



ارزیابی کارایی جدایه‌های بومی قارچ *Beauveria bassiana* در مهار زنجرک مهاجم *Orosanga japonica*

ریحانه غلامی قوام آباد^۱، سیده معصومه زمانی^{۲*}، یزدانفر آهنگران^۳، فرزانه کازرانی^۲ و ابراهیم زرقانی^۴

۱- دانش آموخته دکتری و محقق، بخش تحقیقات حمایت و حفاظت، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۲- *نویسنده مسوول: استادیار پژوهش، بخش تحقیقات حمایت و حفاظت، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران (mzamani@rifr-ac.ir)

۳- کارشناس ارشد، دفتر حفاظت و حمایت منابع طبیعی سازمان جنگل‌ها، مراتع و آبخیزداری کشور، چالوس، مازندران، ایران

۴- استادیار پژوهش، باغ گیاه شناسی نوشهر، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، نوشهر، مازندران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۷

چکیده

زنجرک *Orosanga japonica* آفت مهاجم و چندخوار در منطقه پالنارکتیک است که در سال ۱۳۸۹ از شمال ایران از روی درختان مرکبات جمع‌آوری شد. پوره‌ها و حشرات کامل این آفت با تغذیه از شیره گیاهی و ترشح زیاد عسلک به گیاهان مختلف خسارت اقتصادی وارد می‌کنند. علیرغم شیوه‌های مختلف مدیریتی، مهار موفقیت‌آمیز این آفت به دلیل رشد و تکثیر سریع آن دشوار است. در مطالعه حاضر، طی جنگل‌گردی در مناطق پراکنش این آفت در استان مازندران، لاروهایی که به قارچ آلوده بودند، مشاهده شدند. پس از بررسی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی، دو جدایه بومی قارچ بیمارگر حشرات (EPFs)، *Beauveria bassiana* شناسایی شد. این جدایه‌ها دارای پرگنه‌های سفید تا کرم رنگ با لبه‌های نامنظم و ظاهر پودری، ساختارهای زایشی و کنیدی‌هایی با ریخت‌شناسی، اندازه و رنگ معمول گونه‌ی *B. bassiana* بودند. شناسایی جدایه‌های قارچی با تکثیر و توالی‌یابی nrITS با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS1F انجام شد. تحلیل مقایسه‌ای توالی‌های ITS با توالی‌های نوکلئوتیدی پایگاه داده GenBank، شباهت ۹۹-۱۰۰ درصد با *B. bassiana* را نشان داد. کارایی دو جدایه بومی قارچ بیمارگر حشرات در برابر حشره کامل آفت مذکور در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر LC₅₀ جدایه‌ی ۱ و جدایه‌ی ۲ به ترتیب 1.0×10^6 و 3.3×10^6 کنیدی در میلی‌لیتر (روش غوطه‌وری برگ) و به ترتیب 1.0×10^6 و 5.4×10^6 (روش پاشش مستقیم) روی حشرات کامل زنجرک در شرایط آزمایشگاهی پس از ۹۶ ساعت از تیمار، در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰ درصد بود. یافته‌های این پژوهش می‌تواند برای ایجاد یک راه‌برد مدیریتی کارآمد در مهار آفت مهاجم *O. japonica* و ساخت قارچ کش بومی مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: ایران، جنگل‌های هیرکانی، زنجرک؛ زیست‌سنجی؛ قارچ بیمارگر حشرات

دبیر تخصصی: دکتر لاله ابراهیمی

مقدمه

جنگل‌های هیرکانی در دامنه‌های شمالی رشته کوه‌های البرز و در امتداد سواحل جنوبی دریای خزر واقع شده است. این جنگل‌ها به عنوان میراث طبیعی جهانی محسوب شده (Knapp, 2005) و منطقه‌ای با تنوع زیستی زیاد گونه‌های گیاهی در نیم کره شمالی است (Gutleb & Wieser, 2002). این جنگل‌ها ۱۵ درصد از کل جنگل‌های ایران و ۱/۱ درصد از مساحت کشور را تشکیل می‌دهند (Sagheb Talebi et al., 2014). جنگل‌های انبوه هیرکانی با قدمت بیش از یک میلیون سال، دارای رطوبت نسبی بالا، منابع ژنتیکی قابل توجه و صدها گونه‌ی بومی و گونه‌های منحصر به فرد است، بنابراین حفاظت از این جنگل‌ها حائز اهمیت است (Tohidifar et al., 2016; Alavi et al., 2020). پارک جنگلی سیسنگان به عنوان منابع طبیعی ایران، شامل بسیاری از گونه‌های گیاهی و جانوری بوده و جزو ذخایر منحصر به فرد گیاه بومی شمشاد هیرکانی *Buxus hyrcana* Pojark در ایران و خاورمیانه محسوب می‌شود. شمشاد هیرکانی یکی از درختان همیشه سبز بومی جنگل‌های هیرکانی شمال کشور می‌باشد؛ توده‌های خالص کمیاب شمشاد در سراسر این جنگل‌ها مشاهده می‌شود (Hamzeh'ee et al., 2008; Asadi et al., 2011).

زنجرک *Orosanga japonica* Melichar (Hemiptera: Ricaniidae) آفتی مهاجم و چندخوار^۱ در منطقه‌ی پالتارکتیک است که گسترش سریع داشته و آسیب جدی به طیف وسیعی از گیاهان مانند انگور، کیوی، چای، ذرت، کلم، بادمجان و انجیر می‌زند (Demir, 2018; Oztemir, 2014; Gokturk & Aksu, 2014; Cebir, 2016; Akiner et al., 2019; Biryol et al., 2021; Ismaylova, 2021). آفت مذکور در چین، ژاپن، کره، تایوان (Fang, 1989)، روسیه (Avidzba & Bobokhidze, 1982)، اوکراین، گرجستان (Demir, 2009; Arslangündoğdu & Hizal, 2019)، بلغارستان (Gjonov, 2011) و ایران (Mozaffarian, 2018) گسترده شده است. با توجه به گسترش جمعیت این گونه بر روی درختان باغی از جمله

انجیر، انگور و کیوی در شمال ایران (Mozaffarian, 2018) و وضعیت آفت در کشورهای مجاور، مهار آفت حائز اهمیت می‌باشد. بر اساس مطالعه اخیر (Karataş et al., 2020) این زنجرک در ترکیه به صورت تخم زمستان‌گذرانی می‌کند و دارای پنج سن پورگی می‌باشد. همچنین جمعیت بالای آفت روی ساقه‌ها و شاخه‌های جوان، مکیدن شیره گیاهان مختلف و تخم‌گذاری حشره کامل روی شاخه‌های جدید، باعث خشک شدن ساقه‌ها می‌شود. مهار زیستی مراحل بالغ و پوره *O. japonica* توسط گونه‌های پارازیتوئید (Tüfekli et al., 2021)، فرمولاسیون‌های زیستی قارچ *Beauveria bassiana* (Akiner et al., 2020; Biryol et al., 2022) Erper et al., 2021)، قارچ *Metarhizium brunneum* Petch (Biryol et al., 2021)، باکتری Berliner *Bacillus thuringiensis* (Göktürk, 2020) و عصاره‌های گیاهی (Guney et al., 2020; Akiner et al., 2020) چندین مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است، اگرچه برای ساخت آفتکش‌های بومی و مؤثرتر در جنگل‌های هیرکانی شمال کشور مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

یکی از ویژگی‌های کلیدی راه‌برد مدیریت یکپارچه جنگل^۲، تأکید بر روش‌های پایدار اکولوژیکی است که عمدتاً بر اساس اقدامات پیشگیرانه و مهار زیستی و در نهایت ابداع روش‌های پایدار با حداقل اختلالات زیست‌محیطی می‌باشد (Willoughby et al., 2004). قارچ‌های بیمارگر حشرات^۳ پتانسیل قابل توجهی در مهار زیستی آفات به ویژه در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات^۴ نشان داده‌اند (Lacey & Goettel, 1995). مطالعات متعددی نشان داده است که قارچ *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) یک عامل امیدبخش برای استفاده به عنوان حشره‌کش زیستی برای مهار برخی از آفات جنگل می‌باشد (Hicks, 2016; Olatinwo et al., 2018; Kovač et al., 2020; Alfina & Haneda, 2022). این قارچ با موفقیت در مهار آفات راسته Lepidoptera کاج در چین استفاده شده است (Li, 2007; Wang &

3- Entomopathogenic fungi (EPF)
4- Integrated Pest Management (IPM)

1- Polyphage
2- Integrated Forest Management (IFM)

سلسیوس، رطوبت نسبی 65 ± 10 درصد و دوره نوری ۱۲:۱۲ ساعت (روشنایی: تاریکی) نگهداری شدند.

شناسایی جدایه‌های قارچی

جدایه‌های قارچی مستقیماً از حشرات کامل زنجرک *O. japonica* روی درختچه‌های شمشاد جنگلی *B. hyrcana* از جنگل سیسنگان، استان مازندران جداسازی شدند. حشرات به صورت سطحی سترون شده و در انکوباتور تا ظهور میسلیم فعال در حال رشد، انکوبه شدند (Lacey & Brooks, 1979). میسلیم جدایه‌های قارچی روی محیط SDYA^۱ کشت شد (Odds, 1992) و سپس جدایه‌های قارچی در یک محیط‌های انتخابی حاوی ۴۰ گرم گلوکز، ۱۰ گرم پروتئوس پپتون^۲، ۱۵ گرم آگار، ۰/۰۱ گرم کریستال ویولت^۳، ۰/۲۵ گرم سیکلوهمگزامید^۴، ۰/۵ گرم کلرامفنیکل^۵ و یک لیتر آب مقطر کشت شدند (Doberski & Tribe, 1980). کشت‌های خالص از جدایه‌ها با جداسازی تک اسپور (کشت‌های مونوسپوریک^۶) به روش (Choi et al (1999) به دست آمد. جدایه‌های قارچی با استفاده از کلیدهای شناسایی ریخت‌شناسی (Barnett & Hunter, 1998)، به کمک میکروسکوپ نوری Olympus BX51 (Olympus, Japan) با بزرگنمایی 400x شناسایی شدند (Humber, 1998). دو جدایه *B. bassiana* در مجموعه قارچ‌های آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران نگهداری شدند. به منظور شناسایی دقیق‌تر، این دو جدایه با روش مولکولی شناسایی شدند.

روش‌های مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی

برای مطالعات مولکولی، DNA از میسلیم قارچی که به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در محیط کشت SDB (Sabouraud's Dextrose Broth) (حاوی ۲ درصد گلوکز^۷، ۰/۵ درصد پپتون^۸ و ۰/۵ درصد عصاره

(Feng, 2014). جدایه‌ای از این قارچ بومی آمریکای شمالی که از لارو *Choristoneura sp.* استخراج شد، در آزمون زیست‌سنجی آزمایشگاهی در مهار این آفت بسیار موثر بود (Hicks et al. (2007). بر اساس نتایج مطالعه Hicks et al. (2016)، فرمولاسیون روغنی قارچ *B. bassiana* در مهار آفت برگ‌خوار گیاهان جنگلی، *Choristoneura fumiferana* (Clemens) موثر عمل کرد و پیشنهاد شده است در مدیریت آینده این آفت تحت مدیریت یکپارچه آفات در آمریکای شمالی در نظر گرفته شود.

زنجرک *O. japonica* آفتی مهاجم بوده و از مناطق پراکنش، همچنان در حال گسترش به مناطق جدید و گیاهان میزبان جدید است، در نتیجه دانش پتانسیل مهار میکروبی با استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات، به مدیریت پایدار این آفت کمک خواهد کرد. لاروهای زنجرک *O. japonica* آلوده به قارچ *B. bassiana* توسط (Zamani et al. (2022) در مناطق پراکنش این آفت در استان مازندران گزارش شد. در ایران تا کنون از *B. bassiana* جهت مهار این آفت استفاده نشده است. در تحقیق حاضر دو جدایه بومی قارچ *B. bassiana* از زنجرک *O. japonica* که باعث مرگ و میر بالای این آفت در جنگل هیرکانی می‌شد، جداسازی شد و سپس تاثیر قارچ روی آفت به عنوان گام مهم در توسعه آفت‌کش‌های زیستی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش زنجرک *Orosanga japonica*

از اواسط اردیبهشت ماه تا اواخر تیر ماه سال ۱۴۰۰، جمعیت‌هایی از حشرات کامل زنجرک *O. japonica* از درختچه‌های آلوده شمشاد جنگلی *B. hyrcana* در جنگل سیسنگان، استان مازندران جمع‌آوری شدند (شکل ۱). حشرات کامل در اتاقک رشد در داخل ظروف سترون پلاستیکی مجهز به درپوش توری در دمای 25 ± 1 درجه

5- Chloramphenicol
6- Monosporic cultures
7- Glucose
8- Peptone

1- Sabouraud Dextrose Agar with yeast extract
2- Proteose peptone
3- Crystal violet
4- Cycloheximide

با نشانگر DNA Green Viewer (شرکت پارس توس) بارگذاری و سپس زیر نور UV مورد آزمون قرار گرفت. محصول PCR با مقدار مناسب از هر یک از دو آغازگر ITS1 و ITS4، جهت خالص‌سازی و انجام توالی‌یابی به شرکت ژنومیک پکن (BGI)، چین ارسال شد. در ادامه برای حصول اطمینان از صحیح بودن قطعه‌ی توالی‌یابی شده از ژن‌های مرتبط موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI، آزمون جست‌وجو بلاست (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) BLASTn انجام شد. پس از این جست‌وجو، توالی‌های مناسب و معتبر (بر اساس کیفیت، طول توالی‌ها و مقاله‌های منتشر شده مربوط به توالی‌ها) برای آنالیز فیلوژنتیکی و ترسیم درخت‌های فیلوژنتیکی انتخاب شدند.

مخمر^۱ کشت شده بود، استخراج شد. به منظور استخراج DNA، از محلول نمکی DNA مطابق روش Safaie et al. (2005) استفاده شد.

آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر نواحی internal transcriber spacers I و internal transcriber spacers II، ribosomal 5.8S Rna شامل (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و (5'- TCCCTCCGCTTATTGATATGC-3') بود (White et al., 1990). بعد از اتمام واکنش زنجیره پلیمرز (PCR)، جهت حصول اطمینان از موفقیت آمیز بودن واکنش و نیز اندازه نوار تکثیری در مقایسه با نشانگر استاندارد یک کیلو بازی، ۲ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز رنگ آمیزی شده،



شکل ۱- برخی از حشرات کامل زنجبرک *Orosanga japonica* Melichar جمع‌آوری شده از جنگل سیستان آلوده به قارچ بیماری‌گر حشرات *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

Figure 1. Some collected *Orosanga japonica* Melichar adults from Sisangan Forest Park, Mazandaran province infested with *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

تیمار شاهد از ۱ میلی لیتر آب مقطر سترون به همراه توین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) استفاده شد.

آزمون بیماری زایی در شرایط آزمایشگاهی

بعد از انجام آزمایش‌های مقدماتی و تعیین دزهای حداقل و حداکثر، سه دز مختلف کنیدی (شامل 1×10^5 ، 1×10^6 و 1×10^7 کنیدی در میلی لیتر) در آب مقطر سترون حاوی توین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) در صد تهیه شد. حساسیت حشرات کامل زنجریک به هر دو جدایه‌ی قارچ *B. bassiana* با روش غوطه‌وری برگ و پاشش مستقیم (Inanli et al., 2012; Guven et al., 2015) در آزمایشگاه بررسی شد. حشرات تیمار شده با آب مقطر حاوی توین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. آزمون در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 65 ± 10 درصد و دوره نوری ۱۲:۱۲ ساعت (روشنایی: تاریکی) داخل اتاقک رشد انجام شد.

برای آزمون زیست‌سنجی به روش غوطه‌ور شدن برگ، شاخه‌های شمشاد جنگلی *B. hyrcana* با برگ جمع‌آوری شد و مورد استفاده قرار گرفت. شاخه‌ها به طول ۱۰ سانتی متر با تعداد ۷-۵ برگ به مدت ۵ ثانیه در سوسپانسیون حاوی کنیدی‌ها و محلول توین ۸۰ غوطه‌ور شدند و سپس به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. برای جلوگیری از خشک شدن، یک تکه پنبه که با آب مقطر مرطوب شده بود، در کف ظروف شیشه‌ای به ابعاد $16 \times 10 \times 5$ سانتی متر قرار داده شد و شاخه‌هایی با برگ در بالای پنبه قرار داده شد. درپوش‌های این ظروف با پارچه توری پوشیده شده تا عمل تهویه به سهولت انجام گیرد. سپس حشرات کامل زنجریک (به طور جداگانه) برای آزمایش در ظروف شیشه‌ای قرار داده شدند.

برای آزمون زیست‌سنجی به روش پاشش مستقیم، ابتدا پنبه‌ای که با آب مقطر مرطوب شده بود در کف ظروف شیشه‌ای سترون شده به ابعاد $16 \times 10 \times 5$ سانتی متر قرار داده شد. برگ‌ها همراه با شاخه‌ها در بالای پنبه قرار گرفت تا از خشک شدن آنها جلوگیری شود. یک میلی لیتر از سوسپانسیون هر غلظت (شامل همان مقدار کنیدی) روی

توالی‌های تبدیل شده به فرمت FASTA با استفاده از نرم‌افزار ClustalX با فراسنجه‌های تعریف شده‌ی پیش فرض خود نرم‌افزار، همردیف‌سازی شدند. پس از همردیف‌سازی برای اصلاح دو انتهای توالی‌ها، ویرایش و حذف نواحی مبهم موجود در همردیف‌ها از روش چشمی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 (Tamura et al., 2013) استفاده شد. درخت فیلوژنتیکی اولیه بر اساس مدل فاصله‌ی ژنتیکی Tamura-Nei^۱ و با روش پیوست همسایه‌ها^۲ با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 ترسیم و درخت نهایی با استفاده از نرم‌افزار CorelDRAW version 2017، به صورت گرافیکی ترسیم شد. بعد از انجام شناسایی نهایی و مطالعه‌ی موقعیت جدایه‌ها بر روی درخت فیلوژنی، توالی‌های به دست آمده به پایگاه NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) جهت استفاده عموم و دریافت رس‌شمار مربوطه ارسال گردید.

آماده‌سازی اسپور برای آزمون زیست‌سنجی

جدایه‌های به دست آمده به مدت ۱۴ روز روی محیط کشت SDYA در دمای 24 ± 1 درجه سلسیوس کشت شدند. کنیدی‌های جدید قارچ از سطح تشتک پتری برداشته شد و به داخل آب مقطر سترون حاوی توین ۸۰ (۰/۰۵ درصد)، به لوله‌های فالكون ۵۰ میلی لیتری سترون اضافه شد و سپس سوسپانسیون حاصل از کاغذ صافی واتمن سترون^۴ عبور داده شد. غلظت کنیدی‌ها با استفاده از لام گلبول‌شمار (نوبائتر) زیر میکروسکوپ نوری تعیین شد و سوسپانسیون‌های اولیه با غلظت 1×10^7 کنیدی در میلی لیتر تهیه شدند (Ferron, 1978). جهت اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی اسپورها، مرکز تشتک‌های پتری ۹ سانتی متری حاوی محیط کشت SDYA با ۲ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور تلقیح شد. بعد از گذشت ۱۲ ساعت، سه قسمت از تشتک‌های پتری مشخص و تعداد ۱۰۰ کنیدی به صورت تصادفی شمارش و درصد جوانه‌زنی محاسبه گردید. سایر غلظت‌های مورد استفاده در آزمایش شامل 10^5 و 10^6 کنیدی در میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه به دست آمد. برای

و جدایه ۲ گونه *B. bassiana* (با کد کلکسیون N2 و رس‌شمار OP482240) توالی‌یابی شدند. جست‌وجوی BLAST نشان داد که توالی جدایه ۱ دارای ۱۰۰ درصد شباهت^۵ با سه جدایه از گونه *B. bassiana* (با رس‌شمار KX858861، KT280276، ON386271) (E value=0.0) و ۹۹/۸۰ درصد شباهت با دو جدایه شناسایی شده از این گونه (با رس‌شمار MN122432 و MK490863) (E value=0.0) بود. توالی جدایه ۲ دارای ۱۰۰ درصد شباهت با جدایه‌ای از گونه *B. bassiana* (با رس‌شمار MW113318) و ۹۹/۸۰ درصد شباهت با سه جدایه شناسایی شده از این گونه (با رس‌شمار ON386271، KT280276، KX858861) (E value=0.0) بود. درخت ITS دو جدایه‌ی گونه *B. bassiana* جداسازی شده از زنجریک *O. japonica* (شکل ۲) بر اساس ۲۳ توالی درون‌گروهی^۶ و یک توالی برون‌گروهی^۷ ایجاد شد. در این درخت، جدایه ۱ گونه *B. bassiana* (با رس‌شمار OP482184) با جدایه‌ای از گونه مذکور (با رس‌شمار MT350119) که از زنجریک *O. japonica* از کشور ترکیه جداسازی شده است (Akmer et al., 2020) در یک تبار قرار گرفت. دیگر اعضای این تبار، سایر جدایه‌های این گونه (با رس‌شمار MG345082 و MW113318) هستند و جدایه ۲ گونه *B. bassiana* (با رس‌شمار OP482240) تبار خواهری آنها است. آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌های بومی گونه *B. bassiana* به روش پیوست همسایه‌ها نشان داد فیلوژنی در این مطالعه، شبیه توپولوژی درخت ITS توسط Rehner et al. (2011) و همچنین Bich et al. (2021) است.

آزمون بیماری زایی در شرایط آزمایشگاهی

آزمون زیست‌سنجی آزمایشگاهی دو جدایه بومی قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* روی حشرات کامل زنجریک *O. japonica* نشان داد که هر دو جدایه قارچ بیمارگر قادر به آلوده کردن حشره کامل زنجریک مذکور بودند و درصد مرگ و میر با افزایش زمان در معرض قرار

حشرات کامل با اسپری دستی (به حجم ۱۰ میلی‌لیتر) به فاصله ۱۵ سانتی‌متر پاشیده شد. هر بار قبل از استفاده، اسپری‌ها بین آزمایش‌ها با الکل ۹۵ درصد سترون شدند. سپس حشرات کامل زنجریک تیمار شده (به طور جداگانه) داخل ظروف شیشه‌ای قرار گرفت. هر دو جدایه قارچ در دزهای مختلف کنیدی به دو روش زیست‌سنجی آزمایش شد. برای هر تیمار از ۲۵ حشره کامل زنجریک استفاده شد و آزمایش در ۴ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD)^۱ انجام شد. مرگ و میر حشرات کامل به صورت روزانه به مدت ۱۴۴ ساعت ثبت گردید. لاروهای مرده، با آب سترون شسته شدند، روی صفحات دکستروز آگار سیب زمینی (PDA) قرار گرفتند و به مدت ۲ هفته در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس در تاریکی انکوبه شدند. میزان آلودگی در تمام نمونه‌ها پس از آزمایش مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج به دست آمده از تیمارهای مختلف آزمایش به کمک نرم افزار SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه واریانس شده و سپس مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام گردید. همچنین برای محاسبه LC_{50}^2 ، LC_{90}^3 جدایه‌های قارچ و همچنین مقادیر LT_{50}^4 از آنالیز پروبیت نرم افزار SPSS استفاده شد.

نتایج و بحث

جدایه‌های قارچی

دو جدایه‌ی قارچی از حشرات کامل زنجریک *O. japonica* از روی درختچه‌های شمشاد جنگلی *B. hyrcana*، از جنگل سیسنگان، استان مازندران به عنوان گونه *B. bassiana* شناسایی شدند.

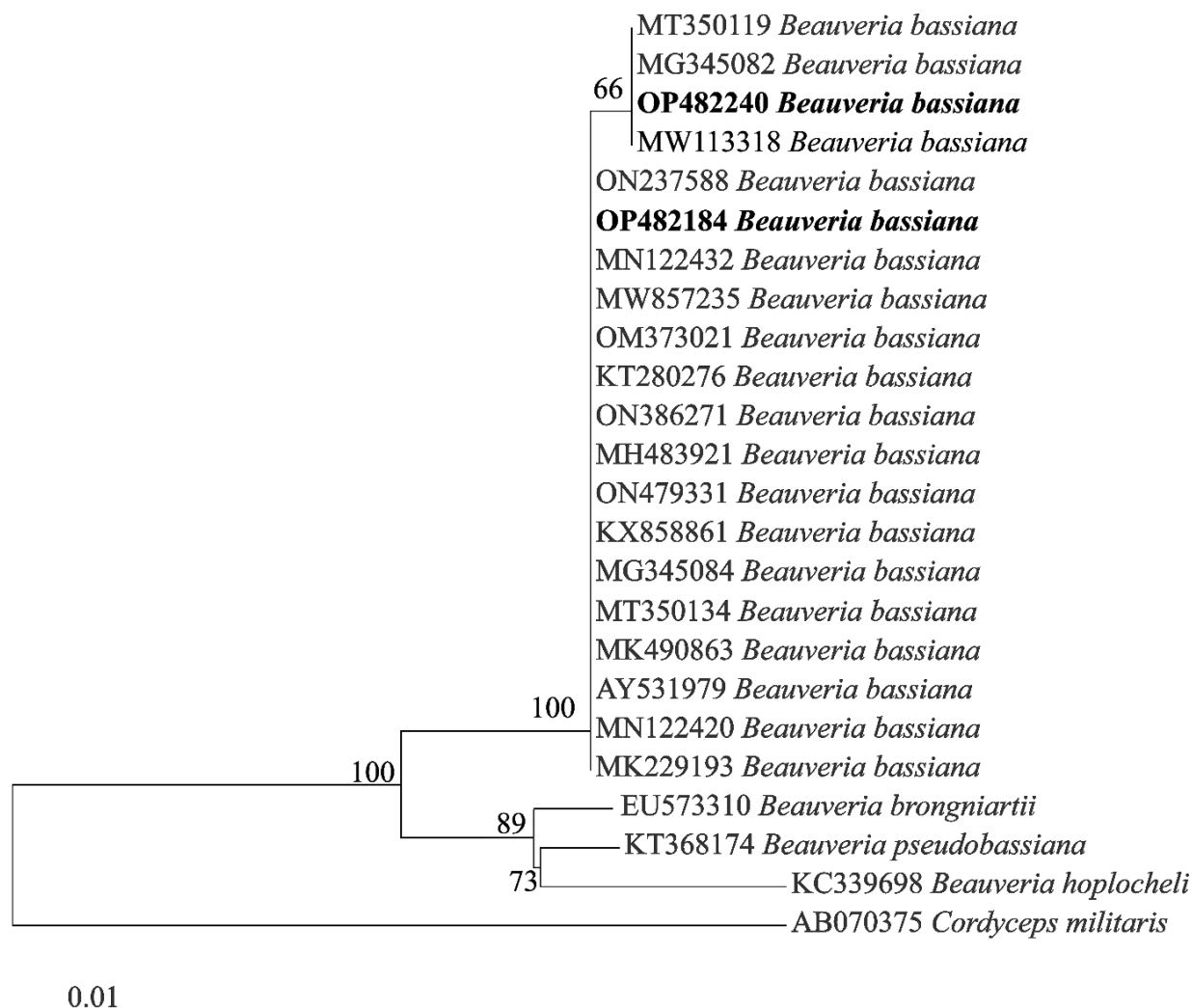
برای آنالیز مولکولی و فیلوژنتیکی دو قطعه به طول ۵۰۱ جفت باز (bp) از ناحیه ITS مربوط به جدایه ۱ گونه *B. bassiana* (با کد کلکسیون N1 و رس‌شمار OP482184)

5- Identity
6- Ingroup
7- Outgroup

1- Complete randomized design
2- Median Lethal Concentration
3- Lethal Concentration for 90% mortality
4- Median Lethal Time

آزمون زیست‌سنجی غلظت- مرگ و میر در مطالعه Erper et al. (2022) تفاوت آماری معنی‌داری را بین جدایه‌های *B. bassiana* آزمایش شده در برابر حشرات کامل *O. japonica* نشان داد ($P < 0.05$). در این مطالعه جدایه‌های قارچی باعث مرگ و میر ۱۰۰٪ حشرات کامل زنجربک طی ۵ روز شدند، در حالی که مرگ و میر در گروه شاهد کمتر از ۱۰٪ بود.

گرفتن و غلظت قارچ افزایش یافت (شکل ۳). تلفات در گروه شاهد بسیار کم بود و رشد قارچی روی لاروهای شاهد مرده مشاهده نشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها اختلاف معنی‌داری را بین جدایه‌های قارچی ($P < 0.0001$) و غلظت‌های قارچ ($P < 0.0001$) در هر دو روش غوطه‌وری برگ (جدول ۱) و پاشش مستقیم (جدول ۲) نشان داد. اثرهای متقابل این فاکتورها نیز معنی‌دار بود ($P < 0.0001$).



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی بازسازی شده بر اساس ناحیه‌ی Internal transcribed spacer of rDNA (ITS) برای دو جدایه‌ی ایرانی *Orosanga japonica* Melichar (*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin) جداسازی شده از زنجربک (*Orosanga japonica* Melichar) (این دو توالی به صورت پررنگ نشان داده شده است) بر اساس مدل فاصله ژنتیکی Tamura-Nei و روش پیوست همسایه‌ها. ارزش پشتیبان بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار انجام شده است.

Figure 2. Phylogenetic tree inferred using the Internal transcribed spacer of rDNA (ITS) sequences of two Iranian isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin from *Orosanga japonica* Melichar (The sequences of the Iranian isolates of *Beauveria bassiana* are indicated in bold). The analysis was based on the neighbor-joining algorithm using the Tamura-Nei genetic distance model, with bootstrap support estimated from 1000 repetitions

جدول ۱- نتایج آزمون تحلیل واریانس تاثیر دو جدایه قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin بر روی حشرات کامل زنجرک *Orosanga japonica* Melichar به روش غوطه‌وری برگ، ۱۴۴ ساعت پس از تیمار در شرایط آزمایشگاهی

Table 1. Analysis of variance results for *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates treatment effects on the adults of *Orosanga japonica* Melichar using the leaf dipping method in 144 h post treatment under laboratory bioassays

| Source | df | Sum of squares | Mean square | F value | Pr>F |
|-------------------------|----|----------------|-------------|---------|---------|
| Model | 7 | 45054.37 | 6436.33 | 2860.60 | <0.0001 |
| Error | 32 | 72.00 | 2.25 | | |
| Corrected Total | 39 | 45126.37 | - | - | - |
| Isolate | 1 | 275.62 | 275.62 | 122.50 | <0.0001 |
| Concentration | 3 | 44651.87 | 14883.95 | 6615.09 | <0.0001 |
| Isolate × Concentration | 3 | 126.87 | 42.29 | 18.80 | <0.0001 |

Concentration: control, 10^5 , 10^6 and 10^7 conidia ml⁻¹

جدول ۲- نتایج آزمون تحلیل واریانس تاثیر دو جدایه قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin بر روی حشرات کامل زنجرک *Orosanga japonica* Melichar به روش پاشش مستقیم، ۱۴۴ ساعت پس از تیمار در شرایط آزمایشگاهی

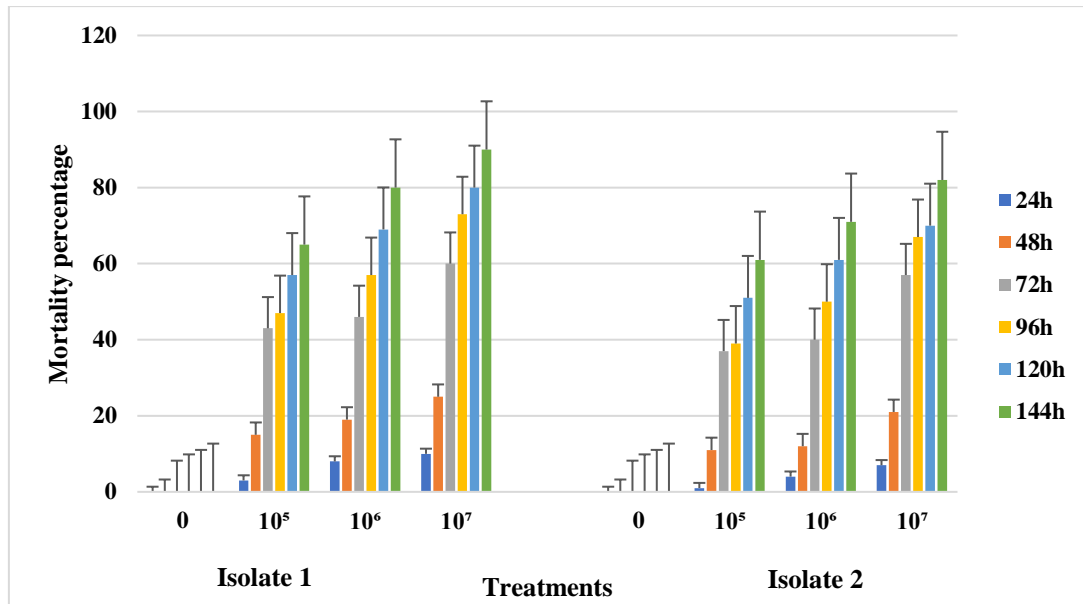
Table 2. Analysis of variance results for *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates treatment effects on the adults of *Orosanga japonica* Melichar using the direct spraying method in 144 h post treatment under laboratory bioassays

| Source | df | Sum of squares | Mean square | F value | Pr>F |
|--------------------------|----|----------------|-------------|---------|---------|
| Model | 7 | 51110.00 | 7301.42 | 3650.71 | <0.0001 |
| Error | 32 | 64.00 | 2.00 | | |
| Corrected Total | 39 | 51174.00 | - | - | - |
| Isolates | 1 | 122.50 | 122.50 | 61.25 | <0.0001 |
| Concentration | 3 | 50940.00 | 16980.00 | 8490.00 | <0.0001 |
| Isolates × Concentration | 3 | 47.50 | 15.83 | 7.92 | 0.0004 |

Concentration: control, 10^5 , 10^6 and 10^7 conidia ml⁻¹

و میر ۴۳ درصد حشرات کامل پس از ۱۴ روز در شرایط صحرائی به همراه داشت. در پژوهش دیگر، جدایه بومی ترکیه *B. bassiana* KTU-24 به منظور تولید انبوه و فرمولاسیون علیه زنجرک *O. japonica* مورد مطالعه قرار گرفت. این جدایه موجب مرگ و میر بیش از ۹۷ درصد پوره‌ها و حشرات کامل زنجرک در شرایط صحرائی شد و اثربخشی بالاتری نسبت به ترکیبات تجاری مشابه در غلظت 10^8 اسپور در میلی لیتر و ۲۰ روز پس از تیمار نشان داد (Biryol et al., 2021). ملاحظات ایمنی محیطی و پایداری زیست بوم منجر به این نتیجه می شود که استفاده از جدایه‌های بومی عوامل مهار زیستی یک آفت در یک منطقه در برنامه مهار میکروبی حائز اهمیت است (Lockwood, 1993). در مطالعه حاضر، هر دو جدایه قارچی ارزیابی شده در شرایط آزمایشگاهی باعث کاهش میزان بقای حشرات کامل زنجرک *O. japonica* شدند (شکل ۳ و ۴).

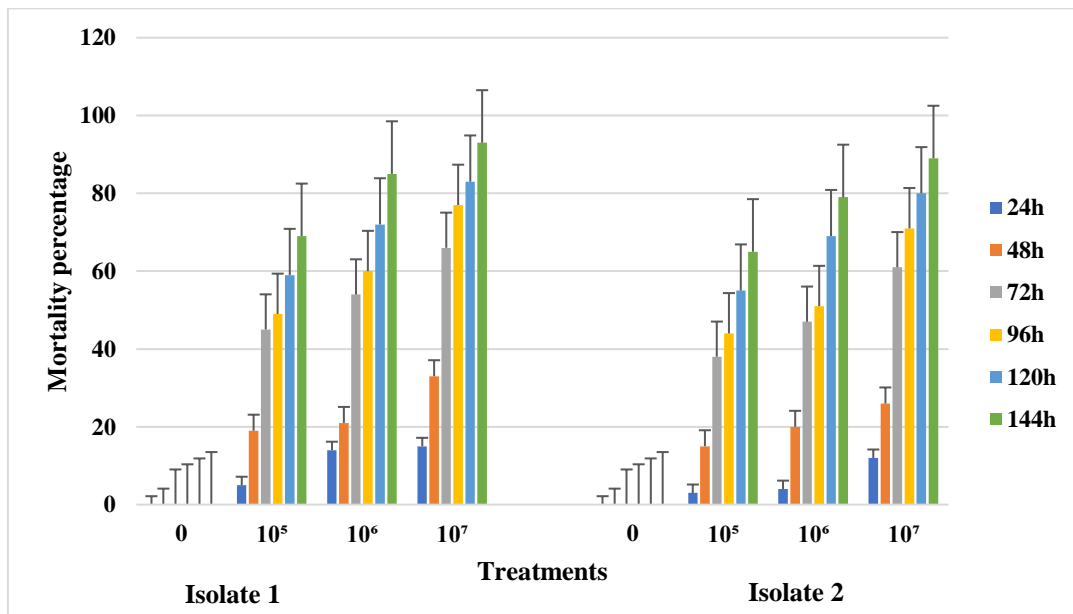
پژوهش‌های پیشین نیز قابلیت بالای قارچ‌های بیمارگر حشرات و موثرترین آن‌ها دو قارچ *B. bassiana* و *Metarhizium anisopliae* را به عنوان یک جایگزین مؤثر برای مهار شیمیایی آفات نشان داده است (Vilas Boas et al., 1996; Moino et al., 1998; Lawrence & Khan 2002; Wakil & Ghazanfar, 2010; Abdel-Raheem et al., 2015). در سال‌های اخیر برخی مطالعات نشان می دهد که قارچ‌های بیمارگر حشرات می توانند به مهار جمعیت زنجرک‌های آفت^۱ در زیست‌بوم‌های کشاورزی و مناطق طبیعی کمک کنند (Wang et al., 2018; Akiner et al., 2019; Clifton et al., 2020; Biryol et al., 2021; Erper et al., 2022). از جمله کاربرد قارچ کش تجاری شده بر اساس سویه *B. bassiana* GHG بر روی جمعیت زنجرک *Lycorma delicatula* (White) در یک پارک عمومی در جنوب شرقی پنسیلوانیا توسط Clifton et al. (2020) نتایج موفقیت آمیز، شامل مرگ



Concentration: control, 10⁵, 10⁶ and 10⁷ conidia ml⁻¹
 Time: 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours

شکل ۳- درصد مرگ و میر دو جدایه قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin بر حشرات کامل *Orosanga japonica* Melichar در روش غوطه‌وری برگ، دمای ۲۵ درجه سلسیوس (میانگین ± SE)

Figure 3. Mortality percentage of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for the adults of *Orosanga japonica* Melichar in leaf dipping method at 25°C (Mean ± SE)



Concentration: control, 10⁵, 10⁶ and 10⁷ conidia ml⁻¹
 Time: 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours

شکل ۴- اثربخشی دو جدایه قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin بر حشرات کامل *Orosanga japonica* Melichar در روش پاشش مستقیم، دمای ۲۵ درجه سلسیوس (میانگین ± SE)

Figure 4. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for the adults of *Orosanga japonica* Melichar in direct spraying method at 25°C (Mean ± SE)

این زنجریک در غلظت 1×10^8 کنیدی در میلی‌لیتر داشتند. نتایج مشابهی توسط Biryol et al. (2021) به دست آمد که نشان داد جدایه *B. bassiana* KTU-24 به ترتیب باعث مرگ و میر $92/33$ و $94/88$ درصد پوره‌ها و حشرات بالغ زنجریک *O. japonica* در غلظت 10^9 کنیدی در میلی‌لیتر، ۱۰ روز پس از تیمار شد. مطالعات دیگر نشان داده است که جدایه *B. bassiana* GHA و جدایه‌های دیگر کمترین تأثیر را بر حشرات مفید از جمله پارازیتوئیدها و شکارگرهای عمومی داشته‌اند (Zhu & Kim 2012; Herrick & Cloyd 2017; Martínez-Barrera et al., 2019).

مقادیر LC_{50} و LC_{90} جدایه‌های قارچی علیه حشرات کامل زنجریک در مطالعه حاضر، ۹۶ ساعت پس از تیمار در جدول ۳ ارائه شده است. کمترین مقدار LC_{50} برای جدایه ۱ در روش پاشش مستقیم ($10^6 \times 3/3$ کنیدی در میلی‌لیتر) به دست آمد، در حالی که بالاترین مقدار برای جدایه ۲ در روش غوطه‌وری برگ ($10^6 \times 5/4$ کنیدی در میلی‌لیتر) به دست آمد. نتایج نشان داد در غلظت 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر، کمترین مقدار LT_{50} برای جدایه ۱ در روش پاشش مستقیم، $84/32$ ساعت است (جدول ۴). نتایج پژوهش Akiner et al. (2019) نشان داد که در غلظت 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر، کمترین مقدار LT_{50} در حشرات کامل این زنجریک، برای جدایه ۱، در روش پاشش مستقیم، $3/02$ روز و برای جدایه ۲، $3/15$ روز بود، که تقریباً مشابه نتایج پژوهش ما می‌باشد.

در روش پاشش مستقیم، جدایه ۱ و ۲ قارچ *B. bassiana* در غلظت $10^7 \times 1$ کنیدی در میلی‌لیتر، ۱۴۴ ساعت پس از تلقیح، به ترتیب باعث مرگ و میر $93/0$ و $89/0$ حشرات کامل زنجریک و در روش غوطه‌وری برگ، در همین غلظت و زمان، به ترتیب باعث مرگ و میر $90/0$ و $82/0$ حشرات کامل زنجریک شد (شکل ۳ و ۴). نتایج نشان داد که جدایه ۱ قارچ *B. bassiana* نسبت به جدایه ۲ بیماری‌زاتر و روش پاشش مستقیم موثرتر از غوطه‌وری برگ است (شکل ۳ و ۴). این نتایج با گزارش Akiner et al. (2019) که دو جدایه بومی *B. bassiana* را روی زنجریک *O. japonica* در ترکیه جداسازی و در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند، مطابقت دارد؛ نتایج آنها نشان داد که در غلظت $10^6 \times 1$ کنیدی در میلی‌لیتر و ۹ روز پس از تلقیح، جدایه ۱ باعث مرگ و میر $96/0-94/0$ حشرات کامل زنجریک و جدایه ۲ باعث مرگ و میر $93/0-89/0$ آفت شد. بر اساس نتایج آنها، این دو جدایه به طور بالقوه می‌توانند برای مدیریت یکپارچه آفت *O. japonica* به عنوان یک عامل مهار زیستی میکروبی استفاده شوند، همچنین پیشنهاد کردند اثرات سمی آنها بر حشرات مفید مانند زنبورهای عسل تعیین شود. در پژوهشی دیگر، ۱۴ جدایه بومی قارچ *B. bassiana* به روش مولکولی شناسایی شد و بیماری‌زایی آنها در برابر حشرات کامل زنجریک *O. japonica* در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آنها نشان داد که همه جدایه‌ها اثر کشنده‌ای روی حشرات بالغ

جدول ۳- مقادیر LC_{50} و LC_{90} دو جدایه قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin بر روی حشرات کامل زنجریک *Orosanga japonica* Melichar به دو روش غوطه‌وری برگ و پاشش مستقیم، ۹۶ ساعت پس از تیمار

Table 3. LC_{50} and LC_{90} values of two *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates on the adults of *Orosanga japonica* Melichar using the leaf dipping method and the direct spraying method, at 96 h post-treatment

| Fungi | N | X ² (df=2) | P-value | Intercept±SE | Slope±SE | LC ₅₀ | LC ₉₀ |
|---------------------------|-----|-----------------------|---------|--------------|-----------|--|--|
| Isolate 1-leaf dipping | 100 | 75.366 | 0.000 | -0.45±0.07 | 0.00±0.00 | 4.0×10^6 (2.9×10^6 - 5.4×10^6) | 1.5×10^7 (1.2×10^7 - 2.0×10^7) |
| Isolate 1-direct spraying | 100 | 80.72 | 0.000 | -0.41±0.07 | 0.00±0.00 | 3.3×10^6 (2.3×10^6 - 4.5×10^6) | 1.3×10^7 (1.1×10^7 - 1.8×10^7) |
| Isolate 2-leaf dipping | 100 | 60.57 | 0.000 | -0.59±0.08 | 0.00±0.00 | 5.4×10^6 (4.2×10^6 - 7.1×10^6) | 1.7×10^7 (1.3×10^7 - 2.3×10^7) |
| Isolate 2-direct spraying | 100 | 65.16 | 0.000 | -0.54±0.07 | 0.00±0.00 | 4.7×10^6 (3.5×10^6 - 6.1×10^6) | 1.5×10^7 (1.2×10^7 - 2.0×10^7) |

جدول ۴- مقادیر LT_{50} و LT_{90} دو جدایه قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin بر روی حشرات کامل زنجبرک *Orosanga japonica* Melichar به دو روش غوطه وری برگ و پاشش مستقیم، در غلظت 10^6 کنیدی در میلی لیتر

Table 4. LT_{50} and LT_{90} values of two *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates on the adults of *Orosanga japonica* Melichar using the leaf dipping method and the direct spraying method, at 10^6 conidia ml⁻¹

| Fungi | N | X ² (df=5) | P-value | Intercept± SE | Slope±SE | LT ₅₀ (hours) | LT ₉₀ (hours) |
|---------------------------|-----|-----------------------|---------|---------------|-----------|--------------------------|---------------------------|
| Isolate 1-leaf dipping | 100 | 11.89 | 0.000 | -1.81±0.12 | 0.02±0.00 | 91.62 (86.09-97.45) | 156.47 (146.34-169.31) |
| Isolate 1-direct spraying | 100 | 15.31 | 0.000 | -1.65±0.12 | 0.02±0.00 | 84.32 (78.82-89.99) | 149.55 (139.83-161.79) |
| Isolate 2-leaf dipping | 100 | 16.23 | 0.000 | -1.97±0.13 | 0.01±0.00 | 103.41 (97.50-109.95) | 170.51 (158.88-185.60) |
| Isolate 2-direct spraying | 100 | 16.64 | 0.000 | -1.88±0.13 | 0.02±0.00 | 93.98 (88.49-99.80) | 157.74 (147.63-170.58) |

پژوهش، اثربخشی این جدایه‌ها در ترکیب با حشره‌کش‌ها و همچنین تاثیر جانبی این جدایه‌ها روی ارگانسیم‌های مفید در مناطق آلوده به آفت *O. japonica* انجام شود تا بتوان راهبردهای مناسبی را اتخاذ نمود.

سپاس‌گزاری

این پژوهش بخشی از نتایج پروژه تحقیقاتی انجام یافته در موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور می باشد؛ بدینوسیله نویسندگان کمال تشکر و قدردانی را از مساعدت‌ها و حمایت‌های مالی موسسه و همچنین اداره کل منابع طبیعی و آبخیزداری استان مازندران-نوشهر به سبب همکاری بیدریغ و خالصانه در اجرای تحقیق دارند.

مطالعه حاضر قابلیت استفاده از دو جدایه بومی قارچ *B. bassiana* به ویژه جدایه ۱ را برای مهار زیستی آفت *O. japonica* در مناطق طغیان آفت برجسته می‌کند. به طور کلی با افزایش کاربرد جدایه‌های بومی این قارچ در برنامه کنترل تلفیقی آفات، شاید بتوان در طول زمان مصرف حشره‌کش‌های شیمیایی را تا حد زیادی کاهش داد. مطالعات بیشتری برای تعیین اینکه آیا جدایه‌های بومی *B. bassiana* می‌توانند با موفقیت برای مهار زیستی پوره‌ها و حشرات بالغ این زنجبرک در شرایط صحرائی مورد استفاده قرار گیرند، مورد نیاز است. علاوه بر این، پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده روی روش‌های فرمولاسیون دو جدایه‌ی بومی حاصل از این

References

Abdel-Raheem, M. A., Ismail, I. A., Abdel-Rahman, R. S., Abdel-Rhman, I. E., & Naglaa Reyad, F. (2015). Efficacy of three entomopathogenic fungi on tomato leaf miner, *Tuta absoluta* in tomato crop in Egypt. *Swift journals of Agricultural Research*, 1(2), 015-020.

Akiner, M. M., Öztürk, M., Güney, E., & Usta, A. (2020). Natural infection potential and efficacy of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against *Orosanga japonica* (Melichar). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 30(68), 2-9. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00269-2>

Akiner, M. M., Beris, F.S., Seyis, F., Ozturk, M., Sevgili, H., & Demir, E. (2019). Annual variation of the *Orosanga japonica* Melichar 1898 (Hemiptera: Ricaniidae) populations in the eastern Black Sea region of Turkey and possible molecular separation with based on 28S rDNA sequences from other Ricaniidae groups. *Plant Protection Bulletin*, 59(4), 11-19.

Alavi, S. J., Veiskarami, R., Esmailzadeh, O., & Gadow, K. V. (2020). Analyzing the biological and structural diversity of Hyrcanian forests dominated by *Taxus baccata* L. *Forests*, 11(6), 701.

Alfina, T., & Haneda, N. F. (2022). Entomopathogenic fungi as biological agents in forest plant pest control: A systematic review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 959, 012013. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/959/1/012013>

- Arslangündoğdu, Z., & Hizal, E. (2019). New distribution area and host plants for invasive alien insect species, *Orosanga japonica* (Melichar) in Turkey (Hemiptera: Ricaniidae). *Journal of the New York Entomological Society*, 124, 26-30. <https://doi.org/10.1664/1947-5136-124.1.26>
- Asadi, H., Hosseini, S. M., Esmailzadeh, O., & Ahmadi, A. (2011). Flora, life form and chorological study of Box tree (*Buxus hyrcana* Pojark.) sites in Khybus protected forest, Mazandaran. *Journal of Plant Biology*, 3, 27-40.
- Avidzba, N. S., & Bobokhidze, Z. M. (1982). Biophenology of the Japanese leafhopper. *Zashchita Rastenii*, 6, 1-36 (in Russian, English summary).
- Barnett, H.L. & Hunter, B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4nd ed). Amer Phytopathological Society, (pp. 1–59).
- Bich, G. A., Castrillo, M. L., Kramer, F. L., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2021). Morphological and molecular identification of entomopathogenic fungi from agricultural and forestry crops. *Conservation of Nature, Floresta e Ambiente*, 28(2), e20180086. <https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2018-0086>.
- Biryol, S., Güney, E., Eski, A., Bayramoglu, Z., Sezen, K., Demirbag, Z., & Demir, I. (2021). Development of mycoinsecticide formulations with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum* for the control of *Orosanga japonica* (Hemiptera: Ricaniidae). *Annals of Applied Biology*, 179(3), 319-330. <https://doi.org/10.1111/aab.12699>
- Cebir, Y. (2016). *Determining of the Ricania japonica population structure that dispersed east Black Sea region and analysis of the systematic situation by molecular methods*. [MSc thesis, Recep Tayyip Erdogan University Graduate School of Natural and Applied Sciences, Rize, 61pp].
- Choi, Y. W., Hyde, K. D., & Ho, W. H. (1999). Single spore isolation of fungi. *Fungal Divers*, 3, 29-38.
- Clifton, E. H., Hajek, A. E., Jenkins, N. E., Roush, R. T., Rost, J. P., & Biddinger, D. J. (2020). Applications of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) to control populations of spotted lanternfly (Hemiptera: Fulgoridae), in Semi-Natural Landscapes and on Grapevines. *Environmental Entomology*, 49(4), 854-864. <https://doi.org/10.1093/ee/nvaa064>
- Demir, E. (2009). *Ricania* Germar, 1818 species of Western Palaearctic Region (Hemiptera: Fulgoromorpha: Ricaniidae). *Munis Entomology & Zoology Journal*, 4(1), 271-275.
- Demir, E. (2018). The economically important alien invasive planthoppers in Turkey (Hemiptera: Fulgoromorpha). *Acta Entomologica Slovenica*, 26(2), 231-240.
- Doberski, J. W., & Tribe, H. T. (1980). Isolation of entomogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 74, 95-100.
- Erper, I., Ak, K., Turkkan, M., Yildirim, E., Alkan, M., & Ozer, G. (2022). Potential of Turkish *Beauveria bassiana* isolates for the management of the polyphagous planthopper, *Orosanga japonica* Melichar 1898 (Hemiptera: Ricaniidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32, 104. <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00604-9>
- Fang, S. J. (1989). Flatidae of Taiwan (Homoptera: Fulgoroidea). *Journal of the National Taiwan Museum*, 8, 117-152.
- Ferron, P. (1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23, 409-42. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.23.010178.002205>.

- Gjonov, I. (2011). *Ricania japonica* Melichar, 1898 a representative of family Ricaniidae (Homoptera, Fulgoromorpha), new to the fauna of Bulgaria. *ZooNotes*, 23, 1-3.
- Gokturk, T., & Aksu, Y. (2014). Morphology, biology and damage of *Ricania simulans* (Walker, 1851) (Hemiptera: Ricaniidae), which harms agricultural and forest areas. *Forest Entomology and Pathology Symposium, Antalya*, 279-281 (Turkish).
- Göktürk, T. (2020). Bazı Entomopatojenlerin *Orosanga japonica* (Melichar, 1898) (Hemiptera: Ricaniidae) Üzerindeki Öldürücü Etkilerinin Belirlenmesi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 7(3), 305-314. <https://doi.org/10.19159/tutad.771088>
- Gutleb, B., & Wieser, C. (2002). Ergebnisse einer zoologischen Exkursion in den Nordiran. *Results of Zoological Excursion to North of Iran in 2001, Carinthia II*, 192(112), 33-140.
- Güven, O., Çayır, D., Baydar, R., & Karaca, I. (2015). Entomopatojen fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. izolatlarının patates böceği [*Leptinotarsa decemlineata* Say. (Coleoptera: Chrysomelidae)] üzerindeki etkisi. *Turkish Journal of Biological Control*, 6(2), 107-116. <https://dergipark.org.tr/en/pub/tbmd/issue/22435/240082>.
- Hamzeh'ee, B., Naqinezhad, A. R., Attar, F. Ghahreman, A., Assadi, M., & Prieditis, N. (2008). Phytosociological survey of remnant *Alnus glutinosa* ssp. barbata communities in the lowland Caspian forests of northern Iran. *Phytocoenologia*, 38, 117-132.
- Herrick, N. J., & Cloyd, R. A. (2017). Direct and indirect effects of pesticides on the insidious flower bug (Hemiptera: Anthocoridae) under laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology*, 110, 931-940.
- Hicks, B. J. (2007). Laboratory development of the fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Eastern Spruce Budworm (*Choristoneura fumiferana*). Report no. 11 to SERG International. 27pp. <http://www.serginternational.org/orderreports.html>. on: 14 November 2022
- Hicks, B. (2016). Optimization of *Beauveria bassiana* in a spray formulation against *Choristoneura fumiferana*. *Canadian Journal of Forest Research*, 46(4), 543-547. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2015-0435>.
- Humber, R. A. (1998). Entomopathogenic Fungal Identification USDA-ARS plant protection research unit 32. Originally prepared for a workshop jointly sponsored by the American phytopathological society and entomological society of America. November.
- Inanlı, C., Yoldaş, Z., & Birgucu, A. K. (2012). Entomopatojen Funguslar *Beauveria bassiana* (Bals.) ve *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)'nin *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)'nin Yumurta ve Larva Dönemlerine Etkisi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 49(3), 239-242. <https://doi.org/https://doi.org/10.20289/zfdergi.69694>.
- Ismaylova, G. (2021). New record of *Orosanga japonica* (Melichar, 1898) (Hemiptera: Fulgomorpha: Ricaniidae) from Azerbaijan. *Punjab University Journal of Zoology*, 36(2), 141-145. <https://doi.org/10.17582/journal.pujz/2021.36.2.141.145>.
- Karataş, A., Karataş, A., Yavuzb, N., & Genç, M. (2020). Distribution and activity period of the invasive *Orosanga japonica* (Melichar, 1898) (Hemiptera: Ricaniidae) in Turkey. *Zoology in the Middle East*, 66(3), 1-7. <https://doi.org/10.1080/09397140.2020.1793502>

- Knapp, H. D. (2005). The global importance of the caspian forests. *Naturschutz und Biologische Vielfalt Bfn Heft*, 12, 45-63.
- Kovač, M., Lacković, N., & Pernek, M. (2020). Effect of *Beauveria bassiana* fungal infection on survival and feeding behavior of pine-tree lappet moth (*Dendrolimus pini* L.). *Forests*, 11(9), 974. <https://doi.org/10.3390/f11090974>
- Lacey, L. A., & Goettel, M. S. (1995). Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga*, 40, 3-27.
- Lacey, L. A., & Brooks, W. M. (1979). Initial handling and diagnosis of diseased insects. In L.A. Lacey (Eds.), *Manual of techniques in insect pathology* (pp. 1-15). Academic Press, UK, 409 pp.
- Lawrence, A. A., & Khan, A. (2002). Comparison of the pathogenicity of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* to *Callosobruchus maculatus*. *International Pest Control*, 44(3), 125-127.
- Li, Z. (2007). *Beauveria bassiana* for pine caterpillar management in the Peoples Republic of China. In L. Vincent, M. S. Goettel, & G. Lazarovits (Eds.), *Biological Control. A Global Perspective*. (pp. 300-310). CAB International.
- Lockwood, J. A. (1993). Environmental issues involved in biological control rangeland grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) with exotic agents. *Environmental Entomology*, 22, 503-518.
- Martínez-Barrera, O. Y., Toledo, J., Liedo, P., Gómez, J., Valle-Mora, J., Cancino, J. & Montoya, P. (2019). Does *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) affect the survival and fecundity of the parasitoid *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae). *Environmental Entomology*, 48, 156-162.
- Moino, A. Jr., Alves, S. B., & Pereira, R. M. (1998). Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored grain pests. *Journal of Applied Entomology*, 122, 301-305.
- Mozaffarian, F. (2018). An Identification key to the species of *Auchenorrhyncha* of Iranian fauna recorded as pests in orchards and a review on the pest status of the species. *Zootaxa*, 4420, 475-501. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4420.4.2>
- Odds, F. C. (1992). Sabouraud ('s) agar. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 29, 355-359.
- Olatinwo, R., Walters, S., & Strom, B. (2018). Impact of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) on the small southern pine engraver (Coleoptera: Scolytidae) in a loblolly pine bolt assay. *Journal of Entomological Science*, 53(2), 180-91.
- Oztemir, E. (2014). *Investigation of the alternative biocides effectiveness that used on agricultural pest of Ricania japonica in the eastern Black Sea region*. [MSc dissertation, Recep Tayyip Erdogan University Graduate School of Natural and Applied Sciences, Rize, 56 pp].
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J. Devotto, L., & Humber, R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055-1073. <https://doi.org/10.3852/10-302>
- Safaie, N., Alizadeh, A., Saidi, A., Rahimian, H., & Adam, G. (2005). Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat head blight. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 41, 171-189.
- Sagheb Talebi, K. Sajedi, T., & Pourhashemi, M. (2014). *Forests of Iran, a treasure from the past, a hope for the future*. Dordrecht Heidelberg, 152 pp.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

Tohidifar, M., Moser, M., Zehzad, B., & Ghadirian, T. (2016). *Biodiversity of the Hyrcanian Forests: A synthesis report*. UNDP/GEF/FRWO Caspian Hyrcanian Forest Project. Iran. 41 pp.

Tüfekli, M., Tireng Karut, Ş., Akmeşe, V., Sekban, R., Aydin, E., & Karadeniz, S. (2021). Determination of potential natural enemies that can be used in biological control of *Ricania japonica* (Hemiptera: Ricaniidae). *Çukurova Journal of Agricultural Sciences*, 36(1), 59-70. <https://doi.org/10.36846/CJAFS.2021.35> (Turkish)

Vilas Boas, A. M., Oliveira, J. V., Campos, A. L., Andrade, R. M., Silva, R. L. X. (1996). Pathogenicity of wild strain and mutants of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 39, 99-104.

Wakil, W., & Ghazanfar, M. U. (2010). Entomopathogenic fungus as abiological control agent against *Rhyzopertha dominica* F (Coleoptera: Bostrychidae) on stored wheat. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43, 1236-1242.

Wang, C., & Feng, M. G. (2014). Advances in fundamental and applied studies in China of fungal biocontrol agents for use against arthropod pests. *Biological Control*, 68, 129-135.

Wang, W., Wan, P., Lai, F., Zhu, T., & Fu, Q. (2018). Double-stranded RNA targeting calmodulin reveals a potential target for pest management of *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science*, 74, 1711-1719. <https://doi.org/10.1002/ps.4865>

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetic. PCR protocols: A guide to methods and applications*. (pp 315-322). Academic press.

Willoughby, I., Evans, H., Gibbs, J., Pepper, H., Gregory, S., Dewar, J., Nisbet, T., Pratt, J., McKay, H., Siddons, R., Mayle, B., Heritage, S., Ferris, R., & Trout, R. (2004). *Reducing pesticide use in forestry*. Forestry Commission Practice Guide, Forestry Commission, Edinburgh.

Zamani, S. M., Gholami Ghavamabad, R., Ahangaran, Y., Kazerani, F., Zarghani, E., & Ghanaei, S. (2022). The first record of *Beauveria bassiana* on the invasive planthopper, *Orosanga japonica* in Iran. *The 1ST International and 10th National Conference on Biocontrol in Agriculture and Natural Resources, Feb. 5-6 2022, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran*.

Zhu, H., & Kim, J. J. (2012). Target-oriented dissemination of *Beauveria bassiana* conidia by the predators, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) for biocontrol of *Myzus persicae*. *Biocontrol Science and Technology*, 22, 393-406.



© 2023 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).



Efficacy of Indigenous Isolates of *Beauveria bassiana* in Controlling Invasive Planthopper, *Orosanga japonica*

R. Gholami Ghavamabad¹, S.M. Zamani^{2*}, Y. Ahangaran³, F. Kazerani², E. Zarghani⁴

1. Ph.D. Graduate student and Researcher, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
2. *Corresponding Author: Assistant Professor, Research Institute of Forests and Rangeland, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran (mzamani@rifr-ac.ir)
3. MSc. Plant pathology, Forests, Rangelands and Watershed Organization, Natural Resources Protection and Conservation substitute Office, Chalus, Iran
4. Assistant Professor, Botanical Garden of Noshahr, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: 9 October 2022

Accepted: 21 January 2023

Abstract

Background and objectives

Orosanga japonica (Hemiptera: Ricaniidae) is an invasive and polyphagous pest in the Palearctic region collected and reported from the northern part of Iran on citrus orchards in 2010. Nymphs and adults of the pest cause economic and critical damage to different plants by direct feeding and heavy deposits of honeydew on leaves. Despite various management practices, successful control of this pest has been difficult due to its rapid development and reproduction rate. *Beauveria bassiana*, an entomopathogenic fungus (EPF), has been extensively researched for its ability to manage a variety of insect pests and appears to be a potential alternative to conventional insecticides.

Material and Methods

In the present study, in the course of a forest survey in the distribution areas of *O. japonica* in Mazandaran province, larvae were infected with some native isolates of fungal mycelia were observed. After morphological and molecular identification, two fungal-infected specimens were confirmed as *B. bassiana*. Fungal collections were characterized by amplifying and sequencing the ITS region of rDNA using primers ITS1 and ITS4. The susceptibility of adults of *O. japonica* to two EPFs isolates was evaluated using the leaf dipping method and the direct spraying method under laboratory conditions. Data were analyzed using Analysis of Variance (SAS, 2002) with insect mortality as the response variable. Means were separated at $\alpha=0.01$ using Duncan's test. The LC₅₀ and LC₉₀ values of EPFs and the mean lethal times of LT₅₀ were estimated by Probit analysis using SPSS Statistics 17.0

Results

Two different fungal isolates presented white to cream colonies with irregular edges and powdery appearance, reproductive structures, and conidia with typical morphology, size, and color of *B. bassiana* species. The mean lethal concentration values (LC₅₀) of isolate 1 and isolate 2 to were 4.00×10^6 and 3.3×10^6 conidia ml⁻¹ (leaf dipping method) and 5.4×10^6 and 4.7×10^6 conidia ml⁻¹ (direct spraying method) on the adults of *O. japonica* respectively in the laboratory tests after 96 h post treatments, at 25°C and 60% relative humidity. The similarities of the ITS sequences of both two EPFs were 99-100% to those of *B. bassiana* in the GenBank database.

Conclusion

The natural pathogens of pests have long been known to play a significant role in the population dynamics of many important forest pests and provide assistance to manage pests and develop tools for management. Fungal diversity in the moist and temperate Hyrcanian forests can vary widely due to diverse ecological conditions. Generally, these findings could help establish an efficient management strategy for *O. japonica* as an invasive pest and the development of mycoinsecticide from an indigenous fungus. Future research could investigate the effect of other native EPF isolates and developing techniques in fungal formulation against *O. japonica*.

Keywords: Iran, Hyrcanian Forest, Planthopper, Bioassay, Entomopathogenic Fungi

Associate editor: L. Ebrahimi (Ph.D.)

Citation: Gholami Ghavamabad, R., Zamani, S.M., Ahangaran, Y., Kazerani, F. & Zarghani, E. (2023). Efficacy of Indigenous Isolates of *Beauveria bassiana* in Controlling Invasive Planthopper, *Orosanga japonica*. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 45(4), 149-163. <https://doi.org/10.22055/ppr.2023.18030>.