کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۶، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۶ (۱۰۹-۱۰۳)
DOI: 10.22059/jbioc.2017.202734.137

تولید دو قارچ بیمارگر حشرات *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* با کشت دو مرحله‌ای بر روی مواد طبیعی

۱. ضرغام بی‌غم؛ ۲. رضا طلایی حسنلویی*
۱و۲. دانشجوی دکتری و استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۲/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷)

چکیده

از بین عوامل بیوکنترل، قارچ‌های بیمارگر حشرات به دلیل مسیر خاص ایجاد آلودگی و دامنه میزبانی وسیع، اهمیت ویژه‌ای دارند. *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* قارچ‌های بیمارگری هستند که علیه بسیاری از آفات مورد استفاده قرار می‌گیرند. در دسترس بودن بیمارگر در مقیاس وسیع، نیاز اولیه در برنامه‌های کنترل بیولوژیک است. در این مطالعه محیط‌های مختلف طبیعی از محصولات جانبی کشاورزی و صنایع مانند سبوس گندم، ضایعات ماکارونی، کاه و پوست سیب‌زمینی همراه با مواد مکمل غذایی مانند اوره، ساکارز و آب پنیر در دو سطح مختلف با روش کشت دو مرحله‌ای مایع و جامد برای تولید کنیدی قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anispoliae* مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیشترین تولید کنیدی برای *B. bassiana* در محیط سبوس گندم همراه با آب پنیر ۸ درصد ($۳/۲×۱۰^{۱۰}$ کنیدی بر گرم محیط) و برای *M. anisopliae* بیشترین کنیدی در محیط ضایعات ماکارونی همراه با آب پنیر ۸ درصد ($۲/۱۱×۱۰^{۱۰}$ کنیدی بر گرم محیط) در مدت ١٤ روز مشاهده شد. نتایج حاصل از این آزمایش می‌تواند در تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات مورد استفاده قرار بگیرد.

کلیدواژگان: تولید کنیدی، ضایعات ماکارونی، قارچ، کنترل میکروبی.

Production of two entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on natural substrates using diphasic production method

Zargham Bigham[1] and Reza Talaei-Hassanloui[2]*
1, 2. Ph.D. Candidate and Professor, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Mar. 10, 2016 - Accepted: Feb. 5, 2017)

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi have an important position among all the biocontrol agents because of their route of pathogenicity and broad host rang. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* are entomopathogenic fungi which are used against a number of insect pests. Large-scale availability of the pathogens is a primary requirement in the biocontrol programs. In this study, various agricultural and industrial by-products such as wheat bran, spaghetti wastes, straw and potato skin with three complementary additives; urea, sucrose and permeate were evaluated for conidial production of *B. bassiana* and *M. anisopliae* using diphasic liquid-solid culture technique. The maximum conidial production of *B. bassiana* was observed on wheat bran plus 8% permeate ($3.2×10^{10}$ conidia/g medium) and for *M. anisopliae*, it was observed on spaghetti wastes plus 8% permeate ($2.11×10^{10}$ conidia/g medium) after 14 days incubation. Our data from this experiment could be applied for the mass production of these two entomopathogenic fungi for biological control purposes.

Keywords: Conidial production, fungus, microbial control, spaghetti wastes.

* Corresponding author E-mail: rtalaei@ut.ac.ir

تازه‌های تحقیق

محصولات جانبی و ضایعات کشاورزی و صنایع، محیط‌های پایه خوبی برای تولید کنیدی قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anispoliae* هستند. محیط‌های پایه مناسب برای تولید این دو قارچ از هم متفاوت بوده، برای *B. bassiana*، سبوس گندم و برای قارچ *M. anispoliae*، ضایعات ماکارونی پیشنهاد می‌شود. آب پنیر ۸ درصد، مکمل خوبی برای افزایش عملکرد کنیدی این دو قارچ است.

مقدمه

یکی از ابزارهای مؤثر در کنترل بیولوژیک حشرات استفاده از میکروارگانسیم‌های مفید نظیر باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها است که تحت نام حشره‌کش‌های میکروبی طبقه‌بندی می‌شوند. در بین عوامل کنترل میکروبی آفات، قارچ‌های بیمارگر حشرات با داشتن ویژگی‌هایی از قبیل شدت بیمارگری زیاد، قدرت نفوذ کوتیکولی، طیف میزبانی وسیع و در عین حال بی‌خطر بودن برای انسان و جانوران اهلی، توانایی همه‌گیری در جمعیت میزبان و توانایی رشد روی محیط‌های غذایی مختلف، جایگاه ویژه‌ای داشته (Kamp and Bidochka 2002) و می‌توانند به عنوان یکی از اجزای مدیریت تلفیقی آفات مورد استفاده قرار بگیرند. مقرون به صرفه بودن تولید از جمله فاکتورهای موثر در تولید حشره‌کش‌های میکروبی و از موانع موجود در کاربرد این عوامل به عنوان عامل بیوکنترل محسوب می‌شود و با وجود افزایش علاقه جامعه جهانی نسبت به استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات به عنوان عوامل کنترل آفات، تجاری شدن و کاربرد مزرعه‌ای آنها به دلیل مشکلات مربوط به تولید انبوه آنها روند کندی دارد (Zimmermann 2007). بیشتر سامانه‌های صنعتی تولید قارچ، از سامانه دو مرحله‌ای استفاده می‌کنند که میسیلیوم یا اجسام هیفی در محیط مایع در درون ارلن‌های متحرک یا فرمانتورها تولید شده و برای تولید کنیدی هوایی به محیط کشت جامد انتقال می‌یابند (Samsinakova *et al*. 1981) که این محیط جامد در اغلب سامانه‌ها، غلات می‌باشد. نوع محیط رشدی و شرایط غذایی و فیزیکی محیطی در سامانه تولید انبوه بسیار حائز اهمیت است زیرا تعداد، شکل، پایداری، بقا و بیمارگری پروپاگول‌های قارچی را در حد خیلی زیادی تحت تأثیر قرار می‌دهد (Jenkins and Goettel 1997). اگر چه قارچ‌ها قادر به استفاده از طیف وسیعی از ترکیبات کربوهیدراتی و نیتروژنی می‌باشند ولی محیط‌های غیرپیچیده و ارزان قیمت که قابلیت تولید میزان بالایی از اسپورهای زنده، پایدار و دارای قدرت بیماری‌زایی زیاد باشند، برای تولید انبوه و تجاری شدن آنها نیاز است. شی با استفاده از ۳۰۰ کیلوگرم سبوس گندم و ۲۰ کیلوگرم آرد گندم به اضافه میزان کمی آرد ذرت، ۲۱ کیلوگرم پودر کنیدی از طریق کشت سطحی تولید نمود (Shi 1988، به نقل از Dalla Santa *et al*. 2005). پاندی و کانوجیا، میزان تولید کنیدی *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin را روی محیط‌های مختلفی شامل جو، ارزن، ذرت، سویا، سورگوم و گندم بررسی کردند و بیش‌ترین میزان کنیدی را به میزان $۵/۳۹\times۱۰^{۷}$ کنیدی برگرم محیط از ارزن به‌دست آوردند (Pandy and Kanaujia 2005). تولید کنیدی *B. bassiana* با استفاده از ضایعات سیب‌زمینی به میزان ۴۰٪ و باگاس ۶۰٪ به میزان $۳/۴\times۱۰^{۹}$ کنیدی در هر گرم محیط بود (Dalla Santa *et al*. 2005). در یک بررسی دیگر، بیش‌ترین میزان تولید کنیدی *B. bassiana* روی محیط لوبیا چشم بلبلی همراه با سویا به میزان $۹/۰۶\times۱۰^{۷}$ کنیدی بر گرم محیط به‌دست آمد (Bhadauria *et al*. 2012). استفاده از مواد طبیعی ارزان قیمت مانند بقایای محصولات کشاورزی می‌تواند یکی از روش‌های اقتصادی نمودن تولید قارچ‌های بیمارگر باشد. لذا تحقیق حاضر به منظور بررسی پتانسیل چند محیط غذایی طبیعی و تاثیر مکمل‌های غذایی مختلف بر میزان تولید کنیدی هوایی قارچ‌های *B. bassiana* و *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin با استفاده از روش تولید دو مرحله‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

کشت جدایه‌های قارچی

در این تحقیق از جدایه JF3 قارچ *B. bassiana* و جدایه CS1 قارچ *M. anisopliae* که به ترتیب از خاک و لارو

ساقه‌خوار برنج در شمال کشور جدا شده و در آزمایشگاه کنترل بیولوژیک حشرات، گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران موجود می‌باشد، استفاده گردید.

جدایه‌های قارچی در شرایط آزمایشگاهی در تشتک‌های پتری شامل محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت شده و در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۴ روز در داخل انکوباتور نگهداری گردیدند تا پس از کنیدی‌زایی کامل مورد استفاده قرار بگیرند. برای کشت‌های بعدی، قارچ عبور داده شده از حشره میزبان استفاده گردید.

بررسی محیط‌های غذایی جامد مختلف در تولید کنیدی‌های هوایی

برای تولید کنیدی، سامانه دوفازی مایع-جامد (Bena-molaei *et al*. 2009, 2011) انتخاب گردید که در این روش ابتدا قارچ در یک محیط مایع درون ارلن‌های متحرک رشد یافته و در یک زمان مشخص به محیط جامد اضافه شد.

برای تهیه محیط مایع PDB (Potato Dextrose Broth)، ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی تازه و پوست کنده در آب مقطر پخته شده و عصاره حاصل پس از عبور دادن از پارچه ململ، با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد و به ازای هر لیتر ۱۰ گرم دکستروز اضافه گردید. مقدار ۲۵۰ میلی‌لیتر از محیط تهیه شده داخل ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری اتوکلاو شده، هر ارلن با دایره‌ای به قطر ۵ میلی‌متر از کشت قارچ‌ها زیر هود میکروبیولوژی مایه‌کوبی شدند و به مدت ۵ روز روی شیکر ۱۲۰ دور در دقیقه برای تولید بلاستوسپور که به عنوان زادمایه برای مرحله دوم بود، قرار گرفتند. محیط‌های غذایی جامد استفاده شده در این تحقیق سبوس گندم، ضایعات ماکارونی، پوسته سیب زمینی و کاه‌وکلش گندم بود. صد گرم از هر محیط وزن شد به نسبت ۱ به ۰/۵ (محیط- آب مقطر) به آنها آب مقطر اضافه گردید؛ سپس داخل کیسه‌های پلاستیکی قابل اتوکلاو به ابعاد ۲۴×۳۴ سانتی‌متر ریخته شد. درب کیسه‌ها بسته شده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس در اتوکلاو استریل شدند. بعد از خنک‌شدن کیسه‌ها، محیط‌ها به محفظه استریل هود منتقل شده و ۱۰ میلی‌لیتر از بلاستوسپورهای حاصل از محیط کشت مایع در مرحله اول با غلظت ۲×۱۰^{۷} بلاستوسپور در میلی‌لیتر به کیسه‌ها اضافه شد و کیسه‌ها به داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۱۴ روز منتقل شدند تا کنیدی‌های هوایی تشکیل گردند. در روزهای سوم، هفتم و دهم محیط‌های غذایی به‌طور کامل بدون اینکه کیسه پلاستیکی باز شود، از روی کیسه با دست مخلوط و داخل کیسه پخش شدند.

جمع‌آوری کنیدی

پس از گذشت ۱۴ روز از اضافه کردن زادمایه قارچ به محیط‌های کشت جامد، استحصال کنیدی‌ها صورت گرفت. بدین صورت که ابتدا محیط‌ها با دست کاملاً خرد شدند سپس از هر کدام از کیسه‌ها نمونه‌های یک گرمی تهیه گردید و داخل ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل همراه با Tween80 ۰/۰۳ درصد ریخته و خوب به هم زده شد و سپس سوسپانسیون حاصل از پارچه ململ عبور داده شد. برای سهولت شمارش، رقیق‌سازی تا ۳ مرحله صورت گرفت. با استفاده از سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده نهایی برداشته و با لام هموسیتومتر تعداد کنیدی‌ها مورد شمارش قرار گرفت.

افزودن مکمل‌های غذایی به محیط‌های غذایی جامد

در این قسمت از ساکارز، اوره و آب پنیر هر کدام در دو سطح ۴ و ۸ درصد به عنوان مکمل برای محیط‌های اصلی استفاده گردید. پس از تهیه درصدهای ذکر شده از مکمل‌ها، مکمل‌ها به محیط‌های جامد شامل سبوس، ضایعات ماکارونی، پوسته سیب زمینی و کاه‌وکلش اضافه شدند. همانند مرحله قبل ۱۰۰ گرم از محیط‌ها وزن و به نسبت ۱ به ۰/۵ (محیط- مکمل) به محیط‌ها مکمل اضافه گردید. تمام مراحل بسته‌بندی کیسه‌ها، استریل کردن، مایه‌کوبی محیط‌ها و شمارش کنیدی برای هر دو قارچ مانند مرحله قبل انجام شد.

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و هر کدام در سه تکرار انجام گرفت. تجزیه

واریانس داده‌ها با استفاده از مدل ANOVA-GLM در نرم‌افزار SYSTAT13 انجام شد. در صورت معنی‌دار بودن اختلاف بین تیمارها، مقایسه میانگین‌ها به روش F-LSD صورت گرفت.

نتایج

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین محیط‌های رشدی برای هر دو قارچ بیمارگر حشرات اختلاف معنی‌داری وجود دارد (برای *B. bassiana*، $F_{3,8}$=917.9, P<0.001؛ برای *M. anisopliae*، $F_{3,8}$=2457.4, P<0.001). مقایسه میانگین‌ها، محیط‌های اصلی و بدون مکمل (آب مقطر) را برای هر دو قارچ در سه سطح گروه‌بندی کرد (F-LSD, P<0.05). برای *B. bassiana* سبوس گندم با تولید ۲/۱×۱۰^۱۰ کنیدی بر گرم محیط بیشترین میزان تولید و کاه گندم با تولیدی ۸/۱×۱۰^۷ کنیدی بر گرم محیط نیز کمترین تولید را داشت (جدول ۱). اما برای *M. anisopliae* ضایعات ماکارونی و کاه گندم به ترتیب با ۱/۴×۱۰^۱۰ و ۱/۰۴×۱۰^۸ کنیدی بر گرم محیط بیشترین و کمترین تولید را داشتند (جدول ۲).

در مرحله دوم، تأثیر افزودن مکمل‌های مختلف مانند اوره، ساکارز و آب پنیر هر کدام در دو سطح چهار و هشت درصد بر میزان تولید کنیدی روی محیط‌های غذایی اصلی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس، باز هم اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها برای هر دو قارچ بیمارگر حشرات نشان داد (برای *B. bassiana*، $F_{5,12}$=29.6, P<0.001 و برای *M. anisopliae*، $F_{5,12}$=135.7, P<0.001). مقایسه میانگین تیمارها به روش F-LSD مشخص کرد که برای هر دو قارچ آب پنیر بیشترین تاثیر را در افزایش تولید دارد. برای *B. bassiana* ساکارز بعد از آب پنیر بیشترین تاثیر را داشت. اوره تأثیر منفی در تولید کنیدی داشت و موجب کاهش تولید در مقایسه با شاهد (محیط همراه با آب مقطر) شد. برخلاف *B. bassiana*، برای *M. anisopliae* اوره بعد از آب پنیر بیشترین تاثیر را در افزایش تولید کنیدی داشت. اثر متقابل محیط در مکمل نیز معنی‌دار بود (در مورد *B. bassiana*، $F_{9,67}$=14.5, P<0.001 و در مورد *M. anisopliae*، $F_{9,67}$=81.9, P<0.001). با توجه به جدول۱، محیط سبوس گندم حاوی آب پنیر ۸٪ با میانگین تولید ۳/۲×۱۰^۱۰ کنیدی بر گرم محیط غذایی بیشترین تولید کنیدی را به خود اختصاص داده و کاه حاوی اوره ۴٪ نیز کمترین میزان تولید کنیدی را به میزان ۱/۱×۱۰^۸ کنیدی بر گرم محیط دارا بود. بیشترین میزان تولید کنیدی برای *M. anisopliae* در محیط غذایی سبوس گندم همراه با آب پنیر ۸٪ به میزان ۲/۳۶×۱۰^۱۰ کنیدی بر گرم محیط بود. کمترین میزان تولید کنیدی نیز همانند *B. bassiana* در کاه گندم حاوی اوره ۴٪ با تولید ۱/۱۳×۱۰^۸ کنیدی بر گرم محیط به‌دست آمد (جدول۲).

جدول ۱. میانگین تولید کنیدی (کنیدی بر گرم محیط) (±SE) در محیط‌های غذایی مختلف همراه با افزودن سطوح مختلف مکمل‌های غذایی در قارچ *B. bassiana* JF3

Table 1. Mean conidial production (±SE) (co/g medium) in various substrates with adding different complementary substances in *B. bassiana* JF3

Complementary Media	Distilled water +Media	Urea4% +Media	Urea8% +Media	Sucrose4% +Media	Sucrose8% +Media	Permeate4% +Media	Permeate8% +Media
Wheat bran	$2.1\times10^{10}\pm1.7\times10^{6}$bcA*	$1.35\times10^{10}\pm3.8\times10^{6}$eA	$1.58\times10^{10}\pm1.8\times10^{6}$deA	$1.9\times10^{10}\pm1.2\times10^{6}$bcA	$2.2\times10^{10}\pm9.8\times10^{6}$bcA	$2.2\times10^{10}\pm2.2\times10^{7}$bA	$3.2\times10^{10}\pm3.5\times10^{7}$aA
Spaghetti waste	$9.4\times10^{9}\pm6.8\times10^{6}$gB	$1\times10^{10}\pm3.7\times10^{6}$gB	$1.1\times10^{10}\pm7.7\times10^{6}$fgB	$1.5\times10^{10}\pm1.4\times10^{6}$eB	$1.5\times10^{10}\pm7.5\times10^{6}$eB	$1.8\times10^{10}\pm6.7\times10^{6}$dcB	$1.4\times10^{10}\pm6.8\times10^{6}$efB
Wheat staw	$8.1\times10^{7}\pm1.4\times10^{5}$hC	$1.1\times10^{8}\pm1.8\times10^{5}$hC	$1.12\times10^{8}\pm0.7\times10^{6}$hC	$1.4\times10^{8}\pm0.7\times10^{6}$hC	$1.7\times10^{8}\pm1.23\times10^{6}$hC	$1.2\times10^{8}\pm0.5\times10^{6}$hC	$1.2\times10^{8}\pm0.7\times10^{6}$hC
Potato skin	$2.1\times10^{8}\pm1\times10^{6}$hC	$2.1\times10^{8}\pm4.8\times10^{5}$hC	$3\times10^{8}\pm1.9\times10^{6}$hC	$2.7\times10^{8}\pm4\times10^{6}$hC	$2.6\times10^{8}\pm3.3\times10^{6}$hC	$3.1\times10^{8}\pm4.8\times10^{6}$hC	$3\times10^{8}\pm1.1\times10^{6}$hC

* حروف کوچک متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در ردیف و حروف بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار در ستون می‌باشند (F-LSD, P<0.05).

* Different small and capital letters indicate significant differences among treatments in row and in column, respectively (F-LSD, P<0.05).

جدول ۲. میانگین تولید کنیدی (کنیدی بر گرم محیط) (±SE) در محیط‌های غذایی مختلف در مقایسه با افزودن سطوح مختلف مکمل‌های غذایی در قارچ *M. anisopliae* CS1

Table 2. Mean conidial production (±SE) (co/g medium) in various substrates with adding different complementary substances in *M. anisopliae* CS1

Complementary Media	Distilled water +Media	Urea4% +Media	Urea8% +Media	Sucrose4% +Media	Sucrose8% +Media	Permeate4% +Media	Permeate8% +Media
Wheat bran	$8\times10^{9}\pm1.2\times10^{7}$fB*	$1.2\times10^{10}\pm2.2\times10^{7}$eB	$1.8\times10^{10}\pm4.4\times10^{7}$cA	$8.4\times10^{9}\pm2.9\times10^{7}$fB	$7.8\times10^{9}\pm2.3\times10^{7}$fB	$1.9\times10^{10}\pm9.2\times10^{7}$bA	$2.3\times10^{10}\pm3.3\times10^{7}$aA
Spaghetti waste	$1.4\times10^{10}\pm1.8\times10^{6}$eA	$1.6\times10^{10}\pm2.7\times10^{6}$dA	$1.6\times10^{10}\pm1.6\times10^{6}$deB	$1.8\times10^{10}\pm4.4\times10^{6}$cA	$1.9\times10^{10}\pm1.1\times10^{6}$bA	$1.9\times10^{10}\pm5.9\times10^{6}$bA	$2.1\times10^{10}\pm1.2\times10^{6}$aB
Wheat staw	$1\times10^{8}\pm0.7\times10^{6}$aC	$1\times10^{8}\pm0.7\times10^{6}$aC	$1.1\times10^{8}\pm0.9\times10^{6}$aC	$1.3\times10^{8}\pm0.3\times10^{6}$aC	$1.7\times10^{8}\pm0.7\times10^{6}$aC	$1.9\times10^{8}\pm2.2\times10^{6}$aB	$3.2\times10^{8}\pm1.9\times10^{6}$aC
Potato skin	$1.7\times10^{8}\pm0.4\times10^{6}$aC	$1.6\times10^{8}\pm0.3\times10^{6}$aC	$1.6\times10^{8}\pm0.4\times10^{6}$aC	$1.7\times10^{8}\pm0.2\times10^{6}$aC	$1.5\times10^{8}\pm0.7\times10^{6}$aC	$1.5\times10^{8}\pm0.4\times10^{6}$aB	$1.4\times10^{8}\pm1\times10^{6}$aC

* حروف کوچک متفاوت نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در ردیف و حروف بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار در ستون می باشند (F-LSD, P<0.05).

* Different small and capital letters indicate significant differences among treatments in row and in column, respectively (F-LSD, P<0.05).

بحث

یکی از مهم‌ترین گام‌های کاربرد موفقیت‌آمیز قارچ‌های بیمارگر حشرات، تولید انبوه آنها می‌باشد؛ به عبارتی تولید تعداد زیاد کنیدی در انتخاب یک بیمارگر قارچی برای کنترل میکروبی آفات در مزرعه، باغ یا جنگل و مرتع از معیارهای اصلی است (Robl *et al*. 2009). روش تولید دو مرحله‌ای مایع-جامد مانند روش LUBILOSA روش مناسبی برای تولید انبوه آفت‌کش‌های قارچی از جمله *B. bassiana* و *M. anisopliae* می‌باشد (Seema *et al*. 2013). با توجه به نوع محیط رشدی و جدایه قارچی، میزان تولید کنیدی متفاوت خواهد بود. انتخاب یک محیط به عنوان محیط رشدی قارچ‌های بیمارگر حشرات به عوامل مختلفی مانند تعادل غذایی یا ارزش غذایی، خاصیت حفظ رطوبت، هزینه محیط رشدی، در دسترس بودن، ویژگی‌های فیزیکی مانند اندازه دانه و شکل و حفظ ساختار بعد از کلنیزه شدن توسط قارچ بستگی دارد (Jenkins *et al*. 1988). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که میزان تولید بر حسب نوع قارچ، بستر رشدی و نوع و میزان مکمل متفاوت است. در تحقیق ما افزودن مکمل‌های غذایی مختلف به محیط‌های غذایی در بیشتر موارد موجب افزایش تولید گردید. در مورد *B. bassiana* افزودن مکمل‌ها به ضایعات ماکارونی و کاه در همه موارد موجب افزایش تولید در مقایسه با محیط بدون مکمل گردیدند. در حالی که پوسته سیب‌زمینی و سبوس گندم واکنش‌های مختلفی به نوع و میزان مواد مکمل دادند. در برخی موارد افزودن مکمل موجب افزایش و در برخی موارد موجب کاهش تولید کنیدی گردید. در مورد *M. anisopliae* نیز همین مسئله صادق بود که می‌توان گفت تلفیق مکمل با محیط غذایی اصلی در برخی موارد موجب از بین رفتن تعادل غذایی شده و نتایج متفاوتی از میزان تولید کنیدی حاصل می‌شود. در پژوهش گولی و همکاران، کنیدی تولید شده به‌وسیله جدایه ARSF-9337 *B. bassiana* بر روی ارزن سه برابر بیشتر از جدایه‌های ARSF-9587 و GHA بود. هم‌چنین در این آزمایش جدایه ARSEF-9593 از قارچ *M. anisopliae* دو برابر بیشتر از جدایه PPRC-29 از همان گونه قارچ تولید کرد (Gouli *et al*. 2013). ، میزان تولید کنیدی قارچ‌های *B. bassiana*، *M. flavoviride*، *P. lilacinus* و *I. tenuipes* را بر روی محیط‌های مختلف مانند برنج، گندم، چاودار، ذرت و سورگوم مورد بررسی قرار گرفت. بیش‌ترین میزان تولید کنیدی برای *M. flavoviride* جدایه CMUCDCT01 در سورگوم و برای *B. bassiana* جدایه CMUCDMF03 در برنج به‌دست آمد که این مقادیر به ترتیب $۱/۰۲\times۱۰^{۱۱}$ و $۱/۴\times۱۰^{۱۱}$ کنیدی بر گرم محیط بودند. برای قارچ‌های *P. lilacinus* و *I. tenuipes* نیز بیشترین تولید بر روی سورگوم بود (Mar and Lumyong, 2013). بیشترین میزان وزن خشک میسلیوم برای قارچ *P. lilacinus* جدایه IPC-P در محیط حاوی گلوکز به عنوان منبع کربن و آمونیوم نیترات به عنوان منبع نیتروژن به دست آمد این در حالی بود که ترکیب مالتوز و اوره دارای نقش بازدارندگی در رشد میسلیومی این قارچ بودند (Gao and Liu 2010). مشابه آن، ما نیز بازدارندگی اوره در برخی موارد را شاهد بودیم اما برای جدایه M-14 از همین قارچ بیشترین میزان تولید میسیلیوم در ترکیب نشاسته قابل حل و اوره بود. بهترین ترکیب برای جدایه SQZ-1-21 از قارچ *M. anisopliae* فروکتوز و تریپتون و برای جدایه RS-4-1 گلوتین و پپتون به عنوان منبع کربن و نیتروژن برای رشد میسیلیومی ترکیب بهتری بودند. همچنین ترکیب مانوز و تریپتون برای جدایه IPC-P، مالتوز و مخمر برای جدایه M-14، اوره و ساکارز برای جدایه SQZ-1-21 و مانوز و مخمر برای جدایه RS-4-1 بهترین ترکیب منبع کربن و نیتروژن برای بیشترین میزان تولید کنیدی در محیط جامد بودند (Gao and Liu 2010). بیشترین میزان تولید کنیدی *M. anisopliae* را در آرد یولاف همراه با پپتون به عنوان منبع نیتروژن به‌دست آمد. نوع و میزان مواد مکمل برای افزایش رشد در محیط‌های غذایی مختلف ممکن است متفاوت باشد به عنوان مثال میزان مخمر مورد نیاز برای تولید بهینه در برنج، جو و سورگوم در تحقیق پراکاش و همکاران به ترتیب ۱/۴۵، ۲/۲۱ و ۱/۵۴ درصد بود (Prakash *et al*. 2008). افندی و همکاران ساکارز را به عنوان بهترین منبع کربوهیدراتی برای اسپورزایی *B. bassiana* معرفی کردند (Afandhi *et al*. 2012). بر اساس پژوهشی که توسط پراساد انجام شد افزودن ۱٪

ساکارز به سورگوم و ارزن موجب افزایش میزان تولید شد در حالی که افزودن ۲٪ ساکارز به این محیط‌ها موجب کاهش چشمگیر در تولید این قارچ گردید (Prasad 2013). کیم و همکاران نیز از بین منابع کربوهیدراتی مختلف استفاده شده، بیشترین رشد میسلیوم را از محیط حاوی ساکارز گزارش کردند (Kim *et al*. 2002). در حالی که در تحقیق ما آب پنیر به عنوان بهترین مکمل برای تولید کنیدی‌های هوایی معرفی شد که با نتایج کار بنامولایی و همکاران (Bena-molaei *et al*. 2009) و کاسا و همکاران (Kassa *et al*. 2008) مطابقت دارد. بر اساس مشاهدات کیم و همکاران نیز افزودن آب پنیر به محیط کشت علاوه بر افزایش تولید، موجب افزایش تحمل حرارتی کنیدی‌های تولیدی بوسیله *B. bassiana* و *M. anisopliae* شده است (Kim *et al*. 2010).

گزارش شده است که تأثیر اسیدهای آمینه بر اسپورزایی قارچ‌ها وابسته به گونه (Evans and Black 1981) حتی وابسته به جدایه قارچ (Elson *et al*. 1998) می‌باشد. برای تندش و به دنبال آن رشد قارچ، حضور سه اسید آمینه ضروری است. بهترین ترکیب آلانین، فنیل آلانین و لوسین یا والین است. ترکیبی از آلانین، اسید آسپارتیک و فنیل آلانین نیز رضایت بخش است. تیروزین می‌تواند جایگزین فنیل آلانین گردد اما در این حالت تندش قارچ سریع نمی‌باشد (Smith and Grula 1981). با توجه به این‌که میزان اسیدهای آمینه لوسین و والین در سبوس گندم و ضایعات ماکارونی بیشتر از سایر محیط‌هاست و هم‌چنین این اسیدهای آمینه در آب پنیر نیز به فراوانی یافت می‌شوند و بیشترین میزان تولید نیز از این محیط‌ها به دست آمده، نشان می‌دهد که وجود این اسیدهای آمینه برای اسپورزایی این دو جدایه پژوهش ما نیز مفید بوده و تولید کنیدی را تحت تأثیر قرار داده است. میزان جذب رطوبت به‌وسیله محیط‌های غذایی نیز متفاوت می‌باشد. در مورد کاه گندم به نظر می‌رسد علاوه بر کیفیت پایین آن از نظر مواد غذایی، کاهش رطوبت محیط غذایی در طول انکوباسیون نیز در تولید پایین آن موثر باشد. ارتباط نزدیکی بین محتوای رطوبتی و در دسترس بودن اکسیژن وجود دارد. با افزایش میزان رطوبت در محیط‌ها اکسیژن در دسترس کاهش پیدا می‌کند زیرا رطوبت فضاهای خالی را پر می‌کند (Jenkins *et al*. 1998). با توجه به این‌که پوسته سیب زمینی بعد از اتوکلاو به صورت خمیری در می‌آید به نظر می‌رسد میزان اکسیژن در دسترس کم بوده و هم‌چنین نسبت سطح به حجم نیز کاهش پیدا می‌کند که این دو می‌توانند دلیل کاهش تولید آن در مقایسه با سایر محیط‌ها باشند، چون گزارش شده که بالا بودن نسبت سطح به حجم محیط در افزایش تولید این قارچ‌ها تاثیرگذار است (Bena-molaei *et al*. 2011). علاوه بر نسبت سطح به حجم، اندازه ذرات محیط کشت باید در حدی باشد که تبادل اکسیژن و CO_2 نیز به سهولت انجام گیرد. میزان تولید کنیدی *M. anisopliae* var. *lepidiotum* بر روی محیط جودوسر و پپتون در دو سطح اکسیژن ۲۱ و ۲۶ درصد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان تولید کنیدی بعد از ۱۵۶ ساعت در محیط با اکسیژن ۲۶ درصد بالاتر بود به‌طوری‌که میزان تولید در گرم محیط کشت ۲/۶ برابر بیشتر از محیط با اکسیژن ۲۱ درصد بود (Tlecuitl-Beristain and *et al*. 2010).

بر اساس نتایج پژوهش حاضر سبوس گندم و ضایعات ماکارونی پتانسیل بالایی در تولید *B. bassiana* و *M. anisopliae* دارند. با این حال، علاوه بر ظرفیت یا عملکرد تولید کنیدی محیط‌ها؛ خصوصیات کیفی کنیدی‌های حاصله از هر محیط هم معیار مهمی در انتخاب و معرفی نهایی محیط مناسب برای تولید انبوه قارچ‌هاست، لذا بررسی زهرآگینی کنیدی‌های حاصله از سبوس گندم و ضایعات ماکارونی در ادامه پژوهش حاضر کاملاً ضرورت دارد. هم‌چنین پودر آب پنیر به عنوان مکمل مناسب در این زمینه قابل استفاده بوده و مطالعات بیشتر در زمینه اثر سایر شرایط فیزیکوشیمیایی برای ارتقای تولید کنیدی در این محیط‌ها لازم است.

REFERENCES

Afandhi A, Chailani SR, Wati A (2012) Evaluation of sucrose for *in vitro* germination and growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN and *Paecilomyces* sp. (DEUTEROMYCETES, MONILIALES). Journal of Tropical Plant Protection 1(1): 39-45.

Bena-Molaei P, Talaei-Hassanlouie R, Askary H, Kharazi-Pakdel A (2009) 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)

Bena-Molaei P, Talaei-Hassanloui R, Askary H (2011) Effect of culture substrates on virulence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) conidia against the browntail moth, *Euproctis chrysorrhoea* (Lepidoptera: Lymantriidae). Biocontrol Science and Technology 21(5): 619-624.

Beristain ST, Gonzalez GV, Godinez GD, Loera O (2009) Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. lepidiotum conidial production and quality. Mycopathologia 169: 387-394.

Bhadauria BP, Puri S, Singh PK (2012) Mas production of entomopathogenic fungi using agricultural products. The Bioscan 7(2): 229-232.

Dalla Santa HS, Dalla Santa OR, Brand D, Vandenberghe LPS, Soccol CR (2005) Spore production of *Beauveria bassiana* from agroindustrial residues. Brazilian Archives of Biology and Technology 48: 51-60.

El Damir M (2006**)** Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Jornal of Biological Science 6(2): 269-274.

Elson MK, Schisler DA, Jackson MA (1998) Carbon to nitrogen ratio, carbon concentration, and amino acid composition of growth media influence conidiation of *Helmithosporium solani*. Mycologia 98: 406-413.

Evans RC, Black CL (1981) Interaction between nitrogen sources and xylose affecting growth, conidiation, and polyphenoloxidase activity *in Bipolaris maydis* Race T. Canadian Journal of Botany 59: 2102-2107.

Gao L, Liu X (2010) Nutritional requirements of mycelial growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. Microbiology 79(5): 612-619.

Gouli V, Provost C, Gouli S, Parker BL, Skinner M (2103**)** Productivity of different species of entomopathogenic fungi based on one type of technology. Journal of Agricultural Technology 9(3): 571-580.

Jenkins NE, Heviefo G, Langewald J, Cherry AJ, and Lomer CJ (1998) Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information 19(1): 21-31.

Jenkins NE, Goettel MS (1997) Methods for mass production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. Memoirs of the Entomological Society of Canada171: 37-48.

Kamp AM, Bidochka MJ (2002) Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agar. Letters in Applied Microbiology 35: 74-77.

Kassa A, Brownbridge M, Parker BL, Skinner M, Gouli V, Gouli S, Gou M, Lee F, Hata T (2008) Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Mycological Research 112(5): 583-591.

Kim JS, Skinner M, Parker BL (2010) Influence of whey permeate and millet as substrates on thermotolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia during storage. Biocontrol Science and Technology 20(8): 859-863.

Kim SW, Hwang HJ, Xu CP, Na YS, Song SK, Yun JW (2002) Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. Letters in Applied Microbiology 34: 389-393.

Mar TT, Lumyong S (2012) Conidial production of entomopathogenic fungi in solid state fermentation. KKU Research Journal 17(5): 762-768.

Pandy AK, Kanaujia (2005) Effect of different grain media on sporulation, germination and virulence of *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* fabricius larvae. Journal of Biological Control 19(2): 129-133.

Prakash BG, VS, Padmaja V, Kiran SRR (2008) Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. Bioresource Technology 99: 1530-1537.

Prasad GG (2013) Evaluation of different substrates for mass multiplication of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Agricultural Science Digest 33(4): 321-323.

Robl D, Sung LB, Novakovich JH, Marangoni PRD, Zawadneak MAC, Dalzoto PR, Gabardo J, Pimentel IC (2009) Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson strains on agro-industrial residues. Brazilian Journal of Microbiology 40: 296-300.

Samsinakova A, Kalalov S, Vlcek V, Kybal J (1981) Mass production *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. Journal of Invertebrate Pathology 38(2): 168-174.

Seema Y, Neeraj T, Krishan K (2013) Mass production of entomopathogenes *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* using rice as a substrate by diphasic liquid-solid fermentation technique. International Journal of Advanced Biological Research 3(3): 331-335.

Smith RJ, Grula EA (1981) Nutritional requirmens for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 37: 222-230.

Zimmermann G (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology 17(5): 553-596.