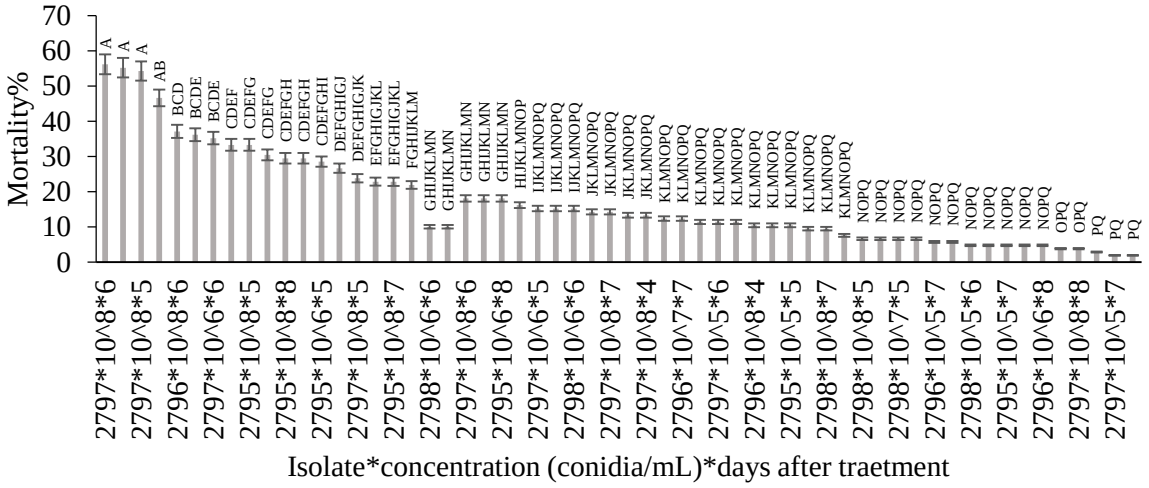
برهمکنش میان جدایه قارچی، غلظت سوسپانسیون کنیدی به کاررفته و عامل زمان در شکل ۷ نشان داده شده است. بیشترین میزان مرگ و میر شپشک (۵۶/۱۷ درصد) در غلظت سوسپانسیون 10^8 کنیدی در هر میلی‌لیتر جدایه PAL7 و پس از ۶ روز از تیمار ثبت شد.



شکل ۶- میانگین مرگ و میر شپشک آردآلود پنبه در برهم‌کنش بین غلظت‌های مختلف سوسپانسیون کنیدی (برحسب کنیدی در میلی‌لیتر) و روز پس از تیمار (عامل زمان).

Figure 6. Mean of mortality in *Phenacoccus solenopsis* in interaction between conidia suspension concentrations (conidia/mL) and different days after treatment (time factor).

Different letters indicate significant difference at 0.01 level (LSD post-hoc test).



شکل ۷- میانگین مرگ و میر شپشک آردآلود پنبه در برهم‌کنش بین جدایه‌های مختلف قارچ بیمارگر *Akanthomyces*، غلظت‌های مختلف سوسپانسیون کنیدی (برحسب کنیدی در میلی‌لیتر) و روز پس از تیمار (عامل زمان).

Figure 7. Mean of mortality in *Phenacoccus solenopsis* in interaction between different isolates of *Akanthomyces*, conidia suspension concentrations (conidia/mL) and different days after treatment (time factor).

Different letters indicate significant difference at 0.01 level (LSD post-hoc test).

بحث

قارچ‌های بیمارگر جنس *Akanthomyces* که اولین بار توسط Lebert در سال ۱۸۵۸ معرفی شدند، توانایی بیماری-زایی روی گونه‌های مختلفی از حشرات در اکوسیستم‌های مختلف را دارند (Aini *et al.*, 2020). حشرات مختلفی از راسته‌های Hemiptera، Coleoptera، Lepidoptera و Orthoptera جزو میزبان‌های این قارچ‌های بیمارگر معرفی شدند (Mongkolsamrit *et al.*, 2018). دو گونه‌ی *A. lecanii* و *A. muscarius* از مهم‌ترین قارچ‌های این جنس هستند که به عنوان مهم‌ترین و رایج‌ترین قارچ‌های بیمارگر Hemiptera شناخته می‌شوند (Broumandnia *et al.*, 2021). کاربرد وسیعی از این قارچ‌ها برای کنترل میکروبی با سفیدبالک‌ها ثبت شده است (Cuthbertson *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2010). جدایه‌های مورد مطالعه در پژوهش حاضر که از روی آفات جوربال مرکبات در استان مازندران جداسازی شده بود، دارای بیماری‌زایی مناسب روی آفاتی نظیر سفید بالک پنبه *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) (Broumandnia *et al.*, 2021)، شپشه آرد *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) (Broumandnia and Rajabpour, 2020) و شته سیاه باقلا *A. fabae* (Soltani *et al.*, 2022) بود. در سفیدبالک پنبه بیشترین و کمترین کُشندگی به ترتیب در *A. muscarius* (AGM5) و *A. lecanii* (PAL6) مشاهده شد (Broumandnia *et al.*, 2021). روی شپشه آرد نیز بیشترین کُشندگی با *A. muscarius* (AGM5) ایجاد شد درحالی که کمترین مرگ و میر متعلق به *L. lecanii* (PAL6) بود (Broumandnia and Rajabpour, 2020). در شته سیاه باقلا، بیشترین میزان مرگ و میر در جدایه‌های PAL6 و PAL7 گونه *A. lecanii* دیده شد (Soltani *et al.*, 2022). بنابراین میزان شدت بیماری‌زایی این جدایه‌ها برحسب گونه میزبان متفاوت است. به طور معمول قارچ‌های جنس *Akanthomyces*، مشابه سایر قارچ‌های بیمارگر حشرات ایجاد بیماری‌زایی می‌کنند. به این ترتیب که با اتصال کنیدی به کوتیکول میزبان، رشد کنیدی، رخنه به درون کوتیکول، تولید بلاستوسپور داخل هموسل، انشعاب ریسه و حمله منجر به مرگ بافت‌های میزبان و سرانجام تولید کنیدی در سطح لاشه می‌شود (Goettel *et al.*, 2008). با توجه به همه جازی بودن این قارچ‌ها، اطلاعات در مورد تخصصی بودن میزبان آن کم است. به نظر می‌رسد جدایه‌های با کنیدی بزرگ برای شته‌ها بیشتر بیماری‌زا هستند و سویه‌های با کنیدی کوچک برای سفیدبالک‌ها بیشتر بیماری‌زا هستند (Sugimoto *et al.*, 2003). رخنه به جلد میزبان هم در گرو فشار مکانیکی ریسه‌ها و هم عمل آنزیم‌های خارج سلولی تجزیه کننده می‌باشد که توسط قارچ ترشح می‌شود. قارچ-های بیمارگر حشرات آنزیم‌هایی در محیط کشت تولید می-کنند که توانایی هضم کردن ترکیبات عمده در پوسته حشرات را دارند. پوسته حشرات از بیش از ۷۰٪ پروتئین تشکیل شده است بنابراین در فرآیند رخنه توجه خاصی به نقش آنزیم‌های پروتئاز شده است. فعالیت پروتئازی در بعضی درجه‌ها می‌تواند میزان فعالیت بیماری‌زایی را تعیین کند. کیتین نیز یک ترکیب مهم در پوسته حشرات است. در ویژگی‌های بیماری‌زایی، کنیدی‌ها و عوامل ژنتیکی متعددی در مورد قدرت بیماری‌زایی شناسایی شده‌اند (Fan *et al.*, 2011). با توجه به تفاوت مقاومت و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی کوتیکول در میزبان‌های مختلف مورد مطالعه این بیمارگرها، علت تفاوت در میزان بیماری‌زایی هر جدایه در حشرات میزبان مختلف، می‌تواند ناشی از این تفاوت‌ها باشد. اگرچه بیماری‌زایی جدایه‌های این گونه‌های قارچ بیمارگر برای اولین بار روی شپشک آردآلود پنبه مورد پژوهش قرار گرفته‌اند و از اینرو داده‌هایی برای مقایسه با سایر جدایه‌ها وجود ندارد، ولی برخی جدایه‌ها از قارچ‌های بیمارگر *Beauveria bassiana* Balsamo، *Metarhizium anisopliae* Metschn و *Paecilomyces fumosoroseus* Wize موجب مرگ و میر بین ۳/۲۶ تا ۸۵ درصد در شپشک آردآلود پنبه شدند (Nawaz *et al.*, 2021).

در بین عوامل اصلی، زمان تأثیر زیادی در میزان بیماری-زایی نشان داده شده توسط هر یک از جدایه‌ها داشت. به طور کلی، ایجاد بیماری و مرگ ناشی از قارچ‌های بیمارگر

حشرات، فرآیندی زمان‌بر است. دلیل این را می‌توان سازوکار بیماری‌زایی این عوامل دانست به صورتی که در چرخه بیماری‌زایی این قارچ‌ها مراحل شامل: ۱- اتصال کنیدی‌های قارچی به لایه کوتیکولی؛ ۲- جوانه زدن کنیدی قارچ و تشکیل چنگک (آپرسوریوم)؛ ۳- حمله و رخنه به داخل بدن حشره؛ ۴- ورود قارچ به داخل هموسل بدن حشره و تشکیل ساختارهای ریسه‌ای شکل؛ ۵- گسترش بیماری داخل بدن و در نهایت مرگ حشره میزبان، است. بعد از مرگ حشره میزبان، در اکثر قارچ‌های بیماری‌زا زندگی به صورت ساپروفیتی درون میزبان مشاهده می‌شود (Amnuaykanjanasin *et al.*, 2012). در مطالعاتی که روی بیماری‌زایی این جدایه‌ها روی سایر میزبان‌های حشرات صورت گرفت نیز افزایش میزان مرگ و میر با گذشت زمان مشاهده شد (Broumandnia and Rajabpour, 2020; Broumandnia *et al.*, 2021; Soltani *et al.*, 2022). شاید یکی از دلایل دیگر افزایش مرگ و میر با گذشت زمان، تولید تدریجی سموم قارچی و افزایش غلظت آن با گذشت زمان باشد. بسیاری از قارچ‌های جنس *Akanthomyces* تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای با ماهیت حشره‌کشی می‌نمایند که بیشتر از جنس ترکیبات آروماتیک ساده و یا ترکیبات فنولیک هستند (Effendi, 2012; Wang *et al.*, 2018). گزارش شده است که مواد مؤثره موجود در این سموم قارچی به عنوان پروتئازهای تجزیه کننده جلد حشرات میزبان عمل نموده و فرآیند نفوذ ریسه‌های این قارچ‌های بیمارگر در کوتیکول را تسهیل می‌نمایند (Keppanan *et al.*, 2019).

مرگ و میر بیشتر شپشک آرد آلود پنبه در تیمار با غلظت‌های بالاتر کنیدی ممکن است ناشی از شکسته شدن سریع‌تر مقاومت بدن حشره میزبان در نفوذ، رشد تعداد بیشتر کنیدی و همچنین تولید مقادیر بیشتر سموم قارچی در یک بازه‌ی زمانی مشخص باشد. نتایج مشابهی در تیمار حشرات دیگر مانند شپشه آرد (Broumandnia and Rajabpour, 2020)، سفیدبالک پنبه (Broumandnia *et al.*, 2021) و شته سیاه باقلا (Soltani *et al.*, 2022) توسط جدایه‌های مورد مطالعه در این پژوهش مشاهده شد.

هر چهار جدایه مورد پژوهش قارچ بیمارگر جنس *Akanthomyces* دارای ماهیت بیماری‌زایی روی شپشک آردآلود پنبه بودند. در بین بیمارگرها مورد مطالعه، جدایه PAL7 گونه *A. lecanii* در غلظت $۱۰^{۸}$ کنیدی در هر میلی-لیتر در ۶ روز پس از تیمار بیشترین مرگ و میر را ایجاد نمود و می‌تواند گزینه بالقوه‌ی مناسبی برای کنترل میکروبی این آفت به ویژه در محیط‌هایی نظیر گلخانه‌ها باشد. البته با توجه به تأخیر زمانی در بروز مرگ و میر و نسبت نه چندان بالای مرگ و میر ایجاد شده که می‌تواند با توجه به سرعت رشد بالای این آفت، قادر به مهار جمعیت این شپشک نباشد، لازم است که این عامل میکروبی به صورت تلفیقی با سایر راهکارهای کنترلی به کار رود.

سپاسگزاری

به این وسیله از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان برای تأمین مالی این پژوهش، سپاسگزاری به عمل می‌آید.

References

Abbot, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide**. Journal of Economic Entomology** 18: 265–267.

Aini, A. N., Mongkolsamrit, S., Wijanarka, W., Thanakitpipattana, D., Luangsa-Ard, J. J. and Budiharjo, A. 2020. Diversity of *Akanthomyces* on moths (Lepidoptera) in Thailand. **MycoKeys** 71: 1.

Amnuaykanjanasin, A., Jirakkakul, J., Panyasiri, C., Panyarakkit, P., Nounurai, P., Chantasingh, D., Eurwilaichitr, L., Cheevadhanarak, S. and Tanticharoen, M. 2012. Infection and colonization of tissues of the aphid *Myzus persicae* and cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* by the fungus *Beauveria bassiana*. **BioControl** 58 (3), 319–330.

Broumandnia, F. and Rajabpour, A. 2020. Efficacies of some isolates of *Lecanicillium lecanii* to control *Tribolium castaneum* (Col., Tenebrionidae). **Journal of Plant Diseases and Protection** 127(5): 625-631.

Broumandnia, F., Rajabpour, A., Parizipour, M. H. G. and Yarahmadi, F. 2021. Morphological and molecular identification of four isolates of the entomopathogenic fungal genus *Akanthomyces* and their effects against *Bemisia tabaci* on cucumber. **Bulletin of Entomological Research** 111(5), 628-636.

Cuthbertson, A. G. and Walters, K. F. 2005. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus, *Lecanicillium muscarium*, against the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci* under laboratory and glasshouse conditions. **Mycopathologia** 160: 315–319.

Cuthbertson, A. G., Walters, K. F. and Northing, P. 2005. The susceptibility of immature stages of *Bemisia tabaci* to the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* on tomato and verbena foliage. **Mycopathologia** 159(1): 23–29.

Effendi, H. 2012. Phenolic Compounds of Sponge-associated Fungi (*Lecanicillium evansii*). **Microbiology Indonesia** 6(3): 1-1.

Fan. Y., Sh. Zhang., N. Kruer and Keyhani, N. O. 2011. High-throughput insertion mutagenesis and functional screening in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology** 106(2): 274–279.

Goettel, M. S., Koike, M., Kim, J. J., Aiuchi, D., Shinya, R. and Brodeur, J. 2008. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. **Journal of Invertebrate Pathology** 98 (3): 256-261.

Hayashi, N., Kobayashi, N., Cruz, C. V. and Fukuta, Y. 2009. Protocols for the sampling of diseased specimens and evaluation of blast disease in rice. **JIRCAS Working Report** 63: 17-33.

Kepler, R. M., Luangsa-ard, J. J., Hywel-Jones, N. L., Quandt, C. A., Sung, G. H., Rehner, S. A., Aime, M. C., Henkel, T. W., Sanjuan, T., Zare R., Chen, M. J., Li, Z. Z., Rossman, A. Y., Spatafora, J. W. and Shrestha, B. 2017. A phylogenetic-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). **IMA Fungus** 8(2): 335–353.

Keppanan, R., Sivaperumal, S., Hussain, M., Bamisile, B. S., Aguila, L. C. R., Qasim, M. and Krutmuang, P. 2019. Molecular characterization of pathogenesis involving the GAS 1 gene from Entomopathogenic fungus *Lecanicillium lecanii* and its virulence against the insect host *Diaphorina citri*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 157: 99-107.

Kim, J. J. 2007. Influence of *Lecanicillium attenuatum* on the development and reproduction of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. **BioControl** 52(6): 789–799.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Dictionary of the fungi* .Wallingford. *UK: CABI*, 599.

Liu, W., Xie, Y., Xue, J., Gao, Y., Zhang, Y., Zhang, X. and Tan, J. 2009. Histopathological changes of Ceroplastes japonicus infected by *Lecanicillium lecanii*. **Journal of Invertebrate Pathology** 10: 96–105.

Liu, B., Lan., P. M., Kao., Y. M., Tzeng, T. and Feng, C. 2003. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology** 33: 410–415.

Moghadam, M. and Bagheri, M. 2010. A new mealybug pest in the south of Iran, *Phenacoccus solenopsis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae). **Journal of Entomological Society of Iran** 30 (1): 67-69. (In Farsi with English abstract).

Mongkolsamrit, S., Noisripoom, W., Thanakitpipattana, D., Wuthikun, T., Spatafora, J. W. and Luangsa-ard, J. J. 2018 Disentangling cryptic species with isaria-like morphs in Cordycipitaceae. **Mycologia** 110(1): 230–257.

Mossadegh, M. S., Vafaei, Sh., Zarghami, S., Farsi, A., Sedighi Dehkordi, F., Fazelinejad, A., Esfandiari, M. and Alizadeh, M. S. 2012. The mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Sternorrhyncha: Coccoidea: Pseudococcidae) in Khuzestan and Kish island. Proceedings of the 20th Iranian Plant Protection Congress, Shiraz, Iran. P. 174. (In Farsi with English abstract).

Nawaz, M. and Freed, S. 2021. Pathogenicity of different isolates of entomopathogenic fungi on cotton mealybug, *Phenaccocus solenopsis* Tinsley. **Pakistan Journal of Zoology** 54(1): 1-8.

Nazar, M. Z., Freed, S., Hussain, S., Sumra, M. W., Shah, M. S. and Naeem, A. 2020. Characteristics of biochemical resistance mechanism of novel insecticides in *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). **Crop Protection** 138: 105320.

Ortiz-Urquiza, A. and Keyhani, N. O. 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. Insects 4(3): 357–374.

Rajabpour, A. and Yarahmadi, F. 2012. Seasonal population dynamics, spatial distribution and parasitism of *Aphis gossypii* on *Hibiscus rosa-chinensis* in Khuzestan, Iran. **Journal of Entomology** 9(3): 163-170.

Ren, S. X., Ali, S., Huang, Z. and Wu, J. H. 2010. *Lecanicillium muscarium* as microbial insecticide against whitefly and its interaction with other natural enemies. **Microbiology and Microbial Biotechnology** 27: 339–348.

Roozdar, E., Habibpour, B., Mossadegh, M. S. and Mahmoodi Sourestani, M. 2019. Evaluation of biological effects of essential oils of 14 plants species against cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hem.: Pseudococcidae) under laboratory conditions. **Plant Protection** 42(3): 72-86.

Saddiq, B., Shad, S. A., Khan, H. A. A., Aslam, M., Ejaz, M. and Afzal, M. B. S. 2014. Resistance in the mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae) in Pakistan to selected organophosphate and pyrethroid insecticides. **Crop Protection** 66: 29-33.

Sahito, H. A., Abro, G. H., Syed, T. S., Memon, S. A., Mal, B. and Kaleri, S. 2011. Screening of pesticides against cotton mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley and its natural enemies on cotton crop. **International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics** 1(9): 232-236.

Soltani, T., Yarahmadi, F., Rajabpour, A. and Ghoddom Parizi Pour, M. H. 2022. Pathogenicity of Iranian isolates of *Akanthomyces lecanii* and *A. muscarius* on the black bean aphid (*Aphis fabae* Scopoli). **Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)** 45(1): 19-28.

Sugimoto, M., Koike, M., Hiyama, N. and Nagao, H. 2003. Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. **Journal of Invertebrate Pathology** 82 (3): 176-187.

Wang, X., Gong, X., Li, P., Lai, D. and Zhou, L. 2018. Structural diversity and biological activities of cyclic Depsipeptides from fungi. **Molecules** 23:169.

Wraight, S. P., Lopes, R. B. and Faria, M. 2017. Microbial control of mite and insect pests of greenhouse crops. In Lawrence A. L. (Eds). Microbial control of insect and mite pests. Academic Press. pp. 237-252.

Plant Pest Research
2022- 12 (3): 57-70

Open access
doi: 10.22124/iprj.2022.6016

Research paper

Potential of some Irianian isolates of *Akanthomyces* for microbial control of cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis*, under greenhouse conditions

N. Lalari Sardar-Abadi, F. Yarahmadi*, N. Zandi-Sohani and M. H. Ghodom Parizipour and A. Rajabpour

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Bavi, Iran

(Received: October 5, 2022- Accepted: November 12, 2022)

Abstract

The cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsely (Hemiptera: Pseudococcidae), is an important pest of many plants in agroecosystems and urban green landscapes. In this study, potential of three isolates of *Akanthomyces lecanii*, isolates PAL6, PAL7, and PAL8, and an isolate of *A. muscarius*, isolate GAM5, to microbial biocontrol of this pest on *Coleus blumei*, as the pest host plant, were investigated under greenhouse conditions. The infested host plants to five last instar nymphs were treated using different conidial suspension concentrations (10^4,10^5, 10^6, 10^7, and 10^8 conidia/mL) of each isolate and the mealybug mortalities were recorded every day, for eight days. The mortalities were varied from 14.3% (isolate PAL7) to 1.79% (isolate PAL8). The highest mortality was observed in concentration of 10^8 conidia/mL of the pathogens. The highest mortality caused by the pathogens was recorded six days after treatment. Totally, conidial suspension concentration of 10^8 conidia/mL from *A. lecanii* PAL7 was the best candidate for microbial biocontrol of the mealybug among the pathogens causing 56.17% mortality in the pest population six days after treatment. The results can be used for developing microbial biocontrol of the cotton mealybug especially in greenhouse conditions.

Key words: Greenhouse pests, IPM, microbiological control, pathogenesis

* Correspond author: yarahmadi@asnrukh.ac.ir; fa_yarahmadi@yahoo.com