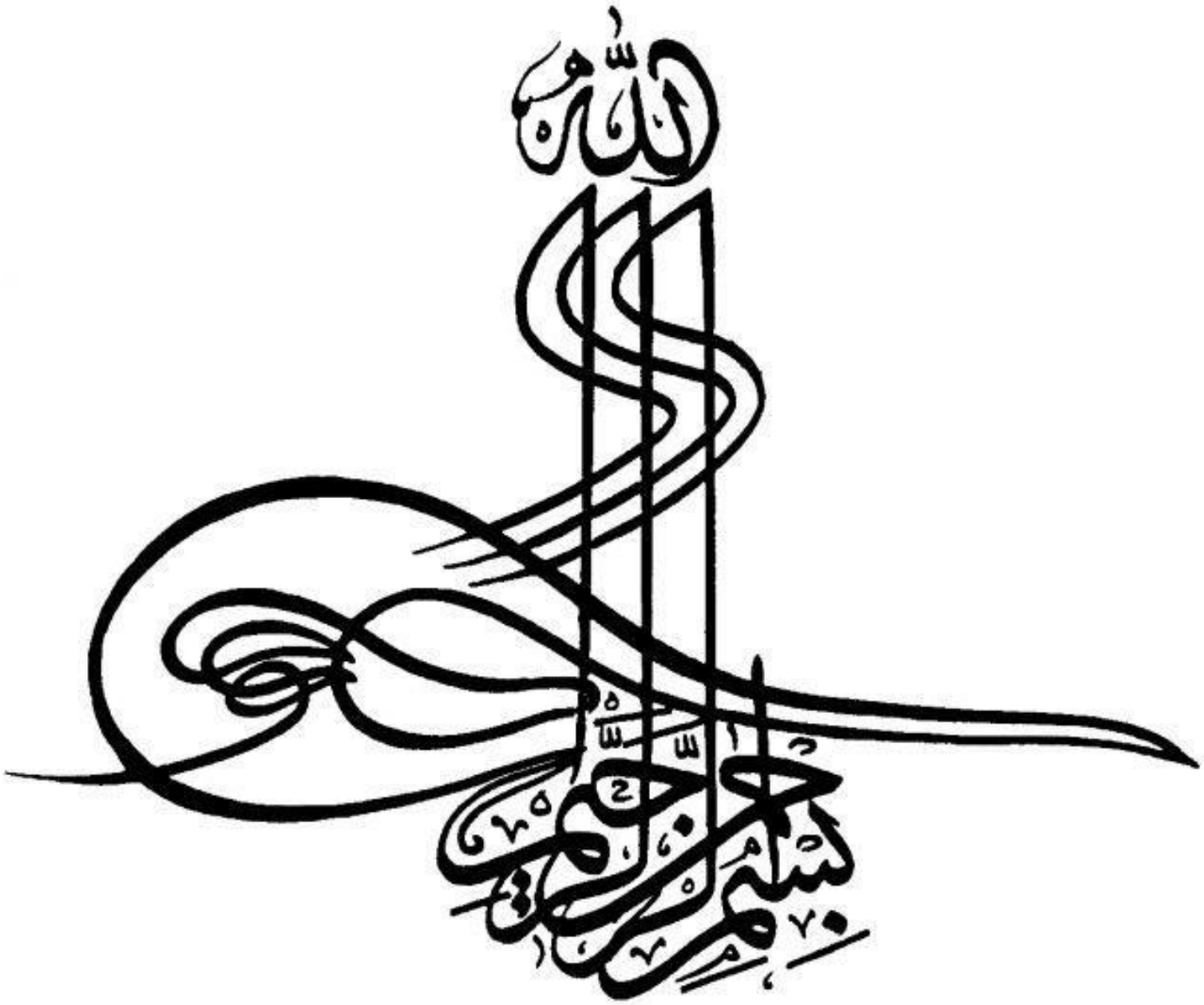

الله
بسم الله الرحمن الرحيم

**دانشکده کشاورزی**

**گروه زراعت و اصلاح نباتات**

# بررسی تنوع ژنتیکی قارچ بیماری‌زای حشرات *Beauveria sp.* با استفاده از نشانگر ISSR

دانشجو:

علی حیدری

اساتید راهنما:

دکتر شاهرخ قرنجیک

دکتر علی درخشان شادمهری

پایان‌نامه‌ی ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی

تابستان ۱۳۹۴

پیوست شماره ۲

## دانشگاه شاهرود

## دانشکده : کشاورزی

## گروه : زراعت و اصلاح نباتات

**پایان نامه کارشناسی ارشد آقای/خانم علی حیدری به شماره دانشجویی: ۹۱۰۲۴۵۴**

**تحت عنوان: بررسی تنوع ژنتیکی قارچ بیماری زای حشرات *Beauveria sp.* با استفاده از نشانگر ISSR**

در تاریخ ۹۴/۶/۲۵ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی- بیوتکنولوژی در کشاورزی مورد ارزیابی و با درجه عالی مورد پذیرش قرار گرفت.

| اساتید راهنما | امضاء | اساتید مشاور | امضاء |
|---|---|---|---|
| دکتر شاهرخ ترنجیک | | نام و نام خانوادگی : | |
| دکتر علی درخشان شادمهری | | نام و نام خانوادگی : | |

| اساتید داور | امضاء | نماینده تحصیلات تکمیلی | امضاء |
|---|---|---|---|
| دکتر مریم عجم حسنی | | دکتر مهدی برادران فیروزآبادی | |
| دکتر مهدیه پارسائیان | | | |
| نام و نام خانوادگی : | | | |
| نام و نام خانوادگی : | | | |

# سپاسگزاری

بر خود لازم میدانم از زحمات استاد گرانقدر جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک به خاطر راهنمایی ها و حمایت هایشان نه تنها در امر این پروژه، بلکه در تمامی دوران تحصیل، کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم. بی شک بدون یاری ایشان رساله اخیر پیش روی شما نبود.

همچنین از جناب آقای دکتر علی درخشان شادمهری به خاطر زحمات بی شائبه و دلسوزانه ایشان که با صبر و حوصله، یکایک پرسش ها و مشکلاتم را بدون هیچ چشم داشتی پاسخگو بودند، صمیمانه تشکر می نمایم.

خدای را بسی شاکرم که از روی کرم، پدر و مادری فداکار نصیبم ساخت تا در سایه درخت پربار وجودشان بیاسایم و از ریشه آنان شاخ و برگ گیرم و از سایه وجودشان در راه کسب علم و دانش تلاش نمایم. والدینی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی ام بوده اند، دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. امید آنکه روزی بتوانم گوشه ای از محبتشان را جبران کنم.

در انتها از مساعدت و همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه مهندس مطهری نژاد، مهندس عبدالهی، مهندس فرجی، مهندس حسین پور، مهندس شاکری و مهندس گلی و از تمامی دوستان و هم کلاسیهایم، خانم ها عصمت اشعار قدیم، مرضیه حسنی، آناهیتا پنجی، مهسا جوکار، وجیهه غدیریان، صدیقه قریشی، مریم رمضانی و آزاده محسنی و آقایان علیرضا شعبانی نژاد، رامین اسدی صدر، حسین زرگر، فرشید عنایتی، شهریار دانش، بهرام الله توکلی و سیف اله حمزه گلکناری و همه کسانی که در این مدت گوشه ای از خاطرات شیرین دوران زندگی ام را ساختند، سپاسگزارم.

هر که در هر کار با عشق است یار

کار او با قیست اندر روزگار

پیشرفت فرهنگ و علم مرهون خردورزی ها و کوشش فرزانگانی است که چراغ راه فرهیختگی اند و توسعه دانش و دانستگی وامدار تلاش و پشتکار مردان و زنان خستگی ناپذیری است که نهال علم و عمل را توأمان در خاک این سرزمین پرورانده اند.

به پای قدرشناسی، این رساله تقدیم می گردد به دو فرشته بی بدیل زندگی، پدر و مادر فداکارم که حمایت های بی دریغ آنها غیر ممکن ها را برایم ممکن ساخت.

علی حیدری

تابستان ۱۳۹۴

# تعهد نامه

اینجانب **علی حیدری** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان‌نامه **بررسی تنوع ژنتیکی قارچ بیماری‌زای حشرات *Beauveria sp.* با استفاده از نشانگر ISSR** تحت راهنمائی **آقایان دکتر شاهرخ قرنجیک و دکتر علی درخشان شادمهری** 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.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- 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.

**تاریخ:** ۹٤/۶/۲۵

**امضای دانشجو:**

## مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده:

قارچ‌های بیماری‌زای حشرات اغلب در طبیعت موجب بیماری حشرات می‌شوند و عامل مهم تنظیم کننده‌ی جمعیت حشرات هستند که طبیعت آن را در اختیار آدمی قرار داده است. قارچ *Beauveria bassiana* جزو بیمارگرهای مشهوری است که به دلیل دامنه میزبانی وسیع به عنوان یک آفتکش زیستی مورد توجه قرار گرفته است. این قارچ دامنه گسترده‌ای از میزبان‌ها را که حداقل۱۰ راسته و ۴۰ خانواده از حشرات را شامل می شوند، آلوده می‌کند. در این تحقیق، جهت بررسی تنوع ژنتیکی این قارچ، از نقاط مختلف شهرستان اهواز (استان خوزستان) و شهرستان شاهرود (استان سمنان) ۵۰ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana* با روش طعمه حشره‌ای جداسازی شدند و با استفاده از صفات مورفولوژیک مانند نرخ رشد، تولید اسپور و قدرت جوانه‌زنی و آزمون زیست سنجی علیه سوسک قرمز آرد *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) شرح داده شدند. نتایج آزمایش‌های مورفولوژیک نشان داد که بین صفات نرخ رشد، تولید اسپور و درصد بیماری-زایی همبستگی معنی‌داری وجود دارد. همچنین، در این تحقیق از چندشکلی تکثیر شده نواحی بین ریز ماهواره‌ای ISSR به منظور بررسی سطوح تنوع ژنتیکی در ۲۶ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana* که از مناطق جغرافیایی متفاوت جداسازی شده بودند، استفاده شد. در این مطالعه، از ۳۰ پرایمر مورد بررسی، ۲۴ پرایمر بر اساس میزان تشکیل باند، چندشکلی و نیز تکرارپذیری باندها انتخاب شدند. ۲۴ پرایمر مذکور، مجموعاً ۹۱۳ باند تولید کردند که همگی چندشکلی قابل قبولی نشان دادند. تعداد قطعات تکثیر شده با پرایمرهای مختلف، متفاوت بود. بیشترین تعداد قطعه تکثیر شده ۵۰ عدد مربوط به پرایمر ISSR840 و کمترین آن ۲۹ عدد مربوط به پرایمر ISSRBIS29 بود. بیشترین مقدار شاخص شانون، بیشترین شاخص Nei، بیشترین تعداد آلل-های موثر، بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی و بیشترین شاخص نشانگر مربوط به پرایمر ISSR840 بود که نشان دهنده این است که این پرایمر تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مورد مطالعه را نسبت به سایر پرایمر-های ISSR بهتر نشان می‌دهد. نتایج این پژوهش نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی در بین جدایه‌های مورد بررسی بوده و بیانگر کارآمدی نشانگرهای ISSR در تعیین تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف قارچ مورد مطالعه می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: قارچ بیماری‌زای حشرات، *B. bassiana*، تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR

# لیست مقالات مستخرج از پایان نامه:

**معرفی و مطالعه‌ی بیمارگری قارچ بیماری‌زای حشرات *Beauveria bassiana* بر روی لارو موم‌خوار زنبور عسل (*Galleria melanolla*) در شرایط آزمایشگاهی**

علی حیدری، شاهرخ قرنجیک، علی درخشان شادمهری

اولین همایش یافته‌های نوین در محیط زیست و اکوسیستم‌های کشاورزی- دانشگاه تهران

آذر ۱۳۹۳

**بررسی آزمایشگاهی ایزوله‌های مختلف قارچ *Beauveria spp.* در کنترل سوسک قرمز آرد *(Tribolium castaneum)***

علی حیدری، شاهرخ قرنجیک، علی درخشان شادمهری

اولین همایش بین المللی و نهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران- دانشگاه شهید بهشتی تهران – سوم تا پنجم خرداد ۱۳۹۴

**بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف قارچ بیماری‌زای حشرات *Beauveria bassiana* در شهرستان اهواز با استفاده از نشانگرهای بین ریز ماهواره‌ای**

علی حیدری، شاهرخ قرنجیک، علی درخشان شادمهری

دومین کنگره قارچ شناسی ایران- دانشگاه تهران

یکم تا سوم شهریور ۱۳۹۴

**بررسی اثر چند محیط کشت جامد و مایع روی جداسازی، رشد و اسپورزایی جدایه-های مختلف قارچ بیماری‌زای حشرات *Beauveria bassiana***

علی حیدری، شاهرخ قرنجیک، علی درخشان شادمهری

دومین کنگره قارچ شناسی ایران- دانشگاه تهران

یکم تا سوم شهریور ۱۳۹۴

# فهرست مطالب


**فصل اول- مقدمه و کلیات** ۱

۱-۱- کنترل زیستی ۲

۱-۲- قارچ‌های بیماری‌زای حشرات ۳

۱-۳- قارچ بیماری‌زای حشرات *B. bassiana* ۶

۱-۳-۱- قدمت و اهمیت قارچ ۷

۱-۳-۲- شکل‌شناسی قارچ ۸

۱-۳-۳- دامنه میزبانی ۹

۱-۳-۴- ژنوم و ساختار سلولی ۱۱

۱-۴- تنوع ژنتیکی و اهمیت آن ۱۲

۱-۵- نشانگرها و انواع آن ۱۳

۱-۵-۱- نشانگرهای مورفولوژیک ۱۴

۱-۵-۲- نشانگرهای پروتئینی ۱۴

۱-۵-۳- نشانگرهای مولکولی ۱۶

۱-۵-۴- نشانگر ISSR ۱۹

۱-۶- اهداف تحقیق ۲۱

**فصل دوم- مرور منابع** ۲۳

۲-۱- پراکنش جغرافیایی ۲۴

۲-۲- کاربرد قارچ بیماری‌زای *B. bassiana* در کنترل آفات..... ۲۵

۲-۳- تشخیص و شناسایی مورفولوژیکی قارچ *B. bassiana* ..... ۳۳

۲-۴- مرور کلی مطالعات تنوع ژنتیکی انجام شده درمورد *B. bassiana* ..... ۳۴

**فصل سوم- مواد و روش‌ها**.....۴۳

۳-۱- مواد.....۴۴

۳-۲- تجهیزات آزمایشگاهی.....۴۴

۳-۳- جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی جدایه‌های مختلف قارچ بیماری‌زای *B. bassiana*... ۴۵

۳-۳-۱- جمع‌آوری نمونه‌های خاک.....۴۵

۳-۳-۲- روش طعمه حشره‌ای.....۴۸

۳-۳-۳- پرورش پروانه موم‌خوار.....۴۸

۳-۳-۴- جداسازی *B. bassiana* از خاک.....۵۱

۳-۳-۵- جداسازی جدایه‌های قارچی.....۵۲

۳-۳-۶- خالص‌سازی جدایه‌های مختلف *B. bassiana*.....۵۴

۳-۳-۷- نام‌گذاری جدایه‌های به‌دست آمده.....۵۷

۳-۳-۸- مطالعه میکروسکوپی قارچ *B. bassiana*.....۵۷

۳-۴- بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana*.....۵۸

۳-۴-۱- آزمایش اندازه‌گیری نرخ رشد.....۵۸

۳-۴-۲- آزمایش شمارش تعداد کنیدی تولیدی.....۶۰

۳-۴-۳- آزمایش زیست‌پذیری کنیدی (قدرت جوانه‌زنی) جدایه‌ها.....۶۰

۳-۵- بررسی بیماری‌زایی بر روی سوسک قرمز آرد (*Tribolium castaneum*)..... ۶۱
۳-۶- مطالعات مولکولی..... ۶۲
۳-۶-۱- آماده‌سازی نمونه..... ۶۳
۳-۶-۲- استخراج DNA با استفاده از روش CTAB ..... ۶۳
۳-۷- محلول‌های مورد نیاز..... ۶۶
۳-۷-۱- محلول تریس اسید کلریدریک ۱ مولار (Tris-HCl 1M, pH = 8)..... ۶۶
۳-۷-۲- محلول اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ۰/۵ مولار (EDTA 0/5M, pH = 8)..... ۶۶
۳-۷-۳- محلول سدیم کلرید ۵ مولار (NaCl 5M)..... ۶۶
۳-۷-۴- بافر Tris-HCl-EDTA (TE)..... ۶۷
۳-۷-۵- بافر TBE..... ۶۷
۳-۸- بررسی کمیت و کیفیت DNA..... ۶۷
۳-۸-۱- الکتروفورز ژل آگارز با دستگاه الکتروفورز افقی..... ۶۷
۳-۸-۲- روش اسپکتروفتومتری..... ۶۸
۳-۹- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و تکثیر پرایمرهای ISSR..... ۶۸
۳-۹-۱- بررسی محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز..... ۷۰
۳-۱۰- اندازه‌گیری فواصل و تشابه‌های ژنتیکی..... ۷۰
۳-۱۱- تجزیه‌های چند متغیره آماری..... ۷۱
۳-۱۱-۱- تجزیه خوشه‌ای..... ۷۱
۳-۱۱-۲- UPGMA..... ۷۲

۳-۱۱-۳- ضریب کوفنتیک..... ۷۲
۳-۱۱-۴- تجزیه به مولفه‌های اصلی..... ۷۳
۳-۱۱-۵- شاخص شانون (SI)..... ۷۴
۳-۱۱-۶- هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)..... ۷۴
۳-۱۱-۷- تعداد آلل‌های موثر (Ne)..... ۷۵
۳-۱۱-۸- تعداد آلل‌های متفاوت (Na)..... ۷۵
۳-۱۱-۹- شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)..... ۷۵
۳-۱۱-۱۰- شاخص نشانگر (MI)..... ۷۵
۳-۱۲- تجزیه داده‌ها..... ۷۶
**فصل چهارم- نتایج و بحث**..... ۷۷
۴-۱- ارزیابی نرخ جداسازی قارچ *B. bassiana*..... ۷۸
۴-۲- ارزیابی نرخ رشد جدایه‌ها بر روی محیط‌کشت PDA..... ۸۰
۴-۳- ارزیابی تعداد کنیدی تولیدی جدایه‌های مختلف *B. bassiana* بر روی محیط‌کشت PDA..... ۸۲
۴-۴- ارزیابی جوانه‌زنی کنیدی‌ها..... ۸۵
۴-۵- بررسی تاثیر بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* علیه سوسک قرمز آرد..... ۸۷
۴-۶- همبستگی میان پارامترهای مورفولوژیکی نرخ رشد، شمارش تعداد کنیدی و بیماری‌زایی..... ۹۰
۴-۷- جمع‌بندی نتایج آزمایشات مورفولوژیک..... ۹۰
۴-۸- نتایج داده‌های مولکولی..... ۹۵
۴-۸-۱- نتایج آنالیز خوشه‌ای..... ۱۰۲

۴-۸-۲- تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA)..... ۱۰۴

۴-۸-۳- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی..... ۱۰۶

۴-۹- نتیجه‌گیری..... ۱۱۱

۴-۱۰- پیشنهادات..... ۱۱۲

**ضمائم**..... ۱۱۳

**منابع**..... ۱۱۷

**چکیده انگلیسی**..... ۱۳۴

**فهرست جدول‌های ذکر شده در پایان‌نامه** **صفحه**


جدول ۱-۱: راسته‌های مهم و پارازیت‌های قارچی نکروتروف که به حشرات حمله می‌کنند ۵

جدول ۱-۲: گزارش لاتردال از میزبان های قارچ *B. bassiana* ۱۰

جدول ۳-۱: مواد مورد استفاده در تهیه بافر استخراج ۶۵

جدول ۳-۲: توالی و دمای اتصال پرایمرهای مورد استفاده ۶۹

جدول ۴-۱: جدول تجزیه واریانس برای نرخ رشد ۵۰ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana* ۸۰

جدول ۴-۲: مقایسه میانگین نرخ رشد جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* ۸۱

جدول ۴-۳: جدول تجزیه واریانس برای تعداد کنیدی تولیدی ۵۰ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana* ۸۳

جدول ۴-۴: مقایسه میانگین تعداد کنیدی تولیدی جدایه‌های مختلف *B. bassiana* ۸۳

جدول ۴-۵: جدول تجزیه واریانس برای قدرت جوانه‌زنی ۵۰ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana* ۸۵

جدول ۴-۶: مقایسه میانگین قدرت جوانه‌زنی جدایه‌های مختلف *B. bassiana* ۸۶

جدول ۴-۷: جدول تجزیه واریانس برای بیماری‌زایی ۵۰ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana* ۸۷

جدول ۴-۸: مقایسه میانگین تلفات سوسک قرمز آرد توسط جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* ۸۸

جدول ۴-۹: نتایج حاصل از آنالیز نشانگرهای ISSR برای جدایه‌های مورد مطالعه ۱۰۰

جدول ۴-۱۰: نتایج حاصل از شاخص‌های اندازه‌گیری شده آنالیز تنوع ژنی Nei در یکایک جمعیت‌ها ۱۰۱

جدول ۴-۱۱: نمودار حاصل از تجزیه واریانس مولکولی بر اساس جمعیت‌های مورد مطالعه ۱۰۵

جدول ۴-۱۲: تجزیه واریانس مولکولی برای جدایه‌های مختلف قارچ مورد مطالعه ۱۰۵

جدول ۴-۱۳: نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی پرایمرهای ISSR ۱۰۷

جدول ۱ ضمیمه: تعداد لاروهای آلوده و نرخ جداسازی قارچ *B. bassiana* و جدایه‌های بدست آمده از آنها ۱۱۴

جدول ۲ ضمیمه: مشخصات جغرافیایی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* بدست آمده ۱۱۵

**فهرست شکل‌های ذکر شده در پایان‌نامه** **صفحه**


شکل ۱-۱: شکل شماتیک از قارچ *B. bassiana* ۹

شکل ۱-۲: شمایی از روش ISSR ۲۱

شکل ۳-۱: جمع‌آوری نمونه‌های خاک ۴۷

شکل ۳-۲: مراحل زندگی پروانه مومخوار ۴۹

شکل ۳-۳: پرورش لارو پروانه مومخوار و رهاسازی لارو بر روی خاک ۵۰

شکل ۳-۴: نمایی از قارچ *Beauveria* روی لارو پروانه مومخوار زنبور عسل و محیط کشت ۵۴

شکل ۳-۵: نحوه‌ی تهیه بانک اولیه از لاروهای آلوده و بانک ثانویه از جدایه‌های بدست آمده ۵۶

شکل ۳-۶: الگوی الکتروفورزی DNAهای استخراج شده از ۲۶ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana* ۶۵

شکل ۴-۱: الگوی باندی حاصل از پرایمر ISSR840 ۹۶

شکل ۴-۲: دندروگرام حاصل از داده‌های ISSR برای جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* مورد مطالعه ۱۰۳

شکل ۴-۳: پلات تجزیه مؤلفه‌های اصلی پرایمرهای ISSR ۱۰۸

شکل ۴-۴: نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی داده‌های مولکولی پرایمرهای ISSR ۱۰۹

شکل ۴-۵: نمودار حاصل از بررسی همبستگی کوفنتیک دو ماتریس فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی پرایمرهای ISSR بر اساس نرم‌افزار NTSYS 2.02e ۱۱۰

**تعدادی از اختصارات به‌کار رفته در پایان‌نامه و نام کامل آنها**

| اختصار | نام کامل |
|---|---|
| **AFLP** | Amplified Fragment Length of Polymorphism |
| **CTAB** | Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide |
| **CV** | Coefficient Variance |
| **CDA** | Czapeck- Dox- Agar |
| **DF** | Degrees of Freedom |
| **GBM** | Galleria Bait Method |
| **LC50** | Letal Concentration 50 |
| **LT50** | Letal Time 50 |
| **MS** | Mean of Square |
| **PVP** | PolyVinylPyrrolidone |
| **PCR** | Polymerase Chain Reaction |
| **RAPD** | Random Amplified Polymorphic DNA |
| **RFLP** | Restriction Fragment Length of Polymorphism |
| **SDA+Y** | Sabroud-Dextrose-Agar + Yeast Extract |
| **SDS** | Sodium Dodecyl Sulfate |
| **SSR** | Simple Sequence Repeat |
| **TBE** | Tris Borate Ehtylen Di-amin Tetra Acetate |
| **YPD** | Yeast extract Peptone Glucose Broth |

# فصل اول

# مقدّمه و کلیات

## ۱-۱- کنترل زیستی[1]

آفات کشاورزی در تمام اکوسیستم‌های مختلف زراعی، باغی، جنگلی و مرتعی دارای دشمنان طبیعی متعددی هستند که با تغذیه از گونه‌های گیاهخوار سبب کاهش جمعیت آفات و تعادل طبیعت در اکوسیستم‌ها می‌شوند. این عوامل شامل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها)، شکارگرها و پارازیتوئیدها هستند. استفاده از موجودات زنده به منظور کنترل و تنظیم جمعیت حشرات آفت، بیمارگرهای گیاهی[2] و علف‌های هرز را کنترل زیستی گویند. در واقع کنترل زیستی یا مهار زیستی به بکارگیری عوامل زنده مفید علیه موجود زنده زیان‌آور گفته می‌شود. میلینگ این تکنیک را تحت عنوان "تغییرات محیط یا شیوه‌های موجود در حفاظت و افزایش دشمنان طبیعی برای کاهش اثرات آفات" توضیح داده است [میلینگ، ۲۰۰۷]. دشمنان طبیعی نقش مهمی را در محدود نمودن جمعیت آفات ایفاء می‌نمایند، هنگامی که از روش‌های کنترل غیرشیمیایی استفاده کنیم این موجودات مفید زنده مانده، جمعیت و خسارت گونه‌های آفت را کاهش می‌دهند [استونر، ۱۹۱۴].

بیشتر دشمنان طبیعی از حساسیت بالایی نسبت به آفت‌کش‌های شیمیایی برخوردارند و لذا استفاده از این مواد، موجب محدودیت کارایی دشمنان طبیعی خواهد شد [استونر، ۱۹۱۴]. کنترل زیستی به عنوان علمی کاربردی در رفع مشکلات استفاده طولانی مدت آفت‌کش‌های شیمیایی توصیف شده است و توجهات زیادی در کاربرد قارچ‌های بیماری‌زای حشرات بوجود آمده است. کاربرد قارچ‌های بیماری‌زای حشرات از جمله قارچ *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill سبب کنترل طیفی وسیعی از آفات شامل راسته‌های Coleoptera، Lepidoptera و Hymenoptera می‌شود که اکثر این حشرات آفات کشاورزی هستند [پادجاما و کوار، ۲۰۰۱]. از آنجا که مطالعات اندکی روی تنوع ژنتیکی قارچ *Beauveria* صورت گرفته است این تحقیق می‌تواند به توسعه حشره‌کش‌های قارچی کمک نموده و علاوه بر از بین بردن آفات مضر کشاورزی و افزایش محصولات، به حفاظت از محیط زیست

[1]. Biological Control
[2]. Plant Pathogens

نیز کمک نماید.

### ۱-۲- قارچ‌های بیماری‌زای حشرات [1]

یکی از عوامل کنترل زیستی، قارچ‌های بیماری‌زای حشرات هستند. قارچ‌های بیماری‌زای حشرات راه-حلی موثر و ایمن برای کنترل حشرات آفت محسوب می‌شوند. این قارچ‌های بیماری‌زا در سراسر سلسله قارچ‌ها پراکنده‌اند، برخی از آنها دامنه میزبانی محدود و برخی دیگر دامنه میزبانی وسیعی دارند. گونه‌های *Metarhizium anisopliae* (Metshn.) Sorokin, *Zoophthora radicans* Batko و *Fusarium sp.* Link, *B. bassiana* گونه‌های مختلفی از حشرات را در شرایط مزرعه و آزمایشگاهی آلوده می‌نمایند [علی و همکاران، ۲۰۱۰].

قارچ‌های بیماری‌زای حشرات در شاخه Ascomycota (قارچ‌های آسک‌دار)، Zygomycota (زیگوسپور[2]داران) و Deuteryomycota (قارچ‌های ناقص) قرار دارند و جنس‌های این قارچ‌ها به راسته Entomophthorales در Zygomycota و یا رده Hyphomycetes در Deuteromycota تعلق دارند که اعضای رده Hyphomycetes به‌طور معمول به عنوان قارچ‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب آلوده‌کننده بسیاری از گونه‌های حشرات در نظر گرفته می‌شوند [هامبر، ۲۰۱۱].

طبق روابط فیلوژنتیک، قارچ‌های مهم بیماری‌زای حشرات در شاخه‌های Ascomycota، Basidiomycota، Zygomycota و Chytridiomycota طبقه‌بندی می‌شوند [تاجیک و همکاران، ۲۰۰۹؛ سانگ و همکاران، ۲۰۰۷]. شایان ذکر است که بیشتر قارچ‌های بیماری‌زای حشرات توانایی تکثیر از طریق تولید مثل جنسی خود را از دست داده‌اند. تمام فرم‌های غیرجنسی (آنامورف[3]) قارچ-های بیماری‌زا، اسپور (کنیدی) و بعضی هم کلامیدوسپور (نوعی اسپور استراحت با دیواره ضخیم)

[1]. Entomopathogenic fungi
[2]. Zigospore
[3]. Anamorph

تولید می‌کنند. فرم جنسی اکثر گونه‌های قارچ‌های بیماری‌زا ناشناخته مانده‌اند، به همین خاطر در شبه رده Deuteromycetes یا قارچ‌های ناقص[1] طبقه‌بندی می‌شوند. احتمال دارد که بسیاری از گونه-های قارچ‌های ناقص شکل جنسی خود را در فرآیند تکامل از دست داده باشند و یا اینکه شکل جنسی آنها در طبیعت تشکیل نمی‌شود و یا به ندرت شکل می‌گیرد. به همین دلیل نمی‌توان این قارچ‌ها را در آرایه‌ی تاکسونومی قرار داد و لذا عنوان قارچ‌های ناقص را به خود گرفته‌اند [کیفر و مورِلت، ۱۹۹۹]. گونه‌های مختلف قارچ *Beauveria* به طور گسترده‌ای به صورت آنامورف در طبیعت پراکنده هستند و به عنوان یک مجموعه ناهمگن از جدایه‌ها گزارش شده است [ماگنای و همکاران، ۱۹۸۹]. در شاخه‌ی Sordariomycetes تنها جنس *Cordyceps* شکل جنسی دارد. از آنجا که جنس-هایی مانند *Beauveria* و *Metarhizium* و دیگر جنس‌ها در قارچ‌های بیماری‌زا، شکل جنسی برای آنها ناشناخته مانده است، شکل جنسی این قارچ‌ها را *Cordyceps* عنوان می‌کنند. جنس *Cordyceps* نزدیک به ۴۰۰ گونه دارد که همگی اندوپارازیت حشرات و دیگر بندپایان هستند. مطالعات مختلف به وضوح نشان داده است که فرم جنسی برخی از گونه‌های *Beauveria* در واقع *Cordyceps* است که این گونه‌ها شامل *Cordyceps bassiana* و *Cordyceps brongniartii* هستند [سانگ و همکاران، ۲۰۰۱]. قارچ‌های بیماری‌زای حشرات اغلب در طبیعت موجب بیماری حشرات می‌شوند و عامل مهم تنظیم‌کننده‌ی جمعیت حشرات هستند که طبیعت آن را در اختیار آدمی قرار داده است [تاجیک و همکاران، ۲۰۰۹]. بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زای حشرات برای جوانه‌زنی، آلودگی و اسپورزایی محدودیت دامنه دمایی و رطوبتی دارند. در بعضی موارد مرحله‌ی آلوده کننده به علت فقدان شرایط مناسب، قوی و موثر عمل نمی‌کند و پرامیدترین کاندیدای قارچی که مراحل جداسازی و آزمایشگاهی را گذرانده است برای کنترل آفات توانایی تولید و تشکیل فرم‌های مقاومت مانند اسپورهای استراحتی را ندارد و کاربرد خود را در شرایط محیطی از دست می‌دهد [جارونسکی، ۲۰۱۰].

[1]. Imperfect Fungi

در جدول ۱-۱ به راسته‌های قارچی پارازیت و اعضای خانواده هیفومیست اشاره شده است. تاکنون بیش از ۹۰ جنس و ۷۰۰ گونه متعلق به قارچ‌های بیماری‌زای حشرات گزارش شده است [خان و همکاران، ۲۰۱۲] که تمام گونه‌های قارچ‌های بیماری‌زا بر روی حشرات مهم از منظر اقتصادی نظیر شته‌ها، سفیده کلم، شب‌پره‌های خانواده Noctuidae، راست‌بالان[1] و دوبالان به‌صورت انگل عمل می-نمایند و لذا قارچ‌های موسکاردین (قارچ‌های ناقصی مانند *Beauveria*، *Metarhizium*، *Paecilomyces* و *Sorosporella*) برای تولید حشره‌کش‌های زیستی مناسب هستند [باتکو، ۱۹۷۴].

جدول۱-۱: راسته‌های مهم و پارازیت‌های قارچی نکروتروف که به حشرات حمله می‌کنند [بنجامین، ۲۰۰۱] .

**Chytridiomycota**
Chytridiomycets
Blastocladiales- *Coelomomyces*
**Zygomycota**
Zygomycetes
**Entomophthorales**
Entomophthoraceae- *Entomophaga, Entomophthora, Erynia, Furia, Massospora, Pandora, Zoophthora*
Neozygitaceae- *Neozygites*
Ancylistaceae- *Conidiobolus*
**Ascomycota**
Pyrenomycetes
**Hypocreales**
Clavicipitaceae- *Cordyceps, Cordycepioideus, Ophiocordyceps, Torrubiella, Nomurea, Gibellula, Pseudogibellula, Akanthomycese, Hymenositlbe, Hirsutella, Paraisaria*
Hypocrealean anamorphs- *Aschersonia, Beauveria, Fusarium, Hirsutella, Metarhizium, Nomuraea, Isariae, Tolypocladium, Lecanicillium.*
Loculoascomycotes
Myriangiales
Myriangiaceae- *Myriangium*
Pleosporales
Tubeufiaceae- *Podonecteia*
Unclassified anamorph- *Entoderma*
**Oomycota**
Lagenidiales
Lagenidiaceae- *Lagenidium*

[1]. Orthopthera

در دهه ۱۹۶۰ و پس از آشکار شدن آثار سوء سموم شیمیایی، علاقه‌مندی برای استفاده از قارچ‌های بیماری‌زای حشرات برای کنترل آفات شکل گرفت. در حال حاضر بیشتر حشره‌کش‌های زیستی که بر اساس قارچ‌های بیماری‌زای حشرات تولید شده‌اند و در بازار موجود می‌باشند شامل قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* می‌باشد [رِدی و همکاران، ۲۰۰۱].

قارچ‌های بیماری‌زا به دلیل ظرفیت بالا در زمینه‌ی کنترل زیستی آفات، همواره توجه دانشمندان را به خود جلب کرده‌اند و تحقیقات زیادی بر روی انتخاب نژادهای عوامل بیماری‌زا برای آفات هدف و نشو و نمای آنها به عنوان عوامل کنترل زیستی در حال انجام است [میلینگ، ۲۰۰۸]. استفاده‌ی موفقیت-آمیز از قارچ‌های بیماری‌زا به عنوان عوامل کنترل میکروبی در نهایت بستگی به استعمال آنها در یک غلظت و زمان مناسب دارد. زمان مناسب و صحیح استعمال نیز به وجود مراحل حساس میزبان، شرایط محیطی مناسب و زمان‌بندی سازگار با دیگر عملیات کشت و کار یا کنترلی نظیر آبیاری، اجتناب از استعمال قارچ‌کش‌ها و غیره وابسته است. بهینه‌سازی بیشتر در فعالیت کنترل میکروبی توسط قارچ‌های بیماری‌زا را می‌توان به واسطه‌ی ترکیب آنها با دیگر فناوری‌ها، استفاده‌ی توأم با دیگر عوامل کنترل زیستی، مدیریت محیط برای بهبود فرآیند آلودگی و همچنین استفاده از آفات هدف برای انتشار قارچ‌ها، ارتقاء داد [اِلیسی، ۲۰۰۱].

### ۱-۳- قارچ بیماری‌زای حشرات *B. bassiana*

در این پایان نامه از بین قارچ‌های بیماری‌زای حشرات صرفاً به قارچ *B. bassiana* پرداخته خواهد شد. در ادامه به تفصیل در خصوص قدمت و اهمیت قارچ، شکل‌شناسی قارچ، طیف میزبانی، ژنوم و ساختار سلولی قارچ *B. bassiana*، توضیح داده خواهد شد.

### ۱-۳-۱- قدمت و اهمیت قارچ

منشأ کنترل میکروبی آفات به اوایل قرن نهم میلادی باز می‌گردد. زمانی‌که دانشمند ایتالیایی آگوستینو باسی[۱] پس از ۳۰ سال مطالعه و تحقیق روی بیماری موسکاردین[۲] سفید در کرم ابریشم (*Bombyx mori* Linnaeus) تشخیص داد که قارچ بیماری‌زای *B. bassiana* عامل این بیماری است. بنابر عقیده‌ی آنیس ورس[۳] (۱۹۵۶)، وان دریش و بلو[۴] (۱۹۹۶) و پورتر[۵] (۱۹۷۳)، کشف باسی نه تنها بنیان کنترل میکروبی آفات را پایه‌ریزی کرد بلکه به طور قابل توجهی کارهای لویی پاستور[۶]، روبرت کخ[۷] و دیگر افراد پیش‌گام در زمینه‌ی میکروبیولوژی را تحت تأثیر قرار داد [لِنگل، ۲۰۰۶]. جنس *Beauveria* در سال ۱۹۱۲ توسط ویلمین[۸] شرح داده شد. بررسی‌های بیشتر بر روی مورفولوژی و تاکسونومی این جنس توسط بنهام و میراندا[۹] در سال ۱۹۵۳ و مک لئود[۱۰] در سال ۱۹۵۴ انجام شد و در اوایل قرن بیستم میلادی کارهای مزرعه‌ای با استفاده از قارچ‌های بیماری‌زای حشرات *B. bassiana*، *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch و *M. anisopliae* صورت گرفت. امروزه با گذشت بیش از ۱۰۰ سال هیچ گزارشی از اثرات مخرب و مضری که بتواند مانع استفاده از این ارگانیسم‌ها شود، ثبت نشده است. قارچ *B. bassiana* جزو بیمارگرهای مشهوری است که به دلیل دامنه میزبانی وسیع به عنوان یک آفتکش زیستی مورد توجه قرار گرفته است [وِیسیم و همکاران، ۲۰۰۴]. این قارچ به طور طبیعی در خاک رشد می‌کند و به عنوان یک انگل در گونه‌های مختلف بندپایان ایجاد بیماری می‌کند. بنابراین قارچ *B.bassiana* را جزء قارچ‌های بیماری‌زای حشرات دانسته‌اند و امروزه به عنوان یک حشره‌کش زیستی برای کنترل تعدادی از آفات از جمله موریانه، مگس سفید، شته، تریپس، سوسک-

1. Agostino Bassi
2. Muscardine
3. Anisworth
4. Van Driesche and Bellows
5. Porter
6. Louis Pasteur
7. Robert Koch
8. Vuillemin
9. Benham And Miranda
10. Macleod

های مختلف و بسیاری دیگر از حشرات استفاده می‌شود [بربریان، ۲۰۱۲]. ضمن اینکه جدایه‌های مختلف آن دامنه میزبانی و بیماری‌زایی بسیار متفاوتی دارند [طلائی حسن‌لویی و همکاران، ۲۰۰۶]. طبق بررسی‌های انجام شده قارچ *B. bassiana* از بیش از ۱۰۰ حشره‌ی آفت جداسازی شده است و آن را یک قارچ خاک‌زی رایج معرفی کرده‌اند [بیدوکا[1] و همکاران، ۲۰۰۲].

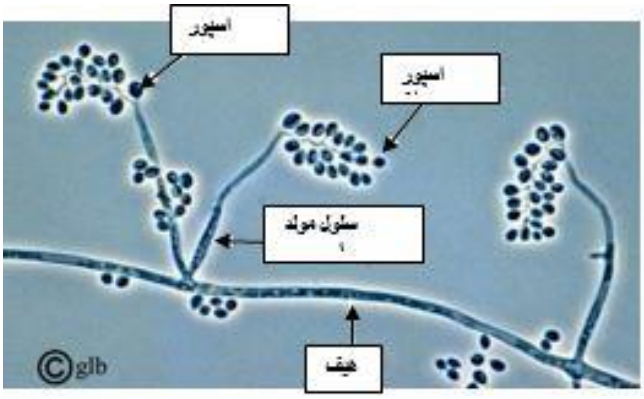
### ۱-۳-۲- شکل‌شناسی قارچ

قارچ *B. bassiana* روی سطح محیط کشت، پشم مانند، کرک‌دار و پودری به نظر می‌رسد. رشته‌های میسلیومی استوانه‌ای، بی‌رنگ و دارای دیواره‌ی عرضی می‌باشند. قطر کلنی‌ها در مدت ۸ روز و در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به ۲/۳-۰/۶ سانتی‌متر می‌رسد. رنگ کلنی ابتدا سفید بوده سپس به رنگ زرد کم‌رنگ در می‌آید. کنیدی‌برها[2] منفرد بوده و به صورت منظم دور هم جمع می‌شوند. در تعدادی از گونه‌های این قارچ کنیدی‌بر متورم بوده و به طرف انتها باریک و حامل کنیدی[3] می‌باشد [آنونیموس، ۱۹۸۰]. اندازه‌ی کنیدی در این قارچ ۱/۵ تا ۳/۵ میکرومتر بوده و کنیدی‌های این قارچ شفاف، گرد تا تخم‌مرغی شکل، یک سلولی و به صورت انفرادی بر روی زواید کوچکی تشکیل می‌شوند [میناسیان و علیزاده، ۱۳۶۸].

قارچ *B. bassiana* قادر است سه نوع اسپور تولید نماید. این سه نوع عبارتند از: کنیدی‌های هوایی، بلاستوسپورها[4] و کنیدی‌های غوطه‌ور. کنیدی‌های هوایی روی لاشه حشرات و محیط‌های کشت جامد تولید می‌شوند. اندام‌های هیفی تک سلولی با دیواره‌ی نازک بلاستوسپور نامیده می‌شوند که از کنیدی بزرگ‌تر بوده و دارای دیواره‌ی نرم می‌باشند. سرعت تندش بلاستوسپور نسبت به دو نوع اسپور دیگر

[1]. Bidochka
[2]. Conidiophores
[3]. Conidium
[4]. Blastospores

سریع‌تر بوده و در عرض ۶-۵ ساعت ۵۰ درصد آنها جوانه می‌زنند [توماس و همکاران، ۱۹۸۷؛ پچاموتو و کمبل، ۲۰۰۰]. نوع محیط کشت، نور و pH آن ممکن است اثراتی روی رنگی شدن[1] میسلیوم قارچ *B. bassiana* داشته باشد [مک‌لئود، ۱۹۵۴]. این قارچ یک بیمارگر اختیاری است که می‌تواند در مراحل ساپروفیتی و پاتوژنی زنده بماند. هوازی و هم خاک‌زی می‌باشد و روی بقایای گیاهی و مواد آلی در مزرعه همانند پوسته‌ی برنج و تراشه‌ی چوب‌های جنگلی یا درون لاشه‌های میزبان زنده می‌ماند [تاندا و کایا، ۱۹۹۳].




شکل ۱-۱: شکل شماتیک از قارچ *B. bassiana* (اقتباس از www.uoguelph.ca)

### ۱-۳-۳- دامنه میزبانی

قارچ‌های بیماری‌زای حشرات در اکوسیستم گسترش وسیعی دارند. در این راستا گونه‌های راسته‌ی Entomophthorales به طور معمول، برای آلوده‌سازی میزبان‌های بندپا استفاده شده‌اند [میلینگ، ۲۰۰۸]. در سال ۱۹۴۹ تحقیقی توسط استین هاوس[2] بر روی قارچ بیماری‌زای *B. bassiana* انجام شد که مشخص نمود این قارچ دامنه گسترده‌ای از میزبان‌ها را که حداقل ۱۰ راسته و ۴۰ خانواده از حشرات را شامل می‌شوند، آلوده می‌کند. چندی بعد بارون[3] در سال ۱۹۶۵ قارچ *Beauveria* را برای

[1]. Pigmentation
[2]. Steinhaus
[3]. Baron

کنترل زیستی حشرات آفت پیشنهاد داد [استین هاوس، ۱۹۴۹].

به طور عمده میزبان‌ها از راسته‌های بالپولکداران، سخت‌بالپوشان و ناجوربالان بوده، ولی در راسته‌های دوبالان و بال‌غشائیان نیز میزبان‌هایی برای این قارچ بیماری‌زای حشرات وجود دارند. از جمله مهم-ترین آفات از نظر اقتصادی که به این قارچ حساس هستند می‌توان به *Ostrinia nubilalis* Hubner, *Cydia pomonella* Linnaeus, *Popillia japonica* Newman, *Pieris brassicae* Linnaeus, *Leptinotarsa desemlineta* Say و *Blissus leucopterus* Say اشاره کرد. لاتردال در سال ۱۹۷۰ میزبان‌های قارچ *B. bassiana* را از ۱۰۶ گونه از حشرات معرفی کرد [لاتردال، ۱۹۷۰]. این لیست از میزبان‌ها در جدول ۱-۲ آمده است.

جدول۱-۲: گزارش لاتردال از میزبان‌های قارچ *B. bassiana*

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

اگر چه بیماری‌زایی قارچ *B. bassiana* بر روی گونه‌های زیادی از حشرات گزارش شده است اما جدایه‌های این قارچ از درجه‌ی تخصص بالایی برخوردار هستند. این تخصص میزبانی ممکن است با خصوصیات فیزیولوژیک بدن میزبان، خواص کوتیکول حشره، نیازهای غذایی قارچ و دفاع سلولی میزبان ارتباط داشته باشد [تاندا و کایا، ۱۹۹۳].

### ۱-۳-۴- ژنوم و ساختار سلولی

ژنوم یوکاریوت‌ها از اندازه‌ای بین ۱۰Mbp تا ۳ Gbp برخوردار است و در میان این موجودات، قارچ‌ها به ویژه مخمرها دارای کوچکترین اندازه ژنوم هستند (۱۰-۵۰ Mbp) و توالی‌یابی اولین قارچ در ۱۹۹۶صورت پذیرفت [گالاگان و همکاران، ۲۰۱۳]. مبداء ژنومیکس قارچ‌ها با توالی‌یابی کامل ژنوم مخمر *Saccharomyces cerevisiae* Meyen and Hansen آغاز شد و طبق گفته گالاگان (۲۰۱۳) در حال حاضر ژنوم بیش از ۴۰ قارچ به‌طور کامل توالی‌یابی شده است [گالاگان و همکاران، ۲۰۱۳]. اکنون با استفاده از تکنیک‌های مولکولی مختلف، مشخص شده است که ژنوم قارچ‌های بیماری‌زای حشرات از اندازه‌ای بین ۳۰-۴۰Mbp برخوردار هستند. تعداد کروموزوم و اندازه ژنوم برای چندین جدایه‌ی متفاوت *B. bassiana* تعیین شده است. فایفر و خاچاتوریان (۱۹۹۳) با استفاده از الکتروفورز کاریوتیپ، تعداد کروموزوم را ۸ و اندازه ژنوم را ۴۰/۶ مگاباز تخمین زدند [فایفر و خاجاتوریان، ۱۹۹۳]. این نتیجه با نتایج ویاد و همکاران (۱۹۹۶) که با الکتروفورز کاریوتیپ تعداد کروموزوم قارچ *B. bassiana* را بین ۷ تا ۸ عدد تخمین زدند منطبق بود. آنها اظهار داشتند که این عدد بسته به جدایه‌ی مورد مطالعه دارد. در این مطالعه که بر روی ۷ جدایه متفاوت *B. bassiana* انجام گرفت، اندازه‌ی هر کروموزوم بین ۱ تا ۷/۷ مگاباز بود و اندازه کل ژنوم بین ۳۴/۱ تا ۴۴/۱ مگاباز گزارش شد [ویاد و همکاران، ۱۹۹۶].

ژنوم قارچ شامل اسید نوکلئیک داخل هسته و DNA میتوکندریایی است. هر چند ممکن است که قارچ‌ها دارای عناصر کروموزومی اضافی مانند پلاسمید و RNA دو رشته‌ای باشند که در ایجاد چند-شکلی‌های بین‌گونه‌ای نقش دارند [استوک، ۲۰۰۹]. اولین بار ملزر و بیدوکا (۱۹۹۸) از وجود RNA دو رشته‌ای در ژنوم *Beauveria* خبر دادند. آنها با بررسی که بر روی ۱۲ جدایه مختلف قارچ بیماری-زای *B. bassiana* انجام دادند، مشخص نمودند که ۲ جدایه از ۱۲ جدایه دارای دو الگوی باندی متفاوتی هستند که اندازه یکی ۳ و دیگری ۲ کیلوباز بود. با توجه به شواهد بدست آمده و تصاویر میکروسکوپ الکترونی که گویای حضور ذرات شبه ویروسی در *Beauveria* بود، از آلوده شدن این قارچ توسط مایکوویروس‌ها خبر دادند [ملزر و بیدوکا، ۱۹۹۸].

### ۱-۴- تنوع ژنتیکی و اهمیت آن

اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی، اساسی‌ترین جنبه تمام علوم زیستی از قبیل اکولوژیکی، زیست شناسی تکاملی، رده‌بندی، زراعت، اصلاح و حفظ نباتات گیاهی به شمار می‌رود. تنوع ژنتیکی شامل تمام اختلافات ژنتیکی در گیاهان، حیوانات، قارچ‌ها و میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. امروزه تنوع ژنتیکی مبنای همه گزینش‌هاست. در سال‌های اخیر تکنیک‌های زیادی جهت مطالعه تنوع ژنتیکی بوجود آمده است که به درک مولکولی پایه پدیده‌های بیولوژیکی مختلف منجر می‌شود. برای تعیین تنوع ژنتیکی در کشورهای آسیایی و اروپایی از نشانگرهای ریزماهواره‌ای استفاده شده است [فرید و همکاران، ۲۰۱۱]. در موسسه تحقیقات بین المللی کشاورزی چین بیش از هزار جدایه از قارچ‌های بیماری‌زای حشرات جمع‌آوری شده است که برای مطالعه تنوع ژنتیکی موجود در آن‌ها از نشانگرهای ریزماهواره‌ای استفاده شده است. به عنوان مثال ISSR از جمله نشانگرهای مولکولی مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات است که در میان جدایه‌های قارچی به سبب تنوع تعداد تکرارها

و قابلیت تکثیر زیاد، چندشکلی بیشتری نشان می‌دهد که امکان سنجش و مقایسه تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها و گونه‌های قارچ را فراهم می‌آورد [ولاسکوئز و همکاران، ۲۰۰۷].

تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی (مورفولوژیکی و مولکولی) ارزیابی می گردد. پس می-توان گفت که نشانگرها به عنوان یکی از ابزارهای موثر در بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشند.

### ۱-۵- نشانگرها و انواع آن

هر صفتی که بین افراد متفاوت باشد، ناشی از تفاوت موجود بین ردیف DNA کروموزوم‌های آنهاست که به نتاج نیز منتقل می‌شود. حتی صفاتی که تحت تأثیر شرایط محیط نیز به صورت متفاوت بروز می‌کنند، بازتاب تفاوت‌های موجود در ردیف‌های DNA هستند. این تفاوت‌ها می‌توانند به عنوان نشانه یا نشانگر ژنتیک بکار گرفته شوند. استفاده از نشانگرهای ژنتیکی، قدمتی برابر با تاریخ بشر دارد. انسان‌های نخستین، حتی آن‌هایی که هنوز کشاورزی را فرا نگرفته بودند و برای ادامه زندگی مجبور به جمع‌آوری بذر و میوه گیاهان بودند، بدون آنکه خود بدانند از نشانگرهای مورفولوژیک برای شناختن و تمایز انواع بذر، میوه و جانوران وحشی استفاده کرده و برخی را بر برخی دیگر ترجیح می-دادند. اما به‌صورت علمی، شاید مندل نخستین کسی بود که از نشانگرهای مورفولوژیک یا نشانگرهای مبتنی بر فنوتیپ[1] برای مطالعه چگونگی توارث صفات در نخود فرنگی استفاده کرد [نقوی و همکاران، ۱۳۸۷].

[1]. Phenotype Based Markers

### ۱-۵-۱- نشانگرهای مورفولوژیک

برخی از تفاوت‌های موجود در توالی DNA در صفات ظاهری و قابل رویت تجلی پیدا می‌کنند که نشانگر مورفولوژیک نامیده می شوند. خصوصیات مورفولوژیکی از جمله اولین نشانگرهای ژنتیکی مورد استفاده در ارزیابی تنوع بین و میان جمعیت‌ها به شمار می‌آید. آن دسته از صفات مورفولوژیکی که تنها به وسیله یک مکان ژنتیکی کنترل می‌شوند ممکن است به عنوان نشانگرهای ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند، زیرا تظاهر این دسته از صفات حتی در شرایط محیطی متفاوت نیز نسبتا ثابت است [کومار و بنتزن، ۱۹۹۹]. ارزیابی این صفات معمولا کم‌هزینه و آسان است اما عوامل متعددی با نشانگرهای مورفولوژیکی مرتبط هستند. اولین عامل وابستگی بالای این صفات به شرایط محیطی و مرحله رشدی موجود است. همچنین دارای آثار اپیستازی و پلیوتروپی هستند که سبب تغییر تظاهر نشانگرهای مورفولوژیک می‌شوند. اساس ژنتیکی بسیاری از نشانگرهای مورفولوژیک هنوز مشخص نشده است و گاهی برای مشاهده و ثبت آنها باید منتظر ظهور آنها ماند. در مجموع درصورتیکه این صفات از توارث‌پذیری بالایی برخوردار باشند نشانگرهای مورفولوژیکی یکی از گزینه‌های مناسب در مطالعات تنوع ژنتیکی به شمار می‌آید، زیرا توارث این صفات می‌تواند بدون نیاز به روش‌ها و تکنیک-های پیشرفته مانند تکنیک‌های بیوشیمیایی و مولکولی ارزیابی شود [نقوی و همکاران، ۱۳۸۷].

### ۱-۵-۲- نشانگرهای پروتئینی

نشانگرهای پروتئینی محصول نهایی ژن‌های ساختاری می‌باشند و در واقع بازتابی از تنوع موجود در سطح ردیف بازی ژنوم هستند. آلل‌های گوناگون ژن‌ها ممکن است پروتئین‌هایی با ترکیبات اسیدآمینه‌ای مختلف تولید کنند که به راحتی از طریق الکتروفورز روی ژل از یکدیگر جدا شده و شناسایی می‌شوند و بنابراین می‌توان به عنوان نشانگر ژنتیکی از آنها استفاده کرد. از آنجایی که

محصولات از روی قسمتی از توالی DNA ساخته می‌شوند، لذا در برگیرنده همه تغییرات در تنوع ژنتیکی در سطح DNA نیستند و نمی‌توانند نماینده کل ژنوم باشند [گروسی و وجدانی، ۱۳۷۱].

معمول‌ترین نشانگرهای پروتئینی، آیزوزایم‌ها هستند که فرم‌های مختلف یک آنزیم را نشان می‌دهند. نشانگرهای پروتئین، تفاوت‌ها را در سطح ردیف و عمل ژن و به صورت نشانگرهای هم‌بارز نشان می‌دهند. از معایب این نشانگرها محدود بودن آنهاست. همچنین این نشانگرها تحت تاثیر تغییرات پس از ترجمه بوده و برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها تحت تاثیر مرحله رشدی، تظاهر کمی بروز می‌دهند. از آنجا که فراوانی این نوع از نشانگرها محدود است، از این‌رو نقشه‌های تهیه شده از این نشانگرها طوری بوده که فقط چند نشانگر در یک کروموزوم قرار می‌گیرند. بنابراین نشانگرهای پروتئینی نیز معایب ویژه خود را دارند. با توجه به اینکه روش‌های رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها در مورد آیزوزایم‌ها چندان زیاد نیست، آیزوزایم‌های قابل ثبت و مشاهده که می‌توان از آنها به عنوان نشانگر استفاده کرد، به یک‌صد عدد هم نمی‌رسد. محدودیت در تعداد نشانگرهای آیزوزایم، از عمده‌ترین معایب آنها بوده و موجب کاهش کارایی آنها می‌شود. از نکات منفی دیگر این نشانگرها، محدودیت تنوع ژنتیکی قابل ثبت در آیزوزایم‌هاست. به عبارت دیگر، آیزوزایم‌ها نه تنها کم هستند، بلکه چندشکلی و تفاوت قابل ثبت در آنها چندان زیاد نیست. پیچیدگی فنوتیپ‌های الکتروفورزی آیزوزایم‌ها نیز که گاهی مشاهده شده است، از دیگر معایب این قبیل نشانگرهاست. این پیچیدگی که به دلیل دخیل بودن آنزیم‌های مرکب از چند پلی‌پپتید مستقل، در ترکیب برخی از آیزوزایم‌هاست، امتیازبندی را دشوار می‌کند [دشتی، ۱۳۷۹].

### ۱-۵-۳- نشانگرهای مولکولی[1]

کشف انواع آنزیم‌های محدودالاثر توسط اسمیت و ویلکاکس (۱۹۷۰)، همچنین کشف واکنش زنجیره-ای پلیمراز (PCR) توسط مولیس و فالونا (۱۹۸۷) فرصت مناسبی را برای بررسی تنوع و تفاوت موجودات مختلف در سطح DNA امکان پذیر کرده است. توسعه نشانگرهای مولکولی DNA عصر جدیدی را در علم ژنتیک گشوده است، بطوریکه به کمک این نشانگرها ایجاد نقشه‌های فیزیکی و ژنتیکی در موجودات زنده و همچنین شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و کیفی امکان‌پذیر شده است [نقوی و همکاران، ۱۳۸۷]. نشانگرهای مولکولی مکان‌های خاصی در DNA هستند که توارث موجود در سطح ژنوم را آشکار می‌کنند. این نشانگرها ممکن است با ژن یا ژن‌های کنترل‌کننده صفات، پیوسته یا ناپیوسته باشند [آگراوال و وانگ، ۲۰۰۸].

نشانگرهای مولکولی نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی چندین مزیت دارند. آن‌ها پایدارند و به سن، بافت و مرحله رشدی موجود وابسته نیستند، تمام قسمت‌های ژنوم را پوشش می‌دهند (اگزون‌ها، اینترون‌ها و نواحی تنظیم‌کننده)، همچنین تحت تاثیر محیط، اثرات غالبیت، اپیستازی و پلیوتروپی قرار نمی‌گیرند. تاکنون تعداد زیادی از نشانگرهای مولکولی معرفی شده‌اند و در تجزیه‌های ژنتیکی موجودات مورد استفاده قرار گرفته‌اند، این نشانگرها از نظر بسیاری از ویژگی‌ها مانند درجه چند-شکلی، غالب یا هم‌بارز بودن، تعداد جایگاه‌های تجزیه شده در آزمایش، توزیع در سطح کروموزوم، تکرارپذیری، نیاز یا عدم نیاز به توالی‌یابی DNA و هزینه مورد نیاز از یکدیگر متفاوت‌اند. انتخاب بهترین نشانگر به هدف مطالعه (انگشت‌نگاری، تهیه‌ی نقشه‌ی پیوستگی، ژنتیک جمعیت و روابط تکاملی) و سطح پلوئیدی موجود مورد مطالعه بستگی دارد [نقوی و همکاران، ۱۳۸۷].

[1]. Molecular Markers

نشانگرهای مولکولی بر اساس آشکارسازی چندشکلی موجود در بین اسیدهای نوکلئیک افراد مختلف عمل می‌کنند. این تفاوت‌ها شامل پدیده‌های حذف، اضافه، جابجایی، دو برابر شدن و جهش‌های نقطه‌ای است و تنها ژن‌های خاص و فعال را شامل نمی‌شود [آگراوال و وانگ، ۲۰۰۸].

روش‌های مختلف مورد استفاده، شامل هضم و هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک، روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و یا ترکیبی از این دو روش هستند. به علاوه روش‌های مختلف نشانگری می‌توانند یک یا چند مکان ژنومی را مورد بررسی قرار دهند. بطوریکه نشانگرهای چندمکانی قادرند به طور همزمان چندین مکان ژنومی را مورد ارزیابی قرار دهند. بنابراین، امکان تشخیص حضور یا عدم حضور باند برای هر مکان وجود دارد ولی امکان تشخیص حالت‌های هتروزیگوت برای آلل‌های مشابه وجود ندارد. درحالیکه نشانگرهای یک‌مکانی از کاوشگرها یا پرایمرهای ویژه برای مکان‌های ژنی استفاده می‌کنند و قادر به تکثیر یا دورگ‌گیری DNA با توالی‌های شناخته شده هستند. این نشانگر-ها را نشانگرهای هم‌بارز می‌نامند که امکان تشخیص مکان‌های هموزیگوت و هتروزیگوت را از یکدیگر می‌دهند [ماندینی و همکاران، ۲۰۰۹].

بدون تردید، ابداع و معرفی واکنش زنجیره ای پلیمراز یا PCR بیشترین نقش را در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA داشته است. PCR یک روش سریع تکثیر آزمایشگاهی قطعه یا قطعه‌های مورد نظر DNA است [قره‌یاضی، ۱۳۷۵؛ فویست و همکاران، ۱۹۹۰]. به دلیل اهمیت و نقش موثر PCR در تحول و تکامل روزافزون فناوری نشانگرهای DNA، محققین نشانگرهای DNA را به دو دسته کلی نشانگرهای DNA غیرمبتنی بر PCR یا روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون و نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR تقسیم نمودند.

### الف. نشانگرهای DNA غیرمبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

این دسته از نشانگرهای DNA بدون استفاده از PCR تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرند. سرگروه

این دسته از نشانگرها همان تفاوت طول قطعه‌های حاصل از DNA توسط آنزیم‌های محدودالاثر است که RFLP[1] نامیده می‌شود. این نشانگرها اولین نشانگرهایی بودند که برای نقشه‌یابی ژنوم انسان توسط بوتستین و همکاران (۱۹۸۰) و پس از آن برای نقشه‌یابی ژنوم گیاهان توسط بر و همکاران (۱۹۸۳) مورد استفاده قرار گرفته‌اند. البته روش RFLP اولین بار توسط گرودزیکر و همکاران (۱۹۷۴) به منظور بررسی نژادهای جهش‌یافته آدنوویروس مورد استفاده قرار گرفت. ولی در سال ۱۹۸۰ بوتستین و همکاران دریافتند که RFLP الزاماً مختص ژن‌های خاص نیست، بلکه در کل ژنوم پراکنده است. از این رو، این پژوهشگران طرحی را ارائه دادند که در آن از نشانگرهای RFLP برای نقشه‌یابی تمام ژن-ها در ژنوم انسان استفاده می‌شد. نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر PCR دارای چندشکلی نسبتا زیادی می‌باشند، توارث هم‌بارز داشته و تکرارپذیری بالایی نشان می‌دهند. با این وجود به دلیل وقت-گیر بودن، نیاز به مواد رادیواکتیویته‌ی گران‌قیمت و سمی و نیاز به DNA با کیفیت بالا بطور وسیع مورد استفاده واقع نمی‌شوند. این محدودیت‌ها سبب شده است که روش‌هایی با پیچیدگی کمتر مانند نشانگرهای مبتنی بر PCR توسعه یابند [ماندینی و همکاران، ۲۰۰۹].

**ب. نشانگرهای DNA مبتنی بر واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR)**

این نشانگرها شامل نشانگرهایی هستند که با بهره‌گیری از PCR در آنها، نیاز به کاوشگر و در نتیجه دورگ‌گیری حذف می‌شود. این گروه از نشانگرها، از توالی الیگونوکلئوتیدی به عنوان پرایمر برای تکثیر قطعه ای خاص از DNA استفاده می‌کنند. نشانگرهای زیادی در این گروه قرار می‌گیرند، RAPD، DAF، AFLP، SSR، STS، SCAR و ISSR نمونه‌هایی از این نشانگرها هستند که در این پایان نامه، از نشانگر بین ریزماهواره‌ای ISSR استفاده می‌کنیم و به همین خاطر در ادامه فقط به توضیح این نشانگر می‌پردازیم.

[1]. Restriction Fragment Length of Polymorphism

**۱-۵-۴- نشانگر ISSR**

بخش اعظمی از ژنوم یوکاریوت‌ها شامل انواع متنوعی از DNA تکرار شونده است. زیرمجموعه‌ای از این توالی‌های تکرار شونده، حاوی تکرارهایی با موتیف‌های بسیار کوتاه (۶-۱ جفت باز) را معمولاً ریزماهواره‌ها، توالی‌های تکراری ساده (SSR) یا توالی‌های کوتاه تکراری (STR) نیز می‌نامند که در ژنوم بیشتر پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها وجود دارند. ریزماهواره‌ها از جمله نشانگرهای ژنتیکی هستند که بسیار متنوع بوده و تقریباً از پراکنش یکسانی در طول ژنوم برخوردارند. نشانگرهای ریزماهواره به دلیل پوشش مناسب ژنومی و تکرارپذیری بالا یکی از بهترین و کامل‌ترین ابزارهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی به شمار می‌روند. این توالی‌ها عموما از چندشکلی بالایی برخوردارند و در نواحی کدکننده و غیر کدکننده ژنوم موجودات مختلف وجود دارند. از آنجایی که مکان ژنی یک ریزماهواره خاص، ژنوم بوده و توالی‌های مجاور آن در گونه‌های خویشاوند حفظ شده است، می توان از پرایمرهای ایجاد شده برای یک گونه به منظور تکثیر ریزماهواره‌ها در سایر گونه‌های خویشاوند استفاده کرد. با توجه به این خصوصیات، این نشانگرها اهمیت بالایی در مطالعه ژنتیک جمعیت دارند [نقوی و همکاران، ۲۰۰۵].

ریزماهواره‌ها به علت ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله محتوای اطلاعات چند شکلی بالا، ماهیت چند آللی و توزیع تصادفی در ژنوم مورد استقبال فراوان محققین قرار گرفته‌اند [آندایا و همکاران، ۱۹۹۶]. مهم‌ترین کاربرد نشانگرهای ریزماهواره مطالعه تنوع ژنتیکی، مطالعه فیلوژنی، تهیه نقشه ژنتیکی، همسانه‌سازی ژن‌ها، پژوهش‌های اکولوژیک و تکامل جمعیت‌ها، انتخاب به کمک نشانگرها، خالص‌سازی مواد ژنتیکی و انجام مطالعات سیتوژنتیکی است. استفاده از ریزماهواره‌ها در مطالعات روابط خویشاوندی، تمایز ژنوتیپ‌ها و نقشه‌یابی ژنتیکی توسط محققان مختلف گزارش شده است [فولاد و همکاران، ۱۹۹۵؛ لمبرت و همکاران، ۲۰۰۴].

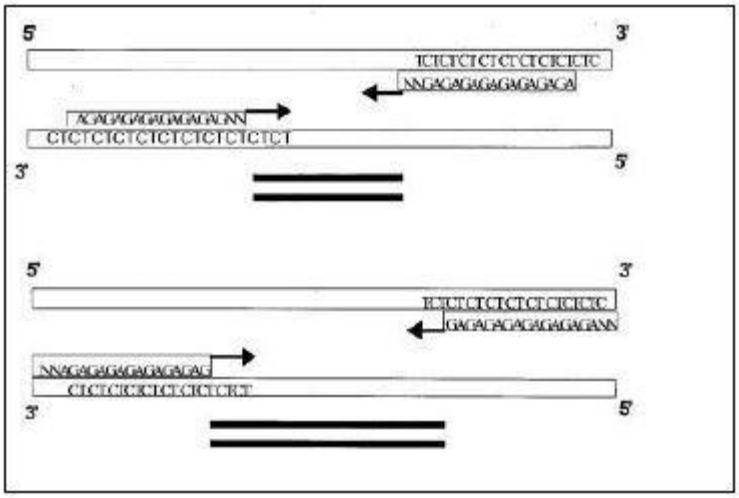
فراوانی ریزماهواره‌ها در ژنوم، سطح بالای تنوع آللی در جایگاه‌های ریزماهواره‌ای، سهولت بکارگیری این نشانگرها، قابل اعتماد و کم هزینه بودن آنها را از سایر نشانگرهای ژنتیکی متمایز ساخته است [اُوِسنا و همکاران، ۲۰۰۲].

نشانگرهای ISSR یک روش مبتنی بر PCR است که شامل تکثیر یک قطعه DNA در فاصله قابل تکثیرپذیر میان دو ناحیه تکراری ریزماهواره با جهات مخالف می‌باشد. تکرارهای ریزماهواره مورد استفاده به عنوان پرایمر، می‌توانند دو، سه، چهار یا پنج نوکلئوتیدی باشند. پرایمرهای مورد استفاده می‌توانند به هر نقطه‌ای از DNA متصل شوند اگرچه معمولا در انتهای ´۳ یا ´۵ خود به یک تا چهار باز متصل بوده و بر اساس آنها، گسترش می‌یابند [زیتکوویچ و همکاران، ۱۹۹۴؛ وانگ و همکاران، ۲۰۰۳].

ISSR-PCR روشی آسان و سریع است و اغلب مزایای ریزماهواره‌ها (SSR) و تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) را با عمومیت DNA چندشکل تکثیر شده تصادفی (RAPD) در هم می-آمیزد. نشانگرهای ISSR بسیار چندشکل هستند و در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، نشاندارکردن ژنی، نقشه‌یابی ژنومی و زیست‌شناسی تکاملی سودمند هستند [رِدی و همکاران، ۲۰۰۰].

امروزه نشانگرهای ISSR مبتنی بر PCR با استفاده از پرایمرهای مبتنی بر تکرارهای دی نوکلئوتید، تری نوکلئوتید، تترا نوکلئوتید یا پنتا نوکلئوتید، در میان محققان به عنوان یک روش متداول درآمده است (شکل ۱-۲) [زیتکوویچ و همکاران، ۱۹۹۴]. بر اساس تکنیک ISSR، مکان‌های ژنی چندگانه SSR ممکن است با الگوی مشابه آن آشکار شوند. برای این روش پرایمری طراحی می‌شود که توالی آن دارای قسمتی از توالی SSR و قسمتی از توالی آن، بازهای اختیاری مورد استفاده باشد. بر طبق مکان‌های نسبی این دو قسمت، دو نوع پرایمر متصور است که اگر بازهای اختیاری پرایمر در انتهای ´۵ باشند یک نوع پرایمر و در صورتی که در انتهای ´۳ باشند پرایمر دیگری حاصل می-شود. PCR به طور همزمان، قطعات مختلف بخش‌های نزدیک به SSRها را که دارای چندشکلی

بالایی هستند، تکثیر خواهد کرد [گادوین و همکاران، ۱۹۹۷].




شکل ۱-۲: شمایی از روش ISSR، در این نشانگر قسمتی از توالی پرایمری که طراحی می‌شود را توالی SSR و قسمتی را بازهای اختیاری ´۳ یا ´۵ تشکیل می‌دهند [اسکارانو و همکاران، ۲۰۰۲].

### ۱-۶- اهداف تحقیق

تاکنون مطالعات زیادی با استفاده از نشانگرهای ISSR به عنوان نشانگر مولکولی در قارچ‌های بیماری-زای حشرات به خصوص قارچ *B. bassiana* انجام نگرفته است. با توجه به اینکه در این تحقیق جدایه‌های مختلف این قارچ از مناطق مختلف شهرستان اهواز در استان خوزستان و مناطق مختلف شهرستان شاهرود در استان سمنان جداسازی شده است، ولی از قرابت ژنتیکی آنها اطلاعاتی در دسترس نیست و از طرفی تاکنون گزارشی دال بر استفاده از نشانگرهای ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی این قارچ در کشور موجود نمی‌باشد، این پژوهش با اهداف زیر طراحی شد:

۱. ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* شهرستان‌های اهواز و شاهرود با استفاده از صفات مورفولوژیک

۲. بررسی کارایی نشانگرهای ISSR جهت بررسی پلی‌مورفیسم و تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana*

۳. تهیه کلکسیون قارچ *B.bassiana* از نمونه‌های خاکی مناطق مختلف شهرستان‌های اهواز و شاهرود

# فصل دوم

# مرور منابع

## ۲-۱- پراکنش جغرافیایی

قارچ‌های بیماری‌زای حشرات در طیف وسیعی از زیست‌بوم‌ها نظیر جنگل‌ها، اکوسیستم‌های کشاورزی، مراتع، دشت‌ها و مناطق شهری پراکنده شده‌اند و توانایی آنها در تنظیم جمعیت حشرات آفت در زیست‌بوم‌های مختلف نظیر نواحی گرمسیری و معتدل مطالعه شده است. خاک پناهگاه مناسبی برای قارچ‌های بیماری‌زای حشرات می‌باشد زیرا از تابش اشعه ماوراءبنفش و تاثیرات مضّر زنده و غیر زنده محفوظ می‌مانند. پراکنش قارچ‌های بیماری‌زای از قطب شمال تا نواحی گرمسیری و زیست‌بوم‌های جنگلی، ساوانا، باتلاق‌ها، نواحی ساحلی و بیابان می‌باشد. مطالعات سانچزپنا و همکاران (۲۰۱۱) نشان‌دهنده این بود که ارتفاع در مناطق مختلف تاثیری بر روی حضور قارچ‌های بیماری‌زای حشرات ندارد اما سان و لیو (۲۰۰۸) اهمیت این عامل را روی تنوع جنس‌های قارچ‌های بیماری‌زا اثبات نمودند. سانچزپنا و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعات خود گزارش نمود که *B. bassiana* در جنگل‌ها و *M. anisopliae* در خاک‌های قابل زرع فراوانی بیشتری دارند و این به واسطه‌ی قابلیت دوام طولانی‌تر کنیدی‌های این دو قارچ در عدم حضور میزبان حشره‌ای است [سانچزپنا و همکاران، ۲۰۱۱].

قارچ *B. bassiana* در بالای سطح خاک یافت می‌شود و *M. anisopliae* در سطح یا خاک زیرین ساکن می‌باشد. اثرات فاکتورهایی مانند موقعیت جغرافیایی، شرایط آب و هوایی، نوع زیست‌بوم، سیستم کشت و ویژگی‌های خاک و اثرات تنش‌های غیرزنده بر حضور و پراکنش قارچ‌های بیماری‌زای حشرات مطالعه شده است [میلینگ و الینبرگ، ۲۰۰۷]. ویژگی‌های خاک یعنی دما، اسیدیته (pH)، محتوای ارگانیک، رطوبت نسبی[1]، ترکیبات آلی و معدنی خاک می‌تواند بر حضور و فعالیت این قارچ‌ها اثرگذار باشد [آسن‌سیو و همکاران، ۲۰۰۳].

گزارشات حاکی از حضور و جداسازی قارچ *B. bassiana* از ترکیه، ساحل عاج، نواحی استوایی غرب

[1]. Relative Humidity (RH)

آفریقا، آفریقای مرکزی، آفریقای جنوبی، باهاما، نپال، شرق سیبری، نیوزیلند، چین، ژاپن و ایران هستند. زیستگاه طبیعی برای قارچ *B. bassiana* از خاک مناطق کوهستانی، زمین‌های بدون پوشش گیاهی تا خاک مناطق جنگلی، زراعی، تپه‌های شنی، خاک بیابان و آب‌های روان گزارش شده است [زیمرمن، ۲۰۰۷].

قارچ *B. bassiana* نیز از سطح و داخل گیاهان جداسازی شده است [واگنر و لوئیس، ۲۰۰۰]. با استفاده از محیط کشت انتخابی، *B. bassiana* از پوست درختان نارون و خاک منطقه‌ی رایزوسفری درخت نارون جداسازی شده است [دوبرسکی و ترایب، ۱۹۸۰]. اخیراً گونه‌های این جنس از سطح برگ گیاهان تزئینی مختلف جداسازی شده‌اند [میلینگ و ایلنبرگ، ۲۰۰۶].

### ۲-۲- کاربرد قارچ بیماری‌زای *B. bassiana* در کنترل آفات

در ایران مطالعه‌ی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات از سابقه چندانی برخوردار نبوده و مطالعات محدودی برای بررسی فلور این قارچ‌ها انجام گرفته است. قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* که گستره‌ی جهانی دارند می‌توانند حشرات زیادی را آلوده کنند. آلودگی حشراتی نظیر پروانه‌ها، شته، شپشک‌ها، زنبورها، سوسک‌ها، مگس‌ها و پشه‌ها به وسیله‌ی این قارچ‌ها امر طبیعی و متداولی است. استین‌هوس (۱۹۴۹) اولین کسی است که نتیجه گرفت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای حشرات برای انسان، حیوانات و گیاهان بی‌ضرر هستند و بعدها پیشنهاد شد از این میکروارگانیسم‌ها به‌جای مواد شیمیایی در کنترل آفات بهره‌برداری شود [استین‌هوس، ۱۹۴۹]. گزارش گردیده است که از قارچ بیماری‌زای *B. bassiana* در روسیه بر روی ۷۰ نوع از محصولات زراعی از جمله کنترل سوسک کلرادو استفاده می‌شود [کاظمی، ۱۳۷۴]. اغلب مطالعات طی سال‌های اخیر روی بررسی میزان زهرآگینی جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیماری‌زای *B. bassiana* و *M. anisopliae* متمرکز شده است. به عنوان مثال

فراشیانی و همکاران (۱۳۸۷) ارزیابی آزمایشگاهی بیمارگری قارچ *B. bassiana* روی لارو سوسک شاخک بلند سارتا *Aeolesthes sarta* Solsky، مجیدی شیلسر و همکاران (۱۳۸۷) اثر قارچ بیمارگر *B. bassiana* روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج در شرایط مزرعه‌ای، خشاوه و همکاران (۱۳۸۷) بررسی حساسیت لارو و حشره‌ی کامل *Trogoderma dominica* به قارچ *M. anisopliae* را مورد مطالعه قرار داده‌اند. مهدنشین و همکاران (۱۳۸۷) تاثیر جدایه‌های ایرانی *B. bassiana* و *M. anisoplia* را روی سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات بررسی کردند.

بورین[1] که اولین فرمولاسیون تجاری قارچ *B. bassiana* است در سال ۱۹۶۵ برای کنترل سوسک برگ‌خوار سیب‌زمینی و کرم سیب تولید شد [دی‌فاریا و رِیت، ۲۰۰۷؛ فرون، ۱۹۷۸]. موینو[2] و همکاران (۱۹۹۸) جدایه‌های مختلفی از قارچ *B. bassiana* را برای کنترل آفات *Sitophilus oryzae* Linnaeus، *Sitophilus zeamais* Motschulsky و *Rhyzopertha dominica* Fabricius آزمایش کردند. زیست‌سنجی به وسیله‌ی آغشته‌سازی حشرات کامل در شرایط آزمایشگاهی انجام گردید. بعد از ۱۰ روز میزان مرگ‌ومیر و $LT_{50}$ در مورد هر سه حشره محاسبه و با هم مقایسه شدند. گونه‌های *S. oryzae* و *S. zeamais* نسبت به گونه‌ی *R. dominica* در مقایسه با جدایه‌های *B. bassiana* حساسیت کمتری نشان دادند بطوریکه گونه‌ی *R. dominica* به طور کامل توسط چندین جدایه تحت تأثیر قرار گرفت. موینو و همکاران (۱۹۹۸) مشاهده کردند که قارچ *M. anisopliae* حشرات را بسیار کندتر و آرام‌تر از *B. bassiana* از بین می‌برد. این نتایج با سایر گزارشات در این زمینه مطابقت داشته و مشخص می‌کند که *B. bassiana* ممکن است در آلوده‌سازی نسبت به *M. anisopliae* موفق‌تر باشد [موینو و همکاران، ۱۹۹۸]. یکی از روش‌های شناسایی قارچ‌های بیماری‌زا، جداسازی آنها از خاک مزارع می‌باشد. محیط خاک یک منبع مهم برای تنوع قارچ‌های بیماری‌زای حشرات می‌باشد که

[1]. Beauverin
[2]. Moino

نقش قابل توجهی در تنظیم جمعیت حشرات آفت دارد [کِلر و زیمرمن، ۱۹۸۹]. اطلاع از تنوع و پراکندگی گونه‌های بومی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات برای کاربرد آنها در کنترل جمعیت آفات در اکوسیستم‌های زراعی مهم می‌باشد [میلینگ و الینبرگ، ۲۰۰۶]. روش‌های متعددی برای جداسازی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اما میلینگ و ایلنبرگ (۲۰۰۶) روش طعمه حشره‌ای[1] را به عنوان یک روش بسیار حساس جهت جداسازی قارچ‌ها در نمونه‌های خاک معرفی نمودند. میلینگ و ایلنبرگ، قارچ‌های بیماری‌زا را در خاک مزارع کشاورزی ارگانیکی مورد بررسی قرار داده و گونه‌هایی که در مطالعه‌ی فوق مورد شناسایی قرار گرفته‌اند عبارتند از: *B. bassiana* *M. anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* Smith, *Paecilomyces farinosus* Holmsk, *Lecanicillium lecanii* zare and Gans, *Conidiobolus coronatus (Constantin) Bakto*, و *Hirsutella nodulosa* Petch بودند [میلینگ و ایلنبرگ، ۲۰۰۶].

شاپیرو و همکاران (۲۰۰۲) قارچ‌های بیماری‌زای باغات گردو آمریکایی را در ایالت‌های جنوبی آمریکا مورد مطالعه قرار داده‌اند. آنها از ۱۶ نمونه خاک جمع‌آوری شده دو گونه قارچ بیماری‌زای حشرات شامل *B. bassiana* و *M. anisopliae* را از ۱۶ نمونه خاک جداسازی کرده‌اند.

کلیجن و همکاران (۲۰۰۲) اثر سیستم زراعی، حاشیه‌ی مزارع و حشره‌ی طعمه را بر وجود قارچ‌های بیماری‌زای حشرات مورد مطالعه قرار داده و نتیجه گرفتند که وجود قارچ‌ها در خاک‌های زراعی تحت پوشش کشاورزی ارگانیک به طور معنی‌داری بیشتر از مزارع تحت پوشش کشاورزی متداول می باشد، اما تفاوت معنی‌داری در بین حاشیه‌های مزارع فوق بدست نیاوردند. قارچ‌های مورد شناسایی در این تحقیق عبارت بودند از *Fusarium merismoides* Corda, *M. anisopliae*, *B. bassiana* و *Tolypocladim cylindrosoporum* Gams.

مهدنشین و همکاران (۱۳۸۷) به منظور ارزیابی تأثیر جدایه‌های ایرانی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات *B. bassiana* و *M. anisoplia* از حشرات کامل *R. dominica* روی گندم‌های انبار شده استفاده

[1]. *Galleria* Bait Method (GBM)

کردند. تمامی جدایه‌های مورد آزمایش برای این حشره بیماری‌زا بودند. هر چند که سرعت مرگ‌ومیر آنها متفاوت بود. تجزیه داده‌ها نشان داد که پایین‌ترین $LC_{50}$[1] برابر $۹/۶\times۱۰^{۵}$ و $۱/۹\times۱۰^{۷}$ کنیدی/میلی‌لیتر به ترتیب برای قارچ *B. bassiana* جدایه‌ی C ۱۸۷ و *M. anisopliae* جدایه‌ی DEMI 001 بود. مقدار $LT_{50}$[2] برای جدایه‌های *B. bassiana* از ۶/۷۷ تا ۹/۲۸ روز متفاوت بود درحالیکه این مقدار در مورد جدایه‌های *M. anisopliae*، ۷/۴۸ تا ۸/۲۵ روز محاسبه گردید.

اغلب بررسی‌های انجام شده در ارتباط با استفاده‌ی قارچ‌ها بر علیه آفات انباری در سطوح آزمایشگاهی بوده و بررسی‌های کلانی در این زمینه صورت نگرفته است. اولین بررسی اثر قارچ‌ها روی حشرات انباری توسط فرون[3] (۱۹۷۷) صورت گرفت. وی در آزمایشاتش اثر رطوبت نسبی را بر روی کارایی قارچ *B. bassiana* برای آلودگی مراحل لاروی سوسک لوبیا *Acanthiscelide obtectous* Say مورد ارزیابی قرار داد و بیان کرد که تحت شرایط کنترل شده می‌توان این قارچ را علیه این آفت بکار برد. پس از آن سرل و دوبرسکی[4] (۱۹۸۴) حساسیت شپشه‌ی دندانه‌دار *Oryzaephilus surinamensis* Linnaeus را به قارچ *B. bassiana* مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که حساسیت این حشره به این قارچ در رطوبت بالای ۹۰ درصد به بالاترین میزان خود رسیده و با کاهش رطوبت از میزان حساسیت آن به شدت کاسته می‌شود.

ادان[5] و همکاران (۱۹۹۶) بررسی‌های اولیه‌ای را برای کنترل شپشه ذرت *S. zeamais* به وسیله ۱۰ جدایه‌ی قارچ *B. bassiana* انجام دادند. تمام جدایه‌های بکار رفته قابلیت بیماری‌زایی را بر روی این حشره دارا بودند اما میزان بیماری‌زایی جدایه‌ها بسیار متفاوت بوده و میزان تلفات این حشره نسبت به جدایه‌ها از ۱۰ تا ۱۰۰ درصد متغیر بوده است.

1. Letal Concentration
2. Letal Time
3. Ferron
4. Searle and Doberski
5. Adane

جدایه‌های وحشی و جهش‌یافته‌ی قارچ‌های بیماری‌زای *B. bassiana* و *M. anisopliae* بر روی *Callosobruchus maculatus* Fabricius توسط ویلاس بوس[1] و همکاران (۱۹۹۶) مورد ارزیابی قرار گرفته و بیان شد که میزان بیماری‌زایی قارچ *B. bassiana* بیشتر از *M. anisopliae* می‌باشد. موینو و همکاران (۱۹۹۸) کارایی قارچ *B. bassiana* را برای کنترل چندین گونه از آفات انباری مورد ارزیابی قرار دادند و بیان کردند که این قارچ می‌تواند به طور موثری این آفات را کنترل کند. بوراسا[2] و همکاران (۲۰۰۱) در بررسی‌های خود دریافتند که جدایه‌ی IMI330194 قارچ *B. bassiana* باعث ۱۰۰ درصد تلفات در حشرات کامل *Prostephanus truncatus* Horn می‌شود.

چری[3] و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی‌های خود، حساسیت حشرات کامل *C. maculatus* را به جدایه-های مختلف قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* مورد ارزیابی قرار دادند. در بررسی‌های این محققین نیز ثابت شد که این حشره حساسیت بیشتری نسبت به *B. bassiana* داشته و بیشترین میزان تلفات و کمترین میزان $LC_{50}$ و $LT_{50}$ مربوط به جدایه‌های این قارچ بوده است.

در ایالت آلیکانته اسپانیا به منظور شناسایی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات در ۶۱ نمونه خاک مزارع کشاورزی از لاروهای *Galleria mellonella* Linnaeus به عنوان طعمه استفاده گردید و مشخص شد قارچ *B. bassiana* با ۳۲/۸٪، *M. anisopliae* با ۶/۴٪ و *L.lecanii* با ۴/۸٪ فراوان‌ترین قارچ‌های بیماری‌زای حشرات در خاک بودند [آسن‌سیو و همکاران، ۲۰۰۳].

در آزمایشی ۲۳ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana* و ۱۳ جدایه مختلف قارچ *M. anisopliae* بر روی پوره‌های سن سوم آفت *Triatoma infestans* Klug ناقل بیماری Chagas بررسی شدند. در رطوبت نسبی ۵۰٪ میزان بیماری‌زایی در میان جدایه‌های مختلف در طیفی معادل ۹۷/۵-۱۷/۵ ٪ مشاهده شد و $LC_{50}$ برای جدایه CG14 قارچ *B. bassiana* معادل $۷/۱ \times ۱۰^{۵}$ کنیدی/میلی‌لیتر و برای جدایه

[1]. Vilas Boas
[2]. Bourassa
[3]. Cherry

CG491 قارچ *M. anisopliae* معادل $۱۰^{۶} \times ۴/۳$ کنیدی/میلی‌لیتر بدست آمد [لوز و همکاران، ۱۹۹۸].

تای لاک و تای بایچ (۲۰۰۵) ۱۲ جدایه مختلف قارچ‌های بیماری‌زای حشرات *M. anisopliae* و *B. bassiana* جمع‌آوری شده از حشرات آلوده مختلف را بر روی سن برنج *Leptocorisa acuta* Thunberg بکار برد و درصد مرگ‌ومیر حشرات را به ترتیب ۵۷/۵٪ و ۷۴/۷٪ اعلام نمود.

در تحقیق دیگری توسط پیرعلی خیرآبادی و همکاران (۲۰۰۷) بیماری‌زایی ۱۱ جدایه بومی قارچ‌های بیماری‌زای جمع‌آوری شده از قسمت‌های مختلف ایران (گونه‌های *M. anisopliae, B. bassiana* (*Lecanicillium psalliotae* Treschew بر روی *Rhipicephalus annulatus* Say با غلظت‌های گوناگون سوسپانسیون اسپور بررسی گردید و پارامترهای مختلفی نظیر نرخ مرگ‌ومیر و درصد آلوده شدن تخم‌های کنه در نظر گرفته شد و نتایج نشان داد که ۵ جدایه در مراحل مختلف سیکل زندگی کنه بیماری‌زا هستند و نرخ مرگ‌ومیر کلی برای قارچ *M. anisopliae* معادل ۱۰۰-۹۰٪، برای *B. bassiana* برابر ۷۰٪ و برای *L. psalliotae* معادل ۵۶/۶٪ گزارش گردید.

تای لاک و همکاران (۲۰۱۰) با جمع‌آوری و جداسازی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات و انجام کارهای مورفولوژیکی، تعداد ۱۰ جدایه را انتخاب نمود و بیماری‌زایی آن‌ها را بر روی شته سیاه مرکبات و پروانه مرکبات بررسی کرد. نتایج نشان داد که آفت‌کش‌های تولیدی از جدایه‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* اثرات زیان‌باری بر دشمنان طبیعی موجود در گلخانه‌ها نخواهند داشت.

در آزمایشی بیماری‌زایی قارچ‌های *Isaria fumosorosea* Wize, *B. bassiana* و *M. anisopliae* بر روی آفت *Leptoglossus occidentalis* Heidemann (گونه بومی آمریکای شمالی) در شرایط آزمایشگاه و شرایط طبیعی بررسی گردید و نتیجه گرفته شد که $LC_{50}$ در شرایط آزمایشگاه برای قارچ بیماری‌زای *I. fumosorosea* بالاترین و برای قارچ *M. anisopliae* کمترین بود. در آزمایشات محیطی

میزان مرگ‌ومیر برای تمام جدایه‌های قارچی کمتر از شرایط آزمایشگاهی بود [بارتا، ۲۰۱۰].

در لبنان به جداسازی قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* از خاک اقدام شده است و بیماری-زایی جدایه‌های بدست آمده بر روی *Bemesia tabac* Gennadius و *Myzus persicae* Sulzer بررسی گردید [ابراهیم و همکاران، ۲۰۱۱].

از سوسپانسیون $۱ \times ۱۰^{۶}$ کنیدی/ میلی‌لیتر قارچ‌های بیماری‌زای حشرات *B. bassiana* و *Metarhizium brunneum* برای لاروهای *Synanthedon myopaeformis Borkhausen* استفاده گردید و $LC_{50}$ به‌دست آمده برای جدایه‌های قارچی برابر $۲/۹ \times ۱۰^{۵}$ و $۳/۴ \times ۱۰^{۵}$ کنیدی/میلی‌لیتر و $LT_{50}$ برای *B. bassiana* برابر ۵/۵ روز و برای دیگری معادل ۵/۱ روز است [کاسنتین و همکاران، ۲۰۱۰].

مارانینو و همکاران (۲۰۰۶) ۴ جدایه قارچ *B. bassiana* و ۴ جدایه قارچ *M. anisopliae* را برای کنترل لاروهای نئونات *Capnodis tenebrionis* Linnaeus بکار بردند، نتایج نشان داد که پس از ۱۰ روز از تلقیح لاروها با سوسپانسیون $۱ \times ۱۰^{۸}$ کنیدی/ میلی‌لیتر میزان مرگ‌ومیر در طیفی معادل ۱۰۰- ۲۳/۵ ٪ بود. کاربرد این ۸ جدایه بر روی تخم‌های این حشره نشان داد که دو جدایه قارچ بیماری‌زای *B. bassiana* سبب کاهش ۸۴/۵٪ و ۹۴/۵٪ تفریخ تخم‌ها می‌شوند.

در موسسه کشاورزی و علوم جانوری نپال به جداسازی قارچ‌های بیماری‌زای *M. anisopliae* و *B. bassiana* از حشرات بیمار و خاک با استفاده از محیط‌کشت انتخابی و روش طعمه گالریا پرداخته شد و از جدایه‌های بدست‌آمده در کنترل آفت کرم سفید ریشه[1] *Polyphylla spp.* استفاده گردید [یوباکا داج، ۲۰۰۶].

تودوراوا[2] و همکاران (۲۰۰۲) در آزمایشی بیماری‌زایی شش جدایه مختلف از *B. bassiana* روی سوسک کلرادو و سن شکارگر آن *Perillus biocalatus* Fabricius را بررسی کردند و نشان دادند که

[1]. White Grub (*Polyphylla spp.*)
[2]. Todorova

جدایه IPP46 مرگ‌ومیر بالایی را در سوسک کلرادو موجب می‌شود، درحالیکه روی سن شکارگر آن تنها ۱۱٪ کشندگی ایجاد کرد. در نتیجه این جدایه را به عنوان جدایه‌ای که پتانسیل خوبی برای کنترل سوسک کلرادو دارد در برنامه مدیریت آفات معرفی کردند.

مهدنشین و همکاران (۱۳۸۷) نیز کنترل سوسک کلرادو توسط جدایه‌های ایرانی *B. bassiana* را بررسی کردند و بالاترین درصد مرگ‌ومیر را ۷۹/۴۸٪ برای جدایه IRAN 187C معرفی کردند. مقدار $LC_{50}$ مربوطه را $۱ \times ۱۰^{۷}$ کنیدی/ میلی‌لیتر بیان کردند.

در آزمایشی دیگر که بر روی آفات انباری *S. oryzae*، *S. zeamaiz* و *R. dominica* انجام شد، ۷۲ جدایه از قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش مشخص شد *R. dominica* نسبت به دو گونه‌ی دیگر، حساسیت بالایی نسبت به قارچ‌ها نشان داد. بطوریکه بیش از ۸۵٪ از جدایه‌های *B. bassiana* و ۳۶٪ از جدایه‌های *M. anisopliae* مرگ‌ومیر بیش از ۸۰ درصد را در این آفت موجب شدند [موینو و همکاران، ۱۹۹۸].

بطورکلی جدایه‌های *B. bassiana* بر روی آفات هدف بیماری‌زایی بیشتری نسبت به جدایه‌های *M. anisopliae* نشان دادند و این در حالی است که سایر محققین نیز به چنین نتایجی در مورد اثر قارچ‌ها بر روی دیگر آفات انباری دست یافتند.

در آزمایشی که توسط ویلاس باوس و همکاران (۱۹۹۶) انجام گرفت، دو قارچ ذکر شده علیه سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات بکار گرفته شد. در این آزمایش جدایه‌ی PL 256، از قارچ *B. bassiana*، $LT_{50}$ کمتری نسبت به جدایه‌ی PL 43 از قارچ *M. anisopliae* نشان داد.

نتایج مطالعات لورد (۲۰۱۰) نشان داد که لاروهای *T. castaneum* که به مدت ۲۴ ساعت در آرد آلوده به اسپورهای *Beauveria spp.* تغذیه شدند، به طور قابل توجهی از لحاظ میزان تغذیه و وزن در مقایسه با لاروهایی که در آرد غیر آلوده به قارچ تغذیه می‌کنند، کمتر بودند. بنابراین، وجود اسپورهای

*B. bassiana* در آرد ممکن است باعث استرس رژیم غذایی شود.

ویکفیلد و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که برخی از جدایه‌های *B. bassiana* می‌توانند موجب ۱۰۰ درصد میزان مرگ‌ومیر در حشرات کامل *O. surinamensis*، *Ephestia kuehniella* Zeller، *Lepinotus patruelis* Pearman و *Acarus siro* Linnaeus به مدت ۱۰ روز بعد از تیمار با غلظت $۱\times۱۰^{۸}$ کنیدی/ میلی‌لیتر شوند.

### ۲-۳- تشخیص و شناسایی مورفولوژیکی قارچ *B. bassiana*

روش‌های معمول آزمایشگاهی برای افتراق گونه‌های *Beauveria* شامل بررسی صفات مورفولوژیک، خصوصیات ظاهری و میکروسکوپی کلونی می‌باشد. از طرفی به دلیل تنوع صفات مورفولوژیک و هم پوشانی این ویژگی‌ها بین گونه‌های مختلف این کار با صرف مدت زمان طولانی همراه است که این امر موجب می‌شود از اعتبار این روش‌ها کاسته شود. می‌توان نتیجه گرفت که روش‌های فوق علاوه بر وقت‌گیر بودن احتیاج به پرسنل مجرب نیز دارد. همین امر ضرورت استفاده از روش‌های مولکولی به دلیل حساسیت بالا، قابل‌اعتماد و تکرارپذیر بودن را بیش از پیش روشن می‌کند. در ادامه برای روشن شدن موضوع به معرفی دو واژه‌ی تشخیص و شناسایی در علم قارچ‌های بیماری‌زای حشرات پرداخته خواهد شد.

تشخیص یعنی تعیین حضور قارچ در محیط طبیعی (مانند خاک) و یا میزبان آن، که روش‌های مختلفی برای تشخیص قارچ‌ها ارائه شده است. معمولا از ویژگی‌های ظاهری و خصوصیات مورفولوژیکی برای تشخیص جنس یک قارچ استفاده می‌شود. تشخیص به‌طور عمده برای مطالعات در سطح اکولوژیکی استفاده می‌شود [کاستریلو و هامبر، ۲۰۰۸].

به عنوان مثال یکی از راه‌های تشخیص *Beauveria* استفاده از روش طعمه حشره‌ای است چرا که

اسپورهای قارچ پس از نفوذ و جوانه‌زنی بر روی لاشه حشره به رنگ سفید مشاهده می‌شوند. در قارچ-شناسی، شناسایی بارزترین ویژگی آن قارچ است که ساده‌ترین پاسخ را به سوال "نام نمونه پیش روی من چیست؟" می‌دهد به عبارت دیگر شناسایی یعنی تخصیص نام علمی مناسب و صحیح به موجود زنده است.

شناسایی قارچ‌ها معمولا نیازمند رتبه‌بندی در سطح گونه یا در سطوح پایین‌تر (زیرگونه، واریته) می-باشد. شناسایی در حد جنس معمولا برای مطالعات اکولوژیکی استفاده می‌شود. شناسایی جنس قارچ اغلب به آسانی توسط مورفولوژی بدون نیاز به روش‌های مولکولی هزینه‌بردار صورت می‌پذیرد. شناسایی یک موجود یا یک گونه جزء مهمی در علم رده‌بندی موجودات می‌باشد. تا پیش از گسترش نشانگرهای مولکولی، دانشمندان برای شناسایی گونه‌های یک موجود از ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده می‌نمودند.

در مورد قارچ‌های بیماری‌زای حشرات باید گفته شود که تنها قارچ‌هایی که دارای پراکنش جهانی[1] هستند نظیر *Paecilomyces, Lecanicillium, Beauveria* و *Metarhizium* توسط تکنیک‌های مولکولی مورد شناسایی و تشخیص قرار گرفته‌اند [کاستریلو و هامبر، ۲۰۰۸].

### ۲-۴- مرور کلی مطالعات تنوع ژنتیکی انجام شده در مورد *B. bassiana*

مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی و ارتباط درون گونه‌ای اهمیت زیادی برای درک ساختار جمعیت، رانش ژنی و طبقه‌بندی جدایه‌ها داشته و همچنین اثر اکولوژیکی موثری روی کنترل زیستی حشرات دارد. در طول سال‌های گذشته، آسیب‌شناسان گیاهی به بررسی ساختارهای ژنتیکی جمعیت قارچ‌های بیماری‌زای

[1]. Cosmopolitan

جانوری برای به وجود آوردن استراتژی‌های نوین جهت کنترل آفات پرداخته‌اند [مک‌دونالد، ۱۹۹۷]. تکنیک‌هایی مانند چندشکلی طولی قطعات محدود (AFLP[1])، چندشکلی تصادفی DNA (RAPD)، توالی‌های ساده تکرار شونده (SSR) و غیره در مطالعات اکولوژیکی، تکاملی، تاکسونومیکی و ژنتیکی گیاهان و قارچ‌ها استفاده شده است [آگراوال و وانگ، ۲۰۰۸].

در دهه ۱۹۷۰ با ظهور تکنیک‌های مولکولی متعدد و روش‌های تحلیلی مربوطه، فرصت‌های جدیدی جهت پیشبرد طبقه‌بندی، فیلوژنتیک و ژنتیک جمعیت قارچ *Beauveria* ایجاد شد. در طول دهه‌ی ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ مطالعات متعددی با موضوعاتی از قبیل کموتاکسونومی، بیوشیمی و تکنیک‌های مبتنی بر DNA برای توصیف الگوهای تنوع ژنتیکی و ارتباط این الگوها با قارچ *Beauveria* منتشر شد. هرکدام از این نشانگرهای مولکولی نسبت به مطالعات مورفولوژیکی که به تنهایی و قبل از توسعه‌ی روش‌های مولکولی جهت آشکارسازی تنوع درون‌گونه‌ای جنس *Beauveria* استفاده شده بودند به شکل کارآمدتری عمل کردند. با این حال تعداد کمی از این تکنیک‌ها بطور موثری در حل و فصل طبقه‌بندی و ارتباطات ژنتیکی *Beauveria* موثر بوده‌اند. در بسیاری از مطالعات، تکنیک‌های مولکولی چون سرولوژی، چندشکلی ساختار تک‌رشته، ایزوزایم‌ها، کاریوتیپینگ، کموتاکسونومی، اینترون‌های DNA ریبوزومی، چندشکلی طولی قطعه‌ی بریده شده‌ی میتوکندریایی ابداع شده است اما سودمندی این روش‌ها بطور کامل مورد ارزیابی قرار نگرفته است. به طور کلی به علت وجود و حضور گونه‌های مختلف قارچ *Beauveria* برای هر گونه تعمیم نتایج چنین مطالعاتی کاری بس دشوار است. لازم به ذکر است که بسیاری از این روش‌های اولیه با روش‌هایی چون داده‌های حاصل از نشانگرهای ریزماهواره و درون‌ماهواره، توالی نوکلئوتیدی، چندشکلی طولی قطعات تکثیریافته برای آنالیز ارتباطات ژنتیکی جایگزین شده‌اند [وگا و بلک‌ول، ۲۰۰۵].

[1]. Amplified Fragment Length of Polymorphism

از الکتروفورز آنزیمی چندمکانی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی میان جدایه‌های قارچ‌های بیماری‌زای حشرات مانند قارچ *Beauveria spp.* استفاده شده است [استی‌لِجر و همکاران، ۱۹۹۲]. از الکتروفورز آنزیمی چندمکانی به علت عدم توانایی این روش در نشان دادن تفاوت در تک‌بازها یا جهش‌های احتمالی که در ژنوم رخ می‌دهد، از آن در مطالعات سیستماتیک و فیلوژنی استفاده نمی‌کنند. به عنوان مثال دو گونه *Beauveria amorpha* (Hohn.) Samson and Evans و *B. brongniartii* بر اساس مورفولوژی و آنالیز DNA قابل تفکیک از *B. bassiana* هستند اما روش الکتروفورز آنزیمی چند مکانی توانایی نشان‌دادن چنین تفاوتی بین‌گونه‌ها را ندارد [فرناندز و همکاران، ۲۰۰۹]. از الکتروفورز کاریوتیپ برای تمایز قائل شدن میان جدایه‌های قارچ‌های بیماری‌زای حشرات استفاده شده است. ویاد و همکاران (۱۹۹۶) از یک پروب تلومری ۱۵۹ جفت بازی با ۸ تکرار $_{8}$(TTAGGG) از منطقه تلومری *Botrytis cinerea* همراه با الکتروفورز CHEF برای تعیین چندشکلی کاریوتیپی در میان ۹ جدایه *B. bassiana* استفاده کردند.

تکنیک‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که برای شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی در قارچ‌های بیماری‌زای حشرات استفاده می‌شود شامل چندشکلی طولی قطعات تکثیر یافته (AFLP)، ریزماهواره-ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر پایه‌ی عناصر تکرار شونده، RFLP بر پایه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR-Based RFLP)، نشانگرهای ریبوزومی و نشانگرهای میتوکندریایی است.

ایزوآنزیم‌ها، انگشت‌نگاری تلومر و چندشکلی طولی قطعات برشی (RFLP) به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک درون قارچ *B.bassiana* مورد استفاده قرار گرفته است [پاپ‌راسکی و همکاران، ۱۹۸۸؛ مورِر و همکاران، ۱۹۹۷].

علاوه بر این، مطالعات مشابهی با استفاده از انواع مختلفی از نشانگرهای مبتنی بر PCR از قبیل چندشکلی تصادفی DNA (RAPD)، ریزماهوارک‌ها (Minisatellites)، چندشکلی طولی قطعات

تکثیریافته (AFLP)، مناطق تکثیریافته با توالی مشخص (SCAR)، توالی‌های ساده تکرار شونده (SSR) بر روی قارچ *B.bassiana* انجام شده است. در تمام این مطالعات، تنوع ژنتیکی قابل‌توجهی در درون جدایه‌های قارچ *B.bassiana* نشان داده شد اما نتایج متناقض و مبهمی در رابطه با تخصصی-شدن میزبان و منطقه جغرافیایی تنوع ژنتیکی قارچ *B.bassiana* ارائه شده است [مورِر و همکاران، ۱۹۹۷؛ بیدوکا و همکاران، ۲۰۰۲]. لذا دسترسی به نشانگری قابل اعتماد، قدرتمند، پلی‌مورفیک و دارای حساسیت بالا برای دستیابی به یک جدایه ژنوتیپی دقیق و استنباط قوی در درون ساختار جمعیتی حائز اهمیت است.

وانگ و همکاران (۲۰۰۵) با توجه به آنالیز داده‌ها به بررسی تنوع ژنتیکی ۳۹ جدایه مختلف قارچ *Beauveria spp.* با استفاده از ۳۳ پرایمر ISSR پرداختند که نتایج بدست آمده نشان داد ۱۵ پرایمر محصولات ضعیف و مبهم تولید کردند که دور ریخته شدند و در نهایت ۱۸پرایمر محصولات روشن، چندشکل و قابل تکرار تکثیر کردند که برای آنالیز بیشتر انتخاب شدند. ۱۸ پرایمر توانست در مجموع ۱۶۸ باند در ۳۹ جدایه مختلف قارچ تولید کنند که ۱۶۱ باند (۹۵/۸ درصد) پلی‌مورف و ۷ باند (۴/۲ درصد) مونومورف بودند. میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر پرایمر ۹/۳۳ باند و میانگین باندهای پلی‌مورف ۸/۹۴ باند بود که پرایمر BIS22 با ۱۹ باند بیشترین تعداد باند دارای چندشکلی و پرایمر BIS19 با ۲ باند کمترین باند دارای چندشکلی را نشان داد. میانگین شاخص تنوع ژنی Nei (h) و میانگین محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای ۱۸ پرایمر به ترتیب ۰/۲۲ و ۰/۳۶ بود که پرایمر BIS09 بیشترین شاخص تنوع ژنی Nei (۰/۴۲) و بیشترین محتوای اطلاعات چندشکل (۰/۶۸) و پرایمر BIS17 کمترین شاخص تنوع ژنی Nei (۰/۰۶) و کمترین محتوای اطلاعات چندشکل (۰/۱۳) را داشتند.

استرادا و همکاران (۲۰۰۶) نشانگر ISSR را به منظور شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی ۱۱ جدایه قارچ *B.bassiana* با منشاء جغرافیایی مختلف مورد استفاده قرار دادند. تنوع و روابط فیلوژنتیک بین این

۱۱ جدایه با استفاده از ۱۴ نشانگر ISSR تجزیه و تحلیل شد و سطح بالایی از پلی مورفیسم (نزدیک به ۸۰ درصد) با استفاده از این نشانگرهای مولکولی نشان داده شد. ۱۴ پرایمر مورد استفاده در مجموع ۱۷۲ باند در ۱۱ جدایه مختلف قارچ تولید کردند که ۱۳۵ باند (۷۸/۴۹ درصد) پلی‌مورف و ۳۷ باند (۲۱/۵۱ درصد) مونومورف بودند. میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر پرایمر ۱۲/۲۸ باند و میانگین باندهای پلی‌مورف ۹/۶۴ باند بود که پرایمرهای ۸۱۰ و ۸۸۸ با ۱۶ باند بیشترین تعداد باند دارای چندشکلی و پرایمر ۸۹۱ با ۲ باند کمترین باند دارای چندشکلی را نشان داد. میانگین قدرت تفکیک (Rp) برای ۱۴ پرایمر ۵ بود که پرایمر ۸۸۸ بیشترین (۸/۹) و پرایمر ۸۹۱ کمترین (۱/۱) قدرت تفکیک را داشتند. بر اساس دندروگرام حاصل از این تحقیق، جدایه‌های مورد بررسی در ۲ گروه اصلی A و B که به ترتیب دارای ۸ و ۳ جدایه بودند، قرار گرفتند. گروه A به دو زیرگروه A1 و A2 تقسیم شدند که به ترتیب دارای ۱ و ۷ جدایه بودند.

کاستریلو و همکاران (۱۹۹۹) به منظور بررسی روابط ژنتیکی بین ۱۱ جدایه قارچ *B.bassiana* و رسم دندروگرام از نشانگرهای ISSR استفاده نمودند.

تاکات‌سوکا (۲۰۰۷) تنوع و روابط ژنتیکی بین ۵۹ جدایه مختلف قارچ *B.bassiana* بومی ژاپن را با استفاده از ۳ نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار داد. ۳ پرایمر مورد استفاده در مجموع ۸۶ باند در ۵۹ جدایه مختلف قارچ تولید کردند که ۸۳ باند (۹۶/۵۱ درصد) پلی‌مورف و ۳۷ باند (۳/۴۹ درصد) مونومورف بودند. میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر پرایمر ۲۸/۶۷ باند و میانگین باندهای پلی‌مورف ۲۷/۶۷ باند بود. میانگین تنوع ژنتیکی برای هر ۳ پرایمر ۰/۲۵ بود. دندروگرام بر اساس آنالیز UPGMA ایجاد شد که در نهایت جدایه‌های مورد مطالعه در ۳ گروه قرار گرفتند. نتایج این پژوهش نشان داد که سطح بالایی از تنوع ژنتیکی (نزدیک به ۹۷ درصد) با استفاده از پرایمرهای ISSR در قارچ *B.bassiana* وجود دارد.

تریسی و همکاران (۲۰۱۳) تنوع ژنتیکی بین ۴۰ جدایه مختلف قارچ *B.bassiana* از مناطق مختلف ترکیه و سوریه را با استفاده از ۱۴ نشانگر AFLP مورد بررسی قرار دادند. از ۱۴ نشانگر مورد استفاده، ۲ نشانگر P35m95 و P24m301 درمجموع ۵۲ باند (۱۰۰ درصد چندشکل) تولید کردند. بر اساس دندروگرام حاصل از این تحقیق، جدایه‌های مورد بررسی در ۳ گروه اصلی A، B و C که به ترتیب دارای ۲۰، ۱۱ و ۹ جدایه بودند، قرار گرفتند. گروه A به چهار زیرگروه A1، A2، A3 و A4 تقسیم شدند که به ترتیب دارای ۶، ۶، ۴ و ۴ جدایه بودند. گروه B به به دو زیرگروه B1 و B2 تقسیم شدند که به ترتیب ۷ و ۴ جدایه بودند. تجزیه مولفه‌های اصلی نشان داد که دو مؤلفه تجزیه به مؤلفه‌های اصلی یعنی PCoA1، PCoA2 به ترتیب ۴۵/۵۸٪ و ۱۶/۹۵٪ (مجموعا ۶۲/۵۳٪) از واریانس کل را برای نشانگرها بیان کردند. یعنی نشانگرهای مورد استفاده دارای توزیع نسبتاً مناسبی در سطح ژنوم بوده‌اند و در ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف مورد مطالعه، مناسب عمل کرده‌اند. در این پژوهش تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها بیشتر از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها است. میانگین تنوع ژنتیکی ۴۰ جدایه مختلف درون جمعیت‌ها ۸۸٪ و میانگین تنوع بین جمعیت‌ها ۱۲٪ بود.

برتا و همکاران (۱۹۹۸) تنوع و روابط ژنتیکی بین ۱۸ جدایه مختلف قارچ *B.bassiana* از مناطق مختلف آرژانتین و برزیل را با استفاده از ۱۲ نشانگر RAPD مورد ارزیابی قرار دادند که در مجموع ۲۷۶ باند توسط این ۱۲ پرایمر تولید شد که میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر پرایمر ۲۳ باند بود. بر اساس دندروگرام حاصل از این تحقیق، جدایه‌های مورد بررسی در ۶ گروه قرار گرفتند. در این گروه‌بندی دامنه تشابه ژنتیکی برای این جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد ۹۲/۲-۱۰/۵ ٪ با میانگین ۴۸/۲٪ بود.

مندونکا و همکاران (۲۰۱۲) در تحقیقی تنوع ژنتیکی و تعیین فواصل ژنتیکی ۱۱ جدایه مختلف قارچ *B.bassiana* بومی برزیل را با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار دادند که در مجموع

۵۲ باند تولید شد که ۳۸ باند (۷۳/۰۸ درصد) پلی‌مورف و ۱۴ باند (۲۶/۹۲ درصد) مونومورف بودند. بر اساس دندروگرام حاصل از این تحقیق، جدایه‌های مورد بررسی در فاصله ۵۰٪ در ۴ گروه اصلی قرار گرفتند. در این گروه‌بندی دامنه تشابه ژنتیکی برای این جدایه‌های قارچی بر اساس ضریب تشابه جاکارد ۷۷-۲ ٪ با میانگین ۳۸/۶٪ بود. بیشترین تشابه بین جدایه‌های ۵۷/۹۹ (Betume2-SE) و ۵۳/۹۶ (Moju-PA) با ضریب تشابه ۷۷٪ و کمترین تشابه بین جدایه‌های ۶۵/۰۳ (Umbauba/SE-C) و ۵۹/۹۹ (Malhador/SE-C) با ضریب تشابه ۲٪ بود.

سویم و همکاران (۲۰۱۲) تنوع و روابط ژنتیکی بین ۱۳ جدایه مختلف قارچ *B.bassiana* بومی ترکیه را با استفاده از نشانگر AFLP مورد ارزیابی قرار دادند. در مجموع ۱۶۳ باند در ۱۳ جدایه مختلف قارچ بدست آمد که ۹۷ باند (۵۹/۵۱ درصد) پلی‌مورف و ۶۶ باند (۴۰/۴۹ درصد) مونومورف بودند. بر اساس دندروگرام حاصل از این تحقیق، جدایه‌های مورد بررسی در ۳ گروه اصلی قرار گرفتند. در این گروه-بندی دامنه تشابه ژنتیکی برای این جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد ۹۸-۲۶ ٪ بود. بیشترین تشابه بین جدایه‌های KTU-22 و KTU-8 و همچنین KTU-23 و KTU-8 با ضریب تشابه ۹۶٪ و کمترین تشابه بین جدایه‌های KTU-38 و KTU-57 با ضریب تشابه ۲۶٪ بود.

اتالا و همکاران (۲۰۱۴) تنوع ژنتیکی و تعیین فواصل ژنتیکی ۹ جدایه مختلف قارچ *Beauveria sp.* بومی مصر را با استفاده از ۱۲ نشانگر RAPD و ۵ نشانگر ISSR مورد بررسی قرار دادند که ۱۲ نشانگر RAPD در مجموع ۱۶۵ باند تولید کرد که ۹۷ باند (۵۸/۷۹ درصد) پلی‌مورف و ۶۸ باند (۴۱/۲۱ درصد) مونومورف بودند. میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر پرایمر ۱۳/۷۵ باند و میانگین باندهای پلی‌مورف ۸/۰۸ باند بود. دندروگرام جدایه‌های مورد بررسی را در فاصله ۱۹٪ در ۳ گروه اصلی قرار داد. در این گروه‌بندی دامنه تشابه ژنتیکی برای این جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد ۰/۸۷۶-۰/۵۲۶ بود. بیشترین تشابه بین جدایه‌های B.9 و B.8 با ضریب تشابه ۰/۸۷۶ و کمترین

تشابه بین جدایه‌های B.5 و B.1 با ضریب تشابه ۰/۵۲۶ بود. ۵ نشانگر ISSR در مجموع ۵۷ باند تولید کرد که ۲۳ باند (۴۰/۳۵ درصد) پلی‌مورف و ۳۴ باند (۵۹/۶۵ درصد) مونومورف بودند. میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر پرایمر ۱۱/۴ باند و میانگین باندهای پلی‌مورف ۴/۶ باند بود. دندروگرام جدایه‌های مورد بررسی را در فاصله ۲۰٪ به ۳ گروه اصلی تقسیم کرد. در این گروه‌بندی دامنه تشابه ژنتیکی برای این جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد ۰/۹۶۷-۰/۶۲۵ بود. بر اساس تجزیه کلاستر داده‌های تلفیقی RAPD و ISSR، جدایه‌های مورد مطالعه در فاصله ۱۶٪ در ۳ گروه اصلی قرار گرفتند. در این گروه‌بندی دامنه تشابه ژنتیکی برای این جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد ۰/۹۰۷-۰/۵۶۷ بود. بیشترین تشابه بین جدایه‌های B.9 و B.8 با ضریب تشابه ۰/۹۰۷ و کمترین تشابه بین جدایه‌های B.9 و B.2 با ضریب تشابه ۰/۵۶۷ بود.

اوما دوی و همکاران (۲۰۰۶) تنوع و روابط ژنتیکی بین ۲۲ جدایه مختلف قارچ *B.bassiana* جمع-آوری شده از ۹ کشور مختلف را با استفاده از ۱۰ نشانگر AFLP مورد ارزیابی قرار دادند. ۶ پرایمر محصولات ضعیف و مبهم تولید کردند که دور ریخته شدند و در نهایت ۴ پرایمر محصولات روشن، چندشکل و قابل تکرار تکثیر کردند که برای آنالیز بیشتر انتخاب شدند. ۴ پرایمر توانست در مجموع ۱۹۴ باند در ۲۲ جدایه مختلف قارچ تولید کنند که ۱۹۱ باند (۹۸/۵ درصد) پلی‌مورف و ۳ باند (۱/۵ درصد) مونومورف بودند. میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر پرایمر ۴۸/۵ باند و میانگین باندهای پلی‌مورف ۴۷/۷۵ باند بود. تشابه ژنتیکی در بین ۲۲ جدایه مختلف قارچ *B.bassiana* فقط ۱۱ درصد مشاهده شد. دندروگرام جدایه‌های مورد بررسی را در فاصله ۱۲٪ در ۲ گروه بزرگ قرار داد. نتایج این پژوهش نشان داد که سطح بالایی از تنوع ژنتیکی (۹۸/۵ درصد) با استفاده از پرایمرهای AFLP در قارچ *B.bassiana* وجود دارد.

با توجه به اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات، در این تحقیق پس از جداسازی قارچ *B.bassiana* از مزارع، نخلستان، باغات، مناطق جنگلی و سبزی‌کاری در شهرستان‌های اهواز

(استان خوزستان) و شاهرود (استان سمنان) به بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR خواهیم پرداخت.

# فصل سوم

# مواد و روش‌ها

این فصل شامل مواد مورد استفاده، تجهیزات آزمایشگاهی، جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی جدایه-های مختلف قارچ بیماری‌زای *B. bassiana*، بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی نرخ رشد، شمارش کنیدی تولیدی و قدرت جوانه‌زنی و بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها، مطالعات مولکولی، محلول‌های مورد نیاز، بررسی کمیت و کیفیت DNA، تجزیه‌های چند متغیره آماری و تجزیه داده‌ها می‌باشد که در ادامه به توضیح مراحل ذکر شده در بالا خواهیم پرداخت.

### ۳-۱- مواد

عصاره مخمر، آگار، محیط کشت SDA، محیط کشت PDA، سیکلوهگزامید، Tween 80، کلرامفنیکل، دودین، کریستال ویولت، اسید لاکتیک، استرپتومایسین، پپتون، سدیم هیدروکسید، اسید کلریدریک، اسید بوریک، Tris-HCl، سدیم کلرید، EDTA، پودر CTAB، PVP، آمونیوم استات، روغن معدنی، کلروفرم، ایزوآمیل الکل، بتامرکاپتواتانول، ایزوپروپانول، دکستروز، سدیم هیدروکسید، سدیم دودسیل سولفات، اتانول، گلیسرول و آگارز از شرکت کیمیا تجهیز پارس تهران، میکروتیوب‌های ۲ و ۱/۵ میلی‌لیتری، سرسمپلرهای زرد، آبی و سفید، DNase Free Deionized water، Ribonuclease A، Gene Ruler 100bp و پتری‌دیش‌های شیشه‌ای و پلاستیکی از شرکت سپاهان طب اصفهان، Taq DNA Master Mix از شرکت ویراژن (تهران) و Loading dye از شرکت سیناژن (تهران) تهیه شد. تمامی مواد مورد استفاده دارای درجه خلوص بیولوژی مولکولی بود. پرایمرهای عمومی و ISSR از شرکت تکاپو زیست تهران تهیه شد.

### ۳-۲- تجهیزات آزمایشگاهی

هود میکروبی Farpajouh (تهران، ایران)، اتوکلاو Rozhin Teb (تهران، ایران)، آون و انکوباتور

Heraeus (هانوآ، آلمان)، ورتکس DENA Medical Industry (تهران، ایران)، ترموسایکلر TaKaRa (اُتسو، ژاپن)، سانتریفیوژ Eppendorf (سنت لوئیس، امریکا)، مایکروویو LG (سئول، کره جنوبی)، حمام آب گرم DENA Medical Industry (تهران، ایران)، ژل داک QUANTUM ST4 (سوبیا، آلمان)، ترانس ایلومینیتور Zhihat Teb Azma (تهران، ایران)، هات پلیت Heidolph (نورنبرگ، آلمان)، لام هموسیتومتر از شرکت Neubauer Improved Bright-Line (هامبورگ، آلمان)، میکروسکوپ نوری و بنی‌کولار Olympus (توکیو، ژاپن)، سمپلر ۱۰µl، ۱۰۰µl و ۱۰۰۰µl Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، pHمتر Metrohm (پلیکان کریک، آمریکا)، یخچال، فریزر ۲۰- پارس (تهران، ایران)، هود شیمیایی Farpajouh (تهران، ایران)، اتاقک رشد Grouc (تهران، ایران)، ترازو SARTORIUS (گوتینگن، آلمان) در این پایان‌نامه مورد استفاده قرار گرفت.

### ۳-۳- جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی جدایه‌های مختلف قارچ بیماری‌زای *B. bassiana*

این مرحله شامل نحوه نمونه گیری از خاک، دستورالعمل پرورش پروانه موم‌خوار به عنوان طعمه، جداسازی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana*، خالص‌سازی جدایه‌ها جهت آماده‌سازی برای اقدامات مولکولی، نام‌گذاری جدایه‌های به‌دست آمده و مشاهده میکروسکوپی کنیدی‌ها جهت شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* است.

#### ۳-۳-۱- جمع‌آوری نمونه‌های خاک

قارچ‌های بیماری‌زای حشرات به طور طبیعی بر روی میزبان‌های حشره‌ای خود قرار دارند، بنابراین نمونه‌برداری از حشرات میزبان سبب بدست آوردن اطلاعات در مورد دامنه‌ی میزبانی و شیوع گونه-های قارچ به عنوان بیمارگرها در جمعیت طبیعی حشرات میزبان می‌شود. اما تعداد زیادی از قارچ‌های بیماری‌زای حشرات فقط مدت زمان کوتاهی از چرخه‌ی زندگی خود را بر روی میزبان‌های حشره‌ای

بوده و بقیه‌ی دوره زندگی خود به صورت کنیدی و یا اسپورهای استراحتی در خاک و در مجاورت لاشه‌ی میزبان می‌گذرانند. حشرات مرده بر سطح خاک افتاده و یک منبع قارچی را در محیط خاک مهیا می‌کنند [میلینگ، ۲۰۰۷]. بنابراین خاک یک محیط بسیار خوب و منبع ذخیره مهم و اصلی برای قارچ‌های بیماری‌زای حشرات می‌باشد و آنها را در برابر اشعه UV محافظت می‌کند [سان و لیو، ۲۰۰۸]. وجود و پایداری قارچ‌های بیماری‌زا می‌تواند در نتیجه عملیات کشاورزی مثل تاریخ کشت، کاربرد آفتکش‌ها و کودها تحت تاثیر قرار بگیرد [سوسا-گومز و همکاران، ۲۰۰۱]. در اثر باران و باد، عملیات خاک‌ورزی و همچنین فعالیت حشرات اسپورهای قارچ‌ها به مناطق مجاور گسترده می‌شوند [میلینگ و الینبرگ، ۲۰۰۶]. بنابراین نمونه‌برداری از خاک و بررسی قارچ‌ها در آنها می‌تواند اطلاعات زیادی را در مورد قارچ‌های بیماری‌زای حشرات به ما ارائه نماید [میلینگ، ۲۰۰۷]. برای جداسازی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات از خاک می‌توان از سه روش طعمه حشره‌ای، روش عصاره‌گیری از خاک و استفاده از ریشه گیاهان گرامینه (اندوفیت[1]) استفاده نمود. از آنجا که خاک محل زندگی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد استفاده از روش عصاره‌گیری، انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها نظیر باکتری‌های خاک‌زاد، نماتدها، قارچ‌های بیماری‌زا و ساپروفیت بر روی محیط کشت تشکیل کلنی می-دهند که کار شناسایی مورفولوژیکی و جداسازی را سخت می‌نمایند. قارچ‌های بیماری‌زای حشرات می‌توانند درون ریشه گیاهان گرامینه به‌صورت اندوفیت زندگی کنند [وایرِبک و همکاران، ۲۰۱۱] اما جداسازی آن‌ها مشکلات زیادی را در پی دارد لذا از روش طعمه حشره‌ای استفاده گردید هر چند که این روش مستلزم پرورش حشره‌ای چون پروانه موم‌خوار است [میلینگ، ۲۰۰۷]. حساس‌ترین روش آزمایشگاهی جداسازی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات به خصوص *Beauveria* و *Metarhizium* روش طعمه حشره‌ای می‌باشد [زیمرمن، ۱۹۸۶؛ وانینِن، ۱۹۹۶]. جمع‌آوری تعداد کافی نمونه خاک که

[1]. Endophyte

پوشش مناسبی از جمعیت قارچ باشد امری ضروری است [آسن‌سیو و همکاران، ۲۰۰۳]. نمونه‌گیری از خاک، از مناطق مختلف شهرستان اهواز در استان خوزستان و همچنین از مناطق مختلف شهرستان شاهرود در استان سمنان انجام پذیرفت و از هر منطقه به جمع‌آوری نمونه خاک اقدام شد که این مناطق در جدول ۱ ضمیمه آورده شده است. با توجه به اینکه ثابت شده است که قارچ‌های بیماری-زای حشرات متناسب با پوشش گیاهی هر منطقه در خاک توزیع می‌شوند نمونه‌گیری‌ها از منطقه رایزوسفری انجام شد [وایربِک و همکاران، ۲۰۱۱]. نحوه نمونه‌گیری بدین شکل بود که سه نمونه خاک از مرکز و دو نمونه خاک از حاشیه گرفته شد و به ثبت مختصات جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا اقدام گردید. برای هر نمونه در کنار ریشه گیاه یا درخت گودالی به عمق ۳۰ سانتی‌متر حفر شده و خاک این عمق با یکدیگر مخلوط شده و سپس حجمی معادل ۱۰۰ گرم در پلاستیک ریخته شده و درب پلاستیک بسته می‌شد. مختصات نمونه بر روی کیسه پلاستیکی ثبت می‌گردید و بعد از انتقال نمونه‌ها به انسکتاریوم دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود در جداسازی به‌کار برده شدند (شکل ۳-۱). تعداد جدایه‌های بدست آمده و مختصات جغرافیایی آنها در جدول۲ ضمیمه آورده شده است.

شکل ۳-۱: جمع‌آوری نمونه‌های خاک. الف: نمونه خاک جمع‌آوری شده و بسته‌بندی شده ب: حفر گودال به عمق ۳۰ سانتی‌متر در مجاورت ریشه درخت

### ۳-۳-۲- روش طعمه حشره‌ای

در این روش قارچ‌های موجود در خاک به وسیله‌ی روش طعمه حشره‌ای جداسازی شدند. این روش اولین بار توسط زیمرمن[1] در سال ۱۹۸۶ به عنوان یک روش حساس برای یافتن طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زا در نمونه‌های خاک معرفی شد. در این روش از حشره‌ای استفاده می شود که بیشترین حساسیت را به قارچ بیماری‌زا داشته باشد، لذا حشره‌ای که در این روش استفاده شد، لارو پروانه مومخوار بزرگ زنبور عسل *G. mellonella* بود [تونینگا و همکاران، ۲۰۰۹]. بنابراین در ابتدا باید جمعیت مناسبی از لاروهای پروانه مومخوار در آزمایشگاه پرورش داد.

### ۳-۳-۳- پرورش پروانه مومخوار

پروانه مومخوار (*G. mellonella*) جزء معدود حشراتی است که در کندوهای زنبورعسل ایجاد خسارت می‌کند. ۵ سن لاروی دارند و از ذخیره گرده گل‌ها در کندو و مومهای کهنه تغذیه می‌کنند. در شرایط مناسب به فاصله کوتاهی زنبوران عسل را وادار به مهاجرت می‌کنند و تمام محتویات کندو را به توده عظیمی از فضولات و کرم مبدّل می‌سازند. دوره زندگی این آفت شامل تخم، ۵ سن لاروی، شفیره و حشره کامل می‌باشد. حشرات کامل به‌طول ۴۱-۳۰ میلی‌متر بوده و در اردیبهشت تا مهر در مناطق معتدل به پرواز در می‌آیند.

علاوه بر حساسیت بالای پروانه مومخوار زنبور عسل به قارچ‌های بیماری‌زای حشرات، پرورش راحت و کم هزینه‌ی این حشره در شرایط آزمایشگاهی یکی از دلایل مهم برای استفاده از آن برای جداسازی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات است. این حشره در شرایطی تکثیر زیادی دارد که دما و رطوبت کافی

[1]. Zimmermann

برایش فراهم باشد. در شکل ۳-۲ مراحل زندگی این حشره را ملاحظه می‌نمایید.

شکل ۳-۲: مراحل زندگی پروانه مومخوار. لارو (الف)، شفیره (ب) و حشره کامل (ج)

برای پرورش حشرات از غذای مصنوعی استفاده شد. دستورالعمل تهیه این غذا به شرح ذیل می‌باشد: ۱پیمانه موم و نصف پیمانه آب مقطر استریل را با یکدیگر مخلوط کرده و روی حرارت گذاشته تا به نقطه جوش برسد، سپس این مخلوط را هم زده تا آب آن کاملا تبخیر شود سپس ۱ پیمانه گلیسرول - ۸۷٪، نصف پیمانه عسل را اضافه کرده خوب مخلوط می‌کنیم. ۲ پیمانه آرد سفید، ۱ پیمانه سبوس و ۱ پیمانه خمیرمایه را از قبل خوب با یکدیگر مخلوط کرده، به مواد درون ظرف اضافه می‌کنیم. عمل هم‌زدن به مدت ۱۰ دقیقه بر روی حرارت ادامه یافته سپس خمیر به‌دست‌آمده کاملا ورز داده شد. در ظروف پرورش گالریا (ظروف پلاستیکی با ابعاد ۲۰× ۱۵× ۳۰ سانتی‌متر دارای دریچه توری به جهت هوادهی)، لایه‌ای از این مواد ریخته سپس نواری از تخم را بر روی آن قرار داده و روی آن را با لایه‌ای از موم می‌پوشانیم. ظروف حشرات را در اتاقک رشد با دمای۱ ± ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۳ ± ۸۵٪ نگهداری می‌نماییم. بعد از گذشت ۷ روز تخم‌ها تفریخ شده و لارو سن اول که بسیار کوچک است شروع به تغذیه از موم می‌کند. در تمام این مراحل بخشی از دهانه ظروف با تور سیمی ضخیم و محکم پوشانیده شد تا هوادهی ظروف تامین گردد.

شایان ذکر است که به منظور تهیه اولیه لارو، تعدادی شفیره و حشرات کامل پروانه‌ی مومخوار از آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشگاه تهران واقع در پردیس کرج، آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد و همچنین از روستاهای اطراف شهرستان شاهرود تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. شفیره‌ها به همراه موم در جعبه‌های پلاستیکی گذاشته شدند. پروانه‌ها پس از بیرون آمدن از شفیره‌ها، تخم-گذاری کرده و تخم‌ها به جعبه‌های پلاستیکی حاوی غذای مصنوعی منتقل شدند. تعدادی از این تخم‌ها جهت تداوم پرورش و استحصال حشرات کامل در جعبه‌های جداگانه پرورش داده شدند و سایر تخم‌ها جهت پرورش لاروها تا سنین ۳ و ۴ جهت طعمه گذاری برای نمونه‌های خاک مورد استفاده قرار گرفتند [میلینگ، ۲۰۰۷]. (شکل ۳-۳).

شکل ۳-۳: پرورش لارو پروانه مومخوار و رهاسازی لارو بر روی خاک.

### ۳-۳-۴- جداسازی *B.bassiana* از خاک

در این تحقیق برای جداسازی قارچ *B.bassiana* از روش طعمه حشره‌ای استفاده شد که در ذیل روش را به‌طور اختصار توضیح می‌دهیم. در روش طعمه حشره‌ای، میزان ۲۰ گرم از هر نمونه خاک با الک ۱ میلی‌متری غربال و در پتری‌دیش‌های ۹۰ میلی‌متری ریخته شد. پتری‌دیش‌ها را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شده بودند و تعداد ۱۰ عدد لارو گالریا در سنین ۳ یا ۴ را در هر پتری قرار داده و پتری‌ها را با پارافیلم درزگیری و این ظروف در دمای ۱ ± ۲۷ درجه سانتی‌گراد و با رطوبت نسبی ۵ ± ۷۰ درصد داخل اطاقک رشد و در شرایط تاریکی نگهداری شد. همچنین برای جلوگیری از تولید پیله[1] تیمار گرما روی لاروها انجام شد [میلینگ، ۲۰۰۷].

به‌دلیل این‌که اسپورهای قارچ برای جوانه‌زنی به رطوبت نیاز دارند لذا برای تامین رطوبت پس از انتقال خاک به پتری‌دیش، میزان ۱۰-۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در سرتاسر پتری‌دیش پخش شد [سان و لیو، ۲۰۰۸].

در روزهای اولیه نمونه‌ها جهت تماس بیشتر لاروها با خاک تکان داده شدند. با مشاهده لاروهای آلوده، برای جداسازی جدایه‌های مختلف قارچ *B.bassiana*، لاروهای آلوده که به رنگ سفید درآمده بودند و یا نمونه های مشکوک به قارچ را پس از چند روز که قارچ به خوبی به درون لارو نفوذ کرده باشد را با الکل اتیلیک ۹۶ درصد و کلراکس ۳ درصد به مدت ۱ دقیقه ضدعفونی سطحی و با آب مقطر استریل ۳ بار آبشویی شدند. لاروهای مرده ضدعفونی شده بطور جداگانه داخل تشتک‌های پتری‌دیش شیشه‌ای استریل ۱۰ سانتی‌متر، حاوی کاغذ صافی استریل مرطوب قرار داده شده، سپس در دمای ۱ ± ۲۷ درجه سانتیگراد و با رطوبت نسبی ۵ ± ۷۰ درصد داخل اطاقک رشد و در شرایط تاریک انتقال داده شدند. پس از ۴۸ ساعت تا ۷۲ ساعت روی بدن لاروهای آلوده، قارچها شروع به

[1]. Webbing

رشد میسلیومی کرده و از پنج تا هفت روز بعد، اسپورزایی روی بدن لاروها انجام شد. در جدول ۱ ضمیمه تعداد لاروهای آلوده شده به قارچ *B.bassiana* و تعداد جدایه‌های به‌دست آمده از این لاروها آورده شده است.

### ۳-۳-۵- جداسازی جدایه‌های قارچی

لارو آلوده به قارچ *Beauveria* (شکل ۳-۴) در محیط خاک در معرض قارچ‌های دیگر و باکتری‌هایی قرار دارد که هنگام انتقال کنیدی یا میسیلیوم *Beauveria* بر روی محیط کشت، می‌توانند محیط کشت اصلی را آلوده کنند. در محیط کشت می‌توان باکتری‌ها را با آنتی بیوتیک‌هایی مانند کلرامفنیکل[1]، تتراسایکلین، استرپتو مایسین و کریستال ویولت[2] و همچنین قارچ‌ها را با آنتی بیوتیک-هایی مانند سیکلوهگزامید[3] و دودین[4] کنترل کرد. لازم به ذکر است که موادی نظیر سیکلوهگزامید، کریستال ویولت و دودین قابلیت اتوکلاو شدن را دارند و لذا قبل از اتوکلاو به محیط‌کشت افزوده می-شوند. یکی از موانع جدی برای رشد قارچ‌های بیماری‌زای حشرات در محیط کشت، سرعت رشد نسبتاً کم این قارچ‌ها در مقایسه با قارچ‌های فرصت طلب ساپروفیت است. بنابراین محیط‌کشت انتخابی مناسب و کارا برای جداسازی یک گونه قارچی باید دارای منبع غذایی[5] و مواد ضد میکروبی[6] (یعنی قارچ‌کش و آنتی‌بیوتیک) در غلظت مناسب باشد تا بتواند موجب رشد قارچ هدف در برابر رشد قارچ-های دیگر شود [یانگ شین و همکاران، ۲۰۱۰؛ لوز و همکاران، ۲۰۰۷] لذا برای جداسازی قارچ ۳ نوع

[1]. Chloramphenicol
[2]. Crystal Violet
[3]. Cyclohexamide
[4]. Dodine
[5]. Nutrient Source
[6]. Antimicrobial

محیط‌کشت SDAY[1] انتخابی دارای مواد مختلف ضد میکروبی تعریف شد که محیط اول دارای کلرامفنیکل، سیکلوهگزامید و اسید لاکتیک بود، محیط دوم دارای اسید لاکتیک و کلرامفنیکل، و محیط سوم دارای کریستال ویولت، دودین [لیو و همکاران، ۱۹۹۳] و سیکلوهگزامید بود.

به‌علت سرعت رشد کمتر قارچ‌های بیماری‌زای حشرات در مقابل قارچ‌های ساپروفیتی نظیر تریکودرما و آسپرژیلوس، محیط‌کشت دیگری بر مبنای بررسی‌های صورت گرفته توسط یانگ‌شین و همکاران [یانگ شین و همکاران، ۲۰۱۰] با کمی تغییرات تعریف شد. محیط‌کشت چهارم شامل PDA[2] غنی-شده با سیکلوهگزامید (۰/۵ گرم بر لیتر)، دودین ۶۵ درصد (۰/۵ گرم بر لیتر)، کلرامفنیکل (۰/۲ گرم بر لیتر)، کلرید مس[3] (۰/۳ گرم بر لیتر) و کریستال‌ویولت (۰/۰۲ گرم بر لیتر) بود که میسلیوم‌های قارچی و در برخی موارد به‌دلیل عدم تولید میسلیوم بر روی لارو، اسپورها با کمک خلال‌دندان استریل به محیط‌کشت‌های تعریف شده انتقال یافتند (این مواد به عنوان ترکیبات ضدباکتریایی[4] و ضدقارچی[5] به‌کار برده شده‌اند). استفاده از محیط‌کشت اختصاصی اخیر سبب کاهش آلودگی پتری‌دیش‌های کشت‌شده گردید.

کاربرد غلظت‌های مختلف دودین در محیط‌کشت به علت توانایی تحمّل[6] قارچ‌های بیماری‌زا به خصوص *Beauveria spp.* و *Metarhizium spp.* به این قارچ‌کش می‌باشد در صورتیکه قارچ‌های غیر بیماری‌زا[7] از این قابلیت تحمّل برخوردار نیستند اما باید گفت تمامی گونه‌های *Beauveria* میزان تحمّل برابری نسبت به دودین ندارند [گوینوسی و همکاران، ۲۰۱۲؛ رنجل و همکاران، ۲۰۱۰].

با رشد قارچ‌ها بر روی محیط کشت، برای شناسایی جنس از تمامی جدایه‌ها، اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید و با استفاده از کلید شناسایی قارچ‌ها مشخص شد که تمامی جدایه‌های بدست‌آمده

1. Sabroud- Dextrose- Agar + Yeast Extract
2. Potato- Dextrose- Agar
3. $CuCl_2$
4. Antibacterial
5. Antifungal
6. Tolerance
7. Non- Entomopathogenic Fungi

مربوط به جنس *Beauveria* می‌باشد [هامبر، ۱۹۹۸].

شکل۳-۴: نمایی از قارچ *Beauveria* روی لارو پروانه مومخوار زنبور عسل و محیط کشت. (الف) رهاسازی لارو پروانه مومخوار بر روی محیط خاک جهت آلوده شدن به قارچ *Beauveria*. (ب) رشد قارچ *Beauveria* پس از انتقال از لارو آلوده بر روی محیط کشت انتخابی.

### ۳-۳-۶- خالص‌سازی جدایه‌های مختلف *B.bassiana*

با جداسازی جدایه‌های قارچی، از کلنی‌های چنداسپوری، کلنی‌های تک‌اسپوری تهیه شد بدین طریق که مقداری اسپور از هر جدایه را به درون لوله آزمایش اتوکلاو شده حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون ۰/۰۲ درصد توئین ۸۰ (نوعی سورفاکتانت بوده و سبب از هم‌گسیختکی اسپورها می‌شود) انتقال داده شد و پس از دو دقیقه ورتکس، حجمی معادل ۱میلی‌لیتر را به لوله دوم انتقال داده شد [اِل دمیر، ۲۰۰۶] و بدین روش برای هر جدایه، سوسپانسیونی با $10^{-3}$ اسپور آماده گردید و مقدار ۱ میلی‌لیتر از

این سوسپانسیون به محیط آب-آگار[1] ۱/۲٪ انتقال یافت و پس از درزگیری پتری‌دیش‌ها با پارافیلم به انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳ روز منتقل شد. با مشاهده میسلیوم‌های تندش-شده (ستاره‌ای)، با استفاده از مارکر این میسلیوم‌ها را در پشت پتری‌دیش مشخص نموده و هر کدام از این تک‌کلنی‌ها به محیط کشت PDA (حاوی ۴۰ گرم دکستروز، ۱۵ گرم پپتون، ۱۰ گرم عصاره مخمر و ۱۲ گرم آگار با اسیدیته ۶/۳) انتقال داده شد. تشتک‌های پتری‌دیش مواد غذایی فوق در دمای ۱ ± ۲۷ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵ ± ۷۰ درصد و شرایط تاریک قرار گرفتند تا پرگنه قارچ تشکیل شود. پس از گذشت ۲ هفته، جدایه‌های خالص بدست آمد. کلیه‌ی مراحل روش تک اسپورگیری در شرایط استریل انجام شد.

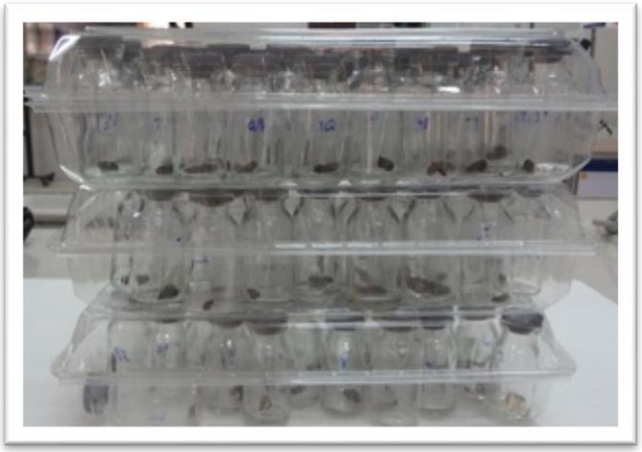
در واقع از آنجا که ممکن است لارو توسط گونه‌های مختلف یا جدایه‌های مختلف قارچ آلوده شود، بنابراین به منظور رسیدن به یک گونه یا یک جدایه، از روش تک اسپورگیری استفاده شد. نام و مشخصات جدایه‌های بدست آمده در ضمیمه ۲ ارائه شده است.

برای حصول اطمینان از پایداری طولانی‌مدت جدایه‌ها و عدم آلودگی و از دست دادن آنها، علاوه بر بانک قارچ اولیه خالص[2]، به تولید بانک قارچ ثانویه[3] با استفاده از لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت PDA اقدام گردید. پس از اتوکلاو نمودن لوله‌های حاوی محیط‌کشت، لوله‌ها را با زاویه ۳۰ درجه قرار دادیم تا سطح تماس افزایش یابد. جهت کاهش میزان از دست دادن جدایه‌ها، لاروهای آلوده به شیشه‌های پنی‌سیلین استریل منتقل شد که اگر در حین خالص‌سازی جدایه‌ها به هر دلیلی از جمله آلودگی باکتری‌ها و قارچ‌های ساپروفیتی مانند تریکودرما و آسپرژیلوس، بتوان مجدد آنها را کشت نمود. سومین بانک قارچ نیز در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (شکل ۳-۵).

[1]. Water- Agar (WA)
[2]. Purified First Fungi Bank
[3]. Secondary Fungi Bank

الف

ب



ج

شکل ۳-۵: نحوه‌ی تهیه بانک اولیه از لاروهای آلوده و بانک ثانویه از جدایه‌های بدست آمده. الف: بانک اولیه با استفاده از روش تک اسپورگیری. ب: آماده‌سازی لوله‌های آزمایش حاوی محیط‌کشت PDA جهت تهیه بانک ثانویه ج: قرار دادن هر لارو آلوده به قارچ درون شیشه‌های جداگانه و قرار دادن شیشه‌ها درون ظروف یک بار مصرف برای نگهداری در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد.

### ۳-۳-۷- نام‌گذاری جدایه‌های به‌دست آمده

نام‌گذاری جدایه‌های مختلف *B.bassiana* بدست آمده به‌صورت SHU.H.XX است که SHU برگرفته از نام دانشگاه شاهرود[1]، H برگرفته از حرف اول نام‌خانوادگی[2] جداکننده و XX پسوند دو رقمی برای ۵۰ جدایه خالص‌شده می‌باشد.

### ۳-۳-۸- مطالعه میکروسکوپی قارچ *B.bassiana*

مهم‌ترین دلیل استفاده از روش طعمه حشره‌ای تشخیص صحیح جنس قارچ *Beauveria* بود. این جنس بر روی جلد بیرونی حشره پوشش سفید رنگی از میسیلیوم را ایجاد می‌کند. البته گاهی تولید سینماتا (سلول های تولیدکننده کنیدی به شکل خوشه و یا پیچ خورده و یا منفرد، بی‌رنگ، کوتاه با پایه‌ای گرد یا فلاسک مانند در زیر میکروسکوپ) نیز می‌کند. این سلول‌ها در انتها به گونه‌ای گسترده شده‌اند که با ایجاد شاخه‌های کوتاه و پیوسته‌ی زیگزاگی تولید کنیدی می‌کند. برای تشخیص گونه-های قارچ‌های جداسازی شده، اقدام به تهیه‌ی اسلاید و رویت اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ نوری شد [هامبر، ۲۰۱۲]. جنس *Beauveria* دارای ۱۲ گونه می‌باشد [رِهنر و همکاران، ۲۰۱۱] که فراوان‌ترین گونه‌ی این قارچ *B. bassiana* می‌باشد. جهت شناسایی نمونه‌ها از چندین کلید تاکسونومی استفاده گردید [سَمسون و همکاران، ۱۹۸۸؛ پوینار و توماس، ۱۹۸۴؛ هامبر، ۱۹۹۷؛ هامبر، ۱۹۹۸].

مشخصاتی که برای شناسایی مورد استفاده قرار گرفتند شامل اندازه، رنگ و شکل اسپور، اتصال آنها به هیف، وجود یا عدم وجود دیواره‌ی عرضی و اندام اتصالی می‌باشد. به عنوان مثال در گونه‌ی *B. bassiana* شکل کنیدی کروی و اندازه کنیدی ۳/۵-۱/۵ میکرومتر می‌باشد. درحالیکه در گونه‌های دیگر اندازه کنیدی بین ۳ تا ۶ میکرومتر است [درآگانووا و همکاران، ۲۰۱۰]. در این مطالعه از تمامی

[1]. Shahrood University
[2]. Heidari

جدایه‌ها اسلاید تهیه شد و در نهایت، همه‌ی جدایه‌های مورد مطالعه *B. bassiana* تشخیص داده شدند.

نحوه تهیه اسلاید بدین گونه بود که پس از قرار دادن یک قطره‌ی کاتن بلو (به علت کوچک بودن اندازه کنیدی‌ها به رنگ کاتن‌بلو برای رنگ‌آمیزی نیاز است) بر روی لام، با استفاده از خلال دندان استریل از مرز بین محیط کشت و محل تولید میسیلیوم میزان کمی بافت قارچی برداشته و به آرامی با کاتن بلو مخلوط شد. در ادامه لامل را با زوایه ۴۵ درجه نسبت به لام با ملایمت قرار داده شد. برای ثابت شدن لامل بر روی لام از برق ناخن استفاده شد. برای مشاهده بهتر ابتدا بزرگنمایی را با کمترین میزان و پس از رفع تاری دید بزرگنمایی افزایش داده شد [هامبر، ۲۰۱۲].

### ۳-۴- بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana*

پس از تایید جنس *Beauveria* آزمایشاتی مانند اندازه‌گیری نرخ رشد[1]، شمارش تعداد کنیدی تولیدی و قدرت جوانه‌زنی تمامی جدایه‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت پذیرفت.

### ۳-۴-۱- آزمایش اندازه‌گیری نرخ رشد

جوانه‌زنی سریع و نرخ رشد بالا برای عوامل کنترل زیستی قارچی مزیت محسوب می‌شود زیرا این صفات در آلودگی سریع میزبان نقش دارند. عامل کلیدی در انتخاب جدایه‌های قارچی در برنامه کنترل زیستی، رشد سریع آن در دماهای مختلف است [لیو و همکاران، ۱۹۹۳].

در ابتدا، با استفاده از روش ترقیق مکرر اقدام به تهیه سوسپانسیون اسپور ($۱ \times ۱۰^{-۴}$ کنیدی/میلی لیتر) شد. ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون در پتری‌دیش استریل با ۱۵ میلی لیتر آب-آگار استریل

[1]. Growth Rate

پوشانده شد. پلیت مربوطه به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس در مقابل نور ۴ عدد کنیدی جوانه‌زده (طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار) را با ماژیک مشخص شدند و با استفاده از پیپت پاستور استریل با قطر مشخص (۵ میلی‌متر) هر کدام از کنیدی‌ها از محیط آب-آگار جدا شد و به مرکز پلیت حاوی محیط کشت PDA انتقال داده شدند. این عمل برای ۵۰ جدایه تکرار شد و تعداد ۲۰۰ عدد پلیت در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از ۷۲ ساعت اندازه گیری نرخ رشد به مدت ۱۶ روز آغاز (هر ۲۴ ساعت) شد. با توجه به قطر پیپت پاستور (۵ میلی‌متر) که برای انتقال قطعه‌ی آب-آگار استفاده شد، رشد شعاعی روزانه از این قطر کسر شد. شایان ذکر است که برای افزایش دقت در اندازه‌گیری از دو شاخص که به شکل متعامد پشت هر تکرار کشیده شده بود، استفاده شد [باجم و همکاران، ۲۰۰۸].

پس از اندازه‌گیری میزان رشد هر جدایه، برای محاسبه نرخ رشد از رابطه ۳-۱ [یودر و همکاران، ۲۰۰۹] استفاده گردید.

(رابطه ۳-۱)

$$K_r = (R_1-R_0)/ (t_1-t_0)$$

$K_r$= نرخ رشد

$R_1$= نرخ رشد نهایی (میلی‌متر)

$R_0$= نرخ رشد اولیه (میلی‌متر)

$t_1$= زمان نهایی (روز)

$t_0$= زمان اولیه (روز)

به علت حجم بالای داده‌ها، اطلاعات مربوط به میزان رشد روزانه به نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office, 2010) وارد گردید و نتایج در قالب طرح کاملاً تصافی در نرم‌افزار MSTATC مورد ارزیابی واقع شد.

### ۳-۴-۲- آزمایش شمارش تعداد کنیدی تولیدی

به منظور شمارش تعداد کنیدی تولیدی جدایه‌ها از تکرارهای آزمایش محاسبه نرخ رشد به علت فعّال بودن پس از گذشت ۱۶ روز از آغاز آزمایش محاسبه نرخ رشد بهره گرفته شد. بر پایه مقاله پتلامول و پریزِرتسن (۲۰۱۲) و اندکی تغییرات، با استفاده از پیپت پاستور سطح مشخصی (قطری معادل ۵ میلی‌متر) از بیرونی‌ترین ناحیه کلنی هر تکرار را برداشته در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۲ درصد توئین۸۰ ریخته و پس از ۲ دقیقه ورتکس، میزان ۲ میکرولیتر را بر روی لام هموسیتومتر ریخته و زیر میکروسکوپ تعداد اسپورها را برای هر جدایه شمارش کردیم. این آزمایش در ۴ تکرار صورت پذیرفت و نتایج در قالب طرح کاملاً تصافی در نرم‌افزار MSTATC مورد ارزیابی واقع شد.

### ۳-۴-۳- آزمایش زیست‌پذیری کنیدی[1] (قدرت جوانه‌زنی) جدایه‌ها

پس از پایان یافتن سنجش فاکتورهای نرخ رشد و شمارش اسپور، از تکرارهای موجود به دلیل فعال بودن جدایه‌ها برای آزمون جوانه‌زنی استفاده شد. در ابتدا، اقدام به تهیه‌ی سوسپانسیون با غلظت $۱\times۱۰^{۶}$ کنیدی/ میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسیتومتر شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون را بر روی لام حاوی محیط کشت PDA انتقال داده شد و لام را در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت یک لامل استریل را بر روی لام قرار داده شد و در محیط این لامل تعداد ۱۰۰ کنیدیی که دارای لوله جوانه‌زنی با هر طولی که بودند و کنیدی‌هایی که فاقد لوله جوانه‌زنی بودند شمارش شدند و برای هر جدایه درصد جوانه‌زنی مشخص شد [پتلامول و

[1]. Viability of Conidium

پریزِرتسن، ۲۰۱۲]. برای صحت شمارش، این عمل سه بار تکرار شد. درصد جوانه‌زنی با استفاده از رابطه ۳-۲ محاسبه شد.

(رابطه ۳-۲)

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

a= تعداد اسپور جوانه‌زده  b= تعداد اسپور جوانه‌نزده

### ۳-۵- بررسی بیماری‌زایی بر روی سوسک قرمز آرد (*Tribolium castaneum*)

سوسک قرمز آرد *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) حشره‌ای کوچک به طول ۴-۳ میلی‌متر به رنگ قرمز دارای قطعات دهانی جونده می‌باشد که آفتی شایع[1] و از حشرات مهم مواد انباری می‌باشد [باتا و اَبوصفی، ۲۰۰۵]. در این آزمایش، برای محاسبه نرخ مرگ‌ومیر آفت انباری *T. castaneum* توسط جدایه‌های مختلف *B. bassiana* ابتدا سوسپانسیونی با غلظت $۱\times ۱۰^{۸}$ کنیدی/ میلی‌لیتر برای هر جدایه تهیه گردید بدین‌طریق که برای تهیه سوسپانسیون $۱\times ۱۰^{۸}$ کنیدی/ میلی‌لیتر درون یک میکروتیوب حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۲ درصد توئین ۸۰، مقداری اسپور ریخته و با استفاده از لام هموسیتومتر، شمارش اسپورها صورت گرفت. با جایگذاری غلظت $۱\times ۱۰^{۸}$ کنیدی/ میلی‌لیتر درون رابطه ۳-۳ ($X = 250000\ A$) می‌توان تعداد اسپوری که بایستی در یک مربع ۴ × ۴ لام شمارش نمود بدست می‌آید.

برای بررسی بیماری‌زایی هر جدایه ۳ تکرار در نظر گرفته شد و با تهیه سوسپانسیون، تعداد ۳۰ حشره کامل را به مدت ۲۰ ثانیه درون سوسپانسیون فرو برده سپس در پتری‌دیش‌های شیشه‌ای استریل دارای کاغذ صافی استریل رها نمودیم و پتری‌دیش‌ها را به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. بعد از گذشت این مدت زمان، حشرات کامل را درون پتری‌دیش‌های حاوی

[1]. Cosmopolitan

مواد غذایی (مخلوط آرد گندم استریل، گلیسرین ۱۵٪، عسل، سبوس گندم استریل) رها نمودیم و در ژرمیناتور با دمای ۱ ± ۲۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۳ ± ۸۵٪ و دوره‌ی نوری ۱۶:۸ (تاریکی : روشنایی) به مدت ۱۶ روز قرار دادیم. چهارمین تکرار برای هر جدایه، تیمار حشرات با آب مقطر استریل بود. بازدید به‌طور روزانه صورت پذیرفت و با مشاهده مرگ حشره‌ای، حشره مرده را به پتری-دیش استریل دارای کاغذ صافی استریل انتقال دادیم تا اگر حشره در اثر فعالیت قارچ یا دیگر میکروارگانیسم‌ها از بین رفته باشد، مشخص گردد. در صورت مرگ‌ومیر حشرات شاهد، میزان مرگ‌و-میر با رابطه ابوت[1] (۳-۴) [ابوت، ۱۹۲۵] تصحیح گردید و جدایه‌ها از منظر قدرت بیماری‌زایی طبقه-بندی شدند.

(رابطه ۳-۴)

$$\text{Corrected mortality (\%)} = 1-(\text{n in T after treatment} / \text{n in CO after treatment}) \times 100$$

Corrected mortality (%) = درصد مرگ‌ومیر اصلاح شده

n = جمعیت حشرات  T = تیمار شده  CO = شاهد

ارزیابی داده‌های حاصل از هر جدایه با نرم‌افزار MSTATC بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت.

### ۳-۶- مطالعات مولکولی

این مرحله شامل آماده‌سازی نمونه، استخراج DNA از جدایه‌های رشد یافته بر روی محیط کشت مایع YPD با استفاده از روش CTAB و تکثیر پرایمرهای ISSR با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشد. تمامی مراحل در شرایط استریل (سترون) به انجام رسید.

[1]. Abbott's Formula

### ۳-۶-۱- آماده‌سازی نمونه

برای مطالعه در زمینه تنوع ژنتیکی، تفکیک گونه‌ها و شناسایی آنها، با استفاده از پرایمرهای اختیاری[1] یا پرایمرهایی برای نواحی ژنومی هدف (تلومر[2]ها، فواصل ریبوزمی[3])، DNA بایستی از کشت‌های تک-اسپوری به‌دست آید. از آنجایی‌که قارچ‌های هیفومیست از لاشه[4] حشرات یا خاک به‌دست می‌آیند از این‌رو بایستی خالص گردند که این امر توسط سری رقّت[5] صورت می‌پذیرد. جداسازی DNA با وزن مولکولی بالا و خلوص بالا در هر مطالعه مولکولی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات مهم است. اگرچه روش‌های مختلفی برای استخراج DNA ژنومی وجود دارد اما اصول و ضوابط آنها یکسان است و شامل حذف دیواره سلولی قارچ و رها شدن اسید نوکلئیک، جدا شدن اسید نوکلئیک از پروتئین‌ها و دیگر مواد و تیمار نمونه‌ها با RNase می‌باشد [کاستریلو و هامبر، ۲۰۰۸].

### ۳-۶-۲- استخراج DNA با استفاده از روش CTAB

مواد و وسایل مورد نیاز برای استخراج DNA شامل: بافر استخراج CTAB، تیوب‌های ۲ و ۱/۵ میلی-لیتری، سرسمپلر، سمپلر، هاون و دسته هاون، نیتروژن مایع، سانترفیوژ یخچال‌دار، اتانول ۹۶٪ و ۷۰٪ سرد، آمونیوم استات ۷/۵ مولار، حمام آب گرم، کلروفرم[6] و ایزوآمیل الکل[7] (به نسبت ۱:۲۴)، آب مقطر استریل و ایزوپروپانول سرد[8] می‌باشند. تعداد ۲۶ جدایه بر پایه آزمایش اولیه نرخ رشد، شکل و رنگ کلونی بر روی محیط کشت انتخاب شدند. هر یک از این جدایه‌های خالص در ۵۰ میلی‌لیتر

1. Arbitrary Primers
2. Telomer
3. Ribosomal Spacers
4. Cadaver
5. Serial Dilution
6. Chloroform
7. Isoamyl alcohol
8. Cold Isopropanol

محیط مایع YPD[1] (۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۱۰ گرم در لیتر پپتون، ۲۰ گرم در لیتر گلوکز) کشت گردیدند [وایربِک و همکاران، ۲۰۱۱] و به مدت ۴-۳ روز در انکوباتور با دمای ۱ ± ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میسلیوم‌های تولیدی را به پتری‌دیش‌های استریل دارای کاغذ صافی اتوکلاو شده جهت حذف محیط‌کشت منتقل شدند. قرار دادن میسلیوم‌ها بر روی کاغذ صافی سبب شد تا میزان رطوبت میسلیوم‌ها کاهش یابد و کوبیدن آنها در ازت مایع ساده‌تر شود. بعد از گذشت یک ساعت، نمونه‌ها با کمک هاون چینی در ازت مایع به خوبی کوبیده شدند. استخراج DNA به روش CTAB[2] [پلازا و همکاران، ۲۰۰۴] استفاده شد. در ادامه، ۸۰۰ میکرولیتر بافر CTAB ۲٪ (جدول ۳-۱) و ۱۰۰ میکرولیتر SDS[3] ۱٪، ۲ میکرولیتر β-مرکاپتواتانول[4] و ۲ میکرولیتر $RN_{ase}$ به میسلیوم کوبیده شده اضافه شد و میکروتیوب به مدت ۱ دقیقه ورتکس افقی گردید. سپس به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد، سپس اجازه داده شد تا در دمای اتاق خنک شوند، هم حجم مایع نمونه کلروفرم-ایزوآمیل الکل سرد (به نسبت ۲۴ به ۱) اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع شناور رویی به میکروتیوب جدید منتقل و به اندازه نصف حجم آن، آمونیوم استات ۷/۵ مولار و به اندازه دوسوم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید. تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا DNA به صورت غیرمحلول در آید. به منظور رسوب DNA، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. فاز محلول رویی دور ریخته شد و سپس ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ به رسوب اضافه گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و بعد از آن به مدت ۱ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل سه بار با اتانول -

[1].Yeast Extract- Peptone- Glucose Broth
[2]. Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)
[3]. Sodium Dodosil Sulfate (SDS)
[4]. β-Mercaptoethanol

۷۰٪ شستشو و به رسوب سفید DNA اجازه داده شد تا در هوای آزاد خشک شود. در نهایت ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه[1] به آن اضافه گردید و در دمای فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. برای مشاهده DNA استخراج شده الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE[2] با غلظت 1X صورت پذیرفته و پس از اتمام الکتروفورز، ژل با رنگ اتیدیوم بروماید[3] (۲۵ میکرولیتر در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) رنگ‌آمیزی شده سپس با آب مقطر رنگ‌های غیراختصاصی حذف شد و تصویربرداری صورت پذیرفت (شکل۳-۶).

جدول۳-۱: مواد مورد استفاده در تهیه بافر استخراج

| در ۱۰۰ میلی لیتر | غلظت (M) | مواد | نیاز به اتوکلاو |
|---|---|---|---|
| 100mM | 1 | Tris-HCl pH=8 | بله |
| 20mM | 0.5 | EDTA | بله |
| 1.4 mM | 5 | NaCl | بله |
| 2% | - | CTAB | خیر |
| 0.2% | - | mercaptoethanol | خیر |
| 1% | - | PVP40 | خیر |

در نهایت حجم بافر توسط آب دو بار تقطیر استریل به حجم ۱۰۰میلی‌لیتر و pH آن با استفاده از HCl به ۵ رسانده شد

شکل ۳-۶: الگوی الکتروفورزی DNAهای استخراج شده از ۲۶ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana*

[1]. Dionized Water
[2]. Tris Borate Ethylene Di-amin Tetra Acetate (TBE)
[3]. Ethidium Bromide

### ۳-۷- محلول‌های مورد نیاز

#### ۳-۷-۱- محلول تریس اسید کلریدریک ۱ مولار (Tris-HCl 1M, pH = 8):

مقدار ۱۲۱/۱ گرم تریس را در ۸۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر، حل کرده بعد از حل شدن کامل pH محلول که تقریبا (۱۱-۱۰/۵) می‌باشد به ۸ رسانده شد. تنظیم pH با استفاده از اسید کلریدریک غلیظ و در زیر هود انجام شد. در موقع تنظیم pH باید به این نکته توجه شود که اضافه کردن HCl باعث افزایش دما و کاهش pH محلول می‌شود، باید صبر کرد تا دمای محلول به دمای محیط برسد، اضافه کردن HCl را باید تا زمانی ادامه داد که pH محلول در دمای محیط به ۸ برسد. بعد از این مرحله، حجم محلول با آب دو بار تقطیر استریل به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده، اتوکلاو کرده و در یخچال نگهداری شد.

#### ۳-۷-۲- محلول اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ۰/۵ مولار (EDTA 0.5M, pH = 8):

مقدار ۱۸/۶۱۲ گرم EDTA در ۷۵ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل شد و با استفاده از یک همزن مغناطیسی بهم زده شد تا کاملاً حل شود. pH محلول با استفاده از سود ۱۰ مولار به ۸ رسانده شد، سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده، اتوکلاو کرده و در یخچال نگهداری شد.

#### ۳-۷-۳- محلول سدیم کلرید ۵ مولار (NaCl 5M):

مقدار ۲۹/۲ گرم NaCl در ۶۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل شد و سپس به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده، اتوکلاو کرده و در دمای اتاق نگهداری شد.

**۳-۷-۴- بافر Tris-HCl-EDTA (TE):**

مقدار ۵۰۰ میکرولیتر Tris–HCl یک مولار (pH =۸) و ۲۰۰ میکرولیتر EDTA نیم مولار (pH =۸) به ۹۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر اضافه کرده، حجم را با آب دوبار تقطیر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده، اتوکلاو کرده و در دمای اتاق نگهداری شد.

**۳-۷-۵- بافر TBE:**

بافر TBE به صورت استوک ×5 تهیه و نگهداری و به صورت استوک ×1 مصرف می‌گردد. برای تهیه استوک ×5 مقدار ۵۴ گرم Tris base، ۲۰ میلی‌لیتر از استوک (EDTA 0/5M, pH = 8) و ۲۷/۵ گرم اسید بوریک را با هم مخلوط کرده به حجم ۷۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. pH محلول به ۸ رسانده، سپس با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد.

**۳-۸- بررسی کمیت و کیفیت DNA**

به منظور تعیین خلوص و غلظت DNA استخراج شده از دو روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری استفاده گردید.

**۳-۸-۱- الکتروفورز ژل آگارز با دستگاه الکتروفورز افقی**

جهت بررسی کیفیت DNA ژنومی از نظر شکستگی و قطعه قطعه شدن بررسی DNA استخراج شده الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. جریان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه برقرار گردید.

### ۳-۸-۲- روش اسپکتروفتومتری

ساده‌ترین روش اندازه‌گیری غلظت DNA تخلیص شده استفاده از اسپکتروفتومتر است. حداکثر جذب نوری اسیدهای نوکلئیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر می‌باشد. روش کار به این صورت است که اگر اسید نوکلئیک (RNA یا DNA) در بافر TE یا آب مقطر حل شده باشد، ابتدا با محلول TE یا آب مقطر به عنوان شاهد دستگاه را صفر می‌کنیم. سپس جذب نمونه را می‌خوانیم. محلولی که نمونه در آن حل شده بایستی شفاف و یکنواخت باشد. بین غلظت RNA یا DNA و جذب نوری آن در ۲۶۰ نانومتر این رابطه وجود دارد:

جذب برابر با یک برابر است با غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای RNA یا DNA تک رشته‌ای و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای DNA دو رشته‌ای می‌باشد. شرط لازم در این موارد آن است که کیفیت DNA استخراج شده (نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به جذب در طول موج ۲۸۰) بین ۱/۸-۱/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر و کیفیت RNA استخراج شده بین ۲-۱/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر باشد.

### ۳-۹- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و تکثیر پرایمرهای ISSR

برای انجام واکنش PCR، از دستور العمل زیتکوویچ[1] و همکاران (۱۹۹۴) استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در جدول ۳-۲ آورده شده است. مواد مورد نیاز برای تکثیر پرایمرهای ISSR شامل مخلوط ۲۰ میکرولیتر PCR محتوی: ۱ میکرولیتر DNA الگوی تهیه شده، ۱ میکرولیتر پرایمر با غلظت 10 ppm، ۱۰ میکرولیتر Taq-PCR Master Mix و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه می‌باشد. پروتکل PCR با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۵ دقیقه آغاز گردید و ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۵۵-۴۵ درجه سانتی‌گراد: ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه) و ۷۲

[1]. Zietkiewicz

درجه سانتی‌گراد: ۶ دقیقه ادامه یافت. با اتمام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، میزان ۵ میکرولیتر از نمونه برای بررسی تکثیر پرایمرهای ISSR در الکتروفورز افقی مورد استفاده قرار گرفت. کیفیت باندهای تکثیری جدایه‌های مختلف *B. bassiana* حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز ۱/۳٪ بررسی گردید و نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰bp) به میزان ۶ µl در هر ژل برای شناسایی و امتیازدهی باندها مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که جهت اطمینان از تکرارپذیری الگوی باندی نشانگرها، واکنش PCR برای هر کدام از پرایمرهای ISSR برای کلیه جدایه‌های قارچی حداقل سه مرتبه تکرار گردید و فقط نشانگرهایی با باندهای تکرارپذیر رتبه‌دهی شد.

در این تحقیق تعداد ۳۰ پرایمر مورد استفاده قرار گرفت که بعد از رقیق‌سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پرایمرهای مورد استفاده در این پایان نامه با بررسی‌های انجام شده در بانک ژن و مرور مقالات، طراحی و انتخاب گردیدند و سعی گردید تا پرایمرهایی که در مطالعات قبلی چندشکلی بالایی در ژنوم قارچ نشان داده بودند استفاده گردد. جدول ۳-۲ اسامی پرایمرها، توالی و دمای اتصال آنها را نشان می‌دهد.

جدول ۳-۲: توالی و دمای اتصال پرایمرهای مورد استفاده

| پرایمر | دمای اتصال | توالی (3' → 5') | پرایمر | دمای اتصال | توالی (3' → 5') |
|---|---|---|---|---|---|
| UBC815 | 50 | $(CT)_8T$ | A7 | 51 | $(AG)_{10}T$ |
| UBC812 | 50 | $(GA)_8A$ | 809 | 54 | $(AG)_8G$ |
| UBC849 | 50 | $(GT)_8CG$ | 810 | 54 | $(GA)_8T$ |
| P1 | 48 | $(CT)_8RC$ | 825 | 50 | $(AC)_8T$ |
| P9 | 52 | $(TC)_8CA$ | 840 | 50 | $(GA)_8YT$ |
| P12 | 46 | $(GA)_8YT$ | 848 | 50 | $(CA)_8RG$ |
| P13 | 46 | $(AT)_8A$ | 849 | 50 | $(GT)_8YA$ |
| MS3 | 55 | $CA(CCA)_6CT$ | 857 | 50 | $(AC)_8YG$ |
| MS4 | 54 | $(CA)_{10}G$ | 873 | 48 | $(GACA)_4$ |
| MS7 | 55 | $(AG)_{10}G$ | BIS06 | 54 | $(GA)_6GG$ |
| MS8 | 55 | $(AG)_{10}C$ | BIS07 | 54 | $(TG)_8GT$ |
| MS11 | 55 | $(CT)_{10}G$ | BIS09 | 54 | $(AG)_8TC$ |
| MS12 | 46 | $(TC)_{10}C$ | BIS22 | 54 | $(GTG)_6$ |
| MS13 | 50 | $(GT)_{10}C$ | BIS27 | 54 | $(CTC)_4GC$ |
| MS14 | 55 | $(TG)_{10}C$ | BIS29 | 48 | $(AAG)_6$ |

### ۳-۹-۱- بررسی محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز

الکتروفورز محصولات PCR برای هر پرایمر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد (W/V) در بافر TBE با غلظت 1X انجام گرفت. برای تهیه ژل، پس از مخلوط کردن ۱/۳ گرم آگارز با ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE با غلظت 1X، نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه با جریان ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند. آنگاه ژل درون دستگاه عکس‌برداری[1] تحت اشعه ماوراء بنفش قرار گرفت و پس از مشاهده باندها، از ژل عکس تهیه شد.

### ۳-۱۰- اندازه‌گیری فواصل و تشابه‌های ژنتیکی

فواصل یا تشابه‌های ژنتیکی بین دو ژنوتیپ، جمعیت یا فرد را می‌توان بسته به نوع داده‌ها از روش‌های آماری گوناگونی محاسبه کرد. به منظور اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی بر مبنای داده‌های نشانگرهای مولکولی چندین روش مختلف معرفی گردیده است. معمول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی یا تشابه ژنتیکی که برای داده‌های نشانگرهای مولکولی بکار می‌روند شامل ضریب تشابه جاکارد، تطابق ساده و دایس می‌باشند. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، وجود و عدم وجود باند با اعداد یک و صفر مشخص شدند. استفاده از ماتریس تشابه می‌تواند به منظور شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌ها در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی بسیار موثر باشد. ضرایب تشابه از صفر تا یک متغیر است. در این ارزیابی زمانی که نشانگرها برای دو ژنوتیپ کاملا یکسان باشند، ضریب تشابه یک می‌شود و صفر حالتی است که تمام نشانگرها برای دو ژنوتیپ کاملا متفاوت باشند.

[1]. Gel Documentaion

## ۳-۱۱- تجزیه‌های چند متغیره آماری

یکی از بهترین راهکارهای طبقه‌بندی ذخایر توارثی و تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی بین افراد استفاده از الگوریتم‌های آماری چندمتغیره است. در تکنیک‌های تجزیه و تحلیل چند متغیره از تجزیه هم‌زمان چندین متغیر برای بررسی روابط بین افراد استفاده می‌شود. این تکنیک‌ها امروزه به طور گسترده‌ای برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی داده‌های مختلف از قبیل داده‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی یا نشانگرهای مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از بین این الگوریتم‌ها، تجزیه خوشه‌ای[1] و تجزیه به مولفه‌های اصلی[2] بیشتر از بقیه کاربرد دارند.

### ۳-۱۱-۱- تجزیه خوشه‌ای

تجزیه خوشه‌ای به گروهی از تکنیک‌های چند متغیره که هدف اولیه آن گروه‌بندی افراد می‌باشد اطلاق می‌شود. در این نوع تجزیه افراد مشابه از نظر صفات مورد بررسی در یک خوشه واحد کنار هم قرار می‌گیرند. در نتیجه دسته‌بندی کردن، افرادی که در یک خوشه قرار می‌گیرند دارای شباهت‌های زیاد و افرادی که در خوشه‌های جداگانه قرار می‌گیرند ناهمگن‌تر هستند. بنابراین اگر طبقه‌بندی به طور صحیح انجام گرفته باشد، افرادی که در یک خوشه قرار دارند در نمایش هندسی در کنار هم قرار گرفته و افرادی که در خوشه‌های جدا قرار دارند از نظر ژنتیکی دورتر خواهند بود.

در روش‌های طبقه‌بندی جهت گروه‌بندی، چند گروه از قبل تعیین شده، توسط داده‌های مورد مطالعه، مورد بررسی قرار می‌گیرند و یک فرد جدید بر اساس داده‌ها به یکی از گروه‌ها منتسب می‌شود. ولی در تجزیه خوشه‌ای هیچ اطلاعی از گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها وجود ندارد. در بین روش‌های تجزیه خوشه-ای، بیشتر از الگوریتم‌های مبتنی بر فاصله در تجزیه تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود. روش‌های مبتنی

[1]. Cluster Analysis
[2]. Prinicipal Component Analysis (PCA)

بر فاصله‌ها، ماتریس فاصله به عنوان ورودی مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند و خروجی به صورت درختی قابل ارائه می‌گردد. روش UPGMA[1] و روش وارد[2] بیشترین کاربرد را برای تجزیه خوشه‌ای دارند. سایر روش‌ها نیز مانند نزدیک‌ترین همسایه[3] و دورترین همسایه[4] توسط برخی از محققین برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی بکار برده می‌شود.

### UPGMA -۲-۱۱-۳

یک روش ساده برای خوشه‌بندی نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد و برای رسم درختچه‌های کوفنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد که منعکس‌کننده‌ی ساختار موجود در یک ماتریس تشابه است [لِگندره و همکاران، ۱۹۹۸].

### ۳-۱۱-۳- ضریب کوفنتیک[5]

یکی از روش‌های مقایسه کارایی الگوریتم‌های مختلف خوشه‌بندی، تخمین ضریب همبستگی کوفنتیک می‌باشد که در آن همبستگی بین ماتریس شباهت یا فاصله به عنوان ورودی تجزیه خوشه-ای با ماتریس کوفنتیک که بر اساس دندروگرام که به عنوان خروجی تجزیه می‌باشد برآورد می‌گردد. روشی که دارای بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک باشد می‌تواند به عنوان مناسب‌ترین روش تجزیه و تحلیل تلقی گردیده و بکار رود.

1. Unweighted Paris Group Method Alitmetic Average
2. Ward
3. Nearest Neighbour
4. Furthest Neighbour
5. Cophenetic coefficient

### ۳-۱۱-۴- تجزیه به مولفه‌های اصلی

تجزیه به مولفه‌های اصلی مانند تجزیه خوشه‌ای یکی دیگر از تکنیک‌های چند متغیره است که دارای کاربرد زیادی در تجزیه تنوع ژنتیکی دارد. این تکنیک را می‌توان برای نمایش دو بعدی پراکنش افراد بکار برد. تجمع افراد در یک ناحیه از پلات نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی آن افراد می‌باشد. PCA به عنوان روشی برای کاستن حجم داده‌ها به منظور روشن ساختن روابط بین دو یا چند متغیر و توجیه تغییرات کل داده‌های اصلی و اولیه به وسیله تعداد محدودی از متغیرهای جدید مستقل به نام مولفه های اصلی می‌باشد. این نوع دسته‌بندی اجازه نمایان شدن تفاوت‌ها را در بین افراد داده و مشاهده هم‌گروه را ممکن می‌سازد.

کاسته شدن حجم داده‌ها به وسیله تبدیل خطی داده‌های اصلی به متغیرهای مستقل جدیدی که به عنوان مولفه‌های اصلی شناخته می‌شوند، انجام می‌گیرد. بطوریکه اولین مولفه بیشترین مقدار تغییرات داده‌های اولیه را توجیه می‌کند و مولفه دوم بیشترین مقدار تغییرات باقیمانده را بعد از مولفه اول توجیه می‌کند. لازم به ذکر است که هر مولفه تغییراتی را توجیه می‌کند که توسط مولفه‌های قبلی بیان نشده است. به علت اینکه مولفه‌ها به صورت متعامد[1] و مستقل از یکدیگر می‌باشند هر مولفه نشان دهنده خصوصیات متفاوتی از داده‌های اصلی می‌باشند و به صورت مستقل از یکدیگر باید تفسیر شوند [محمدی و پراسانا، ۲۰۰۳].

هر چه همبستگی میان متغیرها بیشتر باشد، ۲ تا ۳ مولفه نخست تغییرات بیشتری را توجیه می‌کنند و هر چه همبستگی پایین‌تر باشد نشان‌دهندهٔ تصادفی‌بودن این متغیرها است. نبود همبستگی در میان این متغیرها برای داده‌های مولکولی ویژگی سودمند است زیرا نشان می‌دهد این متغیرها جنبه-های گوناگونی از داده‌ها را اندازه‌گیری می‌کنند که در این صورت به تعداد بیشتری مولفه اصلی برای توجیه تغییرات داده‌های اولیه نیاز می‌باشد. اگر سه مولفه نخست کمتر از ۰/۲۵ تغییرات را توجیه

[1]. Orthogonal

نمایند بهره‌گیری از نمودارهای ۲ و ۳ بعدی برای گروه‌بندی داده‌ها ناکارآمد می‌شود چرا که همبستگی میان این سه مولفه اندک است و بخش بسیاری از تغییرات را مولفه‌های دیگر توجیه کرده‌اند و نمودارهای ۲ و ۳ بعدی دسته‌بندی مورد پذیرشی را انجام نمی‌دهند ولی این رویداد نشان‌دهندهٔ پراکنش خوب پرایمرهای بکار رفته روی ژنوم است [محمدی و پراسانا، ۲۰۰۳].

### ۳-۱۱-۵- شاخص شانون (SI)

شاخص شانون یک معیار ریاضی برای نشان دادن تنوع گونه‌ها می باشد که به زیست‌شناسان برای پی بردن به ساختار جامعه و تنوع موجود در آن کمک می‌کند. شاخص تنوع شانون از شاخص‌های مورد استفاده برای توصیف تنوع گونه‌ها در جامعه می‌باشد. جامعه‌ی با تنوع بالا دارای شاخص تنوع شانون بالا و جامعه با تنوع کم شاخص شانون پایینی دارد.

### ۳-۱۱-۶- هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)

برای یک جایگاه ژنی به صورت فراوانی افراد هتروزیگوس برای آن جایگاه نسبت به کل افراد جمعیت تعریف می‌شود. مقدار آن با افزایش تعداد آلل‌ها، افزایش یافته و زمانی که فراوانی آللی یکسان باشد، ماکزیمم می‌شود. هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، نسبت برآورد شده افراد هتروزیگوس برای هر جایگاه ژنی که به صورت تصادفی انتخاب شده است. یک جایگاه ژنی اگر هتروزیگوسیتی بیشتر از ۰/۱ باشد، چند شکل است و اگر این مقدار بیش از ۰/۷ باشد، به شدت چند شکل است.

### ۳-۱۱-۷- تعداد آلل‌های موثر (Ne)

تعداد آلل با فراوانی برابر در هر جایگاه ریز ماهواره، تعداد آلل موثر برای آن جایگاه نامیده می‌شود که شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنی می‌باشد. این شاخص به این دلیل مورد استفاده قرار می‌گیرد که کمتر به اندازه نمونه حساس است.

### ۳-۱۱-۸- تعداد آلل‌های متفاوت (Na)

هر چه تعداد آلل‌های متفاوت پرایمری به مقدار ۲ نزدیک‌تر باشد، نشان‌دهنده قدرت بالای آن پرایمر در تولید باند چندشکل در بین جمعیت‌هاست، که به نحوی می‌توان آن را به تولید تعداد باندهای اختصاصی برای آن جمعیت ربط داد.

### ۳-۱۱-۹- شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)

محتوای اطلاعات چندشکلی یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش به سزایی دارد. با توجه به اینکه مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی از صفر تا یک متغیر است و هر چه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در ژنوتیپ‌های تحت بررسی می‌باشد [وِی و همکاران، ۲۰۰۵].

### ۳-۱۱-۱۰- شاخص نشانگر (MI)

شاخص نشانگر یک معیار کارائی نشانگر در تخمین چندشکلی می‌باشد. به طور کلی شاخص نشانگر می‌تواند به عنوان یک معیار کلی برای پیشگویی کارائی نشانگر در یک ژرم پلاسم استفاده گردد.

### ۳-۱۲- تجزیه داده‌ها

الگوی باندی حاصل بر اساس وجود یا عدم وجود باند، به صورت صفر و یک امتیازدهی شد. سپس بر اساس ماتریس صفر و یک، فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد با استفاده از ضرایب مختلف محاسبه گردید. مقدار عددی ضرایب تشابه بین صفر و یک است که مقدار صفر، بیانگر عدم وجود باندهای مشترک (عدم شباهت ژنتیکی) و مقدار یک، بیانگر الگوهای باندی یکسان (تشابه ژنتیکی کامل) است. داده‌های این ماتریس سپس توسط نرم افزارهای NTSYS 2.02e، GenAlEx 6.5 و POPGEN 1.32 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

ماتریس‌های تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده را ابتدا با استفاده از نرم افزار NTSYS 2.02e اندازه گرفتیم و ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه و آزمون منتل [منتل، ۱۹۶۷] برای ارزیابی همبستگی بین ماتریس‌های تشابه و دندروگرام نهایی جهت مشخص‌کردن بهترین روش کلاستربندی نمونه‌ها انجام شد. در نهایت گروه‌بندی نمونه‌ها و رسم دندروگرام بر اساس ماتریس تشابه جاکارد و روش UPGMA انجام گرفت. از نرم افزارهای GenAlEx 6.5 و PopGene 1.32 برای اندازه‌گیری شاخص شانون، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، تعداد آلل‌های موثر، تعداد آلل‌های متفاوت، شاخص تنوع ژنی Nei، فراوانی آللی (AF)، محتوای اطلاعات چندشکلی، نسبت چندشکلی موثر (EMR)، شاخص نشانگر، تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA)، درصد چندشکلی و تعداد باندهای چندشکل استفاده شد.

# فصل چهارم

# نتایج و بحث

در این فصل به ارائه‌ی نتایج حاصل از این تحقیق در دو بخش پرداخته شده است. در بخش اول، نتایج مربوط به مطالعات مورفولوژیک و آزمون زیست‌سنجی ارائه شده است. این نتایج در زمینه‌ی ارزیابی نرخ رشد، شمارش تعداد کنیدی‌های تولیدی و ارزیابی جوانه‌زنی کنیدی‌های جدایه‌های مختلف قارچ بیماری-زای *B. bassiana* بر روی محیط کشت‌های PDA و SDAY و همچنین بررسی تاثیر غلظت $۱ \times ۱۰^{۸}$ کنیدی/ میلی‌لیتر جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* بر کشندگی سوسک قرمز آرد می‌باشد. در بخش دوم نتایج مربوط به بررسی مولکولی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* با استفاده از پرایمرهای ISSR آورده شده است.

### ۴-۱- ارزیابی نرخ جداسازی قارچ *B. bassiana*

نتیجه‌ی این تحقیق نشان داد که قارچ *Beauveria* که منبع جداسازی آن خاک در نظر گرفته شد پراکنش یکسان و برابری در نمونه‌های خاک مناطق مختلف ندارد. که این عدم یکسانی می‌تواند به علت یکسان نبودن شرایط محیطی در نقاط مختلف جغرافیایی ذکر کرد. گویای این صحبت تعداد لارو آلوده شده به قارچ و جدول ۲ ضمیمه می‌باشد. در این مطالعه، نمونه‌گیری از خاک، از مناطق مختلف شهرستان اهواز در استان خوزستان و همچنین از مناطق مختلف شهرستان شاهرود در استان سمنان انجام پذیرفت. برای محاسبه نرخ جداسازی قارچ *B. bassiana* در هر منطقه، تعداد لارو آلوده به قارچ به تعداد کل لارو هر منطقه تقسیم شد. در میان مناطق مورد مطالعه، بیشترین میزان جداسازی قارچ، منطقه جنگل ابر با آلوده‌شدن ۴۱ لارو از میان ۲۴۰ لارو مورد استفاده (۱۷/۰۸٪) و منطقه ماهور با آلوده‌سازی ۴۲ لارو از

میان ۲۸۰ لارو مورد استفاده (۱۵٪) و کمترین میزان جداسازی، منطقه موران (۱/۵٪) و منطقه ام الطمیر (۲/۵٪) به ترتیب با آلوده‌شدن ۳ لارو از ۲۰۰ لارو و ۸ لارو از ۳۲۰ لارو بودند. لازم به ذکر است که از بین نمونه خاک‌های جمع‌آوری شده، در مناطق حلاف، عین دو، گوریه، طرفایه، غزاویه کوچک، غزاویه بزرگ، دغاغله، کیانشهر، کیان آباد، کوی باهنر، گروه ملی، گلستان، عرب راشد، شهرک نفت، حیاویه، خضریه، حنیطه و مجن هیچ گونه لارو آلوده به قارچ *B. bassiana* دیده نشد. نتایج بدست آمده حاکی از تفاوت نقاط متفاوت در جداسازی *B. bassiana* از خاک است. چنین نتیجه‌ای را تونینگا و همکاران و براون‌بریج و همکاران که از روش طعمه حشره‌ای گالریا برای جداسازی *Beauveria* از خاک استفاده کردند نیز بدست آوردند. تونینگا و همکاران (۲۰۰۹) از ۲۵۰ نمونه خاک از ۵ منطقه‌ی متفاوت ایالت نیویورک، تعداد ۶۸ جدایه‌ی *Beauveria spp.* بدست آوردند. براون‌بریج و همکاران (۱۹۹۳) از مناطق جنگلی متفاوت با استفاده از روش طعمه حشره‌ای گالریا، تعداد لارو آلوده‌ی متفاوتی را بدست آوردند. طبق گزارش آنها، از بعضی از مناطق هیچ لارو آلوده‌ای بدست نیاوردند. بر اساس مطالعات انجام شده در مورد جداسازی قارچ *Beauveria* با استفاده از روش طعمه حشره‌ای، سویم و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که حضور قارچ *Beauveria* به شرایط آب و هوایی، خصوصیات خاک و خصوصیات زیستگاه (زراعی، باغی و جنگلی) بستگی دارد. لازم به ذکر است که بسیاری از محققان *B. bassiana* را فراوان‌ترین گونه شناسایی شده *Beauveria* برمی‌شمرند، به گونه‌ای که در مناطق مورد مطالعه در این پایان‌نامه همه‌ی جدایه‌ها متعلق به این گونه است.

### ۴-۲- ارزیابی نرخ رشد جدایه‌ها بر روی محیط‌کشت PDA

بررسی نتایج تجزیه و تحلیل (جدول ۴-۱) نشان می‌دهد نرخ رشد جدایه‌های *B. bassiana* اقلیم‌های مورد مطالعه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است. نتایج مقایسه میانگین برای جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* در جدول ۴-۲ مشخص شده است. نتایج مقایسه میانگین نرخ رشد (جدول ۴-۲) نشان می‌دهد که جدایه SHU.H.12 (گمبوعه بزرگ) در کنار جدایه SHU.H.35 (جسانیه کوچک) به ترتیب با ۴/۲۰۰ و ۴/۲۵۰ میلی‌متر/روز از منظر سطح میانگین در کلاس A جای داده شده‌اند و اختلاف معنی-داری با یکدیگر در میانگین نرخ رشد ندارند اما با سایر جدایه‌ها از اختلاف معنی‌داری برخوردارند. جدایه-های SHU.H.09 (ماهور)، SHU.H.34 (سید عامر) و SHU.H.10 (ماهور) هر سه با میانگین ۰/۶۸۳۵ میلی‌متر/روز از کمترین میزان نرخ رشد در کنار جدایه‌های SHU.H.20 (عرب اسد)، SHU.H.48 (جنگل ابر)، SHU.H.19 (عرب اسد)، SHU.H.44 (جنگل ابر)، SHU.H.37 (کوت عبدالله)، SHU.H.49 (جنگل ابر)، SHU.H.39 (موران)، SHU.H.27 (ویس)، SHU.H.46 (جنگل ابر)، SHU.H.28 (ویس) و SHU.H.04 (ماهور) در سطح میانگین O قرار گرفته است و این گروه از جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند و به طور مشترک کمترین میزان نرخ رشد را به خود اختصاص داده‌اند.

جدول ۴-۱: جدول تجزیه واریانس برای نرخ رشد ۵۰ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana*

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | ضریب تغییرات | F |
|---|---|---|---|---|
| جدایه | ۴۹ | ۵/۰۶۳ | ٪۴/۵۹ | ۷۵۲/۲۵۴** |
| خطا | ۱۵۰ | ۰/۰۰۷ | | |
| کل | ۱۹۹ | | | |

**در سطح ۱ درصد معنی دار است.

جدول ۴-۲: مقایسه میانگین نرخ رشد جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana*

| نام جدایه | میانگین نرخ رشد | سطح میانگین |
|---|---|---|
| SHU.H.35 | ٤/٢٥٠ | A |
| SHU.H.12 | ٤/٢٠٠ | AB |
| SHU.H.31 | ٤/١٠٠ | BC |
| SHU.H.36 | ٤/٠٥٠ | C |
| SHU.H.06 | ٤/٠٥٠ | C |
| SHU.H.43 | ٤/٠٣٣ | C |
| SHU.H.24 | ٣/٩٨٤ | C |
| SHU.H.03 | ٢/٨٦٧ | D |
| SHU.H.14 | ٢/٧٥٠ | DE |
| SHU.H.08 | ٢/٦٨٣ | EF |
| SHU.H.13 | ٢/٦٦٧ | EF |
| SHU.H.21 | ٢/٦٦٧ | EF |
| SHU.H.07 | ٢/٦١٧ | F |
| SHU.H.25 | ١/٦٦٧ | G |
| SHU.H.01 | ١/٦٣٤ | GH |
| SHU.H.41 | ١/٦٠٠ | GHI |
| SHU.H.40 | ١/٦٠٠ | GHI |
| SHU.H.02 | ١/٥٦٦ | GHIJ |
| SHU.H.18 | ١/٥٥٠ | GHIJK |
| SHU.H.38 | ١/٥١٧ | HIJKL |
| SHU.H.47 | ١/٥٠٠ | IJKL |
| SHU.H.30 | ١/٤٨٤ | IJKL |
| SHU.H.17 | ١/٤٨٤ | IJKL |
| SHU.H.15 | ١/٤٨٤ | IJKL |
| SHU.H.32 | ١/٤٥٠ | JKL |
| SHU.H.11 | ١/٤٥٠ | JKL |
| SHU.H.50 | ١/٤٥٠ | JKL |
| SHU.H.05 | ١/٤٥٠ | JKL |
| SHU.H.26 | ١/٤٣٤ | KL |
| SHU.H.29 | ١/٤٣٣ | KL |
| SHU.H.23 | ١/٤١٧ | L |
| SHU.H.16 | ١/٤١٧ | L |

| | | |
|---|---|---|
| L | ۱/٤۱٦ | SHU.H.42 |
| L | ۱/٤۰۰ | SHU.H.33 |
| M | ۰/۸۳۳٥ | SHU.H.22 |
| MN | ۰/۸۱٦۷ | SHU.H.45 |
| MNO | ۰/۸۰۰۰ | SHU.H.20 |
| MNO | ۰/۷۸۳٥ | SHU.H.48 |
| MNO | ۰/۷٤۹۸ | SHU.H.19 |
| MNO | ۰/۷٤۹۸ | SHU.H.44 |
| MNO | ۰/۷۳۳٥ | SHU.H.37 |
| MNO | ۰/۷۳۳۳ | SHU.H.49 |
| MNO | ۰/۷۳۳۳ | SHU.H.39 |
| NO | ۰/۷۱٦٥ | SHU.H.27 |
| NO | ۰/۷۰۰۰ | SHU.H.46 |
| NO | ۰/۷۰۰۰ | SHU.H.28 |
| NO | ۰/۷۰۰۰ | SHU.H.04 |
| O | ۰/٦۸۳٥ | SHU.H.09 |
| O | ۰/٦۸۳٥ | SHU.H.34 |
| O | ۰/٦۸۳٥ | SHU.H.10 |

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشند.

### ۴-۳- ارزیابی تعداد کنیدی تولیدی جدایه‌های مختلف *B. bassiana* بر روی محیط‌کشت PDA

بر پایه جدول تجزیه واریانس (جدول ۴-۳) آزمایش شمارش کنیدی ۵۰ جدایه‌ی مختلف *B. bassiana* در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است و مقایسات میانگین مربوط به جدایه‌های *B. bassiana* در جدول ۴-۴ آورده شده است. ارزیابی شمارش کنیدی برای جدایه‌ها، نشان می‌دهد که جدایه SHU.H.43 (ابرسج) با میانگین اسپور $۱۰^{۶} \times$ ۳۶/۳۹ کنیدی/ میلی‌لیتر از بیشترین و جدایه SHU.H.19 (عرب اسد) با میانگین $۱۰^{۶} \times$ ۳/۳۲۹ کنیدی/ میلی‌لیتر از کمترین میزان کنیدی تولیدی برخودار می‌باشد.

جدول ۴-۳: جدول تجزیه واریانس برای تعداد کنیدی تولیدی ۵۰ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana*

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | ضریب تغییرات | F |
|---|---|---|---|---|
| جدایه | ۴۹ | ۲۳۹/۹۰۰ | ٪۱/۷۳ | ۲۵۴۸/۷۹۲** |
| خطا | ۱۵۰ | ۰/۰۹۴ | | |
| کل | ۱۹۹ | | | |

**در سطح ۱ درصد معنی دار است.

جدول ۴-۴: مقایسه میانگین تعداد کنیدی تولیدی جدایه‌های مختلف *B. bassiana*

| نام جدایه | میانگین تعداد اسپور $10^6$ × | سطح میانگین |
|---|---|---|
| SHU.H.43 | ۳۶/۳۹ | A |
| SHU.H.31 | ۳۴/۲۳ | B |
| SHU.H.35 | ۳۱/۵۴ | C |
| SHU.H.36 | ۲۸/۶۷ | D |
| SHU.H.21 | ۲۷/۲۹ | E |
| SHU.H.24 | ۲۷/۰۸ | E |
| SHU.H.15 | ۲۶/۳۰ | F |
| SHU.H.47 | ۲۵/۲۵ | G |
| SHU.H.12 | ۲۴/۵۳ | H |
| SHU.H.03 | ۲۳/۷۹ | I |
| SHU.H.17 | ۲۳/۳۸ | IG |
| SHU.H.07 | ۲۳/۳۵ | J |
| SHU.H.30 | ۲۳/۲۳ | J |
| SHU.H.08 | ۲۲/۳۳ | K |
| SHU.H.18 | ۲۲/۱۸ | K |
| SHU.H.37 | ۲۱/۴۲ | L |
| SHU.H.14 | ۲۱/۴۰ | L |
| SHU.H.38 | ۲۱/۳۰ | L |
| SHU.H.29 | ۲۰/۲۷ | M |
| SHU.H.02 | ۲۰/۲۷ | M |
| SHU.H.11 | ۲۰/۱۹ | M |
| SHU.H.26 | ۱۹/۴۴ | N |
| SHU.H.13 | ۱۹/۳۱ | N |
| SHU.H.16 | ۱۹/۲۶ | N |

| | | |
|---|---|---|
| O | ۱۸/۳۰ | SHU.H.50 |
| O | ۱۸/۲۴ | SHU.H.25 |
| P | ۱۷/۳۳ | SHU.H.32 |
| P | ۱۷/۱۹ | SHU.H.05 |
| Q | ۱۶/۳۲ | SHU.H.33 |
| Q | ۱۶/۲۷ | SHU.H.23 |
| Q | ۱۶/۲۵ | SHU.H.42 |
| R | ۱۵/۵۶ | SHU.H.01 |
| S | ۱۳/۳۱ | SHU.H.40 |
| S | ۱۳/۲۷ | SHU.H.49 |
| S | ۱۳/۲۶ | SHU.H.39 |
| S | ۱۳/۱۰ | SHU.H.09 |
| T | ۱۲/۳۷ | SHU.H.22 |
| U | ۱۱/۲۵ | SHU.H.34 |
| U | ۱۱/۱۸ | SHU.H.46 |
| V | ۱۰/۵۸ | SHU.H.27 |
| V | ۱۰/۲۲ | SHU.H.48 |
| W | ۹/۵۷۶ | SHU.H.06 |
| W | ۹/۳۷۴ | SHU.H.04 |
| X | ۸/۲۸۸ | SHU.H.41 |
| X | ۸/۰۴۳ | SHU.H.44 |
| Y | ۷/۱۸۸ | SHU.H.45 |
| Z | ۶/۳۷۵ | SHU.H.10 |
| Ω | ۵/۳۳۲ | SHU.H.28 |
| e | ۴/۲۸۳ | SHU.H.20 |
| ϕ | ۳/۳۲۹ | SHU.H.19 |

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشند.

## ۴-۴- ارزیابی جوانه‌زنی کنیدی‌ها

خواص فیزیولوژیکی هر جدایه بر بیماری‌زایی آن موثر است از این‌رو لازم است قبل از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها، قدرت جوانه‌زنی آنها تعیین شود. بررسی نتایج تجزیه و تحلیل (جدول ۴-۵) نشان می‌دهد قدرت جوانه‌زنی جدایه‌های *B. bassiana* اقلیم‌های مورد مطالعه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است. نتایج آزمایش حاکی از آن بود که تمامی جدایه‌های *مختلف B. bassiana* از قدرت جوانه‌زنی بیش از ۸۵٪ برخوردار هستند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین (جدول ۴-۶) جدایه‌های SHU.H.06 (ماهور)، SHU.H.31 (شیبان) و SHU.H.12 (گمبوعه بزرگ) در سطح میانگین جوانه‌زنی A قرار گرفته‌اند و اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در میانگین قدرت جوانه‌زنی ندارند اما با سایر جدایه‌ها از اختلاف معنی‌داری برخوردارند. در سطح J جدایه‌های SHU.H.20 (عرب اسد)، SHU.H.37 (کوت عبدالله) و SHU.H.19 (عرب اسد) در کنار جدایه‌های SHU.H.02 (حمیدیه)، SHU.H.45 (جنگل ابر)، SHU.H.27 (ویس)، SHU.H.04 (ماهور)، SHU.H.09 (ماهور)، SHU.H.26 (تل بومه)، SHU.H.39 (موران)، SHU.H.34 (سید عامر)، SHU.H.16 (بروایه)، SHU.H.17 (بروایه)، SHU.H.01 (حمیدیه)، SHU.H.25 (تل بومه)، SHU.H.48 (جنگل ابر)، SHU.H.21 (چم الحمید) و SHU.H.47 (جنگل ابر) جای گرفته‌اند و کمترین میزان جوانه‌زنی را به خود اختصاص داده‌اند.

جدول ۴-۵: جدول تجزیه واریانس برای قدرت جوانه‌زنی ۵۰ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana*

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | ضریب تغییرات | F |
|---|---|---|---|---|
| جدایه | ۴۹ | ۲۹/۵۳ | ٪۱/۱۲ | ۲۹/۵۳** |
| خطا | ۱۰۰ | ۱ | | |
| کل | ۱۴۹ | | | |

**در سطح ۱ درصد معنی دار است.

جدول ۴-۶: مقایسه میانگین قدرت جوانه‌زنی جدایه‌های مختلف *B. bassiana*

| نام جدایه | میانگین قدرت جوانه‌زنی (٪) | سطح میانگین |
|---|---|---|
| SHU.H.06 | ۹۹ | A |
| SHU.H.31 | ۹۸ | A |
| SHU.H.12 | ۹۸ | A |
| SHU.H.24 | ۹۵ | B |
| SHU.H.43 | ۹۴ | BC |
| SHU.H.35 | ۹۳ | CD |
| SHU.H.14 | ۹۲ | DE |
| SHU.H.30 | ۹۲ | DE |
| SHU.H.15 | ۹۲ | DE |
| SHU.H.38 | ۹۱ | EF |
| SHU.H.32 | ۹۱ | EF |
| SHU.H.40 | ۹۱ | EF |
| SHU.H.42 | ۹۱ | EF |
| SHU.H.07 | ۹۱ | EF |
| SHU.H.03 | ۹۱ | EF |
| SHU.H.08 | ۹۰ | FG |
| SHU.H.41 | ۹۰ | FG |
| SHU.H.11 | ۹۰ | FG |
| SHU.H.33 | ۹۰ | FG |
| SHU.H.05 | ۹۰ | FG |
| SHU.H.36 | ۹۰ | FG |
| SHU.H.44 | ۸۹ | GH |
| SHU.H.13 | ۸۹ | GH |
| SHU.H.22 | ۸۸ | HI |
| SHU.H.23 | ۸۸ | HI |
| SHU.H.50 | ۸۸ | HI |
| SHU.H.10 | ۸۸ | HI |
| SHU.H.29 | ۸۸ | HI |
| SHU.H.46 | ۸۸ | HI |
| SHU.H.49 | ۸۸ | HI |
| SHU.H.28 | ۸۸ | HI |

| | | |
|---|---|---|
| SHU.H.18 | ۸۸ | HI |
| SHU.H.02 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.45 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.27 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.04 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.09 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.26 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.39 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.34 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.16 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.17 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.01 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.25 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.48 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.21 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.47 | ۸۷ | IJ |
| SHU.H.20 | ۸۶ | J |
| SHU.H.37 | ۸۶ | J |
| SHU.H.19 | ۸۶ | J |

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشند.

## ۴-۵- بررسی تاثیر بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* علیه سوسک قرمز آرد

مطابق جدول تجزیه واریانس (جدول ۴-۷) اثر غلظت $۱۰^{۸}$ × ۱ کنیدی/ میلی‌لیتر جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* برکشندگی سوسک قرمز آرد در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۴-۷: جدول تجزیه واریانس برای بیماری‌زایی ۵۰ جدایه مختلف قارچ *B. bassiana*

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | ضریب تغییرات | F |
|---|---|---|---|---|
| جدایه | ۴۹ | ۱۲۴۸/۲۷۹ | ٪۱۰/۲۷ | ۳۴/۸۰۲** |
| خطا | ۱۰۰ | ۳۵/۸۶۸ | | |
| کل | ۱۴۹ | | | |

**در سطح ۱ درصد معنی دار است.

جدول ۴-۸: مقایسه میانگین تلفات سوسک قرمز آرد توسط جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana*

| نام جدایه | طبقه‌بندی جدایه‌ها | تعداد مشاهدات | میانگین تلفات | سطح میانگین |
|---|---|---|---|---|
| SHU.H.43 | A (High) | ۲۹ | ۹۶/۳۰ | A |
| SHU.H.35 | A | ۲۸ | ۹۲/۵۹ | A |
| SHU.H.08 | A | ۲۷ | ۸۹/۲۶ | A |
| SHU.H.07 | A | ۲۷ | ۸۹/۲۶ | A |
| SHU.H.17 | A | ۲۷ | ۸۹/۲۶ | A |
| SHU.H.03 | A | ۲۷ | ۸۹/۲۶ | A |
| SHU.H.47 | A | ۲۷ | ۸۹/۲۶ | A |
| SHU.H.36 | A | ۲۷ | ۸۹/۲۶ | A |
| SHU.H.37 | A | ۲۴ | ۷۸/۵۲ | B |
| SHU.H.38 | A | ۲۴ | ۷۸/۵۲ | B |
| SHU.H.02 | A | ۲۴ | ۷۸/۵۲ | B |
| SHU.H.29 | A | ۲۴ | ۷۸/۵۲ | B |
| SHU.H.14 | A | ۲۴ | ۷۸/۵۲ | B |
| SHU.H.30 | A | ۲۴ | ۷۸/۵۲ | B |
| SHU.H.31 | A | ۲۲ | ۷۱/۱۱ | BC |
| SHU.H.21 | A | ۲۱ | ۶۷/۷۸ | CD |
| SHU.H.01 | B (Medium) | ۲۰ | ۶۴/۴۵ | CDE |
| SHU.H.09 | B | ۱۹ | ۶۰/۷۴ | DEF |
| SHU.H.46 | B | ۱۹ | ۶۰/۷۴ | DEF |
| SHU.H.23 | B | ۱۸ | ۵۷/۰۴ | EFG |
| SHU.H.39 | B | ۱۸ | ۵۷/۰۴ | EFG |
| SHU.H.24 | B | ۱۸ | ۵۷/۰۴ | EFG |
| SHU.H.18 | B | ۱۷ | ۵۳/۷۱ | FGH |
| SHU.H.15 | B | ۱۷ | ۵۳/۷۱ | FGH |
| SHU.H.48 | B | ۱۷ | ۵۳/۷۱ | FGH |
| SHU.H.13 | B | ۱۷ | ۵۳/۳۳ | FGH |
| SHU.H.25 | B | ۱۷ | ۵۳/۳۳ | FGH |
| SHU.H.22 | B | ۱۷ | ۵۳/۳۳ | FGH |
| SHU.H.33 | B | ۱۷ | ۵۳/۳۳ | FGH |
| SHU.H.42 | B | ۱۷ | ۵۳/۳۳ | FGH |
| SHU.H.27 | B | ۱۷ | ۵۳/۳۳ | FGH |
| SHU.H.40 | B | ۱۶ | ۵۰ | GHI |
| SHU.H.32 | B | ۱۶ | ۵۰ | GHI |
| SHU.H.26 | B | ۱۶ | ۵۰ | GHI |
| SHU.H.05 | B | ۱۶ | ۵۰ | GHI |
| SHU.H.12 | B | ۱۶ | ۴۹/۶۳ | GHI |
| SHU.H.49 | B | ۱۶ | ۴۹/۶۳ | GHI |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| GHI | ۴۹/۶۳ | ۱۶ | B | SHU.H.50 |
| HIJ | ۴۶/۳۰ | ۱۵ | B | SHU.H.06 |
| HIJ | ۴۶/۲۹ | ۱۵ | B | SHU.H.34 |
| IJ | ۴۲/۵۹ | ۱۴ | B | SHU.H.16 |
| J | ۳۸/۸۹ | ۱۳ | B | SHU.H.11 |
| K | ۲۸/۵۲ | ۱۰ | C (Low) | SHU.H.41 |
| K | ۲۸/۵۲ | ۱۰ | C | SHU.H.10 |
| K | ۲۸/۵۲ | ۱۰ | C | SHU.H.28 |
| K | ۲۸/۵۲ | ۱۰ | C | SHU.H.19 |
| K | ۲۸/۱۵ | ۱۰ | C | SHU.H.20 |
| K | ۲۸/۱۵ | ۱۰ | C | SHU.H.04 |
| K | ۲۸/۱۵ | ۱۰ | C | SHU.H.44 |
| K | ۲۱/۴۸ | ۸ | C | SHU.H.45 |

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشند.

نتایج زیست‌سنجی نشان می‌دهد که تمامی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* بر روی سوسک قرمز آرد بیماری‌زا بودند و سبب مرگ‌ومیر در آفت مذکور شدند اما توان بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف با یکدیگر متفاوت بود و این مسئله به این خاطر است که میزان حساسیت حشرات به جدایه‌های مختلف، متفاوت بوده و جدایه‌ها نیز اثرات متفاوتی را بر روی یک گونه حشره از خود نشان دادند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین (جدول ۴-۸) جدایه‌های SHU.H.43 (ابرسج)، SHU.H.35 (جسانیه کوچک)، SHU.H.08 (ماهور)، SHU.H.07 (ماهور)، SHU.H.17 (بروایه)، SHU.H.03 (ام الطمیر)، SHU.H.47 (جنگل ابر) و SHU.H.36 (جسانیه کوچک) در سطح میانگین بیماری‌زایی A قرار گرفته‌اند و اختلاف معنی‌داری در بیماری‌زایی میان آنها وجود ندارد. در سطح K جدایه‌های SHU.H.41 (بسطام)، SHU.H.10 (ماهور)، SHU.H.28 (ویس)، SHU.H.19 (عرب اسد)، SHU.H.20 (عرب اسد)، SHU.H.04 (ماهور)، SHU.H.44 (جنگل ابر) و SHU.H.45 (جنگل ابر) جای گرفته‌اند و کمترین میزان بیماری‌زایی را به خود اختصاص داده‌اند. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده حساسیت بالای سوسک قرمز آرد

به قارچ مذکور می‌باشد. با این حال آزمایشات بیشتری نظیر $LT_{50}$ و $LC_{50}$ جهت غربال‌گری جدایه‌هایی با توان بیماری‌زایی بیشتر برای کنترل آفات انباری لازم می‌باشد.

**۴-۶- همبستگی میان پارامترهای مورفولوژیکی نرخ رشد، شمارش تعداد کنیدی و بیماری‌زایی**

بر اساس آنالیزهای انجام شده با نرم‌افزار MSTATC مشخص گردید که میان پارامترهای نرخ رشد و تعداد کنیدی همبستگی وجود دارد بدان معنا که هر چه نرخ رشد یک جدایه بیشتر باشد تعداد کنیدی تولیدی بیشتر خواهد بود. بررسی همبستگی میان دو پارامتر نرخ رشد و بیماری‌زایی نشان می‌دهد هرچه نرخ رشد جدایه‌ای بیشتر باشد، قدرت بیماری‌زایی آن جدایه بیشتر و در آلوده‌سازی میزبان موفق‌تر عمل می‌نماید. میان تعداد کنیدی و بیماری‌زایی همبستگی وجود دارد و هر چه تعداد کنیدی تولیدی جدایه‌ای بیشتر باشد بیماری‌زایی آن جدایه بیشتر است. بنابراین جدایه‌های SHU.H.43 و SHU.H.35 به ترتیب با میانگین نرخ رشد ۴/۰۳۳ و ۴/۲۵۰ میلی‌متر/روز، میانگین کنیدی تولیدی $۳۶/۳۹ \times ۱۰^{۶}$ و $۳۱/۵۴ \times ۱۰^{۶}$ کنیدی/میلی‌لیتر و میانگین تلفات ۹۶/۳۰٪ و ۹۲/۵۹٪ دارای بیشترین پتانسیل در مبارزه با سوسک قرمز آرد می‌باشند.

**۴-۷- جمع‌بندی نتایج آزمایشات مورفولوژیک**

در این پایان‌نامه با استفاده از روش طعمه حشره‌ای گالریا از میان ۳۵۶ نمونه خاک مناطق گوناگون، تعداد ۵۰ جدایه قارچ *Beauveria* در محیط‌کشت انتخابی حاوی دودین، سیکلوهگزامید، کریستال ویولت و کلرید مس در کنار دیگر قارچ‌هایی مانند *Metarhizium* و *Verticillium* جداسازی گردید یعنی نرخ

جداسازی قارچ *Beauveria* در اقلیم‌های مورد مطالعه میزان بسیار کمی است و ضرورت تلقیح خاک‌ها و اراضی زراعی و باغی را می‌طلبد. بر این اساس نرخ جداسازی *Beauveria* با توجه به نتایج ما می‌توان گفت که در شرایط نسبتا مشابه از نظر دما و رطوبت، قارچ *Beauveria* فراوان‌ترین جنس در میان قارچ-های بیماری‌زای حشرات است و از نرخ جداسازی بیشتری نسبت به *Metarhizium* برخوردار می‌باشد که این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعات تونینگا و همکاران (۲۰۰۹)، براون‌بریج و همکاران (۱۹۹۳) و میلینگ و الین‌برگ (۲۰۰۶) هم‌خوانی دارد. بر اساس جدول تعداد لاروهای آلوده و درصد جداسازی قارچ (جدول ۱ ضمیمه) می‌توان گفت فراوانی قارچ بیماری‌زای حشرات *Beauveria* در مناطق سبزی‌کاری و جنگلی بیشتر از مناطق زراعی و نخلستان است. در صحت این مطلب همین بس که از میان نمونه‌های خاکی مناطق سبزی‌کاری و جنگلی تنها ۳۰ جدایه (درصد جداسازی قارچ از مناطق سبزی‌کاری و جنگلی ۶۰٪) به‌دست آمد و نتیجه این تحقیق در خصوص فراوانی و پراکندگی قارچ *Beauveria* با نتایج مطالعات سانچزپنا و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد. از سوی دیگر برحسب درصد جداسازی قارچ (جدول ۱ ضمیمه) و مشخصات جدایه‌های بدست آمده (جدول ۲ ضمیمه) می‌توان گفت ممکن است عامل فراوانی این قارچ، رطوبت باشد. می‌دانیم رطوبت عامل مهمی در فراوانی و کارایی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات است [زیمرمن، ۲۰۰۷]. در توضیح این مطلب باید بگوییم که از میان ۵۰ جدایه بدست آمده، ۱۴ جدایه به منطقه ماهور و جنگل ابر تعلق داشتند و این مناطق به علت سبزی‌کاری و جنگلی‌بودن از رطوبت بیشتری نسبت به سایر مناطق نمونه‌گیری برخوردار است و لذا توانستیم تعداد جدایه بیشتری را از آن جدا نماییم درحالیکه در مناطق حلاف، عین دو، گوریه، طرفایه، غزاویه کوچک، غزاویه بزرگ، دغاغله، کیانشهر، کیان آباد، کوی باهنر، گروه ملی، گلستان، عرب راشد، شهرک نفت، حیاویه، خضریه، حنیطه و مجن به علت رطوبت پایین خاک هیچ گونه جدایه‌ای به‌دست نیامد.

اثر دما بر نرخ رشد، بیماری‌زایی و تعداد کنیدی تولیدی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات مانند *B. bassiana* و *M. anisopliae* اثبات شده است [تِفارا و پرینگل، ۲۰۰۳]. اِکسی و همکاران (۱۹۹۹) با بررسی طیف دمایی ۳۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد در میزان کنیدی تولیدی و نرخ رشد قارچ‌های بیماری‌زای حشرات، دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد را به عنوان مناسب‌ترین طیف دمایی برشمردند. داربرو و همکاران (۲۰۱۱) از ۱۰ جدایه مختلف *B. bassiana* برای اندازه‌گیری نرخ رشد در ۳ دمای ۲۰، ۲۶ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد استفاده کردند و نتایج نشان‌دهنده‌ی رشد متفاوت این جدایه‌ها بود و آنها نتیجه گرفتند جدایه‌ها در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، از بیشترین میزان رشد برخوردار بودند. پتلامول و پریزِرتسن (۲۰۱۲) با اندازه‌گیری نرخ رشد ۵ جدایه *B. bassiana* در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت CDA، مشخص نمود که جدایه‌ها دارای میزان رشد متفاوتی هستند. اِکسی و همکاران (۱۹۹۹) از دو جدایه‌ی *B. bassiana* برای اندازه‌گیری نرخ رشد بر روی محیط کشت SDA استفاده کردند که نتایج آنها بیانگر تفاوت این دو جدایه از نظر نرخ رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. صفوی و همکاران (۲۰۰۷) با اندازه‌گیری نرخ رشد دو جدایه‌ی *B. bassiana* در ۷ محیط کشت مختلف، طیف رشدی متفاوتی را برای دو جدایه مشاهده نمودند.

از قارچ بیماری‌زای *B. bassiana* برای کنترل آفات انباری مانند *Oryzaephilus surinamensis* [سرل و دوبرسکی، ۱۹۸۴]، *S. oryzae* [دال‌بلو و همکاران، ۲۰۰۰؛ سامودرا و ابراهیم، ۲۰۰۶]، *S. zeamais* [هیدالگو و همکاران، ۱۹۹۸]، *T. castaneum* [پادین و همکاران، ۲۰۰۲]، *Acanthoscelides obtectus* Say [پادین و همکاران، ۲۰۰۲] و *Prostephanus truncates* Horn [اسمیت و همکاران، ۱۹۹۹] در شرایط آزمایشگاه استفاده شده است. پادین و همکاران (۲۰۰۲) از *B. bassiana* برای کنترل *S. oryzae*،

*T. castaneum* و *A. obtectus* در شرایط آزمایشگاهی استفاده کردند. آزمایش پتلامول و پریزِرتسن (۲۰۱۲) نشان داد تعدادکنیدی‌های تولید شده توسط ۵ جدایه *B. bassiana* بر روی محیط کشت CDA متفاوت است. صفوی و همکاران (۲۰۰۷) با ارزیابی ۲ جدایه *B. bassiana* در ۷ محیط کشت با نسبت کربن به هیدروژن متفاوت، تعداد کنیدی تولید شده را بررسی کردند. نتایج آنها گویای تفاوت در تعداد کنیدی تولیدی برای هر دو جدایه در محیط کشت‌های متفاوت بود.

ارزیابی نرخ رشد و تعداد کنیدی ما نیز در دمای ۱ ± ۲۷ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت و به خوبی توانست تفاوت میان جدایه‌ها را از منظر نرخ رشد و تعداد کنیدی تولیدی نشان دهد. اندازه‌گیری نرخ رشد جدایه‌های مناطق مورد مطالعه در دمای ۱ ± ۲۷ درجه سانتی‌گراد نشان داد سرعت رشد جدایه‌ها با یکدیگر متفاوت است و این نرخ رشد در طیفی معادل ۴/۲۵۰ – ۰/۶۸۳۵ میلی‌متر/ روز قرار دارد. نتایج بدست آمده از این آزمایش با نتایج حاصل از آزمایشات اکسی و همکاران (۱۹۹۹)، داربرو و همکاران (۲۰۱۱)، صفوی و همکاران (۲۰۰۷) و پتلامول و پریزِرتسن (۲۰۱۲) همخوانی دارد و می‌توان گفت نرخ رشد جدایه‌های مختلف *Beauveria* در طیف دمایی ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد با یکدیگر متفاوت است. وارلا (۱۹۹۶) نرخ رشد سریع را مزیتی برای عامل کنترل زیستی دانست و علت آن را کاهش زمان لازم برای تولید انبوه کنیدی، استراتژی رقابتی قارچ در طی چرخه زندگی ساپروفیتی در برابر میکروارگانیسم-های دیگر و تسریع کنترل آفت به علت آلودگی سریع میزبان برشمرد. آزمایشات بی‌شماری تائید نموده‌اند که بهترین محیط‌کشت‌ها برای پرورش قارچ‌ها و به‌خصوص قارچ‌های بیماری‌زای حشرات PDA و SDAY می‌باشد [پتلامول و پریزِرتسن، ۲۰۱۲؛ زورک و همکاران، ۲۰۰۲؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۰۱] لذا ما برای سنجش از این محیط کشت‌ها بهره بردیم.

نتایج مقایسه میانگین تعداد کنیدی تولیدی نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میان جدایه‌های مورد مطالعه در

تعداد کنیدی تولیدی است که با آزمایشات پتلامول و پریزِرتسن (۲۰۱۲) و صفوی و همکاران (۲۰۰۷) همسویی دارد. پتلامول و پریزِرتسن (۲۰۱۲) با بررسی میزان کنیدی تولیدی توسط ۱۰ جدایه قارچ بیمای‌زای حشرات، جدایه‌ای با بیشترین میزان کنیدی را در سطح بالا (High) قرار دادند و لذا بر پایه نحوه تقسیم‌بندی آنها، جدایه SHU.H.43 با میانگین تولید کنیدی $۳۶/۳۹ \times ۱۰^{۶}$ در سطح بالا قرار می-گیرد. در تایلند بیماری‌زایی ۵ جدایه *B. bassiana* علیه لاروهای *Spodoptera litura* بررسی گردید و میزان مرگ‌ومیر را ۲ روز بعد از انکوبه نمودن حشرات آلوده به سوسپانسیون قارچ آغاز نمودند و مشاهده شد بیش از ۵۰٪ جمعیت در روز چهارم از بین رفتند و مرگ ۱۰۰٪ جمعیت برای قارچ *B. bassiana* در روز ششم توسط یک جدایه به ثبت رسید و بر همین مبنا به طبقه‌بندی جدایه‌ها از منظر بیماری‌زایی پرداختند و جدایه‌ای را که سبب بیشترین میزان مرگ‌ومیر گردید را در سطح بالا و جدایه‌ای که کمترین میزان مرگ‌ومیر را در پی داشت در سطح پایین قرار دادند [پتلامول و پریزِرتسن، ۲۰۱۲].

نتیجه مطالعه ما گویای حساسیت بالای سوسک قرمز آرد به قارچ بیماری‌زای *B. bassiana* بود. با این حال آزمایشات بیشتری نظیر $LT_{50}$ و $LC_{50}$ جهت غربال‌گری جدایه‌ها با توان بیماری‌زایی بیشتر برای کنترل آفات انباری لازم می‌باشد. اوما دوی و همکاران (۲۰۰۸) بر اساس درصد مرگ‌ومیر ۹ حشره مختلف، جدایه‌های *B. bassiana* را در ۳ سطح بالا (A)، سطح متوسط (B) و سطح پایین (C) طبقه-بندی نمود که سطح A با توان بیماری‌زایی ۱۰۰- ۶۸ ٪، سطح B با توان مرگ‌ومیر ۶۷-۳۴ ٪ و سطح C با توان بیماری‌زایی ۳۳-۰ ٪ بود. لذا برحسب همین سطوح تعریف‌شده به سطح‌بندی جدایه‌ها از منظر توان بیماری‌زایی پرداختیم (جدول ۴-۸). بر اساس این تقسیم‌بندی، ۱۶ جدایه در سطح A قرار گرفتند یعنی ۳۲٪ جدایه‌ها از توان بیماری‌زایی بالایی برخوردار هستند. ۵۲٪ جدایه‌ها در سطح B (متوسط) و -

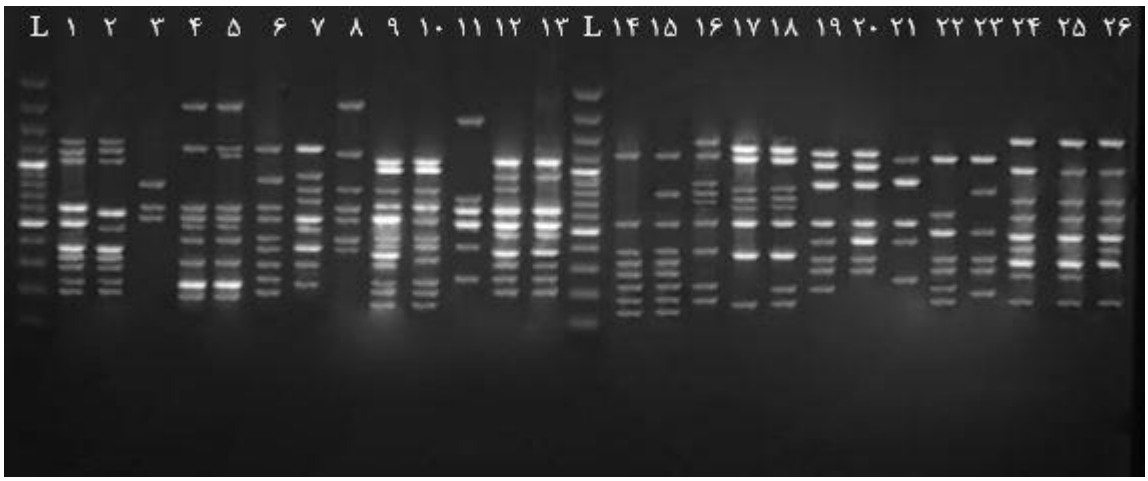
۱۶٪ جدایه‌ها در سطح C (کم) قرار دارند. مطالعه زیست‌سنجی برای تعیین بیماری‌زایی قارچ‌های بیماری‌زا حشرات و غربال‌گری جدایه‌های بیماری‌زا به عنوان عوامل کنترل زیستی ضروری است. بیماری-زایی عامل مهمی برای انتخاب جدایه‌های قارچی کاندیدا برای کنترل حشرات است [نگوین و همکاران، ۲۰۰۷]. آزمایش زیست‌سنجی جدایه‌های مورد مطالعه با غلظتی معادل $۱۰^{۸} \times ۱$ کنیدی/ میلی‌لیتر در برابر سوسک قرمز آرد صورت گرفت و جدایه‌های مختلف، توان بیماری‌زایی متفاوتی را بر روی حشرات کامل *T. castaneum* نشان دادند که با نتایج نانگ و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد.

با استفاده از جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* مشخص گردید که جدایه‌هایی با سرعت جوانه‌زنی زیاد، دارای نرخ رشد سریعی هستند و همبستگی متوسطی میان جوانه‌زنی اسپورها و درصد مرگ‌ومیر مشاهده گردید بدین معنی که هرچه جدایه‌ای سریعتر جوانه‌زنی نماید توانایی آن در آلودگی و مرگ‌ومیر آفت بیشتر است [کی‌سر، ۲۰۱۰]. به طور کلی نتایج مربوط به آنالیز تجزیه واریانس صفات فوق نشان داد میان ۳ پارامتر همبستگی معنی‌داری (در سطح ۱٪) وجود دارد یعنی جدایه‌ای که دارای نرخ رشد سریعتری است تعداد کنیدی تولیدی بیشتری دارد و از قدرت بیماری‌زایی بیشتری در آلوده‌سازی میزبان برخوردار است.

### ۴-۸- نتایج داده‌های مولکولی

برای بررسی چندشکلی DNA بین جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* در مناطق مختلف شهرستان اهواز در استان خوزستان و منطقه جنگل ابر در شهرستان شاهرود واقع در استان سمنان، ۳۰ پرایمر ISSR روی ۲۶ جدایه با خصوصیات متفاوت مورد آزمایش قرار گرفتند. با بررسی تعداد باندهای چند شکل، پرایمرهای مطلوب شناسایی و برای کلیه نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. از ۳۰ پرایمر تعداد ۶ مورد از آنها هیچ‌گونه باندی تولید نکردند و یا اینکه محصولات تکثیر شده آنها وضوح و قابلیت تکرارپذیری

کافی نداشتند. ۲۴ پرایمر دارای باندهای چندشکل و تکرارپذیر بودند. ۲۴ پرایمر، مجموعا ۹۱۳ باند تولید کردند که تمامی پرایمرها، چندشکلی قابل قبولی نشان دادند. به عبارت دیگر ۹۹/۷۶٪ باندها چندشکلی نشان دادند که حاکی از درصد بالای قطعات چندشکل در بین نمونه‌های مورد مطالعه است. چندشکلی بالای حاصل در این پژوهش را می‌توان به کارایی بالای نشانگرهای ISSR، وسعت مناطق نمونه‌برداری شده و به تعداد زیاد جدایه‌های مورد بررسی نسبت داد، همچنین از آنجایی که در روش ISSR، آغازگرها مکمل نواحی ریزماهواره‌ای می‌باشند، که در یوکاریوت‌ها مناطق تکرار شونده با فراوانی بالا در سراسر ژنوم پراکنده‌اند، بنابراین استفاده از نشانگرهای ISSR می‌تواند سطح بالایی از چندشکلی را آشکار کند (جدول ۴-۹).




شکل ۴-۱: الگوی باندی حاصل از پرایمر ISSR840، تفکیک باندها روی ژل آگارز ۱/۳ درصد، با ولتاژ ۱۰۰ و مدت زمان ۶۰ دقیقه انجام شد. کد جدایه‌های مختلف مورد مطالعه: ۱- ماهور۱ (SHU.H.04)، ۲- ماهور۲ (SHU.H.09)، ۳- گمبوعه بزرگ (SHU.H.12)، ۴- الهایی۱ (SHU.H.14)، ۵- الهایی۲ (SHU.H.15)، ۶- بروایه (SHU.H.17)، ۷- عرب حسن (SHU.H.18)، ۸- عرب اسد (SHU.H.19)، ۹- چم الحمید۱ (SHU.H.21)، ۱۰- چم الحمید۲ (SHU.H.22)، ۱۱- ملاثانی (SHU.H.23)، ۱۲- تل بومه۱ (SHU.H.25)، ۱۳- تل بومه۲ (SHU.H.26)، ۱۴- ویس۱ (SHU.H.27)، ۱۵- ویس۲ (SHU.H.28)، ۱۶- مولحه (SHU.H.30)، ۱۷- شیبان۱ (SHU.H.31)، ۱۸- شیبان۲ (SHU.H.32)، ۱۹- سید عامر۱ (SHU.H.33)، ۲۰- سید عامر۲ (SHU.H.34)، ۲۱- بحره (SHU.H.38)، ۲۲- موران (SHU.H.39)، ۲۳- مقطوع (SHU.H.40)، ۲۴- جنگل ابر۶ (SHU.H.47)، ۲۵- جنگل ابر۸ (SHU.H.49) و ۲۶- جنگل ابر۱۱ (SHU.H.50).

میانگین تعداد باندهای ایجاد شده برای هر پرایمر ۳۸/۰۴ باند و میانگین باندهای پلی‌مورف ۳۷/۹۶ باند بود که پرایمر ISSR840 با ۵۰ باند بیشترین تعداد باند دارای چندشکلی و پرایمر ISSRBIS29 با ۲۹ باند کمترین باند دارای چندشکلی را نشان داد. میانگین درصد چندشکلی پرایمرها ۹۹/۷۶ درصد بود. ۲۲ پرایمر با میزان چندشکلی ۱۰۰ درصد بیشترین درصد چندشکلی و ۲ پرایمر ISSRBIS06 و ISSRBIS07 به ترتیب با چندشکلی ۹۶/۹۷ و ۹۷/۲۲ کمترین درصد چندشکلی را داشتند.

میانگین شاخص شانون (SI) ۰/۳۴ بود که بیشترین مقدار مربوط به پرایمر ISSR840 با میزان ۰/۴۴ و کمترین مقدار مربوط به پرایمر ISSRBIS07 با میزان ۰/۲۷ بود.

شاخص تنوع ژنی Nei (h) با میانگین ۰/۲۰ برای پرایمرهای مختلف از ۰/۱۵ تا ۰/۲۸ متغیر بود. بیشترین شاخص Nei مربوط به پرایمر ISSR840 با میزان ۰/۲۸ و کمترین شاخص Nei مربوط به پرایمر ISSRBIS07 با میزان ۰/۱۵ بود. وانگ و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۳۹ جدایه قارچ *B.bassiana* با استفاده از پرایمرهای ISSR شاخص تنوع ژنی Nei را بین ۰/۴۲-۰/۰۶ با میانگین ۰/۲۲ گزارش نمودند. تاکات‌سوکا (۲۰۰۷) تنوع و روابط ژنتیکی بین ۵۹ جدایه مختلف قارچ *B.bassiana* بومی ژاپن را با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد ارزیابی قرار داد. میانگین شاخص تنوع ژنی Nei برای پرایمرها ۰/۲۵ بود.

فراوانی آللی (AF) با میانگین ۰/۱۷۰ برای پرایمرهای مختلف از ۰/۱۲۰ تا ۰/۲۷۶ متغیر بود که پرایمر ISSRA7 بیشترین و پرایمر ISSRP9 کمترین فراوانی آللی را داشتند.

میانگین تعداد آلل‌های موثر (Ne) ۱/۲۸ بود که پرایمر ISSR840 با میزان ۱/۴۳ بیشترین و پرایمر ISSRBIS07 با میزان ۱/۱۹ کمترین تعداد آلل موثر را داشتند.

میانگین تعداد آلل‌های متفاوت (Na) ۱/۹۸۸ بود که ۲۲ پرایمر با مقدار ۲ بیشترین و تنها پرایمرهای

ISSRBIS06 و ISSRBIS07 با مقدار ۱/۹۷ کمترین تعداد آلل متفاوت را داشتند.

از آنجا که میانگین تعداد آلل‌های موثر و میانگین تعداد آلل‌های متفاوت در هر نشانگر ریزماهواره مناسب بودن آن مکان ژنی برای تخمین تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهد، بنابراین پرایمرهایی که تعداد آلل‌های موثر و متفاوت زیادی نشان داده‌اند برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب تشخیص داده می‌شوند. همچنین تفاوت در تعداد آلل‌های موثر و متفاوت می‌تواند به دلیل منشا و خصوصیات متفاوت جدایه‌های مورد مطالعه و نیز ماهیت نشانگرهای ریزماهواره از نظر تعداد نوکلئوتید واحدهای تکراری باشد.

در این پژوهش، با استفاده از فراوانی آللی، شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، نسبت چندشکلی موثر (EMR) و شاخص نشانگر (MI) برای هر پرایمر و بطور جداگانه محاسبه گردید.

پرایمر ISSR840 با میزان ۰/۷۳ بیشترین و پرایمر ISSRBIS06 با میزان ۰/۳۹ کمترین محتوای اطلاعات چندشکلی را داشتند. مقادیر بالای محتوای اطلاعات چندشکلی در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد بنابراین نشانگرهایی با محتوای اطلاعات چندشکلی بالا برای تمایز جدایه‌هایی با خویشاوندی نزدیک بسیار مفید خواهند بود. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش از محتوای اطلاعات چندشکلی بالایی برخوردار بودند که نشان‌دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش می‌باشد. لذا می‌توان از این پرایمرها به خوبی برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف قارچ مورد مطالعه بهره گرفت. میانگین شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۶۱ بود در حالیکه در مطالعات وانگ و همکاران (۲۰۰۵) برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۹ جدایه قارچ *B.bassiana* با استفاده از پرایمرهای ISSR، میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۳۶ گزارش شد.

میانگین نسبت چندشکلی موثر ۳۷/۸۸ بود که بیشترین مقدار مربوط به پرایمر ISSR840 با میزان ۵۰ و

کمترین مقدار مربوط به پرایمر ISSRBIS06 با میزان ۳۱/۰۳ بود. لازم به ذکر است که با توجه به ژنوم و جدایه‌های قارچی، نسبت چندشگلی موثر ممکن است متفاوت باشد که با تغییر در تعداد و نوع پرایمرها نتایج متفاوتی بدست می‌آید.

شاخص نشانگری پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه بین ۱۲/۱ و ۳۶/۵ با میانگین ۲۳/۱۹ بود که پرایمر ISSR840 با میزان ۳۶/۵ بیشترین و پرایمر ISSRBIS06 با میزان ۱۲/۱ کمترین شاخص نشانگری را نشان دادند.

از آنجایی که پرایمر ISSR840 بیشترین تعداد باند چندشکل (۵۰)، بیشترین شاخص شانون (۰/۴۴)، بیشترین شاخص Nei (۰/۲۸)، بیشترین تعداد آلل‌های موثر (۱/۴۳)، بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۷۳)، بیشترین نسبت چندشکلی موثر (۵۰) و بیشترین شاخص نشانگر (۳۶/۵) را به خود اختصاص داده است، بنابراین این پرایمر تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مورد مطالعه را نسبت به سایر پرایمرهای ISSR بهتر نشان می‌دهد (جدول ۴-۹).

جدول ۴-۹: نتایج حاصل از آنالیز نشانگرهای ISSR برای جدایه‌های مورد مطالعه

| پرایمر | دمای اتصال | نوع پرایمر | تعداد کل باندها | تعداد باندهای چندشکل | درصد چندشکلی | شاخص شانون (SI) | شاخص تنوع ژنی Nei (h) | فراوانی آللی (AF) | تعداد آلل-های موثر (Ne) | تعداد آلل‌های متفاوت (مشاهده شده) (Na) | محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) | نسبت چندشکلی موثر (EMR) | شاخص نشانگر (MI) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| UBC812 | 50 | ISSR | ۴۱ | ۴۱ | ۱۰۰ | ۰/۳۵ | ۰/۲۰ | ۰/۱۲۵ | ۱/۲۷ | ۲ | ۰/۶۹ | ۴۱ | ۲۸/۲۹ |
| UBC849 | 50 | ISSR | ۴۰ | ۴۰ | ۱۰۰ | ۰/۳۴ | ۰/۲۰ | ۰/۱۷۱ | ۱/۲۹ | ۲ | ۰/۶۲ | ۴۰ | ۲۴/۸ |
| P1 | 48 | ISSR | ۴۲ | ۴۲ | ۱۰۰ | ۰/۳۱ | ۰/۱۸ | ۰/۱۳۹ | ۱/۲۴ | ۲ | ۰/۶۱ | ۴۲ | ۲۵/۶۲ |
| P9 | 52 | ISSR | ۳۵ | ۳۵ | ۱۰۰ | ۰/۲۸ | ۰/۱۶ | ۰/۱۲۰ | ۱/۲۰ | ۲ | ۰/۵۸ | ۳۵ | ۲۰/۳ |
| P12 | 46 | ISSR | ۳۶ | ۳۶ | ۱۰۰ | ۰/۳۱ | ۰/۱۸ | ۰/۱۶۵ | ۱/۲۴ | ۲ | ۰/۵۸ | ۳۶ | ۲۰/۸۸ |
| MS7 | 55 | ISSR | ۴۴ | ۴۴ | ۱۰۰ | ۰/۳۷ | ۰/۲۲ | ۰/۱۷۴ | ۱/۳۴ | ۲ | ۰/۶۶ | ۴۴ | ۲۹/۰۴ |
| MS8 | 55 | ISSR | ۳۶ | ۳۶ | ۱۰۰ | ۰/۳۳ | ۰/۱۹ | ۰/۲۱۷ | ۱/۲۷ | ۲ | ۰/۶۳ | ۳۶ | ۲۲/۶۸ |
| MS11 | 55 | ISSR | ۴۶ | ۴۶ | ۱۰۰ | ۰/۳۲ | ۰/۱۸ | ۰/۱۲۳ | ۱/۲۴ | ۲ | ۰/۶۲ | ۴۶ | ۲۸/۵۲ |
| MS12 | 46 | ISSR | ۴۰ | ۴۰ | ۱۰۰ | ۰/۴۲ | ۰/۲۷ | ۰/۲۰۳ | ۱/۴۲ | ۲ | ۰/۶۶ | ۴۰ | ۲۶/۴ |
| A7 | 51 | ISSR | ۳۰ | ۳۰ | ۱۰۰ | ۰/۳۴ | ۰/۲۰ | ۰/۲۷۶ | ۱/۲۹ | ۲ | ۰/۶۶ | ۳۰ | ۱۹/۸ |
| 809 | 54 | ISSR | ۳۶ | ۳۶ | ۱۰۰ | ۰/۳۴ | ۰/۲۰ | ۰/۱۴۴ | ۱/۲۹ | ۲ | ۰/۶۰ | ۳۶ | ۲۱/۶ |
| 810 | 54 | ISSR | ۴۴ | ۴۴ | ۱۰۰ | ۰/۳۱ | ۰/۱۸ | ۰/۱۲۱ | ۱/۲۵ | ۲ | ۰/۶۲ | ۴۴ | ۲۷/۲۸ |
| 825 | 50 | ISSR | ۳۸ | ۳۸ | ۱۰۰ | ۰/۳۸ | ۰/۲۳ | ۰/۲۱۲ | ۱/۳۵ | ۲ | ۰/۶۴ | ۳۸ | ۲۴/۳۲ |
| 840 | 50 | ISSR | ۵۰ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۰/۴۴ | ۰/۲۸ | ۰/۱۶۶ | ۱/۴۳ | ۲ | ۰/۷۳ | ۵۰ | ۳۶/۵ |
| 848 | 50 | ISSR | ۴۶ | ۴۶ | ۱۰۰ | ۰/۳۷ | ۰/۲۲ | ۰/۱۳۷ | ۱/۳۱ | ۲ | ۰/۶۲ | ۴۶ | ۲۸/۵۲ |
| 849 | 50 | ISSR | ۳۸ | ۳۸ | ۱۰۰ | ۰/۳۲ | ۰/۱۹ | ۰/۱۳۶ | ۱/۲۶ | ۲ | ۰/۶۴ | ۳۸ | ۲۴/۳۲ |
| 857 | 50 | ISSR | ۳۵ | ۳۵ | ۱۰۰ | ۰/۳۴ | ۰/۲۰ | ۰/۲۲۷ | ۱/۲۷ | ۲ | ۰/۶۰ | ۳۵ | ۲۱ |
| 873 | 48 | ISSR | ۳۳ | ۳۳ | ۱۰۰ | ۰/۳۶ | ۰/۲۲ | ۰/۲۰۹ | ۱/۳۳ | ۲ | ۰/۶۲ | ۳۳ | ۲۰/۴۶ |
| BIS06 | 54 | ISSR | ۳۳ | ۳۲ | ۹۶/۹۷ | ۰/۳۲ | ۰/۱۸ | ۰/۱۵۹ | ۱/۲۵ | ۱/۹۷ | ۰/۳۹ | ۳۱/۰۳ | ۱۲/۱۰ |
| BIS07 | 54 | ISSR | ۳۶ | ۳۵ | ۹۷/۲۲ | ۰/۲۷ | ۰/۱۵ | ۰/۱۵۷ | ۱/۱۹ | ۱/۹۷ | ۰/۴۸ | ۳۴/۰۲ | ۱۶/۳۲ |
| BIS09 | 54 | ISSR | ۳۳ | ۳۳ | ۱۰۰ | ۰/۳۱ | ۰/۱۸ | ۰/۱۵۵ | ۱/۲۴ | ۲ | ۰/۵۸ | ۳۳ | ۱۹/۱۴ |
| BIS22 | 54 | ISSR | ۳۷ | ۳۷ | ۱۰۰ | ۰/۳۱ | ۰/۱۸ | ۰/۲۱۱ | ۱/۲۴ | ۲ | ۰/۶۰ | ۳۷ | ۲۲/۲ |
| BIS27 | 54 | ISSR | ۳۵ | ۳۵ | ۱۰۰ | ۰/۳۴ | ۰/۲۰ | ۰/۱۵۴ | ۱/۲۷ | ۲ | ۰/۶۳ | ۳۵ | ۲۲/۰۵ |
| BIS29 | 48 | ISSR | ۲۹ | ۲۹ | ۱۰۰ | ۰/۳۱ | ۰/۱۸ | ۰/۱۷۵ | ۱/۲۶ | ۲ | ۰/۵۰ | ۲۹ | ۱۴/۵ |
| میانگین | | | ۳۸/۰۴ | ۳۷/۹۶ | ۹۹/۷۶ | ۰/۳۴ | ۰/۲۰ | ۰/۱۷۰ | ۱/۲۸ | ۱/۹۹۸ | ۰/۶۱ | ۳۷/۸۸ | ۲۳/۱۹ |

میانگین هتروزیگوسیتی کل قابل انتظار (Ht) و میانگین هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (Hs) به ترتیب ۰/۱۹۸۴ و ۰/۶۸۹۲ بود. میانگین ضریب تمایز ژنی (Gst) و میانگین جریان ژنی (Nm) به ترتیب ۰/۳۱۰۸ و ۰/۵۹۱۱ بود (جدول ۴-۱۰).

جدول ۴-۱۰: نتایج حاصل از شاخص‌های اندازه‌گیری شده آنالیز تنوع ژنی Nei در یکایک جمعیت‌ها

| مولفه‌ها | هتروزیگوسیتی کل قابل انتظار (Ht) | هتروزیگوسیتی درون جمعیت (Hs) | ضریب تمایز ژنی (Gst) | جریان ژنی (Nm) |
|---|---|---|---|---|
| مقدار پارامتر | ۰/۱۹۸۴ | ۰/۶۸۹۲ | ۰/۳۱۰۸ | ۰/۵۹۱۱ |
| انحراف معیار | ۰/۰۱۶۶ | ۰/۰۰۵۱ | | |

از آنجا که میزان تمایز ژنی کمتر از یک به عنوان آستانه تمایز در نظر گرفته می‌شود و میزان برآورد کمتر از آن، نشان‌دهنده میزان کم تبادل ژنی خواهد بود. تمایز ژنتیکی ممکن است به دلیل اختلاف در صفات ژنتیکی که بر اثر تغییر شرایط محیطی و انتخاب طبیعی ایجاد شده است، باشد. همچنین به دلیل مهاجرت، میزان یا درجه تمایز جمعیت‌ها و فرآیندهای تصادفی مثل جهش باشد.

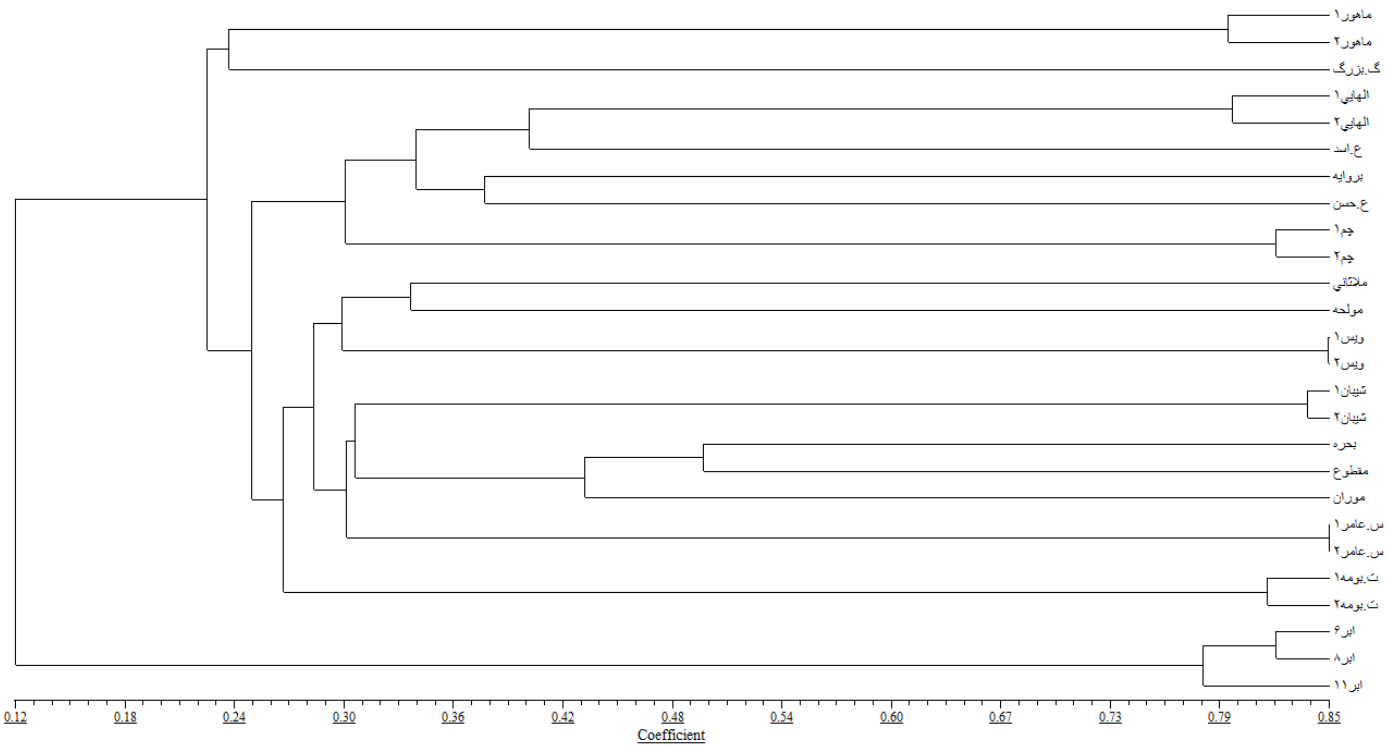
مقدار جریان ژنی در این بررسی (۰/۵۹۱۱) بیانگر پایین بودن تبادل ژنی بین جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد که می‌تواند به دلیل فاصله زیاد بین مناطق نمونه‌برداری خاک باشد.

در این مطالعه میزان هتروزیگوسیتی کل قابل انتظار (Ht) حدود ۲۰ درصد برآورد شد که حدود ۶۹ درصد آن (یعنی ۱۴ درصد) مربوط به تنوع ژنی درون جمعیت‌ها (Hs) و ۳۱ درصد آن (یعنی ۶ درصد)

مربوط به تنوع ژنی بین جمعیت‌ها (Gst) بوده است. این معیار نشان می‌دهد که تنوع بین جمعیت‌ها در قیاس با درون جمعیت‌های قارچ مورد مطالعه کمتر است. این موضوع نشان می‌دهد که اکثر تنوع مشاهده شده ناشی از تنوع میان جدایه‌های درون جمعیت‌ها بوده و بررسی آن به صورت کلی در جمعیت، باعث مشاهده تنوع کمتری در بین جمعیت‌ها شد.

### ۴-۸-۱- نتایج آنالیز خوشه‌ای

به منظورگروه‌بندی جدایه‌ها براساس داده‌های ISSR، سه ضریب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده برای جدایه‌های مورد مطالعه محاسبه گردید، سپس با مقایسه ضریب کوفنتیک هر سه ماتریس با ضریب کوفنتیک حاصل از مقایسه میزان همبستگی میان ضرایب تشابه، ضریب تشابه جاکارد برای داده‌های ISSR به عنوان مناسب‌ترین ضریب برای ترسیم دندروگرام انتخاب گردید. براساس این ماتریس تشابه روش‌های مختلف کلاستربندی مورد مقایسه قرار گرفت که با توجه به ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس‌های تشابه و ماتریس خروجی دندروگرام، کلاستربندی براساس روش UPGMA مناسب‌ترین گروه‌بندی را ایجاد نمود (شکل۴-۲).




شکل ۴-۲: دندروگرام حاصل از داده‌های ISSR برای جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* مورد مطالعه. دندروگرام با استفاده از نرم افزار NTSYS PC 2/02، ضریب تشابه جاکارد و آنالیز خوشه‌ای UPGMA رسم شد.

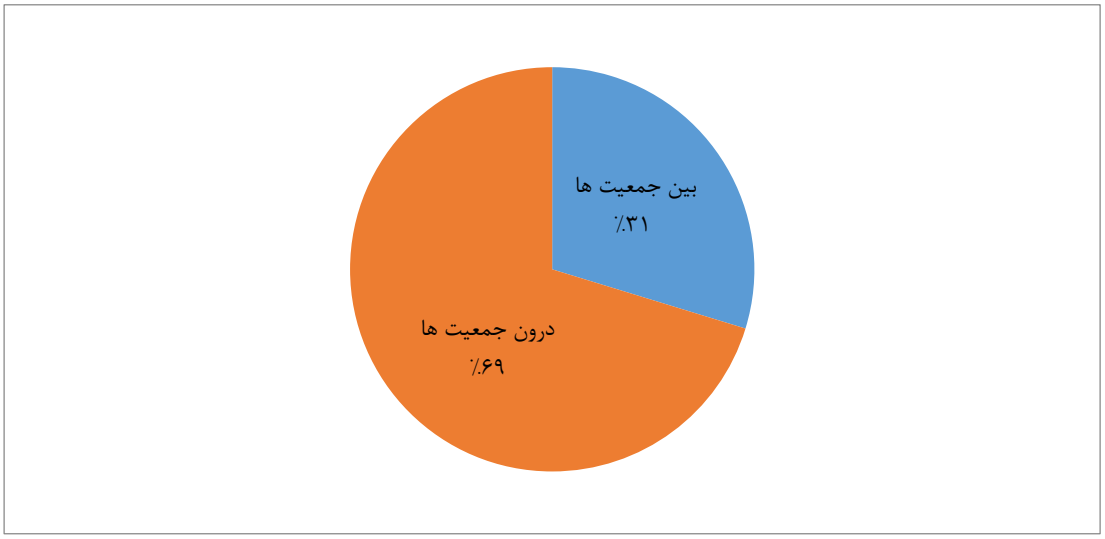
بر اساس این دندروگرام جدایه‌های مورد مطالعه در فاصله ۱۳٪ به ۲ خوشه اصلی تقسیم می شوند. در خوشه اول ماهور۱، ماهور۲، گمبوعه بزرگ، الهایی۱، الهایی۲، عرب اسد، بروایه، عرب‌حسن، چم الحمید۱، چم الحمید۲، ملاثانی، مولحه، ویس۱، ویس۲، شیبان۱، شیبان۲، بحره، مقطوع، موران، سید عامر۱، سید عامر۲، تل بومه۱، تل بومه۲، و در خوشه دوم جنگل ابر۶، جنگل ابر۸ و جنگل ابر۱۱ قرار گرفتند. دندروگرام در فاصله ۲۳٪ به ۳ خوشه اصلی تقسیم می‌شوند. شامل ماهور۱، ماهور۲، گمبوعه بزرگ در خوشه اول، الهایی۱، الهایی۲، عرب‌اسد، بروایه، عرب حسن، چم الحمید۱، چم الحمید۲، ملاثانی، مولحه، ویس۱، ویس۲، شیبان۱، شیبان۲، بحره، مقطوع، موران، سید عامر۱، سید عامر۲، تل بومه۱، تل بومه۲،

در خوشه دوم و در خوشه سوم جنگل ابر۶، جنگل ابر۸ و جنگل ابر۱۱ قرار دارند که نشان می‌دهد این سه جدایه از منطقه‌ی جغرافیایی دیگری نسبت به سایر جدایه‌های مورد مطالعه و در گروه جداگانه‌ای نسبت به سایر جدایه‌ها قرار گرفتند، بنابراین با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد استفاده در این پژوهش جدایه‌های اهواز از جدایه‌های شاهرود به‌خوبی از یکدیگر تفکیک گردیدند. خوشه دوم نسبت به خوشه‌های اول و سوم بیشترین نرخ رشد، بیشترین تعداد کنیدی و بیشترین بیماری‌زایی را دارد. از نتایج این پژوهش چنین بر می‌آید که جدایه‌های بومی مناطق مورد مطالعه از نظر ژنتیکی یکسان نبوده و نسبت به هم متنوع هستند. وانگ و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی بر روی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* نیز به چنین نتیجه‌ای دست یافته بودند که جدایه‌های بومی هر منطقه‌ای ممکن است با همدیگر گروه‌بندی نشوند و در سراسر خوشه‌ها توزیع شوند.

### ۴-۸-۲- تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA)

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس جمعیت‌های تعریف شده نواحی جغرافیایی مورد مطالعه انجام شد. اختلاف معنی‌داری درون و بین جمعیت‌های قارچ مورد مطالعه وجود دارد ($P<0.0010$)، به‌گونه‌ای که تجزیه واریانس مولکولی بر مبنای اطلاعات کلیه‌ی پرایمرها نشان داد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها بیشتر از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها است.

جدول ۴-۱۱: نمودار حاصل از تجزیه واریانس مولکولی بر اساس جمعیت‌های مورد مطالعه




جدول ۴-۱۲: تجزیه واریانس مولکولی برای جدایه‌های مختلف قارچ مورد مطالعه

| منابع تغییرات | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | درصد واریانس |
|---|---|---|---|---|
| بین جمعیت‌ها | ۴ | ۸۹۶/۱۳۶ | ۲۲۴/۰۳۴ | ٪۳۱ |
| درون جمعیت‌ها | ۲۱ | ۱۴۶۰/۶۳۳ | ۶۹/۵۵۴ | ٪۶۹ |
| کل | ۲۵ | ۲۳۵۶/۷۶۹ | | ٪۱۰۰ |
| Stat | Value | P(rand >= data) | | |
| PhiPT | ۰/۳۰۹ | ۰/۰۰۱ | | |

میانگین تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها ٪۶۹ و میانگین تنوع بین جمعیت‌ها ٪۳۱ بود. نتایج تریسی و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه تنوع ژنتیکی بین ۴۰ جدایه مختلف قارچ *B.bassiana* از مناطق مختلف ترکیه و سوریه را با استفاده از ۱۴ نشانگر AFLP حاکی از وجود تنوع بیشتر درون جمعیتی (٪۸۸) نسبت

به بین جمعیتی (۱۲٪) است. تنوع زیاد درون جمعیتی حاصل از این مطالعه احتمالا به خاطر قابلیت بالای آشکارسازی توسط نشانگرهای ISSR و همچنین نزدیکی بعضی از جدایه‌های قارچ از لحاظ جغرافیایی نسبت به یکدیگر و به عبارت دیگر قرابت جغرافیایی زیرجمعیت‌ها می‌باشد. نشانگرهای ISSR تا حدودی جمعیت‌های مورد مطالعه را از یکدیگر متمایز ساخت و میزان تمایز کلی بین جمعیت‌های مورد بررسی قابل قبول بود.

### ۴-۸-۳- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

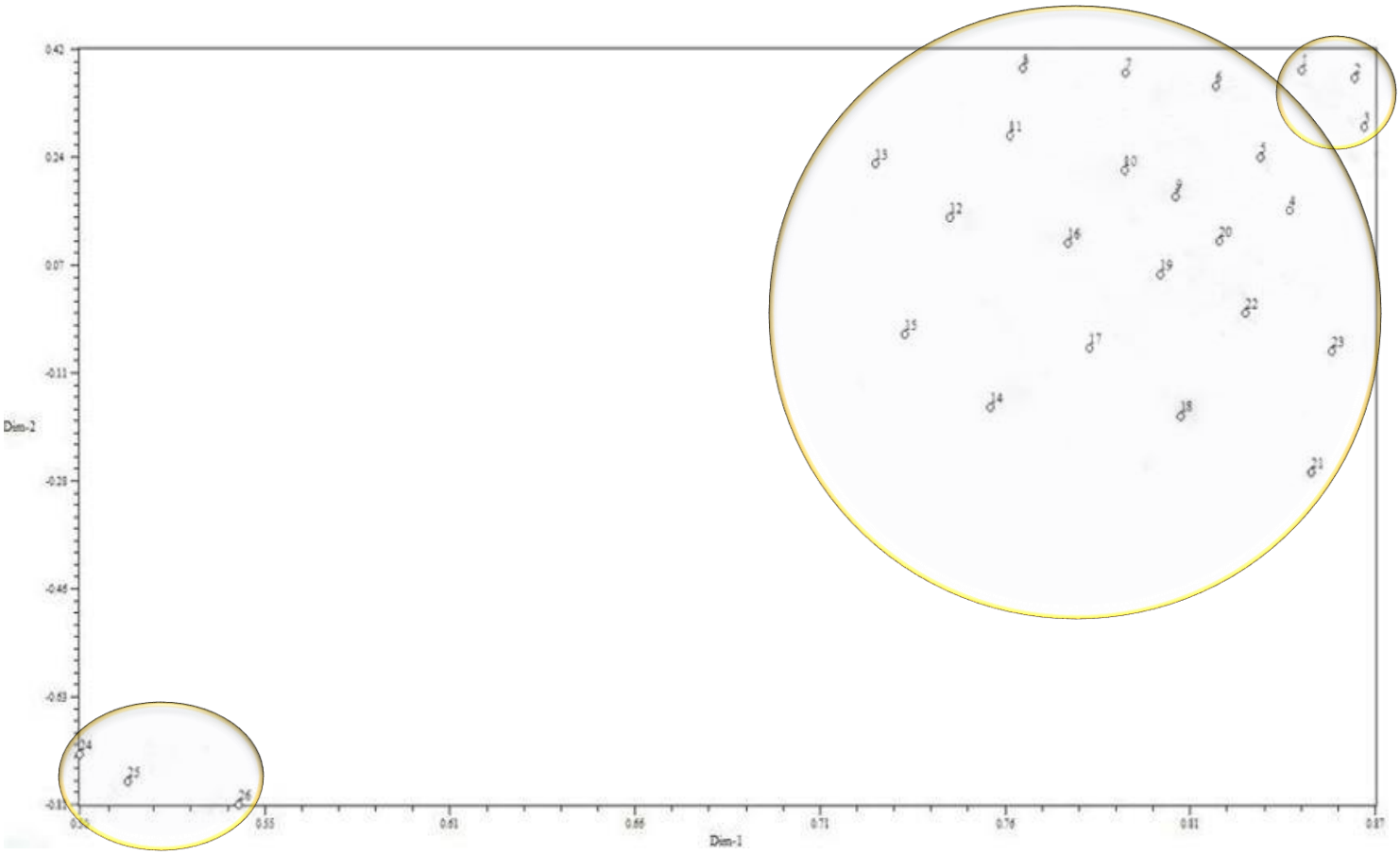
تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCOA) بر اساس داده‌های مولکولی یکی دیگر از تکنیک‌های چندمتغیره است که کاربرد زیادی در تجزیه تنوع ژنتیکی دارد. این تکنیک را می توان برای نمایش سه بعدی پراکنش افراد بکار برد. تجمع افراد در یک ناحیه از پلات نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی افراد می‌باشد.

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی نشانگرهای ISSR، سه مؤلفه تجزیه به مؤلفه‌های اصلی یعنی PCoA1، PCoA2 و PCoA3 به ترتیب ۲۹/۶۹، ۱۸/۵۶و ۱۴/۲۴(مجموعا ۶۲/۴۹٪) از واریانس کل را برای نشانگرها بیان کردند. یعنی نشانگرهای مورد استفاده دارای توزیع نسبتاً مناسبی در سطح ژنوم بوده‌اند و در ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف مورد مطالعه، مناسب عمل کرده‌اند (جدول۴-۱۳). آرایش تجمعی جدایه‌های مختلف با استفاده از شباهت ژنتیکی مبتنی بر پرایمرهای ISSR، در شکل ۴-۳ نشان داده شده است. توزیع جدایه‌ها در این نمودار مطابق با توزیع توده‌ها در شاخه‌های دندروگرام حاصل در این مطالعه می‌باشد چراکه در این پلات جدایه‌ها در ۳ گروه کاملاً مجزا قرار گرفتند. در واقع نمودار دو بعدی مؤلفه ها ابزار دیگری جهت نشان‌دادن پراکنش جدایه‌ها است که می‌تواند به عنوان روشی مکمل

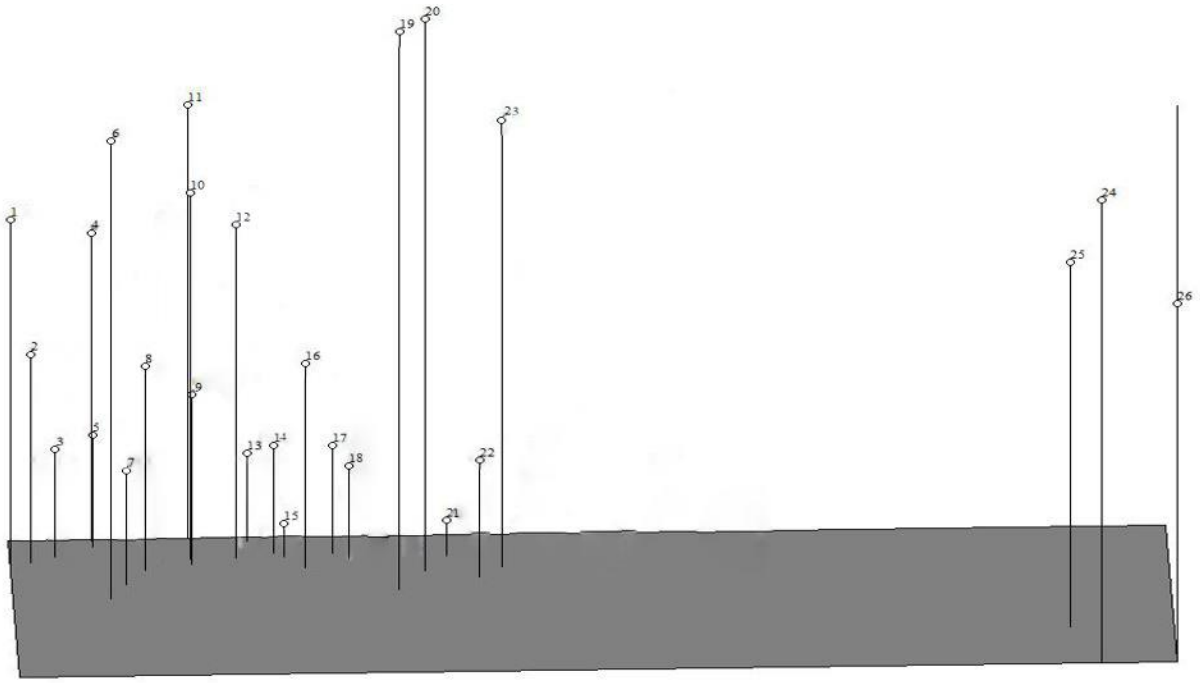
برای تجزیه خوشه‌ای به شمار رود. در شکل ۴-۴ نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی داده-های مولکولی نشانگرهای ISSR نشان داده شده است، با توجه به پلات ۳ بعدی رسم شده کاملاً مشهود است که ۲۶ جدایه‌ی مورد بررسی در ۳ گروه طبقه‌بندی شده‌اند. فواصل فضایی نقاط روی نمودار با فواصل ژنتیکی جدایه‌ها هماهنگی داشته و این روش جدایه‌ها را در گروه‌های جداگانه‌ای دسته‌بندی نموده است. بطور کلی نتایج بدست آمده از تجزیه به روش‌های مختلف یکدیگر را تایید می‌کنند.

جدول ۴-۱۳: نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی پرایمرهای ISSR

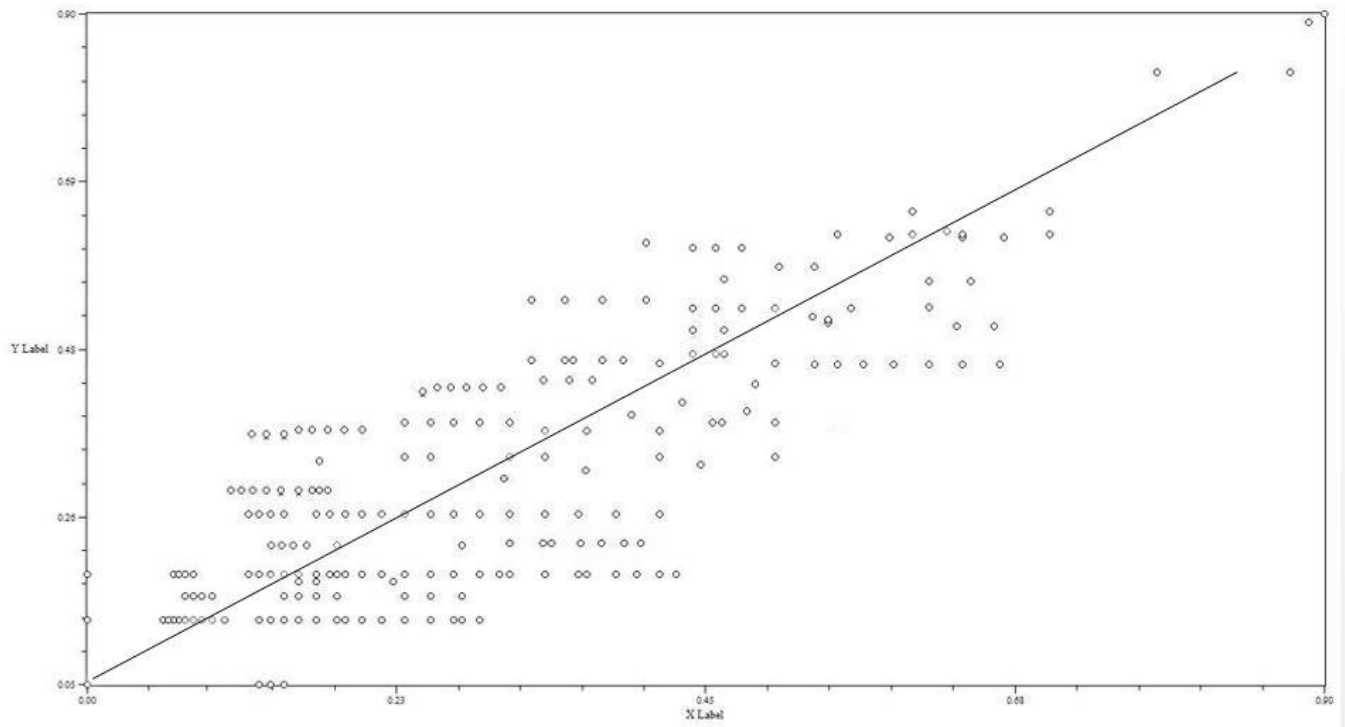
| مولفه ها | درصد مقادیر ویژه | درصد تجمعی |
|---|---|---|
| ۱ | ۲۹/۶۹ | ۲۹/۶۹ |
| ۲ | ۱۸/۵۶ | ۴۸/۲۵ |
| ۳ | ۱۴/۲۴ | ۶۲/۴۹ |




شکل ۴-۳: پلات تجزیه مؤلفه‌های اصلی پرایمرهای ISSR، کد جدایه‌های مختلف مورد مطالعه: ۱- ماهور۱ (SHU.H.04)، ۲- ماهور۲ (SHU.H.09)، ۳- گمبوعه بزرگ (SHU.H.12)، ۴- الهایی۱ (SHU.H.14)، ۵- الهایی۲ (SHU.H.15)، ۶- بروایه (SHU.H.17)، ۷- عرب حسن (SHU.H.18)، ۸- عرب اسد (SHU.H.19)، ۹- چم الحمید۱ (SHU.H.21)، ۱۰- چم الحمید۲ (SHU.H.22)، ۱۱- ملاثانی (SHU.H.23)، ۱۲- تل بومه۱ (SHU.H.25)، ۱۳- تل بومه۲ (SHU.H.26)، ۱۴- ویس۱ (SHU.H.27)، ۱۵- ویس۲ (SHU.H.28)، ۱۶- مولحه (SHU.H.30)، ۱۷- شیبان۱ (SHU.H.31)، ۱۸- شیبان۲ (SHU.H.32)، ۱۹- سید عامر۱ (SHU.H.33)، ۲۰- سید عامر۲ (SHU.H.34)، ۲۱- بحره (SHU.H.38)، ۲۲- موران (SHU.H.39)، ۲۳- مقطوع (SHU.H.40)، ۲۴- جنگل ابر۶ (SHU.H.47)، ۲۵- جنگل ابر۸ (SHU.H.49) و ۲۶- جنگل ابر۱۱ (SHU.H.50). در این پلات جدایه‌هایی که با هم تشابه ژنتیکی بیشتری دارند، نزدیک به هم قرار گرفته‌اند.



شکل ۴-۴: نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی داده‌های مولکولی پرایمرهای ISSR. کد جدایه‌های مختلف مورد مطالعه: ۱- ماهور۱ (SHU.H.04)، ۲- ماهور۲ (SHU.H.09)، ۳- گمبوعه بزرگ (SHU.H.12)، ۴- الهایی۱ (SHU.H.14)، ۵- الهایی۲ (SHU.H.15)، ۶- برواپه (SHU.H.17)، ۷- عرب حسن (SHU.H.18)، ۸- عرب اسد (SHU.H.19)، ۹- چم الحمید۱ (SHU.H.21)، ۱۰- چم الحمید۲ (SHU.H.22)، ۱۱- ملاثانی (SHU.H.23)، ۱۲- تل بومه۱ (SHU.H.25)، ۱۳- تل بومه۲ (SHU.H.26)، ۱۴- ویس۱ (SHU.H.27)، ۱۵- ویس۲ (SHU.H.28)، ۱۶- مولحه (SHU.H.30)، ۱۷- شیبان۱ (SHU.H.31)، ۱۸- شیبان۲ (SHU.H.32)، ۱۹- سید عامر۱ (SHU.H.33)، ۲۰- سید عامر۲ (SHU.H.34)، ۲۱- بحره (SHU.H.38)، ۲۲- موران (SHU.H.39)، ۲۳- مقطوع (SHU.H.40)، ۲۴- جنگل ابر۶ (SHU.H.47)، ۲۵- جنگل ابر۸ (SHU.H.49) و ۲۶- جنگل ابر۱۱ (SHU.H.50). در این پلات ارقامی که با هم تشابه ژنتیکی بیشتری دارند، نزدیک به هم قرار گرفته‌اند.




شکل۴-۵: نمودار حاصل از بررسی همبستگی کوفنتیک دو ماتریس فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی پرایمرهای ISSR بر اساس نرم‌افزار NTSYS 2.02e. همان‌طور که در شکل ملاحظه می‌فرمایید نقاط نزدیک خط اصلی هستند و پیوستگی مشاهده می‌شود و بالا بودن ضریب کوفنتیک میان این دو پارامتر تائیدی بر وجود همبستگی میان دو پارامتر است. X و Y به ترتیب ماتریس جغرافیایی و ماتریس ژنتیکی هستند. لازم به ذکر است این آزمون برای تائید تست منتل GenAlEx 6.5 صورت گرفت.

## ۴-۹- نتیجه‌گیری

طبق بررسی‌های انجام شده توسط نگارنده، این پژوهش اولین مطالعه تنوع ژنتیکی قارچ بیماری‌زای حشرات *B. bassiana* با استفاده از نشانگر ISSR در ایران است، ضمن اینکه تا قبل از سال ۲۰۰۵ میلادی مورد مشابهی با این کار در دنیا انجام نشده بود.

نتایج این تحقیق نشان داد که پرایمرهای ISSR استفاده شده پراکنش مناسبی در سرتاسر ژنوم قارچ مورد مطالعه دارند و برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف این قارچ مناسب هستند. از طرف دیگر با بررسی تنوع ژنتیکی بدست آمده از این تحقیق و بررسی فواصل جغرافیایی و دوری و نزدیکی افراد این نتیجه بدست آمد که ارتباط معنی‌داری بین جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* و فواصل جغرافیایی آنها وجود دارد. نتایج حاصله نشان داد که تنوع قابل توجهی در بین جدایه‌های مورد مطالعه وجود دارد، زیرا تمایز زیادی در بین گروه‌های اصلی و فرعی در دندروگرام حاصل از ماتریس تشابه وجود دارد. گویای این امر قرارگیری جدایه‌ها در خوشه‌های مختلف درختچه رسم شده است (شکل ۴-۲)، این نشان می‌دهد که در بین و درون جمعیت‌های مختلف *B. bassiana*، تنوع ژنتیکی بالایی وجود دارد. مطمئناً زیستگاهای متنوع جدایه‌های مختلف دلیل اصلی این تنوع ژنتیکی است. بطور کلی نتایج این پژوهش نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی در بین جدایه‌های مورد بررسی بوده و بیانگر کارآمدی نشانگرهای ISSR در تعیین تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف قارچ مورد مطالعه می‌باشند، بطوریکه درصد چندشکلی در اکثر پرایمرهای ISSR مورد استفاده ۱۰۰٪ بود.

### ۴-۱۰- پیشنهادات

۱. طبق نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌شود در صورت استفاده از روش طعمه حشره‌ای، تعداد نمونه‌های خاک زیاد باشد چرا که پراکنش این قارچ در تمامی نقاط به یک اندازه نیست، به طوری که در میان مناطق مختلف نمونه‌گیری، بیشترین تعداد جدایه (یعنی ۲۸ درصد جدایه‌ها) از مناطق ماهور و جنگل ابر جداسازی گردید که به علت سبزی‌کاری و جنگلی‌بودن در این ۲ منطقه، ریزوسفر نسبت به سایر مناطق رطوبت بالاتری را در اختیار دارد.

۲. در رابطه با قارچ‌های بیماری‌زای حشرات بهترین روش برای مبارزه با آفات، استفاده از قارچ‌های بومی هر منطقه است ولی می‌توان جدایه‌های مورد مطالعه را با گونه‌های شناخته شده با همتایان بین‌المللی خود و گونه‌های شناخته شده جهانی در خصوص توان بیماری‌زایی بر روی حشرات مختلف با یکدیگر مقایسه نمود و بر اساس نتایج این آزمون، بهترین جدایه‌ها را در بیماری‌زایی حشرات مختلف آفت معرفی و با فرموله نمودن از آنها در کنترل این آفات استفاده نمود.

۳. بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف قارچ با استفاده از تعداد بیشتر نشانگرهای ISSR به منظور پوشش بیشتر و بهتر ژنوم این جدایه‌ها اجرا گردد.

۴. جهت بررسی تنوع ژنتیکی از نشانگرهای دیگر نیز استفاده شود و نتایج حاصل از آنها را با نتایج بدست آمده از نشانگرهای ISSR مقایسه شوند و نشانگرهای برتر برای بررسی روابط بین جدایه‌های مختلف معرفی شوند.

۵. تنوع ژنتیکی قارچ *B. bassiana* در مناطق بیشتری از کشور با استفاده از نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق مورد بررسی قرار گیرند.

# ضمائم

جدول ۱ ضمیمه: تعداد لاروهای آلوده و نرخ جداسازی قارچ *B. bassiana* و جدایه‌های بدست آمده از آنها

| ردیف | منطقه نمونه‌گیری | تعداد لارو مورد استفاده | تعداد لارو آلوده | نرخ جداسازی قارچ (٪) | تعداد جدایه بدست امده |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | حمیدیه | ۳۲۰ | ۱۳ | ۴/۰۶ | ۲ |
| ۲ | ام الطمیر | ۳۲۰ | ۸ | ۲/۵ | ۱ |
| ۳ | ماهور | ۲۸۰ | ۴۲ | ۱۵ | ۷ |
| ۴ | گمبوعه بزرگ | ۳۲۰ | ۱۸ | ۵/۶۲ | ۲ |
| ۵ | الباجی | ۲۸۰ | ۹ | ۳/۲۱ | ۱ |
| ۶ | الهایی | ۲۸۰ | ۱۲ | ۴/۲۹ | ۲ |
| ۷ | بروایه | ۲۸۰ | ۱۰ | ۳/۵۷ | ۲ |
| ۸ | عرب حسن | ۲۴۰ | ۷ | ۲/۹۲ | ۱ |
| ۹ | عرب اسد | ۲۸۰ | ۱۳ | ۴/۶۴ | ۲ |
| ۱۰ | چم الحمید | ۲۸۰ | ۱۵ | ۵/۳۶ | ۲ |
| ۱۱ | ملاثانی | ۳۲۰ | ۱۱ | ۳/۴۴ | ۲ |
| ۱۲ | تل بومه | ۲۸۰ | ۱۸ | ۶/۴۳ | ۲ |
| ۱۳ | ویس | ۲۸۰ | ۱۰ | ۳/۵۷ | ۲ |
| ۱۴ | مولحه | ۲۸۰ | ۱۸ | ۶/۴۳ | ۲ |
| ۱۵ | شیبان | ۲۸۰ | ۱۴ | ۵ | ۲ |
| ۱۶ | سید عامر | ۲۸۰ | ۱۲ | ۴/۲۹ | ۲ |
| ۱۷ | جسانیه کوچک | ۲۸۰ | ۱۲ | ۴/۲۹ | ۲ |
| ۱۸ | کوت عبدالله | ۱۲۰ | ۷ | ۵/۸۳ | ۱ |
| ۱۹ | بحره | ۱۲۰ | ۶ | ۵ | ۱ |
| ۲۰ | موران | ۲۰۰ | ۳ | ۱/۵ | ۱ |
| ۲۱ | مقطوع | ۲۰۰ | ۸ | ۴ | ۱ |
| ۲۲ | بسطام | ۱۲۰ | ۵ | ۴/۱۷ | ۱ |
| ۲۳ | کلامو | ۱۲۰ | ۸ | ۶/۶۷ | ۱ |
| ۲۴ | ابرسج | ۱۲۰ | ۹ | ۷/۵ | ۱ |
| ۲۵ | جنگل ابر | ۲۴۰ | ۴۱ | ۱۷/۰۸ | ۷ |
| ۲۶ | حلاف، عین دو، گوریه، طرفایه، غزاویه کوچک، غزاویه بزرگ، دغاغله، کیانشهر، کیان آباد، کوی باهنر، گروه ملی، گلستان، عرب راشد، شهرک نفت، حیاویه، خضریه، حنیطه، مجن | ۲۵۶۰ | ۰ | ۰ | ۰ |

جدول۲ ضمیمه: مشخصات جغرافیایی جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* بدست آمده

| نام جدایه | استان | شهرستان | منطقه | محصول | حاشیه/مرکز | مختصات جغرافیایی | ارتفاع از سطح دریا | تاریخ جداسازی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SHU.H.01 | خوزستان | اهواز | حمیدیه | باغ | حاشیه | 31°28′31.97″ N 48°26′00.96″ E | 21 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.02 | خوزستان | اهواز | حمیدیه | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°28′32.91″ N 48°25′51.11″ E | 21 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.03 | خوزستان | اهواز | ام الطمیر | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°15′01.66″ N 48°32′18.71″ E | 14 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.04 | خوزستان | اهواز | ماهور | باغ | مرکز | 31°27′10.64″ N 48°29′09.17″ E | 19 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.05 | خوزستان | اهواز | ماهور | باغ | حاشیه | 31°27′20.98″ N 48°29′27.16″ E | 19 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.06 | خوزستان | اهواز | ماهور | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°27′28.57″ N 48°29′27.74″ E | 20 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.07 | خوزستان | اهواز | ماهور | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°26′56.89″ N 48°29′24.59″ E | 18 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.08 | خوزستان | اهواز | ماهور | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°27′02.22″ N 48°29′43.7″ E | 18 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.09 | خوزستان | اهواز | ماهور | نخلستان | حاشیه | 31°26′51.56″ N 48°29′42.51″ E | 18 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.10 | خوزستان | اهواز | ماهور | مزرعه | حاشیه | 31°26′27.43″ N 48°29′30.13″ E | 19 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.11 | خوزستان | اهواز | گمبوعه بزرگ | سبزی‌کاری | مرکز | 31°23′44.5″ N 48°31′29.25″ E | 17 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.12 | خوزستان | اهواز | گمبوعه بزرگ | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°23′12.19″ N 48°31′28.96″ E | 17 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.13 | خوزستان | اهواز | الباجی | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°30′12.41″ N 48°37′28.7″ E | 24 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.14 | خوزستان | اهواز | الهایی | باغ | حاشیه | 31°00′30.59″ N 48°22′32.36″ E | 10 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.15 | خوزستان | اهواز | الهایی | سبزی‌کاری | مرکز | 31°38′41.13″ N 48°35′17.73″ E | 29 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.16 | خوزستان | اهواز | بروایه | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°37′27.14″ N 48°35′25.25″ E | 28 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.17 | خوزستان | اهواز | بروایه | مزرعه | حاشیه | 31°35′44.57″ N 48°34′38.81″ E | 29 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.18 | خوزستان | اهواز | عرب حسن | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°49′43.10″ N 48°53′56.97″ E | 31 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.19 | خوزستان | اهواز | عرب اسد | سبزی‌کاری | مرکز | 31°51′29.36″ N 48°53′42.9″ E | 28 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.20 | خوزستان | اهواز | عرب اسد | نخلستان | حاشیه | 31°51′04.36″ N 48°53′11.53″ E | 31 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.21 | خوزستان | اهواز | چم الحمید | باغ | مرکز | 31°41′04.25″ N 48°51′08.91″ E | 26 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.22 | خوزستان | اهواز | چم الحمید | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°40′33.14″ N 48°51′38.1″ E | 25 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.23 | خوزستان | اهواز | ملاثانی | باغ | حاشیه | 31°34′15.27″ N 48°54′11.8″ E | 22 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.24 | خوزستان | اهواز | ملاثانی | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°35′07.08″ N 48°53′5.45″ E | 28 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.25 | خوزستان | اهواز | تل بومه | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°31′47.76″ N 48°55′53.26″ E | 23 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.26 | خوزستان | اهواز | تل بومه | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°31′28.93″ N 48°56′09.64″ E | 21 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.27 | خوزستان | اهواز | ویس | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°28′35.49″ N 48°52′05.85″ E | 20 | شهریور ۹۳ |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SHU.H.28 | خوزستان | اهواز | ویس | مزرعه | حاشیه | 31°29′38.09″ N 48°52′50.26″ E | 23 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.29 | خوزستان | اهواز | مولحه | سبزی‌کاری | مرکز | 31°27′50.47″ N 48°51′34.85″ E | 24 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.30 | خوزستان | اهواز | مولحه | سبزی‌کاری | مرکز | 31°28′17.25″ N 48°52′29.18″ E | 24 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.31 | خوزستان | اهواز | شیبان | باغ | حاشیه | 31°24′30.41″ N 48°47′39.16″ E | 27 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.32 | خوزستان | اهواز | شیبان | نخلستان | مرکز | 31°24′39.82″ N 48°48′14.69″ E | 21 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.33 | خوزستان | اهواز | سید عامر | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°23′15.48″ N 48°44′41.49″ E | 18 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.34 | خوزستان | اهواز | سید عامر | نخلستان | حاشیه | 31°23′09.05″ N 48°45′09″ E | 18 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.35 | خوزستان | اهواز | جسانیه کوچک | باغ | مرکز | 31°23′49.42″ N 48°44′59.55″ E | 20 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.36 | خوزستان | اهواز | جسانیه کوچک | سبزی‌کاری | حاشیه | 31°21′49.64″ N 48°45′38.19″ E | 21 | مرداد ۹۳ |
| SHU.H.37 | خوزستان | اهواز | کوت عبدالله | نخلستان | مرکز | 31°14′01.75″ N 48°38′22.61″ E | 14 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.38 | خوزستان | اهواز | بحره | مزرعه | حاشیه | 31°00′28.45″ N 48°38′11.74″ E | 12 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.39 | خوزستان | اهواز | موران | باغ | مرکز | 31°09′42.6″ N 48°31′18.59″ E | 14 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.40 | خوزستان | اهواز | مقطوع | باغ | حاشیه | 31°11′33.32″ N 48°32′08.45″ E | 12 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.41 | سمنان | شاهرود | بسطام | باغ | حاشیه | 36°29′23.06″ N 55°00′33.44″ E | 1405 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.42 | سمنان | شاهرود | کلامو | سبزی‌کاری | حاشیه | 36°36′29.56″ N 55°03′45.04″ E | 1423 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.43 | سمنان | شاهرود | ابرسج | سبزی‌کاری | حاشیه | 36°34′34.43″ N 54°55′15.74″ E | 1707 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.44 | سمنان | شاهرود | جنگل ابر | نمونه یک | – | 36°45′53.53″ N 55°02′19.88″ E | 1895 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.45 | سمنان | شاهرود | جنگل ابر | نمونه سه | – | 36°45′32.81″ N 55°01′57.17″ E | 2103 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.46 | سمنان | شاهرود | جنگل ابر | نمونه چهار | – | 36°45′16.44″ N 55°01′52.33″ E | 2075 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.47 | سمنان | شاهرود | جنگل ابر | نمونه شش | – | 36°44′22.14″ N 55°01′29.34″ E | **1852** | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.48 | سمنان | شاهرود | جنگل ابر | نمونه هفت | – | 36°44′47.02″ N 55°02′25.94″ E | 2008 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.49 | سمنان | شاهرود | جنگل ابر | نمونه هشت | – | 36°44′46.31″ N 55°03′02.63″ E | 2132 | شهریور ۹۳ |
| SHU.H.50 | سمنان | شاهرود | جنگل ابر | نمونه یازده | – | 36°45′28.62″ N 55°02′11.66″ E | 2083 | شهریور ۹۳ |

# منابع

خشاوه، ع؛ صفر علی زاده، م. ح. و قوستا، ی. (۱۳۸۷). "بررسی حساسیت لارو و حشره بالغ *Trogoderma dominica* به قارچ *Metarhizium anisopliae* ". خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه بو علی سینا. همدان. صفحه ۱۴.

دشتی، ح. (۱۳۷۹). "بررسی ارتباط کروموزوم‌ها و مارکرهای مولکولی با صفات کمی در گندم با استفاده از رگه‌های جایگزین شده کروموزومی و هاپلوئیدهای دوبرابر شده". رساله دکتری دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ۱۶۸ صفحه.

فراشیانی، م. ا؛ عسکری، ح؛ احتشام حسینی، م. ا؛ منیری، و. ر؛ باب مراد، م. و زاهدی، م. (۱۳۸۷). "ارزیابی آزمایشگاهی بیمارگری قارچ پاتوژن *B. bassiana* روی لارو سوسک شاخک بلند سارتا (*Aeolesthes sarta* Solsky)". خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه بو علی سینا. همدان. صفحه ۳.

قره‌یاضی، ب. (۱۳۷۵). "کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات". مقالات کلیدی چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحات ۳۸۰-۳۲۸.

کاظمی، م. ح. (۱۳۷۴). "کنترل میکروبی آفات و بیماری‌های گیاهی (ترجمه)". انتشارات دانشگاه تربیت معلم تبریز. ۱۶۷ صفحه.

گروسی، ق. و وجدانی، پ. (۱۳۷۱). "بررسی تنوع ژنتیکی و جغرافیایی نخودهای ایرانی در رابطه با اقالیم مختلف کشور". مجله تحقیقات کشاورزی نهال و بذر، جلد ۸، شماره ۴، صفحات ۱۵-۷.

مجیدی شیلسر، ف؛ پاداشت، ف. و علی‌نیا، ف. (۱۳۸۷). "اثر قارچ *B. bassiana* روی کرم ساقه خوار نواری برنج در شرایط مزرعه‌ای". خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه بو علی سینا. همدان. صفحه ۱۰.

مهدنشین، ز؛ قوستا، ی و صفرعلی‌زاده، م. ح. (۱۳۸۷). "بررسی تاثیر سویه‌های ایرانی *B. bassiana* بر روی حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات". خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه بو علی سینا. همدان. صفحه ۱۲.

میناسیان، و. و علیزاده، ع. (۱۳۶۸). " قارچ‌های ناقص (جنس‌های مشروح و مصور)". انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز. ۴۵۷ صفحه.

نقوی، م. ر؛ قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. (۱۳۸۷). "نشانگرهای ملکولی". مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۳۴۲ صفحه.

Abbott W. S. (1925). "A method of computing the effectiveness of an insecticide". Journal of Economic Entomology, 18: 265-267.

Adane K., Moore D. and Archer S. A. (1996). "Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory". Journal of Stored Products Research, 32: 105-113.

Agrawal A. F. and Wang A. D. (2008). "Increased transmission of mutations by low-condition females: Evidence for condition-dependent DNA repair". PLoS Biol., 6: e30. Available from PLoS here.

Ali S., Ren S. X., Huang Z. and Wu J. H. (2010). "Purification of enzymes related to host penetration and pathogenesis from entomopathogenic fungi". Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. pp. 15-22.

Andaya V. C., Tabanao D., Maramara G. and Sebastian L. S. (1996). "Correlation of molecular diversity with heterosis in nine low land rice". Philippine Journal of Crop Science 21 (Supplement no. 1): 4 (Abstract).

Anonymous. (1980). "*Beauveria* Vuill. Compenidium of soil Fungi."

Asensio O. L., Carbonell T., Lopez-Jimenz J. A. and Lopez-lorca L. V. (2003). "Entomopathogenic fungi in solis from Alicante province". Journal of Agricultural Research 1, pp 37-45.

Attallah A. G., Abo-Serreh N. and Abd-El-Aal S. Kh. (2014). Molecular characterization of *Beauvaria sp.* with Inter- Simple Sequence Repeat (ISSR) and RAPD markers. International Journal of PharmTech Research pp 1407-1415.

Barbarin A. M., Jenkins N. E., Rajotte E. G. and Thomas M. B. (2012). "A preliminary evaluation of the potential of *Beauveria bassiana* for bed bug control". Journal of Invertebrate Pathology 111 (1): 82-85.

Barta M. (2010). "Pathogenicity assessment of Entomopathogenic fungi infecting *Leptoglossus occidentalis* ( Heteroptera: Coridae)". Czech Mycol 62, pp 67-76.

Batko A. (1974). "Phylogensis and taxonomic structure of the Entomophthoraceae". Metodologica 1, pp 209-305.

Batta Y. A. and Abu Safieh D. I. (2005). "A study of treatment effect with *Metarhizium anisopliae* and four types of dusts on wheat grain infestation with flour beetles (*Tribolium castaneum* Herbst, Coleoptera: Tenebrionidae)". Journal of the Islamic University of Gaza (Series of Natural Studies and Engineering) 13, pp 11-22.

Benjamin R. (2001). "Major orders and genera of necrotrophic fungal parasites that attack arthropods". Biodiversity of Fungi 1, pp 10-12.

Berretta M. F., Lecuona R. E., Zandomeni R. O. and Grau O. (1998). Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. 71: 145–150.

Bidochka M. J., Menzies F. V. and Kamp A. M. (2002). "Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preference". Archives of Microbiology 178: 531–537.

Botstein D., White R. L., Skolnick M. and Davis R. W. (1980). "Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms". American journal of human genetics 32: 314-331.

Bourassa C., Vincent C., Lomer C. J., Borgemeister C. and Mauffette Y.. (2001). "Effects of entomopathogenic Hyphomycetes against the larger grain borer, *Prostephanus truncates* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae), and its predator, *Teretriosoma nigrescens* Lewis (Coleoptera: Histeridae)." Journal of Invertebrate Pathology, 77: 75-77.

Brownbridge M., Humber R. A., Parker B. L. and Skinner M. (1993). "Fungal entomopathogens recovered from Vermont forest soils". Mycologia, 85(3): 358-361.

Bugeme D., Maniania N., Knapp M. and Boga H. (2008). "Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*". Experimental and Applied Acarology, 46(1-4):275-285.

Castrillo L. A. and Humber R. A. (2008). "Molecular methods for identification and diagnosis of fungi". Insect pathogens molecular approaches and techniques 1, pp 50 - 70.

Castrillo L. A., Wiehmann B. M. and Brooks W. M. (1999). "Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*". J. Invert. Pathol. 73, 269-275.

Cherry A. J., Abalo P. and Hell K. (2005). "A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea". Journal of Stored Products Research, 41: 295 - 309.

Cossentine J. E., Judd G. J. R., Bissett J. D. and Lacey L. A. (2010). "Susceptibility of apple clearwing moth larvae *Synanthedon myopaeformis* (Lepidoptera: Sesiidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*." Biocontrol Science and Technology 20, pp 703-707.

Dal Bello G., Padin S., Lopez Lastra C. and Fabrizio M. (2000). "Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice Weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains". Journal of Stored Products Research, 37(1): 77-84.

Darbro J. M., Graham R. I., Kay B. H., Ryan P. A. and Thomas M. B. (2011). "Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)". Biocontrol Science and Technology 21, pp 1027-1047.

De Faria M. R. and Wraight S. P. (2007). "Mycoinsectcides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and internatinal classification of formulation types". Journal of Biological Control, 43: 237-256.

Doberski J. and Tribe H. (1980). "Isolation of entomopathogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*". Transactions of the British Mycological Society, 74:95-100.

Draganova S. A., Takov D. I. and Doychev D. D. (2010). "Naturally-occurring entomopathogenic fungi on three bark beetle species (Coleoptera: Curculionidae) in Bulgaria". Pesticidii fitomedicina, 25(1):59-63.

Ekesi S., Maniania N. K. and Ampong N. (1999). "Effect of Temperature on germination radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*". Biocontrol Science and Technology 9, pp 177 - 185.

El Damir M. (2006). "Variation in germination, virulence and conidial production of single spore isolates of entomopathogenic fungi in response to environmental heterogeneity". Journal of Biological Sciences 6, pp 305-315.

Estrada, M. E., Camacho M. V. and Benito C. (2006). "The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using intermicrosatellites ($ISSR_S$)". 13: 240-252.

Fernandes E., Moraes A., Pacheco R., Rangel D., Miller M., Bittencourt V. and Roberts D. (2009). "Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non Brazilian isolates and other *Beauveria* species". Journal of applied microbiology, 107(3): 760 - 774.

Ferron P. (1977). "Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* in imagines of *Acanthoscelides obtectus* [Col. Bruchidae]". Entomophaga 22: 393-396.

Ferron P. (1978). "Biological control of insect pests by entomogenous fungi". Annual Review of Entomology, 23: 409- 442.

Foisset N., Deloume R., Barret P., Hubert N., Landry B. S. and Renard M. (1990). "Molecular mapping analysis in *Brassica napus* using isozime, RAPD and RFLP markers on a double haploid progeny". Theoretical and Applied Genetics, 93:1011-1025.

Foolad M., Arulsekar S., Becerra V. and Bliss F. (1995). "A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond". Theoretical and Applied Genetics 91: 262-269.

Freed S., Feng-Liang J. and Shun-Xiang R. (2011). "Determination of genetic variability among the isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from different geographical origins". World J Microbiol Biotechnol. 27:359-370.

Galagan J. E., Henn M. R. and Ma L. (2013). "Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology". Genome Res 15, pp 1620-1631.

Godwin I. D., Aitken E. A. B. and Smith L.W. (1997). "Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics". Electrophoresis 18: 1524–1528.

Guinossi H., Moscardi F., Oliveira M. and Sosa-Gómez D. (2012). "Spatial dispersal of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soybean fields". Tropical Plant Pathology 37, pp 44-49.

Hidalgo E., Moore D. and Le Patourel G. (1998). "The effect of different formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais* in stored maize". Journal of Stored Products Research, 34(2-3):171-179.

Humber R. A. (1997). "Fungi: Identification". In Manual of Techniques in Insect Pathology Edited by L. A. Lacey, 409 pp.

Humber R. A. (1998). "Entomopathogenic fungal identification APS/ESA workshop". APS/ESA joint annual meeting 1, pp 3-26.

Humber R. A. (2011). "Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrate". Insect Mycologist and Curator. ARSEF 20, pp 1-10.

Humber R. A. (2012). "Identification of entomopathogenic fungi, second edn". Academic Press: Elsevier.

Ibrahim L., Hamide A., Ghanem H. and Ibrahim S. K. (2011). "Pathogenicity of entomopathogenic fungi from Lebanese soils against aphids whitefly and none-target beneficial insects". International Journal of Agriculture Sciences 3, pp 156-164.

Jaronski S. T. (2010). "Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens". Springer.

Keller S. and G. Zimmerman. (1989). "Mycopathogens of soil insects". In: Wilding N., Collins N. M., Hammond P. M., Webber J. F. (Eds.), Insect-Fungus Interactions. Academic Press, London, UK, pp 240–270.

Keyser C. A. (2010). PhD. thesis "Development of a Laboratory based system for selecting insect pathogenic fungi with greatest potential for success in the field". In Biology (Logan Utah Utah State University) pp 604.

Khan S., Guo L., Maimaiti Y., Mijit M. and Qiu D. (2012). "Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent." Molecular plant breeding 3, pp63-79.

Kiffer E. and Morelet M. (1999). "The deuteromycetes. Mitosporic fungi: classification and generic keys". Science Publishers, Inc.

Klingen I., Eilenberg J. and Meadow R. (2002). "Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils". Agriculture, Ecosystem and Environment, 91: 191–198.

Kumar A. and Bennetzen J. (1999). "Plant retrotransposons". Annual Reviewe of Genetic. 33: 479-532.

Lacey L. A., Frutos R., Kaya H. K. and Valis P. (2001). "Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future?". Journal of Biological Control, 21: 230-248.

Langle T. (2006). "*Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. a biocontrol agent with more than 100 years of history of safe use". Pest Management Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Central Experimental Farm. Available: http://www. Rebeca-net. de.

Lambert P., Hagen L., Arus P. and Audergon J. (2004). "Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) compared with the almond Texas× peach Earlygold reference map for *Prunus*". Theoretical and Applied Genetics 108 : 1120-1130.

Leatherdale D. (1970). "The arthropod hosts of entomogenous fungi in Britain". Entomophaga, 15(4): 419-435.

Legendre P. and Legendre L. (1998). "Numerical Ecology". Second English Edition. Developments in Environmental Modelling 20. Elsevier, Amsterdam.

Liu Z. Y., Milner R. J., McRae C. F. and Lutton G. G. (1993). "The Use of Dodine in Selective Media for the Isolation of *Metarhizium spp.* from Soil". Journal of Invertebrate Pathology 62, pp 248-251.

Lord J. C. (2010). "Dietary stress increases the susceptibility of *Tribolium castaneum* to *Beauveria bassiana*". journal of Economic Entomology, 103 ( 5 ) : 1542 - 1546.

Luz C., Netto M. and Rocha L. (2007). "In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate-pathogenic and saprobic fungi". Mycopathologia 164, pp 39-47.

Luz C., Tigano M. S., Silva L. G., Cordeiro C. M. T. and Aljanabi S. M. (1998). "Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*". Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 93, pp 839-846.

MacLeod D. M. (1954). "Investigation of the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber". Canadian Journal of Botany, 32: 818-890.

Mantel N. (1967). "The detection of disease clustering and a generalized regression approach". Cancer Res. 27:209-220.

Marannino M. P., Santiago-Álvarez C., De Lillo E. and Quesada-Moraga E. (2006). "A new bioassay method reveals pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against early stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera; Buprestidae)". Journal of Invertebrate Pathology 93, pp 210-213.

Maurer P., Couteaudier Y., Girard P. A., Bridge P. D. and Riba G. (1997). "Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range". Mycological Research 101: 159–164.

McDonald B. A. (1997). "The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques". The American Phytopathological Society. 87(4): 448-453.

Melzer M. J. and Bidochka M. J. (1998). "Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence". Mycologia, pp 586-594.

Mendonca M. da C., Santos M. da F., Silva-Mann R. and Ferreira J. M. (2012). "RAPD, Microsatellites markers in the genetic diversity characterization of *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. Isolates". Tropical and Subtropical Agroecosystems 15: 117–124.

Meyling N. V. (2007). "Method for isolation of entomopatogenic fungi from soil environment". In Department of Ecology (Frederiksberg Denmark University of Copenhagen) Http;// www.orgprints.org/11200. pp. 1-18.

Meyling N. V. (2008). "Ecology of entomopathogenic fungi in agroecosystems". Available:http://www.scitopics.com/Ecology_of_entomopathogenic_fungi_in_agroecosystems.html.

Meyling N. V. and Eilenberg J. (2006). "Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem". Agriculture, Ecosystem and Environment, 113: 336-341.

Meyling N. and Eilenberg J. (2007). "Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control". Biological Control 43, pp 145-155.

Mohammadi S. A. and Prasanna B. M. (2003). "Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations". Crop Sci. 43: 1235-1248.

Moino A., Alves S. B. and Pereira R. M.. (1998). "Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for stored-grain pests". Journal of applied Entomology, 122: 301-305.

Mondini L., Noorani A. and Pagnotta M. A. (2009). "Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools." Diversity, 1:19-35.

Mugnai L., Bridge P. A. and Evans H. C. (1989). "A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*". Mycological Research 92, pp 199-209.

Naghavi M. R., Ghareyazie B. and Hosseini Salekdeh G. (2005). "Molecular Markers". University of Tehran press. pp 315.

Nguyen N. T. H., Borgemeister C., Poehling H. and Zimmermann G. (2007). "Laboratory investigations on the potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and pupae". Biocontrol Science and Technology 17, pp 853-864.

Nong X., Liu C., Lu X., Wang Q., Wang G. and Zhang Z. (2011). "Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi against the white grubs *Holotrichia oblita* and *Anomala corpulent* (Coleoptera: Scarabaeidae) from the field of peanut *Arachis hypogaea*". Biocontrol Science and Technology 21, pp 593-603.

Ovesna J., Polakova K. and Leisova L. (2002). "DNA analyses and their applications in plant breeding". Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 38: 29-40.

Pachamuthu P. and Kamble S. T. (2000). "In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos, and cyfluthrin against German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae)". Journal of Economic Entomology, 93(1): 60-70.

Padin S., Dal Bello G. and Fabrizio M. (2002). "Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum Wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*". Journal of Stored Products Research, 38(1): 69-74.

Padjama V. and Kaur G. (2001). "Use of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Moniliales: Deuteromycetes) for controlling termites". Curr. Sci. 81 (6) 645-647.

Petlamul W. and Prasertsan P. (2012). "Evaluation of Strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura on* the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity". Mycobiology 40, pp 111-116.

Pfeifer T. A. and Khachatourians G. G. (1993). "Electrophoretic Karyotype of the Entomopathogenic Deuteromycete *Beauveria bassiana*". Journal of invertebrate pathology, 61 (3):231-235.

Płaza G. A., Upchurch R., Brigmon R. L., Whitman W. B. and Ulfig K. (2004). "Rapid DNA extraction for screening soil filamentous fungi using PCR amplification". Polish Journal of Environmental Studies 13, pp 315-318.

Pirali-Kheirabadi K., Haddadzadeh H., Razzaghi-Abyaneh M., Bokaie S., Zare R., Ghazavi M. and Shams-Ghahfarokhi M. (2007). "Biological control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* by different strains of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium psalliotae* fungi". Parasitol Res 100, pp 1297–1302.

Poinar G. O. and Thomas G. M. (1984). "Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites". Plenum Press, New York, 392 pp.

Poprawski T. J., Riba G., Jones W. A. and Aioun A. (1988). "Variation in isoesterase of geographical population of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from Sitona weevils (Coleoptera: Curculionidae)". Environmental Entomology 17: 275–279.

Rangel D., Dettenmaier S., Fernandes E. and Roberts D. (2010). "Susceptibility of *Metarhizium spp.* and other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media". Biocontrol Science and Technology 20, pp 375-389.

Reddy M. P., Sarla N., Neeraja C. N. and Siddiq E. A. (2000). "Assessing genetic variation among Asian A-genome Oryza species using inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism." Abstracts Fourth International Rice Genetics Symposium, 22–27 October 2000, IRRI, Philippines. p. 212.

Reddy N., Singh Y., Dureja P. and Singh S. (2001). "Bioefficacy of insecticides, biopesticides and their combinations against podborers in pigeonpea". Indian Journal of Entomology 2001, 63(2): 137-143.

Rehner S. A., Minnis A. M., Sung G. H., Luangsa-ard J. J., Devotto L. and Hember R. A. (2011). "Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*". Mycologia, 103(5): 1055-1073.

Safavi S. A., Shah F. A., Pakdel A. Z., Rasoulian G. R., Bandani A. R. and Butt T. M. (2007). "Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*". FEMS Microbiol Lett 270(1): 116-123.

Samodra H. and Ibrahim Y. (2006). "Effects of dust formulations of three entomophatogenic fungal isolates against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice grain". Journal Biosains, 17(1): 1-7.

Samson R. A., Evans H. C. and Latge J. P. (1988). "Atlas of Entomopathogenic fungi". Springer-Verlag, The Netherlands,187 pp.

Sanchez-Pena S., San-Juan L. J. and Medina R. (2011). "Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and ecosystems in Saltillo Mexico and their virulence towards thrips and whiteflies". Journal of Insect Science 11, pp 1536-2442.

Scarano T., Abbate L., Ferrante S., Tusa N. and Lucretti S. (2002). "ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin". Plant Cell Rep 20:1162–1166.

Searle T. and Doberski J. (1984). "An investigation of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as a potential biological control agent for *Oryzaephilus surinamensis* (L.)". J. Stored Prod. Res. 20: 17-23. Shah, P. A., J. K.

Sevim A., Demir I., Hofte M., Humber R. A. and Demirbag Z. (2010). "Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey". BioControl 55, pp 279-297.

Sevim A., Hofte M. and Demirbag Z. (2012). "Genetic variability of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* isolates obtained from the Eastern Black Sea Region of Turkey". 36: 255–265.

Shapiro-ilan, D. I., Garden, W. A., Fuxa, J. R., Wood, B. W., Nguyen, K. B., Adames, B. J., Humber, R. A. and hall M. J. (2002). "Survey of Entomopathogenic Nematodes and Fungi Endemic to peacan orchards of the southeastern United States and their virulence to the peacan weevil". *Environmental Entemology*, 3:187-195.

Smith S. M., Moore D., Karanja L. W. and Chandi E. A. (1999). "Formulation of vegetable fat pellets with pheromone and *Beauveria bassiana* to control the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* (Horn)". Pestiside Science, 55(7): 711-718.

Sosa-Gomez, D. R., Delpin K. E., Moscardo F. and Farias J. R. B. (2001). "Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces* in soybean under till and no-till cultivation systems". Neotropical Entomology, 30(3): 407-410.

Steinhaus E. A. (1949). "Principles of insect pathology". New York: McGraw-Hill Book Company. p 757.

St Leger R. J., Allee L. L., May B., Staples R. C. and Roberts D. W. (1992). "World Wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria spp*". Mycological Research, 96: 1007-1015.

Stock S. P. (2009). "Insect pathogens: Molecular approaches and Techniques". CABI.

Stoner K. (1914). "Approaches to the biological control of insects". The university of Maine 1, pp 1-8.

Sun B. D. and Liu X. Z. (2008). "Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China". Applied soil ecology 39, pp 100-108.

Sung G., Hywel-Jones N. L., Sung J., Luangsa-ard J. J., Shrestha B. and Spatafora J. W. (2007). "Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi". Studies in Mycology 57, pp 5-59.

Sung G-H, Spatafora J. W., Zare R., Hodge KT. and Gams W. (2001). "A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the Clavicipitaceae". Nova Hedwigia, 72 (3-4) : 311-328.

Tajich Ghanbary M. A., Asgharzade A., Hadizadeh A. R. and Mohammadi Sharif M. (2009). "A quick method for *Metarhizium anisopliae* isolation from cultural soils". American Journal of Agricultural and Biological science 4, pp 152-155.

Takatsuka J. (2007). "Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Japan using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification". 42: 563–571.

Talaei-Hassanloui R., Kharazi-Pakdel A., Goettel M. and Mozaffari J. (2006). "Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics". Biocontrol Sci Technol 16, 525–534.

Tanda Y. and Kaya H. K. (1993). "Insect Pathology". San Diego, CA, USA Academic Press, 666 p.

Tefera T. and Pringle K. (2003). "Germination radial growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and their virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at different temperatures". 13, pp 699-704.

Thi Loc N. and Thi Bich Chi V. (2005). "Efficiency of some new isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against Rice Earhead bug *Leptocorisa acuta*". Omonrice 13, pp 69-75.

Thi Loc N., Thi Bich Chi V., Thi Nhan N. and Thi Be Hong T. (2010). "Exploitation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as potential Biocontrol agents in Integrated Pest Management (IPM) on citrus". Omoneric 17, pp 152-163.

Thomas K. C., Khachatouriansand G. G. and Langledew W. M. (1987). "Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture". Canadian Journal of Microbiology, 33: 12-20.

Todorova S. I., Cloutier C., Cote J. C. and Coddere D. (2002). "Pathogencity of six isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina, Hyphomycetes) to *Perillus bioculatus* (F) (Hem., Pentatomidae)". Journal of Applied Entomology. 126: 182-185.

Trissi A. N., Bouhsini M. E, Alsalti M. N., Korff M. V., Hamwieh A., Skinner M., Parker B. L. and Baum M. (2013). "Genetic diversity among summer and winter Beauveria bassiana populations as revealed by AFLP analysis". Journal of Asia-Pacific Entomology 16: 269–273.

Tuininga A. R., Miller J. L., Morath S. U., Daniels T. J., Falco R. C., Marchese M., Sahabi S., Rosa D. and Stafford III K. C. (2009). "Isolation of entomopathogenic fungi from soils and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) ticks: prevalence and methods". Journal of Medical Entomology 46, pp 557.

Uma Devi K., Padmavathi J., Uma Maheswara Rao C., Khan A. A. P. and Mohan M. C. (2008). "A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae)." Biocontrol Science and Technology, 18(9/10): 975-989.

Uma Devi K., Reineke A., Nageswara Rao Reddy N., Uma Maheswara Rao C. and Padmavathi J. (2006). "Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin". 49: 495–504.

Vanninen I. (1996). "Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type". Mycological Research, 100(1): 93-101.

Varela A. and Morales E. (1996). "Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*". Journal of Invertebrate Pathology 67, pp 147-152.

Vega F. E. and Blackwell M. (2005). "Insect-fungal associations". ecology and evolution Oxford University Press.

Velasquez V. B., Carcamo M. P., Merino C. R., Iglesias A. F. and Duran J. F. (2007). "Interspecific differentiation of Chilean isolate of the entomopathogenic fungi Metarhizium anisopliae var. anisopliae are revealsed by RAPD, SSR and ITS marker". Genetic and Molecuar Biology. 30: 89-99.

Viaud M., Couteaudier Y., Levis C. and Riba G. (1996). "Genome organization in *Beauveria bassiana*: Electrophoretic Karyotype, gene mapping, and telomeric fingerprint". Fungal Genetics and Biology, 20:175-183.

Vilas Boas A. M., Oliveira J. V., Campos A. L., Andrade R. M. and Silva R. L. M. (1996). "Patogenicidade de linhagens selvagens and mutantes de *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* a *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) (Pathogenicity of wild strain and mutants of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae))." Arquivos de Biologia e Teecnologia, 39: 99-104 (Portuguese with English abstract).

Wagner B. L. and Lewis L. C. (2000). "Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*". Applied and Environmental Microbiology, 66 (8):3468-3473.

Wakefield M. E., Coxp D., Moore D., Aquino De Muro M. and Bell B. A. (2005). "Mycopest: results and perspectives". In: Proceedings of the 6th Meeting of COST Action 842 Working Group IV Biocontrol of Arthropoda Pests in Stored Products, 10 - 11 th June, Locorotondo, Italy. 17 - 26.

Wang C. S., Shah F. A., Patel N., Li Z. Z. and Butt T. M. (2003). "Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*". Environmental Microbiology 5: 908–915.

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)". 9: 1364-1372.

Waseem A., Lord J. C., Nechols J. R. and Howard R. W. (2004). "Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment". Journal of Economic Entomology. 97(2): 273-280.

Wei Y. M., Hou Y. C., Yan Z. H., Wu W., Zhang Z. Q., Liu D. C. and Zhang Y. L. (2005). "Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to Fusarium head blight". Theoretical and Applied Genetics, 46: 3-9.

Wyrebek M., Huber C., Sasan R. K. and Bidochka M. J. (2011). "Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity". Microbiology 157. pp 2904-2911.

Yoder J., Benoit J., Christensen B., Croxall T. and Hobss III H. (2009). "Entomopathogenic fungi carried by the cave orb weaver spider *Meta ovalis* (Araneae: Tetragnathidae) with implications for Mycoflora transer to cave crickets". Journal of Cave and Karst Studies 71, pp 116–120.

Young Shin T., Chio J., Bae S., Koo H. and Woo S. (2010). "Study on selective media for isolation of entomopathogenic fungi". International Journal of Industrial Entomology 20, pp 7-12.

Yubaka Dhoj G. C. (2006). PhD. thesis, "White grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) associated with Nepalese agriculture and their control with the indigenous entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Erlangung der Wurde eines". Doktors der Philosophy Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultat der Universitat Basel).

Zhang W., Sulz M. and Bailey K. L. (2001). "Growth and spore production of *Plectosporium tabacinum*". Can J Bot 79, pp 1297-1306.

Zietkiewicz E., Rafalski A. and Labuda D. (1994). "Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification". Genomics 20: 176–183.

Zimmermann G. (1986). "The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil". Journal of Applied Entomology, 102 (1-5):213-215.

Zimmerman G. (2007). "Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana and Beauveria brongniartii*". Biocontrol Science and Technology 17 (6): 553-596.

Zurek L., Watson D. and Schal C. (2002). "Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) and boric acid against the German cockroach (Dictyoptera:Blattellidae)". Biol Control 23, pp 296-302.

## Study on genetic diversity of fungus *Beauveria sp.* using ISSR markers

Abstract

Entomopathogenic fungi often in nature make insects diseases and important agent regulator insects population that nature of human had put it. Insect pathogenic fungus, *Beauveria bassiana* a famous as pathogens because of the wide host range as a biological pesticide is considered. This fungus wide range of hosts that least 10 orders and 40 families of insects are included, infects. In this research, to study genetic diversity this fungus, from different regions of ahvaz (khuzestan province) and shahrood (semnan province) 50 different isolates of *B. bassiana* fungus by *Galleria* Bait Method (GBM) have been isolated and using morphological traits such as growth rate, sporulation and germination power and pathogenicity against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) were described. Morphological experiments results revealed that among the parameters of growth rate, sporulation and percent pathogenicity there is a significant correlation. Also, in this research from replicated polymorphisms of micro-satellite ISSR markers to assess the levels of genetic diversity in 26 different isolates of *B. bassiana* fungus isolated from different geographic regions were used. In this study, from 30 primers evaluated, 24 primers on the basis of bond formation rate, polymorphism and repeatability of bands were selected. Mentioned 24 primers, in total 913 bands were produced, that all showed acceptable polymorphism. The number of replicated fragments by different primers were varied. The highest number of amplified fragment was 50 belong to ISSR840 primers and the lowest of them was 29 belong to ISSRBIS29 primers. The highest Shannon's variation coefficient, Nei's variation coefficient, Effective number of alleles, Polymorphism Information Content and Marker Index belong to ISSR840 primers that indicates that this primers variation between isolates show better. The results of this research indicate a molecular and morphological diversity among isolates and showed the efficiency of ISSR markers for determine genetically diversity of between different isolates that were studied.

Keywords: Entomopathogenic fungi, *B. bassiana*, genetic diversity, ISSR markers

**Shahrood University**

**Faculty of Agriculture**

**M. Sc.Thesis in Agricalture Biotechnology**

# Study on genetic diversity of fungus *Beauveria sp.* using ISSR markers

**Ali Heidari**

**Supervisors:**

**Dr. Shahrokh Gharanjik**

**Dr. Ali Derakhshan shadmehri**

September 2015