شناسایی ۳۰ جدایه قارچ *Metarhizium* با استفاده از توالی

ناصر فرخی*[۱] ، مهسا جوکار[۲] ، مهدیه پارسائیان[۳]، علی درخشان شادمهری[۴]، ابوالفضل مسعودی[۵]

تاریخ دریافت: ۹٤/۰۷/۰۸
تاریخ تصویب: ۹٦/۰۳/۰۳

چکیده

***Metarhizium spp.* قارچ بیمارگری است که در کنترل زیستی طیف وسیعی از آفت ها نقش دارد و بر پایه ویژگی های تبارشناختی و ملکولی شناسایی می گردد. توالی های ITS و S۸/۵ ریبوزومی، برای شناسایی گونه ها و سویه های ۳۰ جدایه ی جمع آوری شده از خاک های شاهرود و شمال ایران به همراه ۱۰ توالی از گونه های شناخته شده برای رسم درخت تبارشناختی متارایزیوم به کار برده شدند. صفات نرخ رشد، زهرآگینی و تعداد کنیدی های تولیدی جدایه ها روی محیط کشت PDA حاوی قارچ کش های انتخابی اندازه گیری شدند. سوسپانسیون ۱۰^۸ × ۱ کنیدی/میلی لیتر این جدایه ها جهت تایید کنترل زیستی آنها، روی حشره ی کامل سوسک قرمز آرد(Tribolium castaneum (Col, Tenebrionidae) تیمار شد. نتایج نشان داد که بالاترین میزان نرخ رشد به جدایه های SHU.J.27، SHU.J.33 ، SHU.J.22، SHU.J.35، SHU.J.11، SHU.J.02، SHU.J.24 و SHU.J.29 تعلق داشت. ۱۰ جدایه بر**

*۱- استادیار، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین،تهران (نویسنده مسئول n_farrokhi@sbu.ac.ir)
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود
۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود
٤- استادیار، گروه باغبانی و گیاهپزشکی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود
۵- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه نورث وست چین

اساس طبقه بندی Yip، در سطح A با قدرت تهاجمی بالا علیه آفت میزبان، قرار گرفتند که در این بین جدایه ی SHU.J.01 با میانگین تولید $۸/۰۲۵ \times ۱۰^{۷}$ کنیدی، بر طبق گروه بندی پتلامول و پراسرتسان، به عنوان مهاجم ترین جدایه جهت کنترل زیستی آفت شناسایی شد. ضریب همبستگی معنی دار ($p < ۰/۰۱$) صفات نیز نشان داد که جدایه های دارای نرخ رشد سریعتر، با تولید تعداد کنیدی بیشتر، از قدرت زهرآگینی بیشتری در آلوده سازی میزبان برخوردارند و از نظر کاربردی می توانند در کنترل زیستی آفات، بطور موفق مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: Metarhizium، Tribolium castaneum، تنوع ژنتیکی، کنترل زیستی

مقدمه

قارچ همه جازی (Ascomycota, Hypocreales) *Metarhizium* با توان آلوده سازی بیش از ۲۰۰ گونه آفت نقش موثری در مبارزه زیستی داشته است. این قارچ نخستین مرتبه در سال ۱۸۸۳ توسط (Metchnikoff) روسی به عنوان بیمارگر سوسک قهوه ای گندم معرفی شد (Khan et al., 2012). در همان سال توسط Metchnikoff و Sorokin *M. anisopliae* ت غییر نام داد (Entz, 2005).در گذشته از توصیف گرها و کلیدهای ریخت شناسی برای رده بندی استفاده می شد ولی با گذر زمان روشن گردید که شناسایی گونه های قارچی منجمله انواع بیمارگر حشرات منحصر بر ویژگی های ریخت شناختی که تحت تاثیر محیط هستند سخت و گاهی غیرممکن است (Neelapu et al., 2009; Tangthirasunun et al., 2010). در مقابل استفاده از فنون ملکولی، درک صحیحی از روابط ژنتیکی درون و بین گونه ای را فراهم می آورند (Tangthirasunun et al., 2010). مطالعه ی توالی های DNA و مقایسه ی بین آنها می تواند دیدگاهی جدید درباره ی تنوع اشکال جنسی و غیر جنسی قارچ های بیمارگر حشرات فراهم آورد و به شفاف سازی روابط تبارشناختی میان آنها کمک نماید (Sosa-Goemez et al., 2009). هربرت (2002) شناسایی موجودات را با استفاده از بارکدهای ملکولی پیشنهاد نمود. یکی از روش های معمول شناسایی قارچ ها استفاده از تنوع در توالی فواصل رونویسی شده ی داخلی (ITS) است (White et al., 1990; Stockinger et al., 2010). در ارزیابی تبارشناختی *Metarhizium* به همت درایور و همکاران (Driver et al., 2000)

با استفاده از ناحیه ITS، تعداد ۱۰ خوشه در این جنس مشخص شد که *M. anisopliae* دربرگیرنده ی چهار گونه *M. anisopliae*، *lepidiotae* (Driver & Miner) J.F.Bisch., Rehner & Humber و *M. acridum* (Driver & (Miner) J.F.Bisch., Rehner & Humber، *M. majus* بود (Bisch et al., 2009). در طبقه بندی جدیدتر گونه های *M. guizhouense* ، *M. anisopliae* ، *M. pingshaense* ، *M. acridum*، *M. majus* ، *M. lepidiotae* , *M. globosum* ، *M. brunneum* و *M. robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber در این جنس معرفی شدند (Bischoff et al., 2009). اشنایدر و همکاران (2011) پس از معرفی گونه های *M. majus* (J.R.Johnst) J.F.Bisch., Rehner & Humber, *M. guizhouens*، *M. robertsii*، *M. anisopliae*، *M. pingshaense* و *M. brunneum* در این جنس، گونه ی *M. anisopliae* را ترکیبی از گونه های دیگر از منظر تکاملی دانست بر این اساس، دو گونه ی *M. brunneum* و *M. anisopliae* با داشتن ویژگی بوت استرپ پایین، از قرابت کمی در خوشه بندی بر اساس توالی ITS برخوردار بودند. تحلیل توالی ITS و ۵/۸ S برای شناسایی SHU.J. ۲۵ جدایه *Metarhizium* جمع آوری شده از حشرات میزبان و خاک مناطق مختلف تایلند نشان داد که جدایه های *M. album*، *M. anisopliae* *anisopliae var. anisopliae* و *M. flavoviride* به وضوح از یکدیگر تفکیک می شوند و SHU.J. ۲۵ جدایه قارچی به ٤ گروه اصلی تفکیک شدند (Gams & Roszypal,1973). با این حال، این مطالعه نتوانست تفاوت میان جدایه های *M. anisopliae* var. *anisopliae* و *M. anisopliae* var. *majus* را مشخص نماید (Tangthirasunun et al., 2010). تحلیل ITS و ژن EF-1α در SHU.J. ۱٤۵ جدایه ی *Metarhizium* بدست امده از خاک های ژاپن، جدایه ها را در ۲ گروه *M. flavoviride* var. *pimphigi* و *M. lepidiotae* دسته بندی نمود (Nishi et al., 2011). در ۱۰۸۰ نمونه خاک کره، تعداد SHU.J. ۸۲ جدایه *Metarhizium* *spp*. و SHU.J. ۱۲۵ جدایه *Beauveria spp*. بر اساس ناحیه ITS شناسایی شدند (Young Shin et al., 2013). همچنین لوآن و همکاران نشان دادند که *M. anisopliae* و گونه خواهری آن یعنی *M. robertsii* مونوفیلتیک نیستند (Luan et al., 2013).

قارچ *M. anisopliae* در کنترل آفات انباری *Tribolium castaneum* (Herbst,1797; Batta, 2004 Batta and Kawanishi, 2005; Khashaveh and Sakenin Chelav, 2013; Abbasafieh) و *T. confusum* (Jacquelin duVal,1863) و Sitophylus orizae Kavallieratos et al., 2006) در شرایط آزمایشگاهی به کار برده شده است. با این وجود، بر پایه نتایج کیسر (Keyser, 2010) بیماری زایی آزمایشگاهی ممکن است مناسب ترین نمایه پتانسیل فعالیت مزرعه ای قارچ های بیمارگر نباشد (Roberts and St. Leger, 2004) و باید از

دیگر شاخص ها نظیر نرخ رشد و تعداد کنیدی تولیدی توسط یک جدایه و ارزیابی تاثیرعوامل محیطی نیز استفاده شود. بررسی نرخ رشد در میان قارچ های بیمارگر حشرات توسط درایور و همکاران نشان داد که *M. anisopliae* نسبت به سایر قارچ ها، نرخ رشد سریع تری دارد (Darbro et al., 2011). ابراهیم و همکاران نیز با بررسی نرخ رشد جدایه های *M. anisopliae* در محیط های کشت مختلف گزارش نمودند که سرعت رشد این جدایه در محیط SDAنسبت به سایر محیط های کشت دیگر بیشتر است (Ibrahim et al., 2011). نرخ رشد سریع در دماهای مختلف متناظر با تعییرات دمایی زیست بوم آفت هدف باید از گزینه های انتخاب بین جدایه های مختلف قارچ زیست مهارگر باشد (Keyser, 2010). بررسی کیسرنشان داد که دمای بهینه ی نرخ رشد جدایه های *Metarhizium spp* بین ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد است. پتلامول و پراسرتسان (Petlamul and Prasertsan, 2012) اظهار داشتند که تعداد کنیدی تولیدی به نوع جدایه ی مورد استفاده بستگی دارد و جدایه های *B. bassiana* از بیشترین میزان کنیدی تولیدی برخوردار بودند همچنین، علاوه بر نوع جدایه مورد استفاده، ترکیب محیط کشت، منبع کربن، غلظت و نسبت کربن به نیتروژن نیز بر تعداد کنیدی تولیدی توسط جدایه ها تاثیرگذار می باشد. با توجه به موارد مذکور، هدف این مطالعه، شناسایی گونه های قارچی جدا شده از خاک های چند منطقه از ۷ استان کشور، ار طریق ترسیم درخت تبارشناختی بر پایه ی ارزیابی تکثیر توالی ITS آنها است. همچنین بررسی تفاوت های میان این جدایه ها از نظر خصوصیاتی چون نرخ رشد و تولید کنیدی توسط زیست سنجی آزمایشگاهی به منظور انتخاب جدایه-هایی با توان زهرآگینی بیشتر علیه میزبان هدف (سوسک قرمز آرد) از دیگر اهداف این پژوهش می باشد. اطلاعات حاصل از این پژوهش می تواند جهت انتخاب موثرترین جدایه های قارچی در کنترل زیستی سوسک قرمز آرد بطور کاربردی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

منطقه مورد مطالعه و نمونه گیری خاک

در این پژوهش، هفت ناحیه (ناحیه ۱: شهنما، ناحیه ۲: کلاته اسد، میامی، ابراهیم آباد، ناحیه ۳: مرادآباد، ده ملا، کلاته ملا، مومن آباد، حداده، ناحیه ٤: مغان، شهرک ابوذر، ناحیه ٥: جاده شاهرود/آزاد شهر، جنگل ابر، روستای ابر، جنگل قطری، چهارطاق پرو، قلعه نوخرقان، ناحیه ٦: بسطام، امیریه، فرحزاد، مجن، تاش و ناحیه ۷: رویان، دیزج، شهرک دانشگاه) در شهرستان شاهرود برای نمونه گیری انتخاب شد و از هر ناحیه تعداد ۳۰ نمونه خاک گرفته شد. نحوه نمونه گیری به این صورت بود که در فصل

بهار، از هر باغ یا مزرعه دو نمونه (یکی از حاشیه باغ یا مزرعه و دیگری از مرکز آن) جمع آوری شد و به ثبت مختصات جغرافیایی اقدام گردید. نمونه برداری در فصل بهار، در مناطق زراعی و باغی با رطوبت مناسب انجام پذیرفت. برای هر نمونه در کنار ریشه گیاه یا درخت گودالی به عمق ۳۰ سانتی متر حفر شد و خاک این دو ناحیه با یکدیگر مخلوط شد و سپس حجمی معادل ۵۰۰ گرم در پلاستیک ریخته شد. مختصات باغ و نمونه بر روی کیسه پلاستیکی ثبت گردید. رطوبت عامل مهمی در فراوانی و کارایی قارچ های بیمارگر حشرات است (Zimmerman, 2007) در ادامه، دامنه ی نمونه گیری توسعه پیدا کرد و از مناطق مختلف شمال کشور، شامل جنگل گلستان (نهارخوران)، شهرهای بابل، بابلسر، آمل و رامسر در استان مازندران، منطقه سرولات (چابکسر) از استان گیلان، پارک جنگلی چیتگر در تهران، روستای حسن آباد استان هرمزگان و البرز (فردیس کرج) نیز نمونه ی خاک جمع آوری شد.

جداسازی قارچ از خاک

جداسازی قارچ های بیمارگر حشرات توسط روش طعمه حشره ای[1] صورت گرفت (Zimmerman, 2007). در این روش، میزان ۲۰ گرم از هر نمونه خاکی با الک ۱ میلی متری غربال و در پتری دیش های ۹۰ میلی متری ریخته شد (Meyling, 2007). تعداد ۱۰ عدد لارو گالریا در سنین ۳ یا ٤ در هر پتری قرار داده شد پتری ها با پارافیلم درزگیری شد و در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۷ روز در انکوباتور قرار داده شدند.

جداسازی و خالص سازی جدایه ها

به علت سرعت رشد کمتر قارچ های بیمارگر حشرات در مقابل قارچ های ساپروفیتی نظیر تریکودرما و آسپرژیلوس، محیط کشت DOC2-PDA (Young Shin et al., 2010) با کمی تغییرات (۰/۵ گرم سیکلوهگزامید (سیگما، سنت لوئیس، آمریکا)، ۰/۵ گرم دودین ٦۵ درصد ، ۰/۲ گرم کلرامفنیکل (سیگما، سنت لوئیس، آمریکا)، ۰/۳ گرم کلرید مس و ۰/۰۲ گرم کریستال ویولت (سیگما، سنت لوئیس، آمریکا) با اسیدیته ۵/۸ استفاده شد. با جداسازی جدایه ها، از کلنی های چنداسپوری، با استفاده از روش سری رقّت (Petlamul and Prasertsan, 2012)، کلنی های تک اسپوری تهیه شد و بدین ترتیب SHU.J. ۳۰ جدایه خالص به دست آمد.

محاسبه نرخ جداسازی

از هر یک از هفت ناحیه شاهرود تعداد ۳۰ نمونه خاک و از هر یک از استان های گلستان، گیلان، مازندران، تهران، هرمزگان و البرز تعداد ۱۰ نمونه خاک جمع آوری شد

۱-Galleria Bait Method (GBM)

و برای هر نمونه خاک تعداد ۱۰ لارو در پتری دیش قرار داده شد. برای محاسبه نرخ جداسازی قارچ *Metarhizium* در هر منطقه، تعداد لارو آلوده به قارچ به تعداد کل لارو هر منطقه تقسیم شد (Masoudi, 2013).

بررسی نرخ رشد جدایه ها

کلنی های جوان حاصل از یک تک اسپور هر جدایه توسط پیپت پاستور با قطری معادل پنج میلی متر به پتری دیش حاوی ADP(Lifechem ، میلانو، ایتالیا) انتقال و پس از گذشت ۷۲ ساعت قطر کلنی درحال رشد، به طور روزانه تا ۱۵ روز اندازه گیری شد (Darbro et al., 2011). این آزمایش در سه تکرار صورت پذیرفت. پس از اندازه گیری میزان رشد هر جدایه، برای محاسبه نرخ رشد از رابطه زیر استفاده شد (Yoder et al., 2009). که در آن R1 = نرخ رشد نهایی، R0 = نرخ رشد اولیه، t1 = زمان نهایی و t0 = زمان اولیه بود.

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

آزمایش شمارش تعداد کنیدی

بر پایه مقاله پتلامول و پراسرتسان (Petlamul and Prasertsan, 2012) و اندکی تغییرات، پس از گذشت ۱۵ روز، با استفاده از پیپت پاستور سطح مشخصی (قطری معادل ۵ میلی متر) از ناحیه ی میانی کلنی از هر تکرار آزمایش سنجش نرخ رشد برداشته شد و در میکروتیوب حاوی ۱ میلی لیتر محلول ۰/۲ درصد توئین ۸۰ (Merck، فرانکفورت، آلمان) ریخته شد پس از ۲ دقیقه ورتکس شدن، میزان ۰/۰۱ میلی لیتر بر روی لام هموسیتومتر (Neubauer Improved Bright-Line، هامبورگ، آلمان) ریخته و زیر میکروسکپ تعداد اسپورها برای هر جدایه شمارش شد. این آزمایش در سه تکرار صورت پذیرفت.

حشرات

حشرات کامل سوسک قرمز آرد در مخلوطی از آرد، سبوس، گلیسرین ۱۵% (Merck، فرانکفورت، آلمان) و عسل در ظروفی با ابعاد ۱۵ × ۲۰ × ۲۰ سانتی متر در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. تخم و لاروهای حاصل به ظرف دیگری انتقال یافته و نسل F۱ آنها مورد استفاده قرار گرفتند.

زنده مانی کنیدی ها

سوسپانسیون ۱×۱۰^{۸} (کنیدی/میلی لیتر) از هر جدایه تهیه و میزان ۰/۰۱ میلی لیتر از این سوسپانسیون به محیط کشت SDA غنی شده با عصاره مخمر[۱] انتقال یافت. سپس پتری دیش ها درون انکوباتور با دمای ۱ ± ۲۷ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۸۵%

۱-Sabroud Dextrose Agar + Yeast Extract

نگهداری شدند. پس از گذشت ۲٤ ساعت از انکوباسیون، به هر پتری دیش تعداد سه قطره رنگ لاکتوفنول کاتن بلو به‌طور تصادفی برای تثبیت و رنگ آمیزی و جلوگیری از جوانه زنی بیشتر اضافه شد. این آزمایش بر مبنای آزمایش پتلامول و پراسرتسان با اندکی تغییرات صورت پذیرفت (Petlamul and Prasertsan, 2012). در محل هر قطره تعداد کل اسپورها و همچنین اسپورهای تندش نموده[۱] شمارش و قدرت زنده مانی توسط فرمول زیر برای هر جدایه محاسبه شد (Ble Kanga et al., 2003). با توجه به درصد به دست آمده، جدایه های با بالاترین میزان زنده مانی برای زهرآگینی استفاده شدند.

$$\text{درصد جوانه‌زنی} = \left(\frac{a}{a+b}\right) \times ۱۰۰ \quad (۲)$$

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

زهرآگینی جدایه ه

در این آزمایش، برای محاسبه نرخ مرگ و میر آفت انباری *T. castaneum* توسط جدایه های قارچ *Metarhizium* ابتدا سوسپانسیونی با غلظت ۱×۱۰^{۸} برای هر جدایه تهیه شد. برای بیماری زایی هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد و با تهیه سوسپانسیون، تعداد ۳۰ حشره کامل به مدت ۳۰ ثانیه درون سوسپانسیون فرو برده شد و سپس در پتری دیش های پلاستیکی دارای کاغذ صافی رها شد. به منظور تماس بیشتر اسپورهای قارچ با حشرات کامل سوسپانسیون را بر روی کاغذ صافی ریخته و پتری دیش ها به مدت ۲٤ ساعت درون انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در صورت مرگ و میر حشرات شاهد، میزان مرگ و میر با فرمول ابوت (Abbott, 1925) تصحیح گردید و جدایه ها از منظر قدرت زهرآگینی بر طبق فرمول یپ و همکاران (Yip et al., 1992) طبقه بندی شدند.

Corrected mortality (%) = (Mobs - Mcontrol)/ (100 - Mcontrol) × 100

Mobs =تعداد مرگ و میر مشاهده شده Mcontro = تعداد مرگ و میر در شاهد ۱%

بررسی های آماری

تجزیه واریانس یک طرفه ی داده های حاصل از هر آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی، با استفاده از نرم افزار SAS ۹,۱ انجام گرفت و مقایسه میانگین داده ها با آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد. سنجش نرمال بودن داده ها بر اساس آزمون اندرسون-دارلینگ، توسط نرم افزار Minitab ۱٦,۲,٤ (Minitab Inc. 2013) انجام شد. از ضریب

۱-منظور اسپورهایی است که شروع به رشد نموده اند و لوله تندش آنها ظاهر شده است

همبستگی پیرسون که مناسب داده های نرمال است برای بررسی رابطه بین نرخ رشد، شمارش اسپور و زهرآگینی با پارامترهای ریخت شناسی استفاده شد.

استخراج DNA

جدایه های خالص در ۵۰ میلی لیتر محیط مایع YPD[1] عصاره مخمر، ۱% پپتون، ۲% گلوکز (Lifechem)، میلانو، ایتالیا بر طبق روش وایربک و همکاران کشت شد و برای مدت ٤-۳ روز در انکوباتور با دمای ۱ ± ۳۰ درجه سانتی گراد نگه داری شدند (Wyrebek M et al., 2011). مقدار ۰/۰۲ گرم از میسلیوم هر نمونه به میکروتیوب انتقال یافت و نمونه ها با کمک کندانسور در ازت مایع کوبیده شدند. استخراج DNA به روش CTAB (Płaza et al., 2004) با تغییراتی انجام شد. بافرCTAB ۲ درصد، PVP ٤۰ ۱ درصد، Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۲۰ میلی مولار و NaCl ۱/٤ مولار) و SDS[2] β- ، ۱%مرکاپتواتانول (Merck، فرانکفورت، آلمان) و RNase Bioscience، کمبریج، انگلستاناضافه و میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه ورتکس افقی شد. با استفاده از ترکیب فنل، کلروفروم و ایزوآمیل الکل (۲۵:۲٤:۱) (Merck، فرانکفورت، آلمان و Bioscience، کمبریج، انگلستان) به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ٦۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. جهت رسوب DNA از ایزوپروپانول سرد (Bioscience، کمبریج، انگلستان) استفاده شد و ۱٦ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ، رسوب سفید رنگی در جداره و انتهای تیوب مشاهده گردید. دو بار شستشو به ترتیب با الکل ۹٦ و ۷۰ درصد و سانتریفیوژ rpm) ۱۲/۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) صورت گرفت. رسوب در هوای آزاد خشک شد. به رسوب DNA، آب مقطر استریل دوبار تقطیر اضافه شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز و تکثیر منطقهITS

برای تکثیر توالی ITS قارچ از آغازگرهای ITS۱ و ITS٤ (Bioneer، داجون، کره جنوبی) استفاده شد (White et al., 1990). دستورالعمل PCR با ۹٤ درجه سانتی گراد: ۵ دقیقه آغاز شد و ۳۵ چرخه (۹٤ درجه سانتی گراد: ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی گراد: ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد: ۱ دقیقه) و گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد: به مدت۱۰ دقیقه ادامه یافت. کیفیت ناحیه تکثیری ITS جدایه ها ی جنس *Metarhizium* حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل آگارز ۱% (Bioscience، کمبریج، انگلستان) بررسی شد و بر اساس خط کش ژنی (Bioscience، کمبریج، انگلستان) مشخص شد این ناحیه در

۱-Yeast Extract- Peptone- Glucose Broth

۲-Sodium dodecyl Sulfate (SDS)

طولی میان ۶۰۰-۵۰۰ جفت باز قرار دارد. توالی های تکثیری هر جدایه، با استفاده از کیت DNA Gel Extraction (Norgen, Sant Catrine, Canada) خالص سازی و برای خوانش دو طرفه توالی به شرکت Bioscience (Cambridge, England) و Bioneer ارسال شد.

توالی یابی و شناسایی گونه ها

با استفاده از نرم افزار (http://www.mb.mahidol.ac.th /pub/Chromas/chromas.html) Chromas Lite v2.1 خوانش توالی ها صورت پذیرفت. سپس به منظور تطبیق خوانش دو آغازگر پیشرو و معکوس برای هر جدایه، از نرم افزار Codon Code Aligner (Codon Code Corporation, Dedham, MA.) استفاده شد و متوسط طول منطقه هم پوشان[1] برای هر ۳۰ جدایه معادل ۵۳۰ نوکلئوتید به دست آمد. منطقه هم پوشان به دست آمده در بخش BLASTn[2] پایگاه ژنی NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) برای ترسیم درخت تبارشناختی در کنار توالی های ۳۰ جدایه ایران، توالی های ITS مربوط به ۱۰ گونه شناخته شده *Metarhizium* با استفاده از شماره دسترسی آن ها در مقالات Schneider et al., 2011)، Destéfano (Destéfano et al., 2004)redienhcS نیز به کار برده شدند(جداول ۱ و ٤) و مقایسه با این توالی ها به انجام رسید. با شناسایی گونه های قارچی جدا شده از خاک، درخت تبارشناختی رسم شد و تفاوت های میان این جدایه ها از منظر تکاملی مورد بررسی قرار گرفت. درخت تبارشناختی، پس از تایید آزمون نیکویی برازش، با الگوریتم بیشینه ی پارسیمونی (پس از رسم درخت با استفاده از سایر الگوریتم ها (نتایج آورده نشده اند) و بوت استرپ ۱۰۰۰ با استفاده از نرم افزار MEGA ۵,۲ (Tamura et al., 2011) ترسیم گردید. بوت استرپ ۱۰۰۰۰ نیز بطور آزمایشی در شروع رسم درخت مورد آزمون قرار گرفت و نتایج اختلافی با بوت استرپ ۱۰۰۰ نشان ندادند از اینرو در ادامه از بوت استرپ ۱۰۰۰ برای تسریع در رسم درخت تبارسنجی استفاده شد.

همبستگی پراکنش جغرافیایی و تنوع ژنتیکی

برای محاسبه همبستگی میان پراکنش جغرافیایی و تنوع ژنتیکی ناحیه ITS جدایه ها از نرم افزار GenAlEx (Peakall and Smouse, 2012) (http://www.biology.anu.edu.au/GenAlEx/) ۶,۵ استفاده شد. ماتریس تشابه ژنتیکی بر پایه ی توالی منطقه ی ITS ۳۰ جدایه *Metarhizium* محاسبه گردید. ماتریس فاصله جغرافیایی بر پایه ی مختصات

۱-Contig

۲-Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool

جغرافیایی (طول و عرض جغرافیایی) مکان جمع آوری نمونه های خاکی به دست آمد. ماتریس های حاصله به نرم افزار NTSYS 2.02e (http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html) (Rohlf, 1997) وارد شدند تا ضریب کوفنتیک دو ماتریس با استفاده از آزمون منتل محاسبه گردد.

نتایج

نرخ جداسازی قارچ ها

پراکنش قارچ *Metarhizium* صرف نظر از نوع گونه، در نمونه های خاک هفت ناحیه شاهرود و نمونه های دیگر استان ها یکسان نیست و به شرایط محیطی نقاط مختلف جغرافیایی بستگی دارد. در میان نواحی شاهرود، بیشترین میزان جداسازی قارچ، ناحیه شهنما با آلوده سازی ۷۰ لارو از میان ۳۰۰ لارو مورد استفاده (یعنی ۲۳/۳%) و کمترین میزان جداسازی، منطقه شهرک ابوذر- مغان (یعنی ۲%) بود. از بین نمونه خاک های ٦ استان دیگر (مازندران، گلستان، گیلان، هرمزگان، البرز و تهران) گلستان با نرخ جداسازی ۲% کمترین و گیلان با نرخ جداسازی ۲۰% بیشترین میزان جداسازی قارچ را به خود اختصاص داده اند.

ارزیابی نرخ رشد

جدایه های *Metarhizium* جمع آوری شده از اقلیم های مورد مطالعه تفاوت بسیار معنی داری ($P< ۰/۰۱$) از نظر نرخ رشد نشان دادند (جدول ۱). نتایج مقایسه ی میانگین جدایه های *Metarhizium* spp. در جدول ۲ آورده شده است. بر این اساس، جدایه SHU.J.11 (شهنما) با میانگین ۲٤/۱۷۹ میلی متر/ روز و پس از آن جدایه های SHU.J.22 (سرولات) و SHU.J.33(شهنما)، SHU.J.27 (فردیس)، SHU.J.24 (نهارخوران)، SHU.J.02(رویان) و SHU.J.29(شهنما) از بالاترین میزان نرخ رشد نسبت به سایر جدایه ها برخوردار بودند.

ارزیابی شمارش تعداد کنیدی

تعداد کنیدی های شمارش شده ی ۳۰ جدایه *Metarhizium* spp. در ۳ تکرار، تفاوت بسیار معنی داری (در سطح ۱ درصد) داشتند. نتایج مقایسه ی میانگین این صفت نشان داد که جدایه SHU.J.01 (کلاته اسد) با میانگین تولید اسپور $۸/۰۲۵ \times ۱۰^{۷}$ از بیشترین میزان تولید کنیدی برخوردار بود. در حالی که جدایه های SU.J.17 (شهنما)، SHU.J.15 (شهنما)، SHU.J.31 (شهنما)، SHU.J.25 (شهرک دانشگاه) و SHU.J.08(رویان) کمترین میزان کنیدی را تولید کردند. علاوه بر این نتایج، جدایه ی SHU.J. 01 برپایه ی تقسیم

بندی پتلامول و پراسرتسان (Petlamul and Prasertsan, 2012)، نیز برترین جدایه از نظر تولید کنیدی شناخته شد.

زنده مانی کنیدی

قدرت زنده مانی کنیدی یکی از عواملی است که بر پتانسیل بیماری زایی جدایه ها تاثیرگذار است. از این رو لازم است قبل از بررسی زهرآگینی جدایه ها، زیست پذیری و قدرت جوانه زنی آنها تعیین شود. نتایج این آزمایش حاکی از آن بود که تمامی جدایه های *Metarhizium spp.* از قدرت زنده مانی بیش از ۸۹ درصدی برخوردار بودند. لازم به ذکر است که تمامی جدایه ها در شرایط یکسان (درون انکوباتور با دمای ۱ ± ۲۷ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۸۵%) و سن یکسان (۲٤ ساعت پس از انکوباسیون) نگهداری شده بودند.

ارزیابی زهرآگینی

تجزیه واریانس نتایج زیست سنجی نشان داد که توان زهر آگینی جدایه های مختلف بر سوسک قرمز آرد بسیار متفاوت (P < ۰/۰۱) بود (جدول ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین (جدول ۲) بیشترین زهرآگینی به جدایه های SHU. J. 22 (سرولات)، SHU. J. 35 (جنگل ابر)، SHU. J.29 (شهنما)، SHU. J.02 (رویان)، SHU. J.33 (شهنما)، SHU. J.10 (شهنما)، SHU. J.04 (شهرک ابوذر) و SHU. J.12 (شهنما) تعلق داشت که به طور مشترک در گروه برتر آماری قرار گرفتند. در حالیکه جدایه های SHU. J. 26، SHU. J. 08، SHU. J. 30، SHU. J. 31، SHU. J. 25، SHU. J.15، SHU. J.14 و SHU. J. 09 از کمترین میزان زهرآگینی برخوردار بودند. مطالعه ی ما گویای حساسیت بالای سوسک قرمز آرد به قارچ مذکور می باشد. با این حال آزمایش های بیشتری نظیر LT۵۰، LC۵۰ برای غربال گری جدایه هایی با توان زهرآگینی بیشتر برای کنترل آفات انباری لازم است. یپ و همکاران (Yip et al., 1992) با بررسی میزان مرگ و میر جدایه های *M. anisopliae* بر روی حشره *Adoryphorus coulonii* (*Col, Scarabaeidae*) به تقسیم Adoryphorus coulonii (Burmeister) مرگ و میر پرداختند و بر این اساس جدایه ها را در سه سطح شامل سطح A با توان زهرآگینی ۱۰۰-۶۸%، سطح B با توان ۶۷-۳۴% و سطح C با توان ۳۳-۰% گروهبندی نمودند. در پژوهش حاضر، برحسب همین سطوح تعریف شده به سطح بندی جدایه ها از منظر توان زهرآگینی پرداخته شد (جدول ۲). بدین ترتیب که، ۱۰ جدایه در سطح A قرار گرفتند یعنی ۳۳/۳% جدایه ها از توان زهرآگینی بالایی برخوردار هستند. ۵۰% جدایه ها در سطح B (متوسط) و ۱۶/۷% جدایه ها در سطح C (کم) قرار گرفتند.

همبستگی میان پارامترهای ریخت شناختی، نرخ رشد، شمارش اسپور و توان زهرآگینی

محاسبه ی ضریب همبستگی پیرسون بین پارامترهای اندازه گیری شده نشان داد این پارامترها روابط همسو و بسیار معنی داری (p<۰/۰۱) با یکدیگر دارند (جدول ۳). بدان معنا که با افزایش نرخ رشد یک جدایه، تعداد کنیدی تولیدی آن بیشتر خواهد بود. همچنین، نظریه همبستگی مثبت ومعنی دار دو شاخص نرخ رشد وتعداد کنیدی با قدرت زهرآگینی، هرچه نرخ رشد و تعداد کنیدی جدایه ای بیشتر باشد، قدرت زهرآگینی آن جدایه بیشتر و در آلوده سازی میزبان موفق تر عمل می نماید نیز مشاهده گردید.

روابط تبارشناختی

بررسی درخت رسم شده به روش بیشینه پارسیمونی و بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار (شکل ۱) نشان داد، جدایه های *Metarhizium* در ۲۰ خوشه قرار گرفتند. نشانگر STI، تنوع ژنتیکی بالایی را در جدایه های شاهرود و دیگر مناطق نمونه-گیری شده نشان داد. گویای این امر قرارگیری جدایه ها در ۲۱ خوشه در درخت تبارشناسی رسم شده است (شکل۱). به نظر می رسد جدایه های شاهرود پلی فیلتیک باشند و منطقه STI توانسته است گونه های جدیدی را در کنار گونه های شناخته شده جهانی شناسایی نماید و ۵ گونه *M. brunneum*، *M. robertsii*، *M. guizhouense*، *M. velutinum*، *M. anisopliae* نمایندگانی در اقلیم شاهرود دارند. *M. velutinum* از اقلیم زراعی شاهرود (شهنما)، *M. robertsii* از اقلیم جنگلی گیلان (سرولات) و اقلیم زراعی و باغی شاهرود (شهنما) و *M. guizhouense* از مناطق زراعی و باغی شاهرود، *M. anisopliae* از مناطق با اقلیم متفاوت (باغ، جنگل و زراعی) و *M. brunneum* در مناطق باغی شاهرود و دیگر جدایه های شاهرود و شهرستان های اطراف از مزارع و باغات و مناطق جنگلی جدا شده اند که این حاکی از پراکنش جغرافیایی قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium* و سهولت استقرار آن در اقلیم های مختلف است. در خوشه های ۵، ٦، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ١٤، ۱۵، ١٦، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰ جدایه های اقلیم استان سمنان و دیگر استان های نمونه گیری شده قرار گرفته که همتایی از ۱۲ گونه گزارش شده برای *Metarhizium* ندارند. در یک درخت ترسیم شده، جدایه ها، گروه های تاکسونی فعال هستند و از نظر تکاملی جدایه های اقلیم شاهرود گونه های جدیدتری نسبت به ۱۲ گونه شناسایی شده هستند و احتمال گونه زایی[۱] در مورد جدایه های اقلیم شاهرود وجود دارد. قرارگیری جدایه های اقلیم شاهرود و شهرستان های اطراف در ۱۷ خوشه نشان از تنوع فیلوژنی بالای این جدایه

۱-Speciation

ها است. احتمال داده می شود که جدایه های بدست آمده از ایران، گونه های جدیدی هستند که شناسایی دقیق آنها نیازمند بررسی های بیشتر با استفاده از دیگر توالی های ژنی نظیر EF-1α و β- توبولین می باشد.

همبستگی میان تنوع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی

نتایج همبستگی تنوع جغرافیایی و ژنتیکی بر پایه ی ضریب همبستگی کوفنتیک، نشان داد که میان این دو پارامتر همبستگی معنی داری وجود ندارد (r = ۰/۱٤) اگرچه بررسی ارتباط بین پراکنش جغرافیایی جدایه های مختلف *Beauveria* با تنوع موجود در منطقه ITS توسط قیکاس و همکاران (Ghikas et al., 2010) انجام شد و نتایج نیز حاکی از عدم وجود همبستگی بین محل جمع آوری و تنوع موجود در منطقه ی ITS بود، لازم به ذکر است این آزمون تاکنون درمورد تعیین ارتباط پراکنش جغرافیایی قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium* با تنوع ژنتیک موجود در منطقه ITS استفاده نشده است.

بحث

با استفاده از روش طعمه حشره ای گالریا، تعداد ۳۰ جدایه ی قارچ *Metarhizium spp.* از میان ۲٤۰ نمونه ی خاک مناطق گوناگون، در محیط کشت انتخابی حاوی دودین، سیکلوهگزامید، کریستال ویولت و کلرید مس در کنار دیگر قارچ هایی مانند *Beauveria*، *Phytophthora*، *Nectria* و *Trichoderma* جداسازی گردید. نرخ جداسازی قارچ *Metarhizium* در اقلیم های مورد مطالعه ۱۲/۵درصد بود که میزان بسیار کمی است. سویم و همکاران(Sevim et al., 2010)، Sanchez-Pena(Sánchez-Peña et al., 2011) نیز میزان جداسازی *Metarhizium* را در خاک زیست بوم های مختلف اندک گزارش نمودند. مسعودی (Masoudi, 2013) در بررسی نرخ جداسازی قارچ *Beauveria* در باغ های مرکبات، گزارش نمود که در شرایط به نسبت مشابه از نظر دما و رطوبت، قارچ *Beauveria* فراون ترین جنس در میان قارچ های بیمارگر حشرات است و از نرخ جداسازی بیشتری نسبت به *Metarhizium* برخوردار است این نتیجه با نتایج حاصل از پژوهش های توینینگا و همکاران (Tuininga et al., 2009)، بریج و همکاران (Bridge M et al., 1993)، میلینگ و الینبرگ (Meyling and Elinberg, 2006) و نتایج حاصل از این تحقیق نیز هم خوانی دارد. بر پایه ی جدول تعداد لاروهای آلوده و درصد جداسازی قارچ می توان اظهار داشت که فراوانی قارچ بیمارگر حشرات *Metarhizium* در خاک های زراعی بیشتر از مناطق جنگلی است. یافته های پژوهش حاضر در خصوص فراوانی و پراکندگی قارچ *Metarhizium* با نتایج پژوهش های سانچز-پنا (Sánchez-Peña et al., 2011) مطابقت داشت. درحالی که سویم و همکاران (Sevim et al., 2010) پراکنش

Metarhizium را در خاک های زراعی اندک و در جنگل های فندق زیاد گزارش نمودند. از سوی دیگر، برحسب درصد جداسازی قارچ و مشخصات جدایه های به دست آمده مشاهده شد این قارچ احتمالا در مناطقی با رطوبت بیشتر از پراکندگی بیشتری برخوردار است. نظر به اینکه رطوبت عامل مهمی در فراوانی و کارایی قارچ های بیمارگر حشرات است از میان ۳۰ جدایه به دست آمده، ۱۵ جدایه به منطقه ی شهنما تعلق داشت که به علت سبزی کاری از رطوبت بیشتری نسبت به سایر مناطق نمونه گیری برخوردار بود و بنابراین، تعداد جدایه های بیشتری از آنجا جدا شد درحالی که نرخ جداسازی از مناطق کلاته اسد- ابراهیم آباد- میامی- جو دانه و ده ملاّ- کلاته ملاّ- مراد آباد- حدّاده- مومن آباد به علت رطوبت پایین خاک محدود به تنها یک جدایه شد.

فاکتورهای زهرآگینی، تولید اسپور و رشد قارچ های بیمارگر حشرات، تحت تاثیر فاکتور مهم دما هستند. این تاثیر در بسیاری از قارچ ها مانند *B. bassiana* و *M. anisopliae* به اثبات رسیده است (Tefera and Pringle, 2003). مطالعات صورت گرفته با طیف دمایی متفاوت (از ۳۰-۱۵ درجه سانتی گراد) در ارزیابی تولید اسپور و نرخ رشد، حاکی از مناسب بودن طیف دمایی ۲۷- ۲۵ درجه سانتی گراد می باشد(Ekesi et al., 1999). در پژوهش حاضر نیز، ارزیابی نرخ رشد و تعداد کنیدی در دمای ۱ ± ۲۷ درجه سانتی گراد صورت پذیرفت و به خوبی توانست تفاوت میان جدایه ها را از منظر نرخ رشد و تعداد کنیدی تولیدی نشان دهد. بر این اساس، سرعت رشد جدایه ها با یکدیگر متفاوت بود و در طیفی معادل ۲۴/۱ - ۹/۲ میلی متر/ روز قرار داشت. نتایج به دست آمده از این تحقیق با نتایج حاصل از آزمایشات اکسی و همکاران (Ekesi et al., 1999)، داربورو و همکاران (Darbro et al., 2011)، صفوی و همکاران (Safavi et al., 2007) و پتلامول و پراسرتسان (Petlamul and Prasertsan, 2012) مطابقت داشت. وارلا و مورالز (Varela and Morales, 1996) نرخ رشد سریع را مزیتی مهم در کنترل زیستی دانستند و علت آن را کاهش زمان لازم برای تولید انبوه کنیدی، استراتژی رقابتی قارچ در طی چرخه زندگی ساپروفیتی در برابر میکروارگانیسم های دیگر و تسریع کنترل آفت به علت آلودگی سریع میزبان برشمردند. ارزیابی شمارش تعداد کنیدی با آزمایشات پتلامول و پراسرتسان (Petlamul and Prasertsan, 2012)، صفوی و همکاران (Safavi et al., 2007) همسویی داشت و بر پایه ی تفسیم بندی پتلامول و پراسرتسان (Petlamul and Prasertsan, 2012) جدایه ی SHU.J.01 با تولید بیشترین تعداد کنیدی، نسبت به بقیه ی جدایه ها برتر بود.

مطالعه ی زیست سنجی به منظور تعیین زهرآگینی قارچ های بیمارگر حشرات و غربال

گری جدایه های بیماری زا به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک ضروری است. زهرآگینی عامل مهمی برای انتخاب سویه های قارچی کاندیدا در کنترل حشرات است (Nguyen et al., 2007). آزمایش زیست سنجی جدایه های مورد مطالعه علیه سوسک قرمز آرد با غلظتی معادل ۱×۱۰^{۸} انجام شد و جدایه های مختلف، توان زهرآگینی متفاوتی را بر روی حشرات کامل *T. castaneum* نشان دادند. نتایج بتا و ابوصفیح (Batta and Abu Safieh, 2005)، خشاوه و ساکنین شالاو (Khashaveh and Sakenin Chelav, 2013)، میکالاکی و همکاران (Michalaki et al., 2006) و نانگ و همکاران (Nong et al., 2011) نیز توان زهر-آگینی متفاوتی را در جدایه های پژوهش های خود گزارش نمودند.

ساموئل و همکاران (Samuels et al., 1989) در بررسی ارتباط میان جوانه زنی، نرخ رشد، تولید اسپور، تولید آنزیم های برون سلولی[۱] با زهرآگینی ۲٤ جدایه ی *M. anisopliae* علیه Nilaparvata lugens (Arthropoda,Hemiptera) (Stål,1854) را گزارش کردند. با استفاده از جدایه های *Metarhizium* اظهار داشتند که جدایه های با سرعت جوانه زنی زیاد، از نرخ رشد سریعی برخوردارند همچنین با عنایت به وجود همبستگی مثبت و معنی دار بین دو شاخص درصد جوانه زنی اسپورها و میزان مرگ ومیر آفت میزبان، آنها نتیجه گرفتند که هرچه جدایه ای سریعتر جوانه زنی نماید توانایی آن در آلودگی و مرگ و میر آفت بیشتر است (Keyser, 2010). نتایج بررسی همبستگی جدایه های *Metarhizium* در تحقیق حاضر نیز مبین وجود روابط مثبت و معنی دار بین شاخص های ارزیابی شده بود به طوری که جدایه های دارای نرخ رشد سریعتر و تولید کنیدی بیشتر قدرت زهرآگینی بیشتری در آلوده سازی میزبان نشان دادند.

بررسی های تبار شناختی پیشین مانند آنچه کوران و همکاران(Curran et al., 1994) با استفاده از ناحیه ITS و ژن ۵/۸S برای درک روابط تکاملی درون جنس *Metarhizium* انجام دادند و تحلیل پارسیمونی[۲] و آزمون احتمال دنباله[۳] نشان داد که این جنس تک نیایی است. پژوهش های درایور و همکاران (Driver et al., 2000)، سانگ(Sung, 2007) و اسپتوفورا و همکاران (Spatafora et al., 2007) نیز اثبات نمود که *Metarhizium* جنسی تک نیایی است. پانتوآ و همکاران (Pantou et al., 2003) با گروهبندی تمام جدایه های *M. anisopliae* var. anisopliae در یک خوشه، این گونه را تک نیایی دانست اما لوآآن و همکاران(Luan et al., 2013) با بررسی آنالیز فیلوژنتیکی توالی ITS ۵۱ جدایه *Metarhizium spp.* بیان نمودند که گونه ی *M. anisopliae* و گونه ی خواهری

۱-Extracellular Enzyme

۲*Parsimony Analysis

۳-Tail Probability (T-PTP) Test

آن *M. robertsii*تک نیایی نیستند. بررسی حاضر نیز نشان داد که جدایه های شاهرود پلی فیلتیک هستند و بررسی تنوع منطقه ی ITS، گونه های جدیدی را در کنار گونه های شناخته شده ی جهانی جای داد. همچنین، چنانچه میزان نمونه برداری (از نظر فاصله و دفعات) دراقلیم شاهرود و شهرستان های اطراف افزایش یابد این احتمال وجود دارد که تعداد گونه های جدید حاوی زیر گونه های متنوع بیش از این نیز باشد. همچنین ضرورت دارد تا این یافته ها با نشانگرهای ملکولی دیگر و همچنین مطالعات سلولی و میکروسکوپی آتی مورد تائید و بررسی قرار گیرند.

بسیاری از محققان *M. anisopliae* را فراوان ترین گونه ی شناسایی شده *Metarhizium* در بین قارچ های بیمارگر حشرات برمی شمرند (Bischoff et al., 2009 Yip et al., 1992;) با این وجود، در مناطق مورد مطالعه در این پژوهش صرفا ۰/٤ درصد از جدایه ها (یعنی جدایه های SHU. J. 28، SHU. J. 01 و SHU. J. 35) متعلق به این گونه بودند. تجزیه ی خوشه ای جدایه ها بر پایه ی محل جمع آوری نشان داد که جدایه های SHU. J. 22از سرولات (گیلان)، SHU. J. 12 و SHU. J. 29از شهنما (شاهرود) در کنار M. robertsii، در خوشه ۱ گروهبندی شدند. در خوشه ی ۲ جدایه های SHU. J. 26و SHU. J. 30 از شهنما و SHU. J. 09 رویان با قرابت ۸۱ درصد در کنار گونه ی *M. velutinum* لهستان جای گرفتند. در خوشه ی ۳ جدایه های SHU. J.۳۱، SHU. J. 19 از شهنما و SHU. J. 06 بسطام (شاهرود) در کنار *M. guizhouense* جای گرفتند. نمایندگانی از جدایه های جنگل ابر و شهنما در خوشه ٤ در کنار *M. anisopliae* قرار گرفته اند و برپایه ی قرابت ۳ گونه SHU. J. 01، SHU. J. 35و SHU. J. 28با عنوان *M. anisopliae* به عنوان گونه های مشابه شناسایی شدند. در خوشه ی ٥ جدایه های SHU. J. 34 از رامسر (مازندران) و SHU. J. 15 از شهنما در کنار هم با قرابت ۸٥ درصدی قرار گرفتند. جدایه ی SHU. J. 27 به تنهایی در خوشه ی ٦ جای گرفت و قرابتی بین آن و دیگر گونه ها مشاهده نشد. در خوشه های ۷ و ۹ دو نماینده ی شناخته شده ی جهانی قرار گرفتند و معادلی از جدایه های ایران نداشتند. در خوشه ۸ جدایه SHU. J. 02 رویان (شاهرود) با قرابت ۸۸ درصد با نام *M. brunneum* شناسایی گردید. در خوشه ی ۱۰، سه گونه ی، *M. lepidiotae* *M. acridum*و *M. globosum* قرابتی با جدایه های ایران نشان ندادند. در ۸ خوشه ی بعدی تنها جدایه های ایران قرار دارند و با توجه به عدم قرابت با نمایندگان گونه های شناخته شده ی جهانی احتمالا گونه های جدیدی باشند که ادعای این امر مستلزم بررسی های بیشتر است. در خوشه ی ۱۹، جدایه های SHU. J. 11 (شهنما)، SHU. J. 10

(شهنما)، SHU. J. 05(بسطام) و SHU. J. 33 (شهنما) در کنار یکدیگر قرار گرفتند. در خوشه ی ۲۰ نیز دو جدایه ی SHU. J. 14 و SHU. J. 20 هر دو از شهنما با شباهت ۷۹ درصدی در یک گروه خواهری قرار گرفتند. گونه ی *Isaria farinosa* به عنوان اوت گروپ در آنالیز فیلوژنی استفاده گردید. با توجه به درختچه ی فیلوژنی چنین نتیجه گیری می شود که در تحقیق حاضر، نماینده ای برای گونه های *M. majus*، *M. lepidiotae*، *M. acridum* و *M.globosum* وجود ندارد. مشخص شده است که گونه های *Metarhizium* به خصوص *M. lepiditum*، *M. robertsii*، *M. brunneum*، *M. anisopliae*، *M. album* از منظر ریخت شناختی و تبار شناختی بسیار مشابه یکدیگر هستند و شناسایی آنها تنها بر مبنای مقایسه ی توالی های ITS به دست آمده با توالی های موجود در پایگاه اطلاعاتی GenBank امکان پذیر نیست. در نتیجه سایر نواحی ژنی نیز باید برای شناسایی و تفکیک این گونه ها استفاده شوند.

از میان ۳۰ جدایه ی توالی یابی شده، ۱٤ جدایه به باغات مختلف، ۱۲ جدایه به مزارع و ٤ جدایه به مناطق جنگلی تعلق داشت، که طبق یافته های سانچز-پنا و همکاران (Sanchez-Pena et al., 2011) حضور و پراکنش این قارچ در مزارع و باغات بیشتر از مناطق جنگلی است. قرار گرفتن جدایه های ایران در ۱۱ خوشه ی مختلف این درختچه، نمایانگر وجود گونه های پنهان[1] از قارچ های بیمارگر حشرات در کشور می باشد (Bidochka M et al;2005 Bidochka et al., 2001; Hughes et al., 2004). مطالعه ی بالاچندر و همکاران (Balachander et al., 2012) نشان داد که جدایه های *M. anisopliae var. acridum* بررسی شده به شاخه های مختلفی تعلق دارند و هیچ کدام از آنها به توالی های گزارش شده در پژوهش های انجام شده ی قبلی توسط درایور و همکاران (Driver et al., 2000) و بیشاف و همکاران (Bischoff et al., 2006) شباهتی ندارند. محققین زیادی بر سودمندی ناحیه ی S8/5، ITS1، و ITS2 در شناسایی مولکولی قارچ ها تاکید نمودند (Pereira de Lyra et al., 2012). تحقیقات تنگتیراسونان و همکاران (Tangthirasunun et al., 2010) نیز نشانگر تنوع بالای ناحیه ی ITS درون گونه ی *M. anisopliae* بود. با یافته های پژوهش حاضر مبنی بر پراکندگی جدایه های مورد مطالعه در تاکسون های مختلف هماهنگی داشت. اگر چه این انتظار وجود داشت که جدایه های استخراج شده از یک منطقه، در یک گروه خواهری قرار گیرند اما نتایج کسب شده، این انتظار را تامین ننمود. با توجه به تکامل نسبتا آهسته ی توالی های هسته ای نظیر ITS این توالی ها می توانند مرجع مهمی برای شناسایی قارچ ها باشند.

۱-Cryptic Species

سپاسگزاری

از زحمات جناب آقای مهندس سعید متین که همکاری های ایشان در مراحل انجام این پروژه همواره احساس می گردید کمال امتنان و تشکر را داریم.

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات بیماری زایی، تعداد کنیدی و نرخ رشد جدایه های قارچ *Metarhizium spp* .

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			ضریب تغییرات		
		نرخ رشد	تعداد کنیدی	بیماری‌زایی	نرخ رشد	تعداد کنیدی	بیماری‌زایی
جدایه	۲۹	۸۷/۴۹۹**	۲۰۱۵/۵۹۴**	۱۲۹۵/۰۲۹**	۷/۸۶۲	۵/۵۸۹	۱۰/۱۳۹
خطا	۶۰	۱/۷۸۵۰۷	۴/۴۰۹۳۸	۳۴/۹۰۳۰۳			
** در سطح ۱٪ معنی‌دار است							

جدول ۲:مقایسه میانگین نرخ رشد، تعداد کنیدی و تلفات سوسک قرمز آرد در جدایه های مختلف قارچ .Metarhizium spp به روش چند دامنه ای دانکن وطبقه بندی جدایه ها بر طبق روش پتلامول و پراسرتسان (۲۰۱۲)

طبقه‌بندی جدایه‌ها *Isolate classes*	میانگین تلفات *Mortality mean*	میانگین تعداد کنیدی *Mean conidia number*	میانگین نرخ رشد *Mean growth rate*	نام جدایه *Isolate*
a (High)	۷۶/۸۶۳^{B}	۶۱/۰۰۰^{d}	۲۴/۱۷۹^{a}	*SHU.J.*۱۱
a	۸۶/۸۰۰^{A}	۷۶/۶۲۵^{b}	۲۳/۸۶۵$^{a, b}$	*SHU.J.*۳۵
a	۸۸/۸۳۷^{A}	۶۶/۱۲۵^{c}	۲۳/۵۷۳$^{a, b, C}$	*SHU.J.*۲۲
a	۸۳/۸۲۰^{A,B}	۷۵/۳۷۵^{b}	۲۳/۴۹۱$^{a, b, c}$	*SHU.J.*۳۳
b (Medium)	۵۳/۳۳۳$^{E, F}$	۳۱/۰۶۳^{k}	۲۳/۴۲۷$^{a, b, c, d}$	*SHU.J.*۲۷
b	۵۸/۹۰۳$^{C, D, E, F}$	۴۵/۸۷۵^{g}	۲۳/۲۲۳ $^{a, b, c, d}$	*SHU.J.*۲۴
a	۸۴/۹۰۷^{A,B}	۵۶/۸۷۵^{e}	۲۲/۵۴۳$^{a, b, c, d, e}$	*SHU.J.*۰۲
a	۸۴/۹۰۷^{A,B}	۵۹/۰۰۰^{d,e}	۲۲/۱۸۲$^{a, b, c, d, e}$	*SHU.J.*۲۹
a	۷۹/۸۵۷$^{A, B}$	۵۳/۷۵۰^{f}	۲۱/۶۸۳$^{b,c, d, e}$	*SHU.J.*۱۲
c	۲۶/۶۶۷^{J}	۱۵/۸۷۵^{n}	۲۱/۵۸۸$^{c, d, e}$	*SHU.J.*۰۹
b	۵۳/۹۱۰$^{D, E, F}$	۲۱/۶۲۵^{l}	۲۱/۲۲۷$^{d, e, f}$	*SHU.J.*۱۳
b	۶۳/۳۳۳$^{C, D}$	۳۹/۶۸۸^{i}	۲۰/۷۲۹$^{e, f}$	*SHU.J.*۲۸
b	۵۷/۹۳۷$^{C, D, E, F}$	۴۲/۶۲۵^{h,i}	۲۰/۴۴۴$^{E, f}$	*SHU.J.*۰۶
b	۵۶/۶۶۷$^{C, D, E, F}$	۴۲/۰۰۰^{i}	۱۹/۱۶۸^{f}	*SHU.J.*۳۴
a	۷۶/۵۲۳^{B}	۸۰/۲۵۰^{a}	۱۹/۱۴۰^{f}	*SHU.J.*۰۱
b	۳۵/۹۷۳$^{H, I, J}$	۱۹/۰۶۳^{l,m}	۱۴/۳۲۷^{g}	*SHU.J.*۲۶
a	۸۱/۹۱۰$^{A, B}$	۵۲/۵۰۰^{F}	۱۴/۲۸۳^{g}	*SHU.J.*۰۴
c (Low)	۳۱/۹۶۳$^{I, J}$	۱۰/۰۰۰^{o,p}	۱۳/۸۵۱$^{g, h}$	*SHU.J.*۲۵
b	۴۲/۹۸۳$^{H, G}$	۱۱/۶۲۵^{o,p}	۱۳/۵۳۶$^{g, h, i}$	*SHU.J.*۱۷
b	۳۵/۹۷۳$^{H, I, J}$	۸/۷۵۰^{p}	۱۳/۴۶۰$^{g, h, i}$	*SHU.J.*۰۸
b	۶۲/۸۸۰$^{C, D, E}$	۴۵/۵۰۰^{g,h}	۱۲/۷۳۲$^{g, h, i}$	*SHU.J.*۲۱
b	۴۹/۹۲۳$^{F, G}$	۳۶/۲۵۰^{j}	۱۲/۵۷۴$^{g, h, i}$	*SHU.J.*۰۵
c	۳۳/۹۶۳$^{H, I, J}$	۱۰/۲۵۰^{o,p}	۱۲/۱۵۷$^{g, h, i, j}$	*SHU.J.*۱۵
c	۳۰/۹۶۷$^{I, J}$	۱۰/۱۸۸^{o,p}	۱۱/۸۳۹$^{h, i, j, k}$	*SHU.J.*۳۱
b	۳۴/۹۵۷$^{H, I, J}$	۱۲/۳۱۳^{o}	۱۱/۶۲۴$^{i, j, k, l}$	*SHU.J.*۱۴
c	۲۷/۹۷۰$^{I, J}$	۱۵/۵۰۰^{n}	۱۰/۰۹۱$^{j, k, l, m}$	*SHU.J.*۳۰
a	۸۲/۸۵۰$^{A, B}$	۵۳/۸۱۳^{f}	۹/۹۲۳$^{K, l, m}$	*SHU.J.*۱۰
b	۶۱/۷۸۹$^{C, D, E}$	۳۵/۸۷۵^{j}	۹/۸۹۷$^{K, l, m}$	*SHU.J.*۰۷
b	۳۶/۶۶۷$^{H, I}$	۱۶/۸۷۵^{m,n}	۹/۵۱۹$^{l, m}$	*SHU.J.*۲۰
b	۶۳/۸۴۳^{C}	۲۰/۷۵۰^{l}	۹/۲۹۴^{m}	*SHU.J.*۱۹

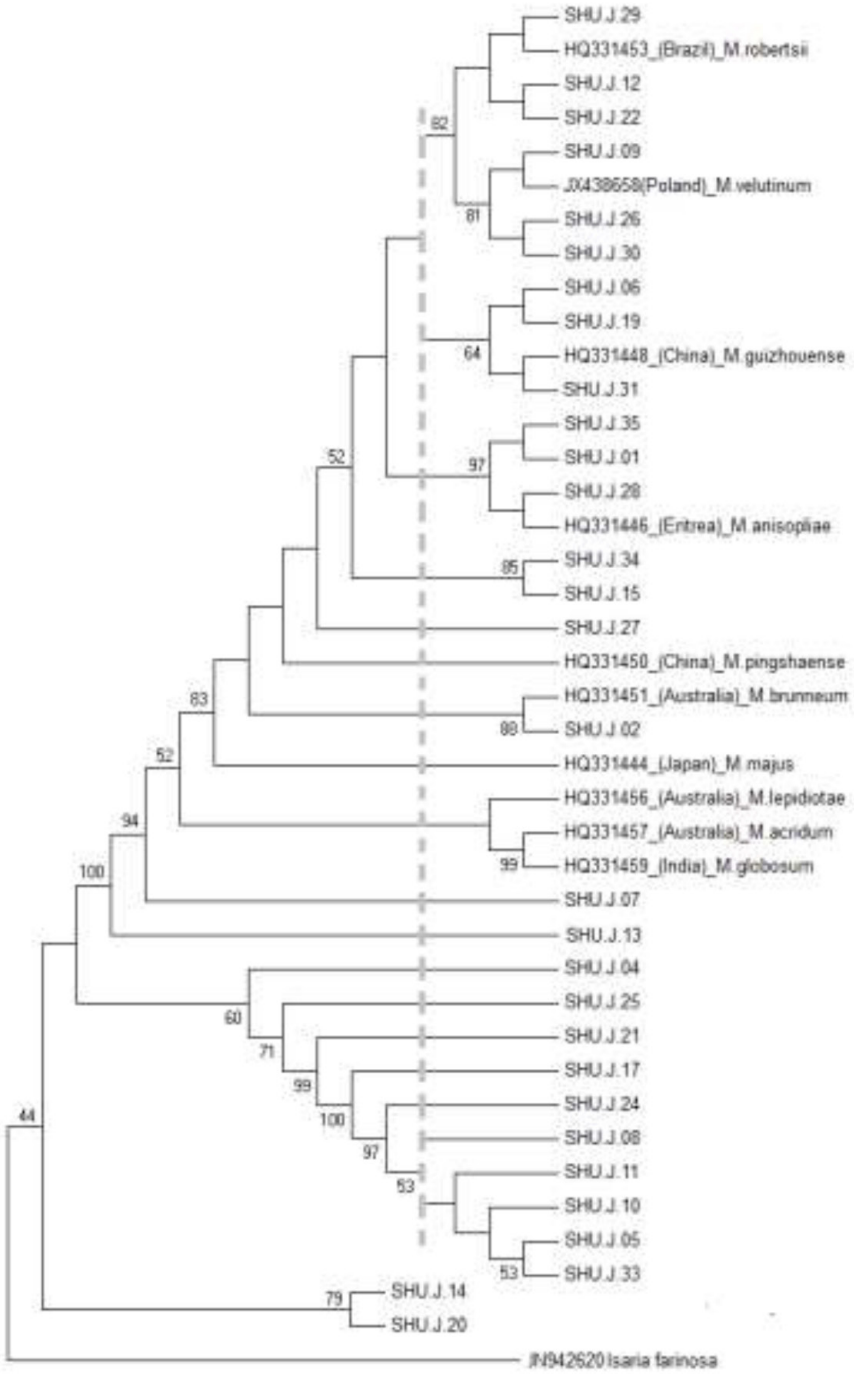
حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشند.

جدول۳: همبستگی میان سه پارامتر نرخ رشد، تعداد کنیدی و بیماری زایی جدایه های *Metarhizium spp*.

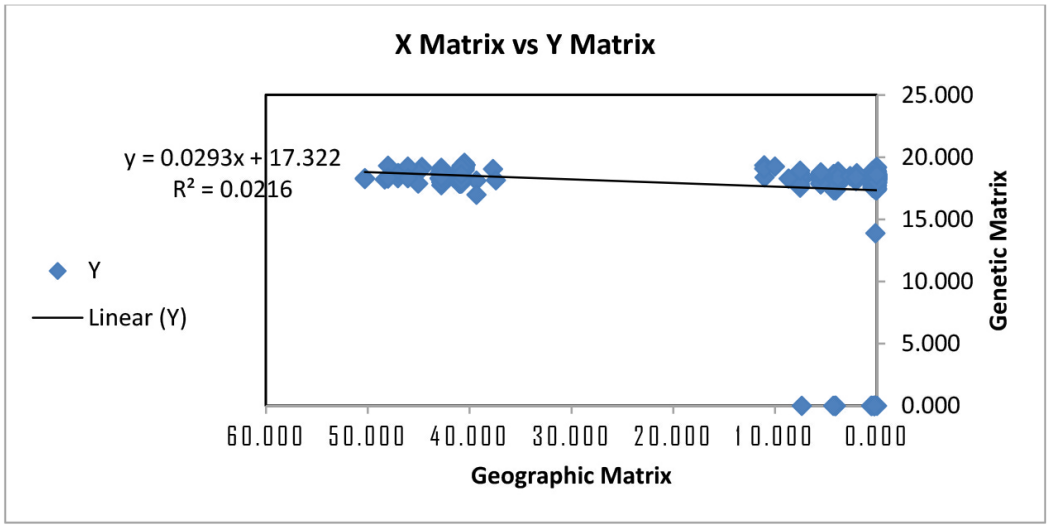
	نرخ رشد *Growth rate*	تعداد کنیدی *Conidia number*	بیماری‌زایی *Virulence*
نرخ رشد *Growth rate*	۱/۰۰۰۰		
تعداد کنیدی *Conidia number*	۰/۵۹۹۷۱**	۱/۰۰۰۰	
بیماری‌زایی *Virulence*	۰/۵۱۶۶۹**	۰/۹۱۴۲۰**	۱/۰۰۰۰

جدول ٤: لیست گونه های *Metarhizium* و شماره دسترسی آن در پایگاه ژنی NCBI استفاده شده در ترسیم درختچه فیلوژنی

نام جدایه	شماره دسترسی	کشور	منبع
M. guizhouense	*HQ*۳۳۱۴۴۸	چین	(*Schneider et al.*, ۲۰۱۱)
M.brunneum	*HQ*۳۳۱۴۵۱	استرالیا	(*Schneider et al.*, ۲۰۱۱)
M. anisopliae	*HQ*۳۳۱۴۴۶	اریتره	(*Schneider et al.*, ۲۰۱۱)
M. velutinum	*JX*۴۳۸۶۵۸	لهستان	*GenBank*
M. lepidiotae	*HQ*۳۳۱۴۵۶	استرالیا	(*Schneider et al.*, ۲۰۱۱)
M. robertsii	*HQ*۳۳۱۴۵۳	برزیل	(*Schneider et al.*, ۲۰۱۱)
M. acridum	*HQ*۳۳۱۴۵۷	استرالیا	(*Schneider et al.*, ۲۰۱۱)
M. globosum	*HQ*۳۳۱۴۵۹	هند	(*Schneider et al.*, ۲۰۱۱)
M. majus	*HQ*۳۳۱۴۴۴	ژاپن	(*Schneider et al.*, ۲۰۱۱)
M. pingshaense	*HQ*۳۳۱۴۵۰	چین	(*Schneider et al.*, ۲۰۱۱)



شکل ۱: درخت تبارسنجی حاصل از توالی های دو طرفه ناحیه ITS جدایه های قارچ *Metharizium spp.* به روش بیشینه پارسیمونی و بوت استرپ ۱۰۰۰. درخت تبار سنجی جدایه ها را به ۲۰ خوشه تقسیم می کند و جدایه های شاهرود پلی فیلیتیک هستند و توالی ITS توانسته است گونه های جدیدی را در کنار گونه های شناخته شده جهانی شناسایی نماید.



شکل ۲: نمودار همبستگی میان تنوع ژنتیکی ناحیه ITS سی جدایه و تنوع جغرافیایی. این نمودار با وارد کردن ۲ ماتریس فاصله ژنتیکی (محور Y) و فاصله جغرافیایی (محور X) به تست منتل نرم افزار GenAlEx ٦,٥ به دست آمده است و با توجه به داده های حاصل از آن می بینیم میان دو پارامتر همبستگی وجود ندارد (ضریب کوفنتیک همبستگی ١٤/٤% محاسبه شده است)

منابع

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

Al-Aidroos, K. and Roberts, D.W. (1978) Mutant of *Metarhizium anisopliae* with increase virulence toward Mosquito larvae. Canadian Journal of Genetics and Cytology 20: 211-219.

Balachander, M., Remadevi, K.O., Sasidharan, T.O. and Bai, N.S. (2012)Virulence and mycotoxic effects of *Metarhizium anisopliae* on Mahogany shoot borer, Hypsipyla robusta (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Forestry Research 23: 651–659.

Batta, Y.A. (2004) Control of rice weevil (*Sitophilus oryzae* L., coleoptera: Curculionidae) with various formulations of *Metarhizium anisopliae*. Crop Protection 23:103-108.

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

Bidochka, M. J., Small, C. L. N. and Spironello, M. (2005) Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus Metarhizium anisopliae. Environmental Microbiology 7:1361-1368.

Bidochka, M.J., Kamp, A.M., Lavender, T.M., Dekoning, J. and Amritha, A.N. (2001) Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* uncovering cryptic species? Applied and Environmental Microbiology 67:1335-1342.

Bischoff, J.F., Rehner, S.A. and Humber, R.A. (2006) *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. Mycologia 98:737-745.

Bischoff, J.F., Rehner, S.A. and Humber, R.A. (2009) A multilocus phylogeny of the Metarhizium anispliae lineage. Mycologia 101:512-530.

Ble Kanga, L., Jones, W. and James, A. (2003) Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite Varroa destructor (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera*. (Hymenoptera: Apidae) colonies. Journal of Economic Entomology 96:1091-1099.

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

Curran, J., Driver, F., Ballard, J.W.O. and Milner, R.J. (1994) Phylogeny of Metarhizium: analysis of ribosomal DNA sequence data. Mycological Research 98:547-552.

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

Driver, F., Milner, R.J. and Trueman, J.W. (2000) A taxonomic revision of *Metarhizium*

based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycological Research 104:134-150.

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

Entz, S.C. (2005) Molecular methods and isolation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for environmentally sustainable control of grasshoppers in Canada. PhD. Thesis. University of Lethbridge, Alberta, Canada.

Ghikas, D.V., Kouvelis, V.N. and Typas, M.A. (2010) Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1-5.8S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B.brongniartii*. BMC Microbiology 10:1-15.

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

Hassan, A.E.M., Dillon, R.J. and Charnley, A.K. (1989) Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for manduca sexta. Journal of Invertebrate Patholology 54: 277. 280.

Hughes, W.O. H., Thomsen, L., Eilenberg, J. and Boomsm, J.J. (2004) Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 85:46-53.

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

Kavallieratos, N.G., Athanassiou, C.G., Michalaki, M.P., Batta, Y.A., Rigatos, H.A., Pashalidou, F.G., Balotis, G.N., Tomanovic, Z. and Vayias, B.J. (2006) Effect of the com-

bined use of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin and diatomaceous earth for the control of three stored-product beetle species. Crop Protection 25:1087–1094.

Keyser, C.A. (2010) Development of a Laboratory based system for selecting insect pathogenic fungi with greatest potential for success in the field. PhD. Thesis. Utah State University, Logan, Utah.

Khan, S., Guo, L., Maimaiti, Y., Mijit, M. and Qiu, D. (2012) Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. Molecular Plant Breeding 3:63-79.

Khashaveh, A. and Sakenin Chelav, H. (2013) Laboratory bioassay of Iranian Isolates of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against two species of storage pest. Agriculturae Conspectus Scientificus 78:35-40.

Luan, F., Zhang, S., Wang, B., Huang, B. and Li, Z. (2013) Genetic diversity of the fungal pathogen *Metarhizium* spp., causing epizootics in Chinese burrower bugs in the Jingting Mountains, eastern China. Molecular Biology Report 40:515-523.

Masoudi, A. (2013) Genetic diversity of soil-born entomopathogenic fungi from citrus orchad. MSc. Thesis. Shahrood University, Shahrood, Seminam. (in Farsi)

Meyling, N.V. (2007) Method for isolation of entomopatogenic fungi from soil environment. University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark. from http://www.orgprints.org/11200.

Meyling, N.V. and Elinberg, J. (2006) Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. Mycological Research 110:188-195.

Michalaki, M.P., Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Batta, Y.A. and Balotis, G.N. (2006) Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin applied alone or in combination with diatomaceous earth against *Tribolium confusum* Du Val larvae: Influence of temperature, relative humidity and type of com-modity. Crop protection 25:418-425.

Milner, R.J. (1992)Selection and characterization of strains of *Metarhizium anisopliae* for control of soil insects in Australia In C. J. Lomer and C. Prior (Eds.), Biological

Control of Locust and Grasshoppers, CAB International, Melksham, Pp. 200-207.

Neelapu, N.R.R., Reineke, A., Chanchala, U.M.R. and Koduru, U.D. (2009). Molecular phylogeny of asexual entomopathogenic fungi with special reference to *Beauveria bassiana* and *Nomuraea rileyi* Rev Iberoam. Micology 26:129-145.

Nishi, O., Hasegawa, K., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C. and Shimizu, S. (2011). Phylogenetic analysis of *Metarhizium* spp. isolated from soil in japan. Appl Entomology and Zoology 46:301–309.

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

Pantou, M.P., Mavridou, A. and Typas, M.A. (2003) IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. Fungal Genetics and Biology 38:159–174.

Peakall, R. and Smouse, P. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics Applications Note 28:2537–2539.

Pereira de Lyra, M.C.C., Bastos da Silva, M.L., Cavalcanti, A.L.B. and Santo Mergulhão, A.C.E. (2012) Characterization of *Metarhizium anisopliae* using amplifed ribossomal DNA restriction analysis (ARDRA) and internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis. African Journal of Biotechnology 11:16635-16639.

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

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

Roberts, D.W.St. and Leger, R.J. (2004) *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects Adv. Applied Microbiology. 54:1-70.

Rodrigues Destéfano, R.H., Lanza Destéfano, S.A. and Messias, C.L. (2004). Detection of *Metarhizium anisopliae* var. anisopliae within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. Genetics and *Molecular Biology* 27:245-252.

Rohlf, F. (1997) NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariance analysis system version 2.02e. Exeter Software, New York, USA http://wwwexetersoftware-com/cat/ntsyspc/ntsyspchtml.

Safavi, S.A., Shah, F.A., Pakdel, A.Z., Rasoulian, G.R., Bandani, A.R. and Butt, T.M. (2007) Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiology Letter 270- 272.

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

Sánchez-Peña, S., Lara, J.S. and Medina, R. (2011) Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards thrips and whiteflies. Journal of Insect Science 11:1-10.

Schneider, S., Rehner, S.A., Widmer, F. and Enkerli, J. (2011) A PCR-based tool for cultivation-independent detection and quantification of *Metarhizium* clade 1. Journal of Invertebrate Pathology 108:106-114.

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

Sevim, A., Hofte, M. and Demirbag, Z. (2012) Genetic variability of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. anisopliae isolates obtained from the eastern black sea region of Turkey. Turkish Journal of Biology 36:255-265.

Sosa-Goemez, D.R., Humber, R.A., Hodge, K.T., Binnece, E. and L, da Silva-Branda˜o, K.L. (2009) Variability of the mitochondrial SSU rDNA of Nomuraea species and other entomopathogenic fungi from Hypocreales. Mycopathologia 167:145-

154.

Spatafora, J.W., Sung, G.H., Sung, J.M., Hywel-Jones, N.L. and White, J.F.J. (2007). Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. Molecular Ecology 16:1701-1711.

Stockinger, H., Kruger, M. and Schu¨ßler, A. (2010) DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 187:461–474.

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

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739.

Tangthirasunun, N., Poeaim, S., Soytong, K., Sommartya, P. and Popoonsak, S. (2010) Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. Journal of Agricultural Technology 6:317-329.

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

Tuininga, A.R., Miller, J.L., Morath, S.U., Daniels, T.J., Falco, R.C., Marchese, M., Sahabi, S., Rosa, D. and Stafford, K.C. (2009) Isolation of entomopathogenic fungi from soils and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) ticks: prevalence and methods. Journal of Medical Entomology 46:557-578.

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

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal Ribosomal RNA genes for phylogenetics. Genetic and evolution 3:315- 322.

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

Yip, H. Rath, A. and Koen, T. (1992) Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded *Cockchafer* (*Coleoptera: Scarabaeidae, Adoryphorus couloni*). Mycological Research 96:92-96.

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

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

Young Shin, T., Lee, W.W., Ko, S.H., Choi, J.B., Bae, S.M., Choi, J.Y., Lee, K.S., Je, Y.H., Jin, B.R. and Woo, S.D. (2013) Distribution and characterisation of entomopathogenic fungi from Korean soils. Biocontrol Science and Technology. 23:288-304.

Zimmerman, G. (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology. 17:879-920.