

الحمد لله
الرحمن الرحيم



دانشگاه شاهرود

دانشکده کشاورزی

بررسی تنوع ژنتیکی قارچ بیماری زای حشرات

Metarhizium anisopliae

مهسا جوکار

اساتید راهنما:

دکتر ناصر فرّخی

دکتر علی درخشان شادمهری

اساتید مشاور:

دکتر مهدیه پارسائیان

دکتر مریم غائب زمهریر

پایان نامه‌ی ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی

پائیز ۱۳۹۲

تقدیم به مهربان فرشتگانی که:

مخاطات ناب بارور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های

یکتا و زیبای زندگیم، میون حضور سبز آنهاست و وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر

تشکر و قدردانی

اگر خزان را امید بهاری نبود، اگر درد را امید شفائی نبود، بی شک تلاش که مهم ترین عامل سازندگی و رشد انسان است در گرداب تنبلی هلاک می گشت. اما تقدیر این بود، زندگی معنا یابد و آنان که می- خواهند همیشه زنده بمانند به تلاشی بزرگ برای رسیدن به امیدی در دوردست واداشته شوند.

سپاس بیکران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

و بعد از مدتها، پس از پیمودن راه های فراوان که با حضور اساتید عزیزم، دغدغه های فراوان و شیطنت های زیبای آن دوران، نگاه های پدر و مادرم با چشم های پر از برق شوق و زیبایی حضور دوست بی همتایم در کنارم، که خستگی های این راه را به امید و روشنی راه تبدیل کرده بر خود واجب می دانم از تمامی آن بزرگواران کمال تشکر و قدردانی را بنمایم. جا دارد از زحمات اساتید راهنما جناب آقایان دکتر ناصر فرخی، دکتر علی درخشان شادمهری، اساتید مشاور سرکار خانم دکتر مهدیه پارسائیان، دکتر مریم غائب زمهریر، دوست و همکار عزیزم جناب آقای مهندس ابوالفضل مسعودی، آقایان سعید متین، مصطفی محمدی، محمد قاسم کشاورز خوب، نسیم طهماسبی زاوه، علی یدالله پور، احسان ترابی، علیرضا متین، هادی قاسمی، محمد باقر غائی، مهدی قمری، حامد دیداری، معصومه هنرور، کارشناسان آزمایشگاه سرکار خانم مهندس سمیه فرجی، مهندس احمدی، آقایان مهندس محمد ابراهیم حسین پور، مهندس غلامرضا شاکری، مهندس حسن گلی، مهندس حسین مطهری نژاد، آقایان محسن حسین پور، علی حدادان، علی حسین پور، و دیگر عزیزانی که مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

امیدوارم بتوانم در آینده ی نزدیک جوابگوی این همه محبت آنها باشم.

اینجانب مهسا جوکار دوست آباد دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی

دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بررسی تنوع ژنتیکی قارچ بیماری زای حشرات *Metarhizium*

anisopliae تحت راهنمایی آقایان دکتر ناصر فرخی و دکتر علی درخشان شادمهری متعهد می شوم.

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

تاریخ:

امضای دانشجو:

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

قارچ‌های بیمارگر حشرات در سلسله قارچ‌ها به‌طور گسترده پراکنده شده‌اند. برخی از این قارچ‌ها طیف میزبانی محدودی داشته درحالی‌که برخی دارای طیف میزبانی گسترده‌ای می‌باشند. چندین گونه از این قارچ‌ها پتانسیل کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌های گیاهی و حشرات را دارند. *Metarhizium* spp. قارچ بیمارگری است که برای کنترل بیولوژیک طیف وسیعی از آفات نظیر راسته‌های بال‌پولک-داران و سخت بال‌پوشان استفاده شده است. *Metarhizium* به‌طور عمده بر پایه ویژگی‌های مورفولوژیکی و ملکولی شناسایی می‌گردد. هدف این پایان‌نامه جداسازی و شناسایی واریته‌های این قارچ با استفاده از فواصل رونویسی‌شده داخلی (ناحیه ITS) می‌باشد. ما به بررسی ۳۰ جدایه جمع-آوری شده از خاک‌های مناطق گوناگون شاهرود و شمال ایران پرداختیم. این جدایه‌ها به صورت جزئی با استفاده از صفات مورفولوژیکی مانند نرخ رشد، اسپورزایی، بیماری‌زایی علیه *Tribolium castaneum* (Col, Tenebrionidae) شرح داده شدند. آزمایشات مورفولوژیک نشان داد همبستگی میان این ۳ پارامتر وجود دارد. تجزیه و تحلیل توالی‌های ITS و ۵/۸S ریبوزومی برای شناسایی گونه-ها و سویه‌های این قارچ به‌کار برده شد. نواحی ITS با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 قطعه‌ای به طول تقریبی ۵۳۰ جفت باز را تکثیر نمود. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Codon Code Aligner هم‌ردیف شدند و در کنار توالی ۱۲ گونه شناخته شده *Metarhizium* برای رسم درختچه در نرم‌افزار مگا (روش ماکسیمم پارسیمونی با بوت استرپ ۱۰۰۰) مورد استفاده قرار گرفتند. در میان ۸ کلاستر به وجود آمده، ۵ کلاستر حاوی ۲۵ جدایه به‌دست آمده از اقلیم شاهرود و شهرستان‌های اطراف، فاقد همتایی از گونه‌های شناخته شده بودند و احتمال وجود ۵ گونه جدید در این مناطق وجود دارد که این امر نیازمند مطالعات ملکولی با نشانگرهای دیگر می‌باشد. ۵ جدایه شناسایی شده نیز به گونه‌های *M. guizhouense*, *M. robertsii*, *M. anisopliae*, *M. flavoviride* و *M. velutinum* تعلق دارند.

واژگان کلیدی: قارچ بیمارگر حشرات، شناسایی، فواصل رونویسی‌شده داخلی، ماکسیمم پارسیمونی

بررسی نرخ رشد جدایه‌های قارچ پاتوژن حشرات، *Metarhizium* spp.

مهسا جوکار، ناصر فرّخی*، علی درخشان شادمهری، ابوالفضل مسعودی، مهدیه پارسائیان، سعید متین

همایش پدافند غیر عامل- قشم- آبان ۱۳۹۲

شناسایی قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium* spp. با استفاده از ITS1-5.8S-ITS2

مهسا جوکار، ناصر فرّخی*، ابوالفضل مسعودی، سعید متین، علی درخشان شادمهری، مهدیه پارسائیان

هشتمین همایش ملی بیوتکنولوژی و چهارمین همایش ملی ایمنی زیستی- تهران

۱۷-۱۵ تیرماه ۱۳۹۲

ارزیابی جدایه‌های *Metarhizium* spp. در کنترل *Tribolium castaneum* L. (Col,

Tenebrionidae) و همبستگی آن با تعداد اسپور

مهسا جوکار، ناصر فرّخی*، علی درخشان شادمهری، ابوالفضل مسعودی، مهدیه پارسائیان، سعید متین

همایش دوسالانه کنترل بیولوژیک در کشاورزی و منابع طبیعی- تهران

۵ و ۶ شهریور ۱۳۹۹

فصل اول- مقدمه و کلیات	۱
۱-۱. کنترل بیولوژیک	۳
۲-۱. قارچ‌های بیمارگر حشرات ایزاری موثر در کنترل بیولوژیک	۵
۳-۱. قارچ بیمارگر حشرات <i>Metarhizium spp.</i>	۶
۱-۳-۱. طیف میزبانی	۹
۲-۳-۱. نحوه فعالیت و مکانیسم بیماری‌زایی	۱۱
۳-۳-۱. اثر عوامل محیطی بر فعالیت قارچ‌های بیمارگر حشرات	۱۵
۴-۱. ژنوم و ساختار سلولی قارچ <i>Metarhizium spp.</i>	۱۷
۵-۱. مطالعه تنوع فیلوژنتیکی و روش‌های آن	۱۹
۱-۵-۱. تکنیک‌های مبتنی بر PCR	۲۱
۲-۵-۱. نشانگرهای ریبوزومی	۲۲
فصل دوم- مرور منابع	۲۸
۱-۲. شناسایی قارچ <i>Metarhizium spp.</i> با استفاده از ناحیه ITS ریبوزومی	۲۹
۲-۲. پراکنش جغرافیایی	۳۵
۳-۲. کاربرد قارچ بیمارگر <i>Metarhizium spp.</i> علیه حشرات مختلف و بندپایان	۳۶
۴-۲. تشخیص و شناسایی مورفولوژیکی قارچ <i>Metarhizium spp.</i>	۳۹
۵-۲. تبار‌زایی قارچ و ضرورت مطالعه تنوع ژنتیکی	۴۱

فصل سوم- مواد و روش‌ها	۴۵
۱-۳. مواد	۴۶
۲-۳. تجهیزات آزمایشگاهی	۴۷
۳-۳. نمونه‌گیری خاک	۴۷
۴-۳. پرورش پروانه موم‌خوار	۴۸
۵-۳. جداسازی <i>Metarhizium spp.</i> از خاک	۵۰
۶-۳. جداسازی جدایه‌های قارچی	۵۲
۷-۳. خالص‌سازی جدایه‌های <i>Metarhizium spp.</i>	۵۳
۸-۳. نام‌گذاری جدایه‌های به‌دست آمده	۵۵
۹-۳. مطالعه میکروسکوپی قارچ <i>Metarhizium spp.</i>	۵۷
۱۰-۳. مطالعات مولکولی	۵۷
۱-۱۰-۳. آماده‌سازی نمونه	۵۷
۲-۱۰-۳. استخراج DNA	۵۸
۳-۱۰-۳. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و تکثیر منطقه ITS	۵۹
۴-۱۰-۳. توالی‌یابی و شناسایی گونه‌ها	۶۰
۵-۱۰-۳. نرم‌افزار و روش مورد استفاده در ترسیم درختچه فیلوژنی	۶۱
۶-۱۰-۳. تعیین درصد همولوژی جدایه‌ها	۶۲
۱۱-۳. همبستگی پراکنش جغرافیایی و تنوع ژنتیکی	۶۲
۱۲-۳. بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ <i>Metarhizium spp.</i>	۶۳

۳-۱۲-۱. آزمایش اندازه‌گیری نرخ رشد	۶۳
۳-۱۲-۲. آزمایش شمارش تعداد کنیدی	۶۴
۳-۱۲-۳. آزمایش زیست‌پذیری کنیدی جدایه‌های انتخاب‌شده	۶۴
فصل چهارم- نتایج	۶۸
۴-۱. تحلیل فیلوژنی منطقه ITS1-5.8S-ITS2 جدایه‌های <i>Metarhizium</i> spp.	۶۹
۴-۱-۱. دستیابی به توالی‌های ناحیه تکثیری ITS جدایه‌ها	۷۰
۴-۲. نتایج درختچه فیلوژنی برای جدایه‌های <i>Metarhizium</i> spp.	۷۰
۴-۳. همبستگی میان تنوع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی	۷۵
۴-۴. نرخ جداسازی قارچ <i>Metarhizium</i> spp.	۷۵
۴-۵. ارزیابی نرخ رشد جدایه‌ها بر روی محیط کشت PDA	۷۶
۴-۶. ارزیابی تعداد کنیدی جدایه‌های قارچ <i>Metarhizium</i> spp. بر روی محیط کشت	۷۹
۴-۷. زیست‌پذیری کنیدی‌ها	۷۹
۴-۸. تاثیر بیماری‌زایی قارچ در برابر سوسک قرمز آرد	۷۹
۴-۹. همبستگی میان پارامترهای مورفولوژیکی نرخ رشد، شمارش تعداد کنیدی و بیماری‌زایی	۸۲
فصل پنجم- بحث و پیشنهادات	۸۴
۵-۱. تجزیه و تحلیل درختچه فیلوژنی	۸۶
۵-۲. جمع‌بندی نتایج آزمایشات مورفولوژیک	۹۰
۵-۳. پیشنهادات	۹۴

ضمائم..... ۹۷

منابع..... ۱۰۵

کنفرانس‌ها و همایش‌ها و مقالات چاپ شده..... ۱۲۰

صفحه	فهرست جداول ذکر شده در پایان نامه
۷	جدول ۱-۱: راسته‌های مهم و پارازیت‌های قارچی نکروتروف که به حشرات حمله می‌کنند
۱۸	جدول ۱-۲: آفت‌کش‌های زیستی تولید شده از قارچ <i>Metarhizium spp.</i>
۷۱	جدول ۱-۴: لیست گونه‌های <i>Metarhizium spp.</i> و شماره دسترسی آن در پایگاه ژنی NCBI
۷۶	جدول ۲-۴: جدول تجزیه واریانس
۷۷	جدول ۳-۴: مقایسه میانگین نرخ رشد
۷۹	جدول ۴-۴: مقایسه میانگین تعداد کنیدی تولیدی
۸۰	جدول ۵-۴: مقایسه میانگین تلفات سوسک قرمز آرد
۸۲	جدول ۶-۴: همبستگی میان سه پارامتر
۹۷	جدول ۱ ضمیمه: تعداد لاروهای آلوده و نرخ جداسازی
۹۸	جدول ۲ ضمیمه: مشخصات جدایه‌های <i>Metarhizium spp.</i> به دست آمده
۱۰۰	جدول ۳ ضمیمه: درصد همولوژی میان مناطق ITS

صفحه	فهرست شکل‌ها و نمودارهای قید شده در پایان‌نامه
۱۲	شکل ۱-۱: مراحل چرخه آلودگی <i>Metarhizium</i> spp.
۲۳	شکل ۲-۱: دو ناحیه ITS و IGS
۲۶	شکل ۳-۱: انواع پرایمرهای ITS برای تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2
۴۲	شکل ۱-۲: مشاهده میکروسکوپی ساختارهای <i>M. anisopliae</i>
۴۹	شکل ۱-۳: جمع‌آوری نمونه خاک
۴۹	شکل ۲-۳: مراحل زندگی پروانه موم‌خوار
۵۱	شکل ۳-۳: نمایی از مراحل عمومی در شناسایی گونه‌های قارچ <i>Metarhizium</i> با استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر PCR
۵۴	شکل ۴-۳: نمایی از قارچ <i>Metarhizium</i> spp. روی لارو پروانه موم‌خوار و محیط کشت
۵۶	شکل ۵-۳: تهیه بانک قارچ اولیه و بانک ثانویه
۷۰	شکل ۱-۴: نمایی از تکثیر ناحیه ITS جدایه‌های <i>Metarhizium</i> spp. روی ژل آگارز ۱٪
۷۲	شکل ۲-۴: ایجاد درختچه فیلوژنی برای جدایه‌های مختلف <i>Metarhizium</i> spp.
۷۶	شکل ۳-۴: نمایی از کنیدی قارچ <i>Metarhizium</i> spp. و رشد آن بر روی محیط کشت PDA
۱۰۱	نمودار همبستگی میان تنوع ژنتیکی ناحیه ITS و تنوع جغرافیایی
۱۰۲	درختچه UPGMA رسم شده برای ماتریس‌های ژنتیکی و جغرافیایی
۱۰۳	نمودار حاصل از بررسی همبستگی کوفنتیک دو ماتریس فاصله ژنتیکی و جغرافیایی

اختصارات به کار رفته در پایان نامه و نام کامل آنها

نام کامل	اختصار
Accession Number	AC
Amplified Fragment Length Polymorphism	AFLP
Amplified rDNA Restriction Analysis	ARDRA
Basic Local Alignment Search Tool	BLAST
Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide	CTAB
Coefficient Variance	CV
Czapeck- Dox- Agar	CDA
DNA Data Bank of Japan	DDBJ
Degrees of Freedom	DF
European Molecular Biology Laboratory	EMBL
Elongation Factor 1- α	<i>EF1-α</i>
Galleria Bait Method	GBM
Inter-Genic Spacer or Non-Transcribed Spacer	IGS
Letal Concentration 50	LC50
Letal Time 50	LT50
Malate Extract Agar	MA
Multi-Locus Enzyme Electrophoresis	MLEE
Mean of Square	MS
National Center for Biotechnology Information	NCBI
PolyVinylPyrrolidone	PVP
Polymerase Chain Reaction	PCR
Random Amplified Polymorphic DNA	RAPD
Restriction Fragment Length of Polymorphism	RFLP
Sabroud-Dextrose-Agar + Yeast Extract	SDA+Y
Sodium Dodecyl Sulfate	SDS
Simple Sequence Repeat	SSR
Tris Borate Ehtylen Di-amin Tetra Acetate	TBE
Virulence Gene	Vri
Yeast extract Peptone Glucose Broth	YPD

فصل اول

مقدمه و کلیات

زمانی که کشاورزی به صورت بدوی انجام می‌گرفت کشاورزان با تعداد معدودی حشره سروکار داشتند. مشکل از زمانی آغاز شد که اراضی به صورت فشرده و در سطح زیاد تحت کشت یک محصول قرار گرفت. این امر سبب افزایش شدید آفات گردید. عامل دیگر وجود آفات امروزی هجوم انواعی از موجودات از موطن اصلی خود به نقاط دیگر است و چارلز دالتون^۱ (۱۹۸۰) در بوم‌شناسی هجوم می‌نویسد: در دوره کرتاسه^۲ طغیان دریاها، ارتباط بین خشکی‌ها را قطع کرد و در جزایر انواع جدیدی از گونه‌ها به وجود آمد. پس از گذشت سال‌ها، خشکی‌ها دوباره به هم پیوستند و این گونه‌ها وارد مناطق شدند. ورود این گونه‌ها سبب توسعه گونه‌های آفت شد و لذا کشاورزان برای حفظ دست رنج خویش به استفاده از آفت‌کش‌ها روی آوردند. افزایش استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی مرسوم علاوه بر افزایش تولید غذا، تاثیرات مخربی نیز بر محیط و موجودات غیر هدف داشته است [۵]. استفاده بی‌رویه از آفت‌کش‌ها سبب شد تا مشکلاتی از قبیل تاثیرات نامطلوب بر سلامت انسان و محیط‌زیست، از بین رفتن موجودات غیر هدف و مقاومت آفات مختلف به آفت‌کش‌های تجاری مرسوم به وجود آید [۶]. یکی از راهکارها در کاهش استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی، تهیه و فرمولاسیون آفت‌کش‌های زیستی بر مبنای قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر حشرات است. در این پایان‌نامه به جداسازی قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium spp.* و شناسایی گونه‌های به دست آمده با استفاده از ناحیه ITS و ترسیم درختچه فیلوژنی خواهیم پرداخت. در این فصل در خصوص کنترل بیولوژیک، معرفی قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium spp.* طیف میزبانی، پراکنش جغرافیایی، نحوه فعالیت و مکانیسم بیماری‌زایی، اثر عوامل محیطی بر فعالیت قارچ‌های بیمارگر، بیماری‌زایی قارچ مذکور، محاسن و معایب استفاده از قارچ‌های بیمارگر، ویژگی‌های ژنومی (هسته‌ای و میتوکندریایی) به صحبت می‌پردازیم و در پایان نیز به معرفی چگونگی شناسایی قارچ‌ها در سطح گونه و زیر گونه خواهیم پرداخت.

۱- Charles Dalton

۲- سومین دوره دوران میانه‌زیستی است که در ۱۴۵۰۵ تا ۶۵ میلیون سال پیش بود و در واقع هفتاد میلیون سال به طول انجامید

۱-۱. کنترل بیولوژیک

مدیریت تلفیقی آفات^۱ در واقع استراتژی مدیریت آفات بر اساس شرایط اکولوژیکی می باشد و در آن از تمام روش های مناسب برای حداقل سازی خسارت آفات یعنی کنترل زراعی، واریته های مقاوم، کنترل شیمیایی و کنترل بیولوژیکی^۲ استفاده می شود [۷].

استفاده از موجودات زنده برای سرکوب جمعیت حشرات آفت، بیمارگرهای گیاهی^۳، علف های هرز و حشرات را کنترل بیولوژیک گویند و در سال ۱۷۶۲ با معرفی مرغ مینا^۴ از هند برای کنترل ملخ قرمز نیشکر آغاز شد و میلینگ و همکاران این تکنیک را به عنوان " تغییرات محیط یا شیوه های موجود در حفاظت و افزایش دشمنان طبیعی برای کاهش اثرات آفات " توضیح داده اند [۸]. حشرات از گروه های مهم موجودات هستند که هدف برنامه های کنترل بیولوژیک قرار می گیرند. دشمنان طبیعی^۵ نقش مهمی را در محدود نمودن جمعیت آفات ایفاء می نمایند که وقتی از روش های کنترل غیرشیمیایی استفاده کنیم این موجودات زنده مانده و جمعیت و خسارت گونه های آفت را کاهش می دهند [۹]. دشمنان طبیعی حشرات آفت را در سه رده شکارگرها^۶، پارازیتوئیدها^۷ و بیمارگرها^۸ طبقه بندی نموده اند که در ذیل مختصری در مورد این گروه ها صحبت خواهیم نمود.

شکارگرها معمولاً از میزبان خود از نظر جثه بزرگ تر هستند و آنها را گرفته و می کشند. معمولاً تخم های خود را در نزدیکی شکار قرار می دهند و نابالغین قادر خواهند بود در کوتاه ترین زمان، میزبان خویش را یافته و از آن تغذیه نمایند. این دسته از دشمنان طبیعی در طول مرحله رشد و نمو خود بیش از یک میزبان مورد حمله قرار می دهند. کفشدوزک ها و بال توری^۹ ها، مگس های خانواده

۱- Integrated Pest Management (IPM)

۲- Biological Control

۳- Plant Pathogen

۴- Mynab Bird

۵- Natural Enemy

۶- Predator

۷- Parasitoid

۸- Pathogen

۹- *Crysoperlla carnea*

Syrphidae، کنه‌ها و عنکبوت‌های شکارگر در این دسته جای می‌گیرند [۹]. پارازیتوئیدها در راسته-های بال‌غشائیان^۱ و دوبالان^۲ قرار می‌گیرند و این دشمنان طبیعی در مرحله بلوغ خود آزادزی هستند و یک یا چند تخم را در سطح یا داخل بدن میزبان خویش قرار می‌دهند. حشرات نابالغ پارازیت در سطح یا داخل بدن میزبان زندگی کرده و آن را از بین می‌برند. پارازیت‌ها به مرحله‌ی خاصی از زندگی میزبان خویش حمله می‌نمایند اما بایستی یادآور شویم که تمام مراحل زندگی میزبان (تخم، لارو یا پوره، حشره کامل) توسط پارازیت‌های مختلف مورد حمله قرار می‌گیرد [۹]. در مورد بیمارگرها گفته می‌شود که حشرات مانند حیوانات و گیاهان توسط باکتری‌ها، قارچ‌ها، آغازیان و ویروس‌هایی که موجب بیماری می‌شوند آلوده می‌گردند. این عوامل بیماری‌زا ممکن است نرخ تغذیه و رشد حشره را کاهش دهند، سرعت تولید مثل را کند نمایند یا از آن جلوگیری به عمل آورند یا موجب مرگ حشرات شوند [۱۰]. از جمله این بیمارگرها می‌توان به باسیلوس، ویروس‌های خانواده Baculoviridae، قارچ‌های خانواده Entomophthoraceae اشاره نمود.

مزایای کلی کنترل میکروبی در کنترل بیولوژیکی خسارت حشرات آفت با استفاده از ویروس‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها و نماتدهای بیمارگر حشرات در مدیریت تلفیقی آفات شامل اختصاصیت میزبانی، بیماری‌زایی بالا، حفاظت از دشمنان طبیعی آفت هدف و غیرگسیختگی اکولوژیکی می‌باشد. اختصاصیت میزبانی جنبه‌ی مهمی برای موجودات مورد استفاده در کنترل بیولوژیک است. مطالعات نشان داده است که *Metarhizium anisopliae* سیگنال‌های خاص میزبان نظیر لیپیدهای موجود در اپی کوتیکول و ساختارهای سطحی را تشخیص می‌دهد و لذا این سیگنال‌ها بر اتصال اسپور و القای ترشح پروتئین‌های اختصاصی میزبان تاثیرگذار هستند [۱۱]. بیشتر دشمنان طبیعی از حساسیت بالایی نسبت به آفت‌کش‌های شیمیایی برخوردارند و لذا استفاده از این مواد، موجب محدودیت کارایی

۱- Hymenoptera

۲- Diptera

دشمنان طبیعی خواهد شد [۹]. در تولید یک آفت کش زیستی، اولین قدم اثبات بیماری زایی قارچ بر روی حشره مورد نظر می باشد که بر مبنای این امر، به بررسی بیماری زایی جدایه های مختلف قارچی در حشرات گوناگون پرداخته اند که اصطلاح بیماری زایی در قارچ شناسی عبارت از زنجیره ای از رخدادها در توسعه ی بیماری در یک میزبان به محض آلودگی است. استین هوس (۱۷۹۵) اولین کسی است که نتیجه گرفت میکروارگانیسم های بیمارگر حشرات برای انسان، حیوانات و گیاهان بی ضرر هستند و بعدها پیشنهاد شد از این میکروارگانیسم ها به جای مواد شیمیایی در کنترل آفات بهره برداری شود.

۱-۲. قارچ های بیمارگر حشرات ابزاری موثر در کنترل بیولوژیک

یکی از انواع دشمنان طبیعی حشرات، قارچ های بیمارگر حشرات هستند. قارچ های بیمارگر حشرات راه حلی موثر و ایمن برای کنترل حشرات آفت محسوب می شوند و این قارچ ها در سراسر سلسله قارچ ها پراکنده اند، برخی از آنها طیف میزبانی محدودی دارند و برخی طیف میزبانی وسیع و گونه های *Zoophthora radicans*, *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium sp.* و *Beauveria bassiana* گونه -

های مختلفی از حشرات را در شرایط مزرعه و آزمایشگاهی آلوده می نمایند [۱۲].

قارچ های بیمارگر حشرات در شاخه Ascomycota (قارچ های آسکدار)، Zygomycota (زیگوسپور^۱ داران) و Deuteriomycota (قارچ های ناقص) قرار دارند و جنس های این قارچ ها به راسته Entomophthorales در Zygomycota و یا رده Hyphomycetes در Deuteriomycota تعلق دارند که اعضای رده Hyphomycetes به طور معمول به عنوان قارچ های بیمارگر فرصت طلب آلوده کننده بسیاری از گونه های حشرات در نظر گرفته می شوند [۱۳]. طبق روابط فیلوژنتیک، قارچ های مهم بیمارگر حشرات در شاخه Ascomycota و Basidiomycota در زیرسلسله^۲ Dikarya و Zygomycota و Chytridiomycota طبقه بندی می شوند [۱۴، ۱۵]. قارچ های بیمارگر حشرات غالباً

۱- Zigospor

۲- Subkingdom

در طبیعت موجب بیماری حشرات می شوند و عامل مهم تنظیم کننده ی جمعیت حشرات هستند که طبیعت آن را در اختیار آدمی قرار داده است [۱۴]. در جدول ۱-۱ به راسته های قارچی پرازیت و اعضای خانواده هیفومیست اشاره شده است (۲۰۰۱). تاکنون بیش از ۹۰ جنس و ۷۰۰ گونه متعلق به قارچ های بیمارگر حشرات گزارش شده است [۱۶] که برخی پرازیت اجباری (Entomophthora) و برخی پرازیت اختیاری (نظیر فوزاریوم^۱ و آسپرژیلوس^۲) هستند. قارچ های پرازیت اجباری بر روی حشرات خاصی زندگی می کنند و مطالعه آنها تنها در صورتی امکان پذیر است که به طور طبیعی به آلوده سازی میزبان خویش پردازند در صورتی که پرازیت های اختیاری از دو امتیاز آسانی مطالعه آزمایشگاهی و آنالیز، زندگی ساپروفیتی در غیاب میزبان مناسب در طبیعت برخوردار هستند که این ویژگی ها در مورد *Metarhizium* spp. صادق است [۱۳]. تمام گونه های قارچ های بیمارگر حشرات بر روی حشرات مهم از منظر اقتصادی نظیر شته ها، سفیده کلم، شب پره های خانواده Noctuidae، راست بالان^۳ و دوبالان به صورت انگل عمل می نمایند و لذا قارچ های موسکاردین (قارچ های ناقصی مانند *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* و *Sorospora*) برای تولید حشره کش های زیستی مناسب هستند [۱۷].

۱-۳. قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium* spp.

در میان قارچ های بیمارگر حشرات، جنس های *Beauveria*, *Metarhizium* و *Paecilomyces* دارای طیف میزبانی وسیع، تنوع ژنتیکی^۴ درون گونه ای و اختصاصیت میزبانی بالاتری هستند. کشت آسان بر روی محیط کشت عصاره سیب زمینی - دکستروز - آگار^۵ یا عصاره مالت - آگار^۱، عدم به مخاطره انداختن

۱- *Fusarium* spp.

۲- *Aspergillus* spp.

۳- Orthoptera

۴- Genetic Diversity

۵- Potato-Dextrose Agar (PDA)

جدول ۱-۱: راسته‌های مهم و پارازیت‌های قارچی نکروتروف که به حشرات حمله می‌کنند [۱۸].

Chytridiomycota

Chytridiomycetes

Blastocladales- *Coelomomyces*

Zygomycota

Zygomycetes

Entomophthorales

Entomophthoraceae- *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*,

Furia, *Massospora*, *Pandora*, *Zoopthora*

Neozygitaceae- *Neozygites*

Ancylistaceae- *Conidiobolus*

Ascomycota

Pyrenomycetes

Hypocreales

Clavicipitaceae- *Cordyceps*, *Cordycepioideus*, *Ophiocordyceps*,

Torrubiella, *Gibellula*, *Pseudogibellula*, *Akanthomyces*,

Nomurea, *Hymenosilbe*, *Hirsutella*, *Paraisaria*

Hypocrealean anamorphs- *Aschersonia*, *Beauveria*, *Fusarium*,

Hirsutella, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Isariae*,

Tolypocladium, *Lecanicillium*.

Loculoascomycetes

Myriangiales

Myriangiaceae- *Myriangium*

Pleosporales

Tubeufiaceae- *Podonectea*

Unclassified anamorph- *Entoderma*

Oomycota

Lagenidiales

Lagenidiaceae- *Lagenidium*

سلامت انسان و موجودات خونگرم، تولید اسپوره‌های غیرجنسی در شرایط مرطوب، تولید اسپوره‌های مقاوم یا غیر فعال از محاسن این قارچ‌ها می‌باشد. از معایب قارچ‌های بیمارگر می‌توان به حساسیت آنها به خشکی، فراهم‌شدن شرایط محیطی مناسب برای تلقیح و حساسیت در برابر قارچ‌کش‌ها اشاره نمود. اولین بار در ۱۸۴۸ در فرانسه، آلودگی و مرگ شپشک‌ها توسط قارچ‌های بیمارگر حشرات گزارش گردید [۶]. بیش از ۱۳۰ سال است که قارچ‌های *B. bassiana*، *Metarhizium anisopliae* و *B. brongniartii* برای کنترل آفات استفاده می‌شوند. *Metarhizium spp.* از قارچ‌های بیمارگر حشرات به عنوان قارچ موسکاردین سبز^۱ شناخته می‌شود و این به علت تولید اسپوره‌های سبز رنگ بر روی لاشه‌ی حشرات می‌باشد. اولین بار این قارچ از روسیه به عنوان بیمارگر سوسک طلایی گندم^۲ توسط متشنکووف^۳ معرفی گردید [۱۵] و سپس در سال ۱۸۸۳ توسط سوروکین^۴ به *M. anisopliae* تغییر نام داد [۱۹]. این قارچ در زیرسلسله *Dikarya*، شاخه *Ascomycota*، راسته *Hyphocreales* و خانواده *Clavicipitaceae* قرار گرفته است. این قارچ پراکنش جهانی دارد و طیف میزبانی وسیعی را شامل می‌شود و فراوان‌ترین گونه آن *M. anisopliae* می‌باشد که در زیست‌بوم‌های مختلفی وجود دارد و با توجه به آلوده‌سازی بیش از ۲۰۰ گونه حشره آفت، در بسیاری از کشورها به عنوان عامل کنترل بیولوژیک استفاده می‌شود [۲۰]. این قارچ در رده قارچ‌های ناقص^۵ جای داده شده بود و تا مدت‌ها تصور می‌شد که فاقد فرم جنسی^۶ است اما بعدها بر پایه مطالعات فیلوژنی مشخص شد جنس *Cordyceps* در واقع فرم جنسی قارچ‌های بیمارگر حشرات هستند [۱۴، ۲۱]. سانگ [۱۵] در *Ascomycota*، رده *Sordariomycetes* (= *Pyrenomycetes*) جنس‌های قارچ‌های بیمارگر حشرات مهمی نظیر *Cordyceps*، *Torrubiella* و *Hypocrella* در خانواده *Clavicipitaceae* را معرفی نمود. مشخص شده

۱- Green Muscardine

۲- *Anisopliae austriaca* (Col, Scarabidae)

۳- Elie Metchnikoff

۴- Sorokin

۵- Imperfect Fungi

۶- Teleomorph

است که جنس *Cordyceps* چندنیایی است و برای آن ۳ خانواده *Cordycipitaceae*, *Ophiocordycipitaceae* و *Clavicipitaceae* تعیین شده است. علاوه بر این، جنس *Metacordyceps* برای برخی جنس‌های قارچی در خانواده *Clavicipitaceae* پیشنهاد شده است که بنا به نظر سانگ این جنس در واقع مرحله جنسی قارچ *Metarhizium* می‌باشد [۱۵]. به گفته اشنايدر [۲۲] امروزه این قارچ دارای گونه‌های *M. anisopliae*، گونه خواهری آن *M. robertsii*، *M. guizhouense*، *M. M. albomaculata*، *M. M. album*، *M. M. flavoviridae*، *M. M. frigidum*، *M. M. acridum* (*M. anisopliae* var. *acridum*)، *M. M. majus* (*M. M. lepidiotae* (*M. anisopliae* var. *lepidiotae*))، *M. M. pingshaense*، *M. M. globosum* (*M. anisopliae* var. *major*)، *M. M. brunneum* می‌باشد.

۱-۳-۱. طیف میزبانی

دامنه میزبانی گونه *M. anisopliae* نسبت به *B. bassiana* از محدودیت بیشتری برخوردار است. پتانسیل این قارچ در استرالیا برای کنترل ملخ‌های شاخک کوتاه توسط میلنر گزارش شده است [۲۳]. قارچ‌های بیمارگر حشرات نظیر *B. bassiana* و *M. anisopliae* در توسعه Mycopesticide^۱ها برای کنترل حشرات آفت نظیر ملخ‌های شاخک کوتاه و شاخک بلند، حشرات راسته‌های بالپوش‌داران^۲ و بال‌پولک‌داران^۳ استفاده می‌شوند. کنترل موریانه‌ها^۴، مگس سفید تنباکو^۵، کنه‌ی عنکبوتی قرمز^۶، تخم کنه‌ها، مگس‌های میوه^۷ و شته‌ها، زنجره‌ی سبز^۸، شپشک برنج^۹، سوسک آرد^{۱۰} و برخی از راست‌بالان را به قارچ *Metarhizium* نسبت داده‌اند [۱۴]. استین هوس (۱۹۴۹) در فاصله سال‌های ۱۹۲۶ تا

آفت‌کش‌هایی که بر پایه قارچ‌های بیمارگر حشرات تولید می‌شوند و برای محیط‌زیست و موجودات خونگرم سمیتی ندارند. ۱-

۲- Coleoptera

۳- Lepidoptera

۴- Termites

۵- Tobacco Whitefly (*Thrips tabaci*)

۶- Red Spider Mite

۷- Fruit Flies

۸- Green Leafhopper

۹- Rice Weevil

۱۰- Flour Beetle

۱۹۲۹ بیماری‌زایی این قارچ را در حشراتی هم‌چون کرم‌ابریشم^۱ و ساقه‌خوار اروپایی^۲ گزارش نمود. مولر-کوگلر (۱۹۶۵) به بررسی بیماری‌زایی این قارچ بر روی حشراتی نظیر *Scotinophara lurida*, *Oryctes rhinoceros*, *Cleonus punctiventris*, *Agriotes obscurus* and, *A. sputator*, *Agrotis*, *Popillia japonica*, *Alissonotum impressicolle*, *Ostrinia*(*Pyrausta*)*nubilalis* *segetum* و *Euxoa* spp. پرداخت [۲۴]. جامع‌ترین لیست از حشرات میزبان این قارچ توسط وین (۱۹۶۸) با ۲۰۴ گونه حشره از ۷ راسته مختلف گزارش شده است. بیشتر این حشرات به راسته بالپوش‌داران به‌ویژه حشرات خاک‌زی شامل بیش از ۷۰ گونه سوسک‌های *Scarabidae* تعلق دارند [۲۴]. بر پایه گوئتل و همکاران (۱۹۹۰) طیف میزبانی *M. anisopliae* شامل گوش‌خیزک‌ها^۳، راست-بالان^۴، مساوی‌بالان^۵، جور‌بالان^۶، ناجور‌بالان^۷، دوبالان^۸، بال‌پوش‌داران، بال‌غشائیان، *Siphonaptera*، بال‌پولک‌داران، *Symphyla* و برخی حشرات راسته‌های *Malacostrata* و کنه‌ها^۹ می‌باشد درحالی‌که *M. anisopliae* گونه‌ای با طیف وسیع است، سویه‌ها و ژنوتیپ‌های این جنس طیف میزبانی محدودتری دارند. به‌علاوه جدایه‌های این قارچ در شرایط مزرعه در مقایسه با شرایط آزمایشگاهی از اختصاصیت بیشتری برخوردار هستند [۲۴]. برخی از گروه‌های ژنتیکی *Metarhizium* از مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری به‌ویژه گونه‌های *M. anisopliae* var. *majus*، *M. flavoridae* و *M. album* به‌ترتیب به راسته‌های بال‌پوش‌داران، راست‌بالان و جور‌بالان صدمه می‌زنند [۲۴]. در مورد *M. anisopliae* رابطه شفافی میان ژنوتیپ قارچ و اختصاصیت میزبانی تأیید نشده است.

۱- *Bombyx mori*۲- *Ostrinia nubilalis*۳- *Dermaptera*۴- *Orthoptera*۵- *Isoptera*۶- *Homoptera*۷- *Heteroptera*۸- *Diptera*۹- *Acari*

۱-۳-۲. نحوه فعالیت و مکانیسم بیماری زایی

از منظر تغذیه، قارچ‌ها ممکن است ساپروفیت^۱ (قارچ‌های ساپروفیت از مواد آلی مرده یا تجزیه شده تغذیه می‌نمایند. اکثر قارچ‌ها ساپروفیت هستند)، اندوساپروفیت^۲ (ساپروفیت داخلی)، ساپروتروف^۳ (قارچ‌هایی که مواد غذایی مورد نیاز خود را از مواد آلی غیر زنده به دست می‌آورند)، بیوتروف^۴ (این قارچ‌های پارازیت در میان سلول‌های میزبان خود (گیاه) رشد نموده و به تعدادی از سلول‌ها از طریق تولید هستوریوم^۵ (ساختارهای جذب کننده مواد غذایی) حمله می‌نمایند به تغذیه از مواد غذایی تولید شده در گیاه می‌پردازند اما موجب مرگ میزبان نمی‌شوند) یا نکروتروف^۶ (قارچ‌های پارازیتی که با حمله مستقیم به بافت‌های میزبان خود یا تولید توکسین‌ها و آنزیم‌های تجزیه‌کننده و تغذیه از بافت‌ها، موجب مرگ میزبان می‌شوند) باشند. قارچ‌های بیمارگر حشرات در بیماری‌زایی^۷ متفاوت هستند. آلودگی موفق این قارچ‌ها به چسبندگی و توانایی نفوذ آنها به بندهای بدن حشرات میزبان بستگی دارد. از محاسن دیگر این قارچ‌ها می‌توان به ایمنی انسان و دیگر موجودات غیر هدف، حداقل بودن بقایای آنان در محصولات غذایی، افزایش تنوع زیستی در اکوسیستم‌های مدیریت شده اشاره کرد. قارچ‌هایی که در حشرات علایم بیماری را به وجود می‌آورند در طیفی از قارچ‌هایی با کشندگی سریع تا پارازیت‌های مطلق قرار می‌گیرند [۲۴]. بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر حشرات شامل ۴ مرحله چسبندگی، جوانه‌زنی، تفکیک و نفوذ می‌باشد که در ادامه به‌طور اختصار به معرفی این مراحل می‌پردازیم. در شکل ۱-۱ نمایی از مراحل چرخه آلودگی قارچ را مشاهده خواهید نمود.

چسبندگی^۸ معمولا با ترشح موسیلاژ (در قارچ‌ها به آن لایه چسبناک^۹ گفته می‌شود و گلیکوپروتئینی

۱- Saprophyte

۲- Endo-Saprophyte

۳- Saprothrophe

۴- Hemi-Biothrophe

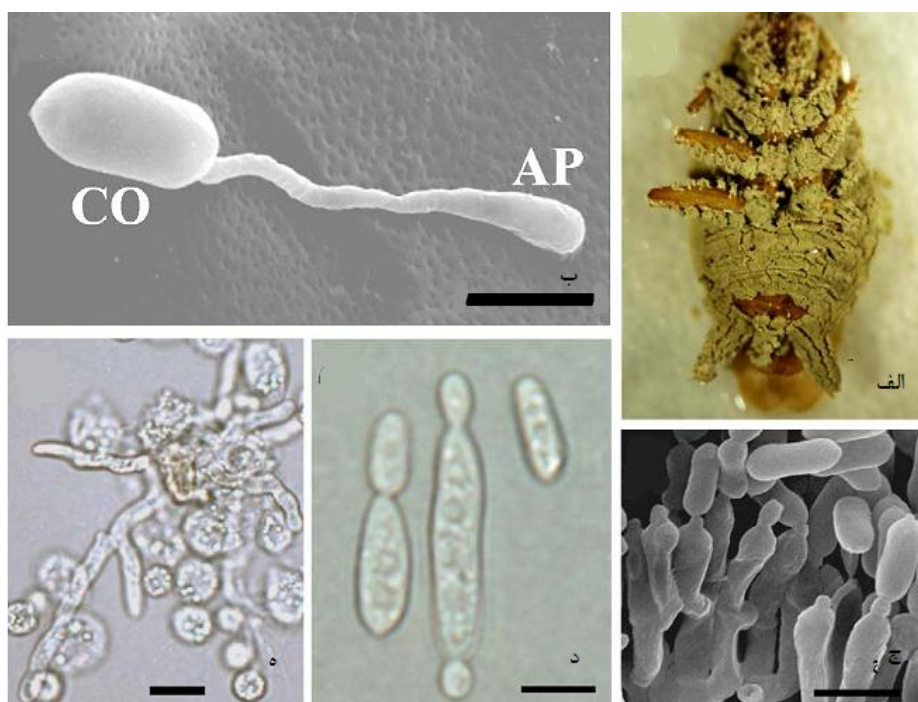
۵- Haustorium

۶- Necrothrophe

۷- Pathogenicity (Virulence)

۸- Adhesion

۹- Slime Layer



شکل ۱-۱: مراحل چرخه آلودگی *Metarhizium* spp. (الف) لاشه حشره آلوده به کنیدی (ب) کنیدی جوانه زده به تولید اپرسوریوم می پردازد (CO مخفف کنیدی (Conidium) و AP مخفف اپرسوریوم (Apresorium) (ج) اجتماعی از کنیدی های جوانه زده (د) جوانه زنی سلول- های نوع مخمری (بلاستواسپور) (ه) حمله میسلیم به هموسیت پس از نفوذ به کوتیکول [۴]

و پلی ساکاریدی است) همراه است هرچند که آنزیم‌ها، لکتین^۱‌ها، نیروهای هیدروفوب و الکترواستاتیک نیز در این زمینه نقش دارند. واحد آلوده‌کنندگی، کنیدیوسپوری هاپلوئید است که به صورت زنجیره-ای روی فیالید^۲ شکل می‌گیرد. بیماری‌زایی قارچ بیمارگر با اتصال اسپور آن به بدن حشره آغاز می‌گردد. کوتیکول حشره ترکیبی از کیتین، پروتئین‌های مومی، لایه‌ی لیپیدی یا اسید چرب می‌باشد. مرحله‌ی بعد از اتصال، هیدرولیز اپیدرم میزبان است که لیپازها، پروتئازها و کیتینازها درگیر هستند [۲۴].

در مرحله جوانه‌زنی^۳ طیف وسیعی از عوامل نظیر آب، یون‌ها، اسیدهای چرب، مواد غذایی روی سطح کوتیکول حشره و مرحله‌ی فیزیولوژی که حشره در آن به سر می‌برد بر جوانه‌زنی اسپور اثرگذار است. لازمه‌ی جوانه‌زنی موفق قارچ، آسیمیلایسون مواد غذایی قابل استفاده‌ی سطح کوتیکول و تحمل قارچ به ترکیبات سمی موجود در بدن حشره است [۱۱، ۱۳]. جوانه‌زنی و آلودگی موفق قارچ به تعدادی از عوامل نظیر حشره و مرحله‌ی فیزیولوژی که حشره در آن به سر می‌برد بر جوانه‌زنی اسپور اثرگذار است. لازمه‌ی جوانه‌زنی موفق قارچ، آسیمیلایسون مواد غذایی قابل استفاده سطح کوتیکول و تحمل قارچ به ترکیبات سمی موجود در بدن حشره است [۱۱، ۱۳]. جوانه‌زنی و آلودگی موفق قارچ به تعدادی از عوامل نظیر وجود میزبان مستعد، مرحله زندگی میزبان و شرایط محیطی مختلف هم‌چون دما و رطوبت بستگی دارد. به‌طور معمول جوانه‌زنی کنیدی‌های قارچ *M. anisopliae* در ۲۰ ساعت اول پس از تماس صورت می‌گیرد [۲۴]. متابولیت‌های ثانویه‌ای نظیر دستروکسین^۴، سیتوکالاسین‌ها^۵، سواپین سونین^۶ توسط این قارچ تولید می‌شوند. پس از جوانه‌زنی، اپرسوریومی^۷ کوتاه در انتهای لوله تندنش ظاهر می‌شود که به این مرحله تفکیک^۸ می‌گویند. اتصال قارچ به کوتیکول توسط لوله‌ی

۱- Lectin

۲- Phialid

۳- Germination

۴- Destruxin

۵- Cytochalasins

۶- Swainsonine

۷- Appresorium

۸- Differentiation

تندش یا اپرسوریوم به کوتیکول را نفوذ^۱ گویند [۱۱]. در واقع اپرسوریوم مسئول اتصال اسپور جوانه زده به سطح اپی کوتیکول حشره است و این عمل فرآیندی مکانیکی و آنزیمی است و طیفی از آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی کوتیکول در طول نفوذ به میزبان تولید می‌شوند. در *M. anisopliae* گروهی از آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی کوتیکول وجود دارند که هم در محیط کشت و هم در طول فرآیند آلودگی تولید می‌شوند و این گروه شامل پروتئازهای شبه ساب تیلیسین^۲، متالوپروتئازها^۳، تریپسین^۴، کیموتریپسین^۵، آمینوپپتیدازها^۶، دی پپتیدیل پپتیدازها^۷ و کیتینازها^۸ هستند [۲۴]. تعدادی از بیمارگرهای خاک‌زی به‌طور مستقیم و به‌ندرت از زخم‌ها، اندام‌های حساس یا روزنه‌ها نفوذ می‌کنند [۱۱]. در عوض درون بدن میزبان، قارچ‌های بیمارگر به‌صورت پروپاگول^۹های مخمرمانند (بلاستواسپور^{۱۰}) رشد می‌نمایند، مرگ حشره در نتیجه‌ی خسارت مکانیکی که توسط رشد میسلیوم درون بدن حشره^{۱۱} یا توکسین‌های تولید و رها شده توسط بیمارگر همراه با اضمحلال پاسخ‌های دفاعی حشره‌ی میزبان صورت می‌گیرد [۱۱]. گونه‌هایی نظیر *Beauveria*، *Metarhizium* و *Tolypocladium* طیفی از توکسین‌ها را ترشح می‌نمایند که تعدادی از این توکسین‌ها نظیر دستروکسین، بارنيسین^{۱۲} و افراپتین^{۱۳} از منظر شیمیایی شناخته شده‌اند و نقش و سهم آنها در فرآیند بیماری‌زایی مشخص شده است. متابولیت‌های قارچی تولیدشده توسط قارچ‌های بیمارگر حشرات موجب بازداری از تغذیه و یا آنتی بیوسیس^{۱۴} (تضاد بین دو میکروب و فرآورده میکروب دیگر

۱- Penetration

۲- Subtilisin-like proteinases

۳- Metalloproteases

۴- Trypsin

۵- Chymotrypsin

۶- Aminopeptidases

۷- Dipeptidyl Peptidases

۸- Chitinases

۹- Propagule

۱۰- Blastospore

۱۱- Mummification

۱۲- Barenicin

۱۳- Efraeptin

۱۴- Antibiosis

که باعث از بین رفتن میکروب اول می شود) می شوند [۲۵]. در قارچ های راسته Entomophthorales، مرگ حشره در نتیجه کلنی سازی کامل قارچ در بافت های بدن به انجام می رسد. پس از مرگ حشره، قارچ روی لاشه به کلنی سازی ادامه می دهد و در طول ۲-۳ روز هیف های هوایی شکل گرفته و سپس اسپورزایی صورت می گیرد. راسته Hypocreales به تولید اسپورهای غیرجنسی می پردازد ولی راسته Entomophthorales دو نوع اسپور غیرجنسی^۱ (کنیدی اولیه) و جنسی تولید می نماید. این دو راسته در نحوه پراکنش اسپورها متفاوت عمل می نمایند و اسپورها توسط باد و باران پراکنش یافته و به میزبان جدیدی برای ایجاد آلودگی متصل می شوند [۲۶].

۱-۳-۳. اثر عوامل محیطی بر فعالیت قارچ های بیمارگر حشرات

آزمایشات نشان داده است که دما و رطوبت نسبی بر تولید اسپور و بیماری زایی قارچ های بیمارگر حشرات اثرگذار است. دما می تواند بر جوانه زنی و رشد، قدرت بقا^۲ قارچ های بیمارگر حشرات در آزمایشگاه و مزرعه اثرگذار باشد. *M. anisopliae* قارچی مزوفیل است که در طیف دمایی بین ۱۵ تا ۳۵ درجه سانتی گراد رشد می کند و بهینه ی دما برای جوانه زنی و رشد آن ۲۵-۳۰ درجه است. تفاوت های زیادی میان جدایه ها در جوانه زنی و رشد شعاعی^۳ در دمای ثابت مشاهده شده است [۲۷] یعنی بیش از ۸۰٪ کنیدی ها در دمای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد و ۶۷-۲۶٪ در ۳۵ درجه و کمتر از ۱۰٪ در ۱۵ درجه سانتی گراد پس از ۲۴ ساعت جوانه زنی می نمایند. دما هم چنین بر توانایی ذخیره سازی^۴ قارچ اثر می گذارد. برای مثال، قدرت بقای کنیدی های خشک *M. anisopliae* با افزایش دمای ذخیره سازی^۵ از ۸ به ۲۵ درجه سانتی گراد کاهش می یابد [۲۴]. دما تنها بر جوانه زنی اسپورهای قارچی اثر نمی گذارد بلکه بر سرعت و کیفیت اسپورزایی نیز تاثیر می گذارد. بیشترین میزان جوانه زنی

۱- Azygospore

۲- Viability

۳- Radial Growth Rate

۴- Storability

۵- Storage Temperature

و اسپورزایی *M. anisopliae* در رطوبت نسبی ۱۰۰٪ و دمای ۲۰-۳۰ درجه سانتی گراد رخ می دهد. کاهش میزان جوانه زنی و بیماری زایی قارچ در رطوبت نسبی و دماهای پایین اتفاق می افتد. رطوبت نه تنها عامل محیطی مهم و اثرگذار بر کارایی قارچ بیمارگر است بلکه عامل بقای قارچ است. به طور معمول، رطوبت نسبی بالا برای جوانه زنی *M. anisopliae* مورد نیاز است. والسند (۱۹۷۰) دریافت که بهترین جوانه زنی در رطوبت نسبی ۱۰۰٪ رخ می دهد [۲۴]. آب به شکل باران هم چنین بر حرکت عمودی قارچ های بیمارگر حشرات در خاک های مختلف تاثیر می گذارد. به طور طبیعی، پراکنش کنیدی های قارچی درون خاک روی بازدهی پاتوژن های قارچی^۱ به عنوان کنترل بیولوژیک اثرگذار است. اشعه فراءبنفش در کنار رطوبت و دما یکی از عوامل کلیدی مسئول کارایی یا عدم موفقیت *M. anisopliae* در مزرعه است. یعنی ممکن است بر بقای قارچ اثرگذار باشد و بنابراین پیامد ایمنی مهم روی بقایای آفت کش های زیستی روی محصولات تیمار شده خواهد بود [۲۴].

درباره اثر ریشه های گیاه و ترشحات ریشه روی فعالیت قارچ های بیمارگر حشرات اطلاعات اندکی وجود دارد. زیمرمن (۱۹۸۴) هنگام بررسی کنترل شیشه ی سیاه مو با استفاده از *M. anisopliae* دریافت که بیمارگر بر روی گیاه سیکلامن^۲ نسبت به دیگر گیاهان کارایی کمتری دارد [۲۴].

۱-۳-۴. حشره کش های زیستی بر مبنای قارچ *Metarhizium spp.*

قارچ های بیمارگر حشرات در بسیاری از کشورهای جهان به عنوان عامل کنترل زیستی به کار برده شده اند و میزان استفاده از سموم شیمیایی آلوده کننده محیط زیست را به طور چشمگیری کاهش داده -

۱- Mycopathogen

۲- Cyclamen

اند. تاکنون بیش از ۱۵۰ حشره کش زیستی^۱ بر مبنای این قارچ‌ها در نقاط مختلف جهان تولید شده- اند که در جدول ۱-۲ شماری از آفت کش‌های زیستی بر مبنای قارچ *Metarhizium* آورده شده است.

۱-۴. ژنوم و ساختار سلولی قارچ *Metarhizium spp.*

ژنوم یوکاریوت‌ها از اندازه‌ای بین ۱۰ Mbp تا ۳ Gbp برخوردار است و در میان این موجودات، قارچ‌ها به‌ویژه مخمرها دارای کوچکترین اندازه ژنوم هستند (۵۰-۱۰ Mbp) و توالی‌یابی اولین قارچ در ۱۹۹۶ صورت پذیرفت [۲۸]. مبداء ژنومیکس قارچ‌ها با توالی‌یابی کامل ژنوم مخمر *Saccharomyces cerevisiae* آغاز گردید و طبق گفته گالاگان (۲۰۱۳) در حال حاضر ژنوم بیش از ۴۰ قارچ به‌طور کامل توالی‌یابی شده است [۲۸]. اکنون با استفاده از تکنیک‌های ملکولی مختلف، مشخص شده است که ژنوم قارچ‌های بیمارگر حشرات از اندازه‌ای بین ۳۰-۴۰ Mbp برخوردار هستند. مطالعات کروموزومی حاکی از تناقض یافته‌ها در تعداد کروموزوم‌های قارچ *Metarhizium spp.* دارد و تنوع بین ۷ و ۸ کروموزوم است [۲۹-۳۱] و اندازه ژنوم این قارچ در حدود ۳۰ Mbp تخمین زده می‌شود [۲۹، ۳۰]. به علت بالا بودن تعداد میتوکندری‌ها، بخش قابل توجهی از ژنوم کل سلول را در بر می‌گیرند. ژنوم میتوکندریایی^۲ به‌دلیل استخراج راحت‌تر نسبت به ژنوم هسته‌ای، وجود اینترون‌ها و عناصر متحرک نشان‌دهنده چندشکلی، اندازه کوچک، عدم وجود رخداد متیلاسیون، سهولت خالص‌سازی، ابزارهای ایده‌آل برای بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های قارچی و شناسایی ژنتیکی گونه‌ها هستند [۳۲]. همچنین نواحی intergenic میتوکندری می‌تواند اطلاعات فیلوژنیک ارزشمندی را برای مطالعه جغرافیای حیاتی^۳ (رشته‌ای در زیست‌شناسی که درباره طرز انتشار و گسترش جغرافیایی موجودات بحث می‌نماید) قارچ در اختیار قرار دهند. ژنوم میتوکندریایی قارچ بیمارگر حشرات *M. anisopliae var. anisopliae* با اندازه کلی ۲۴/۶۷۳ bp از کوچک‌ترین mtDNA های شناخته شده

۱- Biopesticide

۲- Mitochondrial Genome (mtDNA)

۳- Biogeography

جدول ۱-۲: آفت کش های زیستی تولید شده از قارچ *Metarhizium spp.*

نام محصول	شرکت تولید کننده	میزبان	کشور تولید کننده و منبع
Ago Biocontrol Metarhizium 50	Ago Biocontrol	بال غشائیان، سخت بال پوشان، جوربالان، راست بالان	کلمبیا
BIO 1020	Bayer AG/	شپشه انگور	آلمان، آمریکا
BioGreen	BioCare Technology Pty. Ltd.	سوسک طلایی پردار سر قرمز ^۱	استرالیا
BioCane	BioCare Pty. Ltd.	مگس پشت قهوه ای نیشکر	استرالیا
Green guard	Seed Grain and Biotechnology	انواع ملخها	استرالیا
Green muscle	Biological Control Products SA	انواع ملخها	آفریقای جنوبی
Metarhizium Schweizer	Eric Schweizer Seeds Ltd.	زمین های چمنی، جوانه های میوه، مو- کاری ها و باغبانی	سوئیس
Taenure	Earth BioSciences Inc.	شپشه ریشه، لارو مگس ها، انواع ساس و کنه، تریپس نابالغ، سفیدبالکها	http://www.taensa.com/products-taenure.Html

^۱ - *Adoryphorus couloni*

Pezizomycota می باشد و دارای ۱۴ ژن کدکننده پروتئین است. تعداد میتوکندری ها در هر سلول یوکاریوتی بین ۱۰۰۰-۲۰۰ عدد تخمین زده شده است. آنالیز مقایسه ای ۳ ناحیه intergenic میتوکندری این قارچ نشان داد که تنوع توالی برای شناسایی درون گونه ای و برون گونه ای این قارچ استفاده می شود [۳۳]. میتوکندری ها تغییرات قابل توجهی را در ساختار، اندازه، محتوای ژنی، آرایش و بیان نشان می دهند. نواحی Intergenic، حضور اینترون ها و یا پلاسمیدها به میزان قابل توجهی در سطوح بالای چند شکلی مشاهده شده در DNA میتوکندریایی قارچی شرکت دارند [۳۳]. گرچه قارچ های بیمارگر حشرات ممکن است دارای عناصر خارج کروموزومی^۱ نظیر پلاسمید^۲ [۳۴] و DNA دو رشته ای^۳ باشند که ممکن است در چند شکلی های درون گونه ای شرکت نمایند.

۱-۵. مطالعه تنوع فیلوژنتیکی و روش های آن

شناسایی مورفولوژیکی با استفاده از اسلاید میکروسکوپی دارای مشکلاتی است. حذف پوشش اسلاید (لامل) و بلوکه های آگار همراه با قطعه برداشته شده موجب تغییراتی در ویژگی های مورفولوژیکی نظیر زاویه انشعاب و الصاق اسپوره های ماکرو و میکرو به اسپورانژیوسپورها موجب ایجاد مشکل در تعیین گونه قارچ ها می شود. هم چنین برای مشاهده میکروسکوپی اسپورها به رنگ آمیزی نیاز است که زمان زیادی برای رنگ آمیزی و سپس رنگ زدایی لازم است. از طرفی بررسی ساختارهای جای گرفته درون محیط کشت آگار امکان پذیر نمی باشد. هم چنین مشاهده ساختارهای قارچی در مدت زمان خاصی امکان پذیر است برای مثال مشاهده اسپوره های قارچ *Metarhizium* در محیط کشت آگار ۳ روز پس از کشت امکان پذیر است و گذشت این مدت موجب جوانه زنی میسلیم ها می شود [۳۵]. هم چنین بسیاری از قارچ های هیفومیست مهم گونه های پیچیده ای هستند و مرزهای میان تفاوت های مورفولوژیکی در شناسایی گونه ها معتبر نمی باشد [۳۶] لذا مطالعه توالی های DNA مقایسه ای می -

۱- Extra Chromosomal Elements

۲- Plasmid

۳- Double Stranded DNA (ds DNA)

تواند دیدگاهی جدید درباره پیوستگی میان قارچ‌های بیمارگر حشرات (فرم غیر جنسی) و فرم جنسی آنها فراهم آورد و به شفاف‌سازی روابط فیلوژنتیکی میان آنها کمک نماید [۳۷]. بدون تنوع ژنتیکی، جمعیت یک جاندار قادر به تکامل نخواهد بود و نمی‌تواند با تغییرات محیطی سازگار گردد و این تنوع بر تنوع زیستی اثرگذار است. شناسایی تنوع به‌طور عمده بر پایه صفات مورفولوژیکی انجام می‌شود ولی تغییرپذیری مورفولوژیکی محدود بوده، صفات در تمام مراحل توسعه موجود زنده مشاهده نمی‌شوند و همچنین ممکن است تحت تاثیر محیط قرار گیرند لذا از ابزارهای مولکولی برای بررسی تنوع استفاده می‌شود [۳۸]. تکنیک‌های مولکولی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۱ به تعیین ارتباط میان موجودات زنده و طبقه‌بندی آنها کمک می‌نماید. علی‌رغم ضرورت استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای تاکسونومی و سیستماتیک قارچ‌های بیمارگر حشرات، شناسایی و تشخیص این قارچ‌ها مشکلاتی را در پی دارد از اینرو به‌طور گسترده به تکنیک‌های مولکولی به‌ویژه تکنیک‌های مبتنی بر PCR استفاده می‌شود [۳۴]. هبرت (۲۰۰۲) سیستم نوینی را برای شناسایی گونه‌های حیوانی بر اساس تنوع ژن سیتوکروم اکسیداز I میتوکندریایی بیان نمود که مزیت این ژن شامل برخورداری از طول مناسب (۶۴۸ جفت باز)، عدم وجود اینترون‌ها، محدودیت رخداد نوترکیبی در این ژن، وراثت هاپلوئید آن است [۳۹]. نشانگرهای مولکولی^۲ (عبارت است از تفاوت در توالی نوکلئوتیدی DNA که این تفاوت دارای توارث مندلی است) برای دستیابی به تنوع ژنتیکی میان جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر حشرات، شناسایی جدایه‌های فرعی، عیین منبع جدایه‌ها، مطالعه جمعیت و آنالیز فیلوژنی به‌کار برده می‌شوند [۴۰]. تکنیک‌هایی نظیر RFLP^۳، AFLP^۴، DNA بارکدینگ^۵، SSR^۶ برای تعیین چندشکلی در DNA هسته‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند [۴۱] که در میان این تکنیک‌ها، تکنیک ایزوزایم کارایی

۱- Polymerase Chain Reaction (PCR)

۲- Molecular Markers

۳- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

۴- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

۵- DNA Barcoding

۶- Simple Sequence Repeat (SSR)

ساده‌ای دارد و نسبتاً ارزان می‌باشد ولی دیگر تکنیک‌ها پر هزینه بوده و نیازمند مهارت زیاد می‌باشند [۴۲]. عواملی چون حجم داده‌های ملکولی به دست آمده و ارتباط میان آنها بر موفقیت روش ملکولی مورد استفاده در شناسایی قارچ‌ها اثرگذار می‌باشد. تکنیک‌های ملکولی به دو دسته تکنیک‌های غیر مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^۱ و تکنیک‌های مبتنی بر PCR تقسیم می‌نمایند. شناسایی و تشخیص قارچ‌ها با استفاده از تکنیک‌های ملکولی، متکی بر چندشکلی DNA است [۴۲]. این چندشکلی‌ها بیشتر در نواحی غیرکد کننده ژنوم، اینترون‌ها، فواصل بین ژنی و توالی‌های تکراری وجود دارد [۳۴].

۱-۵-۱. تکنیک‌های مبتنی بر PCR

این روش‌ها شامل چندشکلی DNA تکثیرشده تصادفی (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمر اختیاری^۲، چندشکلی طولی قطعات تکثیر یافته، ریزماهواره^۳، نشانگرهای ریبوزومی^۴ و نشانگرهای میتوکندریایی^۵ هستند که در خصوص *Metarhizium spp.* مطالعاتی از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمر اختیاری [۴۳-۴۷]، چندشکلی طولی قطعات تکثیر یافته [۷، ۴۱، ۴۸-۵۱]، ریزماهواره [۵۲-۵۴]، نشانگرهای ریبوزومی [۴۵، ۵۵-۶۲]، نشانگرهای میتوکندریایی [۳۳] انجام گرفته است که در این پایان‌نامه به دلیل استفاده از نشانگرهای ریبوزومی صرفاً به شرح آنها پرداخته می‌شود.

۱- Polymerase Chain Reaction

۲- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

۳- Microsatellite or Simple Sequence Repeat (SSR)

۴- Ribosomal Marker

۵- Mitochondrial Marker

۱-۵-۲. نشانگرهای ریبوزومی

بخشی از ژنوم در قارچ‌ها و دیگر یوکاریوت‌ها مربوط به DNA ریبوزومی^۱ است که RNA ریبوزومی (rRNA) را کد می‌کند. ژن DNA ریبوزومی در بیش از ۱۰۰ تا ۲۰۰ نسخه به شکل توالی تکراری پشت سرهم وجود دارد. هر واحد ژنی DNA ریبوزومی نسخه‌ای از زیر واحد بزرگ ریبوزوم (۲۸S)، زیر واحد کوچک ریبوزوم (۱۸S) و زیر واحد ۵/۸S را دارد (شکل ۱-۲). ژن‌های زیرواحدهای DNA ریبوزومی توسط فواصل رونویسی شده داخلی^۲ از یکدیگر جدا می‌شوند. مناطق بین هر واحد ژنی را فواصل بین ژنی یا فواصل رونویسی نشونده^۳ می‌گویند که این فواصل بین ژنی غیر رونویسی شده، به طور جداگانه‌ای دارای rRNA ۵/۸S می‌باشد. ITS1 ناحیه‌ای است که در میان زیر واحدهای ۱۸S و ۵/۸S قرار گرفته و از ناحیه ITS2 که میان دو زیر واحد ۵/۸S و ۲۸S قرار گرفته بزرگتر می‌باشد. طول کلی این ناحیه در میان موجودات مختلف در طیفی معادل ۶۴۷-۶۳۸ bp می‌باشد [۶۳]. نسخه‌های ژنی ۲۸S، ۱۸S و ۵/۸S و ۵/۸S در مقایسه با مناطق ITS و IGS، محافظت شده هستند و برای مطالعه‌ی روابط بالاتر از مراتب تاکسونومی^۴ استفاده می‌شوند [۳۴]. مقایسه ۳ زیر واحد DNA هسته‌ای نشان داد گرچه نواحی ژن‌های کد کننده پروتئین اغلب دارای درصد بالایی از شناسایی دقیق نسبت به نشانگرهای ریبوزومی هستند اما قابلیت تکثیر PCR و توالی‌یابی موفق آنها کم است و آنها را از بارکد جهانی شناسایی قارچ‌ها حذف می‌نماید. از تنوع موجود در ITS برای شناسایی گونه به جنس^۵ و از تنوع موجود در IGS برای شناسایی جمعیت به زیر گونه^۶ استفاده می‌شود. از آنجا که مناطق ۲۸S و ۱۸S در موجودات مرتبط به شدت محافظت شده است و توالی‌های آنها در یوکاریوت‌های مختلف مشخص شده است بنابراین می‌توان برای آنالیز چند شکلی موجود در ITS و IGS از

۱- Ribosomal DNA

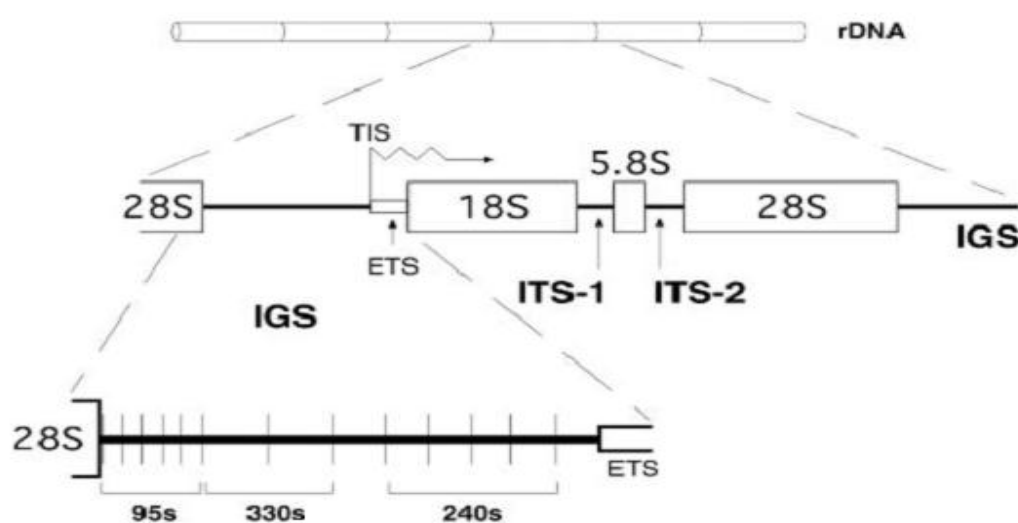
۲- Internal Transcribed Spacer (ITS)

۳- Inter-Genic Spacer or Non-Transcribed Spacer (IGS)

۴- Taxonomic Hierarchy

۵- Specific to Generic

۶- Population to Subspecific



شکل ۱-۲: دو ناحیه ITS و IGS [۲]. ژن‌های زیرواحدهای DNA ریپوزومی توسط فواصل رونویسی شده داخلی (ITS) از یکدیگر جدا می‌شوند. مناطق بین هر واحد ژنی را فواصل بین ژنی غیر رونویسی شده (IGS) می‌گویند. که این فواصل بین ژنی غیر رونویسی شده، به طور جداگانه‌ای دارای ۵/۸S rRNA می‌باشد

پرایمرهایی استفاده کرد که با بخشی از مناطق ۲۸S و ۱۸S مکمل هستند. برای بررسی و آنالیز چند شکلی موجود در مناطق ITS و IGS می‌توان مستقیماً از ژل آگارز برای بررسی چند شکلی موجود در مناطق ITS و IGS نه تنها برای مشاهده تنوع بین و درون گونه‌ای در قارچ‌های بیماری‌زای حشرات استفاده شده است بلکه با طراحی پرایمرهای اختصاصی از آنها برای مطالعات تشخیصی استفاده شده است. تعداد کپی‌های زیاد نواحی ITS این ژن (بیش از ۲۵۰ نسخه) سبب شده که این نواحی برای توالی‌یابی مناسب باشند و معمولاً این ناحیه دارای ۴۵۰ تا ۷۰۰ جفت باز می‌باشد [۶۴]. توالی‌های زیر واحد کوچک rDNA هسته‌ای برای مطالعه روابط موجودات و ژن‌های rRNA میتوکندریایی برای شناسایی در سطح خانواده و راسته مورد استفاده قرار می‌گیرند. نواحی ITS و توالی‌های تکراری rDNA هسته‌ای ممکن است در میان گونه‌های یک جنس یا در میان یک جمعیت تغییر نمایند. توالی‌یابی مستقیم rRNA برای به‌دست آوردن اطلاعات سریع از توالی ژنوم مورد استفاده قرار می‌گیرد اما نیازمند مقادیر نسبتاً زیاد RNA است. پرایمرهای مختلفی برای تکثیر قطعات ژن‌های rDNA میتوکندریایی و هسته‌ای طراحی شده است. پرایمرهای ITS از نواحی حفاظت شده ۲۸S، ۱۸S و ۵/۸S ژن‌های rRNA برای تکثیر نواحی غیرکدکننده میان آنها استفاده می‌کنند و شامل ۵ پرایمر هستند که هر کدام قسمت‌هایی از ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 را تکثیر می‌کنند. به عنوان مثال استفاده از پرایمر ITS5 موجب تکثیر قسمت‌هایی از ناحیه ۱۸S، فواصل رونویسی شده داخلی و ۲۸S می‌شود که در شکل ۱-۳ پرایمرها و مناطق تکثیری توسط آنها نشان داده شده است. مقایسه توالی‌های ۵/۸S rRNA در قارچ *Schizosaccharomyces cerevisiae*، *Neurospora crassa* و *S. pombe* و باقلا و موش^۱ برای انتخاب پرایمرهای ITS2 و ITS3 انجام شد. توالی‌های ۲۸S در *S. pombe*، *S. cerevisiae* و برنج برای انتخاب پرایمر ITS4 با یکدیگر مقایسه شدند [۱]. پرایمرهای ITS شامل ۵ پرایمر هستند که هر کدام قسمت‌هایی از ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 را تکثیر می‌کنند. به عنوان مثال

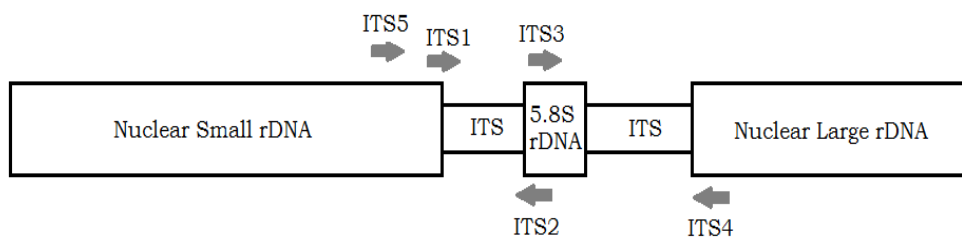
۱- *Mus musculus*

استفاده از پرایمر ITS5 موجب تکثیر قسمت‌هایی از ناحیه ۱۸S، فواصل رونویسی شده داخلی و ۲۸S می‌شود (شکل ۱-۳).

در حالت کلی برای شناسایی سریع و دقیق گونه‌ها، از نواحی ژنی استاندارد به عنوان دنباله‌های درون گونه‌ای استفاده می‌شود که به آنها بارکدینگ DNA گویند و کارایی این نواحی در برخی گونه‌ها نظیر پرندگان [۶۵]، پروانه‌ها، جلبک‌های دریایی [۶۶] و گیاهان گلدار [۶۷] ارزیابی شده است. در سلسله قارچ‌ها، شناسایی گونه‌ها بر پایه مورفولوژی چندان ساده نیست و هم‌چنین این شناسایی دقیق نمی‌باشد و لذا برای این موجودات که میکروارگانیسم‌هایی با بیش از ۱/۵ میلیون گونه هستند [۲۸] روش‌های بارکدینگ DNA متفاوتی پیشنهاد شده است که یکی از آنها سیتوکروم اکسیداز I (COX) است و برای قارچ‌های حقیقی^۱ به کار برده می‌شود [۶۸]. ناحیه زیر واحد بزرگ سیتوکروم اکسیداز C میتوکندریایی به عنوان نشانگری بالقوه برای قارچ‌ها استفاده شد اما این ناحیه در قارچ‌ها به سختی تکثیر می‌شود و دارای اینترون‌های بزرگ می‌باشد و به میزان اندکی تغییرپذیری دارد. نواحی ژنی متنوعی نظیر زیر واحد بزرگ ریبوزومی هسته‌ای، ITS، توالی‌های ژنی β -توبولین و توالی‌های فاکتور طول شدن $1-\alpha$ ^۲ برای شناسایی قارچ‌ها در سطح گونه به کار برده شده است [۶۸] به دلیل این که ژن‌هایی که پروتئین را کد می‌نمایند ممکن است از نظر تکاملی متفاوت باشند و به علت فشار انتخابی، مستعد اریبی باشند، بیش از یک ژن بایستی برای داشتن تنوع ژنتیکی توالی‌یابی شود [۳۴]. قارچ-شناسان از توالی ITS در DNA ریبوزومی به عنوان بارکد معمول استفاده می‌نمایند زیرا این نشانگر در نسخه‌های متعدد در بیشتر قارچ‌ها وجود دارند. ناحیه ITS در ۷۲٪ تمام قارچ‌ها شناسایی موفقیت-آمیزی را در پی دارد که این میزان تقریباً با دو سیستم بارکد شناسایی گیاهان برابری می‌کند. نرخ بالای موفقیت PCR یکی از دیدگاه‌های ضروری کاربرد محتمل این ناحیه به عنوان بارکد است، گرچه

۱- True Fungi

۲- Elongation Factor 1- α



شکل ۱-۳: انواع پرایمرهای ITS برای تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 [1] پرایمر ITS2 به تکثیر ناحیه 5.8S ، ITS1 و قسمتی از زیر واحد کوچک ریبوزومی می‌پردازد. پرایمر ITS4 قسمتی از زیر واحد بزرگ ریبوزومی، کل ناحیه ITS (یعنی ITS1، ITS2 و 5.8S) و زیر واحد کوچک ریبوزومی را تکثیر می‌نماید. پرایمر ITS3 موجب تکثیر ناحیه 5.8S و ITS2 و قسمتی از زیر واحد بزرگ ریبوزومی می‌گردد. پرایمر ITS1 قسمتی از زیر واحد کوچک ریبوزومی، کل ناحیه ITS و قسمتی از زیر واحد بزرگ ریبوزومی را در بر گرفته و آنها را تکثیر می‌نماید.

شناسایی موفقیت آمیز برای *RPB1*^۱ برابر ۸۱٪ است اما میزان PCR موفق آن اندک است و جدی ترین محدودیت این ژن در انتخاب آن به عنوان بارکد استاندارد می باشد [۶۷]. این بارکد (ناحیه ITS) کوتاه است و در برخی جنس ها نظیر آسکومیست ها قادر به شناسایی گونه ها نمی باشد [۶۹] که شامل بیش از ۶۰٪ گونه های قارچی شناخته شده است لذا برای این قارچ ها به بارکدی ثانویه با تغییرپذیری کافی در کنار ITS برای شناسایی گونه ها نیاز است [۶۷].

در این پایان نامه، به مطالعه ی پراکنش قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium spp.* در نمونه خاک های استان های سمنان، گلستان، مازندران، گیلان، هرمزگان، تهران، تعیین قدرت بیماری زایی جدایه های حاصل از نمونه های خاکی، بررسی کارایی واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تکثیر منطقه ی ITS قارچ *Metarhizium spp.* به منظور توالی یابی و شناسایی گونه های این قارچ که از مناطق مختلف جداسازی شده اند، آنالیز و بررسی تنوع موجود در منطقه ی ITS ژنوم قارچ بیماری زای حشرات *Metarhizium spp.* خواهیم پرداخت.

در این پایان نامه به دنبال پاسخ هایی برای سوالاتی از قبیل این که امکان جداسازی قارچ *spp. Metarhizium* در نمونه خاک ها وجود دارد یا خیر؟، جدایه های قارچی به دست آمده از نظر خصوصیات مرفولوژیکی با یکدیگر تفاوت دارند؟، تاثیر شرایط آب و هوایی مناطق مختلف بر پراکنش قارچ *Metarhizium spp.* چگونه است؟، در قدرت بیماری زایی قارچ های جدا شده تفاوتی وجود دارد یا خیر؟، آیا تفاوت های مشاهده شده در جدایه های قارچی از نظر ژنتیکی با استفاده از تنوع موجود در ناحیه ی ITS قابل بررسی هستند؟

۱- RNA Polymerase II Large Subunit (RPB1)

فصل دوم

مرور منابع

یکنیک ITS در شناسایی و بررسی تنوع ژنیتی قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium* spp.

تکنیک‌های مختلفی برای مطالعه تنوع ژنتیکی موجودات زنده وجود دارد که بسته به هدف کار از یک یا تعدادی از این تکنیک‌ها استفاده می‌شود. بررسی مطالعات گوناگون نشان داد برای تشخیص و شناسایی یک قارچ در حد گونه و سلسله مراتب تاکسونومی پایین‌تر می‌توان از نشانگرهای ریبوزومی، نشانگرهای میتوکندریایی، ژن‌های کد کننده میتوکندریایی استفاده نمود. در این فصل از پراکنش جغرافیایی قارچ، شناسایی و تشخیص آن و مرور منابع نشانگرهای ریبوزومی در زمینه قارچ *Metarhizium spp.* صحبت به میان خواهد آمد و در انتها دلیل استفاده از پرایمرهای ITS را برای شناسایی قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium spp.* بیان می‌کنیم.

۲-۱. شناسایی قارچ *Metarhizium spp.* با استفاده از ناحیه ITS ریبوزومی

پس از پیشرفت تکنیک‌های ملکولی، شناسایی موجودات زنده با دقت و سرعت بیشتری همراه گردید. از این تکنیک‌های ملکولی برای طبقه‌بندی مجدد بسیاری از جنس‌های قارچی نظیر قارچ‌های بیمارگر *Paecilomyces* و *Lecanicillium* استفاده شده است. جنس *Paecilomyces* به دو بخش *Paecilomyces* دارای قارچ‌های ترموفیل و بخش *Isarioidea* دارای قارچ‌های مزوفیل شامل چندین قارچ بیمارگر حشرات یا گونه‌های نماتوفاز^۱ نظیر *P. farinoseus*، *P. fumosoroseus* تقسیم شده است [۷۰]. *Verticillium* نیز هم اکنون به دو بخش *Verticillium section Verticillium* که شامل بیمارگرهای گیاهی است و در واقع قارچ‌های آنامورف^۲ (فرم غیرجنسی) آسکومیست‌های پرتیس‌دار راسته *Phyllachorales* می‌باشد و *V. section Prostrata* که شامل آنامورف‌های راسته *Hypocreales* (Sordariomycetes) می‌باشد و بیشتر قارچ‌های بیمارگر حشرات در این گروه جای می‌گیرند که به آن‌ها *Lecanicillium* گویند، تقسیم‌بندی شده است [۱۳]. شناسایی قارچ *Metarhizium* با استفاده از نشانگر ITS صورت پذیرفته که در ادامه برخی از مطالعات فیلوژنی صورت

۱- Nematophagous

۲- Anamorph

گفته در خصوص این قارچ را بیان می‌نماییم.

در چین [۵۷] نواحی ITS-1-۵/۸S rDNA و ITS2 در *Cordyceps taii* و *M. taii* و *M. anisopliae* var. *anisopliae* تکثیر، کلون‌سازی و توالی‌یابی گردید و آنالیز اطلاعات سویه‌های *M. anisopliae* و *M. flavoviride* از GenBank نشان داد که *M. taii* مترادف^۱ *M. anisopliae* var. *anisopliae* است یعنی توالی هم‌ردیف شده *M. taii* چین و *M. anisopliae* درجه بالایی از شباهت را با ۱۷ جدایه *M. anisopliae* var. *anisopliae* درایور نشان دادند و طبق آنالیز ماکسیمم پارسیمونی^۲ (حداکثر صرفه-جویی) درختچه، فرم جنسی *M. anisopliae* var. *anisopliae* در واقع *Cordyceps taii* است. لیو [۵۹] برخی از نواحی شناسایی گونه‌های *Metarhizium* را از دیگر گونه‌ها در زیرواحدهای کوچک و بزرگ RNA ریبوزومی (۲۸S، ۱۸S) تعیین نمود. کوران [۵۵] محصولات PCR نواحی ITS2، S، ITS1، ۵.۸rDNA را در ۳۱ سویه *Metarhizium* توالی‌یابی نمود و اطلاعات به‌دست آمده از این مطالعات نشان داد جنس *Metarhizium* تک‌نیایی^۳ است (یعنی جنسی شامل تمام گونه‌های مربوط به یک نیا) و دو گونه *M. anisopliae* و *M. flavoviride* از یکدیگر جدا هستند. با مطالعه گونه‌های مختلف قارچ *M. anisopliae* var. *anisopliae*، *M. anisopliae* var. *majus*، *M. album* و *M. flavoviride* با استفاده از DNA کدکننده rRNA مشاهده شد که می‌توان بر اساس منشاء جغرافیایی گونه‌های این قارچ را در آنالیز کلاستر، تفکیک و طبقه‌بندی نمود اما همبستگی میان RFLP‌ها و منشاء حشرات میزبان وجود ندارند [۵۱]. درایور [۴۵] بر پایه توالی‌های ITS جدایه‌های تعیین شده *M. anisopliae* var. *frigidum* را در دو شاخه^۴ از *M. flavoviride* قرار داد و بدین ترتیب توالی ITS به عنوان معیار مهم تاکسونومی قارچ‌ها شناخته شد. در سال ۲۰۰۱ [۵۹] گونه جدید *C. brittlebarkisoides* معرفی شد که بر اساس آنالیز توالی ITS آنامورف آن را *M. anisopliae* var.

۱- Synonym

۲- Maximum Parsimony

۳- Monophyly

۴- Clade

majus دانستند درحالی که در درختچه فیلوژنتیک *C. brittlebarkisoides* در کلاستر قارچ *M. flavoviride* قرار گرفته است. بر اساس توالی ITS مشخص شده است که *M. flavoviride* و *M. anisopliae* به ترتیب دارای ۵ و ۴ کلاستر هستند و *M. album* به عنوان گونه‌ای جدا در نظر گرفته شد [۵۷]. روابط میان *Cordyceps* و فرم‌های غیر جنسی مفروض آنها را با استفاده از توالی‌های ITS1-5.8S-ITS2 بررسی شده و ارتباطات میان فرم جنسی و غیر جنسی قارچ‌های بیمارگر حشرات را بر پایه روش اتصال مجاور^۱ به صورت زیر بیان نموده‌اند: *B. brongniartii* فرم غیر جنسی *C. B. sobolifera*, *C. brittlebankisoides* فرم غیر جنسی *M. anisopliae* var. *majus*, *brongniartii* فرم غیر جنسی *C. sobolifera* و *Hirsutella sinensis* فرم غیر جنسی *C. sinensis* است. نتیجه گرفته شد توالی‌های ITS و ۵/۸S اطلاعات مفیدی برای تایید اتصال فرم جنسی - غیر جنسی قارچ‌ها فراهم می‌آورند و در تعیین محدوده گونه‌های درون *Cordyceps* کمک می‌نمایند [۷۱]. شناسایی روابط فیلوژنتیکی میان قارچ‌های کاتریپلار^۲ (فرم جنسی قارچ‌های بیمارگر حشرات را به دلیل تولید میسلومی که کاتریپلار (در واقع همان اندام میوه‌ای) نامیده می‌شود را قارچ‌های کاتریپلار می‌گویند) با استفاده از مقایسه توالی‌های نواحی رونویسی شده داخلی (ITS1 و ITS2 و ۵/۸S) صورت پذیرفت. در این آزمایش توالی‌های ۱۰ سویه *Cordyceps*، ۱۲ سویه *Paecilomyces*، ۳ سویه *Beauveria*، ۲ سویه *Metarhizium* و ۱ سویه *Hirsutella* به کار برده شد. در درختچه فیلوژنتیک رسم شده با استفاده از روش اتصال مجاور، جنس‌ها در ۳ کلاستر قرار گرفتند و *Metarhizium* به عنوان اوت‌گروپ^۳ در درختچه مشخص شد [۷۲].

آنالیز توالی‌های ITS nrDNA در ۷۲ تاکسون *Cordyceps*، *Claviceps*، *Epichloe* و فرم‌های غیر جنسی *Akanthomyces*، *Beauveria*، *Metarhizium*، *Hirsutella*، *Hymenostilbe*، *Paecilomyces*، *Polycephalomyces* و *Tolypocladium* صورت گرفت. بر پایه روش حداکثر صرفه-

۱- Neighbor Joining

۲- Caterpillar Fungi

۳- Outgroup

جویی^۱، ۱۰ زیر کلاستر از آنالیز جداگانه زیر مجموعه‌ها شناسایی گردید و مشخص شد *Cordyceps* spp. دارای نتاج متعدد است. اختصاصیت میزبانی، اهمیت و مفهوم فیلوژنتیکی را محدود نموده و رخداد تغییر میزبانی در طول تکامل *Cordyceps* پیشنهاد شده است [۷۳]. در برزیل به بررسی ۵ میزبان قارچ *Metarhizium* نظیر سن نیشکر و ملخ پرداخته شد و آنالیز RAPD صورت گرفته تفاوتی میان جدایه‌ها نشان نداد اما استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 مشخص نمود که گرچه جدایه‌های قارچ میزبان‌های یکسانی را آلوده می‌نمایند اما این جدایه‌ها از نظر ژنتیکی از یکدیگر متمایز هستند. ناحیه ITS1 تغییرپذیری بیشتری نسبت به ITS2 نشان می‌دهد. واگرایی توالی ITS درون گونه‌های *Metarhizium* بین ۵-۰٪ گزارش شده است درحالی که *B. brongniaritti* و *B. bassiana* هر دو دارای واگرایی بیش از ۵٪ هستند [۵۸]. در برزیل توالی‌های ITS1-5.8S-ITS2 سویه‌ها و واریته‌های *M. anisopliae*، *M. album* و *M. flavoviride* بررسی شدند. ناحیه تکثیری برای جدایه *M. anisopliae* تقریباً از طولی معادل ۵۴۰ نوکلئوتید برخوردار بود سپس با استفاده از روش اتصال مجاور به ترسیم درختچه فیلوژنی پرداخته شد [۶۱].

انستیتو کشاورزی تحقیقات بین‌المللی شیلی ۳۵۰ جدایه *M. anisopliae* var. *anisopliae* را از مرکز و جنوب این کشور جدا نموده‌اند و این جدایه‌ها از منظر صفات مورفولوژیک یعنی اندازه کنیدی، شکل و رنگ کلنی، الگوی رشد و کارایی آنها در کنترل آفات بررسی شده‌اند. برای درک تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت این جدایه‌ها از نشانگرهای ملکولی نظیر RAPD، SSR، RFLP و ITS استفاده شد و اطلاعات به دست آمده نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در این قارچ وجود دارد (برای RAPD ۴۱٪ شباهت، برای SSR میزان شباهت ۴۵/۲٪ و برای نشانگر ITS شباهت برابر ۷۰/۲٪ بود) [۶۲]. شناسایی قارچ‌های بیمارگر حشرات *Metarhizium* از لارو حشره *Diatraea saccharalis* با استفاده از نواحی ITS1 و ITS2 سویه‌های *M. anisopliae*، *M. album* و *M. flavoviride* صورت پذیرفت و

۱- Maximum Parsimony

محصول PCR این نواحی برای *M. anisopliae* از طولی معادل ۶۰۰ bp، برای *M. album* از طولی معادل ۶۵۰ bp و برای *M. flavoviride* از طولی معادل ۶۰۰ bp برخوردار بود و سپس این محصولات، توسط اندوکلازهای محدودالایز مختلفی نظیر *Hpa* II, *Hae* III, *Dde* I, *Alu* I, *Afa* I توسط RFLP صورت گرفته، تفاوت‌های واضحی را میان این گونه‌ها نشان داد [۶۱]. توالی‌های ITS را ابزاری موثر در تعیین تنوع ژنتیکی در بسیاری از گونه‌های قارچی دانسته شد و تغییرپذیری ژنتیکی^۱ را در قارچ *Metarhizium* spp. مشخص نمود [۵۳]. در مطالعه‌ای به بررسی تغییرپذیری ژنتیکی جدایه‌های مختلف قارچ *M. anisopliae* جدا شده از خاک‌های کشورهای چین، لائوس، کره جنوبی، سنگاپور و هلند با استفاده از نشانگر ریزماهواره پرداخته شد و آنالیز ۶۲ جدایه نشان داد که حداقل سطح تغییرپذیری ژنتیکی در این گونه از قارچ‌های بیمارگر وجود دارد و ژنوتیپ‌ها توسط ITS- rDNA تعیین گردید. تغییرات توالی در نواحی ITS، ITS^۲ و IGS وجود دارد که در تکثیر فسمت‌هایی از ژنوم موجودات مختلف نظیر قارچ‌های بیمارگر به کار رفته است [۷۴].

تنوع ایجاد شده در نواحی ITS ۴۰ جدایه *M. anisopliae* var. *M. anisopliae* و *M. flavoviride* var. *flavoviride acridum* و *M. flavoviride* var. *minus* سبب دسته‌بندی ۳۹ تایی آنها درون یک کلاستر گردید. تنوع توالی نوکلئوتیدی نواحی IGS در ۲۱ جدایه *M. anisopliae* var. *anisopliae* نشان‌دهنده این است که تغییر طول ناحیه IGS موجب دسته‌بندی این جدایه‌ها درون ۳ کلاستر می‌شود که به‌طور ضعیف با حشره میزبان همبستگی دارند [۷۵]. برای دستیابی به تغییرپذیری ژنتیکی ناحیه IGS rDNA در *Metarhizium* تعداد ۳۴ جدایه از این قارچ توالی‌یابی شده و با ۲۰ توالی *M. anisopliae* var. *anisopliae* موجود در پایگاه ژنی آنالیز شدند. تنوع نوکلئوتیدی بانک ژنی برای ناحیه مورد مطالعه برابر ۰/۰۹۰ و برای جدایه‌های برزیل معادل ۰/۰۱۶ بود و پیشنهاد گردید که تنوع ژنتیکی جدایه‌های برزیل، زیرمجموعه‌ای از تنوع *M.*

۱- Genetic Variability

۲- Non-Transcribed Spacer

anisopliae var. *anisopliae* جهانی می باشد [۷۶]. تعداد ۷ جدایه قارچ بیمارگر حشرات به دست آمده با روش طعمه گالریا از جنگل های فندق ترکیه با استفاده از توالی ITS و ژن *EF1-α* توالی یابی شدند و بر اساس روش اتصال مجاور به عنوان *Metarhizium* sp.، *M. anisopliae* var. *anisopliae*، *B. bassiana*، *B. cf. bassiana*، *Isaria fumosorosea* و *Evalchovaknea* sp. شناسایی شدند [۴۱]. ۲۵ جدایه *Metarhizium* جمع آوری شده از حشرات میزبان و خاک مناطق مختلف تایلند با استفاده از صفات مورفولوژیکی مانند مورفولوژی کلنی، اندازه و شکل کنیدی ها بر روی محیط کشت PDA توصیف شدند و آنالیز توالی ITS و *EF1-α* برای شناسایی ژنوتیپ ها صورت گرفت. تکثیر جدایه ها با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 قطعه ای به طول تقریبی ۵۵۰ نوکلئوتید را به وجود آورد. ترسیم درختچه با استفاده از روش اتصال مجاور نشان داد *M. anisopliae*، *M. album*، *M. anisopliae* و *M. flavoviride* به طور صریح از یکدیگر تفکیک می شوند و ۲۵ جدایه قارچی در ۴ گروه اصلی (شاخه های B، C، E و F) قرار گرفتند. اما این مطالعه نتوانست تفاوت میان *M. anisopliae* var. *anisopliae* و *M. anisopliae* var. *majus* را مشخص نماید [۷۷]. آنالیز ITS و ۵ انتهای توالی *EF1-α* در ۱۴۵ جدایه *Metarhizium* جدا شده از مناطق مختلف ژاپن صورت گرفت که آنالیز ITS با استفاده از روش اتصال مجاور، جدایه های بدست آمده را درون ۲ کلاستر *M. anisopliae*، *M. lepidiotae* و *flavoviride* var. *pimphigi* قرار داد و آنالیز *EF1-α* ۶ گونه *M. anisopliae*، *M. brunneum*، *M. guizhouense*، *M. majus*، *M. pingshaense* و *M. robertisii* را شناسایی نمود [۶۰].

اشنایدر و رنر [۲۲] از روش حداکثر صرفه جویی برای ترسیم درختچه جدایه های *Metarhizium* استفاده نمودند. بر این اساس، کلاسترهای *M. brunneum* و *M. anisopliae* توسط ناحیه ITS دارای ارزش بوت استرپ کمی بودند و مرزهای گونه ای برای *M. guizhouense*، *M. majus*، *M. pingshaense* و *M. robertisii* در این مکان ژنی برطرف نگردید. هم چنین روش حداکثر درست-

نمایی^۱ و اتصال مجاور نیز برای رسم درختچه مورد استفاده قرار گرفت که نتایج حاصل از آن در مقاله نشان داده نشده است. در بزریل [۷۸] اهمیت قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium* در کنترل ساقه-خوار نیشکر^۲ بررسی شده است و بر پایه تنوع ژنتیکی این قارچ و نبود اتصالی میان بیماری‌زایی و اختصاصیت میزبانی جدایه‌های این قارچ، جدایه‌های IPA213، IPA215، IPA219، IPA216 و IPA217 را با استفاده از ناحیه ITS تکثیر نموده و با آنزیم‌های برشی *HpaI* و *HinfI*، *HindIII* برش دادند. نتایج حاصل از توالی‌یابی ITS نشان داد جدایه‌ها گرچه از یک میزبان به دست آمده‌اند اما به-طور ژنتیکی با یکدیگر فاصله دارند و این شاید به علت منشاء ناشناخته میزبان‌ها باشد. براساس روش اتصال مجاور نتایج این آزمایش نشان داد *M. anisopliae* مونوفیلیک است. بررسی پراکنش قارچ‌های بیمارگر حشرات در ۱۰۸۰ نمونه خاک در کره [۷۹] صورت پذیرفت و جداسازی این قارچ‌ها با استفاده از محیط کشت انتخابی حاوی دودین و آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شد. در کنار شناسایی مورفولوژیکی قارچ-ها، از ناحیه ITS برای شناسایی ملکولی آنها استفاده شد و بدین صورت ۸۲ جدایه *Metarthizium* spp. و ۱۲۵ جدایه *Beauveria* spp. شناسایی شدند و رسم درختچه با روش اتصال مجاور صورت گرفت [۸۰]. بر اساس توالی‌های رونویسی شده داخلی و توالی‌های تکراری ساده، روابط فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی *Metarhizium* spp. بیمارگر سن *Schiodtella formosana* بررسی گردید. نتایج نشان داد عوامل مسبب بیماری موسکاردین سبز در جمعیت این سن *M. anisopliae* و گونه‌خواهری آن *M. robertsii* می‌باشند. با استفاده از روش اتصال مجاور دو کلاستر اصلی در دندروگرام ترسیم شده مشاهده شد [۷۹].

۲-۲. پراکنش جغرافیایی

بنا به نظر فوکسا (۱۹۹۵) اکولوژی^۳ مطالعه‌ی علمی پراکنش و فراوانی موجودات است که این پراکنش و فراوانی در محیط‌زیست از عوامل مختلف زنده و غیرزنده اثر می‌پذیرد [۲۴]. قارچ‌های بیمارگر

۱- Maximom Likelihood

۲- *Mahanarva posticata*

۳- Ecology

حشرات در طیف وسیعی از زیست بومها نظیر جنگلها، اکوسیستمهای کشاورزی، مراتع، دشتها و مناطق شهری پراکنده شدهاند و توانایی آنها در تنظیم جمعیت حشرات آفت در زیست بومهای مختلف نظیر نواحی گرمسیری و معتدل مطالعه شده است. خاک پناهگاه مناسبی برای قارچهای بیمارگر حشرات میباشد زیرا از تابش اشعه ماوراءبنفش و تاثیرات مضر زنده و غیر زنده محفوظ میمانند. پراکنش قارچهای بیمارگر حشرات از قطب شمال تا نواحی گرمسیری و زیست بومهای جنگلی، ساوانا، باتلاقها، نواحی ساحلی و بیابان میباشد. مطالعات کووئسادا-مورگا نشان دهنده این بود که ارتفاع در مناطق مختلف تاثیری بر روی حضور قارچهای بیمارگر حشرات ندارد [۸۱] اما سان و لئو اهمیت این عامل را روی تنوع جنسهای قارچهای بیمارگر حشرات اثبات نمودند [۸۲]. سانچز-پنا [۸۱] در مطالعات خود گزارش نمود که *B. bassiana* در جنگلها و *M. anisopliae* در خاکهای قابل زرع فراوانی بیشتری دارند و این به واسطه قابلیت دوام طولانی تر کنیدیهای آن در عدم حضور میزبان حشره ای است. بر پایه مطالعات میلینگ و الین برگ قارچ *B. bassiana* در بالای سطح خاک یافت می شود و *M. anisopliae* در سطح یا خاک زیرین ساکن می باشد. اثرات فاکتورهایی مانند موقعیت جغرافیایی، سیستم کشت، ویژگیهای خاک، اثرات فاکتورهای غیر زنده بر حضور و پراکنش قارچهای بیمارگر حشرات مطالعه شده است [۸۱]. عوامل خاک یعنی دما، اسیدیته (pH)، محتوای ارگانیک، رطوبت نسبی^۱، ترکیبات آلی و معدنی خاک می تواند بر حضور و فعالیت این قارچها اثرگذار باشد [۸۳].

۳-۲. کاربرد قارچ بیمارگر *Metarhizium spp.* علیه حشرات مختلف و بندپایان

باید گفته شود سویه های مختلف قارچ *M. anisopliae* در کنه *Ixodes scapularis* بیماری زا می- باشند و نقشی را در مدیریت جمعیت کنه ها ایفاء می نمایند [۸۴]. بررسی بیماری زایی قارچ *M.*

۱- Relative Humidity (RH)

anisopliae روی کنه پارازیت *Varroa destructor* در کندوهای عسل نشان داد که این قارچ می‌تواند در مدت ۳-۴ روز سبب حداکثر مرگ و میر کنه‌ها گردد [۸۵]. در ایالت آلیکانته اسپانیا به منظور تعیین بیمارگرهای حشرات در ۶۱ نمونه خاک مزارع کشاورزی از لاروهای *Galleria mellonella* به عنوان طعمه استفاده گردید و مشخص شد قارچ *B. bassiana* با ۳۲/۸ درصد، *Metarhizium anisopliae* با ۶/۴ درصد و *L. lecanii* با ۴/۸ درصد فراوان‌ترین قارچ‌های بیمارگر در خاک بودند [۸۳]. کاربرد قارچ *M. anisopliae* علیه حشرات کامل و لاروهای سوسک برگ نارگیل *Brontispa longissima* در آزمایشگاه نشان داد که حساسیت لاروها به این قارچ بیشتر است و کاربرد *M. anisopliae* و *B. bassiana* در مزارع آلوده به این آفت نشان‌دهنده کارایی بیشتر *M. anisopliae* در کنترل آفت است [۸۶]. ۲۳ جدایه *B. bassiana* و ۱۳ جدایه *M. anisopliae* بر روی پوره‌های سن سوم *Triatoma infestans* ناقل بیماری Chagas بررسی شدند. در رطوبت نسبی ۵۰٪ میزان بیماری‌زایی در میان جدایه‌ها در طیفی معادل ۹۷/۵٪ - ۱۷/۵٪ مشاهده شد و LC_{50} برای جدایه CG14 قارچ *B. bassiana* معادل $10^5 \times 7/1$ و برای جدایه CG491 قارچ *M. anisopliae* معادل $10^6 \times 4/3$ کنیدی/میلی‌لیتر به دست آمد [۸۷]. تای لاک [۸۸] ۱۲ جدایه قارچ‌های بیمارگر حشرات *M. anisopliae* و *B. bassiana* جمع‌آوری شده از حشرات آلوده مختلف را بر روی سن برنج *Leptocorisa acuta* بکار برد و درصد مرگ و میر حشرات را به ترتیب ۵۷/۵ و ۷۴/۷ درصد اعلام نمود. بیماری‌زایی ۱۱ سویه بومی قارچ‌های بیمارگر حشرات جمع‌آوری شده از قسمت‌های مختلف ایران (گونه‌های *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *L. psalliotae*) بر روی *Rhipicephalus annulatus* با غلظت‌های گوناگون سوسپانسیون اسپور بررسی گردید و پارامترهای مختلفی نظیر نرخ مرگ و میر، 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 مرگ و میر کلی برای *M. anisopliae* معادل ۹۰-۱۰۰٪، برای *B. bassiana* برابر ۷۰٪ و برای *L. psalliotae* معادل ۵۶/۶٪ گزارش گردید [۸۹]. در آزمایشی ۵۰-۳۰ حشره بالغ آنوفل (ناقل مالاریا) در معرض سوسپانسیون $10^6 \times 1$ کنیدی/میلی‌لیتر *M.*

anisopliae قرار گرفتند و مرگ و میر ۹۶ درصدی این حشرات گزارش گردید [۹۰].

کریمی (۲۰۰۹) گزارش نموده است که وقوع بیماری قارچ *M. anisopliae* بر روی کرم سفید ریشه بسته به منشاء و گونه‌ها میزبان، چیزی در حدود ۲٪-۰ می‌باشد [۹۱]. تای لاک [۹۲] با جمع‌آوری و جداسازی قارچ‌های بیمارگر 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 آفت-کش‌های تولیدی از جدایه‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* اثرات زیان‌باری بر دشمنان طبیعی موجود در گلخانه‌ها نخواهند داشت. در آزمایشی بیماری‌زایی قارچ‌های *B. bassiana*، *I. fumosorosea*، *M. anisopliae* بر روی آفت *Leptoglossus occidentalis* (گونه بومی آمریکای شمالی) در شرایط آزمایشگاه و شرایط طبیعی بررسی گردید و نتیجه گرفته شد که بیماری‌زایی گونه‌ها، به روش‌های در معرض قرارگیری، موقعیت زیست‌سنجی بستگی دارد و همچنین مشخص شد LC_{50} در شرایط آزمایشگاه برای *I. fumosorosea* بالاترین و برای *M. anisopliae* کمترین بود. در آزمایشات محیطی میزان مرگ و میر برای تمام ایزوله‌های قارچی کمتر از شرایط آزمایشگاهی بود [۹۳]. در لبنان به جداسازی قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* از خاک اقدام شده است و بیماری‌زایی جدایه‌های به دست آمده بر روی *Bemisia tabaci* و *Myzus persicae* بررسی گردید [۹۴]. عوامل احتمالی مختلفی برای کاهش بیماری‌زایی در نظر گرفته شده‌اند. کنیدی‌های *M. anisopliae* قدرت بیماری‌زایی خود را در برابر لاروهای سن ۴ و ۵ گالریا و *Tenebrio molitor* پس از انتقال کنیدی به محیطی با نسبت بالای کربن: نیتروژن از دست خواهند داد [۹۵]. از سوسپانسیون $10^6 \times 1$ اسپور/ میلی‌لیتر قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *M. brunneum* برای لاروهای *Synanthedon myopaeformis* (Lepidoptera: Sesiidae) استفاده گردید و LC_{50} به دست آمده برای قارچ‌ها برابر $10^5 \times 2/9$ و $10^5 \times 3/4$ اسپور/میلی‌لیتر و LT_{50} برای *B. bassiana* برابر ۵/۵ روز و برای دیگری معادل ۵/۱ روز است [۹۶]. استفاده از ۴ جدایه *B. Bassiana* و ۴ جدایه *M. anisopliae* برای

کنترل لاروهای نئونات *Capnodis tenebrionis* نشان داد که پس از ۱۰ روز از تلقیح لاروها با سوسپانسیون 1×10^8 کنیدی/ میلی لیتر میزان مرگ و میر در طیفی معادل ۱۰۰٪ - ۲۳/۵ بود اما بایستی خاطر نشان کرد که ۳ تا از جدایه های *M. anisopliae* مرگ و میری معادل ۱۰۰٪ ایجاد نمودند. کاربرد این ۸ جدایه در برابر تخم های این حشره نشان داد که دو جدایه *B. bassiana* سبب کاهش ۸۴/۵٪ و ۹۴/۵ درصدی تفریح تخم ها می شوند [۹۷]. در موسسه کشاورزی و علوم جانوری نپال به جداسازی قارچ های بیمارگر حشرات *M. anisopliae* و *B. bassiana* از حشرات بیمار و خاک با استفاده از محیط کشت انتخابی و روش طعمه گالریا^۱ پرداخته شد و از سویه های به دست آمده در کنترل کرم سفید ریشه^۲ *Polyphylla spp.* استفاده گردید [۹۸].

۲-۴. تشخیص و شناسایی مورفولوژیکی قارچ *Metarhizium spp.*

تشخیص یعنی تعیین حضور قارچ در محیط طبیعی (مانند خاک) و یا میزبان آن، که روش های مختلفی برای تشخیص قارچ ها ارائه شده است. معمولاً از ویژگی های ظاهری و خصوصیات مورفولوژیکی برای تشخیص جنس یک قارچ استفاده می شود. تشخیص به طور عمده برای مطالعات در سطح اکولوژیکی استفاده می شود [۳۴]. به عنوان مثال یکی از راه های تشخیص *Metarhizium* استفاده از روش طعمه حشره ای است چرا که اسپورهای قارچ پس از نفوذ و جوانه زنی بر روی لاشه حشره به رنگ سبز مشاهده می شوند. در قارچ شناسی، شناسایی بارزترین ویژگی آن قارچ است که ساده ترین پاسخ را به سوال "نام نمونه پیش روی من چیست؟" می دهد به عبارت دیگر شناسایی یعنی تخصیص نام علمی مناسب و صحیح به موجود زنده است. شناسایی قارچ ها معمولاً نیازمند رتبه بندی در سطح گونه یا در سطوح پایین تر (زیرگونه، واریته) می باشد. شناسایی در حد جنس معمولاً برای مطالعات اکولوژیکی استفاده می شود. شناسایی جنس قارچ اغلب به آسانی توسط مورفولوژی

۱- Galleria Bait Method (GBM)

۲- White Grub (*Polyphylla spp.*)

بدون نیاز به روش‌های ملکولی هزینه بردار صورت می‌پذیرد. شناسایی یک موجود یا یک گونه جزء مهمی در علم رده‌بندی موجودات می‌باشد. تا پیش از گسترش نشانگرهای ملکولی، دانشمندان برای شناسایی گونه‌های یک موجود از ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی استفاده می‌نمودند که در خصوص قارچ بیمارگر خاک‌زاد *Metarhizium spp.* بر پایه آزمایشات انجام شده توسط تالوخ [۵۷] مشخص گردید که گونه *M. anisopliae* دارای دو واریته متفاوت *M. anisopliae* var. *anisopliae* با کنیدی‌های کوچک و *M. anisopliae* var. *majus* با کنیدی‌های بزرگ می‌باشد. هم‌چنین مشخص شده است که *M. flavoviride* دارای دو واریته مشخص بر اساس اندازه کنیدی *M. flavoviride* var. *flavoviride* و *M. flavoviride* var. *minus* است. سه گونه جدید *M. pingshaense*، *M.* *guizhouens* و *M. cylindrospora* را بر پایه مورفولوژی در سال ۱۹۶۶ توصیف شده است [۵۷]. رامباچ سه گونه *M. anisopliae*، *M. flavoviride*، *M. album* را بر همین اساس شناسایی نمود. در سال ۱۹۹۵ واریته *M. anisopliae* var. *frigidum* بر پایه توانایی کنیدی در جوانه‌زنی و الگوهای استفاده کربن معرفی شد [۹۹]. بسیاری از قارچ‌ها از منظر مورفولوژیکی به یکدیگر شبیه هستند و شناسایی بر این اساس چندان منطقی نیست و ممکن است شناسایی دقیق آنها صورت نگیرد. به عنوان مثال در گذشته *M. robertsii* بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی به عنوان *M. anisopliae* var. *anisopliae* - به علت برخورداری از ویژگی‌های مورفولوژیکی مشابه با این زیر گونه - شناخته می‌شد اما اکنون با استفاده از تکنیک‌های ملکولی به عنوان گونه جدایی توصیف می‌شود [۷۹].

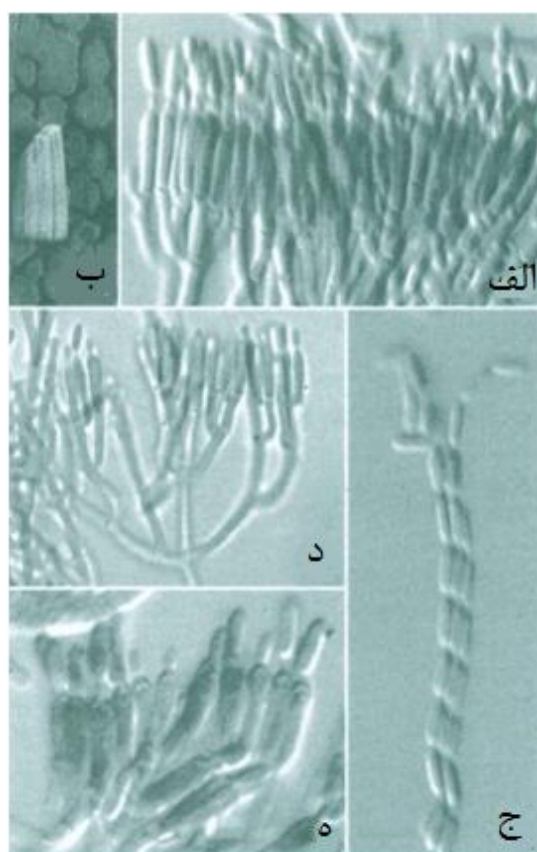
کلید شناسایی هامبر در شناسایی مورفولوژیکی جنس *Metarhizium* چنین بیان نموده که میسلیوم-ها غالباً تمام سطح بدن میزبان را پوشش می‌دهند. کنیدیوفورها متراکم و کنیدیوفورهای منفرد تقریباً منشعب (شبیه چهلچراغ) هستند. سلول‌های کنیدی‌زا دارای نوک کروی و کنیدی‌ها غیرمجزا، استوانه‌ای یا تخم‌مرغی با رنگ‌های سبز روشن تا سبز-زرد، سبز زیتونی، سوبیایی (قرمز-قهوه‌ای) هستند که زنجیره‌های انبوهی را درون ستون‌های استوانه‌ای یا شیری تشکیل می‌دهند. قارچ

Metarhizium anisopliae به آسانی شناسایی می‌شود زیرا زنجیره‌های کنیدی سیلندری شکلی را تشکیل می‌دهد که در تماس با حشره آلوده تولید می‌شوند و موجب بیماری موسکاردین سبز می‌شوند [۳]. کلنی‌های قارچی در آغاز سفید یا کرم رنگ بوده و و سپس سبز/ زرد شده و در طول اسپورزایی، کلنی‌ها به رنگ سبز تیره درخواهند آمد. کنیدیوفورها ساده یا دو شاخه می‌باشند. کنیدی ۷/۲ - ۴/۸ میکرون طول و ۳/۵ - ۱/۶ میکرون عرض دارد (شکل ۱-۲). در شناسایی گونه‌های یک جنس دو راه وجود دارد که یکی ارزیابی مورفولوژیکی کنیدی‌ها در زیر میکروسکوپ الکترونی است (این تفاوت در گونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری امکان‌پذیر نیست) که منظر [۶۴] نبود توانایی در شناسایی نمونه‌های قارچی در حد گونه یا در بسیاری موارد حتی در حد جنس شرح داده است و دیگری توالی-یابی ناحیه ITS ریبوزومی می‌باشد.

۲-۵. تبارزایی^۱ قارچ و ضرورت مطالعه تنوع ژنتیکی

مفهوم تکامل زیستی در واقع تبارزایی (فیلوژنی) است یعنی ارتباطات میان تمام گروه‌های موجودات توسط روابط نسل‌ها/ نیاها یا به عبارت دیگر در زیست‌شناسی، فیلوژنتیک یعنی مطالعه روابط تکاملی در میان گروه‌های موجودات (یعنی گونه‌ها، جمعیت‌ها) که از طریق اطلاعات توالی‌یابی ملکولی و ماتریس‌های اطلاعات مورفولوژیکی کشف می‌شود. [۱۰۰]. جدایه‌های گونه *M. anisopliae* جدا شده از یک نمونه خاک علی‌رغم شباهت ظاهری از منظر شکل، رنگ کلونی و ویژگی‌های مورفولوژیکی ممکن است از نظر ملکولی و فیلوژنی متفاوت باشند لذا برای شناسایی صحیح گونه‌های یک قارچ از روش‌های ملکولی و فیلوژنی استفاده می‌نماییم. در فیلوژنی قارچ *Metarhizium* به بررسی تک‌نیایی یا چند نیایی بودن آن، تعیین گروه‌های خواهری، سیر تکاملی جدایه‌های به دست آمده، بررسی تفاوت‌های فیلوژنی جدایه‌های به دست آمده با جدایه‌های کشورهای دیگر خواهیم پرداخت.

۱- Phylogeny



شکل ۱-۲: مشاهده میکروسکوپی ساختارهای *M. anisopliae* (الف) سلول‌های کنیدی‌زا (فیالیدها) که لایه انبوهی (هایمنیوم) را شکل می‌دهند. (ب) ستون کنیدی‌ها (ج) زنجیره کنیدی‌های به هم چسبیده جانبی (د) کنیدیوفورهای منشعب (ه) انتهای ضخیم و پهن سلول‌های کنیدی‌زا [۳]

مطالعه فیلوژنی *Metarhizium* توسط درایور [۲۲] با استفاده از ناحیه ITS تعداد ۱۰ کلاستر را برای این جنس مشخص نمود که شامل *M. album*، *M. flavoviride* Type E، *M. flavoviride* var. *M. novazealandicum*، *M. flavoviride* var. *minus*، *M. flavoviride* var. *pemphigi*، *M. anisopliae* var. *anisopliae*، *M. anisopliae* var. *lepidiotum*، *M. flavoviride* var. *flavoviride* و *M. anisopliae* var. *majus* می‌باشد. در سال‌های بعد تلاش‌ها برای ارائه طبقه‌بندی دقیق این قارچ بر مبنای تکنیک‌های ملکولی افزایش یافت و بیش‌تر این جنس را دارای چندین گونه دانست. اشنایدر (۲۰۱۱) [۲۲] با بررسی کلاستر ۱ جنس *Metarhizium* شکل گرفته از گونه‌های *M. brunneum* و *M. robertsii*، *M. anisopliae*، *M. pingshaense*، *M. guizhouense*، *majus* مشخص نمود *M. anisopliae* کمپلکسی از گونه‌های پنهان است. افرادی مانند کوران [۷۷]، درایور [۲۲]، سانگ [۱۵]، اسپاتافورا [۱۲۲] با بررسی فیلوژنتیک قارچ *Metarhizium* آن را جنسی تک‌نیایی دانستند اما مطالعات لوان (۲۰۱۳) [۷۹] نشان داد *M. anisopliae* و گونه خواهری آن یعنی *M. robertsii* مونوفیلتیک نیستند. البته باید خاطر نشان نمود بررسی فیلوژنی تنها از طریق یک ژن نمی‌تواند به تنهایی تاریخچه تکاملی ژنوم یک موجود را به وضوح بیان نماید لذا در کنار ناحیه ITS که بارکدی قوی برای شناسایی گونه‌های قارچی است از ژن‌های دیگری مانند *EF-1α*، *RPB1*، β -توبولین، *RPB2* و *TEF*^۱ استفاده نمود تا شناسایی دقیق‌تری صورت پذیرد [۷۸]. در سال‌های اخیر استفاده از آنالیز چند ژنی برای مطالعات فیلوژنتیک مرسوم‌تر شده و مطالعاتی بر پایه ژن‌های کد کننده پروتئین در قارچ‌ها نشان داد که آنالیز چند مکانی تفکیک بهتری را فراهم می‌نماید و بنابراین فرضیه‌های فیلوژنتیک معتبری در فیلوژنی قارچ‌ها فراهم می‌گردد [۱۰۱].

در انتها می‌توان چنین جمع‌بندی نمود که شناسایی و تشخیص قارچ‌ها توسط تکنیک‌های ملکولی در صورتی موفقیت‌آمیز است که این تکنیک‌ها بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، به رده‌بندی قارچ‌ها بپردازند. در مورد قارچ‌های بیمارگر حشرات باید گفته شود که تنها قارچ‌هایی که دارای پراکنش

۱- RNA PolymeraseII Second Largest Subunit

جهانی^۱ هستند نظیر *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium*, *Beauveria* توسط تکنیک-های ملکولی مورد شناسایی و تشخیص قرار گرفته‌اند [۳۴]. از میان تمام تکنیک‌های ملکولی، قارچ-شناسان نشانگرهای ریبوزومی به خصوص ناحیه ITS را ابزاری مناسب در شناسایی قارچ‌ها در حد گونه و زیر گونه می‌دانند و این انتخاب به علت برخورداری از تغییر پذیری کافی، وجود نسخه‌های متعدد این سیستم ریبوزومی در سلول‌های قارچی [۶۷]، وجود بانک اطلاعاتی گسترده برای مقایسه این توالی‌ها در میان جدایه‌های قارچی [۱۰۲]، موفقیت ۷۲ درصدی در شناسایی گونه‌های قارچی [۶۷] و در دسترس بودن پرایمرهای این ناحیه و تکثیر آسان این ناحیه [۱۰۲] می‌باشد.

گرچه ناحیه ITS rDNA بهترین بارکد انتخاب شده برای شناسایی قارچ‌ها است اما دارای مشکلاتی در هنگام استفاده است یعنی در برخی از گروه‌های قارچی نظیر مخمرها و قارچ‌های آربسکولار مایکوریز^۲ (AM) بسیار تغییر پذیر است [۱۰۲] و این ناحیه به علت برخورداری از طول اندک به عنوان بارکدی ایده‌آل برای برخی زیر گروه‌های قارچی به خصوص جنس‌های Ascomycota محسوب نمی‌شود لذا برای این قارچ‌ها به بارکدی ثانویه با تغییرپذیری کافی در کنار ITS برای شناسایی گونه-ها نیاز است [۶۷] که از ژن‌هایی مانند *RPB1* و *RPB2*^۳ و *EF 1-α* استفاده می‌شود.

۱- Cosmopolitan

۲- Arbuscular Mycorrhiza (AM)

۳- RNA PolymeraseII Second Largest Subunit (RPB2)

فصل سوم

مواد و روش ها

این فصل شامل مواد مورد استفاده، نحوه نمونه‌گیری از خاک، دستورالعمل پرورش پروانه موم‌خوار به عنوان طعمه در جداسازی قارچ‌های بیمارگر، جداسازی قارچ بیمارگر *Metarhizium spp.* با استفاده از محیط کشت انتخابی، مشاهده میکروسکوپی کنیدی‌ها جهت شناسایی مورفولوژیکی قارچ، خالص‌سازی جدایه‌ها جهت آماده‌سازی برای اقدامات ملکولی، کشت مایع جدایه‌ها و استخراج DNA به روش CTAB، تکثیر DNA با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4، الکتروفورز افقی و خالص‌سازی قطعات تکثیر یافته و ارسال آنها جهت توالی‌یابی و بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی نرخ رشد، شمارش اسپور و بیماری‌زایی جدایه‌ها، می‌باشد که در ادامه به توضیح مراحل ذکر شده در بالا خواهیم پرداخت.

۳-۱. مواد

SDA، PDA، Agar، Yeast Extract از شرکت Lifechem (میلانو، ایتالیا) خریداری شد. سیکلوهگزامید، کلرامفنیکل، (BSA) Bovine Serum Albumin از شرکت Sigma (سنت لوئیس، آمریکا) خریداری شد. dNTP، $MgCl_2$ ، 10× PCR Buffer، Smart Taq DNA Polymerase، DNase Free Deionized water، Bioscience از شرکت Gene Ruler 100bp، Loading Buffer، Agarose، Phenol، Ribonuclease A، (کمبریج، انگلستان) خریداری شد. Tween 80، β -Mercaptoethanol، CTAB، PVP، Tris-HCl، EDTA، Glycerol، NaCl، Chloroform، IsoAmyl Alcohol، Isopropanol، Boric Acid از شرکت Merck (فرانکفورت، آلمان) خریداری شد. DNA Gel Extraction Kit و DNA Gel Purification Kit از شرکت Neuberger Improved (سنت کاترین، کانادا) خریداری شد. لام هموسیتومتر از شرکت Bioneer (داجون، کره جنوبی) تهیه شد.

۳-۲. تجهیزات آزمایشگاهی

اتوکلاو Rozhin Teb (تهران، ایران)، آون و انکوباتور Heraeus (هانوآ، آلمان)، ورتکس DENA Medical Industry (تهران، ایران)، هود میکروبی Farpajouh (تهران، ایران)، ترموسایکلر TaKaRa (آتسو، ژاپن)، سانتریفیوژ Sigma (سنت لوئیس، آمریکا)، حمام آب گرم DENA Medical Industry (تهران، ایران)، میکروویو LG (سئول، کره جنوبی)، ژل داگ QUANTUM ST4 (سوبیا، آلمان)، ترانس ایلومینیتور Zhihat (تهران، ایران)، میکروسکوپ نوری و بنی کولار Olympus (توکیو، ژاپن)، سمپلر $100\mu\text{l}$ و $10\mu\text{l}$ Eppendorf (هامبورگ، آلمان)، هات پلیت Heidolph (نورنبرگ، آلمان)، pH متر Metrohm (پلیکان کریک، آمریکا)، یخچال، فریزر -20°C پارس (تهران، ایران)، پتری دیش شیشه‌ای و پلاستیکی نوین تجهیز (تهران، ایران)، هود شیمیایی Farpajouh (تهران، ایران)، اتاقل رشد Grouc (تهران، ایران)، ترازو SARTORIUS (گوتینگن، آلمان) در این پایان‌نامه مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۳. نمونه‌گیری خاک

برای جداسازی قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌توان از سه روش طعمه حشره‌ای، روش عصاره‌گیری از خاک و استفاده از ریشه گیاهان گرامینه 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 بیمارگر و ساپروفیت بر روی محیط کشت تشکیل کلنی می‌دهند که کار شناسایی مورفولوژیکی و جداسازی را سخت می‌نمایند. قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌توانند درون ریشه گیاهان گرامینه به‌صورت اندوفیت زندگی کنند [۱۰۳] اما جداسازی آن‌ها مشکلات زیادی را در پی دارد لذا از روش طعمه حشره‌ای استفاده گردید [۸]. برای نمونه‌گیری از خاک، شهرستان شاهرود به ۷ منطقه تقسیم بندی گردید و از هر منطقه به جمع‌آوری ۳۲ نمونه خاک اقدام شد که این مناطق شامل منطقه یک (شهنا)، منطقه دو (کلاته اسد- میامی- ابراهیم آباد)، منطقه سه (مراد آباد- ده ملّا- کلاته ملّا،- مومن آباد- حدّاده)، منطقه چهار (مغان- شهرک ابودر)، منطقه پنج (جاده شاهرود/آزادشهر- جنگل ابر- روستای ابر- جنگل قطری- چهار

طاق پرو - قلعه نو خرقان)، منطقه شش (بسطام - امیریه - فرحزاد - مجن - تاش) و منطقه هفت (رویان، دیزج - شهرک دانشگاه) بودند. نمونه‌گیری بدین صورت انجام گرفت که از هر باغ یا مزرعه دو نمونه (یکی از حاشیه باغ یا مزرعه و دیگری از مرکز) جمع‌آوری می‌شد 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 ۵۰۰ گرم در پلاستیک ریخته شده و درب پلاستیک بسته می‌شد. مختصات باغ و نمونه بر روی کیسه پلاستیکی ثبت می‌گردید. از سوی دیگر برای نمونه‌گیری از مرکز یک باغ یا مزرعه، دو نمونه خاک به روش بالا گرفته می‌شد و بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه دانشکده این دو نمونه مرکز باغ یا مزرعه با یکدیگر مخلوط شده و در جداسازی به کار برده شدند. در ادامه به منظور افزایش تنوع قارچی، دامنه نمونه‌گیری توسعه پیدا کرد و از مناطق مختلف جنگل گلستان (نهارخوران)، شهرهای بابل، بابلسر، آمل و رامسر در استان مازندران، منطقه سرولات (چابکسر) استان گیلان، پارک جنگلی چیتگر در تهران، روستای حسن‌آباد استان هرمزگان و فردیس کرج نیز به جمع‌آوری نمونه خاک پرداختیم (ضمیمه ۱).

۳-۴. پرورش پروانه موم‌خوار

پروانه موم‌خوار *Galleria mellonella* جزء معدود حشراتی است که در کندوهای زنبورعسل ایجاد خسارت می‌کند. لاروها به طول ۲۵ میلی‌متر هستند و ۴ 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 مبدل می‌سازند. سیکل زندگی این آفت شامل تخم، ۴ سن لاروی، شفیره و حشره کامل می‌باشد. حشرات کامل به طول ۳۰-۴۱ میلی‌متر بوده و در اردیبهشت تا مهر در مناطق معتدل به پرواز درمی‌آیند. مزایای استفاده از لارو پروانه موم‌خوار بزرگ به عنوان مدل میزبان شامل بقای لارو در طیف دمایی ۲۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تحویل آسان بیمارگر می‌باشد. در شکل ۳-۲



شکل ۱-۳: الف: نمونه خاک جمع آوری شده و بسته بندی شده ب: حفر گودال به عمق ۳۰ سانتی متر در مجاورت ریشه درخت



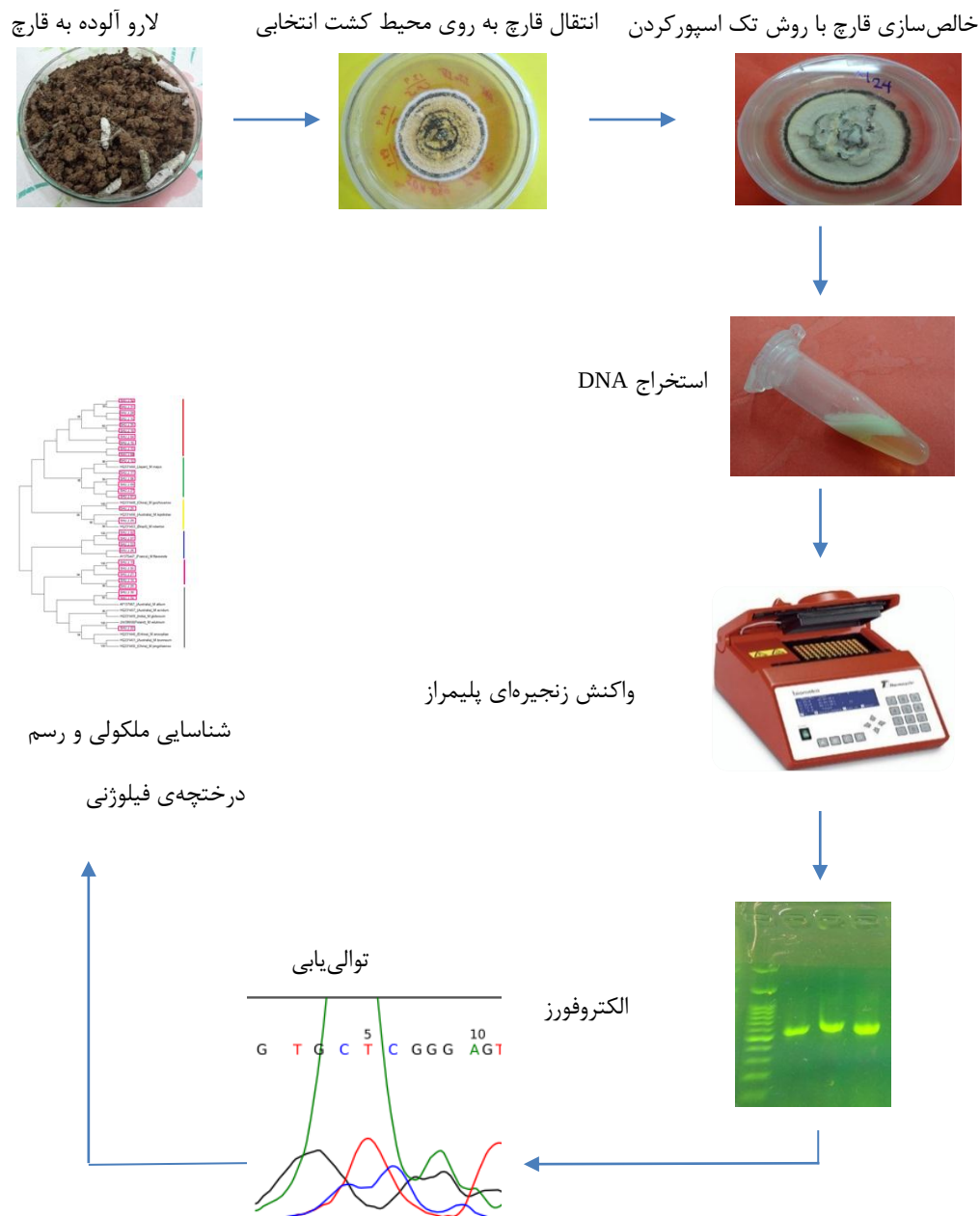
شکل ۲-۳: تصویری از لارو (الف)، شفیره (ب) و حشره کامل (ج)

مراحل زندگی این حشره را ملاحظه می‌نمایید. در این جا برای پرورش حشرات از غذای مصنوعی استفاده شد. دستورالعمل تهیه این غذا به شرح ذیل می‌باشد: ۱ پیمانه موم، ۱/۲ پیمانه آب مقطر استریل را با یکدیگر مخلوط کرده و روی حرارت می‌گذاریم تا به نقطه جوش رسد و سپس این مخلوط را هم زده تا آب آن کاملاً تبخیر شود سپس ۱ پیمانه گلیسرول ۸۷٪، ۱/۲ پیمانه عسل را اضافه کرده خوب مخلوط می‌کنیم. ۲ پیمانه آرد سفید، ۱ پیمانه سبوس و ۱ پیمانه خمیر مایه 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 به دست آمده کاملاً ورز داده شد. در ظروف پرورش گالریا (ظروف پلاستیکی با ابعاد ۳۰ × ۱۵ × ۲۰ 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 دمای 1 ± 30 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی $85 \pm 3\%$ نگهداری می‌نماییم.

۳-۵. جداسازی *Metarhizium spp.* از خاک

جداسازی قارچ‌های بیمارگر حشرات توسط روش طعمه حشره‌ای (گالریا بیت متد^۱) امکان‌پذیر است که در ذیل روش را به‌طور اختصار توضیح می‌دهیم. زیمرمن (۱۹۸۶) روشی به‌نام گالریا بیت را برای جداسازی انتخابی جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر حشرات را معرفی نمود [۲۴]. در روش طعمه حشره‌ای، میزان ۲۰ گرم از هر نمونه خاکی را با الک ۱ میلی‌متری غربال و در پتری‌دیش‌های ۹۰ میلی‌متری ریخته شد [۸]. پتری-دیش‌ها 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 پارافیلیم درزگیری و این ظروف در دمای 1 ± 27 درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۷ روز در تاریکی انکوبه گردید. با مشاهده لاروهای آلوده، آنها را به پتری‌دیش‌های استریل دارای کاغذ صافی مرطوب انتقال و به مدت ۳-۴ روز به منظور توسعه و اسپورزایی

۱- Galleria Bait Method (GBM)



شکل ۳-۳: نمایی از مراحل عمومی در شناسایی گونه های قارچ بیماری زای *Metarhizium* با استفاده از تکنیک های مبتنی بر PCR. در این شکل با استفاده از روش طعمه حشره ای قارچ بیمارگر حشرات از خاک جداسازی شد و با استفاده از روش تک اسپور کردن جدایه مورد نظر خالص گردید. در ادامه پس از جداسازی DNA ژنومی با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 منطقه ی ITS در ژنوم تکثیر شد. در نهایت داده های حاصل از توالی یابی با استفاده از علم بیوانفورماتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

قارچ در انکوباتور در دمای 1 ± 27 درجه سانتی گراد انکوبه شد. به دلیل این که اسپوره های قارچ برای جوانه زنی به رطوبت نیاز دارند لذا برای تامین رطوبت پس از انتقال خاک به پتری دیش، میزان ۵-۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل در سرتاسر پتری دیش پخش شد [۱۰۴]. در جدول ۱ ضمیمه تعداد لاروهای آلوده شده به قارچ *Metarhizium spp.* و تعداد جدایه های به دست آمده از این لاروها آورده شده است.

۳-۶. جداسازی جدایه های قارچی

محیط کشت انتخابی مناسب و کارا برای جداسازی یک گونه قارچی باید دارای منبع غذایی^۱ و مواد ضد میکروبی^۲ (یعنی قارچ کش و آنتی بیوتیک) در غلظت مناسب باشد تا بتواند موجب رشد قارچ هدف در برابر رشد قارچ های دیگر شود [۸۰، ۱۰۵] لذا برای جداسازی قارچ ۳ نوع محیط کشت SDAY^۳ انتخابی دارای مواد مختلف ضد میکروبی تعریف شد که محیط اول دارای کلرامفنیکل^۴، سیکلوهگزامید^۵ و اسید لاکتیک^۶ بود، محیط دوم اسید لاکتیک و کلرامفنیکل، محیط سوم دارای کریستال ویولت^۷، دودین^۸ [۱۰۶] و سیکلوهگزامید بود. به علت سرعت رشد کمتر قارچ های بیمارگر حشرات در مقابل قارچ های ساپروفیتی نظیر تریکودرما و آسپرژیلوس، محیط کشت دیگری بر مبنای بررسی های صورت گرفته توسط یانگ شین و همکاران [۸۰] با کمی تغییرات تعریف شد. محیط کشت چهارم شامل PDA^۹ 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^{۱۰} (۰/۳ گرم بر لیتر) و کریستال ویولت (۰/۰۲ گرم بر لیتر) بود که میسلیم های قارچی و در برخی موارد به دلیل عدم

۱- Nutrient Source

۲- Antimicrobial

۳- Sabroud- Dextrose- Agar + Yeast Extract

۴- Chloramphenicol

۵- Cyclohexamide

۶- Lactic Acid

۷- Crystal Violet

۸- Dodine

۹- Potato- Dextrose- Agar

۱۰- CuCl₂

تولید میسلیم بر روی لارو، اسپورها با کمک خلال دندان استریل به محیط کشت های تعریف شده انتقال یافتند (این مواد به عنوان ترکیبات ضدباکتریایی^۱ و ضدقارچی^۲ به کار برده شده اند). استفاده از محیط کشت اختصاصی اخیر سبب کاهش آلودگی پتری دیش های کشت شده گردید. باید گفت موادی نظیر سیکلوهمزامید، کریستال ویولت و دودین قابلیت اتوکلاو شدن را دارند و لذا قبل از اتوکلاو به محیط کشت افزوده می شوند. قابل ذکر است که سیکلوهمزامید و دودین به عنوان قارچ کش و کریستال ویولت، کلرامفنیکل و اسید لاکتیک به عنوان باکتری کش به محیط کشت افزوده می شوند. کاربرد غلظت های مختلف دودین در محیط کشت به علت توانایی تحمل^۳ قارچ های بیمارگر به خصوص *Beauveria* spp. و *Metarhizium* به این قارچ کش می باشد در صورتی که قارچ های غیر بیماری زا^۴ از این قابلیت تحمل برخوردار نیستند اما باید گفت تمامی گونه های *Metarhizium* میزان تحمل برابری نسبت به دودین ندارند [۱۰۷، ۱۰۸] با ظهور قارچ ها، برای شناسایی جنس از تمامی جدایه ها، اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید و با استفاده از کلید شناسایی قارچ ها مشخص شد که تمامی جدایه های به دست آمده مربوط به جنس *Metarhizium* می باشد [۱۰۹].

۳-۷. خالص سازی جدایه های *Metarhizium* spp.

با جداسازی جدایه های قارچی، از کلنی های چنداسپوری، کلنی های تک اسپوری تهیه شد بدین طریق که مقداری اسپور از هر جدایه را به درون لوله آزمایش اتوکلاو شده حاوی ۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون ۰/۲٪ توئین ۸۰ (نوعی سورفاکتانت بوده و سبب از هم گسیختگی اسپورها می شود) انتقال داده شد و پس از دو دقیقه ورتکس، حجمی معادل ۱ میلی لیتر را به لوله دوم انتقال داده شد [۱۱۰] و بدین روش برای هر جدایه،

۱- Antibacterial

۲- Antifungal

۳- Tolerance

۴- Non- Entomopathogenic Fungi



شکل ۳-۴: نمایی از قارچ *Metarhizium* روی لارو پروانه موم خوار زنبور عسل و محیط کشت. (الف) رهاسازی لارو پروانه موم خوار بر روی محیط خاک جهت آلوده شدن به قارچ *Metarhizium*. (ب) رشد قارچ *Metarhizium* پس از انتقال از لارو آلوده بر روی محیط کشت انتخابی.

سوسپانسیون با 10^{-3} اسپور آماده گردید و مقدار ۱ میلی لیتر از این سوسپانسیون به آب-آگار^۱ ۱/۲٪ انتقال یافت و پس از درزگیری پتری دیش ها با پارافیلیم به انکوباتور با دمای 1 ± 27 درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی 3 ± 85 ٪ برای مدت ۳ روز منتقل شد. با مشاهده میسلیم های تندش شده (ستاره ای)، با استفاده از مارکر این میسلیم ها را در پشت پتری دیش مشخص نموده و هر کدام از این تک کلنی ها به محیط کشت PDA انتقال داده شد و در انکوباتور با دمای 1 ± 27 درجه سانتی گراد قرار گرفت، پس از گذشت ۲ هفته، جدایه های خالص به دست آمد. نام و مشخصات جدایه های به دست آمده در ضمیمه ۲ ارائه شده است. برای حصول اطمینان از پایداری طولانی مدت جدایه ها و عدم آلودگی و از دست دادن آنها، علاوه بر بانک قارچ اولیه خالص^۲، به تولید بانک قارچ ثانویه^۳ با استفاده از لوله های آزمایش حاوی محیط کشت PDA اقدام گردید. پس از اتوکلاو نمودن لوله های حاوی محیط کشت، لوله ها را با زاویه ۳۰ درجه قرار دادیم تا سطح تماس افزایش یابد. جهت کاهش میزان از دست دادن جدایه ها، لاروهای آلوده به شیشه های پنی سیلین استریل منتقل شد که اگر در حین خالص سازی جدایه ها به هر دلیلی از جمله آلودگی باکتری ها و قارچ های ساپروفیتی مانند تریکودرما^۴ و آسپرژیلوس، بتوان مجدد آنها را کشت نمود. این بانک ثانویه در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (شکل ۳-۵).

۳-۸. نام گذاری جدایه های به دست آمده

نام گذاری جدایه های *Metarhizium* به دست آمده به صورت SHU.J.XX است که SHU برگرفته از نام دانشگاه شاهرود^۵، J برگرفته از حرف اول نام خانوادگی^۶ جداکننده و XX پسوند دو رقمی برای ۳۵ جدایه خالص شده می باشد.

۱- Water- Agar (WA)

۲- Purified First Fungi Bank

۳- Secondary Fungi Bank

۴- *Trichoderma* spp.

۵- Shahrood University

۶- Jokar



شکل ۳-۵: نحوه‌ی تهیه بانک اولیه از لاروهای آلوده و بانک ثانویه از جدایه‌های به دست آمده. الف: بانک اولیه با استفاده از روش تک اسپور گیری. ب: آماده‌سازی لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت 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.

۳-۹. مطالعه میکروسکوپی قارچ *Metarhizium* spp.

برای مشاهده میکروسکوپی نمونه‌ها جهت شناسایی جنس جدایه‌های به دست آمده، تعدادی از اسپورهای هر جدایه را به لام استریل حاوی یک قطره (۰/۰۱ میلی لیتر) گلیسرول ۸۷٪ با کمک خلال دندان استریل انتقال و لامل را با زاویه ۴۵ درجه بر روی آن قرار گرفت (به علت بزرگ بودن اندازه اسپورها به رنگ کاتن بلو برای رنگ آمیزی نیازی نیست). در زیر میکروسکوپ ساختار اسپور بر اساس کلید شناسایی هامبر مشاهده گردید.

۳-۱۰. مطالعات مولکولی

این مرحله شامل استخراج DNA از جدایه‌های رشد یافته بر روی محیط کشت مایع YPD، تکثیر ناحیه ITS با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، خالص سازی قطعات تکثیر یافته و توالی یابی قطعات تکثیری هر جدایه می باشد. تمامی مراحل در شرایط استریل (سترون) به انجام رسید.

۳-۱۰-۱. آماده سازی نمونه

برای مطالعه در زمینه تفکیک سویه‌ها یا گونه‌ها و شناسایی با استفاده از پرایمرهای اختیاری^۱ یا پرایمرهایی برای نواحی ژنومی هدف (تلومر^۲، فواصل ریبوزمی^۳)، DNA بایستی از کشت های تک اسپوری به دست آید. از آنجایی که قارچ های هیفومیست از لاشه^۴ حشرات یا خاک به دست می آیند از این رو بایستی خالص گردند که این امر توسط سری رقت^۵ صورت می پذیرد. جداسازی DNA با وزن ملکولی بالا و خلوص بالا در هر مطالعه ملکولی قارچ های بیمارگر حشرات مهم است. گرچه روش های 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 پروتئین ها و دیگر مواد، تیمار نمونه ها با RNase می باشد [۳۴].

۱- Arbitrary Primers

۲- Telomer

۳- Ribosomal Spacers

۴- Cadaver

۵- Serial Dilution

۳-۱۰-۲. استخراج DNA

تعداد ۳۰ جدایه بر پایه آزمایش اولیه نرخ رشد، شکل و رنگ کلونی بر روی محیط کشت انتخاب شدند. هر کدام از این جدایه‌های خالص در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع YPD^۱ (۲٪، عصاره مخمر، ۱٪ پپتون، ۲٪ گلوکز) کشت گردیدند [۱۰۳] و برای مدت ۳-۴ روز در انکوباتور با دمای 1 ± 30 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میسلیوم‌های تولیدی را به پتری‌دیش‌های استریل دارای کاغذ صافی اتوکلاو شده جهت حذف محیط کشت منتقل کردند. 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، مقدار ۰/۰۲ گرم از هر نمونه به میکروتیوب انتقال یافت و نمونه‌ها با کمک کندانسور در ازت مایع کوبیده شدند. استخراج DNA به روش CTAB^۲ [۱۱۱] با تغییراتی استفاده شد. در ادامه، بافر CTAB^۲ (حاوی CTAB ۲ درصد از PVP 40 ۱ درصد، Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۲۰ میلی‌مولار و NaCl ۱/۴ مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر SDS^۳ ۱٪، ۲ میکرولیتر β -مرکاپتواتانول^۴ و ۲ میکرولیتر RNase^۵ به میسلیوم کوبیده شده اضافه شد و میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه ورتکس افقی گردید. پس از انکوبه کردن در حمام آب ۶۵ درجه سانتی‌گراد و حذف ترکیباتی مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها (با استفاده از ترکیب فنل^۵، کلروفرم^۶ و ایزوآمیل الکل^۷ (به نسبت ۲۵:۲۴:۱)) با سانتریفیوژ با سرعت ۱۰/۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، به منظور رسوب DNA از ایزوپروپانول سرد^۸ استفاده شد و ۱۶ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از سانتریفیوژ (۱۰/۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه)، رسوب سفید رنگی در جداره و انتهای تیوب مشاهده گردید. دو بار شستشو به ترتیب با الکل ۷۰ و ۹۶ درصد و سانتریفیوژ با سرعت ۱۲/۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سبب از

۱- Yeast Extract- Peptone- Glucose Broth

۲- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)

۳- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

۴- β -Mercaptoethanol

۵- Phenol

۶- Chloroform

۷- Isoamyl alcohol

۸- Cold Isopropanol

بین رفتن ناخالصی‌های احتمالی گردید. پس از وارونه کردن تیوب به مدت ۲۰ دقیقه، رسوب سفید رنگ در مجاورت هوای آزاد خشک شد. به رسوب DNA، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه^۱ اضافه شد. برای مشاهده DNA استخراج شده الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ در بافر $0.5 \times TBE$ ^۲ صورت پذیرفته و پس از اتمام الکتروفورز، ژل با رنگ اتیدیوم بروماید^۳ (۲۵ میکرولیتر در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) رنگ‌آمیزی شده سپس با آب مقطر رنگ‌های غیر اختصاصی حذف شد و تصویر برداری صورت پذیرفت.

۳-۱۰-۳. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر منطقه ITS

برای تکثیر ITS فارچ از پرایمرهای ITS1 (با توالی 3' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 5') به عنوان پرایمر پیشرو^۴ و ITS4 (با توالی 3' TCCTCCGCTTATTGATATGC 5') به عنوان پرایمر معکوس^۵ استفاده گردید [۱]. مواد مورد نیاز برای تکثیر ناحیه ITS شامل dNTP (10 mM) به میزان ۰/۵ میکرولیتر، ۰/۶ میکرولیتر $MgCl_2$ (50 mM)، آغازگر پیشرو و معکوس (۵ پیکو بر مول) به میزان ۱ میکرولیتر، ۰/۵ واحد آنزیمی Taq DNA polymerase، بافر 10× PCR به میزان ۲ میکرولیتر، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱۳/۲ میکرولیتر ddH₂O می‌باشد. پروتکل PCR با ۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۵ دقیقه آغاز گردید و ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد: ۱۰ دقیقه ادامه یافت. بافر 10× PCR شامل ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCL ۱× با اسیدیته ۸/۳، ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم (KCl)، ۱۵ میلی‌مولار منیزیم کلرید ($MgCl_2$) و ۰/۰۱٪ (حجمی/وزنی) ژلاتین^۶ (موجب پایداری Taq پلیمراز و افزایش تکثیر) می‌باشد.

با اتمام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، میزان ۳ میکرولیتر از نمونه برای بررسی تکثیر ناحیه ITS در الکتروفورز افقی مورد استفاده قرار گرفت. کیفیت ناحیه تکثیری ITS جدایه‌های جنس *Metarhizium* حاصل از

۱- Dionized Water

۲- Tris Borate Ethylene Di-amin Tetra Acetate (TBE)

۳- Ethidium Bromide

۴- Forward Primer

۵- Reverse Prime

۶- Gelatin

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید و بر اساس خط‌کش ژنی مشخص شد این ناحیه در طولی میان ۵۰۰-۶۰۰ جفت باز برای جدایه‌ها قرار دارد. توالی‌های تکثیر شده هر جدایه، با استفاده از کیت DNA Gel Extraction NORGEN خالص‌سازی و برای توالی‌یابی به شرکت Bioscience انگلیس و Bioneer کره جنوبی ارسال شد.

۳-۱۰-۴. توالی‌یابی و شناسایی گونه‌ها

خوانش توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار کروماس^۱ صورت پذیرفت. سپس به منظور تطبیق خوانش دو پرایمر پیشرو و معکوس برای هر جدایه، از نرم‌افزار Codon Code Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA.) استفاده گردید و متوسط طول منطقه هم‌پوشان^۲ برای هر ۳۰ جدایه معادل ۵۳۰ نوکلئوتید به دست آمد. منطقه هم‌پوشان به دست آمده در بخش BLASTn^۳ پایگاه ژنی NCBI^۴ با دیگر توالی‌های ثبت شده مقایسه شدند تا بر پایه تشابه و هم‌ردیفی، شناسایی قارچ صورت پذیرد. با شناسایی گونه‌های قارچی جدا شده از خاک، به ترسیم درختچه فیلوژنتیک^۵ و بررسی تفاوت‌های میان این جدایه‌ها از منظر تکاملی پرداخته شد. درختچه فیلوژنتیک و بوت استرپ^۶ با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5.2 ترسیم گردید. [۱۱۲]

۳-۱۰-۵. نرم‌افزار و روش مورد استفاده در ترسیم درختچه فیلوژنی

نرم‌افزار مگا به دلیل برخورداری از ویژگی‌هایی مانند رایگان بودن، به روز بودن، گرافیک مناسب، انجام سه مرحله هم‌ردیف‌سازی^۷، ارزیابی مدل و آنالیز فیلوژنتیکی^۸ در این پایان‌نامه مورد استفاده قرار گرفت [۱۱۲]. روش مورد استفاده در ترسیم درختچه تست ماکسیمم پارسیمونی می‌باشد و بوت‌استرپ با ۱۰۰۰ تکرار

۱- Chromas Lite v2.1 (<http://www.mb.mahidol.ac.th/pub/chromas/chromas.htm>)

۲- Contig

۳- nucleotide Basic Local Alignment Search Tool

۴- National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)

۵- Phylogenetic Tree

۶- Bootstrap

۷- Alignment

۸- Phylogenetic Analysis

صورت پذیرفت. در ترسیم درختچه دو روش کلی وجود دارد که شامل روش های مبتنی بر فاصله و روش های مبتنی بر صفات مجزا هستند. در روش دوم، داده های مورد استفاده نوکلئوتیدها هستند و الگوریتم، داده های وارد سازی شده را با هر تعداد درخت ممکن مقایسه کرده، بهترین درختی را که نمایانگر داده ها باشد نشان می دهد. شیوه ماکسیمم پارسیمونی بر پایه جستجویی روشمند در میان درخت های احتمالی، درخت تکاملی را ایجاد می کند. این جستجو برای یافتن کمترین تعداد جهش احتمالی صورت می گیرد که برای انشقاق دو دودمان از یک جد مشترک مورد نیاز است. کمترین تعداد تغییرات جهشی - که برای تفسیر داده ها ضروری است - برای تمام درخت های احتمالی محاسبه می شود و به درختانی با کمترین نیاز به تغییرات، درخت هایی با ماکسیمم پارسیمونی (درخت های بهینه) گفته می شود. پارسیمونی فرضیات اندکی در مورد فرآیندهای تکاملی دارد و این روش عمدتاً بر اساس نظریات ریاضی همراه با الگوریتم های قدرتمند رایانه ای بنا نهاده شده است و از نظر بسیاری، این روش بهترین تخمین فیلوژنی است زیرا تنها فرض قطعی در مورد تکامل این است که تغییرات تکاملی نادر هستند.

۳-۱۰-۶. تعیین درصد همولوژی جدایه ها

جهت ارزیابی تنوع میان مناطق ITS گونه های متفاوت *Metarhizium* و ۳۰ جدایه مورد مطالعه، همولوژی میان مناطق ITS ۱۲ گونه شناخته شده جهانی *Metarhizium* و ۳۰ جدایه با استفاده از نرم افزار آنالین Align Query^۱ انجام شد (جدول ۳ ضمیمه).

۳-۱۱. همبستگی پراکنش جغرافیایی و تنوع ژنتیکی

تست منتل^۲، آزمونی ریاضی برای بررسی همبستگی میان دو ماتریس است که این دو ماتریس باید رتبه مشابهی داشته باشند. این تست در سال ۱۹۶۷ توسط ناتان منتل^۳ ارائه گردید و در علم اکولوژی برای

۱- (<http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>)

۲- Mantel Test

۳- Nathan Mantel

تخمین فاصله میان گونه‌های یک موجود به کار برده می‌شود. در این پایان‌نامه برای محاسبه همبستگی میان پراکنش جغرافیایی و تنوع ژنتیکی ناحیه ITS جدایه‌ها از نرم‌افزار GenAlEx 6.5^۱ استفاده شد. نحوه کار بدین صورت است که ابتدا دو ماتریس فاصله ژنتیکی^۲ (میزان تفاوت میان دو ژنوم مختلف) و ماتریس فاصله جغرافیایی^۳ (میزان تفاوت میان دو منطقه مختلف) را با استفاده از نرم‌افزار [۱۱۳] محاسبه می‌نماییم. ماتریس ژنتیکی بر پایه توالی منطقه ITS ۳۰ جدایه *Metarhizium* به دست می‌آید. ماتریس فاصله جغرافیایی بر پایه مختصات جغرافیایی (طول^۴ و عرض جغرافیایی^۵) نمونه‌های خاکی (جدول ۲ ضمیمه) به دست آمده و سپس ماتریس‌های حاصله به نرم‌افزار NTSYS 2.02e^۶ [۱۱۴] وارد شدند و به بررسی کوفنتیک^۷ و همبستگی میان دو ماتریس با استفاده از تست منتل پرداخته می‌شود.

۱۲-۳. بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ *Metarhizium* spp.

در کنار تشخیص قارچ *Metarhizium* با استفاده از اسپوره‌های سبز رنگ قارچ بر روی لاشه لارو گالریا، به منظور شناسایی دقیق مورفولوژیکی جدایه‌ها از کلید شناسایی هامبر استفاده شد [۱۰۹] و پس از تایید جنس *Metarhizium* spp. آزمایشاتی مانند اندازه‌گیری نرخ رشد^۸، شمارش تعداد کنیدی^۹ و بیماری‌زایی صورت پذیرفت.

۱-۱۲-۳. آزمایش اندازه‌گیری نرخ رشد

جوانه‌زنی سریع و نرخ رشد بالا برای عوامل کنترل بیولوژیک قارچی مزیت محسوب می‌شود زیرا این صفات

۱- Genetic Analysis in Excel (<http://www.biology.anu.edu.au/GenAlEx/>)

۲- Genetic Distance Matrix

۳- Geographic Distance Matrix

۴- Longitude

۵- Latitude

۶- Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System

(<http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html>)

۷- Cophenetic

۸- Growth Rate

۹- Spore Count or Sporulation

در آلودگی سریع میزبان نقش دارند. عامل کلیدی در انتخاب جدایه‌های قارچی در برنامه کنترل بیولوژیک، رشد سریع آن در دماهای مختلف است [۱۰۶]. در این پایان‌نامه برای بررسی این که "آیا میان جدایه‌ها از منظر میزان و سرعت رشد تفاوت‌هایی وجود دارد یا خیر؟"، "آیا میان رشد شعاعی یک جدایه و بیماری-زایی آن همبستگی وجود دارد یا خیر؟" و "آیا می‌توان از نرخ رشد به عنوان پارامتری در انتخاب جدایه‌ها در ساخت و فرمولاسیون آفت‌کش زیستی استفاده نمود" ما آزمایشی را در قالب طرح کاملاً تصادفی به-صورت زیر تعریف نمودیم:

میسلیوم ستاره‌ای حاصل از یک تک‌اسپور هر جدایه را توسط پیپت پاستور با قطری معادل ۵ میلی‌متر به پتری‌دیش حاوی PDA انتقال و پس از گذشت ۷۲ ساعت قطر کلنی در حال رشد، به‌طور روزانه تا ۱۵ روز اندازه‌گیری شد [۱۱۵]. این آزمایش در ۳ تکرار صورت پذیرفت. پس از اندازه‌گیری میزان رشد هر جدایه، برای محاسبه نرخ رشد از فرمول زیر [۱۱۶] استفاده گردید.

$$K_r = (R_1 - R_0) / (t_1 - t_0) \quad (\text{فرمول ۱-۳})$$

$$R_1 = \text{نرخ رشد نهایی}$$

$$R_0 = \text{نرخ رشد اولیه}$$

$$t_1 = \text{زمان نهایی}$$

$$t_0 = \text{زمان اولیه}$$

به علت حجم بالای داده‌ها، اطلاعات مربوط به میزان رشد روزانه به نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office, 2010) وارد گردید و مدل خطی تعدیل و نتایج در طرح کاملاً تصادفی در نرم‌افزار SAS (SAS Institute Inc., Ver.9.1) مورد ارزیابی واقع شد.

۳-۱۲-۲. آزمایش شمارش تعداد کنیدی

برای درک این فرضیه که "آیا میان تعداد کنیدی تولیدی هر جدایه با بیماری‌زایی همبستگی وجود دارد یا خیر" این آزمایش صورت پذیرفت و از تکرارهای آزمایش محاسبه نرخ رشد به علت فعال بودن پس از

گذشت ۱۶ روز از آغاز آزمایش محاسبه نرخ رشد بهره گرفته شد. بر پایه مقاله پتلامول و همکاران [۱۱۷] و اندکی تغییرات، با استفاده از پیپت پاستور سطح مشخصی (قطری معادل ۵ میلی‌متر) از بیرونی‌ترین ناحیه کلنی هر تکرار را برداشته در میکروتیوب حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ درصد توئین ۸۰ ریخته و پس از ۲ دقیقه ورتکس، میزان ۰/۰۱ میلی‌لیتر 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 طرح کاملاً تصافی در نرم‌افزار SAS 9.1 مورد ارزیابی واقع شد.

۳-۱۲-۳. آزمایش زیست‌پذیری کنیدی^۱ جدایه‌های انتخاب‌شده

سوسپانسیون 1×10^8 (کنیدی/میلی‌لیتر) از هر جدایه تهیه و میزان ۰/۰۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به محیط کشت SDA غنی‌شده با عصاره مخمر^۲ انتقال یافت. سپس پتری‌دیش‌ها را درون انکوباتور با دمای $27 \pm$ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۵٪ نگهداری شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون، به هر پتری‌دیش تعداد ۳ قطره رنگ لاکتوفنول کاتن‌بلو به‌طور تصادفی برای تثبیت و رنگ‌آمیزی و جلوگیری از جوانه‌زنی بیشتر اضافه شد. این آزمایش بر مبنای آزمایش پتلامول و همکاران با اندکی تغییرات صورت پذیرفت [۱۱۷]. در محل هر قطره تعداد کل اسپورها و همچنین اسپورهای تندش نموده را شمارش و قدرت زنده‌مانی را توسط فرمول ۲-۳ برای هر جدایه محاسبه گردید [۸۵]. با توجه به درصد به‌دست آمده، جدایه‌هایی با بالاترین میزان زنده‌مانی برای بیماری‌زایی استفاده شدند.

(فرمول ۲-۳)

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

a = تعداد اسپور جوانه زده b = تعداد اسپور جوانه نزده

۱- Viability of Conidium

۲- Sabroud Dextrose Agar + Yeast Extract

۳-۱۲-۴. بررسی بیماری زایی بر روی *Tribolium castaneum* Herbst (Col, Tenebrionidae)

سوسک قرمز آرد (*Tribolium castaneum*) حشره‌ای کوچک به طول ۳-۴ میلی‌متر به رنگ قرمز دارای قطعات دهانی جونده می‌باشد که آفتی شایع^۱ و از حشرات مهم مواد انباری می‌باشد [۱۱۸]. در این آزمایش، برای محاسبه نرخ مرگ و میر آفت انباری *Tribolium castaneum* توسط جدایه‌های قارچ *Metarhizium* spp. ابتدا سوسپانسیونی با غلظت 1×10^8 برای هر جدایه تهیه گردید بدین‌طریق که برای تهیه سوسپانسیون 1×10^8 درون یک میکروتیوب حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ درصد توئین ۸۰، مقداری اسپور ریخته و با استفاده از لام هموسیتومتر، شمارش اسپورها صورت پذیرفت. با جایگذاری غلظت 1×10^8 درون فرمول $3-3 \times = 250000 A$ می‌توان تعداد اسپوری که بایستی در یک مربع 4×4 لام شمارش نمود به دست می‌آید.

برای بیماری‌زایی هر جدایه ۳ تکرار در نظر گرفته شد و با تهیه سوسپانسیون، تعداد ۳۰ حشره کامل را به مدت ۳۰ ثانیه درون سوسپانسیون فرو برده سپس در پتری‌دیش‌های پلاستیکی دارای کاغذ صافی رها نمودیم. جهت تماس بیشتر اسپورهای قارچ با حشرات کامل سوسپانسیون را بر روی کاغذ صافی ریخته و پتری‌دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. بعد از گذشت این مدت زمان، حشرات کامل را درون پتری‌دیش‌های حاوی مواد غذایی (مخلوط آرد، گلیسرین ۱۵٪، عسل، سبوس گندم) رها نمودیم و در انکوباتور با دمای 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی $85 \pm 3\%$ قرار دادیم. چهارمین تکرار برای هر جدایه، تیمار حشرات با آب مقطر استریل بود. سرکشی به‌طور روزانه صورت پذیرفت و با مشاهده مرگ حشره‌ای، حشره مرده را به پتری‌دیش استریل دارای کاغذ صافی انتقال دادیم تا اگر حشره در اثر فعالیت قارچ یا دیگر میکروارگانیسم‌ها از بین رفته باشد، مشخص گردد. در صورت مرگ و میر حشرات شاهد، میزان مرگ و میر با فرمول ابوت^۲ (۳-۴) [۱۱۹] تصحیح گردید و جدایه‌ها از منظر قدرت بیماری‌زایی طبقه‌بندی شدند.

۱- Cosmopolitan

۲- Abbott's Formula

$$\text{Corrected mortality (\%)} = (M_{\text{obs}} - M_{\text{control}}) / (100 - M_{\text{control}}) \times 100 \quad (\text{فرمول ۳-۴})$$

$$M_{\text{obs}} = \text{تعداد مرگ و میر مشاهده شده}$$

$$M_{\text{control}} = \text{تعداد مرگ و میر شاهد}$$

ارزیابی داده‌های حاصل از هر جدایه با نرم‌افزار SAS9.1 در طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و نرم‌افزار

Minitab 16.2.4 (Minitab Inc. 2013) نرمال‌سازی داده‌های حاصل از تکرارهای هر جدایه را انجام داد.

فصل چہارم

نتیجہ

امروزه با استفاده از روش‌های ملکولی توانسته‌اند رده‌بندی کامل‌تری را ارائه نمایند. فیلوژنتیک مجدد برای قارچ‌های بیمارگر حشرات با استفاده از روش‌های ملکولی سبب تفکیک خانواده Clavicipitaceae به سه خانواده مستقل شده است. به دلیل مشکلات در تعیین دقیق گونه‌های قارچی از جمله طولانی بودن این فرآیند، هزینه بسیار و پیچیدگی نتایج به دست آمده، شناسایی این گروه از موجودات یوکاریوت امروزه به روش‌های ملکولی علی‌الخصوص تکنیک‌های مبتنی بر PCR در حد گونه و رده‌های پایین‌تر نیازمندیم لذا برای این موجودات که میکروارگانیسم‌هایی با بیش از ۱/۵ میلیون گونه هستند روش‌های بارکدینگ DNA متفاوتی پیشنهاد شده است. نواحی ژنی متنوعی نظیر زیر واحد بزرگ ریبوزومی هسته‌ای، ITS، توالی‌های ژنی β -توبولین و توالی‌های فاکتور طولیل شدن $1-\alpha$ برای شناسایی قارچ‌ها در سطح گونه به کار برده شده است [۶۸].

۴-۱. تحلیل فیلوژنی منطقه ITS1-5.8S-ITS2 جدایه‌های *Metarhizium spp.*

به مطالعه ارتباط تکاملی بین موجودات زنده فیلوژنی گفته می‌شود که معمولاً به صورت درخت فیلوژنتیکی نشان داده می‌شود. برای رسم این درختچه از توالی‌های نوکلئوتیدی یا اسیدآمینه‌ای استفاده می‌شود و اساس کار ما بر پایه توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از تکثیر ناحیه ITS جدایه‌ها می‌باشد. توالی‌های نوکلئوتیدی به دو صورت توالی‌یابی ناحیه تکثیری با استفاده از دستگاه توالی‌یاب^۲ یا استفاده از توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه‌های اطلاعاتی نظیر NCBI، EMBL^۳، DDBJ^۴ به دست می‌آید. در این پایان‌نامه علاوه بر توالی‌یابی ناحیه ITS جدایه‌ها، از توالی‌های موجود در پایگاه ژنی NCBI بهره گرفته شد.

۱- Elongation Factor 1- α

۲- Sequencer

۳- European Molecular Biology Laboratory (EMBL)

۴- DNA Data Bank of Japan (DDBJ)

۴-۱-۱. دستیابی به توالی‌های ناحیه تکثیری ITS جدایه‌ها

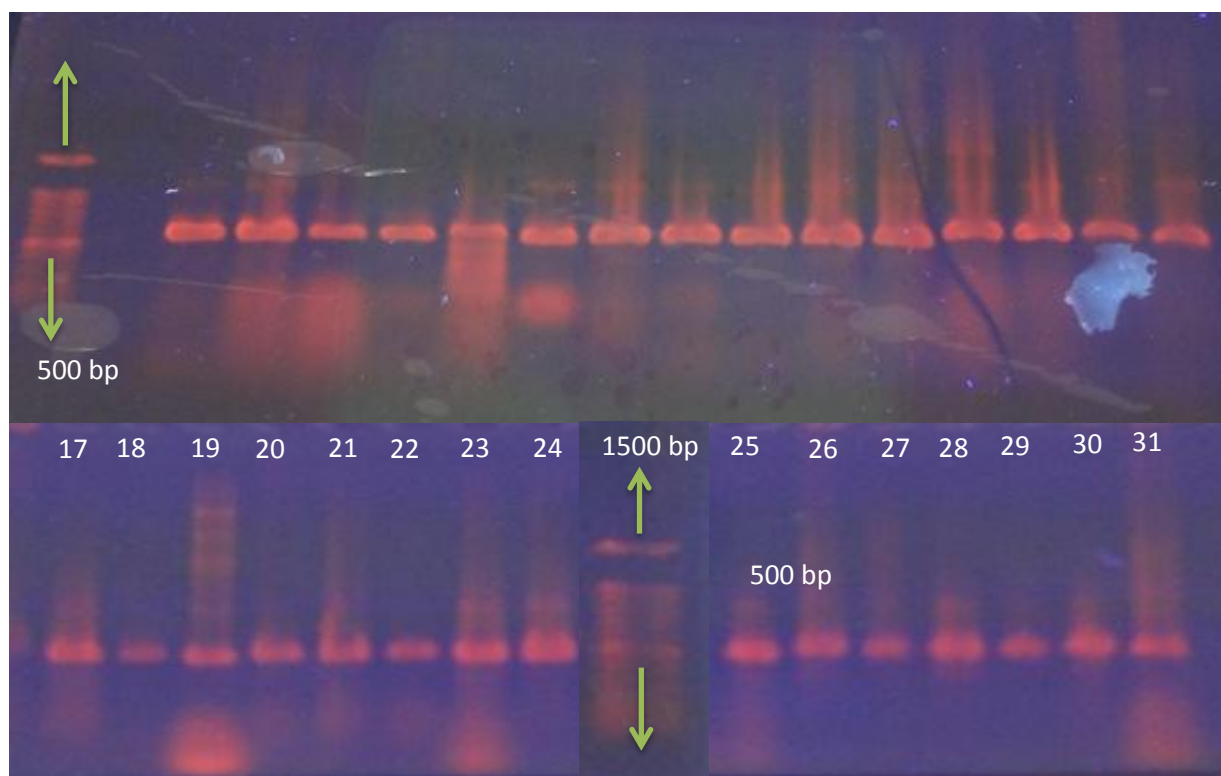
استخراج DNA و تکثیر آن توسط جفت پرایمر ITS برای ۳۰ جدایه صورت پذیرفت و الکتروفورز افقی ناحیه تکثیری ITS در شکل ۴-۱ نشان داده شده است. بر مبنای خط‌کش ژنی تمام جدایه‌ها در ناحیه‌ای میان ۵۰۰-۶۰۰ نوکلئوتید جای گرفته‌اند و توالی‌یابی آنها نشان داد که متوسط طول تکثیری تقریباً ۵۳۰ نوکلئوتید می‌باشد و قرار دادن منطقه هم‌پوشان هر جدایه در BLASTn و شناسایی جدایه‌ها ثابت نمود ناحیه ITS را می‌توان به عنوان DNA بارکدی برای شناسایی گونه‌های قارچی استفاده کرد و قادر خواهد بود بر مبنای منطقه به‌شدت حفاظت شده^۱ ۵/۸S - که درون این ناحیه جای گرفته شده است - به ترسیم درختچه فیلوژنتیک بپردازد.

۴-۲. نتایج درختچه فیلوژنی برای جدایه‌های *Metarhizium spp.*

درایور [۴۵]، دی‌استفانو [۶۱] و اشنایدر [۲۲] در زمینه شناسایی گونه‌های قارچ *Metarhizium* بر اساس ناحیه ITS و ترسیم درختچه فیلوژنتیکی آن بسیار قدرتمند عمل نموده‌اند و ما از شماره دسترسی جدایه‌های معرفی شده توسط اشنایدر [۲۲] و دی‌استفانو [۶۱] و درایور [۴۵] در ترسیم درختچه فیلوژنتیک استفاده نمودیم که در جدول ۴-۱ شماره دسترسی این توالی‌ها را ملاحظه خواهید نمود.

بررسی درختچه رسم شده به روش ماکسیمم پارسیمونی و بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار (شکل ۴-۲) نشان می‌دهد جدایه‌های *Metarhizium* در ۸ کلاستر قرار گرفته‌اند. کلاسترها با بوت استرپ ≥ 70 مورد تقسیم‌بندی قرار داده شد و زیر کلاسترهای درون هر خوشه را با بوت استرپ ≥ 80 لحاظ گردید. بدین ترتیب کلاستر ۱ با ۶ زیر خوشه (۱-۱ تا ۱-۶)، کلاستر ۳، کلاستر ۴ با سه زیر کلاستر (۴-۱، ۴-۲ و ۴-۳)، کلاستر ۵ با دو زیر کلاستر (۵-۱ و ۵-۲) و کلاستر ۸ با دو زیر خوشه (۸-۱ و ۸-۲) از ایران مشابه

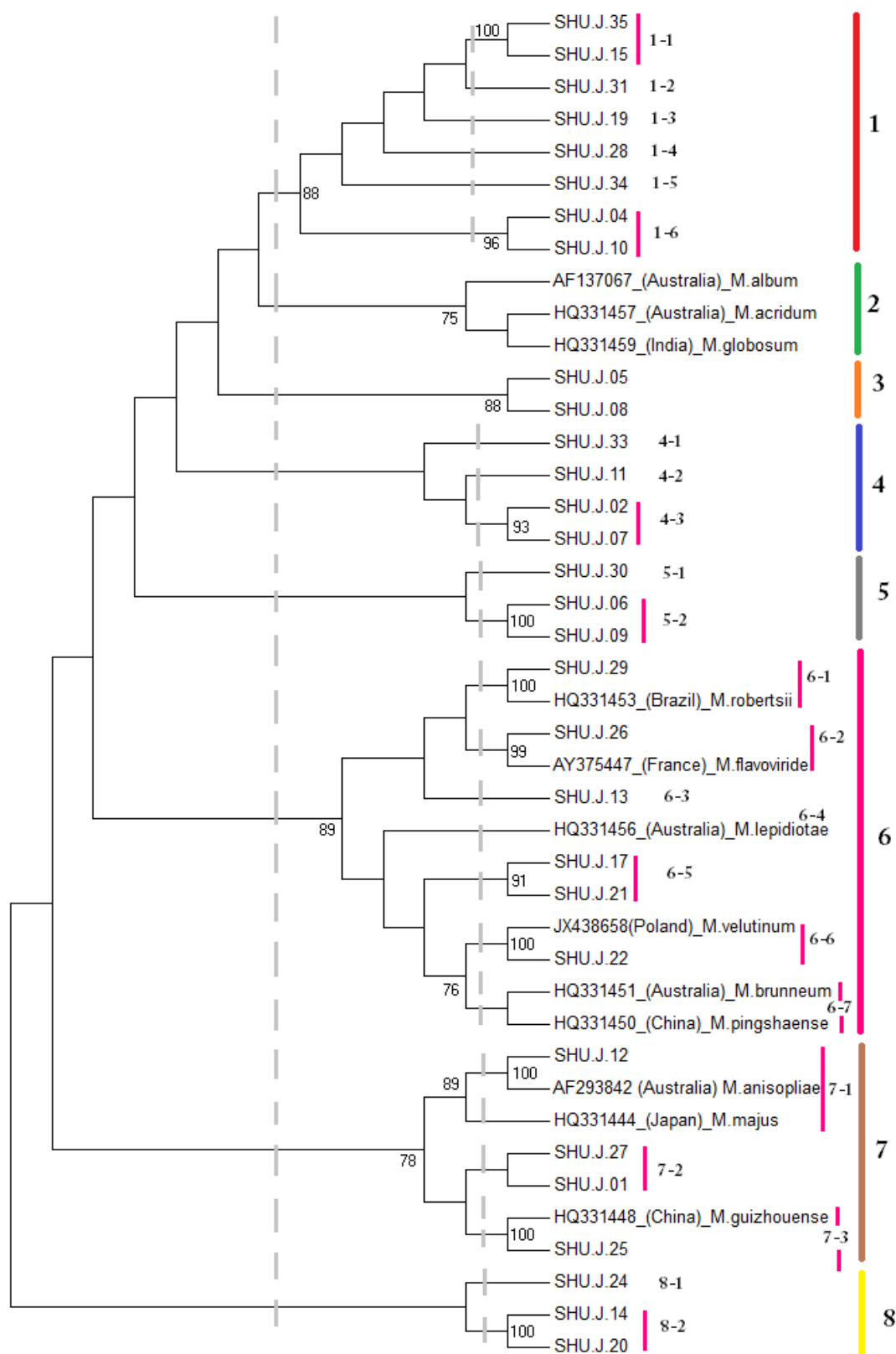
۱- Highly Conserved Sequence



شکل ۴-۱: نمایی از تکثیر ناحیه ITS1-5.8s-ITS2 جدایه‌های *Metarhizium* روی ژل آگارز ۱٪. قطعه تکثیر یافته برای هر جدایه از طولی معادل ۵۰۰-۶۰۰ نوکلئوتید برخوردار است. چاهک ۲ تا ۳۱ به ترتیب مربوط به جدایه‌های SHU.J.01، SHU.J.02، SHU.J.04، SHU.J.05، SHU.J.06، SHU.J.07، SHU.J.08، SHU.J.09، SHU.J.10، SHU.J.11، SHU.J.12، SHU.J.13، SHU.J.14، SHU.J.15، SHU.J.17، SHU.J.19، SHU.J.20، SHU.J.21، SHU.J.22، SHU.J.24، SHU.J.25، SHU.J.26، SHU.J.27، SHU.J.28، SHU.J.29، SHU.J.30، SHU.J.31، SHU.J.33 و SHU.J.34. SHU.J.35 و SHU.J.34 تعلق دارند. خط‌کش ژنی با طول ۱۵۰۰ جفت باز دارای دو باند مرجع (۵۰۰ و ۱۵۰۰ جفت باز) است که در شکل علامت‌دار شده‌اند.

جدول ۴-۱: لیست گونه‌های *Metarhizium* و شماره دسترسی آن در پایگاه ژنی NCBI استفاده شده در ترسیم

نام جدایه	شماره دسترسی	کشور	منبع
<i>M. guizhouense</i>	HQ331448	چین	[۲۲]
<i>M. brunneum</i>	HQ331451	استرالیا	[۲۲]
<i>M. anisopliae</i>	AF293842	استرالیا	[۲۲]
<i>M. velutinum</i>	JX438658	لهستان	GenBank
<i>M. flavoviride</i>	AY375447	فرانسه	[۶۱]
<i>M. lepidiotae</i>	HQ331456	استرالیا	[۲۲]
<i>M. robertsii</i>	HQ331453	برزیل	[۲۲]
<i>M. album</i>	AF137067	استرالیا	[۴۵]
<i>M. acridum</i>	HQ331457	استرالیا	[۲۲]
<i>M. globosum</i>	HQ331459	هند	[۲۲]
<i>M. majus</i>	HQ331444	ژاپن	[۲۲]
<i>M. pingshaense</i>	HQ331450	چین	[۲۲]



شکل ۴-۲: رسم درختچه‌ی فیلوژنی برای جدایه‌های مختلف *Metarhizium spp.* و مقایسه جدایه‌های بومی با دیگر مناطق دنیا. درختچه‌ی فیلوژنی با نرم‌افزار مگا، روش ماکسیمم پارسیمونی و آنالیز بوت استرپ با تکرار ۱۰۰۰ رسم شد. همانطور که در تصویر دیده می‌شود ۱۲ گونه در *Metarhizium* در شاخه‌های شماره ۲، ۴ و ۵ قرار گرفته‌اند. کلاسترها با بوت استرپ ≤ 70 مورد تقسیم‌بندی قرار داده شدند (خط چین اول) و زیر کلاسترهای درون هر خوشه را با بوت استرپ ≤ 80 (خط چین دوم) لحاظ گردید.

همتایی از گونه‌های گزارش شده در جهان نیستند و نظر به کوچکی اندازه بوت استرپ‌ها (≤ 70) احتمال این وجود دارد که حداقل ۵ گونه جدید را بتوان تنها در اقلیم شاهرود و شهرستان‌های اطراف (جدول ۲ ضمیمه) گزارش نمود.

درختچه فیلوژنی نشان می‌دهد که گونه‌های *M. globosum*، *M. acridum*، *M. album* در کلاستر ۲ (زیر کلاسترهای ۱-۲، ۲-۲ و ۳-۲) از شباهت نسبی با یکدیگر برخوردارند و هیچ نماینده‌ای از اقلیم‌های مورد مطالعه ایرانی در این خوشه جای نگرفته است. کلاستر ۶ را می‌توان با توجه به اندازه بوت استرپ (≤ 70) به ۷ زیر خوشه (۱-۶ تا ۷-۶) تقسیم نمود. در زیر خوشه ۱-۶، جدایه SHU.J.29 نماینده ایرانی گونه *M. robertsii* و همچنین SHU.J.26 نماینده گونه *M. flavoviride* است. در این بین SHU.J.13 خود یک زیر خوشه و یا به تعبیری زیر گونه است و در صورتی که تعداد نمونه‌برداری‌ها افزایش یابد ممکن است محل استقرار این جدایه قارچی در درختچه فیلوژنتیکی تغییر نماید و قرابتی به یکی از گونه‌ها بیابد. زیر خوشه ۴-۶ به تنهایی گونه *M. lepidiotae* از استرالیا را در خود جای داده است و نماینده‌ای از اقلیم‌های مورد مطالعه قرابتی با این گونه را نشان نمی‌دهد. زیر خوشه ۵-۶ دارای دو جدایه قارچی از استان-های سمنان (SHU.J.17) و گیلان (SHU.J.21) بود که با هیچ‌یک از گونه‌های شناخته شده از خود قرابتی نشان ندادند. زیر خوشه ۶-۶ گونه *M. velutinum* را به همراه جدایه کاملاً مشابه (بوت استرپ ۱۰۰) از گیلان (SHU.J.22) را در خود دارد و در نهایت زیر خوشه ۷-۶ حاوی گونه‌های *M. brunnum* و *M. pingshaense* با بوت استرپ ≤ 70 است.

کلاستر ۷ دارای ۳ زیر خوشه (۱-۷، ۲-۷ و ۳-۷) است که زیر خوشه ۱-۷ دارای دو گونه *M. anisopliae* به همراه نماینده‌ای از شاهرود (SHU.J.12) و گونه *M. majus* بدون هیچ جدایه‌ای در این مطالعه است.

زیر خوشه ۲-۷ دارای دو جدایه SHU.J.27 (استان البرز) و SHU.J.01 (استان سمنان) است که اگرچه در یک زیر خوشه جای گرفته‌اند ولی از قرابت پائینی برخوردار هستند و تشابهی به هیچ‌یک از گونه‌ها ندارند. زیر خوشه ۳-۷ در خود گونه *M. guizhouense* و جدایه‌ای از سمنان (SHU.J.25) با همولوژی کامل با این گونه را جای داده است.

کلاستر ۸ دارای دو زیر خوشه ۱-۸ و ۲-۸ است که زیر خوشه ۱-۸ جدایه SHU.J.24 (شهنما) را در خود جای داده است و در زیر خوشه ۲-۸، جدایه‌های SHU.J.14 و SHU.J.20 هر دو از شهنما (شاهرود) به دست آمدند.

تهیه اسلاید از اسپورهای تشکیل شده بر سطح محیط کشت و بررسی آن در زیر میکروسکوپ نوری نشان داد که جدایه‌های خالص شده تماماً به جنس *Metarhizium* تعلق دارند [۱۰۹] (شکل ۴-۳).

۳-۴. همبستگی میان تنوع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی

بررسی همبستگی میان دو پارامتر تنوع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی بر پایه ضریب همبستگی کوفنتیک دو ماتریس، نشان داد که میان این دو پارامتر همبستگی ضعیف ولی غیر معنی‌دار وجود دارد و r^2 محاسبه شده برای این دو از مقداری معادل ۰.۱۴/۰۳۴٪ برخوردار است یعنی میان تنوع ناحیه ITS جدایه‌های *Metarhizium* و پراکنش جغرافیایی ارتباطی وجود ندارد (ضمیمه ۴).

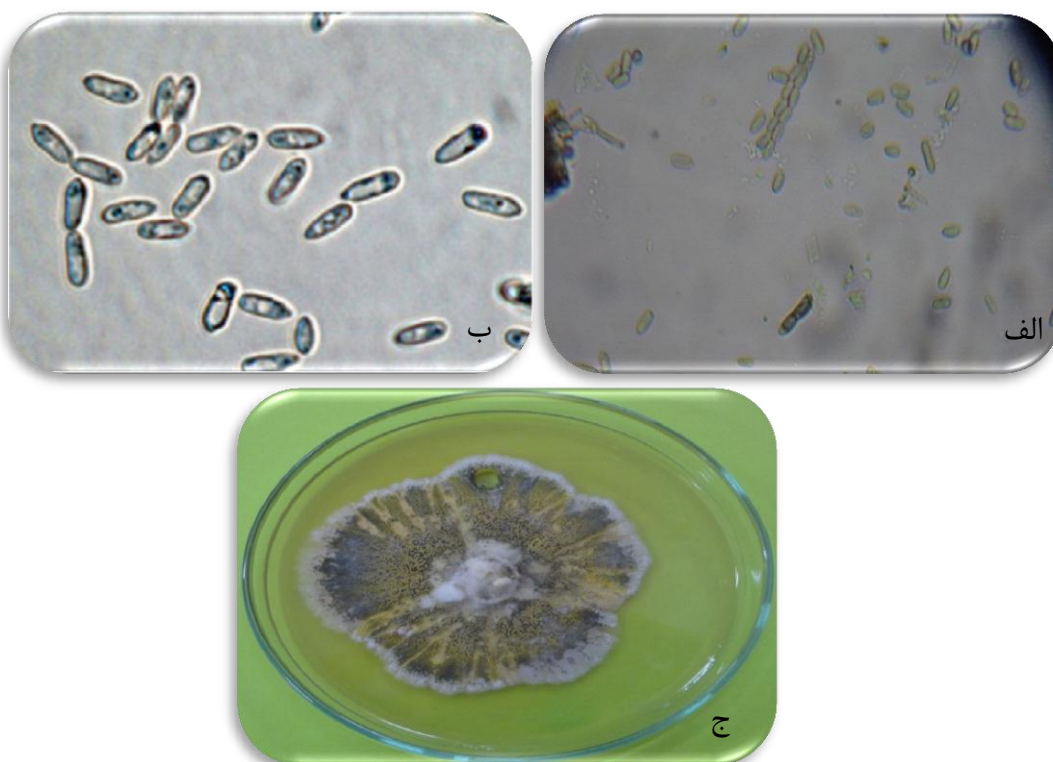
۴-۴. نرخ جداسازی قارچ *Metarhizium* spp.

از هریک از ۷ منطقه شاهرود تعداد ۳۲ نمونه خاک و از هر یک از استان‌های شمالی ایران (گلستان،

گیلان، مازندران) و تهران تعداد ۱۰ نمونه خاک جمع‌آوری گردید و برای هر نمونه خاک تعداد ۱۰ لارو در پتری‌دیش قرار داده شد. برای محاسبه نرخ جداسازی قارچ *Metarhizium* در هر منطقه، تعداد لارو آلوده به قارچ به تعداد کل لارو هر منطقه تقسیم شد. پراکنش قارچ *Metarhizium* در نمونه‌های خاک ۷ منطقه شاهرود و نمونه‌های دیگر استان‌ها یکسان نیست و به شرایط محیطی نقاط مختلف جغرافیایی بستگی دارد و دلیل این گفته را می‌توان در جدول ۱ ضمیمه جستجو نمود. در میان مناطق شاهرود، بیشترین میزان جداسازی قارچ، منطقه شهنما با آلوده شدن ۷۰ لارو از میان ۲۰۰ لارو مورد استفاده (یعنی ۳۵٪) و کمترین میزان جداسازی، منطقه ۲ (کلاته اسد- ابراهیم آباد- میامی و جودانه) و منطقه ۳ (ده ملّا- کلاته ملّا- مراد آباد- مومن آباد- حدادّه) با آلوده شدن ۸ لارو (یعنی ۲/۵٪) هستند. از بین نمونه خاک‌های ۴ استان (مازندران، گلستان، گیلان و تهران) گلستان با نرخ جداسازی ۲٪ (یعنی ۲ لارو آلوده از میان ۱۰۰ لارو استفاده شده) کمترین و گیلان با نرخ جداسازی ۲۰٪ (۲۰ لارو آلوده از میان ۱۰۰ لارو استفاده شده) بیشترین میزان جداسازی قارچ را به خود اختصاص داده‌اند.

۴-۵. ارزیابی نرخ رشد جدایه‌ها بر روی محیط کشت PDA

بررسی نتایج تجزیه و تحلیل (جدول ۴-۲) نشان می‌دهد نرخ رشد جدایه‌های *Metarhizium* اقلیم‌های مورد مطالعه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است. نتایج مقایسه میانگین برای جدایه‌های *Metarhizium* spp. در جدول ۴-۳ مشخص شده است. نتایج مقایسه میانگین نرخ رشد (جدول ۴-۳) نشان می‌دهد که جدایه‌های SHU.J.35 (جنگل ابر)، SHU.J.22 (سرولات)، SHU.J.33 (شهنما)، SHU.J.27 (فردیس)، SHU.J.24 (نهارخوران)، SHU.J.02 (رویان) و SHU.J.29 (شهنما) در کنار جدایه SHU.J.11 (شهنما) از منظر سطح میانگین در کلاس A جای داده شده‌اند و اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در میانگین نرخ رشد ندارند اما با سایر جدایه‌ها از اختلاف معنی‌داری برخوردارند.



شکل ۳-۴: نمایی از کنیدی‌های قارچ *Metarhizium* و رشد آن بر روی محیط کشت PDA (الف) کنیدی‌های جدایه SHU.J.01 با بزرگ‌نمایی $40\times$ (ب) کنیدی‌ها با بزرگ‌نمایی $100\times$ (ج) برداشت حجم مشخصی از بیرونی‌ترین ناحیه کلنی برای شمارش اسپور توسط پیت پاستور

جدول ۴-۲: تجزیه واریانس برای بیماری‌زایی، تعداد کنیدی و نرخ رشد جدایه‌های قارچ *Metarhizium spp*

منابع تغییر		درجه آزادی		میانگین مربعات		ضریب تغییرات	
نرخ رشد	تعداد کنیدی	بیماری‌زایی	نرخ رشد	تعداد کنیدی	بیماری‌زایی	تعداد	بیماری‌زایی
۸۷/۴۹۹**	۲۰۱۵/۵۹۴**	۱۲۹۵/۰۲۹**	۷/۸۶۲	۵/۵۸۹	۱۰/۱۳۹		
۱/۷۸۵۰۷۵	۴/۴۰۹۳۸	۳۴/۹۰۳۰۳					
۶۰							
۸۹							

** در سطح ۱٪ معنی‌دار است

جدول ۴-۳: مقایسه میانگین نرخ رشد جدایه‌های مختلف قارچ *Metarhizium spp.*

نام جدایه	سطح میانگین	میانگین نرخ رشد
SHU.J.11	A	۲۴/۱۷۹
SHU.J.35	A, B	۲۳/۸۶۵
SHU.J.22	A, B, C	۲۳/۵۷۳
SHU.J.33	A, B, C	۲۳/۴۹۱
SHU.J.27	A, B, C, D	۲۳/۴۲۷
SHU.J.24	A, B, C, D	۲۳/۲۲۳
SHU.J.02	A, B, C, D, E	۲۲/۵۴۳
SHU.J.29	A, B, C, D, E	۲۲/۱۸۲
SHU.J.12	B, C, D, E	۲۱/۶۸۳
SHU.J.03	C, D, E	۲۱/۵۸۸
SHU.J.13	D, E, F	۲۱/۲۷۷
SHU.J.28	E, F	۲۰/۷۲۹
SHU.J.06	E, F	۲۰/۴۴۴
SHU.J.34	F	۱۹/۱۶۸
SHU.J.01	F	۱۹/۱۴۰
SHU.J.26	G	۱۴/۳۲۷
SHU.J.04	G	۱۴/۲۸۳
SHU.J.25	G, H	۱۳/۸۵۱
SHU.J.17	G, H, I	۱۳/۶۵۳
SHU.J.08	G, H, I	۱۳/۴۶۰
SHU.J.21	G, H, I	۱۲/۷۳۲
SHU.J.05	G, H, I	۱۲/۵۷۴
SHU.J.15	G, H, I, J	۱۲/۱۵۷
SHU.J.31	H, I, J, K	۱۱/۸۹۳
SHU.J.14	I, J, K, L	۱۱/۶۲۴
SHU.J.30	J, K, L, M	۱۰/۰۹۱
SHU.J.10	K, L, M	۹/۹۲۳
SHU.J.07	K, L, M	۹/۸۹۷
SHU.J.20	L, M	۹/۵۱۹
SHU.J.19	M	۹/۲۹۴

حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشند.

۴-۶. ارزیابی تعداد کنیدی جدایه‌های قارچ *Metarhizium spp.* بر روی محیط کشت PDA

بر پایه جدول تجزیه واریانس (جدول ۴-۲) آزمایش شمارش کنیدی ۳۰ جدایه‌ی *Metarhizium spp.* در ۳ تکرار در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است و مقایسات میانگین مربوط به گونه‌های *Metarhizium spp.* جدول ۴-۴ آورده شده است. ارزیابی شمارش کنیدی برای جدایه‌ها، نشان می‌دهد که جدایه SHU.J.01 (کلاته اسد) با میانگین اسپور $10^6 \times 80/25$ از بیشترین میزان کنیدی تولیدی برخوردار می‌باشد (سطح میانگین A) و از اختلاف معنی‌داری با دیگر جدایه‌ها در میزان کنیدی تولیدی دارد و جدایه SHU.J.08 (رویان) با میانگین $10^6 \times 8/750$ از کمترین میزان کنیدی تولیدی در کنار جدایه‌های SHU.J.17 (شهنا)، SHU.J.15 (شهنا)، SHU.J.31 (شهنا)، SHU.J.25 (شهرک دانشگاه) در سطح میانگین P قرار گرفته است و این گروه از جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند و مشترکاً کمترین میزان تولید کنیدی را به خود اختصاص داده‌اند.

۴-۷. زیست‌پذیری کنیدی‌ها

قدرت زیست‌پذیری کنیدی یکی از عواملی است که بر بیماری‌زایی اثر می‌گذارد از این‌رو لازم است قبل از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها، زیست‌پذیری و قدرت جوانه‌زنی آنها تعیین شود. نتایج آزمایش حاکی از آن بود که تمامی جدایه‌های *Metarhizium spp.* از قدرت زیست‌پذیری بیش از ۸۹٪ برخوردار هستند.

۴-۸: تاثیر بیماری‌زایی قارچ در برابر سوسک قرمز آرد

مطابق جدول تجزیه واریانس (جدول ۴-۳) اثر غلظت $10^8 \times 1$ کنیدی / میلی‌لیتر قارچ *Metarhizium spp.* بر کشندگی سوسک قرمز آرد در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب، درصد بیماری‌زایی جدایه‌ها نرمال شدند و سپس در نرم‌افزار SAS 9.1 در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد استفاده

جدول ۴-۴: مقایسه میانگین تعداد کنیدی تولیدی جدایه‌های قارچ *Metarhizium*

نام جدایه	سطح میانگین	میانگین تعداد اسپور $\times 10^6$
SHU.J.01	A	۸۰/۲۵۰
SHU.J.35	B	۷۶/۶۲۵
SHU.J.33	B	۷۵/۳۷۵
SHU.J.22	C	۶۶/۱۲۵
SHU.J.11	D	۶۱/۰۰۰
SHU.J.29	D, E	۵۹/۰۰۰
SHU.J.02	E	۵۶/۸۷۵
SHU.J.10	F	۵۳/۸۱۳
SHU.J.12	F	۵۳/۷۵۰
SHU.J.04	F	۵۲/۵۰۰
SHU.J.24	G	۴۵/۸۷۵
SHU.J.21	G, H	۴۵/۵۰۰
SHU.J.06	H, I	۴۲/۶۲۵
SHU.J.34	I	۴۲/۰۰۰
SHU.J.28	I	۳۹/۶۸۸
SHU.J.05	J	۳۶/۲۵۰
SHU.J.07	J	۳۵/۸۷۵
SHU.J.27	K	۳۱/۰۶۳
SHU.J.13	L	۲۱/۶۲۵
SHU.J.19	L	۲۰/۷۵۰
SHU.J.26	L, M	۱۹/۰۶۳
SHU.J.20	M, N	۱۶/۸۷۵
SHU.J.09	N	۱۵/۸۷۵
SHU.J.30	N	۱۵/۵۰۰
SHU.J.14	O	۱۲/۳۱۳
SHU.J.17	O, P	۱۱/۶۲۵
SHU.J.15	O, P	۱۰/۲۵۰
SHU.J.31	O, P	۱۰/۱۸۸
SHU.J.25	O, P	۱۰/۰۰۰
SHU.J.08	P	۸/۷۵۰

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

جدول ۴-۵: مقایسه میانگین تلفات سوسک قرمز آرد توسط جدایه‌های مختلف قارچ *Metarhizium spp.*

نام جدایه	سطح میانگین	تعداد مشاهدات	میانگین تلفات	طبقه‌بندی جدایه‌ها
SHU.J.22	A	۲۹	۸۸/۸۳۷	A (High)
SHU.J.35	A	۲۸	۸۶/۸۰۰	A
SHU.J.29	A, B	۲۸	۸۴/۹۰۷	A
SHU.J.02	A, B	۲۸	۸۴/۹۰۷	A
SHU.J.33	A, B	۲۷	۸۳/۸۲۰	A
SHU.J.10	A, B	۲۷	۸۲/۸۵۰	A
SHU.J.04	A, B	۲۷	۸۱/۹۱۰	A
SHU.J.12	A, B	۲۷	۷۹/۸۵۷	A
SHU.J.11	B	۲۵	۷۶/۸۶۳	A
SHU.J.01	B	۲۵	۷۶/۵۲۳	A
SHU.J.19	C	۲۰	۶۳/۸۴۳	B (Medium)
SHU.J.28	C, D	۱۹	۶۳/۳۳۳	B
SHU.J.21	C, D, E	۲۰	۶۲/۸۸۰	B
SHU.J.07	C, D, E	۱۹	۶۱/۸۹۷	B
SHU.J.24	C, D, E, F	۱۹	۵۸/۹۰۳	B
SHU.J.06	C, D, E, F	۱۹	۵۷/۹۳۷	B
SHU.J.34	C, D, E, F	۱۷	۵۶/۶۶۷	B
SHU.J.13	D, E, F	۱۷	۵۳/۹۱۰	B
SHU.J.27	E, F	۱۶	۵۳/۳۳۳	B
SHU.J.05	F, G	۱۶	۴۹/۹۲۳	B
SHU.J.17	H, G	۱۳	۴۲/۹۸۳	B
SHU.J.20	H, I	۱۱	۳۶/۶۶۷	B
SHU.J.08	H, I, J	۱۱	۳۵/۹۷۳	B
SHU.J.26	H, I, J	۱۱	۳۵/۹۷۳	B
SHU.J.14	H, I, J	۱۱	۳۴/۹۵۷	B
SHU.J.15	H, I, J	۱۱	۳۳/۹۶۳	C (Low)
SHU.J.25	I, J	۱۱	۳۱/۹۶۳	C
SHU.J.31	I, J	۱۰	۳۰/۹۶۷	C
SHU.J.30	I, J	۹	۲۷/۹۷۰	C
SHU.J.09	J	۸	۲۶/۶۶۷	C

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

قرار گرفتند. این طرح در ۳ تکرار صورت پذیرفت. نتایج زیست‌سنجی نشان می‌دهد که جدایه‌های مختلف *Metarhizium spp.* بر روی سوسک قرمز آرد بیماری‌زا بودند و سبب مرگ و میر در آفت مذکور شدند اما توان بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف با یکدیگر متفاوت بود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین (جدول ۴-۵) جدایه‌های SHU.J.22 (سرولات)، SHU.J.35 (جنگل ابر)، SHU.J.29 (شهنا)، SHU.J.02 (رویان)، SHU.J.33 (شهنا)، SHU.J.10 (شهنا)، SHU.J.04 (شهرک ابوذری) و SHU.J.12 (شهنا) در سطح میانگین بیماری‌زایی A قرار گرفته‌اند و اختلاف معنی‌داری در بیماری‌زایی میان آنها وجود ندارد. در سطح J جدایه‌های SHU.J.08، SHU.J.26، SHU.J.14، SHU.J.15، SHU.J.25، SHU.J.31، SHU.J.30 و SHU.J.09 (رویان) جای گرفته‌اند و کمترین میزان بیماری‌زایی را به خود اختصاص داده‌اند. مطالعه ما گویای حساسیت بالای سوسک قرمز آرد به قارچ مذکور می‌باشد. با این حال آزمایشات بیشتری نظیر LT_{50} ، LC_{50} جهت غربال‌گری جدایه‌هایی با توان بیماری‌زایی بیشتر برای کنترل آفات انباری لازم می‌باشد.

۴-۹. همبستگی میان پارامترهای مورفولوژیکی نرخ رشد، شمارش تعداد کنیدی و بیماری‌زایی

محاسبه ضریب همبستگی پیرسون برای جدایه‌های *Metarhizium spp.* نشان می‌دهد (جدول ۴-۷) میان این پارامترها همبستگی معنا داری در سطح ۱٪ وجود دارد. 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

۱- Leta Time

مدت زمان لازم برای مرگ ۵۰ درصد یک جمعیت

۲- Leta Concentration

میزان غلظت مورد استفاده برای مرگ و میر ۵۰ درصدی یک جمعیت

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.

جدول ۴-۶: همبستگی میان سه پارامتر نرخ رشد، تعداد کنیدی و بیماری‌زایی جدایه‌های *Metarhizium spp.*

بیماری‌زایی	تعداد کنیدی	نرخ رشد	
** ۰/۵۱۶۶۹	** ۰/۵۹۹۷۱	۱/۰۰۰۰	نرخ رشد
** ۰/۹۱۴۲۰	۱/۰۰۰۰	** ۰/۵۹۹۷۱	تعداد کنیدی
۱/۰۰۰۰	** ۰/۹۱۴۲۰	** ۰/۵۱۶۶۹	بیماری‌زایی

** در سطح ۱٪ معنی‌داری وجود دارد

فصل پنجم

بحث و شهادات

آنالیز فیلوژنی با استفاده از توالی‌یابی DNA برای جنس *Metarhizium* صورت پذیرفته است و واریته‌های *M. anisopliae* به‌طور تاکسونومیکی مجدداً مشخص شده‌اند. درایور در سال ۲۰۰۰ با آنالیز توالی‌های ITS هسته‌ای بیان نمود که تعدادی زیر گونه مشخص از نظر تکاملی در *M. anisopliae* وجود دارد و در بین آنها بیشترین زیر گونه با پراکنش جهانی را *M. anisopliae* var. *anisopliae* دانست. در مطالعه نیشی [۱۲۰] با استفاده از ژن *EF1-α* ۳ جدایه *M. anisopliae* var. *majus* گروهی مونوفیلیتیک را به وجود آوردند. بیشوف [۲۰] با انجام آنالیز فیلوژنی چند مکانی کمپلکس *M. anisopliae*، دو گروه بزرگ مونوفیلیتیک را با نام‌های PARB و MGT درون این کمپلکس را شناسایی نمود و تمام جدایه‌ها با کنیدی‌های نسبتاً بزرگ در کلاستر MGT قرار گرفتند. در این کلاستردو گونه *M. majus* و *M. guizhouense* بر پایه توالی *EF1-α* معرفی شد.

با استفاده از توالی ITS نشان داده شده که *M. anisopliae* var. *majus* فرم غیر جنسی *C. britebankisoides* می‌باشد. گرچه نواحی ژن‌های ریبوزومی به شدت حفاظت شده هستند اما مناطق ITS میان آنها ممکن است در توالی و طول متغیر باشند و اغلب برای تاکسونومی گونه‌ها و جنس‌های قارچی استفاده می‌شوند. مطالعه ۳۳ جدایه قارچ *Metarhizium* نشان داد *M. anisopliae* var. *frigidum* به کلاستر *M. flavoviride* نسبت به کلاستر *M. anisopliae* شباهت بیشتری دارد [۱۲۱]. بر پایه ITS1-5.8 S-ITS2 (شواهد فیلوژنتیکی) و گاه‌ها مشاهدات مورفولوژیکی مشخص شده کمپلکس *M. anisopliae* تک‌نیایی است [۷۸]. فیلوژنی چند ژنی نشان داده *M. anisopliae* کمپلکسی از گونه‌های دارای تاکسون‌ها یا شاخه‌های پنهان می‌باشد. قرارگیری قارچ‌های بیمارگر حشرات در شاخه‌ها یا گونه‌های فیلوژنتیکی مجزا بر اساس نشانگرهای ملکولی، اطلاعات بیشتری راجع به اکولوژی آنها در اکوسیستم‌های طبیعی و مدیریت شده را به نسبت ویژگی‌های مورفولوژیکی فراهم می‌نماید [۵۴].

در این پایان‌نامه با جداسازی قارچ *Metarhizium* از خاک، استخراج DNA هسته‌ای و تکثیر ناحیه ITS و

توالی‌یابی این ناحیه به ترسیم درختچه فیلوژنی و شناسایی جدایه‌های اقلیم‌های استان‌های سمنان، گیلان، مازندران، گلستان و البرز اقدام نمودیم و در ادامه به بررسی گونه‌ها و تحلیل آزمایشات مورفولوژیکی پرداخته شده است.

۵-۱. تجزیه و تحلیل درختچه فیلوژنی

نشانگر ITS، تنوع ژنتیکی بالایی را در جدایه‌های شاهرود و دیگر مناطق نمونه‌گیری شده نشان داد. گویای این امر قرارگیری جدایه‌ها در ۸ کلاستر درختچه فیلوژنی رسم شده است (شکل ۴-۲). کوران [۵۵] از ناحیه ITS و ژن ۵/۸s برای درک روابط تکاملی درون جنس *Metarhizium* استفاده نمود و آنالیز پارسیمونی^۱ و تست احتمال دنباله^۲ نشان داد که این جنس تک‌نیایی است. مطالعات افرادی هم‌چون درایور [۴۵]، سانگ [۱۴] و اسپاتافورا [۱۲۲] اثبات نموده که *Metarhizium* جنسی تک‌نیایی است. پانتو [۷۵] تمام جدایه‌های *M. anisopliae* var. *anisopliae* را درون یک کلاستر قرار داد و این گونه را تک‌نیایی دانست اما لوان [۷۹] با بررسی آنالیز فیلوژنتیکی توالی ITS ۵۱ جدایه *Metarhizium* spp. بیان نمود *M. anisopliae* و گونه خواهری آن *M. robertsii* تک‌نیایی نیستند، به نظر می‌رسد جدایه‌های شاهرود پلی‌فلیتیک^۳ باشند و منطقه ITS توانسته است گونه‌ای جدید با چندین زیر گونه را در کنار گونه‌های شناخته شده جهانی شناسایی نماید و ۵ گونه *M. anisopliae*، *M. velutinum*، *M. guizhouense*، *M. robertsii*، *M. flavoviride* نمایندگانی در اقلیم شاهرود دارند. *M. velutinum* از اقلیم جنگلی گیلان (سرولات)، *M. robertsii* و *M. flavoviride* از مناطق زراعی شاهرود، *M. anisopliae* و *M. guizhouense* در مناطق باغی شاهرود و دیگر جدایه‌های شاهرود و شهرستان-های اطراف از مزارع و باغات و مناطق جنگلی جدا شده‌اند که این حاکی از پراکنش جغرافیایی قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium* و سهولت استقرار آن در اقلیم‌های مختلف است.

۱- Parsimony Analysis

۲- Tail Probability (T-PTP) Test

۳- Polyphyletic

در کلاسترهای ۱، ۳، ۴، ۵ و ۸ جدایه‌های اقلیم استان سمنان و دیگر استان‌های نمونه‌گیری شده قرار گرفته که همتایی از ۱۲ گونه گزارش شده برای *Metarhizium* ندارند. در خصوص اقلیم شاهرود و شهرستان‌های اطراف لازم به توضیح است که اگر میزان نمونه‌برداری (از نظر فاصله و دفعات) افزایش یابد می‌توان این احتمال را داد که تعداد گونه‌های جدید حاوی زیر گونه‌های متنوع بیش از این خواهد بود. همچنین ضرورت دارد تا این یافته‌ها با نشانگرهای ملکولی دیگر و همچنین مطالعات سلولی و میکروسکوپی آتی مورد تأیید و بررسی قرار گیرد. در یک درختچه ترسیم شده، جدایه‌ها، گروه‌های تاکسونی فعال هستند و از نظر تکاملی جدایه‌های اقلیم شاهرود گونه‌های جدیدتری نسبت به ۱۲ گونه شناسایی شده هستند و احتمال گونه‌زایی^۱ در مورد جدایه‌های اقلیم شاهرود وجود دارد. قرارگیری جدایه‌های اقلیم شاهرود و شهرستان‌های اطراف در ۵ کلاستر نشان از تنوع فیلوژنی بالای این جدایه‌ها است. احتمال داده می‌شود که این جدایه‌ها دارای ۵ زیر گونه است که شناسایی دقیق آنها نیازمند بررسی‌های بیشتر با استفاده از دیگر توالی‌های ژنی است.

بسیاری از محققان *M. anisopliae* را فراوان‌ترین گونه شناسایی شده *Metarhizium* برمی‌شمرند [۲۰، ۱۲۳] با این وجود در مناطق مورد مطالعه در این پایان‌نامه صرفاً ۰/۳۳٪ از جدایه‌ها (یعنی تنها جدایه SHU.J.12) متعلق به این گونه است.

تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها بر پایه محل جمع‌آوری نشان می‌دهد در کلاستر ۱، جدایه‌هایی از جنگل ابر، شهنما و رویان و شهرک ابودر (شاهرود) و رامسر، در کلاستر ۳ جدایه‌هایی از بسطام و رویان، در کلاستر ۴ جدایه‌هایی از شهنما و رویان قرار دارند. نمایندگانی از جدایه‌های شهنما، بسطام و رویان در کلاستر ۵ قرار گرفته‌اند. در کلاستر ۶ جدایه‌هایی از شهنما، سرولات (گیلان) در کنار گونه‌های شناخته شده به چشم می‌خورند و بر پایه قرابت میان گونه‌های خواهری، ۳ جدایه SHU.J.29 (جدایه کاملاً مشابه با بوت استرپ ۱۰۰ با *M. robertsii*

۱- Speciation

برزیل)، SHU.J.26 (قرابت ۹۹ درصدی با گونه *M. flavoviride* فرانسه) و SHU.J.22 (جدایه کاملاً مشابه با *M. velutinum* لهستان) شناسایی شدند. در کلاستر ۷ جدایه‌هایی از استان سمنان (شهینما، شهرک دانشگاه و کلاته اسد) و استان البرز در کنار گونه‌های *M. anisopliae* استرالیا، *M. majus* ژاپن و *M. guizhouense* چین قرار گرفته‌اند و بر همین اساس دو جدایه SHU.J.12 و SHU.J.25 شناسایی شدند. در کلاستر ۸ هم جدایه‌هایی از استان‌های گلستان (نهارخوران) و سمنان (شهینما) قرار دارند و فاقد هر گونه قرابتی با ۱۲ گونه شناخته شده *Metarhizium* در جهان هستند. با توجه به درختچه فیلوژنی می‌توان گفت در این تحقیق، نماینده‌ای برای گونه‌های *M. brunneum*، *M. majus*، *M. lepidiotae*، *M. album* وجود ندارد. مشخص شده گونه‌های *Metarhizium* به خصوص *M. album*، *M. anisopliae*، *M. brunneum*، *M. robertsii*، *M. lepiditum* از منظر مورفولوژی و فیلوژنی بسیار شبیه یکدیگر هستند و شناسایی آنها تنها بر مبنای مقایسه توالی‌های ITS به دست آمده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی GenBank امکان‌پذیر نیست و باید سایر نواحی ژنی برای شناسایی و تفکیک این گونه‌ها استفاده شوند.

ITS نشانگر توانست به خوبی به تفکیک قارچ‌های دیگر بپردازد زیرا در حین جداسازی قارچ *Metarhizium* تعداد ۵ قارچ از لاروهای آلوده به دست آمد که بر پایه شکل کنیدی، نحوه رشد بر روی محیط کشت و سایر ویژگی‌های مورفولوژیکی تصور بر این بود که متعلق به جنس *Metarhizium* هستند، استخراج DNA و تکثیر ناحیه ITS و توالی‌یابی آنها نشان داد گرچه این جدایه‌ها در ظاهر مشابه *Metarhizium* بودند اما در واقع قارچ‌های دیگری نظیر *Nectria* هستند که جداسازی شده بودند.

ضمیمه ۳ نتایج همولوژی میان ۱۲ گونه شناخته شده *Metarhizium* و ۳۰ جدایه مورد مطالعه را نشان می‌دهد که کمترین شباهت منطقه ITS در میان گونه‌های جهانی و جدایه‌های ما مربوط به جدایه SHU.J.13 است. برای بسیاری از جدایه‌ها (یعنی جدایه‌های SHU.J.05، SHU.J.17، SHU.J.04، SHU.J.08، SHU.J.24، SHU.J.10، SHU.J.21، SHU.J.25) این درصد همولوژی کمتر از ۵۰ درصد توسط نرم‌افزار محاسبه شده است.

از میان ۳۰ جدایه توالی یابی شده، ۱۴ جدایه به باغات مختلف، ۱۲ جدایه به مزارع و ۴ جدایه به مناطق جنگلی تعلق دارند و این نشان می دهد طبق گفته سانچزینا حضور و پراکنش این قارچ در باغات بیشتر از مناطق جنگلی است. قرار گرفتن جدایه های ایران در ۵ کلاستر مختلف این درختچه نمایانگر وجود گونه های پنهان^۱ می باشد [۱۲۴-۱۲۶]. مطالعه بالاکاندر [۱۲۷] نشان داد جدایه های *M. anisopliae* var. *acridum* بررسی شده به شاخه های مختلفی تعلق دارند و هیچ کدام از آنها به توالی های گزارش شده توسط درایور [۴۵] و بیشوف [۱۲۱] شباهتی ندارند. مطالعه تانگ تیراسون و همکاران [۷۷] نشانگر تغییر پذیری بالای ناحیه ITS درون *M. anisopliae* می باشد و این گونه از واگرایی بالایی برخوردار می باشد و جدایه های تایلند در شاخه های جداگانه ای در مقایسه با جدایه های دیگر کشورها قرار می گیرند (شاخه های B، C و F) در حالی که مجزا بودن گونه های یک کشور از دیگر کشورها برای جدایه های مورد مطالعه ما چندان مصداقی ندارد زیرا ۵ جدایه در کنار گونه های شناخته شده دیگر کشورها قرار دارند.

در کلاستر ۳، جدایه SHU.J.11 از بالاترین میزان نرخ رشد (۲۴/۷۹۳ میلی متر/ روز)، در کلاستر ۱، جدایه SHU.J.35 از بالاترین تعداد کنیدی تولیدی ($10^6 \times 76/667$) و بیشترین بیماری زایی (۸۶/۸٪) برخوردار هستند.

تنوع ژنتیکی ناحیه ITS و پراکنش جغرافیایی جدایه های *Metarhizium* با استفاده از تست منتل، همبستگی را میان این دو پارامتر نشان نداد. گرچه بررسی ارتباط بین پراکنش جغرافیایی جدایه های مختلف *Beauveria* با تنوع موجود در منطقه ITS توسط جیکاس و همکاران [۱۲۸] انجام شده و هیچ همبستگی بین محل جداسازی با تنوع موجود در منطقه ی ITS مشاهده نمودند اما لازم به ذکر است این آزمون تاکنون برای قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium* صورت نپذیرفته است.

۱- Cryptic Species

مطالعات بی‌شماری اشاره نموده‌اند ناحیه ITS1، ITS2 و ITS3 برای شناسایی ملکولی قارچ‌ها به کار برده می‌شود [۷۸] و در این تحقیق مشخص شد منطقه ITS دارای تنوع است زیرا جدایه‌های مورد مطالعه درون تاکسون‌های مختلفی پراکنده شده‌اند. انتظار داشتیم جدایه‌هایی که از یک منطقه جدا شده‌اند در یک گروه خواهری قرار داشته باشند اما نتایج این انتظار را جوابگو نبود. با توجه به تکامل نسبتاً آهسته توالی‌های هسته‌ای نظیر ITS این توالی‌ها می‌توانند مرجع مهمی برای شناسایی قارچ‌ها باشند.

۵-۲. جمع‌بندی نتایج آزمایشات مورفولوژیک

برای جداسازی قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌توان از سه روش طعمه حشره‌ای، روش عصاره‌گیری از خاک و استفاده از ریشه گیاهان گرامینه (اندوفیت)^۱ 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 بیمارگر و ساپروفیت بر روی محیط کشت تشکیل کلنی می‌دهند که کار شناسایی مورفولوژیکی و جداسازی را سخت می‌نمایند. قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌توانند درون ریشه گیاهان گرامینه به‌صورت اندوفیت زندگی کنند [۸] اما جداسازی آن‌ها مشکلات زیادی را در پی دارد لذا معمولاً از روش طعمه حشره‌ای استفاده می‌شود هر چند که این روش مستلزم پرورش حشره‌ای چون پروانه موم‌خوار است [۸].

در این پایان‌نامه با استفاده از روش طعمه حشره‌ای گالریا از میان ۲۴۰ نمونه خاک مناطق گوناگون، تعداد ۳۰ جدایه قارچ *Metarhizium* در محیط کشت انتخابی حاوی دودین، سیکلوهگزامید، کریستال ویولت و کلرید مس در کنار دیگر قارچ‌هایی مانند *Beauveria*، *Nectria*، *Phytophthora* و *Trichoderma* جداسازی گردید یعنی نرخ جداسازی قارچ *Metarhizim* در اقلیم‌های مورد مطالعه ۱۲/۵٪ بوده است که میزان بسیار کمی است و ضرورت تلقیح خاک‌ها و اراضی زراعی و باغی را می‌طلبد. سویم [۱۲۹]، سانچز-پنا [۱۳۰] نیز میزان جداسازی *Metarhizium* را در خاک‌های زیست‌بوم‌های مختلف اندک دانسته‌اند. مسعودی (۲۰۱۳) [۱۳۱] نرخ جداسازی

۱- Endophyte

Beauveria را در باغات مرکبات بررسی نموده و با توجه به نتایج ایشان می توان گفت در شرایط نسبتاً مشابه از نظر دما و رطوبت، قارچ *Beauveria* فراوان ترین جنس در میان قارچ های بیمارگر حشرات است و از نرخ جداسازی بیشتری نسبت به *Metarhizium* برخوردار می باشد که این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعات تونینگا و همکاران [۱۳۲]، براون بریج و همکاران [۷]، میلینگ و الین برگ [۱۳۳] و نتایج حاصل از این تحقیق هم خوانی دارد. بر اساس جدول تعداد لاروهای آلوده و درصد جداسازی قارچ (جدول ۱ ضمیمه) می توان گفت فراوانی قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium* در خاک های زراعی بیشتر از مناطق جنگلی است به طوری که سورو کین این قارچ را به عنوان گونه ای کشاورزی برشمرد. در صحت این مطلب همین بس که از میان نمونه های خاکی مناطق جنگلی تنها ۴ جدایه (درصد جداسازی قارچ از مناطق جنگلی ۱۳/۳۳٪) به دست آمد و نتیجه این پایان نامه در خصوص فراوانی و پراکندگی قارچ *Metarhizium* با نتایج مطالعات سانچزپنا [۱۳۰] مطابقت دارد در حالی که سویم [۱۲۹] بیان نمود که پراکنش *Metarhizium* در خاک های زراعی اندک و در جنگل های فندق زیاد است. از سوی دیگر برحسب درصد جداسازی قارچ (جدول ۱ ضمیمه) و مشخصات جدایه های به دست آمده (جدول ۲ ضمیمه) می توان گفت ممکن است عامل فراوانی این قارچ، رطوبت باشد. می دانیم رطوبت عامل مهمی در فراوانی و کارایی قارچ های بیمارگر حشرات است [۲۴]. در توضیح این مطلب باید بگوییم که از میان ۳۰ جدایه به دست آمده، ۱۵ جدایه به منطقه شهنما تعلق داشتند و این منطقه به علت سبزی کاری از رطوبت بیشتری نسبت به سایر مناطق نمونه گیری برخوردار است و لذا توانستیم تعداد جدایه بیشتری را از آن جدا نماییم در حالی که از منطقه ۲ (کلاته اسد- ابراهیم آباد- میامی- جو دانه) و منطقه ۳ (ده ملّا- کلاته ملّا- مراد آباد- حدّاده- مومن آباد) به علت رطوبت پایین خاک تنها ۱ جدایه به دست آمد.

برای قارچ های بیمارگر حشرات فاکتورهای بیماری زایی، تولید اسپور و رشد تحت تاثیر فاکتور مهم دما هستند و رشد و بیماری زایی وابسته به دما برای بسیاری از این قارچ ها مانند *B. bassiana* و *M. anisopliae* اثبات شده

است [۱۳۴] و مطالعات صورت گرفته با طیف دمایی متفاوت (از ۳۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد) در ارزیابی تولید اسپور و نرخ رشد، حاکی از مناسب بودن طیف دمایی ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد [۱۳۵]. ارزیابی نرخ رشد و تعداد کنیدی ما نیز در دمای 1 ± 27 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 1 ± 27 درجه سانتی‌گراد نشان داد سرعت رشد جدایه‌ها با یکدیگر متفاوت است و این نرخ رشد در طیفی معادل $24/1 - 9/2$ میلی‌متر/روز قرار دارد. نتایج به دست آمده از این آزمایش با نتایج حاصل از آزمایشات اکسی و همکاران [۱۳۵]، داربرو و همکاران [۱۱۵]، صفوی و همکاران [۱۳۶] و پتلامول و همکاران [۱۱۷] یکسان است و می‌توان گفت نرخ رشد جدایه‌های مختلف *Metarhizium* در طیف دمایی ۲۹-۲۵ درجه سانتی‌گراد با یکدیگر متفاوت است. وارا [۱۳۷] نرخ رشد سریع را مزیتی برای عامل کنترل بیولوژیک دانست و علت آن را کاهش زمان لازم برای تولید انبوه کنیدی، استراتژی رقابتی قارچ در طی چرخه زندگی ساپروفیتی در برابر میکروارگانیسم‌های دیگر و تسریع کنترل آفت به علت آلودگی سریع میزبان برشمرد. آزمایشات بی‌شماری تأیید نموده‌اند که بهترین محیط‌کشت برای پرورش قارچ‌ها و به‌خصوص قارچ‌های بیمارگر حشرات PDA می‌باشد [۱۱۷، ۱۳۸، ۱۳۹] و رشد شعاعی قارچ‌های مختلف بر روی این محیط با هم تفاوت دارد لذا ما برای سنجش از این محیط کشت 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 همکاران [۱۱۷]، صفوی و همکاران [۱۳۶] همسویی دارد. پتلامول و همکاران با بررسی میزان اسپور تولیدی توسط ۱۰ جدایه قارچ بیمارگر حشرات، جدایه‌ای با بیشترین میزان اسپور را در سطح High قرار دادند [۱۱۷] و لذا بر پایه نحوه تقسیم‌بندی آنها، جدایه SHU.J.01 با میانگین تولید کنیدی $10^6 \times 80/25$ در سطح High قرار می‌گیرد.

بیپ (۱۹۹۲) [۱۲۳] با بررسی میزان مرگ و میر جدایه‌های *M. anisopliae* بر روی حشره *Adoryphorus*

couloni به تقسیم‌بندی جدایه‌ها بر پایه میزان مرگ و میر پرداخت و سه سطح را معرفی نمود که شامل سطح A با توان بیماری‌زایی ۱۰۰-۶۸٪، سطح B با توان مرگ و میر ۶۷-۳۴٪ و سطح C با توان بیماری‌زایی ۳۳-۰٪ بود. لذا برحسب همین سطوح تعریف‌شده به سطح‌بندی جدایه‌ها از منظر توان بیماری‌زایی پرداختیم (جدول ۴-۶). بر اساس این تقسیم‌بندی، ۱۰ جدایه در سطح A قرار گرفتند یعنی ۳۳/۳٪ جدایه‌ها از توان بیماری‌زایی بالایی برخوردار هستند. ۵۰٪ جدایه‌ها در سطح B (متوسط) و ۱۶/۷٪ جدایه‌ها در سطح C (کم) قرار دارند. مطالعه زیست‌سنجی برای تعیین بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر حشرات و غربال‌گری جدایه‌های بیماری‌زا به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک ضروری است. بیماری‌زایی عامل مهمی برای انتخاب سویه‌های قارچی کاندیدا برای کنترل حشرات است [۱۴۰]. آزمایش زیست‌سنجی جدایه‌های مورد مطالعه با غلظتی معادل $10^8 \times 1$ در برابر سوسک قرمز آرد صورت گرفت و جدایه‌های مختلف، توان بیماری‌زایی متفاوتی را بر روی حشرات کامل *T. castaneum* نشان دادند و نتایج باتا و ابوصفیح [۱۱۸]، خشاوه [۱۴۱]، میکالاکی [۱۴۲] و نونگ [۱۴۳] این یافته را تأیید نموده است اما همان‌طور که در فصل اول گفتیم با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی مانند اندازه، شکل و رنگ کنیدی، سلسله مراتب تاکسونومیکی پایین‌تر تعیین نخواهد گردید.

ارتباط میان جوانه‌زنی، نرخ رشد، تولید کنیدی، تولید آنزیم‌های برون‌سلولی^۱ با بیماری‌زایی ۲۴ جدایه *M. anisopliae* بر روی *Nilaparvata lugens* مشخص گردید [۱۴۴]. با استفاده از جدایه‌های *Metarhizium* مشخص گردید که جدایه‌هایی با سرعت جوانه‌زنی زیاد، دارای نرخ رشد سریعی هستند و همبستگی کمی میان جوانه‌زنی ۵۰٪ از اسپورها و درصد مرگ و میر مشاهده گردید بدین معنی که هرچه جدایه‌ای سریع‌تر جوانه‌زنی نماید توانایی آن در آلودگی و مرگ و میر آفت بیشتر است [۱۴۵]. ال-آیدروس و روبرتس [۱۴۶]، حسان [۱۴۷] همبستگی میان بیماری‌زایی و نرخ رشد را بیان نموده‌اند. نتایج بررسی همبستگی پیرسون جدایه‌های

۱- Extracellular Enzyme

Metarhizium شاهرود و شهرستان‌های اطراف نشان داد میان ۳ پارامتر همبستگی معناداری (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.

۵-۳. پیشنهادات

در قارچ‌ها گرچه با استفاده از توالی‌های ITS و ۱۸S قادر خواهند بود به شناسایی گونه، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی بپردازند و از فراوانی زیادی در پایگاه‌های اطلاعاتی برخوردار هستند اما مقایسه جدایه‌های قارچی تنها با یک ژن نمی‌تواند تاریخچه تکاملی ژنوم یک موجود را به وضوح بیان نماید و حتی ممکن است موجب نتیجه‌گیری‌های غلط درباره روابط تکاملی یک قارچ با دیگر اعضای گونه‌های مشابه یا حتی جنس‌های قارچی گردد [۷۵] و لذا طبق بسیاری از مقالات می‌توان در کنار ITS از ژن‌های دیگری چون β -*RPB1*، *EF-1 α* ، *TEF* و *RPB2* استفاده نمود تا شناسایی دقیق‌تری صورت پذیرد [۷۸]. در سال‌های اخیر استفاده از آنالیز چند ژنی برای مطالعات فیلوژنتیک مرسوم‌تر شده و مطالعاتی بر پایه ژن‌های کد کننده پروتئین در قارچ‌ها نشان داد که آنالیز چند مکانی تفکیک بهتری را فراهم می‌نماید و بنابراین فرضیه‌های فیلوژنتیک معتبری در فیلوژنی قارچ‌ها فراهم می‌گردد [۱۰۱].

یکی از این ژن‌ها در کمک به شناسایی گونه‌های قارچی ژن β -توبولین است که برای بررسی روابط درون قارچ در تمام سطوح - از مطالعات گروه‌هایی با گونه‌های مبهم تا بررسی‌های فیلوژنی جغرافیایی - به کار می‌رود. زیرا این ژن یک کد کننده پروتئین است و مزایای استفاده از آن نسبت به توالی‌های ژن RNA ریبوزمی بیشتر است: هم‌ردیف سازی توالی‌های آن کمتر مشکل‌ساز است و سومین نوکلئوتید می‌تواند تخمین نسبتاً مناسبی از

۱- RNA PolymeraseII Second Largest Subunit

نرخ جابجایی خنثی^۱ را فراهم آورد. ژنهای RNA ریبوزومی مکررا جهت ساخت روابط ترتیبی میان قارچها استفاده می شود [۳۶] و استراتژی مهم که می تواند اطلاعات ارزشمندی در سطوح بالای روابط تاکسونومیکی فراهم آورد، ناهمگنی^۲ درون اینترونهای ژن کد کننده β -توبولین است [۱۴۸].

برخلاف بسیاری از قارچهای میتوسپوری^۳ که سطوح بالایی از چندشکلی را در کمپلکس rRNA هسته‌ای خود نشان می دهند و مطالعه سویه های *M. anisopliae* var. *anisopliae* جدا شده از میزبانها و مناطق جغرافیایی مختلف [۳۳] با استفاده از ناحیه IGS میتوکندریایی اثبات نموده که توالیهای ITS1، ITS2، ۱۸S و ۲۸S هسته‌ای حفاظت شده هستند و اطلاعات کافی برای تفکیک قابل تشخیص سویه‌های یک گونه را به دست نمی دهند و نواحی IGS میتوکندری در تفکیک سویه‌ها موفق عمل نموده و لذا پیشنهاد می شود در آنالیز فیلوژنتیکی قارچ *Metarhizium* از نواحی IGS میتوکندری برای تفکیک درون و بین گونه‌ای قارچ استفاده شود. ITS-RFLP روشی است که در آن قطعات تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای ITS به کمک چندین آنزیم برشی در دسترس بریده شده و الگوهای بانندی حاصل از هضم این قطعات با الگوهای بانندی موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی جهت شناسایی گونه‌ها مقایسه می شود [۶۱] و استفاده از این روش موجب می شود نیازی به توالی‌یابی پر هزینه قطعات تکثیر شده ITS نباشد ولی این امر در صورتی تحقق خواهد یافت که پایگاه اطلاعاتی برای این الگوهای بانندی فراهم گردد. این روش اکنون برای بررسی تنوع ژنتیکی و جغرافیایی قارچهای بیمارگر حشرات استفاده می شود [۱۴۹].

طبق نتایج به دست آمده (جدول ۱ ضمیمه) پیشنهاد می شود در صورت استفاده از روش طعمه حشره‌ای، تعداد

۱- Neutral Situation

۲- Heterogenicity

۳- Mitosporic Fungi

قارچهای آسکومیستی که تولید اسپورهای غیر جنسی (اسپورهای میتوتیک) می نمایند و در آنها فاز جنسی وجود ندارد که از جمله آنها می توان به قارچهای ناقص (دئوتریمیستها) اشاره نمود.

نمونه‌های خاکی زیاد باشد چرا که پراکنش این قارچ در مقایسه با قارچ *Beauveria* در تمامی نقاط جهان کمتر است و گستره مناطق نمونه‌گیری به مناطقی با رطوبت بالا محدود شود زیرا در میان ۷ منطقه نمونه‌گیری شاهرود، بیشترین تعداد جدایه (یعنی ۵۰٪ جدایه‌ها) از منطقه یک (شهنما) جداسازی گردید که به علت سبزی‌کاری در این منطقه، ریزوسفر نسبت به سایر مناطق رطوبت بالاتری را در اختیار دارد.

همچنین می‌توان ۵ جدایه ایرانی مشابه با گونه‌های شناخته شده با هم‌تایان بین‌المللی خود و گونه‌های شناخته شده جهانی را 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.

ضمائم

جدول ۱ ضمیمه: تعداد لاروهای آلوده و نرخ جداسازی قارچ و جدایه‌های به‌دست آمده از آنها

ردیف	منطقه نمونه‌گیری	تعداد لارو مورد استفاده	تعداد لارو آلوده	نرخ جداسازی قارچ (%)	تعداد جدایه به‌دست آمده
۱	کلاته اسد- ابراهیم آباد- میامی- جو دانه	۳۲۰	۸	۲/۵	۱
۲	رویان- دیزج	۳۲۰	۱۳	۴/۰۶	۳
۳	ده ملّا- کلاته ملّا- مراد آباد- حدّاده- مومن آباد	۳۲۰	۸	۲/۵	۱
۴	جاده شاهروود/ آزادشهر- جنگل ابر- جنگل قطری- روستای ابر- چهار طاق پرو- قلعه نو خرقان	۳۲۰	۱۲	۳/۷۵	۱
۵	بسطام- امیریه- مجن- تاش- فرحزاد	۳۲۰	۱۲	۳/۷۵	۲
۶	شهنما	۲۰۰	۷۰	۳۵	۱۵
۷	شهرک ابوذر- مغان- شهرک دانشگاه	۱۳۰	۷	۵/۳۸	۳
۸	تهران- البرز	۱۰۰	۴	۴	۲
۹	گلستان (نهار خوران، جنگل گلستان)	۱۰۰	۲	۲	۲
۱۰	گیلان (چابکسر، سرولات)	۱۰۰	۲۰	۲۰	۲
۱۱	مازندران (رامسر، بابل، بابلسر، آمل)	۱۰۰	۵	۵	۱

جدول ۲ ضمیمه: مشخصات جدایه های *Metarhizium spp.* به دست آمده

نام جدایه	استان	شهرستان	منطقه	محصول	حاشیه / مرکز	مختصات جغرافیایی	ارتفاع از دریا	جداسازی
SHU.J. 01	سمنان	شاهرود	کلاته اسد	زردآلو	مرکز	۳۶۲۴۵۱.۶	۱۱۱۷	مرداد ۹۱
SHU.J.02	سمنان	شاهرود	رویان	انگور	حاشیه	۵۵۳۳۳۹.۱ ۳۶۲۲۵۵.۶	۱۲۴۸	مرداد ۹۱
SHU.J. 04	سمنان	شاهرود	شهرک ابودر	زردآلو	مرکز	۵۴۵۹۵۸.۸ ۳۶۲۵۵۵.۱	۱۳۴۳	دی ۹۱
SHU.J.05	سمنان	شاهرود	بسطام	زردآلو	مرکز	۵۴۵۹۱۶.۷ ۳۶۲۸۳۳.۶	۱۳۸۱	دی ۹۱
SHU.J.06	سمنان	شاهرود	بسطام	زردآلو	حاشیه	۵۴۵۹۵۱.۰ ۳۶۲۸۳۳.۱	۱۳۸۰	دی ۹۱
SHU.J.07	سمنان	شاهرود	رویان	انگور	مرکز	۵۴۵۹۵۰.۴ ۳۶۲۲۱۲.۴	۱۲۸۲	دی ۹۱
SHU.J.08	سمنان	شاهرود	رویان	انگور	مرکز	۵۵۰۰۱۰.۱ ۳۶۲۲۵۵.۵	۱۳۰۰	دی ۹۱
SHU.J.09	سمنان	شاهرود	رویان	جو	حاشیه	۵۴۵۹۵۶.۹ ۳۶۲۱۱۷.۶	۱۲۶۷	دی ۹۱
SHU.J.10	سمنان	شاهرود	شهنما	سبزی - کاری	حاشیه	۵۵۰۰۳۰.۲ ۳۶۲۴۰۰.۰	۱۳۲۵	دی ۹۱
SHU.J.11	سمنان	شاهرود	شهنما	سبزی - کاری	حاشیه	۵۴۵۷۵۴.۵ ۳۶۲۴۰۹.۲	۱۳۳۰	دی ۹۱
SHU.J.12	سمنان	شاهرود	شهنما	گلادی	حاشیه	۵۴۵۷۵۶.۹ ۳۶۲۴۱۵.۷	۱۳۳۶	دی ۹۱
SHU.J.13	سمنان	شاهرود	شهنما	سبزی - کاری	حاشیه	۵۴۵۸۰۲.۶ ۳۶۲۴۰۸.۵	۱۳۲۹	دی ۹۱
SHU.J.14	سمنان	شاهرود	شهنما	گردو	حاشیه	۵۴۵۷۵۶.۷ ۳۶۲۴۱۷.۱	۱۳۳۳	دی ۹۱
SHU.J.15	سمنان	شاهرود	شهنما	آلو	حاشیه	۵۴۵۸۰۷.۵ ۳۶۲۴۱۴.۳	۱۳۳۶	دی ۹۱
SHU.J.17	سمنان	شاهرود	شهنما	زردآلو	مرکز	۵۴۵۸۰۴.۵ ۳۶۲۴۱۱.۲	۱۳۳۳	دی ۹۱
						۵۴۵۷۵۱.۵		

SHU.J.19	سمنان	شاهرود	شهنا	گوچه -	حاشیه	۳۶۲۴۱۱.۵	۱۳۳۳	دی ۹۱
				فرنگی		۵۴۵۷۵۳.۷		
SHU.J.20	سمنان	شاهرود	شهنا	سبزی -	مرکز	۳۶۲۴۰۲.۱	۱۳۲۶	دی ۹۱
				کاری		۰۵۴۵۷۵۶		
SHU.J.21	گیلان	چابکسر	سرولات	نمونه ۲	---	۳۶۵۶۵۱.۹	۳۱۸	دی ۹۱
						۵۰۳۱۳۰.۳		
SHU.J.22	گیلان	چابکسر	سرولات	نمونه ۵	---	۳۶۵۶۵۱.۹	۳۸۱	دی ۹۱
						۵۰۳۱۳۰.۳		
SHU.J. 23	گلستان	گرگان	نهارخوران	نمونه ۷	---	۳۶۴۳۱۷.۴	۱۲۹۷	دی ۹۱
						۰۵۴۲۴۵۱.۶		
SHU.J.24	گلستان	گرگان	نهارخوران	نمونه ۴	مرکز	۳۶۴۳۱۷.۴	۱۲۹۷	دی ۹۱
						۵۴۲۴۵۱.۶		
SHU.J.25	سمنان	شاهرود	شهرک	شهرک	مرکز	۳۶۲۳۳۵.۱	۱۳۳۰	دی ۹۱
			دانشگاه	دانشگاه		۵۴۵۶۲۸.۳		
SHU.J.26	سمنان	شاهرود	شهنا	سبزی -	مرکز	۳۶۲۴۰۱.۸	۱۳۲۳	دی ۹۱
				کاری		۵۴۵۷۵۶.۳		
SHU.J.27	البرز	کرج	فردیس	آلو	مرکز	۳۵۴۹۱۵.۶	۱۳۶۳	دی ۹۱
						۵۰۵۹۲۵.۱		
SHU.J.28	سمنان	شاهرود	شهنا	سبزی -	حاشیه	۳۶۲۴۲۰.۷	۱۳۴۱	دی ۹۱
				کاری		۰۵۴۵۸۱۰.۶		
SHU.J.29	سمنان	شاهرود	شهنا	گوچه -	مرکز	۳۶۲۴۱۱.۶	۱۳۳۲	دی ۹۱
				فرنگی		۰۵۴۵۷۵۲.۸		
SHU.J.30	سمنان	شاهرود	شهنا	سبزی -	مرکز	۳۶۲۴۲۰.۵	۱۳۴۱	دی ۹۱
				کاری		۵۴۵۸۱۰.۳		
SHU.J.31	سمنان	شاهرود	شهنا	زردآلو	حاشیه	۳۶۲۴۱۱.۳	۱۳۳۱	دی ۹۱
						۰۵۴۵۷۵۱.۹		
SHU.J.033	سمنان	شاهرود	شهنا	گردو	مرکز	۳۶۲۴۱۷.۹	۱۳۲۴	دی ۹۱
						۰۵۴۵۸۰۷.۴		
SHU.J.34	مازندران	رامسر	رامسر	مرکبات	مرکز	۳۶۴۹۱۸.۱	-۲۰	دی ۹۱
						۰۵۰۵۰۴۹.۰		
SHU.J.35	سمنان	شاهرود	جنگل ابر	نمونه ۶	---	۳۶۳۸۵۱.۰	۲۱۸۹	دی ۹۱
						۰۵۵۱۱۲۳.۰		

جدول ۳ ضمیمه: درصد همولوژی میان مناطق ITS، ۱۲ گونه‌ی متفاوت *Metarhizium* و ۳۰ جدایه توالی‌یابی شده

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵
<i>M. velutinum</i>	۹۵/۹	۹۵/۹	۹۶/۵	۹۵/۹	۹۶/۳	۹۵/۹	۹۶/۵	۹۵/۹	۹۵/۹	۸۳/۴	۹۳/۰	۹۶/۳	۹۶/۳	۹۶/۵	۴۵/۲
<i>M. album</i>	۶۹/۷	۶۹/۷	۶۹/۷	۶۹/۷	۶۹/۵	۶۹/۷	۶۹/۷	۶۹/۷	۶۹/۷	۶۲/۰	۶۸/۸	۶۷/۱	۶۹/۳	۶۹/۹	۴۳/۱
<i>M. flavoviride</i>	۶۴/۱	۶۴/۱	۶۳/۷	۶۴/۵	۶۲/۶	۶۴/۱	۶۳/۷	۶۴/۱	۶۴/۱	۶۷/۶	۶۵/۴	۶۱/۳	۶۲/۵	۶۳/۴	۴۲/۴
<i>M. anisopliae</i>	۹۵/۰	۹۵/۰	۹۵/۷	۹۵/۰	۹۵/۹	۹۵/۰	۹۵/۷	۹۵/۰	۹۵/۰	۸۲/۶	۹۲/۱	۹۵/۹	۹۵/۹	۹۶/۱	۴۴/۹
<i>M. acridum</i>	۷۶/۵	۷۶/۵	۷۶/۸	۷۶/۵	۸۰/۵	۷۶/۵	۷۶/۸	۷۶/۵	۷۶/۵	۶۶/۴	۷۳/۹	۸۱/۶	۸۰/۶	۷۷/۴	۴۵/۷
<i>M. brunneum</i>	۹۴/۶	۹۴/۶	۹۵/۲	۹۴/۶	۹۵/۹	۹۴/۶	۹۵/۲	۹۴/۶	۹۴/۶	۸۲/۳	۹۱/۷	۹۵/۹	۹۵/۹	۹۵/۷	۴۴/۸
<i>M. globosum</i>	۷۷/۱	۷۷/۱	۷۷/۶	۷۷/۱	۸۱/۱	۷۷/۱	۷۷/۶	۷۷/۱	۷۷/۱	۶۷/۰	۷۴/۶	۸۲/۲	۸۱/۵	۷۸/۰	۴۵/۱
<i>M. guizhouensis</i>	۸۵/۸	۸۵/۸	۸۵/۱	۸۵/۸	۸۱/۴	۸۵/۸	۸۵/۱	۸۵/۸	۸۵/۸	۹۵/۷	۸۷/۷	۸۰/۳	۸۱/۰	۸۴/۷	۴۵/۵
<i>M. lepidiotae</i>	۸۷/۹	۸۷/۹	۸۸/۵	۸۷/۹	۹۲/۰	۸۷/۹	۸۸/۵	۸۷/۹	۸۷/۹	۷۷/۰	۸۵/۲	۹۲/۰	۹۲/۰	۸۸/۹	۴۳/۶
<i>M. majus</i>	۹۵/۷	۹۵/۷	۹۵/۹	۹۵/۷	۹۵/۷	۹۵/۷	۹۵/۹	۹۵/۷	۹۵/۷	۸۳/۴	۹۲/۸	۹۴/۸	۹۵/۷	۹۵/۹	۴۶/۰
<i>M. pingshaense</i>	۹۴/۶	۹۴/۶	۹۵/۲	۹۴/۶	۹۵/۹	۹۴/۶	۹۵/۲	۹۴/۶	۹۴/۶	۸۲/۳	۹۱/۷	۹۵/۹	۹۵/۹	۹۵/۷	۴۴/۷
<i>M. robertsii</i>	۹۶/۱	۹۶/۱	۹۶/۱	۹۶/۱	۹۴/۸	۹۶/۱	۹۶/۱	۹۶/۱	۹۶/۱	۸۵/۵	۹۴/۶	۹۴/۴	۹۴/۸	۹۵/۹	۴۵/۳

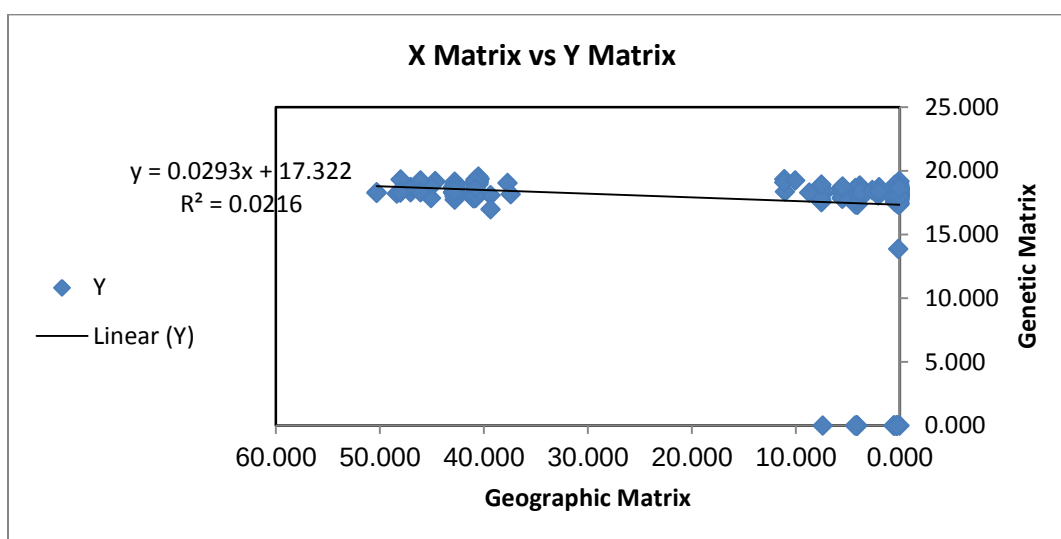
1= SHU.J.35 2= SHU.J.34 3= SHU.J.06 4= SHU.J.28 5= SHU.J.29 6= SHU.J.19 7= SHU.J.09 8= SHU.J.31 9= SHU.J.15 10= SHU.J.26 11= SHU.J.30 12= SHU.J.27 13= SHU.J.12 14= SHU.J.01 15= SHU.J.11

ادامه جدول ۳ ضمیمه: درصد همولوژی میان مناطق ITS، ۱۲ گونه‌ی متفاوت *Metarhizium* و ۳۰ جدایه توالی‌یابی

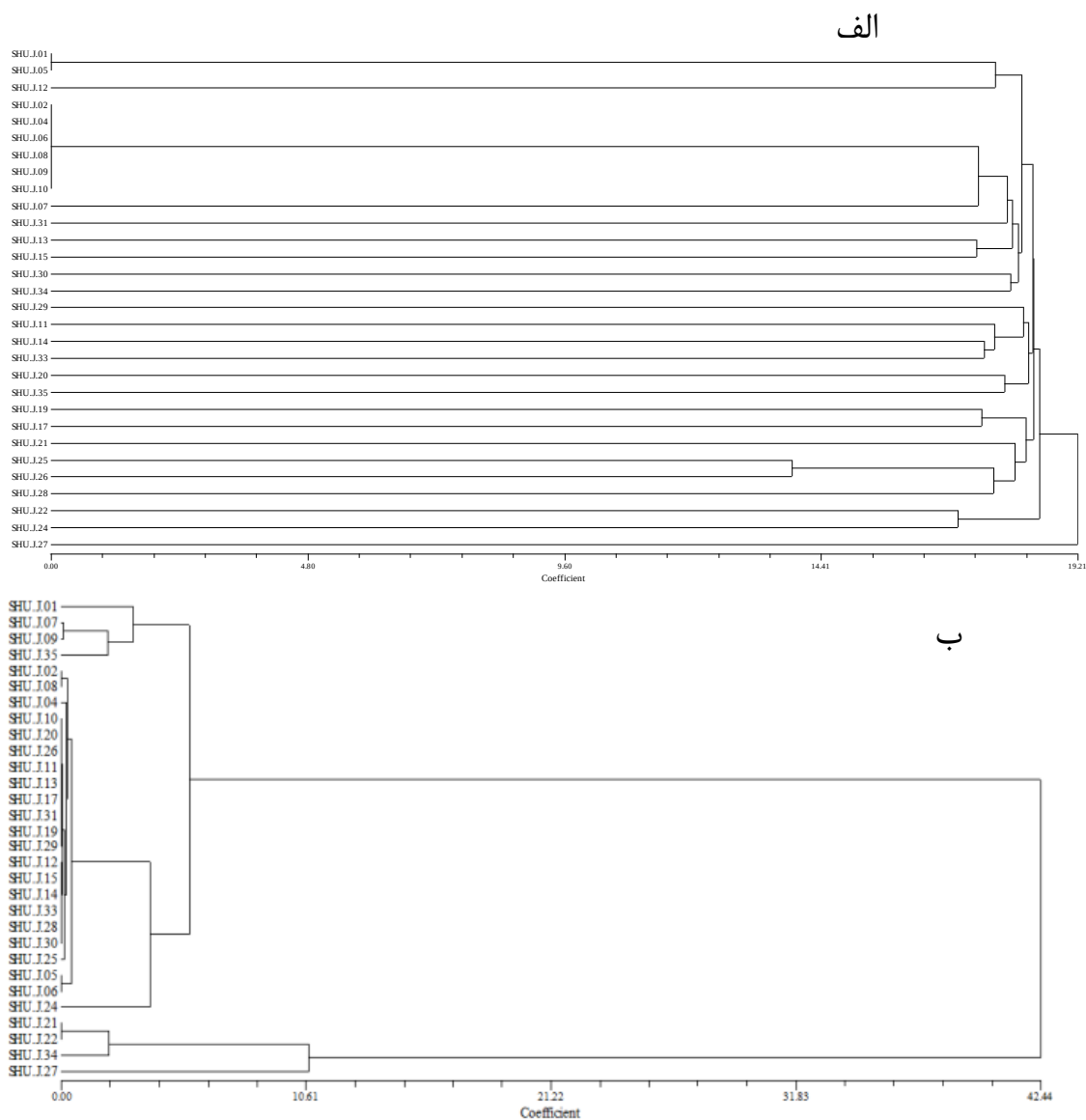
	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰
<i>M. velutinum</i>	۴۵/۱	۴۵/۴	۴۵/۳	۴۹/۱	۴۹/۳	۹۱/۱	۸۲/۶	۳۲/۷	۹۶/۷	۴۴/۹	۴۵/۶	۴۵/۷	۴۶/۵	۴۵/۸	۴۳/۶
<i>M. album</i>	۴۴/۸	۴۴/۷	۴۵/۰	۴۱/۰	۴۳/۴	۶۷/۳	۶۰/۵	۳۳/۱	۶۷/۱	۴۶/۱	۴۵/۸	۴۳/۹	۴۴/۹	۴۳/۵	۴۳/۵
<i>M. flavoviride</i>	۴۲/۵	۴۳/۳	۴۲/۵	۴۱/۲	۴۳/۲	۵۹/۳	۵۸/۵	۳۳/۱	۶۰/۹	۴۶/۱	۴۵/۹	۴۳/۴	۴۳/۲	۴۳/۰	۴۳/۲
<i>M. anisopliae</i>	۴۵/۵	۴۵/۵	۴۵/۷	۴۸/۵	۴۹/۵	۹۰/۹	۶۷/۸	۳۲/۸	۹۶/۳	۴۴/۵	۴۴/۷	۴۶/۰	۴۷/۰	۴۶/۲	۴۴/۰
<i>M. acridum</i>	۴۴/۰	۴۴/۴	۴۴/۴	۴۱/۶	۴۴/۷	۸۲/۰	۸۰/۲	۳۲/۲	۸۲/۵	۴۶/۲	۴۶/۱	۴۲/۹	۴۵/۳	۴۴/۵	۴۳/۹
<i>M. brunneum</i>	۴۵/۱	۴۵/۱	۴۵/۳	۴۸/۶	۴۹/۳	۹۱/۵	۹۸/۷	۳۰/۶	۹۶/۳	۴۴/۳	۴۴/۸	۴۵/۷	۴۶/۵	۴۵/۶	۴۳/۵
<i>M. globosum</i>	۴۳/۰	۴۴/۳	۴۳/۲	۴۲/۰	۴۴/۶	۸۳/۲	۸۰/۷	۳۱/۸	۸۳/۴	۴۴/۹	۴۴/۹	۴۳/۴	۴۶/۳	۴۳/۹	۴۴/۱
<i>M. guizhouense</i>	۴۵/۳	۴۵/۴	۴۴/۵	۵۰/۳	۵۱/۶	۷۴/۸	۸۱/۸	۳۳/۱	۷۹/۶	۴۵/۳	۴۵/۳	۴۵/۶	۴۵/۸	۴۵/۵	۴۳/۹
<i>M. lepidiotae</i>	۴۴/۱	۴۴/۰	۴۴/۳	۴۶/۸	۴۷/۹	۸۶/۹	۷۶/۱	۳۱/۶	۹۲/۴	۴۲/۹	۴۲/۹	۴۵/۱	۴۵/۸	۴۴/۴	۴۳/۶
<i>M. majus</i>	۴۶/۲	۴۵/۱	۴۶/۲	۴۸/۷	۵۰/۰	۸۸/۹	۹۰/۱	۳۲/۴	۹۴/۴	۴۶/۶	۴۶/۹	۴۷/۰	۴۶/۰	۴۶/۴	۴۴/۴
<i>M. pingshaense</i>	۴۵/۴	۴۵/۲	۴۵/۶	۴۸/۳	۴۹/۱	۹۰/۹	۸۲/۶	۳۱/۰	۹۶/۳	۴۴/۶	۴۴/۳	۴۵/۶	۴۶/۵	۴۵/۹	۴۳/۷
<i>M. robertsii</i>	۴۵/۳	۴۳/۸	۴۵/۴	۴۹/۳	۵۰/۰	۸۸/۷	۸۱/۷	۳۲/۳	۹۴/۴	۴۶/۰	۴۴/۹	۴۵/۶	۴۵/۳	۴۵/۷	۴۳/۳

16= SHU.J.05 17= SHU.J.17 18= SHU.J.33 19= SHU.J.14 20= SHU.J.20 21= SHU.J.02 22= SHU.J.07 23= SHU.J.13 24= SHU.J.22 25= SHU.J.25 26= SHU.J.04 27= SHU.J.08 28= SHU.J.24 29= SHU.J.10 30=

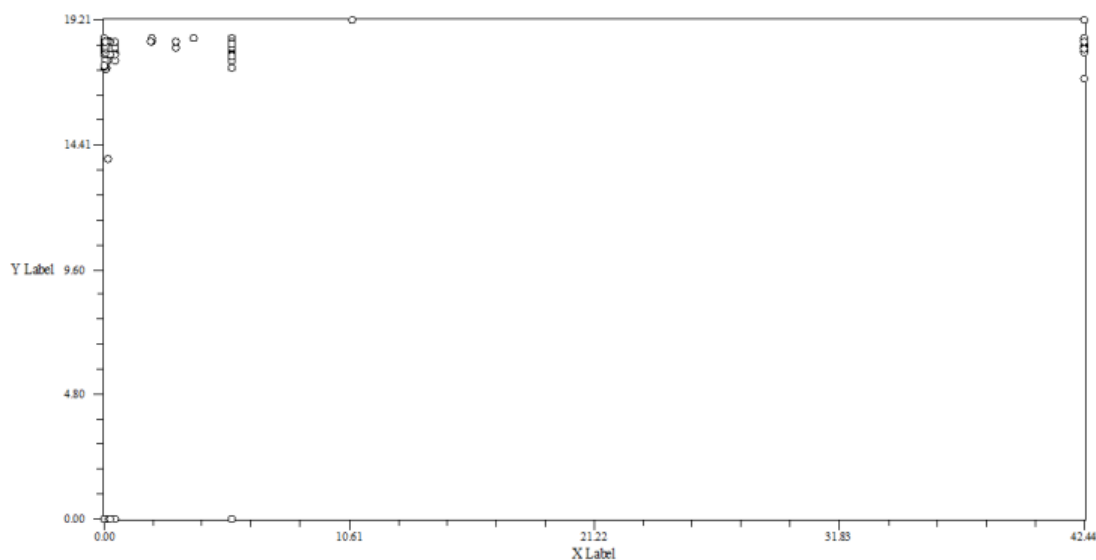
ضمیمه ۴



نمودار همبستگی میان تنوع ژنتیکی ناحیه ITS سی جدایه و تنوع جغرافیایی. این نمودار با وارد کردن ۲ ماتریس فاصله ژنتیکی (محور Y) و فاصله جغرافیایی (محور X) به تست منتل نرم افزار GenAlEx 6.5 به دست آمده است و با توجه به داده‌های حاصل از آن می‌بینیم میان دو پارامتر همبستگی وجود ندارد (ضریب کوفنتیک همبستگی ۱۴/۴٪ محاسبه شده است)



درختچه‌های UPGMA (مبتنی بر فاصله) رسم شده برای ماتریس‌های ژنتیکی و جغرافیایی بر پایه نرم‌افزار NTSYS 2.02e (الف) درختچه رسم شده برای ماتریس ژنتیکی (ب) درختچه رسم شده برای ماتریس جغرافیایی



نمودار حاصل از بررسی همبستگی کوفاکتیک دو ماتریس فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی بر اساس نرم افزار NTSYS. همان طور که در شکل ملاحظه می فرمایید نقاط از خط اصلی دور هستند و پیوستگی مشاهده نمی شود و پایین بودن ضریب کوفاکتیک میان این دو پارامتر تأییدی بر عدم همبستگی میان دو پارامتر است. X و Y به ترتیب ماتریس جغرافیایی و ماتریس ژنتیکی هستند. لازم به ذکر است این آزمون برای تأیید تست منتل GenAlEx 6.5 صورت گرفت.

منابع

1. White T. J. Bruns T. Lee S. and Taylor J. (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal Ribosomal RNA genes for phylogenetics." **Genetic and evolution** 3, pp 315- 322.
2. Bellemain E. Carlsen T. Brochmann C. Coissac E. Taberlet P. and Kauserud H. (2010). "ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases" **BMC Microbiology** 10, pp1-9.
3. Humber R. A. (1997). "Chapter V-1: Fungi: Identification." Manual of techniques in insect pathology 10 153-185.
4. Gao Q. Jin K. Ying S. Zhang Y. Xiao G. Shang Y. Duan Z. Hu X. Xie X. Zhou G. Peng G. Luo Z. Huang W. Wang B. Fang W. Wang S. Zhong Y. Ma L. St. Leger R. J. Zhao G. Pei Y. Feng M. Xia Y. Wang C. (2011). "Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*." **Plos Genetics** 7, pp1-18.
5. Talwar B. H. (2005). PhD. thesis, "Isolation and characterization of entomopathogenic fungi and their effectiveness." In Agricultural of Microbiology (University of Agricultural Sciences Dharwad University of agricultural sciences Dharwad- 580 005) pp. 129.
6. Beigi M. A. (2012). PhD.thesis "Efficacy of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae) and *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae)" Newcastle UK Newcastle University pp. 1-116.
7. Bridge M. Humber R. A. Parker B. L. and Skinner M. (1993). "Fungal entomopathogens recovered from vermont forest soils." **Mycologia** 85, pp358-361.
8. 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](http://www.orgprints.org/11200). pp. 1-18.
9. Stoner K. (1914). "Approaches to the biological control of insects." **The university of Maine** 1, pp 1-8.
10. Santi L. Silva W. O. B. Pinto A. F. M. Schrank A. and Vainstein H. M. (2010). "*Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods." **Fungal biology** 114, pp 312-319.
11. Shahid A. A. Rao A. Q. Bakhsh A. and Husnain T. (2012). "Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity" **Arch**

Biol Sci Belgrade 64, pp 21-42.

12. 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** 1, pp15-22.
13. Humber R. A. (2011). "Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrate. Insect Mycologist and Curator " **ARSEF** 20, pp1-10.
14. 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.
15. 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.
16. Khan S. Guo L. Maimaiti Y. Mijit M. and Qiu D. (2012). "Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent." **Molecular plant breeding** 3, pp63-79.
17. Batko A. (1974). "Phylogensis and taxonomic structure of the Entomophthoraceae." **Metodologica** 1, pp209-305.
18. Benjamin R. (2001). "Major orders and genera of necrotrophic fungal parasites that attack arthropods." **Biodiversity of Fungi** 1, pp10-12.
19. Entz S.C. (2005). PhD. thesis "Molecular methods and isolation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for environmentally sustainable control of grasshoppers in Canada." In School of Graduate Studies (Alberta Canada University of Lethbridge) pp. 1-141.
20. Bischoff J. F. Rehner S. A. and Humber R. A. (2009). "A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage." **Mycologia** 101, pp512-530.
21. Mouatcho J. C. (2010). PhD. thesis "The use of entomopathogenic fungi against *Anopheles funestus* Giles (Diptera: Culicidae)." In Faculty of Science (Johannesburg University of the Witwatersrand) pp. 189.
22. Schneider S. Rehner S. A. Widmer F. and Enkerli J. (2011). "A PCR-based tool for cultivation-independent detection and quantification of *Metarhizium* clade 1." **Journal of Invertebrate Pathology** 108, pp 106-114.
23. Milner R. J. Baker G. I. Hooper G. H. S. and Prior C. (1997). "Development of a mycoinsecticide for the Australian plague locust New Strategies in Locust Control.

-
- An integrated pest management strategy for the African grasshopper" **Zonocerus variegatus**, pp283-292.
24. Zimmerman G. (2007). "Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ." **Biocontrol Science and Technology** 17, pp 879-920.
 25. Glare T. R. Goettel M. S. and Eilenberg J. (2010)." Addendum: entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations 2004-2009." **Biology** 15, pp20-35.
 26. Jaronski S. T. (2000). " Beauveria and other fungi: tools to help manage coffee berry borer not magic bullets." **Mycotoxin** 20, pp1-90.
 27. Dimbi S. Maniania N. K. Lux S. A. and Mueke J. M. (2002)." Effect of constant temperatures on germination radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of african tephritid fruit flies." **Med Entomol** 39, pp723-728.
 28. Galagan J. E. Henn M. R. and Ma L. (2013). "Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology." **Genome Res** 15, pp1620-1631.
 29. Kava-Cordeiro V. De -Queiroz M. V. Pizzirani-Kleiner A. A. and Azevedo J. L. (2005). "Pulsed field gel electrophoresis reveals chromosome length and number differences in Brazilian strains of *Metarhizium anisopliae* ." **Brazilian archives of Biology and Technology** 48, pp1-6.
 30. Shimizu S. Arai Y. and Matsumoto T. (1992). "Electrophoretic karyotype of *Metarhizium anisopliae* ." **Journal of Invertebrate Pathology** 60, pp 185-187.
 31. Valadares-Inglis M. C. and Peberdy J. F. (1998). "Variation in the electrophoretic karyotype of Brazilian strains of *Metarhizium anisopliae* ." **Genetics and Molecular Biology** 21, pp 1-15.
 32. Hegedus D. D. and Khachatourian G. G. (1993). "Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* and *Metarhizium*." **Applied and Environmental microbiology** 59, pp4283-4288.
 33. Ghikas D. V. Kouvelis V. and Typas A. M. (2006). "The complete mitochondrial genome of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* : gene order and trngene clusters reveal a common evolutionary course for all Sordariomycetes while intergenic regions show variation." **Arch Microbiol** 185, pp393-401.
 34. Castrillo L. A. and Humber R. A. (2008). "Molecular methods for identification and diagnosis of fungi" *Insect pathogens molecular approaches and techniques* 1, pp50-70.

35. Wijedasa M. H. and Liyanapathirana L. C. V. (2012). "Evaluation of an alternative slide culture technique for the morphological identification of fungal species." **Sri Lanka Journal of Infectious Diseases** 2, pp 47-52.
36. Neelapu N. R. R. Reineke A. Chanchala U. M. R. and Koduru U. D. (2009). "Molecular phylogeny of asexual entomopathogenic fungi with special reference to *Beauveria bassiana* and *Nomuraea rileyi*" **Rev Iberoam Micology** 26, pp129-145.
37. Sosa-Goomez D. R. Humbe R. A. Hodge K. T. Binnece E. and da Silva-Brandaño K. L. (2009). "Variability of the mitochondrial SSU rDNA of *Nomuraea* species and other entomopathogenic fungi from Hypocreales." **Mycopathologia** 167, pp 145-154.
38. Somasundaram S. T. and Kalaiselvam M. (2005). "Molecular tools for assessing genetic diversity." **Journal of Annamalai University** 1, pp 82-91.
39. Stockinger H. Kruger M. and Schu"bler A. (2010). "DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi." **New Phytologist** 187, pp 461-474.
40. Marquez M. Iturriaga E. A. Quesada-Moraga E. Santiago-Alvarez C. and Monte E. Hermosa R. (2006). "Detection of potentially Valuable polymorphism in 4 group 1 intron insertion sites at the 3 end of the LUS rDNA genes in biocontrol isolates of *Metarhizium anisopliae* ." **BMC Microbiology** 6, pp1471-2180.
41. 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." **Turk J Biol** 36, pp 255-265.
42. Amer M. M. El-Sayed T. I. Bakheit H. K. Moustafa S. A. and El-Sayed Y. A. (2008). "Pathogenicity and genetic variability of five entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis*". **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences** 4, pp354-367.
43. Boucias D.G. Tigano M.S. Sosa-Gomez D. R. Glare T.R. and Inglis P.W. (2000). "Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*." **Biological Control** 19, pp124 -138.
44. Cobb B. D. and Clarkson G. M. (1993). "Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR." **FEMS Microbiology Letters** 12, pp319-324.
45. Driver F. Milner R. J. and Trueman J. W. (2000). "A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data." **Mycological Research** 104, pp134-150.

46. Leal S. C. M. Bertioli D. J. Butt T. M. and Peberdy J. F. (1994). "Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR." **Mycological Research** 98, pp1077-1081.
47. Sheng Kao S. Tsai Y. Yang P. and Hung T. (2002). "Use of random amplified polymorphic DNA to characterize entomopathogenic fungi *Nomuraea* spp. *Beauveria* spp. and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from Taiwan and China." **Formosan Entomol** 22, pp 125-134.
48. Bridge P. Williams M. Prior C. and Paterson R. (1993). "Morphological biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*." **Microbiology** 139, pp1163-1170.
49. Enkerli J. Ghormade V. Oulevey C. and Widmer F. (2009). "PCR-RFLP analysis of chitinase genes enables efficient genotyping of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* ." **Journal of Invertebrate Pathology** 102, pp185-188.
50. Inglis G. D. Duke G. M. Goettel M. S. and Kabaluk J. T. (2008). "Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. " **Journal of Invertebrate Pathology** 98, pp101-113.
51. Pipe N. D. Chandler D. Bainbridge B. W. and Heale J. B. (1995). "Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ." **Mycological Research** 99, pp 485-491.
52. Enkerli J. Widmer F. Gessler C. and Keller S. (2001). "Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*." **Mycol Res** 105, pp1079-1087.
53. Enkerli J. Kolliker R. Keller S. and Widmer R. (2005). "Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*." **Mol Ecol Notes** 5, pp384-386.
54. Meyling N.V. (2008). "PCR-based characterisation of entomopathogenic fungi for ecological studies." Deliverable 52 from VegQure by Nicolai V Meyling, pp1-14.
55. Curran J. Driver F. Ballard J.W.O. and Milner R. J. (1994). "Phylogeny of *Metarhizium* : analysis of ribosomal DNA sequence data." **Mycol Res** 98, pp547-552.
56. Liu Z. W. Guo H. L. and Kurtzman C. P. (1994). "Phylogeny of *Metarhizium* species as determined by partial ribosomal RNA sequences." **Acta Mycol Sinica** 13, pp139-151.
57. Huang B. Li C. Humber R. A. Hodge K. T. Fan M. and Li Z. (2005). "Molecular evidence for taxonomic status of *M. taii* and its teleomorph *Cordyceps taii* (

Hypocreales Clavicipitaceae)". **Mycotaxon** 94, pp137-147.

58. Kouvelis V. N. Typas M. A. and Bridge P. D. (1999). "Presense of a 20bp insertion/deletion in ITS1 region of *Verticillium lecanii*." **Letters in Applied Microbiology** 28, pp258-262.
59. Liu Z. Y. Liang Z. Q. Whalley A. J. S. Yao Y. J. and Liu A. Y. (2001). "*Cordyceps brittlebankisoides* a new pathogen of grubs and its anamorph *Metarhizium anisopliae* var. *majus*." **J Invert Pathol** 78, pp178- 182.
60. Nishi O. Hasegawa K. Iiyama K. Yasunaga-Aoki C. and Shimizu S. (2011). "Phylogenetic analysis of *Metarhizium* spp. isolated from soil in japan." **Appl Entomology and Zoology** 46, pp301–309.
61. Rodrigues Destéfano R. H. Lanza Destéfano S. A. and Messias C. L. (2004). "Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera Pyralidae) using specific primers." **Genetics and Molecular Biology** 27, pp 245-252.
62. Velásquez V. B. Cárcamo M. P. Meriño C. R. Iglesias A. F. and Durán J. F. (2007). "Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD SSR and ITS markers." **Genetics and Molecular Biology** 30, pp 89-99.
63. Baldwin B. G (1992). "Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae." **Molecular Phylogenetics and Evolution** 1, pp3-16.
64. Seena S. Pascoal C. Marvanová L. and Cássio F. (2010). "DNA barcoding of fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species." **Fungal Diversity** 44, pp 77-87.
65. Schindel D. Stoeckle M. Milensky C. Trizna M. Schmidt B. Gebhard C. and Graves G. (2011). "Project description: DNA barcodes of bird species in the national museum of natural history smithsonian institution USA." **ZooKeys** 152, pp 87-91
66. Zhao X. Pang S. Shan T. and Liu F. (2013). "Applications of three DNA barcodes in assorting intertidal red macroalgal flora in Qingdao China." **Journal of Ocean University of China** 12, pp 139-145.
67. Lewis C. T. Bilkhu S. Robert V. Eberhardt U. Szoke S. Seifert K. A. and Lévesque C. A. (2011). "Identification of fungal DNA barcode targets and PCR primers based on Pfam protein families and taxonomic hierarchy." **The Open Applied Informatics**

Journal 5, pp30-44.

68. Shenoy B. D. Jeewon R. and Hyde K. D. (2007). "Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi." **Fungal Diversity** 26, pp 1-54.
69. Jinbo U. Kato T. and Ito M. (2011). "Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology." **Entomological science** 14, pp107-124.
70. Inglis P. W. and Tigano M. S. (2006). "Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences." **Genetics and Molecular Biology** 29, pp132-136.
71. Liu Z. Liang Z. Liu A. Yao Y. Hyde K. D. and Yu Z. (2002). "Molecular evidence for teleomorph $\pm$ anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8S rDNA sequences." **Mycological Research** 106, pp1100-1108
72. Park J. Kim G. Park H. Nam B. An W. Cha J. Lee T. and Lee J. (2001). "Phylogenetic analysis of caterpillar fungi by comparing ITS1-5.8 S-ITS2 ribosomal DNA sequences." **Mycobiology** 29, pp 121-131.
73. Stensrud Ø. Hywel-Jones N. L. and Schumacher T. (2005). "Towards a phylogenetic classification of *Cordyceps* : ITS nrDNA sequence data confirm divergent lineages and paraphyly." **Mycological Research** 109, pp 41-56.
74. 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, pp359–370.
75. Pantou M. P. Mavridou A. and Typas M. A. (2003). "IGS sequence variation group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium* : excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis." **Fungal Genetics and Biology** 38, pp 159–174.
76. Yanaka-Schäfer F. Y. Dall'Onder L. P. Panichi M. C. Mendes R. G. Fagundes N. R. Bandinelli J. B. and Bogo M. R. (2008). "Sequence analysis of the rDNA intergenic spacer of *Metarhizium* strains isolated in Brazil." **Genetics and Molecular Biology** 31, pp 116-121.
77. Tangthirasun N. Poeaim S. Soyong K. Sommartya P. and Popoonsak S. (2010). "Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand." **Journal of Agricultural Technology** 6, pp 317-329.
78. Pereira de Lyra M. C. C. Bastos da Silva M. L. Cavalcanti A. L. B. and Santo Mergulhão A. C. E. (2012). "Characterization of *Metarhizium anisopliae* using amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis." **African Journal of Biotechnology** 11, pp 16635-

16639.

79. Luan F. Zhang S. Wang B. Huang B. and Li Z. (2013). "Genetic diversity of the fungal pathogen *Metarhizium* spp. causing epizootics in Chinese burrower bugs in the Jingting Mountains eastern China." **Molecular Biology Report** 40, pp515-523.
80. 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.
81. Sanchez-Pena S. San-Juan LJ 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.
82. 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, pp145-155.
83. Asensio O. L. Carbonell T. Lopez-Jimenez J. A. and Lopez-lorca L. V. (2003). "Entomopathogenic fungi in solis from Alicante province". **Journal of Agricultural Research** 1, pp37-45.
84. Benjamin M. A. Zhioua E. and Ostfeld R. (2002). "Laboratory and field evaluation of entomopathogenic fungus *M. anisopliae* var. *anisopliae* controlling questing adult *Ixodes scapularis*." **Med Entomol** 39, pp723-728.
85. Ble Kanga L. Jones W. and James A. (2003). "Field trials using the fungal pathogen *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee *Apis mellifera*. (Hymenoptera: Apidae) colonies." **Journal of Economic Entomology** 96, pp1091-1099.
86. Thi Loc N. Hi Bich Chi V. Thi Nhan N. Duc Thanh N. Thi Be Long T. and Quang Hung P. (2004). "Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* against coconut beetle *Brontispa longissima*." **Omonrice** 12, pp 85-91.
87. 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, pp839-846.
88. 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.

89. 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, pp1297–1302.
90. Kannan S. K. Murugan K. Kumar A. N. Ramasubramanian N. and Mathiyazhagan P. (2008). "Adulticidal effect of fungal pathogen *Metarhizium anisopliae* on malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae)." **African Journal of Biotechnology** 7, pp838-841.
91. Karimi J. and Kharazi-Pakdel A. (2009). "Pathogenicity and biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* in the management programme of the white grub *Polyphylla olivieri* (Col. melolonthidae)." **Biocontrol Journal**.
92. 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.
93. Barta M. (2010). "Pathogenicity assessment of Entomopathogenic fungi infecting *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coridae)". **Czech Mycol** 62, pp67-76.
94. 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, pp156-164.
95. Nahar P. B. Kulkarni S. A. Kulye M. S. Chavan S. B. Kulkarni G. Rajendran A. Yadav P. D. Shouche Y. and Deshpande M. V. (2008). "Effect of repeated in vitro sub-culturing on the virulence of *Metarhizium anisopliae* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)." **Biocontrol Science and Technology** 18, pp337-355.
96. 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, pp703-707.
97. Marannino 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, pp210-213.
98. 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 Würde eines." **Doktors der Philosophy Philosophisch-**

Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel).

99. Rath A. C. Carr Q. and Graham B. R. (1995). "Characterization of *Metarhizium anisopliae* strains by carbohydrate utilization (AP150CH)." **J Invert Pathol** 65, pp 152-161.
100. Whelan S. Li P. and N G. (2001). "Molecular phylogenetics: state of the art methods for looking into the past." **Trends in Genetics** 17, pp 262-272.
101. Begerow D. John B. and Oberwinkler F. (2004). "Evaluation relationship among B-tubulin gene sequences of basidiomycetous fungus." **Mycological Research** 108, pp1257-1263.
102. Campbell J. (2007). "Report of Planning workshop for all fungi DNA Barcoding." **Mycological Research** 56, pp1-50.
103. 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.
104. Sun B. and Liu X. (2008). "Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China." **Applied soil ecology** 39, pp 100-108.
105. Luz C. Netto M. and Rocha L. (2007). "In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate-pathogenic and saprobic fungi." **Mycopathologia** 164, pp39-47.
106. 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, pp248-251.
107. 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, pp44-49.
108. Rangel D. Dettenmaier S. Fernandes É. 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.
109. Humber R. A. (1998). "Entomopathogenic fungal identification APS/ESA workshop." **APS/ESA joint annual meeting** 1, pp3-26.
110. 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, pp305-315.

111. Plaza 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.
112. Tamura K. Peterson D. Peterson N. Stecher G. Nei M. and Kumar S. (2011). "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods." **Molecular Biology and Evolution** 28, pp 2731-2739.
113. Peakall R. and Smouse P. (2012). "GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update." **Bioinformatics Applications Note** 28, 2537–2539.
114. Rohlf F. (1997). "NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.02e." Exeter Software New York USA <http://www.exetersoftware.com/cat/ntsypc/ntsypc.html>.
115. 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, pp1027-1047.
116. Yoder J. Benoit J. Christensen B. Croxall T. and Hobbs III H. (2009). "Entomopathogenic fungi carried by the cave orb weaver spider *Meta ovalis* (Araneae Tetragnathidae) with implications for Mycoflora transfer to cave crickets." **Journal of Cave and Karst Studies** 71, pp 116–120.
117. 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.
118. 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* Herbs Coleoptera Tenebrionidae)." **Journal of the Islamic University of Gaza (Series of Natural Studies & Engineering)** 13, pp11-22.
119. Abbott W.S. (1925). "A method of computing the effectiveness of an insecticide". **Journal of Economic Entomology** 18, pp265-267.
120. Nishi O. Iiyama K. Yasuanga-Aoki C. and Shimizu S. (2010). "Incongruence between EF-1 α Phylogeny and Morphology of *Metarhizium majus* and *Metarhizium guizhouense* in Japan." **Entomotech** 34, pp19-23.
121. Bischoff J.F. Rehner S. A. and Humber R. A. (2006). "*Metarhizium frigidum* sp.

- nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex." **Mycologia** 98, pp737-745.
122. Spatafora J. W. Sung G. H. Sung J. M. Hywel-Jones N. L. and White J. F. J. (2007). "Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes." **Mol Ecol** 16, pp 1701-1711.
 123. Yip H. Rath A. and Koen T. (1992). "Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae *Adoryphorus couloni*)." **Mycological Research** 96, pp 92-96.
 124. Bidochka M. J. Kamp A. M. Lavender T. M. Dekoning J. and Amritha A. N. (2001). "Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* uncovering cryptic species?" **Applied and Environmental Microbiology** 67, pp1335-1342.
 125. Hughes W. O. H. Thomsen L. Eilenberg J. and Boomsma J. J. (2004). "Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* ." **Journal of Invertebrate Pathology** 85, pp46-53.
 126. Bidochka M. J. Small C. L. N. and Spironello M. (2005). "Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ." **Environmental Microbiology** 7, pp1361-1368.
 127. Balachander M. Remadevi K.O. Sasidharan T. O. and Bai N. S. (2012). "Virulence and mycotoxic effects of *Metarhizium anisopliae* on Mahogany shoot borer *Hypsipyla robusta* (Lepidoptera: Pyralidae)". **Journal of Forestry Research** 23, pp651-659.
 128. Ghikas D. V. Kouvelis V. N. and Typas M. A. (2010). "Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1-5.8S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B.brongniartii*." **BMC Microbiology** 10, pp1-15.
 129. Sevim A. Demir I. Ho"fte 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.
 130. Sanchez-Pena S. San-Juan LJ 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.

131. Masoudi A. (2013). Msc. thesis. "Genetic diversity of soil-born entomopathogenic fungi from citrus orchad." In **Agronomy and Plant Breeding Department College of Agriculture (Shahrood, Semnan, Shahrood University)** pp. 140.
132. 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.
133. Meyling N.V. and Elinberg J. (2006). "Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation." **Mycological Research** 110, pp188-195.
134. 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.
135. 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, pp177 - 185.
136. Safavi S. A. Shah F. A. Pakdel A. Z. Rasoulilian 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.
137. 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.
138. 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.
139. Zhang W. Sulz M. and Bailey K. L. (2001). "Growth and spore production of *Plectosporium tabacinum*." **Can J Bot** 79, pp 1297-1306.
140. 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, pp853-864.
141. Khashaveh A. and Sakenin Chelav H. (2013). "Laboratory bioassay of Iranian Isolates of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against two species of storage pest." **Agriculturae**

Conspectus Scientificus 78, pp35-40.

142. Michalaki M. P. Athanassiou C. G. Kavallieratos N. G. Batta Y. A. and Balotis G. N. (2006). "Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin applied alone or in combination with diatomaceous earth against *Tribolium confusum* Du Val larvae: Influence of temperature relative humidity and type of com-modity." **Crop protection** 25, pp418-425.
143. 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, pp593-603.
144. Samuels K. D. Z. Heale J. B. and Llewellyn M. (1989). "Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. **Journal of Invertebrate Pathology** 53, pp 25-31.
145. 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.
146. Al-Aidroos K and W R.D. (1978). "Mutant of *Metarhizium anisopliae* with increase virulence toward Mosquito larvae". **Canadian Journal of Genetics and Cytology** 20, pp211-219.
147. Hassan A. E. M. Dillon R. J. and Charnley A.K. (1989). "Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for manduca sexta." **J Invertebr Pathol** 54, pp277.
148. Han Q. Inglis G. D. and Hausner G. (2002). "Phylogenetic relationships among strains of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* as revealed by partialb-tubulin sequences and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis." **Letters in Applied Microbiology** 34, pp376-383.
149. De Muroa M. A. Mehta S. and Moore D. (2003). "The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries and their correlation with host and geographical origin." **FEMS Microbiology Letters** 229, pp249-257.

کنفرانس ها و همایش ها و مقالات چاپ شده

Abstract

Entomopathogenic fungi are widely distributed throughout the fungal kingdom. Some insect-pathogenic fungi have restricted host ranges, while others have a wide host range. Several species of fungi are potent biocontrol agents of plant pathogenic fungi and arthropods. *Metarhizium* spp. an entomopathogenic fungus well characterized for the biocontrol of a wide range of pest. *Metarhizium* spp. mainly identified based on the morphological and molecular characteristics. The objectives of this work were to isolate and identify varieties with ITS region. We investigated 22 isolates which collected from different soil from different sites of Shahrood and North of Iran. These isolates have been partially characterized using morphological traits such as Growth rate, Sporulation, pathogenicity against *Tribolium castaneum* (Col, Tenebrionidae). Morphological experiments indicated that there are correlation between 3 parameters. Internal transcribed spacer (ITS) and 5.8S rDNA sequences analysis was employed to identify species and genotypes. The ITS regions were amplified using the ITS1 and ITS4 primers that was a unique fragment of approximately 540 bp. The sequences were aligned using the Codon Code Aligner program and together with 12 isolates of *Metarhizium* available in the GenBank used for draw tree in Mega (Maximum Parsimony with 1000 bootstrap). Among 8 Clusters, 5 Clusters have 25 isolates of Shahrood and environs, didn't have any match known species and there are possibility of quality of 5 new species in these areas that need more molecular study with another markers. 5 identified isolates belong to *M. flavoviride*, *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. guizhouense* and *M. velutinum*.

Keywords: Entomopathogenic fungi, Identification, Internal transcribed spacer, Maximum Parsimony