مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۷، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۷
صفحه ۱۸۷-۱۷۵

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 2

تاثیر دو جدایه از قارچ *Metarhizium anisopliae* و نانو-قارچ *Metarhizium anisopliae*@Fe_3O_4 برای کنترل بید کلم

Efficacy of two *Metarhizium anisopliae* isolates and nano-fungus *Metarhizium anisopliae*@Fe_3O_4 against Diamondback moth

فرشته خرّمی[۱*]، یوبرت قوستا[۲]، خدیجه اوجاقی آقباش[۳]، اثمر سلیمان زاده[۱]، مریم فروزان[٤]
Fereshteh Khorrami[*1], Youbert Ghosta[2], Khadijeh Ojaghi Aghbash[3], Asmar Soleymanzade[1], Maryam Forouzan[4]

۱ – دکترای حشره‌شناسی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان ایران، واحد ارومیه، ایران
۲– دکترای بیماری‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران
۳– دکترای شیمی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان ایران، واحد عجب‌شیر،
٤– دکترای حشره‌شناسی، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ارومیه، ایران

1- Ph.D, Yong Researchers and Elite Club, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
2- Ph.D, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Ph.D, Yong Researchers and Elite Club, Ajab Shir Branch, Islamic Azad University, Ajab Shir, Iran.
4- PhD, Plant Protection Research Department, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Urmia, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fkhorrami.khorrami20@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۱۰ – تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۳۰)

چکیده

بید کلم (*Plutella xylostella* L.) آفت مهم گیاهان تیره چلیپائیان (Brassicaceae) در ایران و جهان است. حشره‌کش‌های شیمیایی نقش مهمی را در کنترل این آفت ایفا می‌کنند، اما آثار سوء استفاده از آن‌ها و همچنین وجود مقاومت قابل توجه آفت به طیف وسیعی از حشره‌کش‌ها، موجب افزایش توجه به استفاده از ترکیبات و عوامل ایمن و سازگار با محیط زیست شده است. لذا در این تحقیق قدرت بیمارگری جدایه‌های AM111 و AH112 از قارچ *Metarhizium anisopliae* و همچنین نانو-قارچ سنتز شده *Metarhizium anisopliae* AM111@Fe_3O_4 روی لاروهای سن سوم بید کلم در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. مقایسه سمیت نانو-قارچ و قارچ فرموله نشده حاکی از کاهش معنی‌دار غلظت قارچ مورد استفاده در حالت فرموله شده آن بود، به طوری که غلظت کشنده در حالت نانو-قارچ ۱۰^{٤} × ۲/۵ کنیدی در میلی‌لیتر بود که نشان از موثرتر بودن نانو-قارچ نسبت به حالت فرموله نشده آن در مقابل آفت است. بررسی مقایسه میانگین دورکنندگی نانو-قارچ با قارچ فرموله نشده در مقابل لاروهای سن سوم بید کلم انجام شد و نتایج نشان داد که نانو-قارچ به طور معنی‌داری دور کنندگی بالاتری را ایجاد می‌کند به طوریکه میانگین دورکنندگی قارچ و نانو-قارچ برای لارو سن سوم آفت به ترتیب ٦۹ و ۷٤/٦٦ درصد بود. همچنین در مطالعه آنزیمی، مقایسه فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز Pr1 در pH بهینه (۱۱=) در اثر فعالیت قارچ نشان داد که اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمار قارچ و شاهد وجود دارد و در تیمار قارچ فعالیت آنزیم بالاتر بود. میزان واحد فعالیت آنزیم ویژه پروتئاز Pr1 در تیمارهای قارچ و شاهد به ترتیب ۲/۹۹٤ و ۰/۰۵۱ واحد آنزیمی در میلی‌گرم به دست آمد. نتایج ما نشان داد که نانو-قارچ در مقایسه با قارچ فرموله نشده دارای تاثیر بالاتری روی بید کلم بوده و *Metarhizium anisopliae* AM111@Fe_3O_4 می‌تواند به عنوان ترکیبی جدید و موثر در مدیریت تلفیقی این آفت مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

Plutella xylostella،
پروتئاز،
زیست‌سنجی،
قارچ بیمارگر حشرات،
فناوری نانو

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]

مقدمه

بید کلم با نام علمی *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین آفات گیاهان تیره چلیپائیان در سراسر دنیا است (Schuler and Emden, 2000) که دلایل اصلی آن قابلیت مهاجرت این حشره به فواصل طولانی، تنوع و فراوانی گیاهان میزبان، فقدان دشمنان طبیعی در بسیاری از مناطق غیر بومی و باروری بالای آفت می‌باشد (Saeed *et al*. 2010). لاروها از برگ، جوانه، گل، پوشینه، لایه‌های سبز بیرونی ساقه و گاهی اوقات از بذر تغذیه می‌کنند. الگوی تغذیه‌ای لاروها به این صورت است که لاروهای سنین اول به صورت داخلی و به حالت مینوز از نسوج برگ تغذیه می‌کنند. سایر سنین لاروی نیز به صورت خارجی از قسمت‌های مختلف تغذیه کرده و باعث ایجاد خسارت می‌شوند (Ahmad *et al*., 2008). این آفت گاهی تا ۹۰ درصد محصول کلم را نابود می‌کند (De Groot, 2005). هر سال حدود یک میلیارد دلار جهت مدیریت این آفت در سراسر دنیا هزینه می‌شود (Dezianian *et al*. 2010). کنترل این آفت تا حد زیادی به استفاده از حشره‌کش‌های مصنوعی وابسته است اما متاسفانه این آفت به گروه‌های مختلفی از حشره‌کش‌های رایج مقاومت پیدا کرده است (Zhou *et al*. 2011). بنابراین، لزوم کنترل آن از طریق سایر روش‌ها نظیر استفاده از عوامل بیمارگر قابل بررسی است.

در بین عوامل کنترل بیولوژیک، قارچ‌ها یکی از امید بخش‌ترین بیمارگرها بوده و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. این عوامل با نفوذ مستقیم از کوتیکول میزبان موجب آلودگی در آفت هدف می‌شوند (St. Leger *et al*. 1991). قارچ‌های بیمارگر حشرات قادرند تاثیرات بیولوژیک متنوعی روی حشرات شامل مسمومیت عصبی، کاهش فعالیت سیستم ایمنی بدن و فعال‌سازی کانال‌های کلسیم در ماهیچه‌های بدن داشته باشند (Vilicinskas *et al*. 1997). در حالت کلی، مراحل بیمارگری قارچ‌های بیمارگر حشرات شامل چسبیدن اسپور به سطح کوتیکول، تندش اسپور، تولید اپرسوریوم، رخنه به کوتیکول و ورود به هموسل است (Bidochka *et al*., 2001). یکی از مشهورترین قارچ‌های بیمارگر حشرات *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin است که دارای قابلیت بیماری‌زایی در آفات گیاهی و جانوری است. این قارچ به عنوان عامل بیماری موسکاردین سبز حشرات شناخته می‌شود و قارچی مهم در کنترل بیولوژیک حشرات آفت محسوب می‌گردد (TajickGhanbalani *et al*. 2009). قارچ‌های بیمارگر حشرات از طریق اسکلت خارجی (کوتیکول) به میزبان حمله می‌کنند که یک ساختار پیچیده با محتوای پروتئین بالا است. میسلیوم قارچ از طریق یک سری آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند کیتیناز، پروتئاز و لیپاز به کوتیکول حشرات نفوذ می‌کند. در برخی از قارچ‌های بیمارگر حشرات نظیر *Beauveria bassiana* و *M. anisopliae* چندین آنزیم مخرب کوتیکول مانند پروتئاز و کیتیناز شناسایی شده‌اند. پروتئازهای خانواده Pr1 مهمترین آنزیم‌های تولید شده توسط قارچ‌های بیمارگر در طی فرآیند بیماری‌زایی هستند (Ali *et al*. 2009).

امروزه از فناوری نانو به عنوان یک عامل تاثیر گذار بر علم و صنعت استفاده می‌شود و صاحب نظران و محققان نیز تاکید نموده‌اند که این فناوری به عنوان انقلابی در شرف وقوع، آینده اقتصادی کشورها و جایگاه آن‌ها را در جهان تحت تاثیر جدی قرار خواهد داد. تاکنون نمونه‌هایی از حشره‌کش‌های نانو به روش‌های مختلف تولید شده‌اند ولی با توجه به نیاز جدی برای گسترش این گروه از حشره‌کش‌ها، شناسایی روش‌های مناسب تهیه نانوذرات حشره‌کش‌ها لازم است. از طرف دیگر، با توجه به مشکلات زیست‌محیطی و هزینه ناشی از مصرف مقادیر زیاد آفت‌کش‌های معمولی در طبیعت و نیز مشکلات ناشی از

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]

مقاومت آفات به این آفت‌کش‌ها، تحقیق و توسعه در زمینه آفت‌کش‌های نانو به عنوان یک ضرورت مطرح می‌گردد.

نانوذرات مغناطیسی به ذراتی با ماهیت مستقل و با ابعاد حداکثر ۱۰۰ نانومتر و دارای عناصر مغناطیسی گفته می‌شود. این ذرات دارای ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بی‌نظیری هستند که به طرز قابل توجهی متفاوت از حالت توده‌ای مواد هستند (Osaka *et al*. 2006). در بین انواع نانوذرات، ذرات مغناطیسی به دلیل جداسازی آسان با یک میدان مغناطیسی خارجی و ظرفیت بالای آن‌ها برای استفاده در زمینه‌های گوناگون بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند. ویژگی‌های نانو ذرات مغناطیسی، روش‌های سنتز، پایدار کردن، عامل‌دار کردن، روش‌های شناسایی و کاربردهای گوناگون آن‌ها در زمینه‌های مختلف علوم بررسی شده‌اند (Faraji *et al*. 2010). در بین انواع مختلف نانو ذرات مغناطیسی، نانو ذرات اکسید آهن به ویژه نانو ذرات سوپر پارامغناطیسی Fe_3O_4 (مگنتیت) به دلیل عدم سمیت، انطباق‌پذیری زیستی مناسب و عدم حفظ مغناطیس باقیمانده بعد از حذف میدان مغناطیسی خارجی، بیشترین کاربرد را داشته‌اند (Cao *et al*. 2012). به عبارت دیگر، استفاده از نانو ذرات مغناطیسی امکان جمع‌آوری جاذب را از نمونه‌های حجیم با کمک یک میدان مغناطیسی قوی فراهم می‌کند. همچنین با اتصال سطح، می‌توان نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن را با گروه‌های ویژه‌ای مانند OH-، COOH- و NH_2- عامل‌دار نمود تا برای اتصال بیشتر با مولکول‌های فعال زیستی با کاربردهای گوناگون مناسب باشند (Berry and Curtis, 2003).

علی‌رغم مطالعات متعددی که در زمینه بررسی جدایه‌ها و گونه‌های مختلف قارچی روی آفاتی مانند بید کلم انجام شده است، تاکنون هیچ گزارشی در مورد استفاده از نانوذرات مغناطیسی برای تهیه فرم نانو شده قارچ‌های بیمارگر حشرات ارائه نشده است و تحقیق حاضر اولین گزارش در این مورد می‌باشد. همچنین در این تحقیق، علاوه بر بررسی قدرت بیماری‌زایی دو ایزوله قارچ *M. anisopliae* روی لاروهای سن سوم بید کلم، فرم نانو کامپوزیت ایزوله موثرتر سنتز شده و خاصیت دورکنندگی و میزان فعالیت آنزیم پروتئاز Pr1 نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

پرورش گیاه و حشره

برای پرورش بید کلم از گیاه کلم (*Brassica oleracea*) استفاده شد. نخست بذور در ظروف یکبار مصرف (۸ ×۱۰ سانتیمتری) کاشته شدند و پس از گذشت دو هفته هر یک از نشاها به صورت مجزا به گلدان‌های پلاستیکی (۱۵×۱۸ سانتیمتری) حاوی خاک باغچه، ماسه و خاکبرگ به ترتیب به نسبت ۳، ۱و ۰/۵ قسمت منتقل و در شرایط گلخانه (دما ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰-۶۰ درصد، و دوره نوری ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی) در مرکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ارومیه نگهداری شدند. برای ایجاد کلنی، لاروهای سن سوم یا چهارم و شفیره‌ها از مناطق کشت کلم ارومیه جمع آوری و به گلخانه منتقل گردیدند و به مدت چندین نسل پرورش داده شدند. برای تشکیل کلنی و تخم‌گیری از پروانه‌ها از قفس‌هایی به شکل مکعب مستطیل از جنس طلق پلاستیکی و با چهار چوب چوبی در ابعاد ٤٠×٤٠ ×٥٠ سانتیمتر استفاده گردید. برای تغذیه شب‌پره‌ها از محلول ۱۰ درصدی آب و عسل استفاده شد. حدود ٤٠٠ تا ٥٠٠ عدد شفیره درون قفس قرار داده شدند تا بعد از تبدیل شدن به پروانه از تخم‌های هم‌سن آن‌ها برای تشکیل کلنی استفاده شود. برای تخم‌گیری از برگ کلم استفاده شد که به مدت ۱۰ تا ۱۵ ساعت درون قفس قرار داده شدند. سپس برگ‌های مذکور

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]

روی برگ‌های تازه کلم در قفس‌های مربوط به مرحله لاروی منتقل شدند. برای تازه ماندن برگ، دمبرگ آن‌ها توسط پنبه اشباع شده با آب دربرگرفته شد. بسته به تعداد لاروها و تغذیه آن‌ها، برگ‌های جدید هر دو یا سه روز یک بار در اختیار لاروها قرار داده شدند. برای انجام آزمایش‌ها از لاروهای سن سوم استفاده گردید.

تهیه و کشت جدایه قارچی

جدایه‌هایAM111 و AH112 از قارچ *M. anisopliae* از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه ارومیه تهیه گردیدند. برای تکثیر این جدایه‌ها از محیط کشت سیب زمینی–دکستروز–آگار (PDA) آماده استفاده شد. محیط کشت تهیه شده به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون شد و بعد از رسیدن دمای محیط کشت به حدود ۴۵–۵۰ درجه سلسیوس در شرایط سترون، به تشتک‌های پتری پلاستیکی ۸ سانتیمتری افزوده شد. بعد از بستن محیط کشت داخل تشتک‌های پتری، جدایه‌های قارچی در چندین تشتک پتری کشت داده شدند و تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس به مدت دو هفته نگهداری شدند تا به میزان کافی رشد و اسپورزایی نمایند. سپس این تشتک‌ها برای تهیه سوسپانسیون قارچی مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه سوسپانسیون قارچ

برای تهیه سوسپانسیون قارچی، به هر تشتک پتری مقداری آب مقطر سترون اضافه شده و با کمک اسکالپل سترون، سطح کشت کاملا خراش داده شد تا اسپورها از سطح کشت جدا شده و در آب غوطه‌ور شوند. سوسپانسیون‌های حاصل در یک بشر سترون جمع‌آوری شدند و سپس برای حذف قطعات احتمالی محیط کشت و یا میسلیوم‌های قارچ، از پارچه توری سترون عبور داده شدند. سوسپانسیون اسپورها در لوله‌های آزمایش درب‌دار سترون جمع‌آوری شدند. برای شمارش اسپورها در سوسپانسیون از لام هموسایتومتر استفاده گردید. عمل شمارش اسپورها از یک نمونه سوسپانسیون چندین بار و با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر میکروسکوپ نوری انجام گرفت و میانگین شمارش‌ها به عنوان تراکم سوسپانسیون نمونه اصلی محسوب شد. بر اساس تراکم نمونه‌های سوسپانسیون، غلظت مورد نظر برای مطالعات زیست‌سنجی تهیه شدند. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی، تراکم‌هایی که مرگ و میری در حدود ۲۵ تا ۷۵ درصد در جمعیت ایجاد کردند، در آزمایش نهایی استفاده شدند.

تهیه ترکیب نانو–قارچ *Metarhizium anisopliae*@Fe_3O_4

ابتدا محلول‌های $FeCl_3{\cdot}6H_2O$ (۲ گرم) و $FeCl_2.4H_2O$ (۰/۸ گرم) به طور جداگانه در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر تحت گاز بی‌اثر به مدت ۱۰ دقیقه، تهیه گردیدند. سپس محلول‌های حاصل به آهستگی به ۱۰ میلی‌لیتر از غلظت‌های بدست آمده از آزمایش‌های مقدماتی سوسپانسیون جدایه AM111 از قارچ *M. anisopliae* اضافه گردیدند. محلول حاصل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت در شرایط خلاء به هم زده شد. سپس، آمونیاک آبی (٪۲۵) به محلول اضافه گردید تا pH بالای ۱۰ حاصل شود. سپس محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با قدرت زیاد به هم زده شد. رسوبات با یک آهن‌ربای خارجی جمع‌آوری و چندین بار با آب شستشو داده شدند و در نهایت به منظور خشک شدن، به مدت ۲۴ ساعت در شرایط خلاء قرار گرفتند (Rostamnia *et al.*, 2015).

سطح، ریخت‌شناسی و تعیین اندازه ذرات سنتز شده و همچنین پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) نانوکامپوزیت با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل FESEM-TESCAN MIRA3 ساخت کشور چک

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]

تعیین شد (شرکت دی پترونیک، تهران، ایران). طیف‌سنجی مادون‌قرمز (IR) با استفاده از اسپکتروفوتومتر FT-IR ThermoNicolet Nexus 670 ساخت کشور آمریکا در محدوده ۴۰۰۰-۴۰۰cm^{-1} و قدرت تفکیک ۰/۵ cm^{-1} به‌صورت قرص جامد تهیه شده با پودر برمید پتاسیم (KBr)، ثبت گردید (دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران).

زیست‌سنجی جدایه‌های قارچ و نانو-قارچ در شرایط آزمایشگاهی

آزمایش‌ها بر اساس روش Duarte و همکاران (۲۰۱۶) با اندکی تغییرات انجام شد. پس از فراهم شدن سوسپانسیون جدایه‌ها، اقدام به رقیق‌سازی و تهیه سری غلظت‌ها شد. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی غلظت‌های اصلی 10^{8}-10^{4} و 10^{9}-10^{5} کنیدی در میلی‌لیتر به ترتیب برای جدایه‌های AM111 و AH112 تهیه و آزمایش‌های زیست‌سنجی با آن‌ها انجام شد. آزمایش‌ها با استفاده از روش غوطه‌ورسازی برگ کلم انجام شد. برای این منظور دیسک‌های برگی (قطر ۸ سانتیمتر) از برگ‌های تازه کلم تهیه شدند. دیسک‌های برگی به مدت یک دقیقه در ۱۰ میلی‌لیتر از هر یک از تراکم‌های اصلی سوسپانسیون جدایه‌های قارچ قرار داده شدند. برگ‌ها پس از خشک شدن داخل پتری‌های پلاستیکی (قطر ۸ سانتیمتر) قرار گرفتند و در نهایت روی هر برگ ۲۰ عدد لارو سن سوم بید کلم قرار داده شدند. پتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. مرگ و میر لاروها پس از ۷ روز شمارش گردید. در صورت نیاز هر ۴۸ ساعت یک بار برگ‌های تازه کلم جایگزین دیسک‌های برگی آغشته می‌شدند. هر ۲۴ ساعت یک‌بار لاروهای مرده جداسازی شدند و برای اطمینان از مرگ و میر مشاهده شده در اثر قارچ بیمارگر، هر لارو مرده به طور جداگانه برای رشد قارچ بیمارگر داخل پتری پلاستیکی قرار گرفت و پس از گذشت مدت زمان ۱۰ روز، ساختارهای قارچی تشکیل یافته روی بدن آن مورد بررسی قرار گرفت. برای سنتز نانوکامپوزیت-قارچ، موثرترین ایزوله (AM111) انتخاب گردید. در آزمایش‌های مربوط به زیست‌سنجی نانو-قارچ *Metarhizium anisopliae*@Fe_3O_4، ۰/۱ گرم از هر نانوکامپوزیت در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به همراه توئین ۸۰ (۰/۰۲ درصد) ریخته شد. سپس فرصت داده شد تا آب کافی جذب گردد و محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد و پس از پراکنش کامل نانوکامپوزیت‌ها در آب مقطر، برگ‌های تازه کلم به مدت یک دقیقه در محلول‌های حاصل غوطه‌ور شدند و پس از تبخیر آب از سطح برگ‌ها ۲۰ عدد لارو سن سوم روی برگ‌ها قرار داده شدند. مرگ و میر لاروها پس از هفت روز شمارش گردید. محدوده تراکم‌ها برای لاروهای سن سوم قرار گرفته در معرض برگ‌های غوطه‌ور شده در نانو-قارچ جدایه AM111 10^{2}-10^{6} کنیدی در میلی‌لیتر بود. هر تیمار سه تکرار داشت.

بررسی اثر دورکنندگی قارچ و نانو-قارچ *Metarhizium anisopliae*@Fe_3O_4 در مقابل لارو سن سوم بید کلم

برای تعیین **اثر** دورکنندگی قارچ و نانو-قارچ *Metarhizium anisopliae*@Fe_3O_4 در مقابل لارو سن سوم بید کلم از روش Khorrami *et al.* (2018) استفاده شد. یک طرف از برگ کلم از خط میانی برگ در ۱۰ میلی‌لیتر از غلظت 10^{3} کنیدی در میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچ مورد نظر به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور گردید و پس از خشک شدن برگ در محیط آزمایشگاه، از قسمت دیگر برگ به عنوان شاهد استفاده شد و برای تیمار نیمه شاهد برگ تنها از آب مقطر و توئین ۸۰ استفاده گردید. پس از خشک شدن کامل برگ، آن به پتری پلاستیکی هشت سانتیمتری انتقال داده شد که کاغذ صافی مرطوب جهت تامین رطوبت در کف آن قرار داده شده بود. سپس، ۲۰ عدد لارو سن سوم با قلم‌مو به وسط برگ منتقل گردیدند و میزان دور کنندگی ایزوله قارچی برای لارو سن سوم پس از گذشت مدت زمان ۷۲

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]

ساعت بررسی شد. معیار دورکنندگی بر اساس تعداد لاروهای نفوذ کرده در هر نیمه برگ کلم بود. در آزمایش‌های مربوط به دورکنندگی نانو–قارچ *Metarhizium anisopliae*@Fe_3O_4، ۰/۱ گرم از نانوکامپوزیت در غلظت 10^3 کنیدی در میلی‌لیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به همراه توین ۸۰ (۰/۰۲ درصد) ریخته شد. شرایط آزمایش طبق روش توصیف شده در بالا انجام شد. هر آزمایش سه بار تکرار گردید.

استخراج آنزیم پروتئاز Pr1

اندازه‌گیری مقدار پروتئین پیرو روش Bradford (۱۹۷٦) انجام گردید و از تراکم‌های مختلف پروتئین سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد. جهت تهیه عصاره آنزیمی لاروهای تیمار شده با سوسپانسیون قارچی از کوتیکول لاروی، ابتدا پوست لارو از بدن لارو جدا و با شستشو در بافر فسفات (pH 7.0) به داخل آون با دمای ۷۰ درجه جهت خشک شدن منتقل گردید و کوتیکول خشک شده با هاون چینی کاملاً پودر شد. جهت تهیه فَرماند (سوپرناتانت) آنزیمی مقدار مشخصی از کوتیکول خشک شده به محیط کشت PDA جامد ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچی با تراکم ۵۰ درصد تراکم کشنده به مخلوط افزوده شد. بعد از گذشت هشت روز، در سانتریفیوژ با ۸۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و فَرماند به عنوان منبع آنزیم در آزمایش‌ها به کار گرفته شد. سنجش این آنزیم پیرو روش St Leger و همکاران (۱۹۸۷) انجام شد. جهت تهیه عصاره آنزیمی در تیمارهای قارچ و شاهد به ترتیب از لاروهای سن سوم بید کلم تغذیه کرده از برگ‌های کلم غوطه‌ور شده در سوسپانسیون LC_{50} قارچ و آب مقطر استفاده شد. برای آنزیم پروتئاز Pr1 از سوبسترای N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide استفاده گردید. پنجاه میکرولیتر از سوبسترا با غلظت نهایی ۰/۱ میلی مولار (حل شده در بافر تریس) با ۸۵۰ میکرولیتر از بافر تریس ۲۰ میلی مولار با pH 8.5 مخلوط شده و ۱۰۰ میکرولیتر فرماند آنزیمی به آن افزوده شد. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و واکنش با اضافه کردن ۲۵۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۰ درصد خاتمه یافت. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه داخل هر چاهک پلیت ۹٦ تایی افزوده شد و جذب نوری با سه تکرار برای تیمارهای قارچ و شاهد در طول موج ٤۰۵ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر مدل Synergy HT ساخت شرکت BioTek ثبت گردید. از ضریب جذب مولی ۸۸۰۰ برای محاسبه غلظت نهایی پارانیتروآنیلین آزاد شده استفاده گردید (Gupta *et al*. 1992).

تجزیه داده‌ها

برای تعیین مقادیر LC_{50} و LC_{25} داده‌های مربوط به زیست‌سنجی از روش پروبیت در نرم افزار SPSS version 16 استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از روش T-test استفاده گردید. نمودارها نیز با استفاده از نرم افرار 2007 EXCEL رسم شدند.

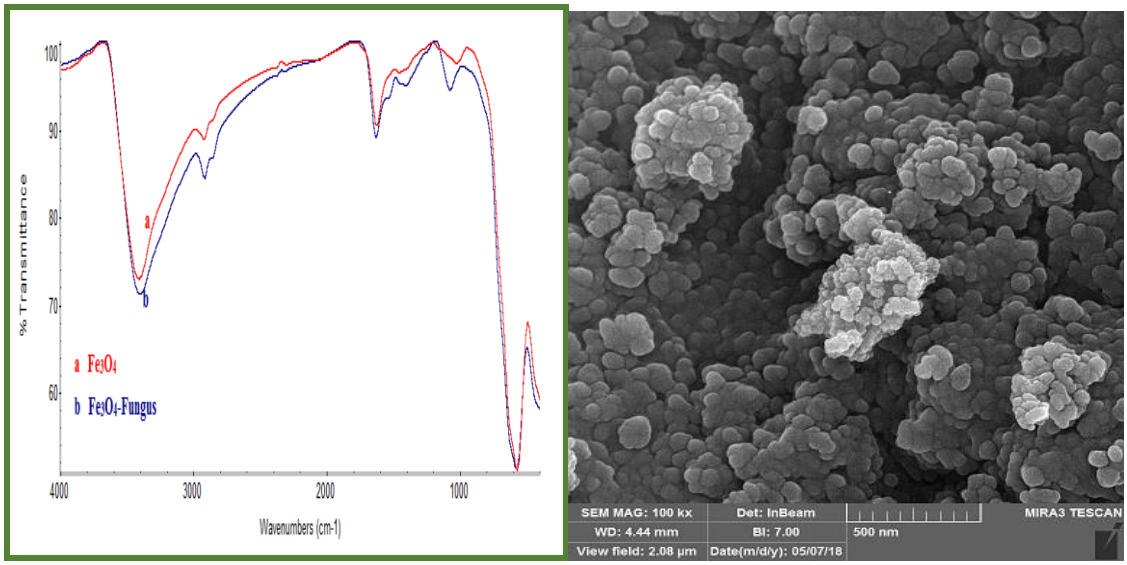
نتایج

برای اثبات نانو–قارچ سنتز شده از دستگاه‌های FT-IR و SEM استفاده گردید و سمیت و دورکنندگی قارچ و نانو–قارچ *M. anisopliae* روی لارو سن سوم بید کلم بررسی و مقایسه شد. همچنین میزان واحد فعالیت آنزیم ویژه پروتئاز Pr1 در قارچ و شاهد اندازه‌گیری و مقایسه گردید.

طیف‌سنجی مادون قرمز (شکل۱، منحنی a) Fe_3O_4 به وضوح یک باند جذبی را در ۳٤۱۵/۳۳ cm^{-1} نشان می‌دهد که مربوط به ارتعاشات کششی گروه هیدروکسیل (O-H)

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]

موجود روی سطح نانوذره یا آب جذب شده در نمونه می‌باشد. ارتعاشات خمشی گروه H-O-H نیز در ۱۶۲۷/۶۵ cm^{-1} واقع شده است. باند جذبی در اطراف ۱۰۲۷/۲۴ cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه C-C-C است. طیف‌های FTIR ذکر شده در بالا موید وجود ناخالصی‌های ارگانیک در طول آماده‌سازی نمونه می‌باشند. علاوه بر این، دو باند جذبی در ۵۷۱/۹ cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کمپلکس‌های تتراهیدرالی است که حاکی از تشکیل ساختار هیدروکسید آهن می‌باشد. منحنی b که مربوط به نمونه Fe_3O_4@Fungus است، ارتعاشات کششی را در ۱۴۴۷/۵۳cm^{-1} (C-N) نشان می‌دهد و یک باند پهن اطراف ۳۴۰۳cm^{-1} (O-H و N-H) مربوط به دیواره قارچ است. با مقایسه طیف‌های FTIR مربوط به Fe_3O_4 (منحنی a) و Fe_3O_4@Fungus (منحنی b) در شکل ۱ به وضوح می‌توان حضور قارچ در اطراف Fe_3O_4 را با توجه به پیک‌ها اثبات نمود.تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به نانوکامپوزیت Fe_3O_4@Fungus نشان می‌دهد که نانوکامپوزیت سنتز شده دارای ریخت‌شناسی منظمی است (شکل ۱).



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی Fe_3O_4@fungus (راست) و طیف‌سنجی مادون قرمز Fe_3O_4 (a) و Fe_3O_4@fungus (b) (چپ)

Figure 1- Scanning electro-micrograph of Fe_3O_4@fungus (right) and FT-IR spectra of Fe_3O_4 (a) and Fe_3O_4@fungus (b) (left)

به هر حال، متوسط اندازه ذرات کریستالی بر اساس تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، زیر ۴۰ نانومتر است. این مورد نشان می‌دهد که نانو ذرات Fe_3O_4 سنتز شده‌اند و در قسمت داخلی ساختار قارچ بیمارگر قرار گرفته‌اند. آنالیز پراش انرژی پرتو ایکس نشان داد که تنها عناصر C، O و Fe به ترتیب با فراوانی نسبی ۲/۰۳، ۳۳/۲۸ و ۶۴/۶۹ درصد در نانوکامپوزیت وجود دارند.مقادیر غلظت کشنده دو جدایه *M. anisopliae* AM111 و *M. anisopliae* AH112 به ترتیب برابر $۱۰^{۶}$ × ۱/۹ و $۱۰^{۷}$ × ۱/۷ کنیدی در میلی‌لیتر بودند (جدول ۱) که با توجه به موثرتر بودن *M. anisopliae* AM111، نانوکامپوزیت این جدایه قارچ بیمارگر سنتز گردید. غلظت کشنده *M. anisopliae* (AM111)@Fe_3O_4 برابر $۱۰^{۴}$ × ۲/۵ کنیدی در میلی لیتر تعیین شد که نشانگر کاهش غلظت مورد نیاز قارچ برای دستیابی به غلظت کشنده لاروهای بید کلم بود (جدول ۱).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]

جدول ۱-سمیت جدایه‌های AM111 و AH112 از قارچ *Metarhizium anisopliae* برای لاروهای سن سوم بید کلم در شرایط آزمایشگاهی

Table 1-Toxicity of two entomopathogenic fungi isolates of *Metarhizium anisopliae* (AM111 and AH112) and *Metarhizium anisopliae*@Fe_3O_4 to the 3rd instar larva of *Plutella xylostella* under laboratory conditions

Fungal treatment	LC_{25} (conidia/ml)	LC_{50} (conidia/ml)	LC_{90} (conidia/ml)	Slope ± S.E.	χ^2 (df)
*M. anisopliae*AM111	1.4×10^4 (1.1×10^3-6.1×10^4)	1.9×10^6 (6.5×10^5-6.5×10^6)	2.00×10^{10} (1.4×10^9-3.3×10^{12})	3.84 ± 0.05	1.58 (3)
*M. anisopliae*AH112	1.6×10^5 (1.6×10^4-6.5×10^5)	1.7×10^7 (6.2×10^6-5.5×10^7)	1.2×10^{11} (1.0×10^{10}-1.2×10^{13})	3.67 ± 0.04	1.00 (3)
Metarhiziumanisopliae (AM111)@Fe_3O_4	2.6×10^2 (3.2×10^1-9.5×10^2)	2.5×10^4 (9.3×10^3-8.3×10^4)	1.4×10^8 (1.2×10^7-1.4×10^{10})	4.67 ± 0.08	1.53 (3)

95% fiducial limit (FL) is shown in parenthesis LC: lethal concentration

مقایسه میانگین دورکنندگی *M. anisopliae* AM111 و *M. anisopliae* AM111@Fe_3O_4 در مقابل لاروهای سن سوم بید کلم نشان دهنده تفاوت معنی‌داری بین دورکنندگی دو ترکیب مورد آزمایش در مقابل لاروهای آفت بود به طوری که نانوکامپوزیت به طور معنی‌داری دور کنندگی بالاتری را نسبت به قارچ فرموله نشده نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲-مقایسه دورکنندگی تیمارهای *Metarhizium anisopliae* AM111 و نانو-قارچ *Metarhizium anisopliae*@Fe_3O_4 علیه لاروهای سن سوم بید کلم ۷۲ ساعت پس از تیمار در شرایط آزمایشگاهی

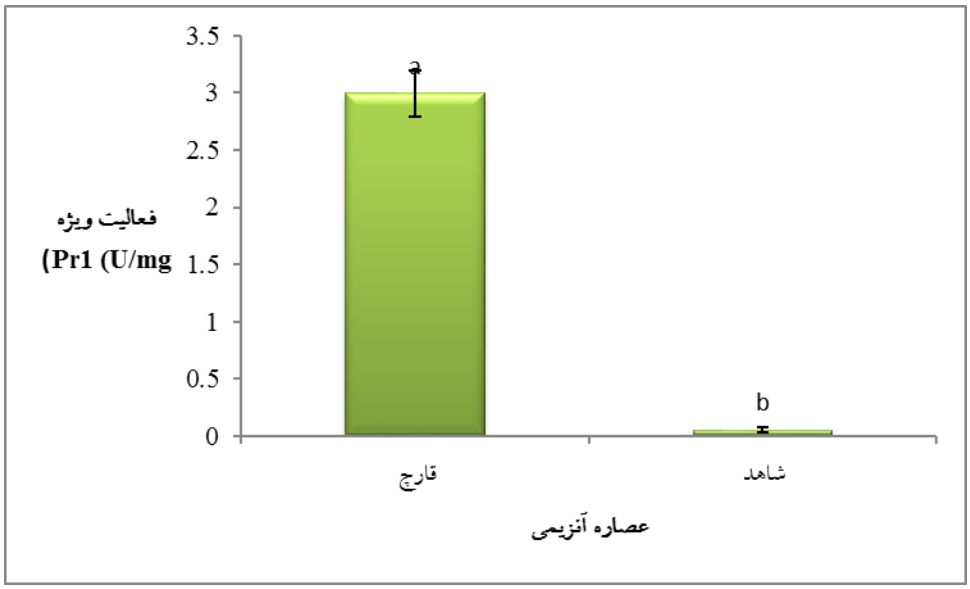
Table 2-Comparison of the repellencies caused by the treatments with *Metarhizium anisopliae* (AM111) and *Metarhizium anisopliae*@Fe_3O_4 against the 3rd instar larva of *Plutella xylostella* after 72 h after treatment under laboratory conditions.

Treatment	Concentration (conidia/ml)	% Repellency ± S.E
Metarhizium anisopliae isolate AM111	1.0×10^3	69.00 ± 0.57
Metarhizium anisopliae AM111@Fe_3O_4	1.0×10^3	74.66 ± 0.88*

*: statistically significant difference ($P < 0.05$).

مقایسه واحد فعالیت آنزیم ویژه پروتئاز Pr1 (در pH بهینه) نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمار قارچ و شاهد (بدون اعمال قارچ) وجود دارد. میزان واحد فعالیت آنزیم ویژه پروتئاز Pr1 در قارچ و شاهد به ترتیب ۲/۹۹٤ و ۰/۰۵۱ واحد آنزیمی در میلی‌گرم به دست آمد که نشان از فعالیت بالای این آنزیم در تیمار قارچی می‌باشد (شکل۲). مقدار بالای آنزیم ویژه پروتئاز Pr1 نشان دهنده قدرت بیماریزایی قارچ *M. anisopliae* در مقابل بید کلم و در نتیجه بروز اثرات کشندگی بوده است و نقش ویژه این آنزیم را در طول فرآیند آلودگی لاروهای بید کلم مشخص می‌نماید. همچنین نقش ویژه این آنزیم را در فرآیند نفوذ قارچ *M. anisopliae* به داخل بدن لاروهای بید کلم اثبات می‌کند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]



شکل ۲–فعالیت ویژه پروتئاز Pr1 در لارو سن سوم بید کلم با سه تکرار (حروف غیر مشابه در هر ستون نمایانگر وجود اختلاف بسیار معنی‌دار میانگین‌ها با سطح احتمال خطای آماری ۱ درصد است).

Figure 2- Pr1 activity (columns with the different letters are highly significantly different ($p< 0.01$))

بحث

قارچ *M. anisopliae* به عنوان قارچ بیماری‌زای حشرات، نقش مهمی در تعیین مدل‌های پایدار مهار زیستی آفات ایفا کرده است (Foster *et al*. 2000). عمده مطالعات پایه در زمینه بیماری‌زایی، مکانیسم‌های بیوشیمیایی، فرمولاسیون، کاربرد عملی با شناخت و بررسی بر روی این قارچ آغاز گردیده است. تاکنون نیز مطالعات گوناگونی روی این قارچ انجام شده و در برخی از کشورها اقدام به ساخت فرمولاسیون تجاری آن گردیده است (Defaria and Wraight, 2007). تحقیق Thumbi (۲۰۰۲) در بررسی کارایی قارچ *M. anisopliae* روی *P. xylostella* L. نشان داد که این قارچ علیه لارو سن دوم و سوم به ترتیب در دوز ۸/۹×۱۰^{۵} و ۳/۲×۱۰^{۶} کنیدی/میلی لیتر خاصیت بیمارگری بالایی بعد از گذشت ۵ روز دارد. در تحقیق دیگری Godonou و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی توانایی ایزوله‌های مختلف قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *M. anisopliae* در کنترل *P. xylostella* پرداختند و نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که ایزوله‌های هر دو قارچ مذکور توانایی بالایی در کاهش جمعیت آفت نشان می‌دهند. در تحقیق دیگری Valda و همکاران (۲۰۰۳) نیز توانایی بیماری‌زایی ایزوله‌های مختلف قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* را روی لاروهای سن دوم *P. xylostella* آزمایش کردند و گزارش نمودند که تمامی ایزوله‌های این دو قارچ در غلظت ۱۰^{۸} کنیدی/میلی لیتر کشندگی بالای ۷۰ درصد را ایجاد می‌کنند. ایزوله‌های مختلف قارچ *M. anisopliae* و *Nomuraea rileyi* به روش غوطه‌ورسازی توسط Jun (۲۰۰۰) علیه لارو سن سوم *P. xylostella* مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این محقق نشان داد که ایزوله F11248 از قارچ *M. anisopliae* با غلظت کشنده ۲/۰۳×۱۰^{۴} کنیدی/میلی لیتر پس از گذشت مدت زمان ۹ روز بیشترین تاثیر را داشته است. نتایج این محققین با نتایج تحقیق حاضر در موثر بودن قارچ *M. anisopliae* علیه *P. xylostella* مطابقت دارد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]

جاذب‌های مغناطیسی با ابعاد نانو در مقایسه با جاذب‌های مرسوم با ابعاد میکرونی دارای مزایای زیادی هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به این موارد اشاره کرد: جداسازی مغناطیسی سریع جاذب و نیاز به جاذب کمتر؛ سطح و راندمان بالای استخراج نانوذرات و سنتز ساده جاذب در آزمایشگاه. کاربردهای این علم در زمینه علوم و صنایع غذایی و ظرفیت بالای نانو ذرات مغناطیسی در این زمینه مرور و بررسی شده‌اند (Faraji and Fadavi 2013). در مطالعه‌ای Mohseni Bandpei و همکاران (۲۰۱۵) از Fe_3O_4 در ساخت لوله‌های کربنی مغناطیسی استفاده کردند و به این طریق میزان جذب دیازینون از محلول‌های آبی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که نانو لوله‌های کربنی مغناطیسی شده با Fe_3O_4 می‌تواند به عنوان جاذب مناسبی برای حذف دیازینون از محیط‌های آبی باشد. در تحقیق دیگری Rostamnia و همکاران (۲۰۱۵) ترکیب نانوکامپوزیت کاراگینان را با استفاده از Fe_3O_4 سنتز کرده‌اند. آنالیزهای مربوطه در تحقیق ایشان نشان از موثر بودن این کاتالیست نانومغناطیسی داشته است که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

مطالعه روی ترکیبات نانو-قارچ محدود بوده و تنها Sabbour (۲۰۱۵) اشاره به عملکرد بالای ترکیبات نانو-قارچ‌های *Isaria fumosorosea* و *M. flavoviridae* علیه بید سیب زمینی *Phtorimaea operculella* داشته است. در تحقیق این محقق به نحوه آماده کردن فرم نانو-قارچ‌های مذکور اشاره‌ای نشده است، اما می‌توان تاثیر بالای فرم نانو شده قارچ‌های بیمارگر حشرات را هم‌سو با تحقیق حاضر دانست.

در تحقیقی Mburu و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که ایزوله‌های قارچ *M. anisopliae* خاصیت دورکنندگی روی حشرات (موریانه‌ها) دارند. نتایج این محققین در دارا بودن خاصیت دور کنندگی قارچ مذکور با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

با توجه به اینکه ۷۰ درصد کوتیکول حشرات را پروتئین تشکیل می‌دهد، فعالیت آنزیم پروتئاز نقش مهمی در نفوذ به میزبان دارد. از آنجا که پروتئازها نقش ویژه‌ای در فرآیند نفوذ قارچ‌ها دارند (Charnley, 2003)، پروتئاز Pr1، آنزیم اصلی تولید شده توسط قارچ‌های بیمارگر حشرات در طول فرآیند آلودگی است. بنابراین، این آنزیم می‌تواند قدرت بیماری‌زایی قارچ را در طول فرآیند آلودگی لاروهای بید کلم آلوده مشخص نماید. در ارتباط با آنزیم‌های دخیل در پروسه بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر حشرات نظر بر این است که سطح فعالیت آنزیم پروتئاز Pr1 نشان دهنده توانایی قارچ در ایجاد بیماری است (St Leger *et al.* 1988). در تحقیقی Ali و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی قارچ *Iseria fumosoroseus* علیه شب پره پشت الماسی به این نتیجه رسیدند که آنزیم‌های پروتئاز Pr1 بیشترین نقش را در بیماری‌زایی قارچ داشته‌اند. در تحقیق دیگری نیز Bye and Charnley (2008) ایزوله‌های مختلف قارچ *Lecanicillium* spp. را روی ملخ و شته هلو بررسی کردند و نشان دادند که پروتئازها خصوصا آنزیم پروتئاز Pr1 نقش عمده‌ای در نفوذ قارچ به بدن این حشرات داشته است. در تحقیق حاضر نیز اختلاف معنی‌داری در سطح فعالیت آنزیم پروتئاز Pr1 در نمونه قارچی در مقایسه با شاهد مشاهده شد که با نتایج محققان فوق مطابقت دارد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]

منابع

Ahmad T, Ali H, Ansari S. 2008. Biology of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linn.) on *Brassica juncea* cv. PUSA BOLD. Asian journal of Bio science 2: 260-262.

Ali SH, Huang Z, Ren SH. 2009. Production and regulation of extracellular proteases from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroseus* (Cordycipitaceae; Hypocreales) in the presence of diamondback moth, *Plutella xylostella* cuticle. Biocontrol Science and Technology 19(5): 523-535.

Berry CC, Curtis ASG. 2003. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. Journal of Physics D: Applied Physics 36: 198-206.

Bidochka MJ, Kamp AM, Lavender TM, Dekoning J, Croos NJA. 2001. Habitat association in two genetic groups of insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? Applied and Environmental Microbiology 67: 1335-1342.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Bye NJ, Charnley AK. 2008. Regulation of Cuticle Degrading Subtilisin Proteasesfrom the Entomopathogenic Fungi, *Lecanicillium* spp.: Implications for Host Specificity. Archives of Microbiology 189: 81-92.

Cao M, Wang J, Li Z, Ge W, Yue T, Li R, Colvin VL, Yu WW. 2012. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. Trends in Food Science and Technology 27:47-56

Charnley AK. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. Advances in Botanical Research 40: 241- 321.

De Groot M, Winkler K, Potting R. 2005. Testing the potential of White mustard (*Sinapisalba*) and Sweet alyssum (*Lobularia maritima*) as trap crops for the Diamondback moth *Plutella xylostella*. Proceedings of the Netherlands Entomological. Society, Meeting, 16.

Defaria MR, Wraight SP. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control 43(3): 237-256.

Dezianian A, Sajap AS, Lau WH, Omar D, Kadir HA, Mohzmed R, Yusoh MRM. 2010. Morphological characteristics of *P. xylostella* Granulovirus and effects on its larval host diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: plutellidae). American Journal of Agricultural and Biological Sciences 5(1): 43-49.

Duarte RT, Gonçalves KC, Espinosa DJ, Moreira LF, De Bortoli SA, Humber RA, Polanczyk RA. 2016. Potential of entomopathogenic fungi as biological control agents of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and compatibility with chemical insecticides. Journal of Economic Entomology 109(2):594-601.

Faraji M, Fadavi Gh. 2013. Application of nanoparticles in food science and technology. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology 8(2): 239-252 (In Farsi with English abstract).

Faraji M, Yamini Y, Rezaee M. 2010. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. Journal of the Iranian Chemistry Society 7:1-37.

Foster S, Denholm I, Devonshire A. 2000. The ups and downs of insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*) in the UK. Crop Protection 19(8): 873-879.

Godonou I, James B, Atcha-Ahowé C, Vodouhe S, Kooyman C, Ahanchédé A, Korie S. 2009. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). Crop Protection 28(3): 220-224.

Gupta SC, Leaters TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM. 1992. Insect cuticle degrading enzymes from the entomogenous fungus *Baeuveria bassiana*. Experimental Mycology 16: 132-137.

Jun MA. 2000. Laboratory susceptibility of *Plutella xylostella* to *Metarhizium anisopliae* and *Nomuraea rileyi*. Insect Science 7(1):53-7.

Khorrami F, Valizadegan O, Forouzan M, Soleymanzade A. 2018. The antagonistic/synergistic effects of some medicinal plant essential oils, extracts and powders combined with Diatomaceous earth on red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). Archives of Phytopathology and Plant Protection doi:10.1080/03235408.2018.1458412.

Mburu DM, Ndung`u MW, Maniania NK, Hassanali A. 2011. Comparison of volatile blends and gene sequences of two isolates of *M. anisopliae* of different virulence and repellency towards the termite; *Macrolermes michealsoni*. Journal of Experimental Biology 214: 956-962.

Mohseni Bandpei A, Fattahzadeh M, Kalantary RR, Eslami A. 2015. Evaluation of Diazinon adsorption from water solutions using magnetic carbon nano-tubes with Fe_3O_4. Journal of Environmental Health Enginering 4:283-293 (In Farsi with English abstract).

Osaka T, Matsunaga T, Nakanishi T, Arakaki A, Niwa D, Iida H. 2006. Synthesis of magnetic nanoparticles

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]

and their application to bioassays. Analytical and Bioanalytical Chemistry 384: 593-600.

Rostamnia S, Zeynizadeh B, Doustkhah E, Baghban A, Aghbash KO. 2015. The use of κ-carrageenan/Fe3O4 nanocomposite as a nanomagnetic catalyst for clean synthesis of rhodanines. Catalysis Communications 5(68): 77-83.

Sabbour MM. 2015. The toxicity effect of nano fungi *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium flavoviride* against the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller). American Journal of Biology and Life Science 3(5): 155-160.

Saeed R, Sayyed AH, Shad SA, Zaka SM. 2010. Effect of different host plants on the fitness of diamond-back moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Crop Protection 29, 178-182.

Schuler TH, Emden HF. 2000. Resistant cabbage cultivars change the susceptibility of *plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis*. Agricultural and Forest Entomology 2: 33-38.

St. Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM. 1987. Characterization of cuticle degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. Archives of Biochemical and Biophysiology 253: 221-232.

St. Leger RJ, Durrands PK, CharnleyAK,Cooper RM. 1988. Role of Extracellular Chymoelastase in the Virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. Journal of Invertebrate Pathology 52: 285-293.

St. Leger RJ, Goettel MS, Roberts DW, Staples RC. 1991. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 58: 168-179.

Tajick Ghanbalani MA, Asgharzadeh A, Hadizadeh AR, Mohammadi Sharif M. 2009. A quick method for *Metarhizium anisopliae* isolation from cultural soils. American Journal of Agricultural and Biological Science 4(2): 152-155.

Thumbi DK. 2002. Evaluation of native isolates of *Basillus thuringiensis* and *Metarhizium anisopliae* for the control of *plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Doctoral dissertation. Kenyatta University. 83p.

Valda, CAS, Reginaldo B, Edmilson JM, Jorge BT. 2003. Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to the Fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Neotropical Entomologist 32(4): 653-658.

Vilicinskas A, Matha V, Gotz P. 1997. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from wax moth, *Galleria mellonella*. Insect Physiology 43(12): 1149-1159.

Zhou L, Huang J, Xu H. 2011. Monitoring resistance of field populations of diamondback moth *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) to five insecticides in South China: A ten-year case study. Journal of Crop Protection 30: 272-278.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 2

Efficacy of two *Metarhizium anisopliae* isolates and nano-fungus *Metarhizium anisopliae*@Fe_3O_4 against Diamondback moth

Fereshteh Khorrami[*1], Youbert Ghosta[2], Khadijeh Ojaghi Aghbash[3], Asmar Soleymanzade[1], Maryam Forouzan[4]

1. Ph.D, Yong Researchers and Elite Club, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
2. Ph.D, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
3. Ph.D, Yong Researchers and Elite Club, Ajab Shir Branch, Islamic Azad University, Ajab Shir, Iran.
4. PhD, Plant Protection Research Department, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Urmia, Iran

Abstract

Diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (L.) is one of the most destructive insect pests of brassicaceous crops in Iran and throughout the world. Chemical pesticides play a key role in managing DBM, however, the adverse effects of chemical insecticides and the significant resistance of the pest to the broad range of synthetic insecticides has led to increased attention to the use of safe and eco-friendly components. Therefore, in this research we examined pathogenicity of two *Metarhizium anisopliae* isolates (AM111 & AH112) and synthesized *Metarhizium anisopliae* AM111@Fe_3O_4 against the 3rd instar larva of diamondback moth under laboratory conditions. Toxicity comparisons of nano-formulated fungus and non-formulated one demonstrated a significant decrease in the LC_{50} value of *Metarhizium anisopliae* AM111@Fe_3O_4 estimated as 2.5×10^4 conidia/ ml that exhibited nano-formulated fungus was more efficient against the pest. Mean comparisons of pure and formulated fungus repellencies showed that nano-fungus significantly was more repellent against the third instar larvae of DBM, so mean repellency values of non-formulated fungus and nano-fungus on 3rd instar larvae of DBM were equivalent to 69 and 74.66%, respectively. Also, in enzymatic study, protease Pr1 activity comparisons in optimal pH (=11) exhibited significant difference between control and fungal treatment and the most level of Pr1 activity was observed in fungal treatment. Pr1 activity levels in nano-fungus and non-formulated fungus treatments were equivalent to 2.994 and 0.051 mg/ml, respectively. Our results showed that nano-fungus was more effective on *P. xylostella* relative to pure-fungus and *Metarhizium anisopliae* AM111@Fe_3O_4 can be used as an efficient new component in integrated *P. xylostella* management.

Key words: *Plutella xylostella*, protease, bioassay, entomopathogenic fungus, nanotechnology

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.6.7]