

پاسخ بویایی پسیل آسیایی مرکبات، *Diaphorina citri* به دو ترکیب شیمیایی گاما-بوتیرو لاکتون و متیل سالیسیلات در شرایط آزمایشگاهی

امین مقبلی قرایی^۱، مهدی ضیاءالدینی^{۲*} و محمدامین جلالی^۳

- ۱- دانشجوی دکتری حشره‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران
- ۲- *نویسنده مسوول: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران (ziaaddini@vru.ac.ir)
- ۳- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۱

چکیده

توانایی درک و تشخیص ترکیبات فرار در حشرات گیاه‌خوار برای انتخاب گیاه میزبان، پیدا کردن جفت و انتخاب میزبان مناسب برای تخم‌ریزی امری حیاتی می‌باشد. در این پژوهش پاسخ بویایی پسیل آسیایی مرکبات (*Diaphorina citri* Kuwayama (Hem.: Psyllidae) به محرک‌های شیمیایی دو ترکیب گاما-بوتیرو لاکتون (فرمون جنسی پسیل مرکبات) و متیل سالیسیلات (ترکیب هورمون گیاهی) در هفت غلظت ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از دستگاه بویایی سنج Y- شکل در سال ۱۳۹۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مشخص کرد که ترکیب گاما-بوتیرو لاکتون به‌طور معنی‌داری، در غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، حشرات نر پسیل آسیایی مرکبات را به خود جلب کرد. اما حشرات ماده پسیل آسیایی مرکبات به هیچ‌کدام از غلظت‌های این ترکیب جلب نشدند. همچنین غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ترکیب متیل سالیسیلات به‌طور معنی‌داری سبب جلب حشرات نر و ماده پسیل آسیایی مرکبات شد. غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متیل سالیسیلات، برای حشرات نر و ماده پسیل آسیایی دور کننده بود. غلظت‌های ۰/۰۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترکیب متیل سالیسیلات اثری روی رفتار حشرات نر و ماده پسیل آسیایی مرکبات نداشت. ارزیابی ترکیبات شیمیایی مؤثر بر رفتار پسیل آسیایی مرکبات و دستیابی به ترکیب جلب‌کننده می‌تواند در مدیریت تلفیقی این آفت مهم و مخرب، نقش بسزایی داشته باشد.

کلید واژه‌ها: بویایی سنج، پسیل آسیایی مرکبات، گاما-بوتیرو لاکتون، متیل سالیسیلات

مقدمه

پسیل آسیایی مرکبات در ایران، اولین بار در سال ۲۰۰۰ و از منطقه کهریز و قصرقند استان سیستان و بلوچستان گزارش شده است (Bove et al., 2000). این آفت علاوه بر ایجاد خسارت از طریق تغذیه از شیر گیاهی، به دلیل توانایی‌اش در انتقال عامل بیماری گرینینگ^۱ یکی از آفات بسیار مخرب و اقتصادی مرکبات در سراسر جهان است

(Halbert and Manjunath, 2004; Bove, 2006).

تغذیه آفت سبب ترشح زیاد عسلک و بیماری گرینینگ نیز موجب کوتاه شدن، خشک شدن شکوفه‌ها، ریزش میوه‌های نارس و کوچک ماندن آن‌ها، تغییر شکل، رنگ‌بندی نامناسب و تلخ مزه شدن میوه‌ها و تولید میوه‌های غیر قابل فروش می‌شود که منجر به از بین رفتن گیاه ظرف مدت ۵ تا ۸ سال می‌شود (Bove, 2006; Halbert and Manjunath, 2004). با توجه به این که

یکی از روش‌های جدید مدیریت آفات، دست‌کاری در رفتار حشرات است به‌نحوی که با استفاده از ترکیبات جلب‌کننده^۲ و دورکننده^۳ جمعیت آفات تنظیم و خسارت آن‌ها کاهش می‌یابد. بندپایان در دنیای پیچیده‌ای از محرک‌های شیمیایی زندگی می‌کنند که می‌تواند جنبه‌های مختلفی از حیات آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. آن‌ها از حس بویایی و علائم شیمیایی^۴ برای پیدا کردن جنس مخالف، غذا و یا اجتناب از رقبای دشمنان طبیعی استفاده می‌کنند.

اسید جاسمونیک^۵، اسید سالیسیلیک^۶ و اتیلن^۷ هورمون‌های گیاهی هستند که می‌توانند نقش کلیدی در تولید و انتشار ترکیبات فرار القایی (HIPV)^۸ ایفا کنند (Kessler et al., 2004; Hilker et al., 2002; Schmelz et al., 2009). اسید سالیسیلیک هورمون گیاهی فنولی است که در گیاهان نقش اساسی در تنظیم رشد، پاسخ به تنش‌های محیطی و برهم‌کنش با سایر ارگانیسم‌ها را دارد و اغلب این هورمون وابسته به دفاع گیاه در پاسخ به پاتوژن‌ها و حشرات مکنده است (Senaratna et al., 2000). استفاده از اسید سالیسیلیک می‌تواند تولید ترکیبات فرار را در گیاهان القاء کند (Ozawa et al., 2000). متیل سالیسیلات ترکیب آروماتیک استری و از مشتقات اسید سالیسیلیک است (به وسیله آنزیم سالیسیلیک اسید متیل ترانسفراز به دست می‌آید). این ترکیب اغلب در میان ترکیبات فرار متصاعد شده از گیاهان آسیب دیده توسط گیاه‌خواران مشاهده می‌شود (Van Poecke and Dicke, 2002; Ozawa et al., 2000). به‌عنوان مثال مشخص شده است که تغذیه پسیل گلابی در درختان گلابی منجر به تولید ترکیبات فراری مثل متیل سالیسیلات و آلفا-فارنزن می‌شود که این ترکیبات در درختان

این آفت روی اکثر گیاهان خانواده مرکبات^۱ خسارت می‌زند و در فاصله زمانی چند سال موجب نابودی باغ‌های آلوده می‌شود (Bove, 2006; Hall, 2008). کنترل این آفت برای کشاورزان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در حال حاضر استفاده از حشره‌کش‌ها برای کنترل ناقل، یکی از راه‌هایی است که به‌صورت عمومی و عملی برای کنترل بیماری گرینینگ انجام می‌شود (Tiwari et al., 2011). با این حال استفاده از حشره‌کش‌ها، اثرات منفی روی جمعیت دشمنان طبیعی و محیط‌زیست دارد و ممکن است باعث گسترش پدیده مقاومت به حشره‌کش‌ها شود. هم‌چنین حشرات بالغ آلوده به پاتوژن می‌توانند در حالی که غلظت‌کشنده حشره‌کش را دریافت کرده‌اند، پاتوژن را انتقال دهند (Gatineau et al., 2010).

اثر پاشش حشره‌کش‌های دیمتوات، ایمیداکلوپراید، هگزافلومورون، پیرپروکسی فن، فوزالون، روغن ولک^۱ درصد و عصاره متانولی گیاه چریش^۱ درصد و نیز تزریق حشره‌کش‌های اکسی‌دی‌متون‌متیل و ایمیداکلوپراید به داخل تنه درخت، در کنترل پسیل آسیایی مرکبات را در استان سیستان و بلوچستان مورد بررسی قرار گرفته است (Motamedinia and Morovati, 2012). آن‌ها گزارش نمودند که مؤثرترین تیمارها در ۳ روز پس از سمپاشی دیمتوات با ۷۷/۶۱ درصد تلفات و ایمیداکلوپراید با ۷۰/۴۹ درصد تلفات بودند. در روش تزریق نیز اکسی‌دی‌متون‌متیل و ایمیداکلوپراید به ترتیب ۱۴/۱۴ و ۱۵/۸۶ درصد تلفات داشتند. در بررسی اثر دو جدایه قارچ‌های *DEMI 002 (Metarrhizium anisoplia)* و *DEPI 002 (Isaria tenuipes)* روی حشرات کامل پسیل آسیایی مرکبات در شرایط آزمایشگاهی گزارش شد که پس از پنج روز جدایه *DEMI 002* و *DEPI 002* به ترتیب ۷۱ درصد و ۲۹ درصد مرگ و میر ایجاد کردند (Haji Allahverdi Pour, 2012).

2- Attractant

3- Repellent

4- Chemical cues

5- Jasmonic acid

6- Salicylic acid

7- Ethylene

8- Herbivore-Induced Plant Volatiles (HIPV)

1- Rutaceae

طی پژوهش‌های بویایی‌سنجی مشخص گردیده که حضور علائم بویایی، پاسخ پسپیل آسیایی مرکبات به علائم بینایی را افزایش می‌دهد (Wenninger et al., 2009). پسپیل آسیایی در طی میزبان‌یابی، اطلاعات به‌دست آمده از حداقل دو حس (بویایی و بینایی) را با هم تلفیق می‌کند (Patt and Setamou, 2010). پسپیل آسیایی مرکبات به ترکیبات فرار متصاعد شده از گیاهان میزبان جلب می‌شود و در این رابطه وارپته گیاهان میزبان و نیز وضعیت آلودگی گیاهان (توسط این آفت) در این برهم‌کنش مؤثر هستند. حشرات نر پسپیل آسیایی مرکبات، به ترکیبات فرار متصاعد شده از حشرات ماده و نیز عسلک تولیدی توسط هم‌گونه‌ها جلب می‌شوند (Moghbeli Gharaei et al., 2013). شناسایی و سنتز ترکیبات فرار شیمیایی جلب‌کننده پسپیل آسیایی مرکبات می‌تواند منجر به توسعه ردیابی و استراتژی مدیریت جدیدی شود که کاهش هزینه‌های تولید، کمک به بهینه‌کردن فواصل سم‌پاشی و یا کاهش استفاده از حشره‌کش‌ها را به دنبال خواهد داشت (Wenninger et al., 2009). بنابراین استراتژی‌های جدید مدیریت مانند استفاده از ترکیبات دورکننده، جلب‌کننده و بازدارنده تغذیه، می‌توانند به‌عنوان ابزارهای جایگزین یا مکمل حشره‌کش‌ها استفاده شوند. با توجه به ضرورت بررسی و تکوین ترکیبات جلب‌کننده و تأثیرگذار روی رفتار پسپیل آسیایی مرکبات در کشور، برای استفاده از آن‌ها در برنامه‌های کنترل و مدیریت این آفت، در این پژوهش پاسخ حشرات نر و ماده پسپیل آسیایی مرکبات به هفت غلظت از ترکیب فرمون جنسی آفت (گاما-بوتیرولاکتون)^۳ و ترکیب هورمونی متیل سالیسیلات^۴ ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش پسپیل آسیایی مرکبات

جمعیت اولیه پسپیل آسیایی مرکبات، از باغ‌های

سالم تولید نمی‌شوند (Scutareanu et al., 1996). هم‌چنین آلودگی گیاهان مرکبات با باکتری عامل بیماری گریننگ، رهاسازی متیل سالیسیلات را القاء می‌کند. بر اساس نتایج گاز کروماتوگرافی در گیاهان آلوده با پسپیل آسیایی مرکبات و نیز گیاهان آلوده به باکتری، میزان تولید متیل سالیسیلات نسبت به گیاهان سالم بیشتر است در حالی که در گیاهان سالم، متیل آنترانیلات و دی-لیمونن به میزان بیشتری وجود دارد (Mann et al., 2012).

گاما-بوتیرولاکتون در جلسه سالانه انجمن حشره‌شناسی آمریکا در نوامبر سال ۲۰۰۸، به‌عنوان یکی از اجزاء اصلی فرمون جنسی پسپیل آسیایی مرکبات گزارش شده است. آن‌ها هم‌چنین از فرموله کردن این ترکیب به کمک شرکت Alpha Scents خبر دادند (Onagbola et al., 2008b). علائم بویایی نقش مهمی در میزبان‌یابی تعدادی از گونه‌های پسپیل دارند مانند: *Heteropsylla cubana* (Finlay-Doney, 2005)؛ *Lapis and Borden, 1993*؛ *and Walter, 2005*؛ *(Soroker et al., 2004) Cacopsylla bidens*؛ *(Gross and Mekonen, 2005) C. melanoneura*؛ *(Mayer et al., 2011) C. picta*؛ *(Mayer et al., 2008) C. pyricola*؛ *(Gross and Mekonen, 2005) Scutareanu et al., (Horton and Landolt, 2007) Psylla pyricola*؛ *(Scutareanu et al., 1996) Trioza erytrea*؛ *(Moran and Brown, 1973) T. apicalis* و *(Kristoffersen et al., 2008) T. apicalis* و *(Valterova et al., 1997)*.

شاخک پسپیل آسیایی مرکبات از نوع نخعی و با ۸ فلاژلومر^۱ است که یازده نوع موی حسی روی شاخک حشرات نر و ماده شناسایی و توصیف شده است. ریناریاهای^۲ روی شاخک منفذدار بوده و در شناسایی ترکیبات شیمیایی فرار گیاهان میزبان و جنس مخالف نقش دارند (Onagbola et al., 2008a).

3- Gamma-butyrolactone

4- Methyl salicylate

1- Flagellomere

2- Rhinaria

تجاری مرکبات اطراف شهرستان جیرفت واقع در استان کرمان (با مختصات ۲۸ درجه، ۱۹ دقیقه و ۵۴/۳۲ ثانیه شمالی و ۵۸ درجه، ۱۴ دقیقه و ۴۶/۱۷ ثانیه شرقی) که آلوده به پسیل آسیایی مرکبات بودند، در طی چندین بار نمونه برداری جمع آوری شد. حشرات بالغ پسیل آسیایی مرکبات پس از جمع آوری به گلخانه‌ی پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان منتقل و سپس داخل قفس‌هایی به ابعاد ۵۰×۵۰×۵۰ سانتی متر که حاوی گیاه پرتقال والنسیا کولتیوار کمپیل (*C. sinensis*) بودند، رهاسازی شدند تا جمعیت کافی برای انجام آزمایش‌ها به دست آید. پرورش گیاهان و حشرات در شرایط کنترل شده گلخانه با دمای 27 ± 2 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 10 ± 60 درصد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی صورت گرفت. از نهال‌های چهار ماهه پرتقال به منظور پرورش استفاده گردید. برای به دست آوردن حشرات بالغ پسیل آسیایی مرکبات با سن مشخص در آزمایش‌های رفتاری، پوره‌های سن پنجم پسیل جمع آوری شدند و روی نهال‌های گیاهان میزبان که به صورت جداگانه درون قفس‌هایی به ابعاد ۵۰×۵۰×۵۰ سانتی متر قرار داشتند، منتقل گردیدند. با توجه به این که حشرات ماده جفت‌گیری کرده پسیل آسیایی مرکبات نسبت به افراد جفت‌گیری نکرده قدرت جلب‌کنندگی بیشتری برای حشرات نر دارند (Wenninger et al., 2008) و از سویی چون برای حشرات ماده جفت‌گیری کرده جهت یابی به سمت علایم بویایی گیاهان میزبان برای تخم‌ریزی اجتناب‌ناپذیر است لذا در این پژوهش از حشرات جفت‌گیری کرده استفاده گردید. حشرات کامل پسیل آسیایی مرکبات پس از ۲ تا ۳ روز به بلوغ جنسی می‌رسند (Wenninger and Hall, 2007). بنابراین در تمامی آزمایش‌ها از حشرات بالغ حدود ۱۰ روزه جفت‌گیری کرده استفاده گردید.

بویایی سنج

از یک دستگاه بویایی سنج Y-شکل^۱ برای بررسی پاسخ

بویایی پسیل آسیایی مرکبات در آزمایش‌ها استفاده گردید (Wenninger et al., 2008؛ Wenninger et al., 2009). بویایی سنج شامل یک بازوی اصلی به طول ۱۴ و دو بازوی فرعی به طول ۱۰ و با قطر داخلی ۲ سانتی متر و از جنس شیشه پیرکس بود. یک درپوش شیشه‌ای توری دار، در پایه بازوی اصلی برای ورود حشره به بویایی سنج استفاده گردید. در انتهای هر بازوی فرعی یک محفظه شیشه‌ای استوانه‌ای به ابعاد $3/5 \times 17/5$ سانتی متر به منظور جاگذاری منبع رایحه تعبیه شده بود. هوا توسط دو لوله رابط از یک پمپ‌دمنده هوا با سرعت ثابت ۳۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه، که با یک هواسنج مدل Testo 425 کنترل می‌شد پس از عبور از محفظه حاوی ذغال فعال^۲ و محفظه حاوی آب مقطر (به منظور مرطوب و تصفیه کردن هوا) توسط لوله‌های تفلونی به محفظه‌های تیمار و شاهد و پس از آن به دو بازوی فرعی وارد شده و از بازوی اصلی خارج می‌شد. در فاصله زمانی بین تیمارها، بویایی سنج و تجهیزات آن و لوله‌های اتصال به‌طور کامل با محلول دو درصد صابون تمیز شدند و بویایی سنج و تجهیزات آن در دمای ۲۰۰ درجه سلسیوس حداقل به مدت ۳ ساعت نگهداری شدند.

پاسخ پسیل آسیایی مرکبات به ترکیب شبه فرومونی

گاما-بوتیرولاکتون و ترکیب هورمونی متیل سالیسیلات

برای این منظور گاما-بوتیرولاکتون و متیل سالیسیلات (خلوص ۹۸ درصد) از شرکت سیگما^۳ آمریکا خریداری گردید. رفتار حشرات نر و ماده پسیل آسیایی مرکبات در پاسخ به هفت غلظت ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در میلی‌لیتر از هر یک از ترکیبات به‌طور جداگانه ارزیابی گردید. به منظور ساختن غلظت‌های موردنظر، از دی‌کلرومتان^۴ به‌عنوان حلال استفاده گردید. بویایی سنجی در اتاقی با شرایط دمایی 27 ± 2 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 10 ± 60 درصد و با نور یک لامپ آفتابی با شدت ۱۶۰۰ لوکس انجام شد. به منظور عادت کردن حشرات موردنظر با شرایط اتاق زیست‌سنجی،

2- Activated charcoal

3- Sigma-Aldrich Chemical, USA

4- Dichloromethane

1- Y-tube olfactometer

آزمون مربع کای^۴ و توسط نرم افزار SAS مقایسه گردید. فرض صفر مورد آزمون برای داده‌های هر تکرار همانند داده‌های کل هر آزمایش، انتخاب ۵۰:۵۰ حشرات مورد آزمایش نسبت به تیمار یا کنترل بود (Moghbeli Gharaei et al., 2013).

نتایج و بحث

در آزمایش اولیه با هوای پاک، تفاوت معنی داری بین دو بازوی بویایی سنج در حشرات نر و ماده پسپیل آسیایی مرکبات به دست نیامد (شکل ۱). هم‌چنین وقتی که در هر دو بازو برگ‌های مرکبات قرار گرفتند نیز حشرات ماده و نر این آفت پاسخ ترجیحی بین دو بازو نشان ندادند (شکل ۱). این نتایج مشخص کرد که دو بازوی بویایی سنج از لحاظ جلب حشرات جستجوگر یکسان عمل می‌کنند و تمایل به هیچ بازویی در آزمایش تیمارها وجود ندارد. هم‌چنین در آزمایش دی کلرومتان در مقابل هوای پاک نیز دی کلرومتان اثری روی رفتار حشرات ماده و نر پسپیل آسیایی مرکبات نداشت (شکل ۱).

بررسی پاسخ بویایی پسپیل آسیایی مرکبات به ترکیب سنتتیک گاما-بوتیرولاکتون

ترکیب گاما-بوتیرولاکتون به‌طور معنی داری در غلظت‌های ۱۰۰۰ در سطح احتمال یک درصد و در غلظت‌های ۱۰۰، ۱۰ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سطح احتمال پنج درصد حشرات نر پسپیل آسیایی مرکبات را به خود جلب کرد (شکل ۲، ب). از سویی غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر این ترکیب روی پاسخ رفتاری حشرات نر پسپیل آسیایی مرکبات اثری نداشت (شکل ۲، ب). اما هیچ یک از غلظت‌های مورد آزمایش گاما-بوتیرولاکتون سبب ایجاد پاسخ در حشرات ماده پسپیل آسیایی مرکبات نشد (شکل ۲، الف). ترشح فرومون جهت جفت‌یابی در چندین گونه از زیر راسته Sternorrhyncha از جمله (Margarodidae) (*Matsucoccus resinosae* (Doane, 1966)

حشرات به صورت منفرد و جداگانه درون ظروف اپندورف^۱ که درب آن‌ها با توری مسدود شده بود یک ساعت قبل از شروع آزمایش به اتاق زیست‌سنجی منتقل شدند. حشرات در این مدت هیچ گونه تغذیه‌ای نداشتند. در تمامی آزمایش‌ها، مدت زمان پاسخ حداکثر پنج دقیقه بود. در صورتی که در این مدت، حشرات پاسخی نداشتند به‌عنوان عدم پاسخ^۲ ثبت شد (Mann et al., 2010). آزمایش‌ها با رهاسازی حشرات نر و ماده پسپیل آسیایی مرکبات به‌صورت جداگانه و منفرد در بازوی اصلی بویایی سنج انجام شد. سپس پاسخ پسپیل، به میزان ۱۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های ترکیب موردنظر که روی کاغذ صافی قرار داده می‌شد، مشاهده و ثبت گردید. در بررسی ترکیب گاما بوتیرولاکتون در هر تیمار تعداد ۶۰ حشره نر و ۶۰ حشره ماده تست شد، اما در بررسی متیل سالیسیلات و نیز آزمایش‌های ابتدایی در هر تیمار تعداد ۳۰ حشره نر و ۳۰ حشره ماده مورد ارزیابی قرار گرفت. قبل از آزمایش ترکیب فرومونی و ترکیب هورمونی، به منظور ارزیابی عدم تمایل به یک بازو، در هر دو بازوی بویایی سنج هوای پاک (به‌عنوان کنترل منفی) و نیز برگ‌های گیاهان میزبان (به‌عنوان کنترل مثبت) قرار گرفت و حشره مورد مطالعه در بازوی اصلی رهاسازی شد تا مساوی بودن انتخاب در دو بازو بررسی گردد. هم‌چنین به منظور ارزیابی عدم تاثیر حلال روی رفتار حشرات، مقدار ۱۰ میکرولیتر از دی کلرومتان روی کاغذ صافی واتمن شماره ۴ (ساخت کشور انگلستان)^۳، که در ابعاد ۲ × ۳ سانتی‌متر بود، ریخته شد و کاغذ صافی داخل محفظه جاگذاری رایحه قرار داده شد و در مقابل هوای پاک مورد ارزیابی قرار گرفت. منبع رایحه در شروع آزمایش به‌صورت تصادفی برای یک بازو اختصاص داده شد و پس از آزمایش پنج پسپیل، به بازوی دیگر منتقل می‌شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمایش‌های بویایی سنجی با

1- Eppendorf

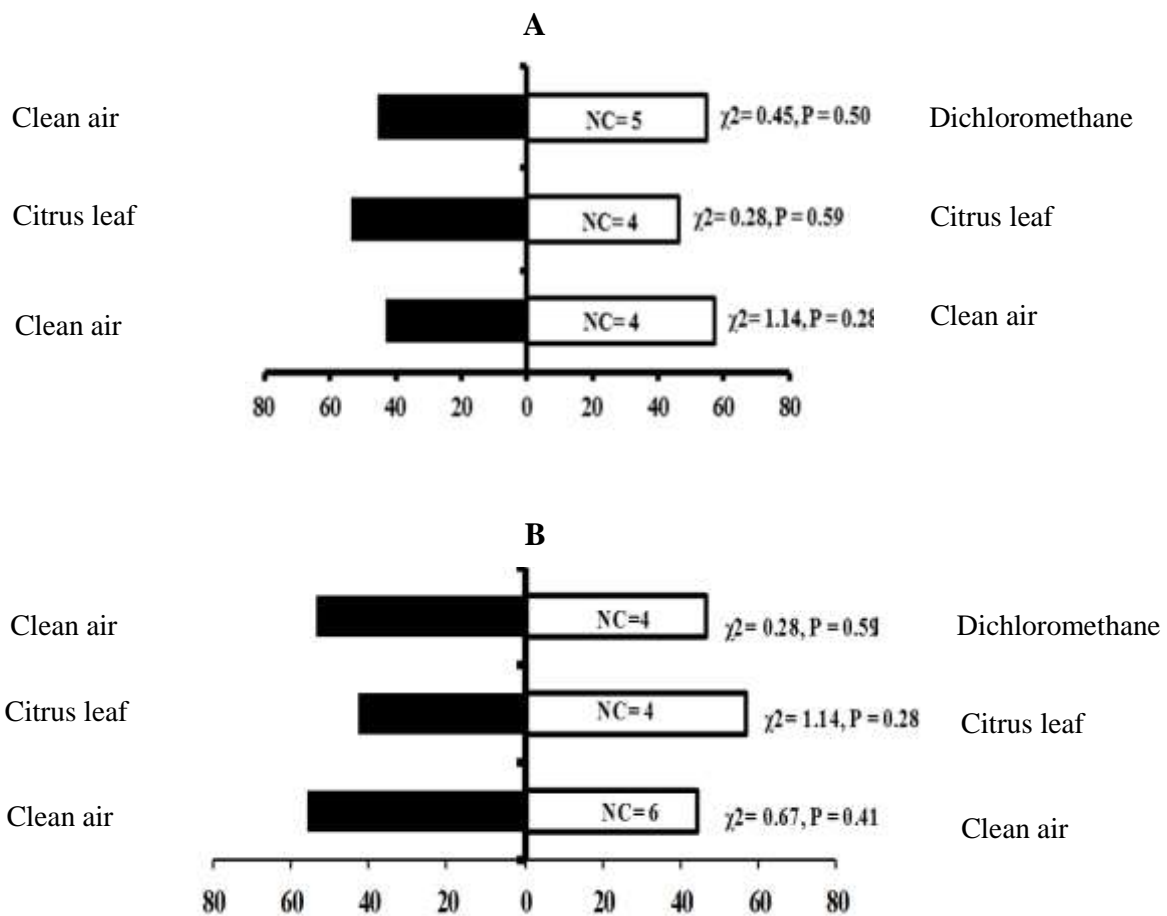
2- No response

3- Whatman No. 4 filterpaper, England

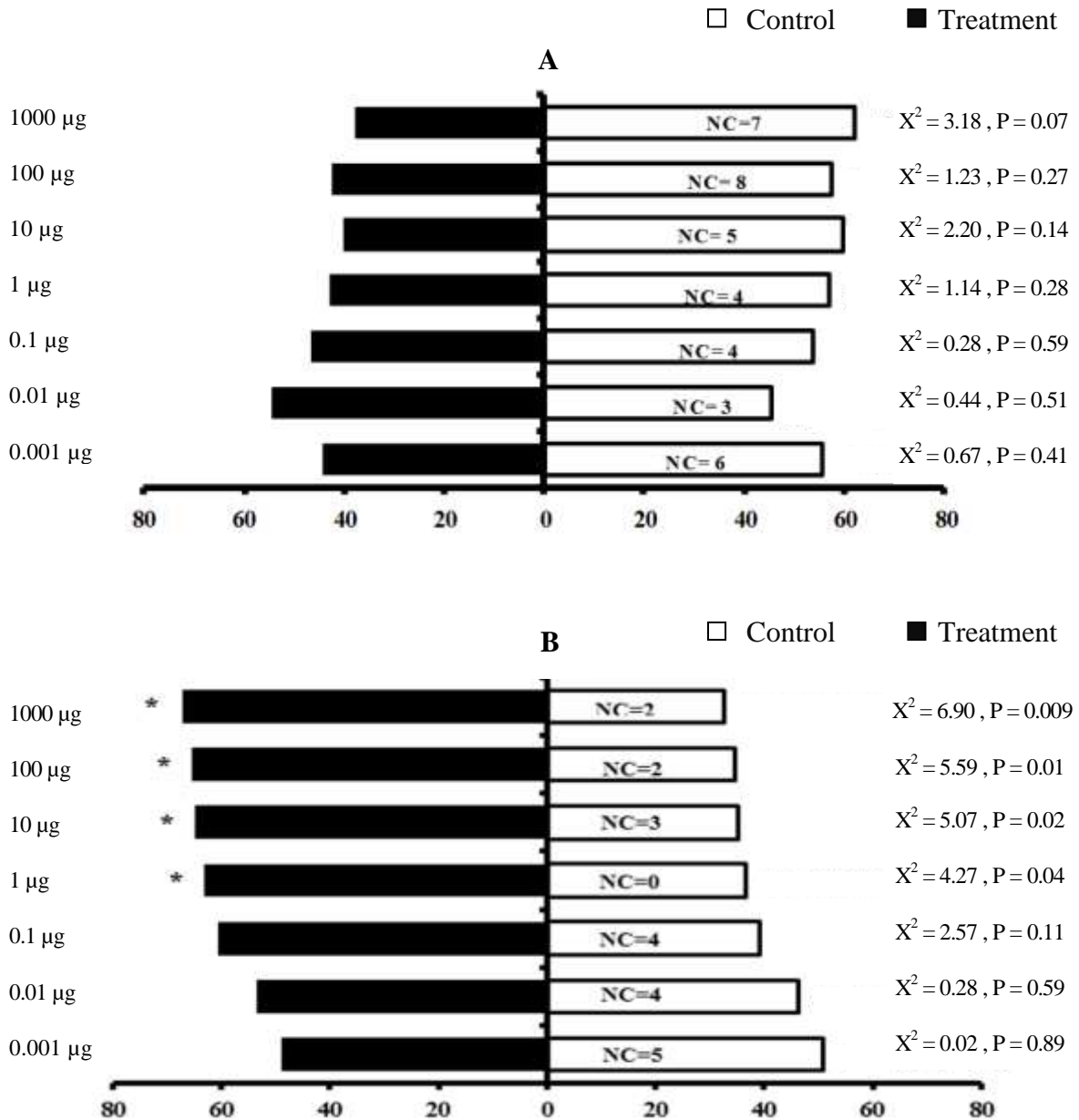
4- Chi-squar

در تلفیق با کارت‌های زرد چسبنده مورد ارزیابی قرار گرفت، اما این ترکیب سبب جلب پسیل آسیایی مرکبات نشد (Thomas, 2010). در توجیه این نتایج ذکر شده که فاکتورهای مختلفی می‌تواند در این مورد دخیل باشند ولی از همه مهم‌تر، تعداد کمتر از حد مطلوب لوره‌های استفاده شده در آزمایش بوده است. نتایج به دست آمده از جلب شدن حشرات نر پسیل آسیایی مرکبات به گاما-بوتیرولاکتون در پژوهش حاضر نشان‌دهنده این موضوع است که این ترکیب می‌تواند روی رفتار حشرات نر پسیل آسیایی مرکبات جمعیت مورد آزمایش مؤثر باشد و آن‌ها را به خود جلب کند. هم‌چنین نتایج ما پیشنهاد می‌کند که پسیل آسیایی مرکبات بین مقادیر متفاوت محرک‌های شیمیایی گاما-بوتیرولاکتون تمایز قایل می‌شود.

Trialeurodes vaporariorum (Aleyrodidae) (Psyllidae), (Yin and Maschwitz, 1983) Horton and Landolt,) *Cacopsylla pyricola* Soroker) *Cacopsylla bidens* (Psyllidae), (2007 Phorodon humuli (Aphididae), (et al., 2004 Campbell) *Rhopalosiphum padi* (Aphididae) و (et al., 2003 گزارش شده است. حشرات نر پسیل آسیایی مرکبات به طور معنی‌داری به محرک‌های شیمیایی حشرات ماده و عسلک تولیدی هم‌گونه‌ها جلب می‌شوند. هم‌چنین حضور حشرات ماده و عسلک، سبب افزایش پاسخ حشرات نر پسیل آسیایی به برگ‌های گیاهان میزبان شد (Moghbeli Gharaei et al., 2013). ترکیب گاما-بوتیرولاکتون در آزمایش‌های گلخانه‌ای و باغی و



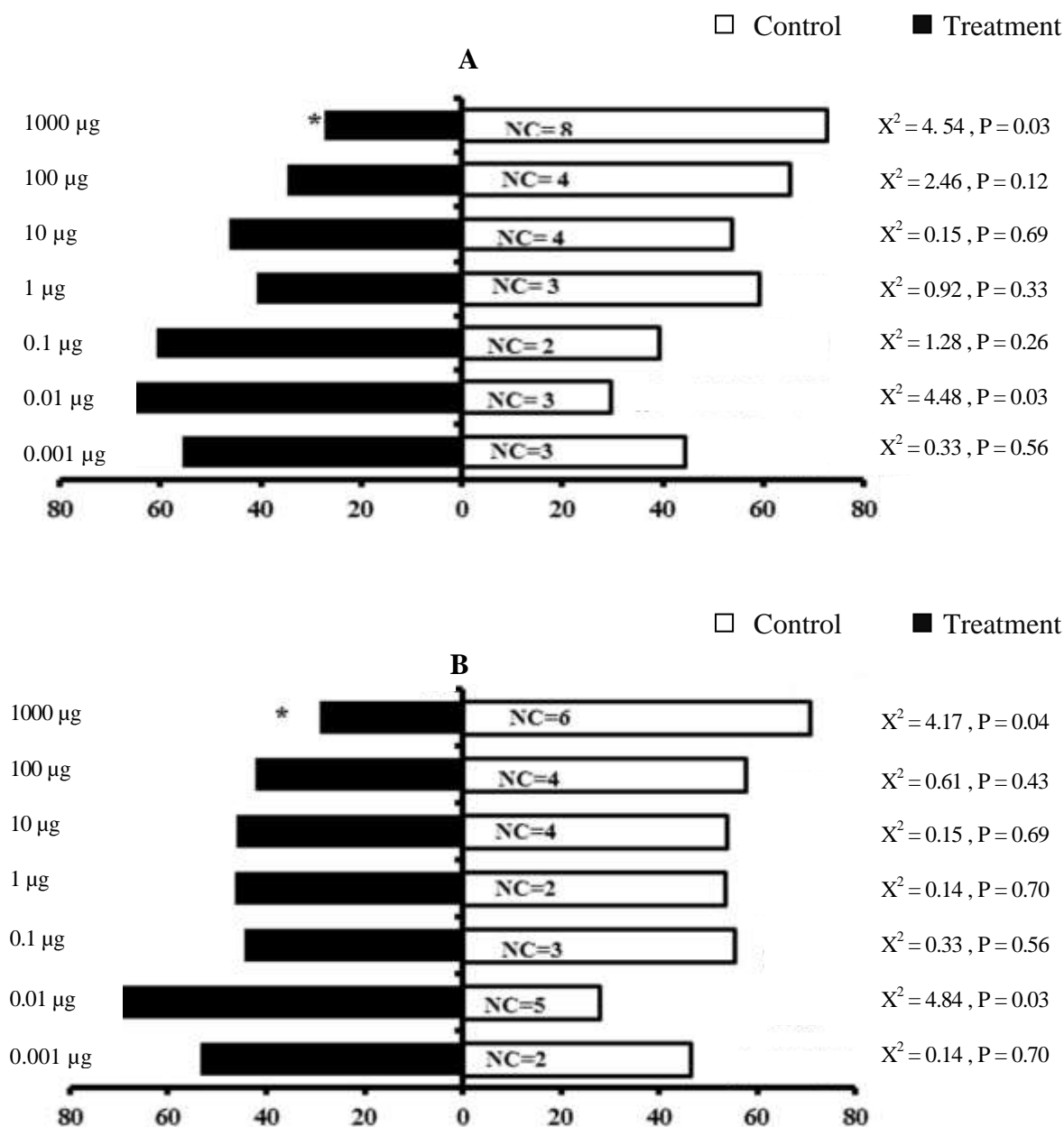
شکل ۱- درصد پاسخ حشرات جفت‌گیری کرده ماده (الف) و نر (ب) پسیل آسیایی مرکبات (N=30)، NC=تعداد بی‌پاسخ‌ها
Figure 1. Percent response of mated females (A) and males (B) of *Diaphorina citri* (N=30), NC=Number of no response



شکل ۲- درصد پاسخ حشرات جفت گیری کرده ماده (الف) و نر (ب) پسیل آسیایی مرکبات به دزهای مختلف گاما-بوتیرولاکتون در مقابل هوای پاک (N=60)، NC= تعداد بی پاسخها
 * نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بر اساس آزمون کای مربع می باشد (P < 0.05)
Figure 2. Percent response of mated females (A) and males (B) of *Diaphorina citri* to different doses of gamma-butyrolactone vs. clean air (N=60), NC= Number of no response
 Asterisks indicate significant departures from 50:50 (χ^2 test, $P \leq 0.05$)

کرد. از دز ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر، تقریباً با بالا رفتن غلظت، از میزان قدرت جلب کنندگی این ترکیب نیز کاسته شد تا این که در نهایت در بالاترین غلظت یعنی ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، این ترکیب دورکننده بود و حشرات بیشتر وارد بازوی حاوی هوای پاک شدند (شکل ۳).

بررسی پاسخی بویایی پسیل آسیایی مرکبات به ترکیب سنتتیک متیل سالیسیلات
 ترکیب متیل سالیسیلات در غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر به طور معنی داری در سطح احتمال پنج درصد حشرات نر و ماده پسیل آسیایی مرکبات را به خود جلب



شکل ۳- درصد پاسخ حشرات جفت‌گیری کرده ماده (الف) و نر (ب) پسیل آسیایی مرکبات به دزهای مختلف متیل سالیسیلات در مقابل هوای پاک (N=۳۰)، NC= تعداد بی‌پاسخ‌ها

* نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون کای مربع می‌باشد (P < 0.05)

Figure 3. Percent response of mated females (A) and males (B) of *Diaphorina citri* to different doses of methyl salicylate vs. clean air (N=30), NC= Number of no response
Asterisks indicate significant departures from 50:50 (χ^2 test, P ≤ 0.05)

2002). در طی پژوهش‌های مختلفی اثر این ترکیب روی آفات مختلفی ارزیابی گردیده است. به‌عنوان مثال متیل سالیسیلات برای شته سیاه باقلا (*Aphis fabae*)، شته برگ یولاف (*Rhopalosiphum padi*) و *Sitophilus zeamais* دورکننده (Hardie et al., 1994)

متیل سالیسیلات یک ترکیب استری آروماتیک و فراوان است که در سیگنال‌های ارتباطی بین گیاه و حشره در موقع استرس شرکت می‌کند و در دفاع گیاه علیه گیاه‌خواران نقش دارد (Drukker et al., 2001)؛ Van Poecke and Dicke, Ozawa et al., 2000

حضور هم گونه‌ها برای پسیل آسیایی مرکبات، در مراحل ابتدایی میزبان‌یابی باشد و آن‌ها را به خود جلب کند. اما با افزایش آلودگی گیاهان میزبان و افزایش غلظت متیل سالیسیلات، این ترکیب برای پسیل آسیایی مرکبات دورکننده می‌گردد، که این روش احتمالاً یک ابزار دفاعی برای گیاه محسوب می‌شود. از سویی احتمال می‌رود که افزایش غلظت متیل سالیسیلات برای پسیل آسیایی مرکبات این پیام را داشته باشد که در صورت جلب شدن، با جمعیت بالایی از هم گونه‌ها مواجه خواهد شد و حشره به منظور جلوگیری از رقابت احتمالی بر سر منابع غذایی، جلب غلظت‌های بالای این ترکیب نمی‌گردد. با توجه به نتایج اخیر مبنی بر قدرت جلب‌کنندگی ترکیب گاما-بوتیرولاکتون و نیز اثرات دورکنندگی ترکیب متیل سالیسیلات برای پسیل آسیایی مرکبات توصیه می‌شود این ترکیبات فرموله شده و کارایی آن‌ها در آزمایش‌های باغی مورد بررسی قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان تشکر و قدردانی می‌گردد.

Rhyzopertha و برای (Pettersson et al., 1994 *Prostephanus truncatus* و *S. zeamais dominica* دارای اثرات جلب‌کنندگی بود (Jayasekara et al., 2005). اثر جلب‌کنندگی متیل سالیسیلات برای سن‌های شکارگر *Anthocoris nemoralis* (Drukker et al., 2001)، کنه *Typhlodromus pyri* (Phytoseiidae) (Gadino et al., 2012)، کفشدوزک هفت نقطه‌ای *Coccinella septempunctata* (Zhu and Park, 2005) و نیز عوامل کنترل بیولوژیکی از خانواده‌های Syrphidae, Empididae, Braconidae و Sarcophagidae (James and Price, 2004) گزارش گردیده است. تغذیه گیاه‌خواران از گیاهان، تولید متیل سالیسیلات را القاء می‌کند، به نحوی که این ترکیب اغلب در میان ترکیبات فرار متصاعد شده از گیاهان آسیب دیده توسط گیاه‌خواران مشاهده شده است. متیل سالیسیلات با دفع حشرات آفت و یا با جلب عوامل کنترل بیولوژیک در دفاع گیاه علیه گیاه‌خواران نقش ایفا می‌کند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان چنین استنباط کرد که احتمالاً رهاسازی متیل سالیسیلات به وسیله گیاهان میزبان، در غلظت پایین (غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌تواند نشانه‌ای از

REFERENCES

- Bove, J., Danet, J., Bananej, K., Hassanzadeh, N., Taghizadeh, M., Salehi, M., and Garnier, M. 2000. Witches' broom disease of lime (WBDL) in Iran. Proceedings of 14th conference, International Organization of Citrus Virology, Riverside, CA. pp. 207-212.
- Bove, J.M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1): 7-37.
- Campbell, C.A.M., Cook, F.J., Pickett, J.A., Pope, T.W., Wadhams, L.J., and Woodcock, C.M. 2003. Responses of the aphids *Phorodon humuli* and *Rhopalosiphum padi* to sex pheromone stereochemistry in the field. *Journal of Chemical Ecology*, 29(10): 2225-2234.
- Doane, C.C. 1966. Evidence for a sex attractant in females of the red pine scale. *Journal of Chemical Ecology*. 59(6): 1539-1540.
- Drukker, B., Bruin, J., and Sabelis, M.W. 2001. Anthocorid predators learn to associate herbivore-induced plant volatiles with presence or absence of prey. *Physiological Entomology*, 25(3): 260-265.

- Finlay-Doney, M., and Walter, G. 2005. Discrimination among host plants (*Leucaena* species and accessions) by the psyllid pest *Heteropsylla cubana* and implications for understanding resistance. *Agricultural and Forest Entomology*, 7(2): 153-160.
- Gadino, A.N., Walton, V.M., and Lee, J.C. 2012. Olfactory response of *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae) to synthetic methyl salicylate in laboratory bioassays. *Journal of Applied Entomology*, 136(6): 476-480.
- Gatineau, F., Bonnot, F., Hong Yen, T.T., Tuan, D.H., Tuyen, N.D., and Ngoc Truc, N.T. 2010. Effects of imidacloprid and fenobucarb on the dynamics of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama and on the incidence of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Fruits*, 65(4): 209-220.
- Gross, J., and Mekonen, N. 2005. Plant odours influence the host finding behaviour of apple psyllids (*Cacopsylla picta*; *C. melanoneura*). *IOBC wprs Bulletin*, 28(7): 351-355.
- Haji Allahverdi Pour, H. 2012. Entomopathogenic fungi: an alternative in the control of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). *Plant Protection Journal*, 4: 1-9. (In Farsi).
- Halbert, S.E., and Manjunath, K.L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87(3): 330-353.
- Hall, D.G. 2008. Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. *Proceedings of the North American Plant Protection Organization Workshop, Taller Internacional Sobre Huanglongbing y el Psilido Asiatico de los Citricos*, May. pp. 7-9.
- Hardie, J., Isaacs, R., Pickett, J.A., Wadhams, L.J., and Woodcock, C.M. 1994. Methyl salicylate and (-)-(1R, 5S)-myrtenal are plant-derived repellents for black bean aphid, *Aphis fabae* Scop. (Homoptera: Aphididae). *Journal of Chemical Ecology*, 20(11): 2847-2855.
- Hilker, M., Rohfritsch, O., and Meiners, T. 2002. The plant's response towards insect egg deposition. *Wiley Online Library*.
- Horton, D.R., and Landolt, P.J. 2007. Attraction of male pear psylla, *Cacopsylla pyricola*, to female-infested pear shoots. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 123(2): 177-183.
- James, D.G., and Price, T.S. 2004. Field-testing of methyl salicylate for recruitment and retention of beneficial insects in grapes and hops. *Journal of Chemical Ecology*, 30(8): 1613-1628.
- Jayasekara, T.K., Stevenson, P.C., Hall, D.R., and Belmain, S.R. 2005. Effect of volatile constituents from *Securidaca longepedunculata* on insect pests of stored grain. *Journal of Chemical Ecology*, 31(2): 303-313.
- Kessler, A., Halitschke, R., and Baldwin, I.T. 2004. Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Sciences STKE*, 305(5684): 665.
- Kristoffersen, L., Larsson, M.C., and Anderbrant, O. 2008. Functional characteristics of a tiny but specialized olfactory system: olfactory receptor neurons of carrot psyllids (Homoptera :Triozidae). *Chemical Senses*, 33(9): 759-769.

- Lapis, E., and Borden, J. 1993. Olfactory discrimination by *Heteropsylla cubana* (Homoptera: Psyllidae) between susceptible and resistant species of *Leucaena* (Leguminosae). *Journal of Chemical Ecology*, 19(1): 83-90.
- Mann, R., Rouseff, R., Smoot, J., Castle, W., and Stelinski, L. 2010. Sulfur volatiles from *Allium* spp. affect Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), response to citrus volatiles. *Bulletin of Entomological Research*, 101(1): 89-97.
- Mann, R.S., Ali, J.G., Hermann, S.L., Tiwari, S., Pelz-Stelinski, K.S., Alborn, H.T., and Stelinski, L.L. 2012. Induced Release of a Plant-Defense Volatile 'Deceptively' Attracts Insect Vectors to Plants Infected with a Bacterial Pathogen. *PLoS Pathogens*, 8(3): e1002610.
- Mayer, C.J., Vilcinskis, A., and Gross, J. 2008. Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. *Journal of Chemical Ecology*, 34(8): 1045-1049.
- Mayer, C.J., Vilcinskis, A., and Gross, J. 2011. Chemically mediated multitrophic interactions in a plant-insect vector-phytoplasma system compared with a partially nonvector species. *Agricultural and Forest Entomology*, 13(1): 25-35.
- Moghbeli Gharaei, A., Ziaaddini, M., Jalali, M.A., and Michaud, J.P. 2013. Sex-specific responses of Asian citrus psyllid to volatiles of conspecific and host-plant origin. *Journal of Applied Entomology*, 138: 500-509.
- Moran, V., and Brown, R. 1973. The antennae, host plant chemoreception and probing activity of the citrus psylla, *Trioza erythrae* (Del Guercio) (Homoptera: Psyllidae). *Journal of the Entomological Society of South Africa*, 36: 191-202.
- Motamedinia, B., and Morovati, M. 2012. Study on spraying and injection of chemical compounds and commercial neem extract on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in Baluchestan. *Plant Pest Research*, 2(1): 13-19. (In Farsi).
- Onagbola, E.O., Meyer, W.L., Boina, D.R., and Stelinski, L.L. 2008a. Morphological characterization of the antennal sensilla of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), with reference to their probable functions. *Micron*, 39(8): 1184-1191.
- Onagbola, E.O., Rouseff, R.L., and Stelinski, L.L. 2008b. Chemical ecology of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Kuwayama) and its parasitoid, *Tamarixia radiata* Waterston (Hymenoptera: Eulophidae). Abstract: Annu. Meet. Ent. Soc. Am. Nov. 2008, Reno NV. http://esa.confex.com/esa/2008/techprogram/paper_39154.htm (accessed 9-9-09).
- Ozawa, R., Arimura, G., Takabayashi, J., Shimoda, T., and Nishioka, T. 2000. Involvement of jasmonate-and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant and Cell Physiology*, 41(4): 391-398.
- Patt, J., and Setamou, M. 2010. Responses of the Asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flushing shoots of its rutaceous host plants. *Environmental Entomology*, 39(2): 618-624.
- Pettersson, J., Pickett, J., Pye, B., Quiroz, A., Smart, L., Wadhams, L., and Woodcock, C. 1994. Winter host component reduces colonization by bird-cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Homoptera, Aphididae), and other aphids in cereal fields. *Journal of Chemical Ecology*, 20(10): 2565-2574.

- Schmelz, E.A., Engelberth, J., Alborn, H.T., Tumlinson III, J.H., and Teal, P.E.A. 2009. Phytohormone-based activity mapping of insect herbivore-produced elicitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(2): 653-657.
- Scutareanu, P., Bruin, J., Posthumus, M.A., and Drukker, B. 2003. Constitutive and herbivore induced volatiles in pear, alder and hawthorn trees. *Chemoecology*, 13(2):63-73.
- Scutareanu, P., Drukker, B., Bruin, J., Posthumus, M., and Sabelis, M. 1996. Leaf volatiles and polyphenols in pear trees infested by *Psylla pyricola*. Evidence of simultaneously induced responses. *Chemoecology*, 7(1): 34-38.
- Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., and Dixon, K. 2000. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation*, 30(2): 157-161.
- Soroker, V., Talebaev, S., Harari, A.R., and Wesley, S.D. 2004. The role of chemical cues in host and mate location in the pear psylla *Cacopsylla bidens* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of Insect Behavior*, 17(5): 613-626.
- Thomas, D.B. 2010. Gamma-Butyrolactone as a lure for traps targeting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Subtropical Plant Science*, 62: 34-37.
- Tiwari, S., Mann, R.S., Rogers, M.E., and Stelinski, L.L. 2011. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Pest Management Science*, 67: 1258-1268.
- Valterova, I., Nehlin, G., and Borg-Karlson, A.K. 1997. Host plant chemistry and preferences in egg-laying *Trioza apicalis* (Homoptera, Psylloidea). *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(6): 477-491.
- Van Poecke, R.M.P., and Dicke, M. 2002. Induced parasitoid attraction by *Arabidopsis thaliana*: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. *Journal of Experimental Botany*, 53(375): 1793-1799.
- Wenninger, E.J., and Hall, D.G. 2007. Daily timing of mating and age at reproductive maturity in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*, 90(4): 715-722.
- Wenninger, E.J., Stelinski, L.L., and Hall, D.G. 2008. Behavioral evidence for a female-produced sex attractant in *Diaphorina citri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128(3): 450-459.
- Wenninger, E.J., Stelinski, L.L., and Hall, D.G. 2009. Roles of olfactory cues, visual cues, and mating status in orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to four different host plants. *Environmental Entomology*, 38(1): 225-234.
- Yin, L.T., and Maschwitz, U. 1983. Sexual pheromone in the Green House Whitefly *Trialeurodes vaporariorum* Westw. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 95(1-5): 439-446.
- Zhu, J., and Park, K.C. 2005. Methyl salicylate, a soybean aphid-induced plant volatile attractive to the predator *Coccinella septempunctata*. *Journal of Chemical Ecology*, 31(8): 1733-1746.

The effect of different concentrations of Gamma-butyrolactone (GBL) and Methyl salicylate (MeSA) in olfactory responses of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hem.: Psyllidae) in laboratory conditions

A. Moghbeli Gharaei¹, M. Ziaaddini^{2*} and M.A. Jalali³

1. Ph.D. student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
2. *Corresponding Author: Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran (ziaaddini@vru.ac.ir)
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

Received: 1 May 2017

Accepted: 13 November 2017

Abstract

Background and Objective

The Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hem.: Psyllidae), is one of the most destructive pests of citrus because of its ability to vector the causal bacterial pathogen of citrus greening disease. This is one of the most devastating diseases of citrus worldwide. Feeding on citrus by Asian citrus psyllid also induces release of Methyl salicylate (MeSA), suggesting that it may be a cue revealing location of conspecifics on host plants. MeSA is a ubiquitous aromatic ester that is a well-known plant stress signal and enhances defense against herbivores with repellent properties. Gamma-butyrolactone (GBL) is a primary component of the volatile ingredients in the female sex pheromone of the *D. citri*. The ability to decrypt plant volatiles is essential for herbivorous insects for their choice of host plants and mating partners and oviposition hosts. *D. citri* is an oligophagous insect with a host range restricted to plants in the Rutaceae family. That is why olfaction plays an important role in its host finding and selection process. The use of olfactory cues by adult psyllids in host plant selection has been reported in many olfactometer studies. In order to achieve the attractive and repellent compounds for pest management strategies against this pest, we investigated the effect of volatiles emitted from Synthetic GBL and MeSA on olfactory response of *D. citri* in laboratory bioassays.

Materials and Methods

This study evaluated the olfactory responses of *D. citri* to chemical stimuli from seven concentrations of GBL and MeSA including 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100 and 1000 µg/ml with individual release of 30 females and 30 males. The GBL and MeSA (>98% purity) were purchased from Sigma Aldrich (USA) and diluted in dichloromethane. A glass Y-tube olfactometer was used in laboratory conditions (27±2°C, 60–80% RH, under a fluorescent 1600 lux light source, 14:10 (L:D) photocycle period and constant airflow of 300 ml/min).

Results

The results revealed that a significant proportion of male *D. citri* were attracted to GBL at the 1.0, 10, 100 and 1000 µg/ml concentrations. But female *D. citri* showed no response to odors emanating from this compound. The results also indicated that a significant proportion of male and female *D. citri* were attracted to MeSA at the 0.01 µg concentration. However MeSA at the concentration 1000 µg/ml was repellent for psyllids. Other concentrations (0.001, 0.1, 1.0, 10 and 100 µg/ml) did not attract or repel the male and female *D. citri*.

Discussion

In this study, results showed that GBL at high concentrations is attractive only for male insects. These results indicate the role of GBL as a sex pheromone in attracting male insects. Feeding by herbivores induces the production of MeSA, so that this compound is often found among the volatile compounds of plants damaged by herbivores. MeSA plays a role in plant defense against herbivores by either repelling herbivores or by attracting biological control agents. The results of this study show that,

probably, release of MeSA by host plants at low concentrations (0.01 μg), can be a cue of the presence of conspecific for *D. citri* in the early stages of host finding. With increasing infestation of host plants and increasing MeSA concentration, this compound repels the insects and that this method is considered a defensive tool for the plant. It is also possible that increasing the concentration of MeSA for the insect has this cue that if attracted, it will encounter a high population of conspecifics and the insect would not be attracted to high concentrations in order to avoid potential competition for food sources. Evaluation of chemical compounds that are attractive or repellent to *D. citri*, can contribute to the improvement in integrated management projects against this pest.

Keywords: Asian citrus psyllid, Citrus Greening, Methyl salicylate, Olfactometer, Pheromone