2026, 2(1): 99-106

JAER

Journal of Animal Environmental Reaserch

Journal homepage: http://www.journalaer.com

Research Article

Identification of a species of *Plasmodium* sp. as a potential biocontrol agent for cotton bollworm in northwest Iran

Parinaz Sheibani [1], Manijeh Jamshidi [1*], Reza Khakvar [2], Sevil Nematollahi [1]

[1] Department of Phytomedicine, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[2] Department of Phytomedicine, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Key Words

Biocontrol
Helicoverpa armigera
Vegetables
Plasmodium yoelii
Unicellular

Abstract

Introduction: Cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) is one of the major agricultural pests in the world and Iran, which larvae can damage more than 120 types of agricultural crops, including cotton, alfalfa, tomato, potato, tobacco, corn, rice, sorghum, different legumes and vegetables and several ornamental plants. Various methods have been proposed to control this pest, one of the safest of which is biological control using microbial agents.

Materials & Methods: In the current research, during the summer of 2018-2019, several vegetable fields, including tomatoes, eggplants, peppers, etc., were investigated in East Azerbaijan province in Norwest Iran to collect *H. armigera* larvae. About 52 apparently diseased larvae were collected separately from several vegetable fields. The collected larvae were transferred to the laboratory under sterile and cool conditions. The samples were analyzed to find lethal infectious microbial agents.

Result: In 12 samples, despite the contagious lethal property of larvae extract, no pathogenic bacteria or fungi were isolated. Due to the failure of the lethal agent to pass through the 0.45µm biological filters, the hypothesis of the virality of the pathogenic agent was rejected. Microscopic study showed that these specimens probably contain a type of eukaryotic single cell. DNA extraction was performed using CTAB method and the total-DNA sample containing the genome of the host insect along with the pathogen was sent for whole genome sequencing.

Conclusion: The result showed that the collected samples are likely infected with a non-cultivable single-cell Apicomplexa type of Plasmodium group and probably belonging to the *Plasmodium yoelii* species.

Article info

* Corresponding Author's email: ma.jamshidi@yahoo.com

Received: 22 June 2025
Reviewed: 27 July 2025
Revised: 29 September 2025
Accepted: 31 October 2025

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-06-18]

مقاله علمی - پژوهشی

شناسایی گونه *Plasmodium yoelii* به‌عنوان عامل بیمارگر بالقوه برای کرم غوزه پنبه در شمال‌غرب ایران

پریناز شیبانی[۱]، منیژه جمشیدی*[۱]، رضا خاک‌ور[۲]، سویل نعمت‌الهی[۱]

[۱] گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

[۲] گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

کلمات کلیدی

تک سلولی
بیوکنترل
سبزیجات
Plasmodium yoelii
Helicoverpa armigera

چکیده

مقدمه: کرم غوزه پنبه (*Helicoverpa armigera*) از آفات عمده کشاورزی در دنیا و ایران می‌باشد که لاروهای آن می‌توانند به بیش از ۱۲۰ نوع محصول کشاورزی ازجمله پنبه، یونجه، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی، تنباکو، ذرت، برنج، سورگوم، انواع حبوبات، سبزیجات و چندین گیاه زینتی آسیب وارد کنند. راه‌های مختلفی برای کنترل این آفت پیشنهاد شده است که یکی از بی‌خطرترین آن‌ها کنترل بیولوژیک با استفاده از عوامل میکروبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر طی تابستان سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸، چندین مزرعه سبزیجات اعم از گوجه فرنگی، بادمجان و فلفل در استان آذربایجان‌شرقی برای جمع‌آوری لاروکرم‌غوزه پنبه موردبررسی قرار گرفت. حدود۵۲ لاروظاهراً بیمار به‌طور جداگانه از چندین مزرعه گوجه‌فرنگی جمع‌آوری شد. لاروهای جمع‌آوری شده در شرایط استریل و خنک به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها برای یافتن عوامل میکروبی مسری و کشنده مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: در دوازده نمونه، هیچ‌گونه باکتری یا قارچ بیماری‌زا بیمارگر حشرات جداسازی نگردید ولی کماکان عصاره لاروهای بیمار خاصیت کشندگی سرایت‌کننده از خود نشان می‌داد. با توجه به عدم عبور عامل کشنده از فیلترهای زیستی ۰/۴۵µm فرضیه ویروسی بودن عامل بیماری‌زا رد گردید. مطالعه میکروسکوپی نشان داد این نمونه احتمالاً حاوی نوعی تک‌سلولی یوکاریوتیک می‌باشد. استخراج DNA به‌روش CTAB انجام و نمونه DNA کل (total-DNA) حاوی ژنوم حشره میزبان همراه با بیمارگر برای توالی‌یابی کل (Whole genome sequencing) ارسال گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: نتیجه آنالیزهای مولکولی نشان داد که به احتمال زیاد نمونه‌های جمع‌آوری شده آلوده به نوعی آپی کمپلکسای غیرقابل کشت از گروه هاگ‌داران جنس *Plasmodium* و متعلق به گونه *Plasmodium yoelii* می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
ma.jamshidi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱ تیر ۱۴۰۴
تاریخ داوری: ۵ مرداد ۱۴۰۴
تاریخ اصلاح: ۷ مهر ۱۴۰۴
تاریخ پذیرش: ۹ آبان ۱۴۰۴

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-06-18]

مقدمه

کرم غوزهٔ پنبه *Helicoverpa armigera* (Hübner) آفتی چندخوار با دامنه میزبانی وسیع است که هر ساله خسارت زیادی به انواع مختلفی از محصولات زراعی و باغی در نقاط مختلف جهان وارد می‌آورد (۱، ۲). لاروهای این آفت با تغذیه از اندام‌های رویشی و زایشی گیاهان میزبان، سبب کاهش رشد اندام‌های بارده و در نتیجه کاهش میزان تولید محصول می‌شوند (۳). علاوه بر خسارت مستقیم، هزینه‌هایی که هرساله به‌منظور کنترل این آفت صرف می‌شود نیز نقش مهمی در افزایش هزینه‌های تولید و کاهش سود کسب‌شده توسط کشاورزان دارد (۴). در حال حاضر، روش اصلی کنترل این آفت در مزارع کشور متکی به استفاده از سموم شیمیایی نظیر سموم فسفره و پایرتروئیدها است که متأسفانه تکیه بیش از حد به این روش تبعات نامطلوبی از جمله آلودگی‌های زیست‌محیطی، تهدید سلامتی انسان، بروز مقاومت در آفات، نابودی دشمنان طبیعی هم‌چنین آسیب به حشرات مفید و غیرهدف را به‌دنبال داشته است. علاوه براین، وجود بقایای سموم شیمیایی در بخش‌های مختلف محیط‌زیست مثل مواد غذایی، علوفه، آب، خاک و حتی هوا منجر به بروز نگرانی‌های زیادی شده است (۵) اگرچه کنترل کننده‌های شیمیایی آفات در اکثر موارد کارآیی خوب و سریعی دارند، اما به‌دلیل اثرات نامطلوب آن‌ها، محققان همواره به دنبال راهکارهایی برای به حداقل رساندن مصرف سموم شیمیایی در اکوسیستم‌های کشاورزی بوده‌اند (۶). در حال حاضر مهم‌ترین و اصلی‌ترین ابزار مدیریت تلفیقی آفات، کنترل زیستی با استفاده از عوامل کنترل زنده مانند حشرات، میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و جوندگان است. بیمارگرهای حشرات یکی از مهم‌ترین گروه‌های مورد استفاده در کنترل زیستی آفات محصولات کشاورزی هستند به‌طوری که قسمت عمده‌ای (حدود ۸۰-۷ درصد) از بازار جهانی کنترل زیستی را به خود اختصاص داده‌اند (۷). عوامل میکروبی بیمارگر حشرات به دلیل ایمن بودن برای انسان، اختصاصی بودن و کارایی بالای آن‌ها، مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیط و نداشتن خاصیت تجمع در مواد غذایی دارای اهمیت بالا در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات بوده و همواره مورد توجه کارشناسان و دست اندرکاران امر بوده است. تاکنون بیش از ۵۰ میکروارگانیسم مفید به‌عنوان عوامل کنترل زیستی در برنامه‌های کنترل زیستی حشرات آفت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۸). با توجه به پراکنش وسیع و دامنه میزبانی گستره آفت کرم غوزه پنبه لزوم کنترل موثر آفت جهت کاهش خسارت اقتصادی به محصولات ضروری می‌باشد. روش‌های مختلفی برای کنترل این آفت در سراسر دنیا استفاده می‌گردد که شامل روش‌های کنترل زراعی، شیمیایی و بیولوژیک می‌باشند. یکی از جدیدترین و موثرترین روش‌های کاهش جمعیت *H. armigera* به‌کارگیری روش‌های کنترل بیولوژیک آفت با استفاده از باکتری‌های بیماری‌زای انتوموپاتوژنیک می‌باشند. مهم‌ترین گونه باکتری انتوموپاتوژن مورد مطالعه گونه *Bacillus thuringiensis* (BT) می‌باشد که دارای خواص حشره‌کشی بر روی بسیاری از حشرات می‌باشد. این باکتری یک باکتری منحصر به فرد است که به‌صورت تجاری برای کنترل حشرات مهم برای کشاورزی و بهداشت عمومی استفاده می‌شود (۳۳). در یک تحقیق دیگر اثرات کشندگی دو گونه *Pantoea agglomerans* و *Alcaligenes piechaudii* بر روی لاروهای حشره بررسی گردید. نتایج نشان داد که میزان مرگ و میر لاروهای سن سوم *H. armigera* پس از ۱۴ روز به‌میزان ۹۵ درصد در آلودگی با *P. agglomerans* و ۹۸/۷۵ درصد پس از آلودگی با *A. piechaudii* بوده است که نشانگر ظرفیت بالای این دو گونه باکتریایی در اثر کشندگی بر روی این حشره می‌باشد (۳۴).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و جداسازی عوامل بیماری‌زای کرم غوزه: طی تابستان سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸، چندین مزرعه سبزی شامل از گوجه فرنگی، بادمجان و فلفل و غیره در مناطقی از استان آذربایجان‌شرقی نظیر تبریز، بستان‌آباد، مرند، شبستر برای جمع‌آوری لاروهای حشره *H. armigera* مورد بررسی قرار گرفت. لاروهای کرم غوزه در سنین مختلف که علائم نکروز و بیماری را از خود نشان می‌دادند، از چندین منطقه جمع‌آوری شد. تمام لارو مشکوک به بیماری جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. برای تشخیص عامل بیماری‌زا بر روی لاروها ابتدا لاروهای بیمار و یا مرده جمع‌آوری شده از مزارع با الکل ۷۰٪ ضدعفونی سطحی شده سپس در شرایط استریل با استفاده از دستگاه هموژنایزر له گردیدند و برای زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفتند. برای این‌کار عصاره‌های به‌دست آمده پس از رقیق‌سازی با آب مقطر استریل تا غلظت (۰/۱٪)، به‌روی لاروهای سالم حشره اسپری شدند. برای این‌کار، در داخل هر پتری‌دیش استریل، ۱۰ لارو سن دوم سالم کرم غوزه پنبه قرار داده شد. سپس عصاره هر لارو بیمار، به طور جداگانه داخل یکی از پتری‌ها چندین بار اِسپری گردید. لاروها پس از آغشته شدن با عصاره لاروهای بیمار، مجدد به محیط کشت استریل خود بازگردانده شدند تا به رشد طبیعی خود ادامه دهند. برای پرورش لاروها در شرایط آزمایشگاهی از غذای مصنوعی استفاده شد که با فرمول زیر تهیه گردید: لوبیای چشم بلبلی به‌مقدار ۲۵۰ گرم، مخمر نانوایی به‌مقدار ۳۵ گرم، پودر جوانه گندم به‌مقدار ۳۰ گرم، متیل هیدروکسی بنزوات به‌مقدار ۲/۲ گرم، آگار به‌مقدار ۱۴گرم، اسید اسکوربیک ۳/۵ گرم، اسید سوربیک به‌مقدار ۱/۱ گرم،

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-06-18]

فرمالدئید ۳۷٪ به‌مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر، روغن آفتاب گردان به‌مقدار ۵ میلی‌لیتر و آب مقطر به‌مقدار ۸۵۰ میلی‌لیتر. در صورت مشاهده مرگ و میر در لاروهای تیمار شده، از لاروهای بیمار مجدداً عصاره به همان روش تهیه شده و از آن برای جداسازی قارچ، باکتری و ویروس بیمارگر حشره استفاده شد. از محیط کشت Sabroud Dextrose Agar+Yeast extract (SDAY) برای جداسازی قارچ‌ها و از محیط کشت Nutrient Agar برای جداسازی باکتری‌ها استفاده گردید. برای اثبات ویروسی بودن عامل بیماری و جداسازی احتمالی آن، ابتدا عصاره از فیلتر زیستی ۰/۴۵µm عبور داده شد سپس روی لاروهای سالم اسپری گردید (۴).

رنگ‌آمیزی بافت‌های حشرات بیماری: برای رنگ‌آمیزی بافت‌ها از روش Ajamhassani استفاده شد (۱). به‌منظور مشاهده عوامل میکروبی غیرقابل کشت احتمالی، ۱۰ میکرولیتر از عصاره لاروهای بیمار (له شده در هاون اتریل) روی یک لام گذاشته و با کمک یک لام دیگر اسمیری (smear) از سلول‌های حشره تهیه گردید. سپس مقداری ماده رنگ‌آمیزی گیمسا (Giemsa stain) (محلول ۹:۱ گیمسا و آب مقطر استریل) روی اسمیر گذاشته و پس از ۳۰ دقیقه لام با آب مقطر به آهستگی شسته شد تا ماده رنگی گیمسا اضافی از اطراف و داخل نمونه پاک شود. سپس رنگ روی لام‌ها با کربنات سدیم به‌مدت ۱۰ ثانیه تثبیت شد. پس از آن، لام‌ها در انکوباتور گرم (۴۲ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد تا خشک شوند. سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ Ziess (مدل YD2005) در بزرگ‌نمایی ×۴۰ مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱).

استخراج DNA برای شناسایی مولکولی: برای شناسایی مولکولی عوامل بیماری‌زای کرم غوزه پنبه، ابتدا DNA کل (total-DNA) از حشرات بیمار استخراج گردید. DNA از نمونه‌ها با استفاده از بافر استخراج CTAB به‌روش Jangra و Ghosh با تغییرات جزئی استخراج شد(۱۳). بافر استخراج ۱۰ میلی‌لیتری، شامل ۲/۸ میلی‌لیتر NaCl ۵مولار، ۳/۵ میلی‌لیتر CTAB ۱۰٪، یک میلی‌لیتر از Tris-HCl ۱ مولار، ۰/۵ میکرولیتر EDTA (pH ۸/۰) ۰/۵ مولار، ۲۰ میکرولیتر β-مرکاپتواتانول، و ۲/۶ میلی‌لیتر آب مقطر استریل بود. ۲ گرم از بدن حشره استریل شده با الکل ۷۰٪، در لوله ۲ میلی‌لیتری منتقل و با هموژنایزر خرد شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج به میکروتیوب‌ها اضافه شد. لوله‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ ساعت نگه‌داری و در هر ۱۰ دقیقه به‌هم زده شدند. سپس حجم مساوی ایزوآمیل‌الکل: کلروفرم (۱:۲۴) به میکروتیوب‌ها اضافه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه‌در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (۸هزارg) سانتریفیوژ شد. مایع بالایی به یک لوله میکروتیوب جدید منتقل شد و ۰/۸ حجم ایزوپروپانول سرد به آن اضافه‌و به‌مدت ۱۰ دقیقه‌در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. DNA با سانتریفیوژ کردن در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. سپس رسوب DNA با اِتانول ۷۰ درصد شسته شد. پلت‌ها در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نگه‌داری و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتری (UV-Vis 1280) با اندازه‌گیری جذب در ۲۶۰ نانومتر و نسبت‌های ۲۶۰ نانومتر/۲۳۰ نانومتر و ۲۶۰ نانومتر/۲۸۰ نانومتر تعیین شد (۹، ۱۰).

توالی‌یابی نسل جدید (Next Generation Sequencing; NGS): به‌منظور شناسایی آلودگی‌ها غیرقابل‌کشت (مثل آلودگی‌های ویروسی و مایکوپلاسمایی)، از تکنیک متاژنومیکس (Metagenomics) و آنالیز DNA کل حشره با رهیافت توالی‌یابی نسل جدید (Next Generation Sequence; NGS) استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل NGS، در ۳ تکرار، حدود ۲۰۰ میکرولیتر (۲۵ نانوگرم در میکرولیتر) از DNA استخراج شده از *H. armigera* خالص‌سازی شد و برای تهیه کتابخانه استفاده شد. پلتفرم Illumina 1.9 Novaseq 6000 برای ایجاد یک کتابخانه ژنی در شرکت Novogene، چین استفاده شد. کیفیت داده‌های خام Illumina توسط نرم‌افزار FastQC نسخه ۰/۷۳ بررسی شد. برای پیش‌بینی ژنوم باکتری و مشخصات ترکیب جوامع میکروبی، داده‌های خام توسط نرم‌افزار MetaPhlAn2 نسخه ۲.۶.۶.۱۷ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مونتاژ ژنوم بیمارگرهای یافت شده‌ها با استفاده از نرم افزار Bowtie2 نسخه ۲.۵.۰، داده‌های خام NGS با ژنوم‌های مرجع که قبلاً در GenBank ثبت شده بود، هم‌ردیف‌سازی (Alignment) شد. سپس تمام خوانش‌های اصلاح شده توسط نرم‌افزار metaSPAdes نسخه ۳.۱۵.۴ برای مونتاژ استفاده شد. برای خوشه‌بندی توالی نوکلئوتیدی و بهبود تحلیل توالی‌های، همه کانتیگ‌ها با استفاده از نرم‌افزار CD-HIT نسخه ۴.۸.۱ خوشه‌بندی شدند. در نهایت تمامی ژنوم‌ها با داده‌های NCBI-Gen Bank مقایسه شدند. هم چنین، ژنوم‌ها با استفاده از ابزار آنلاین GhostKOALA حاشیه‌نویسی (Annotation) شدند. برای پیش‌بینی توالی پروتئین، از برنامه آنلاین MetaGeneMark استفاده شد. توالی‌های پروتئینی به دست آمده با استفاده از پایگاه داده GhostKOALA (https://www.kegg.jp/ghostkoala/) در معرض حاشیه‌نویسی (Annotation) قرار گرفتند. نتایج حاشیه‌نویسی GhostKOALA برای ژنوم‌های مونتاژ شده در جدول ۱ ذکر شده است. هم‌چنین، یک نمای کلی از حاشیه نویسی ژنوم‌ها در شکل ۳ ذکر شده است (۹).

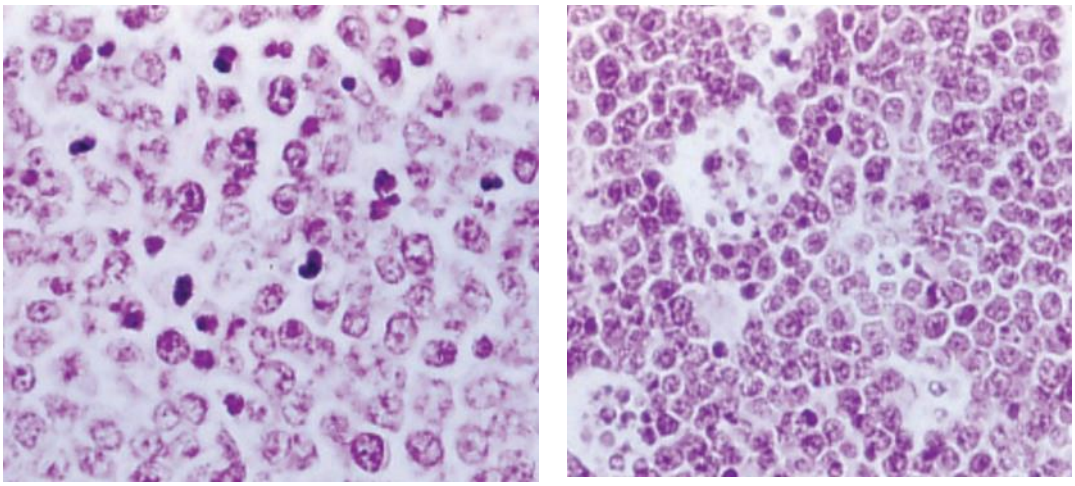
[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-06-18]

نتایج

در کل بیش از ۳۰ مزرعه سبزی به‌شدت آلوده در طی ۲ سال زراعی مورد بازدید قرار گرفت. از مجموع لاروهای جمع‌آوری شده تعداد ۵۲ لارو که علائمی از بیماری (نکروز در قسمت‌های از بدن، بی‌تحرکی، نرم بودن بدن، بد شکل و ...) را از خود نشان می‌دادند (شکل ۱) انتخاب و برای جداسازی عوامل بیمارگر احتمالی به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

شکل ۱: لارو ظاهراً آلوده *H. armigera* جمع‌آوری شده از مزارع استان آذربایجان‌شرقی

در طی آزمایش زیست‌سنجی از عصاره لاروهای مشکوک به آلودگی، مجموعاً ۷۵ جدایه باکتریایی و ۸ جدایه قارچی جداسازی شد. از بین این جدایه‌ها، ۱۵ جدایه باکتری و ۳ جدایه قارچی توان کشندگی لارو از ۲۵-۱۰٪ را نشان داد و هیچ‌کدام به‌عنوان بیمارگر قوی لارو کرم غوزه پنبه شناسایی نشدند. از عصاره ۱۲ لارو بیمار، علی‌رغم داشتن خاصیت بیماری‌زایی، هیچ باکتری یا قارچ با توان کشندگی قابل توجه جداسازی نشد. این احتمال وجود داشت که این لاروها آلوده به نوعی ویروس بیمارگر حشرات هستند. لذا برای اطمینان، عصاره‌ها از فیلتر زیستی ۰/۴۵µm عبور داده شدند. اگر عامل بیماری ویروسی بود می‌بایست پس از عبور داده شدن از فیلتر، عصاره کماکان خاصیت کشندگی حفظ کند؛ چرا که ویروس‌ها عموماً قادر به عبور از منافذ ۰/۴۵ میکرومتر می‌باشند لذا احتمالاً این عامل بیماری زا ویروسی نمی‌باشد. برای بررسی آلودگی با سایر عوامل بیماری‌زا، عصاره لاروهای آلوده پس از رنگ‌آمیزی زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت در همه این نمونه‌ها نوعی آلودگی داخلی با اسپورهای تیره مشاهده گردید (شکل ۲).



شکل ۲: رنگ‌آمیزی سلول‌های لاروهای بیمار *H. armigera* جمع‌آوری شده از مزارع استان آذربایجان‌شرقی

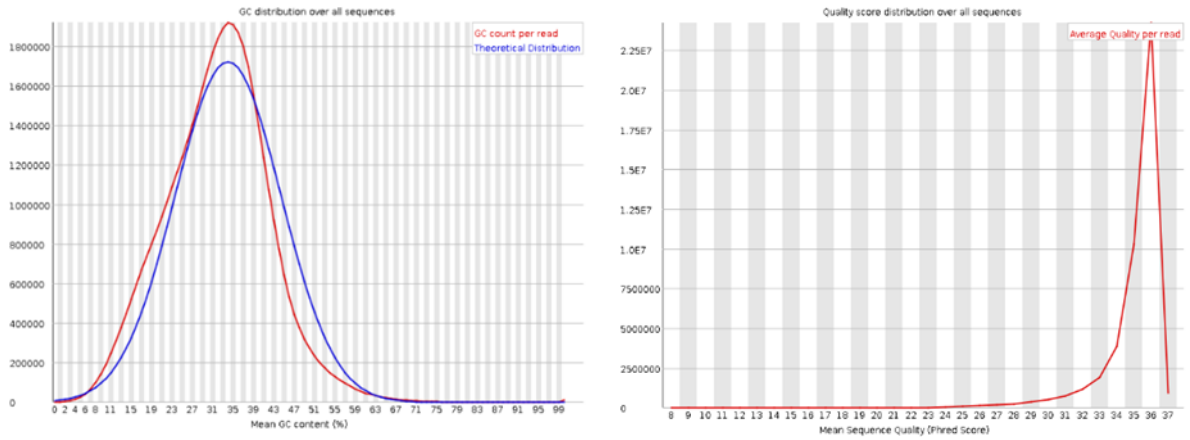
چون این عامل آلودگی ظاهراً غیرقابل کشت (حداقل در محیط‌های کشت معمول مورد استفاده در این تحقیق) بوده و از روی ظاهر آن‌ها زیر میکروسکوپ نوری امکان تشخیص حتی با روش PCR معمولی وجود نداشت؛ لذا ناچاراً از روش متاژنومیکس و توالی‌یابی نسل جدید کل ژنوم حشره استفاده گردید. DNA کل استخراج‌شده از لاروهای بیمار با استفاده از پلت‌فرم Illumine در معرض توالی‌یابی

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-06-18]

نسل جدید (NGS) قرار گرفتند. در نهایت داده‌های خام با حجم ۲ گیگابایت و ۲۱۱۷۸۲۴۸ جفت خوانش (Read) از هر تکرار به‌دست آمد. طول هر خوانش ۱۵۰ جفت باز و اندازه درج (insert size) ۳۵۰ جفت باز بود. آنالیز کیفیت خوانش ها حاکی از آن بود که محتوای GC کل ژنوم حدود ۳۵٪ می‌باشد و کیفیت خوانش‌ها (Phred quality score) بالا و قابل قبول است. در مرحله بعد، برای برآورد آماری جمعیت‌های میکروبی داخل ژنوم *H. armigera*، داده‌های خام NGS تحت آنالیز MetaPhlAn2 قرار گرفتند. نتایج نرم‌افزار MetaPhlan نشان داد در بین عوامل میکروبی شناسایی شده ۴/۷٪ محتوای ژنوم آنالیز شده، مربوط به گونه‌ای از پروتوزوئرهای هاگ‌دار (Apicomplexa) و از جنس *Plasmodium* و گونه *Plasmodium yoelii* بود. برای به دست آوردن خصوصیات ژنومی این گونه هاگ‌دار و مونتاژ ژنوم بیمارگر یافت شده از نرم‌افزار Bowtie2 استفاده گردید نتیجه آن به دست آمدن ۱۳۰۰ کانتیگ به اندازه کل ۷۴۰ هزار نوکلئوتید بود. تمام خوانش‌های اسمبل شده ابتدا توسط نرم‌افزار metaSPAdes سپس با استفاده از نرم‌افزار CD-HIT خوشه‌بندی شدند. نتیجه هم‌ردیف‌سازی تمامی کانتیگ‌ها با داده‌های NCBI-GenBank. حاکی از شباهت ۹۸/۸٪ داده‌های اسمبل شده در این تحقیق با جدایه‌ای از گونه *Plasmodium yoelii* با ژنوم ثبت شده در بانک ژن با کد دسترسی (accession number) UYID00000000.1 می‌باشد. براساس حاشیه نویسی NCBI PGAP حدود ۱۰۰۰ پروتئین در ژنوم *Plasmodium yoelii* شناسایی شد. تجزیه و تحلیل حاشیه‌نویسی در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱: پروتئین‌های *Plasmodium yoelii* شناسایی شده در بدن لاروهای بیمار *H. armigera* حاشیه‌نویسی شده (Annotated) براساس طبقه‌بندی KEGG

تعداد پروتئین شناسایی شده	نوع پروتیئن	مسیر متابولیکی
۴۹	پروتئین‌های ریبوزومی	
۴	پلی‌مراز RNAR	
۳	پلی‌مراز DNA	
۲۲	سنتتاز tRNA-آمینواستیل-	
۶	آنزیم‌های ۲-اکسی کربوکسیل اسید متابولیسم Orthologs, modules and networks	
۴۷۷	اورتولوژی KEGG	
	متابولیسم :خانواده‌های پروتئینی	
۲۷۷	آنزیم‌ها	
۱	پروتئین کینازها	
۴	گلایکوسیل ترنس‌فرازها	
۴	پروتئین فسفاتازها و پروتئین‌های مرتبط	
۱۴	پروتئین‌های لیپید بیوسنتز	
۴۲	پپتیدازها و بازدارنده‌ها	
۱۵	پروتئین‌های لیپو پلی‌ساکارید بیوسنتتاز	
۱۹	پروتئین‌های بیوسنتز و تجزیه پپتیدوگلایسین	
۷	پرنیل تزانسفراز	
۱۷	آنزیم‌های مرتبط با آمینواسید	
۱۲	پروتئین‌های فتوسنتزیز	



شکل ۳: آنالیز کیفیت داده‌های NGS با استفاده از نرم‌افزار FastQC

بحث

بهره‌برداری از عوامل میکروبی در مدیریت آفات گیاهی (IPM) یک اصل پذیرفته شده در بین گیاه‌پزشکان می‌باشد (۱۴، ۱۵، ۱۶).

هرچند استفاده از این عوامل با محدودیت‌های همراه است که مهم‌ترین آن‌ها کند بودن اثر آن‌ها در کشتن میزبان در مقایسه با ترکیبات شیمیایی و نیز بحث مقاومت به آن‌ها در طول زمان می‌باشد (۳). باکتری‌های بیمارگر حشرات پروکاریوت‌های تک سلولی هستند که

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-06-18]

مواد سمی تولید شده توسط آن‌ها موفق‌ترین حشره‌کش‌های میکروبی از نظر تجاری محسوب می‌شوند (۱۷). متابولیت‌های پروتینی تولید شده توسط گونه‌هایی از *Betaproteobacteria* دارای خاصیت حشره کشی بالایی هستند. باکتری‌های انتوموفاژی که در دفع آفات گیاهی اهمیت دارند به طور عمده مربوط به هفت خانواده Bacillaceae، Micrococcaceae، Enterobacteriaceae، Streptococcaceae، Lactobacteriaceae، Bacteriaceae و Pseudomonadaceae می‌باشند (۱۹). استفاده از باکتری‌های بیمارگر حشرات (*Enthomopathogenic bacteria*) به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک، یک روش جدید و در حال توسعه در کنترل آفات بوده و پیش‌بینی می‌شود، در آینده‌ای نزدیک تولید و کاربرد این عوامل با استفاده از روش‌های نوین بیوتکنولوژیکی پیشرفت‌های چشمگیری داشته باشد (۱۸). امروزه بیش از بیش از ۱۰۰ نوع باکتری بیماری‌زا شناخته شده است که در حشرات ایجاد بیماری می‌کنند (۲۳). باکتری‌های بیماری‌زا در اکثر محیط زیست‌ها مانند خاک، لاشه حشرات، بقایای گیاهی، گرد و خاک انبارهای مواد غذایی بافت می‌شوند. اکثر گونه‌های باکتریایی که قادر به ایجاد بیماری در حشرات می‌باشند تولید اسپور نمی‌کنند و پاتوژن اختیاری می‌باشند (۲۴). از جمله می‌توان به *Mattesia* cf. *geminate* از گروه هاگداران یا آپی‌کامپلکسا (Apicomplexa: Lipotrophidae) (۳۱) که پاتوژن مورچه‌ها و *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) که پاتوژن زنبور درودگر است اشاره کرد (۳۲). در بین عوامل میکروبی شناسایی شده ۴/۷٪ محتوای ژنوم آنالیز شده، گونه *Plasmodium yoelii* بود. این گونه از پروتوزواهای هاگ‌دار (Apicomplexa) و متعلق به جنس *Plasmodium* بوده و یک بیمارگر قوی حشرات به‌خصوص پشه مالاریا می‌باشد (۱۳، ۱۴) ولیکن همراهی یا آلوده کنندگی آن تاکنون از کرم غوزه پنبه گزارش نشده است و این اولین گزارش از احتمال بیماری زای این نوع هاگ‌دار در لاروهای کرم غوزه پنبه می‌باشد. در نتیجه این بررسی برای اولین بار در دنیا گونه جدیدی از یک بیمارگر اجباری شناسایی گردید که به‌طور اختصاصی فقط قادر به آلوده کردن کرم قوزه پنبه می‌باشد و هیچ گزارشی از ایجاد بیماری توسط این گونه در انسان یا دام‌ها یا حشرات مفید گزارش نشده است (۲۲، ۲۱). آفت *H. armigera* یکی از خسارت‌زاترین آفات گیاهی شناخته شده می‌باشد علی‌رغم ایجاد خسارت در به بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی انواع روش‌های کنترلی به‌کار برده شده است تاثیر کافی نداشته و این آفت هم‌چنان در حال خسارت زدن به محصولات کشاورزی می‌باشد (۱۷، ۱۸). یکی از امیدوارکننده‌ترین روش‌های کنترل این آفت استفاده از عوامل میکروبی می‌باشد (۱۹، ۲۰) از آن‌جایی که سرعت تکثیر و پراکنش جغرافیایی گونه *P. yoelii* بسیار گسترده و سریع بوده و می‌تواند به‌عنوان یک عامل بالقوه برای کنترل این آفت به‌کار برده شود. با توجه به ماهیت این میکروارگانیسم و پارازیت اجباری بودن آن، امکان ایجاد مقاومت علیه آن در حشره بسیار کم بوده و حشره به راحتی نمی‌تواند نسبت به این دشمن طبیعی مقاوم گردد (۲۱). لذا یافته‌های این تحقیق راهی نوین در کنترل این آفت بسیار خطرناک را ایجاد کرده است. مطالعه ژنوم این میکروارگانیسم راه را برای شناسایی عمیق‌تر نقاط قوت و ضعف آن هموار نموده و از این داده‌ها می‌توان در دستکارهای ژنتیکی و تولید عوامل میکروبی قوی‌تر استفاده نمود. تعداد زیادی از حشرات آفت میزبان‌های باکتری‌ها هستند ولی گونه‌های خاصی از این باکتری‌ها می‌توانند روی آفت میزبان ایجاد آلودگی کنند. بر این اساس شناسایی میکرو فون بدن آفت در برنامه مدیریت تلفیقی ضروری به‌نظر می‌رسد (۲۴). باکتری *Stenotrophomonas maltophilia* توسط Shinde و همکاران (۲۳) از سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera; Chrysomelidae) جداسازی و خاصیت بیماری‌زایی آن روی این حشره به اثبات رسید (۲۵) اثر آنتاگونیستی *S. maltophilia* روی قارچ‌های بیمارگر گیاهی مانند *Fusarium graminearum* و *Verticilium dahlia* نیز اثبات شده است با به‌کارگیری این باکتری در کنترل بیولژیک می‌توان بیماری‌های ایجاد شده توسط آن‌ها را کاهش داد (۲۶). باکتری *Serretia entomophila* در کشور زلاندنو به صورت تجاری علیه آفات مراتع استفاده شده است (۲۷). حشره‌کشی گونه‌های *Paenibacillus popilliae*، *Lysinibacillus sphaericus* و *Brevibacillus laterosporus* از سال‌ها قبل به‌ترتیب علیه سوسک ژاپنی، لارو پشه و بالپولکداران، دوبالان و سخت‌بالپوشان به‌اثبات رسیده و به‌صورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۸). برای نمونه اثر آنتاگونیستی *S. maltophilia* روی قارچ‌های بیمارگر گیاهی مانند *Fusarium graminearum* و *Verticilium dahlia* نیز اثبات شده است با به‌کارگیری این باکتری در کنترل بیولژیک می‌توان بیماری‌های ایجاد شده توسط آن‌ها را کاهش داد ترشح مواد بازدارنده رشد توسط باکتری *S. maltophilia* سبب افزایش توان رقابت و در نتیجه بقای آن در در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌های موجود در بدن میزبان می‌شود تحقیقات Xu و همکاران، روی لارو مگس *Stomoxys calcitrans* نشان داد که *S. maltophilia* هیپرپارازیت قارچ *B. bassiana* بوده و موجب تضعیف شدت بیماری‌زایی قارچ در حشره می‌شود (۲۹). این ترکیبات در کنترل انتخابی حشرات از پتانسیل بالایی برخوردار بوده و به‌دلیل بی‌خطر بودن اکثر آن‌ها برای انسان و جانوران خونگرم مورد توجه بوده است (۳۰). ترشح مواد بازدارنده رشد توسط باکتری *S. maltophilia* سبب افزایش توان رقابت و در نتیجه بقای آن در در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌های موجود در بدن میزبان می‌شود تحقیقات Zepeda-Paulo و Lavandero روی

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-06-18]

لارو مگس *Stomoxys calcitrans* نشان داد که *S. maltophilia* هیپرپارازیت قارچ *B. bassiana* بوده و موجب تضعیف شدت بیماری‌زایی قارچ در حشره می‌شود (۳۰).

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولان آزمایشگاه باکتری‌شناسی گیاهی دانشگاه تبریز و آزمایشگاه‌های بیماری‌های گیاهی و آفات گیاهی دانشگاه آزاد تبریز به خاطر فراهم نمودن امکان انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. **Ajamhassani, M., 2015.** Study on morphology and abundance of hemocytes in spurge hawk moth *Hyles euphorbiae* Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae). *Plant Protection* (*Scientific Journal of Agriculture*). 38(3): 49-62. (In Persian)
2. **Atashi, N., Shishehbor, P., Seraj, A.A., Rasekh, A., Hemmati, S.A. and Riddick, E.W., 2021.** Effects of *Helicoverpa armigera* egg age on development, reproduction, and life table parameters of *Trichogramma euproctidis*. *Insects*. 12(7): 569. doi: 10.3390/insects12070569
3. **Azizpour, N., Nematollahi, S., Khakvar, R., Jamshidi, M. and Norouzi-Beirami, M.H., 2022.** Identification of Endophytic Microbiota of Phytoplasma-Infected Russian Olive Trees "*Elaeagnus angustifolia* L." in the Northwest of Iran. *Forests*. 13(10): 1684. doi: 10.3390/f13101684
4. **Baghery, F., Fathipour, Y. and Naseri, B., 2013.** Nutritional indices of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on seeds of five host plants. *Applied Entomology and Phytopathology*. 80(2): 5-12. (In Persian)
5. **Banerjee, S., Hess, D., Majumder, P., Roy, D. and Das, S., 2004.** The Interactions of *Allium sativum* leaf agglutinin with a chaperonin group of unique receptor protein isolated from a bacterial endosymbiont of the mustard aphid. *J. Biol. Chem.* 279(22): 23782-23789. doi: 10.1074/jbc.M401405200
6. **Baumann, P., 2005.** Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 155-189. doi: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121041
7. **Carlton, J.M., Samuel, V., Angiuoli, B.B., Suh, T.W., Kooij, M.P., Joana, C. and Silva, M.D., 2002.** Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Nature*. 419: 512-519.
8. **Cordeau, S., Triolet, M., Wayman, S. and Steinberg, C., 2016.** Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. *Crop Protection*. 87: 44-49. doi: 10.1016/J.CROPRO.2016.04.016
9. **Douglas, A.E., 1998.** Nutritional interactions in insect microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu. Rev. Entomol*. 17-37.
10. **Du, M., Yu, J., Zhou, Y., Wang, X., Ma, T., Tan, X. and Zhou, H., 2020.** Differentiation of symbiotic bacteria is new evidence for two genetic clades of *Aphelinus mali* (Hymenoptera: Aphelinidae) in China. *Oriental Insects*. 54(4): 447-464. https://doi.org/10.1080/00305316.2019.1671252
11. **Ferrari, J. and Vavre, F., 2011.** Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 366(1569): 1389-1400. doi: 10.1098/rstb.2010.0226
12. **Gu, M., Xue, Z., Lv, S., Cai, Y., Zhang, L. and Gao, X., 2022.** *Corynebacterium* sp. 2-TD mediated toxicity of 2-Tridecanone to Helicoverpaarmigera. *Toxins*. 14(10): 698. doi: 10.3390/toxins14100698
13. **Jangra, S. and Ghosh, A., 2022.** Rapid and zero-cost DNA extraction from soft-bodied insects for routine PCR based applications. *PLoS ONE*. 17(7): e0271312. doi: 10.1371/journal.pone.0271312. eCollection 2022
14. **Kary, N.E., Alizadeh, Z. and Dunphy, G., 2022.** Evolutionary distinction between the geographical isolates of *Beauveria bassiana* from Iran and their efficacy against *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Tropical Insect Science*. 42: 2083-2092. doi: 10.1007/s42690-022-00729-2
15. **Kikuchi, Y., 2009.** Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and cultural-ability. *Microbes and Environments*. 24(3): 195-204. doi: 10.1264/jsme2.me09140s
16. **Kononchuk, A.K., Malysh, S.M., Rumiantseva, A.C., Kireeva, D.S., Gerus, A.V. and Zhuravlyov, V.S., 2022.** Molecular detection of endosymbionts in local populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in European part of Russia. *Herald of Plant Protection*. 105(1): 50-61. doi: 10.31993/2308-6459-2022.105-1-15260
17. **Lamelas, A., Gosalbes, M.J., Manzano-Marín, A., Peretó, J., Moya, A. and Latorre, A., 2011.** *Serratia symbiotica* from the *Aphid Cinaracedri*: A missing link from facultative to obligate insect endosymbiont. *PLOS Genetics*. 7(11): e1002357. doi: 10.1371/journal.pgen.1002357
18. **Mojeni, T.D., Bayat, A.H., Nouri, G.G. and Shojaei, M., 2005.** Study on bioregional aspects of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hb. (Lepidoptera: Noctuidae), in the cotton fields of Golestan province. *The J. Agri. Sci.* 97-115.
19. **Moran, N.A., McCutcheon, J.P. and Nakabachi, A., 2008.** Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu. Rev. Genet.* 42*:* 165-190. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130119
20. **Moran, N.A., Russell, J.A., Koga, R. and Fukatsu, T.T., 2005.** Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(6): 3302-3310. doi: 10.1128/AEM.71.6.3302-3310.2005
21. **Perera, O.P., Allen, K.C., Jain, D., Purcell, M., Little, N.S. and Luttrell, R.G., 2015.** Rapid identification of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera) using ribosomal RNA internal transcribed spacer 1. *Journal of Insect Science*. 15: 1-10. doi: 10.1093/jisesa
22. **Sabri, A., Leroy, P., Haubruge, E., Hance, T., Frère, I., Destain, J. and Thonart, P., 2011.** Isolation, pure culture and characterization of *Serratia symbiotica* sp. nov., the R-type of secondary endosymbiont of the black bean aphid Aphis fabae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61(9): 2081-2088. doi: 10.1099/ijs.0.024133-0

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-06-18]

23. **Shinde, A.A., Shaikh, F.K., Gadge, P.P., Padul, M.V., Govindwar, S.P. and Kachole, M.S., 2019.** Conserved nature of *Helicoverpa armigera* gut bacterial flora on different host plants and in vitro interactions with PI proteins advocates role in host digestive physiology. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 18(2): 141-149. doi: 10.1016/j.jssas.2017.03.004

24. **Sinden, R.E., 2002.** Molecular interactions between Plasmodium and its insect vectors. *Cel Microbiol*. 4(11): 713-724. doi: 10.1046/j.1462-5822.2002.00229.x

25. **Skaljac, M., Kirfel, P., Grotmann, J. and Vilcinskas, A., 2018.** Fitness costs of infection with *Serratia symbiotica* are associated with greater susceptibility to insecticides in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Pest Management Science.* 74(8): 1829-1836. doi: 10.1002/ps.4881

26. **Vigneron, A. and Kaltenpoth, M., 2022.** Symbiosis: Creating a tractable intracellular insect-microbe association. *Current Biology*. 32(18): 943-946. doi: 10.1016/j.cub.2022.08.011

27. **Wang, Y., Cai, Q.N., Zhang, Q.W. and Han, Y., 2006.** Effect of the secondary substances from wheat on the growth and digestive physiology of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Entomology*. 103(1): 255-258. doi: 10.14411/eje.2006.030

28. **Xiang, H., Wei, G.F., Jia, S., Huang, J., Miao, X.X., Zhou, Z., Zhao, L.P. and Huang, Y.P., 2006.** Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Canadian Journal of Microbiology.* 52(11): 1085-1092. doi: 10.1139/w06-064

29. **Xu, P., Liu, Y., Graham, R.I., Wilson, K. and Wu, K., 2014.** Densovirus is a mutualistic symbiont of a global crop pest (*Helicoverpa armigera*) and protects against a baculovirus and BT biopesticide. *PLoSPathog*. 10(10): e1004490. doi: 10.1371/journal.ppat.100449

30. **Zepeda-Paulo, F. and Lavandero, B., 2023.** Diversity of endosymbiotic bacteria in the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) on alfalfa in Chile. *Chilean journal of agricultural research*. 83(1): 63-69. doi: 10.4067/S0718-58392023000100063

31. **Yaman, M., Kıran, K. and Radek, R., 2023.** *Mattesia* cf. *geminata*, an ant-pathogenic neogregarine (Apicomplexa: Lipotrophidae) in two *Temnothorax* species (Hymenoptera: Formicidae). *Parasitol Research.* 122(7): 1573-1579. doi: 10.1007/s00436-023-07860-0

32. **Plischuk, S., Quintana, S., Fernandez De Landa, G., Revainera, P.D., Haramboure, M. and Lange, C.E., 2023.** Detection of *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) in carpenter bees of Argentina. *International Journal of Parasitol Parasites Wildl*. 21: 43-46. doi: 10.1016/j.ijppaw.2023.03.008.

33. **Ibrahim, M.A., Griko, N., Junker, M. and Bulla, L.A., 2010.** *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*. 1(1): 31-50. doi: 10.4161/bbug.1.1.10519

34. **Ishiwata, S., 1901.** On a kind of severe flacherie (sotto disease). DainihonSanshi Kaiho. 114: 1e5.

35. **Yaman, M., Aslan, I., Çalmaşur, Ö. and Sahin, F., 2005.** Two bacterial pathogens of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 107(3): 623-626.

[Downloaded from www.journalaer.com on 2026-06-18]