Arc

Rostaniha 21(1): 49–64 (2020) رستنیها ۲۱(۱): ۶۴–۴۹ (۱۳۹۹)

DOI: 10.22092/BOTANY.2020.341369.1186

جداسازی و شناسایی قارچ‌های بیمارگر حشرات از خاک‌های زراعی و غیرزراعی در استان کرمانشاه*

دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۷ / پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۷

هادی مهرمرادی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

صمد جمالی✉: استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران (jamali454@yahoo.com; s.jamali@razi.ac.ir)

حمیدرضا پوریان: استادیار حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

چکیده

در راستای شناسایی قارچ‌های بیمارگر حشرات (انتوموپاتوژن‌ها)، از خاک‌های زراعی و غیرزراعی استان کرمانشاه نمونه‌برداری صورت گرفت. در مجموع، ۴۱ نمونه خاک از عمق ۱۵-۵ سانتی‌متری خاک از ۱۴ شهرستان استان کرمانشاه جمع‌آوری گردید. در نهایت، ۱۱۴ جدایه قارچی از خاک‌های مختلف جداسازی شد که بیش‌ترین جدایه‌ها به ترتیب از خاک‌های جنگل، مزرعه، مرتع و باغ به دست آمد. با استفاده از ابزار جستجوی BLAST، توالی‌های آی.تی.اس. دی.ان.ای. ریبوزومی به دست آمده با سایر آرایه‌های معتبر مستخرج از بانک ژن مقایسه گردید. در نهایت، گونه‌های *Aspergillus nomius**، *Fusarium oxysporum*، *F. equiseti*، *Fusarium* sp.، *Penicillium solitum*، *P. sizovae**، *Penicillium* sp.، *Alternaria chlamydosporigena*، *Meyerozyma guilliermondii*، *Paramyrothecium roridum*، *Chaetomium elatum*، *Beauveria bassiana*، *B. pseudobassiana** و *B. tenella** شناسایی شدند. گونه‌های ستاره‌دار نخستین بار برای فلور قارچی ایران گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: تاکسونومی، توالی ناحیه نسخه‌برداری شده داخلی دی.ان.ای. ریبوزومی، قارچ بیمارگر حشرات، کنترل بیولوژیک

Isolation and identification of entomopathogenic fungi from cultivated and natural soils in Kermanshah province (West of Iran)

Received: 17.03.2020 / Accepted: 16.06.2020

Hadi Mehrmoradi: MSc Student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

Samad Jamali✉: Assistant Prof., Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran (jamali454@yahoo.com; s.jamali@razi.ac.ir)

Hamid-Reza Pourian: Assistant Prof., Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

Summary

An investigation was carried out on the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in 41 soil samples collected from cultivated and natural regions in Kermanshah province (West of Iran) from July 2017 to April 2018. Among 41 soil samples, 114 fungal isolates were recovered with 39 from forests, 38 from fields, 22 from rangelands and 15 from garden soil. Based on the morphological characters and phylogeny of DNA sequence data for the internal transcribed spacer (ITS) rDNA and comparing the sequences with that available in NCBI database, the entomopathogenic fungi recovered were identified as: *Aspergillus nomius**, *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti*, *Fusarium* sp., *Penicillim solitum*, *P. sizovae**, *Penicillium* sp., *Alternaria chlamydosporigena*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Paramyrothecium roridum*, *Chaetomium elatum*, *Beauveria bassiana**, *B. pseudobassiana*, and *B. tenella**. The asterisk species are the new records for the mycobiota of Iran.

Keywords: Biological control, entomopathogenic fungi, *Ephestia kuehniella*, internal transcribed spacer, taxonomy

* مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده نخست به راهنمایی دکتر صمد جمالی ارایه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

حشرات آفت با ایجاد خسارت اقتصادی (کمی)، بهداشتی و کیفی همواره تاثیر منفی بر زندگی جوامع انسانی در سطوح مختلف داشته و به عنوان تهدیدی جدی در حوزه امنیت غذایی کشورها به شمار می‌آیند. خسارت حشرات به محصولات کشاورزی در کشورهای توسعه یافته سالانه به طور میانگین ۱۸٪ تخمین زده شده که این ارقام در کشورهای کم‌تر توسعه یافته این رقم بسیار بالاتر است (Lovett & Leger 2016).

تعدد کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی طیف وسیع (فسفره و کارباماته) برای کنترل آفات، باعث بروز عوارض منفی زیادی در محیط زیست و موجودات غیرهدف شده و سلامت مصرف‌کنندگان را به خطر انداخته است (Pourian *et al*. 2019). امروزه برای کاهش این اثرات ناخواسته، راهبردهای مختلفی برای کنترل خسارات حشرات زیان‌آور در قالب برنامه مدیریت تلفیقی آفات وجود دارد که مهم‌ترین آن‌ها استفاده از آفت‌کش‌های نسل جدید (بایورشنال‌ها) و عوامل کنترل بیولوژیک می‌باشد (Pourian *et al*. 2019). در این بین، روش‌های دیگر مانند دستکاری ژنتیکی گیاهان به منظور تولید ارقام تراریخته با قابلیت سنتز متابولیت سمی در برابر حشرات نیز به عنوان جایگزین روش شیمیایی وجود دارد که به دلیل هزینه‌های تولید بالا، نامعلوم بودن اثرات جانبی آن‌ها، در شبکه غذایی آگرواکوسیستم و نیز عوارض منفی احتمالی روی سلامت موجودات غیرهدف (به ویژه انسان) از نظر کاربردی در رده اهمیت پایین‌تری قرار گرفته و امروزه کاربرد این روش را با چالش بسیار جدی روبرو نموده است (Zhang *et al*. 2016, Lewis *et al*. 1997). کنترل بیولوژیک یکی از تاکتیک‌های اصلی و دوست‌دار محیط زیست در مدیریت تلفیقی آفات می‌باشد که شامل کاربرد ارگانیسم‌های زنده یا همان دشمنان طبیعی حشرات مثل پارازیتوییدها، شکارگرها و بیمارگرهای حشرات (entomopathogens) علیه آفات برای کنترل جمعیت آن‌ها می‌باشد (Pourian *et al*. 2019). در بین عوامل سه گانه کنترل بیولوژیک، چشم انداز کاربرد بیمارگرهای حشرات به ویژه قارچ‌های بیمارگر در کنترل حشرات زیان‌آور، طی دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Guijarro *et al*. 2007). جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر حشرات دارای مزایایی از قبیل سازگاری با محیط زیست، داشتن تخصص میزبانی روی حشره آفت، عدم تاثیر روی سایر گونه‌های غیرهدف از جمله انسان هستند که آن‌ها را تبدیل به عواملی بی‌خطر برای کاربرد در محصولات غذایی نموده است (Lacey *et al*. 2001, Pourian *et al*. 2019).

قارچ‌های بیمارگر و حشرات در اکوسفر، قدمت چند صد میلیون ساله دارند و طی هزاران سال کنش با یکدیگر در شبکه حیات به تکامل پایاپای رسیده‌اند. برهمکنش بین گونه‌های مختلف رده حشرات و قارچ‌های بیمارگر حشرات در اکوسیستم طبیعی منجر به ایجاد یک مکانیزم کنترل طبیعی و برقراری تعادل در تراکم جمعیت حشرات شده است، به ویژه اهمیت این تعادل در محیط‌هایی که به اوج (کلیمکس) رسیده‌اند (مانند جنگل) خود را نشان می‌دهد (Vega & Blackwell 2005).

در کنترل بیولوژیک کلاسیک، برای مدیریت تراکم جمعیت حشرات زیان‌آور در هر منطقه زیستی، استفاده از دشمنان طبیعی بومی و سازگار با اکوسیستم آن منطقه به دلیل تکامل پایاپای و استقرار حداکثری بسیار مورد توجه است. به همین دلیل، شناسایی گونه‌های کارآمد و ارزیابی ظرفیت کنترلی آن‌ها در کاهش جمعیت آفات بسیار ضروری می‌باشد (Van Dreiesh & Hoddle 2009). در بیش‌تر نقاط دنیا، پژوهش‌های کاربردی و جامعی برای یافتن گونه‌های مؤثر از قارچ‌های بیمارگر حشرات به منظور یک عامل کنترل بیولوژیک علیه آفات و حشرات ناقل بیماری صورت گرفته است. تحقیقات متعدد انجام شده تاکنون نشان می‌دهد که تنوع بالایی از قارچ‌های بیمارگر حشرات در زیستگاه‌های خاکی به ویژه خاک‌های غنی از مواد آلی وجود دارند (Mora *et al*. 2016). لذا این پتانسیل وجود دارد که در صورت جداسازی، شناسایی و ارزیابی گونه‌های کارآمد از قارچ‌های بیمارگر حشرات بومی، بتوان از آن‌ها برای کاربرد در برنامه‌های کنترل بیولوژیک آفات استفاده نمود (Meyling & Eilenberg 2007).

در ایران تاکنون، بررسی جامعی در خصوص جداسازی و شناسایی قارچ‌های بیمارگر حشرات از زیستگاه خاک با استفاده از طعمه حشره‌ای صورت نگرفته و معدود گزارش مربوط به پژوهش طهماسبی زاوه و همکاران (۲۰۱۳) است که در مطالعه خود دو گونه قارچ *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* را به روش طعمه حشره‌ای از خاک جداسازی کردند. تاکنون، مطالعات صورت گرفته در ایران بیش‌تر مربوط به جداسازی مستقیم قارچ‌های بیمارگر حشرات از لاشه حشرات مرده بوده که عمدتا گونه‌های *B. bassiana*، *B. brongniartii*، *Paecilomyces lilacinus*، *P. tenuipes*، *P. farinosus* و *Nomuraea riley* جداسازی و شناسایی شده است

www.SID.ir

Archive of SID

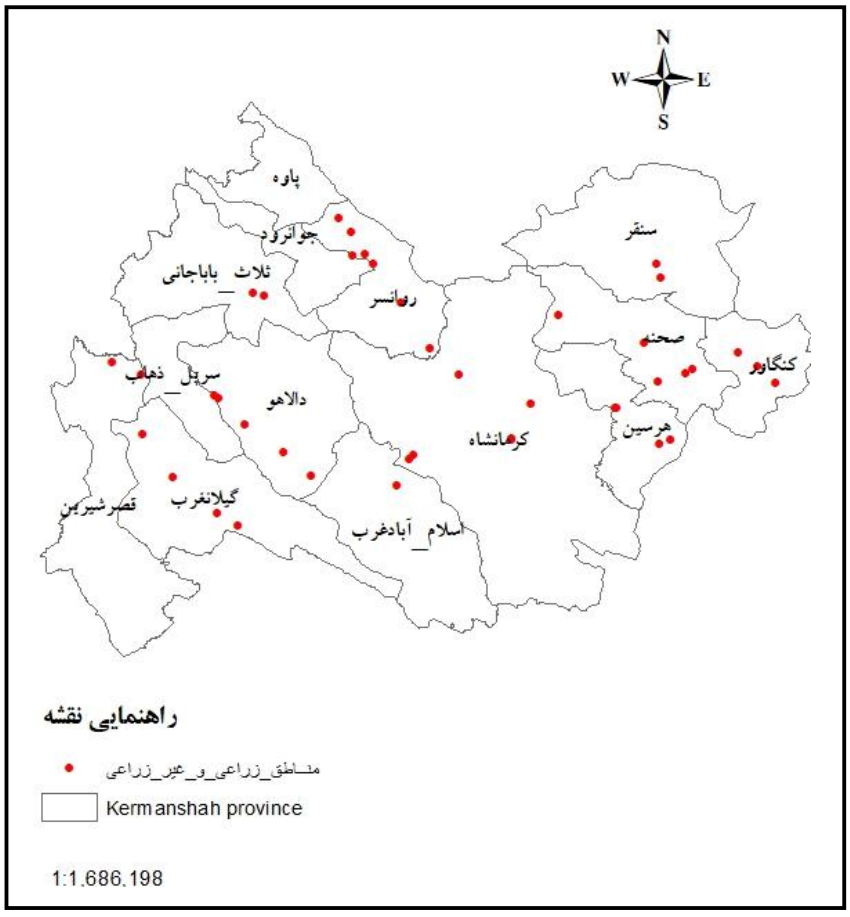
Ghazavi *et al.* 2005, Majidi Shilsar *et al.* 2007, Tahmasebi Zaweh *et al.* 2013).

در سال‌های اخیر، تلاش‌هایی برای تولید انبوه و تجاری‌سازی جدایه‌های بومی قارچ‌های بیمارگر حشرات صورت گرفته است (Javar & Parsi 2019). لذا با توجه به مطالعات صورت گرفته، فرضیه تحقیق حاضر این بود که در اکوسیستم کشاورزی و طبیعی غرب کشور گونه‌های قارچ بیمارگر حشرات با پتانسیل بیماری‌زایی روی آفات وجود دارد، لذا هدف مطالعه حاضر در مرحله اول جداسازی و شناسایی قارچ‌های بیمارگر حشرات با استفاده از طعمه حشره‌ای از خاک‌های کشاورزی (باغ و مزرعه) و اکوسیستم طبیعی (جنگل و مرتع) مناطق مختلف در استان کرمانشاه می‌باشد.

روش بررسی

- نمونه‌برداری از زیستگاه خاک

در این پژوهش، ۴۱ نمونه مختلف خاک مرتع، مزرعه، جنگل و باغ از مناطق زیستی مختلف استان کرمانشاه واقع در شهرستان‌های کرمانشاه، هرسین، اسلام‌آباد، صحنه، کنگاور، سنقر، سرپل ذهاب، گیلانغرب، قصرشیرین، پاوه، جوانرود، ثلاث باباجانی، کرندغرب و سنقر کلیایی از مرداد سال ۱۳۹۶ تا فروردین ۱۳۹۷ طبق روش می‌لینگ (Meyling 2007) با اندکی تغییرات جمع‌آوری شد (شکل ۱)، به این صورت که از یک مساحت ۵۰ مترمربعی در هر منطقه تعداد ۱۰ نمونه خاک از عمق ۵ تا ۱۵ سانتی‌متری جمع‌آوری و در نهایت یک نمونه مرکب به وزن دو کیلوگرم پس از ثبت مشخصات کامل در جعبه‌های یخی (۶۰ × ۴۰) به آزمایشگاه منتقل شد. مختصات جغرافیایی مکان نمونه‌برداری شامل طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا به وسیله دستگاه GPS مدل Garmin Etrex ثبت شد (جدول ۱).



شکل ۱- نقشه ژئورفرنس موقعیت جغرافیایی مکان‌های نمونه‌برداری شده برای جداسازی قارچ‌های بیمارگر حشرات در استان کرمانشاه.

Fig. 1. Geographic map and location of sampling sites for the separation of entomopathogenic fungi in Kermanshah province (West of Iran).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مختصات جغرافیایی مکان‌های نمونه‌برداری شده برای جداسازی قارچ‌های بیمارگر حشرات

مکان نمونه‌برداری	ماهیت زیستگاه	نوع زیستگاه	کد	طول جغرافیایی (E)	عرض جغرافیایی (N)	ارتفاع از سطح دریا (متر)
هرسین	غیرزراعی	جنگل	A1	۴۷° ۲۵′ ۲۱.۴″	۳۴° ۲۲′ ۲۶.۲″	۱۳۴۳
	زراعی	مزرعه	A2	۴۷° ۲۵′ ۴۷.۱″	۳۴° ۲۲′ ۲۴.۶″	۱۳۴۲
	غیرزراعی	مرتع	A3	۴۷° ۳۶′ ۵۶.۱″	۳۴° ۱۶′ ۴۶.۶″	۱۶۲۷
	زراعی	باغ	A4	۴۷° ۳۴′ ۲۳.۲″	۳۴° ۱۶′ ۲.۲″	۱۵۲۹
کرمانشاه	زراعی	مزرعه	B3	۴۶° ۵۲′ ۳۵.۸″	۳۴° ۲۸′ ۵۰.۶″	۱۳۲۰
	زراعی	باغ	B4	۴۷° ۰۳′ ۳۲.۳″	۳۴° ۱۷′ ۳۴.۴″	۱۴۳۶
	غیرزراعی	مرتع	B5	۴۷° ۰۳′ ۲۲.۱″	۳۴° ۱۷′ ۲۱.۰″	۱۴۴۲
	غیرزراعی	جنگل	B6	۴۷° ۰۷′ ۳۴.۶″	۳۴° ۲۳′ ۳۱.۰″	۱۳۵۵
پاوه	غیرزراعی	جنگل	C1	۴۶° ۳۰′ ۲۵.۳″	۳۴° ۵۴′ ۰۸.۱″	۱۶۲۰
	غیرزراعی	مرتع	C2	۴۶° ۲۷′ ۵۱.۷″	۳۴° ۵۶′ ۳۰.۹″	۱۶۵۳
	زراعی	مزرعه	C3	۴۶° ۳۳′ ۱۵.۷″	۳۴° ۵۰′ ۹.۱۵″	۱۶۲۷
صحنه	غیرزراعی	جنگل	D1	۴۷° ۴۲′ ۱۰.۹″	۳۴° ۲۸′ ۵۸.۵″	۱۴۰۸
	زراعی	مزرعه	D2	۴۷° ۴۰′ ۳۳.۲″	۳۴° ۲۸′ ۰۷.۰″	۱۲۶۰
	زراعی	باغ	D3	۴۷° ۳۴′ ۳۲.۴″	۳۴° ۲۶′ ۵۷.۲″	۱۲۲۰
	غیرزراعی	مرتع	D4	۴۷° ۳۱′ ۴۶.۳″	۳۴° ۳۳′ ۳۷.۱″	۱۴۴۷
کنگاور	غیرزراعی	مرتع	E1	۴۷° ۵۵′ ۳۵.۳″	۳۴° ۲۸′ ۵۸.۱″	۱۴۹۶
	زراعی	مزرعه	E2	۴۷° ۵۹′ ۲۴.۲″	۳۴° ۲۶′ ۰۳.۹″	۱۴۶۰
	زراعی	باغ	E3	۴۷° ۵۴′ ۱۰.۱″	۳۴° ۳۰′ ۱.۸۳″	۱۵۶۶
اسلام‌آباد	غیرزراعی	مرتع	F1	۴۶° ۴۲′ ۵۰.۷″	۳۴° ۱۵′ ۵.۴″	۱۴۲۵
	زراعی	مزرعه	F2	۴۶° ۳۹′ ۰.۶″	۳۴° ۰۹′ ۴۶.۵″	۱۵۱۸
	غیرزراعی	جنگل	F3	۴۶° ۴۱′ ۵۱.۰″	۳۴° ۱۴′ ۱۷.۲″	۱۴۷۲
روانسر	غیرزراعی	مرتع	G1	۴۶° ۴۶′ ۳۶.۸″	۳۴° ۳۳′ ۲۸.۶″	۱۳۰۰
	زراعی	مزرعه	G2	۴۶° ۴۰′ ۳۱.۱″	۳۴° ۴۱′ ۲۹.۵″	۱۳۵۹
جوانرود	غیرزراعی	مرتع	H1	۴۶° ۳۵′ ۲.۷″	۳۴° ۴۸′ ۲۷.۰″	۱۵۹۹
	غیرزراعی	جنگل	H2	۴۶° ۳۰′ ۳۳.۸″	۳۴° ۴۹′ ۴۸.۸″	۱۵۲۲
سرپل ذهاب	غیرزراعی	جنگل	J1	۴۶° ۰۷′ ۲۲.۱″	۳۴° ۲۰′ ۴۳.۶″	۱۴۴۳
	زراعی	مزرعه	J2	۴۶° ۰۱′ ۴۸.۴″	۳۴° ۲۵′ ۱۹.۴″	۱۱۵۰
	غیرزراعی	مرتع	J3	۴۶° ۰۱′ ۷.۴″	۳۴° ۲۵′ ۵۴.۳″	۱۰۷۰
کرندغرب	زراعی	مزرعه	I1	۴۶° ۲۱′ ۱۰.۱″	۳۴° ۱۱′ ۴۵.۰″	۱۴۴۱
	غیرزراعی	مرتع	I2	۴۶° ۱۵′ ۲۵.۵″	۳۴° ۱۵′ ۵۶.۰″	۱۵۱۶

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ (ادامه)

ثلاث باباجانی	غیرزراعی	مرتع	K1	″۳۹.۰ ′۱۱ °۴۶	″۴.۶ ′۴۳ °۳۴	۱۲۰۰
	زراعی	مزرعه	K2	″۹۷.۴ ′۹. °۴۶	″۴۴.۶ ′۴۳ °۳۴	۱۲۴۹
قصرشیرین	غیرزراعی	مرتع	L1	″۳۸.۸ ′۴۵ °۴۵	″۲۹.۳ ′۲۹ °۳۴	۵۲۰
	زراعی	مزرعه	L2	″۲۳.۳ ′۳۹ °۴۵	″۴۵.۹ ′۳۱ °۳۴	۴۵۳
گیلانغرب	غیرزراعی	مرتع	M1	″۴۴.۱ ′۴۵ °۴۵	″۱۶.۹ ′۱۹ °۳۴	۵۸۴
	زراعی	باغ	M2	″۱۱.۱ ′۵۲ °۴۵	″۳۹.۵ ′۱۱ °۳۴	۷۷۹
	غیرزراعی	جنگل	M3	″۲۱.۵ ′۰۱ °۴۶	″۲۷.۲ ′۰۵ °۳۴	۱۰۲۱
	زراعی	مزرعه	M4	″۴۰.۷ ′۰۵ °۴۶	″۱۲.۱ ′۰۳ °۳۴	۱۱۱۶
سنقر کلیایی	زراعی	مزرعه	N1	″۵۸.۸ ′۳۴ °۴۷	″۲۳.۷ ′۴۷ °۳۴	۱۶۷۳
	غیرزراعی	مرتع	N2	″۴۷.۸ ′۳۵ °۴۷	″۵۹.۲ ′۴۴ °۳۴	۱۷۸۱
	زراعی	باغ	N3	″۵۴.۰ ′۱۳ °۴۷	۵۷.۵ ′۳۸ °۳۴	۱۶۲۲

- جداسازی قارچ‌های دارای پتانسیل بیماری‌زایی از خاک با طعمه حشره‌ای

به منظور جداسازی قارچ‌های دارای پتانسیل بیماری‌زایی از خاک، از طعمه حشره‌ای استفاده شد. در این روش، از هر خاک مرکب، ۲۰۰ گرم خاک داخل لیوان ۲۵۰ گرمی ریخته و تعداد ۱۰ لارو سن سوم از شب‌پره بید آرد (*Ephestia kuehniella*) داخل هر لیوان و روی سطح خاک قرار داده شد. لاروهای که تازه پوست‌اندازی نموده و وارد سن سوم لاروی شده بودند انتخاب و قبل از قرار دادن آن‌ها روی سطح خاک زیر استریومیکروسکوپ از سالم بودن آن‌ها اطمینان حاصل شد و لاروهایی ضعیف یا کم‌تحرک قبل از انتقال حذف شدند. برای اثبات آلوده شدن لاروها، لیوان‌ها در محیط تاریک انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۵٪ به مدت یک هفته درون انکوباتور نگهداری شدند. در طول یک هفته، خاک لیوان‌ها را به آرامی زیرورو کرده و لاروهای مرده خارج شدند. اگر روی خاک، لارو به قارچ بیمارگر حشرات آلوده شده باشد، قارچ بعد از نفوذ به داخل بدن، ابتدا سطح داخلی را کلونیزه و کاملا آلوده کرده و در نهایت پس از مرگ حشره قارچ دوباره روی سطح خارجی جلد رشد می‌کند. طبق روش رایج در بیماری‌شناسی حشرات (Meyling 2007, Zimmermann 1986)، مراحل ضدعفونی و شست‌وشوی سه‌گانه (ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم ۱٪، الکل ۷۵٪ و شست‌وشو با آب مقطر) انجام شد. سپس، تحت شرایط سترون و زیر هود، لاروهای سترون شده را روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار حاوی آنتی‌بیوتیک فلورفنیکول ۱۰٪ (۰/۵ میلی‌لیتر در ۵۰۰ سی‌سی)، استرپتومایسین (۰/۰۵ گرم در ۰/۵ لیتر) و پنج قطره اسید لاکتیک ۴۵٪ قرار داده شدند. پس از گذشت دو هفته، تشتک‌های پتری کنترل شده و قارچ‌هایی که از سطح جلد بدن لارو رشد نموده بودند انتخاب و پس از کشت مجدد و خالص‌سازی، با استفاده از کلیدهای تاکسونومیکی معتبر شناسایی شدند (Humber 1997, Nelson *et al*. 1994, Samson *et al.* 1988). تمام جدایه‌ها همراه با شماره دسترسی به مجموعه قارچ‌های مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) ارسال شدند.

- آزمون زنده‌مانی (viability) و عبور قارچ از میزبان (host passage)

برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های به دست آمده، هر جدایه یکبار دیگر از میزبان حشره‌ای زنده به روش آلوده کردن میزبان سالم، عبور داده شد تا اطمینان حاصل شود که لاروهای تیمار شده با خاک

www.SID.ir

Archive of SID

در اثر بیماری‌زایی قارچ از بین رفته‌اند (Pourian *et al.* 2008). برای این منظور، ۱۰ بلوک یک سانتی‌متری از پرگنه رشد کرده قارچ‌های جدا شده از خاک را با تیغ اسکالپل خراش داده و درون فالکن ۵۰ میلی‌لیتر حاوی آب مقطر سترون ریخته شد. برای به دست آوردن سوسپانسیون همگنی از کنیدی قارچ، فالکن‌ها به مدت دو ساعت روی شیکر (شرکت پارس آزما) قرار داده شدند. با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک، کنیدی‌ها از سایر ناخالصی جدا شده و غلظت محلول به دست آمده با استفاده از لام گلبول شمار محاسبه شد. برای ثابت بودن غلظت‌های به دست آمده، از تمامی جدایه‌ها، غلظت 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس برای هر جدایه تعداد ۱۰ لارو سن سوم (*E. keuhniella*) انتخاب و پس از ضدعفونی، طبق روش گفته شده در بالا، درون سوسپانسیون کنیدی تهیه شده به مدت ۱۰ ثانیه غوطه‌ور شده و پس از آن لاروها روی کاغذ صافی سترون مرطوب درون تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری قرار داده شدند. تشتک‌های پتری سترون حاوی لارو را به مدت دو روز در یک محیط تاریک و سپس به مدت ۱۴ روز در شرایط کنترل شده انکوباتور (فتوپریود ۱۲ ساعت تاریکی: ۱۲ ساعت روشنایی، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵٪) تا ظهور بار قارچ (مسیلیوم و کنیدی) نگهداری شدند. در صورت بیماری‌زا بودن، جدایه‌های قارچ بعد از این مدت لاروهای آلوده شده از بین رفته و به شکل چوب خشک پوشیده از پوشش قارچ دیده می‌شوند. لاروهای مرده‌ای که این علایم را نشان ندهند به عنوان تلفات ناشی از استرس و جابجایی به شمار خواهند آمد. در کل، آزمایش‌های آزمون قابلیت زنده‌مانی هاگ‌های قارچی براساس روش پوریان و همکاران طی ۲۴ ساعت بیش‌تر از ۹۰٪ بود (Pourian *et al.* 2008).

- بررسی ریخت‌شناسی و تاکسونومیکی

پس از جداسازی، از کشت‌های خالص برای شناسایی جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر حشرات استفاده شد. شناسایی‌ها براساس خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌ها در محیط‌کشت‌های مختلف از قبیل سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA)، سابرو-دکستروز-آگار (SDA)، عصاره مالت-آگار (MEA) و برگ میخک-آگار (CLA)، با بررسی صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی فرم‌های میوسپوری و میتوسپوری با استفاده از کلیدهای تاکسونومیکی معتبر قارچ‌شناسی صورت گرفت (Nelson *et al*. 1994, Humber 1997, Samson *et al*. 1988, Leslie & Summerell 2008). برای بررسی ریخت‌شناسی و تاکسونومیکی جدایه‌ها، حداقل ۵۰ عدد از هر کدام از اندام‌های قارچی اندازه‌گیری شدند. از صفات مذکور با استفاده از میکروسکوپ Olympus مجهز به دوربین دینوکپچر مدل X2 عکس‌برداری گردید.

- شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی

استخراج دی.ان.ای. از کشت هفت روزه جدایه‌ها روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار با استفاده از روش سی‌تب و همچنین استفاده از کیت شرکت ایده‌سازان زیستی زاگرس صورت گرفت. نواحی ITS1-5.8S-ITS2 از دی.ان.ای. ریبوزومی هسته‌ای با استفاده از ترکیب آغازگرهای عمومی (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3) ITS1 به همراه (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) ITS4 به ترتیب به عنوان آغازگرهای پیشرو و پسرو توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز فزون‌سازی شد. مواد مورد استفاده در هر واکنش ۱۰ نانوگرم از دی.ان.ای. قالب، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس شرکت سیناژن در یک حجم ۲۵ میکرولیتری از واکنش بود. چرخه دمایی و میزان دما به صورت چرخه واسرشتگی ابتدایی با دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر (هم‌جوشی) در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، بسط (گسترش) در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر شرکت Biometra مدل T-personal انجام گردید. قطعات فزون‌سازی شده برای توالی‌سنجی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد و از یک جهت به صورت مستقیم با استفاده از آغازگر ITS1 برای نواحی ITS1-5.8S-ITS2 توالی‌سنجی شدند. توالی‌های به دست آمده به روش دستی و با استفاده از نسخه ۷.۱ نرم‌افزار Bioedit (Hall 1999)

www.SID.ir

Archive of SID

ویرایش شدند. توالی‌های ویرایش شده با استفاده از نرم‌افزار BankIit به بانک ژن ارایه و شماره دسترسی برای مطالعات بعدی اخذ شد. ردیف‌سازی ابتدایی توالی‌های ویرایش شده با نرم‌افزار ClustalW انجام شد و متعاقبا به صورت دستی در نرم‌افزار BioEdit تنظیماتی روی آن صورت گرفت و سپس درخت‌های فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 ترسیم گردید. پایداری انشعابات شجره حاصل به وسیله آزمون اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد.

نتیجه

در مجموع، ۱۱۴ جدایه قارچ بیمارگر حشرات از خاک‌های جنگل، مرتع، مزرعه و باغ مناطق مختلف با استفاده از طعمه حشره‌ای *E. kuehniella* جداسازی شد. از این تعداد، ۱۵ جدایه از خاک‌های باغی (شش منطقه)، ۳۹ جدایه از خاک‌های جنگل بلوط (هشت منطقه)، ۳۸ جدایه از خاک‌های مزارع (۱۳ منطقه) و ۲۲ جدایه از خاک‌های مراتع (۱۴ منطقه) بود. با این که تعداد نمونه‌ها از خاک‌های جنگل بلوط کم‌تر از بقیه نمونه‌ها بود، اما بیش‌ترین تعداد جدایه‌های قارچی از این نوع خاک جمع‌آوری شد.

- بیماری‌زایی قارچ‌های جداسازی شده

به منظور تکمیل اصول کخ، اثبات بیماری‌زایی ۱۱۴ جدایه قارچی به دست آمده از خاک روی لارو شب‌پره آرد صورت گرفت. برای این منظور، تاثیر هر جدایه قارچی روی میزبان حشره‌ای *E. kuehniella* به روش غوطه‌وری در سوسپانسیون قارچ با غلظت 10^6 بررسی (آزمون عبور از میزبان) شد. نتایج این آزمون نشان داد که اکثر جدایه‌های مورد مطالعه توان آلوده کردن میزبان سالم را داشته و در این زمینه اصول کخ ثابت شد.

- گونه‌های شناسایی شده

براساس خصوصیات ریخت‌شناختی، ۱۱۴ جدایه به دست آمده از خاک‌های مناطق مختلف متعلق به هشت جنس شامل *Aspergillus* (۲۸ جدایه)، *Penicillium* (۲۳ جدایه)، *Beauveria* (۱۳ جدایه)، *Chaetomium* (یک جدایه)، *Paramyrothecium* (یک جدایه)، *Meyerozyma* (یک جدایه)، *Fusarium* (۴۶ جدایه) و *Alternaria* (یک جدایه) بودند. توالی ناحیه آی.تی.اس. برای جدایه‌هایی که به روش مولکولی شناسایی شدند، یک آمپلیکون ۵۵۰ تا ۶۵۰ جفت بازی ایجاد کرد. آنالیز توالی این جدایه‌ها با استفاده از ابزار جستجوی بلاست نشان داد که میزان شباهت ژنتیکی جدایه‌های این پژوهش با دیگر جدایه‌های معتبر موجود در بانک ژن از سایر کشورها ۹۸ تا ۱۰۰٪ است.

براساس خصوصیات ریخت‌شناختی (شکل‌های ۲ و ۳) و مقایسه توالی ناحیه آی.تی.اس. دی.ان.ای. ریبوزومی گونه‌های شناسایی شده عبارت بودند از: *Aspergillus nomius** (MK450362), *Fusarium oxysporum* (MK651259), *F. equiseti* (MK651237), *Fusarium* sp. (MK651505), *Penicillim solitum* (MK461564), *P. sizovae** (MK459319), *Penicillium* sp. (MK459305), *Alternaria chlamydosporigena* (MK651115), *Meyerozyma guilliermondii* (MK651508), *Paramyrothecium roridum* (MK651513), *Chaetomium elatum* (MK459302), *Beauveria bassiana** (MK651117), *B. pseudobassiana* (MK651117), and *B. tenella** (MK459301). (گونه‌های ستاره‌دار نخستین بار برای فلور قارچی ایران گزارش می‌شوند).

آنالیز فیلوژنتیکی توالی ناحیه آی.تی.اس. با روش پیوست مجاور نشان داد که جدایه‌های تحقیق حاضر با ضریب اطمینان بالا در کنار سایر جدایه‌های معتبر از دنیا در گروه‌های تک‌نیایی قرار گرفتند و به این صورت شناسایی مولکولی نیز پشتیبانی شد (شکل ۴). خصوصیات کامل گونه‌های شناسایی شده به شرح زیر می‌باشد:

۱- *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn and Hesselt. 1987

پرگنه روی محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی-دکستروز-آگار و عصاره مالت-آگار به رنگ سبز فسفری و در محیط‌کشت زاپک مخمر اتولیزات-آگار به رنگ سفید بود. رشد شعاعی پس از یک هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس روی محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی-دکستروز-آگار، ۱۵ میلی‌متر، عصاره مالت-آگار، ۱۸ میلی‌متر و زاپک مخمر اتولیزات-آگار، ۲۱ میلی‌متر بود. میانگین طول وزیکل ۱۴/۲۰ و عرض آن ۱۱/۴۹ میکرومتر بود. فیالیدها به طور مستقیم روی وزیکل تشکیل شدند و میانگین طول فیالید ۷/۰۷ و عرض آن ۲/۸۷ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها گرد و میانگین قطر آن‌ها ۳/۹۵ میکرومتر بود. اسکلروت‌ها کروی و در محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی-دکستروز-آگار و عصاره مالت-آگار تشکیل شدند که میانگین قطر آن‌ها ۲۸/۶۸

www.SID.ir

Archive of SID

میکرومتر بود. مطالعه توالی ناحیه‌ای آی.تی.اس. آر.ان.ای. ریبوزومی نشان داد که طول این ناحیه حدود ۵۵۵ جفت باز است. با استفاده از ابزار جستجوی بلاست در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن، توالی این ناحیه با ۱۰۰٪ شباهت و ۹۹٪ هم‌پوشانی به گونه *Aspergillus nomius* (KX431672) شباهت داشت. این جدایه با کد MK450362 در بانک ژن ثبت شد.

نمونه بررسی شده: استان کرمانشاه، اسلام‌آباد غرب، روی خاک مرتع، ۹۷/۱/۲، 46° 42′ E, 34° 15′ N، هادی مهرمرادی (IRAN 3301C).

۲- *Penicillium sizovae* Baghdadi., Novosti Sistematiki Nizshikh Rastenii 1968

پرگنه روی محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی-دکستروز-آگار و عصاره مالت-آگار به رنگ سبز بود. رشد شعاعی پس از یک هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس روی محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی-دکستروز-آگار، ۱۳ میلی‌متر، عصاره مالت-آگار، ۱۴ میلی‌متر و زاپک مخمر اتولیزات-آگار، ۱۵ میلی‌متر بود. میانگین طول فیالید ۹/۳۳ و عرض آن ۲/۸۰ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها گرد و میانگین قطر آن‌ها ۲/۲۶ میکرومتر بود. مطالعه توالی ناحیه آی.تی.اس. آر.ان.ای. ریبوزومی نشان داد که طول این ناحیه حدود ۵۳۱ جفت باز است. با استفاده از ابزار جستجوی بلاست در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن، توالی این ناحیه با ۱۰۰٪ شباهت و ۹۹٪ هم‌پوشانی به گونه *Penicillium sizovae* (MH858522) شباهت داشت. این جدایه با کد MK459319 در بانک ژن ثبت شد.

نمونه بررسی شده: استان کرمانشاه، قصرشیرین، روی خاک مزرعه، ۹۷/۱/۱۳، 45° 39′ E, 34° 31′ N، هادی مهرمرادی (IRAN 3339C).

۳- *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner and R.A. Humber 2011

پرگنه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار کرم رنگ بود و پس از گذشت ۱۰ روز تولید رنگدانه صورتی نمود. رشد شعاعی آن پس از گذشت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس روی محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی-دکستروز-آگار، ۱۱ میلی‌متر و سابرو-دکستروز-آگار، ۹ میلی‌متر بود. هاگ‌ها گرد و میانگین قطر آن‌ها ۲/۱۷ بود. میانگین طول اندام زاینده (سلول کنیدی‌زا) ۵/۱۵ و میانگین عرض آن ۲/۰۴ بود. همچنین، حلقه‌های شکار نماتد نیز مشاهده گردید. مطالعه توالی ناحیه‌ای آی.تی.اس. آر.ان.ای. ریبوزومی نشان داد که طول این ناحیه حدود ۵۲۲ جفت باز است. با استفاده از ابزار جستجوی بلاست در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن، توالی این ناحیه با ۱۰۰٪ شباهت و ۱۰۰٪ هم‌پوشانی به گونه *Beauveria psedobassiana* (MK142275) شباهت داشت. این جدایه‌ها با کدهای MK651215 در بانک ژن ثبت شد.

نمونه بررسی شده: استان کرمانشاه، گیلانغرب، روی خاک جنگل، ۹۷/۱/۱۳، 46° 01′ E, 34° 05′ N، هادی مهرمرادی (IRAN 3335C).

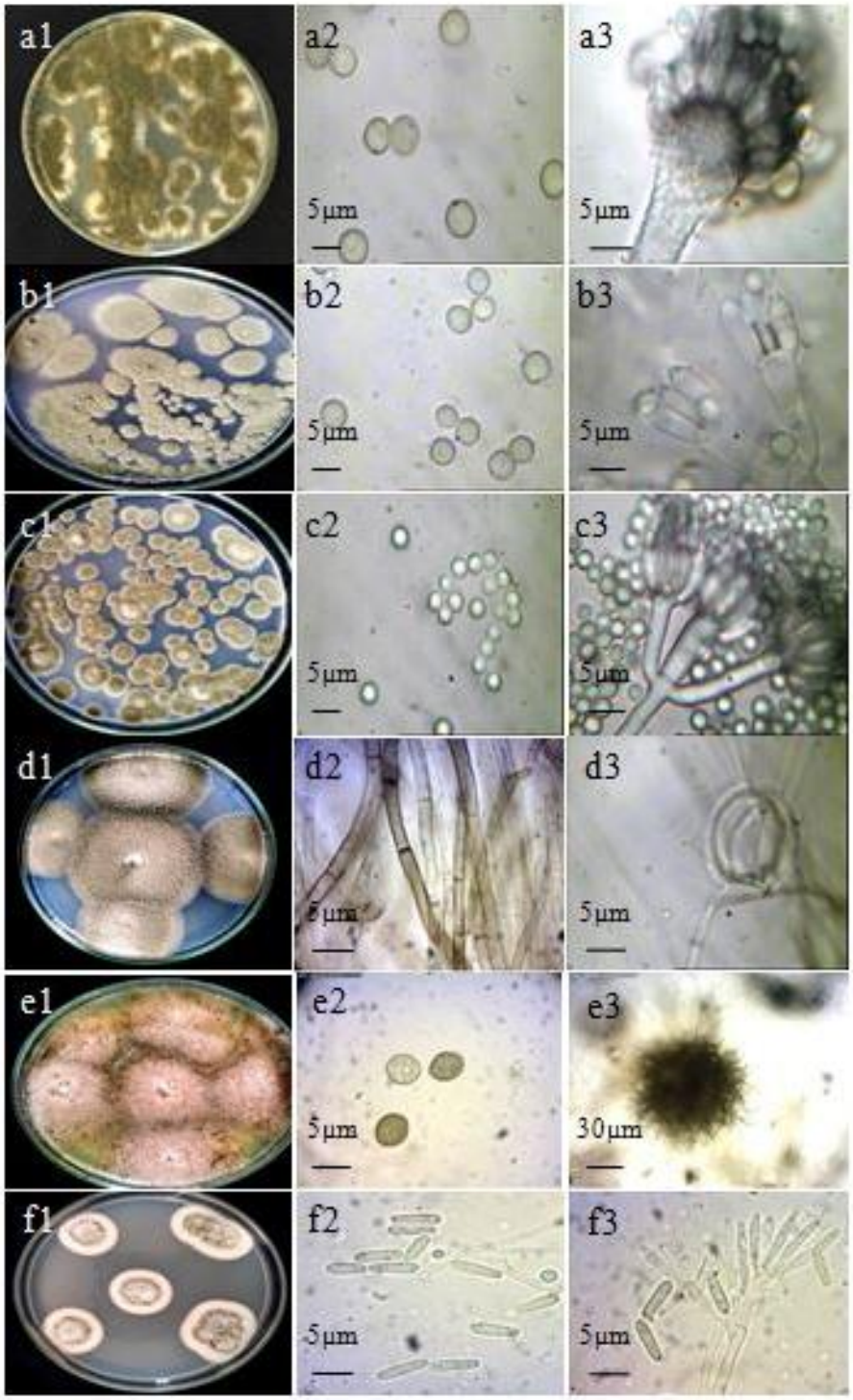
۴- *Beauveria tenella* Cordon T.C., Schwartz J.H., 1962

پرگنه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار در ابتدا شیری و سپس زرد و روی محیط‌کشت سابرو-دکستروز-آگار سفید رنگ بود. شعاع رشد آن پس از گذشت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس روی محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی-دکستروز-آگار، ۱۳ میلی‌متر و سابرو-دکستروز-آگار، ۱۰ میلی‌متر بود. هاگ‌ها گرد و میانگین قطر آن‌ها ۲/۴۱ میکرومتر، پایه اندام زاینده متورم و میانگین طول آن ۱۱/۰۳ و میانگین عرض آن ۲/۵۶ بود. مطالعه توالی ناحیه‌ای آی.تی.اس. آر.ان.ای. ریبوزومی نشان داد که طول این ناحیه حدود ۳۱۰ جفت باز است. با جستجو در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن، توالی این ناحیه با ۹۶٪ شباهت و ۹۱٪ هم‌پوشانی به گونه *Beauveria tenella* (Z54107) شباهت داشت. این جدایه با کد MK459301 در بانک ژن ثبت شد.

نمونه بررسی شده: استان کرمانشاه، هرسین، روی خاک جنگل، ۹۶/۵/۱۵، 47° 25′ E, 34° 22′ N، هادی مهرمرادی (IRAN 3397C).

www.SID.ir

Archive of SID

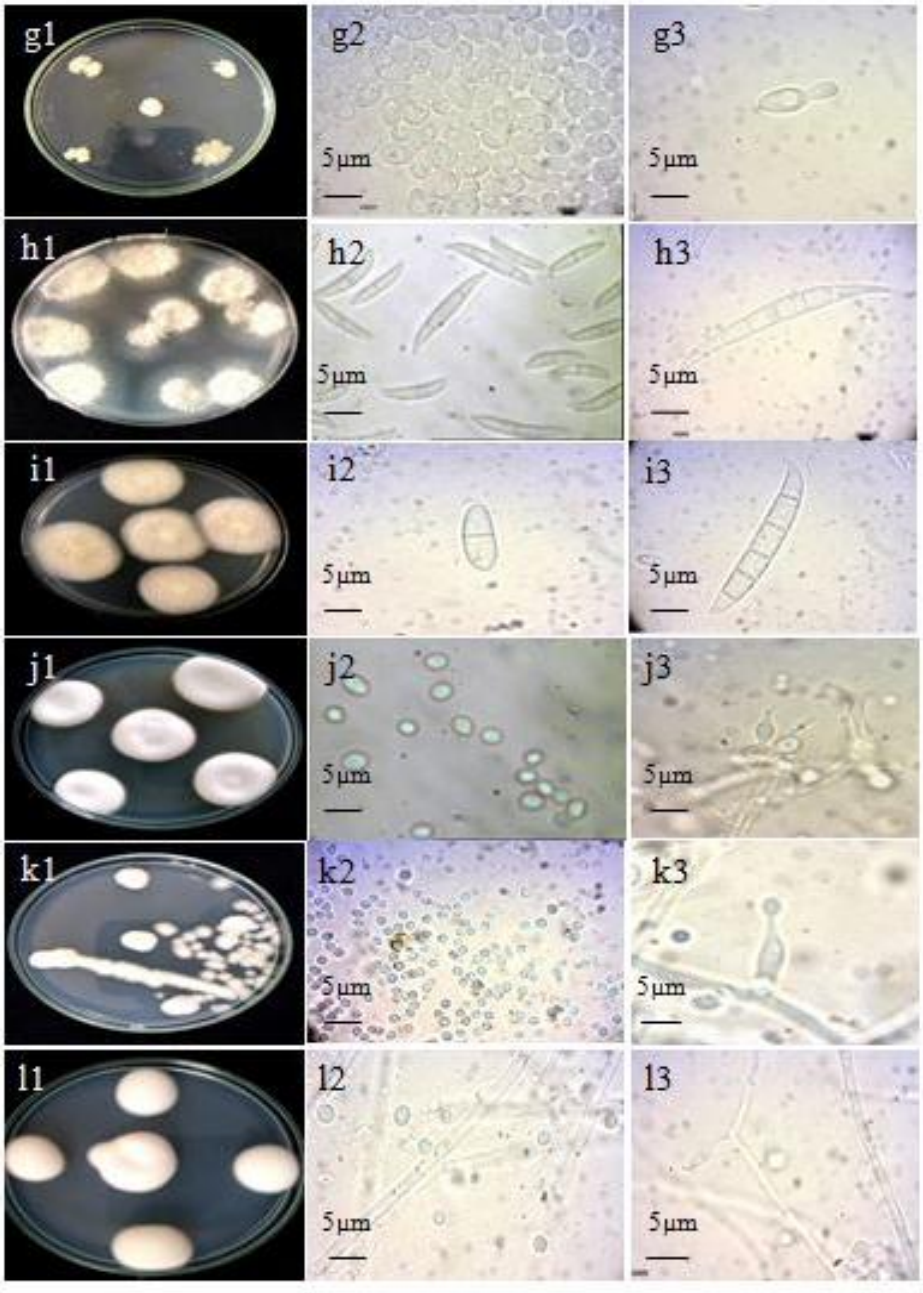


شکل ۲- ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه‌های قارچی بیمارگر حشرات در این مطالعه: *Aspergillius nomius* (a1, a2, a3)، *Penicillium solitum* (b1, b2, b3)، *P. sizovae* (c1, c2, c3)، *Alternaria chlamydosporigena* (d1, d2, d3)، *Chaetomium elatum* (e1, e2, e3)، *Paramyrothecium roridum* (f1, f2, f3).

Fig. 2. Morphological characteristics of entomopathogenic fungal species in this study: *Aspergillius nomius* (a1, a2, a3), *Penicillium solitum* (b1, b2, b3), *P. sizovae* (c1, c2, c3), *Alternaria chlamydosporigena* (d1, d2, d3), *Chaetomium elatum* (e1, e2, e3), *Paramyrothecium roridum* (f1, f2, f3).

www.SID.ir

Archive of SID

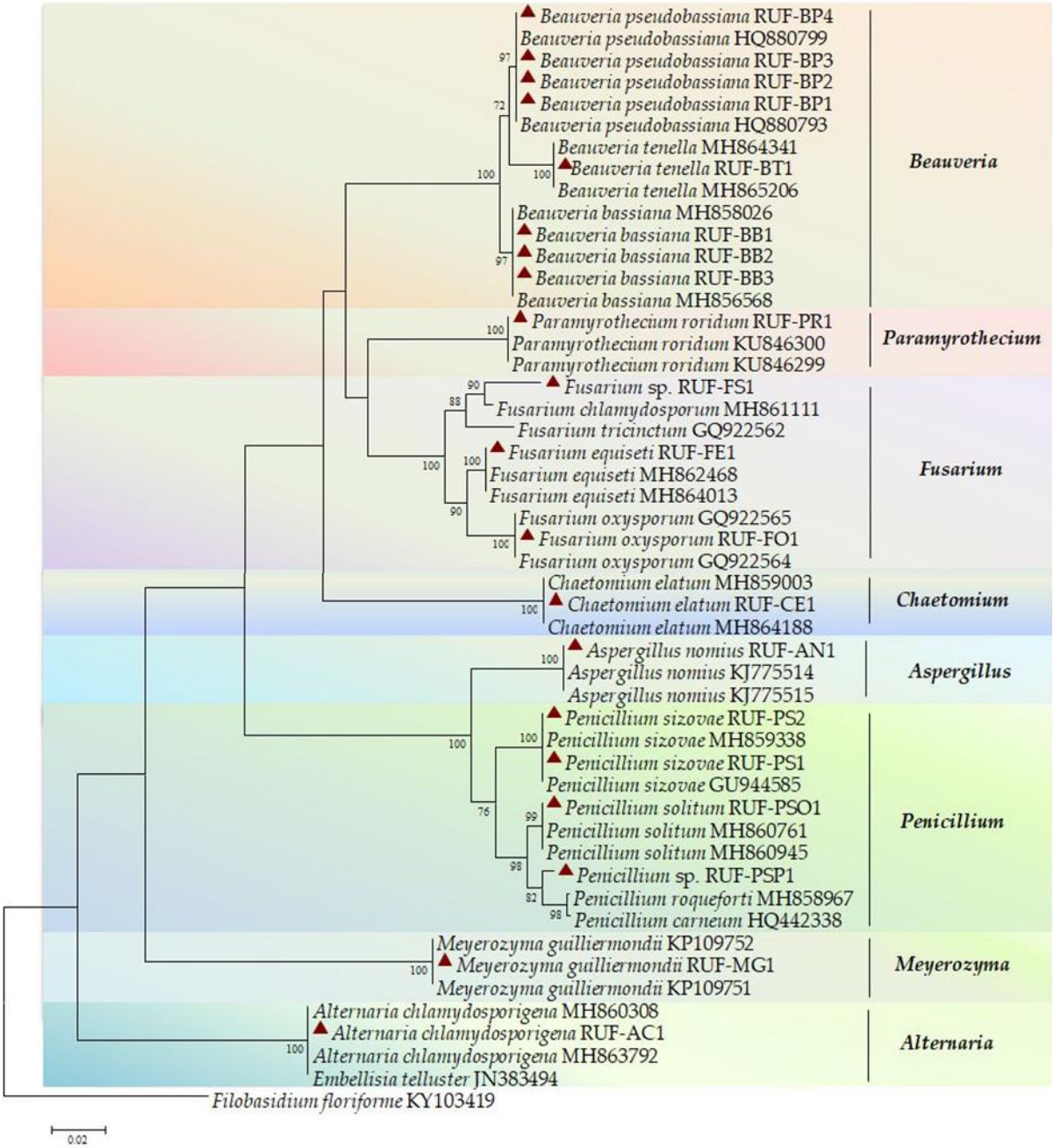


شکل ۳- ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه‌های قارچی بیمارگر حشرات در این مطالعه: *Meyerozyma guilliermondii* (g1, g2, g3)، *Fusarium equiseti* (h1, h2, h3)، *F. oxysporum* (i1, i2, i3)، *Beauveria bassiana* (j1, j2, j3)، *B. pseudobassiana* (k1, k2, k3)، *B. tenella* (l1, l2, l3).

Fig. 3. Morphological characteristics of entomopathogenic fungal species in this study: *Meyerozyma guilliermondii* (g1, g2, g3), *Fusarium equiseti* (h1, h2, h3), *F. oxysporum* (i1, i2, i3), *Beauveria bassiana* (j1, j2, j3), *B. pseudobassiana* (k1, k2, k3), *B. tenella* (l1, l2, l3).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های شناسایی شده در این پژوهش براساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی آی.تی.اس. اعداد روی محل انشعاب شاخه‌ها نشان‌دهنده درصد مقادیر بوت‌استرپ با ۱۰۰۰ بار تکرار است (مثلث در کنار گونه‌ها اشاره به جدایه مورد مطالعه دارد).

Fig. 4. The phylogenetic position of the isolates identified in this study is based on a comparison of the nucleotide sequence of the ITS regions. Numbers on the branched are the bootstrap values (%) with 1000 replications (triangles refer to isolates in study).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

قدمت چندین میلیون ساله رده حشرات و قارچ‌ها و برهمکنش‌های رخ داده بین آن‌ها باعث شده هردوی آن‌ها در تیپ اکولوژیک خود به تکامل پایاپای رسیده باشند. همین کنش‌ها در نهایت منجر به ایجاد پایداری در اکوسیستم‌های طبیعی و کشاورزی می‌شود. قارچ‌های بیمارگر حشرات طی این تکامل توانستند موقعیت خود را در زیستگاه‌های مختلف از جمله خاک (مهمترین زیست‌خوانگاه) تثبیت کنند و توام با استقرار در محیط و بهینه‌سازی قدرت نفوذ و بیماری‌زایی خود روی میزبان‌های هدف بسیار مؤثر باشند، (Meyling & Eilenberg 2007)، به طوری که طی دو دهه اخیر با توجه به پتانسیلی که در آن‌ها وجود دارد می‌توان از قارچ‌های بیمارگر حشرات به عنوان یکی از عوامل کلیدی کنترل بیولوژیک نام برد و حتی به عنوان جایگزین مناسبی برای حشره‌کش‌های شیمیایی که با طیف وسیع و خطرناک به شمار می‌آیند (Butt *et al*. 2001). قارچ‌های بیمارگر حشرات بیش‌تر خاک‌زی بوده، ولی برخی از آن‌ها مانند تعدادی از جدایه‌های *Beauveria bassiana* بدون آسیب به ساختار گیاه، توانایی کلونیزه کردن بافت گیاهی را داشته و در واقع به عنوان قارچ اندوفیت نیز محسوب می‌شوند (Kia *et al*. 2017)، لذا جدایه‌های این گونه ظرفیت بالایی برای کاربرد در برنامه‌های کنترل بیولوژیک حشرات دارند.

در این پژوهش، مطالعات ریخت‌شناسی روی ۱۱۴ جدایه از قارچ‌های بیمارگر حشرات که با استفاده از طعمه حشره‌ای از خاک‌های مناطق مختلف زراعی و غیرزراعی استان کرمانشاه جدا شده بودند صورت گرفت. طبق نتایج اولیه و با استفاده از کلیدهای معتبر قارچ‌شناسی، گونه‌های شناسایی اغلب مربوط به جنس‌های *Fusarium*، *Beauveria*، *Chaetomium*، *Alternaria*، *Penicillium*، *Aspergillus*، *Meyerozyma* و *Paramyrothecium* بود. در این بررسی، میانگین تعداد قارچ‌های جمع‌آوری شده از خاک‌های جنگل، مزرعه، مرتع و باغ مورد بررسی قرار گرفت که بیش‌ترین تعداد قارچ‌های بیمارگر حشرات از مناطق جنگلی جمع‌آوری شدند که در این زمینه با تحقیقات وکیل و همکاران (Wakil *et al*. 2013) مطابقت داشت. بستر خاک و ترکیب آن به عنوان یکی از عناصر اصلی اکوسیستم خشکی نقش به سزایی در ایجاد تنوع و پویایی موجودات زنده دارد، به طوری که هر چه خاک زیست‌پذیرتر و از نظر شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیک پیچیده‌تر باشد، اثرات مثبت یا منفی آن به سطوح بالاتر زنجیره یعنی موجودات زنده منتقل می‌شود (Grigal 2000). شبکه حیات در اکوسیستم جنگل بسیار پویا و نیز علی‌رغم پیچیدگی بالا در نهایت تعادل قرار دارد که به آن بیوسنوز اوج یا کلیمکس نیز می‌گویند. این تعادل مرهون تکامل هزاران ساله‌ای می‌باشد که در بخش زنده (بیوسنوز) و غیرزنده (بیوتوپ) اکوسیستم رخ داده است. به دلیل چرخه پویای انرژی و موادی که در اکوسیستم جنگل وجود دارد، خاک این مناطق زیستی نسبت به سایر (مرتع و زراعی) از نظر مواد آلی و معدنی بسیار غنی‌تر می‌باشد (Perera *et al*. 2007). اثرات پایین به بالای این غنای خاک باعث تقویت تعداد و نوع موجودات زنده میکروسکوپی و ماکروسکوپی می‌شود (Meyling &Eilenberg 2007). بنابراین، یکی از دلایل مهم بالا بودن گونه‌های جمع‌آوری شده از خاک مناطق جنگلی در پژوهش حاضر همین ترکیب پایدار و غنی خاک جنگل می‌باشد.

مطالعات فیلوژنتیکی روی توالی ناحیه آی.تی.اس. قارچ‌های بیمارگر حشرات نشان داد که بیش‌ترین جدایه‌های به دست آمده به ترتیب در راسته‌های *Hypocerales* (۶۰٪)، سپس *Eurotiales* (۲۵٪) و در نهایت *Pleosporales*، *Saccharomycetales* و *Sordariales* (۲۵٪) قرار داشتند. در اغلب پژوهش‌های صورت گرفته در مورد جداسازی و شناسایی قارچ‌های بیمارگر حشرات، دو راسته *Hypocerales* و *Eurotiales* فراوان‌ترین راسته‌های قارچی بودند (NouriAiin *et al*. 2014, Tahmasebi Zaweh *et al*. 2013, Barra *et al*. 2013, Sookar *et al*. 2008). در این تحقیق، بیش‌ترین تعداد جدایه‌های به دست آمده از خاک مربوط به جنس *Fusarium* sp. بود که برخی از گونه‌های این جنس جزو مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی هستند (Baayen *et al*. 1997). برخی گونه‌ها نیز باعث بیماری‌های پوستی، آلرژیک و عفونت‌های داخلی در جانوران و انسان می‌شوند (Nucci & Anaissie 2002, Evans *et al*. 2004)، تعدادی از گونه‌های فوزاریوم به صورت اندوفیت در گیاهان زندگی می‌کنند و بعضی از جمعیت‌های *Fusarium oxysporum* بیمارگر لارو و حشرات کامل هستند (Navarro-Velasco *et al*. 2011, Coleman *et al*. 2011).

در سال ۲۰۱۸ از متابولیت ثانویه *Fusarium oxysporum* به صورت اختلاط با حشره‌کش برای کنترل پشه‌های ناقل عوامل بیماری‌زای انسانی (*Aedes aegypti*، *Anopheles stephensi* و *Culex quinquefaciatus*) استفاده شد که نتایج بیانگر اثر سینرژیستی مطلوب این ترکیبات در کنترل آفات بود

www.SID.ir

Archive of SID

(Vivekanandhan *et al.* 2018). در مطالعه حاضر، یک جدایه از *F. equiseti* از خاک مزرعه شهرستان قصرشیرین جداسازی شد. این گونه تاکنون به عنوان بیمارگر گیاهی گزارش شده است (Suthar *et al.* 2011, Palmero *et al.* 2011).

گونه‌های آسپرژیلوس و پنیسیلیوم از نظر فراوانی در رده‌های دوم و سوم پس از فوزاریوم قرار داشتند. در این بررسی، بیش‌ترین جدایه از آسپرژیلوس مربوط به گونه *Aspegillus nomius* بود که عمدتا از خاک مرتع جداسازی شد. این گونه قبلا از حشره *Drosophila melanogaster* جداسازی و اثبات بیماری‌زایی آن علیه گونه‌های پشه آئدس (*Aedes* spp.) و سوسک‌های *Buprestidae* صورت گرفت که نتایج حاکی از کنترل کامل پشه آئدس توسط این گونه قارچ حکایت داشت (Jaber *et al.* 2016). فولی و همکاران (Foley *et al.* 2014) تأثیر *Aspergillus nomius*، *A. flavus* و*A. phoenicis* را روی لارو و حشره بالغ زنبور عسل بررسی کردند. مشاهدات آن‌ها نشان داد که قارچ‌های مذکور تنها توانایی آلوده کردن لاروهای زنبور را داشتند. جدایه *Penicillium sizovae* که از خاک مزرعه شهرستان قصرشیرین جداسازی شد، به دلیل ترکیبات آلکالوییدی در صنایع دارویی استفاده شده است (Kozlovskii *et al.* 2003, Cordell 2002)، ولی تاکنون بیماری‌زایی این گونه روی حشرات گزارش نشده است. گونه *Penicillium solitum* نیز از خاک مرتع جداسازی شد. این گونه قبلا از لارو سن سه و چهار پروانه سفید صنوبر (*Bupalus piniaria*) جداسازی و گزارش شده بود (Pečiulytė *et al.* 2010).

از جنس *Beauveria* گونه‌های *Beauveria bassiana*، *B. pseudobassiana* و *B. tenella* از خاک‌های بکر و جنگلی جداسازی شد. دو گونه *B. pseudobassiana* و *B. tenella* نخستین بار برای فلور قارچی ایران گزارش می‌شوند. گونه‌های جنس *Beauveria* در بیش از ۷۰۰ گونه از حشرات ایجاد بیماری می‌کنند (De Faria &Wraight 2007). این گونه‌ها دامنه میزبانی وسیعی و ایزوله‌های آن دارای تخصص میزبانی هستند که تقریبا توانایی آلوده‌سازی تمامی مراحل زیستی حشرات خسارت‌زای در مناطق کشاورزی و جنگلی را شامل می‌شوند (Wright & Lax 2016).

در بین گونه‌های *Alternaria chlamydosporigena*، *Meyerozyma guilliermondii*، *Paramyrothecium roridum* و *Chaetomium elatum*، تنها گونه *C. elatum* به عنوان قارچ بیمارگر حشرات گزارش نشده، اما استفاده از سایر گونه‌های مذکور به عنوان عوامل بیوکنترل حشرات قبلا بررسی شده است. گونه *M. guilliermondii* قبلا از خاک بکر در استان کرمانشاه گزارش شده بود (Jamali *et al.* 2016). به طور کلی و براساس یافته‌های این پژوهش، گونه‌های مختلفی از قارچ‌های بیمارگر حشرات از راسته هیپوکریال از خاک جداسازی شد. فراوانی گونه‌های جمع‌آوری شده، عمدتا به ترتیب مربوط به خاک جنگل و مراتع و تایید کننده تحقیقات قبلی بود که اغلب معتقد بودند خاک‌های جنگل به عنوان ذخیره‌گاه بزرگی برای قارچ‌های بیمارگر حشرات به شمار می‌آیند. این موضوع به نوبه خود باعث تقویت کنترل طبیعی در اکوسیستم جنگل شده و منجر به افزایش پایداری این اکوسیستم در ایجاد تعادل بین تراکم جمعیت حشرات در زنجیره غذایی می‌باشد. کاهش فراوانی گونه‌های در مزارع زراعی و باغی نشان‌دهنده ساده بودن خرداقلیم (میکروکلیما) و خاک اکوسیستم کشاورزی نسبت به خاک جنگل می‌باشد و نیز به دلیل مصرف بالای آفت‌کش‌های شیمیایی و به ویژه قارچ‌کش‌ها در مزارع کشاورزی علیه پاتوژن‌های خاک یا بذرزاد، امکان کاهش تعداد گونه‌های میکروبی خاک از جمله قارچ‌های بیمارگر حشرات وجود دارد. تحقیقات آینده در رابطه با ارزیابی قدرت بیمارگری و زهرآگینی جدایه‌های بومی جدا شده روی آفات مختلف، نشان‌دهنده میزان اهمیت آن‌ها در برنامه‌های کنترل بیولوژیک آفات می‌باشد.

References

Baayen, R., Waalwijk, C. & Gams, W. 1997. *Fusarium* sections Elegans and Liseola: taxonomy, rDNA internal transcribed spacer sequences and diagnostics. Springer, pp. 295–297.

Barra, P., Rosso, L., Nesci, A. & Etcheverry, M. 2013. Isolation and identification of entomopathogenic fungi and their evaluation against *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais*, and *Rhyzopertha dominica* in stored maize. Journal of Pest Science 86: 217–226.

www.SID.ir

Archive of SID

Butt, T.M., Jackson, C. & Magan, N. 2001. Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential. Plant Pathology 51: 390.

Coleman, J.J., Wasmann, C.C., Usami, T., White, G.J., Temporini, E.D., McCluskey, K. & VanEtten, H.D. 2011. Characterization of the gene encoding pisatin demethylase (FoPDA 1) in *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant-Microbe Interactions 24: 1482–1491.

Cordell, G.A. 2002. The Alkaloids: Chemistry and Biology. Gulf Professional Publishing, pp. 368.

De Faria, M.R. & Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control 43: 237–256.

Evans, J., Levesque, D., De Lahunta, A. & Jensen, H. 2004. Intracranial fusariosis: a novel cause of fungal meningoencephalitis in a dog. Veterinary Pathology 41: 510–514.

Foley, K., Fazio, G., Jensen, A.B. & Hughes, W.O.H. 2014. The distribution of *Aspergillus* spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. Veterinary Microbiology 169: 203–210.

Grigal, D.F. 2000. Effects of extensive forest management on soil productivity. Forest Ecology and Management 138: 1(3) 167–185.

Guijarro, B., Melgarejo, P. & De Cal, A. 2007. Effect of stabilizers on the shelf-life of *Penicillium frequentans* conidia and their efficacy as a biological agent against peach brown rot. Journal of Food Microbiology 113: 117–124.

Humber, R.A. 1997. Fungi: identification. Manual of techniques in insect pathology. Academic Press 1: 153–185.

Jaber, S., Mercier, A., Knio, K., Brun, S. & Kambris, Z. 2016. Isolation of fungi from dead arthropods and identification of a new moksquito natural pathogen. Parasites and Vectors 9: 491–491.

Jamali, S., Gharaei, M. & Abbasi, S. 2016. Identification of yeast species from uncultivated soils by sequence analysis of the hypervariable D1/D2 domain of LSU-rDNA gene in Kermanshah province, Iran. Mycologia Iranica 3(2): 87–98.

Javar, S. & Parsi, F. 2019. Evaluation of pathogenicity *Isaria farinose*, *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* on *Galleria mellonella*. 9th National Conference on Biological Control, 10–11 July.

Kia, S.H., Glynou, K., Nau, T., Thines, M., Piepenbring, M. & Maciá-Vicente, J.G. 2017. Influence of phylogenetic conservatism and trait convergence on the interactions between fungal root endophytes and plants. The ISME Journal 11: 777–790.

Kozlovskii, A.G., Zhelifonova, V.P., Adanin, V.M., Antipova, T.V., Ozerskaia, S.M., Kochkina, G.A. & Grafe, U. 2003 [The fungus *Penicillium citrinum* Thom 1910 VKM FW-800 isolated from ancient permafrost sediments as a producer of the ergot alkaloids agroclavine-1 and epoxyagroclavine-1]. Mikrobiologiia 72: 816–821.

Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K. & Vail, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? Biological Control of Insect Pests and Weeds 21: 230–248.

Leslie, J.F. & Summerell, B.A. 2008. The *Fusarium* Laboratory Manual. John Wiley & Sons.

Lewis, W.J., van Lenteren, J.C., Phatak, S.C. & Tumlinson, J.H. 1997. A total system approach to sustainable pest management. Proceedings of the National Academy of Sciences 94: 12243–12248.

Lovett, B. & Leger, R.S. 2016. Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi, Elsevier Science, 512 pp.

Mora, M.A.E., Rouws, J.R.C. & Fraga, M.E. 2016. Occurrence of entomopathogenic fungi in Atlantic forest soils. Microbiolgy 4: 1–1.

www.SID.ir

Archive of SID

Meyling, N.V. 2007. Methods for Isolation of Entomopathogenic Fungi from the Soil. Environment-Laboratory Manual, pp. 1–18.

Meyling, N.V. & Eilenberg, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. Biological Control 43(2): 145–155.

Navarro-Velasco, G.Y., Prados-Rosales, R.C., Ortíz-Urquiza, A., Quesada-Moraga, E. & Di Pietro, A. 2011. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. Fungal Genetics and Biology 48: 1124–1129.

Nelson, P.E., Dignani, M.C. & Anaissie, E.J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. Clinical Microbiology Reviews 7: 479–504.

NouriAiin, M., Askary, H., Imani, S. & Zare, R. 2014. Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hibernating sites of sunn pest (*Eurygaster integriceps*) on Ilam Mountains, Iran. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3: 314–325.

Nucci, M. & Anaissie, E. 2002. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. Clinical Infectious Diseases 35: 909–920.

Palmero, D., de Cara, M., Iglesias, C., Gálvez Patón, L. & Tello, J.C. 2011. Comparative study of the pathogenicity of seabed isolates of *Fusarium equiseti* and the effect of the composition of the mineral salt medium and temperature on mycelial growth. Brazilian Journal of Microbiology 42: 948–953.

Pečiulytė, D., Nedveckytė, I., Dirginčiūtė-Volodkienė, V. & Būda, V. 2010. Pine defoliator *Bupalus piniaria* L. (Lepidoptera: Geometridae) and its entomopathogenic fungi: 1. Fungi isolation and testing on larvae. Ekologija 56: 34–40.

Perera, A.H., Buse, L.J. & Weber, M.G. 2007. Emulating Natural Forest Landscape Disturbances: Concepts and Applications. Columbia University Press.

Pourian, H., Khoobdel, M. & Alizadeh, M. 2019. Stored-grains pests and their control with emphasis on military food warehouses in Iran: a review. Journal of Military Medicine 21: 313–324.

Pourian, H.R., Ezzati-Tabrizi, R. & Talaei-Hassanloui, R. 2008. An improved cage system for the bioassay of *Metarhizium anisopliae* on *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). Biocontrol Science and Technology 18: 745–752.

Samson, R.A., Evans, H.C. & Latgé, J.P. 1988. Taxonomy of Entomopathogenic Fungi. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 5–16.

Sookar, P., Bhagwant, S. & Awuor Ouna, E. 2008. Isolation of entomopathogenic fungi from the soil and their pathogenicity to two fruit fly species (Diptera: Tephritidae). Journal of Applied Entomology 132: 778–78.

Suthar, R., Bhatt, P.N. & Bhatt, D.P. 2011. *Fusarium equiseti* - the Causal Organism of Wilt Disease in Cumin. National Symposium on "Evolving Paradigm to Improve Productivity from Dynamic Management and Value Addition for Plant Genetic Resources" at Department of Botany, Gujarat University, India.

Tahmasebi Zaweh, N., Karimi, J. & Taheri, P. 2013. Separating and determining the characteristics of several native isolates of the *Beauveria bassiana* (balsamo) (Ascomycota: Hypocreales) insect mites in Khorasan. Proceedings of the 3rd National Conference of Iranian Agricultural Biotechnology.

Van Driesche, R. & Hoddle, M. 2009. Control of Pests and Weeds by Natural Enemies: An Introduction to Biological Control. John Wiley & Sons.

Vega, F. & Blackwell, M. 2005. Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution. Oxford University Press, Oxford.

www.SID.ir

Archive of SID

Vivekanandhan, P., Karthi, S., Shivakumar, M. & Benelli, G. 2018. Synergistic effect of entomopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* extract in combination with temephos against three major mosquito vectors. Pathogens and Global Health 112: 37–46.

Wakil, W., Ghazanfar, M.U., Riasat, T., Kwon, Y.J., Qayyum, M.A. & Yasin, M. 2013. Occurrence and diversity of entomopathogenic fungi in cultivated and uncultivated soils in Pakistan. Entomological Research 43: 70–78.

Wright, M.S. & Lax, A.R. 2016. Improved mortality of the Formosan subterranean termite by fungi, when amended with cuticle-degrading enzymes or eicosanoid biosynthesis inhibitors. Folia Microbiologica 61: 73–83.

Zhang, C., Wohlhueter, R. & Zhang, H. 2016. Genetically modified foods: A critical review of their promise and problems. Food Science and Human Wellness 5: 116–123.

Zimmermann, G. 1986. The '*Galleria* bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. Journal of Applied Entomology 102: 213–215.

www.SID.ir