نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۹۲ - ۳۳(۱): ۵۹-۶۷

بررسی بیان ژن‌های *CHit1* و *CHit2* در قارچ *Beauveria bassiana* هنگام تعامل پارازیتی با تریپس پیاز، *Thrips tabaci* (Thys.: Thripidae)

لیدا فکرت[۱و*] و مجتبی ممرآبادی[۱و۲]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fekrat@ferdowsi.um.ac.ir

Study on the gene expression of *Chit1* and *Chit2* in *Beauveria bassiana* during the parasitic interaction with onion thrips, *Thrips tabaci* (Thys.: Thripidae)

L. Fekrat[1&*] and M. Mammarabadi[1&2]

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, 2. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.

*Corresponding author, E-mail: fekrat@ferdowsi.um.ac.ir

چکیده

برهم‌کنش پاتوژن- میزبان فرایندی بسیار پیچیده است. همانند بسیاری از قارچ‌های پاتوژن حشرات، *Beauveria bassiana* آنزیم‌هایی تولید می‌کند که در زمان آلودگی برای نفوذ به داخل بدن میزبان، کوتیکول را از بین می‌برند. کیتینازها آنزیم‌های مهمی برای هیدرولیز کیتین به‌شمار می‌روند و می‌توانند نقش مهمی در کنترل بیولوژیک آفات مختلف، ازجمله تریپس پیاز، *Thrips tabaci* Lind. ایفا نمایند. در این پژوهش، آغازگرهای خاص برای ژن‌های *CHit1* و *CHit2* طراحی شد و الگوی بیان این دو ژن در استرین IRAN 789C قارچ *B. bassiana* در سه غلظت 10^4، 10^5 و 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر قبل و بعد از تعامل پارازیتی با لاروهای سن دوم تریپس پیاز با استفاده از روش RT-PCR بررسی گردید. در همه‌ی برهم‌کنش‌ها، بیان ژن‌های مورد نظر بعد از تعامل پارازیتی انجام شد و با افزایش غلظت کنیدی‌های قارچ، میزان بیان ژن نیز افزایش یافت. بیان این ژن‌ها در هنگام تعامل پارازیتی قارچ با لاروها بیانگر حایز اهمیت بودن کیتینازها به‌عنوان فاکتوری مؤثر در کنترل بیولوژیک ارگانیسم‌های هدف می‌باشد.

واژگان کلیدی: *Beauveria bassiana*، بیان ژن، RT-PCR، *Thrips tabaci*، *CHit1*، *CHit2*

Abstract

The host-pathogen interaction is a very complex process. Like many entomopathogenic fungi during infection process, *Beauveria bassiana* produces enzymes which are able to destroy the cuticle of insects in order to penetrate into the host. Chitinases are considered to be the important enzymes for the hydrolysis of chitin and play an important role in the biological control of various pests including onion thrips, *Thrips tabaci* Lind. In the present study, specific primers for *CHit1* and *CHit2* genes were designed to study the expression pattern of these two chitinases from *B. bassiana* IRAN 789C strain before and after interaction with the second instar larvae of onion thrips using RT-PCR. Larval inoculation was carried out using three concentrations, 10^4, 10^5 and 10^6 conidia per ml. The results showed that both genes were expressed in all conidial concentrations, after parasitic interaction. Increasing the conidial concentration of *B. bassiana* caused the upregulation of chitinases expression level. Expression of these genes during the parasitic interaction of the fungus and insect larvae reflects the importance of chitinases gene as an effective factor in biological control of target organisms.

Key words: *Beauveria bassiana*, gene expression, RT-PCR, *Thrips tabaci*, *CHit1*, *CHit2*

مقدمه

بال‌ریشک‌داران (Thysanoptera) از جمله مهم‌ترین حشرات آفت در سیستم‌های کشاورزی محسوب می‌شوند (Kirk, 1997). حدود ۱۰۰ گونه از این راسته به‌عنوان حشرات زیان‌آور محصولات کشاورزی مطرح هستند و باعث صدمه‌ی جدی، یا به‌طور مستقیم و یا از طریق انتقال بیماری‌های گیاهی، به این محصولات می‌شوند (Lewis, 1997). بیش‌تر بال‌ریشک‌داران آفت متعلق به خانواده‌ی Thripidae هستند که تاکنون حدود ۲۰۰۰ گونه از این خانواده در دنیا شناخته شده و بزرگ‌ترین جنس آن که شامل ۲۷۵ گونه می‌باشد، جنس *Thrips* L. است (Mound, 1997). در میان اعضای این جنس، تریپس پیاز، *Thrips tabaci* Lindeman، به دلیل پراکنش بسیار گسترده، میزبان‌های گیاهی متعدد و خسارت شدید به محصولات کشاورزی یکی از مهم‌ترین آفات به‌شمار می‌رود (Ananthakrishnan, 1979;

دریافت: ۱۳۹۱/۷/۸، پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۲.

(Kirk, 1997). تریپس پیاز گونه‌ای همه‌جازی و پلی‌فاژ است که به بیش از ۳۰۰ گونه از گیاهان زراعی و گلخانه‌ای حمله کرده و با پاره کردن و تغذیه از محتویات سلول‌ها، باعث ایجاد لکه‌های نقره‌ای‌رنگ روی برگ می‌شود. تغذیه‌ی شدید تریپس باعث برهم خوردن توازن هورمونی گیاه و درنتیجه پیچیده و بدشکل شدن و گاهی اوقات توقف رشد برگ‌ها می‌شود. همچنین تریپس پیاز می‌تواند ویروس‌های بیماری‌زای گیاهی، ازجمله ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی و ویروس نواری توتون، را منتقل نماید (Capinera, 2001).

در مورد بسیاری از محصولات، کنترل تریپس پیاز عمدتاً توسط حشره‌کش‌های مختلف صورت می‌گیرد و بالا بودن خسارت اقتصادی ناشی از این آفت باعث انجام سم‌پاشی‌های مکرر و بی‌رویه علیه آن می‌شود. این امر علاوه‌بر اثرات نامطلوب بر سلامت انسان و محیط زیست، باعث کاهش تعداد و تنوع دشمنان طبیعی، بروز مقاومت و افزایش هزینه‌های تولید گردیده است (Coudriet *et al.*, 1979). علاوه‌براین، بالا بودن ظرفیت رشد تریپس پیاز (Trichilo & Leigh, 1988) و افزایش سریع مقاومت آن به آفت‌کش‌های مختلف (Van Rijn *et al.*, 1995)، استفاده از سایر روش‌های کنترل، ازجمله کنترل بیولوژیک، را ضروری می‌سازد.

در مورد نقش قارچ‌های پاتوژن در کنترل حشرات آفت بررسی‌های مختلفی صورت گرفته است (Vicentini *et al.*, 2001; Loc & Chi, 2007; Castrillo *et al.*, 2008, 2010). از بین قارچ‌های بیمارگر حشرات، قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin، متعلق به راسته‌ی Hypocreales، به‌دلیل دارا بودن پتانسیل قابل ملاحظه برای کنترل جمعیت آفات، بالاترین توجهات را به خود اختصاص داده است (Feng *et al.*, 1994; Castrillo *et al.*, 2008). این گونه، وسیع‌ترین و متنوع‌ترین طیف میزبانی را در حشرات مختلف دارد (Inglis *et al.*, 2001) و امروزه به‌عنوان یکی ازمهم‌ترین عوامل کنترل بیولوژیک در سطح جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sassa *et al.*, 2009). یکی ازعمده‌ترین مکانیسم‌های عمل این قارچ تأثیر آن روی اسکلت خارجی حشرات از طریق ترشح آنزیم‌های پروتئاز و کیتیناز است که باعث اضمحلال کوتیکول و مراحل بعدی آلودگی می‌شود (Sassa *et al.*, 2009). در این بین نقش آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی کیتین فوق‌العاده مهم جلوه داده شده است (Fang *et al.*, 2005). هرچند تاکنون تمامی ژن‌های کیتیناز موجود در این قارچ به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند ولی در این میان شناسایی و توالی‌یابی دو ژن *CHit1* و *CHit2* کاملاً انجام شده است (Fang *et al.*, 2005).

در زمینه‌ی تأثیر قارچ *B. bassiana* برای کنترل تریپس‌ها تحقیقات مختلفی در دنیا صورت گرفته است؛ ازجمله می‌توان به مطالعه‌ی Thungrabead *et al.* (2006) اشاره نمود که تأثیر درجه‌ی حرارت و میزبان گیاهی را روی کارایی انواع مختلفی از قارچ‌های پارازیت حشرات، علیه *Frankliniella occidentalis* (Pergande) و *T. tabaci* در شرایط آزمایشگاهی مطالعه کردند. همین‌طور، Ahmed & El-Mogy (2011) فرمولاسیون‌های مختلف چریش، *B. bassiana* و روغن جوجوبا (Jojoba) که از بذر گیاه *Simmondsia chinensis* (Link) به‌دست می‌آید را برای کنترل *T. tabaci* در مزارع پیاز ارزیابی کردند و نتیجه گرفتند که استفاده از این قارچ در دوره‌ی رویشی گیاه پیاز همراه با روغن جوجوبا نقش به‌سزایی در کاهش جمعیت و کنترل این آفت دارد. در ایران، و در سال‌های اخیر، تحقیقات پراکنده‌ای روی قارچ *B. bassiana* و تأثیر فرمولاسیون‌های مختلف آن روی لاروهای تریپس پیاز انجام شده است (Bena-Molaei *et al.*, 2011). ازجمله می‌توان به پژوهش

Ezzati-Tabrizi *et al.* (2009) اشاره نمود که تأثیر انواع فرمولاسیون‌های مختلف *B. bassiana* را روی لاروهای تریپس پیاز مورد مطالعه و بررسی قرار دادند. طبق تحقیقات این محققین، افزودن مواد همراه و نمک به سوسپانسیون کنیدی‌های قارچ، باعث افزایش طول عمر و خاصیت بیمارگری آن روی لاروهای تریپس پیاز می‌شود.

علی‌رغم اینکه تاکنون بسیاری از عوامل دخیل در بیماری‌زایی قارچ *B. bassiana* مورد مطالعه قرار گرفته است و همچنین گزارش‌های پراکنده‌ای درخصوص نحوه‌ی بیان ژن‌های کیتیناز این قارچ در برخی از حشرات موجود می‌باشد ولی هیچ‌گونه بررسی دقیق و مبسوطی درخصوص نحوه‌ی بیان ژن‌های دخیل در فرآیند کنترل بیولوژیکی، هنگام تعامل آنتاگونیستی این قارچ با تریپس پیاز صورت نپذیرفته است. باتوجه به اهمیت و نقش کلیدی آنزیم‌های کیتیناز در خاصیت آنتاگونیستی این قارچ، هدف اصلی در این پژوهش بررسی بیان ژن‌های *CHit1* و *CHit2* قارچ *B. bassiana* هنگام تعامل پارازیتی با لاروهای تریپس پیاز با استفاده از روش RT-PCR می‌باشد. تحقیق حاضر، اولین‌گام در درک مکانیسم‌های مولکولی دخیل در بیماری‌زایی قارچ مذکور در تریپس پیاز محسوب می‌شود.

مواد و روش‌ها

پرورش لاروهای تریپس پیاز

برای ایجاد کلنی تریپس‌ها در آزمایشگاه، نمونه‌برداری از مزارع پیاز منطقه‌ی شیرحصار مشهد صورت گرفت و تریپس‌های جمع‌آوری شده، روی گلدان‌های پرورش پیاز رهاسازی شدند. به‌منظور نگه داشتن کلنی منبع و فراهم بودن جمعیت کافی از تریپس‌ها، از روش دی‌آلویز (Loomans & Murai, 1997) استفاده شد؛ یعنی در اطراف گلدان‌های پیاز آلوده به تریپس، تعدادی گلدان حاوی گیاهان پیاز سالم قرار داده می‌شد. تریپس‌ها به سوی گیاهان سالم حرکت کرده و روی آن‌ها تکثیر می‌یافتند و گیاهان آلوده‌ی قدیمی به‌تدریج خشک و حذف می‌شدند. با ادامه و تکرار این کار، مراحل مختلف زیستی تریپس پیاز همواره در دسترس بود. برای داشتن لاروهای هم‌سن (سن دوم)، به‌وسیله‌ی یک آسپیراتور کوچک، تعداد ۴۰-۳۰ عدد تریپس بالغ از کلنی تریپس‌ها جمع‌آوری و داخل یک قفس برگی منتقل شدند. جهت دسترسی به تعداد کافی از لاروها، برای هر تیمار، چهار قفس برگی در نظر گرفته شد. قفس‌های برگی مربوط به گیاه پیاز به شکل استوانه، به طول حدود ٤ و قطر ۱ سانتی‌متر و از جنس پلاستیک ساخته شده بودند. به‌منظور جلوگیری از فرار تریپس‌ها، دو انتهای استوانه توسط پنبه مسدود و به آن‌ها اجازه داده شد که به مدت ۲٤ ساعت روی برگ‌ها تخم‌ریزی کنند. پس از طی این زمان، تریپس‌های بالغ از داخل قفس‌های برگی خارج شدند. قطعات برگ حاوی تخم از گیاهان جدا شده و داخل پتری‌های پلاستیکی به قطر ۹ سانتی‌متر که کف آن‌ها توسط کاغذ صافی مرطوب پوشانده شده بود، منتقل شدند. روی در این پتری‌ها سوراخی مربع‌شکل تعبیه و توسط پارچه‌ی ریزبافت مسدود شد. برای جلوگیری از فرار احتمالی تریپس‌ها دور هر پتری‌دیش با پارافیلم بسته شد. جهت تأمین رطوبت و جلوگیری از خشک شدن قطعات برگی، به‌طور روزانه آب روی کاغذ صافی اضافه می‌شد. جهت مشاهده‌ی خروج لاروهای سن دوم، قطعات برگی هر روز با استریومیکروسکوپ مورد بازدید قرار می‌گرفتند.

کشت و تهیه‌ی ماده‌ی تلقیحی قارچ

در این آزمایش از جدایه‌ی IRAN 789C قارچ *B. bassiana* تهیه شده از مؤسسه‌ی تحقیقات

گیاه‌پزشکی کشور استفاده گردید. قارچ روی محیط کشت PDA در پتری‌دیش‌های پلاستیکی به قطر ۹ سانتی‌متر کشت و اطراف در پتری‌ها توسط پارافیلم بسته شد. سپس پتری‌ها داخل انکوباتور در دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. پس از اسپورزایی قارچ‌ها در محیط کشت (حدود ۳ هفته بعد از کشت)، در شرایط استریل و زیر هود، سطح کشت پس از خراش با اسکالپل به لوله‌ی فالکون ۵۰ میلی‌لیتری محتوی آب مقطر استریل و Tween 80 ۰/۰۵ درصد ریخته شد. پس از ورتکس کردن، حجم نهایی به ۵۰ میلی‌لیتر رسانیده و مجدداً عمل ورتکس انجام شد. سوسپانسیون به‌دست آمده، از پارچه‌ی بسیار ریزبافت از جنس پلی‌استر عبور داده شد تا قطعات هیف و میسلیوم جداسازی شوند. از لام گلبول‌شمار (hemocytometer) برای تعیین غلظت سوسپانسیون حاصله استفاده شد و سپس با رقیق کردن توسط آب مقطر استریل، سایر غلظت‌های مورد نظر از کنیدی ($۱۰^{۴}$، $۱۰^{۵}$ و $۱۰^{۶}$ کنیدی در میلی‌لیتر) تهیه شد.

تعامل آنتاگونیستی

به‌منظور تیمار لاروهای سن دوم تریپس پیاز با غلظت‌های مختلف قارچ *B. bassiana*، از لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری استفاده شد. جهت ایجاد تهویه‌ی مناسب، روی درپوش این لوله‌ها سوراخی دایره‌ای‌شکل به قطر تقریبی یک سانتی‌متر تعبیه و با دستمال کاغذی مسدود گردید تا از فرار لاروها جلوگیری شود. داخل ظروف، ۳۵ میلی‌لیتر آب آگار ۱٪ ریخته و روی آن توسط کاغذ صافی دایره‌ای‌شکل پوشانده شد. سپس، یک قطعه برگ پیاز به طول حدود ۱/۵ سانتی‌متر داخل ظرف قرار گرفت و ۱۵ عدد لارو سن دوم تریپس پیاز روی آن منتقل گردید. پس از کالیبره نمودن دستگاه پاشش، غلظت‌های $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۵}$ و $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر به‌طور جداگانه در هر ظرف پاشیده شد. هر غلظت شامل چهار تکرار بود و سه تیمار (۱) بدون آب، (۲) فقط آب و (۳) آب و Tween 80 نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. پس از پاشش، لوله‌ها داخل انکوباتور با دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. میزان مرگ و میر لاروها هر ۲۴ ساعت و به مدت ۳ روز ثبت گردید و در پایان روز سوم کلیه‌ی لاروهای موجود در هر ظرف به‌طور جداگانه، و با درج شماره‌ی تکرار و تیمار، به داخل لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و تا زمان استخراج RNA، در فریزر با دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند.

تجزیه‌ی کلیه‌ی داده‌های مربوط به تلفات لاروها با استفاده از نرم‌افزار JMP, version 8 و به‌صورت آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

استخراج RNA، طراحی آغازگر و ساخت cDNA

برای استخراج RNA، ابتدا کلیه‌ی لاروهای موجود در هر لوله‌ی اپندورف به‌طور جداگانه توسط ازت مایع و با استفاده از یک سرسمپلر که نوک آن برای انجام کار مورد نظر فرم داده شده بود، خرد شدند. سپس با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini Kit-Q74904 (Qiagen, UK) و طبق دستورالعمل مندرج در آن، کل RNA استخراج گردید. ساخت cDNA از نمونه‌های RNA استحصال شده، با استفاده از کیت iScript TM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, CA) و طبق دستورالعمل مندرج در آن صورت پذیرفت. برای طراحی آغازگرها از نرم‌افزار PRIMER3 استفاده گردید (Rozen & Skaletsky, 2000). نام و توالی آغازگرهای طراحی‌شده در جدول ۱ ذکر شده است. در نهایت، یک میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های cDNA، برای تکثیر با استفاده از RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱– توالی آغازگرهای طراحی‌شده برای بیان ژن‌های *CHit1* و *CHit2* در قارچ *Beauveria bassiana*.

Table 1. Sequence of primers designed for the expression of *Chit1* and *Chit2* genes in *Beauveria bassiana*.

Primer	Sequence	Target gene
BFC1 (Forward primer)	5'-GTCATCAATGCTGCCTTTCC-3'	*CHit1*
BRC1 (Reverse primer)	5'-CAGTCGGTCTGAACAATGAA-3'	*CHit1*
BFC2 (Forward primer)	5'-GAACGGATCTGATTCCCTCA-3'	*CHit2*
BRC2 (Reverse primer)	5'-CTGCGGCGATAACTAAAAGC-3'	*CHit2*

RT-PCR و بررسی بیان ژن‌های کیتیناز

برای انجام RT-PCR از کیت AccuPower PCR PreMix kit (Bioneer, Korea) و طبق دستورالعمل مندرج در آن استفاده شد. سیکل حرارتی دستگاه ترموسایکلر به‌صورت، ۹۵°C به مدت ٤ دقیقه (واسرشته‌سازی اولیه)؛ ۳۰ سیکل حرارتی ۹۲°C به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته‌سازی)، ٦۰°C به مدت ۳۰ ثانیه (اتصال)، ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه (گسترش)؛ و در نهایت ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه (گسترش نهایی) بود. پس از انجام RT-PCR، مقدار پنج میکرولیتر از محصول نهایی روی ژل آگارز رانده شد و تصویربرداری از باندهای حاصله توسط دستگاه gel documentation صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی میزان مرگ و میر لاروهای سن دوم تریپس پیاز تیمارشده با غلظت‌های مختلف قارچ و همچنین درصد کل مرگ و میر مشاهده شده در هر تیمار در جدول ۲ ارائه شده است. در روز اول پس از تیمار، میزان مرگ و میر مشاهده شده در تیمارهای $۱۰^{۵}$ و $۱۰^{٦}$ به‌طور معنی‌داری بیش از مرگ و میر مشاهده شده در تیمار $۱۰^{٤}$ کنیدی در میلی‌لیتر بود (F = ٦۸/۹۵۵، df = ۳، P <۰/۰۰۰۱) ولی اختلاف مشاهده شده بین این تیمار و تیمار شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲). در روز دوم پس از تیمار نیز اختلافات مشاهده شده بین تیمارها معنی‌دار بود و بیش‌ترین میزان مرگ و میر در تیمار $۱۰^{٦}$ کنیدی در میلی‌لیتر مشاهده شد (F = ۱۵/۳۵۰، df = ۳، P <۰/۰۰۰۱). در روز سوم پس از تیمار، میزان مرگ و میر در تمامی تیمارها به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از میزان مرگ و میر در تیمار شاهد بود (F = ۲۰/۷۹۵، df = ۳، P <۰/۰۰۰۱) ولی مرگ و میر لاروهای تریپس پیاز تیمارشده با غلظت‌های مختلف قارچ از لحاظ آماری با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۲). با مقایسه‌ی کل درصد مرگ و میر مشاهده شده در تیمارهای مختلف، می‌توان نتیجه گرفت که اختلاف میزان مرگ و میر مشاهده شده در تمامی تیمارها از لحاظ آماری معنی‌دار بود و تیمار $۱۰^{٦}$ کنیدی در میلی‌لیتر بیش‌ترین میزان مرگ و میر را داشت (F = ٦۸/۹۵۵، df = ۳، P <۰/۰۰۰۱) (جدول ۲).

به‌طورکلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با افزایش غلظت کنیدی‌های قارچ، میزان مرگ و میر لاروهای تریپس پیاز نیز افزایش می‌یابد و غلظت کنیدی‌ها و زمان، هر دو از فاکتورهای دخیل در میزان مرگ و میر لاروها به‌شمار می‌روند (جدول ۲). در تحقیقات مشابه، اثر غلظت‌های متفاوتی از کنیدی‌های قارچ *B. bassiana* جهت کنترل بیولوژیک کنه‌ی تارتن دونقطه‌ای، *Tetranychus urticae* Koch (Gatarayiha *et al*., 2010)، پروانه‌ی ساقه‌خوار *Chilo partellus* (Swinhoe) (Tefera & Pringl., 2003) و همچنین زنجره‌ی *Nilaparvata lugens* (Stål) (Feng & Pu, 2005) مورد مطالعه قرار گرفتند و مشخص شد که با افزایش غلظت کنیدی‌های این قارچ، درصد مرگ و میر در این حشرات نیز افزایش یافت.

جدول ۲- درصد مرگ و میر لاروهای سن دوم تریپس پیاز تیمارشده با غلظت‌های مختلف قارچ *Beauveria bassiana*، یک تا سه روز پس از تیمار.

Table 2. Percent mortality of the second instar larvae of onion thrips treated with different concentrations of *Beauveria bassiana*, one to three days after treatment.

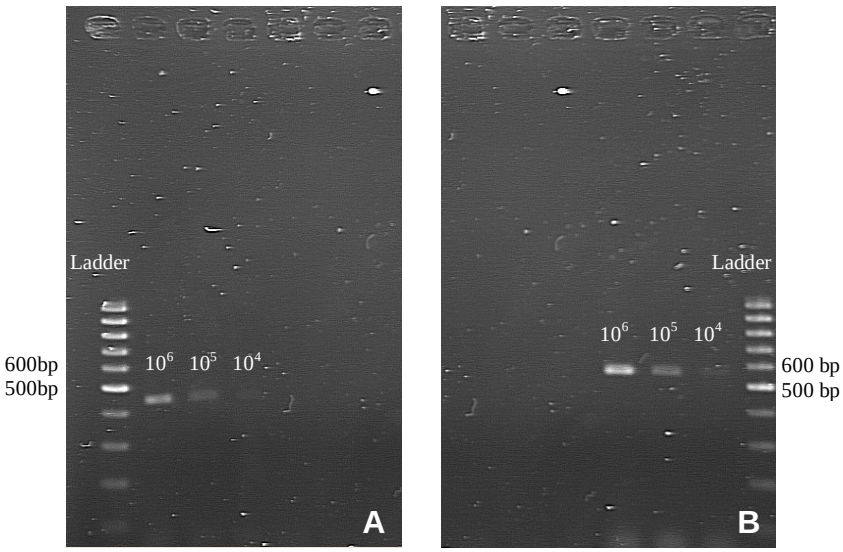
Days after treatment	Control	10^4 Conidia per ml	10^5 Conidia per ml	10^6 Conidia per ml
First day	3.335 ± 1.925 a	6.667 ± 2.720 a	23.332 ± 4.303 b	33.332 ± 4.714 b
Second day	5.355 ± 3.418 a	12.28 ± 5.125 ab	21.177 ± 4.781 b	44.307 ± 3.771 c
Third day	1.922 ± 1.922 a	25.275 ± 4.101 b	41.665 ± 4.812 b	74.8 ± 11.693 b
Total	10 ± 5.773 a	39.997 ± 4.714 b	65 ± 3.19 c	95 ± 3.19 d

Means in a row followed by the same letter were not significantly different ($\alpha = 0.05$) (LSD test).

آنزیم‌های کیتینولیتیک از فاکتورهای دخیل در توانایی قارچ‌های آنتاگونیست به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک محسوب شده و باعث از بین رفتن کوتیکول میزبان می‌شوند (Lorito *et al*., 1993; Lorito 1998). با توجه به اهمیت این آنزیم‌ها، مطالعه‌ی بیان ژن‌های کدکننده‌ی آن‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است، لذا بیان دو ژن کیتیناز *CHit1*، *CHit2* هنگام تعامل پارازیتی قارچ *B. bassiana* و لاروهای سن دوم تریپس پیاز با روش RT-PCR بررسی شد و سطح بیان این دو ژن، مورد مقایسه قرار گرفت. به‌منظور مقایسه‌ی بیان این دو ژن در شرایط عدم تعامل قارچ و حشره و تعامل قارچ و حشره، غلظت‌های $۱۰^{٤}$، $۱۰^{٥}$، و $۱۰^{٦}$ کنیدی در میلی‌لیتر از اسپورهای قارچ تهیه شد و بیان ژن‌های فوق در آن‌ها، در شروع آزمایش و قبل از تعامل با حشره مورد بررسی قرار گرفت. تحت این شرایط، ژن‌های مورد نظر بیان نشدند، به عبارت دیگر، روی ژل آگارز هیچ‌گونه باندی تشکیل نگردید (شکل A, B-۱). معمولاً قارچ‌ها همواره از سهل‌الوصول‌ترین منبع کربن همانند قندهایی نظیر گلوکز برای تأمین نیازهای رشدی خود استفاده می‌نمایند و در شرایط مساوی نسبت به انتخاب این قندها رجحان غذایی نشان می‌دهند. به عبارت دیگر، در حضور این قندها و علی‌رغم وجود کیتین در محیط، رغبتی به استفاده از کیتین و مصرف آن از طریق بیان ژن‌های کیتیناز و ترشح این آنزیم‌ها نشان نخواهند داد. قارچ‌ها هنگامی سراغ کیتین برای تأمین کربن مورد نیاز خود خواهند رفت که غیر از آن منبع دیگری در اختیار نداشته باشند (Mamarabadi *et al*., 2009). ازاین‌رو در شرایط عادی که قارچ روی محیط کشت رشد کرده بود و قبل از شروع آزمایش و عدم تعامل با کوتیکول حشره، عدم بیان این ژن‌ها مشاهده شد.

در بررسی‌های Mamarabadi *et al*. (2009) مشخص شد که بیان ژن کیتیناز cr-nag1 در قارچ آنتاگونیست *Clonostachys rosea* Schroers در محیط‌های حاوی گلوکز، ناچیز ولی در محیط‌های حاوی کیتین و یا در محیط‌های حاوی دیواره‌ی سلولی قارچ *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) افزایش یافت. در همین مطالعه نشان داده شد که ژن کیتیناز cr-nag1 هنگام تعامل قارچ *C. rosea* با اوومیست‌های *Pythium ultimum* Trow که در دیواره‌ی عرضی خود فاقد کیتین است، بیان نگردید. این موارد تأییدکننده‌ی نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر مبنی بر عدم بیان ژن‌های کیتیناز در قارچ *B. bassiana* قبل از انجام تعامل پارازیتی با لاروهای تریپس پیاز می‌باشد.

در مرحله‌ی بعد، ۷۲ ساعت پس از تیمار لاروهای تریپس پیاز با غلظت‌های متفاوت قارچ *B. bassiana*، بیان ژن‌ها بررسی شد. در مورد ژن *CHit1*، بالاترین سطح بیان در تیمار $۱۰^{٦}$ اسپور در میلی‌لیتر مشاهده گردید و تیمار $۱۰^{٥}$ اسپور در میلی‌لیتر در رتبه‌ی دوم



شکل ۱- بیان ژن *CHit1* (A) و ژن *CHit2* (B) در سه غلظت ۱۰^۴، ۱۰^۵ و ۱۰^۶ کنیدی در میلی‌لیتر.

Fig. 1. Gene expression of *Chit1* (A), and *Chit2* (B) in three concentrations of 10^4, 10^5 and 10^6 conidia/ml.

قرار داشت (شکل A-۱). میزان بیان ژن *CHit1* در تیمار ۱۰^۴ اسپور در میلی‌لیتر بسیار کم بود، بااین‌حال در این تیمار نیز ژن مورد نظر بیان شده بود (شکل A-۱). در مورد ژن *CHit2* نیز بیش‌ترین میزان بیان در تیمار ۱۰^۶ اسپور در میلی‌لیتر مشاهده شد و تیمارهای ۱۰^۵ و ۱۰^۴ اسپور در میلی‌لیتر در رتبه‌های بعدی قرار داشتند، به‌طوری‌که در تیمار اخیر میزان بیان ژن بسیار پایین بود (شکل B-۱).

با مقایسه‌ی میزان بیان ژن‌ها درمی‌یابیم که با افزایش غلظت قارچ *B. bassiana*، میزان بیان ژن‌های *CHit1* و *CHit2* نیز افزایش یافته است. به عبارت دیگر، میزان بیان ژن‌های کیتیناز در این قارچ آنتاگونیست می‌تواند رابطه‌ی مستقیمی با کمیت اسپورهای تلقیح‌شده داشته باشد و با مطالعه‌ی بیان این ژن‌ها می‌توان برآوردی از جمعیت اولیه‌ی قارچ ارایه نمود. بیان این ژن‌ها در هنگام تعامل پارازیتی قارچ با لاروها و عدم بیان آن‌ها در شرایطی که کیتین حشره در دسترس قارچ نیست، بیانگر حایز اهمیت بودن نقش آن‌ها به‌عنوان فاکتوری مؤثر در از بین بردن ارگانیسم‌های هدف و اعمال کنترل بیولوژیک می‌باشد؛ یعنی هر دو ژن مذکور، در کنترل بیولوژیکی لاروهای تریپس پیاز دخیل هستند.

نتایج مربوط به میزان مرگ و میر لاروهای تریپس پیاز با نتایج مربوط به بیان ژن‌های کیتیناز رابطه‌ی مستقیم دارد؛ یعنی با افزایش غلظت کنیدی‌ها، میزان بیان ژن‌های *CHit1* و *CHit2* افزایش می‌یابد و باعث بالا رفتن میزان مرگ و میر لاروهای تریپس پیاز می‌شود. بیش‌ترین میزان بیان ژن‌ها در غلظت ۱۰^۶ کنیدی در میلی‌لیتر و بیش‌ترین میزان مرگ و میر لاروها نیز در همین غلظت مشاهده شد، درحالی‌که کم‌ترین میزان بیان ژن‌ها و نیز مرگ و میر لاروها مربوط به غلظت ۱۰^۴ کنیدی در میلی‌لیتر بود.

سپاس‌گزاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد که

بدین‌وسیله از ایشان تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید. از حمایت‌های بی‌دریغ آقایان مهندس محمد علی سبک‌خیز، مهندس محسن سبک‌خیز و همچنین خانم مهندس فاطمه طبسی‌نژاد در طی انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Ahmed, S. S. & El-Mogy, M. M. (2011) Field evaluation of some biological formulations against *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) in onion. *World Applied Science Journal* 14(1), 51-58.

Ananthakrishnan, T. N. (1979) Biosystematics of Thysanoptera. *Annual Review of Entomology* 24, 159-183.

Bena-Molaei, P., Talaei-Hassanloui, R., Askary, H. & Kharazi-Pakdel, A. (2011) Study on potential of some solid natural substances in production of *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Cordycipitaceae) conidia. *Journal of Entomological Society of Iran* 30(2), 1-15.

Capinera, J. L. (2001) *Handbook of vegetable pests*. 1st ed. 729 pp. Academic Press.

Castrillo, L. A., Griggs, M. H., Liu, H., Bauer, L. S. & Vandenberg, J. D. (2010) Assessing deposition and persistence of *Beauveria bassiana* GHA (Ascomycota: hypocreales) applied for control of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae), in a commercial tree nursery. *Biological Control* 54, 61-67.

Castrillo, L. A., Griggs, M. H. & Vandenberg, J. D. (2008) Quantitative detection of *Beauveria bassiana* GHA (Ascomycota: hypocreales), a potential microbial control agent of emerald ash borer, by use of real-time PCR. *Biological Control* 45, 163-169.

Coudriet, D. L., Kisaba, A. N., MeCreight, J. D. & Bohn, G. W. (1979) Varietal resistance in onion to thrips. *Journal of Economic Entomology* 72, 614-615.

Ezzati-Tabrizi, R., Talaei-Hassanloui, R. & Pourian, H. R. (2009) Effect of formulation of *Beauveria bassiana* conidia on their viability and pathogenicity to the onion thrips, *Thrips tabaci* Lind. (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Plant Protection Research* 49(1), 97-104.

Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y. & Pei, Y. (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Applied Environmental Microbiology* 71(1), 363-70.

Feng, M. G., Poprawski, Y. J. & Khachatourians, G. G. (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology* 4, 3-34.

Feng, M.G. & Pu, X.Y. (2005) Time-concentration-mortality modeling of the synergistic interaction of *Beauveria bassiana* and imidacloprid against *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science* 61, 363-370.

Gatarayiha, M. C., Laing, M. D. & Miller, R. M. (2010) Effects of adjuvant and conidial concentration on the efficacy of *Beauveria bassiana* for the control of the two spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Experimental and Applied Acarology* 50, 217-229.

Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M. & Strasser, H. (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing biocontrol agents. pp. 23-69 in Butt, T. M., Jackson, C. & Magan, N. (Eds) *Fungi as biocontrol agents*. 390 pp. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Kirk, W. D. J. (1997) Distribution, abundance and population dynamics. pp. 217-257 in Lewis, T. (Ed.) *Thrips as crop pests*. 1st ed. 740 pp. CAB International.

Lewis, T. (1997) Pest thrips in perspective. pp. 1-13 in Lewis, T. (Ed.) *Thrips as crop pests*. 1st ed. 740 pp. CAB International.

Loc, N. T. & Chi, V. T. B. (2007) Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Omonrice* 15, 86-93.

Loomans, A. J. M. & Murai, T. (1997) Culturing thrips and parasitoids. pp. 477-503 in Lewis, T. (Ed.) *Thrips as crop pests*. 1st ed. 740 pp. CAB International.

Lorito, M. (1998) Chitinolytic enzymes and their genes. pp. 73-99 in Harman G. E. & Kubicek, C. P. (Eds) Trichoderma and Gliocladium: *Enzymes, biological control and commercial applications*. Vol. 2, 393 pp. Taylor and Francis Ltd. London.

Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L. & Di Pietro, A. (1993) Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83, 302-307.

Mamarabadi M., Jensen, D. F. & Lübeck, M. (2009). An N-acetyl-beta-D-glucosaminidase gene, cr-nag1, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is up-regulated in antagonistic interactions with *Fusarium culmorum*. *Mycological Research* 113, 33-43.

Mound, L. A. (1997) Biological diversity. pp. 197-215 in Lewis, T. (Ed.) *Thrips as crop pests*. 1st ed. 740 pp. CAB International.

Rozen, S. & Skaletsky, H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. pp. 365-386 in Krawetz, S. & Misener, S. (Eds) *Bioinformatics methods and protocols*: *methods in molecular biology*. Vol. 132, 500 pp. Humana Press, Totowa, NJ.

Sassa, D. C., Varea-Pereira, G., Neves, P. M. O. J. & Garcia, J. E. (2009) Genetic variation in a chitinase gene of *Beauveria bassiana*: lack of association between enzyme activity and virulence against *hypothenemus hampei*. *Journal of Entomology* 6, 35-41.

Tefera, T. & Pringle, K. L. (2003) Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 84, 90-95.

Thungrabead, M., Blaeser, P. & Sengonca, C. (2006) Effect of temperature and host plant on the efficancy of different entomopathogenic fungi from Thailand against *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) in the laboratory. *Journal of Plant Disease and Protection* 113(4), 181-187.

Trichilo, P. J. & Leigh T. F. (1988) Influence of resource quality on the reproductive fitness of flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Annals of the Entomological Society of America* 81(1), 64-70.

Van Rijn, P. C., Mollema, J. C. & Stenhuis-Broers, G. M. (1995) Comparative life history studies of *Frankliniella occidentalis* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber. *Bulletin of Entomological Research* 85, 285-297.

Vicentini, S., Faria, M. & De Oliveira, M. R. V. (2001) Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay method. *Neotropical Entomology* 30(1), 97-103.