



دانشگاه شاهرود

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

آنالیز بیان برخی ژن های قارچ *Beauveria* در مواجهه با کوتیکول دو

حشره *Tribolium* و *Galleria*

معصومه کردی

اساتید راهنما:

دکتر ناصر فرخی

دکتر شاهرخ قرنجیک

تیرماه ۱۳۹۳

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه شاهرود

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

آنالیز بیان برخی ژن‌های قارچ *Beauveria* در مواجهه با کوتیکول دو

حشره *Tribolium* و *Galleria*

دانشجو:

معصومه کردی

اساتید راهنما:

دکتر ناصر فرّخی

دکتر شاهرخ قرن‌جیک

استاد مشاور:

دکتر علی درخشان شادمهری

پایان‌نامه‌ی ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی

تیر ماه ۱۳۹۳

دانشگاه شاهرود

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه کارشناسی ارشد خانم معصومه کردی

تحت عنوان: آنالیز بیان برخی ژن های قارچ *Beauveria* در مواجهه با کوتیکول دو حشره *Galleria* و *Tribolium*

در تاریخ ۱۳۹۳/۴/۲۳ توسط کمیته تخصص زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد مورد ارزیابی و با درجه.....مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	استاد مشاور	امضاء	اساتید راهنما
	آقای دکتر علی درخشان شادمهری		آقای دکتر ناصر فرخی
			آقای دکتر شاهرخ قرنچیک

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	آقای دکتر مسعود حکیمی تبار		خانم دکتر مریم عجم حسنی
			آقای دکتر مجتبی ممرآبادی

تقدیم بہ بی بدیل ترین بہانہ زندگی ام

مادم، دریای بی کران فداکاری و عشق، کہ وجودم برایش ہمہ رنج است و

وجودش بر ایم ہمہ مہر.

و بہ روان پاک پدرم کہ انسانی وارستہ بودند.

کہ دعای خیرشان، ہموارہ بدرقہ راہم بودہ و ہست.

و تمام عزیزانم.

شکر و قدردانی:

سپاس و ستایش مرخداى راجل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، در فشان. آفریدگاری که خویش را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید. و به، همیشگی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

نخست از خانواده عزیزم که ز نهاد دوران تحصیل، بلکه در تمام زندگی با دعای خیرشان و کمک در انجام مسؤلیت هایم، حامی و پشتیبانم بودند، صمیمانه شکر و قدردانی می نمایم.

شکر و سپاس فراوان از زحمات بی شائبه اساتید محترم راهنا، اساتید گرانقدرم جناب آقای دکتر ناصر فرخی، جناب آقای دکتر شاهرخ قریبیک و استاد محترم مشاور جناب آقای دکتر علی درخشان شادهمری که بکلی از ابتدای راه و در طی انجام این تحقیق، بارها سنائی های خود مراد انجام پایان نامه و نگارش این اثریاری نمودند، که بی شک بدون مساعدت و یاریشان انجام این تحقیق محال بود. و سرکار خانم دکتر مریم عجم حسنی و جناب آقای دکتر مجتبی ممرآبادی که زحمت داورى این اثر را بر عهده گرفته اند و همچنین استاد محترم جناب آقای دکتر مسعود حکیمی تبار که به عنوان ناینده تحصیلات تکمیلی قدم رنج فرموده و هدایت این جلسه را بر عهده گرفتند و همچنین قدردانی و تقدیر از راهنائی ها و زحمات تامی اساتید بزرگوار و عزیزم در دانشکده کشاورزی که در طی هفت سال دوران دانشجویی از ابتدای راه مرایاری کردند، و شکر و قدردانی خاص از کارشناسان محترم آزمایشگاه سرکار خانم مهندس سمیه فرجی، جناب آقای مهندس غلامرضا ساگری، آقای مهندس محمد ابراهیم حسین پور، خانم مهندس احمدی، آقای مهندس حسن گلی که مراد انجام کار با حمایت های بی دریغشان یاری نمودند. از تمامی دوستان و همراهان عزیزم به ویژه از خانم مهندس آمنه یوسفی کیا، خانم مهندس الناز فیمبی، خانم مهندس مهسا جوکار، آقای مهندس ابوالفضل مسعودی و آقای مهندس علیرضا آروم، کمال شکر و قدردانی را دارم.

معضومه کردی تیرماه ۹۳

به امید روزی که بتوانم ذره ای از زحماتتان را جبران نمایم.

تعمدنامه

اینجانب معصومه کردی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان‌نامه **آنالیز بیان برخی ژن‌های قارچ *Beauveria* در مواجهه با کوتیکول دو حشره *Tribolium* و *Galleria* تحت راهنمایی آقایان دکتر ناصر فرخی و دکتر شاهرخ قرنجیک متعهد می‌شوم.**

- تحقیقات در این پایان‌نامه 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 پایان‌نامه 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 بدست آوردن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

امضاء دانشجو:

تاریخ:

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.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

قارچ‌های بیمارگر حشرات، از قبیل *Beauveria spp.* در کنترل جمعیت حشرات موثر هستند. قارچ *Beauveria spp.* علاوه بر اینکه فاز ساپروفیت بر روی بقایای گیاهان و حشرات دارد، دارای دامنه میزبانی گسترده‌ای در بین حشرات و عنکبوت‌ها است. که نظر به تفاوت ترکیب، بافت و ساختار اپی-کوتیکول و پروکوتیکول حشرات ممکن است، مجموعه‌های متفاوتی از ژن‌های قارچی، الگوهای بیان متفاوتی را نشان دهند. این تغییرات با آنالیز کلی بیان ژن یا آنالیز تعدادی از ژن‌های کاندیدای قارچی، در مواجهه با کوتیکول حشرات مختلف مشخص می‌شود. در این تحقیق دو جدایه قارچی *Beauveria* با قدرت بیماری‌زایی متفاوت، ضعیف و قوی استفاده شد. کوتیکول‌های چهار حشره به نام-های *Eurygaster* و *Calliptamus italicus*، *Galleria mellonella*، *Tribolium castaneum* و *integriceps* جدا شدند و در محیط رشد قارچ مورد استفاده قرار گرفتند. بنابراین چهار محیط کشت حداقل عصاره کوتیکولی (القایی) و یک محیط کشت فاقد عصاره کوتیکولی به عنوان کنترل برای رشد دو جدایه قارچی استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های مورد مطالعه با نام‌های پروتئاز باسیاسین I، دای‌پتیدیل‌پپتیداز، سنسور کلسیم، سیتوکروم P450 و پروتئین کیناز طراحی شد و تغییرات بیان این ژن‌ها از طریق RT-PCR نیمه کمی مطالعه شد. سه ژن اول در مواجهه با محیط-های عصاره کوتیکولی به صورت معنی‌داری القا شدند و بیشترین میزان بیان را در مواجهه با عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی نشان دادند. در مقابل و به صورت جالب توجهی، کاهش بیان برای دو ژن دیگر در محیط کشت حداقل در مقایسه با محیط کشت کنترل مشاهده شد. علاوه بر این، دو جدایه قارچی نیز در محیط کشت‌های مختلف، رفتار متفاوتی نشان دادند.

واژگان کلیدی: قارچ‌های بیمارگر حشرات، کوتیکول حشرات، بیان ژن، افزایش بیان، کاهش بیان

مطالعه بیوانفورماتیکی پپتیدازهای هضم کننده کوتیکول خانواده S8 در قارچ‌های بیماریزای حشرات

معصومه کردی، ناصر فرخی، شاهرخ قرنجیک، علی درخشان شادمهری

هشتمین همایش ملی بیوتکنولوژی و چهارمین همایش ملی ایمنی زیستی - تهران (پوستر)

۱۳۹۲ تیرماه ۱۵-۱۷

مطالعه بیوانفورماتیکی آنزیم‌های سیتوکروم P450 در قارچ بیماریزای حشرات *Beauveria bassiana*

معصومه کردی، ناصر فرخی، شاهرخ قرنجیک، علی درخشان شادمهری

هشتمین همایش ملی بیوتکنولوژی و چهارمین همایش ملی ایمنی زیستی - تهران (پوستر)

۱۳۹۲ تیرماه ۱۵-۱۷

تولید کیتیناز توسط قارچ بیمارگر حشرات *B. amorpha* در محیط کشت غوطه‌ور

معصومه کردی، ناصر فرخی، شاهرخ قرنجیک، علی درخشان شادمهری، الناز فهیمی

اولین همایش علوم و مهندسی محیط زیست و توسعه پایدار - تهران (سخنرانی - علمی - پژوهشی)

۱۳۹۲ بهمن ۱۶ تا ۱۷

۱	فصل اول - مقدمه و کلیات
۲	۱-۱. جایگاه کنترل بیولوژیک
۴	۲-۱. قارچ‌های بیمارگر حشرات
۴	۳-۱. مکانیسم عمل قارچ‌های بیمارگر حشرات
۶	۱-۳-۱. اتصال
۷	۲-۳-۱. جوانه‌زنی
۸	۳-۳-۱. نفوذ در کوتیکول
۸	۴-۱. قارچ بیمارگر حشرات جنس <i>Beauveria</i> spp.
۱۱	۵-۱. سیکل زندگی قارچ <i>B. bassiana</i>
۱۱	۶-۱. ساختار و ترکیب کوتیکول حشرات
۱۲	۷-۱. دامنه میزبانی قارچ بیمارگر <i>Beauveria</i> spp.
۱۴	۸-۱. فرمولاسیون قارچ بیمارگر حشرات <i>Beauveria</i> spp.
۱۵	۹-۱. آنزیم‌های هضم‌کننده کوتیکول در قارچ‌های بیمارگر حشرات
۱۶	۱-۹-۱. کیتینازها
۱۷	۲-۹-۱. پروتئازها
۱۸	۳-۹-۱. لیپازها
۱۹	۴-۹-۱. سایر آنزیم‌ها
۲۰	۱۰-۱. ژن‌های مورد بررسی در <i>Beauveria</i> spp.
۲۱	۱۱-۱. اهداف تحقیق
۲۱	۱۲-۱. حشرات مورد آزمایش و ترکیب کوتیکولی آنها
۲۲	۱-۱۲-۱. پروانه موم‌خوار
۲۳	۲-۱۲-۱. سوسک قرمز آرد
۲۶	۳-۱۲-۱. ملخ ایتالیایی
۲۶	۴-۱۲-۱. سن گندم
۲۷	فصل دوم - مرور منابع
۲۸	۱-۲. مطالعه بیان ژن‌ها و روش RT-PCR نیمه کمی
۳۱	۲-۲. مروری بر مطالعات بیان ژن‌های قارچ <i>Beauveria</i> spp. در سطح RNA
۳۵	۳-۲. مروری بر مطالعات انجام شده روی ژن‌های مورد مطالعه
۳۵	۱-۳-۲. ژن کنترل درونی گاما اکتین
۳۷	۲-۳-۲. پروتئاز ترش‌حی باسیاسین I
۳۸	۳-۳-۲. دای‌پتیدیل پپتیداز
۴۱	۴-۳-۲. پروتئین کیناز

۴۴	۵-۳-۲. سیتوکروم P450 مونواکسیژناز
۴۶	۶-۳-۲. سنسور کلسیم
۴۹	فصل سوم - مواد و روش‌ها
۵۰	۱-۳. مواد
۵۱	۲-۳. تجهیزات
۵۱	۳-۳. پرورش حشرات
۵۱	۱-۳-۳. پرورش پروانه موم‌خوار
۵۳	۲-۳-۳. پرورش سوسک قرمز آرد
۵۵	۴-۳. جمع‌آوری آفات زراعی از مزرعه
۵۵	۱-۴-۳. جمع‌آوری ملخ ایتالیایی
۵۵	۲-۴-۳. جمع‌آوری سن گندم
۵۸	۵-۳. روش جداسازی کوتیکول از حشرات
۵۹	۶-۳. جدایه‌های قارچی
۵۹	۷-۳. محیط کشت قارچ <i>B. bassiana</i>
۶۳	۸-۳. روش تهیه و استریل کردن محیط عصاره کوتیکولی
۶۳	۹-۳. تهیه سوسپانسیون اسپور و شرایط کشت
۶۳	۱۰-۳. آماده‌سازی میسلیم قارچی جهت استخراج RNA
۶۴	۱۱-۳. استخراج RNA از قارچ <i>B. bassiana</i>
۶۵	۱۲-۳. تعیین مقدار و کیفیت RNA استخراج شده
۶۶	۱۳-۳. تیمار با DNase I
۶۶	۱۴-۳. سنتز cDNA
۶۷	۱۵-۳. طراحی پرایمر جهت تکثیر ژن‌ها از روی رشته اول cDNA سنتز شده
۶۷	۱۶-۳. انتخاب ژن کنترل درونی و انجام PCR
۶۹	۱۷-۳. روش تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات
۷۱	فصل چهارم - نتایج
۷۳	۱-۴. وزن توده میسلیمی حاصل از رشد قارچ
۷۳	۲-۴. تعیین کیفیت نمونه‌های RNA
۷۵	۳-۴. نرمال‌سازی داده‌های هر ژن نسبت به ژن کنترل
۷۵	۴-۴. بیان ژن گاما اکتین
۷۵	۵-۴. بیان ژن باسیاسین I
۷۷	۶-۴. بیان ژن دای‌پتیدیل پپتیداز
۷۹	۷-۴. بیان ژن پروتئین کیناز
۸۱	۸-۴. بیان ژن سیتوکروم P450
۸۳	۹-۴. بیان ژن سنسور کلسیم

۸۷	فصل پنجم - بحث و پیشنهادات
۸۸	۱-۵. توانایی قارچ جهت رشد بر روی حشرات آزمایشی
۸۹	۲-۵. ژن گاما اکتین
۸۹	۳-۵. ژن پروتئاز هضم کننده کوتیکول باسیاسین
۹۱	۴-۵. ژن دای پپتیدیل پپتیداز
۹۲	۵-۵. ژن پروتئین کیناز
۹۳	۶-۵. ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز
۹۴	۷-۵. ژن سنسور کلسیم
۹۵	پیشنهادات
۹۷	ضمائم
۱۰۵	منابع
	چکیده انگلیسی
۱۱۴	کنفرانس ها و همایش ها و مقالات چاپ شده

۵	جدول ۱-۱. قارچ‌های بیمارگر حشرات تولید شده به صورت تجاری و آزمایشی
۱۰	جدول ۱-۲. رده‌بندی قارچ بیمارگر حشرات <i>Beauveria</i> sp.
۲۴	جدول ۱-۳. درصد آمینواسیدهای موجود در کوتیکول حشره بالغ پروانه موم‌خوار در سوبستراهای مختلف
۲۵	جدول ۱-۴. درصد انواع هیدروکربن‌های موجود در کوتیکول سوسک قرمز آرد
۲۹	جدول ۱-۲. برتری‌ها و کاستی‌های روش‌های مطالعه بیان ژن
۳۲	جدول ۲-۲. اسامی و مشخصات ژن‌های <i>B. bassiana</i> مطالعه شده در مواجهه با کوتیکول حشرات متفاوت
۵۲	جدول ۱-۳. رده‌بندی پروانه موم‌خوار
۵۴	جدول ۲-۳. رده‌بندی سوسک قرمز آرد
۵۶	جدول ۳-۴. رده‌بندی ملخ ایتالیایی
۵۷	جدول ۳-۴. رده‌بندی سن گندم
۶۸	جدول ۳-۵. پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق
۹۹	جدول ضمیمه ۱. جدول تجزیه واریانس وزن توده میسلیمی حاصل از رشد قارچ <i>Beauveria</i> spp. در مواجهه با محیط کشت‌های متفاوت
۱۰۰	جدول ضمیمه ۲. میزان جذب نمونه‌های RNA در A ₂₆₀ و غلظت RNA برحسب میکروگرم بر میکرولیتر
۱۰۱	جدول ضمیمه ۳. جدول تجزیه واریانس میزان کمی بیان ژن گاما اکتین در دو جدایه قارچ <i>Beauveria</i> spp. در مواجهه با محیط کشت‌های متفاوت
۱۰۱	جدول ضمیمه ۴. جدول تجزیه واریانس میزان بیان ژن پروتئاز هضم کننده کوتیکول در دو جدایه قارچ <i>Beauveria</i> spp. در مواجهه با محیط کشت‌های متفاوت
۱۰۱	جدول ضمیمه ۵. جدول تجزیه واریانس میزان بیان ژن دای‌پپتیدیل پپتیداز در دو جدایه قارچ <i>Beauveria</i> spp. در مواجهه با محیط کشت‌های متفاوت
۱۰۲	جدول ضمیمه ۶. جدول تجزیه واریانس میزان بیان ژن پروتئین کیناز در دو جدایه قارچ <i>Beauveria</i> spp. در مواجهه با محیط کشت‌های متفاوت
۱۰۲	جدول ضمیمه ۷. جدول تجزیه واریانس میزان بیان ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز در دو جدایه قارچ <i>Beauveria</i> spp. در مواجهه با محیط کشت‌های متفاوت
۱۰۲	جدول ضمیمه ۸. جدول تجزیه واریانس میزان بیان ژن سنسور کلسیم در دو جدایه قارچ <i>Beauveria</i> spp. در مواجهه با محیط کشت‌های متفاوت
۱۰۳	جدول ۹. اسامی ژن‌های درگیر در فرآیندهای سلولی که در مواجهه با کوتیکول حشرات متفاوت، پلی-مورفیسم بانندی نشان دادند.

صفحه	فهرست اشکال
۹	شکل ۱-۱. ساختار کوتیکول حشرات و روش نفوذ هیف قارچی
۴۰	شکل ۱-۲. ارزیابی RT-PCR نیمه کمی رونوشت‌های β -tubulin و <i>Bb DPP</i> تحت شرایط <i>in vitro</i> و <i>in vivo</i>
۵۲	شکل ۱-۳. مراحل زندگی پروانه موم‌خوار
۵۴	شکل ۲-۳. مراحل زندگی سوسک قرمز آرد
۵۶	شکل ۳-۳. ملخ ایتالیایی
۵۷	شکل ۴-۳. حشره بالغ سن گندم
۶۰	شکل ۵-۳. مراحل کار جهت جداسازی کوتیکول حشرات
۶۲	شکل ۶-۳. محیط کشت‌های مختلف جهت رشد قارچ
۷۳	شکل ۱-۴. مقایسه وزن تر توده میسلیمی حاصل از رشد قارچ <i>Beauveria spp.</i> بر روی پنج نوع محیط کشت
۷۴	شکل ۲-۴. الگوی الکتروفورزی نمونه‌های RNA استخراجی
۷۶	شکل ۳-۴. بررسی بیان ژن گاما اکتین
۷۸	شکل ۴-۴. بررسی بیان ژن ژن باسیاسین I
۸۰	شکل ۵-۴. بررسی بیان ژن دای‌پپتیدیل‌پپتیداز
۸	شکل ۶-۴. بررسی بیان ژن پروتئین کیناز
۸	شکل ۷-۴. بررسی بیان ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز.
۸	شکل ۸-۴. بررسی بیان ژن سنسور کلسیم
۹	شکل ۱. ضمیمه. مراحل کار با نرم‌افزار Image J

فصل اول

مقدمه و کلیات

نیاز به محصولات کشاورزی در جهان و کشور ما روز افزون است. یکی از روش‌های بسیار مؤثر برای افزایش تولید در واحد سطح، جلوگیری از تلفات ناشی از آفات و بیماری‌ها است. که بدین منظور در کشورهای مختلف به خصوص کشورهای در حال توسعه معمولاً از سموم شیمیایی استفاده می‌شود. یکی از رهیافت‌های موفق غیرشیمیایی در مدیریت آفات، کنترل بیولوژیک آنها است. قارچ‌ها از موقعیت مهمی در رابطه با کنترل آفات برخوردار هستند. البته وجود برخی محصولات تجاری و در حال گسترش بودن محصولات تجاری قارچی حاکی از آن است که استفاده از قارچ‌ها جهت کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی رو به افزایش است. زیست‌شناسی مولکولی ابزارهای لازم برای توصیف دقیق مکانیسم بیماری‌زایی و در بلند مدت برای تولید موجودات تغییر یافته ژنتیکی (تراریخته) با ویژگی‌های جدید را فراهم کرده است. در این تحقیق به مطالعه تغییرات بیان ژن تعدادی از ژن‌های درگیر در هضم کوتیکول و بیماری‌زایی قارچ *Beauveria* spp. در مواجهه با حشرات متفاوت، به منظور استفاده از این نتایج در زمینه‌های مختلف از جمله مهندسی ژنتیک (کاربرد ژن‌های درگیر در بیماری‌زایی در زمینه تولید موجودات تراریخته)، خواهیم پرداخت. در این فصل در خصوص جایگاه کنترل بیولوژیک، قارچ‌های بیمارگر حشرات، قارچ *Beauveria* spp.، سیکل زندگی قارچ *Beauveria bassiana*، مکانیسم عمل قارچ‌های بیمارگر حشرات، اتصال، جوانه‌زنی، نفوذ در کوتیکول، ساختار و ترکیب کوتیکول حشرات، دامنه میزبان قارچ *Beauveria* spp.، فرمولاسیون قارچ *Beauveria* spp.، آنزیم‌های هضم‌کننده کوتیکول، ژن‌های مورد بررسی در *Beauveria* spp.، حشرات مورد آزمایش و ترکیب کوتیکولی آنها به صحبت می‌پردازیم.

۱-۱. جایگاه کنترل بیولوژیک^۱

به طور کلی روش‌های کنترل آفات را می‌توان به دو گروه مبارزه شیمیایی و مبارزه غیرشیمیایی تقسیم نمود. روش‌های مبارزه غیرشیمیایی از قبیل روش‌های بیولوژیک، زراعی و مکانیکی می‌باشد. مبارزه

1 - Biological Control

بیولوژیک عبارتست از استفاده از شکارچیان و عوامل بیماری‌زا (باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و سایر عوامل) است، که جمعیت آفت را زیر سطح زیان اقتصادی نگاه می‌دارد. منظور از کنترل زراعی اجرای عملیاتی است که محیط زندگی حشره را نامساعد می‌سازد و یا مراحل حساس رشد گیاه را از دسترس حشره دور می‌دارد. کنترل مکانیکی عملیاتی است که به طور مستقیم بر روی بافت‌های بیمار گیاه آلوده به حشرات در مراحل مختلف رشدی انجام می‌شود، به‌عنوان مثال از تله‌ها جهت کنترل مکانیکی حشرات استفاده می‌شود. بهره‌گیری از ترکیبات شیمیایی روش کنترل مؤثر حشرات است. با این همه در اغلب موارد کنترل حشره با یک روش امکان‌پذیر نیست و باید از چند روش به طور هم زمان استفاده نمود که به آن مبارزه تلفیقی گفته می‌شود (۱). استفاده گسترده و روز افزون از حشره‌کش‌های شیمیایی برای کنترل آفات، توجه محققین را به نکاتی از قبیل خطرات زیست‌محیطی، گسترش مقاومت در حشرات آفت، باقیمانده سموم در مواد غذایی و اثر روی عوامل غیرهدف و حشرات مفید معطوف داشته است. در اثر این عوامل و از طرفی دیگر با بالا رفتن سطح آگاهی عموم، تحقیقات گسترده و مستقیمی برای توسعه استراتژی‌های جایگزین برای کنترل آفات از جمله تشخیص و به‌کارگیری روش‌های غیر شیمیایی به ویژه کنترل بیولوژیک انجام شده است (۲).

عوامل کنترل بیولوژیک میکروبی (ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و نماتدها) به طور طبیعی کنترل‌کننده‌ی آفات هستند و در قیاس با کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی خسارت کمتری به طبیعت وارد می‌کنند، بنابراین جایگزین بسیار مناسبی برای این آفت‌کش‌ها هستند. در واقع آنها دشمنان طبیعی از بین برنده آفات، با اثرات غیر مخرب روی سلامتی انسان و محیط زیست هستند. قارچ‌های بیمارگر حشرات از نظر موقعیت در بین همه عوامل کنترل بیولوژیک مؤثرتر هستند، اما هنوز به علت محدودیت‌های تحقیقی، اقتصادی و اجتماعی در جهان سوم و کشور ما این تحقیقات توسعه چندان نداشته است و تنها درصد کوچکی از کل حشره‌کش‌های موجود در بازار را پوشش می‌دهند (۳). در بین عوامل کنترل بیولوژیک

قارچ‌ها به سبب آسانی توزیع^۱، فزونی فورمولاسیون^۲، شمار عظیم نژادهای پاتوژنیک^۳ شناخته شده، آسانی تکنیک‌های مهندسی ژنتیک^۴ و بیان فوق العاده پروتئین‌های درونی^۵ یا سموم ترشحي^۶ مهم‌تر از بقیه هستند (۳). این قارچ‌ها چندین برتری نسبت به آفت‌کش‌های شیمیایی دارند اینکه فعالانه میزبان را مورد حمله قرار می‌دهند و سیکل‌های عفونت (چرخه‌ی بیمارگری) پی‌درپی دارند (۴). لذا از راهکارهای کاهش استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی، تولید آفت‌کش‌های بیولوژیک مبتنی بر قارچ‌های بیمارگر حشرات است. که در ادامه به توصیف قارچ‌های بیمارگر حشرات، و خصوصا *Beauveria spp.* خواهیم پرداخت.

۱-۲. قارچ‌های بیمارگر حشرات^۷

قارچ‌ها بیمارگرهای طبیعی معمول حشرات هستند و تقریباً ۱۰۰۰ گونه قارچی گزارش شده است که حشرات، عنکبوت‌ها را از بین می‌برند (۵). بیشتر قارچ‌های بیمارگر حشرات در کلاس *Deuteromycetes*^۸ و راسته *Entomophthorales*^۹ قرار دارند (۴). قارچ‌های مهم بیمارگر حشرات شامل *B. bassiana*، *Verticillium*، *Metarhizium anisopliae*، *Culicinomyces clavisporus*، *Hirsutella thompsonii* و *Nomuraea rileyi* و *lecanii* می‌باشند، که تعدادی از محصولات تجاری این قارچ‌های بیمارگر و حشرات میزبان آنها در جدول ۱-۱ آورده شده است (۳).

۱-۳. مکانیسم عمل قارچ‌های بیمارگر حشرات

در زیستگاه‌های خاکی واحد آلوده‌کننده قارچ، کنیدیوم است. کنیدی به کمک عواملی از قبیل باد و آب با

1 - Easy Delivery

2 - Improving Formulation

3 - Pathogenic Strains

4 - Easy Engineering Techniques

5 - Endogenous

6 - Exogenous

7 - Entomopathogenic Fungi

۶ - این کلاس از قارچ‌ها تولیدمثل جنسی ندارند، بنابراین به دلیل سیکل زندگی‌شان آنها را قارچ‌های ناقص می‌نامند.

۷ - راسته‌ای از قارچ‌ها، که اغلب گونه‌های آن پاتوژن حشرات هستند، و قبلاً در کلاس زیگومیست‌ها قرار داشتند.

جدول ۱-۱. قارچ‌های بیماری‌گر حشرات تولید شده به صورت تجاری و آزمایشی (۳، ۶).

قارچ	محصول/نام تجاری	شرکت/تولیدکننده (کشور)	آفات هدف
<i>Culicinomyces clavisporus</i>		(Austria, Belgium, Czech)	Mosquito larvae
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Mycar	(Austria, Belgium)	Citrus rust mite
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Meta-Sin		Spittle bug, Sugarcane frog hopper
<i>Nomuraea rileyi</i>			Lepidopteran larvae
<i>Verticillium lecanii</i>	Vertalec		Aphids; Coffee greenbug, Greenhouse whitefly thrips
<i>Beauveria bassiana</i>	Bio-Power	Stanes (India)	Mite; Coffee greenbug
	BotaniGard ES; BotaniGard 22WP	Laverlam International (USA)	
	Boverol	Fytovita (Czech Republic)	
	Conidia	LST (Columbia)	
	Mycotrol ES; Mycotrol-O	Laverlam International (formerly Emerald BioAgriculture) (USA)	
	Naturalis	Intrachem (Italy)	Aphids Spittle bug;
	Naturalis-L Andermatt Biocontrol	Troy Biosciences Inc (USA)	
	Ostrinil	Arysta (formerly NPP, Calliope) (France)	
	Proecol	Probioagro (Venezuela)	
	Racer BB	SOM Phytopharma (India)	
<i>B. brongniartii</i> (<i>B. tenella</i>)	Trichobass-L; Trichobass-P	AMC Chemical/Trichodex (Spain)	
	<i>Beauveria</i> Schweizer	Lbu (formerly Eric Schweizer seeds) (Switzerland)	Greenhouse whitefly thrips Mosquito larvae
	Betel	Arysta (formerly NPP,) (France)	
	Biolisa-Kamikiri	Nitto Denko (Japan)	
	Engerlingspilz	Andermatt Biocontrol (Switzerland)	
	Melocont-Pilzgerste	Agrifutur-Kwizda (Italy, Austria)	

حشرات تماس پیدا می کند، کنیدی اغلب قارچ های بیمارگر حشرات خاصیت چسبندگی به کوتیکول را دارد (۷). به محض تماس با کوتیکول مناسب، تحت شرایط مطلوب (برای مثال مواد غذایی، رطوبت، دما) کنیدیوم جوانه می زند و بعضی ساختارهای عفونی (برای مثال متورم شدن لوله تندش^۱، پوشش خارج سلولی یا آپرسوریوم^۲) شکل می گیرد که نفوذ هیفی را باعث می شود (۸). شناخت کنونی ما از قارچ های بیمارگر حشرات نشان داد که آنها از طریق یک سری حوادث سیستماتیک مانند اتصال اسپور، جوانه زنی، نفوذ در کوتیکول، رشد و تکثیر در بدن میزبان، برهم کنش با مکانیسم های دفاعی حشره که به صورت وابسته رخ می دهد، سرانجام باعث مرگ حشره میزبان می شوند (۹).

۱-۳-۱. اتصال^۳

پیش نیاز شروع عفونت، اتصال کنیدی قارچ به کوتیکول حشره است. در حالی که همه نیروهای اختصاصی در هم چسبی اسپور و سطح معلوم نشده اند، شماری از این مکانیسم ها معرفی می شوند. نتایج کار فارگوس گواه این مطلب بود که، شارژ الکترواستاتیک باعث تماس اولیه بین اسپور و کوتیکول می گردد. مکانیسم دیگری که این برهمکنش را پایدار می کند پروتئین های متصل به کربوهیدرات خاص، به نام لکتین است، که در صورت حضور روی سطح اسپور، بخش قندی روی کوتیکول حشره را تشخیص خواهد داد، این لکتین ها روی سطح قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* شناسایی شده است. از طرفی آبگریزی کنیدی، نتیجه وجود لایه ای بسیار سازمان یافته از پروتئین های سطحی معروف به rodlets است (۹)، که در اتصال اسپور بسیار موثر است. دو ژن هیدروفوبین که در قارچ *B. bassiana* بیان می شود در تشکیل پوشش محافظ اسپور (rodlet) درگیر هستند. زانگ و همکاران (۲۰۱۱) با تولید موتانت های فاقد ژن های

1 - Germ Tube
2 - Appressorium
3 - Attachment

هیدروفوبین در قارچ *B. bassiana* متوجه نقش این پروتئین‌های آمفی‌پاتی در تشکیل لایه rodlet، آب-گریزی سطحی، چسبندگی و بیماری‌زایی شدند (۱۰).

۱-۳-۲. جوانه‌زنی^۱

اغلب قارچ‌های هیفومیست بیمارگر حشرات دامنه میزبان وسیعی دارند و در نتیجه الزامات آنها برای جوانه‌زنی و رشد بی‌گمان ساده است. اغلب این قارچ‌ها می‌توانند مستقیماً روی محیط‌های مبتنی بر کوتیکول کشت داده شوند که نشان دهنده توانایی آنها برای سنتز آنزیم‌های هیدرولیتیک مورد نیاز برای هضم این سوبسترای پیچیده است (۱۱-۱۳). قارچ *B. bassiana* قادر به سنتز کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای مانند گلیکوژن^۲، مانیتول^۳، اریتریتول^۴، گلیسرول^۵ و آرابیتول^۶ است و تولید این ماکرومولکول‌ها متأثر از محیطی است که قارچ در آن قرار دارد. بر همین اساس حضور ازت، لیپید و کربوهیدرات در محیط کشت در اتصال، جوانه‌زنی و بیماری‌زایی کنیدی نقش ویژه‌ای را ایفا می‌نماید (۹).

مسیرهای پیام رسان ثانویه همچنین در شروع جوانه‌زنی اسپور، تولید پلی‌ساکاریدهای چسبناک خارج سلولی و سنتز و رهاسازی آنزیم‌های هضم‌کننده در *M. anisopliae* درگیر هستند. آنتاگونیست‌های کالمادولین سنتز پروتئین کنیدیایی را کاهش می‌دهند و مانع تقسیم هسته‌ای و جوانه‌زنی می‌شوند. در مقابل، تنها ترشح پروتئین و فسفوریلاسیون، نه سنتز وابسته به یون کلسیم شناسایی شده است. در حالی که کالمادولین به طور اصلی در قطب‌های کنیدی، محل‌های مستعدی برای پیدایش لوله تندش و ذخیره یون کلسیم در اندامک‌هایی از قبیل میتوکندری و واکوئل‌ها، متمرکز می‌شود (۹).

1 - Germination
2 - Glycogen
3 - Mannitol
4 - Erythritol
5 - Glycerol
6 - Arabitol

۱-۳-۳. نفوذ در کوتیکول^۱

کوتیکول حشره از پروتئین و کیتین با لیپیدهای وابسته و ترکیبات فنولیک تشکیل شده است که به عنوان مانعی در برابر هجوم میکروارگانیسم‌ها است. هیف می‌تواند از طریق هر قسمت از بدن میزبان در برپوش نفوذ کند، هرچند، معمولاً در چین‌های بین بخشی^۲ کنیدی‌ها به دام می‌افتند و فرآیند نفوذ به آسانی رخ می‌دهد. بعضی پاتوژن‌های قارچی از قبیل *M. anisopliae* و *Uromyces appendiculatus* قادر به تولید پوشش موسیلاژی^۳ یا آپرسوریا هستند که در ثابت نگه داشتن کنیدی به سطح کمک می‌کند. گمان می‌رود که این ساختارها نیروهای هیدرواستاتیک و آنزیم‌های هضم‌کننده را در محل نفوذ متمرکز می‌کنند. در *B. bassiana* این ساختارهای عفونت تخصص یافته به ندرت مشاهده می‌شود و همانطور که با مطالعات میکروسکوپ الکترونی مشاهده شده است، در این قارچ نفوذ مستقیم هیف اتفاق می‌افتد (۹). اما بعد از اینکه به معرفی جزئی مراحل و چگونگی عمل قارچ‌های بیمارگر حشرات پرداختیم لازم است شناختی در خصوص کوتیکول حشرات داشته باشیم. که در شکل ۱-۱ مکانیسم عمل قارچ‌های بیمارگر حشرات جهت نفوذ در کوتیکول و ساختار و ترکیب کوتیکولی حشرات نشان داده شده است.

۱-۴. قارچ بیمارگر حشرات جنس *Beauveria* spp.

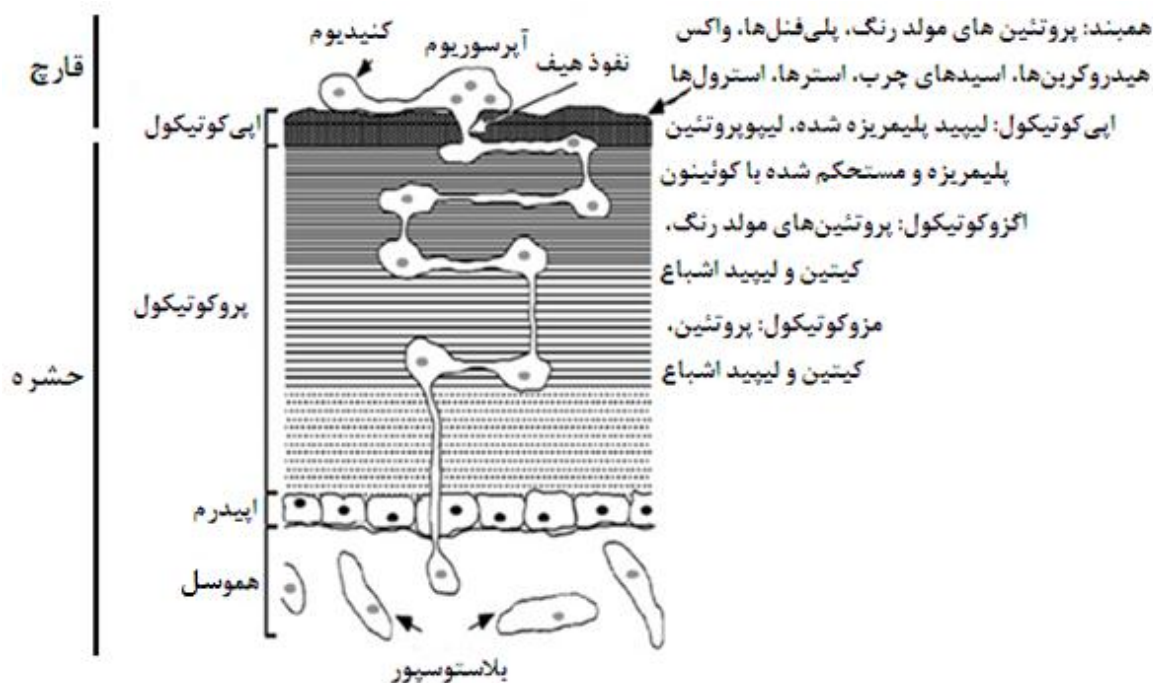
اولین گزارش از قارچ‌های بیمارگر حشرات، *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin بوده است، که در ۲۷۰۰ سال قبل از میلاد^۴ در چین کشف شد (۱۴). قارچ *Beauveria* (جدول ۱-۲) در رده قارچ‌های ناقص بوده، و جنسی آنامورف با پراکنش جهانی از قارچ‌های بیمارگر بندپایان است. مرحله آنامورف آن *Cordyceps bassiana* است، اما هر دو فرم به ندرت، با هم در طبیعت دیده می‌شوند. این جنس دارای

1 - Cuticle Penetration

2 - Intersegmental Folds

3 - Mucilaginous (ترشح کننده موسیلاژ (موسیلاژ یک گلیکوپروتئین قطبی و یک اگزوپلی ساکارید است).

4 - Before Christ (BC)



شکل ۱-۱. ساختار کوتیکول حشرات و روش نفوذ هیف قارچی. کوتیکول از دولایه از خارج به داخل اپی کوتیکول و پرو کوتیکول تشکیل شده است. اپی کوتیکول کمپلکس بسیار باریکی است، که فاقد کیتین و حاوی پروتئین‌های مستحکم شده با فنل است با یک لایه واکسی حاوی اسیدهای چرب، لیپیدها و استرول‌ها پوشیده شده است. پرو کوتیکول بیشترین قسمت کوتیکول را تشکیل می‌دهد و حاوی فیبرهای کیتین جاسازی شده در پروتئین و لیپید و کوئینون است. سلول‌های اپیدرمی ترشح کننده کوتیکول سطح بدن حشره را می‌پوشانند. هموسل، حفره بدنی حشره است که بافت‌ها و ارگان‌ها در آن شناور هستند. کنیدی قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* روی سطح میزبان جوانه می‌زند و آپرسوریوم روی سطح میزبان شکل می‌گیرد. بنابراین شکل‌گیری آپرسوریوم نقش کلیدی در برقراری برهمکنش پاتوژن میزبان بازی می‌کند. بعد از آن هیف است که داخل بدن حشره نفوذ می‌کند (۱).

جدول ۱-۲. رده بندی قارچ بیمارگر حشرات *Beauveria* sp.

Taxonomy	Scientific classification
Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Class	Hyphomycete
Order	Hypocreales
Family	Cordycipitaceae
Genus	<i>Beauveria</i>

گونه‌های شناخته‌ای از قبیل *B. asiatica*، *B. kipukae*، *B. varroae*، *B. brongniartii*، *B. bassiana*، *B. amorpha* و *B. sungii* می‌باشد (۱۵). که در این تحقیق به مطالعه بیان برخی ژن‌های *B. amorpha* و *B. sungii* دو جدایه *B. amorpha* و *B. iranica* (۱۶) از قارچ *Beauveria* در مواجهه با کوتیکول چهار نوع حشره خواهیم پرداخت. از آنجا که بیشتر مطالعات انجام شده روی گونه *B. bassiana* انجام شده است بیشتر اطلاعات جمع‌آوری شده در این تحقیق درباره‌ی این گونه می‌باشد.

۵-۱. سیکل زندگی قارچ *B. bassiana*

مشابه سایر پاتوژن‌های قارچی، *B. bassiana* نیز سیکل زندگی دوشکلی از خود نشان داده است (۱۷). در محیط کشت مصنوعی و خاک *Beauveria spp.* به شکل رشته‌ای رشد می‌یابد و کنیدی تولید می‌کند. تحت شرایط مناسب، پس از اتصال کنیدی به کوتیکول حشره و جوانه‌زنی، لوله‌های تندش شکل می‌گیرد و سپس در کوتیکول میزبان نفوذ کرده و به هموسل می‌رسد. در همولنف حشره، توسعه قارچ از طریق اجسام هیفی شبه مخمری، صورت می‌گیرد، که یک فاز پارازیتیک اجباری است و به طور نرمال در خارج از حشره میزبان مشاهده نمی‌شود، و آنها را در همولنف حشره داریم. اجسام هیفی تولید شده در موجود زنده در همولنف گردش می‌کند و به سرعت توسط جوانه‌زنی توسعه می‌یابند. پس از مرگ میزبان چرخه-ی زندگی قارچ به رشد هیفی خود باز می‌گردد. سرانجام فاز میسلیمی بیرون کوتیکول ایجاد می‌شود و کنیدیوفورهای شفاف و مشخصی را روی سطح خارجی میزبان تولید می‌کنند (۱۸).

۶-۱. ساختار و ترکیب کوتیکول حشرات

کوتیکول حشرات از طریق لایه‌ای از سلول‌های اپیدرمی ترشح می‌شود که تمام سطح بدن حشره، سیستم تراشه‌ای، بخش جلویی و عقبی دستگاه گوارشی را می‌پوشاند (۱۹). مطالعات نشان داده است که کوتیکول حشره از بیش از ۷۰٪ پروتئین تشکیل شده است و شگفت‌انگیز نیست که بیان پروتئین‌های قارچی خارج

سلولی در فرآیند نفوذ خیلی مهم هستند (۲۰). کوتیکول از خارج شامل دو لایه اپی کوتیل و پرو کوتیکول می باشد (شکل ۱-۱) که اپی کوتیل (مخلوط های پیچیده ای از ترکیبات زنجیره بلند همچون هیدروکربن ها، استرهای مومی، استرهای استرولی، کتون ها، الکل ها و کوتین ها) با ساختاری بسیار پیچیده، کیتین ندارد و حاوی پروتئین های فنلی مستحکمی است که با لایه ای واکسی حاوی اسیدهای چرب، لیپیدها و استرول ها پوشیده می شود. اما پرو کوتیکول که بیشتر کوتیکول را شامل می شود حاوی تارچه های کیتین جاسازی شده درون شبکه ای پروتئینی همراه با لیپیدها و کوین ها^۱ می باشد (۱). کوتیکول مانع از دست رفتن آب در حشره و همچنین محافظت در برابر حمله میکروارگانیسم ها، پارازیت ها، و شکارگرها می گردد (۱۹).

۷-۱. دامنه میزبانی قارچ بیمارگر *Beauveria* spp.

بعضی قارچ های پاتوژن حشرات دامنه میزبانی محدودی دارند، برای مثال *Aschersonia aleyrodis* تنها شپشک ها^۲ و مگس سفید را آلوده می کند، در حالی که دیگر گونه های قارچی (مانند *Metarhizium anisopliae* و *Beauveria bassiana*) دامنه میزبانی وسیعی دارند (۱).

گونه های *M. anisopliae* و *B. bassiana* بیمارگر بسیاری از حشرات هستند که به عنوان عواملی جهت کنترل بیولوژیک آفات کشاورزی سراسر دنیا استفاده می شوند، در کلمبیا حدود ۱۱ شرکت حداقل ۱۶ محصول مبتنی بر قارچ های *B. bassiana* را به تولید تجاری رسانده اند. این محصولات نه تنها در محصول قهوه همچنین برای کلم، ذرت، لوبیا، گوجه فرنگی، و سیب زمینی استفاده می شوند (۲۱). دامنه وسیعی از گونه *B. bassiana* از حشرات متفاوتی از سراسر دنیا خالص شده است که از نظر کشاورزی یا پزشکی مهم

1 - Quinone
2 - Scale Insects

هستند. میزبان‌های مهم پزشکی شامل ناقلین بیماری‌های عفونی گرمسیری مثل مگس تسه‌تسه^۱ ناقل بیماری تریپانوزومی، پشه خاکی^۲ که لشمانیا^۳ و حشرات جنس‌های تریاتوما^۴ و رودنیوس^۵ که ناقلان بیماری چاگاس^۶ هستند. میزبان‌های مهم کشاورزی شامل سوسک کلرادو^۷ سیب زمینی، شب پره سیب، و چندین جنس از موربانه‌ها می‌باشند (۱). در حال حاضر در کنترل حشرات زیان آور محصولات زراعی و باغی از قارچ *B. bassiana* استفاده می‌گردد، همچنین از آن برای کنترل آفات انباری مهم از قبیل شپشه برنج^۸ سوسک دانه غلات^۹ سوسک قرمز آرد^{۱۰} و سوسک لوبیا^{۱۱} استفاده شده است (۱). در چین *B. bassiana* بر علیه کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت^{۱۲}، لیسه‌های گونه‌های دندرولیموس^{۱۳} کاج، و زنجره‌های سبز گونه‌های نفوتتیکس^{۱۴} به کار رفته است. در شوروی سابق^{۱۵}، *B. bassiana* تحت نام تجاری Boverin جهت کنترل سوسک برگ‌خوار سیب زمینی^{۱۶} و شب پره سیب^{۱۷} تولید می‌شود. فرمولاسیون تجاری قارچ *Beauveria* جهت استفاده در دسترس است (۲۲). برای مثال به منظور ارزیابی قارچ پاتوژن *Beauveria* در مزارع جنوب شرق چین، دو جدایه فرموله شده از این قارچ بر روی مزارع این مناطق اسپری شد و جهت بررسی حضور قارچ در مزرعه، لاشه حشرات از سطح مزرعه جمع‌آوری و نمونه‌برداری شدند نتایج نشان داد که حتی نژادهای غیر بومی می‌توانند در محیط‌های محلی و در حشرات میزبان غیر هدف زنده

1 - *Glossina morsitans morsitans*

2 - *Phlebotomus*

3 - *Leishmania*

4 - *Triatoma*

5 - *Rhodnius*

6 - Chagas

7 - Colorado

8 - *Sitophilus oryzae* L.

9 - *Rhizopertha dominica* F.

10 - *Tribolium castaneum* Hbst.

11 - *Acanthosceledus obtectus* (Say)

12 - *Ostrinia nubilalis*

13 - *Dendrolimus* spp.

14 - *Nephotettix* spp.

15 - Soviet Union

16 - *Leptinotarsa decemlineata*

17 - *Laspeyresia pomonella*

بمانند (۲۳). یکی از ویژگی های مثبت قارچ های بیمارگر حشرات به ویژه *B. bassiana* سازگاری آن با آفت کش ها می باشد (۲۴, ۲۵).

۱-۸. فرمولاسیون قارچ بیمارگر حشرات *Beauveria spp.*

لازمه موفقیت در تولید تجاری و استفاده از عوامل قارچی کنترل کننده حشرات این است که جدایه قارچی استفاده شده شرایط لازم جهت تولید انبوه و فرمولاسیون، رشد بالا، اسپورزایی فراوان و بیماریزایی بسیار بالا برای آفات هدف باشد، هزینه های تولید از طریق پیشرفت محیط کشت های ارزان و در دسترس کم باشد و روش تولید آسان باشد، سوما، محصولات میکروبی باید برای کنترل آفات مختلف با جنبه های بیولوژیکی متفاوت فرموله شوند و سرانجام، محصولات فرموله شده باید برای ذخیره طولانی مدت تحت شرایط طبیعی یا تقریباً طبیعی بدون از دست رفتن معنی دار زیست پذیری آنها مناسب باشند. قارچ *Beauveria spp.* به آسانی روی هر دو نوع محیط کشت های جامد و مایع با سرعت بالا رشد می کند و کنیدی هوایی و بلاستوسپور تولید می کند. دیواره بلاستوسپورهای *Beauveria spp.* باریک و طی خشک شدن بعد از تخمیر و تحت شرایط کاربرد مزرعه ای ناپایدار هستند در صورتی که کنیدی ها انعطاف پذیری بیشتری دارند. تلاش ها برای تولید کنیدی ها در مقیاس وسیع توجه پژوهشگران زیادی را جلب کرده است. کنیدی ها یا بلاستوسپورهای *Beauveria spp.* به صورت سوسپانسیون آبی، امولسیون و یا با یک پودر حامل مانند آرد، با دستگاه هایی که سموم شیمیایی در مزرعه پاشیده می شوند در مزرعه تلقیح می گردند. در حال حاضر به طور مثال در کشور چین حدود ۱/۳-۰/۸ میلیون هکتار از مزارع و جنگل های مختلف با پودر کنیدی *Beauveria spp.* حفاظت می شود. بسته به میزان بیماریزایی ایزوله، نوع اسپور استفاده شده (کنیدی غرق شده، کنیدی هوایی، بلاستوسپور)، روش به کارگیری و نوع حشره ای که تصمیم به کنترل آن را داریم غلظت اسپور استفاده شده متفاوت است. به طور مثال در آزمایشات مزرعه-

ای در فرانسه اثبات شد که استفاده از قارچ *B. brongniartii* در مورد کرم سفید ریشه^۱ باعث همه‌گیری و کاهش جمعیت آفت می‌گردد. وقتی بلاستوسپورها با غلظت‌های به ترتیب 2×10^{13} و 2×10^{14} اسپور در هکتار در خاک تلقیح می‌شوند باعث ۵۶/۶ - ۱۴/۴ درصد و ۳۸ - ۸۰ درصد مرگ و میر در مرحله‌ی لاروی سوسک می‌گردند (۲۶).

۹-۱. آنزیم‌های هضم‌کننده کوتیکول در قارچ‌های بیمارگر حشرات

فرآیند نفوذ در کوتیکول حشره به عمل آنزیم‌های هیدرولازی مانند پروتئازها، کیتینازها و لیپازها نیاز دارد که ترکیبات اصلی کوتیکول را هضم می‌کنند و مواد غذایی را برای قارچ فراهم می‌نمایند (۹، ۲۷، ۲۸). این آنزیم‌ها به شیوه‌ای هماهنگ و با توجه به ساختار کوتیکول حشره ساخته می‌شوند (۲۹، ۳۰) در آزمایشگاه نشان داده شده است که در صورت حضور کوتیکول حشره، ترشح این آنزیم‌ها القا می‌گردند. از دلایلی که قارچ‌ها بیش از حد جهت توسعه به عنوان آفت‌کش‌های بیولوژیک مطالعه شده‌اند، این است که، برخلاف باکتری‌ها و ویروس‌ها، حشرات را بیشتر از طریق نفوذ مستقیم در کوتیکول و کمتر مانند حشره-کش‌های گوارشی میزبان را عفونی و آلوده می‌کنند (۵)، بنابراین آنها می‌توانند مراحل غیر تغذیه‌ای^۲ از قبیل تخم‌ها و سفیره‌ها را نیز عفونی کنند. محل هجوم، اغلب بین قطعات دهانی، در چین‌ها^۳ یا از طریق سوراخ تنفسی است، کلا در محل‌هایی که به صورت موضعی رطوبت بالاتر است و کوتیکول غیر اسکروتی^۴ (سخت نشده) است هم جوانه‌زنی بیشتر اتفاق می‌افتد و هم قارچ آسانتر در همولنف نفوذ می‌کند (۳۱، ۳۲) در حالی که سایر میکروارگانیسم‌های بیمارگر حشرات وارد دستگاه گوارش حشره می‌شوند و سپس باعث بیماری می‌گردند (۵). آنزیم‌های هضم‌کننده کوتیکول، کوتیکول حشره را که مانعی موثر در برابر (بیشتر عفونت‌ها) بیماری‌زایی است را از بین می‌برند، و در نتیجه باعث دسترسی قارچ به همولنف

1- *Melolontha melolontha* L.

2 - Non-Feeding

3 - Intersegmental

4 - Non-Sclerotised

غنی از مواد غذایی می‌شوند. به‌عنوان مثال به صورت خارج سلولی سرین پروتئاز شبه ساب‌تیلیسین^۱ (*PrI*) را که فاکتوری مهم جهت حشره‌کشی در قارچ‌ها است را تولید می‌کنند (۴). طی فاز بیماری‌زایی قارچ‌ها علاوه بر به‌کارگیری آنزیم‌ها جهت هضم کوتیکول، رشد قارچ بر روی کوتیکول میزبان نیز، فشار مکانیکی به سمت درون کوتیکول وارد می‌نماید و این دو عامل منجر به نفوذ قارچ به حشره میزبان و ایجاد سیکل بیماری‌زایی می‌شود (۳۳).

۱-۹-۱. کیتینازها

از ترکیبات اصلی کوتیکول حشرات کیتین است که ۴۰-۲۵ درصد از حجم کل آن را تشکیل می‌دهد. این پلیمر، به طور اصلی از واحدهای *N*-استیل‌گلوکزآمین (پیوند بین واحدها بتا) تشکیل می‌شود. هیدرولیز کیتین توسط آنزیم‌های هضم‌کننده اگزو (*N*-استیل‌گلوکزآمینیداز^۲ و کیتوبیوز^۳) و اندوکیتیناز انجام می‌شود. سنتز این آنزیم‌ها در حضور مونومرهای قابل حل کیتین، گلوکزآمین، *N*-استیل‌گلوکزآمین و کیتوبیوز القا می‌شود، که در کمیت‌های ناچیز در کوتیکول حضور دارند (۳۴).

کیتینولیتیک‌ها در اغلب قارچ‌های بیمارگر حشرات مطالعه و شناسایی شده‌اند. که اغلب در بیماری‌زایی یا نفوذ کوتیکول نقش دارند (۳۵). در مورد قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Aspergillus fumigatus*، *Lecanicillium lecanii*، *Metarhizium anisopliae* و *Fusarium* spp. تولید آنزیم کیتیناز مشابه با باکتری‌ها به صورت القا-سرکوب است، که طبق بررسی‌ها سنتز کیتینازهای خارج سلولی در *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* توسط یک مکانیسم القا-سرکوب مبنی بر میزان استیل‌گلوکزآمین تنظیم می‌شود. بیدوکا و خاچاتوریان مشاهده کردند که وقتی *B. bassiana* روی

1 - Subtilisin-Like Serin Protease
2 - N-Acetylglucosaminidase
3 - Chitinase

کوتیکول حشرات که استیل گلوکز آمین را رها می کنند، کشت داده شود برای اینکه مقادیر کافی از منابع کربن و نیتروژن برای رشد قارچی فراهم کنند، فعالیت کیتینولیتیک بالایی مشاهده می شود (۳۵).

۱-۹-۲. پروتئازها

مطالعات میکروسکوپ الکترونی^۱ (SEM) نشان داد که کمپلکس کیتین-پروتئین سازنده کوتیکول، لایه‌ای همگن^۲ است که فاقد منافذ (به اندازه کافی بزرگ) برای عبور هیف قارچی از آن است. هضم کوتیکول تنها می تواند توسط ترکیبی از آنزیم‌های پروتئولیتیک و به دنبال آن کیتیناز انجام شود. لزوم افزایش به ترتیب آنزیم‌ها نشان داد که مواد پروتئین‌دار احتمالاً اطراف کیتین را می پوشانند. که هضم آنها می تواند سوبسترای کیتین را در اختیار آنزیم‌های هضم کننده کیتین قرار دهد تا در نهایت منافذ با سایز مناسب در کوتیکول جهت ورود هیف فراهم آید (۹).

تنوع زیادی از پروتئازهای خارج سلولی در قارچ‌های بیمارگر حشرات شناسایی شده است (۹). آنزیم‌های پروتئولیتیک به دو گروه اندوپروتئاز و اگزوپروتئازها تقسیم می شوند، سابتیلیسین شبه پروتئاز^۳ (Pr1) فراوان ترین اندوپروتئازی است که از کشت‌های کوتیکولی قارچ به دست آمده است، عمل Pr1 روی کوتیکول جدا کردن پپتیدی با طول متوسط ۵ آمینواسید است. هضم بیشتر پپتیدها، مواد غذایی بیشتری برای قارچ‌ها فراهم می آورد (۳۶). مواد مترشحه جدا شده از محیط‌های کشت *B. bassiana* بیشترین فعالیت پروتئازی خود را در روز چهارم کشت و در حضور ۰/۵ تا ۱ درصد ژلاتین نشان دادند، و بعد از مطالعه حضور تعداد پروتئازهای ترش‌حی از سلول با آزمون زیموگرام^۴، صرفاً یک تک باند در ژل مشاهده

1 - Scanning Electron Microscope

2 - Homogenous

3 - Subtilisin-Like Protease

۴ - زیموگرافی یک نوع تکنیک الکتروفورز برای شناسایی آنزیم‌های هیدرولیتیک، مبتنی بر مجموعه سوبسترای آنزیم است.

شد که مؤید حضور صرفاً یک پروتئاز بود (۳۷)، و از آنجایی که فعالیت این پروتئاز توسط PMSF^۱ مختل می‌گردد گفته شد که آنزیم یک سرین پروتئاز است (۳۸). همچنین پروتئازهای درون سلولی نیز فعالیت خود را در حضور PMSF از دست می‌دهند (۳۹). سرین پروتئازها به طور وسیع در اغلب قارچ‌ها دیده می‌شوند که اغلب خارج سلولی هستند، وزن مولکولی آنها به طور معمول در دامنه ۳۵ - ۱۸/۵ کیلودالتون است. که غالباً در pH قلیایی (۸/۵) فعال هستند (۳۸).

از پروتئازهای درگیر در هضم کتیکول حشره می‌توان به سه ژن با توالی مشابه به نام‌های پروتئیناز تجزیه کننده کتیکول^۲ (CDEP1)، باسیاسین تجزیه کننده کتیکول^۳ (*bsnI*)، سابتیلیسین شبه پروتئاز (*PrI*) و دی پپتیل پپتیداز^۴ (PPI) اشاره نمود. آزمایشات نشان داده است که سابتیلیسین شبه پروتئازها *PrI* نامیده می‌شوند و کیتیناز *Bbchit1* فاکتورهای مهم بیماری‌زایی در قارچ *Beauveria* می‌باشند (۴۰). با توجه به اینکه بین جنس‌های مختلف حشرات و حتی گونه‌های درون بعضی جنس‌ها ترکیبات کتیکول و لایه خارجی کتیکول با هم فرق دارد. بنابراین آنزیم‌های مؤثر نیاز است تا کتیکول‌هایی را که از نظر ترکیب متفاوت هستند را جهت استقرار موفقیت‌آمیز قارچ در حشره هضم نماید (۲۰). مطالعات انجام شده روی قارچ‌های *Metarhizium* spp. و *Beauveria* spp. نشان داده است که، در محیط کشت‌های غنی و همچنین همولنف حشره، تولید آنزیم‌های پروتئاز تجزیه کننده کتیکول در قارچ متوقف می‌شود چرا که مواد غذایی به میزان کافی در دسترس قارچ وجود دارد (۴۱).

1 - Phenylmethylsulfonyl Fluoride (مهار کننده سرین پروتئاز است)

2 - Cuticle Degrading Proteinase

3 - Cuticle Degrading Bassiasin I

4 - Dipeptyl Peptidase

۱-۹-۳. لیپازها

لیپوپروتئین‌ها قسمت جدایی‌ناپذیر کوتیکول حشرات هستند و همچنین بخش مهمی از بافت‌های حیاتی، از قبیل چربی بدن را تشکیل می‌دهند. بنابراین تولید لیپاز توسط یک بیمارگر حشرات به نفوذ و هم‌تامین مواد غذایی کمک خواهد کرد. هرچند، اهمیت لیپازها به سیستم خاص پاتوژن-میزبان وابسته است. برای مثال موتانت‌های فاقد لیپاز *B. tenella* و *M. anisopliae* به ترتیب در برابر لارو *Melolontha* و *melolontha* بیماریزا نبودند (۹، ۴۲). در مقابل، قدرت بیماریزایی موتانت‌های فاقد لیپاز *M. anisopliae* در برابر پشه‌ها تغییری نیافت (۹).

مطالعه بیان ژن‌های قارچی در مواجهه با کوتیکول‌های مختلف حشرات می‌تواند درک نسبی درستی از چگونگی عملکرد قارچ بیماریزا را در اختیار قرار دهد در این راستا مشخص گردید که ترکیبات کوتیکول، بیشتر از توپوگرافی (شکل و آرایش فضایی) آن در الگوی بیان ژن‌های قارچ پاتوژن حشرات *M. anisopliae* تاثیر داشته است (۳۳).

۱-۹-۴. سایر آنزیم‌ها

رابطه بین تولید آمیلاز و بیماریزایی نشانگر نقش این آنزیم در بیماریزایی است. سطوح بالای تولید آمیلاز با بیماریزایی فوق‌العاده در *M. anisopliae* وابسته است، به طوری‌که، موتانت‌های فاقد آمیلاز، غیربیماریزا بوده است (۹).

تنوع وسیعی از آنزیم‌های کاتابولیک در قارچ‌های بیمارگر حشرات از قبیل؛ آلکالین فسفاتاز، C_۴ استراز، C_۸ استراز/لیپاز، C_{۱۴} لیپاز، لوسین آمینوپپتیداز، والین آمینوپپتیداز، سیستمین آمینوپپتیداز، تریپسین، کیموتریپسین، اسید فسفاتاز، فسفوهیدرولاز، آلفا گالاکتوسیداز، بتا گالاکتوسیداز، بتا گلوکورونیداز، آلفا

گلوکوسیداز، بتا گلوکوسیداز، بتا گلوکوزآمینیداز، آلفا آمینوسیداز، آلفا فروکتوسیداز و آنزیم های هضم-کننده آلکان شناسایی شده است (۹).

۱-۱۰. ژن های مورد بررسی در *Beauveria spp.*

ژن های مورد بررسی در این تحقیق شامل ژن گاما اکتین^۱ به عنوان کنترل درونی، دو پروتئاز (دای-پپتیدیل پپتیداز^۲، پروتئاز هضم کننده کوتیکول باسیاسین I^۳)، ژن پروتئین کیناز^۴، ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز^۵ و ژن سنسور کلسیم^۶ می باشد.

از آنجایی که عمده حجم کوتیکول حشرات را پروتئین تشکیل می دهد، بنابراین پروتئازها نقش اساسی در هضم کوتیکول و بیماریزایی در قارچ های بیمارگر حشرات دارند، از اینرو دو پروتئاز با اهمیت در قارچ بیمارگر *Beauveria spp.* برای این مطالعه به نام های پروتئاز هضم کننده کوتیکول باسیاسین I و دای پپتیدیل پپتیداز انتخاب شدند، از طرفی به دلیل اینکه اولین مانع در برابر قارچ های بیمارگر حشرات اپی-کوتیکول حشره (غنی از لیپید و کربوهیدرات) می باشد، بنابراین یک سیتوکروم P450 مونواکسیژناز درگیر در هضم این لایه جهت مطالعه انتخاب شد. با توجه به مرور منابع اثبات شد که پروتئین کیناز مورد مطالعه نقش کلیدی در بیماریزایی بازی می کند، به این جهت تصمیم به مطالعه بیان این ژن در شرایط مختلف گرفته شد. انتخاب ژن سنسور کلسیم قارچ بیمارگر *Beauveria spp.* جهت مطالعه بیان آن، نیز به دلیل نقش این ژن در حوادث اولیه نفوذ یا پیش از نفوذ قارچ در کوتیکول می باشد.

- 1 - Gamma Actin
- 2 - Dipeptidyl Peptidase
- 3 - Cuticle-Degrading Protease Bassiasin I
- 4 - Mitogen-Activated Protein Kinase
- 5 - Cytochrome P450 Monooxygenase
- 6 - Neuronal Calcium Sensor-1

۱-۱۱. اهداف تحقیق

جهت بررسی تفاوت در بیان ژن‌های قارچ *Beauveria* spp. در مواجهه با حشرات مختلف، پودر کوتیکول دو نوع آفت انباری سوسک قرمز آرد و پروانه موم‌خوار و دو آفت زراعی ملخ ایتالیایی و سن گندم را در معرض این قارچ بیمارگر قرار دادیم تا به سوالات ذیل پاسخ دهیم. که آیا تفاوت‌های موجود در کوتیکول حشرات میزبان قارچ *Beauveria* spp. تاثیری بر الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه‌ی این قارچ می‌گذارد یا خیر؟، آیا در مواجهه‌ی قارچ *Beauveria* spp. با دو آفت انباری از دو رده‌ی پشیزبالان^۱ و قاب‌بالان^۲ و دو آفت زراعی از دو رده نیم‌بالان^۳ و راست‌بالان^۴ تفاوتی در بیان بعضی ژن‌های مورد مطالعه‌ی درگیر در بیماری‌زایی و هضم کوتیکول مشاهده می‌شود یا خیر؟، آیا تفاوتی در بیان ژن‌های مورد مطالعه در جدایه‌های مختلف *Beauveria* spp. در مواجهه با شرایط متفاوت مشاهده می‌شود یا خیر؟، در مواجهه قارچ *Beauveria* با چهار کوتیکول متفاوت کدامیک از ژن‌های مورد مطالعه در هر چهار مورد بیان ثابت دارند؟ اما پیش از اینکه به مرور منابع در خصوص کارهای انجام شده در زمینه مطالعه بیان ژن‌ها در قارچ *Beauveria* spp. بپردازیم، لازم است که شناختی در خصوص مشخصات و ترکیب کوتیکول حشراتی که قرار است بیان ژن‌های قارچ در مواجهه با آنها بررسی شود، داشته باشیم.

۱-۱۲. حشرات مورد آزمایش و ترکیب کوتیکولی آنها

قارچ *Beauveria* به عنوان پارازیت رده‌های Lepidoptera و Coleoptera در حشرات شناخته شده است (۴۳). و با توجه به اهمیت کنترل بیولوژیک آفات انباری، دو آفت انباری مورد استفاده از این دو رده از حشرات انتخاب شد. و با توجه به اثرات سوء سموم شیمیایی روی سلامتی انسان و محیط زیست استفاده

1 - Lepidoptera
2 - Coleoptera
3 - Hemiptera
4 - Orthoptera

از این قارچ به عنوان عامل کنترل بیولوژیک در کنترل آفات زراعی نیز بسیار با اهمیت است از اینرو دو آفت زراعی از دو رده متفاوت دیگر Hemiptera و Orthoptera نیز با اینکه در عنوان پایان نامه نیامده است برای مطالعه انتخاب شدند. می دانیم که کوتیکول شامل آرایشی به شدت بلورین با نانو فیبرهای کیتین در شبکه ای از پروتئین، پلی فنل ها و آب، به همراه میزان کمی لیپید است. اما با توجه به اینکه ترکیب کوتیکولی در حشرات مختلف متفاوت است، و جهت تحلیل بهتر نتایج لازم است تا ترکیب دقیق کوتیکول حشرات را بدانیم در ادامه ترکیب کوتیکولی حشرات مورد آزمایش بررسی خواهند شد و اطلاعات محدود در دست در این زمینه، آورده شده است.

۱-۱۲-۱. پروانه موم خوار (*Galleria mellonella*)

پروانه موم خوار از موم به ویژه موم سیاه در انبارها، مغازه ها، و خانه های گرم تغذیه می کند. در درجه دوم به کندو هایی که به سبب عدم رسیدگی منظم، اصول بهداشتی در آنها رعایت نشده است و یا به علل مختلف ضعیف هستند حمله می کند. پروانه موم خوار در بیشتر نقاط ایران به ویژه در مناطق گرمسیری دیده شده است.

لیپیدهای کوتیکولی لارو این حشره تنها از ۳ گروه مواد شامل هیدروکربن ها، تری اسیل گلیسرول ها و اسیدهای چرب آزاد تشکیل می شود. آنالیز اسیدهای چرب کوتیکول لارو این حشره نشان داده است که ترکیبات $C_{16:0}$ ، $C_{18:0}$ ، $C_{18:1}$ اسید چرب اصلی و $C_{2:18}$ و همچنین مقادیر ناچیزی $C_{5:14}$ ، $C_{1:16}$ ، $C_{2:20}$ و $C_{1:20}$ در کوتیکول وجود دارد. سریواستاوا (۱۹۷۰) پروتئین های کوتیکول لارو بالغ، شفیره و حشره بالغ را از طریق کروماتوگرافی لایه نازک با چهار نوع سوبسترا آب، بافر بوراکس، اوره و NaOH، به روش کارلسون (۱۹۶۹) استخراج کرد. وزن کوتیکول استفاده شده و درصد پروتئین استخراج شده از یک حشره بالغ گالریا (۰/۷ گرم کوتیکول) در سوبستراهای یاد شده به ترتیب ۱۴/۲، ۱۸/۵، ۱۰، ۳/۳۳ درصد و میزان

پروتئین کلی آن ۷۶ درصد محاسبه گردید. اطلاعاتی درباره سایر ترکیبات کوتیکولی این حشره در دست نیست. سریواستاوا (۱۹۷۰) درصد دقیق آمینواسیدهای موجود در کوتیکول لارو، شفیره جوان، شفیره پیر و حشره بالغ را اندازه گیری کرد، که در جدول ۱-۳ درصد دقیق این آمینواسیدها در سوبستراهای مختلف در مرحله بلوغ حشره آورده شده است (۴۴).

۱-۱۲-۲. سوسک قرمز آرد (*Tribolium castaneum*)

سوسک قرمز آرد یکی از آفات محصولات انباری است که حدود ۱۰۰ نوع از محصولات انباری (آرد، سیوس، دانه‌های روغنی، بادام زمینی، بذر کتان، کرچک، حبوبات، میوه‌های خشک، ماکارونی، گیاهان خشک دارویی و کلکسیون‌های جانوری) را مورد حمله قرار می‌دهد. این آفت بیشتر در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری خسارت قابل توجهی را وارد می‌نماید. حشرات بالغ ترشحات کوئینونی حاوی ۲-متیل و ۲-اتیل ۱، ۴-بنزوکوئینون دارند که بوی ناخوشایندی به مواد خوراکی می‌دهند.

لیپیدهای کوتیکولی حشرات بالغ بررسی شده تاکنون، حاوی مخلوط‌هایی از هیدروکربن‌ها است، که در بسیاری از گونه‌ها پیچیده است و توده‌ی لیپیدی را شکل می‌دهد. دو گروه هیدروکربن از عصاره پوشش سوسک بالغ *Tribolium* جدا شده است. گروهی با ۷ هیدروکربن غیراشباع با طول زنجیره از C_{۱۴} تا C_{۱۷} که جز اصلی آن ۱-پنتادکن^۱، شناسایی شده است. دو تا آلکادین، پنتادکا-۱، ۶-دین^۲ و هپتادکا-۱، ۸-دین^۳ نیز شناسایی شده است. و میزان *n*-هپتاکوزان^۴ و *n*-نانوکوزان^۵ بیشتر از *n*-آلکن‌ها^۶ بوده است (۴۵). ترکیب دقیق هیدروکربن‌های *T. castaneum* در جدول ۱-۴ آورده شده است.

1 - 1-Pentadecen
2 - Pentadeca-1,6-diene
3 - Heptadeca-1,8-diene
4 - *N*-Heptacosane
5 - *N*-Nonacosane
6 - *N*-Alkanes

جدول ۱-۳. درصد آمینواسیدهای موجود در کوتیکول حشره بالغ پروانه موم خوار در سوبستراهای (حلال) مختلف (۴۴).

اسیدهای آمینه	آب	بوراکس	اوره	سود سوزآور
گلايسين	۷۹/۲۴	۴۷/۲۲	۴۵/۰۷	۹/۴
L-آلانين	۲/۵	۳۷/۵۳	—	۹/۵۲
بتا آلانين	—	—	—	—
والين	۰/۶	۱/۱	۰/۲	۸/۵۹
لوسين	۰/۷۴	۱/۲۱	۰/۱۶	۶/۹۶
ايزولوسين	۰/۳۴	۱/۰۵	۰/۱۳	۳/۳۶
پرولين	۱/۱۴	۱/۶۹	۰/۱۶	۶/۶۲
فنيل آلانين	۰/۲۸	۰/۶۷	—	۰/۲۳
تيروزين	۰/۲۸	۰/۰۲	—	۲/۳۲
سرين	۱/۱۹	۱/۲۱	۰/۳	۳۱/۳۵
ترئونين	۰/۸۵	۰/۹۴	۰/۲	۰/۸۱
متيونين	۷/۹۸	۰/۸۹	—	۰/۸۱
آسپارتيك اسيد	۱/۶۵	۲/۶۹	۴۷/۷۶	۶/۱۵
گلوتاميك اسيد	۱/۱۹	۲/۴۸	۵/۶۱	۸/۹۴
آرژينين	۰/۲۲	۰/۴۳	۰/۰۶	۴/۴۱
ليزين	۰/۳۹	۰/۵۶	۰/۲۳	۰/۳۴
هيستيدين	۱/۳۴	۰/۲۴	۰/۰۶	۰/۱۱

جدول ۱-۴. درصد انواع هیدروکربن‌های موجود در کوتیکول سوسک قرمز آرد (۴۵).

هیدروکربن	درصد	هیدروکربن	درصد ترکیب
<i>n</i> - pentacosane	۳/۵	3- methyloctacosane	۰/۳
3-methylpentacosane	۱/۵	<i>n</i> - nonacosane	۲۶/۱
<i>n</i> -hexacosane	۱/۲	11+13- methylnonacosane	۰/۲
12+13- methylhexacosane	۰/۶، ۰/۲.	11,15- dimethylnonacosane	۰/۷
3- methylhexacosane	۰/۴	3- methylnonacosane	۲/۷
<i>n</i> - heptacosane	۲۲/۸	<i>n</i> - triacontane	۱/۰
11+13- methylheptacosane	۱۴/۴	methyltriacontane	۰/۱
9, 13+11,15- dimethylheptacosane	۲/۵، ۲/۳	<i>n</i> - hentriaconcontane	۲/۳
3- methylheptacosne	۷/۹	methylhentriacontane	۰/۲
<i>n</i> - octacosane	۶/۲	3- methylhentriacontane	۰/۱
12- methyloctacosane	۲/۲	<i>n</i> - dotriacontane	کمتر از ۰/۱
8,12+12,16- dimethyl octacosane	۰/۵	<i>n</i> - tritriacontane	کمتر از ۰/۱

۱-۱۲-۳. ملخ ایتالیایی (*Caliptamus italicus*)

ملخ ایتالیایی خسارت زیادی به مزارع وارد می کند. این حشره روی انواع لگومها مثل یونجه تغذیه می کند. تاکنون مطالعه ای روی ترکیب دقیق کوتیکولی ملخ ایتالیایی صورت نگرفته است، اما فیلیپ و لوقتون (۱۹۷۵) ترکیب کوتیکولی ملخ *Migratoria* را از شروع مرحله لاروی تا بلوغ و پوسته ریزی بررسی کردند. آنها به روش هوپل (۴۶) پروتئین های کوتیکولی را جدا کردند، و مشخص کردند که کوتیکول این ملخ غنی از پروتئین است (۴۶). مشخص شده است که در مرحله pharate تا بلوغ میزان پروتئین در ۲-۱/۸ میلی گرم کوتیکول حدود ۱/۵ میلی گرم پروتئین است، و میزان کیتین در این مرحله در ۲-۱/۸ میلی گرم کوتیکول حشره حدود ۰/۶-۰/۳ میلی گرم است (۴۶).

۱-۱۱-۴. سن گندم (*Eurygaster integriceps*)

از گونه های غالب خسارت زنده به گندم در خاورمیانه، اروپا، اسپانیا و شمال آفریقا سن گندم است. در هنگام تغذیه، حشره قطعات دهانی خود را در دانه نارس جای می دهد و عصاره شیری آن را می مکد، در نتیجه دانه های گندم بالغ نسبتا خالی می شوند (۴۷). تاکنون مطالعه ای روی هیچ یک از ترکیبات کوتیکولی این حشره صورت نگرفته است. و اطلاعاتی در زمینه ترکیب کوتیکولی آن در دست نیست.

فصل دوم

مرور منابع

این فصل شامل اهمیت مطالعه بیان ژن‌ها، روش‌های مطالعه بیان ژن، مرور منابع مطالعات انجام شده بر روی بیان ژن‌ها در قارچ *Beauveria* spp. در پاسخ به حضور کوتیکول حشرات مختلف، مرور منابع کارهای انجام شده بر روی ژن‌های مورد مطالعه در قارچ *Beauveria* spp. می‌باشد.

۲-۱. مطالعه بیان ژن‌ها و روش RT-PCR نیمه کمی

در زیست‌شناسی مولکولی، بررسی دقیق بیان ژن‌ها اهمیت روز افزونی پیدا کرده است و این بررسی‌ها نه تنها در افزایش شناخت ما از اعمال ژن و پروتئین کمک کرده است بلکه در زمینه تشخیص میزان کم نسخه‌برداری ژن‌ها در زمینه بیوتکنولوژی کاربرد داشته است. آنالیز کلی بیان mRNA به عنوان استراتژی قدرتمندی برای یافته‌های بیولوژیک شکل گرفته است. روش‌های سنتی مطالعه بیان ژن منجر به تمرکز محققان روی یک ژن در یک زمان در هر زمینه بیولوژیک خاص شده بود. که در نتیجه، بسیاری تغییرات بیولوژیکی مهم از دست می‌رفتند (۴۸). امروزه تکنولوژی‌های بسیاری جهت آنالیز سطوح بیان mRNA یا بیان mRNA افتراقی در دسترس است. تکنیک‌های آزمایشی که جهت اندازه‌گیری بیان ژن استفاده می‌شوند به دو گروه روش‌های مطالعه تک‌ژن (Low-to-mid-plex) و روش‌های بررسی کلی بیان ژن (High-plex) تقسیم می‌شوند. از جمله روش‌های مطالعه تک ژن Northern blots، RT-PCR و از جمله روش‌های کلی بیان ژن به macroarrays، microarrays، Real Time-PCR، differential display، serial Massively Parallel Signature (MPSS) و EST analysis، (SAGE) analysis gene expression Sequencing اشاره کرد. لازم به ذکر است که همه این سیستم‌ها کاستی‌ها و برتری‌هایی دارند، که در جدول ۱-۲ شماری از آنها آورده شده است. که اغلب هزینه‌بر، از نظر تکنیکی مشکل، اختصاصی و قابل اعتماد و علاوه بر این قادر به تولید مجموعه‌های وسیعی از اطلاعات بیان ژن هستند (۴۸).

جدول ۲-۱. برتری‌ها و کاستی‌های روش‌های مطالعه بیان ژن (۴۸).

	Micro-arrays	Macro-arrays	MPSS	Northern blot	SAGE	RT-PCR	Differential-display RT-PCR	Comparative EST
Technical difficulty	●●	●	●●●	●	●●●	●	●	●●
Setup expense	●●●	●	●●●	●	●●	●●	●●	●●●
Cost of analysis	●●	●●	●●●	●	●●●	●	●●	●●●
Bioinformatics needs	●●●	●●	●●●	●	●●●	●	●●	●●●
Number of genes	●●●	●●	●●●	●	●●●	●	●●	●●●
Number of samples	●●	●●	●	●	●	●●●	●●	●
Flexibility	●●	●●●	●●	●●●	●●	●●	●●●	●●
Gene specificity	●●	●●	●●●	●●●	●●●	●●	●●	●●●

● = Low; ●● = medium; ●●● = high.

در خصوص روش RT-PCR^۱ برل ژاک و همکاران (۲۰۰۵) سه روش مبتنی بر RT-PCR شامل: ۱- رقابتی^۲، ۲- نیمه کمی^۳، ۳- کمی^۴ را برای کمی کردن نسبی mRNA مقایسه کردند. اطلاعات به دست آمده نشان داد که هر سه روش مبنی بر RT-PCR نتایج قابل اطمینان و قابل مقایسه‌ای را نشان می‌دهد (۴۹).

اگر هدف مقایسه تفاوت‌های نسبی مقدار رونوشت‌ها در بین انواع سلولهای مختلف باشد، یک روش نیمه کمی کافی خواهد بود. ساده ترین روش انجام چنین مطالعاتی تعیین میزان محصولات PCR در طی فاز تصاعدی و قبل از فاز سکون می‌باشد. به گونه‌ای که تعداد سیکل را از کم شروع کرده تا سیکل‌های بالاتر امتحان می‌کنیم تعداد سیکل مناسب باید به گونه‌ای انتخاب گردد که همه نمونه‌های cDNA مورد مقایسه با تعداد سیکل یکسان PCR گذاشته شوند، تعداد سیکل به گونه‌ای باشد که در صورت بیان ژن در همه شرایط، حداقل شدت باند روی ژل قابل رویت باشد. با وجودیکه این روش هیچ مقدار عددی برای میزان mRNA در نمونه مورد بررسی نخواهد داد، ولی به راحتی می‌توان با استفاده از آن تفاوت‌های مقادیر mRNA را تا ۲۰-۱۰ برابر بین نمونه‌های مختلف تعیین کرد. این روش برای بررسی تغییرات میزان بیان یک mRNA هدف در بافت‌ها یا سلول‌ها یکسان در پاسخ به یک محرک خارجی قابل استفاده است (۵۰).

در روش‌های RT-PCR جهت نرمال کردن میزان بیان هر یک از ژن‌های هدف، از ژنی با میزان بیان ثابت به نام ژن مرجع^۵ استفاده می‌شود. در روش RT-PCR نیمه کمی ژن هدف، از تعداد سیکل یکسان برای همه نمونه‌های مورد بررسی استفاده می‌شود. بعد از الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل و رنگ‌آمیزی، میزان

1 - Real-Time PCR
2 - Competitive RT-PCR
3 - Semiquantitative RT-PCR
4 - Real-Time⁴ RT-PCR
5 - Reference Gene


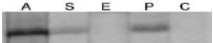


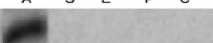




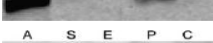







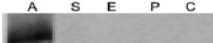
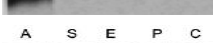

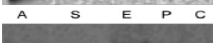
بیان ژن هدف با اندازه‌گیری شدت باند متناظر با قطعات تکثیر یافته تولیدی ارزیابی می‌شود. شدت باندهای حاصل بر روی ژل آگارز، منعکس‌کننده تعداد نسخه‌های cDNA هدف (برای مثال mRNA هدف) در شروع واکنش PCR، و بنابراین سطح بیان ژن هدف در نمونه می‌باشد (۵۱). ما در این تحقیق از روش RT-PCR نیمه کمی جهت مطالعه بیان ژن‌ها در قارچ *Beauveria* استفاده کردیم.

مطالعات بسیاری در زمینه بیان ژن‌های قارچ *Beauveria spp.* در سطح RNA به روش‌هایی مختلف صورت گرفته است. که در ادامه به تعدادی از آنها اشاره خواهد شد.

۲-۲. مروری بر مطالعات بیان ژن‌های قارچ *Beauveria spp.* در سطح RNA

پاتان و همکاران (۲۰۰۷) از تکنیک cDNA-AFLP جهت مطالعه بیان ژن‌ها در قارچ *B. bassiana* استفاده کردند، در این مطالعه بیان ۲۱ ژن قارچی، رشد یافته روی محیط کشت‌های عصاره کوتیکول ۴ نوع حشره متفاوت (*Spodoptera (Lepidoptera: Noctuidae, army worm/tobacco caterpillar)*، *Periplaneta americana (Blattodea:Blattidae, American cockroach)*، *litura (Coleoptera:)* و *Epilachna vigintioctopunctata (Coccinellidae, brinjal beetle)* و *Homoptera: Aphididae, pea*) و *Aphis craccivora (aphid)* و محیط کشت مصنوعی (SDY)، بررسی شد. اسامی ژن‌های مورد بررسی آنها به همراه شماره دسترسی و تصویر باندهای (TDF's) آنها در روی محیط کشت‌های مختلف در جدول ۲-۲ آورده شده است. پس از انجام الکتروفورز، حضور باندها (TDF) در بعضی لاین‌ها و نبود آن در دیگر لاین‌ها (۴ نوع کوتیکول حشره و ۱ محیط کشت کنترل) به صورت مقایسه‌ای تفاوت بیان ژن‌ها را نشان داد. بعد از الکتروفورز ۴۶ عدد از TDFs با بیان متفاوت با سایز بزرگتر از ۲۰۰ جفت باز از روی ژل شناسایی و جدا شدند. سپس ۲۴ قطعه در یک ناقل پلاسمیدی با پرایمرهای خاص کلون شدند و ۲۲ قطعه دیگر مستقیماً توالی‌یابی گردیدند (۵۲).

جدول ۲-۲. اسامی و مشخصات ژن های *Beauveria* مطالعه شده در مواجهه با کوتیکول حشرات متفاوت (۵۲)

اسامی ژن ها	شماره ژن	پروفیل باندهای ژن	پاسخ
		A S E P C	
	EC391447		gim complex component GIM3-like protein
	EC391418		probable signal recognition particle subunit SRP54
	EC391437		antigenic cell wall galactomannoprotein
	EC391430		coenzyme Q biosynthesis protein Coq4
	EC391428		pistil-specific extension-like protein
	EC391423		cytochrome P 450 monooxygenase
	EC391413		exocyst complex subunit Sec15-like
	EC391457		elongation factor1-beta-like protein
	EC391433		methionine aminopeptidase M24
	EC391454		dehydrogenase E1 component
	EC391429		GDP/GTP exchange protein
	EC391449		Protein kinase- like protein
	EC391432		DEAD/DEAH box helicase
	EC391422		yeast PIR protein repeat
	EC391416		ribosomal protein LA1
	EC391420		subtilisin-like protease
	EC391444		histon deacetylase
	EC391421		NmrA-like family
	EC391426		protease-1 PRT1
	EC391414		esterase, lipase
	EC391451		EVHI

۱ پروفیل های بیان TDFs با عملکرد پیش بینی شده در ژل cDNA-AFLP. cDNA های مشتق شده از کشت های *B. bassiana* رشد یافته روی عصاره کوتیکولی *Aphis craccivora* (A)، *Spodoptera litura* (S)، *Epilachna vigintioctopunctata* (E) و *Periplaneta Americana* (P) و (c) محیط کشت سنتتیک (SDY).

از جمله مطالعاتی که از روش RT-PCR نیمه کمی استفاده شده است، مطالعه چو و همکاران (۲۰۰۷) بود که بیان ژن‌های هیدروفوبین^۱ (*hyd*) را در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* بررسی کردند. هیدروفوبین‌ها پروتئین‌های آمفی‌پاتیک کوچکی هستند که در دامنه وسیعی از فرآیندهای رشد و نمو (شکل‌گیری ساختارهای هوایی، اتصال سلول‌های قارچی به سطوح) در قارچ‌ها نقش دارند بعد از کشت قارچ *B. bassiana* روی محیط کشت‌های جامد و مایع حاوی کوتیکول حشره و کیتین (متشکل از نسبت ۴:۱ محیط مایع SD^۲ تکمیلی با ۱ درصد (وزنی/حجمی) کیتین، ۱ درصد پودر کوتیکول *Manduca sexta* یا ۱ درصد کیتین + ۱ درصد کوتیکول *M. sexta*) از کنیدی هوایی^۳، بلاستوسپورها^۴، کنیدی غرق شده^۵، میسلیوم در حال رشد^۶، از سلول‌های رشدیافته روی کوتیکول حشره، کیتین (کربوهیدرات اصلی سازنده کوتیکول حشرات) و کوتیکول حشره + کیتین جهت مطالعه استفاده کردند پس از استخراج RNA کل و سنتز cDNA و انجام PCR شدت باندهای حاصل را به روش RT-PCR نیمه کمی مطالعه کردند. در این مطالعه از ژن‌های *actin* و β -*tubulin* به عنوان کنترل‌های درونی برای نرمال کردن اطلاعات بیان، استفاده گردید. سطح بیان نسبی دو ژن هیدروفوبین (*hyd*) در RNA به دست آمده از کنیدی هوایی، بلاستوسپورها، کنیدی غرق شده، میسلیوم رشد یافته از سلول‌های رشدیافته روی کوتیکول حشره ارزیابی شد. اطلاعات ارائه شده از بخش خطی آنالیز PCR (۲۵ سیکل) بدست آمده بود، غلظت اکتین وابسته به میزان RNA کمی شده برای نمونه تحت آزمایش بود. بیان هیدروفوبین‌ها با کمی کردن باندهای اکتین نرمال شد. بیان *hyd1* در *B. bassiana* در همه مراحل نمو و شرایط محیط کشت‌های تست شده شناسایی شد. سطوح بیان *hyd1* طی رشد میسلیومی افزایش یافت، و بالاترین سطح بیان بعد از ۲۸ روز رشد روی پلیت‌های آگار مشاهده شد. میزان بیان *hyd1* در سلول‌های رشد یافته در حضور کوتیکول و

1 - Hydrophobin

2 - Sabouraud Dextrose Broth

3 - Aerial Conidia

4 - Blastospores

5 - Submerged Conidia

6 - Growing Mycelia

کیتین مشابه بود اما میزان بیان در بلاستوسپور، کنیدی غرق شده و میسلیوم ۱۰-۵ روزه بیشتر بود. در مقایسه با *hyd1*، ژن *hyd2* در تمام مراحل رشد میسلیوم (۲۸-۳ روز) به طور ساختاری و حدوداً هم سطح با اکتین بیان شد، اما *hyd2* در بلاستوسپور یا کنیدی هوایی خیلی کم یا اصلاً بیان نشد. تعدادی رونوشت *hyd2* در کنیدی غرق شده اندازه‌گیری شد، که با ۱۰-۵ درصد سطح بیان با نمونه‌های میسلیومی مطابقت داشت. به صورت قابل توجهی، ژن *hyd2* در سلول‌های قارچی رشدیافته روی ۱ درصد کیتین یا ۱ درصد کوتیکول بیان شد (تقریباً هم سطح اکتین)، اما وقتی سلول‌ها روی ۱ درصد کیتین + ۱ درصد کوتیکول رشد یافته بودند، در واقع هیچ بیانی دیده نشد. شدت نسبی باندها بعد از تصویربرداری با استفاده از نرم-افزار Adobe Photoshop غلظت‌سنجی شد. آزمایش با دو تکرار بیولوژیک انجام شد و هر واکنش PCR نیز دوبار انجام شد. در همه آزمایشات کنترل منفی با فقدان آنزیم یا الگو به انجام رسید. در این مطالعه اثبات شد که ترکیب اصلی لایه rodelt محصول ژن *hyd2* است (۵۳).

توانایی قارچ‌های بیمارگر حشرات برای بیماری‌زایی حشرات فرآیند پیچیده‌ای است، که بیان متفاوت ژن-های زیادی را در برمی‌گیرد که بعضی از آنها وقتی قارچ در تماس یا در معرض کوتیکول حشرات است، بیان آنها افزایش می‌یابد. چانتاسینق و همکاران (۲۰۱۳) مجموعه‌ای از ژن‌های را شناسایی کردند که در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* BCC2659 در پاسخ به کرم برگ‌خوار چغندر^۱ به طور متفاوتی بیان شده بودند. از تکنیک PCR-SHH^۲ برای شناسایی ژن‌هایی که به طور متفاوتی طی مراحل اولیه برهمکنش حشره-قارچ برای مثال حدوداً تا ۲ ساعت بعد از عفونت نمونه بیان شدند، استفاده کردند. بیان ده ژن قارچی شناسایی شده توسط PCR-SHH که به ثبت رسیده بودند، توسط RT-PCR نیمه کمی بررسی شدند و افزایش بیان نشان دادند. از بین ژن‌های مورد مطالعه، کاتالاز (*CatE7*)، درگیر در مقاومت به تنش)، برای شناسایی بیشتر و به منظور تعیین نقش آن در بیماری‌زایی *B. bassiana* از طریق انتقال

1 - *Spodoptera exigua*

2 - PCR-Select Suppression Subtractive Hybridization

ژن افزایش بیان داده شد. نژادهای Bb::BbcatE7 (لاین تراریخته قارچی با کپی‌های اضافی از ژن کاتالاز) سریع‌تر از والدین تیپ وحشی جوانه‌می‌زدند و به طور معنی‌داری بیماری‌زایی بیشتری در برابر لارو *S. exigua* نشان دادند. نژادهای Bb::BbcatE7 در طی رشد رویشی در تیمار با غلظت‌های مختلف، H_2O_2 تفاوتی با تیپ وحشی نشان ندادند. ولی سرعت‌های جوانه‌زنی کنیدی‌های نژاد Bb::BbcatE7 در حضور H_2O_2 بیشتر بود. نتایج گواه این مطلب بود که ژن کاتالاز نقش مهمی را در فرآیند عفونت‌زایی حشرات بازی می‌کند، و دستکاری بیان این ژن می‌تواند منجر به تولید نژادهای قارچی موثرتری جهت کنترل حشرات شود. و در نهایت از RT-PCR نیمه کمی (ژن بتا توبولین به عنوان کنترل درونی) جهت بررسی میزان بیان ژن استفاده شد. آنالیز غلظت‌سنجی محصولات PCR با استفاده از ژل‌های رنگ شده با اتیدیوم بروماید با استفاده از نرم‌افزار ورژن 4.1.1 (Bio-Rad, USA) انجام شد. غلظت متفاوت هر واکنش با بررسی شدت باندهای بررسی شد همه آزمایشات حداقل سه بار با دو نمونه بیولوژیک متفاوت انجام شد (۵۴).

۲-۳. مروری بر مطالعات انجام شده روی ژن‌های مورد مطالعه

۲-۳-۱. ژن کنترل درونی گاما اکتین^۱

ژن‌های کنترل تحت شرایط تغذیه‌ای متفاوت (محیط‌کشت‌های مختلف) و همچنین تحت شرایط تنش-های مختلف بیان پایداری دارند. ژن‌های کنترل با بیان پایدار به عنوان ژن‌های مرجع جهت استاندارد کردن داده‌ها استفاده می‌شوند. این ژن‌ها در تمام سلول‌های یک موجود بیان می‌شوند و در شرایط متفاوت در سطوح نسبتاً پایداری بیان می‌شوند. انتخاب ژن‌های کنترل مناسب جهت کمی کردن دقیق بیان ژن بسیار مهم است. برای شناسایی ژن‌های کنترل مناسب در *B. bassiana*، بیان ۱۴ ژن کاندیدا (*18S*, *28S*, *β -tub*, *GAPDH*, *γ -Act*, *TeF*, *HGPT*, *His3*, *His2A*, *TBP*, *CypA*, *CypB*, *PPI*) به عنوان

1 - *Gamma-Actin*

ژن های کنترل درونی به وسیله واکنش زنجیره پلیمرز کمی در مراحل مختلف پیشرفت و تحت تنوع تغذیه ای و شرایط تنش اندازه گیری شد، و ارزیابی ثبات بیان با استفاده از برنامه های geNorm و NormFinder نشان داد که مجموعه ژن های *CrzA* و *His2A/γ-Act* پایدارترین ژن ها در بیان طی نمو بودند. در حالیکه مجموعه های ژنی *CypA/PPI/28S* و *His2A/γ-Act/CypA* به ترتیب با بیشترین پایداری در بیان تحت شرایط تنوع غذایی و شرایط استرس بودند. نتایج نشان داد به طور کلی ژن های *PPI, 8-* *Act* و *CypA* با بیشترین پایداری در بیان تحت تمام شرایط آزمایشی بودند (۵۵). در قارچ *B. bassiana* ژن های *18S, 28S* گلیسرآلدهید-۳- فسفات دهیدروژناز و بتا توبولین در بسیاری از موارد جهت مطالعات بیان ژن استفاده شده اند. اما در این آزمایش مشخص شد که اینها به اندازه قابل انتظار بیان پایداری نداشتند، با این همه برای مثال بیان گلیسرآلدهید-۳- فسفات دهیدروژناز تحت شرایط تنوع تغذیه ای تغییر می کند، و بیان ژن بتا توبولین به طور قابل توجهی در پاسخ به شوک حرارتی کم می شود (۵۵). کاو و همکاران (۲۰۱۲) ژن های کنترل درونی مناسب را برای نرمال کردن بیان ژن ارزیابی کردند که از بین شماری از ژن های کنترل درونی مانند اکتین، توبولین، گلیسرآلدهید-۳- فسفات دهیدروژناز، پلی یوبی-کوئیتین، فاکتور تطویل α -۱، سیکلوفیلین و یوبی کوئیتین براساس آنالیز NormFinder ژن اکتین بهترین رفتار را از خود نشان می داد، چرا که کمترین M^1 را ($M=0/232$) داشت و تحت تیمارهای مختلف پایدارترین بیان را نشان داد (۵۶). گاما اکتین جز ژن های کنترل درونی است که برای مطالعات بیان ژن در قارچ *B. bassiana* استفاده می شود.

۱ - نشان دهنده اندازه پایداری بیان ژن است که توسط نرم افزار Normfinder اندازه گیری می شود، که هر قدر کوچکتر باشد پایداری بیان ژن در شرایط مختلف بیشتر است.

۲-۳-۲. پروتئاز ترش‌حی باسیاسین I^۱

پروتئازهای خارج سلولی از فاکتورهای کلیدی بیماری‌زایی برای حمله قارچ به حشرات هستند. مطالعات نشان داده است که کوتیکول حشره از بیش از ۷۰٪ پروتئین تشکیل شده است و شگفت‌انگیز نیست که بیان پروتئازهای قارچی خارج سلولی در فرآیند نفوذ، نقش بسیار مهمی دارند (۵۷). یکی از ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق پروتئاز ترش‌حی، تجزیه‌کننده کوتیکول به اسم باسیاسین I است، که در تقسیم‌بندی پایگاه داده MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) این آنزیم در خانواده S8 قرار دارد. سرین پروتئازهای خانواده S8 تنوع وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی (هضم، لخته‌شدن خون، رشد جنین، انتقال پیام و پاسخ ایمنی و به طور خاص در تغذیه و پردازش پروتئین‌ها) را دارند، و به عنوان دومین آنزیم فراوان در طبیعت هستند (۵۸). فیزیولوژی آنزیم‌های S8 هضم کوتیکول در هجوم قارچ به حشره یا نماتد، می‌باشد. مطالعات انجام شده با میکروسکوپ Immunogold electron نشان داد که این پروتئاز توسط آپرسوریوم و هیف‌های نفوذی درون کوتیکول ترشح می‌شوند. آنزیم پپتیداز تجزیه‌کننده کوتیکول، به تعداد ۳ کپی در ژنوم *Metarhizium anisopliae* ۲ کپی در *Cordyceps bassiana*، ۱ کپی در *C. brongniartii*، *Hirsutella minnesotensis*، *Hirsutella rhossiliensis* و *Lecanicillium psalliotae* وجود دارد، این آنزیم در زیر خانواده S8A قرار گرفته است. گزارشی از مطالعه بیان این ژن در قارچ *Beauveria* spp. در دست نیست، کیم و همکاران (۱۹۹۹) بعد از خالص‌سازی و ساخت سازه ژنی حاوی ژن باسیاسین I آن را به قارچ *B. bassiana* منتقل کردند. قارچ مهندسی شده، به صورت ژنتیکی کارایی کنترل بیولوژیک را توسط کاهش زمان مرگ حشره آفت افزایش داد (۵۹).

شنگ و همکاران (۲۰۰۵) ژن سرین پروتئاز (*PrI*) هضم‌کننده کوتیکول خارج سلولی *B. brongniartii* را به عنوان فاکتور اصلی بیماری‌زایی (در خانواده S8 سرین پروتئازها قرار دارد) از طریق فعالیتش در برابر

1 - Bassiasin I

کوتیکول حشرات همسانه سازی کردند. طول این ژن ۱۷۳۲ جفت باز و حاوی ۳ اینترون به ترتیب با طول ۶۴، ۵۷ و ۶۱ جفت باز است. وقتی میسلیم *B. brongniartii* از محیط مایع SDY به محیط القا پروتئاز (محیط حاوی کوتیکول حشره به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن) انتقال یافت، پس از جدا کردن میسلیمها، محیط کشت مورد سنجش آنزیمی قرار گرفت. نتایج نشان داد که، سرین پروتئاز هضم کننده کوتیکول وقتی القا می شود که از کوتیکول حشرات به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن استفاده شود (۴).

۲-۳-۳. دای پتیدیل پتیداز

پروتئازها بر طبق معیارهای مختلفی، شامل نوع واکنشی که کاتالیز می کنند، گروه عملکردی جایگاه فعال، ساختار مولکولی پروتئازها و روابط تکاملی آنها طبقه بندی می شوند. پروتئازهایی از قبیل اگزوپتیدازها هیدرولیز آمینواسیدهای انتهایی زنجیره پلی پتیدی را کاتالیز می کنند، درحالیکه اندوپتیدازها (مترادف با پروتئینازها) هیدرولیز باندهای پتید درونی را کاتالیز می کنند اگزوپتیدازها روی هر دو انتهای آمینی و کربوکسیلی زنجیره های پتید عمل می کنند. اگزوپتیدازهایی که قادرند تا یک، دو و سه آمینواسید را از انتهای آمینی حذف کنند که به ترتیب آمینوپتیداز، دای پتیدیل پتیداز و تری پتیدیل پتیداز نامیده می شوند. دای پتیدیل پتیدازهای قارچ *M. anisopliae* در متابولیسم کربوهیدراتها و آمینواسیدها نقش دارند. این پتیدازها به صورت آنزیم همکار با سرین پروتئاز Pr1 برای تسهیل هیدرولیز پروتئینهای کوتیکول حشره عمل می کنند، و منبعی از مواد غذایی را به آسانی برای *M. anisopliae* فراهم می کنند (۶۱). از جمله مطالعات انجام شده روی ژن دای پتیدیل پتیداز در زیر اشاره شده است.

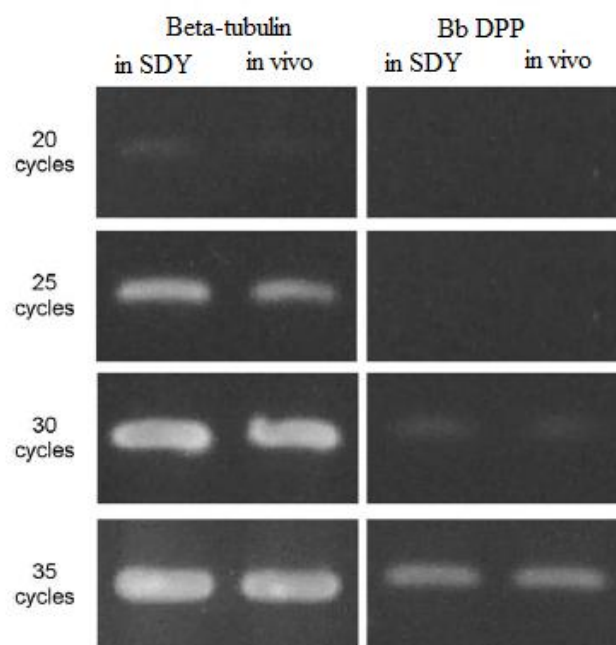
تارتار و همکاران (۲۰۰۴) پس از آنالیز توالی ژن دای پتیدیل پتیداز (DPP) در قارچ *B. bassiana* نشان دادند که ژن DPP ۲۰۶۱ جفت باز طول دارد و پروتئینی با وزن مولکولی ۷۶ کیلودالتون را کد می -

کند، توالی آمینواسیدی آن مشابه آنزیمی در پاتوژن انسانی اسپرژیلوس فومیگاتوس^۱ DPPV^۲ بود، که عملکرد آن هنوز ناشناخته است. اما همچنانکه توسط بویس و همکاران (۱۹۹۷) مشخص شد پروتئاز DPPV احتمالاً منابع آمینواسیدی لازم برای تغذیه قارچ را در حین عفونت‌زایی فراهم می‌کند (۶۲)، در آنالیز آماری توالی انتهای آمینی در BbDPP^۳ سیگنال پپتیدی شناسایی نشد، بنابراین این آنزیم توسط B. bassiana ترشح نمی‌شود (۱۸). واکنش‌های RT-PCR نیمه کمی نشان داد که رونوشت ژن دای‌پپتیدیل پپتیداز در قارچ B. bassiana هم در RNA کل استخراج شده از B. bassiana رشدیافته در روی محیط کشت SDY و هم در RNA کل استخراج شده از اجسام هیفی رشدیافته در همولنف حشره وجود دارد و در هر دو وضعیت بیان می‌گردد. شرایط واکنش برای همه cDNAهای تکثیری یکسان بود، تغییر در تکثیر بین نمونه‌های in vivo (در همولنف) و in vitro (در محیط SDY) منعکس‌کننده تفاوت‌های اولیه در فراوانی mRNA در هر شرایط رشد است. آنها از بتا توبولین به عنوان کنترل درونی استفاده کردند. همانطور که برای بتا توبولین دیده شد بیان DPP نیز در این دو وضعیت مستقل از شرایط رشد بود (۱۸). دای‌پپتیدیل پپتیداز در قارچ B. bassiana متعلق به گروهی از پروتئازهای قارچی است که فعالیت آنزیمی داشته و نقش آن طی عفونت هنوز آشکار نشده است. همانطور که در شکل ۲-۳ نشان داده شده است میزان بیان ژن BbDPP تحت شرایط in vivo و in vitro تغییر نمی‌کند و بیان آن وابسته به شرایط کشت نیست و همواره مانند توبولین (کنترل درونی) بیان ثابتی دارد و با وجود بیان ثابت ژن در دو وضعیت in vivo و in vitro به نظر می‌آید این ژن نقشی در بیماری‌زایی نداشته باشد (۱۸). با توجه به نقش این ژن به عنوان یک اگزوپپتیداز پیش‌بینی می‌شود در هضم و تغذیه قارچ نقش داشته باشد بنابراین جهت مطالعه انتخاب شد.

1 - *Aspergillus fumigatus*

2 - Dipeptidyl peptidase

3 - *Beauveria bassiana* Dipeptidyl peptidase



شکل ۱-۲. ارزیابی RT-PCR نیمه کمی رونوشت های β -tubulin و *Bb DPP* تحت شرایط *in vivo* و *in vitro* (SDY). همانطور که در شکل معلوم است هر دو ژن در دو وضعیت بیان ثابتی داشتند.

۲-۳-۴. پروتئین کیناز

پروتئین کینازها گروهی از آنزیم‌ها هستند، که در فرآیند فسفوریلاسیون، یک گروه فسفات را به پروتئین‌ها منتقل می‌کنند، و به عنوان یک سوئیچ خاموش/ روشن برای بسیاری فرآیندهای سلولی، شامل متابولیسم، نسخه‌برداری^۱، توسعه سیکل سلولی، بازآرایی اسکلت سلولی^۲ و تحرک سلولی، آپوپتوزیس و تمایز عمل می‌کنند.

در چندین قارچ پاتوژن گیاهی و حشرات از قبیل *Candida albicans*، *Magnaporthe grisea*، *Botrytis*، *C. gloeosporioides*، *Cryphonectria parasitica*، *Mycosphaerella graminicola*، *P. teres*، *Cinerea* و *B. bassiana* ژن‌های وابسته به MAPKS^۳ از جمله ژن *Bbmkp*^۴ در قارچ *B. bassiana* در برای شکل‌گیری آپرسوریوم و بیماری‌زایی نقش دارند. در بعضی قارچ‌های بیمارگر، از قبیل پاتوژن بلاست برنج^۵ و پاتوژن آنتراکنوز خیار^۶ موتانت‌های حاصل از جهش این ژن کاملاً بیماری‌زا بودند (۶۳). نتایج سایر پژوهش‌ها نشان داد که این ژن نقش کلیدی در سیگنال‌های تنش محیطی و در بیماری‌زایی بازی می‌کند (۶۴). نفوذ در کوتیکول به هر دو عمل هضم آنزیمی و فشار مکانیکی حاصل از هیف نفوذی نیاز دارد. در موتانت‌های حاصل از جهش این ژن در قارچ *Beauveria* به دلیل تغییر فنوتیپ نفوذ، توانایی خود را برای تولید فشار مکانیکی و نفوذ در کوتیکول از دست می‌دهند (۶۵). در قارچ *B. bassiana* ژن پروتئین کیناز مورد بررسی در تنظیم مبادلات آوندی، متابولیسم لیپید، تحرک و پیشرفت میکروتوبول‌ها، زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی نیز درگیر است. جهش این ژن در *B. bassiana* همچنین باعث کاهش نمایشی در تولید دو هیدروفوبین درگیر در سنتز دیواره سلولی قارچ می‌گردد، در

1 - Transcription

2 - Rearrangement Cytoskeletal

3 - Mitogen-Activated Protein Kinases

4 - *Beauveria bassiana* Mitogen Activated Protein Kinases5 - *Magnaporthe oryzae*6 - *Colletotrichum lagenarium*

نتیجه موتانت های حاصل کاهش بیماریزایی، کاهش زیست پذیری اسپور، کاهش توانایی برای اتصال به کوتیکول حشرات را نشان می دهند. همانطور که مشاهده می کنید ژن های تنظیمی مجموعه ای از فعالیت ها را تحت تاثیر قرار می دهند. مشاهده شده است که *MAPK* در قارچ *Trichoderma virens* بیان ژن های کدکننده آنزیم های هضم کننده کوتیکول را وابسته به بیماریزایی را حمایت می کند. اما در مورد *B. bassiana* این گونه نبوده است و احتمالاً بیان آنزیم های هضم کننده کوتیکول تحت کنترل مکانیسم تنظیمی دیگری می باشد (۶۵).

زانگ و همکاران (۲۰۰۹) ژن *MAPK* در قارچ *B. bassiana* را که کدکننده یک *MAPK* در خانواده *YERK1* بود را جدا کردند. نتایج حاصل از توالی یابی ژن *MAPK* در قارچ *B. bassiana* و مقایسه دو توالی DNA و RNA نشان داد که این ژن حاوی سه اینترون می باشد. توالی آمینواسیدی *BbMPK*^۲، ۹۴ تا ۹۶ درصد با *Fusarium oxysporum FMK1*، *Trichoderma virens TMKA*، *M. grisea PMK1*، *Botrytis cinerea BMP1* و *lagenarium CMK1* آنالیز سادرن نشان داد که *Bbmpk* ژنی تک نسخه در *B. bassiana* است. زانگ و همکاران جهت بررسی عملکرد ژن *Bbmpk1* در *B. bassiana*، ژن مورد نظر را در قارچ جهش دادند و نژاد موتانت تولید کردند. زیست سنجی حشرات نشان داد با جهش ژن، بیماریزایی *B. bassiana* در برابر لارو *Pieris brassicae* به طور کامل از دست می رود که نشان دهنده نقش این ژن در بیماریزایی است. در حالی که متوسط زمان کشندگی (LT_{50}) برای نژاد تیپ وحشی ۳/۲ روز بود، با کاربرد کنیدی موتانت *Bbmpk1* در برابر لارو میزبان حتی بعد از ۶ روز هم مرگ و میر معنی داری مشاهده نشد. این اطلاعات نشان داد که *Bbmpk1* برای بیماریزایی *B. bassiana* ضروری است. مشاهده شد که در پاسخ به کاربرد کنیدی تیپ وحشی دو روز پس از تلقیح، کوتیکول

1 - The Yeast and Fungal Extracellular Signal-Regulated Kinase Subfamily

2 - *Beauveria bassiana* Mitogen-activated Protein Kinases

3 - Lethal Time

حشره تیره^۱ می‌شود و ۴ روز بعد از تلقیح حشرات از بین رفتند، درحالی‌که چنین پاسخی برای حشرات تیمار شده با کنیدی حاصل از نژاد موتانت مشاهده نشد. نتایج مشابه در زیست‌سنجی حشره با استفاده از شته‌های، *Myzus persicae* نیز به دست آمد. وقتی کنیدی قارچی از طریق غشا حلقه حلقه^۲ مستقیماً به هموسل در لارو *Pieris brassicae* تزریق شدند بین نژاد وحشی و نژاد موتانت *Bbmpk1* مقادیر مرگ و میر مشابهی دیده شد، چهار روز بعد از تزریق، همه حشرات در هر دو گروه تیمار مرده بودند که این نتایج بیانگر این است که این ژن در نفوذ سریعتر به حشره نقش دارد (۶۶).

در تحقیق زانگ و همکاران (۲۰۰۹) اثر جهش ژن *Bbmpk1* و تولید نژاد موتانت، روی پارامترهای فنوتیپیک وابسته به بیماریزایی، چسبندگی اسپور و شکل‌گیری آپرسوریوم بررسی شد. چسبندگی کنیدی با استفاده از بال‌های عقب زنجره ارزیابی شد. سوسپانسیون کنیدی روی بال‌های عقب زنجره به کار رفت و ۸ ساعت بعد از تلقیح بال‌های حشره با تویین ۲۰، ۰/۰۵ درصد شسته شدند، بعد از شستشو $27/8 \pm 3/8$ درصد از کنیدی‌های موتانت و $10/5 \pm 81/1$ درصد از کنیدی‌های تیپ وحشی روی بال‌ها باقی مانده بود، مشاهده شد که چسبندگی کنیدی به کوتیکول حشره شدیداً در نژاد موتانت ضعیف شده بود. بعد از تلقیح آپرسوریوم بر روی بال‌های عقبی زنجره، نتایج نشان داد اگرچه که از نظر مورفولوژی ساختار آپرسوریوم در نژاد موتانت شبیه تیپ وحشی بود اما شکل‌گیری آپرسوریوم به صورت معنی‌داری (۷۷/۹ درصد) در نژاد موتانت در مقایسه با تیپ وحشی کاهش نشان داد (۶۶).

۵-۳-۲. سیتوکروم P450 مونواکسیژناز

آنزیم‌هایی که به طور اختصاصی در افزودن گروه‌های هیدروکسیل انتهایی *n*-alkene ها درگیرند P450alk نامیده می‌شوند که از ژن‌های متعلق به خانواده CYP52 هستند. این ژن‌ها در مخمرهای *Candida*

1 - Melanization
2 - Intersegmental

Debaryomyces و *Yarrowia lipolytica*, *Candida apicola*, *Candida maltosa tropicalis*
hansenii شناسایی شده است (۶۷). ژن های *Cyp52X* زیرخانواده ای جدید از سیتوکروم P450 ها در قارچ
B. bassiana دخیل در بیماریزایی و رشد روی سوبستراهای کوتیکولی حشرات هستند (۶۸).

آنزیم های سیتوکروم P450 در همه گروه های موجودات زنده شامل جانوران، گیاهان، قارچ ها، باکتری ها و
آرکی باکترها وجود دارد. بیش از ۱۱۵۰۰ پروتئین سیتوکروم شناخته شده است. وقتی از داروهای ضد
قارچی رده های imidazole و triazole استفاده می شود، فعالیت آنزیم سیتوکروم P450 قارچی مختل
می گردد. آنزیم های سیتوکروم P450 در قارچ *B. bassiana* در هضم هیدروکربن های حشره درگیر
هستند. از آنجایی که اپی کوتیکول حشره با لایه ای غنی از لیپید پوشیده شده است که معمولاً از
هیدروکربن های زنجیر بلند با میزان های متغیری از الکل های چرب، اسیدهای چرب و استرهای واکسی
تشکیل می شود، از اینرو قارچ های بیمارگر حشرات توانایی هضم لیپیدهای کوتیکولی حشرات و هیدرو-
کربن ها را به عنوان منبع تغذیه دارند (۶۷).

اگرچه که *B. bassiana* قادر به رشد روی هیدروکربن های کوتیکولی حشرات است، دامنه طول زنجیره ای
که به عنوان منبع کربن و انرژی می توانست در رشد قارچ مورد استفاده قرار گیرد تا سال ۲۰۱۰ ناشناخته
بود. پدرینی و همکاران (۲۰۱۰) رشد قارچ *B. bassiana* را روی دامنه ای از آلکان های آلیفاتیک، شامل n-
C₉₋₂₄, n-C₂₆₋₂₈, n-C_{30,31,33,35,39,41} در هر دو شرایط محیط کشت جامد و مایع تست کردند و به این
نتیجه رسیدند که قارچ به استثنای سه تا از بلندترین زنجیره های آلکان، n-C_{35,39,41} قادر به رشد روی
همه آلکان ها بود. آلکان های با طول متوسط (حدود n-C₁₆) به نظر رسید که سوبسترای آلکان ترجیحی به
عنوان منبع کربن برای رشد بود (۶۷).

پدرینی و همکاران (۲۰۱۰) به منظور بررسی اینکه آیا ژن‌های P450 به طور اختصاصی توسط آلکان‌ها القا می‌شوند یا خیر. بیان مجموعه آنزیم‌های سیتوکروم P450 (هشت آنزیم) را در قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* رشد یافته روی n-هگزادکان (n-C₁₆)، n-ایکوزان (n-C₂₀)، n-تتراکوزان (n-C₂₄)، یا n-اکتاکوزان (n-C₂₈) به عنوان تنها منبع کربن و گلوکز و همچنین عصاره کوتیکولی *Triatoma infestans* بررسی کردند. بررسی بیان این ژن‌ها تحت شرایط مختلف توسط Real-Time PCR انجام شد. برای آنالیز اطلاعات به دست آمده از روش RT-PCR، از ژن 5.8s rRNA به عنوان کنترل درونی، استفاده شد. و آزمایش دوبار برای هر سه تکرار بیولوژیکی مستقل انجام شد. نتایج آزمایش بیان متفاوت هشت ژن سیتوکروم را در قارچ *B. bassiana* نشان داد.

در مطالعه پدرینی و همکاران (۲۰۱۰) ژن *Cyp52X1* (P450-1) (در تحقیق حاضر نیز) در *B. bassiana* با رشد روی هیدروکربن‌های زنجیره کوتاه (n-C₁₆ و n-C₂₀) به میزان ناچیزی القا شد، و با رشد روی آلکان‌های با طول زنجیر متوسط (n-C₂₄) تقریباً ۱۰ برابر، و در برابر آلکان‌های بسیار زنجیر بلند (n-C₂₈) اغلب ۱۰۰ برابر و در برابر لیپیدهای مشتق شده از حشره بیش از ۳۰ برابر القا نشان داد. نتیجه این تحقیق نشان داد که آنزیم‌های متعلق به خانواده *CYP52* در برابر آلکان‌های زنجیر بلند n-C₂₄ و n-C₂₈ و عصاره اپی کوتیکولی حشره القا می‌شود اما به صورت معنی‌داری توسط آلکان‌های زنجیر کوتاه آزمایش شده، القا نمی‌شود (۶۷).

زانگ و همکاران (۲۰۱۲) عضوی از این زیرخانواده جدید سیتوکروم P450، *CYP52X1*، را در *B. bassiana* توصیف کردند. با جهش ژن *Bbcyp52x1* در قارچ *B. bassiana* و کاربرد قارچ به صورت موضعی روی *Galleria mellonella* کاهش بیماری‌زایی در قارچ مشاهده شد، اما وقتی قارچ از کوتیکول حشره درون هموسل تزریق شد، کاهش در بیماری‌زایی مشاهده نشد. نقصان رشد معنی‌داری در موتانت‌ها در مقایسه با تیپ وحشی روی سوبستراهای لیپیدی آزمایش شده شامل آلکان‌ها و اسیدهای چرب

مشاهده نشد (۶۹). در سنجش جوانه زنی کنیدی روی اپی کوتیکول حشره، کاهش جوانه زنی معنی داری در کنیدی های موتانت *Bbcyp52X1* بر روی بال های ملخ در مقایسه با تیپ وحشی مشاهده شد. این اطلاعات نشان داد که *CYP52X1* در نفوذ به کوتیکول حشرات از طریق تسهیل هضم لیپیدهای اپی- کوتیکولی حشره نقش دارد (۶۹).

۶-۳-۲. سنسور کلسیم

یون کلسیم Ca^{2+} نقش اصلی را در انتقال پیام درون سلولی در قارچ ها و سایر ارگانسیم های یوکاریوتی بازی می کند. در قارچ ها، سیگنالینگ Ca^{2+} در تنظیم فرآیندهایی مانند، ترشح، سازماندهی اسکلت سلولی^۱، رشد نوک هیف، منشعب شدن هیف، اسپورزایی، تمایز ساختار عفونت زایی و پیشرفت سیکل سلولی درگیر است. سطوح یون کلسیم سلولی از طریق مجموعه متنوعی از کانال های یون کلسیم Ca^{2+} ، پمپ ها، انتقال دهنده ها^۲ و پروتئین های اتصال شونده به کلسیم^۳ کنترل می شود. اعضای گروه اخیرا به دو کلاس، بافرهای کلسیم و سنسورهای کلسیم تقسیم می شوند. *Neuronal calcium sensor-1 (NCS-1)* (*frequenin* (the yeast homologue) زیر خانواده ای از سنسورهای کلسیم را نشان می دهد که حاوی سه موتیف EF-hand عملکردی اتصال کلسیم است. میزان Ca^{2+} درون سلولی در درجه اول توسط پروتئین- های اتصال کلسیم neuronal calcium sensor-1 تغییر می کند.

قارچ رشته ای *B. bassiana* محیط خارج سلولی را طی رشد و بیماریزایی در میزبان هدف اسیدی می کند. فان و همکاران (۲۰۱۲) بعد از تولید کتابخانه ی درج تصادفی^۴ از *B. bassiana* متوجه شدند، که تعدادی از کلونی های رشد یافته در محیط کشت باعث افزایش اسیدیته در محیط کشت می گردند، بعد از توالی یابی

1 - Cytoskeletal

2 - Transporter

3 - Calcium-Binding Proteins

4 - Random Insertion Library

ژن موجود در آن کلونی‌ها، مشخص گردید که ژن مورد نظر با *NCS-1* هومولوژی (۹۹ درصد) دارد. آنها برای اثبات نقش ژن سنسور کلسیم در اسیدی‌نمودن محیط کشت، موتانت فاقد این ژن را ساختند. بعد از مقایسه تیپ موتانت و وحشی ثابت شد که *Bbcsa'1* ژن ضروری در اسیدی کردن محیط کشت نیست. در پروفایل HPLC متابولیت‌های ترش‌هیچ تغییر اساسی در تولید اسیدهای آلی بین دو نژاد شناسایی نشد، اگرچه بیان پایین پمپ غشا $H^+/ATPase$ در موتانت ملاحظه شد. نتایج نشان داد این ژن برای رشد قارچ ضروری نیست اما فنوتیپی ضعیف با رشد ناقص برای نژاد موتانت در مقایسه با نژاد وحشی بر روی محیط کشت‌های با غلظت‌های بالای کلسیم دیده شد. زیست‌سنجی حشرات با استفاده از *Galleria mellonella* به عنوان میزبان هدف با موتانت *Bbcsa1* در مقایسه با تیپ وحشی کاهش بیماری‌زایی نشان داد و مهارکننده مسیر طبیعی عفونت بود، اما وقتی سلول‌های قارچی نژاد موتانت مستقیماً در همولنف میزبان هدف تزریق شدند، اثر معنی‌داری در کاهش بیماری‌زایی مشاهده نشد، که این نتایج بیانگر این بود که ژن *Bbcsa1*، در برهمکنش ایمنی میزبان طی رشد در همولنف غیر ضروری است و احتمالاً این ژن در حوادث اولیه نفوذ یا پیش از نفوذ نقش دارد (۷۰).

فان و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی بیان ژن *Bbcsa-1* تحت شرایط مختلف مشاهده کردند که، این ژن تحت شرایط کشت جامد در میسلیم‌های بالغ از ۷ تا ۱۵ روزه به میزان زیادی بیان می‌شود، اما در محیط کشت غنی مایع کمتر از ۶ روز، این ژن میزان بیان ناچیزی نشان می‌دهد (۷۰).

مین و یوکی‌نگ (۲۰۱۲)، نقش بیماری‌زایی ژن سنسور کلسیم *NCS-1* را در قارچ *Metarhizium acridum* بررسی کردند. آنها بیماری‌زایی را در نژاد وحشی قارچ و موتانت‌های تولید شده (از طریق کاهش بیان ژن

پس از نسخه برداری^۱ در برابر ملخ مهاجر^۲ مقایسه کردند، نتایج کاهش شدید بیماریزایی را در نژاد موتانت، و نقش ژن را در بیماریزایی نشان داد (۷۱).

1 - RNA Interference
2 - *Locusta Migratoria Manilensis*

فصل سوم

مواد و روش ها

این فصل شامل مواد مورد استفاده، تجهیزات مورد استفاده، دستورالعمل پرورش آفات انباری، نحوه جمع-آوری حشرات آفت زراعی، روش جداسازی کویتیکول از حشرات و استفاده از آنها در محیط کشت، کشت قارچ بیمارگر حشرات *Beauveria* روی محیط کشت جامد، تهیه سوسپانسیون از کنیدی های سطحی قارچ روی محیط کشت جامد، تهیه محیط کشت مایع القاگر ژن های مورد مطالعه حاوی عصاره کویتیکول، فیلتر محیط کشت و جدا کردن میسلیوم از محیط کشت، استخراج RNA به روش Trizol از میسلیوم-های قارچی، تعیین کیفیت RNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز ۱/۶ درصد، تیمار RNA با DNase I, RNase-free جهت از بین بردن آلودگی احتمالی به DNA، تعیین غلظت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر، سنتز cDNA از RNA تام، جهت تکثیر رشته اول با استفاده از پرایمر Oligo (dt)₁₈ و آنزیم M-Mul V Reverse Transcriptase، تکثیر cDNA های سنتز شده با پرایمرهای اختصاصی و آنزیم Taq DNA polymerase، الکتروفورز افقی و تصویر برداری از ژل در دستگاه Gel documentation و استفاده از نرم افزار Image J جهت کمی کردن تصویر باندها می باشد. که در ادامه به توضیح مراحل ذکر شده در بالا خواهیم پرداخت.

۳-۱. مواد

پپتون، عصاره مخمر و دکستروز از شرکت Lifilchem (میلانو، ایتالیا) توین ۸۰، Tris-HCL، EDTA، بوریک اسید، پتاسیم تترابورات، پتاسیم کلرید، منیزیم سولفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات و گلیسرول از شرکت Merck (فرانکفورت، آلمان) ترایزول (TRI Reagent)، ایزوپروپانول، کلروفرم و اتانول از شرکت Sigma (سنت لوئیس، آمریکا) 2-step RT-PCR kit، Loading dye، 10 mM dNTP MIX، 50 mM MgCl₂، Taq DNA Polymerase، DNase Free Deionized water، 10× Buffer M-MulV، MulV Reverse Transcriptase از شرکت Vivantis (شاه عالم، مالزی) رنگ Safe-stain از شرکت Bioscience (کمبریج، انگلستان) و پرایمرها از شرکت Bioneer (داجون، کره جنوبی) تهیه شد.

۲-۳. تجهیزات

اتوکلاو از Medical Industries (تهران، ایران)، آون و انکوباتور از Hersus (هانوا، آلمان)، حمام خشک و شیکر انکوباتور از Labnet (آلباما، اسپانیا)، هود میکروبی و هود شیمیایی از Farpajouh (تهران، ایران)، ترموسایکلر از TaKaRa (آتسو، ژاپن)، سانتریفیوژ یخچالدار و سمپلر از Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، ورتکس، حمام آب گرم از DENA Medical Industry (تهران، ایران)، مایکروویو از LG (سئول، کره جنوبی)، ژل داگ Quantum ST4 (سوویا، آلمان)، ترانس ایلومینیتور از Toba Negin (تهران، ایران)، پاور سوپلای از PADIDEH NOJEN PARS (مشهد، ایران)، اسپکتروفوتومتر از JENWAY (بدفوردشایر، انگلستان)، میکروسکوپ نوری و بینوکولار از Olympus (توکیو، ژاپن)، لام هموسیتومتر از شرکت Neubauer Improved (هامبورگ، آلمان)، کوت کوارتز از Spectrocell، آلمان، هات‌پلیت از Heidolph (نورنبرگ، آلمان)، pH متر Metrohm (پلیکان کریک، آمریکا)، یخچال و فریزر ۲۰- پارس (تهران، ایران)، پتری‌دیش شیشه‌ای از نوین تجهیز (تهران، ایران)، اتا‌فک رشد از Grouc (تهران، ایران)، ترازو از SARTORLUS (گوتینگن، آلمان)، پمپ خلاء از PLATINUM (آرورا، آمریکا) در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۳. پرورش حشرات

۳-۳-۱. پرورش پروانه موم‌خوار

سیکل زندگی پروانه موم‌خوار (*Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera.: Pyralidae) (جدول ۳-۱)، شامل تخم، ۴ سن لاروی، شفیره و حشره کامل می‌باشد (شکل ۳-۱). حشرات کامل به طول ۴۱-۳۰ میلی‌متر هستند و در اردیبهشت تا مهر در مناطق معتدل به پرواز درمی‌آیند. این حشره از انسکتاریوم حشره، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شد. جهت پرورش پروانه موم‌خوار از غذای

جدول ۳-۱. رده بندی پروانه موم خوار

Kingdom	Animalia
Phylum	Arthropoda
Class	Insecta
Order	Lepidoptera
Family	Pyralidae
Tribe	Galleriini
Genus	<i>Galleria</i> Fabricius, 1798
Species	<i>G mellonella</i>



شکل ۳-۱. مراحل زندگی پروانه موم خوار (الف) تخم حشره، (ب) مرحله لاروی، (ج) مرحله شفیره، (د) مرحله بلوغ

(http://en.wikipedia.org/wiki/Galleria_mellonella)

مصنوعی استفاده شد. یک پیمانۀ موم، ۱/۲ پیمانۀ آب مقطر استریل را با یکدیگر مخلوط و حرارت داده شد تا جوش آید و مخلوط تا تبخیر کامل آب هم زده شد، ۱ پیمانۀ گلیسرول ۸۷٪ حجمی/حجمی و ۱/۲ پیمانۀ عسل اضافه و خوب مخلوط شد. دو پیمانۀ آرد سفید، ۱ پیمانۀ سبوس و ۱ پیمانۀ خمیر مایه را از قبل با یکدیگر مخلوط و به مواد درون ظرف اضافه گردید. عمل هم‌زدن برای ۱۵ دقیقه بر روی شعله ادامه یافت سپس خمیر به دست‌آمده کاملاً ورز داده شد. در ظروف پرورش پروانه موم‌خوار (ظروف پلاستیکی با ابعاد ۲۰ × ۳۰ سانتی‌متر دارای دریچه توری جهت هوادهی)، لایه‌ای از این مواد ریخته شد نواری از تخم بر روی محیط قرار داده شد و روی آن با لایه‌ای از موم پوشانده شد. ظروف حشرات در اتاقک رشد با دمای ۱ ± ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۳ ± ۸۵ درصد نگهداری گردید. حشرات بالغ پروانه موم-خوار به میزان کافی در محیط و شرایط تغذیه‌ای مناسب پرورش داده شدند. حشرات بالغ در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد کشته شدند و جنس ماده از طریق مشاهده شکل دم بیرونی زیر بینوکولر که تقعر دم بیرونی آن نسبت به جنس نر به طور قابل تشخیصی کمتر بود، شناسایی شدند و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

۳-۲-۳. پرورش سوسک قرمز آرد

حشره بالغ سوسک قرمز آرد (*Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera.: Tenebrionidae) (جدول ۲-۳) تقریباً بسیار فعال است و با سرعت حرکت می‌کند. ماده‌ها به طور متوسط تعداد ۴۵۰ تخم کوچک کاملاً سفید می‌گذارد. لارو (سفید مایل به قهوه‌ای) در روز ۵ تا ۱۲ از تخم در می‌آید. تبدیل لاروها به شفیره با تغییر رنگ از سفید و سپس به زرد و قهوه‌ای مایل به قرمز همراه است، و سیکل زندگی حشره بین ۹۰-۴۰ روز می‌باشد. طول سوسک‌ها ۵/۰ سانتی‌متر می‌باشد و حشره بالغ تا دو سال هم زنده می‌ماند (شکل ۲-۳).

جدول ۳-۲. رده بندی سوسک قرمز آرد

Kingdom	Animalia
Phylum	Arthropoda
Class	Insecta
Order	Coleoptera
Family	Tenebrionidae
Genus	<i>Tribolium</i>
Species	<i>T. castaneum</i>



شکل ۳-۲. مراحل زندگی سوسک قرمز آرد به ترتیب از چپ به راست تخم حشره، لارو، شفیره، سوسک بالغ
(http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/beetles/red_flour_beetle.htm)

این حشره از انسکتاریوم دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود تهیه گردید، و روی مخلوط آرد و سیبوس در دمای تقریبی ۳۰ درجه سانتی‌گراد داخل ظروف پرورش (ظروف پلاستیکی با ابعاد ۲۰ × ۳۰ سانتی‌متر دارای درب توری) رشد یافتند.

۳-۴. جمع‌آوری آفات زراعی از مزرعه

۳-۴-۱. جمع‌آوری ملخ ایتالیایی

ملخ‌ها از جمله آفات ویران‌کننده چراگاه‌ها و محصولات زراعی در بسیاری قسمت‌های دنیا هستند. اندازه متوسط حشره بالغ در نرها (۲۶-۱۴) و ماده‌ها (۴۰-۲۱) میلی‌متر است. ملخ ایتالیایی *Calliptamus italicus* (Linnaeus) (Orthoptera.: Acrididae) (جدول ۳-۳) از مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود (بسطام) جمع‌آوری شد، و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مورد ملخ ایتالیایی، بالغ و پوره این حشره را نمی‌توان از روی شکل شناسایی و جدا کرد، از روی اندازه‌گیری کپسول سر (۶-۷ میلی‌متر) به کمک کولیس معلوم گردید که همه حشرات جمع‌آوری شده پوره بودند و شناسایی جنس نیز با چشم غیر مسلح از طریق زوائد انتهایی بدن تعیین گردید که از جنس ماده این حشره در این تحقیق استفاده شد. رده‌بندی این حشره (جدول ۳-۳) و تصویری از حشره مورد استفاده در شکل ۳-۳ آورده شده است.

۳-۴-۲. جمع‌آوری سن گندم

گندم (*Triticum aestivum* L.) و جو (*Hordeum vulgare* L.) محصولات زراعی مهمی هستند، که سن گندم *Eurygaster integriceps* (Puton) (Hemiptera.: Eurygastrinae) (جدول ۳-۴) خسارت زیادی به این محصولات وارد می‌نماید، طول حشره کامل حدود ۱۲ میلی‌متر است. سن گندم (شکل ۳-۴) بالغ

جدول ۳-۳. رده بندی ملخ ایتالیایی

Kingdom	Animalia
Phylum	Arthropoda
Subphylum	Hexapoda
Class	Insecta
Order	Orthoptera
Family	Acrididae
Genus	<i>Calliptamus</i>
Species	<i>C. italicus</i>



شکل ۳-۳. ملخ ایتالیایی (http://en.wikipedia.org/wiki/Calliptamus_italicus)

جدول ۳-۴. رده بندی سن گندم

Kingdom	Animalia
Phylum	Arthropoda
Class	Insecta
Order	Hemiptera
Family	Scutelleridae
Subfamily	Eurygastrinae
Genus	<i>Eurygaster</i>
Species	<i>E. integriceps</i>



شکل ۳-۴. حشره بالغ سن گندم (<http://plantsprotection.persianblog.ir/post/17/>)

از یکی از مزارع گندم دامغان جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه انتقال یافت و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. و با توجه به قطعات بیرونی دستگاه تناسلی حشرات در جنس ماده زیر بینوکولر شناسایی شد.

۳-۵. روش جداسازی کوتیکول از حشرات

با توجه به مرحله زندگی و سایز حشره مورد استفاده از روش‌های متفاوتی جهت جداسازی کوتیکول حشرات استفاده گردید، اولین مرحله در جداسازی کوتیکول حشرات، خرد کردن حشرات به منظور قرارگیری کامل کوتیکول در معرض پتاسیم تترابورات است تا تمامی آلودگی‌های احتمالی به هموسل حشره از بین برود. روش آماده‌سازی بدن حشرات در مورد پروانه موم‌خوار به این صورت است که پس از یخ زدن و شناسایی جنس ماده حشرات پرورش یافته، با استفاده از اسکالپل، بال‌ها و سر حشره جدا گردید و سپس بدن حشره با استفاده از اسکالپل قطعه قطعه شد و تنها از این قسمت استفاده گردید. اما در مورد سوسک قرمز آرد روش جداسازی کوتیکول متفاوت بود، در این حشره پس از اینکه سوسک‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد یخ زدند، داخل هاون چینی کاملاً خرد شدند و از کوتیکول تمام قسمت‌های حشره استفاده گردید. در مورد ملخ ایتالیایی، پس از یخ زدن ملخ‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد، بال‌ها و بدن حشره جدا شدند بال‌ها و بدن حشره با اسکالپل خرد شد. پس از اینکه تمامی حشرات خرد شدند قطعات حاصل پس از آماده‌سازی در محلول پتاسیم تترابورات ۱ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی همزن قرار گرفتند. در مورد سن گندم پس از جمع‌آوری از مزرعه گندم و تشخیص حشرات ماده و یخ زدن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به کمک اسکالپل قطعات بدنی، سر، بال‌ها و قطعات شکمی حشرات ماده از هم جدا شدند و بدن و بالپوش بالایی برای جداسازی کوتیکول استفاده شد (۷۲).

سوسپانسیون‌ها در مورد سوسک قرمز آرد از کاغذ صافی و در مورد باقی حشرات از قیف بوختر عبور داده

شدند و سپس چندین مرحله روی کاغذ صافی با آب مقطر استریل شسته شدند تا کاملا تمیز گردد، سپس با اتانول ۷۰ درصد و مجدداً با آب مقطر استریل شسته شدند و مجدداً از کاغذ صافی عبور داده شدند، در این مرحله تنها کوتیکول حشرات روی کاغذ صافی باقی ماند که در دمای اتاق خشک گردید پس از اینکه کاملاً خشک گردید داخل هاونی تمیز، سائیده شد و پودر کوتیکول حاصل تا زمان مصرف در محیط کشت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (شکل ۳-۵).

۳-۶. جدایه‌های قارچی

جدایه‌های قارچی استفاده شده در این تحقیق، مربوط به دو منطقه ایران می‌باشند. جدایه‌های ۲۲ و ۹۴ قارچ بیماریزای حشرات *Beauveria spp.* استفاده شده در این تحقیق به ترتیب مربوط به مناطق دهنه‌ی میمند مرز کرمان و هرمزگان شهر حاجی‌آباد استان هرمزگان با موقعیت جغرافیایی (N 28° 12' 45" ، E 56° 26' 37") و مینودشت استان گلستان با موقعیت جغرافیایی (E 55° 17' 25" ، N 37° 10' 21") بودند، که طبق بررسی‌های بیماریزایی انجام شده نسبت به شپشه برنج دارای قدرت بیماریزایی به ترتیب ضعیف و قوی بودند و به ترتیب براساس توالی‌یابی ناحیه ITS، جدایه ۲۲، *B. iranica* و جدایه ۹۴، *B. amorpha* شناسایی شدند (۹).

۳-۷. محیط کشت قارچ *Beauveria spp.*

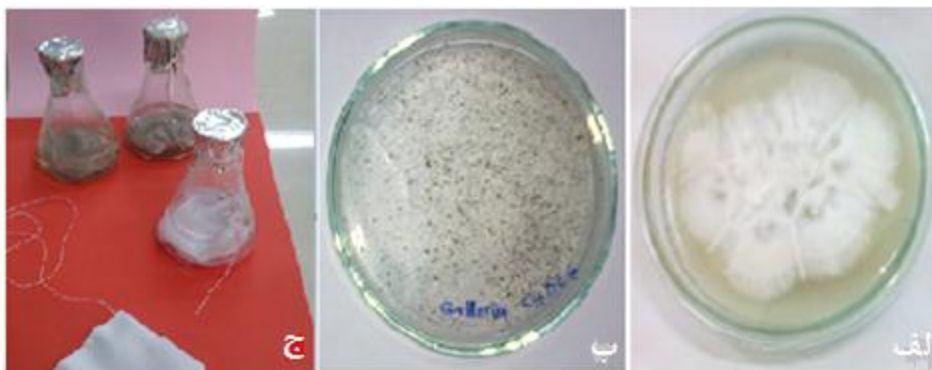
جهت تکثیر و کشت جدایه‌های قارچ *Beauveria spp.* چهار نوع محیط کشت SDY، SDAY، محیط کشت حداقل با نیترات Pontecorvo [۸۰] (۶ گرم سدیم نیترات، ۰/۵۲ گرم پتاسیم کلرید، ۰/۵۲ گرم منیزیم سولفات، ۱/۵۲ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات) تکمیلی با ۱ درصد وزنی/حجمی کوتیکول حشره و محیط عصاره کوتیکولی حشرات حاوی ۰/۵ درصد وزنی/حجمی پودر کوتیکول مورد استفاده قرار گرفت. از محیط SDAY (۱۰ گرم پپتون، ۲۰ گرم دکستروز، ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۱۵ گرم آگار) جهت



شکل ۳-۵. مراحل کار جهت جداسازی کونیکول حشرات (الف) ملخ ایتالیایی (ب) جداسازی کونیکول پروانه موم خوار به کمک اسکالپل (ج) خرد کردن سوسک قرمز آرد داخل هاون چینی (د) فرار گیری حشرات خرد شده داخل محلول پتاسیم

تتراپورات

تکثیر و اسپورزایی جدایه‌های قارچی استفاده شد، و در پتری‌دیش‌های ۱۰ سانتی متری پلیت گردید (شکل ۳-۶). پس از اینکه محیط کشت داخل پلیت‌ها سرد شد پلیت‌ها با پارافیلیم درزگیری شدند و ترجیحا بعد از گذشت یک شبانه‌روز (جهت نشان دادن آلودگی باکتریایی احتمالی) قارچ *Beauveria spp.* با استفاده از لوپ استریل یا خلال دندان استریل روی سطح محیط جامد کشت داده شدند. بعد از گذشت ۱۴-۱۰ روز بسته به شرایط محل نگهداری، قارچ‌ها کاملا رشد یافتند و تمام سطح پتری‌دیش‌ها را پوشاندند. اسپورهای قارچ در بالاترین قسمت، روی سطح پلیت‌های قارچی رشد یافتند و به راحتی با استفاده از لوپ قابل برداشت بودند. در مرحله بعد اسپورهای قارچی بر روی پنج نوع محیط کشت: محیط SDAY به عنوان کنترل (جهت مقایسه با محیط کشت عصاره کوتیکولی) و چهار نوع محیط کشت Pontecorvo به علاوه ۰/۵ درصد وزنی/حجمی پودر کوتیکول هر یک از حشرات، (جهت تحریک بیان ژن تولید کننده آنزیم هضم‌کننده کوتیکول حشرات) کشت داده شد. بعد از کشت قارچ روی محیط کشت Pontecorvo، تکمیلی با پودر کوتیکول حشرات مختلف و محیط SDAY، پتری‌دیش‌های کشت داده شده داخل انکوباتور با دمای 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس از کنیدی‌های قارچی، روی سطح محیط کشت‌های ۱۵ روزه Pontecorvo و SDAY سوسپانسیون اسپور تهیه، و فراونی کنیدی‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری روی 10^7 کنیدی/ میلی‌لیتر تنظیم شد و به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کنیدی 10^7 کنیدی/ میلی‌لیتر آن داخل ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت عصاره کوتیکولی حشرات تلقیح شد. از هر یک از محیط کشت‌های عصاره کوتیکولی و محیط SDY (کنترل) به تعداد سه ارلن (سه تکرار) کشت داده شدند. جهت تحریک حتمی آنزیم‌های هضم‌کننده کوتیکول، قارچ به طور متوالی، از محیط کشت Pontecorvo حاوی کوتیکول روی محیط عصاره کوتیکول انتقال یافت (شکل ۳-۶).



شکل ۳-۶. محیط کشت های مختلف جهت رشد قارچ (الف) محیط کشت SDAY (ب) محیط کشت Pontecorvo حاوی پودر کوتیکول (ج) محیط کشت عصاره کوتیکولی.

۸-۳. روش تهیه و استریل کردن محیط عصاره کوتیکولی

ابتدا به میزان ۰/۲۵ گرم از هر کدام از پودرهای کوتیکولی توزین شد، سپس پودر مورد نظر در کیسه-های دوخته شده از پارچه تنظیف ریخته شد و درب کیسه‌ها کاملاً دوخته شد و داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب شناور شدند، آن‌گاه ارلن‌ها با پنبه و فویل آلومینیومی بسته و در دمای ۱۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه طبق روش وانگ و همکاران (۲۰۰۵) اتوکلاو شدند (۵۲).

۹-۳. تهیه سوسپانسیون اسپور و شرایط کشت

اسپورهای رشد یافته روی سطح محیط کشت جامد Pontecorvo حاوی پودر کوتیکول حشره ۱۵ روزه توسط لوپ استریل اسپور جمع‌آوری شد و سوسپانسیونی از اسپورها با محلول ۱٪ توپین ۸۰ داخل میکروتیوب ۲ میلی‌لیتر بدست آمد و سپس با استفاده از لام هموسیتومتر فراوانی اسپورها زیر میکروسکوپ شمارش شد. فراوانی اسپورها روی 10^7 کنیدی/میلی‌لیتر تنظیم شد و سپس به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور تهیه شده در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت موجود در ارلن‌های ۲۵۰ میلی-لیتری تلقیح شد. محیط کشت‌های مایع داخل انکوباتور شیکردار در دمای 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه به مدت ۵ روز شیک گردید. بعد از این مرحله میسلیم‌ها از محیط کشت فیلتر شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل از این میسلیم‌ها جهت استخراج RNA استفاده شد.

۱۰-۳. آماده‌سازی میسلیم قارچی جهت استخراج RNA

محیط کشت‌ها از کاغذ صافی عبور داده شد و سپس میسلیم‌های روی سطح کاغذ صافی ۲-۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند، میسلیم‌ها به کمک پمپ خلاء، کیف بوخنر و کاغذ واتمن استریل آگیری شدند، سپس توزین شده و مقداری از میسلیم توسط اسکالپل از روی سطح کاغذ صافی برداشته

شد و داخل هاون استریل سرد ریخته شد، و داخل نیتروژن مایع کاملاً سائیده شدند. نمونه سائیده شده قبل از آب شدن به میزان تقریبی ۰/۰۱ گرم به میکروتیوب ۲ میلی لیتری در ۴ درجه سانتی گراد انتقال یافت. استخراج RNA از سه تکرار بیولوژیک (نمونه‌های میسلیم رشدیافته در سه ارلن) درون سه هاون جدا انجام شد.

۱۱-۳. استخراج RNA از قارچ *Beauveria spp.*

استخراج RNA به روش ترایزول صورت گرفت. بدین منظور مقداری از میسلیم‌های سائیده شده حدود (۰/۰۱ گرم) به میکروتیوب ۲ میلی لیتری انتقال یافت و بلافاصله ترایزول به میزان ۰/۸ میلی لیتر به نمونه اضافه شد، سوسپانسیون حاصل کمی هم زده شد، و حدود ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت، سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به هر تیوب اضافه شد و سپس هم زده شد و بعد از ۲-۳ دقیقه ماندن در دمای اتاق، در سانتریفیوژ یخچالدار در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور $12000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد فاز رویی با دقت به میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری جدیدی انتقال یافت و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد و به آرامی مخلوط شد و در دمای اتاق برای مدت ۵ دقیقه نگهداری شد، سپس دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت $12000 \times g$ سانتریفیوژ شد، فاز بالایی^۱ حذف گردید و رسوب باقی مانده با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت $7500 \times g$ برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ و شسته شد و در نهایت اتانول هم حذف شد و پس از خشک شدن رسوب، ۵۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC به آن اضافه شد و در دمای ۵۵ درجه جهت حل شدن رسوب RNA در آب، داخل بن ماری یا حمام خشک قرار گرفت.

1 - Supernatant

۳-۱۲. تعیین مقدار و کیفیت RNA استخراج شده

سنجش کیفیت و کمیت RNA به ترتیب با استفاده از ژل آگارز و اسپکتروفتومتر صورت گرفت.

میزان ۳ میکرولیتر از هر نمونه RNA استخراج شده به همراه ۲ میکرولیتر لودینگ دای روی ژل آگارز ۱/۶ درصد بارگذاری شد، و بعد از ۴۰ دقیقه الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ ولت تصویر ژل در دستگاه ترانس المیناتور یا ژل داک مشاهده شد. با مشاهده الگوی باندهای RNA کل استخراج شده، نمونه‌های با کیفیت مناسب جهت ادامه کار (سنتز cDNA و بررسی بیان ژن‌ها) در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غلظت RNA با اندازه‌گیری جذب نوری ۲۶۰ (A₂₆₀) توسط اسپکتروفتومتر مدل اندازه‌گیری شد (جدول ضمیمه ۲). برای اندازه‌گیری جذب نوری RNA باید در آب حل شده باشد و کلیه ظروف و کووت‌های اسپکتروفتومتر باید توسط محلول‌های RNase-free (آب تیمار شده با DEPC) شستشو شوند و سپس جذب نوری RNA به روش زیر اندازه‌گیری شد:

$$\text{حجم نمونه RNA} = ۵۰ \text{ میکرولیتر}$$

$$\text{رقیق‌سازی نمونه} = ۲ \text{ میکرولیتر نمونه RNA} + ۱۹۸ \text{ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC}$$

سپس جذب نوری توسط یک میکروکووت در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود برای مثال

$$(A_{260} = ۰/۲۳)$$

آنگاه با جاگذاری در فرمول زیر غلظت نمونه RNA محاسبه می‌شود.

$$\text{غلظت نمونه RNA} = A_{260} \times ۴۰ / \text{ضریب رقت}$$

$$\text{غلظت نمونه RNA} = ۰/۹۲۰ \text{ میکروگرم در میکرولیتر}$$

در ادامه نسبت A_{260} به A_{280} اندازه گیری شد که انتظار می رود این نسبت برای RNA نسبتا خالص عددی معادل ۲ بدست آید.

۱۳-۳. تیمار با DNase I

قبل از سنتز cDNA با نمونه RNA استخراج شده، باید آلودگی DNA را از بین برد، به همین منظور میزان ۵ میکروگرم از RNA کل را با ۲ میکرولیتر آنزیم DNase I $1 \text{ u}/\mu\text{l}$ و ۱ میکرو لیتر $10\times$ Reaction Buffer with MgCl_2 به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کردیم و سپس مخلوط واکنش را با مقدار ۱ میکرولیتر 50 mM EDTA مخلوط و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کردیم، تا DNase غیرفعال گردد. از این RNA جهت سنتز cDNA استفاده گردید.

۱۴-۳. سنتز cDNA

توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس^۱ (M-muLV) از روی RNA استخراج شده، cDNA سنتز شد و بررسی بیان ژن ها بر روی آن انجام گرفت. ساخت اولین رشته cDNA با استفاده از مقدار ۵ میکروگرم از RNA کل برای کلیه نمونه ها، با استفاده از دستورالعمل کیت تهیه شده از شرکت Vivantis انجام گرفت. بدین منظور ابتدا RNA کل با ۱ میکرولیتر پرایمر 18 (oligo d(T)) $40 \mu\text{M}$ و ۱ میکرولیتر 10 mM dNTPs mix مخلوط گردید و با آب دیونیزه به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد، سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد، در مرحله بعد مخلوط سنتز cDNA (حاوی $10\times$ Buffer M-MuLV، آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase و آب دیونیزه) به آن اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه انکوبه شد، و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. cDNA های ساخته شده در ۲۰- درجه ذخیره و نگهداری شدند.

1 - Revers Transcriptase

۳-۱۵. طراحی پرایمر جهت تکثیر ژن‌ها از روی رشته اول cDNA سنتز شده

به منظور تکثیر ژن‌های مورد بررسی، توالی mRNA آنها از پایگاه داده NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) جستجو شد، و به کمک نرم‌افزار primer3 پرایمر طراحی شد، و دمای اتصال^۱ پرایمرها در سایت الیگو آنالیز^۲ IDT محاسبه شد. پرایمرها به سفارش شرکت تکاپوزیست در شرکت Bioneer کره‌جنوبی سنتز و ارسال شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده اسامی ژن‌ها به همراه شماره دسترسی^۳ آنها و دمای اتصال و T_m های سفارشی شرکت تکاپوزیست و پایگاه IDT (<http://eu.idtdna.com/site>) در جدول ۳-۵ آمده است.

۳-۱۶. انتخاب ژن کنترل درونی^۵ و انجام PCR

برای اطمینان از صحت ساخت cDNAها به منظور مقایسه بیان ژن نمونه‌های مختلف، نیاز به یک ژن همیشه بیان در قارچ مورد بررسی می‌باشد. ژن همیشه بیان مورد استفاده در این تحقیق گاما اکتین بود که براساس توالی ژن‌های گزارش شده در پایگاه NCBI و به کمک نرم‌افزار Primer3 برای آن پرایمر طراحی شد (جدول ۳-۵). صحت سنتز cDNA تمامی نمونه‌های مورد آزمایش قبل از ارزیابی پرایمرهای اختصاصی توسط این ژن تأیید گردید و باند مورد انتظار بر روی ژل آگار شناسایی و مورد تأیید قرار گرفت. پس از این مرحله کلیه پرایمرها با cDNA سنتز شده بهینه‌سازی گردید. در ادامه واکنش PCR با استفاده از cDNAهای مربوط به میسلیوم‌های رشد یافته در محیط‌های کشت متفاوت، با جفت پرایمرهای مربوط به ژن‌های اختصاصی PCR در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. حجم واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر؛ با ترکیب

۲/۵ میکرولیتر 50 mM MgCl₂، ۲/۵ میکرولیتر 10× PCR buffer، ۰/۵ میکرولیتر 10 mM dNTP

1 - Annealing
2 - Integrated DNA Technologies
3 - Accession number
4 - Melting Temperature
5 - Housekeeping gene

جدول ۳-۵. توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

توالی پرایمر	طول پرایمر (bp)	دمای اتصال	نقطه ذوب در IDT	نقطه ذوب پیشنهادی Takapouzist	اندازه قطعه تکثیری	شماره دسترسی ژن	اسامی پرایمرها
GTATCCACGCCACCACCTTCA	۲۱	۵۸	۵۹/۵	۵۹/۱	۴۱۲	HQ232398.1	Fbactin
GCCTCCTTGATTCTATCACACGCAT	۲۵	۵۸	۵۹	۶۱/۳			Rbactin
CCGATGACCACTGCCAATACTTCAT	۲۵	۵۸	۵۹	۶۱/۸	۳۱۲	AY333430.1	FBbmpk1
GCTTCCCCTTAGCATCTCG	۲۰	۵۸	۵۸/۴	۵۸/۵			Rbmpk1
TACTCCTTTGAGACTCACTCCAAGTC	۲۶	۵۶/۵	۵۷/۵	۵۶/۱	۳۳۲	AY380550.1	FDPP
TTCTCTTCGTCAGCGGCG	۱۸	۵۶/۵	۵۷/۸	۵۷/۱			RDPP
TGTCACAGACGGCTGGTTGC	۲۰	۵۷	۶۰/۴	۵۹/۱	۳۰۰	JQ317159.1	FBcsa1
CCTGATGGCGAAGCAGATTGTAATGTT	۲۷	۵۷	۵۹/۴	۶۳/۹			RBcsa1
AACTTGACCGTCTCCGCCAC	۲۰	۶۲	۶۰	۵۸/۵	۲۷۵	AF104385.1	Fbsn1
GTGACCATCTGTAGTGCCACTGACA	۲۵	۶۲	۶۰/۴	۵۹/۸			Rbsn1
TCTCTTTGACCGTTGCCTTTATCCTCC	۲۷	۶۰	۶۰/۳	۶۴/۲	۳۰۵	ADK36660.1	FCYP52X
CGCCAGAATCGTCTTGATGTTCTCG	۲۵	۶۰	۵۹/۶	۶۴/۶			RCYP52X

آزمایش شده (میزان بیان ژن در شرایط مختلف) به اعداد نسبت داده شده به ژن کنترل درونی در همان شرایط تقسیم گردید و سپس نرمال سازی آماری، به روش لگاریتمی روی داده ها انجام شد و در مقایسه میانگین ها از داده های اصلی استفاده شد .

تصاویر دیجیتال شبکه دوبعدی از ارزش سلول های تصویر هستند، که عرض و ارتفاع تصویر توسط شمار سلول های تصویر در جهت X و Y تعیین می شود. بنابراین سلول تصویر کوچکترین واحد ترکیب تصویر است، شدت سلول تصویر دامنه ای بین سیاه تا سفید دارد. مشخصات این دامنه برای مثال عدد شدت تصویر (درخشندگی) مقادیری هستند که می توانند در تصویر به عنوان bit-depth تصویر تعریف شوند و سطح دقتی که شدت را کد می کند را نشان می دهند به طور مثال تصویر 2-bit چهار رنگ از سیاه تا سفید دارد و تصویر 4-bit شانزده رنگ دارد، بنابراین هرچه میزان bit آن بالاتر باشد عدد نسبت داده شده به شدت pixel دقیقتر برای عددی کردن باندهای الکتروفورز خواهد بود. طبق مرور منابع می توانیم از پنج نرم افزار Kodak، Labwork، Quantum ST4، Adobe Photoshop و UVtech نیز برای عددی کردن باندهای الکتروفورز استفاده کرد.

طرح آماری استفاده شده برای این تحقیق فاکتوریل با طرح پایه بلوک های کامل تصادفی بود. آنالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزارهای SAS و MSTATC انجام شد و نمودارها به کمک نرم افزار Excel رسم گردیدند. مقایسه میانگین ها توسط آزمون¹ LSD و در سطح احتمال مورد نظر صورت پذیرفت.

1 - Least Significant Difference

فصل چہارم

نتیجہ

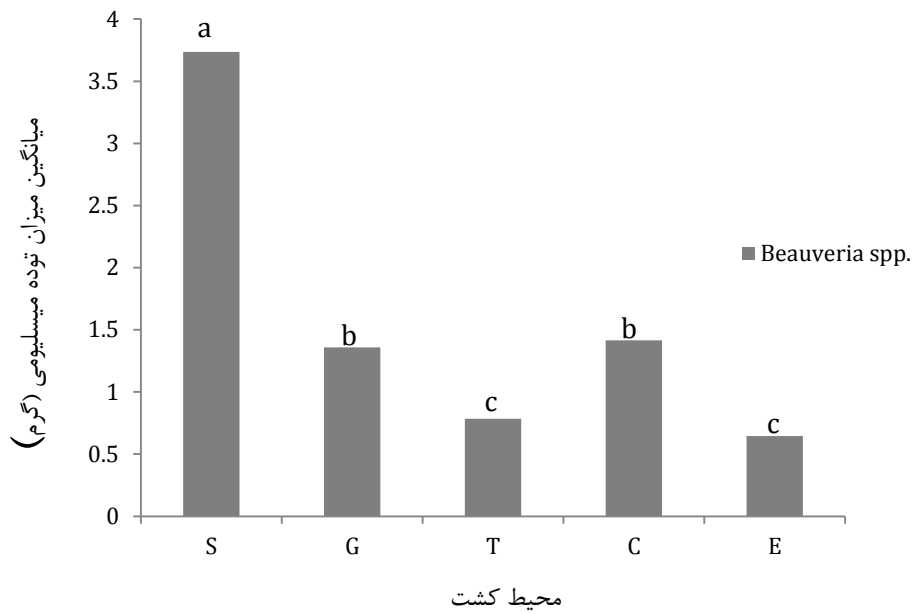
این فصل در بر گیرنده نتایج، وزن توده میسلیمی حاصل از رشد قارچ در محیط کشت های مختلف، نتایج الکتروفورز افقی نمونه های RNA استخراج شده از دو جدایه قارچ *Beauveria* نتایج حاصل از اسپکتروفتومتر نمونه های RNA، بررسی بیان برخی ژن های قارچ *Beauveria* spp. ژن کنترل درونی گاما اکتین، پروتئاز ترشخی تجزیه کننده کوتیکول باسیاسین I، آنزیم دای پپتیدیل پپتیداز، پروتئین کیناز *MAPK*، آنزیم سیتوکروم P450 مونواکسیژناز، ژن سنسور کلسیم و کمی کردن باندهای حاصل از الکتروفورز افقی این ژن ها با استفاده از نرم افزار Image J و آنالیز آماری داده های حاصل از این نرم افزار به کمک دو نرم افزار SAS و MSTATC صورت گرفت.

۴-۱. وزن توده میسلیمی حاصل از رشد قارچ

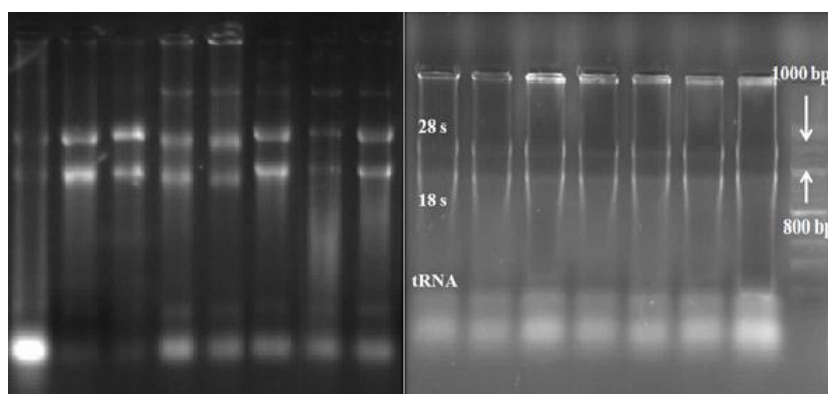
وزن توده میسلیمی حاصل از رشد قارچ بر روی محیط های کشت مختلف بعد از آبیگری کامل با استفاده از قیف بوختر، کاغذ صافی و پمپ خلا اندازه گیری شد. تجزیه واریانس داده های حاصل از توزین توده میسلیمی (جدول ضمیمه ۱) نشان داد که برای هر دو جدایه مورد استفاده وزن توده میسلیمی در محیط کشت SDY بدون عصاره کوتیکولی (۳/۷ گرم) دو-سه برابر محیط کشت های حاوی عصاره کوتیکولی (۰/۶) بود، و بین محیط های عصاره کوتیکولی، میزان توده میسلیمی در محیط کشت عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی و پروانه موم خوار به صورت معنی داری بیشتر از دو محیط عصاره کوتیکولی سوسک قرمز آرد و سن گندم بود و بین دو جدایه از نظر وزن توده میسلیمی حاصل، تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل ۴-۱).

۴-۲. تعیین کیفیت نمونه های RNA

نمونه های RNA از ۳۰ نمونه میسلیم حاصل از رشد دو جدایه قارچی، در مواجهه با چهار نوع محیط عصاره کوتیکولی متفاوت و یک محیط کشت سنتتیک و در سه تکرار بیولوژیک، استخراج شدند. برای تعیین کیفیت، نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد بارگزاری شدند (شکل ۴-۲)، نمونه های با کیفیت



شکل ۴-۱. مقایسه وزن تر توده میسلیمی حاصل از رشد قارچ *Beauveria spp.* بر روی محیط کشت سنتتیک و محیط‌های کشت القایی با کوتیکول ۴ حشره مختلف. (S). محیط کشت سنتتیک، G. عصاره کوتیکولی پروانه موم‌خوار، T. عصاره کوتیکولی سوسک قرمز آرد، C. عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی، E. عصاره کوتیکولی سن گندم). (LSD=۰/۲۱۵۳)



شکل ۴-۲. الگوی الکتروفورزی نمونه‌های RNA استخراجی بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، باندهای مربوط به 18s و 28s rRNA و 28s tRNA و tRNA روی شکل نشان داده شده است سایز قطعات 18s و 28s بین ۸۰۰-۱۰۰۰ جفت باز و سایز tRNA حدود ۱۰۰ جفت باز است.

جهت ادامه کار انتخاب شدند، سپس غلظت نمونه‌های RNA انتخابی با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین گردید (جدول ضمیمه ۲).

۳-۴. نرمال‌سازی داده‌های هر ژن نسبت به ژن کنترل

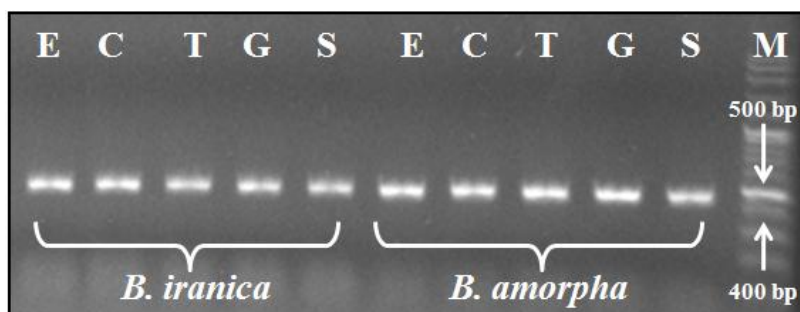
کلیه داده‌های حاصل از کمی‌کردن باند ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Image J، نسبت به این داده‌ها برای ژن کنترل نرمال شدند، از داده‌های نرمال شده جهت تجزیه واریانس استفاده شد.

۴-۴. بیان ژن گاما اکتین

ژن گاما اکتین از قارچ *B. bassiana* طولی معادل ۱۴۱۸ جفت باز (HQ232398) دارد، که پروتئینی به طول ۳۷۵ اسید آمینه را کد می‌کند. طول قطعه تکثیری ژن گاما اکتین از روی cDNA با دو پرایمر Fbactin و Rbactin در این تحقیق، قطعه‌ای به طول ۴۵۸ جفت باز بود. الگوی بانندی حاصل پس از ۲۵ سیکل PCR و تکثیر این ژن برای هر دو جدایه قارچی در شکل ۴-۳ آورده شده است. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در سطح احتمال مورد نظر در جدول ضمیمه ۳ نشان داده شده است، که هیچ کدام از منابع تفاوت معنی‌دار نشان ندادند، و تفاوت معنی‌داری بین میزان بیان ژن گاما اکتین در محیط کشت‌های مختلف و حتی بین دو جدایه مشاهده نشد و در کلیه موارد بیان این ژن تقریباً ثابت بوده است.

۴-۵. بیان ژن باسیاسین I

ژن باسیاسین از قارچ *B. bassiana* طولی معادل ۱۶۲۹ جفت باز (AF104385.1) دارد که سرین پروتئاز تجزیه کننده کوتیکول قوی به طول ۳۷۹ اسید آمینه را کد می‌کند. طول قطعه تکثیری ژن باسیاسین I با cDNA و دو پرایمر Fbsn و Rbsn، در این تحقیق ۲۷۵ جفت باز بود. الگوی بانندی حاصل پس از ۳۵ سیکل PCR و تکثیر این ژن برای هر دو جدایه قارچی در شکل ۴-۴ (الف) آورده



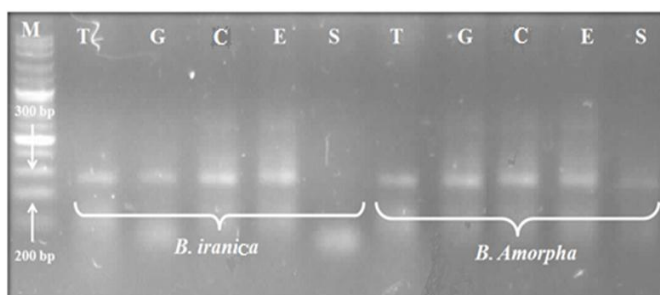
شکل ۳-۴. بررسی بیان ژن گاما اکتین. الگوی الکتروفورزی حاصل از محصولات PCR (۲۵ سیکل) با پرایم‌های ژن گاما اکتین بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، با طول قطعه تکثیری ۴۵۸ جفت باز. M. مارکر DNA، S. محیط کشت SDY، G. محیط عصاره کوتیکولی پروانه موم‌خوار، T. محیط کشت عصاره کوتیکولی سوسک قرمز آرد، C. محیط کشت عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی، E. محیط کشت عصاره کوتیکولی سن گندم.

شده است.

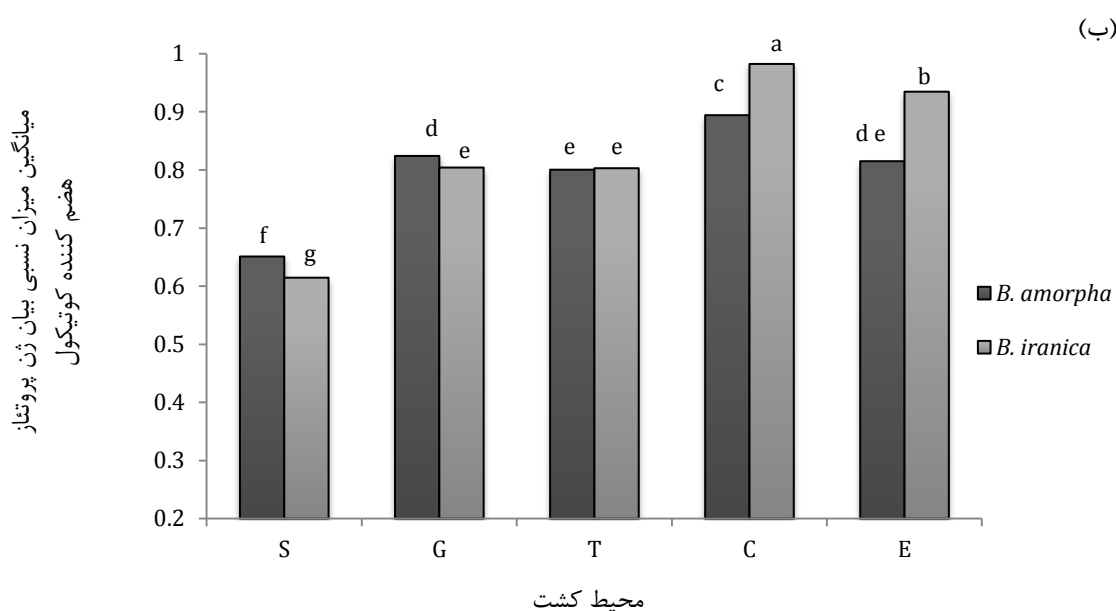
تجزیه واریانس داده‌های نرمال شده به کمک نرم‌افزار SAS انجام شد، جدول تجزیه واریانس ژن باسیاسین I در دو جدایه قارچی و در محیط کشت‌های مختلف در جدول ضمیمه ۴ نشان می‌دهد که اثر کلیه منابع تغییر معنی‌دار شده است. مقایسه میانگین اثرات متقابل جدایه قارچی × محیط کشت (شکل ۴-۴-ب) نشان داد که میزان بیان ژن پروتئاز هضم کننده کوتیکول در جدایه *B. iranica* (۰/۹۱۲۲) به صورت معنی‌داری بیشتر از جدایه *B. amorpha* (۰/۸۹۹۰) بوده است. بیشترین میزان القا بیان این ژن را جدایه *B. iranica* در مواجهه با عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی (۰/۹۹۲۳) و کمترین میزان بیان را در مواجهه با محیط کشت سنتتیک (۰/۷۸۸۵۵) دارد. میزان بیان این ژن در این جدایه به ترتیب در مواجهه با عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی، سن گندم (۰/۹۷۰۶)، پروانه موم-خوار (۰/۹۰۵۳)، سوسک قرمز آرد (۰/۹۰۴۷) و محیط کشت سنتتیک بیشتر بود، و بین میزان بیان ژن در مواجهه با سوسک قرمز آرد و پروانه موم‌خوار تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در جدایه *B. amorpha* بیشترین میزان القا بیان این ژن به ترتیب در مواجهه با عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی (۰/۹۵۱۵)، عصاره کوتیکولی پروانه موم‌خوار (۰/۹۱۶۰)، عصاره کوتیکولی سن گندم (۰/۹۱۱۱)، عصاره کوتیکولی سوسک قرمز آرد (۰/۹۰۳۳) و در نهایت محیط کشت سنتتیک (۰/۸۱۳۵) مشاهده شد. در این جدایه بین میزان بیان ژن در محیط عصاره کوتیکولی پروانه موم‌خوار، سن گندم و سوسک قرمز آرد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

۴-۶. بیان ژن دای‌پتیدیل‌پتیداز

ژن دای‌پتیدیل‌پتیداز از قارچ *B. bassiana* طولی معادل ۲۳۹۷ جفت باز (AY380550.1) دارد، که پروتئینی به طول ۶۸۷ اسیدآمینو را کد می‌کند. طول قطعه تکثیری ژن دای‌پتیدیل‌پتیداز از روی cDNA با دو پرایمر FDpp و RDpp، ۳۳۲ جفت باز بود. الگوی بانندی محصولات PCR بعد از ۳۵ سیکل برای کلیه cDNAهای هر دو جدایه قارچی در شکل ۴-۵ (الف) آورده شده است.



(الف)



(ب)

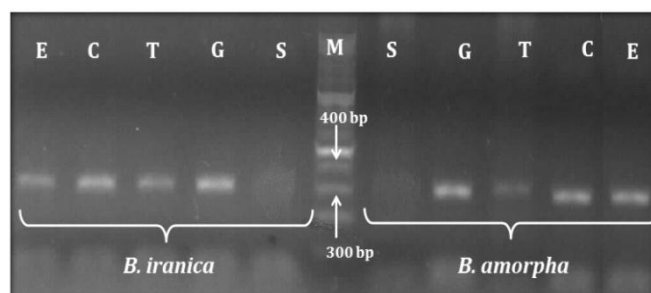
شکل ۴-۴. بررسی بیان ژن پروتئاز هضم کننده کوتیکول باسیاسین I. (الف). الگوی الکتروفورزی حاصل از محصولات PCR (۳۵ سیکل)، با پرایمرهای ژن باسیاسین I در روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکثیری ۲۷۵ جفت باز. (ب). مقایسه میانگین اثرات متقابل جدایه × محیط کشت (LSD=0.1071). M. مارکر DNA، S. محیط کشت SDY، G. محیط عصاره کوتیکولی پروانه موم‌خوار، T. محیط کشت عصاره کوتیکولی سوسک قرمز آرد، C. محیط کشت عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی، E. محیط کشت عصاره کوتیکولی سن گندم.

تجزیه واریانس میزان نسبی بیان ژن دای پپتیدیل پپتیداز انجام شد و نتایج آن در جدول ضمیمه ۵ نشان داد که، اثر کلیه منابع تغییر معنی دار شده است. مقایسه میانگین اثرات متقابل جدایه قارچی × محیط کشت (شکل ۴-۵-ب) نشان داد که میزان بیان ژن دای پپتیدیل پپتیداز در جدایه *B. amorpha* (۰/۹۷۹۳) به صورت معنی داری بیشتر از جدایه *B. iranica* (۰/۸۵۳۹) بوده است. در مورد هر دو جدایه قارچی میزان بیان نسبی این ژن در مواجهه با عصاره‌های کوتیکولی حشرات در مقایسه با محیط کشت سنتتیک به صورت معنی داری بیشتر بود، در جدایه *B. amorpha* به ترتیب بیشترین میزان بیان ژن در مواجهه با عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی (۱/۰۳۱)، پروانه موم‌خوار (۱/۰۲۴)، سوسک قرمز آرد (۱/۰۲۳) و در نهایت محیط کشت سنتتیک (۰/۷۹۷۶) مشاهده شد. و بین محیط کشت‌های عصاره کوتیکولی در میزان بیان این ژن تفاوت معنی داری مشاهده نشد، اما بین میزان بیان این ژن، در محیط‌های عصاره کوتیکولی و محیط کشت سنتتیک تفاوت بسیار معنی دار بود. جدایه *B. iranica* به ترتیب بیشترین میزان بیان ژن دای پپتیدیل پپتیداز در مواجهه عصاره‌های کوتیکولی ملخ ایتالیایی (۰/۹۲۳۹)، پروانه موم‌خوار (۰/۸۶۳۰)، سوسک قرمز آرد (۰/۸۶۲۹)، سن گندم (۰/۸۶۲۳) و محیط کشت سنتتیک (۰/۷۵۷۸) مشاهده شد. بین میزان بیان ژن در محیط عصاره کوتیکولی پروانه موم‌خوار، سوسک قرمز آرد و سن گندم تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

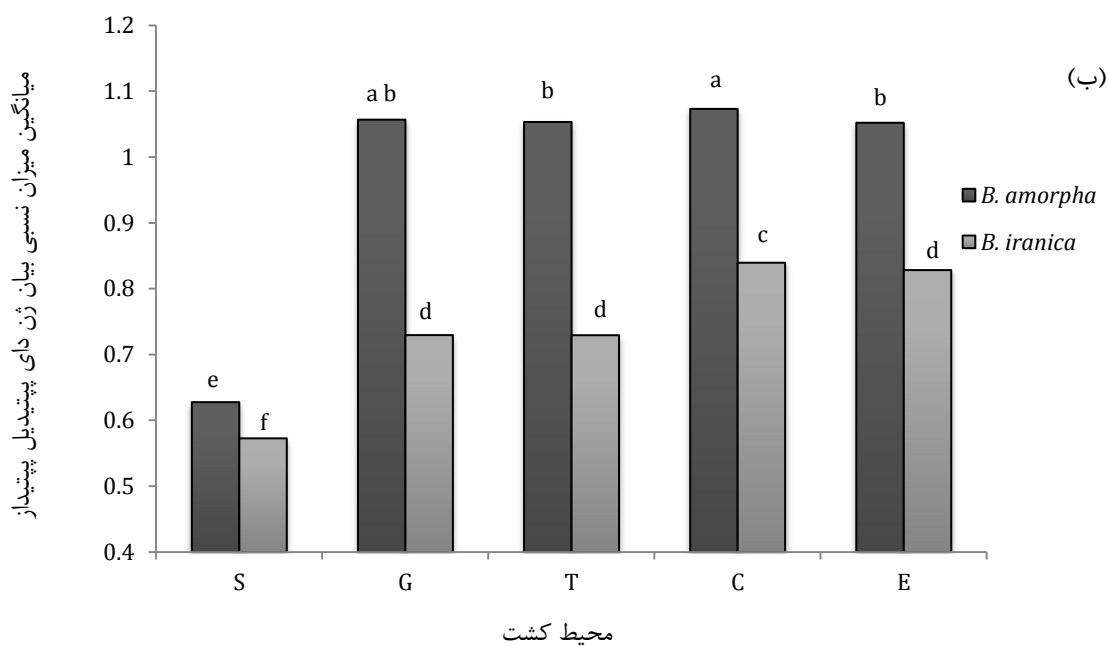
۷-۴. بیان ژن پروتئین کیناز

ژن پروتئین کیناز^۱ از قارچ *B. bassiana* طولی معادل ۱۴۶۴ جفت باز (AY333430.1) دارد، که پروتئینی به طول ۳۵۶ آمینواسید را کد می‌کند. طول قطعه تکثیری ژن پروتئین کیناز از روی cDNA با دو پرایمر FMpk و RMpk، ۳۱۲ جفت باز بود. الگوی بانندی حاصل از محصولات PCR این ژن بعد از ۲۵ سیکل در شکل ۴-۶ (الف) آورده شده است.

نتایج تجزیه واریانس میزان نسبی بیان ژن پروتئین کیناز در دو جدایه قارچی و در محیط کشت‌های



(الف)



شکل ۴-۵. بررسی بیان ژن دای پپتیدیل پپتیداز. (الف). الگوی الکتروفورزی حاصل از محصولات PCR (۳۵ سیکل) با پرایمرهای ژن دای پپتیدیل پپتیداز بر روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، طول قطعه تکشیری ۳۳۲ جفت باز. (ب) مقایسه میانگین اثر متقابل دو جدایه قارچی در مواجهه با محیط کشت های متفاوت (LSD=۰/۰۱۰۱۵). M. مارکر DNA، S. محیط کشت SDY، G. محیط کشت عصاره کوتیکولی پروانه موم خوار، T. محیط کشت عصاره کوتیکولی سوسک قرمز آرد، C. محیط کشت عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی، E. محیط کشت عصاره کوتیکولی سن گندم.

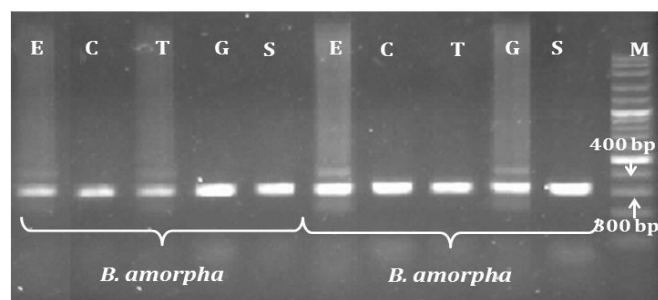
مختلف در جدول ضمیمه ۶ آورده شده است. مقایسه میانگین اثرات متقابل جدایه قارچی × محیط کشت (شکل ۴-۶-ب) نشان داد که میزان بیان نسبی ژن پروتئین کیناز در جدایه *B. iranica* (۱/۰۳۶۱) به صورت معنی‌داری بیشتر از جدایه *B. amorpha* (۱/۰۱۵۵) بوده است. روند تغییرات میزان بیان ژن در محیط کشت‌های مختلف در مورد هر دو جدایه تقریباً هماهنگ بوده است، و میزان بیان این ژن در مورد هر دو جدایه در محیط کشت سنتتیک و عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی بیشترین مقدار بود و تفاوت معنی‌داری بین دو محیط مشاهده نشد، در مورد جدایه *B. amorpha* تفاوت معنی‌داری بین میزان بیان این ژن در محیط سنتتیک (۱/۰۷۲)، عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی (۱/۰۶۳) و عصاره کوتیکولی پروانه موم‌خوار (۱/۰۵۷) مشاهده نشد، بعد از آن بیشترین میزان بیان ژن دای‌پتیدیل پتیداز در مواجهه با سن گندم (۰/۹۵۹۵) و سپس در مقابل عصاره سوسک قرمز آرد (۰/۹۲۵۸) مشاهده شد. در جدایه *B. iranica* بعد از محیط سنتتیک (۱/۰۶۳) و عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی (۱/۰۶۳) بیشترین میزان بیان ژن را در مواجهه با سن گندم (۱/۰۳۱)، سوسک قرمز آرد (۱/۰۲۴) و پروانه موم‌خوار (۱/۰) داشت که تفاوت بین میزان بیان در این سه محیط معنی‌دار نبود.

۴-۸. بیان ژن سیتوکروم P450

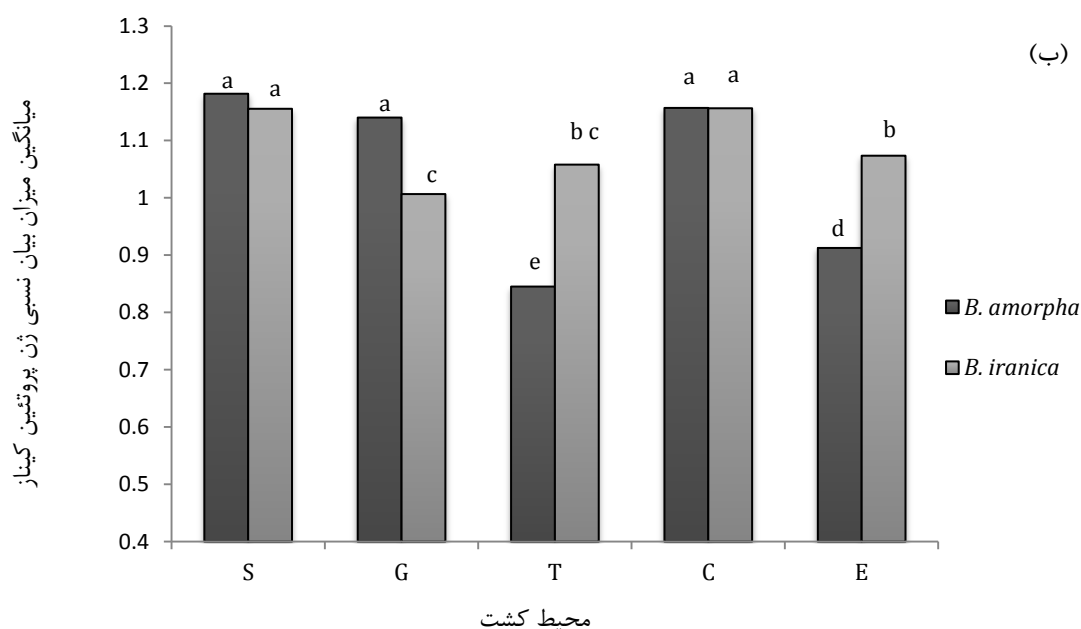
ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز^۱ مورد بررسی طولی معادل ۳۸۲۳ جفت باز (QU566074) دارد، که پروتئینی به طول ۵۲۸ اسیدآمینو را کد می‌کند. توالی تکثیری در این تحقیق قطعه‌ای به طول ۳۰۵ جفت باز بود. بررسی میزان بیان ژن سیتوکروم P450 در دو جدایه قارچ *B. amorpha* و *B. iranica* روی محیط کشت عصاره کوتیکولی حشرات مختلف و محیط کشت SDY با دو پرایمر FCYP و RCYP و تعداد ۳۵ سیکل انجام شد (شکل ۴-۷-الف).

نتایج تجزیه واریانس داده‌های میزان بیان نسبی ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز در دو جدایه

1 - Cytochrome P450 Monooxygenase



(الف)



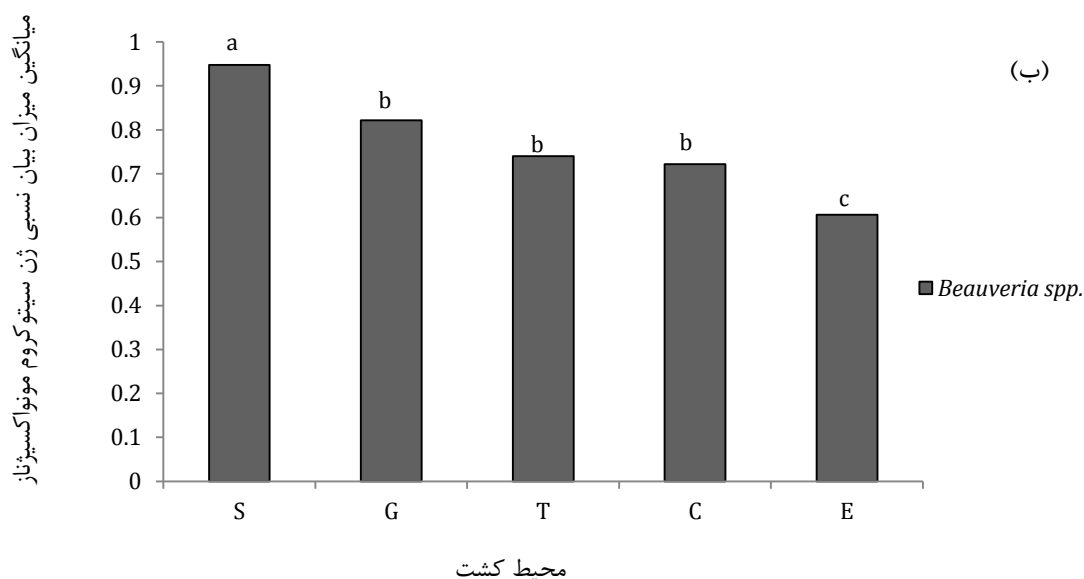
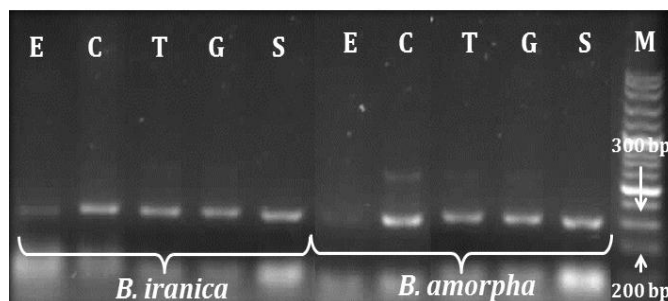
(ب)

شکل ۴-۶. بررسی بیان ژن پروتئین کیناز. (الف) الگوی الکتروفورزی حاصل از محصولات PCR (۲۵ سیکل) با پرایمرهای ژن پروتئین کیناز در روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، با طول قطعه تکثیری ۳۱۲ جفت باز. (ب) مقایسه میانگین اثر متقابل جدایه × محیط کشت (LSD=۰/۰۳۰۴۰). M. مارکر DNA. S. محیط کشت SDY. G. محیط کشت عصاره کوتیکولی پروانه موم خوار، T. محیط کشت عصاره کوتیکولی سوسک قرمز آرد، C. محیط کشت عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی، E. محیط کشت عصاره کوتیکولی سن گندم.

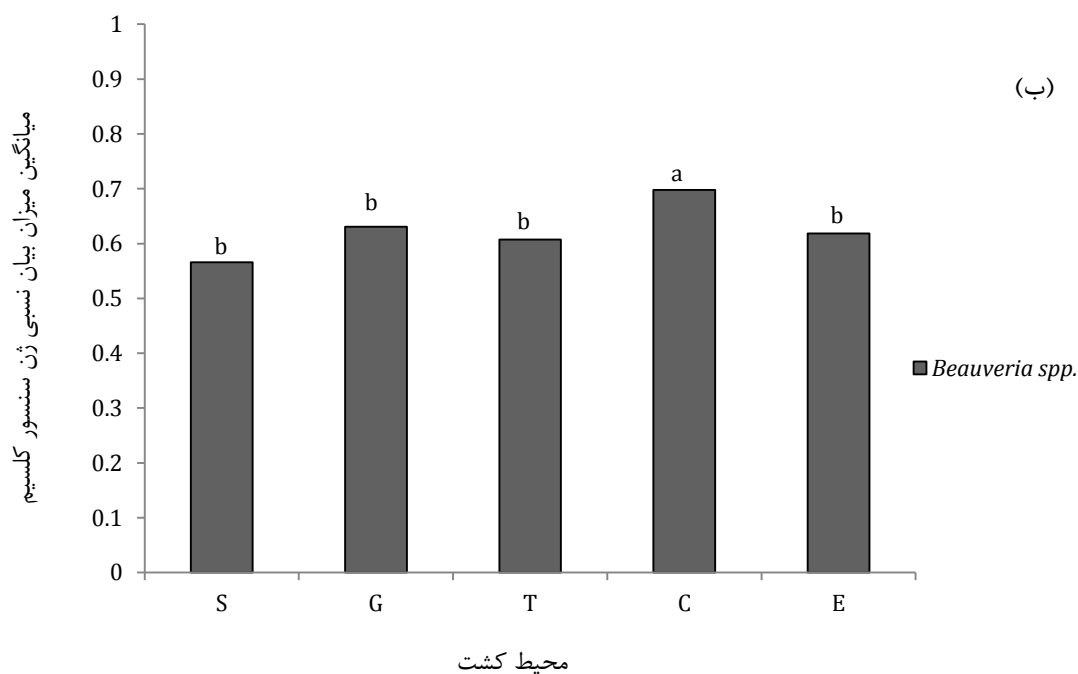
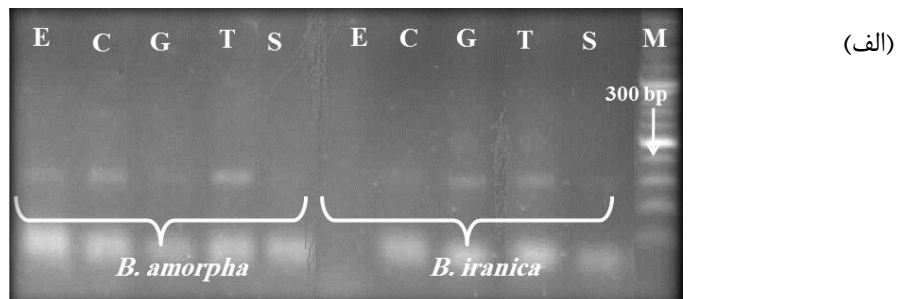
قارچی و در محیط کشت‌های مختلف در جدول ضمیمه ۷ آورده شده است. در جدول تجزیه واریانس تنها اختلاف بین محیط کشت‌ها معنی‌دار شد که مقایسه میانگین بین محیط کشت‌های مختلف نشان داد که (شکل ۴-۷-ب) بیشترین میزان بیان در مواجهه با محیط کشت سنتتیک (۰/۹۷۶۵) مشاهده شد بعد از آن به ترتیب بیشترین بیان در مواجهه با عصاره کوتیکولی پروانه موم‌خوار (۰/۹۱۱۲۳)، سوسک قرمز آرد (۰/۸۶۴۷۵)، ملخ ایتالیایی (۰/۸۵۵۲۹) و سن گندم (۰/۷۸۲۴۵) مشاهده شد، و در میزان بیان ژن بین سه محیط عصاره کوتیکولی پروانه موم‌خوار، سوسک قرمز آرد و ملخ ایتالیایی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

۹-۴. بیان ژن سنسور کلسیم

ژن سنسور کلسیم مورد بررسی طولی معادل ۱۱۰۳ جفت باز (JQ317159.1) دارد که پروتئینی به طول ۲۰۵ اسیدآمینو را کد می‌کند. طول قطعه تکثیری از روی cDNA با دو پرایمر FCSa و RCSa، در این تحقیق ۳۰۰ جفت باز بود. الگوی بانندی حاصل از محصولات PCR این ژن بعد از ۳۵ سیکل در شکل ۴-۸-الف آورده شده است. نتایج تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن سنسور کلسیم در شرایط مختلف با نرم‌افزار انجام شد و در جدول ضمیمه ۸ آورده شده است. در جدول تجزیه واریانس تنها تفاوت بین محیط کشت‌ها معنی‌دار شد، که مقایسه میانگین میزان بیان ژن سنسور کلسیم در محیط کشت‌های مختلف (شکل ۴-۸-ب) نشان داد که بیشترین میزان بیان در مواجهه با عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی مشاهده شد و بین میزان بیان نسبی ژن در سایر محیط کشت‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.



شکل ۴-۷. بررسی بیان ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز. (الف) الگوی الکتروفورزی حاصل از محصولات PCR (۳۵ سیکل)، با پرایمرهای ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز در روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، با طول قطعه تکثیری ۳۰۵ جفت باز. (ب) مقایسه میانگین میزان بیان نسبی ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز در محیط کشت های مختلف جفت باز. M. مارکر DNA. S. محیط کشت SDY، G. محیط عصاره کونیکولی پروانه موم خوار، T. محیط کشت عصاره کونیکولی سوسک قرمز آرد، C. محیط کشت عصاره کونیکولی ملخ ایتالیایی، E. محیط کشت عصاره کونیکولی سن گندم.



شکل ۴-۸. بررسی بیان ژن سنسور کلسیم. (الف) الگوی الکتروفورزی حاصل از محصول PCR (۳۵ سیکل)، ژن سنسور کلسیم در روی ژل آگارز ۱/۶ درصد، با طول قطعه تکثیری ۳۰۰ جفت باز. (ب) مقایسه میانگین میزان بیان نسبی ژن سنسور کلسیم در محیط کشت‌های مختلف (LSD=۰/۰۶۷). M. مارکر DNA، S. محیط کشت SDY، G. محیط کشت عصاره کوتیکولی پروانه موم‌خوار، T. محیط کشت عصاره کوتیکولی سوسک قرمز آرد، C. محیط کشت عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی، E. محیط کشت عصاره کوتیکولی سن گندم.

فصل پنجم

بحث و پیشنهادات

به طور کلی استفاده از قارچ‌ها برای کنترل بیولوژیک آفات به دلیل مزیت‌های بالای آنها از جمله خطرناک نبودن آنها برای سلامتی انسان و سایر مهره‌داران، گستردگی دامنه میزبانی قارچ، توانایی در آلوده کردن میزبان خود در تمام مراحل زندگی، قابلیت اختلاط و سازگاری با حشره‌کش‌ها می‌باشد. زیست‌شناسی مولکولی ابزارهای لازم برای توصیف دقیق مکانیسم بیماری‌زایی و در بلند مدت برای تولید موجودات تراریخته با ویژگی‌های جدید را فراهم آورده است. ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق با مرور مطالعات پیشین (۱۸، ۴۰، ۵۹، ۶۰، ۶۶، ۶۷، ۷۳، ۷۴) و با توجه به اثبات نقش و اهمیت آنها در هضم کوتیکول حشرات و بیماری‌زایی آنها انتخاب شدند. در این تحقیق به مطالعه کاربردی تغییرات بیان این ژن‌ها در دو جدایه از قارچ *Beauveria spp.* در مواجهه با حشرات متفاوت، به منظور استفاده این نتایج در زمینه‌های مختلف مهندسی ژنتیک این قارچ، به خصوص تولید نژادهای تراریخته با کارایی بالا در زمینه کنترل بیولوژیک با بهبود اثر حشره‌کش‌ها از طریق کاهش زمان برای کشتن حشرات و گسترش دامنه میزبانی آنها پرداخته شد.

۵-۱. توانایی قارچ جهت رشد بر روی حشرات آزمایشی

از مشاهده‌ی رشد قارچ بر روی محیط‌های عصاره کوتیکولی حشرات آزمایش شده علاوه بر رشد بر روی محیط کشت سنتتیک می‌توان نتیجه گرفت که دو جدایه قارچی استفاده شده می‌توانند بر روی کوتیکول حشرات آزمایش شده رشد نمایند، و از آنجایی که میزان توده میسلیمی حاصل از رشد هر دو جدایه قارچی بر روی محیط کشت سنتتیک بیشتر از محیط‌های عصاره کوتیکولی بود (شکل ۴-۱). می‌توان نتیجه گرفت که علت تفاوت در میزان توده میسلیمی به این خاطر است که در محیط کشت سنتتیک (SDY) قند ساده داشتیم در حالی که در محیط با عصاره کوتیکولی (قند پیچیده) رشد قارچ به سختی صورت می‌پذیرد. زیادی وزن توده میسلیمی در محیط عصاره کوتیکولی پروانه موم‌خوار و ملخ ایتالیایی در مقایسه با محیط عصاره کوتیکولی دو حشره سوسک قرمز آرد و سن گندم ممکن است به دلیل این باشد که، محیط عصاره کوتیکولی دو حشره سوسک قرمز آرد و سن گندم

حاوی بازدارنده‌هایی برای رشد قارچ باشد. یا شاید کوتیکول دو حشره اول دارای قند ساده‌تری در ترکیب کوتیکول خود باشند، با این همه ارائه نظر قطعی محتاج آنالیز محتوی و ساختار کوتیکول می‌باشد.

۲-۵. ژن گاما اکتین

از شواهد آزمایشی منتشر شده تاکنون نتیجه می‌گیریم که احتمالاً هیچ ژنی با پایداری بیان کلی نداریم، که برای هر نوع سنجشی مناسب باشد. ژن‌های مرجع مطابق با طبیعت مطالعه (برای مثال نوع بافت یا مرحله پیشرفت) انتخاب می‌شوند. که به طور ایده‌آل ژن مرجع نباید به نابسامانی‌هایی از قبیل محرک‌های خارجی، بیماری و یا حتی تغییرات ژنتیکی حساس باشد. ژن‌های مرجع به عنوان کنترل درونی در استاندارد سازی سطوح بیان استفاده می‌شود. نیاز به مطالعه‌ی ژن مرجع به علت اربیی بین نمونه‌های مختلف است که، از تغییرپذیری در محتوی RNA کل، پایداری RNA، کارایی آنزیمی و تغییرات در بارگذاری نمونه ناشی می‌شود. به طور ایده‌آل، انتظار می‌رود چنین ژن‌هایی وابسته به میزان کلی mRNA موجود در هر نمونه بیان ثابت داشته باشند (۷۵). براساس الگوی باندی حاصل از الکتروفورز افقی محصول PCR ژن گاما اکتین مشاهده شد که میزان بیان این ژن در میسلیم قارچ *Beauveria* در مواجهه با محیط‌های کشت متفاوت (شکل ۴-۳) مشابه گزارشات پیشین، تقریباً ثابت بود (۱۶، ۵۳، ۶۶، ۷۶، ۷۷). از اینرو از ژن گاما اکتین به عنوان کنترل درونی بیان ژن، برای نرمال-سازی داده‌های بیان ژن‌ها در قارچ استفاده شد. نتایج حاکی از ثابت بودن میزان بیان ژن در شرایط مختلف محیط کشت و در تکرارهای بیولوژیک مربوط بود.

۳-۵. ژن پروتئاز هضم‌کننده کوتیکول باسیاسین I

انواع پروتئازهای شناسایی شده طی تلاش قارچ برای غلبه بر میزبان خود و در این حالت کوتیکول حشره نقش‌های متنوعی را بازی می‌کنند، به همین خاطر مطالعه چگونگی تولید پروتئازها و تنظیم

بیان آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مطالعات اخیر نشان داده است که تنظیم تولید پروتئازها بسیار پیچیده است و تولید پروتئازها در محیط‌های فقیر غذایی القا می‌شود. سوبستراهای پیچیده مثل کوتیکول حشره و پروتئین تولید پروتئاز را تحریک می‌کند در حالی که منابع نیتروژنی ساده از قبیل آمینواسیدها و آمونیوم سنتز آنرا سرکوب می‌کند. پترسون و همکاران نشان دادند که تولید Pr1 به صورت اختصاصی تنها توسط کوتیکول حشره القا می‌شود در حالی که Pr2 در پاسخ به دامنه وسیعی از پروتئین‌های محلول و نامحلول سنتز می‌شود (۹).

در مورد ژن باسیاسین همانطور که در فصل مرور منابع گفته شد تاکنون مطالعه‌ای روی بیان این ژن در قارچ *Beauveria spp* در شرایط مشابه صورت نگرفته است، این ژن به عنوان سرین پروتئاز قوی هضم‌کننده کوتیکول شناخته شده است، نتایج این مطالعه حاکی از این بود که این ژن در محیط‌های حاوی عصاره کوتیکولی به میزان بیشتری نسبت به محیط SDY (فاقد عصاره کوتیکولی) بیان می‌شود (شکل ۴-۴). بنابراین، با توجه به بیان متفاوت باسیاسین در محیط عصاره کوتیکولی نسبت به محیط سنتتیک می‌توانیم نتیجه بگیریم که بیان این ژن در حضور کوتیکول بیشتر القا می‌گردد و یقیناً در هضم کوتیکول نقش دارد. مقایسه باندهای حاصل نشان داد که این ژن در پاسخ به کوتیکول ملخ ایتالیایی نسبت به سایر حشرات افزایش بیان بیشتری دارد، که این امر احتمالاً ناشی از ماهیت ساختار کوتیکولی متفاوت حشرات است. به نظر می‌رسد که بخش‌های پروتئینی کوتیکول این حشره بیشتر در دسترس قارچ باشد یا میزان پروتئین موجود در کوتیکول این حشره و در نتیجه در عصاره تهیه شده بیشتر از سایر حشرات بوده است که سبب افزایش بیان این ژن گردیده است. همچنین می‌توان استنباط کرد که قارچ *Beauveria spp* از مکانیسم‌های تکمیلی دیگری برای از بین بردن سایر حشرات استفاده می‌کند، به طوری که با بهره‌مندی از آنزیم‌هایی مانند کیتینازها و لیپازها، شبکه‌ی کوتیکول را هضم و پروتئین را در دسترس پروتئاز قارچ *Beauveria spp* قرار می‌دهد. که این موضوع

باید با بررسی تغییرات بیان یا تولید سایر آنزیم های هضم کننده مانند دیگر پروتئازها، کیتینازها و لیپازها مورد بررسی بیشتر قرار بگیرد.

اگرچه دو جدایه استفاده شده در این تحقیق متعلق به جنس *Beauveria* می باشند، ولی اساس انتخاب به توان متفاوت بیماریزایی این دو جدایه بر می گردد که *B. amorpha* با شدت بیماریزایی بالا و *B. iranica* با توان بیماریزایی کم را نشان داد. بنابراین انتظار مشاهده رفتاری متفاوت از دو جدایه در مواجهه با حشرات متفاوت می رفت. در مورد ژن باسیاسین، میزان بیان این ژن در جدایه *B. iranica* به صورت معنی داری در همه شرایط آزمون بیشتر از *B. amorpha* می باشد. مشاهده شد با اینکه این جدایه بیماریزایی ضعیفتری از خود نشان داده است اما میزان بیان این ژن در آن بیشتر است، می توانیم نتیجه بگیریم که یا جدایه *B. amorpha* از آنزیم های دیگری (آنزیم های موثرتر و قوی تری نسبت به باسیاسین) جهت بیماریزایی استفاده می کند یا با اینکه میزان بیان این ژن در *B. iranica* بیشتر است اما میزان تولید آنزیم (بیان در سطح پروتئین) در جدایه *B. amorpha* بیشتر است، که برای گرفتن نتیجه قطعی باید بررسی های بیشتری در زمینه سایر آنزیم های تولیدی توسط این قارچ و پروتئومیکس آنزیمی صورت پذیرد. رفتار بیان ژن پروتئاز هضم کننده کوتیکول نسبت به کوتیکول های حشرات مختلف، متفاوت بود، و در مواجهه با آفات انباری این نسبت در دو سویه قارچی تفاوت زیادی با نمونه کنترل نداشت ولی نسبت به آفات زراعی در جدایه *B. iranica* افزایش معنی داری در میزان بیان نسبت به کنترل مشاهده شد که احتمالاً این پدیده مربوط به جنس کوتیکول متفاوت این آفات است.

۴-۵. ژن دای پتیدیل پتیداز

از آنجایی که مطالعه ای در مورد بیان ژن دای پتیدیل پتیداز در قارچ *Beauveria spp.* در شرایط مشابه این تحقیق در دست نیست، و تنها در مطالعه تارتار و همکاران (۱۸) مشاهده شد که این ژن در محیط SDY و همچنین در همولنف حشره به میزان یکسان بیان می شود و در این دو وضعیت میزان

بیان ژن تفاوت معنی‌داری نداشت و از آنجایی که این ژن اگزو پیتیدازی است که از انتهای زنجیره پروتئینی، دی‌پپتیدها را جدا می‌کند، و از طرفی در این پژوهش ما مشاهده گردید (شکل ۴-۵) که در سه تکرار بیولوژیک دو جدایه میزان بیان این ژن در محیط کشت حاوی عصاره کوتیکول بیشتر از محیط کشت فاقد عصاره کوتیکولی بود می‌توان نتیجه گرفت که در شرایطی که آمینواسیدها به میزان کافی در دسترس قارچ باشند مثل محیط کشت سنتتیک حاوی پپتون و محیط همولنف غنی از مواد غذایی حشرات نیازی به هیدرولیز پروتئین‌ها نیست، اما زمانی که قارچ در محیط فقیر از نظر غذایی مثل محیط عصاره کوتیکولی رشد می‌یابد جهت تامین آمینواسیدهای مورد نیاز خود مجبور به هیدرولیز پروتئین‌های کوتیکولی و بیان یک سری آنزیم‌های دخیل در هضم پپتیدها می‌باشد. از اینرو شاید بتوان تفاوت میزان بیان ژن بین عصاره‌های مختلف را به ماهیت کوتیکول آنها نسبت داد.

میزان بیان این ژن در جدایه *B. amorpha* در مقایسه با جدایه *B. iranica* به صورت معنی‌داری بیشتر است، که این رفتار با شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها که قبلاً مشخص شده بود مطابقت دارد. از اینرو به نظر می‌رسد با تولید موتانت ژن کدکننده‌ی این آنزیم شاید بتوان نقش آن را در بیماری‌زایی به اثبات رساند البته این امر منوط به این است که قارچ *Beauveria spp.* فاقد خانواده‌ی ژنی در خصوص این ژن باشد. میزان بیان ژن دای‌پپتیدیل پیتیداز تقریباً در چهار نوع محیط عصاره کوتیکولی در جدایه *B. amorpha* یکنواخت بود، اما در مورد جدایه *B. iranica* میزان بیان در مواجهه با ملخ ایتالیایی و سن گندم بیشتر از دو آفت انباری است، که مجدداً نظیر باسیاسین که یک پروتئاز است می‌توان نتایج حاصله را احتمالاً به ساختار کوتیکولی غنی از پروتئین‌ها در این دو آفت مزرعه‌ای مورد آزمون در قیاس با آفات انباری نسبت داد.

۵-۵. ژن پروتئین کیناز

می دانیم که ژن پروتئین کیناز، از بازیگران اصلی مسیرهای انتقال پیام در پاسخ به محرک های محیطی در قارچ است. طبق مرور منابع زانگ و همکاران (۲۰۰۹) با جهش این ژن در *Beauveria* spp. و تولید نژاد موتانت متوجه عدم بیمارگری نژادهای موتانت شدند که این نشانگر نقش این ژن در بیماریزایی است (۶۶). ایشان با مقایسه میزان چسبندگی کنیدی در نژاد موتانت و وحشی متوجه نقش این ژن در چسبش کنیدی به کوتیکول حشرات و برقراری ارتباط ملکولی اذعان داشتند (۶۶). در شکل ۴-۶ مشاهده شد که این ژن در کلیه شرایط یعنی محیط سنتتیک (SDY) و محیط های القایی حاوی عصاره کوتیکولی حشرات متفاوت، بیان می شود. اما میزان بیان این ژن در محیط القایی در مقایسه با محیط سنتتیک برخلاف نظر زانگ و همکاران کاهش یافت، شاید دلیل این تفاوت در نتیجه ناشی از ماده آزمایشی به کاررفته در این تحقیق (کوتیکول) و در مطالعه ی زانگ و همکاران که بال عقبی جدا شده از زنجره بوده است باشد چرا که در کوتیکول استخراجی ساختار فضایی طبیعی برهم خورده ای دارد. در مطالعه ی چگونگی بیان ژن پروتئین کیناز در محیط القایی میزان بیان این ژن در مواجهه با عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی و پروانه موم خوار بیشتر از سن گندم و سوسک قرمز آرد بود. از آنجایی که این پروتئین، تنظیمی است و علاوه بر تولید آپرسوریوم و بیماریزایی در فرآیندهای بسیاری درگیر است، دلیل افزایش و کاهش بیان را در این مورد می توان به دلایل مختلف از جمله متابولیسم لیپید و سنتز دیواره سلولی قارچ های رشد یافته در این محیط ها نیز نسبت داد که با سنجش بیماریزایی قارچ های رشد یافته در این محیط ها می توان تا حدودی، بیشتر به دلیل افزایش و کاهش بیان در مورد این ژن دست یافت.

میزان بیان ژن پروتئین کیناز در جدایه *B. iranica* در مقایسه با جدایه *B. iranica* به صورت معنی - داری بیشتر است، که این تفاوت رفتار، با تفاوت شدت بیماریزایی جدایه ها که قبلا مشخص شده بود (۱۶) مطابقت دارد.

۵-۶. ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز

ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز کمک کننده نفوذ به کوتیکول حشرات از طریق تسهیل هضم لیپیدهای اپی کوتیکولی حشره است. سوپر خانواده سیتوکروم P450 مونواکسیژنازها، شامل گروه بزرگ و متنوعی از آنزیمها، اکسیداسیون مواد آلی را کاتالیز می کنند. حدواسطهای متابولیک از قبیل لیپیدها و هورمونهای استروئیدی و مواد زنبوبیوتیک از قبیل داروها و سایر مواد شیمیایی سمی سوسترای آنزیم سیتوکروم می باشند. معمول ترین واکنشی که سیتوکروم P450 ها کاتالیز می کنند واکنش مونواکسیژناز، جاگذاری یک اتم اکسیژن در موقعیت یک سوسترای ارگانیک (RH) است. همانطور که در شکل ۴-۷ مشاهده می کنید این ژن در هر دو محیط کشت SDY و محیط کشت های حاوی عصاره کوتیکولی بیان می شود.

با توجه به اینکه در مطالعه پدرینی و همکاران (۲۰۱۰) به این نتیجه رسیدند که ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز (مورد بررسی در این تحقیق) در مواجهه با آلکان های زنجیره بلند (تا n-C28) افزایش بیان نشان می دهد (۶۷) می توان نتیجه گرفت که تغییرات میزان بیان این ژن بین عصاره های کوتیکولی حشرات متفاوت را به طول زنجیره آلکان سازنده کوتیکول حشرات نسبت داد و گفت آنجایی که میزان بیان این ژن بیشتر بوده است، طول زنجیره آلکان در آن کوتیکول طول تر بوده است. میزان بیان ژن سیتوکروم P450 در مورد دو سویه ی قارچی در مواجهه با سه عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی، سوسک قرمز آرد و پروانه موم خوار بیشتر از محیط عصاره کوتیکولی سن گندم است. این افزایش بیان ممکن است به این دلیل باشد که طول زنجیره آلکان سازنده کوتیکول در این سه حشره بلندتر از سن گندم است یا کوتیکول این سه حشره آلکان بلند زنجیر هم دارد اما کوتیکول سن گندم ندارد. که این موضوع با مطالعه ترکیب کوتیکول حشرات آزمایش شده روشن خواهد گردید.

۵-۷. ژن سنسور کلسیم

در بررسی‌های انجام شده تاکنون روی *NCS-1* در مورد قارچ‌های *Schizosaccharomyces pombe*، *A. fumigatus*، *M. grisea* و *B. bassiana* نقش این ژن در بیماری‌زایی کاملاً روشن نشده است. پیشنهاد می‌گردد با انجام مطالعات بیشتر نظیر آنالیز موتانت‌ها^۱ و یا افزایش بیان بیش از حد^۲ این ژن، مکانیسم این ژن در تنظیم اسیدیته محیط و نقش دقیق آن در بیماری‌زایی روشن گردد. تا بتوان نتایج حاصل را مبنی بر اینکه چرا بیشترین بیان در مواجهه با ملخ ایتالیایی و کمترین بیان روی محیط SDY بوده (شکل ۴-۸) را تفسیر نمود. ضمن اینکه در میزان بیان این ژن بین دو جدایه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

همانطور که فان و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند که بعد از کشت قارچ در محیط مایع کمتر از ۶ روز بیان ناچیزی از این ژن در قارچ مشاهده می‌گردد (۷۰)، میزان بیان این ژن در این تحقیق نیز بعد از ۵ روز رشد در محیط کشت مایع بسیار ناچیز بود.

در بررسی که پاتان و همکاران (۲۰۰۷) روی عصاره کوتیکولی چهار حشره متفاوت انجام دادند به این نتیجه رسیدند که به طور کلی پروفیل بیان ژن ایزوله قارچی مورد استفاده روی عصاره کوتیکولی مشتق شده از حشرات مختلف نسبتاً مشابه است (۵۲).

پیشنهادات:

عوامل کنترل بیولوژیک به عنوان مکمل یا جایگزینی برای حشره‌کش‌های شیمیایی سنتتیک، با اثرات سمی روی ارگانسیم‌های غیر هدف، می‌باشند. حشره‌کش‌های قارچی درصد کوچکی از حشره‌کش‌های بازار را تشکیل می‌دهند، محدودیت اصلی توسعه حشره‌کش‌های قارچی به خاطر این است که در مقایسه با حشره‌کش‌های شیمیایی به زمان طولانی‌تری برای از بین بردن حشره نیاز دارند. افزایش اثر

1 - Mutant Analysis
2 - Overexpression

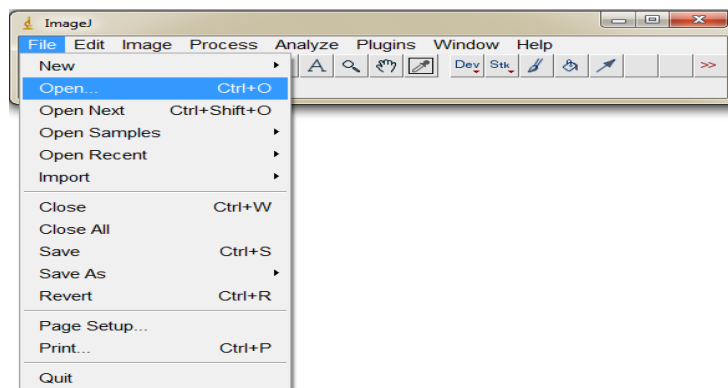
حشره‌کش‌های قارچی از طریق بهینه‌سازی ترکیب تلقیحی قارچ و همچنین تغییر ژنتیکی به دست می‌آید. در این تحقیق تعدادی از ژن‌های هضم‌کننده کوتیکول و درگیر در بیماری‌زایی را در این دو جدایه مورد بررسی از قارچ *Beauveria* قرار گرفت و اطلاعات بنیادی و مفیدی را برای انتخاب نژادها، مهندسی نژادهای جدید و کشت مصنوعی در مقیاس وسیع بدست آمد. پیشنهاد می‌گردد با Overexpression این ژن‌ها در قارچ‌های بیمارگر (مانند کار فانگ و همکاران و جوشی و همکاران) میزان بیماری‌زایی ایزوله را افزایش داده و در نتیجه دوز مورد استفاده قارچ و مدت زمان از بین رفتن حشرات کاهش یابد. همچنین پیشنهاد می‌شود جهت تحلیل بهتر نتایج تغییرات بیان ژن‌ها در محیط‌های حاوی عصاره کوتیکولی حشرات مختلف، ترکیب دقیق کوتیکولی حشرات و تمام اجزا ترکیبات کوتیکولی حشرات متفاوت به صورت جز به جز از طریق روش‌های همچون کروماتوگرافی گازی، روش ترکیبی کروماتوگرافی طیف‌سنجی (جهت شناسایی کربوهیدرات‌ها) صورت گیرد.

در جدول ضمیمه ۹ اسامی ژن‌هایی از قبیل antigenic 'pistil-specific extension-like protein و cell wall galactomannoprotein و histon with a PW1 domain آمده است که، در مواجهه با کوتیکول حشرات متفاوت پلی‌مورفیسم نشان می‌دهند که مطالعه این ژن‌ها پیشنهاد می‌شود.

علاوه بر این پیشنهاد می‌شود جهت مقایسه دقیق‌تر، بیان ژن‌های مورد بررسی با استفاده از روش‌های دیگری مثل Real-Time PCR نیز صورت گیرد.

در پایان پیشنهاد می‌شود جهت پی‌بردن به نقش دقیق‌تر آنزیم‌های مورد بررسی سطوح بیان ژن‌ها در سطح پروتئین نیز صورت گرفته و زیست‌سنجی با آنزیم‌ها نیز صورت گیرد.

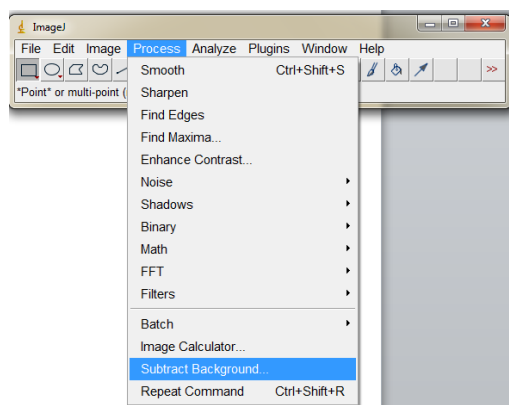
ضمائم



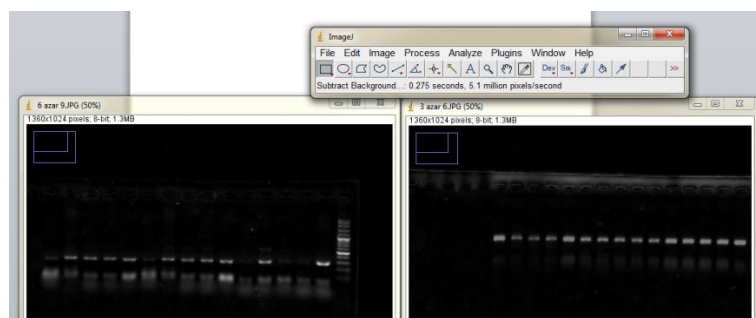
(الف)



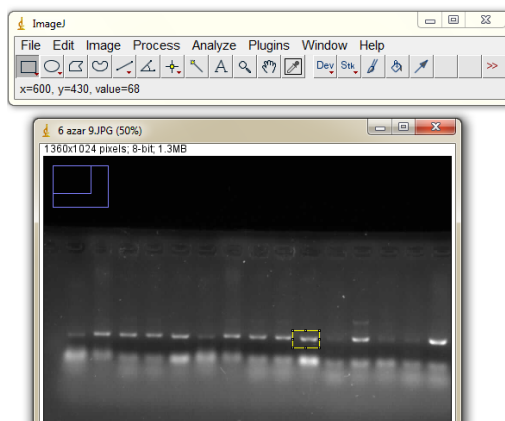
(ب)



(ت)



(ج)



(د)

شکل ۱ ضمیمه. مراحل کار با نرم افزار Image J. الف. جهت باز کردن تصویر ژل از منوی File گزینه open را انتخاب کنید. ب. باز شدن تصاویر مورد نظر جهت آنالیز. ت. جهت یکی شدن زمینه همه تصاویر مورد مطالعه در منوی Process گزینه Subtracted Background را انتخاب کنید. ج. تصاویر با زمینه یکسان جهت مقایسه. د. انتخاب باند مورد نظر از روی تصویر و خواندن ارزش باند و همچنین محیط قسمت انتخاب شده.

جدول ضمیمه ۱. جدول تجزیه واریانس وزن توده میسلیمی حاصل از رشد دو جدایه قارچی بر روی محیط کشت های متفاوت

F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
۲/۲۵ ^{ns}	۰/۰۳۵۴	۰/۰۷۰۹	۲	تکرار
۰/۰۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۲۷	۰/۰۰۰۲۷	۱	جدایه قارچی
۵۹۳/۰۶ ^{**}	۹/۳۴۵۶	۳۷/۳۸۲۷۳	۴	محیط کشت
۰/۱۵ ^{ns}	۰/۰۰۲۳۸۴	۰/۰۰۹۵۳	۴	جدایه قارچی × محیط کشت
	۰/۰۱۵۷	۰/۲۸۳۶	۱۸	خطا

CV = ۷/۹

ضریب تغییرات (درصد)

ns. اختلاف معنی دار نیست * و ** به ترتیب اختلاف در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی دار است.

جدول ضمیمه ۲. میزان جذب (OD^{11}) نمونه های RNA در A_{260} و غلظت RNA بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر (در سه تکرار بیولوژیک)

نمونه RNA	A_{260} (nm)	غلظت RNA	نمونه RNA	A_{260} (nm)	غلظت RNA
<i>B. amorpha 1 S</i>	۰/۴۹۰	۱/۹۶	<i>B. iranica 1 S</i>	۰/۵۲۳	۲/۰۹۲
<i>B. amorpha 2 S</i>	۰/۳۹۴	۱/۵۷۶	<i>B. iranica 2 S</i>	۰/۳۹۳	۱/۵۷۲
<i>B. amorpha 3 S</i>	۰/۴۳۵	۱/۷۴	<i>B. iranica 3 S</i>	۰/۳۹۰	۱/۵۶
<i>B. amorpha 1 T</i>	۰/۴۸۹	۱/۹۵۶	<i>B. iranica 1 T</i>	۰/۳۸۸	۱/۵۵۲
<i>B. amorpha 2 T</i>	۰/۳۹۷	۱/۵۸۸	<i>B. iranica 2 T</i>	۰/۵۱۸	۲/۰۷۲
<i>B. amorpha 3 T</i>	۰/۵۱۲	۲/۰۴۸	<i>B. iranica 3 T</i>	۰/۵۲۱	۲/۰۸۴
<i>B. amorpha 1 G</i>	۰/۴۹۵	۱/۹۸	<i>B. iranica 1 G</i>	۰/۴۴۶	۱/۷۸۴
<i>B. amorpha 2 G</i>	۰/۵۲۱	۲/۰۸۴	<i>B. iranica 2 G</i>	۰/۴۳۹	۱/۷۵۶
<i>B. amorpha 3 G</i>	۰/۳۹۷	۱/۵۸۸	<i>B. iranica 3 G</i>	۰/۴۴۰	۱/۷۶
<i>B. amorpha 1 C</i>	۰/۳۹۳	۱/۵۷۲	<i>B. iranica 1 C</i>	۰/۴۳۷	۱/۷۴۸
<i>B. amorpha 2 C</i>	۰/۵۱۷	۲/۰۶۸	<i>B. iranica 2 C</i>	۰/۴۴۲	۱/۷۶۸
<i>B. amorpha 3 C</i>	۰/۴۳۷	۱/۷۴۸	<i>B. iranica 3 C</i>	۰/۳۹۷	۱/۵۸۸
<i>B. amorpha 1 E</i>	۰/۴۳۰	۱/۷۲	<i>B. iranica 1 E</i>	۰/۳۹۴	۱/۵۷۶
<i>B. amorpha 2 E</i>	۰/۴۹۷	۱/۹۹۶	<i>B. iranica 2 E</i>	۰/۴۰۰	۱/۶
<i>B. amorpha 3 E</i>	۰/۴۹۹	۱/۹۸	<i>B. iranica 3 E</i>	۰/۳۹۷	۱/۵۸۸

S. محیط کشت SDY، T. محیط القایی عصاره کوتیکولی سوسک قرمز آرد، G. محیط القایی عصاره کوتیکولی پروانه

موم خوار، C. محیط القایی عصاره کوتیکولی ملخ ایتالیایی، E. محیط القایی عصاره کوتیکولی سن گندم.

جدول ضمیمه ۳. جدول تجزیه واریانس میزان کمی بیان ژن گاما اکتین در دو جدایه قارچ spp. *Beauveria* در مواجهه با محیط کشت های متفاوت

F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
۰/۰۴ ^{ns}	۰/۰۳۳۳	۰/۰۶۶۶	۲	تکرار
۲/۷۲ ^{ns}	۲/۳۱۸۵	۲/۳۱۸۵	۱	جدایه قارچی
۰/۹۶ ^{ns}	۰/۸۲۱۱	۳/۲۸۴۷	۴	محیط کشت
۰/۵۸ ^{ns}	۰/۴۹۳۱	۱/۹۷۲۶	۴	جدایه قارچی × محیط کشت
	۰/۸۵۳۷	۱۵/۳۶۸۲	۱۸	خطا

ضریب تغییرات (درصد) CV = ۵/۴۳

ns. اختلاف معنی دار نیست * و ** به ترتیب اختلاف در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی دار است.

جدول ضمیمه ۴. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن پروتئاز هضم کننده کوتیکول در دو جدایه قارچ *Beauveria* spp. در مواجهه با محیط کشت های متفاوت

F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
۱/۱۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۸۶	۲	تکرار
۳۳/۲۹ ^{**}	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۱	جدایه قارچی
۶۳۳/۶۱ ^{**}	۰/۰۲۴۸	۰/۰۹۹۵	۴	محیط کشت
۴۸/۴۱ ^{**}	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۷۶	۴	جدایه قارچی × محیط کشت
	۰/۰۰۰۰۳۹	۰/۰۰۰۰۷	۱۸	خطا

ضریب تغییرات (درصد) CV = ۱/۳۴۰

ns. اختلاف معنی دار نیست * و ** به ترتیب اختلاف در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی دار است.

جدول ضمیمه ۵. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن دای پتیدیل پتیداز در دو جدایه قارچ *Beauveria* spp. در مواجهه با محیط کشت های متفاوت

F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
۱/۲۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۴۳	۰/۰۰۰۰۸۶	۲	تکرار
۳۳۴۴/۹۲ ^{**}	۰/۱۱۷۹	۰/۱۱۷۹	۱	جدایه قارچی
۱۰۶۴/۶۶ ^{**}	۰/۰۳۷۵	۰/۱۵۰۱	۴	محیط کشت
۱۲۰/۰۹ ^{**}	۰/۰۰۴۲	۰/۰۱۶۹	۴	جدایه قارچی × محیط کشت
	۰/۰۰۰۰۳۵	۰/۰۰۰۰۶۳	۱۸	خطا

ضریب تغییرات (درصد) CV = ۱/۲۲۳

ns. اختلاف معنی دار نیست * و ** به ترتیب اختلاف در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی دار است.

جدول ضمیمه ۶. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن پروتئین کیناز در دو جدایه قارچ *spp. Beauveria* در مواجهه با محیط کشت های متفاوت

F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
۰/۱۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۳۸	۰/۰۰۰۰۷۶	۲	تکرار
۱۰/۱۵ ^{**}	۰/۰۰۳۱۹	۰/۰۰۳۱۹	۱	جدایه قارچی
۳۱/۸۱ ^{**}	۰/۰۰۹۹۹	۰/۰۳۹۹۸	۴	محیط کشت
۱۸/۹۲ ^{**}	۰/۰۰۵۹۴	۰/۰۲۳۷۸	۴	جدایه قارچی × محیط کشت
	۰/۰۰۰۳۱۴	۰/۰۰۵۶۵	۱۸	خطا

CV = ۳/۵۳

ضریب تغییرات (درصد)

ns. اختلاف معنی دار نیست * و ** به ترتیب اختلاف در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی دار است.

جدول ضمیمه ۷. جدول تجزیه واریانس میزان بیان نسبی ژن سیتوکروم P450 مونواکسیژناز در دو جدایه قارچ *spp. Beauveria* در مواجهه با محیط کشت های متفاوت

F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
۱/۲۸ ^{ns}	۰/۰۰۳۰۲	۰/۰۰۶۰۵	۲	تکرار
۲/۵۶ ^{ns}	۰/۰۰۶۰۴۶	۰/۰۰۶۰۴	۱	جدایه قارچی
۱۳/۰۹ ^{**}	۰/۰۳۰۹۵	۰/۱۲۳۸۳	۴	محیط کشت
۰/۸۴ ^{ns}	۰/۰۰۱۹۹	۰/۰۰۷۹۹	۴	جدایه قارچی × محیط کشت
	۰/۰۰۲۳	۰/۰۴۲۵	۱۸	خطا

CV = ۱۰/۷۹

ضریب تغییرات (درصد)

ns. اختلاف معنی دار نیست * و ** به ترتیب اختلاف در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی دار است.

جدول ضمیمه ۸. جدول تجزیه واریانس میزان بیان ژن سنسور کلسیم در دو جدایه قارچ *spp. Beauveria* در مواجهه با محیط کشت های متفاوت

F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
۲/۵۰ ^{ns}	۰/۰۰۳۸۴۶	۰/۰۰۷۶۹	۲	تکرار
۲/۴۱ ^{ns}	۰/۰۰۳۷	۰/۰۰۳۷۰	۱	جدایه قارچی
۴/۲۹ [*]	۰/۰۰۶۶۱۴	۰/۰۲۶۴۵	۴	محیط کشت
۰/۴۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۶۶۵	۰/۰۰۲۶۶	۴	جدایه قارچی × محیط کشت
	۰/۰۰۱۵۴	۰/۰۲۷۷۴	۱۸	خطا

CV = ۸/۸۵

ضریب تغییرات (درصد)

ns. اختلاف معنی دار نیست * و ** به ترتیب اختلاف در سطح ۵ درصد و ۱ درصد معنی دار است.

جدول ضمیمه ۹. اسامی ژن های درگیر در فرآیندهای سلولی که در مواجهه با کوتیکول حشرات متفاوت، پلی مورفیسم باندی نشان دادند.

pistil-specific extensin-like protein	ژن های مرتبط با دیواره سلولی قارچ
antigenic cell wall galactomannoprotein	
protein of yeast PIR protein repeat	
the exocyst complex subunit Sec15	ژن های درگیر در ترشح قارچ
the signal recongnition particle subunit SRP54	
GDP/GTP exchange protein	ژن های درگیر در اسکلت خارجی قارچ
GIM 3 protein	
protein with a PWI domain	ژن های درگیر در تنظیم بیان ژن
histone deacetylase	
DEAD/DEAH box helicase	
elongation factor 1-B like protein	
subtilisin-like protease Pr1H	

منابع

1. Hong W. (2003). PhD. Thesis, "Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: insect-cuticle degrading enzymes and development of a new selection marker for fungal transformation." In Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany. pp. 147.
2. Gillespie A. and Claydon N. (2006). "The use of entomogenous fungi for pest control and role of toxins in pathogenesis." **Pest Management Science** 27, pp 203-215.
3. Breeding M. P. Khan S. Guo L. Maimaiti Y. Mijit M. and Qiu D. (2012). "Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent." **Molecular Plant Breeding** 3, pp 63-79.
4. Sheng J. An K. Deng C. Li W. Bao X. and Qiu D. (2005). "Cloning a cuticle-degrading serine protease gene with biologyc control function from *Beauveria brongniartii* and its expression in *Escherichia coli*." **Current Microbiology** 53, pp 124-128.
5. Xiao G. Ying S. H. Zheng P. Wang Z. L. Zhang S. Xie X. Q. Shang Y. Leger R. Zhao G. P. and Wang C. (2012). "Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*." **Scientific Reports** 2, pp 483-490.
6. Zimmermann G. (2007). "Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*." **Biocontrol Science and Technology** 17, pp 553-596.
7. Boucias D. G. and Pendland J. C. (1991). "Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycoses in arthropod hosts." **The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals** 23, pp 101-127.
8. St Leger R. J. Charnley A. K. and Cooper R. M. (1986). "Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle." **Journal of Invertebrate Pathology** 47, pp 295-302.
9. Hegedus D. D. and Khachatourians G. G. (1995). "The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents." **Biotechnology Advances** 13, pp 455-490.
10. Zhang S. Xia Y. Kim B. and Keyhani N. O. (2011). "Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*." **Molecular Microbiology** 80, pp 811-826.
11. El-Sayed G. N. Ignoffo C. M. Leathers T. D. and Gupta S. C. (1993). "Effects of cuticle source and concentration on expression of hydrolytic enzymes by an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*." **Mycopathologia** 122, pp 149-152.

12. El-Sayed G. N. Ignoffo C. M. Leathers T. D. and Gupta S. C. (1993). "Insect cuticle and yeast extract effects on germination, growth, and production of hydrolytic enzymes by *Nomuraea rileyi*." **Mycopathologia** 122, pp 143-147.
13. El-Sayed G. N. Ignoffo C. M. and Gupta S. C. (1993). "Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression of cuticle-degrading enzymes from conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*." **Mycopathologia** 122, pp 79-87.
14. Viaud M. Couteaudier Y. and Riba G. (1998). "Molecular analysis of hypervirulent somatic hybrids of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria sulfurescens*." **Applied and Environmental Microbiology** 64, pp 88-93.
15. Rehner S. A. Minnis A. M. Sung G. H. Luangsa-ard J. J. Devotto L. and Humber R. A. (2011). "Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*." **Mycologia** 103, pp 1055-1073.
16. **Masoudi A. (2013). Msc. thesis. "Genetic diversity of soil-borne entomopathogenic fungi from citrus or chad. Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture (Shahrood, Semnam, Shahrood University). pp. 140.**
17. Sánchez-Martínez C. and Pérez-Martín J. (2001). "Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* similar inputs, different outputs." **Current Opinion in Microbiology** 4, pp 214-221.
18. Tartar A. and Boucias D. G. (2004). "A pilot-scale expressed sequence tag analysis of *Beauveria bassiana* gene expression reveals a tripeptidyl peptidase that is differentially expressed in vivo." **Mycopathologia** 158, pp 201-209.
19. Vincent J. F. and Wegst U. G. (2004). "Design and mechanical properties of insect cuticle." **Arthropod Structure & Development** 33, pp 187-199.
20. Ito E. T. Varéa-Pereira G. Miyagui D. T. Pinotti M. H. P. and Neves P. M. O. J. (2007). "Production of extracellular protease by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*." **Brazilian Archives of Biology and Technology** 50, pp 217-223.
21. Holder D. J. and Keyhani N. O. (2005). "Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to substrata." **Applied and Environmental Microbiology** 71, 5260-5266.
22. Wang S. Miao X. Zhao W. Huang B. Fan M. Li Z. and Huang Y. (2005). "Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR)." **Mycological Research** 109, pp 1364-1372.

23. Wang C. Fan M. Li Z. and Butt T. M. (2004). "Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China." **Journal of Applied Microbiology** 96, pp 861-870.
24. Alizadeh A. Samih M.A. Khezri M. and Riseh R.S. (2007). "Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides." **Int J Agric Biol** 9, pp 31-34.
25. Anderson T. E. and Roberts D.W. (1983). "Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control." **Journal of Economic Entomology** 76, pp 1437-1441.
26. Feng M. G. Poprawski T. J. and Khachatourians G. G. (1994). "Production, formulation and application of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status." **Biocontrol Science and Technology** 4, pp 3-34.
27. Bidochka M. J. and Khachatourians G. G. (1991). "The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*." **J Invertebr pathol** 1, pp 106-117.
28. Gillespie J. P. Bidochka M. J. and Khachatourians G. G. (1991). "Separation and characterization of grasshopper hemolymph phenoloxidasases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." **Biochemphysiol** 24, pp 351-358.
29. Samsinakova A. Misikova S. and Leopold J. (1971). "Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth (*Galleria mellonella*)." **J Invertebr Pathol** 18, pp 322-330.
30. Smith R. J. Pekrul S. and Gula E. A. (1981). "Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn eatworm (*Heliothis zea*)." **J Invertebr Pathol** 13, pp 335-344.
31. Hajek A. E. and St. Leger R. J. (1994). "Interactions between fungal pathogens and insect hosts." **Annual Review of Entomology** 39, pp 293-322.
32. Hassan A. E. M. and Charnley A. K. (1989). "Ultrastructural study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through Dimilin-affected cuticle of *Manduca sexta*." **Journal of Invertebrate Pathology** 54, pp 117-124.
33. Wang C. Hu G. and St Leger R. J. (2005). "Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation." **Fungal Genetics and Biology** 42, pp 704-718.
34. Bidochka M. J. and Khachatourians G. G. (1993). "Regulation of extracellular *N*-acetyl-D-glucosaminidase production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*." **Canadian Journal of Microbiology** 39, pp 6-12.

35. Havukkala I. Mitamura C. Hara S. Hirayae K. Nishizawa Y. and Hibi T. (1993). "Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes." **PLoS Pathogens** 61, pp 97-102.
36. Charnley A. K. (2003). "Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins." **Advances in Botanical Research** 40, pp 241-321.
37. Bidochka M. J. and Khachatourians G. G. (1987). "Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*." **Applied and Environmental Microbiology** 53, pp 1679-1684.
38. North M. J. (1982). "Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms." **Microbiological Reviews** 3, pp 308-340.
39. Persson M. Häll L. and Söderhäll K. (1984). "Comparison of peptidase activities in some fungi pathogenic to arthropods." **Journal of Invertebrate Pathology** 44, pp 342-348.
40. Fang W. Leng B. Xiao Y. Jin K. Ma J. Fan Y. Feng J. Yang X. Zhang Y. and Pei Y. (2005). "Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence." **Applied and Environmental Microbiology** 71, pp 363-370.
41. Lu D. Pava-Ripoll M. Li Z. and Wang C. (2008). "Insecticidal evaluation of *Beauveria bassiana* engineered to express a scorpion neurotoxin and a cuticle degrading protease." **Applied Microbiology and Biotechnology** 81, pp 515-522.
42. Paris S. Ferron P. Fargues J. and Robert P. (1985). "Physiological characteristics and virulence of auxotrophic and morphological mutants of *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Perch (*Beauvetia tenella*)." **Mycopathologia** 91, pp 109-116.
43. Inglis G. D. Goettel M. S. Butt T. M. Strasser H. Jackson C. and Magan N. (2001). "Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests." **Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential**, pp 23-69.
44. Srivastava R. P. (1970). "The amino acid comoposition of cuticular proteins of different developmental stages of *Galleria Mellonella*." **J Insect Phyriol** 17, pp 189-196.
45. Baker J. Sukkestad D. Woo S. and Nelson D. (1978). "Cuticular hydrocarbons of *Tribolium castaneum*: Effects of the food additive tricalcium phosphate." **Insect Biochemistry** 8, pp 159-167.
46. Phillips D. R. Loughton B. G. (1975). "Cuticle protein in locusta migratoria." **Comp Biochem Physiol.** 55, pp 129-135.

47. Aja S. Pérez G. and Rosell C. M. (2004). "Wheat damage by *Aelia* spp. and *Erygaster* spp.: effects on gluten and water-soluble compounds released by gluten hydrolysis." **Journal of Cereal Science** 39, pp 187-193.
48. Fryer R. M. Randall J. Yoshida T. Hsiao L. L. Blumenstock J. Jensen K. E. Dimofte T. Jensen R.V. and Gullans S. R. (2002). "Global analysis of gene expression: methods, interpretation, and pitfalls." **Experimental Nephrology** 10, pp 64-74.
49. Breljak D. Ambriovic-Ristov A. Kapitanovic S. Cacev T. and Gabrilovac J. (2005). "Comparison of three RT-PCR based methods for relative quantification of mRNA." **Food Technol Biotechnol** 4, pp 379-388.
50. Bustin S. A. Benes V. Nolan T. and Pfaffl M. W. (2005). "Quantitative realtime RT-PCR: a perspective." **Journal of Molecular Endocrinology** 34, pp 597-601.
51. Guenin S. Mauriat M. Pelloux J. Wuytswinkel O. V. Bellini C. and Gutierrez L. (2009). "Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references." **Journal of Experimental Botany** 60, pp 487-493.
52. Pathan A. A. K. Uma Devi K. Vogel H. and Reineke A. (2007). "Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs." **Fungal Genetics and Biology** 44, pp 1231-1241.
53. Cho E. M. Kirkland B. H. Holder D. J. and Keyhani N. O. (2007). "Phage display cDNA cloning and expression analysis of hydrophobins from the entomopathogenic fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana*." **Microbiology** 153, pp 3438-3447.
54. Chantasingh D. Kitikhun S. Keyhani N. O. Boonyapakron K. Thoetkiattikul H. Pootanakit K. and Eurwilaichitr L. (2013). "Identification of catalase as an early up-regulated gene in *Beauveria bassiana* and its role in entomopathogenic fungal virulence." **Biological Control** 67, pp 85-93.
55. Zhou Y. H. Zhang Y. J. Luo Z. B. Fan Y. H. Tang G. R. Liu L. J. and Pei Y. (2012). "Selection of optimal reference genes for expression analysis in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during development, under changing nutrient conditions, and after exposure to abiotic stresses." **Applied Microbiology and Biotechnology** 93, pp 679-685.
56. Cao S. Zhang X. Ye N. Fan X. Mou S. Xu D. Liang C. Wang Y. and Wang W. (2012). "Evaluation of putative internal reference genes for gene expression normalization in *Nannochloropsis* sp. by quantitative real-time RT-PCR." **Biochemical and Biophysical Research Communications** 424, pp 118-123.
57. Oliveira R. C. D. and Neves P. M. (2004). "Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides." **Neotropical entomology** 33, pp 353-358.

58. Laskar A. Rodger E. J. Chatterjee A. and Mandal C. (2011). "Modeling and structural analysis of evolutionarily diverse S8 family serine proteases." **Bioinformatics** 7, pp 239-245.
59. Kim H. K. Hoe H. S. Suh D. S. Kang S. C. Hwang C. and Kwon S.T. (1999). "Gene structure and expression of the gene from *Beauveria bassiana* encoding bassiasin I, an insect cuticle-degrading serine protease." **Biotechnology Letters** 21, pp 777-783.
60. Sheng J. An K. Deng C. Li W. Bao X. and Qiu D. (2006). "Cloning a cuticle-degrading serine protease gene with biologic control function from *Beauveria brongniartii* and its expression in *Escherichia coli*." **Current Microbiology** 53, pp 124-128.
61. He M. and Xia Y. (2009). "Construction and analysis of a normalized cDNA library from *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* germinating and differentiating on *Locusta migratoria* wings." **FEMS Microbiology Letters** 291, pp 127-135.
62. Beauvais A. Monod M. Debeaupuis J. P. Diaquin M. Kobayashi H. and Latgé J. P. (1997). "Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*." **Journal of Biological Chemistry** 272, pp 6238-6244.
63. jin K. Ming Y. and Xia Y. X. (2012). "MaHog1, a Hog1-type mitogen-activated protein kinase gene, contributes to stress tolerance and virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*." **Microbiology** 158, pp 2987-2996.
64. Segmuller N. Ellendorf U. Tudzynski B. and Tudzynski P. (2007). "BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*." **Eukaryot Cell** 6, pp 211-221.
65. Zhang Y. Zhang J. Jiang X. Wang G. Luo Z. Fan Y. Wu Z. and Pei Y. (2010). "Requirement of a mitogen-activated protein kinase for appressorium formation and penetration of insect cuticle by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*." **Applied and Environmental Microbiology** 76, pp 2262-2270.
66. Zhang Y. Zhao J. Fang W. Zhang J. Luo Z. Zhang M. Fan Y. and Pei Y. (2009). "Mitogen-activated protein kinase *hog1* in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* regulates environmental stress responses and virulence to insects." **Applied and environmental microbiology** 75, pp 3787-3795.
67. Pedrini N. Zhang S. Juárez M. P. and Keyhani N. O. (2010). "Molecular characterization and expression analysis of a suite of cytochrome P450 enzymes implicated in insect hydrocarbon degradation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*." **Microbiology** 156, pp 2549-2557.

68. Howard R. W. and Blomquist G. J. (2005). "Ecological behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons." **Annu Rev Entomol** 50, pp 371-393.
69. Zhang S. Widemann E. Bernard G. Lesot A. Pinot F. Pedrini N. and Keyhani N. O. (2012). "CYP52X1, representing new cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*." **Journal of Biological Chemistry** 287, pp 13477-13486.
70. Fan y. Ortiz-urquiza A. Kudia R. A. and Keyhani N. O. (2012). "A fungal homologue of neuronal calcium sensor-1, *Bbcsal*, regulates extracellular acidification and contributes to virulence in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*." **Microbiology** 158, pp 1843-1851.
71. Min L. and Yueqing C. (2012). "Cloning of *MaNcs1* gene and its role in pathogenicity of *Metarhizium acridum*." **Chin J Appl Environ Biol** 2, pp 240-244.
72. Andersen S. O. (1980). "Cuticular sclerotization." **In Cuticle Techniques in Arthropods, M.T. A., ed. (Springer New York)** 35 , pp 185-215.
73. Tamuli R. Kumar R. and Deka R. (2011). "Cellular roles of neuronal calcium sensor-1 and calcium/calmodulin-dependent kinases in fungi." **Journal of Basic Microbiology** 51, pp 120–128.
74. Joshi L. St Leger R. J. and Bidochka M. J. (1995). "Cloning of a cuticle degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*." **FEMS Microbiology Letters** 125, pp 211-217.
75. Hruz T. Wyss M. Docquier M. Pfaffl MW. Masanetz S. and Borghi L. (2011). "RefGenes: : identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization." **Methodology Article** 12, pp 156.
76. Luo X. Keyhani N. O. Yu X. He Z. Luo Z. Pei Y. and Zhang Y. (2012). "The MAP kinase *Bbslt2* controls growth, conidiation, cell wall integrity, and virulence in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*." **Fungal Genetics and Biology** 49, pp 544-555.
77. Zhou Y. H. Hou L. Zhang Y. J. Fan Y. H. Luo Z. B. Jin D. Zhou Q. S. Li Y. J. Wang Y. and Pei Y. (2013). "Expression and promoter characterization of *BbPacC*, a pH response transcription factor gene of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*." **Microbiology, mic.** 7, pp 1159-1150.

Expression analysis of some *Beauveria* genes in the vicinity of two insect cuticles, *Galleria* and *Tribolium*.

Abstract:

Entomopathogenic fungi such as *Beauveria* spp. have shown to be effective in controlling insect population. *Beauveria* spp., in addition of having a saprophytic life cycle on insect and plant remainders, have diverse host range, including but not limited to insects and spiders. According to differences in epi- and pro- cuticle composition, texture and structure, different suites of genes in fungi might be turned on with different expression patterns. These changes can be highlighted by either whole transcript analysis or analyzing candidate transcripts of fungal genes, facing varieties of insect cuticles. Here, two fungal *Beauveria* isolates with different strength of pathogenicities, weak and strong, were used. Cuticles of four insects, namely *Tribolium castaneum*, *Galleria mellonella*, *Calliptamus italicus* and *Eurygaster integriceps* were isolated and included within the fungal growth culture. Hence, four induced medium next to a minimal medium lacking a cuticle extract as check were used to grow two fungal isolates. Candidate genes, namely protease bassiasin, dipeptidyl peptidase, calcium sensor, cytochrome P450 and protein kinase were used to design gene-specific primers and study the transcript changes via semi-quantitative RT-PCR. The first three genes were induced significantly facing cuticle containing media with highest expression value observed in *C. italicus*. In contrast and interestingly, down-regulation was observed for the two latter genes in induced media once comparing to check. Moreover, fungal isolates behaved differently in different media.

Key words: Entomopathogenic fungi, Insect cuticle, gene expression, down-regulation, up-regulation.

کنفرانس ها و همایش ها و مقالات چاپ شده



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

M. Sc. Thesis in Agriculture Biotechnology

Expression analysis of some *Beauveria* genes in the vicinity of two insect cuticles, *Galleria* and *Tribolium*

Masoumeh Kordi

Supervisor:

Dr. Naser Farrokhi

Dr. Shahrookh Gharanjik

July 2014