مقاله کوتاه

آرایه *Paecilomyces formosus*، بیمارگر جدید سوسک سرشاخه‌خوار رزاسه (*Osphranteria coerulescens*) از ایران

هادی محمودی، محمدرضا میرزایی، غلامرضا توکلی کرقند

بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان جنوبی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، بیرجند، ایران

مسئول مکاتبات: هادی محمودی، ایمیل: Hd_mahmoudi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۹ ۸(۲) ۱۳۵–۱۴۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱

چکیده

سوسک شاخک بلند سرشاخه‌خوار رزاسه در اکثر مناطق میوه‌خیزکشور به انواع درختان میوه از خانواده گل رز و بعضی درختان میوه دیگر حمله می‌کند. از اردیبهشت تا بهمن‌ماه ۱۳۹۱، پس از جمع آوری نمونه‌های شاخه‌های آلوده به آفت سوسک سرشاخه‌خوار رزاسه از باغ‌های بادام و زردآلو در استان خراسان جنوبی، عوامل بیمارگر قارچی لاروهای حشره جداسازی، شناسایی و آزمون‌های اثبات بیماری زایی و کارائی آن‌ها انجام شد. بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی قارچ جداسازی شده به‌عنوان گونه *Paecilomyces formosus* تشخیص داده شد و در مطالعه فیلوژنی جدایه مورد مطالعه در کلاد گونه‌های متعلق به *P. formosus* قرار گرفت. در بررسی میزان کارایی آرایه قارچی، میانگین درصد مرگ و میر لاروهای آفت در غلظت‌های 10^4، 10^5 و 10^6 اسپور در میلی لیتر قارچ به ترتیب ۴۴، ۷۲ و ۸۶ بود و بر اساس آنالیز پروبیت با نرم افزار SAS میزان LC50 قارچ *P. formosus* بر لاروهای سوسک سرشاخه‌خوار رزاسه 2×10^4 اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد. در پژوهش حاضر، آرایه *P. formosus* بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی، برای اولین بار از روی این حشره در ایران گزارش می‌شود. با توجه به میزان مرگ و میر بالای ایجاد شده توسط این آرایه قارچی روی لاروی آفت سوسک شاخک بلند رزاسه، امکان استفاده از آن در برنامه کنترل تلفیقی آفت می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، بیمارگر حشرات، ناحیه ITS

مقدمه

سوسک شاخک بلند رزاسه با نام علمی *Osphranteria coerulescens* (Col: Cerambycidae) در اکثر مناطق میوه‌خیز کشور وجود دارد. این آفت به انواع درختان میوه خانواده رزاسه شامل سیب، گلابی، به، گیلاس، هلو، زردآلو، بادام، آلو، گوجه، آلبالو، زالزالک، به ژاپنی، رز، هلو و زردآلو حمله می‌کند. این حشره در سال یک نسل دارد و زمستان‌گذرانی آن به‌صورت لارو داخل شاخه‌ها می‌باشد. خسارت اصلی مربوط به لاروهای این آفت است که با تغذیه از قسمت مرکزی شاخه ها و ایجاد کانال‌هایی در آن موجب قطع شدن آوندها و مختل شدن جریان شیره نباتی شده و در نتیجه برگ‌ها و شاخه ها پلاسیده و سپس خشک می‌شود (Rajabi, 2002). این آفت در مناطق وسیعی از استان خراسان جنوبی انتشار دارد. تغذیه و فعالیت این آفت در باغ‌های زردآلو و بادام منجر به خسارت شدید شده است و فعالیت برخی دشمنان طبیعی بومی نیز نتوانسته است خسارت آن را به‌طور کامل مهار کند (Tavakkoli Korghond *et al*., 2019). تفریخ سریع تخم‌ها و نفوذ

لاروهای آفت به داخل شاخه‌ها عملا مبارزه شیمیایی را بی‌تاثیر می‌کند. روش‌های کنترل بیولوژیک در روش مدیریت تلفیقی می‌تواند کارایی کنترل را افزایش دهد و قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر آفات منابع بالقوه با ارزش برای این روش کنترل محسوب شده و در این راستا مطالعات شناسایی عوامل آنتاگونیست جدید و امید بخش ضروری می‌باشد (*Amaresan et al*., 2020). تاکنون عوامل قارچی آنتاگونیست شامل *Beauveria bassiana*، *Metarhizium anisopliae* (Mohamadiani *et al*., 2019)، *Paecilomyces lilacinus* (Hamidi *et al*., 2005) روی این آفت در کشور گزارش شده است. گونه‌های مختلف جنس *Paecilomyces* در منابع مختلف به‌عنوان عوامل مهار زیستی روی عوامل بیماریزای گیاهی، آفات و نماتدهای بیمارگر معرفی و اخیرا به عنوان عوامل محرک در رشد گیاهان نیز گزارش شده‌اند (Moreno–Gavíra *et al*., 2020). اعضای جنس *Paecilomyces* به دو گروه *sect. Paecilomyces* و *sect. Isarioidea* تفکیک می‌شوند. بر اساس مطالعات فیلوژنتیکی گونه‌های بیمارگر حشرات و نماتدها در گروه Isarioidea با گونه تیپ *P. farinosus* قرار می‌گیرند (Inglis and Tigano, 2006). با توجه به دامنه میزبانی و خسارات بالای آفت سوسک سرشاخه‌خوار به محصولات مهم در خانواده رزاسه و از طرفی عدم کارایی موثر روش‌های کنترل شیمیایی در مهار این آفت، شناسایی آنتاگونیست‌های آن در راستای بکارگیری در مدیریت تلفیقی امری ضروری بوده و این تحقیق در راستای شناسایی عوامل قارچی بیمارگر جدید و موثر برای کنترل این آفت انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

از اردیبهشت تا بهمن ماه ۱۳۹۱ از باغ‌های بادام و زردآلو آلوده به آفت سوسک سرشاخه‌خوار رزاسه در استان خراسان جنوبی و در سه منطقه شامل شهرستان‌های فردوس، سرایان و قاین نمونه‌برداری انجام شد. لاروهای مرده یا با علایم تغییر رنگ سیاه از داخل شاخه‌ها جمع‌آوری و بعد از ضدعفونی با اتانول ۷۰ درصد و در ادامه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد روی محیط های کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت داده شد. نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی قرار گرفت. جدایه‌ها به روش تک اسپور روی محیط آب آگار خالص و شناسایی قارچ بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی انجام گرفت (Samson *et al*., 2009). تکثیر بخشی از ناحیه ژنی ITS جهت تایید شناسائی مبتنی بر ریخت‌شناسی انجام شد.

آزمون اثبات بیماری‌زائی جدایه‌ها با غوطه‌ورکردن لاروهای سن سه درون سوسپانسیون قارچ با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر به مدت ۱۰ ثانیه انجام شد. در نمونه شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. جداسازی مجدد بیمارگر از نمونه‌ها انجام شد (Pelizza *et al*., 2011).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

حدود ۱۰۰ میلی‌گرم میسلیوم رشدیافته روی محیط کشت مالت آگار به هر میکروتیوب منتقل شد. استخراج DNA از میسلیوم با Chelex100 پنج‌درصد به روش تغییریافته Walsh *et al*. (1991) انجام شد. جهت تکثیر بخشی از ناحیه rDNA از ترکیب آغازگرهای ITS5/ITS4 استفاده شد (White *et al*., 1990). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (شرکت Wizpure)، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر DNA الگو و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها انجام شد. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل واسرشت‌سازی اولیه در یک چرخه ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه، و ۳۳ چرخه شامل واسرشت‌سازی با در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۳ درجه سلسیوس به‌مدت نیم دقیقه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه و یک چرخه شامل گسترش نهائی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Mahmoudi *et al*., 2018). محصول PCR با روش اتوماتیک سانگر پس از تخلیص توسط شرکت Bioneer کره جنوبی توالی‌یابی شد. اطلاعات توالی‌ها با استفاده از نرم افزار Bioedit (version 5.0.6) ویرایش و در بانک ژن جهانی به شماره

MW386464 ثبت گردید. مقایسه توالی جدایه‌ها با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) با نرم افزار آنلاین Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) انجام شد. همردیف‌سازی چندگانه توالی جدایه به همراه توالی‌های استخراج شده از بانک ژن با رویه Clastal W در برنامه MEGA5 انجام گرفت. درخت فیلوژنی با رویه Neighbor–Joining همراه با آزمون حمایتی بوت استرپ (۱۰۰۰ تکرار) انجام شد (Tamura *et al.*, 2013). توالی جدایه‌ای از *Thermoascus crustaceus* مستخرج از بانک ژن به‌عنوان گروه خارجی (outgroup) در ترسیم درخت تبارزائی استفاده گردید.

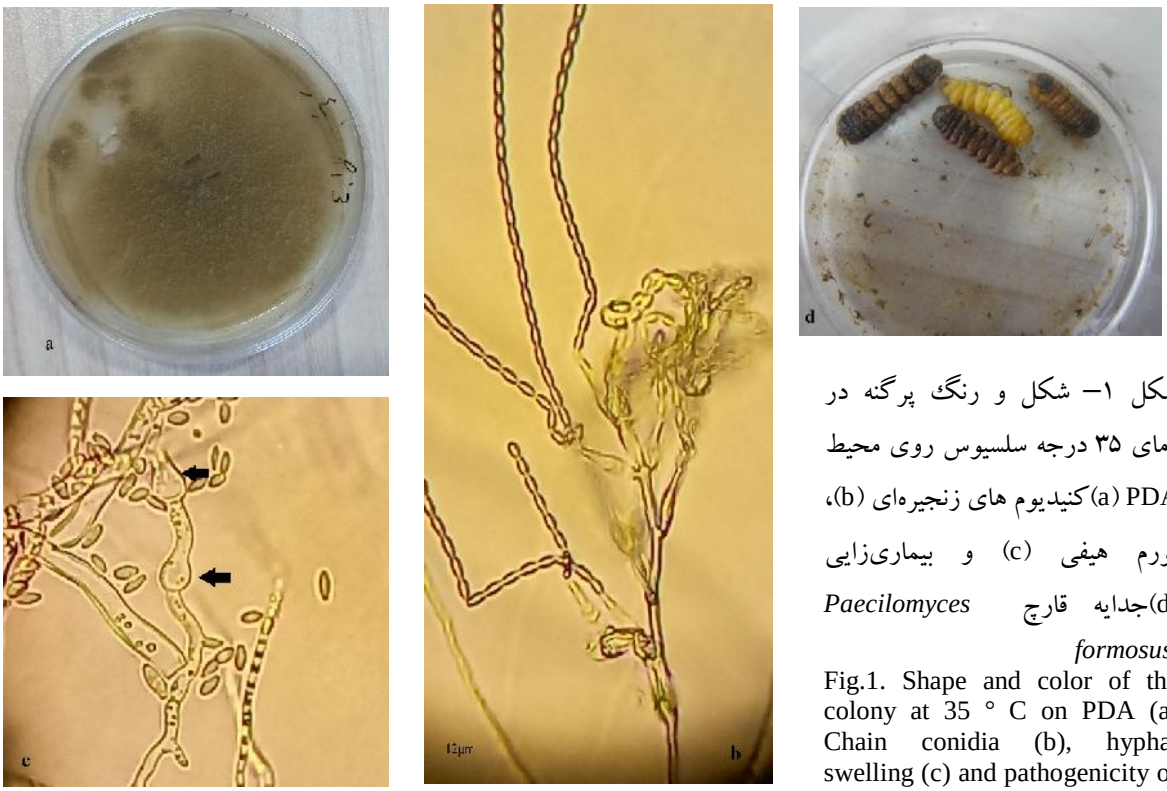
بررسی کارایی آنتاگونیستی قارچ در شرایط آزمایشگاه

سوسپانسیون اسپور قارچ در سه غلظت 10^4، 10^5 و 10^6 اسپور در میلی‌لیتر تهیه و لاروهای سالم سن ۳ سوسک سرشاخه‌خوار بعد از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به‌مدت یک دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل، در سوسپانسیون اسپور به‌مدت ۲۰ ثانیه غوطه‌ور شد. این آزمایش در سه تکرار و در هر تکرار از ۱۰ عدد لارو استفاده شد. لاروها درون ظروف پتری استریل در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و مشاهدات روزانه صورت ثبت شد. در تیمار شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. نتایج با رویه آماری ANOVA با سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میزان مرگ و میر تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد با فرمول ابوت (Abbott, 1925) به اصلاح و داده‌ها با استفاده از فرمول Arcsin(x) نرمال شد. نرمال بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov–Smirnov تایید شد. مقادیر LC50 با آنالیز پروبیت محاسبه و از نرم افزار SAS برای تجزیه آماری داده‌ها استفاده گردید.

نتیجه و بحث

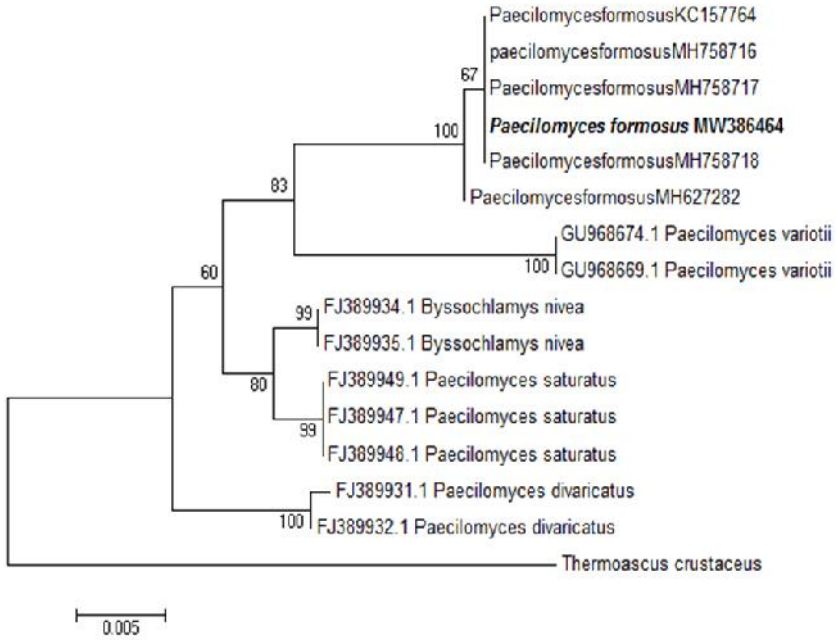
در نمونه‌برداری‌های انجام شده از درختان آلوده در شهرستان فردوس، لاروهای مرده مشاهده و عامل آنتاگونیست جداسازی و شناسایی شد. متوسط قطر پرگنه روی محیط کشت زاپک آگار در دمای ۴۰ درجه سلسیوس بعد از ۵ روز حدود ۴ میلی‌متر، روی محیط کشت مالت آگار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بعد از ۵ روز حدود ۲۰ میلی‌متر، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بعد از ۵ روز حدود ۱۵ میلی‌متر، در دمای ۳۵ درجه سلسیوس بعد از ۵ روز حدود ۲۲ میلی‌متر تعیین شد. رنگ پرگنه روی محیط PDA در دمای ۳۰ درجه سلسیوس ابتدا سفید رنگ و سپس استخوانی تا زرد خرمائی رنگ شد. کنیدیوفورها به‌طور نامنظم منشعب شده و فیالیدهای فلاسکی شکل با ابعاد ۱۳–۷ × ۳–۲ تشکیل شد. کنیدیوم‌ها بیضی تا استوانه‌ای شکل و غالبا به‌رنگ زرد خرمایی، در زنجیرهای بلند و به ابعاد ۲/۵–۵ × ۳/۵–۱۰ میکرومتر بودند. کلامیدوسپور با دیواره صاف در محیط کشت و بدن لاروهای مرده تشکیل و تورم‌های هیفی مشاهده شد (شکل۱). مرحله جنسی قارچ روی محیط‌های کشت فوق مشاهده نشد.

بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی قارچ جداسازی شده، عنوان گونه *Paecilomyces formosus* (Sakag., May. Inoue &Tada) تشخیص داده شد که از لحاظ مشخصات ریخت‌شناسی با توصیف Samson *et al*. (2009) مطابقت دارد و فقط در مورد میانگین میزان رشد روی محیط کشت مالت آگار، جدایه‌های مورد مطالعه رشد کمتری نشان دادند. جدایه‌های این آرایه قارچی قادر به ایجاد فاز مخمری بوده، بنابراین خصوصیت دوشکلی دارد. به‌طوری‌که پرگنه‌های رشد یافته از بدن لاروهای تلقیح شده روی محیط کشت مالت–آگار به‌صورت تشکیل آرتروسپور و تولید سلول‌های مخمری مشاهده گردید. پس از گذشت ۷ روز پرگنه قارچی در شرایط فوق به هیف و کنیدی تغییر شکل داد. آنالیز ۵۱۴ جفت نوکلئوتید ناحیه ژنی ITS جدایه نماینده قارچ مورد مطالعه با نرم افزار بلاست شباهت ۱۰۰ درصد با توالی گونه *P. formosus* به شماره دسترسی MH758716 نشان داد. در مطالعه فیلوژنی جدایه مورد مطالعه در کلاد گونه‌های *P. formosus* قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۱– شکل و رنگ پرگنه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس روی محیط PDA (a) کنیدیوم های زنجیره‌ای (b)، تورم هیفی (c) و بیماری‌زایی (d) جدایه قارچ *Paecilomyces formosus*

Fig.1. Shape and color of the colony at 35 ° C on PDA (a) Chain conidia (b), hyphal swelling (c) and pathogenicity of *Paecilomyces formosus* (d)



شکل ۲– درخت تبارزائی ترسیم شده از توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS گونه *Paecilomyces formosus* بر اساس پیوند هم‌جواری همراه با آزمون بوت استرپ (۱۰۰۰ تکرار)

Fig. 2. Phylogenetic tree based on ITS sequences of *Paecilomyces formosus* strains using neighbor–joining method. The reliability of fungal species in phylogenetic tree showed by bootstrap analysis with 1000 replicates in nodes of tree.

بیماری‌زایی جدایه‌ها هفت روز بعد از تلقیح روی لاروهای سوسک سرشاخه‌خوار رزاسه مشاهده و قارچ شناسایی شده مجددا جداسازی گردید (شکل۱–d). در بررسی میزان کارایی این جدایه نتایج تجزیه واریانس نشان داد بین غلظت های مختلف اسپور قارچ تفاوت معنی دار در میزان کشندگی لاروهای آفت وجود دارد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر آنتاگونیستی غلظت‌های مختلف قارچ *Paecilomyces formosus* بر لارو سوسک سرشاخه خوار رزاسه

Table 1. Analysis of variance (ANOVA) of antagonistic effects by different *Paecilomyces formosus* concentrations on *Osphranteria coerulescens* larvae

Source	Degrees of freedom	Mean Squares	F–statistic	p–value
Treatments	3	0.622	254	0.0001**
error	8	0.002		
Total	11			

CV: 8.54 **: داده ها در سطح یک درصد معنی دار

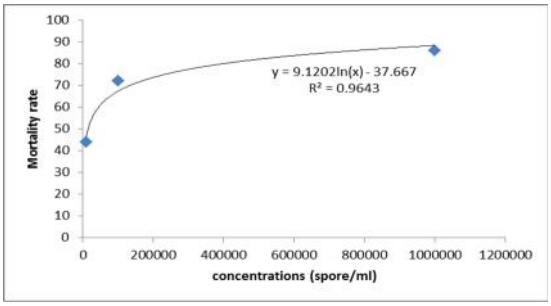
جدول ۲- میانگین درصد مرگ و میر لارو سوسک رزاسه حاصل از جدایه *Paecilomyces formosus* در غلظت‌های مختلف

Table 2. Mean of mortality percentage of by *Paecilomyces formosus* in different concentrations

Concentration (conidia/ mL)	Mean of mortality percentage	LSD group
Control	0	a
10^4	44	b
10^5	72	c
10^6	86	d

LSD: 0.09

میانگین درصد مرگ میر لاروهای آفت در غلظت‌های ۱۰^۴، ۱۰^۵ و ۱۰^۶ اسپور در میلی‌لیتر به ترتیب ۴۴، ۷۲ و ۸۶ درصد بود (جدول ۲) و بر اساس آنالیز پروبیت با نرم افزار SAS میزان LC_{50} قارچ *P. formosus* بر لاروهای سن ۳ سوسک سرشاخه‌خوار رزاسه ۲×۱۰^۴ اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد (شکل ۳). گونه‌های مختلف جنس *Paecilomyces* در منابع مختلف به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک آفات معرفی شده‌اند. در این تحقیق معرفی گونه *P. formosus* روی لارو سوسک سرشاخه‌خوار رزاسه برای اولین بار گزارش می‌شود و نتایج نشان داد کارایی موثری در پارازیته کردن لارو این آفت دارد. در بین گونه‌های *Paecilomyces*، گونه‌های *Isaria farinose* (syn. *Paecilomyces farinosus*) و *Isaria fumosorosea* (syn. *P. fumosoroseus*)، *P. lilacinus* و *P. tenuipes* به‌عنوان آرایه‌های بیمارگر حشرات شناخته شده و مطالعات بسیاری در زمینه تاثیر کارائی آن‌ها روی حشرات انجام شده است (Zimmermann, 2008). گونه *P. formosus* از گونه کمپلکس *Paecilomyces variotii* بر اساس معدودی از خصوصیات ریخت‌شناسی و داده‌های ملکولی جدا شده است (Samson *et al*., 2009). گونه *P. variotii* از منابع مختلف نظیر غذاهای پاستوریزه، خاک، هوا، چوب جداسازی شده و جدایه‌هایی از این گونه به عنوان بیمارگرهای ضعیف در علم پزشکی گزارش شده‌اند (Houbraken *et al*., 2010). جدایه‌های *P. formosus* نیز به‌عنوان عامل بیمارگر در گیاه (Sabernasab *et al*., 2019)، عامل ایجاد حساسیت پوستی در انسان (Kuboi *et al*., 2019) و عامل اندوفیت در گیاه (Bilal *et al*., 2018) گزارش شده‌اند.



شکل ۳– نمودار درصد مرگ و میر لاروهای سن ۳ سوسک سرشاخه‌خوار هسته‌داران در غلظت‌های مختلف جدایه *Paecilomyces formosus*

Fig. 3. Mortality rate of Rosaceous longhorn larvae following treatment by different concentrations of the *Paecilomyces formosus*

Hamidi *et al.* (2005) آرایه قارچی *P. lilacinus* را به عنوان بیمارگر لارو سوسک سرشاخه‌خوار رزاسه جداسازی و بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی شناسائی و گزارش نموده‌اند در حالی که آزمون اثبات بیماری‌زائی توسط این محققان انجام نشده است. در پژوهش حاضر، آرایه *P. formosus* بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی از روی این حشره گزارش می‌شود. بنابراین این دومین جداسازی این جنس قارچی از سوسک سرشاخه‌خوار رزاسه و اولین گزارش از بیماری‌زائی آن روی این حشره در دنیا می‌باشد. جدایه *P. formosus* (MW386464) با حمایت کامل بوت استرپی در گروه جدایه‌های این گونه قرار می‌گیرد که مشتمل بر جدایه‌های اندوفیت یا بیمارگر گیاهی با دامنه میزبانی وسیع است. این جدایه در دامنه دمائی رشد با جدایه‌های بیمارگر پسته گزارش شده توسط Mirzaee *et al.* (2016) تفاوت داشت در حالی که خصوصیات ریخت‌شناسی آن با جدایه‌های پسته از نظر رنگ و شکل خصوصیات ظاهری پرگنه روی محیط PDA و خصوصیات ریخت‌شناسی شباهت داشت، از این رو جهت تعیین حدود و ثغور گونه مطالعات مبتنی بر چندژنی و خصوصیات فیزیولوژیکی در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌گردد. بر اساس مطالعات متاژنومیک مکانیسم‌های کنترل عوامل بیماری‌زا و حشرات در گونه‌های جنس *Paecilomyces* شامل مکانیسم‌های مستقیم از جمله پارازیتیسم، رقابت و آنتی بیوز و روش‌های غیر مستقیم شامل القای مقاومت در گیاهان است (Moreno–Gavíra *et al.*, 2020). با توجه به بیمارگری این گونه قارچی روی آفت مهم سوسک سرشاخه‌خوار درختان میوه هسته‌دار، امکان استفاده از آن در ساخت آفت‌کش بیولوژیک جهت استفاده در برنامه کنترل تلفیقی این آفت می‌تواند مد نظر قرار گیرد و از طرفی با توجه به جدید بودن گونه معرفی شده مطالعات تکمیلی در خصوص تاثیر آن روی حشرات مفید از جمله پارازیتویدها و شکارگرها در راستای تجاری‌سازی محصول و بکارگیری در برنامه‌های کنترل تلفیقی ضروری می‌باشد.

.

References

Amaresan, N.M., Senthil Kumar. K., Annapurna Krishna Kumar, A. & Sankaranarayanan. A. 2020. Beneficial Microbes in Agro–Ecology: Bacteria and Fungi. William Andrew Publishing, 932 pp.

Bilal, S., Ali, L., Khan, A.L., Shahzad, R., Asaf, S., Imran, M., Kang, S.M., Kim, S.K. & Lee, I.J. 2018. Endophytic fungus *Paecilomyces formosus* LHL10 produces sester–terpenoid YW3548 and cyclic peptide that inhibit urease and α–glucosidase enzyme activities. Archea Microbiolology, 10: 1493–1502.

Hamidi, H., Sadeghi, S., Salary, A., Ostovan, H., Askary, H. & Zahedi, M. 2005. Report of the entomopathogen fungus *Paecilomyces lilacinus* on Osphranteria coerulescens from Iran. Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 3(2): 213–218.

Houbraken, J., Verweij, P.E., Rijs, A.J., Borman, A.M. & Samson, R.A. 2010. Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings. Journal of Clinical Microbiology, 48: 2754–2761.

Inglis, P. & Tigano. M. 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA–ITS Sequences. Genetics and Molecular Biology–Genetics and Molecular Biology, 29: 132–136

Kuboi, T., Okazaki, K., Inotani, M., Sugino, M., Sadamura. T., Nakano. A. Kobayashi, S., Ota, A., Nishimura, K. & Yaguchi, T. 2016. A case of cutaneous *Paecilomyces formosus* infection in an extremely premature infant. Journal of Infection and Chemotherapy, 22: 339–41.

Mirzaee, M.R., zare, R., Mirabolfathi, M., Ghasemi, A., Mahmoudi, H., Atarodi, B., Elhami, H., Karimi, M., yoosefi, M., Safari, M. & Haghdad, A. 2016. Etiology of pistachio di–back in Southern Khorasan province. Final report of project.

Mahmoudi, H., Amini, A., Mirzaee, M.R., Sadeghi, H. & tavakkoli, G.R. 2018. *Clonostachys rosea*, a new and promising entomopathogenic fungus infecting pupa of jujube fruit fly, *Carpomya vesuviana*. Mycologia Iranica, 5: 43–49.

Mohamadiani, M., Karimi, J. & Moravej. G.H. 2019. A new record of insect pathogen on larva of Rosaceous longhorn beetle, *Osphranteria coerulescens* (Coleoptera: Cerambycidae). Biological Control of Pests and Plant Diseases, 8: 75–84.

Moreno–Gavira, A., Huertas, V., Dianez, F., Sanchez–Montesinos, B. & Santos, M. 2020. *Paecilomyces* and Its Importance in the Biological Control of Agricultural Pests and Diseases. Plants (Basel, Switzerland), 12: 1746.

Rajabi, G.R. 2002. Fruit tree pests. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). Iran.

Pelizza, S.A., Stenglein, S.A., Cabello, M.N., Dinolfo, M.I. & Lange, C.E. 2011. First record of Fusarium verticillioides as an entomopathogenic fungus of grasshoppers. Journal of Insect Science, 11: 1–8.

Sabernasab, A., Jamali S., Marefat, A. & Abbasi, S. 2019. Molecular and Pathogenic Characteristics of Paecilomyces formosus, a New Causal Agent of Oak Tree Dieback in Iran. Forest Science, 65: 743–750.

Samson, R.A., Houbraken, J., Varga, J. & Frisvad, J.C. 2009. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. Persoonia, 22: 14–27.

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.

Tavakkoli Korghond, G., Ebrahimi, E. & Mahmoudi, H. 2019. [Short Article] Distribution, seasonal activity and efficacy of Ooencyrtus ferdowsii (Hym.: Encyrtidae), egg parasitoid of rosaceous long horn beetle, Osphranteria coerulescens (Col.: Cerambycidae). BioControl in Plant Protection, 7: 163–171.

Walsh, P.S., Metzger, D.A. & Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR–based typing from forensic material. Bio Techniques, 10: 506–513.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Eds). Academic Press, New York, USA.

Zangeneh, S. & Ghazavi. M. 2009. 'New records of entomophthoralean fungi from iran', rostaniha, 9: 190–203.

Zimmermann, G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinose* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the Isaria fumosorosea species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. Biocontrol Science and Technology, 18: 865–901.

Paecilomyces formosus, a new pathogen of *Osphranteria coerulescens* from Iran

Hadi Mahmoudi, Mohammadreza Mirzaei, Gholamreza Tavakkoli Korghond

Plant Protection Research Department, South–Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Birjand, Iran

Corresponding author: Hadi Mahmoudi, email: Hd_mahmoudi@yahoo.com

Received: Feb., 07, 2021 8(2) 135–142 Accepted: Aug., 22, 2021

Abstract

The Rosaceous long–horned beetle (*Osphranteria coerulescens*) attacks a range of fruit trees belonging to Rosaceae family. Starting from May to February 2012, samples of branches infected with *O. coerulescens* were collected from almond and apricot orchards in South Khorasan province of Iran and subsequently the fungal pathogens were isolated and identified. Based on the morphological characteristics of the isolated fungus, it was identified as *Paecilomyces formosus* and in the phylogenetic study the representative isolate was located in clade of *P. formosus*. In evaluating the efficiency of fungal arrays, the mean mortality rate of larvae at concentrations of 10^4, 10^5 and 10^6 spores per ml of was 44, 72 and 86, respectively. The LC50 for beetle larvae were calculated as 2×10^4 spores per ml. In the present study, isolation and pathogenicity of *P. formosus* on this insect is reported for the first time both in Iran and worldwide based on morphological and molecular data. Due to the high mortality rate of this fungal array on the larvae of the beetle pest, the potential of its application in the integrated pest control program can be considered.

Keywords: biological control, insect pathogen, ITS region