نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۸۹ – ۳۰(۲): ۱–۱۵

بررسی پتانسیل چند ماده‌ی طبیعی جامد در تولید کنیدی قارچ بیمارگر حشرات، *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Cordycipitaceae)

پریسا بنا مولایی[۱]، رضا طلایی حسنلویی[۱و*]، حسن عسکری[۲] و عزیز خرازی پاکدل[۱]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۲- مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rtalaei@ut.ac.ir

Study on potential of some solid natural substances in production of *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Cordycipitaceae) conidia

P. Bena-Molaei[1], R. Talaei-Hassanloui[1&*], H. Askary[2] and A. Kharazi-Pakdel[1]

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, 2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

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

چکیده

در این تحقیق، محیط‌های غذایی گندم، آرد گندم، سبوس گندم، آرد برنج، سبوس برنج، شلتوک برنج، ارزن و آرد ذرت در قالب یک طرح کاملاً تصادفی برای تولید کنیدی‌های هوایی جدایه‌های *Beauveria bassiana* EUT105 و *B. bassiana* EUT116 به روش سامانه‌ی دو فازی مایع- جامد مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در هر دو جدایه بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. سبوس گندم با میانگین تولید ۱۰^۱۰ × ۲/۳ و شلتوک برنج با میانگین تولید ۱۰^۹ × ۱/۵ کنیدی به ازای هر گرم محیط غذایی برای جدایه‌ی *B. bassiana* EUT105، به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان تولید کنیدی را داشتند. برای جدایه‌ی *B. bassiana* EUT116، سبوس گندم و ارزن با میانگین تولید ۱۰^۹ × ٦/۱ و ۱۰^۸ × ۸ کنیدی به ازای هر گرم محیط غذایی، به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان تولید کنیدی را به خود اختصاص دادند. در گام بعدی، ملاس چغندرقند و آب پنیر در مقادیر مختلف به عنوان مکمل‌های غذایی به محیط‌های ساده فوق افزوده شد. نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌های این مرحله نیز نشان داد که در هر دو جدایه بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد و افزودن آب پنیر موجب افزایش تولید شده ولی افزودن ملاس در تولید کنیدی در مقایسه با محیط‌های شاهد، تغییر معنی‌داری ندارد. بیشترین و کمترین تولید کنیدی برای جدایه‌های *B. bassiana* EUT105 و *B. bassiana* EUT116، به‌ترتیب مربوط به سبوس گندم همراه با آب پنیر با میانگین تولید ۱۰^۱۰ × ۵ و ۱۰^۱۰ × ٤/٦، و آرد برنج همراه با ملاس با میانگین تولید ۱۰^۸ × ۱/۵ و ۱۰^۸ × ٦ کنیدی در هر گرم محیط غذایی بود.

واژگان کلیدی: *Beauveria bassiana*، محیط طبیعی، تولید کنیدی، مکمل غذایی، قارچ بیمارگر حشرات

Abstract

In this study, two fungus isolates, *Beauveria bassiana* EUT105 and *B. bassiana* EUT116, were evaluated for production of aerial conidia on wheat, wheat flour, wheat bran, rice flour, rice bran, rice paddy, millet and corn flour using two phasic liquid-solid system. Data analysis showed that there are significant differences among treatments (simple media) in both isolates. In *B. bassiana* EUT105, the maximum and minimum productions were achieved on wheat bran, 2.3×10^{10} conidia/g and on rice paddy, 1.5×10^{9} conidia/g of medium, respectively. In *B. bassiana* EUT116, wheat bran with 6.1×10^{9} conidia/g and millet with 8×10^{8} conidia/g had the maximum and minimum productions, respectively. Effect of adding

دریافت: ۱۳۸۸/۱/۳۱، پذیرش: ۱۳۸۹/۱/۳۱.

nutritional complementary compounds to the growth media was significant in increasing of conidial yield. Related results showed that adding permeate increased the production but molasses did not it in comparison with control in both isolates. Wheat bran plus permeate had the maximum production, 5×10^{10} and 4.6×10^{10} conidia/g in *B. bassiana* EUT105 and EUT116, respectively and minimum production was obtained with rice flour plus molasses, 1.5×10^{8} and 6×10^{8} conidia/g in *B. bassiana* EUT105 and EUT116, respectively.
Keywords: *Beauveria bassiana*, natural medium, conidial production, complementary substance, entomopathogenic fungus

مقدمه

یکی از جایگزین‌های مناسب در جهت اقتصادی نمودن تولید و فرآوری قارچ‌های بیمارگر حشرات، استفاده از مواد طبیعی ارزان‌قیمت مثل بقایای محصولات صنعتی کشاورزی می‌باشد. تولید تجاری کنیدی‌ها عموماً روی محیط‌های غذایی جامد انجام می‌گیرد که می‌تواند به حالت کشت ساده روی موادی مانند غلات از جمله برنج یا سایر محیط‌های غذایی (بر اساس نشاسته)، یا تخمیر جامد و یا کشت دو مرحله‌ای روی محیط مایع و جامد باشد.

Shi (1988) با استفاده از ۳۰۰ کیلوگرم سبوس گندم و ۲۰ کیلوگرم آرد گندم به‌اضافه‌ی میزان کمی آرد ذرت (حدود ۲٪)، ۲۱ کیلوگرم پودر کنیدی از طریق کشت سطحی تولید نمود. Yao *et al*. (1988) در تولید انبوه *Beauveria bassiana* در چین از محیط کشت تقریباً ساده و ارزان شامل آرد گندم + آگار + ساکاروز + آب (۵ :۰/۰۲ :۰/۰۲ :۱) استفاده و $۱/۵ \times ۱۰^{۱۱}$ کنیدی به ازای هر گرم، تولید کردند (به نقل از Feng *et al*., 1994).

Dorta *et al*. (1990) نشان دادند که رشد *Metarhizium anisopliae* روی مخلوطی از سبوس و شلتوک برنج در مقایسه با برنج تنها، با تولید کنیدی بیشتری همراه است. Steinmetz & Schonbeck (1994) از پوست درخت کاج به عنوان یک محصول فرعی جنگلی برای تولید *Trichoderma harzianum* و *Gliocladium roseum* استفاده، و به‌ترتیب $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۶}$ کنیدی در هر گرم بعد از یک هفته نگه‌داری تولید نمودند. Nelson *et al*. (1996) (به نقل از El Damir, 2006) نشان دادند که تولید کنیدی قارچ‌های *M. anisopliae*، *B. bassiana* و *Beauveria brongniartii* در شرایط ۲۳ درجه‌ی سیلسیوس و نور طبیعی در مدت ۳ هفته روی برنج بیشتر از گندم و جو می باشد. Lopez-LIorca & Carbonell (1998) برای تولید کنیدی *Verticillium lecanii* از مزوکارپ بادام استفاده کردند. مزوکارپ خردشده همراه با آگار، تولید بیوماس قارچ را در مقایسه با شاهد (فقط مزوکارپ) افزایش داد و در مدت دو هفته، تعداد

$۱۰^{۷}$ × ۹/۷–۲/۹ کنیدی به ازای هر گرم مزوکارپ خشک، تولید گردید. در پژوهشی دیگر، *B. bassiana* و *Metarhizium lavoviride* روی هفت غله‌ی متفاوت؛ جو، گندم بهاره، گندم زمستانه، جو دوسر، چاودار، ارزن و برنج کشت داده شد. بیشترین میزان تولید کنیدی *B. bassiana* روی جو برابر $۱۰^{۸}$ × ۳–۲/۸ کنیدی در هر گرم و *M. flavoviride* روی جو دوسر و برابر $۱۰^{۷}$ × ۳/۹ کنیدی در هر گرم برآورد گردید (Bradley *et al*., 2002). Feng *et al*. (2000) در تخمیر فاز جامد برای تولید *V. lecanii*؛ برنج، سبوس برنج، شلتوک برنج و مخلوط این مواد را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که برنج پخته و سبوس برنج تولید اسپور بالایی داشت که به‌ترتیب $۱۰^{۹}$ × ۱/۵ و $۱۰^{۹}$ × ۱/٤ اسپور به ازای هر گرم محیط کشت تولید نمودند. Dalla-Santa *et al*. (2005) تولید $۱۰^{۹}$ × ۳/٤ کنیدی از *B. bassiana* را در هر گرم ماده‌ی خشک از مخلوط سیب زمینی (٤۰٪) و باگاس نیشکر (٦۰ ٪) گزارش کردند. تولید اسپور *V. lecanii* روی هفت نوع محیط غذایی شامل گندم، برنج، ارزن، سویا، ماش، جو و بلغور جو توسط Farsi-Rahimabadi (2003) مورد بررسی قرار گرفت که سویا با $۱۰^{۷}$ × ۵/۳۷ کنیدی در میلی‌لیتر، بیشترین و برنج با $۱۰^{۷}$ × ۱/٦۷ کنیدی در میلی‌لیتر، کمترین میزان تولید را نشان داد. Haji Allahverdi Pour *et al*. (2008) گندم، جو و برنج را در تولید انبوه *B. bassiana* مورد ارزیابی قرار دادند و مشخص گردید که میانگین تولید کنیدی در واحد حجم در برنج بیشتر از گندم و جو است. در سامانه‌های صنعتی، روش دو مرحله‌ای تولید قارچ بیشتر مورد توجه است که میسلیوم یا اجسام هیفی در محیط مایع درون ارلن‌های متحرک یا فرمانتورها تولید شده و برای تولید کنیدی به محیط کشت جامد انتقال می‌یابند. این سامانه‌ی تخمیر دو مرحله‌ای، مزایای تولید انبوه در تخمیر مایع و تولید کنیدی‌های هوایی پایدار آب‌گریز روی بستر جامد را به‌طور هم‌زمان دارا می‌باشد (Jenkins & Goettel, 1997; Ye *et al*., 2006). یکی از برنامه‌های دو فازی موفق در تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات، LUBILOSA می‌باشد که برای تولید *M. flavoviride* اجرا شده است (Jenkins & Goettel, 1997).

در مطالعه‌ی حاضر، با توجه به دسترسی محلی، هزینه و نتایج حاصل از آزمایش‌های محققان مختلف، محیط‌های گندم، آرد گندم، سبوس گندم، آرد برنج، سبوس برنج، شلتوک

برنج، ارزن و آرد ذرت انتخاب شد، با این هدف که پتانسیل تولید کنیدی از دو جدایهی قارچ *B. bassiana* روی این مواد مورد ارزیابی و مقایسه قرار گیرد.

مواد و روشها

در این پژوهش، دو جدایهی ایرانی *B. bassiana* EUT105 و *B. bassiana* EUT116 که هر دو در شهرستان کرج و بهترتیب از خاک (استفاده از لارو *Galleria*) و یک لارو بالپولکدار جدا شده بودند، از لحاظ تولید کنیدی روی محیطهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفتند.

بررسی محیطهای غذایی جامد طبیعی در تولید کنیدیهای هوایی

روش تولید انتخابشده، سامانهی دو فازی مایع- جامد بود که در آن ابتدا دو جدایهی مورد نظر در یک محیط مایع درون ارلنهای متحرک رشد یافته و به دنبال آن در یک زمان مشخصی به محیطهای غذایی جامد اضافه شد. کنیدیزایی روی این محیطها صورت گرفت. آزمایش در ۳ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

- مرحلهی ۱: برای تهیهی محیط مایع PDB (Potato Dextrose Broth)، ۲۰۰ گرم سیبزمینی تازه و پوستکنده در آب مقطر پخته شد. عصارهی حاصل پس از عبور داده شدن از چند لایه پارچهی ململ، صاف شده و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد. به ازای هر لیتر، ۱۰ گرم دکستروز اضافه گردید. داخل ارلن ۵۰۰ میلیلیتری، ۲۵۰ میلیلیتر از این محیط ریخته و پس از اتوکلاو کردن در شرایط استاندارد و خنک شدن محیط مورد نظر، هر ارلن با دایرهای به قطر ۵ میلیمتر در زیر هود میکروبیولوژی، مایهکوبی شد. ارلنها روی شیکر ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت پنج روز قرار گرفتند. قبل از استفاده از محیطهای مایع در مرحلهی دوم، نمونهای از محیطها به منظور بررسی عدم وجود آلودگی تهیه گردید.
- مرحلهی ۲: محیطهای غذایی مورد استفاده در این تحقیق (گندم، آرد گندم، سبوس گندم، آرد برنج، سبوس برنج، شلتوک برنج، آرد ذرت و ارزن) با بلاستوسپورهای محیط کشت مایع حاصل از مرحلهی اول با غلظت تقریبی ۲×۱۰^{۷} بلاستوسپور در میلیلیتر و حدود ۱۰ میلیلیتر از سوسپانسیون قارچی به ازای هر کیسه مایهکوبی شد تا کنیدیهای هوایی تشکیل گردد.

– مرحله‌ی ۳: وزن مشخصی از گندم و ارزن به‌طور جداگانه شسته شد و به مدت ۳–۲ ساعت داخل آب خیس گردید. سپس غلات داخل آب پخته شده و آب اضافی آن گرفته شد. بعد از سرد شدن، غلات پخته داخل کیسه‌های قابل اتوکلاو با ابعاد ۳٤ × ۲٤ سانتی‌متر قرار گرفت، به‌طوری‌که نزدیک ۱۰ سانتی‌متر از طول کیسه را پر کرد. به ازای هر کیسه، ۱۰۰ گرم از هر یک از مواد غذایی در نظر گرفته شد که پس از بستن درِ کیسه‌ها، به مدت ۱ ساعت در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ °C و فشار یک اتمسفر استریل شدند. سایر محیط‌های غذایی ابتدا وزن شده و سپس با یک پاشنده‌ی دستی تا حدی که رطوبت حدود ٦۰٪ ایجاد شود، مرطوب گردیدند. مواد غذایی، داخل کیسه‌ها ریخته شد و بعد از بستن سر کیسه‌ها، به مدت ٤۵ دقیقه در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ °C و فشار ۱/۵ اتمسفر قرار گرفت تا استریل شود. سپس کیسه‌ها به محفظه‌ی استریل هود منتقل شدند. مواد غذایی داخل کیسه‌ها با زادمایه‌ی قارچ تولید شده در مرحله‌ی اول مایه‌کوبی شد. قبل از استفاده از زادمایه، از عدم وجود آلودگی اطمینان حاصل گردید و شمارش بلاستوسپور صورت گرفت. هر کیسه با ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون بلاستوسپور قارچ مایه‌کوبی شد که غلظت آن برای جدایه‌های *B. bassiana* EUT105 و *B. bassiana* EUT116 به‌ترتیب برابر $۱/۸ \times ۱۰^{۷}$ و ۲×۱۰^{۷} بلاستوسپور در میلی‌لیتر بود. بعد از بستن سر کیسه‌ها، زادمایه کاملاً با مواد غذایی مخلوط گردید، به‌طوری‌که تمام مواد غذایی با محیط کشت مایع آغشته شد. کیسه‌ها داخل انکوباتور با دمای ۱ ± ۲۵ °C و دوره‌ی نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، به مدت ۱۵ روز قرار گرفتند تا کنیدی‌های هوایی تولید گردند. در روز هفتم، محیط‌های غذایی کاملاً با دست مخلوط و داخل کیسه پخش شدند.

– مرحله‌ی٤: در این مرحله، استخراج کنیدی‌ها پس از گذشت ۱۵ روز صورت گرفت. ابتدا محیط‌های غذایی با دست خرد شد تا مواد غذایی و کنیدی‌ها جدا شوند. به هر کدام از کیسه‌ها ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و Tween 80 ۰/۰۳ ٪ اضافه و خوب به هم زده شد تا همه‌ی محیط غذایی را در بر گیرد. سپس مجموعه‌ی مواد داخل بشر ریخته شد و به مدت چند دقیقه با یک هم‌زن در دور کند به هم زده شد تا کنیدی‌ها کاملاً جدا شوند. سوسپانسیون حاصل، از پارچه‌ی ململ سه‌لایه عبور داده شد و یک میلی‌لیتر از آن در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق گردید. برای سهولت شمارش، عمل رقیق‌سازی تا سه مرحله تکرار شد. غلظت کنیدی‌ها در هر

میلی‌لیتر با استفاده از هموسیتومتر تخمین و سپس به ازای هر گرم محیط تعیین گردید. کلیه‌ی مراحل برای هر دو جدایه انجام گرفت.

افزودن مکمل‌های غذایی به محیط‌های غذایی جامد

در این قسمت، از ضایعات کشاورزی و صنایع غذایی به‌عنوان مکمل محیط‌های غذایی و منبع هیدروکربنی خارجی استفاده گردید. ملاس چغندرقند (دریافت از کارخانه چغندرقند) و آب پنیر (دریافت از شرکت پنیرسازی پی‌آذر) با آب مقطر رقیق شدند تا ملاس ۲۰٪ و آب پنیر ۱۰٪ تهیه شود. یک‌سری از محیط‌های غذایی مورد استفاده در این تحقیق با آب مقطر، سری بعد با ملاس و سری سوم با آب پنیر آغشته شد. محیط‌های غذایی همانند مرحله‌ی قبل تهیه گردید. گندم و ازرن بعد از پخته شدن و گرفتن آب اضافی، با آب مقطر، ملاس چغندرقند و آب پنیر مرطوب شدند، و اجازه داده شد تا در هوای آزاد آب اضافی آن‌ها خشک گردد. سپس، غلات به‌طور جداگانه داخل کیسه‌ها ریخته و مشابه مرحله‌ی قبل استریل شدند. سایر محیط‌های غذایی نیز مرطوب گردیدند تا رطوبت مناسب ایجاد شود. برای هر دو جدایه، تمام مراحل توزین، بسته‌بندی کیسه‌ها، استریل و مایه‌کوبی آن‌ها مشابه مرحله‌ی قبل صورت گرفت. استخراج و شمارش کنیدی‌ها نیز مانند مرحله‌ی قبل انجام شد.

تجزیه‌ی آماری

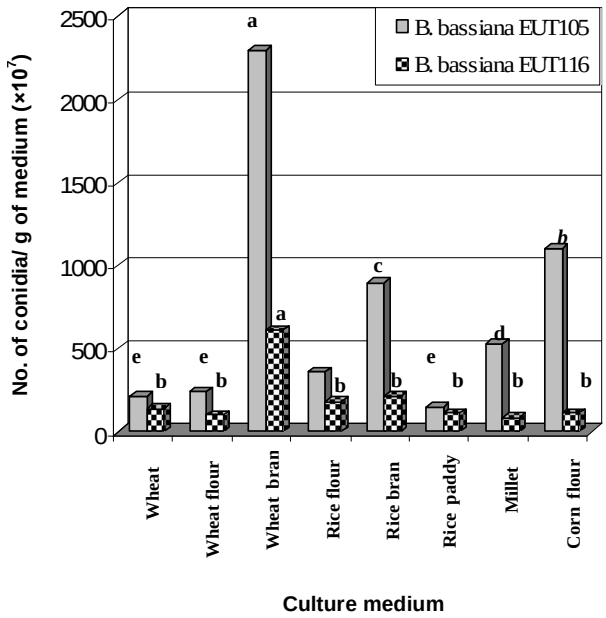
کلیه‌ی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. در مورد افزودن مکمل‌های غذایی، که آزمایش‌های فاکتوریل با پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی پیاده شده بود، تجزیه‌ی واریانس داده‌ها با استفاده از مدل GLM و مقایسه‌ی میانگین‌ها به روش Tukey HSD در نرم‌افزار SYSTAT انجام گرفت. برای رسم نمودارها از برنامه‌ی Excel استفاده گردید.

نتایج

تجزیه‌ی واریانس داده‌ها نشان داد که در هر دو جدایه بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($F_{۷و۱۶}$ = ٤٢/١٣؛ P < ٠/٠١ برای جدایه‌ی *B. bassiana* EUT105 و $F_{۷و۱۶}$ = ١٦/١٣؛

$P <$ ۰/۰۱ در مورد جدایه‌ی *B. bassiana* EUT116). مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی برای جدایه‌ی *B. bassiana* EUT105، تیمارها را در پنج سطح آماری گروه‌بندی نمود ($P <$ ۰/۰۵). سبوس گندم با میانگین تولید ۱۰^۱۰ × ۲/۳ کنیدی به ازای هر گرم محیط غذایی، بیشترین تولید کنیدی را به خود اختصاص داد و در سطح a قرار گرفت. آرد ذرت از نظر تولید کنیدی با میانگین ۱۰^۱۰ × ۱/۱ کنیدی در هر گرم ماده‌ی غذایی، در سطح b قرار داشت و بقیه‌ی تیمارها در سطوح بعدی قرار گرفتند. محیط شلتوک برنج با میانگین تولید ۱۰^۹ × ۱/۵ کنیدی در هر گرم ماده‌ی غذایی، کمترین میزان تولید کنیدی را به خود اختصاص داد. در جدایه‌ی *B. bassiana* EUT116 نیز سبوس گندم بیشترین تولید کنیدی را داشت و با میانگین تولید ۱۰^۹ × ٦/۱ کنیدی به ازای هر گرم سبوس گندم، در سطح a قرار گرفت. بقیه‌ی تیمارها از نظر تولید کنیدی در سطح b قرار گرفتد که ارزن با تولید ۱۰^۸ × ۸ کنیدی، کمترین مقدار را داشت (شکل ۱).

نتایج تجزیه‌ی واریانس افزودن مکمل‌های غذایی (ملاس چغندرقند و آب پنیر) به محیط‌های غذایی با استفاده از مدل GLM نشان داد که در هر دو جدایه بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($F_{۲و٤۸} =$ ۱۵/٤۰؛ $P <$ ۰/۰۰۰۱ برای جدایه‌ی *B. bassiana* EUT105 و $F_{۲و٤۸} =$ ۱۳۱/۰۰؛ $P <$ ۰/۰۰۰۱ برای جدایه‌ی *B. bassiana* EUT116). مقایسه‌ی میانگین‌ها به روش توکی مشخص نمود که محیط‌های دارای آب پنیر، در سطح a قرار دارند ($P <$ ۰/۰۵) و در واقع افزودن آب پنیر موجب افزایش تولید کنیدی گشته است، ولی افزودن ملاس در تولید کنیدی در مقایسه با محیط‌های شاهد، تغییر معنی‌داری نشان نداد ($P >$ ۰/۰۵) و محیط‌های بدون مکمل و دارای ملاس هر دو در سطح b قرار گرفتند. تولید کنیدی محیط‌های غذایی دارای ملاس و آب پنیر در مقایسه با محیط‌های بدون مکمل برای جدایه‌ی *B. bassiana* EUT105 در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به این شکل، در بین تمام محیط‌های غذایی، سبوس گندم دارای آب پنیر با میانگین تولید ۱۰^۱۰ × ۵ و آرد برنج ملاس‌دار با ۱۰^۸ × ۱/۵ کنیدی در هر گرم ماده‌ی غذایی، به‌ترتیب بیشترین و کمترین تولید کنیدی را به خود اختصاص داده‌اند. در جدایه‌ی *B. bassiana* EUT116 نیز، بیشترین و کمترین مقدار تولید کنیدی را به‌ترتیب سبوس گندم دارای آب پنیر با میانگین تولید ۱۰^۱۰ × ٤/٦ و آرد برنج ملاس‌دار با ۱۰^۸ × ٦

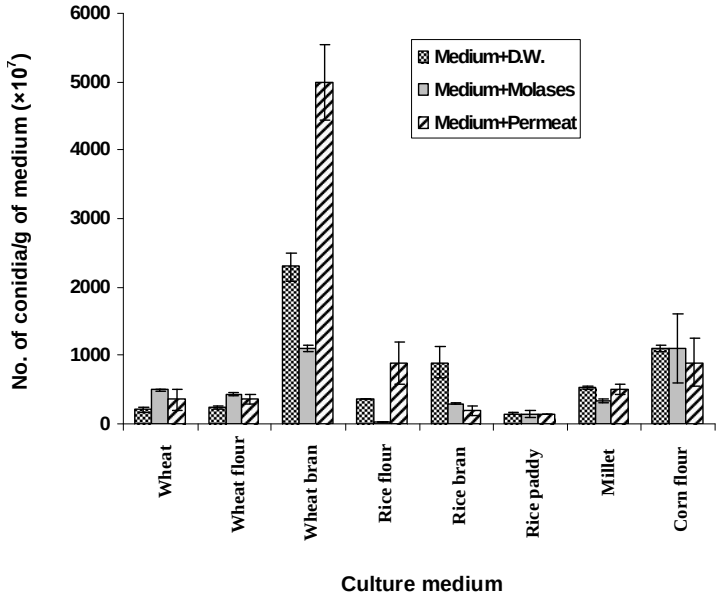


شکل ۱. میزان تولید کنیدی در جدایـه‌هـای *B. bassiana* EUT105 و *B. bassiana* EUT116 در محیط‌های غذایی مختلف. حروف متفـاوت بیـانگر وجـود اخـتلاف معنـی‌دار اسـت (Tukey HSD؛ $P < ۰/۰۵$).

Fig 1. Conidial production for two isolates *B. bassiana* EUT105 and *B. bassiana* EUT116 in different natural media. Values given with different letters are significantly different (Tukey HSD, $P < 0.05$).

کنیدی در هر گرم مادهی غذایی، دارند (شکل ۳).

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، بین محیط‌های غذایی سبوس‌دار در هـر دو جدایـه، تولیـد کنیدی در سبوس گندم بیشتر از سبوس برنج بود (در جدایهی *B. bassiana* EUT105 بهترتیـب برابر $۲/۳ \times ۱۰^{۱۰}$ و ۹×۱۰^{۹}، و در جدایهی *B. bassiana* EUT116، بهترتیب برابر $٦/۱ \times ۱۰^{۹}$ و $۲/۱ \times ۱۰^{۹}$ کنیدی در هر گرم محیط غذایی). بین محیط‌های آردی نیز، آرد ذرت، آرد بـرنج و آرد گندم، بهترتیب بیشترین تولید را داشتند.

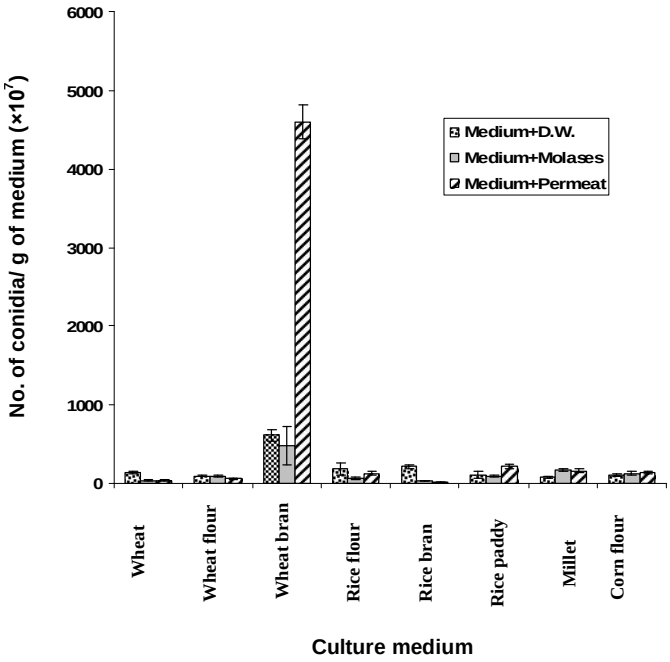


شکل ۲. میانگین (± SE) تولید کنیدی از قارچ *B. bassiana* EUT105 در محیط‌های کشت ساده و همراه با مکمل‌های غذایی (ملاس چغندرقند و آب پنیر).

Fig 2. Mean (± SE) conidial production of *B. bassiana* EUT105 in simple and supplemented (with molasses and permeate) solid culture media.

بحث

توانایی تولید بالای اسپورهای قارچی برای توسعه‌ی موفق عوامل کنترل بیولوژیک امری ضروری می‌باشد. در این تحقیق، از گندم، آرد گندم، سبوس گندم، آرد برنج، سبوس برنج، شلتوک برنج، ارزن و آرد ذرت به عنوان محیط‌های رشدی برای تولید انبوه دو جدایه از *B. bassiana* استفاده شد. در حالت کلی، تعداد زیادی کنیدی روی همه‌ی محیط‌ها تولید شدند اما بسته به جدایه‌ی قارچی و نوع محیط رشدی، میزان تولید متفاوت بود و تجزیه‌ی داده‌های مربوطه برای هر دو جدایه نشان داد که اثر کیفیت محیط غذایی در تولید کنیدی‌های هوایی معنی‌دار می‌باشد. این موضوع توسط El Damir (2006) نیز مورد تأکید قرار گرفته که نوع



شکل ۳. میانگین (± SE) تولید کنیدی از قارچ *B. bassiana* EUT116 در محیطهای کشت ساده و همراه با مکمل‌های غذایی (ملاس چغندرقند و آب پنیر).

Fig 3. Mean (± SE) conidial production of *B. bassiana* EUT116 in simple and supplemented (with molasses and permeate) solid culture media.

محیط کشت، تولید کنیدی قارچ‌های بیمارگر حشرات را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در هر دو جدایه، سبوس گندم، بیشترین تولید کنیدی را به خود اختصاص داد و شلتوک برنج و ارزن کمترین میزان تولید کنیدی را داشتند.

مطالعات مختلفی از نقطه نظر اثر محیط رشد روی تولید کنیدی در قارچ *B. bassiana* صورت گرفته است. Goettel (1986) با استفاده از سبوس گندم، 10^{10} کنیدی به ازای هر گرم محیط کشت تولید کرد (به نقل از Feng *et al.*, 1994) که با میزان تولید کنیدی روی سبوس گندم در بررسی ما مطابقت دارد. در تحقیق مشابهی، Arcas *et al.* (1999) بسته به جدایه، بین

$۱۰^{۷}$ × ۱/۳–۳/۷ کنیدی در هر گرم محیط کشت سبوس گندم تولید کردند که این مقدار تولید، کمتر از میزان تولید در بررسی ما روی سبوس گندم می‌باشد. در تحقیق حاضر، سبوس برنج به‌ترتیب تولید $۱۰^{۹}$ × ۹ و $۱۰^{۹}$ × ۲/۱ کنیدی در هر گرم وزن خشک برای جدایه‌های EUT105 و EUT116 از *B. bassiana* نمود. Feng *et al*. (2000) نیز تولید مشابهی به مقدار $۱۰^{۹}$ × ۱/٤ اسپور به ازای هر گرم سبوس برنج را گزارش نمودند.

در تولید انبوه *B. bassiana*، استفاده از شلتوک برنج و محیط‌های آرد ذرت، آرد برنج و آرد گندم به‌صورت ساده یا مخلوط توسط محققان مختلف بررسی شده است (Padmaja & Kaur, 2001). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که میزان تولید بر حسب جدایه‌ی قارچی و بستر رشدی استفاده‌شده متفاوت است. El Damir (2006) در تولید جدایه‌های مختلف *B. bassiana* روی محیط‌های گندم، ذرت و ارزن با رطوبت‌های مختلف مشاهده کرد که نوع محیط کشت و میزان رطوبت، عوامل تأثیرگذار مهمی در تولید کنیدی می‌باشد. Jenkins *et al*. (1998) بیان کردند که غلات دانه‌ای از لحاظ مواد غذایی، بین گونه‌ها و واریته‌ها متنوع هستند و این تنوع می‌تواند تولید را تحت تأثیر قرار دهد. هم‌چنین، محیط‌های مختلف رشدی به مقدار آب متفاوتی نیاز دارند. از عوامل مهم تأثیرگذار دیگر در میزان تولید، نسبت سطح به حجم محیط مورد استفاده می‌باشد. طبق نظر Mendonca (1992) (به نقل از Jenkins *et al*., 1998)، محیط‌های با نسبت سطح به حجم بالا، برای تولید کنیدی مناسب‌تر هستند. در بررسی حاضر، سبوس گندم بیشترین تولید کنیدی را داشت و می‌توان گفت این ماده‌ی غذایی به علت دارا بودن نسبت سطح به حجم بزرگ‌تر و درشت بودن ذرات، تولید بالای کنیدی‌ها را موجب شده است. درشت بودن ذرات می‌تواند موجب نگه‌داری آب و رطوبت مورد نیاز قارچ در فضای بین ذرات مواد غذایی شود. هم‌چنین، از طریق این فضاها اکسیژن به قارچ رسیده و CO_2 نیز قابل تبادل می‌باشد. مراجعه به تجزیه‌ی سبوس گندم (Kamyab, 2001) نشان می‌دهد که این ماده از منابع کربنی و نیتروژنی نسبتاً مناسبی برخوردار است و نیازهای غذایی قارچ را برای رشد فراهم می‌کند. سبوس گندم در مقایسه با سایر محیط‌های مورد آزمایش، از نظر پروتئین خام، املاح و متیونین به‌علاوه سیستئین غنی‌تر است. تعادل بین مواد غذایی و نسبت کربن به نیتروژن نیز در این میان از اهمیت خاصی برخوردار

است. این عوامل در مجموع محیط سبوس گندم را به محیط مناسبی برای رشد و اسپورزایی قارچ تبدیل کرده است. در مقایسهی محیطهای سبوسدار با محیطهای آردی معلوم شد که این محیطها نسبت به محیطهای آردی تولید کنیدی بیشتری دارند. در محیطهای آردی، ذرات محیط کشت بعد از مرطوب و استریل شدن به هم متصل شده و ذرات درشتتری ایجاد میکنند، ولی در وزن مساوی با بقیهی محیطها، نسبت سطح به حجم کاهش مییابد و این میتواند دلیلی بر کاهش تولید در محیطهای آردی نسبت به محیطهای سبوسدار و بقیهی محیطها باشد. البته در میان محیطهای آردی نیز، آرد ذرت با داشتن ذرات درشتتر، نسبت سطح به حجم بالا و منبع هیدروکربنی خوب، تولید بالایی را نشان میدهد که با سبوس گندم در هر دو جدایه قابل قیاس بوده و میتواند محیطی مناسب برای رشد و اسپورزایی قارچ باشد.

افزودن مکملها (ملاس چغندرقند و آب پنیر) به محیطهای غذایی در هر دو جدایهی قارچی نشان داد که افزودن آب پنیر موجب افزایش تولید میشود، ولی افزودن ملاس تغییر معنیداری در تولید کنیدی در مقایسه با خود محیطهای غذایی نشان نداد. آب پنیر به عنوان یک مکمل غذایی، بارزترین اثر خود در افزایش تولید کنیدی را به همراه سبوس گندم نشان داده است. مکملهایی مثل آب پنیر، پتانسیل افزایش تولید اسپورهای *B. bassiana* را دارا میباشند و تأثیر متفاوت این مواد روی تولید کنیدی میتواند به نوع محیط کشت پایه و نوع جدایه مربوط باشد. ترکیب مواد موجود در پودر آب پنیر (Kamyab, 2001) نشان میدهد که این ماده از نظر منبع هیدروکربنی بسیار غنی بوده و با دارا بودن منبع نیتروژنی به همراه ماکرومولکولها و میکروالمنتهای مورد نیاز قارچ، موجب افزایش ذخیرهی غذایی محیطهای رشدی و تولید کنیدیهای قارچی میشود. پودر آب پنیر در مقایسه با ملاس چغندرقند از نظر هیدروکربن و ازت غنیتر است. همچنین، فسفر، کلسیم، متیونین و سیستئین بیشتری دارد. پایین بودن میزان تولید در برخی محیطها میتواند به ضعیف بودن محیط کشت از نظر ذخایر غذایی، به هم خوردن تعادل بین مواد غذایی و نسبت کربن به نیتروژن، چسبندگی بین ذرات محیط غذایی در حین آمادهسازی محیط کشت و به تبع آن کاهش سطح به حجم و کاهش هوادهی، تغییر pH، و در نهایت نامناسب شدن محیط غذایی برای رشد قارچ مرتبط گردد. عامل مؤثر دیگر در تولید کنیدی، جدایهی قارچ مورد نظر میباشد، چرا که نیازهای غذایی

قارچ‌های مختلف و نیز جدایه‌های یک قارچ متفاوت است. Jenkins *et al*. (1998) نیازهای تغذیه‌ای برای رشد میسلیوم و کنیدی‌زایی را برای جدایه‌های مختلف یک گونه‌ی قارچی، متفاوت اعلام نمودند. از آن‌جائی که نیاز غذایی قارچ‌ها و جدایه‌ها را به روشنی نمی‌دانیم، لذا انجام آزمایش‌هایی برای تعیین نیازهای غذایی قارچ، توجه به ترکیب محیط کشت و نیازهای مطلوب محیطی قارچ امری ضروری می‌باشد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، محیط سبوس گندم به علت عملکرد بالا در تولید، دسترسی آسان و کاهش هزینه‌ی محیط کشت در مقایسه با سایر محیط‌های مورد استفاده، به‌عنوان محیط مناسب و ایده‌آل برای تولید انبوه کنیدی‌های قارچ *B. bassiana* معرفی می‌شود. مطالعات مقایسه‌ای از نظر بیمارگری مطلوب اسپورهای حاصل از این محیط و محیط‌های استاندارد روی برخی آفات هدف، ضروری به نظر می‌رسد.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی دانشگاه تهران و قطب علمی کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی برای انجام این پژوهش صمیمانه سپاس‌گزاری می‌شود. از موسسه‌ی جنگل‌ها و مراتع کشور به خاطر فراهم نمودن بخشی از امکانات پژوهشی قدردانی می‌گردد.

منابع

Arcas, J. A., Diaz, B. M. & Lecuona, R. E. (1999) Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Journal of Biotechnology* 67, 151-158.

Bradley, C. A., Wood, P. P., Black, W. E., Kearns, R. D. & Britton, J. (2002) Solid culture substrate including barley. Available on: *http://www.freepatentsonline.com/20020006650.html* (accessed 10 September 2007).

Dalla-Santa, H. S., Dalla-Santa, O. R., Brand, D., Vandenberghe, L. P. S. & Soccol, C. R. (2005) Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 51-60.

Dorta, B., Bosch, A., Arcas, J. A. & Ertola, R. J. (1990) High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33, 712-715.

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

Farsi-Rahimabadi, M. J. (2003) Evaluation of nutritional media and environmental conditions for production and formulation of *Verticillium lecanii*. Ph. D. Thesis. College of Agriculture, University of Tehran.

Feng, M. G., Liu, B. L. & Tzeng, Y. M. (2000) *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 23, 25-29.

Feng, M. G., Poprawski, T. J. & Khachatourians, G. G. (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology* 4, 3-34.

Haji Allahverdi Pour, H., Ghazavi, M. & Kharazi-Pakdel, A. (2008) Comparison of the virulence of some Iranian isolates of *Beauveria bassiana* to *Eurygaster integriceps* (Hem.: Scutelleridae) and production of the selected isolate. *Journal of Entomological Society of Iran* 28(1), 13-26.

Jenkins, N. E. & Goettel, M. S. (1997) Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171, 37-48.

Jenkins, N. E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A. J. & Lomer, C. J. (1998) Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information* 19, 21-31.

Kamyab, A. (2001) *A user guide to the animal nutrition*. 218 pp. Hagh-Shenas Publication.

Lopez-LIorca, L. V. & Carbonell, T. (1998) Use of almond mesocarp for production of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 886-895.

Padmaja, V. & Kaur, G. (2001) Use of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (Moniliales: Deuteromycetes) for controlling termites. *Current Science* 81, 645-647.

Steinmetz, J. & Schonbeck, F. (1994) Conifer bark as growth medium and carrier for *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium roseum* to control *Pythium ultimum* on pea. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101, 200-211.

Ye, S. D., Ying, S. H., Chen, C. & Feng, M. G. (2006) New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnological Letters* 28, 799-804.