

بررسی کارآیی جدایه‌های مختلف قارچ *Lecanicillium muscarium* علیه بالشک مرکبات *Pulvinaria aurantii*

سیروس آفاجانزاده^{۱*} و حسین طاهری^۲

۱ و ۲. دانشیار و مربی پژوهش، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، موسسه تحقیقات باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۲۵- تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۲۷)

بالشک مرکبات *Pulvinaria auranti* از مهم‌ترین آفات مرکبات به‌شمار می‌رود و هر ساله موجب خسارت اقتصادی روی محصول می‌شود. در این تحقیق ۹ جدایه قارچ *Lecanicillium muscarium* از باغ‌های مرکبات غرب مازندران و شرق گیلان جمع‌آوری و پس از شناسایی، کارآیی آنها روی بالشک مرکبات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و ۴ تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. بیماری‌گری قارچ با محلول‌پاشی 5×10^6 اسپور در میلی‌لیتر آب از هر جدایه روی بالشک مرکبات تعیین شد. درصد تلفات جدایه‌های قارچ بیمارگر روی بالشک مرکبات محاسبه شد و نتایج نشان داد که تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند. مقایسه میانگین درصد تلفات تیمارها نشان داد که جدایه ۶، ۷، ۸ و ۹ بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر بیشترین درصد تلفات و جدایه‌های ۲ و ۵ کمترین درصد تلفات را روی بالشک مرکبات ایجاد کردند. بنابراین قارچ *L. muscarium* روی بالشک مرکبات بیمارگر بوده و با توجه به درصد تلفات آن روی آفت، می‌تواند به‌عنوان یک عامل میکروبی موثر در کاهش جمعیت آن باشد.

کلیدواژه‌گان: مرکبات، کنترل بیولوژیک، *Lecanicillium muscarium* *Pulvinaria aurantii*

Study on efficiency of different isolates of *Lecanicillium muscarium* against *Pulvinaria aurantii*

Sirous Aghajanzadeh^{1*} and Hossein Taheri²

1 and 2. Associate Professor and Researcher, Citrus and Subtropical fruits Center, Horticultural Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization

(Received: June 14, 2016 - Accepted: December 17, 2016)

ABSTRACT

Orange pulvinaria scale, *Pulvinaria aurantii*, is one of the most important pests on citrus in Iran. It causes economic damage on the citrus products, annually. The present investigation was conducted to identify different isolates of entomopathogenic fungus, *Lecanicillium muscarium* and its efficiency against *P. aurantii*. Nine isolates of *L. muscarium* were collected from infected orange pulvinaria scale in west of Mazandaran and east of Guilan provinces. For evaluation of these isolates against *P. aurantii*, a suspension of 5×10^6 spore/ml was sprayed on it. In this regard, a completely randomized design with 10 treatments and 4 replications were used. The mortality percentage of each isolate on *P. aurantii* was calculated and the results showed that treatments had significant differences with each other. Data analysis showed that isolates 6, 7, 8 and 9 caused the highest mortality and the lowest mortality percentage was occurred by isolate 2 and 3. Thus, *L. muscarium* is pathogenic on *P. aurantii* and according to high mortality, it can be postulated an effective microbial agent for reducing pest population.

Keywords: Citrus, biological control, *Lecanicillium muscarium*, *Pulvinaria aurantii*.

* Corresponding author E-mail: aghajanzadehs@yahoo.com

تازه‌های تحقیق

این بررسی، بیماری‌گری قارچ *Lecanicillium muscarium* را روی بالشک مرکبات نشان داد. به طوری که غلظت 5×10^6 اسپور در میلی‌لیتر آن قادر است تا ۶۷ درصد تلفات روی آفت ایجاد نماید. با توجه به استفاده مکرر سموم شیمیایی در جلوگیری از خسارت این آفت کلیدی مرکبات و نظر به درصد تلفات بالای قارچ روی آفت، *L. muscarium* می‌تواند به عنوان یک عامل موثر در کاهش جمعیت بالشک در قالب برنامه مدیریت تلفیقی آفت باشد.

مقدمه

مرکبات در ایران با سطح زیر کشت حدود ۲۹۰ هزار هکتار از مهم‌ترین محصول باغی کشور به شمار می‌آید (Ahmadi et al. 2015).

بالشک مرکبات *Pulvinaria* (Hem.: Coccidae) Kll. در سراسر مناطق شمالی ایران از گرگان تا بندرانزلی انتشار دارد. این آفت علاوه بر برگ و سرشاخه، میوه‌های مرکبات را نیز مورد حمله قرار می‌دهد و عسلک فراوانی ترشح می‌کند (Esmaili 1996). گونه *Lecanicillium lecanii* W. Gams & Zare (Ascomycota, Hypocreales) تعداد محدودی از قارچ‌های بیماری‌گر سپردارهای نواحی گرمسیری را شامل می‌شود (Gams and Zare 2002). جدایه‌های کارآمد و به شدت بیماری‌گر متعلق به *Lecanicillium* تولید انبوه شده، به عنوان عامل کنترل بیولوژیک علیه بعضی از حشرات آفات در نظر گرفته شده‌اند (Faria and Wraight 2007). در یک بررسی آزمایشگاهی نتایج خوبی از تاثیر قارچ *L. lecanii* روی شپشک‌های (Hem.:) *Pseudococcidae* Migula *Planococcus* spp. به دست آمد (Gonzales et al. 1995). همه‌گیری ناشی از قارچ *L. lecanii* در بین جمعیت بالشک مرکبات از گرگان و مازندران گزارش شده است (Keriokhin 1947, Davachi 1949). قارچ‌های *L. lecanii* و *Hirsutella* sp. بیماری‌گرهای بالشک مرکبات هستند که نقش بسزایی در تنظیم و کنترل جمعیت نسل دوم آفت دارند (Jafari and Mafi 2000). فعالیت قارچ‌های *L. muscarium* و *L. aphanocladii* از روی بالشک مرکبات در مازندران و گیلان گزارش شد (Shabanian

(et al. 2011).

با توجه به استفاده بیش از حد سموم شیمیایی در کنترل آفات و نیز نظر به ارزش اقتصادی مرکبات، کنترل بیولوژیک آفات به عنوان یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل، بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است، لذا در این تحقیق جدایه‌های مختلف قارچ *L. muscarium* جمع‌آوری، شناسایی و کارایی آن‌ها روی بالشک مرکبات مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی جدایه‌های قارچ *L. muscarium*

نمونه‌های برگ و سرشاخه ارقام مختلف مرکبات آلوده به بالشک از غرب مازندران و شرق گیلان برداشت و داخل کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شد. برای هر نمونه مشخصاتی شامل نام میزبان، محل و تاریخ جمع‌آوری ثبت شد. نمونه‌های پارازیته توسط قارچ که دارای میسلیم سفید رنگ در سطح بدن بودند، با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضد عفونی، با آب مقطر سترون شستشو و پس از آب‌گیری در محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) قرار گرفتند. سپس به انکوباتور با دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس منتقل شدند. خالص‌سازی عامل بیماری‌گر، به روش تک اسپور یا نوک ریسبه انجام شد و پس از شناسایی اولیه، جدایه‌ها جهت تشخیص نهایی به موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور ارسال شدند و مورد شناسایی قرار گرفتند.

تهیه نهال‌های آلوده به *P. aurantii*

نهال‌های نارنج گلدانی یک ساله با استفاده از کیسه‌های تخم بالشک مرکبات در داخل گلخانه آلوده شدند. دو هفته پس از آلوده سازی و استقرار پوره‌های سن یک روی برگ، نهال‌های با آلودگی یکنواخت برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه سوسپانسیون اسپور جدایه‌های مختلف

قارچ *L. muscarium*

جدایه‌های مختلف قارچ در ظروف پتری شیشه‌ای (به قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی محیط PDA کشت و در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس به مدت ۱۴ روز نگهداری

درجه سانتی‌گراد به ۲۵-۱۵ میلی‌متر رسید. فیالیدها با اندازه ۱-۲ × ۱-۳۰ میکرومتر بر روی هیف و کینیدی‌های بیضوی تا کمی استوانه‌ای شکل با اندازه ۱-۱/۵ × ۱-۶/۵ میکرومتر در راس فیالیدها تشکیل شدند. بر اساس مشخصات ظاهری و کلید شناسایی (Zare and Gams 2001) و با تایید موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، قارچ مورد نظر *L. muscarium* تشخیص داده شد. در مجموع تعداد ۹ جدایه روی میزبان‌های مختلف مرکبات طبق جدول ۱ جمع‌آوری شد.

تعیین کارایی جدایه‌های مختلف قارچ

L. muscarium روی *P. aurantii*

درصد تلفات ۹ جدایه از قارچ بیمارگر *L. muscarium* روی بالشک مرکبات محاسبه شد و نتایج نشان داد که تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($P < 0.01$) و $F=3/15df_1=8$ (جدول ۱). مقایسه میانگین درصد تلفات تیمارها نشان داد که جدایه ۶، ۷، ۸ و ۹ بدون اختلاف معنی‌دار با یکدیگر بیشترین درصد تلفاتو جدایه‌های ۲ و ۵ کمترین درصد تلفات را روی بالشک مرکبات ایجاد کردند (جدول ۱). نتایج این بررسی، بیمارگری قارچ *L. muscarium* را علیه بالشک روی نهال‌های مرکبات نشان داد. مطالعات متعددی حساسیت آفات مختلف از جمله بالشک مرکبات را به قارچ *Lecanicillium spp.* نشان داده است (Gonzales et al. 1995, Jafari and Mafi 2000, Shabanian et al. 2011). همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه‌های مختلف قارچ دارای پتانسیل متفاوتی در بیمارگری آفت بودند، به طوری که دامنه درصد تلفات ایجاد شده روی آفت از ۴۳ تا ۶۷ درصد متغیر بود. جدایه‌های شماره ۶، ۷، ۸ و ۹ دارای بیشترین درصد تلفات و جدایه‌های شماره ۲ و ۵ دارای کمترین درصد تلفات روی آفت بودند. در مطالعه‌ای تاثیر دو جدایه از قارچ *Lecanii* با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر روی بالشک مرکبات در ساری، ۴۰ و ۷۰ درصد آلودگی را گزارش کردند (Mirabzadeh et al. 2000).

اگرچه گونه و غلظت قارچ به کار گرفته شده با این آزمایش متفاوت بود ولی درصد آلودگی ایجاد شده روی آفت در یک محدوده مشابهی قرار داشت. با دو بار

شدند. برای تهیه سوسپانسیون اسپور، آب مقطر استریل و توپین ۸۰ استریل ۰/۲ درصد به هر کدام از پتری‌دیش‌ها افزوده شدند و با گذراندن آن از پارچه توری استریل، ذرات اضافی و قطعات میسلیوم حذف شدند. اسپورها با استفاده از لام هموسیتومتر شمارش و غلظت 5×10^6 اسپور در میلی‌لیتر از هر جدایه تهیه شد. جوانه‌زنی اسپورها در محیط کشت PDA بیشتر از ۹۰ درصد بود.

تعیین بیمارگری جدایه‌های مختلف قارچ *L. muscarium*

بیمارگری جدایه‌های قارچ روی بالشک مرکبات با استفاده از ۹ جدایه *L. muscarium* با غلظت 5×10^6 اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر استریل به همراه توپین ۸۰ (۰/۲ درصد) تعیین شد. نهال‌های آلوده به پوره‌های سن اول بالشک با استفاده از سم‌پاش دستی از فاصله ۲۵-۱۵ سانتی‌متری محلول‌پاشی شدند. نهال‌های شاهد با آب مقطر استریل و توپین ۸۰ (۰/۲ درصد) محلول‌پاشی شدند. سپس نهال‌ها در گلخانه با دمای $23 \pm 4^\circ C$ و رطوبت نسبی ۸۵-۸۰ درصد نگهداری شدند.

نمونه‌برداری‌ها قبل از محلول‌پاشی و ۲ هفته پس از آن با برداشت ۴ برگ از هر نهال انجام شد. تعداد بالشک‌های زنده و مرده در زیر بینوکولر شمارش شدند. بالشک‌های مرده پس از ضدعفونی به روش بالا روی کاغذ صافی مرطوب داخل یک ظرف پتری قرار داده شدند تا از مرگ آن‌ها در اثر تیمار قارچ اطمینان حاصل شود. از هر تیمار ۴ تکرار انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. درصد مرگ‌ومیر آفت با استفاده از فرمول هندرسون - تیلتون تصحیح شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت و میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD مقایسه شدند.

نتایج و بحث

شناسایی جدایه‌های قارچ *L. muscarium*

کلونی قارچ در محیط کشت PDA نسبتاً فشرده، کرم یا زرد کمرنگ بود. قطر کلونی پس از ۱۰ روز در دمای ۲۵

اسپورپاشی قارچ *L. lecanii* با غلظت $10^6 \times 16$ اسپور در میلی‌لیتر روی شپشک (*Coccus viridis* Green (Hem.: شپشک) گزارش شد (Jayaraj, 1989).
 Coccidae) در هندوستان ۷۳/۱ درصد مرگ و میر آفت

جدول ۱- جدایه‌های مختلف قارچ *L. muscarium* جمع‌آوری شده از روی *Pulvinaria aurantii* و میانگین (\pm خطای استاندارد) درصد تلفات آنها روی آفت

Table 1. Different isolates of *Lecanicillium muscarium* collected from *Pulvinaria aurantii* and Mean (\pm SE) mortality percentage of them on pest

No. Isolate	Fungus Isolate	Host plant	Place of collection	Mortality (%)
1	<i>L. cf. muscarium</i>	<i>Citrus sinensis</i> var. Thompson	Tonekabon, Soleiman Abad	53.13 \pm 4.13 bc
2	<i>L. muscarium</i>	<i>Citrus sinensis</i> var. Siavaraz	Langroud, Leilakoh	44.13 \pm 7.86 c
3	<i>L. muscarium</i>	<i>Citrus sinensis</i> var. Siavaraz	Langroud, Komleh	52.82 \pm 2.81 bc
4	<i>L. cf. muscarium</i>	<i>Citrus sinensis</i> var. Thompson	Roudsar, Rahim Abad	51.88 \pm 2.99 bc
5	<i>L. muscarium</i>	<i>Citrus sinensis</i> var. Siavaraz	Ramsar, Katalom	43.19 \pm 7.97 c
6	<i>L. cf. muscarium</i>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Langroud, Liseroud	67.31 \pm 1.66 a
7	<i>L. cf. muscarium</i>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Kelachay, Rezamahalleh	62.56 \pm 1.75 ab
8	<i>L. muscarium</i>	<i>Citrus sinensis</i> var. Siavaraz	Abbas Abad, Seydmahalleh	61.31 \pm 2.19 ab
9	<i>L. cf. muscarium</i>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ramsar, Lapasar	58.56 \pm 4.70 ab

میانگین‌ها با حروف مشابه در ستون با هم تفاوت معنی‌دار ندارند (آزمون LSD, $P < 0.05$)

در بررسی دیگری تاثیر ۳ جدایه از قارچ *L. lecanii* با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر روی بالشک مرکبات بهترتیب ۴۷، ۴۳ و ۱۸ درصد آلودگی را گزارش کردند (Aghajanzadeh et al. 2008). همان‌طور که ملاحظه شد تفاوت گونه قارچ در این دو تحقیق، موجب اختلاف در درصد آلودگی آفت شده است.

به‌طور کلی نتیجه‌گیری می‌شود که قارچ *L. Muscarium* روی بالشک مرکبات بیمارگر بوده و با توجه به درصد تلفات بالای جدایه‌های مختلف آن روی آفت، می‌تواند به عنوان یک عامل میکروبی موثر در کاهش جمعیت آفت باشد.

REFERENCES

- Aghajanzadeh S, Farrokhi Sh, Mahdavian SE (2008) Investigation on possibility of biological control of *Pulvinaria* scale, *Pulvinaria auranti* Cockerelli, using *Cryptolaemus montrouzieri* and *Verticillium lecanii*. Final Report of Research Project, Iran Citrus Research Institute, Ramsar 40. (In Persian).
- Ahmadi K, Gholizadeh H, Ebadzadeh H, Hoseinpour R, Hatami F, Rezaei MM, Arab H, Kazmifard R, Abdeshah H, Sefidi H (2015) Agricultural statistics. Center for Information and Communication Technology, Tehran. (In Persian).
- Davachi AS (1949) Important pests of field crops and their control measures. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran. (In Persian).
- Esmaili M (1996) Important pests of fruit trees. Sepehr Publication Center, Tehran. (In Persian).
- Faria M, Wraight S (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides, a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43(3): 237–256.
- Gams W, Zare R (2002) New generic concepts in *Verticillium*, section *Prostrata*. *Mycological Research* 106(2): 129-131.
- Gonzales E, Martinez MA, Martinez B (1995) Effectiveness in vitro of *Verticillium lecanii* against *Planococcussp.* *Revista de Protection Vegetal* 10 (3): 265-268.
- Jafari MA, Mafi Sh (2000) Complementary investigation on biology and seasonal population dynamic of orange pulvinaria scale. Final Report of Research Project. Agricultural Research Center of Mazandaran, Sari. 28. (In Persian).
- Jayaraj S (1989) Integrated management of coffee green scale *Coccus viridis* (Hom.: Coccidae). *Journal of Plantation Crops* 16:195-201.
- Keriokhin GA (1947) Scale insects of fruit trees in Iran. *Journal of Plant Pests and Diseases* 9: 22-1.
- Mirabzadeh A, Moazemi N, Amirsadeqi S, Jafari MA (2000) The effect of the fungus *Verticillium lecanii* on orange pulvinaria scale, *Pulvinaria aurantii*, and its isolation from the pest. In: the 14th Iranian Plant Protection Congress, 4-7 September, University of Isfahan, Iran 330. (In Persian).
- Shabanian F, Dolati L, Aghajanzadeh S, Golein B (2011) Identification of the fungus *Lecanicillium muscarium* isolates biocontrol agent of orange pulvinaria scale, *Pulvinaria aurantii*. In: the First National Congress of Agricultural Science and New Technologies, 10-12 September, Zanjan University, Iran 608-610. (In Persian).
- Zare R, and Gams W (2001) A revision of *Verticillium* section *Prostrata*, III. Generic classification. *Nova Hedwigia* 72: 329-337.