



Semarak Proceedings of Natural and Environmental Sciences

Journal homepage:
<https://semarakilmu.my/index.php/spnes/index>
ISSN: 3083-8191



Pemencilan Nematoda dari Tanah Tanaman Limau Kasturi dan Kesan Nematoda Sebagai Entomopatogen bagi Afid Toxoptera Citricidus. *Isolation of Nematodes from Calamansi Lime Plant Soil and the Effect of Entomopathogenic Nematodes for Aphid (Toxoptera Citricida)*

Izham N.F.M.^{1,2}, Jalinis Jalinis^{1,2}, * Sundaram D.A.N.^{1,2} Abba A.³, Wan Nurashikin Khairuddin^{1,2}

¹ Jabatan Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, 43600, Selangor

² Makmal Entomologi Gunaan, Pusat Sistematis Serangga, Jabatan Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor

³ Federal Polytechnic Bali, Nigeria

ABSTRACT

Serangga perosak afid *Toxoptera citricidus* merupakan serangga perosak utama yang paling banyak dijumpai di kawasan tanaman pokok limau kasturi *Citrus microcarpa* organik, Taman Botani Bangi (TBB) UKM. *T. citricidus* menjejaskan kawasan pucuk meristem dan permukaan daun serta menyebabkan jangkitan virus dan kulat kepada pokok limau kasturi ini. Pihak pengurusan TBB UKM mengeluarkan hasil tanaman limau kasturi organik, bagi mengekalkan keadaan ini kawalan secara biologi sedia ada di lapangan amat perlu diutamakan. Oleh itu, objektif pertama kajian ini adalah bertujuan untuk mengenalpasti agen kawalan biologi berpotensi iaitu nematoda entomopatogen yang terdapat di tanah tanaman limau kasturi tersebut. Objektif kedua pula untuk menguji kesan koleksi nematoda entomopatogen Makmal Entomologi Gunaan (MEG) ke atas *T. citricidus* di makmal. Pensampelan tanah telah dilakukan di 10 lokasi berdekatan pokok limau kasturi TBB UKM. Hasil pemencilan menunjukkan 20% sampel tanah positif terhadap kehadiran nematoda entomopatogen ini. Tiga spesies nematoda koleksi MEG; *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis indica*, dan nematoda Pulau Redang (NPR1) bermula dari kepekatan 50ij, 100ij, 150ij, 200ij, 250ij, dan 300ij telah digunakan. Analisa Kaplan Meier dan analisa uji log pangkat telah digunakan bagi melihat perbezaan antara kepekatan ij dan melihat kepekatan yang dapat meningkatkan kadar kematian serangga perosak dengan pantas. Kesan kepekatan nematoda yang tinggi bagi *S. feltiae* dan *H. indica* iaitu 300ij hanya memerlukan masa 6 jam sahaja untuk menurunkan kadar kelangsungan hidup *T. citricidus* kepada 0.5. Kesimpulannya, nematoda entomopatogen ini merupakan organisma yang boleh dijumpai di mana-mana habitat termasuk tanah tanaman pokok limau kasturi di TBB. Kebolehan nematoda entomopatogen menjangkiti serangga *T. citricidus* menunjukkan potensinya sebagai agen kawalan biologi terhadap serangga perosak *T. citricidus*.

The aphid Toxoptera citricidus is the main pest found in the area of citrus plant Citrus microcarpa at Taman Botani Bangi (TBB) UKM. Aphids infest the shoot meristem and leaf surface, causing viral and fungal infections in these plants. TBB UKM produces organic citrus fruits with minimal use of chemical insecticides for pest control application. To sustain this practice, this study explores biological control using entomopathogenic nematodes. The first objective is to identify potential biological control agents of entomopathogenic nematodes in the soil at TBB, UKM. The second objective is to test the efficiency of three species of entomopathogenic nematodes from the Applied Entomology Laboratory MEG collection which are Steinernema feltiae, Heterorhabditis indica, and nematode from Pulau Redang NPR 1, on aphids in the lab. Soil sampling was done at 10 locations near the calamansi plant area at TBB UKM. Isolation results showed 20% of soil samples were positive for entomopathogenic nematodes. Three nematode species from the MEG collection, at concentrations of 50ij, 100ij, 150ij, 200ij, 250ij, and 300ij, were tested on aphids. Kaplan-Meier analysis and log-rank tests were used to evaluate the differences between concentrations and identify the most effective concentration for increasing pest mortality. The highest nematode concentration of S. feltiae and H. indica of 300ij reduced the survival rate of aphids to 0.5 in just 6 hours. Entomopathogenic nematodes, can be found in various habitats including the soil

* Corresponding author.

E-mail address: johari_j@ukm.edu.my

<https://doi.org/10.37934/spnes.1.1.3035a>

of citrus trees at TBB. In conclusion, entomopathogenic nematodes are able to kill aphid pests, showing its ability to become successful biological control agents.

Kata Kunci: Afid; biologi; entomopatogen; Kaplan Meier; nematoda

Keywords: Aphid; biology; entomopathogen; Kaplan Meier; nematode

1. Pengenalan

1.1 Serangga Perosak Tanaman Pokok Limau Kasturi

Tanaman limau kasturi (*Citrus microcarpa*) yang diusahakan oleh pihak TBB UKM telah ditanam di kawasan yang mempunyai sinaran matahari yang mencukupi serta keadaan persekitaran yang lembab. Keadaan ini telah merangsang peningkatan populasi serangga perosak seperti afid *Toxoptera citricidus* di sekitar tanaman pokok limau. Serangan afid pada tumbuhan limau adalah dengan cara menyerap sap sel tumbuhan dan mengurangkan kualiti buah limau dari segi saiz buah yang dihasilkan oleh pokok tersebut kerana kekurangan nutrien Rousselin *et al.*, [1]. Penggunaan racun serangga dalam mengawal populasi serangga perosak menyebabkan penghasilan buah yang tidak organik dan boleh menyebabkan masalah kesihatan kepada petani atau beracun yang boleh mengakibatkan kepada kematian Damalas *et al.*, [2].

1.2 Pemencilan Nematoda Entomopatogen dari Tanah Tanaman Pokok Limau Kasturi

Pemencilan nematoda entomopatogen ini disampel dari tanah dengan menggunakan kaedah umpan serangga untuk mengasingkan nematoda dari tanah seperti yang dilaporkan oleh Ingeborg *et al.*, [3]. Nematoda entomopatogen menjangkiti umpan serangga *Tenebrio molitor* bagi melengkapkan kitar hidup dan melakukan pembiakan di dalam badan serangga bagi meneruskan kelangsungan hidup nematoda. Nematoda entomopatogen ini dipengaruhi oleh keadaan tanah yang terletak di kawasan tertutup atau separa terbuka dan kehadiran hos serangga yang banyak turut memainkan peranan yang penting dalam kelangsungan hidup nematoda entomopatogen Li *et al.*, [4]

1.3 Kesan Nematoda Entomopatogen Terhadap Afid

Penggunaan musuh semulajadi bagi afid seperti nematoda entomopatogen sebagai agen kawalan biologi dalam mengawal populasi afid ini patut dipertimbangkan. Penggunaan nematoda entomopatogen dalam pengurusan serangga perosak telah dijalankan secara meluas bagi spesies afid yang berbeza seperti yang dapat dilihat dalam beberapa kajian berbeza pengarang [5-7]. Kajian ini memfokuskan kepada penggunaan tiga spesies nematoda dari koleksi Makmal Entomologi Gunaan (MEG) iaitu *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis indica*, dan nematoda Pulau Redang NPR1 sebagai agen kawalan biologi terhadap afid *T. citricidus* yang telah menjangkiti tanaman pokok limau TBB, UKM.

2. Kaedah Kajian

2.1 Pensampelan Tanah

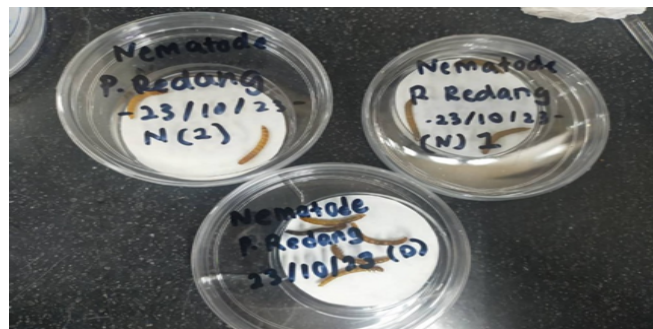
Pensampelan tanah merangkumi dua lokasi tanah kawasan tanaman pokok limau iaitu tanah di bahagian akar dan tanah di bahagian laluan antara pokok limau dengan menggunakan penyodok tanah kecil. Pokok limau berlabel 12, 27, 43, 58, dan 72 telah dipilih menggunakan kaedah garisan transek bagi merangkumi keseluruhan kawasan kajian seperti yang ditunjukkan dalam peta Rajah 1 di TBB UKM (N 2.9196176658388135, E 101.7845076308724).



Rajah 1. Peta kajian tanaman pokok limau Taman Botani Bangi UKM

2.1.1 Pemencilan nematoda daripada sampel tanah

Pemencilan nematoda dilakukan dengan menggunakan umpan serangga sebagai perumah untuk memindahkan nematoda dari tanah ke dalam piring petri. Umpan serangga yang digunakan adalah larva kumbang *Tenebrio molitor* sebagai perumah kepada nematoda. *T. molitor* yang telah mati dipindahkan dan diperiksa di bawah mikroskop cahaya untuk mengesan kehadiran nematoda. Seterusnya, *T. molitor* akan dipindahkan ke dalam perangkap putih bagi proses pengasingan nematoda entomopatogen daripada umpan serangga Stock *et al.*, [8] seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 2.



Rajah 2. Teknik perangkap putih yang dijalankan bagi mengasingkan nematoda EPN dari *T. molitor*

2.2 Pensampelan Afid

Sekurang-kurangnya 10 pokok limau disaring dan diperhatikan secara rawak bagi memastikan jika pokok tersebut mempunyai afid atau tidak. Afid spesies *T. citricidus* ini dikenalpasti dengan melihat pada permukaan badan afid yang berkilat dan mempunyai warna coklat gelap kehitaman serta habitat spesies ini adalah pada kawasan pucuk muda pokok limau yang belum berkembang, seperti yang dinyatakan oleh European and Mediterranean Plant Protection Organization [9].

2.3 Ujian Bioasai Nematoda ke atas *T. Citricidus*

Ujian bioasai nematoda dijalankan dengan menggunakan tiga spesies nematoda iaitu *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis indica*, dan nematoda Pulau Redang NPR1 dengan kepekatan juvenil menjangkiti yang berbeza. Kepekatan yang ditetapkan bagi setiap spesies nematoda EPN

adalah 50ij, 100ij, 150ij, 200ij, 250ij dan 300ij ke atas 10 ekor afid. Ujian bioasai ini dilakukan di dalam piring petri yang mengandungi sehelai daun, afid dan nematoda EPN.

2.4 Data Analysis

2.4.1 Pengiraan peratusan

Kejayaan pemencilan nematoda entomopatogen diukur dengan menggunakan kaedah pengiraan peratusan untuk membandingkan peratusan kejayaan dengan penyebut denominator iaitu 100 Araujo *et al.*, [10] seperti persamaan 1.

$$\text{Peratusan kehadiran nematoda} = (\text{jumlah sampel positif}) / (\text{jumlah sampel tanah}) \times 100 \quad (1)$$

2.4.2 Lengkok Kaplan Meier

Lengkok Kaplan Meier merupakan kaedah analisis data yang digunakan bagi menginterpretasikan data pengiraan kebarangkalian kelangsungan hidup *T. citricidus* dalam bentuk graf yang lebih mudah untuk dilihat. Pengiraan kebarangkalian kelangsungan hidup *T. citricidus* dilakukan terlebih dahulu untuk diplotkan ke dalam graf. Paksi-x graf ini merupakan masa (*j*) manakala paksi-y merupakan kadar kebarangkalian kelangsungan hidup *T. citricidus*, survival probability *S(t)* selepas didedahkan dengan kepekatan nematoda entomopatogen yang berbeza Jager *et al.*, [11]. Seterusnya, analisa uji log pangkat dilakukan bagi mencari nilai *p* analisis dengan menggunakan kaedah khi kuasa dua seperti persamaan 2.

$$\chi^2 = \frac{(\sum_{j=1}^J O_{(i,j)} - \sum_{j=1}^J E_{(i,j)})^2}{(\sum_{j=1}^J V_{(i,j)})} \quad (2)$$

3. Hasil

3.1 Kehadiran Nematoda Entomopatogen daripada Tanah Tanaman Limau

Terdapat 20% sampel tanah bagi pokok berlabel 12 dan 72 mempunyai kehadiran nematoda entomopatogen ditunjukkan pada Rajah 3 serta berjaya diasingkan menggunakan perangkap putih selepas 3 kali proses pemencilan. Faktor biotik seperti keadaan tanah yang bertekstur ringan merupakan keadaan habitat tanah yang disukai oleh nematoda seperti tanah berpasir atau berkelodak Blackshaw [12]. Kehadiran air yang terhad menyebabkan *T. molitor* mati akibat kekeringan. Terdapat juga *T. molitor* yang dijangkiti spesies kulat yang telah menyerang semua jenis peringkat hidup nematoda entomopatogen menyebabkan kesukaran proses pemencilan dilakukan Jiang *et al.*, [13].



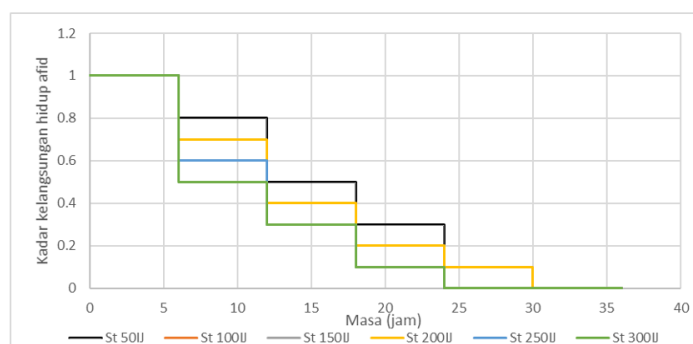
Rajah 3. Kehadiran nematoda EPN (anak panah merah) yang dipencilkan dari tanah pokok limau kasturi

3.2 Kesan Nematoda Entomopatogen ke atas Keadaan *T. Citricidus*

EPN *H. indica* memerlukan masa 24 jam sahaja untuk menjangkiti kesemua 10 ekor *T. citricidus* bagi kepekatan 50ij (5ij/serangga) berbanding menggunakan nematoda *S. feltiae* memerlukan 30 jam dan NPR1 memerlukan 42 jam. Hal ini dikaitkan dengan kebolehan untuk nematoda menembusi *T. citricidus* melalui bukaan kecil iaitu mulut, liang dan anus yang terdapat pada permukaan badan serangga afid Renn [14]. Bakteria simbiosis yang hidup dalam badan nematoda memainkan peranan penting dalam menyebabkan kematian kepada serangga perumah iaitu afid Labaude *et al.*, [15].

3.3 Lengkur Kaplan Meier

Lengkur Kaplan Meier ini menunjukkan masa yang paling cepat bagi setiap spesies nematoda dalam menjangkiti 10 ekor afid untuk mencapai nilai median bagi kadar kelangsungan hidup afid iaitu 0.5 seperti dalam Rajah 4. Spesies nematoda EPN *H. indica* menunjukkan masa yang paling singkat iaitu kurang daripada 12 jam untuk menyebabkan kadar kelangsungan hidup afid menurun sehingga 0.5 berbanding *S. feltiae* (18 jam) dan NPR1 (36 jam). Nematoda EPN *H. indica* menunjukkan hasil yang positif dalam mengawal populasi afid dan kepekatan ij yang sesuai untuk diaplikasikan di lapangan adalah 5ij/serangga bagi nematoda spesies ini sudah mencukupi.



Rajah 4. Graf Kadar kelangsungan hidup *T. citricidus* selepas didedahkan dengan nematoda koleksi makmal: *H. indica*

4. Kesimpulan

Secara kesimpulannya, keadaan dan tekstur sampel tanah merupakan antara faktor utama yang mempengaruhi kebolehan untuk nematoda ini dipencil dengan jayanya. Kebolehan nematoda entomopatogen *H. indica* menunjukkan hasil yang positif dalam kajian ini tetapi kajian yang lebih mendalam perlu dilakukan bagi mengetahui potensi spesies ini untuk digunakan secara meluas. Spesies nematoda yang berbeza boleh menyebabkan hasil yang berbeza bergantung kepada tahap serangan, saiz dan spesies bakteria simbiosis yang berbeza.

Pengakuan

Penulis-penulis mengisytiharkan bahawa tidak mempunyai konflik kepentingan.

Rujukan

- [1] Rousselin, Aurélie, Daniele Bevacqua, Marie-Hélène Sauge, Françoise Lescourret, Karsten Mody, and Marie-Odile Jordan. "Harnessing the aphid life cycle to reduce insecticide reliance in apple and peach orchards. A

- review." *Agronomy for Sustainable Development* 37 (2017): 1-13. <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-017-0444-8>
- [2] Damalas, Christos A., and Spyridon D. Koutroubas. "Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention." *Toxics* 4, no. 1 (2016): 1. <https://doi.org/10.3390/toxics4010001>
- [3] Klingen, Ingeborg, Jørgen Eilenberg, and Richard Meadow. "Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils." *Agriculture, ecosystems & environment* 91, no. 1-3 (2002): 191-198. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00227-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00227-4)
- [4] Li, Xianping, Ting Liu, Huixin Li, Stefan Geisen, Feng Hu, and Manqiang Liu. "Management effects on soil nematode abundance differ among functional groups and land-use types at a global scale." *Journal of Animal Ecology* 91, no. 9 (2022): 1770-1780. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13744>
- [5] Iker, K. E. P. E. N. E. K. C. İ., B. İnal, T. Atay, and A. Yeşilayer. "Effect of Entomopathogenic Nematodes, on the Black Cherry Aphid, *Myzus cerasi* (F.)(Hemiptera: Aphididae)." *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 24, no. 1 (2014).
- [6] Yu-Kun, Wang, Bing Xu, Xiao-Ping Wang, Wu Lin-Lin, Zhao Nian-Xi, Ruan Wei-Bin, Gu Xing-Hui, and Zhang Li-Meng. "Effects of Entomopathogenic Nematodes on the Development of Root-knot Nematode and Aphid, and on the Parasitism of Aphid Parasitoid in Tobacco." *Journal of Agriculture Resources and Environment* 34, no. 3 (2017): 293. <https://doi.org/10.13254/j.jare.2016.0241>
- [7] Stokwe, N. F., and A. P. Malan. "Laboratory bioassays to determine susceptibility of woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum* (Hausmann)(Hemiptera: Aphididae), to entomopathogenic nematodes." *African Entomology* 25, no. 1 (2017): 123-136. <http://dx.doi.org/10.4001/003.025.0123>
- [8] Stock, S. Patricia, and H. E. I. D. I. Goodrich-Blair. "Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance." *Manual of techniques in invertebrate pathology* 2 (2012). <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00012-9>
- [9] European and Mediterranean Plant Protection Organization. "*Toxoptera citricidus*." *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 36, (2006): 451-456.
- [10] Araujo, John, and David G. Born. "Calculating percentage agreement correctly but writing its formula incorrectly." *The Behavior Analyst* 8, no. 2 (1985): 207.
- [11] Jager, Kitty J., Paul C. Van Dijk, Carmine Zoccali, and Friedo W. Dekker. "The analysis of survival data: the Kaplan-Meier method." *Kidney international* 74, no. 5 (2008): 560-565. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.217>
- [12] Blackshaw, R. P. "A survey of insect parasitic nematodes in Northern Ireland." *Annals of Applied Biology* 113, no. 3 (1988): 561-565. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1988.tb03333.x>
- [13] Jiang, X., M. Xiang, and X. Liu. "Nematode-trapping fungi. *Microbiology Spectrum*, 5 (1)(p. 12)." (2017). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0022-2016>
- [14] Renn, N. "Routes of Penetration of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema feltiae* Attacking Larval and Adult Houseflies (*Musca domestica*)." *Journal of Invertebrate Pathology* 72, no. 3 (1998): 281-287.
- [15] Labaude, Sophie, and Christine T. Griffin. "Transmission success of entomopathogenic nematodes used in pest control." *Insects* 9, no. 2 (2018): 72. <https://doi.org/10.3390/insects9020072>