

تأثیر میزان رطوبت، بستر کشت و مکمل‌های غذایی روی کنیدیوم‌زایی و زهرآگینی قارچ *Beauveria bassiana* علیه سفیدبالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum*

سعیده جاویر[✉]، شهرام فرخی، شهرام نعیمی، مریم کلانتری جوشانی

مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. sajavar@gmail.com[✉]

دریافت: ۱۴۰۰/۴/۲۱ بازنگری: ۱۴۰۰/۵/۲۰ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱۹

چکیده

ارزیابی تأثیر بسترهای کشت ارزان قیمت روی میزان کنیدیوم‌زایی و بیماری‌گری قارچ بیمارگر حشرات، برای تولید انبوه با صرفه اقتصادی الزامی است. هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر میزان رطوبت، نوع بستر کشت و مکمل‌های غذایی روی کنیدیوم‌زایی و زهرآگینی قارچ *Beauveria bassiana* علیه آفت سفیدبالک گلخانه بود. در ابتدا نیاز آبی جدایه A₁₋₁ از قارچ *B. bassiana* برای تولید انبوه روی سبوس گندم، سبوس برنج، سبوس ذرت، شلتوک برنج، جو پرک و بقایای جو مصرف شده در انسکتاریوم در نسبت‌های ۱:۰/۵، ۱:۱ و ۱:۱/۵ (آب مقطر: بستر کشت) بررسی شد. سپس تأثیر مکمل‌های غذایی آب پنیر و ملاس چغندر قند روی میزان کنیدیوم‌زایی این قارچ ارزیابی گردید. همچنین زهرآگینی کنیدیوم‌های برداشت شده از بسترهای مختلف روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه در آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد. سبوس گندم و سبوس برنج با نسبت آبی ۱:۰/۵ (آب مقطر: بستر کشت) با میانگین تولید کنیدیوم به ترتیب $5/1 \times 10^{10}$ و $5/3 \times 10^{10}$ و هر گرم از بستر کشت، بیشترین میزان تولید کنیدیوم را داشتند. در آزمایش تأثیر مکمل‌های غذایی، به غیر از بستر جو پرک، افزودن آب پنیر موجب افزایش میزان تولید کنیدیوم در بسترهای مختلف گردید. در زیست‌سنجی آزمایشگاهی، کلیه تیمارها بین ۸۰ تا ۸۷ درصد تلفات نشان دادند اما در زیست‌سنجی گلخانه‌ای، کنیدیوم تولید شده روی سبوس برنج، سبوس ذرت و سبوس گندم به ترتیب با $1/87 \pm 56$ ، $2/54 \pm 52$ و $2/91 \pm 49$ درصد مرگ و میر بالاترین میزان تلفات را ایجاد کردند. براساس نتایج این پژوهش سبوس برنج، سبوس ذرت و سبوس گندم به‌عنوان بسترهای مناسب برای این جدایه قارچی معرفی می‌شوند.

کلمات کلیدی: آفت‌کش زیستی، بستر جامد، تولید انبوه، زیست‌سنجی، کنترل زیستی

Effect of moisture content, substrate and nutritional supplements on condition and virulence of *Beauveria bassiana* against greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*

Saeedeh Javar[✉], Shahram Farrokhi, Shahram Naeimi, Maryam Kalantari Jooshani

Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. sajavar@gmail.com[✉]

Received: 12 July 2021

Revised: 11 Aug 2021

Accepted: 10 Sep 2021

Abstract

For cost-effective mass production of entomopathogenic fungi, it is necessary to evaluate the effect of a low-cost culture media on condition and virulence of entomopathogenic fungi. The objective of this research was to evaluate the effect of moisture content, substrate and nutritional supplements on condition and virulence of *Beauveria bassiana* against greenhouse whitefly. The water requirement of *B. bassiana* A₁₋₁ for mass production on wheat bran, rice bran, corn bran, rice husk, rolled oat, and the used barley residues in insectariums, was initially evaluated at the ratio of 0.5:1, 1:1 and 1.5:1 (distilled water: culture medium). Then, the effect of whey and molasses on the condition of this fungus was evaluated. The virulence of conidia harvested from wheat bran, rice bran, corn bran and barley substrates was also investigated on greenhouse whitefly nymphs in laboratory and greenhouse conditions. Wheat bran and rice bran in water ratio of 0.5:1 (distilled water: culture medium) showed the highest yield with an average of 5.3×10^{10} and 5.1×10^{10} conidia per gram of substrate, respectively. In the test of the effect of nutritional supplements, except to barley substrate, the addition of whey increased the condition in other substrates. In laboratory bioassay, all treatments showed between 80 and 87% mortality, but in the greenhouse bioassays, the produced conidia on rice bran, corn bran and wheat bran caused 56 ± 1.87 , 52 ± 2.54 and $49 \pm 2.91\%$ mortality, respectively. According to results, rice bran, corn bran and wheat bran are introduced as suitable substrates for mass production of the studied fungal isolate.

Keywords: Biological control, Bioassay, Biopesticide, Mass production, Solid substrate

How to cite:

Javar S, Farrokhi Sh, Naeimi Sh, Kalantari Jooshani M, 2022. Effect of moisture content, substrates and nutritional supplements on condition and virulence of *Beauveria bassiana* against greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (2): 57–66.

مقدمه

سپروفیت بالا است (Jackson *et al.* 1997; Jackson *et al.* 2010; Mascarin & Jaronski 2016). بررسی سوابق و منابع مختلف علمی نشان داد که بیشترین تحقیق صورت گرفته در زمینه بسترهای کشت مناسب برای تکثیر قارچ‌های بیمارگر حشرات، روی قارچ *Beauveria bassiana* Vuill. (Bals.) بوده است. معمول‌ترین بستر کشت برای تولید انبوه قارچ *B. bassiana*، برنج است (Jenkins *et al.* 1998; Tarocco *et al.* 2005; Ye *et al.* 2006; Posada-Florez 2008). به‌منظور دستیابی به بستر کشت ارزان‌قیمت و با صرفه اقتصادی، تحقیقات مختلف در زمینه استفاده از بقایای گیاهی مختلف به‌عنوان بستر کشت جامد صورت گرفته است. در بین این مواد، انواع غلات نظیر گندم، سورگوم، جو، ذرت، ارزن، یولاف، و سایر مواد گیاهی نظیر سیب زمینی، نان، بادام زمینی، لوبیا و غیره دیده می‌شود (Jenkins *et al.* 1998; Feng *et al.* 1994; Abraham *et al.* 2003; Asgari *et al.* 2009; Lopez-Perez *et al.* 2015). همچنین محیط‌های غذایی مختلف شامل آرد گندم، سبوس گندم، آرد برنج، سبوس برنج، شلتوک برنج، ارزن و آرد ذرت برای تولید کنیدیوم‌های هوایی دو جدایه از قارچ *B. bassiana* به روش تخمیر دو فازی مایع-جامد مورد ارزیابی قرار گرفته است که سبوس گندم بیشترین میزان تولید کنیدیوم را نشان داده است (Bena-Molaei *et al.* 2011). محصولات جانبی کشاورزی مختلف شامل پنج ماده جامد شامل خاک الیاف نارگیل، خاک اره، تفاله چای، قسمت‌های دور ریختنی ذرت، کنجاله و دو ماده مایع شامل آب نارگیل و ملاس برای تولید انبوه قارچ *B. bassiana* مورد ارزیابی قرار گرفته که بیشترین تعداد کنیدیوم، در بستر کشت ملاس $10^{13} \times 6/9$ کنیدیوم در هر میلی‌لیتر به‌دست آمده است (Subasinghe *et al.* 2013). در زمینه سایر قارچ‌های بیمارگر حشرات، ضایعات مختلف محصولات کشاورزی و صنایع مانند سبوس گندم، ضایعات ماکارونی، کاه و پوست سیب‌زمینی برای تولید کنیدیوم قارچ‌های *B. bassiana* و *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin مورد ارزیابی قرار گرفته که بیشترین تولید کنیدیوم قارچ *B. bassiana* در بستر سبوس گندم و قارچ *M. anisopliae* در بستر ضایعات ماکارونی مشاهده شد (Bigham & Talaei-Hassanloui 2017). افزودن مکمل‌های غذایی مختلف نیز در میزان تولید کنیدیوم قارچ‌ها موثر بوده است. اضافه کردن مواد مکمل غذایی مانند اوره، ساکارز و آب پنیر به میزان مختلف به بسترهای کشت جامد نشان داده است که

از مشکلات اساسی تولید محصولات گلخانه‌ای وجود آفات چون سفیدبالک *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) است که سالانه خسارات زیادی را به محصول وارد می‌کند (Hamdi *et al.* 2011) در حال حاضر، برای کنترل این آفت در درجه اول از آفت‌کش‌های شیمیایی استفاده می‌شود که با توجه به مقاوم شدن سریع سفیدبالک به این سموم و نیز مخاطرات زیست محیطی استفاده از سموم شیمیایی، تحقیق و توسعه روش‌های کنترل جایگزین و مناسب از لحاظ زیست محیطی را می‌طلبد. با توجه به اینکه سفیدبالک با استفاده از قطعات دهانی زنده-مکنده با فرو بردن قطعات دهانی خود به بافت آوندی گیاه، از شیره نباتی تغذیه می‌کند برای کنترل این آفت، استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات که از طریق تماسی عمل می‌کنند منطقی به نظر می‌رسد (Fransen 1990). برای استفاده از این قارچ‌ها به‌عنوان عامل کنترل زیستی تجاری، تولید انبوه آنها الزامی است. تولید انبوه قارچ‌ها در شرایط تخمیری در محیط مایع و یا تکثیر در محیط جامد صورت می‌گیرد که هر یک از این روش‌ها مزایا و معایب خود را دارند. فرآورده‌ی نهایی تخمیر مایع بیشتر بلاستوسپور می‌باشد که نسبت به کنیدیوم‌های هوایی بیشتر پخش می‌شود، اما برای استفاده از آنها روش‌های خاصی برای مقاوم کردن در مقابل خشک شدن لازم است. نیاز به زمان کمتر برای تکثیر، کنترل بهتر آلودگی‌های سپروفیت و نیاز به هزینه کمتر در تولید صنعتی از مزایای تولید در شرایط تخمیر مایع می‌باشد. ماحصل تولید در شرایط تکثیر در بستر جامد تولید کنیدیوم‌های هوایی است. تولید و فرمولاسیون آن ساده‌تر اما نیاز به زمان طولانی برای تکثیر، احتمال آلودگی به قارچ‌های سپروفیت و همچنین هزینه کارگری بالا برای تولید صنعتی آن از چالش‌های این روش تولید می‌باشد (Ravensberg 2011). در سامانه‌های صنعتی، روش تخمیر دو مرحله‌ای بیشتر مورد توجه است بدین صورت که میسلیم در محیط مایع درون ارلن‌های متحرک یا فرمانتورها تولید شده و برای تولید کنیدیوم به محیط کشت جامد انتقال می‌یابند. این روش تخمیر دو مرحله‌ای، مزایای تولید انبوه در تخمیر مایع و تولید کنیدیوم‌های هوایی پایدار آب‌گریز روی بستر جامد را به‌طور همزمان دارا می‌باشد. از مشکلات و معایب این روش می‌توان گفت که چون تکثیر در دو مرحله صورت می‌گیرد، نیاز به زمان بیشتری برای تکثیر دارد و هم امکان آلودگی محیط کشت به قارچ‌های

Agar (PDA) کشت شد و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۴-۱۲ روز در شرایط تاریکی نگهداری شد.

ایجاد کلنی سفیدبالک گلخانه

حشرات کامل سفیدبالک گلخانه *T. vaporariorum*، از گلخانه گوجه‌فرنگی هشتگرد جمع‌آوری شد. پرورش و ایجاد کلنی آن روی توتون رقم وایت بارلی در گلخانه (۵ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰ ± ۵ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی) صورت گرفت.

تعیین رطوبت مناسب برای بسترهای کشت مختلف

بسترهای کشت مورد استفاده در این تحقیق شامل سبوس گندم، سبوس برنج، سبوس ذرت، شلتوک برنج، جو پرک و بقایای جو مصرف شده در انسکتاریوم پرورش بید غلات (که از این پس جو نامیده می‌شود) بودند که برای آماده کردن آنها مطابق با روش El Damir (2006) انجام شد به این صورت که ۱۰۰ گرم از بستر-های کشت با نسبت های ۱:۰/۵، ۱:۱ و ۱:۱/۵ (آب مقطرسترون: بستر کشت) به داخل کیسه‌های نایلونی قابل اتوکلاو به ابعاد ۳۰ × ۴۰ سانتی‌متر منتقل شدند. پس از بستن در کیسه‌ها و قراردادن مقداری پنبه برای هوادهی، به مدت ۴۵ دقیقه در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر سترون شدند. مواد غذایی داخل کیسه‌ها با چهار دیسک به قطر ۱۰ میلی‌متر از محیط کشت ۱۴ روزه قارچ مایه‌کوبی شده و سپس داخل انکوباتور با دمای ۲۵ ± ۵ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی به مدت ۲۰ روز قرار داده شدند. هر سه روز یکبار کیسه‌ها با دست از بیرون کیسه مخلوط شدند تا کنیدیوم‌ها کاملاً در کیسه پخش شوند. برای ارزیابی میزان تولید کنیدیوم، مقدار یک گرم از هر تیمار را در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ ریخته و کاملاً با ورتکس به هم زده شد تا کنیدیوم‌های موجود در سطح بسترها در آب غوطه‌ور و جدا شوند. سوسپانسیون به‌دست آمده، از پارچه ملامل سه لایه عبور داده و یک میلی‌لیتر از آن در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. غلظت کنیدیوم‌ها در هر میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسیتومتر تخمین و سپس مقدار کنیدیوم تولید شده به ازای هر گرم محیط کشت محاسبه شد. آزمایش در چهار تکرار صورت گرفت.

افزودن مکمل‌های غذایی به بسترهای کشت

افزودن آب پنیر هشت درصد تاثیر معنی‌داری در میزان کنیدیوم-زایی قارچ دارد (Bigham & Talaei-Hassanloui 2017).

نتایج بررسی‌ها نشان داده است که هرچند انتخاب بستر کشت یک اصل مهم است اما نیاز غذایی بر اساس جنس، گونه و حتی جدایه قارچی متفاوت است. میزان تولید کنیدیوم برای دو جدایه مختلف از قارچ *B. bassiana* (EUT105, EUT116) روی بسترهای کشت مختلف متفاوت بود به‌طوری‌که بیشترین و کمترین میزان تولید کنیدیوم در جدایه EUT105، به ترتیب روی سبوس گندم و شلتوک برنج و برای جدایه EUT116، به ترتیب روی سبوس گندم و ارزن به‌دست آمد (Bena-Molaei et al. 2011). تحقیقات نشان داده است که نوع بستر کشت روی میزان زهرآگینی قارچ بیمارگر حشرات نیز تاثیر می‌گذارد. به‌عنوان مثال در جدایه‌ای از قارچ *B. bassiana* کنیدیوم‌های برداشت شده از دانه‌های گندم اثر زهرآگینی بالاتری را روی لاروهای سن پنجم شب‌پره دم‌قهوه‌ای نشان دادند، در حالی که کنیدیوم‌های برداشت شده از روی برنج پایین‌ترین تلفات را داشتند (Bena-Molaei et al. 2011).

بنابراین، لازم است برای تولید انبوه یک جدایه بومی از قارچ بیمارگر، میزان تولید کنیدیوم روی بسترهای کشت مختلف و زهرآگینی آن ارزیابی شود تا مناسب‌ترین بستر کشت انتخاب شود. هدف از انجام این تحقیق، در ابتدا بررسی نیاز آبی جدایه A₁₋₁ از قارچ *B. bassiana* برای تولید انبوه روی سبوس گندم، سبوس برنج، سبوس ذرت، شلتوک برنج، جو پرک و بقایای جو مصرف شده در انسکتاریوم در نسبت‌های ۱:۰/۵، ۱:۱ و ۱:۱/۵ (آب مقطر: بستر کشت) می‌باشد. سپس تاثیر افزودن مکمل‌های غذایی آب پنیر هشت درصد و ملاس چغندر قند پنج درصد و مخلوط آب پنیر و ملاس به بسترهای مختلف روی میزان کنیدیوم‌زایی این قارچ ارزیابی گردید. همچنین زهرآگینی کنیدیوم‌های برداشت شده از بسترهای مختلف روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جدایه قارچی

در این پژوهش از جدایه (A₁₋₁) قارچ *B. bassiana* که در پژوهش قبلی (Javar et al. 2019) بهترین عملکرد را روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه نشان داده بود، استفاده شد. جدایه قارچی مورد نظر در محیط سیب زمینی- دکستروز-آگار Potato Dextrose

درصد و ۱۶ ساعت روشنایی) قرار گرفته، پس از ۴۸ ساعت و تخم-ریزی حشرات بالغ در سطح پشتی برگ لوبیا، گلدان‌ها از کلنی خارج و در گلخانه در داخل قفس عاری از هر گونه آلودگی قرار داده شدند. با سپری شدن دوره انکوباسیون تخم و ظهور اکثر پوره-های سن سوم، آزمایش با اسپورپاشی غلظت 10^7 کنیدیوم در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های قارچی منتخب در پنج تکرار (هر تکرار شامل یک برگ لوبیا) انجام شد. تعداد پوره‌ها قبل از انجام آزمایش روی برگ‌های مشخص شده، با استفاده از ذره‌بین شمارش شدند. هفت روز پس از اسپورپاشی، نمونه‌های برگ‌ها به آزمایشگاه منتقل و تعداد سفیدبالک مرده و زنده زیر استرنومیکروسکوپ شمارش شد. پوره‌های سفیدبالک خشک شده و تغییر رنگ داده و یا پوره‌های پوشیده شده با میسلیم قارچی سفیدرنگ به‌عنوان پوره‌های مرده در نظر گرفته شد.

تجزیه آماری

در آزمایش‌های تعیین رطوبت و افزودن مکمل‌های غذایی به بستر کشت جامد از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. آزمایش‌های زیست‌سنجی در قالب طرح کاملاً تصادفی و در پنج تکرار انجام شد. در آزمایش‌های زیست‌سنجی از تجزیه واریانس (ANOVA) استفاده شده، درصد مرگ و میر پوره‌های سفیدبالک بر اساس فرمول ابوت تصحیح و مقایسه میانگین درصد تلفات آفات با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد با نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل صورت گرفت.

نتایج

نیاز آبی بسترهای کشت مختلف

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر بسترهای کشت مختلف، مقدار رطوبت و اثر متقابل آنها در تولید کنیدیوم معنی-دار است (جدول ۱).

در این قسمت، از ملاس چغندر قند پنج درصد، آب پنیر هشت درصد و مخلوط ملاس پنج درصد و آب پنیر هشت درصد به‌عنوان مکمل برای بسترهای کشت استفاده شد. ملاس چغندر قند و آب پنیر به ترتیب از بازار و کارخانه پنیرسازی آشوراده استان گلستان تهیه شدند. پس از تهیه درصدهای ذکر شده از مکمل‌ها، مکمل‌ها با بهترین نسبت آبی یا رطوبت به‌دست آمده از آزمایش قبلی، به بسترهای جامد اضافه شدند. تمام مراحل بسته‌بندی کیسه‌ها، سترون کردن، مایه‌کوبی بسترها و شمارش کنیدی مانند مرحله قبل انجام شد.

آزمایش‌های زیست‌سنجی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

در این آزمایش از بسترهایی که در آزمایش‌های قبل، تولید کنیدیوم بیشتری را داشتند، استفاده شد. در زیست‌سنجی آزمایشگاهی مطابق روش (Oreste et al. 2016) انجام شد. برای تامین جمعیت هم‌سن سفیدبالک و انجام زیست‌سنجی، گلدان‌های چهار برگ لوبیا سبز به مدت ۲۴ ساعت در داخل کلنی پرورش سفیدبالک قرار گرفته، پس از تخم‌ریزی حشرات بالغ، گلدان‌ها از کلنی خارج شده و در قفس عاری از هر گونه آلودگی قرار گرفتند. با سپری شدن دوره انکوباسیون تخم و ظهور اکثر پوره‌های سن سوم، دواگیری از برگ به قطر تقریبی ۳۰ میلی‌متر تهیه شد. دیسک-های برگ حاوی پوره‌های سن سوم با سوسپانسیون قارچی با غلظت 10^7 کنیدیوم در هر میلی‌لیتر با استفاده از پاشنده دستی اسپری شد و سپس دیسک‌ها برای مدت پنج دقیقه روی کاغذ صافی برای جذب رطوبت اضافی قرار گرفته و نهایتاً به ظروف پتری حاوی آب آگار دو درصد انتقال داده شدند و داخل انکوباتور با شرایط دمایی 26 ± 5 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 5 ± 60 درصد و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند. تعداد مرگ و میر روزانه برای مدت هشت روز بررسی و ثبت شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و در پنج تکرار همراه با یک تیمار شاهد انجام شد. برای انجام زیست‌سنجی در شرایط گلخانه تحت شرایط محیطی کنترل شده با رطوبت نسبی 5 ± 60 درصد، دمای 5 ± 25 درجه سلسیوس و دارای نور طبیعی، بذر لوبیا در گلدان‌هایی به قطر ۳۰ سانتی‌متر کاشته شده و پس از رسیدن بوته‌های لوبیا به مرحله چندبرگی، گلدان‌ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل کلنی پرورش (دما 5 ± 25 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 5 ± 60

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر رطوبت و بسترهای کشت در تولید کنیدی قارچ *Beauveria bassiana*.

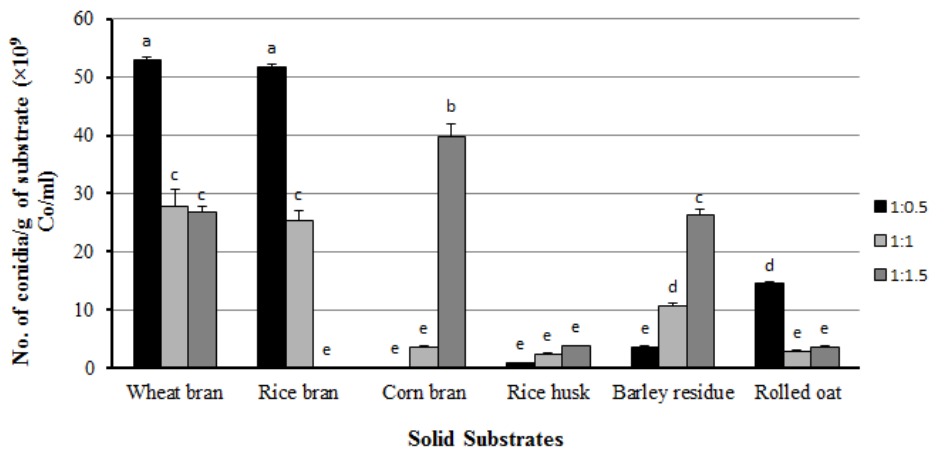
Table 1. Variance analysis of the effect of moisture content and substrates on conidiation of *Beauveria bassiana*.

Source of variation	Degree of freedom	Mean squares
Moisture	2	444.496*
Substrates	5	1823.526*
Moisture × Substrates	10	1150.615*
Experimental error	54	4.616
Coefficient of Variation (%)		8.07

*Represents significant at 5% probability level.

کنیدیوم را داشتند (شکل ۱). کمترین میزان تولید کنیدیوم قارچ در بستر سیوس برنج با بیشترین مقدار رطوبت یا نسبت آبی ۱:۱/۵ (آب مقطر: بستر کشت) (در این بستر قارچ رشد نکرد) و سیوس ذرت با نسبت آبی ۱:۰/۵ (آب مقطر: بستر کشت) با میزان تولید $۱۰^۸ \times ۲/۶$ کنیدیوم به ازای هر گرم محیط غذایی مشاهده شد.

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی، تیمارها را در پنج سطح آماری گروه‌بندی نمود ($P < 0.05$). سیوس گندم و سیوس برنج با کمترین میزان رطوبت یا نسبت آبی ۱:۰/۵ (آب مقطر: بستر کشت) با میانگین تولید کنیدیوم به ترتیب $۱۰^{۱۰} \times ۵/۳$ و $۱۰^{۱۰} \times ۵/۱$ کنیدیوم به ازای هر گرم محیط غذایی، بیشترین میزان تولید



شکل ۱. میزان تولید کنیدیوم قارچ *Beauveria bassiana* روی بسترهای جامد مختلف با نسبت آب مختلف. حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$: Tukey HSD).

Figure 1. Conidial production of *Beauveria bassiana* on different solid substrates with different water level. Values given with different letters are significantly different (Tukey HSD, $P < 0.05$).

میزان تولید کنیدیوم در بستر سیوس گندم به میزان $۸/۹ \times ۱۰^{۱۰}$ کنیدیوم به ازای هر گرم محیط غذایی و سپس به ترتیب در بسترهای سیوس برنج و سیوس ذرت ($۶/۲ \times ۱۰^{۱۰}$ و $۵/۷ \times ۱۰^{۱۰}$ کنیدیوم به ازای هر گرم محیط غذایی) با افزودن آب پنیر بدست آمد. کمترین میزان تولید کنیدیوم در بستر جوپرک ($۱/۱ \times ۱۰^۹$ کنیدیوم به ازای هر گرم محیط غذایی) به دست آمد. با توجه به شکل ۲، افزودن مکمل‌های غذایی تاثیر معنی‌داری در تولید کنیدیوم در بستر شلتوک برنج نداشت.

افزودن مکمل‌های غذایی به بسترهای کشت

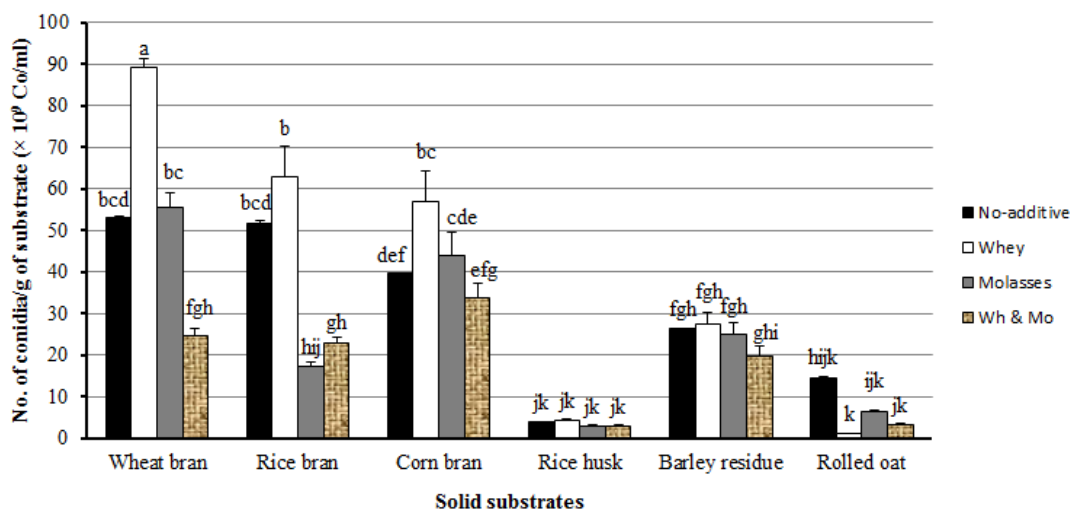
نتایج تجزیه واریانس افزودن مکمل‌های غذایی (ملاس چغندر قند پنج درصد، آب پنیر هشت درصد و مخلوط ملاس و آب پنیر) به بسترهای کشت نشان داد که اثر بسترهای کشت مختلف، مکمل‌های غذایی و اثر متقابل آنها در تولید کنیدیوم معنی‌دار ($P < 0.05$) است (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها به روش توکی نشان داد که به غیر از بستر جوپرک، افزودن آب پنیر موجب افزایش میزان تولید کنیدیوم در بسترهای مختلف شده است (شکل ۲). بیشترین

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر مکمل‌های غذایی و بسترهای کشت در تولید کنیدی قارچ *Beauveria bassiana*.

Table 2. Variance analysis of the effect of additives and substrates on conidiation of *Beauveria bassiana*.

Source of variation	Degree of freedom	Mean squares
Additives	3	2177.09*
Substrates	5	7065.61*
Additives × Substrates	15	625.149*
Experimental error	72	33.231
Coefficient of Variation (%)		13.83

*represents significant at 5% probability level.



شکل ۲. میزان تولید کنیدیوم قارچ *Beauveria bassiana* روی بسترهای جامد مختلف با افزودن مکمل‌های مختلف. حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$: Tukey HSD).

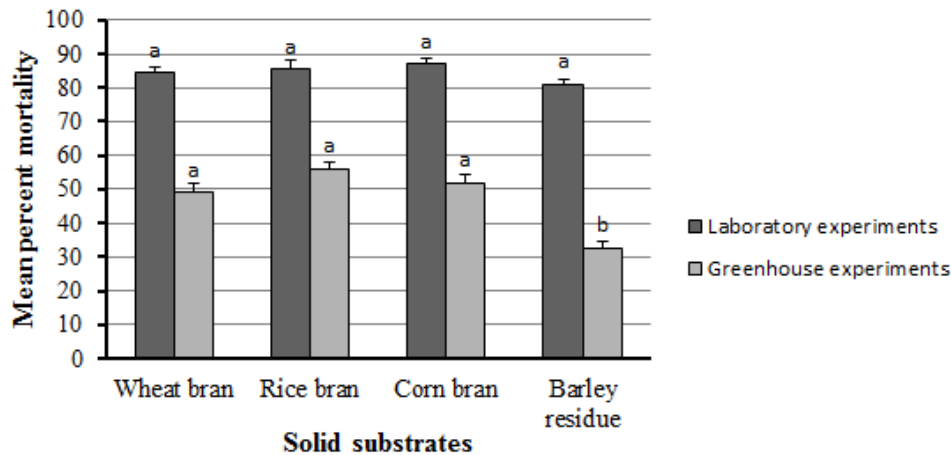
Figure 1. Conidial production rate of *Beauveria bassiana* on different solid substrates by adding different additives. Values given with different letters are significantly different (Tukey HSD, $P < 0.05$).

گلخانه در شرایط آزمایشگاهی وجود ندارد ($P < 1.859$, $df = 3$) و کلیه تیمارها بدون اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بین ۸۰ تا ۸۷ درصد تلفات روی پوره‌های سفید بالک در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی نشان دادند. نتایج آزمایش‌های زیست‌سنجی در شرایط گلخانه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین میزان تاثیر کنیدیوم‌های برداشت شده از روی بسترهای مختلف روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه وجود دارد ($F = 3$, $df = 3$, $P < 0.00$). کنیدیوم تولید شده روی بسترهای سبوس برنج، سبوس ذرت و سبوس گندم به ترتیب با میانگین درصد مرگ و میر $1/87 \pm 56$ ، $2/54 \pm 52$ و $2/91 \pm 49$ درصد بدون اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بالاترین میزان تلفات و کنیدیوم‌های تولید شده روی بستر جو با میانگین درصد مرگ و

آزمایش‌های زیست‌سنجی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای با توجه به شکل ۲، قارچ *B. bassiana* روی بسترهای سبوس گندم، سبوس برنج، سبوس ذرت و جو با اضافه شدن آب پنیر هشت درصد میزان تولید کنیدیوم بالایی را نشان دادند که از این بسترها به منظور تعیین میزان تاثیر بسترهای کشت در میزان زهرآگینی جدایه قارچی استفاده شد. میانگین درصد مرگ و میر کنیدیوم‌های برداشت شده از بسترهای سبوس گندم، سبوس برنج، سبوس ذرت و جو همراه با افزودن آب پنیر هشت درصد روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در شکل ۳ نمایش داده شده است. تجزیه واریانس (ANOVA) داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین درصد مرگ و میر کنیدیوم‌های برداشت شده از روی بسترهای مختلف روی پوره‌های سفیدبالک

کنترل شده آزمایشگاهی بالاتر از میزان تلفات در شرایط گلخانه‌ای بوده است.

میر $2/08 \pm 32/8$ درصد کمترین میزان تلفات را ایجاد کردند. به طور کلی، درصد تلفات قارچ روی پوره‌های سفیدبالک در شرایط



شکل ۳. درصد مرگ‌ومیر پوره سن سوم سفیدبالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum* پس از آلودگی با *Beauveria bassiana*. میله‌ها خطای استاندارد میانگین هستند. حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (Tukey HSD, $P < 0.05$).

Figure 3. Mean percent mortality of the third instar of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* after infection by *Beauveria bassiana*. Vertical bars: standard error. Values given with different letters are significantly different (Tukey HSD, $P < 0.05$).

سطح آب بسترهای کشت تاثیر معنی‌داری روی میزان تولید کنیدیوم در بسترهای کشت مختلف داشت. بسترهای سبوس گندم، سبوس برنج و جوپرک در نسبت آبی ۱:۰/۵ (آب مقطر: بستر کشت)، بیشترین میزان تولید کنیدیوم را داشتند و با افزایش مقدار آب میزان تولید کنیدیوم کاهش چشمگیری داشت (شکل ۱)، بر اساس یافته‌های محققان دیگر نیز، بیشترین میزان تولید کنیدیوم قارچ *B. bassiana* روی بستر سبوس گندم هنگامی به دست آمد که رطوبت بستر ۶۶ درصد بود و افزایش رطوبت، تولید کنیدیوم را کاهش داد (Nunez-Gaona et al. 2010). این یافته می‌تواند مربوط به این واقعیت باشد که وقتی محتوای آب در بستر بالا می‌آید، فضاهای داخل بستر پر شده و ضریب انتقال اکسیژن کاهش می‌یابد (Durand et al. 1988; Pandey et al. 2003). در بسترهای سبوس ذرت، شلتوک برنج و جو، افزایش نسبت آب به وزن بستر باعث افزایش تولید کنیدیوم شد (شکل ۱). اینطور استنباط می‌شود که بسترهایی با بافت سلولزی و سخت‌تر، نیاز به میزان آب بیشتری دارند تا در طی مراحل استریل کردن نرم‌تر شده، رشد بهتر قارچ فراهم شود. همانطور که برای جوانه‌زنی و تندش کنیدیوم روی

بحث

برای توسعه یک عامل کنترل زیستی قارچی در مدیریت آفات، به تولید کنیدیوم قارچ با ظرفیت بالا نیازمندیم. انتخاب یک محیط به عنوان بستر رشد قارچ‌های بیمارگر حشرات به عوامل مختلفی مانند ارزش غذایی محیط، نیازهای دمایی و رطوبتی، خاصیت حفظ رطوبت، ویژگی‌های فیزیکی بستر مانند اندازه دانه، شکل و حفظ ساختار بعد از رشد قارچ و همچنین به هزینه محیط رشدی و در دسترس بودن آن بستگی دارد (Jenkins & Goettel 1997; Jenkins et al. 1998). از بین این عوامل، دستیابی به نیاز آبی بسترهای کشت مناسب برای تولید انبوه ضروری است (Jenkins et al. 1998; Suh et al. 2002) و میزان تولید کنیدیوم یک قارچ بیمارگر حشرات روی بستر کشت جامد به میزان رطوبت بستر کشت دارد (El Damir 2006). در تحقیق حاضر، پتانسیل شش بستر کشت جامد شامل سبوس گندم، سبوس برنج، سبوس ذرت، شلتوک برنج، جوپرک و جو استفاده شده در انسکتاریوم برای تولید انبوه قارچ *B. bassiana* مورد بررسی قرار گرفت. این بسترها ارزان قیمت بوده و در دسترس هستند. با توجه به نتایج، تغییر در میزان

ملاس باعث افزایش تعداد اسپور تا $10^{13} \times 6/9$ کنیدیوم در میلی-لیتر شده است (Subasinghe *et al.* 2013). نوع منبع کربن و نیتروژن بر میزان رشد موجودات زنده تاثیر می‌گذارد (Khoshayand *et al.* 2014). ترکیب مواد موجود در پودر آب پنیر نشان می‌دهد که این ماده از نظر منبع هیدروکربنی بسیار غنی بوده و منبع خوب کربوهیدرات قابل تخمیر یعنی لاکتوز است و با دارا بودن منبع نیتروژنی به همراه ماکرومولکول‌های مورد نیاز قارچ، موجب افزایش ارزش غذایی بسترهای کشت و تولید کنیدیوم‌های قارچ می‌شود. پودر آب پنیر در مقایسه با ملاس چغندر قند از نظر هیدروکربن و ازت غنی‌تر است و همچنین فسفر، کلسیم، متیونین و سیستئین بیشتری دارد (Kamyab 2001). همچنین برای تندش و رشد قارچ حضور سه اسیدآمین ضروری است اسیدهای آمینه آلانین، فنیل آلانین، لوسین و یا والین بهترین ترکیب هستند (Smith & Grula 1981). با توجه به اینکه اسیدآمین‌های لوسین و والین در آب پنیر به وفور یافت می‌شوند افزودن آب پنیر به بسترها تندش و اسپورزایی قارچ را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

در این پژوهش، که به منظور تعیین میزان تاثیر بسترهای کشت در میزان زهرآگینی جدایه قارچی، زیست‌سنجی کنیدیوم‌های برداشت شده از روی بسترهای سبوس گندم، سبوس برنج، سبوس ذرت و جو روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای صورت گرفت، میزان تلفات ایجاد شده توسط کنیدیوم‌ها اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (شکل ۳). این نتایج می‌تواند به این دلیل باشد که بسترهای انتخابی همگی از بسترهای مناسب برای تولید قارچ بوده و تولید کنیدیوم بالایی را داشتند. در بررسی‌های گلخانه‌ای، زهرآگینی کنیدیوم‌های برداشت شده از بستر جو پایین‌تر از سایر بسترها بود. در بررسی‌های میکروسکوپی مشاهده شد که اندازه کنیدیوم‌های برداشت شده از بسترهای سبوس گندم و جو کوچک‌تر از کنیدیوم‌های برداشت شده از بسترهای سبوس برنج و سبوس ذرت است (مشاهدات چشمی و ثبت نشده). این داده‌ها نشان می‌دهد که صرف تولید بیشتر کنیدیوم روی یک بستر نشان از مناسب بودن آن بستر برای تولید انبوه قارچ نیست و بایستی به کیفیت کنیدیوم تولید شده، قابلیت جوانه‌زنی آن و زنده مانی و تأثیر آنها نیز توجه شود. در

کوتیکول سخت حشرات، و همینطور رشد و ایجاد بیماری در اغلب قارچ‌های بیمارگر حشرات به حداقل ۹۵ درصد رطوبت نیاز است (Hallsworth & Magan 1999). در دیگر قارچ بیمارگر حشرات (*Metarhizium flavoviride* Gams & Roszypal)، بیشترین میزان تولید کنیدیوم روی بسترهای برنج، مخلوط سبوس و شلتوک برنج و برنج پخته شده در نسبت‌های آبی بین ۱:۰/۳ (آب مقطر: بستر کشت) تا ۱:۱/۲۰ (آب مقطر: بستر کشت) بدست آمد (Magalhaes & Frazao 1996).

در تحقیق حاضر، بیشترین مقدار تولید کنیدیوم قارچ *B. bassiana* روی بسترهای جامد مختلف بدون افزودن افزودنی‌ها (آب پنیر و یا ملاس)، در بستر سبوس گندم ($10^{10} \times 5/3$ کنیدیوم بر گرم بستر) و سبوس برنج ($10^{10} \times 5/1$ کنیدیوم بر گرم بستر) و سپس با اختلاف معنی‌دار، سبوس ذرت ($10^{10} \times 3/9$ کنیدیوم بر گرم بستر) بدست آمد. با اضافه کردن آب پنیر، میزان تولید کنیدیوم در این بسترها افزایش یافت. با افزودن آب پنیر میزان تولید کنیدیوم در بستر سبوس گندم به $10^{10} \times 8/9$ کنیدیوم به ازای هر گرم محیط غذایی و سپس به ترتیب در بسترهای سبوس برنج و سبوس ذرت به $10^{10} \times 6/2$ و $10^{10} \times 5/7$ کنیدیوم به ازای هر گرم محیط غذایی افزایش یافت. این نتایج با یافته‌های Kassa *et al.* (2008) و Bena-Molaei *et al.* (2011) و Bigham & Talaei (2017) مطابقت دارد. در تحقیقات Bigham & Talaei-Hassanloui (2017) بیشترین مقدار تولید کنیدیوم، در بستر سبوس گندم بدست آمد و افزودن آب پنیر هشت درصد باعث افزایش تولید از $10^{10} \times 2/1$ کنیدیوم به ازای هر گرم محیط غذایی به $10^{10} \times 3/2$ کنیدیوم به ازای هر گرم محیط شد. افزودن ملاس تاثیری در تولید کنیدیوم نداشته و در برخی بسترها باعث کاهش تولید نیز گشته است. بر اساس یافته‌های Bena-Molaei *et al.* (2011) نیز افزودن ملاس چغندر قند به بسترهای گندم، آرد گندم، سبوس گندم، آرد برنج، سبوس برنج، شلتوک برنج، ارزن و آرد ذرت تاثیر معنی‌داری در افزایش تولید کنیدیوم در مقایسه با محیط‌های شاهد نداشت. در تحقیق دیگری، اضافه کردن ۷۰ درصد تفاله چغندر قند (باگاس چغندر قند) به سبوس گندم، ۷۷ درصد کاهش در تولید کنیدیوم قارچ *B. bassiana* را به همراه داشته است (Nuñez-Gaona *et al.* 2010). هرچند در کشت مایع اضافه کردن

سپاسگزاری

مطالعه حاضر قسمتی از یک پروژه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور است بدین وسیله از این مؤسسه که امکانات اجرای این پژوهش را فراهم کرد سپاسگزاری می‌شود.

تکمیل این پژوهش، بررسی‌های بیشتر در ارتباط با اندازه کنیدیوم-ها، پایداری و زنده‌مانی آنها در طول مدت ۹ ماه و میزان زهرآگینی آنها بعد از مدت ۹ ماه در حال اجرا می‌باشد که نتایج آن متعاقباً منتشر خواهد شد. در این پژوهش، با توجه به نتایج زیست‌سنجی‌ها، سبوس برنج، سبوس ذرت و سبوس گندم به‌عنوان بسترهای مناسب برای این جدایه فارچی معرفی می‌شوند.

References

- Abraham T, Easwaramoorthy S, Santhalakshmi G, 2003. Mass production of *Beauveria bassiana* isolated from sugarcane root borer, *Emmalocera depresella* Swinhoe. *Sugar Technology* 5 (4): 225–229.
- Asgari H, Zamani SM., Ashouri A, 2009. Effect of some liquid and solid media on sporulation of *Beauveria bassiana*. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 39 (1): 31–43 (In Persian with English abstract).
- Bena-Molaei P, Talaei-Hassanloui R, Askary H, Kharazi-Pakdel A, 2011. Study on potential of some solid natural substances in production of *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Cordycipitaceae) conidia. *Journal of Entomological Society of Iran* 30 (2): 1–15 (In Persian with English abstract).
- Bigham Z, Talaei-Hassanloui R, 2017. Production of two entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on natural substrates using diphasic production method. *Biological Control of Pests and Plant Diseases* 6 (1): 103–109 (In Persian with English abstract).
- Durand A, Pichon P, Desgranges C, 1988. Approaches to KLa measurements in solid state fermentation. *Biotechnology Techniques* 2: 11–16.
- El Damir M, 2006. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Biological Sciences* 6 (2): 269–274.
- Feng MG, Poprawski YJ, Khachatourians GG, 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. *Biocontrol Science and Technology* 4: 3–34.
- Fransen, JJ, 1990. Natural Enemies of Whiteflies, Fungi. In: Gerling, D. (Eds.), *Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management Intercept*. Andover, UK, Pp. 187–210.
- Hallsworth JE, Magan N, 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 74 (3): 261–266.
- Hamdi F, Jacques Fargues, Gilles Ridray, Benoît Jeannequin, Olivier Bonato, 2011. Compatibility among entomopathogenic hyphocreales and two beneficial insects used to control *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleurodidae) in Mediterranean greenhouses. *Journal of Invertebrate Pathology* 108: 22–29.
- Jackson MA, 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19: 180–187.
- Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST, 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl* 55:129–145. doi:10.1007/s10526-009-9240-y
- Javar S, Farrokhi Sh, Asgari B, Parsi F, 2019. Investigating on the potential of local isolates of entomopathogenic fungi as biological control agents against greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *BioControl in Plant Protection* 7 (1): 127–142 (In Persian with English abstract).
- Jenkins NE, Heviefio G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ, 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information* 19 (1): 21N–31N.
- Jenkins NE, Goettel MS, 1997. Methods for mass production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171: 37–48.
- Kamyab A, 2001. A user guide to the animal nutrition. Hagh-Shenas Publication. 218 pp. (In Persian).

- Kassa A, Brownbridge M, Parker BL, Skinner M, Gouli V, et al., 2008. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 112 (5): 583–591.
- Khoshayand MR, Mokhtarnejad L, Etebarian HR, Farzaneh M, Sheikhpour P, 2014. Screening and optimization of industrial medium for mass production of *Candida membranifaciens*, biocontrol agent of blue mold and gray mold diseases of apple. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 2 (2): 1–87.
- Lopez-Perez M, Rodriguez-Gomez D, Loera O, 2015. Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* 35 (3): 334–341.
- Mascarin GM, Jaronski ST, 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32: 177. 2131–3.
- Nuñez-Gaona O, Saucedo-Castañed G, Alatorre-Rosas R, Loera O, 2010. Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53 (4): 771–777.
- Oreste M, Bubici G, Polisenio M, Tarasco E, 2016. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the *Trialeurodes vaporariorum-Encarsia formosa* system. *Journal of Pest Science* 89 (1):153–160.
- Pandey A, 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81–84. Posada-Florez FJ, 2008. Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. *Journal of Insect Science* 26: 1–13.
- Ravensberg WJ, 2011. A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods, *Progress in Biological Control*, Springer Netherlands. 386 pp.
- Smith RJ, Grula EA, 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 222–230.
- Subasinghe MRVN, Amarasinghe KGAPK, Dharmadasa M, 2013. Possibility of use of agricultural byproducts for mass production of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to control coffee berry borer (*Hypothenemus hampei* (Ferrari)). *Journal of Food and Agriculture* 6 (1-2): 24–31.
- Suh EY, Son KH, Shin DH, Kim KD, Jang C, et al., 2002. Cultivation optimization of insect-pathogenic fungi *Paecilomyces lilacinus* HY-4 to Soil-pest *Adoretus tenuimaculatus*. *Entomological Research* 32 (3): 133–139.
- Tarocco F, Lecuona RE, Couto AS, Arcas JA, 2005. Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 481–8.
- Ye SD, Ying SH, Chen C, Feng MG, 2006. New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnology Letters* 28: 799–804.



This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)