

سورة



دانشگاه شاهرود

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

## مطالعه تنوع ژنتیکی قارچ‌های خاک‌زاد بیماری‌زای حشرات از باغات مرکبات

ابوالفضل مسعودی

اساتید راهنما:

دکتر ناصر فرخی

دکتر علی درخشان شادمهری

اساتید مشاور:

دکتر مهدیه پارسائیان - دکتر مجتبی ممرآبادی

پایان‌نامه‌ی ارشد جهت اخذ درجه‌ی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی


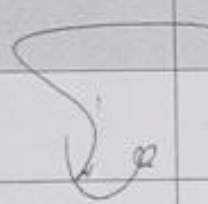
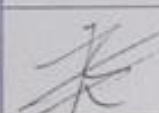
شهریور ۹۲

دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده : کشاورزی  
گروه : زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای ابوالفضل مسعودی  
تحت عنوان: مطالعه تنوع ژنتیکی قارچ‌های خاک‌زاد بیماری‌زای حشرات از باغات مرکبات

در تاریخ ۱۳۹۵/۰۷/۲۵ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد مورد ارزیابی و با درجه عالی مورد پذیرش قرار گرفت.

اعضا	اساتید مشاور	اعضا	اساتید راهنما
	نام و نام خانوادگی : دکتر محسنی ممربادی		نام و نام خانوادگی : دکتر ناصر فرخی
	نام و نام خانوادگی : دکتر مهدیه پارسائیان		نام و نام خانوادگی : دکتر علی درخشان شادمهری

اعضا	نماینده تحصیلات تکمیلی	اعضا	اساتید داور
	نام و نام خانوادگی : دکتر خلیل ازدری		نام و نام خانوادگی : دکتر شاهرخ فرنجیک
			نام و نام خانوادگی : دکتر مریم عجم حسینی

بعد از مدت ها، پس از سیمودن راه های فراوان

با نهایت احترام برای اساتید راهنما

این پایان نامه را به خواهر مهربانم تقدیم می کنم

## مشکر ویژه

حمد و سپاس خدای بزرگ و یگانه که توکل به ذات مقدسش و ذکر یادش آرامش، بخش قلب ماست.

برادر و خواهر عزیزم که بدون حمایت آنها این پایان نامه انجام نمی شد.

## مشکر و قدردانی

استاد محترم آقایان دکتر فرخی، دکتر درخشان، دکتر مرآبادی و سرکار خانم دکتر پارسایان.

مهندس مسابجوار، مهندس سعید متین، مهندس مرضیه حلیلی و آقای علی حدادان

اعضای محترم جهاد کشاورزی استان هرمزگان به ویژه مهندس جعفری و مهندس یونسی

اعضای محترم جهاد کشاورزی شهرستان فسا به ویژه مهندس جم و مهندس خیراندیش و جهاد کشاورزی شهرستان بهرم مهندس دهقان و مهندس

یزدان پناه

اعضای محترم جهاد کشاورزی شهرستان وکیل آباد استان کرمان به ویژه مهندس جوادی

کارشناسان محترم آزمایشگاه مهندس عبدالمی، مهندس فرجی، مهندس ساگر، مهندس حسین پور، مهندس کلی و مهندس مطهری نژاد.

## تعهدنامه

اینجانب **ابوالفضل مسعودی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه مطالعه تنوع ژنتیکی قارچ‌های خاک زاد بیماری‌زای حشرات از باغات مرکبات تحت راهنمایی آقایان دکتر ناصر فرّخی و دکتر علی درخشان شادمهری متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آوردن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ:

امضای دانشجو:

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

اولین همایش DNA Barcoding در آرایه‌شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد، بهمن ۱۳۹۰

### جداسازی DNA ژنومی از *Beauveria spp.* به روش ترمولیز

ابوالفضل مسعودی، ناصر فرّخی، علی درخشان شادمهری، مجتبی ممرآبادی، مهدیه پارسائیان  
دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود

بیستمین کنگره‌ی گیاه‌پزشکی، دانشگاه شیراز، شهریور ۱۳۹۱

بررسی خصوصیات مورفولوژیک جدایه‌های قارچ خاک‌زاد *Beauveria* از باغات مرکبات استان‌های

### گلستان و مازندران

ناصر فرّخی، ابوالفضل مسعودی، علی درخشان شادمهری، مجتبی ممرآبادی، مهدیه پارسائیان  
دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود

هشتمین همایش ملی بیوتکنولوژی، دانشگاه تهران، تیر ۱۳۹۲

ناحیه‌ی ITS ابزاری مناسب برای شناسایی ملکولی گونه‌های قارچ بیمارگر حشرات، *Beauveria*  
*spp.*

ابوالفضل مسعودی، ناصر فرّخی، مهسا جوکار، سعید متین، مهدیه پارسائیان، علی درخشان شادمهری  
دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود

پدافند غیرعامل در بخش کشاورزی (جزیره قشم)، فروردین ۱۳۹۲

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌های قارچ خاک‌زاد *Beauveria spp.* از باغات مرکبات استان-

### های هرمزگان و فارس

ابوالفضل مسعودی، ناصر فرّخی، علی درخشان شادمهری، مهدیه پارسائیان، مجتبی ممرآبادی  
دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود

## چکیده:

قارچ خاکزاد بیمارگر هایفوما ایست *Beauveria*، توزیع جهانی دارد و به‌عنوان یک سیستم مدل برای مطالعه‌ی بیمارگری و کنترل بیولوژیک حشرات آفت مورد علاقه است. به علت نبود اطلاعات مورفولوژیکی لازم از نظر تاکسونومیکی، شناخت گونه‌های *Beauveria* و مطالعه‌ی تنوع گونه‌ها در این جنس دشوار است. در این تحقیق، ۱۶۶ جدایه‌ی *Beauveria* از نقاط مختلف ایران جداسازی شد. آنالیز ملکولی براساس توالی‌یابی فواصل رونویسی شده‌ی داخلی (ITS) برای ۳۵ جدایه انجام گرفت. این جدایه‌ها با روش طعمه حشره‌ای جداسازی شدند. براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و ملکولی، ۲۹ جدایه به عنوان *Beauveria bassiana*، ۳ جدایه *B. amorpha*، یک جدایه به عنوان *B. brongniartii*، یک جدایه *B. sungii*، و یک جدایه *B. malawensis* شناسایی شدند. درختچه‌ی فیلوژنی براساس روش اتصال مجاور<sup>۱</sup> ترسیم شد. جدایه‌های ایرانی در ۳ شاخه‌ی مجزا قرار گرفتند. در این مطالعه به جهت یافتن جدایه‌ای مؤثر برای کنترل بیولوژیک، به ارزیابی جدایه‌های *B. bassiana* پرداختیم. این ارزیابی‌ها شامل بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی *Sitophilus oryzae*، اندازه‌گیری نرخ رشد و شمارش کنیدی بود. برای انجام بیماری‌زایی، غلظت کنیدی‌ها با استفاده لام هموسیتومتر بر روی  $10^8 \times 1$  کنیدی/ میلی‌لیتر تنظیم شد. در میان جدایه‌های *B. bassiana*، جدایه‌ی SHU.M.022 با ۸۹/۹ درصد مرگ و میر بیشترین بیماری‌زایی را بر روی *S. oryzae* داشتند. جدایه‌های SHU.M.018، SHU.M.163 و SHU.M.142 با ۲۵ درصد بیماری‌زایی، درصد بیماری‌زایی حداقلی را از خود نشان دادند. ارزیابی نرخ رشد نشان داد که جدایه‌ی SHU.M.068 با میانگین ۱۸/۲۸ میلی-متر/روز بیشترین و جدایه‌ی SHU.M.023 کمترین نرخ رشد (۴/۳۱ میلی‌متر/روز) را داشتند. آزمایش تعداد کنیدی تولیدی نشان داد که جدایه‌ی SHU.M.156 با میانگین  $37/83 \times 10^6$  کنیدی/میلی‌لیتر بیشترین تولید کنیدی و جدایه‌ی SHU.M.015 با میانگین  $4/91 \times 10^6$  کنیدی/میلی‌لیتر کمترین تعداد کنیدی را داشت.

۱- Neighbor-Joining (NJ)



فصل اول - کلیات .....	۱
۱-۱. ضرورت مطالعه و کنترل بیولوژیک آفات و آثار مخرب سموم دفع آفات نباتی .....	۳
۲-۱. مقدمه‌های بر قارچ‌های بیمارگر حشرات .....	۵
۳-۱. قارچ‌های بیمارگر حشرات و اهمیت آنها از نظر بیوتکنولوژی کشاورزی .....	۸
۴-۱. اندوفیت بودن قارچ‌های بیمارگر و اهمیت آنها از منظر بیوتکنولوژی کشاورزی .....	۱۳
۵-۱. چرخه‌ی زندگی <i>Beauveria</i> .....	۱۷
۶-۱. حضور طبیعی و توزیع جغرافیایی قارچ بیمارگر حشرات، <i>Beauveria spp.</i> .....	۱۷
۷-۱. دامنه‌ی میزبانی .....	۱۹
۸-۱. شناسایی و تشخیص .....	۲۰
۱۰-۱. ژنوم قارچ <i>B. bassiana</i> .....	۲۱
۱۱-۱. فیلوژنی <i>Beauveria</i> .....	۲۴
۱۲-۱. ارزیابی تنوع ژنتیکی در قارچ <i>Beauveria</i> .....	۲۷
۲۱-۱. نشانگرهای ریبوزومی .....	۳۱
فصل دوم- مرور منابع .....	۳۷
۱-۲ مرور منابع آزمایشات مورفولوژیک .....	۳۷
۲-۲. مطالعات فیلوژنی انجام شده در مورد <i>Beauveria</i> با استفاده از منطقه‌ی ITS .....	۳۹
۳-۲. نتیجه‌گیری و افق‌های آینده .....	۴۰
فصل سوم- مواد و روش‌ها .....	۴۲
۱-۳ مواد شیمیایی .....	۴۴

- ۴۴ ..... ۲-۳ دستگاه‌های آزمایشگاهی
- ۴۵ ..... ۳-۳ جداسازی قارچ *Beauveria*
- ۴۶ ..... ۴-۳ روش طعمه حشره‌ای
- ۴۸ ..... ۵-۳ پرورش پروانه موم‌خوار
- ۴۸ ..... ۶-۳ جداسازی قارچ *Beauveria* از لارو آلوده:
- ۵۰ ..... ۷-۳ محیط کشت انتخابی برای جداسازی *Beauveria spp.*
- ۵۰ ..... ۸-۳ محاسبه‌ی نرخ جداسازی قارچ *Beauveria* در هر منطقه
- ۵۲ ..... ۹-۳ خالص‌سازی قارچ *Beauveria* با استفاده از روش تک اسپورگیری
- ۵۳ ..... ۱۰-۳ تهیه‌ی بانک ژنی اولیه از لاروهای آلوده
- ۵۴ ..... ۱۱-۳ کشت درون شیشه‌ای قارچ به منظور تهیه‌ی بانک ژنی ثانویه
- ۵۶ ..... ۱۲-۳ نحوه‌ی نام‌گذاری جدایه‌ها
- ۵۹ ..... ۱۴-۳ اندازه‌گیری شعاعی نرخ رشد
- ۵۹ ..... ۱۵-۳ شمارش تعداد کنیدی تولیدی
- ۶۰ ..... ۱۶-۳ انجام آزمایش زیست‌پذیری (زنده مانی) کنیدی
- ۶۱ ..... ۱۷-۳ انجام آزمون زیست‌سنجی
- ۶۲ ..... ۱۸-۳ کشت قارچ *Beauveria* بر روی محیط کشت مایع به منظور استخراج DNA
- ۶۲ ..... ۱۹-۳ آماده‌سازی نمونه جهت استخراج DNA
- ۶۳ ..... ۲۰-۳ استخراج DNA ژنومی
- ۶۶ ..... ۲۱-۲ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

۶۸.....	۲۲-۳. خالص سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
۶۸.....	۲۳-۳. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از منطقه‌ی ITS1-5.8S-ITS2
۶۹.....	۵-۳. نتایج شناسایی جدایه‌های مورد مطالعه ملکولی
۷۰.....	فصل چهارم- نتایج
۷۸.....	۳-۴. تأثیر غلظت $1 \times 10^8$ کنیدی/میلی لیتر قارچ <i>Beauveria spp.</i> بر کشندگی شیشه‌ی برنج
۸۳.....	۴-۴. ارزیابی نرخ رشد جدایه‌های <i>B. iranica</i> و <i>B. bassiana</i> بر روی محیط کشت PDA
۸۳.....	۵-۴. ارزیابی شمارش کنیدی جدایه‌های <i>B. iranica</i> و <i>B. bassiana</i> بر روی محیط کشت PDA
۸۶.....	۶-۴. ارتباط میان نرخ رشد، تعداد کنیدی تولیدی و قدرت بیماری‌زایی
	۲-۵. استنتاج فیلوژنی (شاخه‌بندی) گونه‌های <i>Beauveria</i> و مقایسه‌ی آنها با دیگر جدایه‌ها و گونه‌ها
۹۰.....	
۹۴.....	۲-۵. جمع‌بندی آزمایشات مورفولوژیک
۹۶.....	۴-۵. پیشنهادات
۹۸.....	پیوست‌ها

۱۰	جدول ۱-۱: راسته‌های مهم و پارازیت‌های قارچی نکروتروف که به حشرات حمله می‌کنند
۲۲	جدول ۲-۱: گزارش لاتردال از میزبان‌های قارچ بیمارگر <i>B. bassiana</i>
۶۷	جدول ۱-۳: پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز
۷۴	جدول ۱-۴: شناسایی جدایه‌های <i>Beauveria</i> براساس پایگاه ژنی NCBI
۷۵	جدول ۲-۴: لیست گونه‌های مختلف <i>Beauveria spp.</i> مورد استفاده در پایگاه ژنی
۷۹	جدول ۳-۴: خلاصه جدول تجزیه واریانس برای بیماری‌زایی، تعداد اسپور و نرخ رشد ۵ جدایه <i>B. bassiana</i>
۷۹	جدول ۴-۴: خلاصه جدول تجزیه واریانس برای بیماری‌زایی، تعداد اسپور و نرخ رشد ۲۴ جدایه مختلف <i>B. iranica</i>
۸۰	جدول ۵-۴: گزیده‌ای از مطالعات مورفولوژیک گونه‌های شناسایی شده <i>Beauveria spp.</i>
۸۰	جدول ۶-۴: مقایسه میانگین تلفات شپشه‌ی برنج توسط جدایه‌های <i>B. bassiana</i>
۸۱	جدول ۷-۴: مقایسه میانگین تلفات شپشه‌ی برنج توسط جدایه‌های مختلف قارچ <i>B. iranica</i>
۸۴	جدول ۸-۴: مقایسه میانگین نرخ رشد جدایه‌های مختلف قارچ <i>B. bassiana</i>
۸۴	جدول ۹-۴: مقایسه میانگین نرخ رشد جدایه‌های مختلف قارچ <i>B. iranica</i>
۸۵	جدول ۱۰-۴: مقایسه میانگین تعداد کنیدی جدایه‌های مختلف قارچ <i>B. bassiana</i>
۸۵	جدول ۱۱-۴: مقایسه میانگین تعداد کنیدی جدایه‌های مختلف قارچ <i>B. iranica</i>
۹۹	پیوست ۱: جدایه‌های قارچ <i>Beauveria spp.</i> و محل جداسازی آنها
۱۰۵	پیوست ۲: محاسبه‌ی نرخ جداسازی قارچ <i>Beauveria spp.</i>
۱۰۷	پیوست ۴: درصد همولوژی میان مناطق ITS، ۱۲ گونه متفاوت <i>Beauveria</i>

۱۸	شکل ۱-۱: چرخه زندگی دو شکلی <i>Beauveria</i>
۲۵	شکل ۲-۱: RNA دو رشته‌ای در <i>B. bassiana</i>
۳۰	شکل ۳-۱: نمایی از توانمندی روش‌های ملکولی برای شناسایی قارچ‌های بیمارگر حشرات
۳۲	شکل ۴-۱: دیاگرام ساختار DNA ریبوزومی
۴۷	شکل ۱-۳: استان‌ها و شهرهایی که نمونه‌گیری خاک از آنها انجام شده است
۴۹	شکل ۲-۳: مراحل پرورش لارو و حشرات کامل پروانه موم‌خوار زنبور عسل
۵۱	شکل ۳-۳: نمایی از قارچ <i>Beauveria spp.</i> روی لارو پروانه موم‌خوار و محیط کشت
۵۵	شکل ۴-۳: نحوه تهیه ژن بانک اولیه از لاروهای آلوده
۵۵	شکل ۵-۳: نمایی از کشت قارچ <i>Beauveria</i> درون فالكون حاوی محیط کشت PDA
۵۸	شکل ۶-۳: تصویر میکروسکپی قارچ <i>Beauveria</i>
۶۴	شکل ۷-۳: نمایی از کاندانسور
۶۵	شکل ۸-۳: مراحل کلی انگشت‌نگاری DNA بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای قارچ
۷۳	شکل ۱-۴: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای منطقه ITS بر روی ژل الکتروفورز
۷۶	شکل ۲-۴: ایجاد درختچه فیلوژنی برای جدایه‌های مختلف <i>Beauveria spp.</i>
۸۲	شکل ۳-۴: اثر بیماری‌زایی <i>Beauveria bassiana</i> بر روی <i>S. oryzae</i>
۱۱۰	شکل پیوست ۱: رشد <i>C. militaris</i> بر روی حشره میزبان خود
۱۱۰	شکل پیوست ۲: تصویر <i>B. brongniartii</i> که بر روی تخته سنگی در منطقه‌ی Ardovska,
۱۱۱	شکل پیوست ۴: نمایی از لاروهای آلوده به <i>B. bassiana</i>
۱۱۲	شکل پیوست ۵: جدایه‌ی SHU.M.102 بر روی محیط کشت SDAY

## اختصارات به کار رفته در پایان نامه

نام کامل	اختصار
Potato-Dextrose Agar	PDA
Water- Agar	WA
Sabroud- Dextrose- Agar + Yeast Extract	SDA+Y
Polymerase Chain Reaction	PCR
Restriction Fragment Length of Polymorphism	RFLP
Random Amplified Polymorphic DNA	RAPD
Amplified Fragment Length Polymorphism	AFLP
Simple Sequence Repeat	SSR
Multi-Locus Enzyme Electrophoresis	MLEE
Electromorph Type	ET
Pulsed Field Gel Electrophoresis	PFGE
Internal Transcribed Spacer	ITS IGS
Inter-Genic Spacer or Non-Transcribed Spacer	ARDRA
Amplified rDNA Restriction Analysis	EF 1- $\alpha$
Elongation Factor 1- $\alpha$ <i>Galleria</i> Bait Method	GBM
Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide	CTAB
Sodium Dodocil Sulfate	SDS
PolyVinyl Pyrrolidone	PVP
Tris Borate EDTA	TBE
Dimethyl Sulfoxide	DMSO
Ethylene Di-amin Tetra Acetic Acid	EDTA

فصل اول

کلیات

کاربرد انواع مختلفی از مواد شیمیایی در طی سال‌های گذشته منجر به مقاومت آفات، سمیت برای محیط زیست، آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی، ایجاد مشکل در صنعت شیلات، نامناسب کردن شرایط زیستی برای میکروارگانیسم‌های ریزوسفر و اثرات مضر در سلامتی انسان شده است. امروزه کنترل بیولوژیک به عنوان بخشی از علوم بسیار مورد توجه قرار گرفته است و به عنوان راهکاری برای حل مسئله‌ی کاربرد وسیع آفت‌کش‌های شیمیایی محسوب می‌شود. محققان زیادی معتقدند که قارچ‌های بیمارگر حشرات ضمن مهار بسیاری از آفات، معایب سموم شیمیایی را نداشته و می‌توانند جایگزین آنها شوند.

هدف از مطالعه‌ی قارچ‌های بیمارگر حشرات، استفاده‌ی تجاری از آنها در مدیریت تلفیقی آفات است. هرچند که جدایه یا جدایه‌هایی که براساس مطالعات مورفولوژیکی مانند شکل و رنگ کلونی، تعداد اسپور تولیدی، سرعت رشد آنها و قدرت بیماری‌زایی مورد بررسی و مقایسه قرار می‌گردند و بهترین جدایه به عنوان عامل کنترلی انتخاب می‌گردد اما نباید این نکته را از نظر دور داشت جدایه‌ی معرفی شده باید به شکل صحیح شناسایی شده باشد و دارای شناسنامه باشد. راه مناسب شناسایی و تهیه‌ی شناسنامه، که علاوه بر قابل اعتماد بودن قابل تکرار نیز باشد، استفاده از روش‌های ملکولی است. در این رساله ضمن معرفی قارچ بیمارگر *Beauveria* و بررسی فاکتورهایی مانند بیماری‌زایی، تعداد اسپور تولیدی و نرخ رشد به شناسایی و طبقه‌بندی ملکولی این قارچ پرداخته می‌شود. این طبقه‌بندی از این نظر اهمیت دارد که می‌توان فهمید که حتی جدایه‌های یک گونه برای مثال *Beauveria bassiana* که از یک نمونه خاک جداسازی شده‌اند، با اینکه از نظر مورفولوژیکی، رنگ و شکل کلونی یکسان هستند اما ممکن است که از نظر ملکولی و فیلوژنی در خوشه‌ها و گروه‌های خواهری مختلفی قرار گیرند. تمرکز کارهای گذشته در مورد قارچ *Beauveria* به ندرت بر روی فیلوژنتیک بوده است و تأکید بیشتر بر روی رده‌بندی و به شکل ویژه کاربرد نشانگرهای ملکولی برای نشان دادن اختلاف میان جدایه‌ها بوده است. تلاش بر این است که در فیلوژنی *Beauveria* به سوالاتی از قبیل منشأ



تکاملی این جنس چیست؟ آیا *Beauveria* مونوفیلتیک<sup>۱</sup> (تک‌نیا) است؟ گروه خواهری (نزدیک‌ترین گونه‌هایی که با یکدیگر در یک گروه قرار می‌گیرند) برای *Beauveria* چیست؟ آیا گونه‌های مورفولوژیکی در *Beauveria* مونوفیلتیک هستند؟ و چگونه آنها به یکدیگر مرتبط می‌شوند؟ آیا گونه‌های *Beauveria* که توزیع جغرافیایی دارند ممکن است از نظر مورفولوژیکی و ژنتیکی اینقدر به یکدیگر نزدیک باشند که از نظر فیلوژنتیکی در یک گروه قرار بگیرند؟ آیا شکل جنسی *Cordyceps* به *Beauveria* نزدیک است؟ آیا شکل جنسی *Cordyceps* از *Beauveria* انشقاق پیدا کرده است؟ به علاوه با مقایسه‌ی ساختار فیلوژنی گونه‌های بومی با دیگر جدایه‌ها از نقاط دیگر دنیا می‌توان تفاوت جدایه‌های مختلف را از نظر فیلوژنی مشاهده کرد. در ادامه در مورد ضرورت مطالعه و کنترل بیولوژیک آفات و آثار مخرب سموم دفع آفات نباتی، قارچ‌های بیمارگر حشرات و جایگاه آنها در راسته‌ی Hypocreales و شکل جنسی آنها، کاربردی شدن قارچ‌های بیمارگر حشرات توسط بیوتکنولوژی، اهمیت اندوفیت بودن این قارچ‌ها از منظر بیوتکنولوژی به تفصیل صحبت می‌شود.

## ۱-۱. ضرورت مطالعه و کنترل بیولوژیک آفات و آثار مخرب سموم دفع آفات نباتی

انسان معاصر با مسائل زیادی مواجه است که یکی از آنها موضوع امنیت غذایی است. علت عمده قحطی‌ها، تباه شدن محصولات کشاورزی است که در اثر عوامل گوناگونی اتفاق می‌افتد. خشکسالی، سرمای ناگهانی هوا و شرایط نامناسب انبارداری می‌توانند به از بین رفتن این محصولات منجر شوند. اما شاید بتوان گفت نقش آفات در این میان برجسته‌تر است. ناآگاهی و عدم دسترسی به روش‌های جدید کنترل آفات و تکیه بر روش‌های سنتی و پرخطری چون استفاده مکرر و بی‌رویه و بدون منطق از سموم آفت‌کش، باعث شده که انسان و محیط زیست قربانی اینگونه فعالیت‌های نادرست شوند. مشکلات ناشی از مصرف بی‌رویه آفت‌کش‌ها زمانی ملموس‌تر می‌شود که با مصرف بی‌رویه‌ی سموم

۱- Monophyletic

شیمیایی موجب طغیان آفات و ظهور آفات جدید می شویم [۱].

با این توضیحات پیشنهاد برای به کار بردن روش کنترل بیولوژیک عاقلانه‌ترین راه به نظر می‌رسد. واژه‌ی بیوکنترل اولین بار به عنوان بازدارنده جمعیت حشرات توسط دشمنان طبیعی تعریف شد. مهمترین فرآورده‌های بیولوژیکی کنترل‌کننده آفات میکروارگانیسم‌ها هستند. حشرات نیز مانند سایر ارگانیسم‌های زنده به بیماری مبتلا می‌شوند و ابتلای به بیماری یکی از عوامل مهم مرگ و میر در شرایط طبیعی است. بیمارگرهای میکروبی حشرات شامل ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، نماتدها و پروتوزوآها می‌باشند [۲]. استفاده از میکروارگانیسم‌ها شامل جداسازی و کشت در محیط کشت‌های آزمایشگاهی و سپس تولید مایه تلقیح در مقیاس وسیع برای استفاده در زمان و مکان مناسب در گلخانه و یا مزرعه است. البته این تکنیک برای میکروارگانیسم‌هایی مناسب است که به راحتی در محیط کشت رشد می‌کنند و همچنین امکان تحریک آنها به تولید کنیدی و یا سایر اندام‌های مقاوم برای انبارداری و کاربرد وجود دارد. بسیاری از قارچ‌ها و باکتری‌ها با این روش سازگارند ولی ویروس‌ها محدودیت‌هایی دارند و باید حتماً در اندام‌های زنده تکثیر شوند [۳]. عواملی چون کاهش تأثیر کنترل شیمیایی به علت مقاومت بسیاری از آفات به آفت‌کش‌های وسیع‌الطیف و اینکه بسیاری از آفات بیشتر از این توسط مواد شیمیایی کنترل نمی‌شوند، شناسایی خطرهای زیست محیطی بسیاری از آفت‌کش‌ها، افزایش نگرانی در مورد بقایای آفت‌کش‌ها در داخل و یا روی مواد غذایی باعث شد که جامعه‌ی جهانی به فکر استفاده از روش‌های کنترل غیرشیمیایی بیفتد. اعتقاد بر این است که استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات به عنوان کنترل بیولوژیک با توسعه‌ی آنها به صورت حشره‌کش‌های زیستی پیوند خورده است. قارچ‌های بیمارگر حشرات به عنوان پارازیت‌های اختیاری و به دلیل راحتی مطالعات آزمایشگاهی و اینکه در نبود میزبان مناسب توانایی زندگی ساپروفیتی در طبیعت دارند بیشتر مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. سازگاری با محیط زیست، عدم وجود باقیمانده بر روی فرآورده‌های کشاورزی، اختصاصی عمل کردن و بی‌خطر بودن برای موجودات غیرهدف از مزایای

حشره‌کش‌های زیستی است که با کمک قارچ‌های بیمارگر حشرات تهیه می‌شوند [۴].

## ۱-۲. مقدمه‌ای بر قارچ‌های بیمارگر حشرات

قارچ‌ها مجموعه‌ی متنوعی از موجودات هستند و در هر جا که بندپایان<sup>۱</sup> یافت می‌شوند آنها حضور دارند [۵]. نزدیک به ۱۲۰ هزار گونه از سلسله‌ی ۰/۷-۱/۵ میلیون گونه‌ای قارچ‌ها شناسایی شده‌اند [۶]. از بین این گونه‌ها، ۷۰۰ گونه در ۹۰ جنس به عنوان عامل بیماری‌زای حشرات شناخته شده‌اند و تاکنون تقریباً ۱۷۰ محصول تجاری برای کنترل آفات بر اساس حداقل ۱۲ گونه از قارچ‌های بیماری‌زای حشرات تولید شده‌اند قارچ‌های بیماری‌زا دشمنان طبیعی بسیاری از حشرات و برخی از گونه‌های کنه‌ها<sup>۲</sup> هستند و با اثر منفی کم بر محیط زیست ابزاری کنترلی و مهم برای آفات در اکوسیستم محسوب می‌شوند [۷].

به نظر می‌رسد که بیشتر یا همه قارچ‌های بیماری‌زای حشرات توانایی تکثیر از طریق تولید مثل جنسی خود را از دست داده‌اند. این روند تولید مثلی در پاتوژن‌های مهم جنس‌های *Aspergillus*, *Hirsutella*, *Gibellula*, *Fusarium*, *Culicinomyces*, *Beauveria*, *Aschersonia* و *Sorosporrella*, *Paecilomyces*, *Nomuraea*, *Metarhizium*, *Lecanicillium*, *Hymenostilbe* و *Tolypocladium* دیده می‌شود. تمام فرم‌های غیرجنسی (آنامورف<sup>۳</sup>) این قارچ‌ها، اسپور (کنیدی<sup>۴</sup>) و بعضی هم کلامیدسپور<sup>۵</sup> (نوعی اسپور استراحت با دیواره‌ی ضخیم) تولید می‌کنند. فرم جنسی اکثر گونه‌های این جنس‌ها ناشناخته مانده‌اند. به طور سنتی این جنس‌ها در شبه رده *Deuteromycetes*

۱- Arthropods

۲- Mites

۳- Anamorph

۴- Conidia

۵- Chlamydospores

یا قارچ‌های ناقص<sup>۱</sup> طبقه‌بندی می‌شوند. احتمال دارد که بسیاری از گونه‌های قارچ‌های ناقص شکل جنسی خود را در فرآیند تکامل از دست داده باشند و یا اینکه شکل جنسی آنها در طبیعت تشکیل نمی‌شود و یا به ندرت شکل می‌گیرد. به همین دلیل نمی‌توان این قارچ‌ها را در آرایه‌ی تاکسونومی قرار داد و لذا عنوان قارچ‌های ناقص را به خود گرفته‌اند [۸].

در شاخه‌ی Sordariomycetes تنها جنس *Cordyceps* شکل جنسی دارد. از آنجا که جنس‌هایی مانند *Beauveria* و *Metarhizium* و دیگر جنس‌ها در قارچ‌های بیمارگر، شکل جنسی برای آنها ناشناخته مانده است، شکل جنسی این قارچ‌ها را *Cordyceps* عنوان می‌کنند. جنس *Cordyceps* نزدیک به ۴۰۰ گونه دارد و گونه‌های *Cordyceps* همگی اندوپارازیت حشرات و دیگر بندپایان هستند. این جنس توزیع جهانی دارد و بسیاری از گونه‌های این جنس از آسیا توصیف شده‌اند. بنا به مطالعات فیلوژنی سانگ<sup>۲</sup> (۲۰۰۱) منشاء تکاملی *Beauveria* خانواده‌ی Cordycipitaceae است و فرم جنسی *C. scarabaeicola* در شاخه‌ی<sup>۳</sup> *Beauveria* و در گروه خواهری *B. caledonica* قرار گرفت [۹]. هم-چنین سویه‌های جدا شده از استروماتا چندین گونه‌ی *Cordyceps*، تولید قارچ‌های *Beauveria* کردند.

مطالعات ایشان به وضوح نشان داد که فرم جنسی برخی از گونه‌های *Beauveria* در واقع *Cordyceps* است و این گونه‌ها شامل *C. bassiana*، *C. brongniartii* و *C. staphylinidaecola* هستند [۹]. براساس فیلوژنی ملکولی (rDNA) و مشاهدات مورفولوژیکی رنر و همکاران *Cordyceps* و *Beauveria* دارای جد مشترک هستند [۱۰]. جنس *Beauveria* در خانواده‌ی Cordycipitaceae و جنس *Cordyceps* در Clavicipitaceae قرار دارند. قارچ‌های بیماری‌زای حشرات عموماً میزبان‌های خود را از طریق کوتیکول آلوده می‌کنند اگرچه بعضی از طریق مجرای گوارشی آلوده می‌کنند (مانند

۱- Imperfect Fungi

۲- Sung

۳- Cluster

*Culicinomyces Ascosphaera*). بعد از مرگ میزبان و تحت شرایط مطلوب، هیفها<sup>۱</sup> از سطح بدن مرده میزبان آشکار می شوند و تولید سلول های اسپورزا می کنند. اسپورزایی بر روی سطح میزبان رخ می دهد که منجر به رها سازی کنیدی ها می شود [۱۱].

از نظر تاریخی چینی ها در قرن ۱۸ و ۱۹ آلوده شدن حشرات به جنس *Cordyceps* (شکل جنسی قارچ های بیماری زای حشرات که در خانواده ی Clavicipitacea قرار دارد) را در نوشته های خود ثبت کرده اند. اولین اثبات بیماری زایی میکروبی توسط آگوستینو باسی<sup>۲</sup> (۱۸۳۵) در ایتالیا انتشار یافت که در آن *Beauveria bassiana* به عنوان قارچ بیماری زای کرم ابریشم<sup>۳</sup> معرفی گردید [۱۲]. وی نشان داد که قارچ سبب مرگ حشره می شود و توانایی انتقال به کرم های ابریشم دیگر را نیز دارد. پس از اثبات اولین اثر ویرانگری قارچ بیماری زای حشرات روی حشره ی مفید کرم ابریشم، طولی نکشید که محققانی به فکر استفاده از بیماری زایی این قارچ برای کنترل حشرات آفت افتادند. پاستور با پیشنهادی، استفاده از قارچ مبنی بر کنترل حشرات آفت را مطرح کرد. او در حالی استفاده از قارچ برای کنترل شته ی فیلوکسرا<sup>۴</sup> را در مزارع انگور توصیه کرد، که برای کنترل آن از محلول های مسی استفاده می کردند [۱۳]. مچنیکف<sup>۵</sup> (برنده ی جایزه ی نوبل)، از سال ۱۸۷۸ در روسیه شروع به کار بر روی *Metarhizium anisopliae*، به عنوان عامل کنترل کننده سوسک قهوه ای گندم<sup>۶</sup> و حشره کامل سرخرطومی چغندر قند<sup>۷</sup> کرد [۱۴]. وی، با تولید توده ی میسیلیومی<sup>۸</sup> قارچ، شرایط لازم برای آزمایشات مزرعه ای را فراهم آورد و بدین ترتیب اولین آفت کش زیستی حشرات پدید آمد. متعاقب این

۱- Hyphes

۲- Agostino Bassi

۳- Silkworm

۴- *Phylloxera*

۵- Eli Metchnikoff

۶- *Anisoplia austriaca*

۷- *Cleonus punctiventris*

۸- Mycelium

یافته کراسیلچیک<sup>۱</sup> (۱۸۸۸)، به طور گسترده از *M. anisopliae* در روسیه برای کنترل سرخرطومی چغندر قند، استفاده کرد. با وجود کشف پتانسیل قارچ‌های بیماری‌زای حشرات در کنترل آفات، تنها در سال‌های اخیر بود که به طور موفقیت‌آمیزی در برنامه‌های کنترلی آفات از این قارچ‌ها بهره جستند. توانایی علوم زیستی برای به کارگیری مؤثر و قابل اعتماد این قارچ‌ها در جهت کنترل آفات هنوز نتوانسته است که جای آفت‌کش‌های شیمیایی را بگیرد اگرچه روش‌های بیولوژیک کارایی ترکیبات شیمیایی را ندارند ولی بر کسی پوشیده نیست که از نظر اکولوژیکی با تأثیر گذرا (برخلاف آفت‌کش‌های شیمیایی با تأثیر پایدار) کمتر برهم زنده‌ی زیست بوم‌ها هستند اما فعالیت آنها به شدت به شرایط محیطی وابسته است [۱۵]. بسیاری از این قارچ‌ها برای جوانه‌زنی، آلودگی و اسپورزایی محدودیت دامنه‌ی دمایی و رطوبتی دارند. در بعضی موارد مرحله‌ی آلوده کننده به علت نبود شرایط مناسب، قوی و مؤثر عمل نمی‌کند و پرامیدترین کاندیدای قارچی که مراحل جداسازی و آزمایشگاهی را گذرانده است برای کنترل آفات توانایی تولید و تشکیل فرم‌های مقاومت مانند اسپورهای استراحت و ذخیره را ندارد و کاربرد خود را در شرایط محیطی از دست می‌دهد [۱۶]. در جدول ۱-۱ به راسته‌های مهم بیماری‌زای حشرات اشاره شده است.

### ۱-۳. قارچ‌های بیمارگر حشرات و اهمیت آنها از نظر بیوتکنولوژی کشاورزی

در این مقدمه از نقش بیوتکنولوژی در گسترش قارچ‌های بیمارگر حشرات صحبت می‌شود. امروزه بیوتکنولوژی از شناسایی جنس‌ها، گونه‌ها و جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر حشرات تا فرمولاسیون و تولید تجاری آنها نقش داشته است [۱۷]. روش‌هایی که در آن از قارچ‌های بیمارگر حشرات علیه حشرات آفت استفاده می‌شود اولین بار الین‌برگ<sup>۲</sup> (۲۰۰۱) آنها را در ۴ مورد معرفی کرد.

۱- Krassilstchik

۲- Eilenberg

۱- بیوکنترل کلاسیک<sup>۱</sup> که در آن از جدایه ای غیربومی<sup>۲</sup> بدون مدیریت کنترلی (عدم استفاده از سموم شیمیایی) برای مدت طولانی استفاده می شود. ۲ بیوکنترل از طریق آلوده سازی<sup>۳</sup> که در آن از جدایه ای بومی<sup>۴</sup> بدون مدیریت کنترلی (عدم استفاده از سموم شیمیایی) برای مدت طولانی استفاده می شود. ۳- بیوکنترل انبوه یا رهاسازی انبوه<sup>۵</sup> که در آن آفت با رهاسازی انبوه جدایه محدود می گردد. ۴- کنترل بیولوژیک حفاظتی<sup>۶</sup>، مبنای این روش تغییر محیط برای افزایش آلودگی با قارچ است. معمولاً بیوکنترل انبوه متکی بر حشره کش های زیستی است. منظور از حشره کش های زیستی استفاده از میکروب های بیمارگر است. بیوکنترل انبوه آشکارترین کاربرد بیوتکنولوژی در مورد قارچ های بیمارگر حشرات است [۱۸]. حشرات آفت استفاده می شود اولین بار الین برگ<sup>۷</sup> (۲۰۰۱) آنها را در ۴ مورد معرفی کرد. ۱- بیوکنترل کلاسیک<sup>۸</sup> که در آن از جدایه ای غیربومی<sup>۹</sup> بدون مدیریت کنترلی (عدم استفاده از سموم شیمیایی) برای مدت طولانی استفاده می شود. ۲ بیوکنترل از طریق آلوده سازی<sup>۱۰</sup> که در آن از جدایه ای بومی<sup>۱۱</sup> بدون مدیریت کنترلی (عدم استفاده از سموم شیمیایی) برای مدت طولانی استفاده می شود. ۳- بیوکنترل انبوه یا رهاسازی انبوه<sup>۱۲</sup> که در آن آفت با رهاسازی انبوه جدایه محدود می گردد. ۴- کنترل بیولوژیک حفاظتی<sup>۱۳</sup>، مبنای این روش تغییر محیط برای افزایش آلودگی با قارچ است. معمولاً بیوکنترل انبوه متکی بر حشره کش های زیستی است. منظور از حشره کش های زیستی استفاده از میکروب های بیمارگر است. بیوکنترل انبوه آشکارترین کاربرد بیوتکنولوژی در مورد قارچ- های بیمارگر حشرات است [۱۸].

۱- Classical Biological Control  
۲- Exotic  
۳- Inoculative Biocontrol  
۴- Endemic  
۵- Inundative Biological Control (Mass Release)  
۶- Conservation Biological Control  
۷- Eilenberg  
۸- Classical Biological Control  
۹- Exotic  
۱۰- Inoculative Biocontrol  
۱۱- Endemic  
۱۲- Inundative Biological Control (Mass Release)  
۱۳- Conservation Biological Control

جدول ۱-۱: راسته‌های مهم و پارازیت‌های قارچی نکروتروف که به حشرات حمله می‌کنند [۱۹].

**Chytridiomycota**

Chytridiomycetes

Blastocladales- *Coelomomyces*

**Zygomycota**

Zygomycetes

**Entomophthorales**

Entomophthoraceae- *Entomophaga, Entomophthora, Erynia,*

*Furia, Massospora, Pandora, Zoophthora*

Neozygitaceae- *Neozygites*

Ancylistaceae- *Conidiobolus*

**Ascomycota**

Pyrenomycetes

**Hypocreales**

Clavicipitaceae- *Cordyceps, Cordycepioideus, Ophiocordyceps,*

*Torrubiella, Gibellula, Pseudogibellula, Akanthomyces,*

*Nomurea, Hymenositlbe, Hirsutella, Paraisaria*

Hypocrealean anamorphs- *Aschersonia, Beauveria, Fusarium,*

*Hirsutella, Metarhizium, Nomuraea, Isariae,*

*Tolypocladium, Lecanicillium.*

Loculoascomycotes

Myriangiales

Myriangiaceae- *Myriangium*

Pleosporales

Tubeufiaceae- *Podonectea*

Unclassified anamorph- *Entoderma*

**Oomycota**

Lagenidiales

Lagenidiaceae- *Lagenidium*



در دهه‌ی ۱۹۶۰ و پس از آشکار شدن آثار سوء سموم شیمیایی، علاقه‌مندی برای استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات برای کنترل آفات شکل گرفت. در حال حاضر بیشتر حشره‌کش‌های زیستی که بر اساس قارچ‌های بیمارگر حشرات تولید شده‌اند و در بازار موجود می‌باشند شامل *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisoplia* می‌باشد [۲۰]. توسعه‌ی میسلیوم خشک شده، به عنوان راهی مؤثر برای تولید انبوه و استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات است. بدین شکل که بوسیله‌ی فیلتراسیون اجسام هیفی شکل، گرفته می‌شوند. اجسام هیفی شکل پس از شستشو با آب و قبل از خشک شدن با محلول شکر پوشش داده می‌شوند. از این روش برای تولید انبوه *B. bassiana* استفاده شده است [۲۱]. تولید کنیدی روشی دیگر برای تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات هستند. برای تولید کنیدی از بسترهای جامد (معمولات غلات مانند برنج) و مایع به عنوان کشت استارتر استفاده می‌کنند. مزیت کشت استارتر مایع نسبت به جامد شامل افزایش توانایی رقابتی قارچ می‌باشد که این عامل مانع از رشد آلودگی‌های دیگر بر روی محیط کشت می‌گردد. رشد سریع‌تر قارچ در مراحل اولیه و امکان بررسی محیط کشت قبل از کشت قارچ به منظور وجود یا عدم وجود آلودگی است. بیوتکنولوژی با نظارت بر فرآیند تولید، فرمولاسیون و کاربرد و سازگاری این سه مرحله با یکدیگر نقش مهمی در استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات در کشاورزی دارد [۲۲].

قارچ‌های بیمارگر حشرات توانایی تولید آنزیم‌ها و توکسین‌های بین سلولی را دارند. بعضی از این متابولیت‌ها به عنوان فعال‌های زیستی<sup>۱</sup> بر روی حشرات مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. این ارزیابی خود نوعی روش بیوتکنولوژی برای استفاده از این متابولیت‌ها برای کنترل حشرات آفت است. آنزیم‌های شناخته شده از قارچ‌های بیمارگر حشرات که به نوعی بر هضم کوتیکول حشره تأثیر می‌گذارند شامل پروتئازها، لیپازها و کیتینازها می‌باشند. قارچ‌های بیمارگر حشرات تولید توکسین‌های حشره‌کش نیز می‌کنند [۲۳]. برای مثال قارچ *Beauveria spp.* تولید توکسین معروف بورسین<sup>۲</sup> می‌کند. بورسین

۱- Bioactives

۲- Beauvericin

پیتیدی با یک یا چند گروه آمیدی است (دپسی پتید)<sup>۱</sup>. بورسین خاصیت سمی بر روی بسیاری از حشرات دارد. همه‌ی گونه‌های *Beauveria* و جدایه‌های آن توانایی تولید بورسین را ندارند. بورسین از قارچ‌های دیگر جداسازی شده است. از جمله‌ی این قارچ‌ها می‌توان به *Paecilomyces fumosoroseus* اشاره کرد. گزارش شده است که *B. bassiana* تولید *Isarolides*, *Beauverolides* و *Bassianolides* می‌کند. ترکیبات نام برده همگی سیکلوتترادپسی پتید<sup>۲</sup> هستند [۲۴].

برخی از قارچ‌های بیمارگر حشرات تولید آنتی بیوتیک می‌کنند. هنگامی که این قارچ‌ها برای دستیابی به بقایای حشرات مرده با دیگر قارچ‌ها و باکتری‌ها رقابت می‌کنند تولید آنتی بیوتیک توسط آنها دور از ذهن نخواهد بود. جنس *Hirsutella* و *Cordyceps* تولید متابولیت‌هایی می‌کنند که سم ضعیف یا آنتی بیوتیک است. کراسنف و گاپا<sup>۳</sup> (۱۹۹۴) آنتی بیوتیکی به نام فومالاکتون<sup>۴</sup> از *H. thompsonii* var. *synnematosus* جداسازی کردند که نسبت به *Rhagoletis pomonella*<sup>۵</sup> خاصیت کشندگی و سمی داشت. فومالاکتون برای دیگر قارچ‌های بیمارگر از قبیل *Beauveria*, *Tolypocladium* و *Metarhizium* خاصیت بازدارندگی دارد [۲۵]. در بخش‌هایی از آسیا از لارو صدپای آلوده به *Cordyceps* به عنوان یک داروی سنتی برای درمان عفونت‌ها استفاده می‌کنند. احتمالاً این خاصیت درمانی به خاطر تولید آنتی بیوتیکی به نام کردی سیپین<sup>۶</sup> است [۲۶]. در آینده بیوتکنولوژی می‌تواند با استفاده از کشف فعال‌های زیستی تولیدی قارچ‌های بیمارگر حشرات (آنزیم‌ها، توکسین‌ها و آنتی بیوتیک‌ها) که در کنترل حشرات آفت نقش دارند، با فرموله کردن آنها به عنوان حشره کش زیستی یا ایجاد جدایه‌های تراریخت نقش مهمی در به کارگیری مؤثر قارچ‌های بیمارگر حشرات در کنترل آفات مهم کشاورزی ایفا کند.

۱- Depsipeptide  
۲- Cyclotetradepsipetides  
۳- Krasnoff and Gupta  
۴- Phomalactone  
۵- Apple Maggots  
۶- Cordycipine

هدف از دست‌ورزی در قارچ‌های بیمارگر حشرات شامل مواردی از قبیل ایجاد جدایه‌هایی با بهبود در کنترل حشرات آفات به منظور کاهش در زمان مرگ میزبان، تغییر در ژن‌هایی که در فرآیند بیماری-زایی درگیر هستند که بتوان ژنتیک فرآیند بیماری‌زایی را به خوبی درک کرد و ایجاد جدایه‌هایی که حاوی ژن‌های گزارشگری از قبیل  $\beta$ -Glucuronidase یا GFP است. استفاده از این ژن‌های گزارشگر سبب ردیابی جدایه‌های دست‌ورزی شده و رها شده در طبیعت می‌گردد. این ردیابی اطلاعات مهمی در مورد اکولوژی و دامنه‌ی میزبانی قارچ‌های بیمارگر حشرات به ما می‌دهد [۲۷]. در نهایت، در سال-های اخیر روش‌های بیوتکنولوژی در مطالعه و گسترش قارچ‌های بیمارگر حشرات پیشرفت زیادی داشته‌اند. بهبود در فرمولاسیون باعث ساخت و تولید حشره‌کش‌های زیستی‌ای شده است که در شرایط غیره منتظره نیز موفق عمل کردند (مانند کنترل ملخ در افریقا) [۲۸]. بهبود در انتخاب جدایه، شناسایی و درک فرآیند بیماری‌زایی و اکولوژی از دیگر دستاوردهای بیوتکنولوژی در مورد قارچ‌های بیمارگر حشرات است. ایجاد سیستم‌های شناسایی اختصاصی‌تر توسط بیوتکنولوژی نه تنها امکان بازرگری کاربرد حشره‌کش‌های زیستی را فراهم می‌کند بلکه سبب بهبود طبقه‌بندی فیلوژنتیک قارچ-های بیمارگر حشرات می‌شود. با وجود این موفقیت‌ها، کاربرد تجاری قارچ‌های بیمارگر حشرات به عنوان حشره‌کش زیستی به دلایلی از قبیل هزینه‌ی بالا، ناکافی بودن کارایی آنها، محدودیت در تولید انبوه این قارچ‌ها و کوتاه بودن مدت زمان نگهداری محدود شده است. با این حال، قارچ‌های بیمارگر حشرات نسبت به دیگر میکروب‌ها برای تهیه‌ی فرمولاسیون تجاری جهت کاربرد در حشره‌کش زیستی مزایایی از قبیل اسپورزایی قوی، توانایی بقای محصول برای چند ماه و رشد آسان این قارچ‌ها بر روی محیط کشت دارند [۲۹].

#### ۱-۴. اندوفیت بودن قارچ‌های بیمارگر و اهمیت آنها از منظر بیوتکنولوژی کشاورزی

بیش از ۹۰ درصد گیاهان آوندی رابطه‌ی هم‌زیستی با قارچ‌ها برقرار می‌کنند [۳۰]. این هم‌زیستی مزایای زیادی برای گیاه فراهم می‌کند. این مزایا شامل افزایش سلامت گیاه، حفاظت گیاه در مقابل

بیمارگرهای گیاهی و بهبود سیستم تغذیه‌ای گیاه است [۳۱]. در اکوسیستم‌های طبیعی بسیاری از گیاهان برای بهبود جذب عناصری چون نیتروژن و فسفر به قارچ‌ها متکی هستند. قارچ میکوریزا از طریق همزیستی با ریشه‌ی گیاه قادر به انتقال مواد غذایی به گیاه است. این قارچ متعلق به فیلوم Glomeromycota است [۳۲]. اخیراً تحقیقات ثابت کرده است که برخی از قارچ‌های بیمارگر آسکومیکوت توانایی اندوفیتی دارند و قادر به انتقال نیتروژن موجود از حشره به گیاه هستند. تعدادی از قارچ‌های بیمارگر حشرات در حال حاضر به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در کشاورزی استفاده می‌شوند. تحقیقات اخیر حاکی از همراهی جنس *Beauveria* و *Metarhizium* به عنوان همزیست با ریشه‌ی گیاهان است که توانایی انتقال نیتروژن بدن مرده‌ی حشرات به گیاه را دارند [۳۳]. بنابراین نه تنها می‌توان از این قارچ‌ها در سیستم‌های کشاورزی به عنوان عامل کنترلی حشرات آفت مضر استفاده کرد، بلکه این همزیستی می‌تواند در جهت حفظ سلامت گیاه به کار گرفته شود. با درک و روشن شدن مکانیسم ژنتیکی شکل دهنده‌ی همزیستی بین گیاه و این قارچ‌ها، دست‌ورزی‌های بیوتکنولوژی منتج شده از این درک می‌تواند صفات مفید و مؤثری را به گیاهان زراعی اعطا کند. از این صفات مفید می‌توان به کاهش ضرر و زیان حشره‌کش‌های شیمیایی در محیط، کاهش استفاده از کودهای شیمیایی جهت تغذیه‌ی گیاه و ایجاد مقاومت در گیاه به شرایط شوری نام برد [۳۴].

یکی از چالش‌های پیش‌رو در بیوتکنولوژی تغییر گیاه زراعی یا قارچ همزیست آن از نظر ژنتیکی به منظور تسهیل ارتباط و همزیستی قارچ-گیاه است. اولین قدم شناسایی ژن‌های مسئول این ارتباط است. این شناخت راه‌کارهای بیوتکنولوژی را برای تسهیل همزیستی قارچ با گیاه را فراهم می‌کند. تحقیقات نشان داده است که بیان برخی از ژن‌های گیاه قبل از تماس فیزیکی قارچ با گیاه افزایش پیدا می‌کند که این امر تأییدی بر ترشح ملکول‌های قارچی جهت تحریک گیاه برای همزیستی است [۳۴]. در مراحل آغازین ارتباط قارچ با گیاه سیستم‌های دفاعی گیاه به ویژه مسیر بیوسنتزی

جاسمونیک اسید<sup>۱</sup> و سالیسیلیک اسید<sup>۲</sup> افزایش پیدا می‌کند. عموماً افزایش بیان مسیر سالیسیلیک اسید در اثر حمله‌ی پاتوژن‌های گیاهی افزایش پیدا می‌کند. در طول هم‌زیستی این تعادل ایجاد می‌شود و بیان این مسیر کاهش پیدا می‌کند تا به یک وضعیت پایدار برسد. اگر گیاه نتواند این مکانیسم دفاعی را در مقابل قارچ هم‌زیست کنترل کند سبب حذف این ارتباط می‌گردد. از موضوعات گفته شده می‌توان نتیجه گرفت که قارچ‌های مفید مسیر بیوسنتزی سالیسیلیک اسید را متوقف می‌کنند در حالیکه قارچ‌های بیمارگر گیاهی چنین توانایی را ندارند [۳۵]. این امر گویای ارتباط ویژه‌ی گیاه با قارچ‌های مفید است. شناسایی و کنترل ژن‌های مسئول ارتباط گیاه با قارچ می‌تواند هم‌زیستی بین آنها را افزایش دهد. چندین ژن مؤثر در هم‌زیستی گیاه با قارچ شناسایی شده است. *MtScp1*<sup>۳</sup>، ژن گیاهی است که کربوکسی‌پپتیداز درگیر در انتقال سیگنال‌های قارچی به گیاه را کد می‌کند [۳۶]. *Mad2*<sup>۴</sup>، ژن قارچی است که در اتصال قارچ به گیاه نقش دارد. از دیگر ژن‌های قارچی می‌توان به *myc* اشاره کرد که همراه با *mad2* عمل تنظیم ترشح ملکول‌های قارچی را قبل از اتصال قارچ به گیاه و تحریک به هم‌زیستی را کنترل می‌کنند [۳۴]. این ژن‌ها را می‌توان در سطح ملکولی دچار دست‌ورزی کرد و عمل هم‌زیستی قارچ با ریشه‌ی گیاه را بهبود بخشید. به منظور روشن شدن مجموعه ژن‌هایی که در این ارتباط مؤثر نقش دارند می‌توان این ارتباط را با و بدون قارچ میکوریزا در نظر گرفت و با استفاده از آنالیزهای پروتئومیکس و توالی‌یابی DNA به روش نوین<sup>۵</sup> به کشف ژن‌های درگیر در این ارتباط پی‌برد. پس از درک و روشن شدن ژن‌های درگیر در هم‌زیستی می‌توان از قارچ‌های بیمارگر مانند *Beauveria* و *Metarhizium* برای ارزیابی دست‌ورزی‌های ژنتیکی استفاده کرد. استفاده از این قارچ‌های بیمارگر جهت چنین ارزیابی‌هایی نسبت به قارچ میکوریزا که قارچی با ویژگی هم‌زیستی

۱- Jasmonic Acid (JA)

۲- Salicylic Acid (SA)

۳- Serine Carboxypeptidase

۴- Mitotic Arrest Deficient 2

۵- Next Generation Sequencing (NGS)

اجباری است و عملاً بر روی محیط کشت رشد نمی‌کند دارای این مزیت است که آنها به آسانی بر روی محیط کشت رشد می‌کنند و به راحتی از نظر ژنتیکی دست‌ورزی می‌شوند [۳۴].

از مزایای مهم استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات برای کنترل حشرات کاهش استفاده از حشره-کش‌های شیمیایی است. بسیاری از این آفت‌کش‌های شیمیایی برای سلامت انسان مضر هستند. باید به نکته توجه کرد که استفاده‌ی بیش از حد از حشره‌کش‌های شیمیایی، سبب مقاومت آفات به این سموم می‌شود. قارچ‌های بیمارگر *Beauveria* و *Metarhizium* چرخه‌ی زندگی دوگانه‌ای دارند. آنها هم به عنوان اندوفیت گیاهی و هم به عنوان پاتوژن حشرات نقش ایفا می‌کنند. مهندسی ژنتیک در چنین قارچ‌هایی فرصت را برای افزایش بیان ژن‌هایی که در بیماری‌زایی نقش دارند به شکل مناسب فراهم می‌کند. ژن‌های *Pr1*<sup>۱</sup> و *chyl*<sup>۲</sup> در هضم کوتیکول، ژن *ste1*<sup>۳</sup> درگیر در متابولیسم چربی و ژن *mad1*<sup>۴</sup> درگیر در اتصال قارچ به کوتیکول نقش دارند. با توجه به امر بیماری‌زایی و دامنه‌ی میزبانی، بیوتکنولوژی می‌تواند با امانت گرفتن این ژن‌ها و دست‌ورزی در آنها و ایجاد جدایه‌هایی با قدرت بیماری‌زایی بیشتر حضور خود را در دنیای امروز برجسته‌تر نشان دهد [۳۷].

در این رساله از بیان قارچ‌های بیمارگر حشرات صرفاً به قارچ *Beauveria spp.* می‌پردازیم. در ادامه به تفصیل در خصوص چرخه‌ی زندگی *Beauveria*، حضور طبیعی، توزیع جغرافیایی و دامنه‌ی میزبانی قارچ *Beauveria*، صحبت خواهد شد.

۱- Subtilisin-like Serine Protease (Pr1)

۲- Chymotrypsin

۳- Esterase

۴- Mitotic Arrest Deficient 1

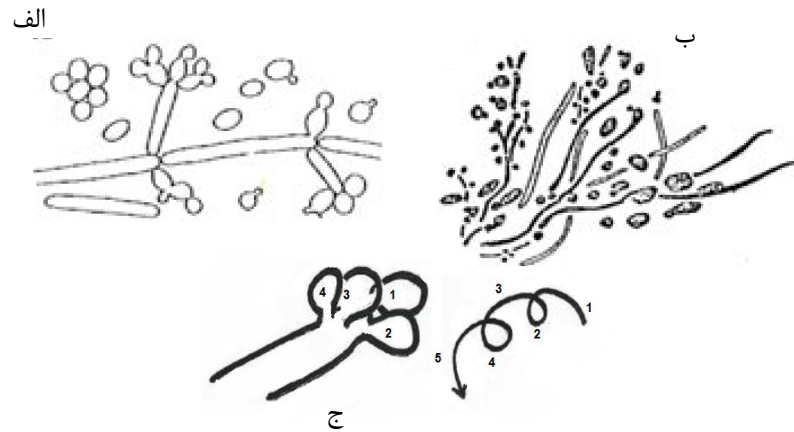
## ۱-۵. چرخه زندگی *Beauveria*

جنس *Beauveria* چرخه زندگی دوشکلی<sup>۱</sup> دارد. در نبود میزبان اختصاصی خود چرخه زندگی غیرجنسی رویشی<sup>۲</sup> که شامل جوانه زنی، رشد میله ای و شکل گیری کنیدی های زیگزاگی<sup>۳</sup> است را در پیش می گیرد (شکل ۱-۱-ب). در حضور میزبان خود، *Beauveria* به چرخه بیماری زایی<sup>۴</sup> خود بر می گردد. کنیدی های این قارچ بر روی سطح کوتیکول جوانه می زنند و لوله های هیفی شکل ایجاد شده مستقیماً به درون بدن حشره نفوذ می کند. پس از نفوذ، قارچ مورفولوژی رشدی خود را تغییر می دهد و وارد فاز شبه مخمری<sup>۵</sup> می شود و تولید اجسام هیفی<sup>۶</sup> می کند. این اجسام هیفی همراه با همولنف حشره گردش می کنند و بوسیله ی جوانه زنی<sup>۷</sup> تکثیر می شوند (شکل ۱-۱-الف). پس از مرگ میزبان چرخه زندگی قارچ به رشد هیفی شکل خود باز می گردد. احتمالاً توانایی تغییر به فاز شبه مخمری لازمه ی بیماری زایی است.

## ۱-۶. حضور طبیعی و توزیع جغرافیایی قارچ بیمارگر حشرات، *Beauveria spp.*

قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* فراوانترین گونه ی جنس *Beauveria* محسوب می شود. این قارچ عموماً سبب آلودگی حشرات در مناطق گرمسیری و معتدل در سراسر جهان می شود.

۱- Dimorphic Life Cycle  
۲- Asexual Vegetative Life Cycle  
۳- Sympoduloconidia  
۴- Pathogenic Life Cycle  
۵- Yeast-Like Phase  
۶- Hyphal Bodies  
۷- Budding



شکل ۱-۱: چرخه‌ی زندگی دوشکلی *Beauveria*. (الف) نمایی از فاز پارازیتی شبه مخمری قارچ در رویارویی با میزبان حساس. (ب) نشانگر فاز غیرجنسی قارچ در عدم حضور میزبان. (ج) نشان‌دهنده‌ی کنیدی‌های زیگراگی قارچ *Beauveria* است.



مک لود<sup>۱</sup> [۳۸] [۶] گونه *B. bassiana* را از ۶۳ گونه‌ی متفاوت حشرات در نقاط مختلف کانادا و بافت ریه‌ی ۱۴ جاندار جداسازی کرد هر چند بررسی‌های بافت‌شناسی حاکی از عدم ایجاد بیماری پاتولوژیک در بافت‌های جانوری توسط این قارچ است [۳۸].

گزارشات حاکی از حضور و جداسازی *B. bassiana* از ترکیه، ساحل عاج، نواحی استوایی غرب آفریقا، آفریقای مرکزی، آفریقای جنوبی، باهاما، نپال، شرق سیبری، نیوزلند و ژاپن هستند. زیستگاه طبیعی برای *B. bassiana* از خاک مناطق کوهستانی، زمین‌های بدون پوشش گیاهی تا خاک مناطق جنگلی، زراعی، تپه‌های شنی، خاک بیابان و آب‌های روان گزارش شده است [۳۹]. قارچ *B. bassiana* نیز از سطح و داخل گیاهان جداسازی شده است [۴۰]. با استفاده از محیط کشت انتخابی *B. bassiana* از پوست درختان نارون و خاک منطقه‌ی رایزوسفری درخت نارون جداسازی شده است [۴۱]. اخیراً گونه‌های این جنس از سطح برگ<sup>۲</sup> گیاهان تزئینی مختلف جداسازی شده‌اند [۴۲].

#### ۷-۱. دامنه‌ی میزبانی

قارچ بیمارگر *B. bassiana* در همه جا وجود دارد و از طیف گسترده‌ای از حشرات جداسازی شده است [۳۸، ۳۹، ۴۳]. لاتردال از انگلستان (۱۹۷۰) میزبان‌های قارچ بیمارگر *B. bassiana* را از ۱۰۶ گونه از حشرات معرفی کرد [۴۳]. این لیست از میزبان‌ها در جدول ۱-۲ آمده است. براساس دامنه‌ی میزبانی، لی و گوتل<sup>۳</sup> ۷۰۷ گونه از حشرات میزبان *B. bassiana* را لیست کرده‌اند. این لیست شامل ۵۲۱ جنس از ۱۴۹ خانواده از ۱۵ راسته بود. به علاوه ۱۳ گونه از کنه‌ها که در ۷ جنس و ۶ خانواده قرار دارند در این لیست ارائه شده‌اند [۳۹].

با وجود حضور و جداسازی قارچ *B. bassiana* از تعداد زیادی از حشرات و راسته‌های مختلف، واضح

۱- MacLeod

۲- Phylloplane

۳- Li & Goettle

است که بیشتر جدایه‌های این قارچ دامنه‌ی میزبانی محدود و مشخصی دارند. هم‌چنین مثال‌هایی وجود دارد که با وجود جداسازی و به‌دست آوردن جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* از حشرات دیگر یا از خاک اما همین جدایه‌ها به شدت نسبت به دیگر حشرات بیماری‌زا بوده‌اند [۴۴-۴۸].

روش‌های معمول آزمایشگاهی برای افتراق گونه‌های *Beauveria* شامل بررسی صفات مورفولوژیک، خصوصیات ظاهری و میکروسکوپی کلونی می‌باشد. از طرفی به دلیل تنوع صفات مورفولوژیک و هم-پوشانی این ویژگی‌ها بین گونه‌های مختلف این کار با صرف مدت زمان طولانی همراه است و از دقت کافی برخوردار نمی‌باشد که این امر موجب می‌شود از اعتبار این روش‌ها کاسته شود. می‌توان نتیجه گرفت که روش‌های فوق علاوه بر وقت‌گیر بودن احتیاج به پرسنل مجرب نیز دارد. همین امر ضرورت استفاده از روش‌های ملکولی به دلیل حساسیت بالا و قابل اعتماد و تکرار پذیر بودن را بیش از پیش روشن می‌کند. هدف از مطالعه‌ی حاضر استفاده از تعیین توالی منطقه‌ی ITS همراه با داده‌های مورفولوژیک برای شناسایی گونه‌های *Beauveria* است. در ادامه برای روشن شدن موضوع به معرفی دو واژه‌ی تشخیص و شناسایی در علم قارچ‌های بیمارگر حشرات پرداخته خواهد شد.

## ۱-۸. شناسایی و تشخیص

در هر مطالعه برای شناسایی و تشخیص، تعریف هدف و تعیین تکنیک‌های ملکولی مناسب امری ضروری به نظر می‌رسد. قبل از هر تصمیمی برای انتخاب تکنیک ملکولی یا نشانگر ملکولی چند نکته شامل شناسایی سطح تاکسونومی (شناسایی گونه در مقابل سویه)، خلوص نمونه‌ها (کشت خالص ناشی از تک اسپور در مقابل مخلوطی از نمونه‌ها)، در دسترس بودن نمونه‌ها (پاتوژن‌های اجباری در مقابل پاتوژن اختیاری) باید مدنظر قرار گیرد. شناسایی در سطح طبقه‌بندی (گونه، جنس، خانواده و غیره) امری مهم است زیرا هر تکنیک ملکولی مشخص فقط تا حد معینی می‌تواند به تفکیک بپردازد. بسته به محل و پایداری منطقه‌ی ژنتیکی مورد نظر در ژنوم، برخی از نشانگرهای ملکولی برای مطالعات جمعیتی و شناسایی سویه‌ها بسیار مناسب هستند اما برای مطالعات پائین‌تر از گونه

(زیرگونه) بیش از حد متغیر هستند. در مقابل نشانگرهای ملکولی که برای مناطق به شدت محافظت شده در ژنوم استفاده می شوند ممکن است اطلاعاتی در حد گونه یا پایین تر از آن را به ما ندهند اما برای مطالعات فیلوژنتیکی مناسب باشند [۴۹].

### ۱-۱۰. ژنوم قارچ *B. bassiana*

تعداد کروموزوم و اندازهی ژنوم برای چندین جدایه‌ی متفاوت *B. bassiana* تعیین شده است. فایفر و خاچاتوریان<sup>۱</sup> (۱۹۹۳) با استفاده از الکتروفورز کاریوتیپ، تعداد کروموزوم را ۸ و اندازهی ژنوم را ۴۰/۶ مگاباز تخمین زدند [۵۰]. این نتیجه با نتایج ویاد و همکاران<sup>۲</sup> (۱۹۹۶) که با الکتروفورز کاریوتیپ تعداد کروموزوم *B. bassiana* را بین ۷ تا ۸ عدد تخمین زدند منطبق بود. آنها اظهار داشتند که این عدد بسته به جدایه‌ی مورد مطالعه دارد. در این مطالعه که بر روی ۷ جدایه‌ی متفاوت *B. bassiana* انجام گرفت، اندازهی هر کروموزوم بین ۱ تا ۷/۷ مگاباز بود و اندازهی کل ژنوم بین ۳۴/۱ تا ۴۴/۱ مگاباز گزارش گردید [۵۱]. شناسایی و تشخیص قارچ با استفاده از روش‌های ملکولی متکی بر چند شکلی ملکول DNA است. بیشتر این چند شکلی‌ها در مناطق غیرکد کننده شامل اینترون‌ها، توالی‌های بین ژنی<sup>۳</sup> و توالی‌های تکرار شونده رخ می‌دهند. به علت فشار انتخاب، مناطق کد کننده محافظت بیشتری می‌شوند. مناطق غیرکد شونده DNA هسته‌ای قارچ نزدیک به ۳۰ درصد است و در مقایسه با ژنوم دیگر یوکاریوت‌ها درصد کوچکی را به خود اختصاص می‌دهد. چند شکلی در DNA ممکن است به علت حذف، درج، جابه‌جایی، واژگونی یا خطا در همانندسازی ایجاد شود. بیش از ۹۵ درصد از چند شکلی DNA ناشی از تغییرات تک بازی است. ژنوم قارچ شامل اسید نوکلئیک داخل هسته و DNA میتوکندریایی است. هر چند ممکن است که قارچ‌ها دارای عناصر کروموزومی اضافی

۱- Pfeifer and Khachatourians

۲- Viaud

۳- Spacers

جدول ۱-۲: گزارش لاتردال از میزبان‌های قارچ بیمارگر *B. bassiana*

نام علمی	راسته
<i>Picromerus bidens</i>	<b>Heteroptera</b>
<i>Anthocoris nemorum</i>	
<i>Eulecanium</i> spp.	<b>Homoptera</b>
<i>Hepialus</i> spp.	
<i>Hypocrita jacobaea</i>	<b>Lepidoptera</b>
<i>Cydia nigricans</i>	
<i>Lathrobium brunnipes</i>	
<i>Calvia quattuordecimguttata</i>	
<i>Phytodectra olivacea</i>	
<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	
<i>Sitona lineatus</i>	<b>Coleoptera</b>
<i>S. sulcifrons</i>	
<i>S. macularius</i>	
<i>S. hispidulus</i>	
<i>Anthonomus pomorum</i> ,	
<i>Hylaster ater</i>	
<i>Ichneumonidae</i>	
<i>Lasius fuliginosus</i>	<b>Hymenoptera</b>
<i>Vespula</i> spp.	
<i>Bombus pratorum</i>	
<i>Leriserrata</i>	<b>Diptera</b>
	<b>Spiders</b>

مانند پلاسمید و RNA دو رشته‌ای باشند که در ایجاد چند شکلی‌های بین گونه‌ای نقش دارند [۵۲]. اولین بار ملزر و بیدوچکا<sup>۱</sup> (۱۹۹۸) از وجود RNA دو رشته‌ای در ژنوم *Beauveria* خبر دادند. آنها با بررسی که بر روی ۱۲ جدایه‌ی *B. bassiana* انجام دادند، مشخص نمودند که ۲ جدایه از ۱۲ جدایه دارای دو الگوی بانندی متفاوتی هستند که اندازه یکی ۳ و دیگری ۲ کیلوباز بود. با توجه به شواهد بدست آمده و تصاویر میکروسکوپ الکترونی که گویای حضور ذرات شبه ویروسی<sup>۲</sup> در *Beauveria* بود، از آلوده شدن این قارچ توسط مایکویروس‌ها<sup>۳</sup> خبر دادند [۵۳]. در مطالعه‌ی دیگر که توسط دالزوتو و همکاران<sup>۴</sup> (۲۰۰۶) صورت گرفت از ۱۳ جدایه‌ی مورد مطالعه، ۱ جدایه دارای دو الگوی بانندی متفاوت با شاهد بود. یکی از باندها دارای ۳/۵ و دیگری ۴ کیلوباز بود. آنها پس از استخراج اسید نوکلئیک ژنومی، به شکل جداگانه آن را در معرض RNase A و DNase قرار دادند که نتیجه‌ی آن آشکار نمود که این دو باند ماهیت RNA دارند (شکل ۱-۲) [۵۴]. تا کنون گزارشی در مورد حضور پلاسمید در قارچ‌های بیمارگر حشرات گزارشی در دست نیست. ژنوم میتوکندریایی برای گونه‌های *B. bassiana* و *B. brongniartii* به شکل کامل توالی‌یابی شده است. اندازه‌ی ژنوم میتوکندریایی برای گونه‌ی *B. bassiana* ۳۳،۹۲۶ جفت باز و برای گونه‌ی *B. brongniartii* ۳۲،۲۶۳ جفت باز است [۵۵].

در این رساله تشخیص برمبنای حضور قارچ در نمونه‌ی محیطی مانند خاک با روش طعمه حشره‌ای انجام گرفت و شناسایی براساس منطقه‌ی ITS صورت گرفت که جایگاه این روش در سلسله مراتب رده‌بندی قارچ‌های بیمارگر حشرات در شکل ۱-۲ مشخص شده است و در ادامه و پس از معرفی فیلوژنی جنس *Beauveria* به معرفی روش‌هایی که برای شناسایی و طبقه‌بندی قارچ‌های بیمارگر حشرات استفاده می‌شود در قالب روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و روش‌های غیر

۱- Melzer & Bidochka

۲- Virus-Like Particles (VLP)

۳- Mycoviruses

۴- Dalzoto

مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز پراخته می‌شود.

### ۱-۱۱. فیلوژنی *Beauveria*

قارچ‌های <sup>۱</sup> SSU rRNA فیلوژنی *Beauveria* اولین فرضیه‌ی فیلوژنتیک ملکولی برای منشأ تکاملی کلاویسیپیتاسه<sup>۲</sup> و دیگر پیرونوماست‌ها<sup>۳</sup> توسط سانگ<sup>۴</sup> و همکاران ارائه شد [۹]. در این فیلوژنی (Hypocreales: Clavicipitaceae یک گروه مونوفیلتیک<sup>۵</sup> در سورداریومیست<sup>۶</sup> (*Beauveria*) به نظر می‌رسد که *B. bassiana* و *B. caledonica* بین SSU rRNA [۵۶]. براساس همولوژی توالی اخیراً (۷۵ تا ۱۰۰ میلیون سال قبل) بوده است [۵۷]. نبود اطلاعاتی چون ژن‌های *Beauveria* منشأ کدکننده‌ی پروتئین، اینترون‌ها و توالی‌های غیرکدکننده بین این دو گونه باعث می‌شود که نتوان به و کهرباهایی که SSU rRNA روشن گردد. براساس مطالعات *Beauveria* قطع، زمان و منشأ جنس <sup>۷</sup> ۲۵ میلیون سال قبل بوده *B. cf. bassiana* درون فسیل یافت شده‌اند مشخص شده است که منشأ اتفاق *Beauveria* است [۵۸]. در آینده برای اظهار نظر در مورد منشأ و واگرایی‌هایی که در جنس افتاده علاوه بر نیاز به داده‌هایی که از موقعیت ژن‌های کدکننده‌ی پروتئین، اینترون‌ها و توالی‌های غیرکدکننده بدست آمده، نیاز به کشف فسیل‌های جدید امری اجتناب ناپذیر است. استنباط مهمی که بود *Cordyceps* و فرم جنسی جنس *Beauveria* به دست آمد اثبات ارتباط بین SSU rRNA از آنالیز در نزدیکی شاخه‌ی *Cordyceps militaris* که در بررسی‌های فیلوژنتیکی مشخص شد که *B. caledonica* خواهر *Beauveria* درون شاخه‌ی *C. scarabaeicola* قرار گرفت و *Beauveria*

۱- Small Subunit Ribosomal RNA Gene

۲- Clavicipitaceous Fungi

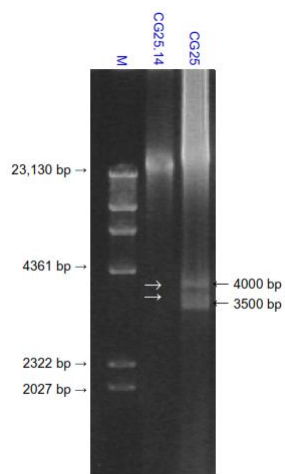
۳- Pyrenomycetes

۴- Sung et al

۵- Monophyletic

۶- Sordariomycetes

۷- *B. pseudobassiana*



شکل ۱-۲: RNA دو رشته‌ای در *B. bassiana*. لاین M گویای مارکر، لاین وسط جدایی‌ی مورد استفاده به عنوان شاهد است. لاین آخر جدایی‌ی دارای RNA دو رشته‌ای است. همان‌طور که دیده می‌شود این جدایه دارای دو RNA دو رشته‌ای با اندازه‌ی ۳/۵ و ۴ کیلوباز است [۵۴].

است. این یافته‌ها تقویت کننده‌ی این فرضیه است که حداقل بعضی از گونه‌ها در جنس *Beauveria* به شکل جنسی باقی مانده‌اند [۹].

فیلوژنتیک در *Beauveria* تا سال ۲۰۱۱ براساس آنالیز دو جایگاه ژن‌های هسته‌ای یکی ITS1-5.8S-ITS2 و دیگری EF1- $\alpha$  انجام می‌شد. رنر و بوکلی<sup>۱</sup> (۲۰۰۵) از ۶ گونه‌ی متفاوت شامل *B. amorpha*، *B. bassiana*، *B. brongniartii*، *B. caledonica*، *B. vermiconia* و *B. varroae* و سه گونه‌ی *Cordyceps* شامل *C. staphylinaedicola*، *C. bassiana* و *C. scarabaeicola* با استفاده از مناطق ژنی ITS1-5.8S-ITS2 و EF1- $\alpha$  به بررسی فیلوژنی *Beauveria* پرداختند [۱۰]. علاوه بر این در این مطالعه به بررسی ساختار فیلوژنتیکی جدایه‌های مختلف *B. bassiana* پرداخته شد. در این بررسی مشخص شد که این ۶ گونه در ۶ شاخه‌ی مجزا (A-F) تفکیک شدند. نتایج آنالیز ITS1-5.8S-ITS2 و EF1- $\alpha$  مشخص کرد که جدایه‌های متفاوت *B. bassiana* در دو شاخه‌ی A و C قرار گرفتند. بنابراین آنها نتیجه گرفتند که گونه‌ی *B. bassiana* پلی‌فیلتیک (چندنیایی) است. در گذشته قادر به تفکیک این دو شاخه از یکدیگر نبودند. هر دو گروه تولید کنیدی‌های غیرقابل تفکیک، کوچک، کروی تا حدی کروی می‌کنند (شاخه‌ی A تولید کنیدی با اندازه‌ی ۲/۳-۳/۲ میکرومتر و شاخه‌ی C تولید کنیدی با اندازه‌ی ۲/۹-۲/۱ میکرومتر می‌کند). از نظر مورفولوژیکی تنها راه تشخیص این دو شاخه از یکدیگر، اندازه‌ی کنیدی بود. حتی گونه‌هایی که در این دو شاخه قرار می‌گیرند الگوی بیماری‌زایی یکسان و هم‌پوشانی زیادی در میزبان‌های خود دارند. ثابت شده است که شاخه‌ی A توزیع جهانی دارد و بیشتری افرادی که در سراسر دنیا با جدایه‌های مختلف *B. bassiana* کار می‌کنند، احتمالاً این جدایه‌ها در شاخه‌ی A قرار دارند [۱۰].

حاصل مطالعات آقای رنر و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۱۱) براساس ۴ جایگاه ژنی (TEF<sup>۳</sup>، RPB2<sup>۱</sup>، RPB1<sup>۳</sup>)

۱- Rehner and Buckley

۲- Rehner et al.

۳- RNA Polymerase II Largest Subunit



Bloc<sup>۳</sup> علاوه بر ۶ گونه ای که در بالا به آنها اشاره شد، گزارش ۶ گونه ای جدید *Beauveria* بود [۵۹]. این ۶ گونه شامل *B. sungii*, *B. kipukae*, *B. australis*, *B. asiatica*, *B. malawiensis*, *B. pseudobassian* است. نتایج تحقیق آنها نشان داد که جنس *Beauveria* مونوفیلتیک است [۵۹]. دلیل این ادعا این است که با ترکیب نتایج مطالعات مناطق ژنی ITS و *EF1-α* با نتایج تحقیق براساس ۳ جایگاه *RPB1*, *RPB2* و *Bloc* تمام گونه های شناخته شده ی *Beauveria* در یک شاخه قرار گرفتند. بنابراین آنها نتیجه گرفتند که جنس *Beauveria* تک نیایی است. در ادامه پس از صحبت و ذکر کلیاتی در مورد تنوع ژنتیکی قارچ *Beauveria*، روش های ملکولی که برای شناسایی، طبقه بندی و تنوع ژنتیکی استفاده شده در مورد قارچ *Beauveria* معرفی می گردند.

#### ۱-۱۲. ارزیابی تنوع ژنتیکی در قارچ *Beauveria*

در دهه ی ۱۹۷۰ با ظهور تکنیک های ملکولی متعدد و روش های تحلیلی مربوطه، فرصت های جدیدی جهت پیشبرد طبقه بندی، فیلوژنتیک و ژنتیک جمعیت قارچ *Beauveria* ایجاد شد. در طول دهه ی ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ مطالعات متعددی با موضوعاتی از قبیل کموتاکسونومی، بیوشیمی و تکنیک های مبتنی بر DNA برای توصیف الگوهای تنوع ژنتیکی و ارتباط این الگوها با قارچ *Beauveria* منتشر شد. هر کدام از این نشانگرهای ملکولی نسبت به مطالعات مورفولوژیکی که به تنهایی و قبل از توسعه ی روش های ملکولی جهت آشکارسازی تنوع درون گونه ای جنس *Beauveria* استفاده شده بودند به شکل کارآمدتری عمل کردند. با این حال تعداد کمی از این تکنیک ها به طور مؤثری در حل و فصل طبقه بندی و ارتباطات ژنتیکی *Beauveria* مؤثر بوده اند. در بسیاری از مطالعات، تکنیک های ملکولی چون سرولوژی<sup>۴</sup>، چند شکلی ساختار تک رشته<sup>۱</sup>، ایزوایمها<sup>۲</sup>، کاریوتیپینگ<sup>۳</sup>، کموتاکسونومی<sup>۴</sup>،

۱- RNA PolymeraseII Second Largest Subunit

۲- Translation Elongation Factor-1a

۳- Nuclear Intergenic Region

۴- Serology

اینترن‌های DNA ریبوزومی<sup>۵</sup>، چند شکل طولی قطعه‌ی بریده شده‌ی میتوکندریایی<sup>۶</sup> ابداع شده است اما سودمندی این روش‌ها به طور کامل مورد ارزیابی قرار نگرفته است. به طور کلی، به علت وجود و حضور گونه‌های مختلف و جدایه‌های متفاوت قارچ *Beauveria* برای هر گونه تعمیم نتایج چنین مطالعاتی کاری بس دشوار است. لازم به ذکر است که بسیاری از این روش‌های اولیه با روش‌هایی چون داده‌های حاصل از توالی نوکلئوتیدی<sup>۷</sup>، نشانگرهای ریزماهوره<sup>۸</sup> و درون ریزماهوره<sup>۹</sup>، چند شکلی طولی قطعات تکثیر یافته<sup>۱۰</sup> برای آنالیز ارتباطات ژنتیکی جایگزین شده‌اند (شکل ۱-۳). این مطالعات گذاری از روش‌های مورفولوژیکی مرسوم که برای طبقه‌بندی گونه‌های *Beauveria* استفاده می‌شده است به مرحله‌ی پذیرش روش‌های مولکولی مورد اعتماد به عنوان اساس تعیین ارتباطات ژنتیکی و طبقه‌بندی قارچ *Beauveria* بوده‌اند [۵۸].

تکنیک‌های ملکولی که برای شناسایی و تشخیص سویه‌ها و گونه‌های قارچی استفاده می‌شوند به دو گروه مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۱۱</sup> و مستقل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تقسیم می‌شوند. تکنیک‌های غیرمبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل الکتروفورز آنزیمی چندمکانی<sup>۱۲</sup>، الکتروفورز کاریوتیپ<sup>۱۳</sup>، چندشکلی طولی قطعه بریده شده<sup>۱۴</sup> است. از الکتروفورز آنزیمی چند جایگاهی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی میان ایزوله‌های قارچ‌های بیماری‌زای حشراتی مانند *Beauveria spp* استفاده شده است [۶۰]. از الکتروفورز آنزیمی چند جایگاهی به علت عدم توانایی این روش در نشان دادن

- 
- ۱- Single-Strand Conformation Polymorphism
  - ۲- Isozymes
  - ۳- Karyotyping
  - ۴- Chemotaxonomy
  - ۵- Ribosomal DNA Introns
  - ۶- Mitochondrial Restriction Fragment Length Polymorphisms
  - ۷- Nucleotide Sequence Data
  - ۸- Microsatellite Marker
  - ۹- Inter-Microsatellite PCR (ISSR-PCR) Marker
  - ۱۰- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)
  - ۱۱- Polymerase Chain Reaction
  - ۱۲- Multi-Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE)
  - ۱۳- Karyotype Electrophoresis
  - ۱۴- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

تفاوت در تک بازها یا جهش‌های احتمالی که در ژنوم رخ می‌دهد از آن در مطالعات سیستماتیک و فیلوژنی استفاده نمی‌کنند. برای مثال *B. amorpha* و *B. brongniartii* براساس مورفولوژی و آنالیز DNA قابل تفکیک از *B. bassiana* هستند اما روش الکتروفورز آنزیمی چند جایگاهی توانایی نشان دادن چنین تفاوتی بین گونه‌ها را ندارد [۶۱]. از الکتروفورز کربوتیپ برای تمایز قائل شدن میان جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر حشرات استفاده شده است. ویاد<sup>۱</sup> و همکاران از یک پروب تلومری ۱۵۹ جفت بازی با هشت تکرار (TTAGGG)<sub>۸</sub> از منطقه‌ی تلومری *Botrytis cinerea* همراه با الکتروفورز CHEF<sup>۲</sup> برای تعیین چند شکلی کربوتیپی در میان ۹ ایزوله *Beauveria bassiana* استفاده کردند [۵۱].

تکنیک‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز که برای شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی در قارچ‌های بیمارگر حشرات استفاده می‌شود شامل چند شکل طولی قطعات تکثیر یافته (AFLP) [۶۲]، ریزماهواره‌ها<sup>۳</sup> [۶۳]، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر پایه‌ی عناصر تکرار شونده<sup>۴</sup>، RFLP بر پایه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR- Based RFLP)، نشانگرهای ریبوزومی و نشانگرهای میتوکندریایی است. نظر به اینکه در این رساله از نشانگرهای ریبوزومی جهت تشخیص، شناسایی و مطالعه‌ی فیلوژنی جدایه‌های *Beauveria* استفاده شده است صرفاً به معرفی این نشانگر می‌پردازیم و به منظور جلوگیری از اطاله‌ی کلام، خواننده را به منابع مرتبط به سایر روش‌ها که در متن در خصوص *Beauveria* اشاره شده است ارجاع می‌دهیم.

۱- Viaud et al.

۲- Contour-Clamped Homogeneous Field

۳- Microsatellites or Simple Sequence Repeat (SSR)

۴- Repetitive Element- Based PCR (REP-PCR)

شاخه	رده	خانواده	جنس	گونه	زیرگونه	جمعیت
۱- روش های غیر مبتنی بر PCR : آیزوزایمها و آلوزایمها هیبریداسیون DNA-DNA کاریوتیپ ۲- روش های مبتنی بر PCR : AP-PCR/RAPD AFLP ریزماهورها PCR-RFLP ITS ریبوزومی IGS ریبوزومی آنالیز توالی DNA ریبوزومی ITS IGS 18S 28S DNA میتوکندریایی (با ژن های کدکننده) ژن های کد کننده هسته‌ای						

شکل ۱-۳: نمایی از توانمندی روش های ملکولی برای شناسایی قارچ های بیمارگر حشرات: بیانی ساده برای نشان دادن کاربرد روش های ملکولی در مطالعات جمعیتی و شناسایی و طبقه بندی قارچ های بیماری زای حشرات. روش های ملکولی مورد استفاده به دو بخش مستقل از واکنش زنجیره ای پلیمرز و وابسته به واکنش زنجیره ای پلیمرز تقسیم بندی می شوند. شروع کار با نشانگرهای مستقل از PCR با کشف آنزیم های برشی بود. این روش ها شامل آیزوزایمها و آلوزایمها، هیبریداسیون و کاریوتیپ کروموزومی است. دسته دیگر از نشانگرهای DNA با کشف واکنش زنجیره ای پلیمرز ابداع شدند. این نشانگرها به سرعت توسعه یافتند که از جمله این نشانگرها می توان به PCR با آغازگر اختیاری (Arbitrary Primed-PCR) اشاره کرد. در این روش از آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی ۲۰ تایی و یا بیشتر استفاده می شود. از جمله دیگر نشانگرهای مبتنی بر PCR که بیشترین کاربرد را در علم قارچ های بیمارگر حشرات دارند شامل AFLP<sup>۱</sup>، ریزماهورها<sup>۲</sup>، PCR-RFLP<sup>۳</sup> که خود شامل ITS (Internal Transcribed Spacer) و IGS (Intergenic Spacer) ریبوزومی است، آنالیز توالی که خود شامل آنالیز DNA ریبوزومی (ITS, IGS, 18S, 28S)، آنالیز DNA میتوکندریایی و آنالیز ژن های کدکننده هسته ای است [۵۲].

۱- Amplified Fragment Length Polymorphism

۲- Microsatellites

۳- Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length polymorphism

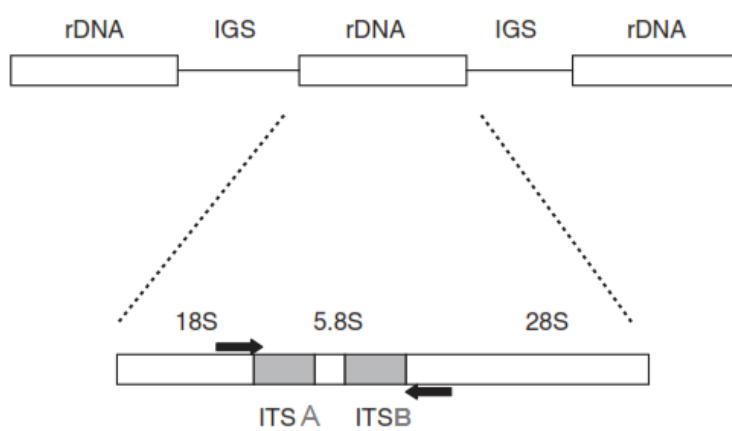
## ۱-۲۱. نشانگرهای ریبوزومی

بخشی از ژنوم در قارچ‌ها و دیگر یوکاریوت‌ها مربوط به DNA ریبوزومی (rDNA) است که RNA ریبوزومی (rRNA) را کد می‌کند. ژن DNA ریبوزومی در بیش از ۱۰۰ تا ۲۰۰ نسخه به شکل توالی تکراری پشت سرهم وجود دارد. هر واحد ژنی DNA ریبوزومی یک نسخه از زیر واحد بزرگ ریبوزوم (۲۸S)، زیر واحد کوچک ریبوزوم (۱۸S) و زیر واحد ۵/۸S را دارد. ژن‌های زیر واحدهای DNA ریبوزومی توسط فواصل رونویسی شده‌ی داخلی<sup>۱</sup> (ITS) از یکدیگر جدا می‌شوند. مناطق بین هر واحد ژنی را فواصل بین ژنی غیر رونویسی شده<sup>۲</sup> (IGS) می‌گویند. که این فواصل بین ژنی غیر رونویسی شده، به طور جداگانه‌ای دارای rRNA ۵/۸S می‌باشد (شکل ۱-۳) [۶۴]. از تنوع موجود در منطقه‌ی ITS برای شناسایی گونه و از تنوع موجود در منطقه‌ی IGS برای شناسایی زیر گونه استفاده می‌شود. از آنجا که مناطق ۲۸S و ۱۸S در موجودات مرتبط به شدت محافظت شده است و توالی‌های آنها در یوکاریوت‌های مختلف مشخص شده است بنابراین می‌توان برای آنالیز چند شکلی موجود در ITS و IGS از پرایمرهایی استفاده کرد که با بخشی از مناطق ۲۸S و ۱۸S مکمل هستند [۶۵]. برای بررسی و آنالیز چند شکلی موجود در مناطق ITS و IGS می‌توان مستقیماً از ژل آگارز برای بررسی چند شکلی موجود استفاده کرد یا اینکه قطعات تکثیر شده را با اندونوکلیازهای برشی تیمار نمود و قطعات برشی حاصل را روی ژل آگارز برد که به این روش آنالیز برش DNA ریبوزومی تکثیر شده<sup>۳</sup> می‌گویند [۶۶]. هم‌چنین می‌توان برای متمایز نمودن قطعات تکثیری در سطح جفت باز آنها را توالی‌یابی نمود. در گذشته از چند شکلی موجود در مناطق ITS و IGS نه تنها برای مشاهده‌ی تنوع بین و درون گونه‌ای در قارچ‌های بیماری‌زای حشرات استفاده شده است [۶۶-۶۹] بلکه با طراحی پرایمرهای اختصاصی از آنها برای مطالعات تشخیصی استفاده شده است [۴۹، ۷۰].

۱- Internal Transcribed Spacer

۲- Non-Transcribed Spacer = Intergenic Spacer

۳- Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA)



شکل ۱-۴: دیاگرام ساختار DNA ریپوزومی - فلش‌ها نشان دهنده‌ی پرایمرهایی است که با بخشی از مناطق محافظت شده‌ی ۱۸S و ۲۸S مکمل هستند. این پرایمرها توانایی تکثیر مناطق ITS را دارا می‌باشند. همانطور که در تصویر دیده می‌شود IGS، واحدهای تکرار شونده‌ی rDNA پشت سرهم را از یکدیگر جدا می‌کند [۵۲].

---

تاکنون، کلیاتی در مورد معرفی قارچ‌های بیمارگر حشرات، نقش بیوتکنولوژی در کاربردی کردن این قارچ‌ها در کشاورزی، شناسایی و طبقه‌بندی این قارچ‌ها با روش‌های ملکولی اشاره شد. در فصل دوم در DNA بارکدینگ و نقش آن در طبقه‌بندی قارچ‌های بیمارگر حشرات اشاره می‌شود و به مرور منابع مرتبط می‌پردازیم.

فصل دوم

مرور منابع



شناسایی صحیح گونه‌ی موجود زنده همواره چالش برانگیز بوده است [۷۱, ۷۲]. یک شناسایی صحیح و دقیق باید قابل تکرار و قابل اعتماد باشد. این مشکل رده‌بندی دلیل اصلی برای گسترش روشی جدید برای شناسایی سریع گونه‌ها براساس توالی خاصی از DNA شد. DNA بارکدینگ، شامل توالی کوتاه ژنی است که اندازه‌ای بین ۴۰۰ تا ۸۰۰ جفت باز طول دارد و برای تمام گونه‌های موجود بر روی کره-ی زمین قابل استفاده است [۷۳, ۷۴]. با پیشرفت و افزایش مهارت در ژنتیک ملکولی، تکنولوژی تعیین توالی و علم بیوانفورماتیک، بارکدینگ DNA این اجازه را به محققین می‌دهد که به سرعت و با دقت به شناسایی گونه‌های مورد نظر خود بپردازند. استفاده از توالی‌های کوتاه DNA برای شناسایی‌های بیولوژیکی اولین بار توسط پائول هبرت<sup>۱</sup> با هدف شناسایی سریع، صحیح و قابل تکرار تمام گونه‌ها از تمام شاخه‌ها از قبیل حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها بود [۷۵]. استفاده از یک بخشی از ملکول DNA که به عنوان نشانگر شناسایی جهانی برای تمام گونه‌ها به کار رود اولین بار برای حیوانات استفاده شد [۷۴]. با این حال مکان ژنی استاندارد بارکد DNA برای گیاهان توسط کمیته‌ی گیاه‌شناسی تا ۶ سال بعد به صورت رسمی پذیرفته نشد [۷۶]. پس از چندین دوره غربالگری و بازنگری در مورد مناطق ژنی در ژنوم‌های گیاهی، نهایتاً دو ژن پلاستیدی<sup>۲</sup> *matK* و ژن زیر واحد بزرگ ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات کربوکسیلاز/اکسیژناز<sup>۳</sup> مورد توافق برای بارکدینگ DNA قرار گرفت [۷۷]. منطقه‌ی rDNA هسته‌ای برای بیش از ۲۰ سال است که برای شناسایی و مطالعات فیلوژنتیکی در قارچ‌ها استفاده می‌شود [۷۸]. منطقه‌ی rDNA یوکاریوتی دارای ژن‌های ۱۸S، ۵/۸S و ۲۸S است که توسط RNA پلی‌مراز I رونویسی می‌شوند. پس از رونویسی، دو فاصله‌ی بین ژنی (ITS1 و ITS2) جدا می‌شوند [۷۹]. ژن زیرواحد کوچک ریبولوزومی<sup>۴</sup> (۱۸S) که معمولاً در مطالعات فیلوژنتیکی استفاده می‌شود همولوگ زیرواحد ۱۶S ریبولوزومی است که برای شناسایی گونه‌های باکتریایی استفاده

۱- Paul Hebert

۲- Maturase-Encoding Gene

۳- Ribulose 1-5 Biphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit Gene

۴- Ribosomal Small Subunit rRNA Gene (SSU)

می‌شود [۸۰]. ژن زیرواحد بزرگ ریبوزومی<sup>۱</sup> (۲۸S) تا حدی قدرت تفکیک گونه‌ها را دارد و گاهی در ترکیب با ITS برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌شود. در مخمرها قبل از گسترش مفاهیم DNA بارکدینگ از منطقه‌ی D1/ D2 ژن زیرواحد بزرگ ریبوزومی برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌شده است [۸۱]. در حال حاضر ۱۷۲,۰۰۰ توالی کامل ITS در بانک ژنی موجود است که ۵۶ درصد آن همراه با نام علمی می‌باشند که نماینده‌ی ۱۵,۵۰۰ گونه و ۲,۵۰۰ جنس است که از ۱۱,۵۰۰ مطالعه‌ی علمی در ۵۰۰ مجله‌ی علمی به دست آمده است [۸۲]. ژن‌های کدکننده‌ی پروتئینی<sup>۲</sup> به فراوانی در قارچ‌شناسی و در مطالعات فیلوژنتیکی یا شناسایی گونه‌ها استفاده شده‌اند. در Ascomycota استفاده از این ژن‌ها نسبت به ژن‌های rDNA برای حل ارتباط در سطوح تاکسونومی متنوع عموماً بهتر است [۸۳]. از این ژن‌ها که به شکل اختصاصی برای شناسایی استفاده شده‌اند می‌توان به TEF 1- $\alpha$ <sup>۳</sup> (مسئول انتقال آمینو آسیلی tRNA به ریبوزوم و یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های محلول در سلول-های یوکاریوتی است) برای *Fusarium* و  $\beta$ -توبولین (توبولین  $\beta$  همراه با توبولین  $\alpha$  در ایجاد ساختار پلی‌مری میکروتوبول‌ها نقش دارند) برای *Penicillium* اشاره کرد [۷۵]. از آنجا که این ژن‌ها مدت کوتاهی است که در مورد برخی از ژن‌ها به کار گرفته شده‌اند، هنوز نیاز به ارزیابی‌های بیشتری جهت تفکیک گونه‌های یک جنس نیاز دارند. بنابراین این مناطق ژنی هنوز به عنوان منطقه‌ی بارکد در قارچ‌ها پذیرفته نشده‌اند. در میان ژن‌های کدکننده‌ی پروتئینی بزرگ‌ترین زیرواحد RNA پلیمراز II (RPB 1) ممکن است که دارای پتانسیل استفاده به عنوان بارکد قارچی باشد [۸۴]. از این زیرواحد در مطالعات فیلوژنتیکی Basidiomycota, Zygomycota, Microsporidia و بعضی از Protista ها استفاده شده است. پرایمرهای RPB 1 برای تهیه‌ی پروژهای درختچه‌ی حیات قارچی<sup>۴</sup> مورد استفاده

۱- Ribosomal Large Subunit rRNA Gene (LSU)

۲- Protein-Coding Genes

۳- Translation Elongation Factor 1- $\alpha$

۴- Assembling the Fungal Tree of Life (AFTOL) project

قرار گرفته‌اند و در سامانه‌ی (<http://www.lutzonilab.net/aftol/>) WASABI<sup>۱</sup> موجود است. با این حال استفاده از این زیرواحد به شکل بارکدینگ به طور فراگیر در قارچ‌ها استفاده نشده است [۷۵]. در ادامه به مرور منابع آزمایشات مورفولوژیک، مطالعات فیلوژنی انجام شده در مورد *Beauveria* با استفاده از منطقه‌ی ITS و در نهایت به جمع‌بندی مطالب گفته شده پرداخته می‌شود.

## ۲-۱ مرور منابع آزمایشات مورفولوژیک

اثر دما بر نرخ رشد، بیماری‌زایی و تعداد کنیدی قارچ‌های بیمارگر حشرات *B. bassiana* و *M. anisopliae* مشخص شده است [۸۵]. اکسی<sup>۲</sup> و همکاران (۱۹۹۹) با بررسی طیف دمایی ۳۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد در میزان کنیدی تولیدی و نرخ رشد قارچ‌های بیمارگر حشرات، دمای ۲۷-۲۵ درجه را به عنوان مناسب‌ترین طیف دمایی برشمردند [۸۶].

از قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* برای کنترل آفات انباری مانند *Oryzaephilus surinamensis*<sup>۳</sup>، [۸۷]، *Sitophilus oryzae*<sup>۴</sup>، [۸۸-۹۰]، *Sitophilus zeamais*<sup>۵</sup>، [۹۱]، *Tribolium castaneum*<sup>۶</sup>، [۹۲]، *Acanthoscelides obtectus*<sup>۷</sup>، [۹۲]، *Prostephanus truncatus*<sup>۸</sup>، [۹۳] در شرایط آزمایشگاه استفاده شده است. پادین<sup>۹</sup> و همکاران از *Beauveria bassiana* برای کنترل *Sitophilus oryzae*، *Tribolium castaneum* و *Acanthoscelides obtectus* در شرایط آزمایشگاهی استفاده کردند [۹۲]. آنها گزارش کردند که *S. oryzae* نسبت به دو گونه‌ی دیگر به قارچ *B. bassiana* بسیار حساس است در حالی این قارچ تأثیری بر کشندگی دو گونه‌ی دیگر ندارد. این تنها گزارش

۱- Web Accessible Sequence Analysis for Biological Inference

۲- Ekési

۳- Sawtoothed Grain Beetle

۴- Rice Weevil

۵- Maize Weevil

۶- Red Flour Beetle

۷- Bean Weevils or Seed Beetles

۸- Larger Grain Borer

۹- Padin

موجود جهت استفاده از قارچ *B. bassiana* برای کنترل *S. oryzae* می‌باشد.

اکسی و همکاران از دو جدایه‌ی *B. bassiana* برای اندازه‌گیری نرخ رشد بر روی محیط کشت SDA استفاده کردند که نتایج آنها بیانگر تفاوت این دو جدایه از نظر نرخ رشد در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی-گراد بود [۸۶]. صفوی<sup>۱</sup> و همکاران با اندازه‌گیری نرخ رشد دو جدایه *B. bassiana* در ۷ محیط کشت مختلف، طیف رشدی متفاوتی را برای دو جدایه مشاهده نمودند [۹۴]. داربرو<sup>۲</sup> و همکاران از ۱۰ جدایه *B. bassiana* برای اندازه‌گیری نرخ رشد در ۳ دمای ۲۰، ۲۶ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد استفاده نمودند و نتایج نشان‌دهنده رشد متفاوت این جدایه‌ها بود و آنها نتیجه گرفتند جدایه‌ها در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، از بیشترین میزان رشد برخوردار بودند [۹۵]. طلایی حسن‌لویی<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۲) آزمایشات بیماری‌زایی ۵ جدایه *B. bassiana* بر روی *S. litura* و نرخ رشد این جدایه‌ها بر روی محیط SDA را انجام داده و همبستگی‌ای را میان این دو پارامتر مشاهده نکردند [۹۶]. پتلامول<sup>۴</sup> (۲۰۱۲) با اندازه‌گیری نرخ رشد ۵ جدایه *B. bassiana* در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت CDA<sup>۵</sup>، مشخص نمودند که جدایه‌ها دارای میزان رشد متفاوتی هستند و همچنین گزارش نمودند که یکی از این جدایه‌ها در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد رشدی معادل ۳۷ میلی‌متر/روز را داشت [۹۷].

آزمایش پتلامول و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد تعداد کنیدی‌های تولید شده توسط ۵ جدایه *B. bassiana* بر روی محیط کشت CDA متفاوت است [۹۷]. وارلا<sup>۶</sup> و همکاران (۱۹۹۶) بیان نمود که نرخ رشد سریع یک قارچ، مزیتی در کنترل بیولوژیک محسوب می‌شود چرا که این ویژگی موجب کاهش زمان لازم برای تولید انبوه کنیدی شده و نوعی استراتژی رقابتی قارچ در طی چرخه

۱- Safavi

۲- Darbro

۳- Talaei-Hassanloui

۴- Petlamul

۵- Czapek Dox Agar

۶- Varela

ساپروفیتی در برابر سایر میکروارگانیسمها محسوب می شود و موجب تسریع کنترل آفت به علت آلودگی سریعتر میزبان می گردد [۹۸]. صفوی و همکاران (۲۰۰۷) با ارزیابی ۲ جدایه ی *B. bassiana* در ۷ محیط کشت با نسبت کربن به نیتروژن متفاوت، تعداد کنیدی تولید شده را بررسی کردند. نتایج آنها گویای تفاوت در در تعداد کنیدی تولیدی برای هر دو جدایه در محیط کشت های متفاوت بود [۹۴]. نتایج آزمایش پتلامول و همکاران (۲۰۱۲) برای ارزیابی تعداد کنیدی تولیدی گویای تفاوت میان ۵ جدایه ی *B. bassiana* بر روی محیط کشت CDA بود [۹۷].

## ۲-۲. مطالعات فیلوژنی انجام شده در مورد *Beauveria* با استفاده از منطقه ی ITS

کروز و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۰۶) از منطقه ی ITS برای مطالعه ی فیلوژنی ۱۱ جدایه *B. bassiana* استفاده کردند. آنها ابراز داشتند که این ۱۱ جدایه در ۳ شاخه ی مجزا از یکدیگر قرار گرفتند. تکثیر منطقه ی ITS با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 انجام گرفت و اندازه ی منطقه ی تکثیری برای جدایه ها ۵۴۵ جفت باز بود. نتایج آنها نشان داد که بین گروه های ایجاد شده در درختچه ی و منشأ جغرافیایی جدایه ها ارتباطی بدست نیامد [۹۹]. جانی و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۱۲)، ۷۸ جدایه *Beauveria* را از *Agrilus planipennis*<sup>۳</sup> (Coleoptera: Buprestidae) از نقاط مختلف استان آنتاریو، کانادا جداسازی کردند. گونه های شناخته شده براساس منطقه ی ITS دو گونه ی *B. bassiana* و *B. pseudobassina* بود و این جدایه ها در ۳ شاخه ی مجزا نسبت به یکدیگر قرار گرفتند. طول منطقه ی تکثیری خوانش شده با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 برای تمام جدایه ها ۵۴۰ نوکلئوتید بود [۱۰۰]. میلینگ و همکاران<sup>۴</sup> (۲۰۱۲)، ۳۲ جدایه *Beauveria* را از *Meligethes aeneus*<sup>۵</sup> از نقاط مختلف سوئیس جداسازی کردند. منطقه ی ITS با استفاده از پرایمرهای ITS4 و ITS5 تکثیر شد و نتایج آنها نشان داد

۱- Cruz and et al.

۲- Johney and et al.

۳- Emerald Ash Borer (EAB)

۴- Meyling

۵- Pollen Beetle

که طول خوانش شده برای این منطقه ۵۶۴ نوکلئوتید بوده است و گونه‌های شناخته شده براساس منطقه‌ی ITS دو گونه‌ی *B. brongniartii* و *B. bassiana* بود. از نظر فیلوژنی جدایه‌های مذکور در ۳ شاخه‌ی مجزا قرار گرفتند. آنها ابراز داشتند که منطقه‌ی ITS ابزاری مفید برای شناسایی گونه‌های *Beauveria* است [۱۰۱].

## ۲-۳. نتیجه‌گیری و افق‌های آینده

بسیاری از تکنیک‌های ملکولی که ممکن است به تشخیص یا شناسایی قارچ‌ها کمک کنند، فقط برای آن دسته از آرایه‌های قارچی مفید هستند که تاکسونومی بر پایه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آنها وجود دارد یا حداقل داده‌های مربوط به مطالعات ملکولی آنها به چاپ رسیده است که این امر امکان مقایسه‌ی داده‌ها را فراهم می‌کند. در راسته‌ی Hypocreales تشخیص و شناسایی ملکولی محدود به تعداد کمی از جنس‌ها می‌شود. این جنس‌های قارچی شامل *Metarhizium*، *Beauveria*، *Paecilomyces*، *Isaria*، *Lecanicillium* و *Nomuraea* که نه تنها توزیع جهانی دارند بلکه کاربرد عملی گسترده‌ای در کنترل حشرات آفت دارند. دیگر قارچ‌های مهم بیماری‌زای حشرات که اطلاعات فیلوژنتیکی آنها برای شناسایی و تشخیص ناقص است شامل *Zygomycetes* ها در راسته‌ی Entomophthorales، Blastocladales، *Coelomomyces* و بازیدیومیست‌های شبه زنگ<sup>۱</sup> در *Septobasidium* ها می‌باشند. عموماً تشخیص<sup>۲</sup> تمایل به طبقه‌بندی خانواده و جنس دارد و ممکن است نیاز به روش‌های تکنیکی متفاوتی نسبت به شناسایی<sup>۳</sup> داشته باشد. شناسایی تمایل به طبقه-بندی در حد گونه و زیرگونه دارد. با تجدید نظری که در جزئیات روابط فیلوژنتیکی قارچی انجام شده است، شناسایی اولیه بیشتر به تطبیق توالی‌ها تا استفاده از روش‌های سنتی وابسته است. حتی

۱- Rust-Like Basidiomycetes

۲- Diagnose

۳- Identification

هنگامی که تعداد آرایه های قارچی که با داده های بر پایه ی توالی یابی که اجازه ی شناسایی صحیح جنس، گونه و زیرگونه را می دهند، پیوسته رو به افزایش باشد، تعداد کل قارچ های بیماری زای حشرات که با داده های بر پایه ی توالی یابی شناسایی می شوند هم چنان پائین خواهد ماند. در آینده ای که مشخص نیست چه تعداد از ژن ها و قارچ های مختلف از نظر تاکسونومی در دسترس خواهند بود، بدون شک صفات سنتی و مورفولوژیکی هم چنان به عنوان تنها ابزار برای شناسایی دامنه ی وسیعی از این قارچ ها استفاده می شود.

با توجه به شناختی که نسبت به قارچ های بیمارگر حشرات به ویژه در مورد جنس *Beauveria* ایجاد شد. در ادامه و در فصل سوم به مواد و روش های استفاده شده در این رساله اشاره می شود. در فصل چهارم به ارائه ی نتایج تحقیق پرداخته می شود و در نهایت در فصل پنجم علاوه بر بحث در مورد نتایج کسب شده، به ارائه ی پیشنهادات لازم بسنده می شود.

فصل سوم

مواد و روش ها



در این فصل در خصوص جداسازی قارچ *Beauveria* از نمونه خاک از استان های گلستان، مازندران، هرمزگان، فارس، کرمان، سمنان و آذربایجان شرقی با استفاده از روش طعمه حشره ای صحبت شده است. خالص سازی قارچ با استفاده از روش تک اسپورگیری، تهیه ی بانک ژنی اولیه و ثانویه، شناسایی مورفولوژیکی قارچ، انجام آزمایشات مورفولوژیک از قبیل نرخ رشد، شمارش تعداد کنیدی تولیدی و آزمون زیست سنجی از مباحث دیگری است که در ادامه صحبت شده است. در نهایت برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز، روش استخراج DNA ژنومی از قارچ *Beauveria*، پرایمرهای مورد استفاده، خالص سازی محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز برای توالی یابی ذکر می شود.

نتایج مطالعات ما نشان داد که روش طعمه گیری حشره ای، روشی مفید و با حساسیت بالا جهت جداسازی قارچ بیمارگر *Beauveria* از خاک بود. با این روش انجام عمل تشخیص<sup>۱</sup> به خوبی انجام شد. تشخیص، مهمترین مزیت روش طعمه حشره ای در مقایسه با روش عصاره گیری از خاک است. از معایب روش طعمه حشره ای می توان به فرآیند زمان بر پرورش حشره که نیاز به تغذیه ی مناسب و شرایط نگهداری بهینه حشره دارد اشاره کرد. یکی از روش های دیگری که برای جداسازی قارچ بیمارگر *Beauveria* استفاده می شود روش عصاره گیری از خاک است. این روش سرعت بیشتری و هزینه ی کمتری نسبت به روش طعمه حشره ای نیاز دارد. این روش برای آزمایشگاه هایی توصیه می شود که افراد مجرب جهت شناسایی کلونی های قارچی شکل گرفته، حضور داشته باشند. قارچ های بیمارگر حشرات معمولاً از سرعت رشد کمتری بر روی محیط کشت نسبت به دیگر قارچ ها برخوردارند و همین عامل باعث شده که در روش عصاره گیری با اینکه کنیدی قارچ *Beauveria* انتقال پیدا کند اما به دلیل رشد کم در مقایسه با دیگر قارچ ها فرصت رشد بر روی محیط کشت را پیدا نکنند. هر چند می توان از قارچ کش هایی نظیر سیکلو هگزامید و دودین در محیط کشت جهت جلوگیری از رشد دیگر قارچ ها استفاده کرد اما تجربه نشان داده است که قارچ های سریع الرشدی چون *Trichoderma*

۱- Diagnosis

*Aspergillus* کمتر تحت تأثیر این قارچ‌کش‌ها در محیط کشت قرار می‌گیرند.

### ۳-۱ مواد شیمیایی

SDA, PDA, Agar, Yeast Extract از شرکت Lifechem, میلانو، ایتالیا، خریداری شد. سیکلوهمگزامید، (BSA) Bovine Serum Albumin از شرکت Sigma, سنت لوئیس، امریکا، خریداری شد. dNTP, MgCl<sub>2</sub>, PCR Buffer, Smart Taq DNA Polymerase, DNase Free, Gene Ruler 100bp, Loading Buffer, Agaros, Phenol, Ribonuclease A, Deionized water از شرکت Bioscience, کمبریج، انگلستان خریداری شد. CTAB, β-Mercaptoethanol, Tween 80 از شرکت Merck, فرانکفورد، آلمان، خریداری شد. DNA Gel و DNA Gel Extraction Kit از شرکت Norgen, سنت کاترین، کانادا خریداری شد. لام هموسیتومتر از شرکت Neubauer Improved Bright-Line, هامبورگ، آلمان تهیه گردید و پرایمرهای ITS1 و ITS2 از شرکت Bioneer, داجون، کره جنوبی تهیه شد.

### ۳-۲ دستگاه‌های آزمایشگاهی

اتوکلاو (Rozhin Teb), تهران، ایران، آون (Heraeus), هانوا، آلمان، ورتکس (DENA Medical Industry), تهران، ایران، هود میکروبی (Farpajouh), تهران، ایران، انکوباتور (Heraeus), هانوا، آلمان، ترموسایکلر (TaKaRa), آتسو، ژاپن، سانتریفیوژ (Sigma), سنت لوئیس، امریکا، حمام آب گرم (DENA Medical Industry), تهران، ایران، مایکروویو (LG), سئول، کره جنوبی، ژل داک (QUANTUM ST4), سوپیا، آلمان، ترانس ایلومینیتور (Zhihat Teb Azma), تهران، ایران، میکروسکوپ نوری (Olympus), توکیو، ژاپن، سمپلر ۱۰ μl, ۱۰۰ μl و ۱۰۰۰ μl (Eppendorf), هامبورگ، آلمان، بینی‌کولار (Olympus), توکیو، ژاپن، هات پلیت (Heidolph), نورنبرگ، آلمان،

pH متر (Metrohm، پلیکان کریک، آمریکا)، یخچال، فریزر ۲۰- (پارس، تهران، ایران)، پتری دیش شیشه‌ای و پلاستیکی (نوبین تجهیز، تهران، ایران)، هود شیمیایی (Farpajouh، تهران، ایران)، اتاقک رشد (Grouc، تهران، ایران)، ترازو (SARTORIUS، گوتینگن، آلمان) در این رساله مورد استفاده قرار گرفت.

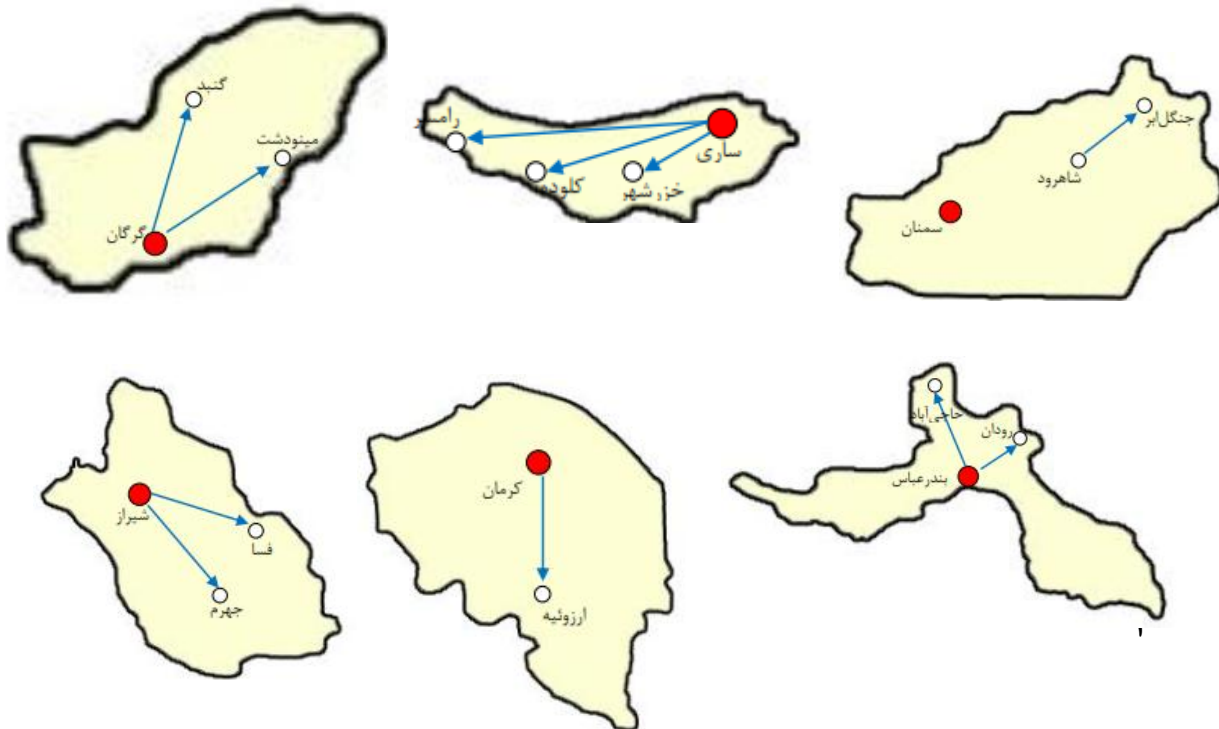
### ۳-۳. جداسازی قارچ *Beauveria*

قارچ بیماری‌گر *Beauveria* را می‌توان از سه منبع متفاوت جداسازی کرد. این سه منبع عبارتند از خاک، حشرات مرده و ریشه و برگ گیاهانی مانند خانواده‌ی گرامینه و گزنه می‌باشد [۴۲، ۱۰۲-۱۰۵]. در این پایان‌نامه منبع جداسازی قارچ *Beauveria* از خاک‌هایی است که از باغات مرکبات شمال و جنوب، مناطق جنگلی و زراعی ایران جمع‌آوری شده است. برای جداسازی این قارچ از روش طمعه حشره‌ای استفاده شد [۱۰۶]. حساس‌ترین روش آزمایشگاهی جداسازی قارچ‌های خاک‌زاد بیماری‌زای حشرات (به خصوص *Beauveria* و *Metarhizium*) روش طمعه حشره‌ای می‌باشد [۱۰۶-۱۰۸]. جمع‌آوری تعداد کافی نمونه خاک که پوشش مناسبی از جمعیت قارچ باشد امری ضروری است [۱۰۹]. برای رسیدن به این مطلوب نمونه خاک‌ها از باغات مرکبات استان‌های گلستان، مازندران، هرمزگان، فارس و کرمان، مناطق جنگلی (شاهرود، جنگل ابر) و زراعی (آذربایجان شرقی، مراغه) جمع‌آوری شد. لازم به ذکر است که یک جدایه نیز از استان البرز (پردیس کشاورزی دانشگاه تهران) مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه ثابت شده است که قارچ‌های بیماری‌گر حشرات توزیع تصادفی در خاک ندارند، و متناسب با پوشش گیاهی هر منطقه در خاک توزیع می‌شوند نمونه‌گیری‌ها از منطقه‌ی رایزوسفری انجام شد [۱۱۰]. نحوه‌ی نمونه‌گیری از باغات بدین شکل بود که سه نمونه خاک از مرکز و یک نمونه خاک از حاشیه باغ گرفته شد. شکل ۲-۱ محل جمع‌آوری نمونه‌های خاک را نشان می‌دهد. تعداد جدایه‌های به‌دست آمده و مختصات جغرافیایی آن‌ها در پیوست ۱ آورده شده است.

### ۳-۴. روش طعمه حشره‌ای

در این روش از حشره‌ای استفاده می‌شود که بیشترین حساسیت را به قارچ بیمارگر داشته باشد. حشره‌ای که در این روش استفاده شد (*Galleria mellonella*, (Lepidoptera: Pyralidae) [۱۱۱]. برای جداسازی قارچ *Beauveria* تعداد ۱۰ عدد لارو *Galleria* را درون پتری دیش‌های حاوی خاک مرطوب مربوط به هر منطقه قرار داده شدند [۱۱۲]. سپس این پتری دیش‌ها را به مدت ۱۵ روز به درون انکوباتور (تاریکی) با دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نزدیک به ۴۰ درصد انتقال داده شدند. در ۷ روز اول با سرکشی روزانه به پتری‌دیش‌ها و انجام عمل تکان دادن سه بار در روز مانع از شفییره شدن لاروها شدیم. با سرکشی‌هایی که در روزهای بعدی انجام می‌شد ترجیح بر این بود که لاروهای مرده با رنگ قرمز<sup>۱</sup> را از پتری‌دیش‌ها خارج کرده و به پتری‌دیش استریل دیگری که حاوی کاغذ صافی استریل مرطوب بود منتقل شوند. در صورتی که لارو آلوده به قارچ شده بود، در روزهای آتی نمود اسپورزایی بر روی لارو دیده می‌شد.

۱- Red Colouration



شکل ۱-۳: استان ها و شهرهایی که نمونه گیری خاک از آنها انجام شده است با رنگ صورتی در شکل دیده می شود. مسیرهای آبی رنگ بیانگر حضور با خودروی سواری و مسیرهای زرد رنگ بیانگر حضور به شکل هوایی در مرکز استان و رسیدن به محل نمونه گیری با خودروی سواری می باشد.

### ۳-۵. پرورش پروانه موم خوار

علاوه بر حساسیت بالای پروانه موم خوار زنبور عسل به قارچ‌های بیمارگر حشرات، پرورش راحت و کم هزینه‌ی این حشره در شرایط آزمایشگاهی یکی از دلایل مهم برای استفاده از آن برای جداسازی قارچ‌های بیمارگر حشرات است. این حشره در شرایطی تکثیر زیادی دارد که دما و رطوبت کافی برایش فراهم باشد. حشرات بالغ تمایل به تخم گذاری در فواصل نازک بین شکاف‌ها را دارند. بدین منظور برای نگهداری حشرات بالغ از ظروفی که دارای این ویژگی بودند استفاده شد. با بازدید روزانه به ظروف پرورش، نوارهای تخم شکل گرفته شده را با ملایمت برداشته و به ظروف پلاستیکی به ارتفاع ۱۵ و قطر ۴۰ سانتی‌متر که حاوی موم عسل بودند انتقال داده شدند. پرورش انبوه آزمایشگاهی پروانه موم خوار در رطوبت نسبی  $5 \pm 65$  درصد و دمای  $2 \pm 25$  درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. بعد از گذشت ۷ روز تخم‌ها تفریق شده و لارو سن اول که بسیار کوچک است شروع به تغذیه از موم می‌کند. در تمام این مراحل بخشی از دهانه ظروف با تور سیمی ضخیم و محکم پوشانیده شد تا هوادهی ظروف تأمین گردد. لاروهای این آفت به علت تحرکات زیاد و با قطعات دهانی جونده خود تا حدی قادر به سوراخ نمودن تور سیمی و خارج شدن از ظرف می‌باشند. (شکل ۲-۲).

### ۳-۶. جداسازی قارچ *Beauveria* از لارو آلوده:

لارو آلوده به قارچ *Beauveria* (شکل ۳-۳) در محیط خاک در معرض قارچ‌ها دیگر و باکتری‌هایی قرار دارد که هنگام انتقال کنیدی یا میسیلیوم *Beauveria* بر روی محیط کشت، می‌توانند محیط کشت اصلی را آلوده کنند. در محیط کشت می‌توان باکتری‌ها را با آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند کلرامفنیکل، تتراسایکلین و استرپتومایسین کنترل کرد. یکی از موانع جدی برای رشد قارچ‌های بیمارگر در محیط کشت، سرعت رشد نسبتاً کم این قارچ‌ها در مقایسه با قارچ‌های فرصت طلب



شکل ۲-۳: مراحل پرورش لارو و حشره کامل پروانه موم خوار زنبور عسل. (الف) انتقال نوارهای تخم به ظروف حاوی موم. (ب) ظروف استفاده شده برای پرورش حشره کامل پروانه موم خوار زنبور عسل. (ج) لاروهای سن سوم و چهارم پروانه موم خوار زنبور عسل. (د) رهاسازی لاروهای پرورش یافته درون پتری دیش حاوی خاک مرطوب.

سaprofیت<sup>۱</sup> است. بنابراین در محیط کشت نیاز است که از ترکیباتی استفاده شود که از رشد قارچهای سaprofیت جلوگیری شود. در این پژوهش محیط کشت انتخابی (شکل ۳-۳) که برای جداسازی قارچ *Beauveria* استفاده شد [SDAY<sup>۲</sup> ۱۱۳] بود که حاوی آنتی بیوتیکهایی مانند کلرامفنیکل (۰/۲ گرم بر لیتر) و استرپتومایسین (۰/۲ گرم بر لیتر) و قارچکشهایی مانند دودین ۶۵ درصد (۰/۵ گرم بر لیتر) و سیکلوهگزامید (۰/۵ گرم بر لیتر) بود. با این روش ۱۶۵ جدایه از نقاط مختلف جداسازی شد (پیوست ۱).

### ۳-۷. محیط کشت انتخابی برای جداسازی *Beauveria spp.*

ابتدا ۱۰ گرم پپتون، ۲۰ گرم گلوکز، ۱۲ گرم آگار، ۵ گرم عصاره‌ی مخمر، ۰/۵ گرم سیکلوهگزامید و دودین (به عنوان قارچکشها) را بر روی هات پلیت قرار داده شد. در ادامه با شیک ملایم، حجم فلاسک ارلن‌مایر را به ۱ لیتر رسانیده شد. پس از اطمینان از حل شدن کامل محیط کشت، pH را با استفاده از HCL یک مولار روی ۶/۳ تنظیم شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی-گراد اتوکلاو شد. ۵۰۰ میکرولیتر کلرامفنیکل (۰/۲ گرم بر لیتر) و ۵۰۰ میکرولیتر استرپتومایسین (۰/۲ گرم بر لیتر) (به عنوان آنتی بیوتیک) به محیط کشت اضافه شد. پس از این مراحل محیط کشت به پتری‌دیش‌های استریل انتقال داده شد.

### ۳-۸. محاسبه‌ی نرخ جداسازی قارچ *Beauveria* در هر منطقه

باغات مرکبات در شمال کشور تقریباً از پیوستگی برخوردار هستند. با علم به این موضوع شروع نمونه‌گیری از منطقه‌ی مینودشت استان گلستان بود که به ازای هر ۵۰ کیلومتر فاصله، منطقه‌ی نمونه‌گیری با توجه به شرایط مدنظر انتخاب می‌شد. پایان منطقه‌ی نمونه‌گیری شهر رامسر که انتهای حوزه

۱- Saprotrophic

۲- Sabouraud Dextrose Agar Yeast extract





شکل ۳-۳: نمایی از قارچ *Beauveria* روی لارو پروانه موم خوار زنبور عسل و محیط کشت. (الف) رهاسازی لارو پروانه موم خوار بر روی محیط خاک جهت آلوده شدن به قارچ *Beauveria*. (ب) رشد قارچ *Beauveria* پس از انتقال از لارو آلوده بر روی محیط کشت انتخابی.

استحفاظی استان مازندران بود انتخاب شد. در جنوب کشور باغات مرکبات شرایط شمال کشور را نداشته و براساس هر منطقه توزیع شده‌اند. به طور کلی در هر منطقه ۵ باغ انتخاب شد و در هر باغ سه نمونه خاک از مرکز و یک نمونه خاک از حاشیه‌ی باغ گرفته شد. نمونه خاک‌ها داخل کیسه‌های پلاستیکی ریخته شدند و درب آنها جهت حفظ رطوبت بسته شد. به این ترتیب ۳۲۰ نمونه خاک از باغات مرکبات شمال و جنوب، ۲۰ نمونه خاک از شاهرود (جنگل ابر) و ۴ نمونه خاک از منطقه‌ی مراغه جمع‌آوری شد. پس از انتقال نمونه خاک‌ها به آزمایشگاه، اقدام به تفکیک آن‌ها براساس نام منطقه شد. برای هر منطقه موقع پلیت کردن نمونه خاک‌ها، میزان ۲۰ گرم خاک داخل پتری‌دیش استریل ریخته شد. بدین شکل که ۲۰ گرم خاک از نمونه خاک حاشیه و ۲۰ گرم خاک که ترکیبی از سه نمونه خاک مرکز بود درون پتری‌دیش استریل جداگانه ریخته شد. به این ترتیب برای هر منطقه با ۵ باغ، ۱۰ پتری‌دیش حاوی ۲۰ گرم خاک فراهم شد. در ادامه درون هر پتری‌دیش ۱۰ عدد لارو پروانه‌ی موم‌خوار زنبور عسل رها شد. با این توصیف برای هر منطقه تعداد ۱۰۰ عدد لارو استفاده شد. برای محاسبه‌ی نرخ جداسازی قارچ *Beauveria* در هر منطقه، تعداد لارو آلوده به قارچ به تعداد کل لارو هر منطقه تقسیم شد. درصد نرخ جداسازی قارچ *Beauveria* در هر منطقه، در پیوست ۲ ذکر شده است.

### ۳-۹. خالص‌سازی قارچ *Beauveria* با استفاده از روش تک اسپورگیری

پس از انتقال قارچ *Beauveria* بر روی محیط کشت انتخابی و رشد آن، خالص‌سازی قارچ امری ضروری به نظر می‌رسد. این ضرورت از این جهت قابل توجیه است که ممکن است لارو توسط گونه‌های مختلف یا جدایه‌های مختلف قارچ آلوده شود، به منظور رسیدن به یک گونه یا یک جدایه، از روش تک اسپورگیری استفاده شد. خالص‌سازی قارچ امری پایه‌ای برای مراحل بعدی چون استخراج DNA می‌باشد. چرا که برای شناسایی صحیح و دقیق نیاز است یک توالی مشخص تکثیر شده از یک

جدایه‌ی منحصر به فرد توالی‌یابی گردد. کلیه‌ی مراحل روش تک اسپورگیری<sup>۱</sup> در شرایط استریل انجام شد. در ابتدا تعداد ۳ عدد لوله آزمایش را که اولی حاوی ۱۰ و بقیه حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل بود آماده شد. با استفاده از خلال دندان استریل میزان کمی از کنیدی قارچ را برداشته و درون لوله‌ی آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل قرار داده شد. پس از ورتکس شدن و اطمینان از یکنواختی کامل سوسپانسیون، ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون را به لوله‌ی دوم انتقال داده و ورتکس شد. به همین ترتیب ۱ میلی‌لیتر از لوله دوم برداشته و به لوله‌ی سوم انتقال داده شد و ورتکس شد. در نهایت ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون لوله سوم (رقت این سوسپانسیون  $10^{-3}$  است) را به پتری‌دیش استریل انتقال داده و میزان ۱۵ میلی‌لیتر آب آگار استریل به آن اضافه شد و به طور ملایم برای مخلوط شدن سوسپانسیون و آب آگار پتری‌دیش تکان داده شد. جهت تندش کنیدی‌ها، پتری-دیش در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. پس از این مرحله با قرار دادن پتری‌دیش در جهت انعکاس نور مناسب تک کنیدی تندش یافته را با ماژیک بر روی پتری‌دیش مشخص کرده و در زیر هود، با خلال دندان استریل اطراف این تک کنیدی را برش داده و بر روی محیط کشت PDA<sup>۲</sup> (حاوی ۴۲ گرم دکستروز، ۱۵ گرم پیتون، ۱۰ گرم عصاره مخمر و ۱۲ گرم آگار با اسیدیته ۶/۳) انتقال داده شد. این مراحل برای تمام جدایه‌های به دست آمده انجام شد.

### ۳-۱۰. تهیه‌ی بانک ژنی اولیه از لاروهای آلوده

در این پژوهش به علت حجم بالای کار، برای جلوگیری از دست رفتن لاروهای آلوده و اطمینان از انتقال مؤثر قارچ بر روی محیط کشت انتخابی، اقدام به تهیه‌ی بانک ژنی اولیه از لاروهای آلوده شد. تهیه‌ی این بانک ژنی بدین شکل بود که هر لارو آلوده (هر لارو آلوده به عنوان یک جدایه در نظر گرفته شد) را درون یک شیشه‌ی پنی‌سیلین استریل قرار داده شد (شکل ۳-۵). در طی مراحل انتقال

۱- Single Spore Isolation Method

۲- Potato- Dextrose- Agar

قارچ بر روی محیط کشت، لاروها از شیشه‌ها خارج می‌شدند و پس از انتقال قارچ از بدن لارو آلوده، مجدداً لاروهای آلوده درون شیشه‌ها قرار داده می‌شدند و مجموعه‌ی شیشه‌ها در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند.

### ۱۱-۳. کشت درون شیشه‌ای قارچ به منظور تهیه‌ی بانک ژنی ثانویه

یکی از مشکلاتی که در حین کار با جدایه‌های مختلف قارچ ممکن است پیش بیاید از دست رفتن یک جدایه است. برای به حداقل رساندن این مشکل اقدام به تهیه‌ی بانک ژن شد که درون لوله‌های آزمایش و فالكون که محتوی محیط کشت PDA بود کشت قارچ انجام شد (شکل ۲-۵). یکی از راه‌های حفظ و نگهداری جدایه‌های به‌دست آمده کشت آنها درون لوله‌ی آزمایش حاوی محیط کشت است. روش کار بدین صورت است که محیط کشت مورد نظر (در اینجا PDA است) باید به خوبی در آب مقطر حل شده باشد. روش کار بدین صورت است که محیط کشت مورد نظر (در اینجا PDA است) باید به خوبی در آب مقطر حل شده باشد. پس از آن میزان ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت را درون لوله‌ی آزمایش ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد اتوکلاو شد. پس از اتوکلاو لوله‌ی آزمایش حاوی محیط کشت در زیر هود به شکل اریب (زاویه‌ی ۳۰ درجه با سطح هود) گذاشته شد. این عمل باعث می‌شود پس از سرد شدن محیط کشت، یک سطح مقطع بیضوی شکل در لوله‌ی آزمایش ایجاد شود. برای کشت قارچ، با استفاده از لوپ استریل یک سطح مقطع از قارچ به همراه محیط کشت برداشته شد و درون لوله‌ی آزمایش مورد نظر انتقال داده شد. برای یک رشد مناسب لوله‌های آزمایش حاوی جدایه‌های مختلف به مدت ۲ هفته در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای نگهداری طولانی مدت، این لوله‌ها در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل ۳-۴: نحوه‌ی تهیه‌ی ژن بانک اولیه از لاروهای آلوده. الف: قرار دادن هر لارو آلوده به قارچ درون شیشه‌های جداگانه. ب: جمع‌آوری و قرار دادن شیشه‌ها درون ظروف یک بار مصرف برای نگهداری در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد.



شکل ۳-۵: نمایی از کشت قارچ *Beauveria* درون فالکون محتوی محیط کشت PDA. جهت اطمینان از عدم آلودگی پس از کشت قارچ درب فالکون‌ها با پارافیلیم پوشیده شده است.

### ۳-۱۲. نحوه نام گذاری جدایه ها

جدایه های بدست آمده بدین شکل نام گذاری گردید که پیشوند SHU از نام انگلیسی دانشگاه شاهرود<sup>۱</sup> گرفته شد. پیشوند M از حرف اول فامیلی نگارنده<sup>۲</sup> اخذ شد و از آنجا که ۱۶۶ جدایه به دست آمد پسوند ۳ رقمی برای هر جدایه انتخاب شد.

### ۳-۱۳. شناسایی مورفولوژیکی قارچ *Beauveria*

مهمترین دلیل استفاده از روش طعمه حشره ای تشخیص صحیح جنس قارچ *Beauveria* بود. این جنس بر روی جلد بیرونی حشره پوشش سفید رنگی از میسیلیوم را ایجاد می کند. البته گاهی تولید سینماتا<sup>۳</sup> (سلول های تولید کننده ی کنیدی به شکل خوشه و یا پیچ خورده و یا منفرد، بی رنگ، کوتاه با پایه ای گرد یا فلاسک مانند در زیر میکروسکوپ) نیز می کند. این سلول ها در انتها به گونه ای گسترده شده اند که با ایجاد شاخه های کوتاه و پیوسته ی زیگزاگی تولید کنیدی می کند. برای تشخیص گونه های قارچ های جداسازی شده، اقدام به تهیه ی اسلاید و رویت اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ نوری شد [۱۱۴]. جنس *Beauveria* دارای ۱۲ گونه می باشد [۵۹] که فراوان ترین گونه ی این قارچ *B. bassiana* می باشد. در شناسایی گونه های جنس *Beauveria* به ترتیب از فاکتورهای شکل، اندازه و رنگ کنیدی استفاده می شود.

برای شناسایی گونه ی قارچ از شکل کنیدی و اندازه ی کنیدی استفاده شد. در گونه ی *B. bassiana* شکل کنیدی کروی و اندازه ی کنیدی ۱/۵-۳/۵ میکرومتر می باشد. در حالی که در گونه های دیگر اندازه ی کنیدی بین ۳ تا ۶ میکرومتر است [۱۱۵] و تفکیک آنها براساس شکل کنیدی صورت می گیرد. در این مطالعه از ۶۷ جدایه اسلاید تهیه شد و با توجه به بضاعت و امکانات موجود، جدایه های

۱- Shahrood University

۲- Masoudi

۳- Synnemata

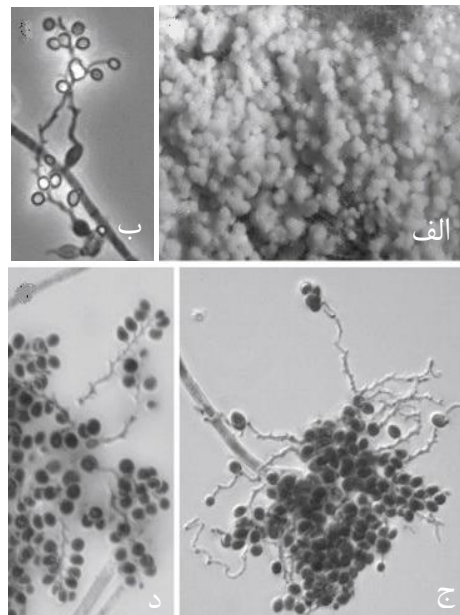
مورد مطالعه *B. bassiana* (Hypocreles: Cordycipitace) بودند.

نحوه‌ی تهیه اسلاید بدین گونه بود که پس از قرار دادن یک قطره‌ی کاتن بلو (برای مشاهده بهتر کنیدی‌ها به جهت کوچک بودن اندازه آنها) بر روی لام، با استفاده از خلال دندان استریل از مرز بین محیط کشت و محل تولید میسیلیوم میزان کمی بافت قارچی برداشته و به آرامی با کاتن بلو مخلوط شد. در ادامه لامل را با زاویه‌ی ۴۵ درجه نسبت به لام با ملایمت قرار داده شد. برای ثابت شدن لامل بر روی لام از برق ناخن استفاده شد. برای دید بهتر ابتدا بزرگنمایی را با کمترین میزان و پس از رفع تاری دید بزرگنمایی افزایش داده شد [۱۱۴]. مشاهده‌ی ساختار میکروسکوپی قارچ با توجه به ویژگی‌های مورفولوژیک جهت تشخیص قارچ از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تشخیص سریع میکروسکوپی نیاز به رنگ‌آمیزی دارد. در آزمایشگاه به طور معمول از لاکتو فنل کاتن بلو برای رنگ-آمیزی استفاده می‌کنند. رنگ کاتن بلو خود ترکیبی از مواد کریستال فنل، گلیسرول و اسید لاکتیک است. در این رنگ‌آمیزی اسید لاکتیک به درون هیف قارچ نفوذ کرده و موجب حفظ ساختمان و پیکره‌ی قارچ می‌گردد. کریستال فنل سبب غیر فعال شدن سلول زنده می‌شود. کاتن بلو با اتصال به دیواره‌ی میسیلیوم و کنیدی سبب رنگ شدن آن می‌شود. گلیسرول سبب نیمه دائمی شدن رنگ شده و از رسوب رنگ جلوگیری می‌کند. از میان جدایه‌های بدست آمده، ۳۵ جدایه برای آزمایشات مورفولوژیک انتخاب شد. و در قالب طرح کاملاً تصادفی پارامترهایی چون نرخ رشد، تعداد اسپور تولیدی<sup>۲</sup> و بیماری‌زایی<sup>۳</sup> آنها مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱- Radial Growth Rate

۲- Spore Count or Sporulation

۳- Pathogenicity or Virulence



شکل ۳-۶: تصویر میکروسکوپی قارچ *Beauveria*: الف: کنیدی‌ها به شکل توپ-های فشرده کنار یکدیگر دیده می‌شوند. ب-د: سلول‌های تولید کننده کنیدی با پایه‌ی متورم و محور دندان‌های، که کنیدی-ها روی هر دندان شکل گرفته‌اند.



### ۳-۱۴. اندازه گیری شعاعی نرخ رشد

در گام نخست، با استفاده از روش ترقیق مکرر اقدام به تهیه‌ی سوسپانسیون اسپور ( $10^{-4} \times 1$  کنیدی/ میلی لیتر) شد. ۱ میلی لیتر از این سوسپانسیون در پتری دیش استریل با ۱۵ میلی لیتر آب- آگار استریل پوشانده شد. پلیت مربوطه به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی گراد قرار داده شد. سپس در مقابل نور سه عدد کنیدی جوانه زده (طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار) را با مایک مشخص شدند و با استفاده از پیپت پاستور استریل با قطر مشخص (۵ میلی متر) هر کدام از کنیدی‌ها از محیط آب آگار جدا شد و به مرکز پلیت حاوی محیط کشت PDA انتقال داده شدند. این عمل برای ۶۶ جدایه تکرار شد و تعداد ۱۹۸ عدد پلیت در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه قرار داده شدند و پس از ۷۲ ساعت، اندازه‌گیری نرخ رشد به مدت ۱۶ روز آغاز (هر ۲۴ ساعت) شد. با توجه به قطر پیپت پاستور (۵ میلی متر) که برای انتقال قطعه‌ی آب آگار استفاده شد، رشد شعاعی روزانه از این قطر کسر شد. قابل توجه است برای افزایش دقت در اندازه‌گیری از دو شاخص که به شکل متعامد پشت هر تکرار کشیده شده بود استفاده شد [۴۶]. داده‌های خام اندازه‌گیری شده در طی ۱۶ روز با استفاده از رابطه- ی ۳-۱ تصحیح شدند [۱۱۶].

$$\text{نرخ رشد (میلی متر/ روز)} = \frac{\text{نرخ رشد اولیه} - \text{نرخ رشد نهایی}}{\text{زمان اولیه} - \text{زمان نهایی}}$$

رابطه‌ی بالا در نرم افزار Microsoft Excel 2013 اجرا و داده‌ها ثبت شدند. مقایسه‌ی میانگین نرخ رشد جدایه‌های مختلف براساس آزمون LSD در قالب طرح کاملاً تصادفی در سطح ۵ درصد با نرم- افزار SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Ver 9.1) گروه‌بندی شدند.

### ۳-۱۵. شمارش تعداد کنیدی تولیدی

با اندکی تغییرات در روش شمارش اسپور پتلامول و همکاران (۲۰۱۲) از مرکز کلونی تکرارای هر جدایه، با استفاده از پیپت پاستور سطح مشخصی از محیط کشت همراه با کنیدی قارچ برداشته شد و

به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی آب و توئین ۸۰ (۰/۰۲ درصد) با حجم ۱ میلی‌لیتر انتقال داده شد. سپس میکروتیوب حاوی آب، توئین و قطعه‌ی انتقالی به مدت ۵ دقیقه ورتکس شد که زمان کافی برای جدا شدن کنیدی‌ها از محیط کشت فراهم شود. در ادامه میزان ۲ میکرولیتر از این سوسپانسیون را بر روی لام هموسیتومتر انتقال داده شد و اقدام به شمارش کنیدی شد [۹۷]. مقایسه‌ی میانگین تعداد اسپور تولیدی جدایه‌های مختلف براساس آزمون LSD در قالب طرح کاملاً تصادفی در سطح ۵ درصد با نرم‌افزار SAS 9.1 گروه‌بندی شدند.

### ۳-۱۶. انجام آزمایش زیست‌پذیری (زنده مانی) کنیدی<sup>۱</sup>

پس از پایان یافتن سنجش فاکتورهای نرخ رشد و شمارش اسپور، از تکرارهای موجود به دلیل فعال بودن جدایه‌ها برای آزمون زیست‌سنجی استفاده شد. قبل از انجام آزمون زیست‌سنجی، اقدام به تهیه‌ی سوسپانسیون با غلظت  $1 \times 10^6$  کنیدی/میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسیتومتر شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون را بر روی لام حاوی محیط کشت PDA انتقال داده شد و لام را در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت یک لامل<sup>۲</sup> استریل را بر روی لام قرار داده شد و در محیط این لامل تعداد ۱۰۰ کنیدی‌ای که دارای لوله‌ی جوانه‌زنی با هر طولی که بودند و کنیدی‌هایی که فاقد لوله‌ی جوانه‌زنی بودند شمارش شدند و برای هر جدایه درصد جوانه‌زنی مشخص شد [۹۷]. برای صحت شمارش، این عمل سه بار تکرار شد. درصد جوانه‌زنی جدایه‌ها ۹۲ تا ۱۰۰ درصد بود. درصد جوانه‌زنی با استفاده از رابطه‌ی ۳-۲ محاسبه شد.

$$\text{درصد جوانه‌زنی} = \left( \frac{a}{a+b} \right) \times 100$$

a = تعداد اسپور جوانه زده

b = تعداد اسپور جوانه نزن

۱- Viability of Conidium

۲- Cover Slip

### ۳-۱۷. انجام آزمون زیست‌سنجی

برای مقایسه‌ی جدایه‌های مختلف از نظر بیماری‌زایی از محلول ۰/۲ درصد تویین ۸۰ به عنوان ماده حامل استفاده شد. برای این منظور کنیدی‌های جدایه‌های مورد آزمایش درون محلول ۰/۲ درصد تویین ۸۰ استریل در درون میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری به حالت معلق در آمدند و با استفاده از ورتکس محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه تکان داده شد. جهت شمارش کنیدی و تهیه‌ی تراکم  $1 \times 10^8$  کنیدی/میلی‌لیتر از لام هموسیتمتر استفاده شد. پس از انجام آزمایشات مقدماتی و تعیین غلظت مشخص آزمون زیست‌سنجی انجام گردید. آزمایش زیست‌سنجی به روش غوطه‌وری در ۳ تکرار به همراه تیمار شاهد (محلول ۰/۲ درصد تویین ۸۰) انجام گرفت. در هر تکرار به طور متوسط از تعداد ۴ عدد حشره کامل شپشه‌ی برنج استفاده گردید. بعد از جداسازی شپشه‌های برنج، شپشه‌ها در ۱ میلی-لیتر سوسپانسیون اسپور به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شدند. در ادامه شپشه‌های در معرض سوسپانسیون را به مدت ۲۴ ساعت به درون پتری‌دیش با کاغذ صافی مرطوب استریل انتقال داده شدند. بعد از مراحل گفته شده درون پتری‌دیش‌های استریل به میزان کافی برنج استریل قرار داده شد و حشرات مربوط به هر جدایه و تکرار به درون آنها انتقال داده شد و به منظور جلوگیری از فرار شپشه‌ها اطراف پتری‌دیش‌ها را با پارافیلیم مهر و موم شد. پتری‌دیش‌ها به درون اطاقک رشد با شرایط دمایی  $1 \pm 24$ ، رطوبت نسبی  $10 \pm 60$  درصد و دوره‌ی نوری (۸ : ۱۶، تاریکی : روشنایی) به مدت ۱۲ روز نگهداری شدند. مرگ و میر شپشه‌ها روزانه ثبت شد. میزان مرگ و میر برای هر جدایه در هر تکرار در صورت مرگ و میر در شاهد با فرمول ابوت تصحیح شد [۱۱۷]. مقایسه‌ی میانگین درصد مرگ و میر جدایه‌های مختلف براساس آزمون LSD در قالب طرح کاملاً تصادفی در سطح ۵ درصد با نرم‌افزار SAS 9.1 گروه‌بندی شدند.

### ۱۸-۳. کشت قارچ *Beauveria* بر روی محیط کشت مایع به منظور استخراج DNA

از ۶۷ جدایه‌ای که وارد آزمایشات مورفولوژیک شدند، تعداد ۳۵ جدایه براساس فراوانی در هر منطقه، آزمایش اولیه نرخ رشد، شکل و رنگ کلونی بر روی محیط کشت انتخاب شدند. این تعداد جدایه وارد استخراج DNA و تکثیر منطقه‌ی ITS با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شدند. به منظور استخراج DNA جدایه‌های مختلف بر روی محیط کشت مایع رشد کردند. بدین شکل که پس از تهیه‌ی محیط کشت در هر فلاسک ارلن‌مایر میزان ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت YPD<sup>۱</sup> (حاوی گلوکز ۲٪، پپتون ۱٪ و عصاره مخمر ۱٪) ریخته شد و اتوکلاو گردید. پس از استریل و خنک شدن، میزان کمی کنیدی از جدایه‌ی مورد نظر با خلال دندان استریل برداشته شد و درون فلاسک ارلن‌مایر حاوی محیط کشت ریخته شد و به مدت ۳ تا ۴ روز این فلاسک در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد.

### ۱۹-۳. آماده‌سازی نمونه جهت استخراج DNA

برای مطالعه‌ی تمایز گونه‌ها و شناسایی آنها، می‌توان از پرایمرهای اختصاصی یا پرایمرهایی که برای مناطق خاصی از ژنوم (تلومر یا فواصل ریبوزومی) است استفاده کرد. در مورد قارچ‌ها رشته‌ی اسید نوکلئیک الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از کشت خالص قارچ به دست می‌آید. برای دستیابی به یک تک کلون قارچی از تکنیک تک اسپور کردن<sup>۲</sup> می‌توان بهره جست [۱۱۸]. اما در مطالعات ژنومی، می‌توان به تکثیر موجود هدف با اختصاصیت بالای پرایمرها پرداخت و دریافت که آیا جاندار مورد نظر مثلاً قارچ *Beauveria* در میان موجودات برگرفته از یک زیست بوم وجود دارد یا خیر. توجه شود که نکته‌ی حائز اهمیت آلودگی نمونه با مواد طبیعی بازدارنده‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مانند اسید هیومیک و پلی‌ساکاریدها است که سبب ممانعت از انجام واکنش می‌شوند. برای رفع این مشکل و

۱- Yeast Extract- Peptone- Glucose Broth

۲- Single Spore Isolation Method

افزایش کارایی واکنش پرایمر با DNA الگو از موادی مانند آلبومین سرم گاوی<sup>۱</sup>، دی متیل سولفوکساید<sup>۲</sup> و پروتئین ۳۲ ژن T4<sup>۳</sup> استفاده می شود. در مطالعات ملکولی در قارچ های بیماری زای حشرات، DNA استخراجی باید از کیفیت مناسبی برخوردار باشد و بسته به در دسترس بودن مواد قارچی، ماهیت مطالعه و مورد استخراج، DNA ممکن است از اسپور، میسیلیوم، اجسام هیفی شکل یا مخلوطی از موارد گفته شده به دست آید. شکل ۲-۹ مراحل کلی انگشت نگاری DNA بر پایه ی واکنش زنجیره ی پلیمرز را برای قارچ بیمارگر *Beauveria* نشان می دهد.

### ۲-۳. استخراج DNA ژنومی

پس از حصول اطمینان از رشد کافی میسیلیوم قارچ بر روی محیط کشت مایع، میسیلیوم را از فلاسک ارلن مایر خارج کرده و به پتری دیشی که حاوی یک لایه دستمال کاغذی و یک لایه کاغذ صافی استریل بود انتقال داده شد تا محیط کشت مایع اضافی از میسیلیوم جذب شود. پس از گذشت ۳۰ دقیقه میزان کافی از میسیلیوم (تقریباً ۰/۱ گرم) را درون میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شد و در تماس غیر مستقیم با ازت مایع با استفاده از کاندنسر<sup>۴</sup> (شکل ۳-۷) به خوبی کوبیده شد. ادامه میزان ۸۰۰ میکرولیتر محلول بافر CTAB<sup>۵</sup> ۲ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر SDS<sup>۶</sup> ۱ درصد به میسیلیوم کوبیده شده اضافه شد. برای تهیه ی بافر CTAB ۲ در صد از PVP 40 ۱ درصد، Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۲۰ میلی مولار و NaCl ۱/۴ مولار استفاده شد. سپس، میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه ورتکس افقی شد. پس از حذف ترکیباتی مانند کربوهیدرات ها و پروتئین ها با کمک سانتریفیوژ (۱۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه) به منظور رسوب DNA از ایزوپروپانول سرد استفاده شد و به مدت

۱- Bovine Serum Albumin (BSA)

۲- Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

۳- T4 Gene 32 Protein

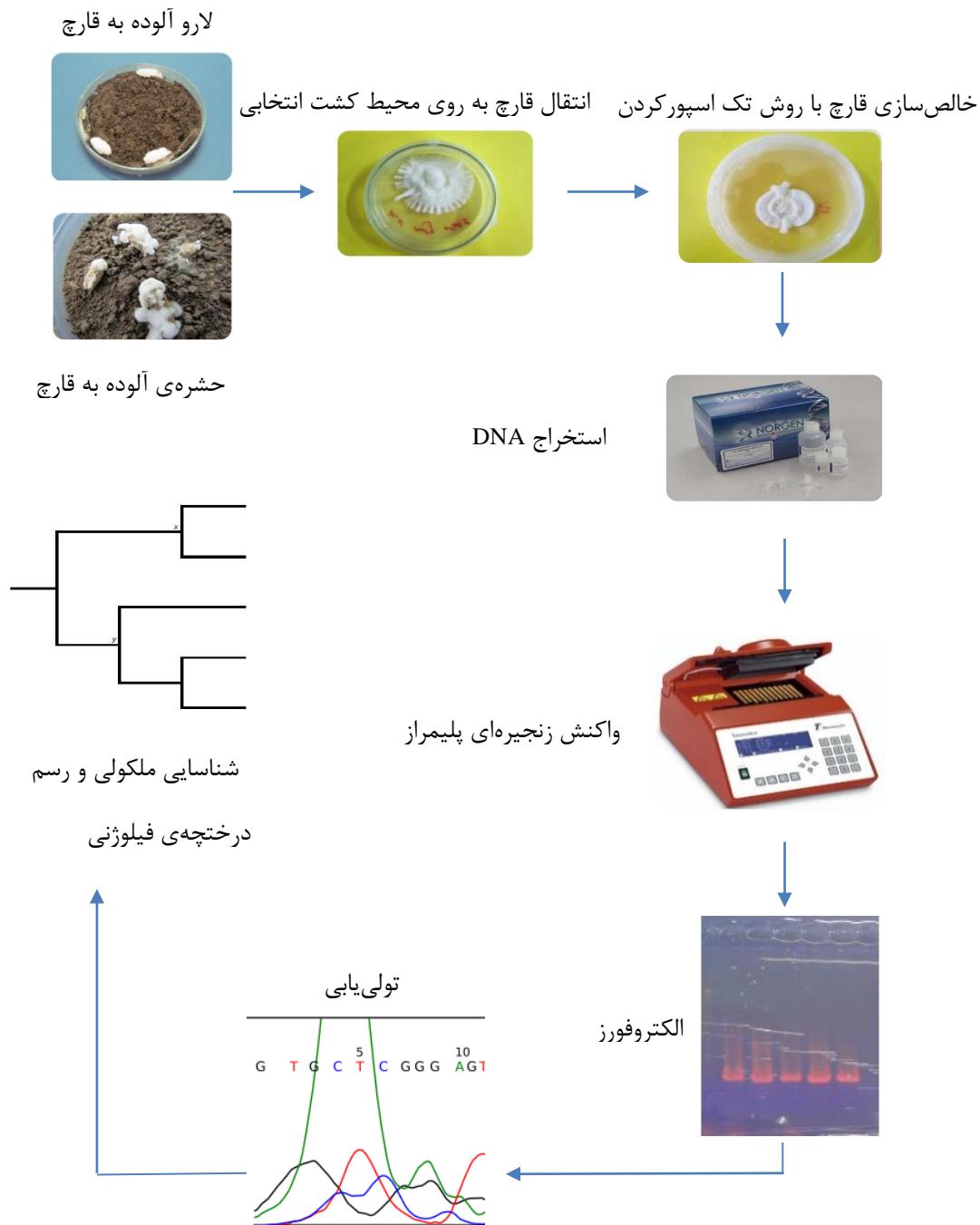
۴- Condenser (Dental care)

۵- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

۶- Sodium Dodecyl Sulfate



شکل ۳-۷: نمایی از کاندنسور- ابزاری که از آن برای کوبیدن میسلیوم در طی فرآیند استخراج DNA استفاده شد.



شکل ۳-۸: مراحل کلی انگشتنگاری DNA بر پایه ی واکنش زنجیره ی پلیمرز برای قارچ بیماری زای *Beauveria*. در این شکل با استفاده از روش طعمه حشره ای قارچ بیمارگر حشرات از خاک جداسازی شد و با استفاده از روش تک اسپور کردن ایزوله مورد نظر خالص گردید. در ادامه پس از جداسازی DNA ژنومی با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 منطقه ی ITS در ژنوم تکثیر شد. در نهایت داده های حاصل از تولی یابی با استفاده از علم بیوانفورماتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

۱۶ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ (rpm ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه)، رسوب سفید رنگی ته تیوب دیده شد. سپس با دو بار شستشو به ترتیب با الکل ۷۰ و ۹۶ درصد و سانتریفیوژ rpm ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه ناخالصی‌های احتمالی حذف شدند. پس از برعکس کردن تیوب به مدت ۲۰ دقیقه رسوب سفید رنگ خشک شد. بعد از خشک شدن رسوب DNA، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل دوبار تقطیر به آن اضافه شد. سپس نمونه DNA استخراجی در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور بررسی ملکولی نگهداری شد. کیفیت DNA استخراجی بر روی ژل آگارز ۱ درصد و بافر TBE با غلظت 0.5x (این بافر به صورت استوک با غلظت 10x تهیه شد که مواد مصرفی شامل ۵/ مولار EDTA، ۸۹۰ میلی‌مولار تریس و ۸۹۰ میلی‌مولار بوریک اسید می‌باشد) بررسی شد.

## ۲-۲۱. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

در این آزمایش به منظور تکثیر ناحیه‌ی ITS، پس از استخراج DNA واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در جدول ۲-۱ آورده شده است. برای بهینه کردن واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر الگوی حرارتی با ۳۵ تکرار، مطلوب-ترین شرایط برای تکثیر ناحیه‌ی ITS بود. پروتکل PCR به شرح ۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۱۰ دقیقه بود. کیفیت ناحیه‌ی تکثیری ITS جنس *Beauveria* حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۲ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۵/ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر برای هر آغازگر (۵ پیکومول)، ۵/ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase، الگو ۱ میکرولیتر، MgCl<sub>2</sub> (۵۰ میلی‌مولار) به میزان ۶/ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر BSA (۱/ میکروگرم/میکرولیتر) و ۱۲/۲ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر بود.



جدول ۳-۱: پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمرز [۱۱۹].

اندازه امپلیکون	دمای ذوب	توالی	پرایمر
(bp)	(C°)		
۵۴۰	۵۸	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'	<b>ITS1</b>
۵۴۰	۵۱/۷	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'	<b>ITS4</b>

### ۳-۲۲. خالص‌سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

پس از حصول اطمینان از تکثیر منطقه‌ی ITS، قطعه تکثیری با استفاده از کیت خالص‌سازی شرکت نورژن (Norgen Biotek, Ontario, Canada) طبق دستورالعمل از روی ژل خالص شد و جهت انجام توالی‌یابی به شرکت Bioscience (Source BioScience LifeSciences Sequencing Service) ارسال شد.

### ۳-۲۳. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از منطقه‌ی ITS1-5.8S-ITS2

پس از تعیین ترادف محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، در مرحله‌ی اول کیفیت توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas (<http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas/chromas.htm>) بررسی شد. برای هر ۳۵ جدایه منطقه‌ی تکثیری به وسیله‌ی آغازگر پیشرو و آغازگر معکوس خوانش شدند و متوسط طول ناحیه‌ی تکثیری توسط آغازگر پیشرو و آغازگر معکوس برای هر ۳۵ جدایه ۵۴۰ نوکلئوتید بود. در ادامه با استفاده از نرم‌افزار CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA.) منطقه‌ی هم‌پوشان برای خوانش هر جفت پرایمر بدست آمد. در جهت شناسایی گونه‌های هر ۳۵ جدایه، توالی‌های هم‌پوشان هر جدایه با توالی‌های موجود در بانک ژنی مقایسه شدند. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (BLASTn<sup>۱</sup>) [۱۲۰]. در نهایت درختچه‌ی فیلوژنی جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5.2 (Kumar Lab, Arizona, USA) رسم شد [۱۲۱]. هم‌چنین جهت ارزیابی تنوع میان مناطق ITS گونه‌های متفاوت *Beauveria*، همولوژی میان مناطق ITS ۱۲ گونه‌ی *Beauveria* با استفاده از نرم‌افزار آنلاین (<http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) Align Query انجام شد (پیوست ۴).

۱- Basic Local Alignment Search Tool

### ۳-۵. نتایج شناسایی جدایه های مورد مطالعه ملکولی

پس از آنکه برای هر جدایه منطقه‌ی هم‌پوشان<sup>۱</sup> خوانش هر جفت پرایمر با نرم‌افزار CodonCode Aligner بدست آمد، منطقه‌ی هم‌پوشان مربوطه به نرم‌افزار BLASTn<sup>۲</sup> در پایگاه ژنی<sup>۳</sup> معرفی شد. نتایجی مورد توجه قرار گرفت که امتیاز هم‌ردیفی آنها با منطقه‌ی هم‌پوشان مربوط به هر جدایه بیش از ۹۹ درصد باشد. برای هر جدایه شبیه‌ترین جدایه با شماره دسترسی<sup>۴</sup> مربوط به آن در جدول ۴-۶ آورده شده است.

---

۱- Contig

۲- Basic Local Alignment Search Tool

۳- National Center for Biotechnology Information (NCBI)

۴- Accession number (AC)

فصل چہارم

نتیجہ

در این فصل به ارائه‌ی نتایج حاصل از این تحقیق پرداخته شده است. ارائه‌ی نتایج در این فصل شامل دو بخش است. در بخش اول، نتایج آنالیز فیلوژنی براساس منطقه‌ی ITS برای جدایه‌های قارچ *Beauveria* ارائه گردیده است. روابط فیلوژنی میان ژن‌ها را می‌توان با درخت فیلوژنی شرح داد. درخت فیلوژنی روابط میان توالی‌های هم‌ردیف شده را نشان می‌دهد. برای رسم درختچه‌ی فیلوژنی از توالی‌های نوکلئوتیدی یا اسید آمینه‌ای استفاده می‌شود. در این رساله مبنای ترسیم درختچه‌ی فیلوژنی استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی براساس منطقه‌ی ITS است. در این تحقیق برای ترسیم درختچه‌ی فیلوژنی علاوه بر توالی‌های جدایه‌های مورد استفاده، از توالی‌های ناحیه‌ی ITS موجود در پایگاه اطلاعاتی مربوط به اسید نوکلئیک نیز استفاده شده است.

در بخش دوم، نتایج مربوط به مطالعات مورفولوژیک ارائه شده است. این نتایج در زمینه‌ی تأثیر غلظت  $10^8 \times 1$  کنیدی/میلی‌لیتر جدایه‌های مختلف *Beauveria* بر کشندگی شپش‌های برنج، ارزیابی نرخ رشد جدایه‌های متفاوت *Beauveria* بر روی محیط کشت PDA و ارزیابی شمارش کنیدی جدایه‌های *Beauveria* بر روی محیط کشت می‌باشد.

#### ۴-۱. نحوه‌ی تکثیر و دستیابی به ناحیه‌ی ITS با استفاده از توالی‌یابی

برای جدایه‌های انتخابی، ناحیه‌ی ITS با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 تکثیر شد و پس از خالص‌سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، منطقه‌ی ژنی مورد نظر توالی‌یابی شد. همانطور که در شکل ۴-۱ دیده می‌شود طول ناحیه‌ی تکثیری برای هر ۳۵ جدایه تقریباً یکسان به نظر می‌رسد. هرچند داده‌های حاصل از توالی‌یابی گویای این مسئله نیز بود. بدین شکل طول ناحیه‌ی خوانش شده برای پرایمر پیشرو و معکوس ۵۴۰ نوکلئوتید بود. با اینکه طول تکثیری برای هر ۳۵ جدایه تقریباً یکسان بود اما از میان این ۳۵ جدایه، ۲۹ جدایه پس از انجام شناسایی با استفاده از پایگاه ژنی، گونه-ی *B. bassiana* بودند در حالی که ۶ جدایه‌ی دیگر گونه‌های متفاوتی داشتند. جدایه‌ی SHU.M.102 گونه‌ی *B. brongniartii* بود. جدایه‌های SHU.M.077، SHU.M.074 و SHU.M.153 گونه‌ی *B. amorpha* بودند. براساس شناسایی منطقه‌ی ITS جدایه‌ی SHU.M.123

گونه‌ی *B. sungii* شناسایی شد. شناسایی ملکولی ثابت کرد که جدایی‌ی SHU.M.160 گونه‌ی *B. malawiensis* است (جدول ۴-۱). منطقه‌ی ITS شامل دو بخش حفاظت شده<sup>۱</sup> و بخش متغیر<sup>۲</sup> است (شکل ۱-۱). بخش حفاظت شده منطقه‌ی ژنی ۵/۸S است. از مناطق محافظت شده برای آنالیزهای فیلوژنی استفاده می‌شود. برای انجام مقایسه‌ی جدایی‌های ایرانی با دیگر کشورها از شماره دسترسی چند جدایی‌ی ثبت شده در پایگاه ژنی مربوط به مناطق جغرافیایی مختلف نیز استفاده شد. در جدول ۴-۵ به لیست گونه‌های متفاوت *B. bassiana* که تا کنون شناسایی شده‌اند اشاره شده است.

#### ۴-۲. نتایج رسم درختچه‌ی فیلوژنی برای جدایی‌های *Beauveria*

درختچه‌ی فیلوژنی برای جدایی‌های مختلف *Beauveria* ایرانی و دیگر گونه‌های جنس *Beauveria* با نرم‌افزار مگا، روش اتصال مجاور<sup>۳</sup> و آنالیز bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد (شکل ۴-۳). همان‌طور که در شکل ۴-۳ دیده می‌شود جدایی‌های مورد استفاده در این مطالعه همراه با دیگر جدایی‌های گونه‌های جنس *Beauveria* در ۴ شاخه‌ی مجزا قرار گرفتند. ملاک ایجاد شاخه، گره‌های اجدادی (داخلی) موجود در درختچه هستند. گره‌های داخلی نیز به نام واحدهای تاکسونومیکی فرضی<sup>۴</sup> شناخته می‌شوند و تأکیدی بر این است که آنها جد فرضی گره‌های خارجی هستند. گره‌های خارجی (انتهاپی) که واحدهای تاکسونومیکی فعال<sup>۵</sup> نامیده می‌شوند، یک واژه‌ی ژنتیکی است که در این رساله اشاره به هر جدایی‌ی قارچی دارد. گره‌های داخلی شامل A (A1, A2) و B (B1, B2) است. با توجه به در نظر گرفتن گره‌ها، جدایی‌های مختلف *Beauveria* در ۳ شاخه قرار گرفتند. با توجه به اینکه در گره ۳ تنها جدایی‌های ایرانی قرار گرفته است، این گره، یک شاخه در نظر گرفته شد. طبق مطالعات آقای رنر، جنس *Beauveria* دارای ۱۲ گونه است. براساس درختچه‌ی ترسیم شده ۱۱ گونه‌ی

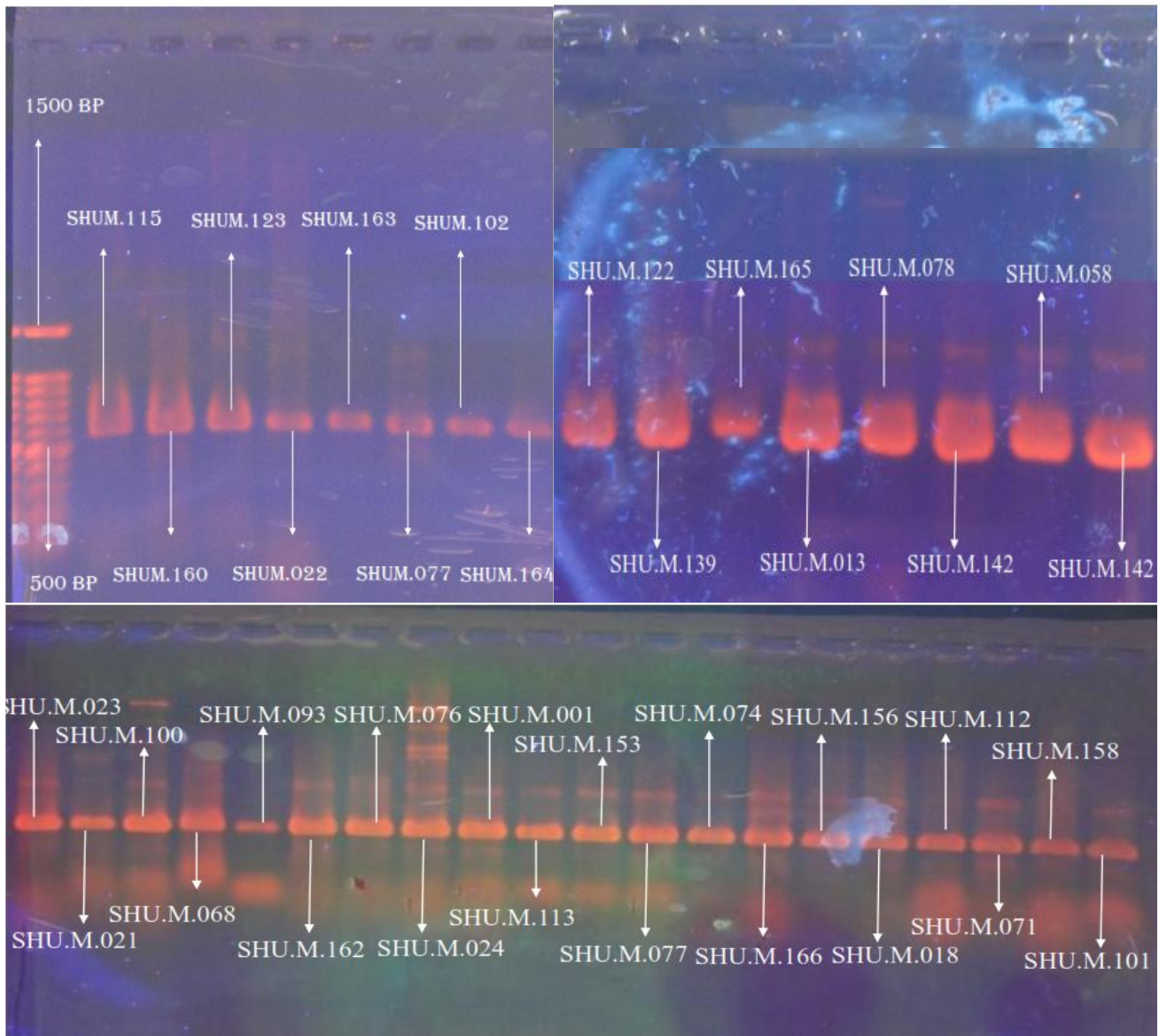
۱- Highly Conserved Region

۲- Highly Variable Region

۳- Neighbor Joining (NJ)

۴- Hypothetical Taxonomic Unit (HTU)

۵- Operating Taxonomic Unit (OTU)



شکل ۴-۱: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای منطقه‌ی ITS بر روی ژل الکتروفورز. همانطور که دیده می‌شود ۳۵ جدایی‌ی مورد مطالعه از نظر منطقه‌ی تکثیری ITS در طولی بین ۵۰۰ تا ۶۰۰ جفت باز قرار گرفته‌اند. در چاهک شماره ۱ خط‌کش ژنی که اندازه‌ای بین ۱۵۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز قرار دارد.

جدول ۴-۱: شناسایی جدایه های *Beauveria* بر اساس پایگاه ژنی (NCBI)

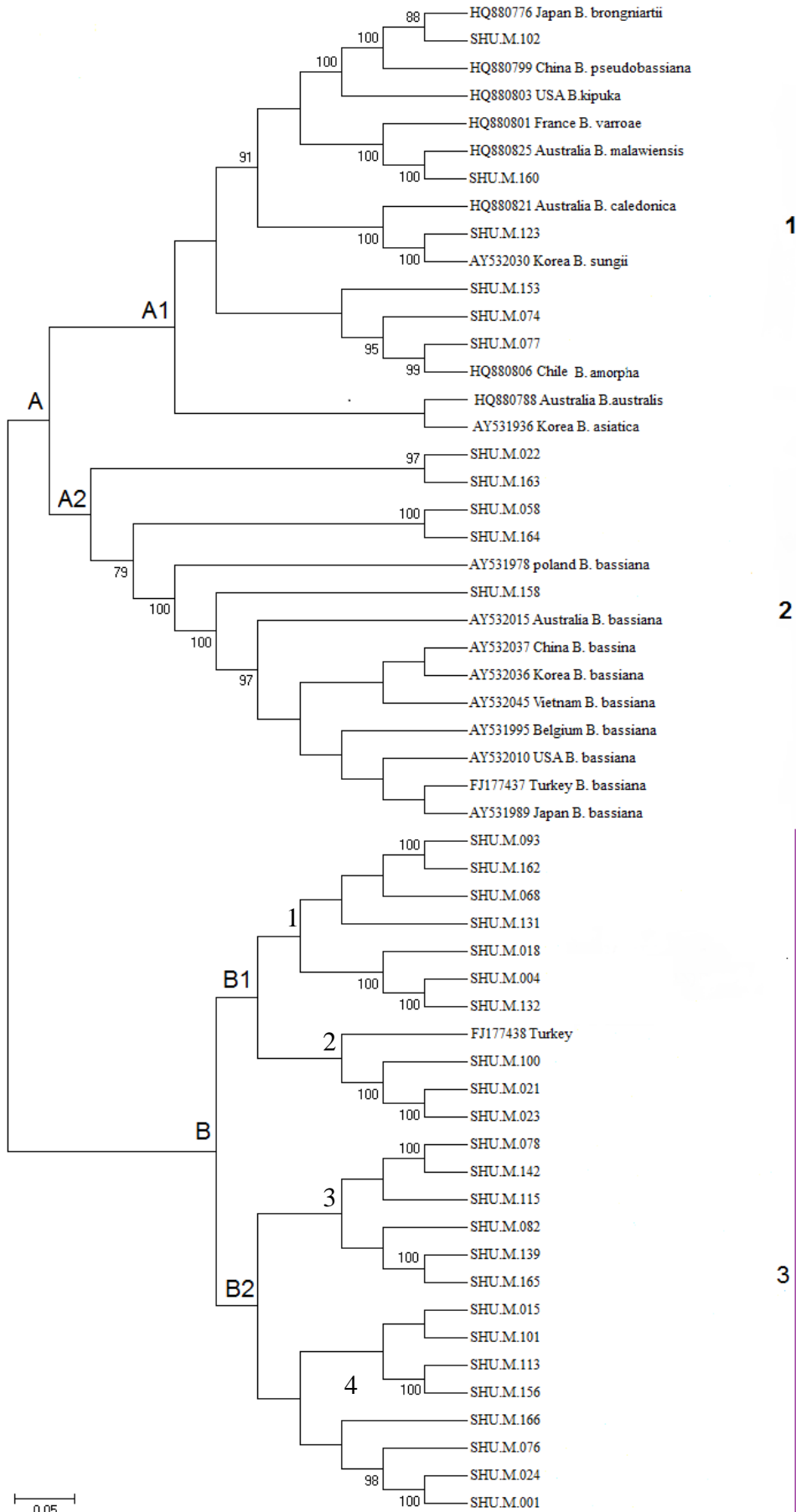
میزان همولوژی	شماره دسترسی	نام جدایه
۹۹	JX624254, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.022
۹۹	AY532030, <i>B. sungii</i>	SHU.M.123
۹۹	JX110389, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.115
۹۹	HQ880804, <i>B. amorpha</i>	SHU.M.077
۹۹	AY334553, <i>B. malawiensis</i>	SHU.M.160
۹۹	AY334543, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.163
۹۹	AY334544, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.164
۹۹	AY334545, <i>B. brongniartii</i>	SHU.M.102
۹۹	JN593242, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.113
۹۹	JQ999972, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.076
۹۹	KC121560, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.078
۹۹	JQ999971, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.142
۹۹	KC753383, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.021
۹۹	KC753383, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.023
۹۹	JX406519, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.024
۹۹	KC753383, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.018
۹۹	JX284408, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.071
۹۹	KF308683, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.058
۹۹	JX110389, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.082
۹۹	EU315003, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.100
۹۹	K2478657, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.101
۹۹	KC551959, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.093
۹۹	JX284408, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.122
۹۹	JX284408, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.112
۹۹	HQ880804, <i>B. amorpha</i>	SHU.M.074
۹۹	EF672307, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.068
۹۹	KC759730, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.139
۹۹	EU673371, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.013
۹۹	HQ880804, <i>B. amorpha</i>	SHU.M.153
۹۹	HQ259059, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.156
۹۹	JF837133, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.001
۹۹	JF837130, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.162
۹۹	KC461115, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.158
۹۹	KC759728, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.165
۹۹	JX178686, <i>B. bassiana</i>	SHU.M.166



جدول ۴-۲: لیست گونه‌های مختلف *Beauveria* spp. مورد استفاده از پایگاه ژنی برای ترسیم درختچه‌ی

فیلوژنی

منبع	AC	کشور	نام علمی
[۵۹]	AY532012	شیلی	<i>B. vermiconia</i>
[۵۹]	AY531936	کره	<i>B. asiatica</i>
[۱۰]	AY531978	لهستان	<i>B. bassiana</i>
[۱۰]	AY532036	کره	<i>B. bassiana</i>
[۱۰]	AY532045	ویتنام	<i>B. bassiana</i>
[۵۹]	AY532015	استرالیا	<i>B. bassiana</i>
[۵۹]	HQ880803	آمریکا	<i>B. kipuka</i>
[۵۹]	HQ880806	شیلی	<i>B. amorpha</i>
[۵۹]	HQ880776	ژاپن	<i>B. brongniartii</i>
[۱۰]	AY531989	ژاپن	<i>B. bassiana</i>
[۱۲۲]	FJ177437	ترکیه	<i>B. bassiana</i>
[۱۰]	AY532037	چین	<i>B. bassiana</i>
[۵۹]	HQ880799	چین	<i>B. pseudobassiana</i>
[۵۹]	AY532030	کره	<i>B. sungii</i>
[۵۹]	HQ880821	استرالیا	<i>B. caledonica</i>
[۵۹]	HQ880825	استرالیا	<i>B. malawiensis</i>
[۱۰]	AY532010	امریکا	<i>B. bassiana</i>
[۱۰]	AY531995	بلژیک	<i>B. bassiana</i>
[۵۹]	HQ880788	استرالیا	<i>B. australis</i>
[۵۹]	HQ880801	فرانسه	<i>B. varroae</i>



شکل ۴-۲: ایجاد درختچه‌ی فیلوژنی برای جدایه‌های مختلف *Beauveria* و مقایسه‌ی جدایه‌های بومی با دیگر مناطق دنیا. درختچه‌ی فیلوژنی با نرم‌افزار مگا، روش اتصال مجاور و آنالیز bootstrap با تکرار ۱۰۰۰ رسم شد. پرکاربردترین روش ارزیابی صحت درختچه‌ی فیلوژنی روش آنالیز bootstrap است. در واقع bootstrap راهی مفید برای برآورد اساس توزیع با نمونه‌گیری مجدد از مجموعه داده‌های اولیه است. همانطور که در تصویر دیده می‌شود ۱۱ گونه‌ی *Beauveria* در شاخه‌ی شماره ۱ قرار گرفته است. در گزارش آقای رنر نیز این ۱۱ گونه در یک شاخه قرار داشتند که گویای قرابت فیلوژنتیکی این گونه‌هاست [۵۹]. گونه‌ی *B. bassiana* همراه با ۵ جدایه‌ی ایرانی *B. bassiana* در شاخه‌ی ۲ قرار گرفته است. در شاخه‌ی ۳ تنها جدایه‌های ایرانی (۲۴ جدایه) قرار گرفته‌اند که به وضوح حاکی از شکل‌گیری شاخه‌ای است که حاوی گونه‌ی جدیدی است که در این رساله آن را *B. Iranica* نام نهادیم.

*Beauveria* به جز گونه‌ی *B. bassiana* در شاخه‌ی شماره ۱ قرار گرفتند. جدایه‌های SHU.M.102، SHU.M.160، SHU.M.123، SHU.M.153، SHU.M.074 و SHU.M.077 براساس نوع گونه‌ی خود و براساس منطقه‌ی ITS شناسایی شده‌اند نیز در این شاخه قرار گرفتند. جدایه‌های SHU.M.022، SHU.M.163، SHU.M.058، SHU.M.164 و SHU.M.158 که همگی براساس منطقه‌ی ITS گونه‌ی *B. bassiana* بودند در شاخه‌ی ۲ با دیگر گونه‌های *B. bassiana* از دیگر کشورها قرار گرفتند. به نظر می‌رسد که گونه‌ی *B. bassiana* مونوفلتیک است. هرچند که ارزیابی BLAST، نشان می‌دهد که ۲۹ جدایه‌ی ایرانی با جدایه‌های متفاوت *B. bassiana* در پایگاه ژنی شباهت دارد (جدول ۴-۱) اما براساس درختچه‌ی فیلوژنی ترسیم شده و درصد شباهت<sup>۱</sup> تنها ۵ جدایه‌ی SHU.M.022، SHU.M.163، SHU.M.058، SHU.M.164 و SHU.M.158 گونه‌ی *B. bassiana* هستند. درصد شباهت منطقه‌ی ITS جدایه‌های SHU.M.022، SHU.M.163، SHU.M.058، SHU.M.164 و SHU.M.158 با گونه‌ی *B. bassiana* شناسایی شده توسط رنر و همکاران (۲۰۱۱) بر حسب درصد عبارتند از ۹۳/۹، ۹۳/۵، ۹۸/۷، ۹۳/۵ و ۹۸/۲ بود. این امر صحت قرارگیری ۵ جدایه‌ی ایرانی را در شاخه ۲ در کنار سایر جدایه‌های گونه‌ی *B. bassiana* را تأیید می‌کند.

درصد شباهت جدایه‌های ایرانی که در خوشه‌ی ۳ قرار گرفته‌اند با *B. bassiana* به طور متوسط ۴۵/۳ درصد بود. قابل توجه است که گونه‌ی *B. asiatica* کمترین شباهت را با دیگر گونه‌های *Beauveria* دارد (پیوست ۴). همچنین جدایه‌هایی که در شاخه ۳ قرار گرفته‌اند به طور متوسط ۴۶/۱ درصد شباهت با *B. asiatica* دارند. با توجه به مطالب گفته شده به نظر می‌رسد که جدایه‌هایی که در شاخه‌ی ۳ قرار گرفته‌اند یک گونه‌ی جدید هستند که برای اولین بار آن را گزارش می‌کنیم. نگارنده با مشورت اساتید راهنما این گونه‌ی جدید را *B. iranica* نام نهاد. براساس درختچه‌ی فیلوژنی این

۱- Identity

گونه‌ی جدید احتمالاً دارای ۲ تا ۴ زیر گونه است و این گونه شباهتی با جدایه‌ای از ترکیه دارد که به اشتباه توسط دمیرباگ و همکاران [۱۲۲] گونه‌ی *B. bassiana* گزارش شده است.

#### ۳-۴. تأثیر غلظت $10^8 \times 1$ کنیدی / میلی لیتر قارچ *Beauveria spp.* بر کشندگی شپشه‌ی برنج

طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۴-۳) و (جدول ۴-۴) اثر غلظت  $10^8 \times 1$  کنیدی / میلی لیتر قارچ *B. bassiana* و *B. iranica* بر کشندگی شپشه‌ی برنج در سطح ۱ درصد معنی دار شد. از آنجا که داده‌های بیماری‌زایی برحسب درصد بود با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب داده‌ها نرمال شدند و سپس در نرم‌افزار SAS 9.1 در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد استفاده قرار گرفتند. نمودار تست نرمال بودن داده‌ها در پیوست ۳ می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که جدایه‌های مختلف دو گونه‌ی *B. bassiana* و *B. iranica* بر روی شپشه برنج بیماری‌زا بودند و سبب مرگ و میر در آفت مذکور شدند اما توان بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف با یکدیگر متفاوت بود. از آنجا که براساس منطقه‌ی ITS یک گونه *B. brongniartii*، یک گونه *B. sungii*، یک گونه *B. malawiensis* و سه گونه *B. amorpha* شناسایی شدند نتایج مطالعات مورفولوژیک آنها در جدول ۴-۶ خلاصه شدند. براساس نتایج مقایسه میانگین برای گونه‌های *B. bassiana* (جدول ۴-۷) چهار جدایه *B. bassiana* تفاوت معنی‌داری از نظر بیماری‌زایی با یکدیگر نداشتند و جدایه‌ی SHU.M.163 (مراغه، آذربایجان شرقی) کمترین بیماری‌زایی (۲۵ درصد) را از خود نشان داد. براساس نتایج مقایسه میانگین، ۲۲ جدایه‌ی *B. iranica* (جدول ۴-۸) از نظر بیماری‌زایی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. کمترین بیماری‌زایی مربوط به جدایه‌های SHU.M.018 (کلوده و حسین‌آباد، مازندران) و SHU.M.142 (وکیل‌آباد، کرمان) با ۲۵ درصد بود. براساس گروه بندی این دو جدایه با دیگر جدایه‌های این گونه از نظر بیماری‌زایی تفاوت معنی‌داری دارند.

جدول ۳-۴ خلاصه تجزیه واریانس برای بیماری زایی، تعداد اسپور و نرخ رشد ۵ جدایه‌ی مختلف *B. bassiana*

منابع تغییر		درجه آزادی		میانگین مربعات		ضریب تغییرات	
نرخ رشد	تعداد کنیدی	بیماری زایی	نرخ رشد	تعداد کنیدی	بیماری زایی	تعداد کنیدی	بیماری زایی
۲/۰۸۸۷**	۱۲۶/۳۷۹۴**	۱۷۲/۲۹۰۲**	۱۰/۶۸۹۸	۲۹/۶۰۳۷	۱۷/۴۷۶۸		جدایه
۰/۲۹۶۵	۴۸/۲۸۸۱	۱۱۸/۳۷۰۷					خطا
							کل
							۱۴

\*\* در سطح ۱٪ معنی‌دار است

جدول ۴-۴: خلاصه تجزیه واریانس برای بیماری زایی، تعداد اسپور و نرخ رشد ۲۴ جدایه‌ی مختلف *B. iranica*

منابع تغییر		درجه آزادی		میانگین مربعات		ضریب تغییرات	
نرخ رشد	تعداد کنیدی	بیماری زایی	نرخ رشد	تعداد کنیدی	بیماری زایی	تعداد کنیدی	بیماری زایی
۲۲/۲۴۸۸**	۲۲۳/۱۹۱۷**	۱۰۴۵/۰۲۰۲**	۱۰/۶۸۹۸	۳/۷۷۹۶	۱۷/۵۶۹۸		جدایه
۰/۷۴۷۰	۰/۵۲۸۸	۱۳۰/۰۵۴۴					خطا
							کل
							۷۱

\*\* در سطح ۱٪ معنی‌دار است

جدول ۴-۵: گزیده‌ای از مطالعات مورفولوژیک گونه‌های شناسایی شده‌ی *Beauveria* spp.

تعداد کنیدی تولیدی (کنیدی/میلی لیتر)	نرخ رشد (میلی متر/روز)	درصد بیماری زایی	گونه
$37.83 \times 10^6$	5.57	88.97	SHU.M.102 ( <i>B. brongniartii</i> )
$21.91 \times 10^6$	9.16	89.96	SHU.M.077 ( <i>B. amorpha</i> )
$30 \times 10^6$	7.45	58.33	SHU.M.074 ( <i>B. amorpha</i> )
$16.91 \times 10^6$	7.45	80.97	SHU.M.153 ( <i>B. amorpha</i> )
$16.91 \times 10^6$	10.7	90.98	SHU.M.123 ( <i>B. sungii</i> )
$16.91 \times 10^6$	8.24	58.33	SHU.M.160 ( <i>B. malawiensis</i> )

جدول ۴-۶: مقایسه میانگین تلفات شپشه برنج توسط جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassina* در غلظت  $1 \times 10^8$  کنیدی/میلی لیتر در روز دوازدهم آزمایش

نام جدایه	سطح بیماری - زایی	مرگ و میر در تکرارها	مرگ و میر در شاهد	میانگین تلفات	سطح میانگین
SHU.M.022	A	11	1	89.967	A
SHU.M.158	A	9	2	72.980	A,B
SHU.M.58	B	8	2	64.983	B
SHU.M.164	B	7	0	58.333	B
SHU.M.163	C	3	0	25.000	C

حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد است. این آزمون در یک تکرار انجام شد. لازم به ذکر است که یک تکرار شاهد بود.

جدول ۴-۷: مقایسه میانگین تلفات شیشه برنج توسط جدایه‌های مختلف قارچ *B. iranica* در غلظت  $1 \times 10^8$  کنیدی/میلی‌لیتر در روز دوازدهم آزمایش

نام جدایه	سطح بیماری -	مرگ و میر در	مرگ و میر در	سطح میانگین
		شاهد	تکرار	
SHU.M.165	A	1	11	A
SHU.M.156	A	1	11	A
SHU.M.078	A	1	11	A
SHU.M.093	A	2	10	A
SHU.M.139	A	0	10	A
SHU.M.082	A	0	10	A
SHU.M.113	A	2	10	A
SHU.M.024	A	0	9	A
SHU.M.021	A	0	9	A
SHU.M.004	A	1	9	A
SHU.M.001	A	1	9	A
SHU.M.101	B	0	8	B
SHU.M.166	B	2	8	B
SHU.M.023	B	0	7	B
SHU.M.115	B	0	7	B
SHU.M.131	B	0	7	B
SHU.M.162	B	0	7	B
SHU.M.015	B	0	6	B
SHU.M.132	B	0	6	B
SHU.M.100	B	1	6	B
SHU.M.076	B	1	6	B
SHU.M.068	B	1	6	B
SHU.M.018	C	0	3	C
SHU.M.142	C	0	3	C

توجه: حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشند.



شکل ۳-۴: اثر بیماری زایی *Beauveria bassiana* بر روی *S. oryzae*. در تصویر بیماری زایی جدایه ی SHU.M.022 بر روی *S. oryzae* دیده می-شود.



#### ۴-۴. ارزیابی نرخ رشد جدایه‌های *B. iranica* و *B. bassiana* بر روی محیط‌کشت PDA

طبق جداول تجزیه واریانس (جدول ۳-۴ و جدول ۴-۴) میانگین نرخ رشد جدایه‌های مختلف قارچ *B. iranica* و *bassiana* در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است. این آزمون در ۳ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. نتایج مقایسه میانگین برای جدایه‌های *B. bassiana* در جدول ۴-۸ مشخص شده است. براساس نتایج مقایسه میانگین مشخص گردید که جدایه SHU.M.164 (مراغه، آذربایجان شرقی) با میانگین نرخ رشد  $9/34$  میلی‌متر/روز از بیشترین میزان رشد برخوردار بود و در سطح میانگین A قرار گرفت. دیگر جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و در سطح میانگین B قرار گرفتند. نتایج مقایسه میانگین برای جدایه‌های *B. iranica* (جدول ۴-۹) نشان می‌دهد که جدایه‌ی SHU.M.068 (رامسر، مازندران) دارای بیشترین نرخ رشد ( $18/28$  میلی‌متر/روز) بود.

#### ۴-۵. ارزیابی شمارش کنیدی جدایه‌های *B. iranica* و *B. bassiana* بر روی محیط‌کشت PDA

براساس جداول تجزیه واریانس (جدول ۳-۴ و جدول ۴-۴) آزمایش شمارش کنیدی ۵ جدایه‌ی *B. bassiana* در ۳ تکرار و ۲۴ جدایه‌ی *B. iranica* در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است و مقایسات میانگین مربوط به گونه‌های *B. iranica* و *B. bassiana* به ترتیب در جدول ۴-۱۰ و جدول ۴-۱۱ آورده شده است. ارزیابی شمارش کنیدی برای جدایه‌های *B. bassiana*، نشان می‌دهد که این جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر از نظر تعداد کنیدی ندارند. جدایه‌ی SHU.M.158 (جنگل ابر، سمنان) با تولید  $22/33 \times 10^6$  کنیدی/میلی‌لیتر کمترین میزان کنیدی را داشته است و سطح میانگین B را به خود اختصاص داده است. ارزیابی شمارش کنیدی برای جدایه‌های *B. iranica* نشان داد که جدایه‌ی SHU.M.156 (جنگل ابر، سمنان) با تولید  $36/50 \times 10^6$  کنیدی/میلی‌لیتر بیشترین و جدایه‌ی SHU.M.015 (بهشهر، مازندران) با تولید  $4/91 \times 10^6$  کنیدی/میلی‌لیتر کمترین میزان کنیدی تولیدی را به خود اختصاص می‌دهند.

جدول ۴-۸: مقایسه میانگین نرخ رشد جدایه های مختلف قارچ *B. bassiana* در روز پانزدهم آزمایش

نام جدایه	میانگین نرخ رشد	سطح میانگین
SHU.M.164	9.38493	A
SHU.M.058	7.72123	B
SHU.M.158	7.68583	B
SHU.M.163	7.47673	B
SHU.M.022	7.32983	B

توجه: حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ می باشند.

جدول ۴-۹: مقایسه میانگین نرخ رشد جدایه های مختلف قارچ *B. iranica* در روز پانزدهم آزمایش

نام جدایه	میانگین نرخ رشد	سطح میانگین
SHU.M.068	18.28973	A
SHU.M.166	10.42533	B
SHU.M.165	10.14803	B,C
SHU.M.078	9.83953	B,C
SHU.M.100	9.39063	B,C,D
SHU.M.139	9.34533	B,C,D
SHU.M.018	8.91683	C,D,E
SHU.M.132	8.89873	C,D,E
SHU.M.021	8.38143	D,E,F
SHU.M.156	8.07603	D,E,F,G
SHU.M.142	7.89923	E,F,G
SHU.M.115	7.79213	E,F,G
SHU.M.093	7.64593	E,F,G,H
SHU.M.113	7.60333	E,F,G,H
SHU.M.082	7.41533	F,G,L
SHU.M.001	7.38103	F,G,L
SHU.M.004	7.20193	F,G,H,I
SHU.M.015	6.95153	G,H,I,J
SHU.M.162	6.27203	G,H,I,J,K
SHU.M.101	5.93703	I,J,K
SHU.M.131	5.57733	J,K,L
SHU.M.076	5.18513	K,L
SHU.M.024	5.16253	K,L
SHU.M.023	4.31683	L

توجه: حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ می باشند.

جدول ۴-۱۰: مقایسه میانگین تعداد کنیدی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* در روز پانزدهم آزمایش

نام جدایه	میانگین تعداد اسپور $\times 10^6$	سطح میانگین
SHU.M.058	31.3333	A
SHU.M.163	27.6673	A,B
SHU.M.022	27.0003	A,B
SHU.M.164	25.0003	B
SHU.M.158	22.3333	B

توجه: حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشند.

جدول ۴-۱۱: مقایسه میانگین تعداد کنیدی جدایه‌های مختلف قارچ *B. iranica* در روز پانزدهم آزمایش

نام جدایه	میانگین تعداد اسپور $\times 10^6$	سطح میانگین
SHU.M.156	36.50003	A
SHU.M.132	34.66673	B
SHU.M.018	32.00003	C
SHU.M.100	28.66673	D
SHU.M.024	26.50003	E
SHU.M.115	24.58333	F
SHU.M.162	23.80003	F
SHU.M.131	23.66673	F
SHU.M.101	22.00003	G
SHU.M.021	21.00003	G,H
SHU.M.139	20.33333	H,I
SHU.M.076	20.25003	H,I
SHU.M.023	19.50003	I
SHU.M.078	17.33333	J
SHU.M.001	16.91673	J
SHU.M.082	13.75003	K
SHU.M.068	13.66673	K
SHU.M.093	13.16673	K
SHU.M.113	11.58333	L
SHU.M.142	11.00003	L
SHU.M.166	9.73333	M
SHU.M.004	8.83333	M
SHU.M.163	6.93333	N
SHU.M.015	4.91673	O

توجه: حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشند.

سمنان) با تولید  $10^6 \times 22/33$  کنیدی/میلی لیتر کمترین میزان کنیدی را داشته است و سطح میانگین B را به خود اختصاص داده است. ارزیابی شمارش کنیدی برای جدایه های *B. iranica* نشان داد که جدایه SHU.M.156 (جنگل ابر، سمنان) با تولید  $10^6 \times 36/50$  کنیدی/میلی لیتر بیشترین و جدایه SHU.M.015 (بهشهر، مازندران) با تولید  $10^6 \times 4/91$  کنیدی/میلی لیتر کمترین میزان کنیدی تولیدی را به خود اختصاص می دهد.

#### ۴-۶. ارتباط میان نرخ رشد، تعداد کنیدی تولیدی و قدرت بیماری زایی

بر اساس همبستگی انجام شده با نرم افزار SAS 9.1 و محاسبه ی ضریب همبستگی پیرسون، میان داده های حاصل از قدرت بیماری زایی، تعداد کنیدی تولیدی و نرخ رشد، مشاهده شد که هیچ ارتباط معنی داری بین این سه فاکتور وجود نداشته است.

#### ۴-۷. نتایج جداسازی *Beauveria*

نتیجه ی این تحقیق نشان داد که قارچ بیمارگر *Beauveria* که منبع جداسازی آن خاک در نظر گرفته شد پراکنش یکسان و برابری در نمونه خاک های مناطق مختلف ندارد. که این عدم یکسانی می تواند به علت یکسان نبودن شرایط محیطی در نقاط مختلف جغرافیایی ذکر کرد. گویای این صحبت تعداد لارو آلوده شده به قارچ و جدول موجود در پیوست ۲ می باشد. بیشترین میزان جداسازی قارچ *Beauveria* از منطقه ی کلوده-حسین آباد استان مازندران با آلوده شدن ۳۸ لارو از ۱۰۰ لارو رها شده (۳۸ درصد) بدست آمد. کمترین میزان جداسازی *Beauveria* مربوط به مناطق فسا از استان فارس (۱ درصد)، بند ملاً از استان هرمزگان (۱ درصد)، لیوان شرقی از استان گلستان و گنبد از استان گلستان (۱ درصد) بود. در این مطالعه بیشترین لارو آلوده به قارچ *Beauveria* از منطقه ی کلوده و حسین آباد استان مازندران (۳۸ درصد) و جهرم استان فارس (۳۲ درصد) بدست آمد.

# فصل پنجم

## بحث و پیشهادات

جداسازی و خصوصیت‌بندی قارچ‌های بیمارگر بومی برای ایجاد بینشی متناسب با تنوع زیستی قارچی، که از نظر طبیعی در یک منطقه‌ی خاص رخ می‌دهد امری ضروری به نظر می‌رسد. این گونه‌ها پتانسیل بالقوه‌ای برای کنترل حشرات آفات دارند. استفاده از جدایه‌های غیربومی قارچ‌های بیمارگر حشرات که برای مقابله با حشرات آفت، که در کشورهای مختلف تولید و فرموله شده‌اند به علت متفاوت بودن جدایه و شرایط محیطی امری غیر مؤثر است. بنابراین توزیع قارچ‌های بیمارگر حشرات و ارزیابی فیلوژنی این قارچ‌ها جهت شناسایی ساختار جمعیتی قارچ‌های بیمارگر بومی امری مهم در استفاده از آنها برای بیوکنترل در یک منطقه‌ی خاص به حساب می‌آید.

جنس *Beauveria* با لغات، همه‌جازی، آنامورف، خاک‌زاد، بیمارگر بندپایان، گندروی و اندوفیت گیاهان شناخته می‌شود. طبق گزارش رنر و همکاران (۲۰۱۱) جنس *Beauveria* دارای ۱۲ گونه است که تا کنون شناخته شده است [۵۹]. گزارش آنها حاکی از این است که *Beauveria* هنوز دارای گونه‌های پنهان است. این گونه‌های پنهان دارای توزیع بین قاره‌ای هستند و در زیستگاه‌های طبیعی و کشاورزی حضور دارند. در گزارشی، شین و همکاران (۲۰۱۲) جداسازی و مطالعه‌ی فیلوژنی *Beauveria* در کره‌ی جنوبی را انجام دادند، از ۴۰ جدایه‌ی *Beauveria* سه گونه‌ی *B. bassiana*، *B. brongniartii* و *B. pseudobassiana* را با استفاده از منطقه‌ی ITS گزارش کردند [۱۲۳].

## ۵-۱. بحث پیرامون جداسازی *Beauveria* از خاک

نتایج بدست آمده حاکی از تفاوت نقاط متفاوت در جداسازی *Beauveria* از خاک است. چنین نتیجه‌ای را تونینگا<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۹) [۱۱۱]، براون‌بریج<sup>۲</sup> و همکاران (۱۹۹۳) [۱۲۴] که از روش طعمه حشره‌ای گالریا برای جداسازی *Beauveria* از خاک استفاده کردند نیز کسب کردند. تونینگا و همکاران از ۲۵۰ نونه خاک از ۵ منطقه‌ی متفاوت ایالت نیویورک، تعداد ۶۸ جدایه‌ی *Beauveria*

۱- Tuininga

۲- Brownbridge

بدست آوردند. براون بریج و همکاران از مناطق جنگلی متفاوت با استفاده از روش طعمه حشره‌ای گالریا، تعداد لارو آلوده‌ی متفاوتی را به دست آوردند. طبق گزارش آنها، از بعضی مناطق هیچ لارو آلوده‌ای به دست نیاوردند. براساس مطالعات انجام شده در مورد جداسازی قارچ *Beauveria* با استفاده از روش طعمه حشره‌ای، تایه و همکاران (۲۰۰۲)، موراکی و همکاران (۲۰۰۷)، سویم و همکاران (۲۰۱۰) و رنر و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که حضور قارچ *Beauveria* به شرایط آب و هوایی، خصوصیات خاک، خصوصیات زیستگاه (زراعی، باغی و جنگلی) بستگی دارد [۱۲۳].

همانطور که ذکر شد تشخیص صحیح، مهمترین مزیت روش طعمه حشره‌ای گالریا است. با توجه به شکل ظاهری آلوده شدن جدایه‌ها (پوششی سفید رنگ بر روی لارو آلوده) پیش‌بینی می‌شد که لارو آلوده به جنس *Beauveria* است. پس از تهیه اسلاید و مشاهده‌ی شکل‌گیری سلول‌های تولیدکننده‌ی کنیدی که ویژگی اصلی این سلول‌ها شکل زیگزاگی آنهاست، مشخص شد تمام جدایه‌ها *Beauveria* بودند. نتیجه‌ی تشخیص جنس به روش طعمه حشره‌ای گالریا و مطالعه‌ی مورفولوژیکی جنس *Beauveria* با نتایج شناسایی ملکولی براساس منطقه‌ی ITS منطبق بود و جدایه‌های مورد مطالعه‌ی ملکولی نیز جنس *Beauveria* بودند. از آنجا که گونه‌ی *B. bassiana* دارای کنیدی‌های کروی است با تهیه اسلاید از ۳۵ جدایه حدس بر این بود که جدایه‌های مورد مطالعه دارای کنیدی کروی هستند. اما پس از اتمام مطالعات ملکولی این نتیجه حاصل شد که شناسایی گونه‌های *Beauveria* با تهیه اسلاید و مشاهده با میکروسکوپ نوری امری مشکل است. نتایج ملکولی نشان داد که ۳۵ جدایه‌ی مورد مطالعه گونه‌های *B. bassiana*، *B. brongniartii*، *B. sungii*، *B. amorpha* و *malaweinsis* بودند. با توجه به آنالیز خوشه‌های ایجاد شده که با رسم درختچه‌ی فیلوژنی به دست آمد و قرارگیری گونه‌های متفاوت *Beauveria* در شاخه‌ی یک، به این نتیجه رسیدیم که جدایه‌هایی که در شاخه ۳ قرار گرفته‌اند، گونه‌ای جدید هستند که تا کنون گزارش نشده‌اند. این گونه‌ی جدید را *B. iranica* نام نهادیم. طبق نتایج BLAST، ۳ جدایه *B. amorpha* (SHU.M.153، SHU.M.074 و SHU.M.077)، یک جدایه *B. sungii* (SHU.M.123)، یک جدایه

*B. malawiiensis* (SHU.M.160) و یک جدایه *B. brongniartii* (SHU.M.102) بود. این امر ضعف روش شناسایی مورفولوژیکی را نشان می دهد. دقت شود که امر شناسایی مورفولوژیکی گونه های *Beauveria* به دلیل هم پوشانی زیاد ویژگی های مورفولوژیکی کاری بس دشوار است و بدون تردید مطالعات ملکولی راه گشای این امر خطیر خواهد بود. اما نمی توان برای امر شناسایی گونه تنها به مطالعه ملکولی اکتفا کرد. چنین موضوعی را می توان با شناسایی جدایه ی SHU.M.102 روشن نمود. نتیجه ی BLAST منطقه ی ITS این جدایه در NCBI، سه جدایه با شباهت ۹۹ درصد که دو جدایه ی آن *C. brongniartii* و یک جدایه *B. brongniartii* بود را در بالاترین درجه ی شباهت نشان داد (پیوست)

## ۵-۲. استنتاج فیلوژنی (شاخه بندی) گونه های *Beauveria* و مقایسه ی آنها با دیگر جدایه ها و گونه ها

الگوریتم اتصال مجاور براساس ماتریس فاصله<sup>۱</sup> است. در واقع اساس روش اتصال مجاور واگرایی میان توالی هاست. الگوریتم های دیگر چون تکامل کمینه<sup>۲</sup> و UPGMA<sup>۳</sup> نیز نتایج مشابه الگوریتم اتصال مجاور را ایجاد می کنند. در الگوریتم ماکزیمم پارسیمونی<sup>۴</sup> ترسیم درختچه براساس کمترین تعداد تغییر در توالی های DNA صورت می گیرد. که این اساس با فرض بیشترین تفاوت موجود بین دو توالی جهت تفکیک دو گونه از یکدیگر سازگار نیست. در واقع در این روش همه ی توپولوژی های قابل قبول ارزیابی می شود و درختی که نیاز به کمترین تغییر دارد به عنوان بهترین درخت انتخاب می شود. امروزه روش اتصال مجاور رایج ترین روش مورد استفاده برای ترسیم درختچه هایی است که فرض آنها براساس واگرایی (فاصله) میان توالی هاست. ارزیابی صحت درختچه ی ترسیم شده با آنالیز bootstrap

۱- Distance Matrix

۲- Minimum Evolution

۳- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic

۴- Maximum Parsimony (MP)



انجام شد. آنالیز bootstrap یک روش ساده و مؤثر برای آزمودن پایداری نسبی گروه‌های درون یک درخت فیلوژنتیکی است. مزیت اصلی روش bootstrap این است که می‌تواند به طور کلی برای همه‌ی الگوریتم‌های ایجاد درختچه به کار رود. خود bootstrap یک فرآیند خنثی است که تنها اخطار (یا اختلال) فیلوژنتیکی را در داده‌هایی که به وسیله‌ی روش‌های ایجاد درخت مورد استفاده قرار گرفته‌اند، منعکس می‌کند. به طور کلی، در شرایط معمولی، اطمینان قابل ملاحظه‌ای برای شاخه‌ها یا گروه‌های با تأیید بیش از ۷۰ یا ۷۵ درصد وجود دارد و بالعکس شاخه‌هایی که با کمتر از ۷۰ درصد تأیید شده‌اند، باید با احتیاط مورد بحث قرار بگیرند.

امر شناسایی با استفاده از منطقه‌ی ITS به خوبی صورت گرفت. این تحقیق تنوع فیلوژنی بالایی را در مورد جدایه‌های ایرانی براساس منطقه‌ی ITS نشان داد. گویای این صحبت قرار گیری جدایه‌های ایرانی در ۳ شاخه‌ی<sup>۱</sup> (زیست دسته) مجزا در درختچه‌ی فیلوژنی است که برای جدایه‌های بومی و غیر بومی رسم شده است (شکل ۴-۳). براساس منطقه‌ی ژنی ITS و *EF1-α* آقای رنر و بوکلی ۶ گونه برای جنس *Beauveria* معرفی کردند [۱۰]. همچنین، طبق مطالعات آقای رنر و همکاران (۲۰۱۱) که براساس مناطق ژنی ITS، *EF1-α*، *RPB1* و *RBP2* صورت گرفت، ۱۲ گونه برای جنس *Beauveria* معرفی کردند [۵۹]. نتایج تحقیق آقایان رنر و بوکلی (۲۰۰۵) براساس منطقه‌ی ITS و *EF1-α* بیانگر پلی‌فیلتیک<sup>۲</sup> بودن گونه‌ی *B. bassiana* بود. دلیل آنها قرار گرفتن این گونه در دو شاخه‌ی مجزا بود. آنها این دو شاخه را A و C نام گذاری کردند. آنها ابراز داشتند جداسازی بر اساس فاصله<sup>۳</sup> عاملی مؤثر در قرار دادن جدایه‌های مختلف *B. bassiana* در این دو شاخه می‌باشد. نتایج تحقیق رنر و همکاران (۲۰۱۱) براساس ۴ منطقه‌ی ژنی بیانگر مونوفیلتیک<sup>۴</sup> (هم‌تبار یا تک نیا) بودن گونه‌ی *B. bassiana* بود. گروهی از تاکسون‌ها (در این رساله منظور از تاکسون جدایه‌های قارچی

---

۱- Clade

۲- Polyphyletic

۳- Isolation By Distance

۴- Monophyletic

است) که متعلق به یک شاخه‌ی یکسان هستند منشأ مونوفیلیتیک (تک‌نیا یا هم‌تبار) دارند.

طبق درختچه‌ی ترسیم شده (شکل ۴-۳) در این تحقیق، اینطور به نظر می‌رسد که *B. bassiana* براساس منطقه‌ی ITS مونوفیلیتیک است. دلیل این صحبت قرار گرفتن جدایه‌های *B. bassiana* از ایران در شاخه‌ی ۲ در کنار سایر جدایه‌های این گونه از دیگر کشورها است. این نتیجه با نتایج رنر و همکاران منطبق است. با توجه به اینکه دیگر گونه‌های *Beauveria* در یک شاخه (شاخه ۱) قرار گرفته‌اند، به نظر می‌رسد که دیگر گونه‌های *Beauveria* نیز مونوفیلیتیک باشند.

مطالعات فیلوژنی جدایه‌های ایرانی براساس منطقه‌ی ITS نشان داد که جدایه‌هایی که در خوشه‌ی ۳ قرار گرفته‌اند گونه‌ای جدید است که در این رساله نام آن *B. iranica* گذاشته شد. با توجه به درختچه‌ی فیلوژنی ترسیم شده به نظر می‌رسد که از نظر تکاملی گونه‌ی *B. iranica* نسبت به دیگر گونه‌های *Beauveria* جدیدتر است. براساس درختچه‌ی فیلوژنی که با استفاده از منطقه‌ی ITS ترسیم شده است می‌توان نتیجه گرفت که گونه‌ی *B. iranica* دارای ۲ تا ۴ زیرگونه است. تجزیه‌ی خوشه‌ای جدایه‌هایی که در شاخه ۳ براساس محل جمع‌آوری بر این نکته صحه می‌گذارد که این گونه‌ی جدید مختص ایران است و گونه‌ای سازگار با این ماکروکلیم است. نکته‌ی قابل تأمل در مورد جدایه‌های قارچی و محل جداسازی آنها، با تنوعی است که در منطقه‌ی ITS دیده می‌شود. ۵ جدایه‌ی *B. bassiana* ایرانی از اقلیم‌های متفاوتی چون کوهستانی (مراغه = SHU.M.164، SHU.M.163)، جنگلی (جنگل ابر = SHU.M.153) ساحل دریای خزر (مازندران = SHU.M.058، SHU.M.022) جداسازی شد. این خود حاکی از پراکنش جغرافیایی این گونه و سهولت استقرار آن در اقلیم‌های مختلف است. گیکاس و همکاران که از منطقه‌ی ITS برای بررسی ارتباط بین پراکنش جغرافیایی جدایه‌های مختلف *Beauveria* با تنوع موجود در منطقه‌ی ITS استفاده کردند. آنها به این نتیجه رسیدند که هیچ همبستگی بین محل جداسازی با تنوع موجود در منطقه‌ی ITS وجود ندارد [۵۵].

علاوه بر ارزیابی صحت درختچه‌ی ترسیم شده با آنالیز bootstrap، می‌توان بر صحت شاخه‌های شکل گرفته با ارزیابی شباهت منطقه‌ی ITS گونه‌های شناخته شده صحت گذاشت. پیوست ۴، نتایج همولوژی میان ۱۲ گونه‌ی شناخته شده‌ی با یکدیگر را نشان می‌دهد. کمترین شباهت منطقه‌ی ITS در میان گونه‌ها مربوط به *B. asiatica* با دیگر گونه‌های *Beauveria* است. با توجه به درختچه‌ی ترسیم شده گونه‌ی *B. asiatica* در درون شاخه ۱ با گروه خواهری *B. australis* قرار می‌گیرد. شباهت منطقه‌ی ITS این دو گونه ۸۹/۹ درصد است. از آنجا که گونه‌ی *B. asiatica* کمترین شباهت را با دیگر گونه‌های *Beauveria* دارد در انتهای شاخه‌ی ۱ و به دور از دیگر گونه‌های *Beauveria* قرار گرفت. این گویای این امر است که الگوریتم انتخاب شده برای رسم درختچه با فرض انتخاب شده (شناسایی گونه براساس واگرایی میان توالی منطقه‌ی ITS جدایه‌های متفاوت) منطبق است. گزارش آقای رنر گویای تفاوت مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی گونه‌ی *B. asiatica* با دیگر گونه‌های جنس *Beauveria* است. براساس گزارش آقای رنر ۱۱ گونه‌ی *Beauveria* نیز در یک شاخه قرار گرفتند و گونه‌ی *B. asiatica* به دور از دیگر گونه‌های *Beauveria* و با گونه‌ی *B. australis* در یک گروه خواهری قرار گرفتند. آنها ابراز داشتند که این دو گونه قرابت مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی دارند. البته نباید از نظر داشت معیار فیلوژنی الگوهای جایگزینی نوکلئوتیدی است و صرفاً Identity نمی‌تواند میزان شباهت را نشان دهد.

بیشترین بیماری‌زایی برای گونه‌های *B. iranica* (جدول ۴-۸) مربوط به جدایه‌ی SHU.M.165 (ساری، مازندران) با ۸۸/۹۷ درصد که در زیرگونه‌ی ۳ گونه‌ی *B. iranica* قرار دارد و کمترین بیماری‌زایی مربوط به جدایه‌های SHU.M.018 (کلوده و حسین‌آباد، مازندران) و SHU.M.142 (وکیل‌آباد، کرمان) با ۲۵ درصد بود که جدایه‌ی SHU.M.018 در زیرگونه‌ی ۱ و جدایه‌ی SHU.M.142 در زیرگونه ۳ گونه‌ی *B. iranica* قرار دارد. از نظر نرخ رشد جدایه‌ی SHU.M.068 (رامسر، مازندران) با ۱۸/۲۸ میلی‌متر/روز در زیرگونه‌ی ۱ و جدایه‌ی SHU.M.023 (کلوده و حسین‌آباد، مازندران) با ۴/۳۱ میلی‌متر/روز در زیرگونه ۲ قرار گرفت. بیشترین تعداد کنیدی تولیدی مربوط به

جدایه‌ی SHU.M.156 (جنگل ابر، سمنان) با تولید  $10^6 \times 36/50$  کنیدی/میلی‌لیتر و جدایه‌ی SHU.M.015 (بهشهر، مازندران) با تولید  $10^6 \times 4/91$  کنیدی/میلی‌لیتر کمترین میزان کنیدی تولیدی را داشتند که هر دو در زیرگونه‌ی ۴ گونه‌ی *B. iranica* قرار دارند.

## ۵-۲. جمع‌بندی آزمایشات مورفولوژیک

نتایج تحقیق این رساله بر حساسیت بالای *S. oryzae* به قارچ بیمارگر *Beauveria* تأکید دارد و نتایج گویای این است که میان جدایه‌های مختلف استفاده شده در این مطالعه از نظر قدرت بیماری‌زایی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. تنها گزارش موجود از بیماری‌زایی *Beauveria* بر روی *S. oryzae* مربوط به پادین<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۲) است. ارزیابی نرخ رشد جدایه‌های مختلف نشان داد که این نتایج با نتایجی که دیگران [اکسی و همکاران (۱۹۹۹) [۸۶]، صفوی و همکاران (۲۰۰۷) [۹۴]، داربرو و همکاران (۲۰۱۱) [۹۵].] در مورد نرخ رشد *Beauveria* بدست آوردند یکسان بود. نتایج آنها حکایت از تفاوت در میان جدایه‌های متفاوت *Beauveria* از نظر نرخ رشد بود. براساس نتایج مقایسه‌ی میانگین، می‌توان نتیجه گرفت که جدایه‌های مورد ارزیابی از نظر تعداد کنیدی تولیدی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند. نتایج پتلامول و همکاران نیز از تفاوت بین ۵ جدایه‌ی *Beauveria* برای تعداد کنیدی تولیدی حکایت دارد [۹۷]. در تایلند بیماری‌زایی ۵ جدایه *B. bassiana* علیه لاروهای *Sodospora litura* بررسی گردید و درصد مرگ و میر را ۲ روز بعد از انکوبه نمودن حشرات آلوده به سوسپانسیون قارچ آغاز نمودند و مشاهده شد بیش از ۵۰٪ جمعیت در روز چهارم از بین رفتند و مرگ ۱۰۰ درصدی جمعیت برای قارچ *B. bassiana* در روز ششم توسط یک جدایه به ثبت رسید و بر همین مبنا به طبقه‌بندی جدایه‌ها از منظر بیماری‌زایی پرداختند و جدایه‌ای را که سبب

۱- Padin

بیشترین میزان مرگ و میر گردید را در سطح بالا<sup>۱</sup> و جدایه‌ای را که کمترین میزان مرگ و میر را در پی داشت در سطح پائین<sup>۲</sup> قرار دادند [۹۷]. نتیجه مطالعه ما گویای حساسیت بالای شیشه برنج به قارچ *Beauveria* بود. با این حال آزمایشات بیشتری نظیر  $LT_{50}^3$ ،  $LC_{50}^4$  جهت غربال‌گری جدایه‌هایی با توان بیماری‌زایی بیشتر برای کنترل آفات انباری لازم می‌باشد. اوما دوی و همکاران [۱۲۵] براساس درصد مرگ و میر ۹ حشره مختلف، جدایه‌های *B. bassiana* را در سه سطح بالا (A)، متوسط (B) و پائین (C) طبقه‌بندی نمود که سطح A با توان بیماری‌زایی ۱۰۰-۶۸٪، سطح B با توان مرگ و میر ۶۷-۳۴٪ و سطح C با توان بیماری‌زایی ۳۳-۰٪ بود. برای جدایه‌های مورد مطالعه چنین سطح‌بندی در جداول ۴-۷ و جدول ۴-۸ ارائه شده است.

---

۱- High

۲- Low

۳- Lethal Time

۴- Lethal Concentration

#### ۴-۵. پیشنهادات

گذشته از اینکه منطقه‌ی ITS به عنوان منطقه‌ی بارکد در قارچ‌ها در نظر گرفته می‌شود، وجود یک مخزن اطلاعاتی بسیار خوب در پایگاه ژنی دلیل استفاده زیاد از این منطقه ژنی جهت شناسایی و مطالعات فیلوژنی است. اخیراً با تحقیق جامعی که آقای رنر و همکاران بر روی دیگر مناطق ژنی *Beauveria* انجام دادند و ثبت اطلاعات مربوط به آن مناطق ژنی در پایگاه ژنی، این اطمینان و امکان برای دیگر محققان ایجاد می‌شود که با انجام کارهای مشابه علاوه بر منطقه‌ی ITS دیگر مناطق ژنی چون *EF1-a*، *RPB1*، *RPB2* و *Bloc* بر روی جدایه‌های بومی هر منطقه و مقایسه‌ی توالی‌های به-دست آمده با توالی‌های ثبت شده با اطمینان بالاتری به تفسیر نتایج خود بپردازند. این مجموعه داده-ها می‌تواند اساسی برای گسترش روش‌هایی چون PCR-RFLP و سیستم‌های شناسایی براساس چند شکلی نوکلئوتیدی<sup>۱</sup> باشد. این امر کمک بسزایی در تصحیح تاکسونومی گونه‌های *Beauveria* خواهد کرد. هرچند تصور بر این است که روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی روش‌هایی دقیق‌تری نسبت به دیگر روش‌ها هستند که البته اینگونه است اما نباید از نظر دور داشت که حتی اگر توالی‌یابی هم صورت بگیرد اما ملاک مقایسه وجود نداشته باشد روش‌های توالی‌یابی هم مفید فایده نخواهند بود. روش-هایی وجود دارند که می‌توان از آنها برای شناسایی نیز استفاده کرد هرچند از توالی‌یابی استفاده نمی-کنند. یکی از این روش‌ها AP-PCR<sup>۲</sup> است. در این روش با مقایسه‌ی الگوی بانندی گونه‌ی ناشناخته با الگوی بانندی گونه‌هایی که شناخته شده‌اند می‌توان گونه‌ی مورد نظر را شناسایی کرد. از آنجا که در این روش ۸۰-۱۰۰ درصد باندهایی که توسط یک پرایمر ۱۶-۱۵ تایی برای یک گونه ایجاد می‌شود برای بقیه‌ی جدایه‌های همان گونه هم ایجاد می‌شود در حالی که ۲۰-۰ درصد باندهای ایجاد شده در این روش بین جدایه‌های گونه‌های هم‌سان الگوی بانندی متفاوت می‌دهد روشی مفید برای شناسایی است. به اعتقاد نگارنده می‌توان با جدایه‌هایی که شناسایی شده‌اند یک الگوی AP-PCR تهیه کرد و

۱- SNP Based Identification Systems

۲- Arbitrarily Primed PCR= Single- Primer PCR Analysis (Random Amplified Polymorphic DNA)

این الگو را در آزمایشگاه نگهداری کرد. مزیت این الگو در این خواهد بود که می‌توان از آن برای شناسایی سریع و ارزان استفاده کرد. اهمیت تهیهی این آرشیو برای آزمایشگاه‌های دانشگاه‌های ایران که توانایی توالی‌یابی نمونه‌های خود را ندارند و مجبور به ارسال نمونه به خارج از کشور هستند جهت جلوگیری از صرف هزینه و زمان، امری ضروری به نظر می‌رسد.

ژنوم میتوکندری یکی از مناطق ژنومی است که در سال‌های اخیر جهت شناسایی و مطالعات فیلوژنی از آن استفاده می‌کنند. ژنوم میتوکندری دو گونه‌ی *B. bassiana* و *B. brongniartii* به طور کامل توالی‌یابی شده است و مشخص شده است که ژنوم میتوکندری آنها نسبت به دیگر قارچ‌های راسته‌ی Hypocreales اینترون، عناصر متحرک بیشتر و مناطق درون ژنی طولانی‌تری دارند. بنابراین از این ویژگی می‌توان برای تفکیک بین و میان گونه‌های استفاده کرد. گیکاس و همکاران نشان دادند که ژنوم میتوکندری به دلایل گفته شده توانایی تفکیک گونه‌های بیشتری برای جنس *Beauveria* نسبت به منطقه‌ی ITS دارد [۵۵]. از اینرو نگارنده توصیه‌ی استفاده از ژنوم میتوکندری را برای محققان و آزمایشگاه‌هایی مدنظر قرار می‌دهد که مواد شیمیایی و امکانات مناسبی جهت استخراج DNA میتوکندریایی دارند.

یکی از مهمترین عوامل مؤثر در موفقیت قارچ‌های بیمارگر حشرات، توانایی فرموله کردن آنهاست. گذشته از اثرات منفی‌ای که ممکن است ترکیبات همراه در فرمولاسیون هم برای قارچ و هم برای گیاه داشته باشد، اشعه‌ی ماوراء بنفش و خشکی هوا از عوامل اصلی کاهش زنده‌مانی کنیدی‌های یک جدایه‌ی قارچی در فرموله می‌گردد. نگارنده معتقد است که برای تأثیر بهتر و پرهیز از شرایط بد محیطی بر روی بقای قارچ، و با توجه به اثبات اندوفیت بودن قارچ *Beauveria*، می‌توان از جدایه‌های بدست آمده جهت کلونیزاسیون و معرفی آنها به ریشه‌ی گیاهان استفاده کرد. این هم‌زیستی نه تنها می‌تواند به سلامت گیاه کمک کند بلکه می‌تواند سبب محافظت قارچ از شرایط نامساعد محیطی از قبیل اشعه‌ی ماوراء بنفش و خشکی هوا گردد.

پوستہ



پیوست ۱

جدایه‌های قارچ *Beauveria spp.* و محل جداسازی آنها

شماره جدایه	محل (شهر)	استان	باغ	حاشیه/ مرکز	مختصات	ارتفاع از سطح دریا	تاریخ جداسازی
SHUM-001	گنبد	گلستان	۱	حاشیه	55° 10' 14" E 37° 14' 17" N	۴۰	آبان ۹۰
SHUM-002	مینودشت	گلستان	۲	حاشیه	55° 17' 25" E 37° 10' 21" N	۵۶	آبان ۹۰
SHUM-003	مینودشت	گلستان	۳	مرکز	55° 17' 23" E 37° 10' 26" N	۴۸	آبان ۹۰
SHUM-004	لیوان شرقی	گلستان	۱	مرکز	53° 52' 06" E 36° 44' 41" N	-۵۵	آبان ۹۰
SHUM-005	بهشهر	مازندران	۱	حاشیه	53° 52' 06" E 36° 44' 41" N	-۳۵	آبان ۹۰
SHUM-006	بهشهر	مازندران	۴	مرکز	53° 52' 10" E 36° 44' 40" N	-۳۲	آبان ۹۰
SHUM-007	بهشهر	مازندران	۴	مرکز	53° 52' 13" E 36° 44' 44" N	-۳۶	آبان ۹۰
SHUM-008	بهشهر	مازندران	۴	مرکز	53° 52' 16" E 36° 44' 46" N	-۳۸	آبان ۹۰
SHUM-009	بهشهر	مازندران	۴	مرکز	53° 52' 16" E 36° 44' 46" N	-۳۸	آبان ۹۰
SHUM-010	بهشهر	مازندران	۴	حاشیه	53° 52' 32" E 36° 44' 53" N	-۲۷	آبان ۹۰
SHUM-011	بهشهر	مازندران	۴	حاشیه	53° 52' 32" E 36° 44' 53" N	-۲۷	آبان ۹۰
SHUM-012	بهشهر	مازندران	۳	حاشیه	53° 50' 32" E 36° 44' 53" N	-۲۲	آبان ۹۰
SHUM-013	بهشهر	مازندران	۳	حاشیه	53° 50' 32" E 36° 44' 53" N	-۲۲	آبان ۹۰
SHUM-014	بهشهر	مازندران	۲	مرکز	53° 54' 42" E 36° 41' 23" N	-۲۵	آبان ۹۰
SHUM-015	بهشهر	مازندران	۲	حاشیه	53° 54' 12" E 36° 41' 06" N	-۲۰	آبان ۹۰
SHUM-016	بهشهر	مازندران	۲	حاشیه	53° 54' 12" E 36° 41' 06" N	-۲۰	آبان ۹۰
SHUM-017	بهشهر	مازندران	۲	حاشیه	53° 54' 12" E 36° 41' 06" N	-۲۰	آبان ۹۰
SHUM-018	کلوده	مازندران	۳	مرکز	52° 57' 27" E 36° 31' 13" N	۱	آبان ۹۰
SHUM-019	ساری	مازندران	۱	مرکز	52° 57' 32" E 36° 31' 05" N	۱۲	آبان ۹۰
SHUM-020	کلوده	مازندران	۱	مرکز	52° 16' 35" E 36° 31' 13" N	۶	آبان ۹۰
SHUM-021	کلوده	مازندران	۱	مرکز	52° 16' 35" E 36° 31' 13" N	۶	آبان ۹۰
SHUM-022	کلوده	مازندران	۱	حاشیه	52° 16' 35" E 36° 31' 13" N	۷	آبان ۹۰
SHUM-023	کلوده	مازندران	۱	حاشیه	52° 16' 35" E 36° 31' 13" N	۷	آبان ۹۰
SHUM-024	کلوده	مازندران	۱	حاشیه	52° 16' 35" E 36° 31' 13" N	۷	آبان ۹۰

۹۰	آبان	۷	52° 16' 35" E 36° 31' 13" N	حاشیه	۱	مازندران	کلوده	SHUM-025
۹۰	آبان	۷	52° 16' 35" E 36° 31' 13" N	حاشیه	۱	مازندران	کلوده	SHUM-026
۹۰	آبان	۷	52° 16' 35" E 36° 31' 13" N	حاشیه	۱	مازندران	کلوده	SHUM-027
۹۰	آبان	۷	52° 16' 35" E 36° 31' 13" N	حاشیه	۱	مازندران	کلوده	SHUM-028
۹۰	آبان	۷	52° 16' 35" E 36° 31' 13" N	حاشیه	۱	مازندران	کلوده	SHUM-029
۹۰	آبان	۷	52° 16' 35" E 36° 31' 13" N	حاشیه	۱	مازندران	کلوده	SHUM-030
۹۰	آبان	۱۱	52° 23' 32" E 36° 30' 16" N	حاشیه	۲	مازندران	کلوده	SHUM-031
۹۰	آبان	۱۱	52° 23' 32" E 36° 30' 16" N	حاشیه	۲	مازندران	کلوده	SHUM-032
۹۰	آبان	۱۱	52° 23' 32" E 36° 30' 16" N	حاشیه	۲	مازندران	کلوده	SHUM-033
۹۰	آبان	۱۱	52° 23' 32" E 36° 30' 16" N	حاشیه	۲	مازندران	کلوده	SHUM-034
۹۰	آبان	۱۱	52° 23' 32" E 36° 30' 16" N	حاشیه	۲	مازندران	کلوده	SHUM-035
۹۰	آبان	۱۱	52° 23' 32" E 36° 30' 16" N	حاشیه	۲	مازندران	کلوده	SHUM-036
۹۰	آبان	۱۱	52° 23' 32" E 36° 30' 16" N	حاشیه	۲	مازندران	کلوده	SHUM-037
۹۰	آبان	۱۱	52° 23' 32" E 36° 30' 16" N	حاشیه	۲	مازندران	کلوده	SHUM-038
۹۰	آبان	۱۱	52° 23' 32" E 36° 30' 16" N	حاشیه	۲	مازندران	کلوده	SHUM-039
۹۰	آبان	۱۷	52° 29' 35" E 36° 26' 19" N	مرکز	۲	مازندران	کلوده	SHUM-040
۹۰	آبان	۱۷	52° 29' 35" E 36° 26' 19" N	مرکز	۲	مازندران	کلوده	SHUM-041
۹۰	آبان	۲۰	52° 27' 36" E 36° 28' 17" N	مرکز	۳	مازندران	کلوده	SHUM-042
۹۰	آبان	۲۰	52° 27' 36" E 36° 28' 17" N	مرکز	۳	مازندران	کلوده	SHUM-043
۹۰	آبان	۲۰	52° 27' 36" E 36° 28' 17" N	مرکز	۳	مازندران	کلوده	SHUM-044
۹۰	آبان	۲۰	52° 27' 36" E 36° 28' 17" N	مرکز	۳	مازندران	کلوده	SHUM-045
۹۰	آبان	۲۰	52° 27' 36" E 36° 28' 17" N	مرکز	۳	مازندران	کلوده	SHUM-046
۹۰	آبان	۲۰	52° 27' 36" E 36° 28' 17" N	مرکز	۳	مازندران	کلوده	SHUM-047
۹۰	آبان	۲۰	52° 27' 36" E 36° 28' 17" N	مرکز	۳	مازندران	کلوده	SHUM-048
۹۰	آذر	۲۲	52° 26' 34" E 36° 24' 21" N	حاشیه	۳	مازندران	کلوده	SHUM-049
۹۰	آذر	۲۲	52° 26' 34" E 36° 24' 21" N	حاشیه	۳	مازندران	کلوده	SHUM-050
۹۰	آذر	۲۲	52° 26' 34" E 36° 24' 21" N	حاشیه	۳	مازندران	کلوده	SHUM-051
۹۰	آذر	۲۲	52° 26' 34" E 36° 24' 21" N	حاشیه	۳	مازندران	کلوده	SHUM-052
۹۰	آذر	۲۲	52° 26' 34" E 36° 24' 21" N	حاشیه	۳	مازندران	کلوده	SHUM-053
۹۰	آذر	۲۲	52° 26' 34" E 36° 24' 21" N	حاشیه	۳	مازندران	کلوده	SHUM-054



۹۰	آذر	۲۲	52° 26' 34" E 36° 24' 21" N	حاشیه	۳	مازندران	کلوده	SHUM-055
۹۰	آذر	۲۲	52° 26' 34" E 36° 24' 21" N	حاشیه	۳	مازندران	کلوده	SHUM-056
۹۰	آذر	۳۶	52° 36' 06" E 36° 12' 16" N	مرکز	۵	مازندران	کلوده	SHUM-057
۹۰	آذر	-۲۵	52° 27' 48" E 36° 40' 34" N	حاشیه	۱	مازندران	خزر شهر	SHUM-058
۹۰	آذر	-۲۵	52° 27' 48" E 36° 40' 34" N	حاشیه	۱	مازندران	خزر شهر	SHUM-059
۹۰	آذر	-۲۳	52° 27' 46" E 36° 40' 32" N	مرکز	۲	مازندران	خزر شهر	SHUM-060
۹۰	آذر	-۲۱	52° 27' 49" E 36° 40' 35" N	حاشیه	۲	مازندران	خزر شهر	SHUM-061
۹۰	آذر	-۲۱	52° 27' 49" E 36° 40' 35" N	حاشیه	۲	مازندران	خزر شهر	SHUM-062
۹۰	آذر	-۲۷	52° 26' 44" E 36° 41' 32" N	مرکز	۳	مازندران	خزر شهر	SHUM-063
۹۰	آذر	-۲۵	52° 26' 40" E 36° 41' 26" N	حاشیه	۴	مازندران	خزر شهر	SHUM-064
۹۰	آذر	-۲۶	52° 26' 49" E 36° 41' 38" N	مرکز	۵	مازندران	خزر شهر	SHUM-065
۹۰	آذر	-۲۰	50° 50' 49" E 36° 49' 18" N	مرکز	۱	مازندران	رامسر	SHUM-066
۹۰	آذر	-۱۶	50° 50' 46" E 36° 49' 14" N	حاشیه	۱	مازندران	رامسر	SHUM-067
۹۰	آذر	-۱۶	50° 50' 46" E 36° 49' 14" N	حاشیه	۱	مازندران	رامسر	SHUM-068
۹۰	آذر	-۱۶	50° 50' 46" E 36° 49' 14" N	حاشیه	۱	مازندران	رامسر	SHUM-069
۹۰	آذر	-۱۶	50° 50' 46" E 36° 49' 14" N	حاشیه	۱	مازندران	رامسر	SHUM-070
۹۰	آذر	-۱۶	50° 50' 46" E 36° 49' 14" N	حاشیه	۱	مازندران	رامسر	SHUM-071
۹۰	آذر	-۱۶	50° 50' 46" E 36° 49' 14" N	حاشیه	۱	مازندران	رامسر	SHUM-072
۹۰	آذر	۲۱۲	57° 08' 28" E 27° 27' 11" N	مرکز	۱	هرمزگان	رودان - بند ملاً	SHUM-073
۹۰	آذر	۲۰۰	57° 08' 32" E 27° 27' 17" N	حاشیه	۲	هرمزگان	رودان	SHUM-074
۹۰	آذر	۲۰۰	57° 08' 32" E 27° 27' 17" N	حاشیه	۲	هرمزگان	رودان	SHUM-075
۹۰	آذر	۲۰۰	57° 08' 32" E 27° 27' 17" N	حاشیه	۲	هرمزگان	رودان	SHUM-076
۹۰	آذر	۱۹۵	57° 11' 38" E 27° 21' 29" N	مرکز	۲	هرمزگان	رودان	SHUM-077
۹۰	آذر	۱۹۵	57° 11' 38" E 27° 21' 29" N	مرکز	۲	هرمزگان	رودان	SHUM-078
۹۰	آذر	۹۲۰	55° 55' 06" E 28° 19' 11" N	حاشیه	۱	هرمزگان	حاجی آباد	SHUM-079
۹۰	آذر	۹۲۰	55° 55' 06" E 28° 19' 11" N	حاشیه	۱	هرمزگان	حاجی آباد	SHUM-080
۹۰	آذر	۹۲۰	55° 55' 06" E 28° 19' 11" N	حاشیه	۱	هرمزگان	حاجی آباد	SHUM-081
۹۰	آذر	۹۰۱	55° 55' 13" E 28° 19' 04" N	مرکز	۲	هرمزگان	حاجی آباد	SHUM-082
۹۰	آذر	۸۹۸	55° 53' 18" E 28° 15' 08" N	حاشیه	۵	هرمزگان	حاجی آباد	SHUM-083
۹۰	آذر	۸۹۸	55° 53' 18" E 28° 15' 08" N	حاشیه	۵	هرمزگان	حاجی آباد	SHUM-084

۹۰	آذر	۱۰۷۳	56° 18' 30" E 28° 03' 42" N	مرکز	۱	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-085
۹۰	آذر	۱۰۷۳	56° 18' 30" E 28° 03' 42" N	مرکز	۱	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-086
۹۰	آذر	۱۰۷۰	56° 18' 29" E 28° 03' 40" N	حاشیه	۱	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-087
۹۰	آذر	۱۰۷۰	56° 18' 29" E 28° 03' 40" N	حاشیه	۱	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-088
۹۰	آذر	۱۰۷۰	56° 18' 29" E 28° 03' 40" N	حاشیه	۱	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-089
۹۰	آذر	۱۰۸۵	56° 18' 34" E 28° 03' 45" N	حاشیه	۲	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-090
۹۰	آذر	۱۰۸۵	56° 18' 34" E 28° 03' 45" N	حاشیه	۲	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-091
۹۰	آذر	۱۰۸۵	56° 18' 34" E 28° 03' 45" N	حاشیه	۲	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-092
۹۰	آذر	۱۰۸۵	56° 18' 34" E 28° 03' 45" N	حاشیه	۲	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-093
۹۰	آذر	۱۰۹۰	56° 24' 32" E 28° 09' 43" N	مرکز	۳	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-094
۹۰	آذر	۱۰۹۰	56° 24' 32" E 28° 09' 43" N	مرکز	۳	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-095
۹۰	آذر	۱۰۹۴	56° 24' 31" E 28° 09' 41" N	حاشیه	۳	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-096
۹۰	آذر	۱۰۹۴	56° 24' 31" E 28° 09' 41" N	حاشیه	۳	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-097
۹۰	آذر	۱۰۹۴	56° 24' 31" E 28° 09' 41" N	حاشیه	۳	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-098
۹۰	آذر	۱۱۰۰	56° 26' 35" E 28° 11' 44" N	مرکز	۴	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-099
۹۰	آذر	۱۱۰۰	56° 26' 35" E 28° 11' 44" N	مرکز	۴	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-100
۹۰	آذر	۱۱۰۷	56° 26' 37" E 28° 12' 45" N	حاشیه	۵	هرمزگان	شمیل بالا	SHUM-101
۹۰	دی	۱۳۵۹	56° 19' 58" E 27° 58' 30" N	مرکز	۳	هرمزگان	دهنه‌ی میمند	SHUM-102
۹۰	دی	۱۳۵۹	56° 19' 58" E 27° 58' 30" N	مرکز	۳	هرمزگان	دهنه‌ی میمند	SHUM-103
۹۰	دی	۱۳۵۹	56° 19' 58" E 27° 58' 30" N	مرکز	۳	هرمزگان	دهنه‌ی میمند	SHUM-104
۹۰	دی	۱۳۵۹	56° 19' 58" E 27° 58' 30" N	مرکز	۳	هرمزگان	دهنه‌ی میمند	SHUM-105
۹۰	دی	۱۳۵۲	56° 19' 52" E 27° 58' 31" N	حاشیه	۳	هرمزگان	دهنه‌ی میمند	SHUM-106
۹۰	دی	۱۳۵۲	56° 19' 52" E 27° 58' 31" N	حاشیه	۳	هرمزگان	دهنه‌ی میمند	SHUM-107
۹۰	دی	۱۳۵۲	56° 19' 52" E 27° 58' 31" N	حاشیه	۳	هرمزگان	دهنه‌ی میمند	SHUM-108
۹۰	دی	۱۳۵۲	56° 19' 52" E 27° 58' 31" N	حاشیه	۳	هرمزگان	دهنه‌ی میمند	SHUM-109
۹۰	دی	۱۴۷۹	53° 38' 42" E 29° 00' 17" N	مرکز	۴	فارس	فسا	SHUM-110
۹۰	دی	۱۱۹۶	53° 40' 45" E 28° 30' 45" N	مرکز	۱	فارس	چهرم	SHUM-111
۹۰	دی	۱۱۹۶	53° 40' 45" E 28° 30' 45" N	مرکز	۱	فارس	چهرم	SHUM-112
۹۰	دی	۱۱۹۶	53° 40' 45" E 28° 30' 45" N	مرکز	۱	فارس	چهرم	SHUM-113
۹۰	دی	۱۱۹۶	53° 40' 45" E 28° 30' 45" N	مرکز	۱	فارس	چهرم	SHUM-114

دی ۹۰	۱۱۹۶	53° 40' 45" E 28° 30' 45" N	مرکز	۱	فارس	چهرم	SHUM-115
دی ۹۰	۱۱۹۴	53° 40' 42" E 28° 30' 44" N	حاشیه	۱	فارس	چهرم	SHUM-116
دی ۹۰	۱۱۹۴	53° 40' 42" E 28° 30' 44" N	حاشیه	۱	فارس	چهرم	SHUM-117
دی ۹۰	۱۱۹۴	53° 40' 42" E 28° 30' 44" N	حاشیه	۱	فارس	چهرم	SHUM-118
دی ۹۰	۱۱۹۴	53° 40' 42" E 28° 30' 44" N	حاشیه	۱	فارس	چهرم	SHUM-119
دی ۹۰	۱۱۹۴	53° 40' 42" E 28° 30' 44" N	حاشیه	۱	فارس	چهرم	SHUM-120
دی ۹۰	۱۱۹۴	53° 40' 42" E 28° 30' 44" N	حاشیه	۱	فارس	چهرم	SHUM-121
دی ۹۰	۱۱۹۴	53° 40' 42" E 28° 30' 44" N	حاشیه	۱	فارس	چهرم	SHUM-122
دی ۹۰	۱۱۹۹	53° 47' 09" E 28° 42' 12" N	مرکز	۲	فارس	چهرم	SHUM-123
دی ۹۰	۱۱۹۹	53° 47' 09" E 28° 42' 12" N	مرکز	۲	فارس	چهرم	SHUM-124
دی ۹۰	۱۱۹۹	53° 47' 09" E 28° 42' 12" N	مرکز	۲	فارس	چهرم	SHUM-125
دی ۹۰	۱۲۰۱	53° 47' 13" E 28° 42' 07" N	حاشیه	۲	فارس	چهرم	SHUM-126
دی ۹۰	۱۲۰۱	53° 47' 13" E 28° 42' 07" N	حاشیه	۲	فارس	چهرم	SHUM-127
دی ۹۰	۱۲۰۱	53° 47' 13" E 28° 42' 07" N	حاشیه	۲	فارس	چهرم	SHUM-128
دی ۹۰	۱۲۰۱	53° 47' 13" E 28° 42' 07" N	حاشیه	۲	فارس	چهرم	SHUM-129
دی ۹۰	۱۲۰۱	53° 47' 13" E 28° 42' 07" N	حاشیه	۲	فارس	چهرم	SHUM-130
دی ۹۰	۱۲۰۱	53° 47' 13" E 28° 42' 07" N	حاشیه	۲	فارس	چهرم	SHUM-131
دی ۹۰	۱۲۰۱	53° 47' 13" E 28° 42' 07" N	حاشیه	۲	فارس	چهرم	SHUM-132
دی ۹۰	۱۱۸۹	53° 38' 51" E 28° 31' 27" N	مرکز	۴	فارس	چهرم	SHUM-133
دی ۹۰	۱۱۸۹	53° 38' 51" E 28° 31' 27" N	مرکز	۴	فارس	چهرم	SHUM-134
دی ۹۰	۱۱۸۹	53° 38' 51" E 28° 31' 27" N	مرکز	۴	فارس	چهرم	SHUM-135
دی ۹۰	۱۱۸۹	53° 38' 51" E 28° 31' 27" N	مرکز	۴	فارس	چهرم	SHUM-136
دی ۹۰	۱۱۸۹	53° 38' 51" E 28° 31' 27" N	مرکز	۴	فارس	چهرم	SHUM-137
دی ۹۰	۱۱۸۹	53° 38' 51" E 28° 31' 27" N	مرکز	۴	فارس	چهرم	SHUM-138
دی ۹۰	۱۱۸۹	53° 38' 51" E 28° 31' 27" N	مرکز	۴	فارس	چهرم	SHUM-139
دی ۹۰	۱۱۸۹	53° 38' 51" E 28° 31' 27" N	مرکز	۴	فارس	چهرم	SHUM-140
دی ۹۰	۱۱۸۹	53° 38' 51" E 28° 31' 27" N	مرکز	۴	فارس	چهرم	SHUM-141
دی ۹۰	۱۲۱۰	53° 40' 01" E 28° 31' 54" N	حاشیه	۴	کرمان	وکیل آباد	SHUM-142
دی ۹۰	۱۰۶۸	56° 18' 01" E 28° 26' 39" N	حاشیه	۴	کرمان	وکیل آباد	SHUM-143
دی ۹۰	۱۰۶۸	56° 18' 01" E 28° 26' 39" N	حاشیه	۴	کرمان	وکیل آباد	SHUM-144

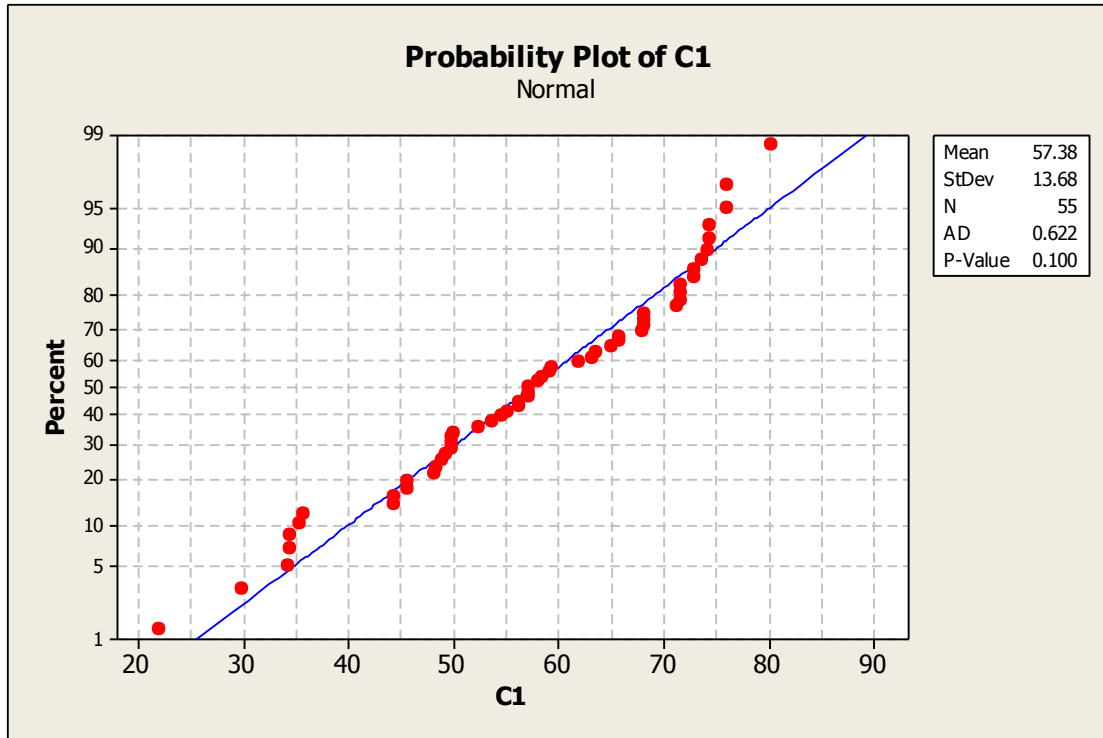
شماره‌ی جدایه	نمونه خاک	محل	استان	مختصات جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا	تاریخ جداسازی
SHUM-145	۴	جنگل ابر	سمنان	55° 02' 50" E 36° 44' 47" N	۲۰۶۱	بهمن ۹۰
SHUM-146	۴	جنگل ابر	سمنان	55° 02' 50" E 36° 44' 47" N	۲۰۶۱	بهمن ۹۰
SHUM-147	۴	جنگل ابر	سمنان	55° 02' 50" E 36° 44' 47" N	۲۰۶۱	بهمن ۹۰
SHUM-148	۵	جنگل ابر	سمنان	55° 11' 23" E 36° 38' 51" N	۲۱۸۹	بهمن ۹۰
SHUM-149	۵	جنگل ابر	سمنان	55° 11' 23" E 36° 38' 51" N	۲۱۸۹	بهمن ۹۰
SHUM-150	۷	جنگل ابر	سمنان	55° 27' 02" E 36° 31' 16" N	۲۲۰۰	بهمن ۹۰
SHUM-151	۸	جنگل ابر	سمنان	55° 24' 43" E 36° 29' 08" N	۲۱۹۶	بهمن ۹۰
SHUM-152	۱۲	جنگل ابر	سمنان	55° 19' 12" E 36° 21' 46" N	۲۱۱۴	بهمن ۹۰
SHUM-153	۱۳	جنگل ابر	سمنان	55° 33' 14" E 36° 25' 01" N	۲۰۹۲	بهمن ۹۰
SHUM-154	۱۳	جنگل ابر	سمنان	55° 33' 14" E 36° 25' 01" N	۲۰۹۲	بهمن ۹۰
SHUM-155	۱۴	جنگل ابر	سمنان	55° 30' 43" E 36° 23' 12" N	۲۱۱۸	بهمن ۹۰
SHUM-156	۱۷	جنگل ابر	سمنان	55° 32' 38" E 36° 25' 21" N	۱۷۲۵	بهمن ۹۰
SHUM-157	۱۸	جنگل ابر	سمنان	55° 48' 02" E 36° 31' 15" N	۱۶۷۰	بهمن ۹۰
SHUM-158	۱۹	جنگل ابر	سمنان	55° 46' 16" E 36° 30' 24" N	۱۶۰۰	بهمن ۹۰
SHUM-160	۱۶	جنگل ابر	سمنان	55° 46' 16" E 36° 30' 24" N	۱۶۰۷	بهمن ۹۰
SHUM-161	۵	بهشهر	مازندران	53° 52' 13" E 36° 44' 44" N	-۳	آبان ۹۰
SHUM-162	۶	مراغه	آذربایجان شرقی	46° 14' 16" E 37° 23' 00" N	۱۴۳۹	بهمن ۹۰
SHUM-163	۱	مراغه	آذربایجان شرقی	46° 13' 16" E 37° 23' 11" N	۱۴۵۵	بهمن ۹۰
SHUM-164	۲	مراغه	آذربایجان شرقی	46° 14' 21" E 37° 23' 27" N	۱۵۰۱	بهمن ۹۰
SHUM-165	۲	ساری	مازندران	52° 57' 32" E 36° 31' 05" N	۵	بهمن ۹۰
SHUM-166		کرج	البرز	50° 59' 25" E 35° 43' 15" N	۱۳۶۳	

پیوست ۲

محاسبه‌ی نرخ جداسازی قارچ *Beauveria*

نام منطقه	استان	تعداد کل لارو رها شده	تعداد لارو آلوده	نرخ جداسازی قارچ برای هر منطقه
مینودشت	گلستان	۱۰۰	۲	۲ درصد
گنبد	گلستان	۱۰۰	۱	۱ درصد
لیوان شرقی	گلستان	۱۰۰	۱	۱ درصد
بهشهر	مازندران	۱۰۰	۱۴	۱۴ درصد
بهشهر	مازندران	۱۰۰	۲	۲ درصد
ساری - قائمشهر	مازندران	۱۰۰	۲	۲ درصد
خزرشهر	مازندران	۱۰۰	۸	۸ درصد
کلوده - حسین	مازندران	۱۰۰	۳۸	۳۸ درصد
رامسر	مازندران	۱۰۰	۷	۷ درصد
رودان	هرمزگان	۱۰۰	۵	۵ درصد
بند ملأ	هرمزگان	۱۰۰	۱	۱ درصد
حاجی آباد	هرمزگان	۱۰۰	۶	۶ درصد
دهنه‌ی میمند	هرمزگان	۱۰۰	۸	۸ درصد
شمیل بالا	هرمزگان	۱۰۰	۱۷	۱۷ درصد
فسا	فارس	۱۰۰	۱	۱ درصد
جهرم	فارس	۱۰۰	۳۲	۳۲ درصد
وکیل آباد	کرمان	۱۰۰	۲	۲ درصد
جنگل ابر	سمنان	۱۰۰	۱۴	۱۴ درصد
مراغه	آذربایجان شرقی	۱۰۰	۳	۳ درصد

### پیوست ۳



نمودار داده های نرمال سازی شده بیماری زایی با استفاده از نرم افزار مینی تب داده ها یعنی میانگین درصد ۳ تکرار به نرم افزار وارد شد و نرمال سازی صورت پذیرفت سپس با استفاده از داده های نرمال شده برای رسم گراف مورد استفاده قرار گرفتند. محور افقی (C1) پراکندگی داده ها از انحراف استاندارد و محور عمودی (Percent) میانگین داده ها می باشد.



پیوست ۴

درصد همولوژی میان مناطق ITS، ۱۲ گونه‌ی متفاوت <i>Beauveria</i>												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
A												
B	۸۹,۳											
C	۴۷,۵	۴۷,۵										
D	۹۲,۶	۹۲,۶	۴۴,۸									
E	۸۹,۳	۸۹,۳	۴۴,۹	۹۲,۲								
F	۹۲,۴	۹۲,۴	۴۶,۱	۹۹,۱	۹۱,۸							
G	۹۱,۳	۹۱,۳	۴۵,۲	۹۷,۱	۹۲,۱	۹۶,۹						
H	۹۲,۶	۹۲,۶	۴۶,۲	۹۸,۹	۹۲,۸	۹۸,۷	۹۷,۱					
I	۹۰,۷	۹۰,۷	۴۶,۳	۹۵,۶	۸۹,۸	۹۶,۰	۹۵,۴	۹۵,۱				
J	۹۲,۴	۹۲,۴	۴۵,۵	۹۸,۰	۹۲,۴	۹۸,۰	۹۵,۸	۹۸,۰	۹۴,۵			
K	۸۷,۹	۸۷,۹	۴۶,۶	۹۱,۶	۹۵,۶	۹۱,۲	۹۱,۶	۹۱,۸	۸۹,۱	۹۱,۱		
L	۹۲,۶	۹۲,۶	۸۹,۹	۹۹,۶	۹۲,۶	۹۹,۱	۹۶,۹	۹۸,۹	۹۵,۶	۹۸,۲	۹۱,۶	

A = *B. bassiana*, B = *B. amorpha*, C = *B. asiatica*, D = *B. brongniartii*, E = *B. caledonica*, F = *B. kipuka*, G = *B. malawiensis*, H = *B. pseudobassiana*, I = *B. sungii*, J = *B. varroae*, K = *B. vermiconia*, L = *B. australis*

## پیوست ۵

شناسایی گونه‌ی *B. brongniartii* با استفاده از مطالعات ملکولی و مورفولوژیکی نتیجه‌ی اسلاید میکروسکوپی حاکی از وجود جنس *Beauveria* (زیگزاگی بودن سلول‌های تولید کننده‌ی کنیدی در حالی که در جنس *Cordyceps* کنیدی‌ها به شکل زنجیره‌ای یا خطی بر روی سلول‌های تولید کننده‌ی کنیدی قرار می‌گیرند) برای جدایه‌ی SHU.M.102 بود. بنابراین پذیرش جنس *Cordyceps* برای این جدایه کم رنگ شد. برای بهتر و دقیق‌تر انجام شدن امر شناسایی دو کار انجام شد. ابتدا مقایسه‌ی مورفولوژیکی جنس *Cordyceps* با جنس *Beauveria* صورت گرفت. در گام دوم ویژگی‌های رشدی جنس *Cordyceps* از سامانه‌ی US *Cordyceps*.  
(<http://cordyceps.cgrb.oregonstate.edu/>) مورد بررسی قرار گرفت. طبق کلید شناسایی هامبر<sup>۱</sup> [۱۴۶]، مشخصه‌ی مورفولوژیکی جنس *Cordyceps*، علاوه بر ایجاد کنیدی به شکل خطی بر روی سلول‌های تولید کننده‌ی کنیدی، تولید اجسام میوه‌ای شکل<sup>۲</sup> (در واقع همان هیف‌های تولیدی قارچ است) بر روی اجساد حشرات نیز می‌باشد (شکل ۴-۱). از آنجا که چنین ویژه‌گی‌ای در مورد جدایه‌ی SHU.M.102 صادق نبود، گونه‌ی *B. brongniartii* برای جدایه‌ی SHU.M.102 انتخاب شد. در مطالعه‌ی آقای جورادو<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۰۸) تصویر ماکروسکوپی *B. brongniartii* جداسازی شده از کشور اسلوواکی را ارائه کرده بودند (شکل ۴-۲). آقای جورادو و همکاران برای شکل رشدی میسیلیوم قارچ *B. brongniartii* ساختار پنجه‌ای شکل<sup>۴</sup> را توصیف کردند. در این تصویر قارچ بر روی تخته سنگی رشد کرده است. آنها بیان داشتند که گونه‌های *Beauveria* از نظر ساختار مورفولوژی بسیار متنوع هستند و متناسب با شرایط رشدی از قبیل دما، رطوبت و منبع تغذیه ساختار مورفولوژیکی آنها تغییر می‌کند [۱۲۶]. با مراجعه به آرشیو عکس‌های تهیه شده از لاروهای آلوده، یک شباهت واضح از

۱- Humber

۲- Fruit Body

۳- Jurado

۴- Claw-Like Structure

شکل آلوده شدن لاروی که جدایه‌ی SHU.M.102 از آن جداسازی شده بود با شکل رشدی میسیلیوم گونه‌ی *B. brongniartii* جلب توجه می‌کرد. شکل رشدی قارچ بر روی لارو به شکل پنجه-ای بود (شکل ۳-۴). با مقایسه‌ای که با دیگر لاروهای آلوده شده توسط گونه‌ی *B. bassiana* صورت گرفت (شکل ۴-۴) مشخص گردید که لاروهای آلوده به قارچ توسط گونه‌ی *B. bassiana* با یک لایه-ی سفید رنگی پوشیده می‌شوند. نکته‌ی جالب در مورد جدایه‌ی SHU.M.102 این است که پس از انتقال بر روی محیط کشت (SDAY) کاملاً شبیه گونه‌ی *B. bassiana* رشد می‌کند (شکل ۴-۵). هر چند منطقه‌ی ITS مسیری قابل اطمینان برای شناسایی گونه‌های *Beauveria* بود اما بدون شک ترکیب مطالعات ملکولی و مورفولوژی مکمل بسیار خوب برای شناسایی گونه‌های *Beauveria* خواهد بود.



شکل پیوست ۱: رشد *C. militaris* بر روی حشره میزبان خود. همانطور که در تصویر می بینید، اجسام میوه ای شکل از بدن حشره مرده خارج شده اند. اجسام میوه ای شکل در تصویر با پیکان نشان داده شده است.

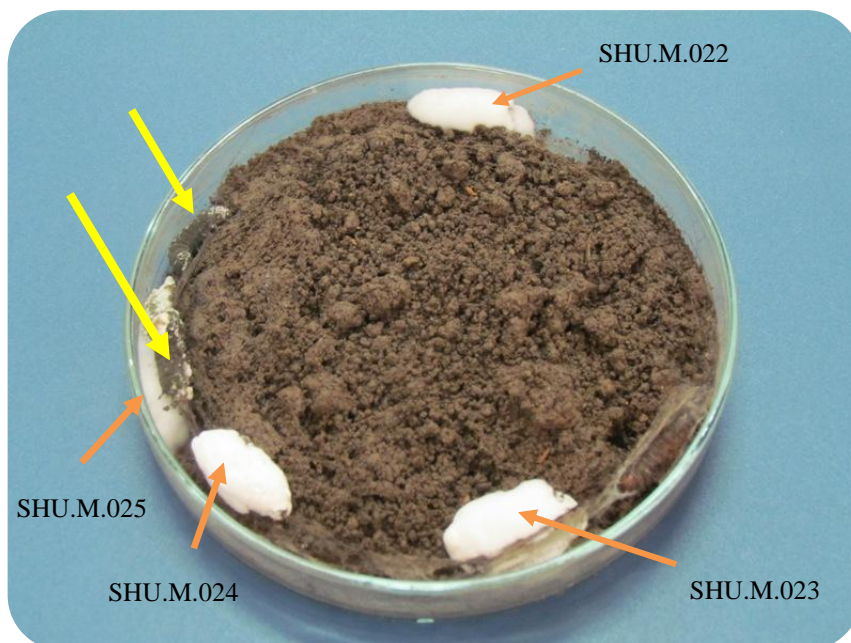
(<http://cordyceps.cgrb.oregonstate.edu>)



شکل پیوست ۲: تصویر *B. brongniartii* که بر روی تخته سنگی در منطقه ای کشور اردووسکا، Cave اسلوواکی رشد کرده است. ساختار پنجه ای شکل میسیلیوم قارچ مشهود است [۱۲۶].



شکل پیوست ۳: تصویر لارو آلوده به *B. brongniartii*. همانطور که در تصویر دیده می‌شود این گونه تولید میسلیوم با ساختار پنجه‌ای شکل ایجاد کرده است. این ساختار با پیکان قرمز رنگ نشان داده شده است.



شکل پیوست ۴: نمایی از لاروهای آلوده به *B. bassiana*. جدایه‌های *B. bassiana* با پیکان نارنجی و جدایه‌های *Metarhizium* spp. با پیکان زرد مشخص شده‌اند.



شکل پیوست ۵: جدایه‌ی SHU.M.102 بر روی محیط کشت SDAY.

منابع



1. Lacey L, Frutos R, Kaya H, Vail P: **Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?** *Biological control* 2001, **21**(3):230-248.
2. Shah P, Pell J: **Entomopathogenic fungi as biological control agents.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003, **61**(6):413-423.
3. Sun X-l, Peng H-y: **Recent advances in biological control of pest insects by using viruses in China.** *Virologica Sinica* 2007, **22**(2):158-162.
4. Van Lenteren J: **Early entomology and the discovery of insect parasitoids.** *Biological control* 2005, **32**(1):2-7.
5. Lang B, O'kelly C, Nerad T, Gray M, Burger G: **The closest unicellular relatives of animals.** *Current Biology* 2002, **12**(20):1773-1778.
6. Jobard M, Rasconi S, Solinhac L, Cauchie H-M, Sime-Ngando T: **Molecular and morphological diversity of fungi and the associated functions in three European nearby lakes.** *Environmental Microbiology* 2012, **14**(9):2480-2494.
7. Pell J, Hannam J, Steinkraus D: **Conservation biological control using fungal entomopathogens:** Springer; 2010.
8. Kiffer E, Morelet M: **The deuteromycetes. Mitosporic fungi: classification and generic keys:** Science Publishers, Inc.; 1999.
9. Sung G-H, Spatafora JW, Zare R, Hodge KT, Gams W: **A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the Clavicipitaceae.** *Nova Hedwigia* 2001, **72**(3-4):311-328.
10. Rehner SA, Buckley E: **A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs.** *Mycologia* 2005, **97**(1):84-98.
11. Blackwell M, Spatafora JW: **Fungal and Their Allies.** In: *Biodiversity of Fungi.* Edited by Mueller GM, Bills GF, Foster MS. America: Elsevier; 2001: 7-22.
12. Xiao G, Ying S-H, Wang PZ, Zhang S, Xie X-Q, Shang Y, Leger RJS, Zhao G-P, Wang C, Feng M-G: **Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*.** *Nature/ Scientific Reports* 2012, **2**: 483.
13. Glare TR: **Biotechnological Potential of Entomopathogenic Fungi.** In: *Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications.* Edited by Arora DK. America: Marcel Dekker, Inc; 2004: 79-90.
14. Zimmermann G, Papierok B, Glare T: **Elias Metschnikoff, Elie Metchnikoff or Ilya Ilich Mechnikov (1845-1916): a pioneer in insect pathology, the first describer of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and how**



- to translate a Russian name. *Biocontrol Sci Technol* 1995, **5**:527-530.
15. Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST: **Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol**: Springer; 2010.
  16. Jaronski ST: **Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens**: Springer; 2010.
  17. Arora DK: **Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications**: CRC Press; 2003.
  18. Eilenberg J, Hajek A, Lomer C: **Suggestions for unifying the terminology in biological control**. *BioControl* 2001, **46**(4):387-400.
  19. Mueller GM, Gerald F, Foster MS: **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**: Access Online via Elsevier; 2004.
  20. Reddy N, Singh Y, Dureja P, Singh S: **Bioefficacy of insecticides, biopesticides and their combinations against podborers in pigeonpea**. *Indian Journal of Entomology* 2001, **63**(2):137-143.
  21. Pereira RM, Roberts DW: **Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana***. *Journal of invertebrate pathology* 1990, **56**(1):39-46.
  22. Burges HD: **Formulation of mycoinsecticides**: Springer; 1998.
  23. Strasser H, Vey A, Butt TM: **Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species?** *Biocontrol Science and Technology* 2000, **10**(6):717-735.
  24. Fukuda T, Arai M, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Omura S: **New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity, Produced by *Beauveria* sp. FKI-1366. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties**. *The Journal of antibiotics* 2004, **57**(2):110-116.
  25. Krasnoff SB, Gupta S: **Identification of the antibiotic phomalactone from the entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii* var. *synnematos***. *Journal of chemical ecology* 1994, **20**(2):293-302.
  26. Ahn Y-J, Park S-J, Lee S-G, Shin S-C, Choi D-H: **Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2000, **48**(7):2744-2748.
  27. Ying S-H, Feng M-G: **Novel blastospore-based transformation system for integration of phosphinothricin resistance and green fluorescence protein genes into *Beauveria bassiana***. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, **72**(1):206-210.

28. Lomer C, Bateman R, Johnson D, Langewald J, Thomas M: **Biological control of locusts and grasshoppers.** *Annual review of entomology* 2001, **46**(1):667-702.
29. Meyling NV: **PCR-based characterisation of entomopathogenic fungi for ecological studies.** *Journal of invertebrate pathology* 2008, **65**(5):137-145.
30. Gaude N, Bortfeld S, Duensing N, Lohse M, Krajinski F: **Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development.** *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2012, **69**(3):510-528.
31. Sasan RK, Bidochka MJ: **The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development.** *Am J Bot* 2012, **99**(1):101-107.
32. Schüßler A, Schwarzott D, Walker C: **A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution.** *Mycological Research* 2001, **105**(12):1413-1421.
33. Behie S, Zelisko P, Bidochka M: **Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants.** *Science* 2012, **336**(6088):1576-1577.
34. Behie SW, Bidochka MJ: **Potential agricultural benefits through biotechnological manipulation of plant fungal associations.** *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2013, **35**(4):328-331.
35. Pozo MJ, Azcon-Aguilar C: **Unraveling mycorrhiza-induced resistance.** *Current opinion in plant biology* 2007, **10**(4):393-398.
36. Liu J, Blaylock LA, Endre G, Cho J, Town CD, VandenBosch KA, Harrison MJ: **Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis.** *The Plant cell* 2003, **15**(9):2106-2123.
37. St Leger RJ, Wang C: **Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **85**(4):901-907.
38. MacLeod D: **Investigations on the Genera *Beauveria* vuill, and *Tritirachium* Limber.** *Canadian Journal of Botany* 1954, **32**(6):818-890.
39. Zimmermann G: **Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*.** *Biocontrol Science and Technology* 2007, **17**(6):553-596.
40. Wagner BL, Lewis LC: **Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*.** *Applied and Environmental Microbiology* 2000, **66**(8):3468-3473.

41. Doberski J, Tribe H: **Isolation of entomopathogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*** *Transactions of the British Mycological Society* 1980, **74**:95-100.
42. Meyling NV, Eilenberg J: **Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation.** *Mycological Research* 2006, **110**(2):188-195.
43. Leatherdale D: **The arthropod hosts of entomogenous fungi in Britain.** *Entomophaga* 1970, **15**(4):419-435.
44. Aslantaş R, Eken C, Hayat R: ***Beauveria bassiana* pathogenicity to the cherry slugworm, *Caliroa cerasi* (Hymenoptera: Tenthredinidae) larvae.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008, **24**(1):119-122.
45. Maniania NK, Bugeme DM, Wekesa VW, Delalibera Jr I, Knapp M: **Role of entomopathogenic fungi in the control of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), pests of horticultural crops.** *Experimental and Applied Acarology* 2008, **46**(1-4):259-274.
46. Bugeme D, Maniania N, Knapp M, Boga H: **Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*.** *Experimental and Applied Acarology* 2008, **46**(1-4):275-285.
47. Eken C, Tozlu G, Dane E, Çoruh S, Demirci E: **Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) to Larvae of the Small Poplar Longhorn Beetle, *Saperda populnea* (Coleoptera: Cerambycidae).** *Mycopathologia* 2006, **162**(1):69-71.
48. Wekesa VW, Maniania NK, Knapp M, Boga HI: **Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*.** *Experimental & Applied Acarology* 2005, **36**(1-2):41-50.
49. Castrillo LA, Thomsen L, Juneja P, Hajek AE: **Detection and quantification of *Entomophaga maimaiga* resting spores in forest soil using real-time PCR.** *Mycological Research* 2007, **111**(3):324-331.
50. Pfeifer TA, Khachatourians GG: **Electrophoretic Karyotype of the Entomopathogenic Deuteromycete *Beauveria bassiana*.** *Journal of invertebrate pathology* 1993, **61**(3):231-235.
51. Viaud M, Couteaudier Y, Levis C, Riba G: **Genome organization in *Beauveria bassiana*: electrophoretic karyotype, gene mapping, and telomeric fingerprint.** *Fungal Genetics and Biology* 1996, **20**:175-183.
52. Stock SP: **Insect pathogens: molecular approaches and techniques:** CABI; 2009.
53. Melzer MJ, Bidochka MJ: **Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for**

- fungal growth and virulence.** *Mycologia* 1998:586-594.
54. Dalzoto PR, Glienke-Blanco C, Kava-Cordeiro V, Ribeiro JZ, Kitajima EW, Azevedo JL: **Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*.** *Mycological Research* 2006, **110**(12):1475-1481.
  55. Ghikas DV, Kouvelis VN, Typas MA: **Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1-5.8S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii*.** *BMC microbiology* 2010, **10**(1):174.
  56. Eriksson O, Baral H-O, Currah R, Hansen K, Kurtzman C, Rambold G, Læssøe T: **Outline of Ascomycota-2003.** *Myconet* 2003(9 (1):1-89.
  57. Kasuga T, White TJ, Taylor JW: **Estimation of nucleotide substitution rates in eurotiomycete fungi.** *Molecular Biology and Evolution* 2002, **19**(12):2318-2324.
  58. Vega FE, Blackwell M: **Insect-fungal associations: ecology and evolution.** Oxford University Press; 2005.
  59. Rehner SA, Minnis AM, Sung G-H, Luangsa-ard JJ, Devotto L, Humber RA: **Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*.** *Mycologia* 2011, **103**(5):1055-1073.
  60. St Leger RJ, Allee LL, May B, Staples RC, Roberts DW: **World wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp.** *Mycological Research* 1992, **96**:1007-1015.
  61. Fernandes É, Moraes Á, Pacheco R, Rangel D, Miller M, Bittencourt V, Roberts D: **Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non Brazilian isolates and other *Beauveria* species.** *Journal of applied microbiology* 2009, **107**(3):760-774.
  62. Aquino de Muro M, Elliot S, Moore D, Parker BL, Skinner M, Reid W, El Bouhssini M: **Molecular characterization of *Beauveria bassiana* isolates from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species).** *Mycological Research* 2005, **109**:294-306.
  63. Rehner SA, Buckley EP: **Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales).** *Molecular Ecology Notes* 2003, **3**:409-411.
  64. Anderson IC, Campbell CD, Prosser JI: **Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil.** *Environmental Microbiology* 2003, **5**(1):36-47.
  65. Chillali M, Idder-Ighili H, Guillaumin J, Mohammed C, Escarmant B, Botton B: **Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the**

- biological species of European *Armillaria*. *Mycological Research* 1998, 102(5):533-540.**
66. Pantou MP, Mavridou A, Typas MA: **IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis.** *Fungal genetics and biology : FG & B* 2003, **38**(2):159-174.
  67. Coates BS, Hellmich RL, Lewis LC: ***Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP.** *Mycological Research* 2002, **106**(1):40-50.
  68. Jensen AB, Eilenberg J: **Genetic variation within the insect-pathogenic genus *Entomophthora*, focusing on the *E. muscae* complex, using PCR—RFLP of the ITS II and the LSU rDNA.** *Mycological Research* 2001, **105**(3):307-312.
  69. Rohel E, Couteaudier Y, Papierok B, Cavelier N, Dedryver C: **Ribosomal internal transcribed spacer size variation correlated with RAPD-PCR pattern polymorphisms in the entomopathogenic fungus *Erynia neoaphidis* and some closely related species.** *Mycological Research* 1997, **101**(5):573-579.
  70. Entz SC, Johnson DL, Kawchuk LM: **Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*.** *Mycological Research* 2005, **109**(11):1302-1312.
  71. Blackwell M: **The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?** *American Journal of Botany* 2011, **98**(3):426-438.
  72. Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AG, Worm B: **How many species are there on Earth and in the ocean?** *PLoS biology* 2011, **9**(8):e1001127.
  73. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL: **Biological identifications through DNA barcodes.** *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 2003, **270**(1512):313-321.
  74. Hebert PD, Ratnasingham S, de Waard JR: **Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species.** *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 2003, **270**(Suppl 1):S96-S99.
  75. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW: **Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, **109**(16):6241-6246.
  76. Schindel D, Miller SE: **DNA barcoding a useful tool for taxonomists.** *Nature* 2005, **17**:435.
  77. Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, van der Bank M, Chase MW, Cowan RS, Erickson DL, Fazekas AJ: **A DNA**



- barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, **106**(31):12794-12797.**
78. Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W: **Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010, **87**(1):99-108.**
  79. Eberhardt U: **A constructive step towards selecting a DNA barcode for fungi. *New Phytologist* 2010, **187**(2):265-268.**
  80. Stackebrandt E, Goebel B: **Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1994, **44**(4):846-849.**
  81. Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Stazell-Tallman A: **Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000, **50**(3):1351-1371.**
  82. Buee M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, Uroz S, Martin F: **454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* 2009, **184**(2):449-456.**
  83. Schoch CL, Sung G-H, López-Giráldez F, Townsend JP, Miadlikowska J, Hofstetter V, Robbertse B, Matheny PB, Kauff F, Wang Z: **The Ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic biology* 2009, **58**(2):224-239.**
  84. Tanabe Y, Watanabe MM, Sugiyama J: **Are *Microsporidia* really related to Fungi?: a reappraisal based on additional gene sequences from basal fungi. *Mycological Research* 2002, **106**(12):1380-1391.**
  85. Tefera T, Pringle K: **Germination, radial growth, and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and their virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at different temperatures. 2003, **13**(7):699-704.**
  86. Ekesi S, Maniania N, K., Ampong- Nyarko: **Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Science and Technology* 1999, **9**:177 - 185.**
  87. Searle T, Doberski J: **An investigation of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as a potential biological control agent for *Oryzaephilus surinamensis* (L.). *Journal of Stored Products Research* 1984, **20**(1):17-23.**
  88. Dal Bello G, Padin S, López Lastra C, Fabrizio M: **Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored**

- grains. *Journal of Stored Products Research* 2000, **37**(1):77-84.
89. Padín S, Dal Bello G, Fabrizio M: **Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*.** *Journal of Stored Products Research* 2002, **38**(1):69-74.
  90. Samodra H, Ibrahim Y: **Effects of dust formulations of three entomopathogenic fungal isolates against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice grain.** *Jurnal Biosains* 2006, **17**(1):1-7.
  91. Hidalgo E, Moore D, Le Patourel G: **The effect of different formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais* in stored maize.** *Journal of Stored Products Research* 1998, **34**(2-3):171-179.
  92. Padin S, Dal Bello G, Fabrizio M: **Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*.** *Journal of Stored Products Research* 2002, **38**(1):69-74.
  93. Smith SM, Moore D, Karanja LW, Chandi EA: **Formulation of vegetable fat pellets with pheromone and *Beauveria bassiana* to control the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* (Horn).** *Pesticide Science* 1999, **55**(7):711-718.
  94. Safavi S, Shah FA, Pakdel AK, Reza Rasoulia G, Bandani AR, Butt TM: **Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*.** *FEMS Microbiology Letters* 2007, **270**(1):116-123.
  95. Darbro JM, Graham RI, Kay BH, Ryan PA, Thomas MB: **Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** *Biocontrol Science and Technology* 2011, **21**(9):1027-1047.
  96. Talaei-Hassanloui R, Kharazi-Pakdel A, Goettel M, Mozaffari J: **Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics.** *Biocontrol Science and Technology* 2006, **16**(5):525-534.
  97. Petlamul W, Prasertsan P: **Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme Activity.** *Mycobiology* 2012, **40**(2):111-116.
  98. Varela A, Morales E: **Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*.** *Journal of Invertebrate Pathology* 1996, **67**(2):147-152.
  99. Cruz LP, Gaitan AL, Gongora CE: **Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, **71**(6):918-926.

100. Johny S, Kyei-Poku G, Gauthier D, Frankenhuyzen Kv, Krell PJ: **Characterization and virulence of Beauveria spp. recovered from emerald ash borer in southwestern Ontario, Canada.** *Journal of Invertebrate Pathology* 2012, **111**:41-49.
101. Meyling NV, Pilz C, Keller S, Widmer F, Enkerli J: **Diversity of Beauveria spp. isolates from pollen beetles, Meligethes aeneus, in Switzerland.** *Journal of invertebrate pathology* 2012, **109**(1):76-82.
102. Vega FE, Posada F, Catherine Aime M, Pava-Ripoll M, Infante F, Rehner SA: **Entomopathogenic fungal endophytes.** *Biological Control* 2008, **46**(1):72-82.
103. Elliot SL, Sabelis MW, Der Geest Van LPS, Beerling EAM, Franssen J: **Can plants use entomopathogens as bodyguards?** *Ecology Letters* 2000, **3**(3):228-235.
104. White JF, Belanger F, Meyer W, Sullivan RF, Bischoff JF, Lewis EA: **Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes: Development of symbiotic interactions with plants.** *Symbiosis* 2002, **33**(3):201-213.
105. Meyling NV, Pell JK, Eilenberg J: **Dispersal of Beauveria bassiana by the activity of nettle insects.** *Journal of Invertebrate Pathology* 2006, **93**(2):121-126.
106. Zimmermann G: **The Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil.** *Journal of Applied Entomology* 1986, **102**(1-5):213-215.
107. Bidochka MJ, Kasperski JE, Wild GA: **Occurrence of the entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana in soils from temperate and near-northern habitats.** *Canadian Journal of Botany* 1998, **76**(7):1198-1204.
108. Vänninen I: **Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type.** *Mycological Research* 1996, **100**(1):93-101.
109. Asensio L, Carbonell T, Lopez Jimenez J, Lopez Llorca L: **Entomopathogenic fungi in soils from Alicante province (Spain).** *Spanish Journal of Agricultural Research* 2003, **1**(3):37-45.
110. Wyrebek M, Huber C, Sasan RK, Bidochka MJ: **Three sympatrically occurring species of Metarhizium show plant rhizosphere specificity.** *Microbiology* 2011, **157**:2904-2911.
111. Tuininga AR, Miller JL, Morath SU, Daniels TJ, Falco RC, Marchese M, Sahabi S, Rosa D, Stafford III KC: **Isolation of entomopathogenic fungi from soils and Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) ticks: prevalence and methods.** *Journal of medical entomology* 2009, **46**(3):557.
112. Meyling NV, Eilenberg J: **Occurrence and distribution of soil borne**



- entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem.** *Agriculture, ecosystems & environment* 2006, **113**(1):336-341.
113. Luz C, Netto MCB, Rocha LFN: **In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate-pathogenic and saprobic fungi.** *Mycopathologia* 2007, **164**(1):39-47.
114. Humber RA: **Identification of Entomopathogenic Fungi.** In: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology.* Edited by Lacey L, second edn. Academic Press: ELSEVIER; 2012: 151-187.
115. Draganova SA, Takov DI, Doychev DD: **Naturally-occurring entomopathogenic fungi on three bark beetle species (Coleoptera: Curculionidae) in Bulgaria.** *Pesticidi i fitomedicina* 2010, **25**(1):59-63.
116. Santos-Villalobos Sdl, Guzmán-Ortiz DA, Gómez-Lim MA, Délano-Frier JP, de-Folter S, Sánchez-García P, Peña-Cabriales JJ: **Potential Use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a Biological Control Agent against Anthracnose in Mango (*Mangifera indica* L.).** *Biological Control* 2013, **64**:37-44.
117. Abbott W: **A method of computing the effectiveness of an insecticide.** *J econ Entomol* 1925, **18**(2):265-267.
118. Castrillo LA, Griggs MH, Vandenberg JD: **Vegetative compatibility groups in indigenous and mass-released strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: likelihood of recombination in the field.** *Journal of Invertebrate Pathology* 2004(86):26-37.
119. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J: **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** *PCR protocols: a guide to methods and applications* 1990, **18**:315-322.
120. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W: **A greedy algorithm for aligning DNA sequences.** *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 2000, **7**(1-2):203-214.
121. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** *Molecular Biology and Evolution* 2011, **28**(10):2731-2739.
122. Sevim A, Demir I, Ho"fte M, Humber R, A., Demirbag Z: **Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey.** *BioControl* 2010, **55**:279-297.
123. Shin TY, Lee WW, Ko SH, Choi JB, Bae SM, Choi JY, Lee KS, Je YH, Jin BR, Woo SD: **Distribution and characterisation of entomopathogenic fungi from Korean soils.** *Biocontrol Science and Technology* 2013, **23**(3):288-304.
124. Brownbridge M, Humber RA, Parker BL, Skinner M: **Fungal**

- 
- entomopathogens recovered from Vermont forest soils.** *Mycologia* 1993, **85**(3):358-361.
125. Uma Devi K, Padmavathi J, Uma Maheswara Rao C, Khan A, P, , Mohan M, C: **A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae).** *Biocontrol Science and Technology* 2008, **18**(9/10):975-989.
126. Jurado V, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C: **Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage: a review.** *International Biodeterioration & Biodegradation* 2008, **62**(4):325-330.

مقالات و کنفرانس ها

**Abstract:**

*Beauveria* is a globally distributed genus of soil-borne entomopathogenic hyphomycetes of interest as a model system for the study of entomopathogenesis and the biological control of pest insects. Species recognition in *Beauveria* is difficult due to a lack of taxonomically informative morphology. This matter has prevented assessment of species diversity in this genus. In total, we have isolated 166 isolates of *Beauveria* from different location of Iran. These isolates were isolated with insect bait method. Molecular analyses were done based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences for thirty five isolates. Based on molecular characteristics, 29 isolates were identified as *Beauveria bassiana*, 3 isolates as *B. amorpha*, 1 isolate *B. brongniartii*, 1 isolate *B. malawiensis* and 1 isolate *B. sungii*. Phylogenetic trees were inferred using Neighbor-Joining method. Four well supported clades with compared *Beauveria* from others species.

In this study, in order to find a more effective and safe biological control agent, we investigated different isolates of *B. bassiana* and tested their pathogenicity on *Sitophilus oryzae*, measure of growth rate and conidial production. For bioassays, Concentrations of conidia were calculated using a haemocytometer and adjusted to  $1 \times 10^8$  viable conidi/ml. Isolate SHU.M.022 was the most pathogenic against *S. oryzae*, with 89.9 % mortality. Isolates SHU.M.018, SHU.M.163 and SHU.M.042 were the least pathogenic against *S. oryzae*, with 25 % mortality. Investigation of growth rate showed isolate SHU.M.068 with mean 18.28 ml/day was the most growth rate and the isolate SHU.M.023 was the least growth rate (4.31 ml/day). Examination of conidial production exhibit isolate SHU.M.156 with mean  $37.83 \times 10^6$  conidi/ml was the most conidial production and the isolate SHU.M.015 with mean 4.417 conidi/ml was the least conidial production.