

Evaluating the Efficacy of a Multicomponent Biopesticide with Calcium Nanoparticles in Controlling the Pest *Plodia interpunctella*

Alizadeh¹, F., Larypoor^{2*}, M. and Rahmani³, S.

Received Date: 28 October 2023

Accepted Date: 31 December 2023

(Research Article)

Abstract

Plodia interpunctella Indian moth is a very common warehouse pest in the world, which mainly feeds on stored food products, and in fact, it has been called the most important pest of stored products. Considering that the food stocks targeted by this pest are mainly grains, legumes, nuts, dried fruits, etc., so it causes great damage to the economy of countries and families. This study intends to investigate the effect of multi-component biological pesticide in the management and control of this pest. In this study, 480 third instar larvae of Indian moth were studied. After making a multi-component biological pesticide including *B. bassiana* and *M. anisopliae*, CaCO_3 , Thymol nanoparticles were tested by spraying on third instar larvae. The trend of increasing and decreasing mortality in the presence and absence of biological pesticide within 10 days of LT50 case was investigated and the biological composition was determined for each of the components. The studies showed that the use of biological composition had the lowest effective time $\text{LT}_{50}=4.28$ and the highest mortality rate of 100% within 10 days compared to the control group. The results showed that each of the substances tested alone can cause deaths and casualties in this pest. It was also found that the simultaneous use of these compounds in the form of a bio-pesticide causes a significant increase in casualties and the percentage of deaths and accelerates the effectiveness of the bio-pesticide.

Keywords: Biological pesticide, *Plodia interpunctella*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Trachyspermum ammi*, Calcium nanoparticles

1 and 2. MSc Graduated and Associate Professor, Respectively, Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

✉: Corresponding author

Email: m.larypoor@iau.ir

بررسی کارایی آفت کش زیستی چندجزئی به همراه نانوذرات کلسیم در کنترل آفت شب پره هندی

Evaluating the Efficacy of a Multicomponent Biopesticide with Calcium Nanoparticles in Controlling the Pest *Plodia interpunctella*

فاطمه علیزاده^{۱*}، محدثه لاری پور^۲ و شیما رحمانی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۰
(مقاله پژوهشی)

چکیده

شب پره هندی یک آفت انباری بسیار رایج در سطح جهان است که عمدتاً از محصولات غذایی ذخیره شده تغذیه می کند و در واقع یکی از مهم ترین آفت محصولات ذخیره شده نامیده شده است. با توجه به این که ذخایر مواد غذایی مورد هدف این آفت عمدتاً غلات، حبوبات، خشکبار و دانه های روغنی، میوه های خشک، ادویه جات، گندم و ذرت می باشد بنابراین لطمه بزرگی به اقتصاد کشورها و خانواده ها وارد می کند. این مطالعه در نظر دارد به بررسی اثر آفت کش زیستی چندجزئی در مدیریت و کنترل آفت بپردازد. در این مطالعه تعداد ۴۸۰ لارو سن سوم شب پره هندی مورد مطالعه قرار گرفت. پس از ساخت آفت کش زیستی چندجزئی (شامل بیوریا باسیانا و متاریزیوم/آنیزوپلیه، نانوذرات کلسیم کربنات، اسانس گیاه زنیان (تیمول) به روش پاشش روی لاروهای سن سوم آزمایش شد. روند افزایش و کاهش مرگومیر در حضور و عدم حضور آفت کش زیستی طی ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت و کمترین زمان اثرگذاری برای هر کدام از اجزا و ترکیبات به طور جداگانه تعیین گردید. بررسی ها نشان داد استفاده از ترکیب زیستی چندجزئی کمترین زمان اثرگذاری برابر با ۴/۲۸ روز و بیشترین درصد مرگومیر برابر با ۱۰۰ درصد را طی ۱۰ روز در مقایسه با گروه شاهد داشته است. نتایج نشان داد هر کدام از مواد مورد آزمایش به تنهایی می تواند باعث ایجاد مرگومیر و تلفات در این آفت شوند. همچنین مشخص گردید استفاده همزمان از این ترکیبات در قالب یک آفت کش زیستی باعث افزایش تلفات و درصد مرگومیر قابل توجه و سرعت بخشیدن به اثربخشی آفت کش زیستی می شود.

واژه های کلیدی: آفت کش زیستی، شب پره هندی، بیوریا باسیانا، متاریزیوم/آنیزوپلیه، زنیان، نانوذره کلسیم

۱ و ۲. به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی،

تهران، ایران

۳. استادیار حشره شناسی، گروه گیاه پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*: نویسنده مسئول Email: m.larypoor@iaui.ir

مقدمه

محصولات انباری غذایی و صنعتی عموماً یکی از مهم‌ترین و پرارزش‌ترین اندوخته‌های کشورهای مختلف جهان می‌باشند که حفظ و حراست آن‌ها نیازمند تلاش فراوانی است. همچنین جمعیت جهان رو به افزایش است و تأمین غذا از اهمیت بالایی برخوردار است. هر ساله سهم قابل‌توجهی از محصولات کشاورزی در قاره‌های مختلف به‌علت حمله آفات و بیماری‌ها از دست می‌روند (Wang et al., 2024). آفات انباری با تغذیه از انواع محصولات کشاورزی زیان‌های قابل‌توجهی به اقتصاد کشورهای در حال رشد وارد می‌سازند و یکی از علت‌های عمده کاهش جدی پس از برداشت محصولات کشاورزی می‌باشند، به همین جهت جلوگیری یا به حداقل رساندن خسارات ناشی از آن‌ها می‌تواند نقش مؤثری در بهبود زندگی اجتماعی و اقتصاد کشورها داشته باشد (Pandit et al., 2022).

شب‌پره هندی (*Plodia interpunctella*) از شاخه بندپایان و خانواده پوزه بیدان (*pyralidae*) و سرده پلودیا می‌باشد و از مهم‌ترین آفت محصولات ذخیره شده نامیده شده است که معمولاً لارو این آفت در خانه، انبارها یا فروشگاه‌های حاوی غلات، حبوبات، آجیل، میوه‌ها، آب‌نبات‌ها و تنقلات یافت می‌شود (Sedehi et al., 2014).

در ایران نیز مطالعات انجام‌شده بر محدودیت‌ها و پیامدهای منفی روش‌های شیمیایی در مدیریت آفات انباری تأکید دارند (Sabbour, 2015).

در سال‌های اخیر، کاربرد فناوری نانو به‌عنوان رویکردی نوین و سازگار با محیط‌زیست در کنترل آفات موردتوجه قرار گرفته است. نانوذرات به دلیل سطح ویژه بالا و افزایش کارایی زیستی، توان بالقوه‌ای در بهبود مدیریت آفات انباری نشان

داده‌اند (Yaman et al., 2022; Noman et al., 2023). با توجه به محدود بودن پژوهش‌ها در این زمینه در ایران، انجام مطالعات بیشتر برای ارزیابی کارایی نانوذرات در کنترل آفات انباری ضروری به نظر می‌رسد. لاروها در داخل تار در مواد غذایی، تغذیه می‌کنند. این تار حاوی آگزویا است که بوی نامطبوعی در محصول ایجاد می‌کند (Mohandass et al., 2007). تخم‌های شب‌پره هندی سفید مایل به خاکستری به نظر می‌رسد و به طول حدود ۳/۷-۱/۷ میلی‌متر می‌باشد (Bayındır Erol et al., 2024). این حشره دارای پنج تا هفت سن لاروی است (Hasan et al., 2024). لاروها در یک پیله ابریشمی تبدیل به شفیره می‌شوند (Golzan et al., 2023). ویژگی بویایی قوی باعث می‌شود شب‌پره هندی به‌راحتی منابع غذایی مناسب برای تخم‌گذاری و رشد لاروها را پیدا کند. همچنین این آفت به‌دلیل سازگاری بالا با شرایط انباری و دامنه وسیع مواد غذایی مورد حمله، کنترل دشواری دارد و نقش مهمی در کاهش کیفیت و ایمنی ذخایر غذایی ایفا می‌کند (Liu et al., 2024). چرخه زندگی می‌تواند بین ۲۷ تا ۳۰۰ روز کامل شود. جفت‌گیری و تخم‌ریزی حدود سه روز بعد از ظهور حشره کامل اتفاق می‌افتد. هر حشره ماده در طول زندگی به نسبت کوتاه خود ۹۷ تا ۳۱۷ تخم می‌گذارد (Mantzoukas et al., 2024). بلوغ لارو بستگی به درجه حرارت و در دسترس بودن غذا دارد و می‌تواند بین ۲۰ تا ۷۰ روز طول بکشد. دوره زندگی این حشره از تخم تا ظهور حشره کامل، در شرایط مناسب حدود ۴۰ روز است و در سال ۲ تا ۵ نسل و یا بیشتر می‌تواند داشته باشد (Liu et al., 2024; Lahlali et al., 2022). در شکل ۱ مراحل مختلف زندگی این حشره نشان داده شده است.



شکل ۱: از چپ به راست مشاهده تخم، لارو، شفیره، شفیره در پیله و حشره کامل و چرخه زندگی شب‌پره هندی (Liu et al., 2024; IFAS, 2025)

Fig. 1: From left to right, the egg, larva, pupa, pupa in cocoon, and adult insect are seen in the life cycle of the Indian moth (Liu et al., 2024; IFAS, 2025)

تنظیم‌کننده رشد حشرات و ترکیبات تدخینی)، متیل‌بروماید و فسفین (به دو صورت ضدعفونی انبار و یا کاربرد مستقیم روی محصول) استفاده می‌شود که کارایی آن‌ها محدود است. این حشره‌کش‌ها باعث آلودگی آب و خاک می‌شوند و سلامت

روش‌های مدیریت آفات و حشرات شامل نظارت و مدیریت بهداشت محل نگهداری مواد غذایی است. در مقیاس بزرگ برای حفظ مواد غذایی از حشره‌کش‌های شیمیایی نظیر ارگانوفسفرها، پایریتروئیدها، خاک‌های دیاتومه (ترکیبات

ترکیبات شیمیایی یا حتی به صورت جایگزینی برای این ترکیبات علیه حشرات آفت به کار روند (Tudi et al., 2028). گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi*) از گیاهان دارویی در طب سنتی است و به عنوان نگهدارنده های طبیعی در مواد غذایی و همچنین در کنترل آفات و عوامل بیماری زای گیاهی استفاده می شود. این گیاه علفی و یک ساله از خانواده چتریان است. این گیاه از راسته کرفس سانان و تیره چتریان بوده و گل های سفید به صورت چتر مرکب، میوه کوچک و بیضوی شکل دارد (Kim et al., 2023). این گیاه به صورت خودرو در استان های مختلف ایران و نواحی مختلف اروپای مرکزی، هندوستان و مصر می روید. اسانس این گیاه غنی از مؤثرترین ترکیبات مثل تیمول است. در تجزیه گیاه زنیان ایرانی ترکیبات تیمول، سایمن، گاما، تربینن بتاپین و سابینن گزارش شده است (Imran et al., 2023; Akbari et al., 2021). نانوذرات به روش های شیمیایی و زیستی سنتز می شوند. روش های شیمیایی امکان کنترل بهتر اندازه و شکل ذرات را فراهم می کنند، در حالی که روش های زیستی به دلیل سازگاری بیشتر با محیط زیست و سمیت کمتر، کاربرد گسترده تری در کشاورزی دارند. نانوذرات به صورت تجاری در قالب پودر خشک، مایع یا به شکل سوسپانسیون و امولسیون در محیط های آبی یا آلی عرضه می شوند. اندازه نانوذرات معمولاً در هر سه بعد بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است که این ویژگی موجب افزایش سطح تماس، بهبود نفوذپذیری و افزایش کارایی آن ها در کنترل آفات می شود (Noman et al., 2023; Yaman et al., 2022). با استفاده از نانوذرات علیه آفات انباری آلودگی به میزان قابل ملاحظه ای کاهش می یابد (Vahedi et al., 2021). انواع نانوذرات فلزی آلومینیوم، سیلیس و روی و پلیمرهای مبتنی بر اکسید فلز و دی اکسید تیتانیوم برای مصارف کشاورزی در حال توسعه هستند و کاربرد فناوری در سطح نانو می تواند نقش مهمی در بهبود تکنیک های مدیریت محصولات موجود داشته باشد (Usta, 2024).

نانوکربنات می تواند قطر ذرات متوسط کمتر از ۱۰۰ نانومتر اطلاق می شود که می تواند به عنوان افزودنی در محصولات مختلف مورد استفاده قرار گیرد. افزودن نانوکربنات کلسیم می تواند موجب بهبود مقاومت مواد در برابر شرایط جوی، ضربه و تنش های مکانیکی شود و عملکرد آن ها را در شرایط دمایی شدید ارتقا دهد. کربنات کلسیم در آب نامحلول است و دارای فرمول شیمیایی CaCO_3 با وزن مولکولی ۰۹/۱۰۰، چگالی ۲/۹۳ گرم بر سانتی متر مکعب و نقطه ذوب ۸۲۵ درجه سانتی گراد می باشد (Al-Khayri et al., 2023). کربنات کلسیم در حوزه های مختلفی از جمله صنعت ساختمان، تولید، پزشکی

انسان، محیط زیست و حیوانات را به خطر می اندازد (Pourian et al., 2011). بهترین روش کنترل زیستی به معنی استفاده از پارازیتوئیدها، پرداتورها، پاتوژن ها، آنتاگونیست ها و یا میکروارگانیسم های رقیب برای کاهش جمعیت یک آفت است تا جمعیت آفت کاهش یابد و در نتیجه خسارات کمتری وارد شود (Huffaker, 2012). قارچ ها از مهم ترین آفت کش های زیستی حشرات می باشند که با تولید متابولیت های ثانویه فعال زیستی مانند پپتیدهای غیرریبوزومی آکالوئیدها، برای حشرات سمیت دارند (Fira et al., 2018). مکانیسم اثر این متابولیت ها به شکل زندگی ساپروفیتی روی کوتیکول حشره با ایجاد هاستوریوم و اختلال در تنفس حشره و دفاع خارجی میزبان در برابر موجودات قارچ خوار می باشد (Fira et al., 2018). همچنین قارچ ها زیست سازگار بوده و به چرخه طبیعت بر می گردند (Odelade et al., 2024).

قارچ *بیوریا باسیانا* (*Beauveria bassiana*) از خانواده *Cordycipitaceae* و راسته *Hypocreales* با کلنی سفید پشم مانند و پودری بر روی محیط کشت، پتانسیل خوبی برای کنترل آفات محصولات انباری مختلف دارد. کنیدی تک سلولی این قارچ شفاف، گرد تا تخم مرغی شکل است که به صورت انفرادی بر روی زواید کوچکی تشکیل می شوند و در هوا پراکنده می شود و از طیف گسترده ای از حشرات راسته های مختلف یافت و جدا شده است (Liu et al., 2023; Golzan et al., 2023). متابولیت های ثانویه حشره کش تولید شده با وزن مولکولی کم توسط این قارچ شامل بیوریسین (Beauvericin)، باسیانولید (Bassianolide)، باسیانین (Bassianin)، اکسالیکاسید (Oxalic acid)، اوسپورین (Oosporin)، تنلین (Tenellin) و بیوریولیدز (Beauveriolides) می باشند که در میان آن ها بیوریسین مهم ترین ترکیب است که برای اولین بار از قارچ *بیوریا باسیانا* گزارش شده است (Figuroa et al., 2024). متاریزیوم *آنیزوپلیه* (*Metarhizium anisopliae*) قارچ دیگری است که به عنوان عامل بیماری موسکاردین سبز حشرات می باشد و قارچی مهم در کنترل زیستی آفت محسوب می گردد. هاستوریوم این قارچ، با ترشح آنزیم هایی مانند کیتیناز پروتئاز و لیپاز به کوتیکول حشرات نفوذ می کند و قارچ را از بین می برد (Wang et al., 2021; Golzan et al., 2023). قارچ *متاریزیوم آنیزوپلیه* بر روی محیط کشت کلنی های سفید مایل به رنگ سبز زیتونی تشکیل می دهد (Zhao et al., 2023). مواد شیمیایی آلی فعال زیستی موجود در برخی از گیاهان نقش مهمی در کاهش بیماری ها، کنترل علف های هرز و افزایش عملکرد محصول در سراسر جهان دارند (Huang et al., 2023). حشره کش های گیاهی می توانند به طور متناوب با

و کشاورزی کاربرد دارد. با تولید این ماده در مقیاس نانو و کاهش اندازه ذرات، خواص فیزیکی و شیمیایی آن بهبود یافته و در نتیجه دامنه و کارایی کاربردهای آن به طور قابل توجهی افزایش یافته است. با کوچک شدن سایز ذرات سطح تماس آن ها افزایش خواهد یافت و تأثیرگذاری ماده معدنی به مراتب بیشتر می شود. می تواند کربنات فراوان ترین ماده معدنی موجود در طبیعت می باشد که دارای خواص شیمیایی و فیزیکی مختص خود می باشد (Gao et al., 2024).

اقتصادی بودن هزینه نانوکربنات، ایمنی بالای این ماده سازگاری با محیط زیست و ضد اسیدی بودن از جمله خواص و ویژگی های منحصر به فرد نانوذرات کربنات است. از این ماده می توان به عنوان سیستم رهاسازی پایدار برای نگهداری بار به مدت زمان طولانی در طبیعت استفاده نمود. در این تحقیق سعی بر آن شده است که مدیریت زیستی یا کنترل زیستی برای مبارزه با آفات گیاهی استفاده شود.

مواد و روش ها

طرح کلی پژوهش و منطق انتخاب تیمارها

این پژوهش به صورت آزمایشگاهی و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. هدف، مقایسه اثرات کشندگی اجزای منفرد (قارچ ها، تیمول و نانوذرات کلسیم کربنات) و ترکیب های دوجزئی، سه جزئی و چهارجزئی آن ها بر لارو سن سوم *Plodia interpunctella* بود. انتخاب اجزا براساس پیشینه پژوهشی کنترل زیستی آفات انباری و مکمل بودن مکانیسم های اثر (پاتوژنیسیته قارچی، سمیت گیاهی و اثرات فیزیکی شیمیایی نانوذرات) انجام شد. غلظت ها پس از آزمایش های مقدماتی، بررسی منابع معتبر و آزمون سازگاری بین اجزا انتخاب گردید تا هم اثرگذاری زیستی مناسب و هم عدم تداخل منفی بین اجزا تضمین شود.

پرورش و تهیه حشره پلودیا/اینترپونکتلا

حشرات کامل و لاروهای شب پره هندی از مرکز تحقیقات گیاه پزشکی کشور دریافت شد و در اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای 26 ± 1 درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد پرورش داده شدند. مقداری غذای مصنوعی (سبوس گندم ۸۰۰ گرم، عسل ۲۰۰ میلی لیتر، گلیسرول ۲۰۰ میلی لیتر، مخمر ۱۶۰ گرم) به همراه قطعات آجیل هایی نظیر پسته، گردو و تکه های خرما داخل ظروف پرورش حشره بعد از استریل کردن قرار داده شد (Bell & Walker, 1973). جهت تبادل اکسیژن و جلوگیری از تجمع

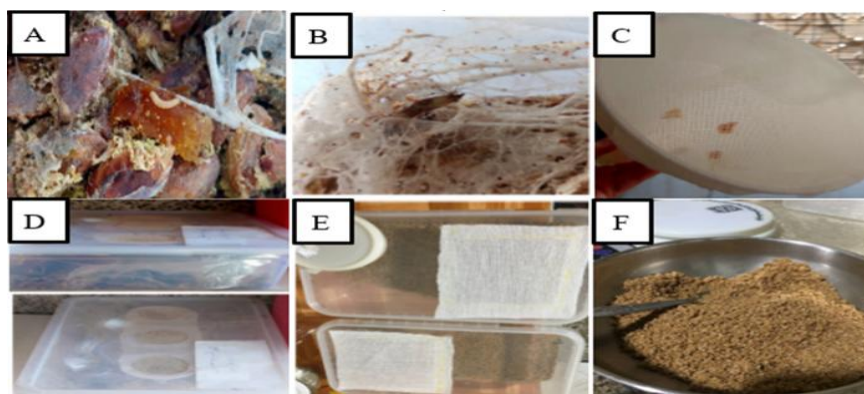
زیاد رطوبت در داخل ظروف در ظرف ها با پارچه توری دو لایه پوشانده شد. جهت جمع آوری تخم ها، انتهای یک قیف بزرگ را با تور دارای منافذ نسبتاً درشت (به جهت تهویه و عبور تخم ها) پوشانده و قسمت باریک و ابتدایی قیف با پنبه پوشانده شد. پروانه ها به صورت روزانه توسط آسپیراتور از ظروف پرورش جمع آوری شده و با برداشتن درپوش پنبه ای توسط لوله آسپیراتور به قیف منتقل شد. پروانه های بالغ داخل قیف جفت گیری کردند و تخم ها رها و از منافذ توری انتهای قیف عبور کرده و روی مقوای زیر قیف افتادند. در بازه زمانی یک روز در میان تخم ها جمع آوری شد و به ظروف پرورش منتقل شد. با هربار انتقال، روی ظرف پرورش تاریخ زده شد تا تخم های هم سن داخل یک ظرف پرورش باشند. بعد از گذشت حدوداً دو هفته لاروهای بیرون آمده از تخم ها به سن سوم رسیدند و جهت انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند. در شکل ۲ مراحل کار نشان داده شده است.

تهیه عصاره گیاهی

پودر گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi*) تهیه و عصاره آبی آن با خیساندن ۵۰ گرم پودر در ۱۵۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت تهیه شد. پس از صاف سازی، عصاره در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور تعیین غلظت مناسب تیمول و اطمینان از عدم اثر بازدارندگی آن بر رشد قارچ ها، آزمون دیسک دیفیوژن طبق استاندارد CLSI در غلظت های ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ پی پی ام انجام شد. نتایج نشان داد که غلظت ۷۰۰ پی پی ام فاقد اثر مهاري بر قارچ ها بوده و براساس مطالعات پیشین، بیشترین اثر حشره کشی را دارد؛ بنابراین این غلظت برای آزمایش های زیست سنجی انتخاب شد (Singh & Ahmad, 2017).

تهیه سوبه های قارچ

در این تحقیق از قارچ های *بیوریا باسیانا* IRAN441C و *متاریزیوم آنیزوپلیه* IRAN10180 استفاده شد که از مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور تهیه شد. سپس بانک کشت قارچ بر روی محیط های کشت پوتیتو دکستروز آگار و تریپتیک سوی آگار تهیه شد. جهت اطمینان از عدم آلودگی پلیت های حاوی کلنی قارچ و تأیید ساختارهای رویشی و زایشی قارچ ها تکنیک اسلاید کالچر انجام شد (Gutiérrez et al., 2024; Lei et al., 2022).



شکل ۲: مراحل آماده‌سازی حشرات جهت انجام آزمایش A) لارو (طول متوسط ۸-۱۰ میلی‌متر)، تخم (۰/۵-۰/۷ میلی‌متر) و تارهای تنیده شده روی مواد غذایی (مقیاس مشاهده شده ۱ سانتی‌متر) B) حشره بالغ C) قیف جمع‌آوری تخم حشره D) ظرف پرورش حشره E) تهیه لارو در غذای مصنوعی F) غذای مصنوعی

Fig. 2: Steps of insect preparation for experiment A) Larva (average length 8-10 mm), egg (0.5-0.7 mm) and webs woven on food (observed scale 1 cm) B) Adult insect C) Funnel for collecting insect eggs D) Insect breeding container E) Preparation of larvae in artificial food F) Artificial food

نانوذرات بدون اضافه کردن مایع رویی کشت جهت مقایسه نتایج تهیه شد (Narware et al., 2023).

زیست‌سنجی با عصاره گیاهی

برای انجام تیمار از طراحی آزمایش فاکتوریل استفاده شد. پس از انجام آزمایشات مقدماتی و تعیین محدوده غلظت (۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ پی‌پی‌ام) زیست‌سنجی با چهار تکرار انجام شد. طبق تست آنتی بیوگرام انجام شده، ثابت شد که تیمول در غلظت ۷۰۰ پی‌پی‌ام اثر بازدارندگی روی قارچ‌های بیوریا *باسیانا* و *متاریزیوم آنیزوپلیه* ندارد. همچنین طبق تحقیقاتی که قبلاً انجام شده غلظت ۷۰۰ پی‌پی‌ام بهترین اثرگذاری را در از بین بردن آفات انباری دارد. بنابراین غلظت ۷۰۰ پی‌پی‌ام از تیمول روی آفت *پلودیا اینتروپونکتلا* برای آزمایشات بعدی استفاده شد. برای هر تکرار روی تعداد ۱۰ عدد لارو سن سه به صورت هم‌زمان از ماده موردنظر اسپری شد. لاروهای تیمار شده به روی محیط غذایی استریل شده منتقل و در دمای ± 1 ۲۶ رطوبت نسبی ۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در ژرمیناتور نگهداری شدند. آماربرداری شامل تعیین تعداد لاروهای مرده تا ۱۱ روز پس از تیمار و تعداد لاروهای کاملاً سالم بود. زیست‌سنجی روی لارو سن سوم *پلودیا اینتروپونکتلا* در ۴ تکرار (در هر تکرار ۱۰ لارو داشتیم) طی مدت ۱۱ روز مورد بررسی قرار گرفت. هربار از جمعیت ۸۰ لارو استفاده شد (۴۰ لارو در گروه شاهد و ۴۰ لارو مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند). جمعیت لاروها در هر زیست‌سنجی ۳۲۰ عدد و کل جمعیت لاروهای مورد مطالعه ۱۹۲۰ عدد بود.

تهیه سوسپانسیون قارچی استاندارد

ابتدا اسپورها با سرم فیزیولوژی از سطح محیط کشت برداشته شد. سپس نمونه تهیه شده به لوله دارای ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حاوی ۰/۰۲ درصد توپین ۸۰ منتقل شد. سپس برای حذف میسلیم قارچ، از فیلتر یا پارچه توری سترون‌سازی شده با قطر منافذ یک میلی‌متر عبور داده شد. سپس برای استاندارد کردن غلظت سوسپانسیون قارچی به جهت انجام تست‌های زیست‌سنجی، محلول سولفات باریم، معادل با استاندارد نیم مکفارلند تهیه شد. سوسپانسیون‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر کدورت سنجی شدند (که نشان داد ۱۰ اسپور در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون وجود دارد). سوسپانسیون به عدد جذب (۰/۱۳-۰/۰۸) رسانده شد. سوسپانسیون‌های قارچی استاندارد به فاکون منتقل شدند و تا زمان استفاده در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند (Oliveira et al., 2015).

نانوذرات کلسیم کربنات

این نانوذرات از شرکت «آزما فن طب» تهیه شد و تست‌های تأییدی FTIR و SEM بر روی آن انجام شد. کشت‌های قارچی رشدیافته با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و به منظور سنتز نانوذرات، ۵۰ میلی‌لیتر از محلول آبی ۱ میلی‌مولار مربوطه با ۵۰ میلی‌لیتر از مایع رویی کشت قارچ مخلوط شد. مخلوط حاصل در یک فلاسک مخروطی ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید و pH محلول به ۸/۵ تنظیم شد. سپس فرایند سنتز تحت شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. کل مخلوط در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۰ آرپی‌ام به مدت ۷ روز در شرایط تاریک انکوبه شد. کنترل

زیست سنجی با قارچ بیوریا باسیانا و متاریزیوم آنیزوپلیه

برای برآورد میزان بیماری زایی قارچ های متاریزیوم آنیزوپلیه و بیوریا باسیانا از روش پاشش با اسپری استفاده شد، به این صورت که پس از تهیه غلظت نیم مک فارلند از هر کدام از قارچ ها، زیست سنجی با چهار تکرار انجام شد. در هر تکرار ۱۰ عدد لارو سن سوم با محلول سوسپانسیون استاندارد قارچی اسپری شدند. از آب مقطر حاوی ۰/۰۲٪ توپین ۸۰ درصد به عنوان شاهد استفاده شد. دورتادور پلیت با پارافیلیم بسته شد. پلیت ها در دمای 26 ± 1 و رطوبت نسبی 70 ± 3 و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در داخل ژرمیناتور نگهداری شدند. آماربرداری روزانه به مدت ۱۱ روز انجام گردید. آماربرداری شامل تعیین تعداد لاروهای مرده و زنده بود.

زیست سنجی با نانوذرات کلسیم کرینات

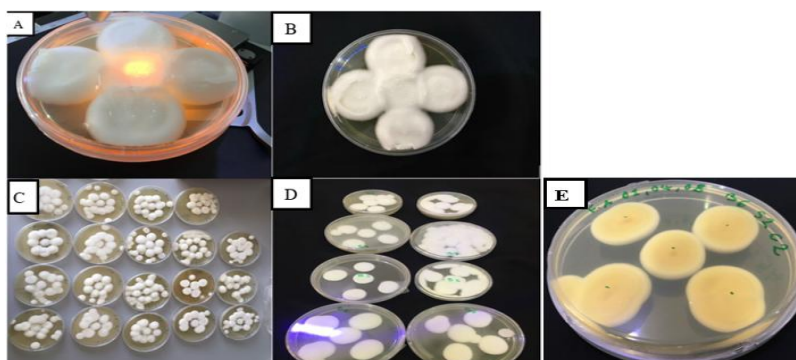
نانوذرات سنتز شده با قارچ های بیوریا باسیانا و متاریزیوم آنیزوپلیه در چهار تکرار روی لاروهای سن سوم پلودیا / اینترپونکتلا اسپری شدند. در هر تکرار ۱۰ عدد لارو سن سوم در گروه شاهد هم (محلول نانوذراتی که بدون اضافه کردن مایع

روی کشت قارچ ها سنتز شده بودند) روی لاروها اسپری شدند. برای جلوگیری از خطا تمام آزمایشات زیست سنجی ۴ بار تکرار شد.

نتایج

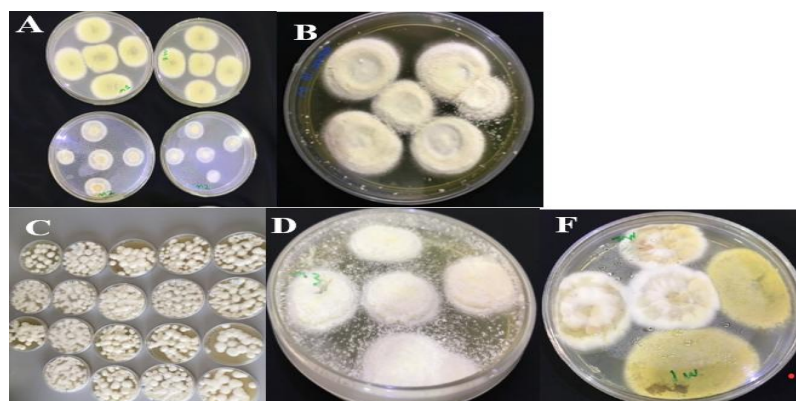
کشت قارچ بیوریا باسیانا

در شکل ۳ قسمت A و B و D قارچ های بیوریا باسیانا کشت شده روی محیط سابرو دکستروز آگار پس از گذشت ۷ روز را نشان می دهد. قسمت C کشت انبوه قارچ بیوریا باسیانا جهت تهیه سوسپانسیون استاندارد را نشان می دهد. قسمت E کلنی های زرد رنگ این قارچ را پس از دو هفته نشان می دهد. در شکل ۴ در قسمت A، B و D قارچ های متاریزیوم آنیزوپلیه کشت شده روی محیط کشت سابرو دکستروز آگار پس از گذشت ۷ روز نشان داده شده است. قسمت C کشت انبوه این قارچ را جهت تهیه سوسپانسیون استاندارد نشان می دهد. قسمت E کلنی متمایل به سبز متاریزیوم آنیزوپلیه را بعد از گذشت ۱۴ روز نشان می دهد.



شکل ۳: A, B, D) *Bioria bassiana* روی محیط سابرو دکستروز آگار C) کشت انبوه E) کلنی زرد بعد از گذشت ۱۴ روز (تصاویر با مقیاس تقریبی ۵۰ سانتی متر فاصله از نمونه ثبت شده)

Fig. 3: A, B, D) *Bioria bassiana* on Sabro dextrose agar medium C) Mass culture E) Yellow colony after 14 days (images with approximate scale 50 cm distance from recorded sample)



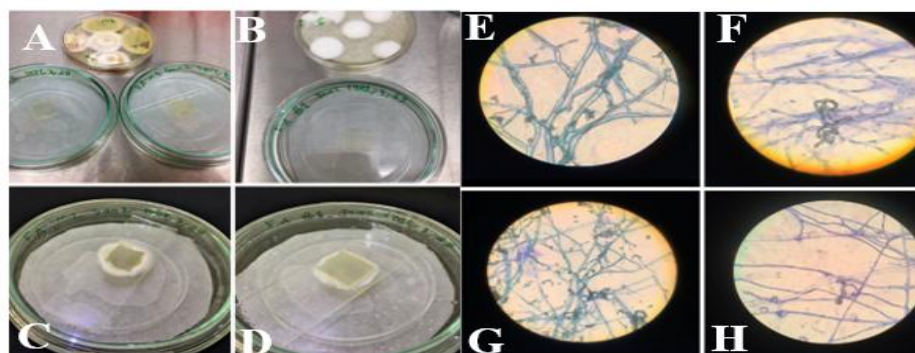
شکل ۴: A, B, D) *Metarhizium anisopliae* روی محیط سابرو دکستروز آگار C) کشت انبوه E) کلنی سبز بعد از گذشت ۱۴ روز (تصاویر با مقیاس تقریبی ۵۰ سانتی متر فاصله از نمونه ثبت شده)

Fig. 4: A, B, D) *Metarhizium anisopliae* on Sabro-dextrose agar medium C) Mass culture E) Green colony after 14 days (images at an approximate scale of 50 cm from the recorded sample)

ساختار زایشی و رویشی هر دو قارچ را تأیید می‌نماید. نتایج در شکل ۵ دیده می‌شود.

نتایج تکنیک کشت لام شیشه‌ای (اسلاید کالچر)

نتایج اسلاید کالچر کشت خالص قارچ را نشان می‌دهد و



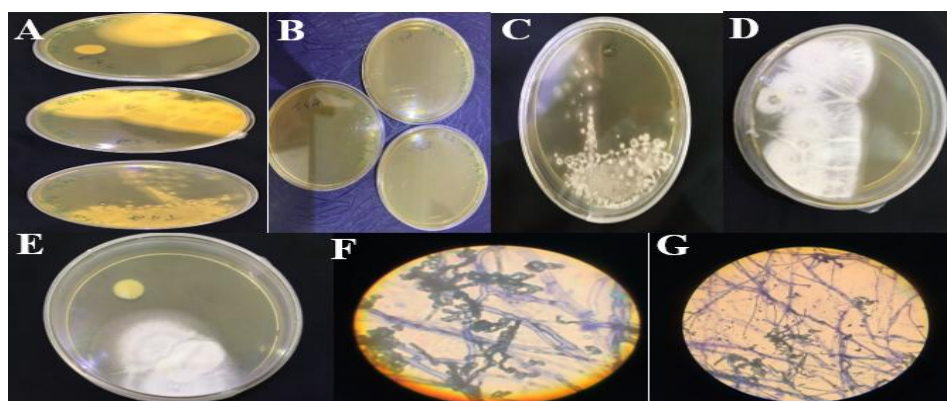
شکل ۵: (A) اسلاید کالچر متاریزیوم آنیزوپیل (B) اسلاید کالچر بیوریا باسیانا (C) اسلاید کالچر ۳ روزه متاریزیوم آنیزوپیل (D) اسلاید کالچر ۳ روزه بیوریا باسیانا (تصاویر A, B, C, D با فاصله تقریبی ۵۰ سانتی‌متر لنز از نمونه گرفته شده است)، (E) شکل میکروسکوپی متاریزیوم آنیزوپیل با رنگ‌آمیزی متیلن بلو و بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و (G) بزرگ‌نمایی ۴۰ (F) شکل میکروسکوپی بیوریا باسیانا با رنگ‌آمیزی متیلن بلو و بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و (H) بزرگ‌نمایی ۴۰

Fig. 5: A) Metarhizium anisopile culture slide B) Bioria bassiana culture slide C) 3-day culture slide of Metarhizium anisopile D) 3-day culture slide of Bioria bassiana (Images A, B, C, D were taken at a distance of approximately 50 cm from the lens), E) Microscopic image of Metarhizium anisopile stained with methylene blue and magnification 100 and G) magnification 40 F) Microscopic image of Bioria bassiana stained with methylene blue and magnification 100 and H) magnification 40

باکتری روی محیط کشت مشاهده نشد و در نتیجه از عدم حضور آلودگی باکتریایی در کلنی‌های قارچی اطمینان حاصل شد. نتایج در شکل ۶ دیده می‌شود.

نتایج کشت قارچ‌ها روی محیط کشت TSA

قارچ‌های متاریزیوم آنیزوپیل و بیوریا باسیانا روی این محیط کشت داده شد و پس از گذشت ۲ الی ۳ روز رشد



شکل ۶: (A) کشت ۳ روزه قارچ و عدم وجود آلودگی (B) کشت اولیه بیوریا باسیانا و متاریزیوم آنیزوپیل بر روی محیط کشت TSA، (C, D و E) کشت ده روزه قارچ‌ها (تصاویر با مقیاس تقریبی ۵۰ سانتی‌متر فاصله از نمونه ثبت شده) (F) مشاهده میکروسکوپی قارچ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و (G) بزرگ‌نمایی ۴۰

Fig. 6: A) 3-day culture of the fungus and no contamination B) Initial culture of Bioria bassiana and Metarhizium anisopile on TSA culture medium, C, D and E) Ten-day culture of the fungi (Images with a scale of approximately 50 cm from the recorded sample) F) Microscopic observation of the fungus with magnification 100 and G) magnification 40

رشد کامل قارچ در طی ۲۴، ۴۸ و پس از ۶۰ ساعت مشاهده شد. بنابراین می‌توان تیمول را به‌همراه هر دو قارچ در آفت‌کش استفاده نمود. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که تیمول روی رشد قارچ‌های بیوریا باسیانا، متاریزیوم آنیزوپیل و

نتایج آنتی‌بیوگرام

طبق شکل ۷ نتایج طی مدت زمان ۶۰ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که تیمول هیچ اثر بازدارندگی رشد روی هر دو قارچ بیوریا باسیانا و متاریزیوم آنیزوپیل ندارد و

از این اجزا در کنار هم بلامانع است و می تواند روی حشره پلودیا/ینتروپونکتلا اثر کشندگی داشته باشد.

ترکیب متاریزیوم + بیوریا عدم بازدارندگی رشد ندارد و با توجه به این که آفت کش زیستی موردنظر چندجزئی می باشد، استفاده



شکل ۷: A) مشاهده رشد کامل قارچ پس از ۲۴ ساعت B) ۴۸ ساعت C) و ۶۰ ساعت (تصاویر با مقیاس تقریبی ۵۰ سانتی متر فاصله از نمونه ثبت شده)

Fig. 7: A) Observation of complete mushroom growth after 24 hours B) 48 hours C) and 60 hours (images with an approximate scale of 50 cm from the recorded sample)

نتایج زیست سنجی با قارچ بیوریا باسیانا

طبق نتایج به دست آمده در جدول ۱ کمترین درصد مرگومیر در روزهای اول، دوم و سوم معادل صفر درصد مشاهده شد و بیشترین درصد مرگومیر در روزهای نهم، دهم و یازدهم معادل ۷۰ درصد مشاهده شد.

نتایج زیست سنجی با بیوریا + متاریزیوم + تیمول

طبق نتایج به دست آمده در جدول ۵ کمترین درصد مرگومیر در روز اول معادل صفر درصد و بیشترین درصد مرگومیر در روزهای هشتم، نهم، دهم و یازدهم معادل ۹۰ درصد مشاهده شد.

نتایج زیست سنجی با قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه

طبق نتایج به دست آمده در جدول ۲ کمترین درصد مرگومیر در روزهای اول، دوم، سوم و چهارم معادل صفر درصد و بیشترین درصد مرگومیر در روزهای دهم تا یازدهم معادل ۹۰ درصد مشاهده شد.

کلسیم

نتایج زیست سنجی با بیوریا + متاریزیوم + تیمول + نانوذرات طبق نتایج به دست آمده در جدول ۶ کمترین درصد مرگومیر در روز اول معادل صفر درصد و بیشترین درصد مرگومیر در روزهای هفتم، هشتم، نهم، دهم و یازدهم معادل ۱۰۰ درصد مشاهده شد. در نتیجه بیشترین اثرگذاری آفت کش زیستی مورد مطالعه در این حالت گزارش شد.

نتایج زیست سنجی با زنیان (تیمول)

طبق نتایج به دست آمده در جدول ۳ کمترین درصد مرگومیر در روز اول معادل صفر درصد و بیشترین درصد مرگومیر در روزهای هفتم، هشتم، نهم، دهم و یازدهم معادل ۹۰ درصد مشاهده شد.

نتایج زیست سنجی با قارچ های بیوریا + متاریزیوم

طبق نتایج به دست آمده در جدول ۴ کمترین درصد مرگومیر در روزهای اول، دوم و سوم معادل صفر درصد و بیشترین درصد مرگومیر در روزهای دهم و یازدهم معادل ۹۰ درصد مشاهده شد.

در شکل ۸ میزان مرگومیر لارو شبپره هندی تحت تأثیر آفت کش ها به تفکیک در برابر زمان نشان داده شده و بیشترین میزان مرگومیر تحت تأثیر بیوریا باسیانا از روز نهم، متاریزیوم آنیزوپلیه از روز دهم، تیمول از روز هفتم، بیوریا باسیانا + متاریزیوم آنیزوپلیه از روز دهم، بیوریا باسیانا + متاریزیوم آنیزوپلیه + تیمول از روز هفتم، تیمول + متاریزیوم آنیزوپلیه + بیوریا باسیانا + تیمول + نانوذره کلسیم کربنات از روز هفتم به بعد ثبت شده است.

جدول ۱: نتایج زیست‌سنجی با قارچ *بیوریا باسیان*

Table 1: Bioassay results with the fungus *Beauveria bassiana*^۱

نوع قارچ	تکرار ۱				تکرار ۲				تکرار ۳				تکرار ۴			
	روز	لارو مرده	درصد مرگ‌ومیر	لارو زنده	مرگ شاهد	لارو مرده	درصد مرگ‌ومیر	لارو زنده	مرگ شاهد	لارو مرده	درصد مرگ‌ومیر	لارو زنده	مرگ شاهد	لارو مرده	درصد مرگ‌ومیر	لارو زنده
بیوریا	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
	2	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
	3	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
	4	1	10	9	0	0	10	10	0	1	10	9	0	1	10	9
	5	2	20	8	0	0	10	9	0	2	20	8	0	3	30	7
	6	3	30	7	0	0	10	7	0	3	30	7	0	3	30	7
	7	6	60	4	0	0	10	6	0	5	50	5	0	5	50	5
	8	7	70	3	0	0	10	4	0	8	80	2	0	6	60	4
	9	8	80	2	1	7	10	3	1	10	100	0	0	7	70	3
	10	8	80	2	1	7	10	3	1	10	100	0	0	7	70	3
	11	8	80	2	1	7	10	3	1	10	100	0	0	7	70	3

جدول ۲: نتایج زیست‌سنجی با قارچ *متاریزیوم آنیزوپلیه*

Table 2: Bioassay results with the fungus *Metarhizium anisopliae*

نوع قارچ	تکرار ۱				تکرار ۲				تکرار ۳				تکرار ۴			
	روز	لارو مرده	درصد مرگ‌ومیر	لارو زنده	مرگ شاهد	لارو مرده	درصد مرگ‌ومیر	لارو زنده	مرگ شاهد	لارو مرده	درصد مرگ‌ومیر	لارو زنده	مرگ شاهد	لارو مرده	درصد مرگ‌ومیر	لارو زنده
متاریزیوم	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
	2	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
	3	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
	4	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
	5	1	10	9	0	0	10	9	0	1	10	9	0	1	10	9
	6	3	30	7	0	0	10	7	0	2	20	8	0	2	20	8
	7	5	50	5	0	0	10	6	0	4	40	6	0	4	40	6
	8	7	70	3	0	0	10	5	0	5	50	5	0	6	60	4
	9	8	80	2	0	0	10	4	0	7	70	3	0	7	70	3
	10	9	90	1	1	9	10	3	1	9	90	1	1	8	80	2
	11	9	90	1	1	9	10	3	1	9	90	1	1	8	80	2

جدول ۳: نتایج آزمایشات زیست سنجی با تیمول

Table 3: Bioassay results with Thymol

نوع ماده	روز	تکرار ۱				تکرار ۲				تکرار ۳				تکرار ۴			
		لاارو مرده	درصد مرگ و میر	لاارو زنده	مرگ شاهد	لاارو مرده	درصد مرگ و میر	لاارو زنده	مرگ شاهد	لاارو مرده	درصد مرگ و میر	لاارو زنده	مرگ شاهد	لاارو مرده	درصد مرگ و میر	لاارو زنده	مرگ شاهد
تیمول	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0
	2	1	10	9	0	2	20	8	0	1	10	9	0	0	0	10	0
	3	2	20	8	0	3	30	7	0	1	10	9	0	0	0	10	0
	4	3	30	7	0	5	50	5	0	2	20	8	0	0	0	10	0
	5	5	50	5	0	3	70	7	0	3	30	7	0	0	0	10	0
	6	7	70	3	0	2	80	8	0	4	40	6	0	0	0	10	0
	7	9	90	1	0	1	90	9	0	6	60	4	0	0	0	10	0
	8	9	90	1	0	1	90	9	0	6	60	4	0	0	0	10	0
	9	9	90	1	1	1	90	9	1	6	60	4	0	0	0	10	0
	10	9	90	1	1	1	90	9	1	6	60	4	0	0	0	10	0
	11	9	90	1	1	1	90	9	1	6	60	4	0	0	0	10	0

جدول ۴: نتایج زیست سنجی با قارچ بیوریا + متاریزیوم

Table 4: Bioassay results with the fungi *Beauveria* + *Metarhizium*

نوع ماده	روز	تکرار ۱				تکرار ۲				تکرار ۳				تکرار ۴			
		لاارو مرده	درصد مرگ و میر	لاارو زنده	مرگ شاهد	لاارو مرده	درصد مرگ و میر	لاارو زنده	مرگ شاهد	لاارو مرده	درصد مرگ و میر	لاارو زنده	مرگ شاهد	لاارو مرده	درصد مرگ و میر	لاارو زنده	مرگ شاهد
متاریزیوم + بیوریا	1	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0
	2	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0
	3	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0
	4	1	10	9	0	2	20	8	0	8	20	2	0	1	10	9	0
	5	2	20	8	0	3	30	7	0	7	30	3	0	1	10	9	0
	6	4	40	6	0	5	50	5	0	5	50	5	0	2	20	8	0
	7	6	60	4	0	7	70	3	0	4	40	6	0	4	40	6	0
	8	8	80	2	1	9	90	1	0	3	30	7	0	6	60	4	0
	9	8	80	2	2	10	100	0	0	2	20	8	0	7	70	3	0
	10	9	90	1	1	10	100	0	0	1	10	9	0	8	80	2	1
	11	9	90	1	1	1	100	1	1	0	100	0	1	8	80	2	1

جدول ۵: نتایج زیست‌سنجی با تیمول + متاریزیوم + بیوریا

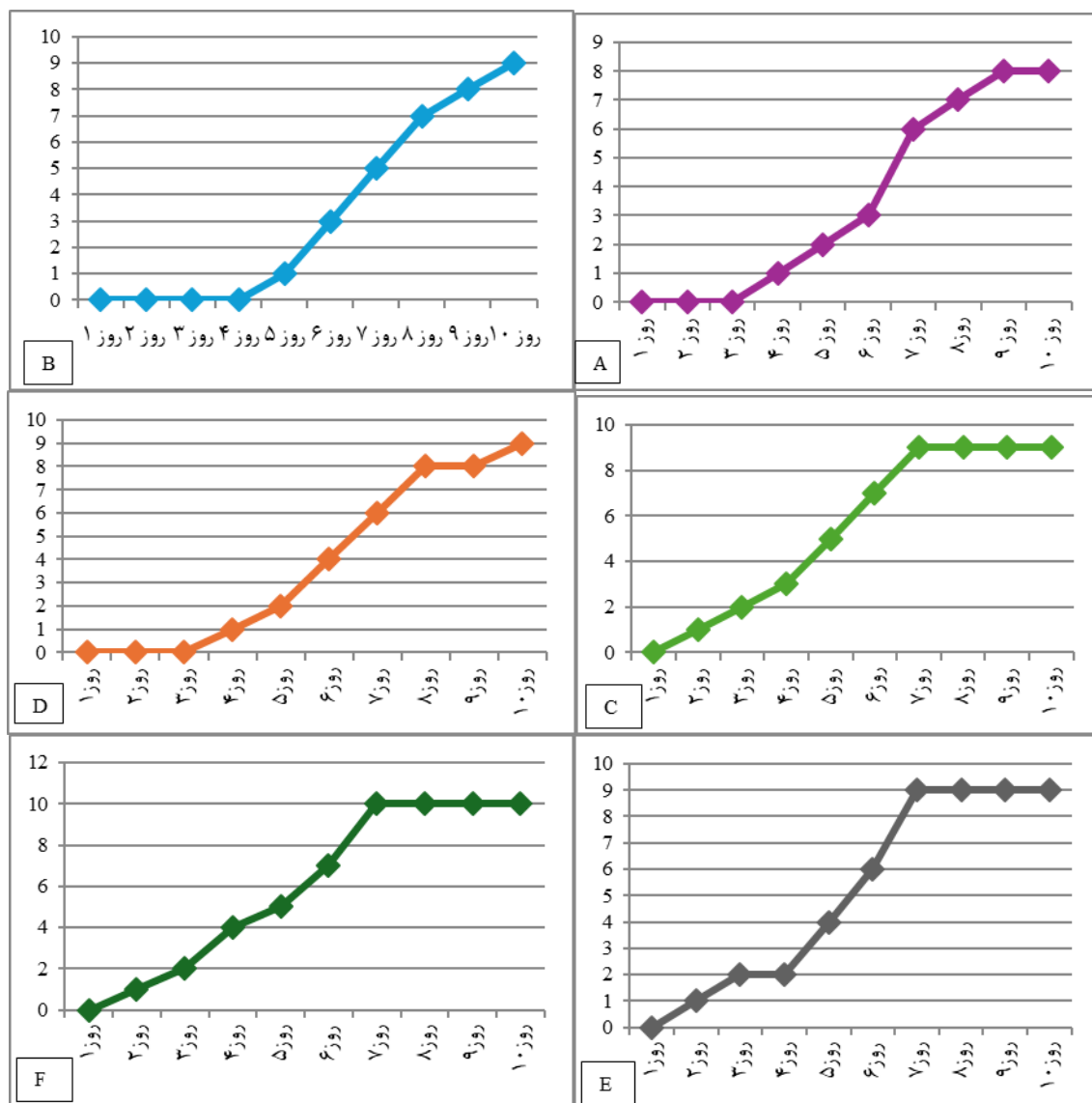
Table 5: Bioassay results with Thymol + *Metarhizium* + *Beauveria*

روز	نوع ماده																			
	تکرار ۱					تکرار ۲					تکرار ۳					تکرار ۴				
	درصد					درصد					درصد					درصد				
	لارو مرده	مرگ	لارو زنده	مرگ شاهد	لارو مرده	لارو زنده	مرگ شاهد	لارو مرده	مرگ	لارو زنده	مرگ شاهد	لارو مرده	لارو زنده	مرگ شاهد	لارو مرده	مرگ	لارو زنده	مرگ شاهد		
	و میر				و میر				و میر				و میر				و میر			
1	0	0	10	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	10	0		
2	1	10	9	0	1	10	0	0	10	0	0	0	9	10	1	0	9	0		
3	2	20	8	0	2	20	0	0	9	10	1	0	8	20	2	0	8	0		
4	2	20	7	0	3	30	0	0	8	20	2	0	8	20	2	0	7	0		
5	4	40	5	0	5	50	0	0	6	40	4	0	6	40	4	0	5	0		
6	6	60	3	0	7	70	0	0	5	50	5	0	4	60	6	0	3	0		
7	8	80	2	0	9	90	0	0	3	70	7	0	2	80	8	0	2	0		
8	9	90	1	0	10	100	0	0	2	80	8	0	1	90	9	0	1	0		
9	9	90	1	0	10	100	1	1	2	90	9	1	1	90	9	0	1	0		
10	9	90	1	0	10	100	1	1	2	90	9	1	1	90	9	0	1	0		
11	9	90	1	1	10	100	1	1	2	90	9	1	1	90	9	1	1	0		

جدول ۶: نتایج زیست‌سنجی با قارچ متاریزیوم + بیوریا به همراه تیمول و نانوذره کلسیم کربنات

Table 6: Bioassay results with the fungi *Metarhizium* + *Beauveria* combined with thymol and calcium carbonate nanoparticles

نوع ماده	تکرار ۱																تکرار ۲																تکرار ۳																تکرار ۴																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
	روز	درصد								درصد								درصد								درصد								درصد																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
		لارو زنده				مرگ و				لارو مرده				مرگ و				لارو زنده				مرگ و				لارو مرده				مرگ و				لارو زنده				مرگ و				لارو مرده				مرگ و																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
		میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر	میر



شکل ۸: مرگومیر لارو شب پره هندی در برابر زمان (روز) تحت اثر (A) *Beauveria bassiana* (B) *Metarhizium anisopliae* (C) تیمول (D) *Beauveria bassiana* + *Metarhizium anisopliae* (E) *Beauveria bassiana* + *Metarhizium anisopliae* + تیمول (F) تیمول + *Beauveria bassiana* + *Metarhizium anisopliae* و بیوریا باسیلانا + تیمول + نانوذره کلسیم کرینات

Fig. 8: Mortality of Indian meal moth larvae over time (days) under the effect of A) *Beauveria bassiana* B) *Metarhizium anisopliae* C) thymol D) *Beauveria bassiana* + *Metarhizium anisopliae* E) *Beauveria bassiana* + *Metarhizium anisopliae* + Thymol F) Thymol + *Beauveria bassiana* + *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* + Thymol + Calcium carbonate nanoparticles

ترکیب بیوریا + متاریزیوم برابر با صفر درصد گزارش شد. در روز چهارم بیشترین میزان کشندگی برای ترکیب بیوریا + متاریزیوم + تیمول + نانوذره کلسیم برابر با 37.5 ± 2.5 و کمترین میزان کشندگی برای متاریزیوم برابر با صفر درصد گزارش شد. در روز پنجم بیشترین میزان کشندگی برای ترکیب بیوریا + متاریزیوم + تیمول + نانوذره کلسیم برابر با 40.8 ± 5.0 درصد و کمترین میزان کشندگی برای متاریزیوم برابر با ۱۰ درصد گزارش شد. در روز ششم بیشترین میزان کشندگی برای تیمول برابر با 67.5 ± 9.46 درصد و کمترین میزان کشندگی برای متاریزیوم برابر با 25 ± 2.88 درصد

در جدول ۷ میانگین درصد مرگومیر لاروهای شب پره هندی در ۴ تکرار، طی ۱۰ روز برای هر ترکیب به صورت جداگانه بیان شده است. طبق نتایج به دست آمده، در روز اول برای هیچ کدام از ترکیبات مرگومیری ثبت نشده است. در روز دوم بیشترین میزان کشندگی برای تیمول برابر با 4.08 ± 1.0 درصد و کمترین میزان کشندگی برای ترکیب بیوریا، ترکیب متاریزیوم و ترکیب بیوریا + متاریزیوم برابر با صفر درصد گزارش شد. در روز سوم بیشترین میزان کشندگی برای زنیان برابر با 4.08 ± 2.0 درصد و کمترین میزان کشندگی برای ترکیب بیوریا، ترکیب متاریزیوم و

روز نهم بیشترین میزان کشندگی برای ترکیب بیوریا + متاریزیوم + تیمول + نانوذره کلسیم برابر با ۱۰۰ درصد و کمترین میزان کشندگی برای متاریزیوم برابر با $75 \pm 2/88$ درصد گزارش شد. در روز دهم میزان کشندگی برای ترکیب بیوریا + متاریزیوم + تیمول + نانوذره کلسیم برابر با ۱۰۰ درصد و کمترین میزان کشندگی بیوریا تیمول برابر با $7/07 \pm$ ۸۰ درصد گزارش شد.

گزارش شد. در روز هفتم بیشترین میزان کشندگی برای ترکیب بیوریا + متاریزیوم + تیمول + نانوذره کلسیم برابر با 95 ± 5 درصد و کمترین میزان کشندگی برای متاریزیوم برابر با $2/88 \pm 45$ درصد گزارش شد. در روز هشتم بیشترین میزان کشندگی برای ترکیب بیوریا + متاریزیوم + تیمول + نانوذره کلسیم برابر با ۱۰۰ درصد و کمترین میزان کشندگی برای متاریزیوم برابر با $62/5 \pm 4/78$ درصد گزارش شد. در

جدول ۷: مقایسه میانگین آماری درصد مرگومیر و انحراف معیار
Table 7: Statistical comparison of mean mortality percentage and standard deviation

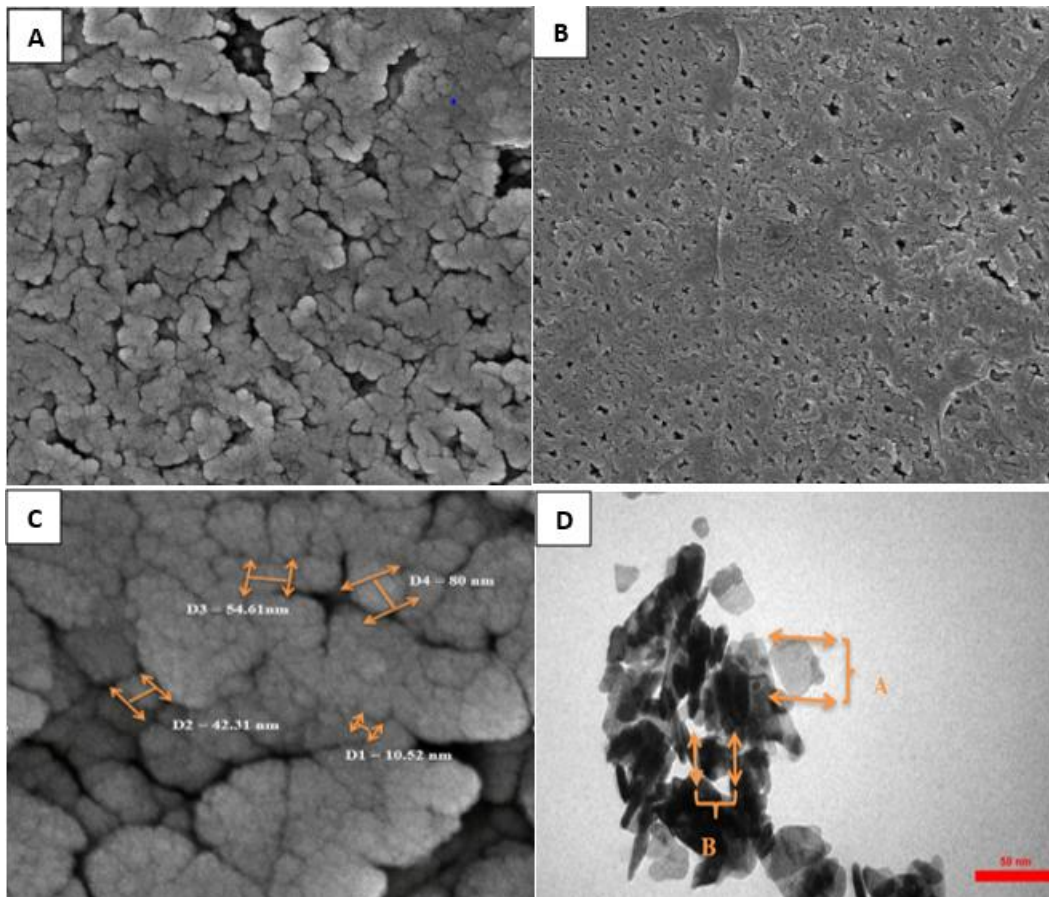
Treatment	Mortality (%) $\pm$ SE									
	Day									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
control	0.0	0.0b	0.0b	0.0d	0.0c	0.0c	0.0d	0.0e	0.0d	0.0d
Metarhizium + Beauveria + Thymol + CaCO ₃	0.0	10 $\pm$ 0.0a	20 $\pm$ 0.0a	37.5 $\pm$ 2.5a	50 $\pm$ 4.08a	67.5 $\pm$ 2.5a	95 $\pm$ 5.0a	100 $\pm$ 0.0a	100 $\pm$ 0.0a	100 $\pm$ 0.0a
Beauveria Metarhizium + Beauveria + Thymol	0.0	0.0b	0.0b	7.5 $\pm$ 2.5cd	20 $\pm$ 4.08b	30 $\pm$ 0.0b	50 $\pm$ 4.08c	67.5 $\pm$ 4.78cd	82.5 $\pm$ 6.29bc	82.5 $\pm$ 6.29bc
Metarhizium + Beauveria + Thymol	0.0	7.5 $\pm$ 2.5a	17.5 $\pm$ 2.5a	25 $\pm$ 2.88b	45 $\pm$ 2.88a	62.5 $\pm$ 4.78a	80 $\pm$ 4.08b	90 $\pm$ 4.08ab	92.5 $\pm$ 2.5ab	92.5 $\pm$ 2.5ab
Metarhizium Thymol	0.0	0.0b	0.0b	0.0d	10 $\pm$ 0.0bc	25 $\pm$ 2.88b	45 $\pm$ 2.88c	62.5 $\pm$ 4.78d	75 $\pm$ 2.88c	87.5 $\pm$ 2.5bc
Metarhizium + Beauveria	0.0	10 $\pm$ 4.08a	20 $\pm$ 4.08a	32.5 $\pm$ 6.29ab	50 $\pm$ 8.16a	67.5 $\pm$ 9.46a	80 $\pm$ 7.07b	80 $\pm$ 7.07bc	80 $\pm$ 7.07bc	80 $\pm$ 7.07c
P value	-	0.0002	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
F	-	7.55	32.27	24.69	23.27	27.55	44.31	48.09	54.14	68.88
df	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21	6, 21

شکل ۹ قسمت A, B, C نشان داده شده است. به منظور جلوگیری از تخریب و باردار شدن نانوذرات، ترکیب مورد مطالعه به وسیله یک لایه نازک ۱۵ نانومتری از نقره به وسیله دستگاه Desk Sputter coater پوشش دهی شد. نمونه ای از هر بزرگنمایی در شکل ۹ به نمایش گذاشته شده است. نانوذرات با نرم افزار Motic Plus 2.0 اندازه گیری شد و اندازه نانوذرات کلسیم تأیید شد. عکس برداری از نمونه آفت کش زیستی مورد مطالعه به منظور با میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل CM120 ساخت کشور هلند با حداکثر ولتاژ ۱۰۰ کیلوولت انجام شده. شکل ۹D نتایج عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری را نشان می دهند. وجود بخش تیره مربوط به ترکیب سوسپانسیون های قارچی و اسانس زنیان و بخش روشن مربوط به نانوذرات کلسیم کربنات می باشد. این نانوذرات به خوبی در ساختار آفت کش زیستی پراکنده شده اند و اندازه آن ها ۱۰ تا ۸۰ نانومتر است.

نتایج کمترین زمان اثرگذاری در جدول ۸ بیان شده است. باتوجه به نتایج به دست آمده کمترین زمان اثرگذاری کشندگی روی لاروهای سن سوم شب پره هندی برای ترکیب متاریزیوم + بیوریا + نانوذره کلسیم + تیمول برابر با ۴/۲۸ روز، برای ترکیب متاریزیوم + بیوریا + تیمول برابر با ۴/۸۸، برای ترکیب بیوریا + متاریزیوم برابر با ۶/۵۰ روز، برای بیوریا برابر با ۶/۶۲ روز، برای متاریزیوم ۷/۳۱۵ روز و برای تیمول ۴/۹۱۹ روز می باشد. در نتیجه کمترین زمان اثرگذاری مربوط به ترکیب متاریزیوم + بیوریا + نانوذره کلسیم + تیمول برابر با ۴/۲۸ روز اندازه گیری شد.

نتایج تست های تأییدی نانوذره

نتایج عکس برداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی با گسیل میدانی (FESEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) ویژگی ها و مورفولوژی ظاهری آفت کش زیستی چند جزئی به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل MIR/TESCAN ساخت جمهوری چک با ولتاژ شتاب دهی ۵ تا ۱۵ کیلوولت در



شکل ۹: A) مورفولوژی آفت کش زیستی با (FESEM)، بزرگ‌نمایی ۲۵kx، فاصله نمونه تا لنز ۴/۴۸۹ میلی‌متر، B) بزرگ‌نمایی ۵kx، فاصله نمونه تا لنز ۴/۴۸۹ میلی‌متر، C) بزرگ‌نمایی ۱۵kx، فاصله نمونه تا لنز ۴/۴۸۹ میلی‌متر، D) تصویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی عبوری با بزرگ‌نمایی ۵۰ نانومتر، در این تصویر پوشش‌دهی ترکیب آفت کش زیستی مورد مطالعه توسط نانوذرات کلسیم کربنات A دارای ظاهر مکعبی و B دارای ظاهر شش ضلعی می‌باشند که با مورفولوژی نانوذرات کلسیم کربنات مطابقت دارد

Fig. 9: A) Morphology of the biopesticide via FESEM, 25kx magnification, sample-to-lens distance 4.489 mm, B) 5kx magnification, sample-to-lens distance 4.489 mm, C) 15kx magnification, sample-to-lens distance 489.4 nm; D) Transmission electron microscopy image (50 nm scale bar) showing the coating of the biopesticide compound with calcium carbonate nanoparticles; the particles exhibit cubic (A) and hexagonal (B) shapes, consistent with the morphology of calcium carbonate nanoparticles

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار آفت کش زیستی چندجزئی در مقایسه با کاربرد اجزای منفرد، موجب افزایش معنی‌دار مرگ‌ومیر لاروهای *Plodia interpunctella* و کاهش زمان LT50 شد. این یافته بیانگر بروز اثر هم‌افزایی میان اجزای به‌کاررفته در فرمولاسیون است. به نظر می‌رسد ترکیب هم‌زمان قارچ‌های بیمارگر حشرات، نانوذرات و اسانس گیاهی با تضعیف مکانیسم‌های دفاعی حشره و افزایش نفوذ عوامل بیماری‌زا از طریق کوتیکول، کارایی زیستی عوامل را تقویت کرده باشد. کاهش زمان اثرگذاری نیز نشان می‌دهد که این ترکیب زیستی قادر است در بازه زمانی کوتاه‌تری جمعیت آفت را کاهش دهد؛ موضوعی که در مدیریت آفات انباری، به‌ویژه در شرایطی که سرعت گسترش آلودگی بالاست، اهمیت کاربردی دارد.

قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* از شناخته‌شده‌ترین قارچ‌های بیمارگر حشرات هستند که سابقه طولانی در برنامه‌های کنترل زیستی دارند. در مطالعه حاضر، این عوامل در کنار تیمول (به‌عنوان جزء فعال اسانس گیاه زنیان) و نانوذرات کربنات کلسیم مورد استفاده قرار گرفتند. هریک از این اجزا به‌تنهایی توانستند باعث ایجاد مرگ‌ومیر در لاروهای سن سوم شوند، با این حال ترکیب آن‌ها در قالب یک فرمولاسیون چندجزئی، اثر کشندگی بیش‌تر و سرعت اثر بالاتری ایجاد کرد. چنین افزایشی در کارایی می‌تواند ناشی از برهم‌کنش‌های فیزیولوژیک و فیزیکی بین اجزاء از جمله افزایش چسبندگی، پایداری یا تسهیل ورود پاتوژن‌ها به بدن حشره باشد. از دیدگاه زیست‌محیطی، استفاده از عوامل زیستی و ترکیبات گیاهی، در مقایسه با بسیاری از آفت‌کش‌های

(Sabbour, 2015). از سوی دیگر، پژوهش سدهی و همکاران در سال ۲۰۱۴ که صرفاً از *Beauveria bassiana* بدون افزودنی‌های دیگر استفاده کرد، حداکثر مرگومیر ۷۰ درصد را در بازه زمانی ۱۴ روز گزارش نمود که با یافته مقاله حاضر (مرگومیر ۱۰۰ درصد طی ۱۰ روز) تفاوت چشمگیری دارد (Sedehi et al., 2014). در مغایرتی دیگر، منتزوکاس و همکاران در سال ۲۰۲۴ نشان دادند که فرمولاسیون‌های ساده قارچی به تنهایی قادر به دستیابی به مرگومیر کامل در کم‌تر از ۱۴ روز نیستند، درحالی‌که مطالعه حاضر با بهره‌گیری از رویکرد چندجزئی چنین محدودیتی را پشت سر گذاشته است (Mantzoukas et al., 2024). این مقایسه‌ها آشکار می‌سازد که افزودن نانوذرات کلسیم کربنات و تیمول به ترکیب قارچ‌های بیمارگر، به دلیل افزایش سطح تماس، بهبود نفوذ به کوتیکول و ایجاد اثر هم‌افزایی، موجب ارتقای چشمگیر کارایی و سرعت اثر آفت‌کش زیستی شده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کادر آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال قدردانی می‌کنند.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

میزان مشارکت

محدثه لاری‌پور ایده و طرح اصلی، آنالیز داده‌ها و مطالعه مفهوم و طراحی نوشتن و بازنگری انتقادی نسخه چاپ‌نشده را ارائه داد و فاطمه عزیزاده و شیما رحمانی در انجام طرح و ارائه داده‌ها و نگارش متن کمک کردند.

شیمیایی متداول، به‌طور بالقوه با خطر کم‌تر برای انسان، سایر مهره‌داران و محیط‌زیست همراه است؛ هرچند ارزیابی‌های تکمیلی سمیت و پایداری محیطی برای تأیید کامل ایمنی این فرمولاسیون در شرایط کاربردی ضروری است.

در مجموع، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که آفت‌کش‌های زیستی چندجزئی می‌توانند به‌عنوان گزینه‌ای امیدبخش در چارچوب مدیریت تلفیقی آفات انباری مطرح شوند. این رویکرد نه تنها موجب افزایش کارایی کنترل آفت *Plodia interpunctella* می‌شود، بلکه می‌تواند گامی در جهت کاهش وابستگی به سموم شیمیایی و توسعه راهکارهای پایدار در حفاظت از ذخایر غذایی باشد. همچنین نتایج حاضر می‌تواند مبنایی برای پژوهش‌های آینده در زمینه بهینه‌سازی فرمولاسیون و ارزیابی عملکرد آن در شرایط نیمه‌میدانی و انباری واقعی فراهم کند.

مقایسه یافته‌های این مطالعه با پژوهش‌های پیشین نشان‌دهنده برتری آشکار فرمولاسیون چندجزئی حاوی نانوذرات کلسیم نسبت به کاربرد تک‌عاملی قارچ‌ها یا اسانس‌های گیاهی است. در مطالعه گلزان و همکاران در سال ۲۰۲۳، برهم‌کنش آنزیم‌های کوتیکول‌شکن قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* تأیید شد، اما این پژوهش بدون استفاده از نانوذرات و تیمول، به مرگومیر ۱۰۰ درصد در مدت ۱۰ روز دست نیافته بود، درحالی‌که ترکیب چهارجزئی در مطالعه حاضر چنین نتیجه‌ای را حاصل کرد (Golzan et al., 2023). همچنین در سال ۲۰۱۵ سابور با استفاده از نانوذرات استخراج‌شده از *Metarhizium anisopliae* توانست مرگومیر بالایی در *Plodia interpunctella* ایجاد کند، اما LT50 گزارش‌شده در آن مطالعه (حدود ۵/۲ روز) بیش‌تر از مقدار ۴/۲۸ روز به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر بود که نشان‌دهنده نقش مؤثر تیمول و نانوذرات کلسیم در تسریع اثر کشندگی است.

References

- Alföldi, J. and Lindblad-Toh, K. 2013. Comparative genomics as a tool to understand evolution and disease. *Genome Research*, 23: 1063-1068. DOI: [10.1101/gr.157503.113](https://doi.org/10.1101/gr.157503.113)
- Alm, R., Ling, L. S., Moir, D. King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R., Noonan, B., Guild, B. C., DeJonge, B. L., Carmel, G., Tummino, P. J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D. M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S. D., Jiang, Q., Taylor, D. E., Vovis, G. F. and Trust, T. J. S. 1999. Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Nature*, 397: 176-180. DOI: [10.1038/16495](https://doi.org/10.1038/16495)
- Anderson, L., Georges, M. 2004. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits, *Nature Reviews Genetics*, 5: 202-212. DOI: [10.1038/nrg1294](https://doi.org/10.1038/nrg1294)
- Argos, P., Kamer, G., Nicklin, M. J. and Wimmer, E. 1984. Similarity in gene organization and homology between proteins of animal picornaviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families. *Nucleic Acids Research*, 1 (18): 7251-7267. DOI: [10.1093/nar/12.18.7251](https://doi.org/10.1093/nar/12.18.7251)
- Avsec, Ž., Agarwal, V., Visentin, D., Ledsam, J. R., Grabska-Barwinska, A., Taylor, K. R., ... and Kelley, D. R. 2021. Effective gene expression prediction from sequence by integrating long-range interactions. *Nature Methods*, 18(10): 1196-1203.

- Barcia-cruz, R., Balboa, S., Lema, A. and Romalde, J. 2024. Comparative genomics of *Vibrio toranzoniae* strains. Research Square, pp. 1-17. DOI: [10.1007/s10123-024-00557-z](https://doi.org/10.1007/s10123-024-00557-z)
- Chain, P., Kurtz, S., Ohlebusch, E. and Slezak, T. 2003. An applications-focused review of comparative genomics tools: capabilities, limitations and future challenges. Briefing in bioinformatics, 4: 105-123. DOI: [10.1093/bib/4.2.105](https://doi.org/10.1093/bib/4.2.105)
- Darling, A.E., Miklós, I., Ragan, M. A. 2008. Dynamics of Genome Rearrangement in Bacterial Populations, PLOS Genetics, pp. 4-7. DOI: [10.1371/journal.pgen.1000128](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000128)
- Dumas, J. and Ninio, J. 1982. efficient algorithms for folding and comparing nucleic acid sequences, Nucleic Acids Research, 10: 197-206. DOI: [10.1093/nar/10.1.197](https://doi.org/10.1093/nar/10.1.197)
- Ellegren, H. 2008. Comparative genomics and the study of evolution by natural selection, Molecular Ecology, 17(21): 4586-4596. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2008.03954.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03954.x)
- Flores, R., Huneau, C., Burlot, L., Lainé, M., Kimmel, E., Pommier, C., Alaux, M., Adam-Blondon, A. F., Pont, C., Quesneville, H. and Salse, J. 2023. SyntenyViewer: a comparative genomics-driven translational research tool. Database: The Journal of Biological Databases and Curation, 2023: baad027. DOI: [10.1093/database/baad027](https://doi.org/10.1093/database/baad027)
- Goffeau, A., Barrell, B., Bussey, G. H., Davis, R., Dujon, W. B., Feldmann, H., Galibert, F. J., Hoheisel, D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S. G. 1996. Life with 6000 genes, Science, 274(5287), 546: 563-567.
- Golicz, A. A., Bayer, P. E., Barker, G. C., Edger, P. P., Kim, H., Martinez, P. A., ... and Edwards, D. 2016. The pangenome of an agronomically important crop plant *Brassica oleracea*. Nature Communications, 7(1): 13390. DOI: [10.1038/ncomms13390](https://doi.org/10.1038/ncomms13390)
- Gottgens, B., Barton, L. M., Gilbert, J. G. Bench, A. J., Sanchez, M. J., Bahn, S., Mistry, S., Grafham, D., McMurray, A., Vaudin, M., Amaya, E., Bentley, D. R., Green, A. R. and Sinclair, A. M. 2000. Analysis of vertebrate SCL loci identifies conserved enhancers, Nat, Biotechnology, 18: 777-787. DOI: [10.1038/72635](https://doi.org/10.1038/72635)
- Gottgens, B., Gilbert, J., Barton, L. M., Grafham, L., Rogers, J. Bentley, D. R. and Green, A. R. 2001. Long-range comparison of human and mouse SCL loci: localized regions of sensitivity to restriction endonucleases correspond precisely with peaks of conserved noncoding sequences, Genome Research, 11: 87-97. DOI: [10.1101/gr.153001](https://doi.org/10.1101/gr.153001)
- Haft, D. H. 2015. Using comparative genomics to drive new discoveries in microbiology. Current Opinion in Microbiology, 23: 189-196. DOI: [10.1016/j.mib.2014.11.017](https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.017)
- Hardison, R., Oeltjen, J. and Miller, W. 1997. Long human-mouse sequence alignments reveal novel regulatory elements: a reason to sequence the mouse genome, Genome Research, 7: 959-996. DOI: [10.1101/gr.7.10.959](https://doi.org/10.1101/gr.7.10.959)
- Hardison, R. C. 2003. Comparative genomics, PLoS Biology, 2: 52-58.
- Lund, J., Chen, F., Hua, Roe, B., Budarf, M., Emanuel, B. S. and Reeves, R. H. 2000. Comparative sequence analysis of 634kb of the mouse chromosome 16 region of conserved synteny with the human velocardiofacial syndrome region on chromosome 22q11.2, Genomics, 63: 374-383.
- Paulsen, I. T., Seshadri, R., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Read, T. D., Dodson, R. J., Umayam, L., Brinkac, L. M., Beanan, M. J., Daugherty, S. C., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Nelson, W. C., Ayodegi, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S. E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S. R. and White, O. 2000. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 20: 13148-13153. DOI: [10.1073/pnas.192319099](https://doi.org/10.1073/pnas.192319099)
- Read, T. D., Salzberg, S. L. and Pop, M. 2000. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*, Science, 296: 2028-2033. DOI: [10.1126/science.1071837](https://doi.org/10.1126/science.1071837)
- Sengupta, S. and Azad, R. K. 2023. Leveraging comparative genomics to uncover alien genes in bacterial genomes. Microbial Genomics, 9(1): mgen000939. DOI: [10.1099/mgen.0.000939](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000939)
- Safari, S. and Mehrabi, A. A. 2020. Association of microsatellite markers with root architecture and agromorphologic traits in diverse germplasm of bread wheat. Plant Genetic Resources, 18(6): 437-444.
- Tahmasebi, Z., Safari, S., Arminian, A., & Fatehi, F. 2022. Marker-trait association of Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) resistance in the global diversity set of wild barely. Journal of Plant Molecular Breeding, 10(2): 46-60.
- Touchman, J. 2010. Comparative Genomics, Nature Education Knowledge, 3: 10-13.
- Varshney, R. K., Sinha, P., Singh, V. K., Kumar, A., Zhang, Q. and Bennetzen, J. L. 2020. 5Gs for crop genetic improvement. Current Opinion in Plant Biology, 56: 190-196.
- Wang, J., Chen, Y. and Zou, Q. 2023. Comparative Genomics and Functional Genomics Analysis in Plants International Journal of Molecular Sciences, 24: 6539. DOI: [10.3390/ijms24076539](https://doi.org/10.3390/ijms24076539)
- Wienberg, J., and Stanyon, R. 1998. Comparative chromosome painting of primate genomes, ILAR, J39: 77-91. DOI: [10.1093/ilar.39.2-3.77](https://doi.org/10.1093/ilar.39.2-3.77)
- Yang, X., Liu, D., Tschaplinski, T. J. and Tuskan, G. A. 2019. Comparative genomics can provide new insights into the evolutionary mechanisms and gene function in CAM plants. Journal of Experimental Botany, 70(22), 6539-6547. DOI: [10.1093/jxb/erz408](https://doi.org/10.1093/jxb/erz408)
- Yugi, K., Kubota, H., Hatano, A., and Kuroda, S. 2016. Trans-omics: how to reconstruct biochemical networks across multiple 'omic' layers. Trends in Biotechnology, 34(4): 276-290.
- Zhou, H., Clark, E., Guan, D., Lagarrigue, S., Fang, L., Cheng, H., Tuggle, C. K., Kapoor, M., Wang, Y., Giuffra, E., and Egidy, G. 2025. Comparative Genomics and Epigenomics of Transcriptional Regulation. Annual Review of Animal Biosciences, 13(1): 73-98. DOI: [10.1146/annurev-animal-111523-102217](https://doi.org/10.1146/annurev-animal-111523-102217)