نامه انجمن حشره‌شناسی ایران ۳۰۰-۲۸۱,(٤)٤١ ,١٤٠٠

JOURNAL OF ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF IRAN
2021, 41(4), 281–300

DOI: 10.22117/JESI.2022.357584.1446

مقالـهٔ علـمی پژوهـشی

شاخص‌های زیستی قارچ‌های بیمارگر حشرات، *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* و ارزیابی تنوع زهرآگینی آن‌ها

پریا سلیمانی، علی مهرور* و ناهید واعظ

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ali.mehrvar@azruniv.ac.ir

چکیده

شاخص‌های زیستی کنیدیوم از جمله ریخت‌شناسی، جوانه‌زنی، ویژگی‌های سطح کنیدیوم از عوامل موثر در میزان زهرآگینی یک جدایه به شمار می‌روند. از این‌رو، شاخص‌های رشدی (رشد رویشی، کنیدی‌زایی و جوانه‌زنی)، خاصیت آب‌گریزی، فعالیت آنزیم پروتئاز Pr1 سه جدایه از قارچ *Beauveria bassiana* (JS1، JS2 و KA75) و جدایه TT1 قارچ *Metarhizium anisopliae* ارزیابی شد. هم‌چنین ارتباط این شاخص‌ها با میزان زهرآگینی جدایه‌ها روی لاروهای سن آخر *Galleria mellonella* و سن چهارم *Ephestia kuehniella* مورد بررسی قرار گرفت. از نظر میزان رشد رویشی بین جدایه‌های *B. bassiana* تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما بالاترین میزان آن (۷/۰۵ سانتی‌متر) مربوط به جدایه TT1 بود. جدایه JS2 بالاترین میزان تولید کنیدیوم (۱۰٦×٤/۱۱ کنیدی/میلی‌لیتر) را نسبت به دیگر جدایه‌ها نشان داد. درصد جوانه‌زنی همه جدایه‌ها بالای ۸۰ درصد بود اما بیش‌ترین مقدار آن (۱۰۰٪) در ارتباط با جدایه TT1 ثبت شد که با میزان کنیدی‌زایی جدایه KA75 در یک سطح آماری قرار گرفتند. کم‌ترین میزان خاصیت آب‌گریزی سطح کنیدیوم مربوط به جدایه KA75 بود که اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها داشت. ولی بالاترین درصد آن مربوط به جدایه TT1 با ۹۱/۰۷٪ بود. میزان فعالیت آنزیم Pr1 جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. زیست‌سنجی‌ها نشان دادند که جدایه‌های TT1 و JS2 بیش‌ترین زهرآگینی را به ترتیب روی لاروهای شب‌پره موم‌خوار بزرگ و بید آرد داشتند. از بین شاخص‌های مورد ارزیابی، خاصیت آب‌گریزی و میزان کنیدی‌زایی این دو جدایه نیز در مقایسه با سایر جدایه‌ها بیش‌تر بود که با میزان زهرآگینی بالای آن‌ها ارتباط مستقیم داشت. بنابراین، جدایه TT1 قارچ *M. anisopliae* و جدایه JS2 قارچ *B. bassiana* نسبت به سایر جدایه‌های مورد بررسی کارآیی زیستی بیش‌تری داشتند و از این‌رو، برای بهره‌گیری در برنامه‌های مهار زیستی آفات گیاهی مناسب‌تر خواهند بود.

واژه‌های کلیدی: ویژگی‌های رشدی قارچ، آب‌گریزی، فعالیت پروتئازی، *Galleria mellonella*، *Ephestia kuehniella*.

Biological indices of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and assessment of their virulence diversity

Parya Soleimani, Ali Mehrvar* & Nahid Vaez

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

*Corresponding author, E-mail: ali.mehrvar@azaruniv.ac.ir

Abstract

Biological indices such as conidial morphology, germination, and surface characteristics influence the virulence of an isolate. Therefore, the growth indices (vegetative growth, conidiogenesis, and germination), hydrophobicity property and Pr1 protease enzyme activity of three isolates of *Beauveria bassiana* (JS1, JS2 and KA75) and TT1 isolate of *Metarhizium anisopliae* evaluated. Also, the relationship between these indices and the virulence of the isolates on the last instar larvae of *Galleria mellonella* and

دریافت: ١٤٠٠/١١/٠٤، پذیرش ١٤٠٠/١٢/١١.

دبیر تخصصی : رضا طلایی‌حسنلویی

fourth instar larvae of *Ephestia kuehniella* investigated. There was no significant difference in vegetative growth rate between *B. bassiana* isolates, but the highest rate (7.05 cm) was related to the TT1 isolate. JS2 isolate showed the highest conidial production (4.11×10^6 spores / ml) compared to the other isolates evaluated. All isolates showed germination above 80%, and the highest value (100%) was related to the TT1 isolate, which was statistically on par with the conidiogenesis of the KA75 isolate. The lowest hydrophobicity of the conidial surface was related to KA75 isolate, which was significantly different from other isolates. However, the highest percentage was related to TT1 isolate with 91.7%. Also, no differences were observed between the isolates in terms of Pr1 enzyme activity. Bioassays showed that TT1 and JS2 isolates had the highest virulence on the last instar larvae of *G. mellonella* and fourth instar larvae of *E. kuehniella*, respectively. Among the evaluated indices, the hydrophobicity and conidiogenesis of these two isolates were higher than the other isolates, which was directly related to their high virulence. Thus, the TT1 isolate of the *M. anisopliae* and the JS2 isolates of *B. bassiana* had greater bioefficiency than the other isolates and therefore, they will be more suitable for use in plant pest biological control programs.

Key words: Fungal growth characteristics, hydrophobicity, protease activity, *Galleria mellonella*, *Ephestia kuehniella*

Received: 24 January 2022, *Accepted:* 2 March 2022.

مقدمه

تاکنون در حدود ۱۰۰۰ گونه قارچ بیمارگر حشرات در جهان شناسایی شده است که اغلب متعلق به دو راسته Hypocreales (به ویژه از جنس‌های *Beauveria* Vuillemin, 1912 و *Metarhizium* Sorokin, 1879) و Entomophthorales بوده که علیه طیف وسیعی از آفات گیاهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Lacey, 2017). مانع اصلی آلودگی حشرات توسط قارچ‌های بیمارگر حشرات کوتیکول آن‌ها است (Chandler, 2017). بنابراین، اولین گام برای ایجاد آلودگی، اتصال کارآمد کنیدیوم‌های قارچ با کوتیکول میزبان است. این اتصال شامل مکانیسم‌های چسبندگی غیراختصاصی است که توسط خواص آب‌گریز دیواره سلولی کنیدیوم کنترل می‌شود (Boucias *et al.*, 1988). به‌طور کلی ماهیت آب‌گریز اپی‌کوتیکول، بستری مناسب برای چسبندگی کنیدیوم‌های قارچی فراهم می‌نماید. چسبندگی به‌دلیل آب‌گریز بودن سطح کنیدیوم و کوتیکول، و هم‌چنین ترشح مخاط موسیلاژ صورت می‌گیرد. در این میان، آنزیم‌ها، لکتین‌ها، نیروهای آب‌گریز و الکترواستاتیک نیز نقش مهمی ایفا می‌کنند (Boucias *et al.*, 1988). قارچ‌های آنامورفیک راسته Hypocreales اغلب برای شروع عفونت‌زایی نیاز به کمینه تعداد کنیدیوم ها در سطح میزبان دارند که برحسب غلظت متوسط کشندگی از $۱۰^۲$ تا $۱۰^۹$ کنیدی/میلی‌لیتر به دست آمده است (Hesketh *et al.*, 2010). بسیاری از قارچ‌های این راسته به دنبال ایجاد سازگاری در مواجهه با مواد مومی کوتیکول حشرات برای اتصال سریع به آن‌ها، تولید کنیدیوم‌های آب‌گریز را درپیش گرفته‌اند (Chandler, 2017). در این اتصال، حضور پروتئین‌های هیدروفوبین موجود در سطح کنیدیوم‌ها هم دخیل هستند (Holder *et al.*, 2007). گام بعدی در عفونت‌زایی قارچی، جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ بیمارگر روی کوتیکول میزبان است. این شاخص، تحت تاثیر عوامل مختلفی از قبیل میزبان (نوع و مرحله حساس آن) و برخی از عوامل محیطی مانند دما و رطوبت بهینه قرار دارد. هم‌چنین جوانه‌زنی موفق قارچ نیازمند جذب مواد غذایی مورد نیاز از زیرنهشت خود است. قارچ‌ها در آغاز دوره عفونت‌زایی با منابع مختلفی از هیدروکربن‌های کوتیکول حشرات روبرو می‌شوند. ترکیبات مختلفی مانند انواع پروتئین‌ها، هیدروکربن‌ها، اسیدهای چرب و لیپیدها در سطح کوتیکول حشرات وجود دارند که قادر هستند جوانه‌زنی قارچ را تحت تاثیر قرار دهند (Jarrold *et al.*, 2007; Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013).

در جریان فرگشت متقابل قارچ‌های بیمارگر و حشرات میزبان، مکانیسم‌هایی برای ردیابی کوتیکول جلد بدن حشرات و سهولت چسبندگی کنیدیوم‌ها پدید آمده‌اند که منجر به انجام واکنش‌های متنوعی از جمله فعالیت هیدرولیتیک توسط آنزیم‌هایی هم‌چون لیپازها، استرازها، کاتالازها، سیتوکروم P450، پروتئازها و کیتینازها می‌گردد. از دیگر واکنش‌های فرگشتی می‌توان به تولید ساختارهای عفونی تخصصی و هم‌چنین متابولیت‌های ثانویه اشاره نمود که فرآیند عفونت را تسهیل می‌سازند (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013). به عبارتی، این قارچ‌ها، فاکتور

چسبندگی، آنزیم‌های تخریب کننده کوتیکول (Chandler, 2017)، ساختارهای عفونی‌سازی (Butt *et al*., 2016) و متابولیت‌های ثانویه سمی را برای غلبه بر کوتیکول میزبان و ایجاد عفونت تولید می‌کنند (Pedrini, 2018). قارچ‌ها اغلب از نواحی غیراسکلروتینه کوتیکول حشرات مانند نواحی بین‌حلقه‌ای به درون بدن نفوذ می‌کنند. پیش از نفوذ جلدی، در انتهای لوله تندش قارچ اندامی موسوم به آپرسوریوم ایجاد می‌شود که فرایند نفوذ را با بهره‌گیری از نیروهای مکانیکی و آنزیمی تسهیل می‌نماید. هنگام نفوذ به کوتیکول میزبان، طیف وسیعی از آنزیم-های تجزیه‌کننده کوتیکول توسط قارچ تولید می‌شوند (Chandler, 2017). از آن‌جایی‌که، پروتئین‌ها، حجم عمده-ای از ترکیبات کوتیکول حشرات را به خود اختصاص می‌دهند، از این‌رو، پروتئازها، نقش مهمی را در نفوذ موفق قارچ به میزبان بر عهده دارند. یکی از این آنزیم‌ها، پروتئاز هضم کننده کوتیکول موسوم به آنزیم سرین پروتئاز شبه‌سابتیلیسین (Subtilisin-like serine protease (designated Pr1)) است که در مراحل اولیه عفونت، یعنی در زمان تشکیل آپرسوریوم مورد نیاز است. این آنزیم به‌عنوان یکی از عوامل مهم در شروع عفونت‌زایی توسط قارچ‌های بیمارگر از طریق نفوذ درکوتیکول میزبان شناخته شده است (Gillespie *et al*., 1998; Zimmermann, 2007; Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013). کارآیی پروتئازهای تولید شده توسط گونه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر حشرات در نفوذ از لایه‌های کوتیکول حشرات متفاوت است. برای مثال آنزیم پروتئاز Pr1 در مقایسه با آنزیم شبه‌تریپسین Pr2 نفوذپذیری قارچ *Beauveria bassiana* را بیش‌تر افزایش می‌دهد (Dias *et al*., 2008). پروتئازهای تولیدی به وسیله قارچ *Metarhizium anisopliae* برای هر میزبان و در مراحل مختلف رشدی اختصاصی بوده و بیانگر توانایی قارچ در آلوده کردن میزبان‌های مختلف است. این مفاهیم، نقش مهمی در درک مکانیسم‌های سازگاری با میزبان‌ها و عوامل موثر در آن‌ها را دربردارد (Santi *et al*., 2010).

قارچ‌های بیمارگری که دارای سرعت جوانه‌زنی بالا، خواص آب‌گریزی و فعالیت پروتئازی مناسبی هستند، می‌توانند به‌خوبی از نظر بیوشیمیایی با بدن میزبان تعامل داشته و مکانیسم‌های دفاعی میزبان را مختل کرده و در نهایت منجر به مرگ میزبان شوند (Shah *et al*., 2007; Hussain *et al*., 2010). بنابراین، پتانسیل قارچ‌های بیمارگر حشرات در عفونت‌زایی روی میزبان، بستگی به شاخص‌های بیولوژیک آن‌ها ازجمله وجود خواص آب‌گریزی مناسب برای ایجاد چسبندگی اولیه روی کوتیکول حشرات، قدرت بالای جوانه‌زنی و تندش کنیدیوم، توانایی مناسب در نفوذ از لایه‌های جلدی حشرات که توام با فعالیت شیمیایی و آنزیمی قارچ‌ها است، قدرت تکثیر در همولنف با غلبه بر واکنش‌های دفاعی سیستم ایمنی میزبان و در نهایت رشد ساپروفیتی روی لاشه میزبان و تولید کنیدیوم جدید دارد (Khachatourians, 1998; Hesketh *et al*., 2010). در مطالعات پیشین، برخی از ویژگی‌های کنیدیایی هم‌چون ریخت‌شناسی و فعالیت‌های بیوشیمیایی آن‌ها در ارتباط با میزان زهرآگینی قارچ‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (St Leger *et al*., 1986; Altre *et al*., 1999; Holder & Keyhani, 2005; Holder *et al*., 2007). در مطالعه‌ای دیگر، نوع تندش یک‌طرفه، دوطرفه و چندطرفه کنیدیوم‌های قارچ *B. bassiana* با میزان زهرآگینی آن روی حشرات مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که جدایه‌های با تندش کنیدیایی یک‌طرفه، زهرآگینی بیش‌تری داشتند (Talaei-Hassanloui *et al*., 2007). از آن‌جایی‌که مکانیسم‌های مورد استفاده توسط هر قارچ برای نفوذ به کوتیکول میزبان متفاوت است (Khachatourians, 1998)، از این‌رو، هدف این پژوهش، تبیین شاخص‌های زیستی کنیدیوم چند جدایه از قارچ‌های بیمارگر حشرات، *B. bassiana* و *M. anisopliae*، جداسازی شده از خاک‌های ایران و بررسی تنوع زهرآگینی آن‌ها روی دو گونه از حشرات است. از طرفی، ارتباط بین

ویژگی‌های زیستی قارچ‌های بیمارگر حشرات ازجمله قدرت جوانه‌زنی، سرعت رشد رویشی، میزان کنیدی‌زایی و فعالیت آنزیم پروتئاز Pr1 با میزان زهرآگینی قارچ‌های بیمارگر بررسی شد. بنابراین، برای انتخاب جدایه(های) مناسب در کنترل میکروبی حشرات با ارتباط‌سازی مناسب بین شاخص‌های زیستی و میزان زهرآگینی قارچ‌های بیمارگر حشرات برای تبیین بهتر فرآیند عفونت‌زایی آن‌ها می‌توان از یافته‌های این نوع مطالعات بهره گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

برای پرورش شب‌پره موم‌خوار بزرگ *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) از غذای مصنوعی و در شرایط آزمایشگاهی ۲۵°C±۱ و شرایط نوری ۱۶:۸ (تاریکی:روشنایی) استفاده شد. ترکیبات به کار رفته برای تهیه غذای مصنوعی شامل آرد (۳۰۰ گرم)، مخمر (۷۵ گرم)، عسل (۱۵۰ گرم)، گلیسیرین (۱۲۵ گرم) و موم (۳۰ گرم) بود. مقدار ٦٨٠ گرم از غذای آماده شده را داخل هر یک از ظروف پلاستیکی به ابعاد ۹×۱۷×۲۵ سانتی‌متر ریخته و برگه حاوی دسته‌های تخم که از انسکتاریوم گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تهیه شده بودند روی غذا قرار گرفتند. برای تخم‌گیری، حشرات کامل پس از ظهور با استفاده از آسپیراتور جمع‌آوری شده و تعداد ۲۰ شب‌پره در داخل قیف‌های تخم‌گیری پلاستیکی به قطر ۱۷ سانتی‌متر که دهانه آن‌ها توسط پارچه توری مسدود شده بود قرار گرفتند. قیف‌ها به صورت جداگانه و به حالت وارونه روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا حشرات ماده روی این کاغذها تخم‌گذاری نمایند. تخم‌ها برای تشکیل کلنی در ظروف جدید حاوی غذا قرار می‌گرفتند.

هم‌چنین، شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) در شرایط آزمایشگاهی مشابه و روی آرد گندم نانوایی مخلوط با مخمر با نسبت وزنی ۱:۱۰ (مخمر: آرد) پرورش یافت. برای پرورش از ظروف استریل پلی‌پروپیلنی گرد به قطر ۱۸ سانتی‌متر و با ارتفاع ۹ سانتی‌متر با درب‌های تهویه‌دار و پوشیده شده با توری پارچه‌ای استفاده شد. دسته‌های حاوی تخم تهیه شده از همان انسکتاریوم، روی غذا قرار گرفتند. بیشینه ارتفاع آرد مصرفی در ظروف پرورشی همواره ۳ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. پس از شفیرگی، محتویات غذای داخل ظروف الک شده و شفیره‌ها جمع‌آوری شدند و تعداد ۲۰ شفیره در داخل هر قیف تخم‌ریزی قرار داده شدند. برای تخم‌گیری، از روش بالا استفاده شد و تخم‌های به دست آمده، به طور جداگانه روی مخلوط آرد و مخمر در ظروف مجزایی قرار می‌گرفتند.

جدایه‌های قارچی

برای انجام آزمایش‌ها، سه جدایه از قارچ *B. bassiana* به نام‌های IR34-JS1، IR34-JS2 و IR41-KA75 و یک جدایه از قارچ *M. anisopliae* با نام IR41-TT1 (با علامت‌های اختصاری JS1، JS2، KA75 و TT1) از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه پاتولوژی حشرات، گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تهیه شدند. این جدایه‌ها پیش‌تر از خاک‌های چند منطقه از ایران جمع‌آوری، شناسایی و مورد بررسی تبارزایی قرار گرفته بودند (Alizadeh, 2014). جدایه‌های JS1 و JS2 از خاک‌های منطقه جیرفت (استان کرمان)، جدایه KA75 از منطقه خسروشهر (استان آذربایجان‌شرقی) و جدایه TT1 از خاک‌های اطراف تبریز (استان آذربایجان‌شرقی) جمع-آوری شده بودند. برای کشت قارچ‌ها از محیط کشت PDA استفاده شد. محتویات این محیط که شامل سیب‌زمینی پخته (۱۰۰ گرم)، دکستروز (۱۰ گرم) و آگار (۷/۵ گرم) بود در فلاسک شیشه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و

حجم آن با افزودن آب مقطر به ۵۰۰ میلی‌لیتر رسید. مخلوط به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱°C اتوکلاو شد و سپس در حجم‌های مناسب به ظروف پتری ۹ سانتی‌متری ریخته شدند و اجازه داده شد تا به طور کامل سرد شوند. سپس، دیسک‌های برش یافته حاوی میسلیوم قارچ به وسیله دهانه سرسمپلر استریل ۱۰۰ میکرولیتری (به قطر ۵ میلی‌متر) به صورت وارونه در مرکز هر ظرف پتری قرار گرفته و برای رشد در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند.

سوسپانسیون هر یک از جدایه‌های قارچی از کشت‌های ۱۵روزه آن‌ها تهیه و استفاده شد. برای این‌کار، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط با ۰/۰۳ درصد از محلول Tween-80 درون ظروف پتری ۹ سانتی‌متری حاوی میسلیوم قارچ ریخته شده و با قلم‌موی استریل هم زده شد تا کنیدیوم‌ها از بافت قارچی جدا شوند. این سوسپانسیون از قیف شیشه‌ای مفروش با پارچه متقال دولایه عبور داده شده و به درون لوله آزمایش درب‌دار استریل ریخته شد. به‌منظور جدا شدن کامل کنیدیوم‌ها از هیف قارچی سوسپانسیون به‌مدت ۵ دقیقه ورتکس گردید.

پس از آماده شدن سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها، برای تعیین غلظت کنیدیوم آن‌ها از لام تصحیح‌شده گلبول‌شمار نئوبار ((Neubauer improved bright line hemocytometer (Simax, Kavalier, Czech Republic)) استفاده شد (Mehrvar, 2015).

زیست‌سنجی‌ها

شب‌پره موم‌خوار بزرگ

برای زیست‌سنجی از لاروهای سن آخر استفاده شد. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی، غلظت‌های متوالی مورد استفاده برای زیست‌سنجی قارچ‌ها با فواصل ۱۰ برابر از $۱۰^{۳}$ تا $۱۰^{۷}$ کنیدی/میلی‌لیتر تعیین شدند. لاروها به‌روش غوطه‌ورسازی مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند. برای این کار سوسپانسیون هر جدایه به مدت ۲ دقیقه ورتکس شده و بلافاصله هر لارو با استفاده از پنس استریل به مدت ۳۰ ثانیه داخل سوسپانسیون قارچی غوطه‌ور شد. لاروهای تیمار شده داخل ظروف پتری پلاستیکی ٦ سانتی‌متری مفروش با کاغذصافی مرطوب قرار گرفتند. داخل هر پتری تعداد پنج لارو قرار گرفت. برای جلوگیری از فرار لاروها، اطراف پتری‌ها با سلفون مسدود شدند. به‌منظور انجام تهویه، سوراخ‌هایی روی درب پتری‌ها تعبیه شد که با دو لایه توری پارچه‌ای و فلزی پوشیده شدند. تیمار شاهد با آب مقطر استریل و Tween 80 (0.03%) زیست‌سنجی شد. هر تیمار در شش تکرار و با ۳۰ لارو انجام شد. در صورت خشک شدن کاغذهای صافی داخل ظروف پتری در طول آزمایش، با ۵۰ میکرولیتر آب‌مقطر استریل مرطوب می‌شدند. ظروف پتری در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱٦:۸ (تاریکی:روشنایی) قرار گرفتند. شمارش لاروهای آلوده از ٢٤ ساعت تا هفت روز پس از انجام آزمایش صورت گرفت. آزمایش زیست‌سنجی سه بار تکرار شد. لاروهای مرده برای تایید آلودگی توسط قارچ‌ها داخل پتری‌های مفروش با کاغذصافی استریل آغشته به آب‌مقطر استریل نگه‌داری شدند. در نهایت رشد قارچ روی اجساد و بررسی میکروسکوپی آن‌ها تاییدکننده آلودگی توسط قارچ بود.

شب‌پره آرد

برای ارزیابی زهرآگینی قارچ‌های موردنظر از لاروهای سن چهارم شب‌پره آرد نیز استفاده شد. پس از تعیین غلظت‌های مورد نیاز برای هر یک از جدایه‌ها در آزمایش‌های مقدماتی (از $۱۰^{۳}$ تا $۱۰^{۷}$ کنیدی/میلی‌لیتر با فواصل

ترقیق ۱۰ برابر)، لاروها به‌روش غوطه‌ورسازی مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند. برای این کار، ابتدا سوسپانسیون-های قارچی در غلظت‌های موردنظر تهیه شدند و به مدت ۲ دقیقه ورتکس گردیدند. سپس هر لارو با استفاده از پنس استریل به مدت ۱۰ ثانیه داخل سوسپانسیون غوطه‌ور شد. در نهایت لاروها به صورت جداگانه درون حفره‌های صفحه-چاهک مفروش با کاغذصافی مرطوب قرار گرفتند. از آب مقطر استریل مخلوط با ۰/۰۳ درصد Tween 80 به‌عنوان شاهد استفاده شد. هر تیمار در سه تکرار و با ۳٦ لارو انجام شد. به‌منظور تامین رطوبت برای قارچ‌ها، در صورت خشک شدن کاغذصافی‌ها در طول آزمایش، با ۵۰ میکرولیتر آب‌مقطر استریل مرطوب شدند. بقیه مراحل شبیه روش بالا انجام گرفت. این آزمایش سه بار تکرار شد.

ارزیابی شاخص‌های زیستی قارچ‌ها

رشد رویشی و کنیدی‌زایی

برای ارزیابی رشد رویشی قارچ‌ها، سوسپانسیونی با غلظت ۳×۱۰^{٦} کنیدی/میلی‌لیتر از هر جدایه تهیه شده و ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA داخل پتری‌های ۹ سانتی‌متری استریل ریخته شد و پس از بستن محیط، در مرکز آن حفره‌ای به قطر ۵ میلی‌متر با قاعده سرسمپلر ۱۰۰ میکرولیتری ایجاد شد و مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون داخل هر یک از حفره‌ها تلقیح گردید. سپس ظروف پتری در انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. رشد رویشی قارچ‌ها بعد از ۱۵ روز با اندازه‌گیری دو قطر عمود برهم ثبت گردید. آزمایش در سه تکرار انجام شد (Alves *et al*., 1998; Ummidi & Vadlamani, 2014). برای بررسی کنیدی‌زایی جدایه‌ها، دایره‌ای به قطر ۵ میلی‌متر با قاعد سرسمپلر ۱۰۰ میکرولیتری از مرکز کلنی هر یک از کشت‌های ۱۵ روزه جدایه‌ها برداشت شد و به‌طور جداگانه در داخل لوله‌های آزمایش حاوی آب مقطر استریل مخلوط با ۰/۰۳ درصد محلول Tween-80 ریخته شد. هر یک از این لوله‌ها برای جدا شدن کنیدیوم‌ها از رشته‌های هیفی به مدت ۵ دقیقه با ورتکس به هم زده شدند. تعیین غلظت سوسپانسیون با استفاده از لام تصحیح‌شده گلبول‌شمار نئوبار انجام گرفت (Ummidi & Vadlamani, 2014).

جوانه‌زنی

برای بررسی جوانه‌زنی جدایه‌های قارچی، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه با غلظت ۱×۱۰^{٦} کنیدی/میلی‌لیتر روی لام استریل حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط‌کشت PDA تلقیح شده و لام‌ها در ظروف پتری شیشه‌ای استریل داخل انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند و بعد از ۲٤ ساعت، درصد جوانه‌زنی کنیدی‌ها با شمارش تعداد کنیدیوم‌های جوانه‌زده و جوانه نزده در سطح لام زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ٤۰ برابر تعیین گردید. کنیدیوم‌هایی که طول لوله تندش آن‌ها بیش‌تر از قطر کنیدی بود به‌عنوان جوانه‌زده در نظر گرفته شدند. آزمایش در سه تکرار انجام شد (Faraji *et al*., 2013; Hussain *et al*., 2015; Hosseinzadeh *et al*., 2018).

فعالیت آب‌گریزی نسبی

برای این ارزیابی از ترکیب سه روش ارایه شده توسط Shah *et al.* (2007)، Mascarin *et al*. (2013) و Hussain *et al.* (2015) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا سوسپانسیون کنیدیومی از قارچ‌های ۲٤ روزه با غلظت ۱×۱۰^{۷} کنیدی/میلی‌لیتر در محلول ۰/۱ مولار نیترات پتاسیم تهیه گردید و جذب آن در طول موج ٦٦۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج فرابنفش (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, BioTek U.S.) به‌عنوان جذب کل(ODtotal) ثبت شد. سپس مقدار ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون داخل لوله آزمایش ریخته شد و پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از حلال هگزان، به مدت ۲ دقیقه ورتکس گردید. پس از گذشت ۱۵ دقیقه و زمانی که دو فاز از

هم جدا شدند، فاز حلال حذف شد و غلظت کنیدیوم در فاز آبی (ODaq) با استفاده از دستگاه طیف‌سنج در طول موج ٦٠٠ نانومتر تعیین گردید. از محلول نیترات پتاسیم به صورت تنها و هم‌چنین همراه با حلال به‌عنوان شاهد استفاده شد. درصد آب‌گریزی نسبی با فرمول زیر محاسبه گردید (Mascarin *et al*., 2013):

$$\text{Relative hydrophobicity (\%)} = 100\,(1 - \frac{OD_{aq}}{OD_{total}}) \quad (1)$$

فعالیت آنزیم سرین پروتئاز شبه‌سابتیلیسین (Pr1)

مقدار ١٠ میلی‌گرم کنیدیوم از هر جدایه، از سطح محیط کشت‌های ٢٤ روزه برداشت شده و داخل میکروتیوب قرار گرفت و سپس به مدت ٥ دقیقه در ١ میلی‌لیتر از Tris-HCl ٠/١ مولار با pH معادل ٧/٩٥ که با ١ میلی‌مولار Succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide به عنوان سوبسترا مخلوط شده بود، تلقیح گردید و سوسپانسیون به دست آمده به مدت ١٠ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس با g× ١٢٠٠٠ سانتریفیوژ شد. مقدار ٢٠٠ میکرولیتر از لایه رونشین (با رنگ مایل به زرد) داخل میکروپلیت کف‌پهن ریخته و جذب آن در ٤٠٥ نانومتر اندازه‌گیری شد. از بافر سوبسترا به‌عنوان شاهد استفاده گردید (St Leger *et al*., 1991; Mascarin *et al*., 2013). فعالیت آنزیم پروتئاز باعث تبدیل ٤-نیتروآنیلید به ٤-نیتروآنیلین می‌شود که در شرایط قلیایی به رنگ زرد بوده و نشانگر انجام واکنش مربوطه است (Mascarin *et al*., 2013).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

از ریشه دوم اعداد برای نرمال‌سازی داده‌های مربوط به شمارش و از arcsine√x برای داده‌های با ماهیت درصد استفاده گردید. سپس داده‌های مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند (Wraight *et al*., 2000). مقادیر مختلف LC و LT با تجزیه پروبیت در نرم‌افزار SPSS (ver. 22) به دست آمد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده شد. برای بیان اختلاف معنی‌دار بین مقادیر محاسبه شده LC_{50} و LT_{50} از عدم هم‌پوشانی حدود اطمینان بالا و پایین در سطح ٩٥ درصد استفاده شد. از نرم‌افزار SAS 9.2 برای تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ٥ درصد در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. برای دخالت دادن اثر شیب خط در مقدار کشندگی، ضریب تداخل شیب (Slope intervention factor (SIF)) در مقادیر LC_{50} و LT_{50} با فرمول‌های زیر محاسبه شد:

$$SIF_C = \frac{100-\text{Slope}}{\text{Log (Corresponding } LC_{50} \text{ value)}} \quad (2)$$

$$SIF_T = \frac{100-\text{Slope}}{\text{Corresponding } LT_{50} \text{ value}} \quad (3)$$

از شاخص فعالیت نسبی (Relative activity (RA)) برای مقایسه مقادیر LC50 به دست آمده برای هر یک از جدایه‌ها استفاده شد (Shapiro & Argauer, 2001):

$$RA\ (\%) = \frac{LC_{50}(H) - LC_{50}(T)}{LC_{50}(H)} \times 100 \quad (4)$$

که در آن، $LC_{50}(H)$ بیش‌ترین مقدار LC_{50} در بین جدایه‌ها و $LC_{50}(T)$ مربوط به جدایه مورد بررسی (تیمار) است. هم‌چنین، برای محاسبه درصد سرعت نسبی کشندگی (Relative speed of kill (RSK)) از فرمول ارایه شده توسط Shapiro & Argauer (2001) استفاده گردید:

$$(5) \quad \mathrm{RSK}\ (\%) = 100 - \frac{\mathrm{LT_{50}(T)} \times 100}{\mathrm{LT_{50}(H)}}$$

در این فرمول نیز $LT_{50}(H)$ بیش‌ترین مقدار LT50 در بین جدایه‌ها و $LT_{50}(T)$ مربوط به جدایه مورد بررسی (تیمار) است.

نتایج

زیست‌سنجی شب‌پره موم‌خوار بزرگ

جدایه TT1 در کاربرد روی لاروهای سن آخر این آفت کم‌ترین میزان LC_{50} (۱/۷۹×۱۰^۵ کنیدی/میلی‌لیتر) را نشان داد. هرچند هم‌پوشانی زیادی با حدود اطمینان ۹۵٪ بین جدایه‌ها مشاهده گردید، ولی این جدایه با ۹۱/۳۲ درصد، بیش‌ترین میزان فعالیت زیستی (RA%) را به خود اختصاص داد که ۱۱/۵۱ برابر زهرآگین‌تر از جدایه JS1 به عنوان جدایه با بیش‌ترین میزان LC_{50} بود (جدول ۱). ضریب تداخل شیب در غلظت (SIF_C) برای دخالت دادن اثر شیب خط در مقدار کشندگی هر یک از جدایه‌ها نیز نشان داد که بیش‌ترین مقدار این شاخص به جدایه TT1 اختصاص دارد (جدول ۱). چون ضرایب به دست آمده هیچ تغییری در روند زهرآگینی جدایه‌ها نشان ندادند، بنابراین، روند مورد اشاره برای مقایسه مقادیر LC_{50} در این آزمایش قابل استناد بودند.

جدول ۱- واکنش‌های تجزیه پروبیت غلظت-کشندگی لاروهای سن آخر *Galleria mellonella* نسبت به جدایه-های JS1، JS2 و KA75 قارچ *Beauveria bassiana* و جدایه TT1 قارچ *Metarhizium anisopliae*.

Table 1. Probit analysis of concentration-mortality responses of *Galleria mellonella* last instar larvae to JS1, JS2 and KA75 isolates of *Beauveria bassiana* and TT1 isolate of *Metarhizium anisopliae*.

Isolates	LC_{50} (95% CL) (× 10^5 conidia/ml)	Slope ± SE	χ^{2*} (df=5)	RA# (%)	SIF_C&
JS1	20.61 (14.96 – 29.51)	1.45 ± 0.17	4.06	0.00	18.56
JS2	8.43 (2.61 – 40.18)	0.79 ± 0.12	11.59	59.10	20.12
KA75	9.88 (2.56 – 15.81)	0.99 ± 0.14	2.84	52.06	19.80
TT1	1.79 (1.30 – 24.38)	1.59 ± 0.18	2.70	91.32	23.16

*All lines are insignificant at $P < 0.05$; #Relative activity; &Slope intervention factor for concentration.

هرچند کم‌ترین مقدار LT_{50} برای جدایه TT1، ٤/٩٥ روز به دست آمد، ولی از آن‌جایی‌که همه جدایه‌ها هم‌پوشانی کاملی (۹۵٪) با جدایه TT1 داشتند، لذا این اختلاف‌ها، غیرمعنی‌دار در نظر گرفته شدند (جدول ۲). با این حال، بالاترین درصد سرعت نسبی کشندگی (RSK%) با مقدار ۱۰/٤۹ درصد مربوط به جدایه TT1 بود. با محاسبه ضریب تداخل شیب در زمان (SIF_T) روند موجود در سرعت نسبی کشندگی جدایه‌ها تغییری نیافت و هم‌چنان جدایه TT1 بیش‌ترین مقدار عددی را به خود اختصاص داد. در این آزمایش بیش‌ترین مقدار عددی LT_{50} برای جدایه JS1 به دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲- واکنش‌های تجزیه پروبیت زمان-کشندگی لاروهای سن آخر *Galleria mellonella* نسبت به جدایه-های JS1، JS2 و KA75 قارچ *Beauveria bassiana* و جدایه TT1 قارچ *Metarhizium anisopliae*.

Table 2. Probit analysis of time-mortality responses of *Galleria mellonella* last instar larvae to JS1, JS2 and KA75 isolates of *Beauveria bassiana* and TT1 isolate of *Metarhizium anisopliae*.

Isolates	LT_{50} (95% CL) (days)	Slope ± SE	χ^{2*} (df=5)	RSK# (%)	SIF_T&
JS1	5.53 (5.20 – 5.89)	10.21 ± 1.56	1.53	0.00	16.24
JS2	5.50 (5.17 – 5.86)	10.22 ± 1.60	5.35	0.54	16.32
KA75	5.49 (5.16 – 5.84)	10.23 ± 1.60	3.14	0.72	16.35
TT1	4.95 (4.70 – 5.08)	15.34 ± 2.25	0.95	10.49	17.10

Concentration used for the LT_{50} calculations was 1×10^6 conidia/ml; *All lines are insignificant at $P < 0.05$; #Relative speed of kill; &Slope intervention factor for time.

زیست‌سنجی بید آرد

در بین جدایه‌های مورد بررسی، جدایه JS2 نسبت به لاروهای سن چهارم بید آرد با کم‌ترین میزان LC_{50} معادل ۱/۰۹×۱۰^۵ کنیدی/میلی‌لیتر به عنوان زهرآگین‌ترین جدایه روی این آفت شناخته شد (جدول ۳). هم‌چنین، بر اساس عدم هم‌پوشانی (۹۵٪) کرانه‌های پایین و بالای LC_{50} این جدایه، اختلاف بین آن با دیگر جدایه‌ها معنی‌دار بود. جدایه JS1 با بیش‌ترین مقدار LC_{50} (۸/۹۷×۱۰^۵ کنیدی/میلی‌لیتر) به عنوان مبنای محاسبات درصد فعالیت نسبی (RA%) روی لاروهای سن چهارم این آفت درنظر گرفته شد. جدایه JS2 با ۸۷/۸۵ درصد بالاترین درصد فعالیت نسبی (RA%) را به خود اختصاص داد (جدول ۳). هرچند مقادیر ضرایب تداخل شیب در غلظت (SIF_C)، تغییراتی جزیی در روند زهرآگینی نسبت به مقادیر خالص LC_{50} نشان داد، ولی جدایه JS2 هم‌چنان با بیش‌ترین مقدار در جایگاه اول قرار گرفت.

جدول ۳- واکنش‌های تجزیه پروبیت غلظت-کشندگی لاروهای سن چهارم *Ephestia kuehniella* نسبت به جدایه‌های JS1، JS2 و KA75 قارچ *Beauveria bassiana* و جدایه TT1 قارچ *Metarhizium anisopliae*.

Table 3. Probit analysis of concentration-mortality responses of *Ephestia kuehniella* fourth instar larvae to JS1, JS2 and KA75 isolates of *Beauveria bassiana* and TT1 isolate of *Metarhizium anisopliae*.

Isolates	LC_{50} (95% CL) (× 10^5 conidia/ml)	Slope ± SE	χ^{2*} (df=5)	RA# (%)	SIF_C&
JS1	8.97 (5.51 – 14.59)	0.90 ± 0.11	6.31	0.00	16.65
JS2	1.09 (0.57 – 1.84)	0.75 ± 0.11	0.75	87.85	19.70
KA75	8.11 (4.56 – 13.12)	0.82 ± 0.12	5.51	9.59	16.78
TT1	8.53 (5.27 – 14.49)	0.88 ± 0.10	1.49	4.91	16.71

*All lines are insignificant at $P < 0.05$; #Relative activity; &Slope intervention factor for concentration.

بر اساس نتایج تجزیه پروبیت واکنش‌های زمان-کشندگی جدایه‌های کاربردی علیه لاروهای سن چهارم بید آرد، کم‌ترین میزان LT_{50} با ۳/۷۱ روز به جدایه JS2 اختصاص داشت (جدول ٤). از آن‌جایی که، کرانه‌های پایین و بالای LT_{50} این جدایه با سایر جدایه‌ها هم‌پوشانی نداشت، بنابراین، اختلاف بین مقدار LT_{50} آن با سایر جدایه‌ها، معنی‌دار در نظر گرفته شد. هم‌چنین، بیش‌ترین میزان سرعت نسبی کشندگی با ۲۸/۲٤ درصد به این جدایه اختصاص داشت. بالاترین ضریب تداخل شیب در زمان (۲٤/٦٥) نیز برای همین جدایه به دست آمد. روند تغییرات SIF_T کاملا مشابه تغییرات مقادیر خالص LT_{50} جدایه‌های مورد ارزیابی قارچ‌های بیمارگر بود، بنابراین، این روند تغییرات برای مقایسه مقادیر LT_{50} در این آزمایش نیز قابل استناد بودند (جدول ٤). با این حال، بیش‌ترین مقدار عددی LT_{50} مربوط به جدایه JS1 با ۵/۱۷ روز بود.

جدول ٤- واکنش‌های تجزیه پروبیت زمان-کشندگی لاروهای سن چهارم *Ephestia kuehniella* نسبت به جدایه‌های JS1، JS2 و KA75 قارچ *Beauveria bassiana* و جدایه TT1 قارچ *Metarhizium anisopliae*.

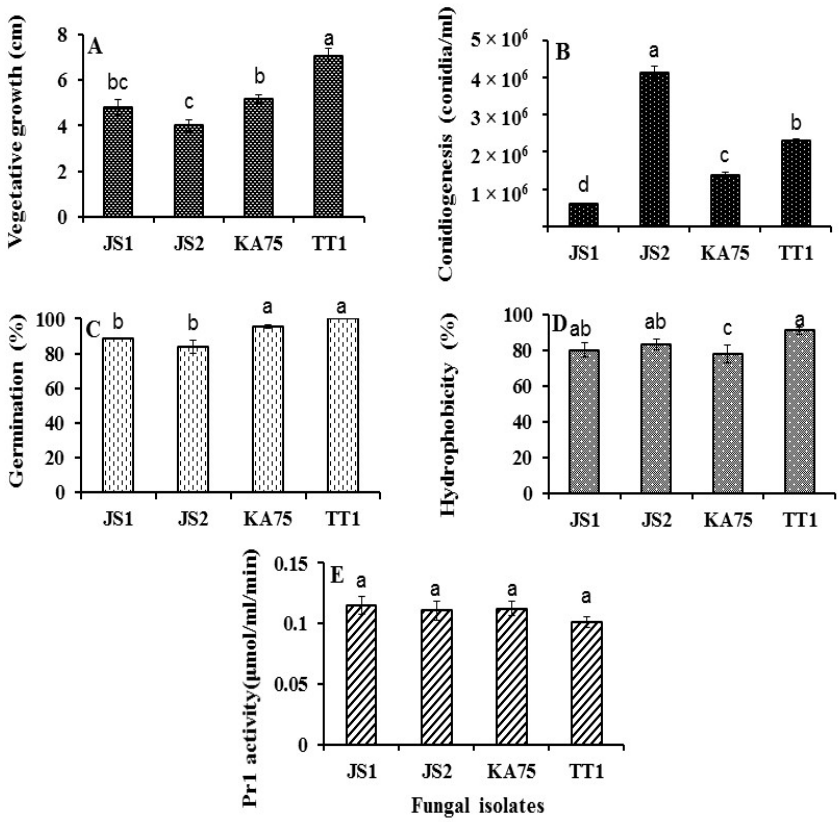
Table 4. Probit analysis of time-mortality responses of *Ephestia kuehniella* fourth instar larvae to JS1, JS2 and KA75 isolates of *Beauveria bassiana* and TT1 isolate of *Metarhizium anisopliae*.

Isolates	LT_{50} (95% CL) (days)	Slope ± SE	χ^{2*} (df=5)	RSK# (%)	SIF_T&
JS1	5.17 (4.88 – 5.48)	9.20 ± 1.17	1.66	0.00	17.56
JS2	3.71 (3.45 – 3.96)	8.55 ± 1.00	1.90	28.24	24.65
KA75	4.93 (4.65 – 5.22)	9.61 ± 1.20	2.09	4.64	18.34
TT1	5.14 (4.82 – 5.49)	7.86 ± 1.03	0.38	0.58	17.93

Concentration used for the LT_{50} calculations was 1×10^7 conidia/ml; *All lines are insignificant at $P < 0.05$; #Relative speed of kill; &Slope intervention factor for time.

شاخص‌های زیستی جدایه‌های قارچی

بر اساس نتایج به دست آمده، بین جدایه‌های مورد مطالعه از نظر میزان رشد رویشی ($F = 20.00$; df = 3,20; $P < 0.0001$) (شکل ۱-A)، کنیدی‌زایی ($F = 207.35$; df = 3,20; $P < 0.0001$) (شکل ۱-B)، درصد جوانه‌زنی ($F = 13.67$; df = 3,20; $P < 0.0001$) (شکل ۱-C) و خاصیت آب‌گریزی ($F = 8.85$; df = 3,20; $P = 0.043$) (شکل ۱-D)، تفاوت معنی‌داری وجود داشت ولی فعالیت آنزیم پروتئاز Pr1 ($F = 0.80$; df = 3,20; $P = 0.503$)، تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌ها ایجاد نکرد (شکل ۱-E). بالاترین میزان رشد رویشی مربوط به جدایه TT1 با مقدار ۷/۰۵ سانتی‌متر بود که با سایر جدایه‌ها اختلاف معنی‌دار نشان داد (شکل ۱-A). در مقابل، جدایه JS2 به طور معنی‌داری بیش‌ترین تولید کنیدیوم را با مقدار ٤/١١×١٠^٦ کنیدی/میلی‌لیتر نسبت به دیگر جدایه‌ها نشان داد (شکل ۲-B). هرچند همه جدایه‌ها درصد جوانه‌زنی بالای ۸۰ درصد را نشان دادند اما بیش‌ترین اختلاف معنی‌دار جوانه‌زنی مربوط به دو جدایه TT1 (با ۱۰۰ درصد) و KA75 (با ۹۵/٤٥ درصد) بود (شکل ۱-C). هم‌چنین کم‌ترین درصد آب‌گریزی در ارتباط با جدایه KA75 به دست آمد و سه جدایه دیگر با بیش از ۸۰ درصد خاصیت آب‌گریزی کنیدیایی، فاقد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر بودند (شکل ۱-D).



شکل ١- میانگین (± خطای معیار) شاخص‌های زیستی: (A) رشد رویشی (سانتی‌متر)، (B) کنیدی‌زایی (کنیدی/میلی‌لیتر)، (C) جوانه‌زنی کنیدیوم‌ها (٪)، (D) خاصیت آب‌گریزی (٪) و (E) فعالیت آنزیم Pr1 (µmol/ml/min)، جدایه‌های JS1، JS2 و KA75 قارچ *Beauveria bassiana* و جدایه TT1 قارچ *Metarhizium anisopliae* با استفاده از آزمون HSD توکی ($P < 0.05$). غلظت مورد استفاده برای ارزیابی میزان رشد رویشی، کنیدی‌زایی، درصد جوانه‌زنی و خاصیت آب‌گریزی نسبی به ترتیب ۳×۱۰^۶، ۳×۱۰^۶، ۱×۱۰^۶ و ۱×۱۰^۷ کنیدی/میلی-لیتر بود.

Fig. 1. Mean (±SE) values of biological indices: (A) vegetative growth (cm), (B) conidiogenesis (conidia/ml), (C) conidial germination (%), (D) hydrophobicity (%), and (E) Pr1 enzyme activity (µmol/ml/min), of JS1, JS2 and KA75 isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* TT1 isolate, separated using Tukey's HSD test ($P < 0.05$). Concentration used for evaluation of fungal vegetative growth, conidiogenesis, conidial germination and relative hydrophobicity were 3×10^6, 3×10^6, 1×10^6 and 1×10^7 conidia/ml, respectively.

بحث

از نظر کشندگی بین جدایه‌های هر دو گونه *B. bassiana* و *M. anisopliae* روی لاروهای سن آخر *G. mellonella* اختلافی مشاهده نشد، اما جدایهٔ TT1 در مقایسه با سه جدایهٔ دیگر از قارچ *B. bassiana* فعالیت نسبی کشندگی بیش‌تری نشان داد. با این حال، ارزیابی قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های مذکور روی لاروهای سن چهارم *E. kuehniella* حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین زهرآگینی این جدایه‌ها بود؛ به طوری‌که، جدایهٔ JS2

قارچ *B. bassiana* به طور معنی‌داری کم‌ترین میزان LC_{50} را به خود اختصاص داد اما سایر جدایه‌ها هم‌پوشانی زیادی با یکدیگر داشتند. مقایسه کشندگی این جدایه‌ها روی دو میزبان متفاوت نشان داد که عملکرد قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌تواند بسته به نوع حشره میزبان متفاوت باشد. این اختلاف در میزان زهرآگینی جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر حشرات روی میزبان‌های مختلف، مورد توجه مطالعات پیشین نیز بوده است. در آزمایشی که توسط Faraji *et al.* (2013) برای بررسی میزان زهرآگینی ۱۰ جدایهٔ از قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* جمع‌آوری شده از خاک‌های منطقه مراغه (ایران)، روی لاروهای سن سوم *E. kuehniella* انجام گرفت، بین مقادیر LC_{50} و LT_{50} اختلاف معنی‌داری برای هر دو قارچ مشاهده شد. Rios-Velasco *et al.* (2014) اثر بیماری‌زایی دو گونه قارچ بیمارگر حشرات، *B. bassiana* و *M. anisopliae*، را روی سه گونه آفت گیاه گوجه‌فرنگی، *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)، *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae) و *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae)، مورد بررسی قرار دادند. تفاوت زهرآگینی بین قارچ-های بیمارگر روی آفات مذکور از ۱ تا ٤ برابر متغیر بود.

گروهی از مطالعات روی قارچ‌های بیمارگر حشرات در جستجوی ارتباطات موجود بین ویژگی‌های زیستی این میکروارگانیسم‌ها با میزان بیماری‌زایی و زهرآگینی آن‌ها روی میزبان‌های مختلف صورت گرفته است. در بررسی‌ها این موضوع به اثبات رسیده است که جدایه‌هایی با قدرت جوانه‌زنی و رشد رویشی بالا، توانایی ایجاد سریع‌تر عفونت موثر علیه حشرات را نیزدارند (Fuxa, 1987; Hajek & St Leger, 1994). Samuels *et al.* (1989) نشان دادند که جوانه‌زنی و رشد رویشی سریع قارچ *M. anisopliae* با زهرآگینی بالاتر روی زنجرک *Nilaparvata lugens* در ارتباط است. Liu *et al.* (2003) نیز در بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* برای مدیریت سن *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois, 1818) به این نتیجه رسیدند که جدایه‌های با اندازه کنیدیوم بزرگ‌تر، کنیدی‌زایی بیش‌تری داشتند و جدایه‌های با سرعت جوانه‌زنی و رشد رویشی بالا، روی پورهٔ سن دوم *L. lineolaris* زهرآگین‌تر بودند. اما این موضوع در گونه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر حشرات یکسان گزارش نشده است، به‌طوری‌که در قارچ *Nomuraea rileyi*، جدایه‌های با جوانه‌زنی کندتر علیه لاروهایی از خانواده Noctuidae زهرآگین‌تر بودند (Boucias & Pendland, 1984).

با نگاهی به تغییرات شاخص‌های زیستی مورد بررسی قارچ‌های بیمارگر، میزان رشد رویشی جدایه TT1 در ظروف پتری و روی محیط PDA با اختلاف معنی‌داری بیش‌تر از سایر جدایه‌ها بود (شکل ۱-A). هم‌چنین، مقدار عددی LC_{50} این جدایه روی لاروهای سن آخر *G. mellonella* کم‌تر از سایر جدایه‌ها به دست آمد که این موضوع می‌تواند نشانگر نوعی ارتباط با میزان رشد رویشی زیاد این جدایه در نظر گرفته شود. با این حال، وضعیت بیماریزایی این جدایه روی لاروهای *E. kuehniella* متفاوت بود و این بار جدایه JS2 با اختلاف معنی-داری به عنوان زهرآگین‌ترین جدایه روی این آفت شناخته شد. به عبارتی، تفاوت در نوع میزبان، فرآیند ارتباطی محتمل بین شاخص رشد رویشی و میزان زهرآگینی جدایه‌های قارچی را دست‌خوش تغییر نمود. وضعیت مشابهی برای میزان کنیدی‌زایی قارچ‌های مورد بررسی نیز مشاهده گردید. در این آزمایش، بیش‌ترین میزان کنیدی‌زایی به ازای هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچی برای جدایه JS2 ثبت شد که اختلاف معنی‌داری با بقیه جدایه‌ها داشت (شکل ۱-B). وجود ارتباط مستقیم بین بالا بودن این شاخص و قدرت زهرآگینی بالای آن در بین سایر جدایه‌ها در خصوص لاروهای سن چهارم بید آرد قابل توجه است. بدیهی است در شرایط طبیعی، افزایش میزان کنیدی‌زایی قارچ‌های بیمارگر حشرات موجب ازدحام بیش‌تر کنیدیوم‌های آن‌ها در واحد حجم و سطح شده و درنتیجه احتمال برخوردهای تصادفی و اتصال کنیدیایی با بدن حشرات میزبان نیز افزایش خواهد یافت. این موضوع در شرایط این بررسی نیز برای جدایه JS2 قابل تعمیم است. درصد بالای جوانه‌زنی جدایه TT1 نیز

می‌تواند به عنوان یکی دیگر از شاخص‌هایی باشد که دلیلی بر فزونی میزان زهرآگینی این جدایه در کاربرد علیه لاروهای سن آخر شب‌پره موم‌خوار بزرگ است. هم‌چنین، روند تغییرات خاصیت آب‌گریزی هر یک از جدایه‌های قارچی نیز ارتباط مطمئنی با میزان زهرآگینی آن‌ها روی دو آفت مورد بررسی ارایه نمود (شکل ۱-D). بیش‌ترین خاصیت آب‌گریزی برای جدایه TT1 مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با دو جدایه JS1 و JS2 نداشت و فقط جدایه KA75 با اختلاف معنی‌داری از سه جدایه مذکور فاصله گرفت. در این بررسی میزان فعالیت پروتئازی آنزیم Pr1 جدایه‌ها تقریبا مشابه یکدیگر و بدون اختلاف معنی‌دار بود.

نگاهی به نتایج بالا، نشان داد که اثر شاخص‌های زیستی قارچ‌های بیمارگر حشرات روی میزان بیماریزایی و زهرآگینی آن‌ها هرچند در بررسی یک گونه میزبانی معین و مشخص قابل استناد است ولی به عنوان یک قاعده کلی نمی‌توان نتایج آن را به همه میزبان‌های حشره‌ای تعمیم داد. به عبارتی، فرآیند بیماریزایی در میزبان، مجموعه‌ای از عوامل مختلفی است که حدوث آن‌ها در زمان عفونت‌زایی لازم و ضروری خواهد بود. به‌نظر می‌رسد عوامل مرتبط با میزبان مانند فیزیولوژی و کوتیکول حشرات و شرایط محیطی ممکن است بر حساسیت میزبان و درنتیجه میزان زهرآگینی قارچ نسبت به آن‌ها تأثیر بگذارد. Rodriguez-Gomez *et al.* (2009) زهرآگینی قارچ *B. bassiana* را روی حشرات کامل و لاروهای *Tenebrio molitor* L., 1758 بررسی کردند و به ۹۰ درصد مرگ‌ومیر در حشرات‌کامل بعد از ٦ روز، و به ۸۰ درصد مرگ‌ومیر در لاروها بعد از ۱۱ روز دست یافتند. این پژوهشگران تفاوت در میزان زهرآگینی این قارچ درمراحل مختلف رشدی را به وجود اختلاف در ماهیت سطح کوتیکول حشره نسبت دادند. دلیل دیگر برای زهرآگینی بیش‌تر قارچ بیمارگر علیه حشرات‌کامل به کاهش پاسخ ایمنی با افزایش سن حشره ارتباط داده شده است، چرا که در مرحله حشره‌کامل بخش عمده انرژی برای انجام فعالیت‌های تولیدمثلی ذخیره می‌شود و انرژی کم‌تری برای مکانیسم‌های دفاعی (فعالیت فنل‌اکسیداز و کپسوله شدن) اختصاص می‌یابد (Schmid-Hempel, 2005).

در بین شاخص‌های زیستی ممکن است عملکرد بعضی از آن‌ها نسبت به سایر شاخص‌ها برتری داشته باشد. به عنوان مثال، موضوع چسبندگی کنیدی به کوتیکول ازجمله عوامل موثر و اولیه برای ایجاد عفونت قارچی است و عمدتاً به میزان آب‌گریزی کنیدیوم بستگی دارد. لذا این شاخص می‌تواند به تنهایی نقش موثرتری نسبت به سایر شاخص‌ها در بیماریزایی قارچ‌های بیمارگر ایفا نماید. Hussain *et al.* (2010) در بررسی ویژگی‌های تعیین‌کننده زهرآگینی قارچ *B. bassiana* نشان دادند که جوانه‌زنی کنیدیوم مستقل از فعالیت آنزیم Pr1 و خاصیت آب‌گریزی است. آن‌ها مشاهده کردند که جدایه B8465 با بیش‌ترین میزان جوانه‌زنی و کم‌ترین مقدار آب‌گریزی و فعالیت آنزیم Pr1 منجر به مرگ‌ومیر کم‌تری در لارو *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) شد. به این ترتیب این پژوهشگران نتیجه گرفتند که جوانه‌زنی کنیدیوم به تنهایی در عملکرد قارچ بیمارگر حشرات موثر نیست. هم‌چنین، این پژوهشگران تفاوت در رشد میزبان، عفونی شدن آن و دفاع میزبان را در درجه اول به ویژگی‌های بیماری‌زایی قارچ شامل آب‌گریزی، جوانه‌زنی و فعالیت پروتئازهای تخریب‌کننده کوتیکول نسبت دادند. با این حال در پژوهش مذکور، وجود شاخص‌های بالایی هم‌چون خاصیت آب‌گریزی و فعالیت پروتئازی بیش‌تر را به زهرآگینی بالای جدایه دیگری با نام B8463 مرتبط دانستند. در پژوهش حاضر نیز مشخص شد که هرگاه جدایه‌ای، خاصیت آب‌گریزی بالایی به همراه میزان کنیدی‌زایی بیش‌تری را در شرایط *in vitro* نشان داد، میزان زهرآگینی آن جدایه روی حشرات نیز بیش‌تر از سایر جدایه‌ها بود. این شرایط برای هر دو جدایه زهرآگین این پژوهش (جدایه TT1 قارچ *M. anisopliae* و جدایه JS2 قارچ *B. bassiana*) مشاهده گردید.

نشان داده شده است که کاهش میزان زهرآگینی قارچ‌های بیمارگر حشرات ممکن است تا حدودی ناشی از حضور کنیدیوم‌هایی فاقد آنزیم‌های مناسب برای تسهیل نفوذ در کوتیکول میزبان باشد (St Leger *et al.*, 1986). فعالیت‌های آنزیمی موجود در سطح کنیدیوم ممکن است راهی برای دست‌یابی به مواد غذایی مورد نیاز برای جوانه‌زنی کنیدیوم فراهم نمایند و هم‌چنین باعث تغییرات اولیه در سطح کوتیکول میزبان پیش از جوانه‌زنی شوند (St Leger *et al.*, 1991). میزان فعالیت آنزیمی بالا منجر به آلودگی سریع‌تر در میزبان خواهد شد اما نتایج پژوهش حاضر ارتباطی بین میزان فعالیت آنزیم Pr1 و زهرآگینی قارچ نشان نداد. این موضوع به احتمال زیاد در ارتباط با کشت‌های متوالی در محیط‌کشت PDA است. چنان‌چه Shah *et al.* (2007) در آزمایش‌های خود به این نتیجه رسیدند که تهیه کشت‌های متوالی و مکرر باعث ایجاد تغییرات سریع در ویژگی‌های سطحی کنیدیوم و زهرآگینی قارچ *M. anisopliae* می‌شود. هم‌چنین دریافتند چسبندگی و آب‌گریزی کنیدیوم‌ها پس از سومین کشت، دیگر ثابت مانده و کاهش نشان نمی‌دهد، در حالی که فعالیت آنزیمی با کشت‌های مکرر هم‌چنان کاهش می‌یابد. میزان این فعالیت آنزیمی بستگی به شرایط تولید کنیدیوم در حالت *in vivo* و *in vitro* دارد، به‌طوری که کنیدیوم‌های تولید شده در شرایط *in vivo* سطوح بالاتری از میزان فعالیت آنزیمی را نشان می‌دهند. این موضوع به این معنی است که حشره میزبان، مواد مغذی بیش‌تر و مناسب‌تری را برای رشد و تولید کنیدیوم زهرآگین فراهم می‌کند (Hussain *et al.*, 2010). در حقیقت کنیدیوم‌های تولید شده روی اجساد حشرات از سطح بالاتری از فعالیت آنزیمی Pr1 برخوردار هستند. مطالعه دیگری در این زمینه نشان داد زهرآگینی کنیدیوم سویه‌های قارچی پس از عبور از بدن لارو شب‌پره ابریشم‌باف ناجور *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Erebidae, Lymantriinae) و آلوده‌سازی مجدد آن بهبود یافته است (Hajek *et al.*, 1990). در مقابل، Golo *et al.* (2015) میزان فعالیت آنزیم Pr1 قارچ *M. anisopliae* در کنیدیوم‌های تولید شده روی اجساد کنه و روی محیط کشت را اندازه‌گیری کردند و مشاهده نمودند که فعالیت آنزیمی در کنیدیوم‌های تولید شده روی اجساد کنه‌ها نه برابر بیش‌تر از فعالیت آنزیمی در کنیدیوم‌های تولید شده روی محیط کشت بود. Mascarin *et al.* (2013) نشان دادند که فعالیت آنزیمی و آب‌گریزی سطح کنیدیوم‌ها ارتباطی با زهرآگینی قارچ‌های *B. bassiana* و *Isaria fumosorosea* علیه سفیدبالک پنبه نداشت.

تنوع در میزان حساسیت گونه‌های مختلف حشرات نسبت به یک گونه مشخص قارچی هنوز به طور کامل تبیین نشده است (Keyhani, 2018). حساسیت کم‌تر نسبت به قارچ‌های بیمارگر حشرات موجب بروز واکنش‌های متفاوتی از زهرآگینی روی گونه‌های مختلف حشرات می‌گردد. علت این امر به عوامل متعددی ازجمله فعالیت آنزیمی سطح روکوتیکول، قدرت اتصال و چسبندگی کنیدی، سرعت جوانه‌زنی، تشکیل ساختارهای نفوذی مناسب و کارآمد نظیر لوله تندش و آپرسوریوم و غیره نسبت داده می‌شود (Lewis *et al.*, 2009; Wanchoo *et al.*, 2009; Pedrini *et al.*, 2010; Rella *et al.*, 2016). اما گروهی از پژوهشگران دلیل عمده آن را وجود تغییر در ترکیبات روکوتیکول به ویژه ترکیبات چربی در گونه‌های مختلف حشرات می‌دانند (Gutierrez *et al.*, 2015). عصاره‌های لیپیدی برگرفته از کوتیکول برخی از حشرات، فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی انتخابی روی گونه-های مختلف حشرات را نشان داده‌اند. در توجیه تفاوت در زهرآگینی یک گونه قارچ بیمارگر مشخص روی گونه‌های مختلف حشرات، مطالعات مختلفی صورت گرفته است (Golebiowski *et al.*, 2014, 2015). در زمینه بررسی تغییر در سطح فنل‌اکسیداز کوتیکولی، اسیدهای چرب و هیدروکربن‌های حشرات از یک‌سو و هم‌چنین وجود همبستگی مثبت بین شاخص سرعت جوانه‌زنی و زهرآگینی بالای قارچ‌های بیمارگر حشرات از سوی دیگر، گزارش‌هایی ارایه شده است (Raafat *et al.*, 2015). به عنوان مثال، قارچ *M. anisopliae* با سرعت جوانه-زنی بالا در کوتاه‌ترین زمان قادر به کشتن گونه *Blattella germanica* L., 1767 بود، در حالی‌که همین قارچ نسبت

به گونه *Blatta orientalis* L., 1758 عملکرد بسیار ضعیفی را نشان داد (Gutierrez *et al.*, 2015). این امر سبب شد اسیدهای چرب آزاد کوتیکولی این گونه مورد تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی قرار گیرد. دست‌کم ۱۹ ترکیب مختلف (١٤-کربنه تا ٢٤-کربنه) در عصاره چربی‌های روکوتیکولی دو گونه مذکور گزارش شد؛ به طوری‌که، گونه *B. orientalis* به عنوان گونه با حساسیت کم‌تر نسبت به این قارچ، حاوی ترکیبات منحصر به فردی از جمله اسیدهای میریستولئیک (Myristoleic)، سی-لینولئیک (C-linoleic)، آراکیدیک (Arachidic)، دی‌همولینولئیک (Dihomolinoleic) و بنیک اسید (Behenic acid) بود (Gutierrez *et al.*, 2015). این پژوهشگران، دلیل حساسیت کم‌تر گونه دوم را وجود اسیدهای چرب مذکور در ساختمان روکوتیکول این حشره دانستند که موجب کاهش جوانه‌زنی و تندش قارچ بیمارگر شده است. بنابراین، به منظور فراهم نمودن درک بهتری از رفتار و فعالیت زیستی گونه‌ها و جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر حشرات روی میزبان‌های مختلف باید دلایل مغایرت‌های بیماری-زایی و زهرآگینی آن‌ها از جنبه‌های متعددی هم‌چون عوامل مربوط به میزبان، عامل بیمارگر، تاثیر زیرنهشت و عوامل محیطی مورد ارزیابی قرار بگیرند.

به عنوان نتیجه‌گیری کلی همان‌طور که نتایج نشان دادند، اختلاف معنی‌داری در میزان رشد رویشی، کنیدی-زایی، درصد جوانه‌زنی کنیدیوم‌ها و خاصیت آب‌گریزی بین جدایه‌های مورد بررسی از دو گونه قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* مشاهده شد. اما از نظر فعالیت آنزیمی پروتئازی Pr1، تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌های مورد ارزیابی وجود نداشت. بیش‌ترین میزان زهرآگینی روی لاروهای سن آخر شب‌پره موم‌خوار بزرگ مربوط به جدایه TT1 و روی لاروهای سن چهارم شب‌پره آرد توسط جدایه JS2 به دست آمد. در بین شاخص‌های مورد ارزیابی قارچی، هرگاه میزان خاصیت آب‌گریزی جدایه‌ای با میزان کنیدی‌زایی بالایی همراه بود، آن جدایه میزان زهرآگینی بیش‌تری را نیز روی حشرات ایجاد نمود، اما این ویژگی، قابلیت تعمیم برای همه جدایه‌های قارچی و گونه‌های میزبانی را نداشته و باید برای هر نوع ارتباط قارچ-میزبان مورد ارزیابی قرار بگیرد. با این حال، دو جدایه *M. anisopliae* TT1 و *B. bassiana* JS2 با داشتن پتانسیل کشندگی بالا نسبت به سایر جدایه‌های مورد بررسی کارآیی بیش‌تری برای بهره‌گیری در برنامه‌های مهار زیستی آفات گیاهی دارند.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از پایان‌نامهٔ کارشناسی‌ارشد رشته حشره‌شناسی کشاورزی نویسنده اول بوده و نگارندگان بر خود وظیفه می‌دانند که از حمایت‌های مادی و معنوی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تشکر و قدردانی نمایند.

References

Alizadeh, Z. (2014) *Identification of entomopathogenic fungi from Khosrowshahr region based on phylogenetic analysis of ITS-rDNA sequence*. M.Sc. thesis, Azarbaijan Shahid Madani University, 118 pp. (In Persian with English summary).

Altre, J. A., Vandenberg, J. D. & Cantone, F. A. (1999) Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 73, 332-338.

Alves, S. B., Moino A. & Almeida, J. E. M. (1998) Produtos fitossanitários e entomopatógenos, pp. 217-238 in Alves, S. B. (Ed) *Controle microbiano de insetos.* 1163 pp. Piracicaba, FEALQ.

Boucias, D. G. & Pendland, J. C. (1984) Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology* 43, 288-292.

Boucias, D. G., Pendland, J. E. & Latge, J. P. (1988) Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1795-1805.

Butt, T., Coates, C., Dubovskiy, I. & Ratcliffe, N. (2016) Entomopathogenic fungi: new insights into host–pathogen interactions. *Advanced Genetics* 94, 307-64.

Chandler, D. (2017) Basic and applied research on entomopathogenic fungi. pp. 69-89 *in* Lacey, L. A. (Ed) *Microbial Control of Insect and Mite Pests from Theory to Practice*. 461 pp. Elsevier Inc. UK.

Dias, B. A., Neves, P. M. O. J., Furlaneto-Maia, L. & Furlaneto, M. C. (2008) Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 301-306.

Faraji, S., Mehrvar, A. & Derakhshan Shadmehri, A. (2013) Studies on the virulence of different isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metcsn.) Sorokin against Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *African Journal of Agricultural Research* 8, 4157-4161.

Fuxa, J. (1987) Ecological considerations for the use of entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology* 23, 409-442.

Gillespie, J. P., Bateman, R. & Charnley, A. K. (1998) Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 128-137.

Golebiowski, M., Cerkowniak, M., Urbanek, A., Dawgul, M., Kamysz, W., Boguś, M. I., Sosnowska, D. & Stepnowski, P. (2014) Antimicrobial activity of untypical lipid compounds in the cuticular and internal lipids of four fly species. *Journal of Applied Microbiology* 116, 269-287.

Golebiowski, M., Cerkowniak, M., Urbanek, A., Dawgul, M., Kamysz, W., Boguś, M. I. & Stepnowski P. (2015) Identification and antifungal activity of novel organic compounds found in cuticular and internal lipids of medically important flies. *Microbiological Research*, 170, 213-222.

Golo, P. S., Santos, H. A., Perinotto, W. M. S., Quinelato, S., Angelo, I. C., Camargo, M. G., Sa, F. A., Massard, C. L., Fernandes, E. K. K., Roberts, D. W. & Bittencourt, V.

R. E. P. (2015) The influence of conidial Pr1 protease on pathogenicity potential of *Metarhizium anisopliae* senso latu to ticks. *Parasitology Research* 114, 2309-2315.

Gutierrez, A. C., Gołębiowski, M., Pennisi, M., Peterson, G., García, J. J., Manfrino, R. G. & López Lastra, C. C. (2015) Cuticle fatty acid composition and differential susceptibility of three species of cockroaches to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales). *Journal of Economic Entomology* 108, 752-760.

Hajek, A. E. & St Leger, R. J. (1994) Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology* 39, 293-322.

Hajek, A. E., Humber, R. A. & Griggs, M. H. (1990) Decline in virulence of *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) with repeated *in vitro* subculture. *Journal of Invertebrate Pathology* 56, 91-97.

Hesketh, H., Roy, H. E., Eilenberg, J., Pell, J. K. & Hails, R. S. (2010) Challenges in modeling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. *Biocontrol* 55, 55-73.

Holder, D. J. & Keyhani, N. O. (2005) Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5260-5266.

Holder, D. J., Kirkland, B. H., Lewis, M. H. & Keyhani, N. O. (2007) Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana*. *Microbiology* 153, 3448-3457.

Hosseinzadeh, R., Mehrvar, A., Eivazian Kary, N. & Valizadeh, H. (2018) Compatibility of some plant essential oils in combination with the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against *Callosobruchus maculatus* (Col.: Bruchidae). *Plant Pest Research* 8, 1-14.

Hussain, A., Rizwan-ul-Haq, M., Al-Ayedh, H., Ahmed, S. & Al-Jabr, A. M. (2015) Effect of *Beauveria bassiana* infection on the feeding performance and antioxidant defence of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *BioControl* 60, 849-859.

Hussain, A., Tian, M. Y., He, Y. R., Ruan, L. & Ahmed, S. (2010) In vitro and in vivo culturing impacts on the virulence characteristics of serially passed entomopathogenic fungi. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 8, 481-487.

Jarrold, S. L., Moore, D., Potter, U. & Charnley, A. K. (2007) The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Research* 111, 240-249.

Keyhani, N. O. (2018) Lipid biology in fungal stress and virulence: entomopathogenic fungi. *Fungal Biology* 122, 420-429.

Khachatourians, G. G. (1998) Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. pp. 331-363 in Howard, D. H. & Miller, J. D. (Eds) *The Mycota*, *human and animal relationships*. Vol. 6. 307 pp. Springer Verlag, Berlin.

Lacey, L. A. (2017) Entomopathogens used as microbial control agents. pp. 3-12 in Lacey, L. A. (Ed) *Microbial Control of Insect and Mite Pests from Theory to Practice*. 461 pp. Elsevier Inc.

Lewis, M. W., Ines V. Robalino, I. V. & Keyhani, N. O. (2009) Uptake of the fluorescent probe FM4-64 by hyphae and haemolymph-derived *in vivo* hyphal bodies of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology* 155, 3110-3120.

Liu, H., Skinner, M., Brownbridge, M. & Parker, B. L. (2003) Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology* 82, 139-147.

Mascarin, G. M., Kobori, N. N., Quintela, E. D. & Delalibera, I. (2013) The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. *Biological Control* 66, 209-218.

Mehrvar, A. (2015) *An introduction to pathology and microbial control of pests*. 301 pp. Azarbaijan Shahid Madani University Press. Tabriz, Iran. [In Persian].

Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N. O. (2013) Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4, 357-374.

Pedrini, N. (2018) Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. *Fungal Biology* 122, 538-45.

Pedrini, N., Zhang, S., Juarez, M. P. & Keyhani, N.O. (2010) Molecular characterization and expression analysis of a suite of cytochrome P450 enzymes implicated in insect hydrocarbon degradation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology* 156, 2549-2557.

Raafat, I., Meshrif, W. S., El Husseiny, E. M., El-Hariry, M. & Seif, A. I. (2015) *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) cuticle as a barrier for *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces* sp. Infection. *African Entomology* 23, 75-87.

Rella, A., Farnoud, A. M. & Del Poeta, M. (2016) Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. *Progress in Lipid Research* 61, 63-72.

Rios-Velasco, C., Pérez-Corral, D. A., Salas-Marina, M. A., Berlanga-Reyes, D. I., Ornelas-Paz, J. J., Acosta Muñiz, C. H., Cambero-Campos, J. & Jacobo-Cuellar, J. L. (2014) Pathogenicity of the Hypocreales fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against insect pests of tomato. *Southwestern Entomologists* 39, 739-750.

Rodriguez-Gomez, D., Loera, O., Saucedo-Castaneda, G. & Viniegra-Gonzalez, G. (2009) Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 513-518.

Samuels, K. D. Z., Heale, J. B. & Liewellyn, M. (1989) Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53, 25-31.

Santi, L., Silva, W. O. B., Pinto, A. F. M, Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2010) *Metarhizium anisopliae* host–pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biology* 114, 312-319.

Schmid-Hempel, P. (2005) Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology* 50, 529-551.

Shah, F. A., Allen, N., Wright, C. J. & Butt, T. M. (2007) Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* 276, 60-66.

Shapiro, M. & Argauer, R. (2001) Relative effectiveness of selected stilbene optical brighteners as enhancers of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. *Biological and Microbial Control* 94, 339-43.

Siebers, M., Brands, M., Wewer, V., Duan, Y., Hölzl, G. & Dörmann, P. (2016) Lipids in plant–microbe interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861: 1379-1395.

St Leger, R. J., Charnley, A. K. & Cooper, R. M. (1986) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 48, 85-95.

St Leger, R. J., Goettel, M., Roberts, D. W. & Staples, R. C. (1991) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 58, 168-179.

Talaei-Hassanloui, R., Kharazi-Pakdel, A., Goettel, M. S., Little, S. & Mozaffari, J. (2007) Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. *Journal of Invertebrate Pathology* 94, 102-107.

Ummidi, V. R. S. & Vadlamani, P. (2014) Preparation and use of oil formulations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Spodoptera litura* larvae. *African Journal of Microbiology Research* 8, 1638-1644.

Wanchoo, A., Lewis, M. W. & Keyhani, N. O. (2009) Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology* 155, 3121-3133.

Wraight, S. P., Carruthers, R. I., Jaronski, S. T., Bradley, C. A., Garza, C. J. & Galaini-Wraight, S. (2000) Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and

Paecilomyces fumosoroseus for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control* 17, 203-217.

Zimmermann, G. (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 17 (5/6): 553-596.