



## Mass production efficiency of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum*, and *Lecanicillium lecanii* on some solid natural substrates

Marzieh Alinejad<sup>1</sup> , Reza Talaei-Hassanloui<sup>2</sup> , Seyedeh Masoumeh Zamani<sup>3</sup> ,  
Hasan Askary<sup>4</sup> , Jamasb Nozari<sup>5</sup>

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran [m.alinejad@ut.ac.ir](mailto:m.alinejad@ut.ac.ir)
2. Corresponding Author, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, [rtalaei@ut.ac.ir](mailto:rtalaei@ut.ac.ir)
3. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran [mzamani@rifr-ac.ir](mailto:mzamani@rifr-ac.ir)
4. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran. [askary2@gmail.com](mailto:askary2@gmail.com)
5. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran [nozari@ut.ac.ir](mailto:nozari@ut.ac.ir)

| Article Info                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Article type:</b><br/>Research Article</p> <p><b>Article history:</b><br/>Received: 19 September 2025<br/>Revised: 16 October 2025<br/>Accepted: 25 October 2025<br/>Published online: Autumn and Winter 2024</p> <p><b>Keywords:</b><br/><i>Cucumber powdery mildew</i>,<br/><i>Microbial formulations</i>,<br/><i>Phenolic compounds</i>,<br/><i>Defense mechanism</i>.</p> | <p>Biological control using entomopathogenic fungi is a promising alternative to chemical pesticides. The effectiveness of fungal biopesticides depends on optimizing large-scale conidial production and maintaining viability during storage. This study evaluated the conidial production and germination percentage of <i>Beauveria bassiana</i> B2, <i>Metarhizium anisopliae</i> M1, <i>Purpureocillium lilacinum</i> Ento1, and <i>Lecanicillium lecanii</i> V198499 on five solid substrates: rice husk, wheat, wheat bran, broken corn, and flaked barley. Isolates were first cultured in potato extract liquid medium at 25 °C for 10 days on a shaker to obtain inoculum. Each 200 g substrate was sterilized, moistened with 100 ml of sterile water, and inoculated with 10 ml of fungal suspension. The substrates were incubated at 25 °C for 14 days, with mixing every 48 hours to enhance sporulation. After air-drying, conidia were harvested, and the yield was measured using a hemocytometer. Germination was assessed weekly for 56 days. Flaked barley yielded the highest production for <i>B. bassiana</i>, <i>L. lecanii</i>, and <i>P. lilacinum</i>, with <math>5.3 \times 10^9</math>, <math>3.6 \times 10^9</math>, and <math>2.8 \times 10^9</math> conidia/g, respectively. <i>M. anisopliae</i> performed best on wheat (<math>4.6 \times 10^9</math> conidia/g), with flaked barley second. Flaked barley also showed the highest germination (98% initially, 60% after 56 days), while rice husk and wheat bran had the lowest germination (&lt; 50%). From an economic perspective, the conidia-based cost index revealed flaked barley as the most economically viable substrate across all four isolates. In contrast, wheat bran exhibited the highest cost and lowest biological performance. Flaked barley is therefore recommended as the optimal solid substrate for large-scale production of the tested entomopathogenic fungi.</p> |

**Cite this article:** Alinejad, M., Talaei-Hassanloui, R., Zamani, S. M., Askary, H. & Nozari, J. (2024). Mass production efficiency of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum*, and *Lecanicillium lecanii* on some solid natural substrates. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 55 (2), 379-394. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.402251.1007093>



© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.402251.1007093>

### Extended Abstract

#### Introduction

Entomopathogenic fungi are important biological control agents that offer a promising alternative to synthetic chemical pesticides. Their effectiveness depends on producing large quantities of viable conidia and maintaining their quality during storage. Solid-state fermentation (SSF) using agricultural products is a common method for large-scale conidial production. However, the type of substrate plays a major role in conidial yield, germination rate, and production cost. The present study aimed to evaluate the biological performance and economic efficiency of five solid substrates (rice husk, wheat, wheat bran, broken corn, and flaked barley) in the production of conidia for four fungal isolates: *Beauveria bassiana* B2, *Metarhizium anisopliae* M1, *Purpureocillium lilacinum* Ento1, and *Lecanicillium lecanii* V198499.

## Materials and Methods

The experiment was conducted under laboratory conditions at 25 °C. Four entomopathogenic fungal isolates were cultured in potato extract liquid medium on a shaker (150 rpm) for 10 days to prepare the inoculum. Five solid substrates were used, including rice husk, wheat, wheat bran, broken corn, and flaked barley. Each substrate (200 g) was autoclaved, moistened with 100 ml of sterile water, and inoculated with 10 ml of the fungal suspension. The inoculated substrates were incubated at 25 °C for 14 days and manually mixed every 48 hours to improve sporulation. After incubation, substrates were air-dried, and conidia were harvested by mixing 1 g of dry substrate with 9 ml of water-Tween 80 solution (0.01%). Conidial concentrations were determined using a hemocytometer. The germination percentage was assessed weekly for 8 weeks by plating samples on PDA medium and counting germinated conidia under a microscope. The cost of each substrate per 100 g was recorded to assess economic performance. Then, a cost index was calculated based on the average number of conidia produced per gram of substrate. This index, expressed in Tomans per  $10^9$  conidia, allowed direct comparison of cost efficiency among substrates.

## Results and Discussion

Results showed that conidial production varied among fungal isolates and substrates. *B. bassiana* B2 yielded the highest number of conidia on flaked barley ( $5.3 \times 10^9$  conidia/g), followed by rice husk ( $3.5 \times 10^9$  conidia/g), while the lowest production was recorded on wheat ( $1.2 \times 10^9$  conidia/g). In contrast, *M. anisopliae* M1 had the highest yield on wheat ( $4.6 \times 10^9$  conidia/g), with flaked barley ranking second ( $3.1 \times 10^9$  conidia/g) and wheat bran yielding the lowest ( $6.0 \times 10^8$  conidia/g). *L. lecanii* V198499 produced the highest conidia on flaked barley ( $3.6 \times 10^9$  conidia/g) and the lowest on wheat bran ( $4.6 \times 10^8$  conidia/g). In *P. lilacinum* Ento1, flaked barley yielded  $2.8 \times 10^9$  conidia/g, while the lowest production was observed on rice husk ( $1.5 \times 10^8$  conidia/g). These findings highlight the significant influence of substrate type on sporulation, indicating that both nutrient composition and structural properties of the substrates strongly affect fungal growth and conidiation efficiency. Conidial germination rates were also affected by substrate and incubation time. Flaked barley supported the highest initial germination (98%) across all isolates and retained 60% after 56 days for *B. bassiana*. Wheat (97% to 55%) and rice husk (95% to 44%) followed. In contrast, wheat bran and rice husk caused sharp declines in *L. lecanii* germination, dropping to 40% and 38% after eight weeks. *P. lilacinum* retained 62% germination on flaked barley but only 44% on rice husk and 46% on wheat bran. These results demonstrate that substrate properties such as aeration, porosity, and moisture retention have a crucial role in sustaining conidial viability during storage. Economic analysis showed that the **cost per gram of substrate** varied significantly among substrates. Flaked barley was the most economical option across all tested isolates—*B. bassiana* B2, *M. anisopliae* M1, *P. lilacinum* Ento1, and *L. lecanii* V198499—with costs of 0.015–0.034 USD g<sup>-1</sup> of substrate. In contrast, wheat bran consistently incurred the highest costs and yielded the lowest biological performance among all substrates. Overall, flaked barley provided the best balance between biological efficiency and cost-effectiveness, supporting its suitability as a sustainable substrate for large-scale production of entomopathogenic fungi.

## Conclusion

Overall, the results showed that substrate type significantly influenced conidial yield, germination rate, and production cost of entomopathogenic fungi. Flaked barley resulted in the highest conidial production and germination rate in *B. bassiana*, *P. lilacinum*, and *L. lecanii*, while *M. anisopliae* performed best on wheat. Economically, flaked barley had the lowest cost per  $10^9$  conidia across all isolates. In contrast, wheat bran showed the lowest biological performance and cost in all cases. Therefore, flaked barley is recommended as the most suitable substrate for large-scale production of the tested fungi.

## Author Contributions

**Marzieh Alinejad:** investigation, methodology, formal analysis, visualization, draft preparation; **Reza Talaei-Hassanloui:** methodology, formal analysis, supervision, project administration and funding acquisition, final review and edit; **Seyede Masoomeh Zamani:** methodology, supervision, final review and edit; **Hassan Askary:** final review and edit; **Jamasb Nozari:** final review and edit.



## کارایی تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات *Metarhizium*، *Beauveria bassiana* و *Purpureocillium lilacinum* *anisopliae* روی چند بستر طبیعی جامد

مرضیه علی‌نژاد<sup>۱</sup> | رضا طلایی حسنلویی<sup>۲</sup> | سیده معصومه زمانی<sup>۳</sup> | حسن عسکری<sup>۴</sup> | جاماسب نوزری<sup>۵</sup>

- دانشجوی دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. رایانامه: [m.alinejad@ut.ac.ir](mailto:m.alinejad@ut.ac.ir)
- نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. رایانامه: [rtalaei@ut.ac.ir](mailto:rtalaei@ut.ac.ir)
- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران. رایانامه: [mzamani@rifr-ac.ir](mailto:mzamani@rifr-ac.ir)
- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران. رایانامه: [askary2@gmail.com](mailto:askary2@gmail.com)
- عضو هیات علمی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. رایانامه: [nozari@ut.ac.ir](mailto:nozari@ut.ac.ir)

| اطلاعات مقاله                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | چکیده                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>نوع مقاله:</b></p> <p>مقاله پژوهشی</p> <p><b>تاریخ دریافت:</b> ۱۴۰۴/۰۶/۲۸</p> <p><b>تاریخ بازنگری:</b> ۱۴۰۴/۰۷/۲۴</p> <p><b>تاریخ پذیرش:</b> ۱۴۰۴/۰۸/۰۳</p> <p><b>تاریخ انتشار:</b> پاییز و زمستان ۱۴۰۴</p> <p><b>کلیدواژه‌ها:</b></p> <p>آفت‌کش زیستی، تولید کنیدیوم، تخمیر در بستر جامد، زنده‌مانی کنیدیوم‌ها، بهینه‌سازی بستر کشت.</p> | <p>کنترل زیستی با استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات جایگزینی امیدبخش برای آفت‌کش‌های شیمیایی است. کارایی آفت‌کش‌های زیستی قارچی به بهینه‌سازی تولید انبوه کنیدیوم‌ها و حفظ زنده‌مانی آن‌ها در دوره نگهداری بستگی دارد. در این مطالعه، میزان تولید کنیدیوم‌ها و درصد تندش چهار گونه قارچ بیمارگر حشرات شامل <i>Purpureocillium lilacinum</i> Ento1، <i>Metarhizium anisopliae</i> M1، <i>Beauveria bassiana</i> B2 و <i>Lecanicillium lecanii</i> V198499 روی پنج بستر جامد پوسته برنج، گندم، سیبوس گندم، ذرت خرد شده و جو پرک شده ارزیابی شد. جدایه‌های قارچی ابتدا در محیط مایع عصاره سیب‌زمینی کشت داده شدند. بسترهای جامد استریل و مایه‌زنی شده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از برداشت کنیدیوم‌ها، درصد تندش آنها تا ۸ هفته (۵۶ روز) ارزیابی شد. طبق نتایج حاصله، بستر جو پرک شده برای قارچ‌های <i>B. bassiana</i>، <i>L. lecanii</i> و <i>P. lilacinum</i> به ترتیب با <math>5/3 \times 10^9</math>، <math>3/6 \times 10^9</math> و <math>2/8 \times 10^9</math> کنیدیوم در هر گرم بیشترین تولید کنیدیوم‌ها را داشت. <i>M. anisopliae</i> بهترین عملکرد را روی بستر گندم (<math>4/6 \times 10^9</math> کنیدیوم در هر گرم) داشت. در بین همه جدایه‌ها، جو پرک شده بالاترین درصد تندش (۹۸ درصد در ابتدا و ۶۰ درصد پس از ۵۶ روز) را حفظ کرد. از نظر اقتصادی، شاخص هزینه‌ترین بستر به ازای تولید <math>10^9</math> کنیدیوم نشان داد که بستر جو پرک‌شده در هر چهار جدایه مورد بررسی، کم‌هزینه‌ترین بستر کشت بود. در مقابل، بستر سیبوس گندم در همه جدایه‌ها، هزینه بیشتر و عملکرد زیستی پایین‌تری داشت. جو پرک‌شده به عنوان بستر بهینه برای تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر مورد بررسی پیشنهاد می‌گردد.</p> |

**استناد:** علی‌نژاد، مرضیه؛ طلایی حسنلویی، رضا؛ زمانی، سیده معصومه؛ عسکری، حسن و نوزری، جاماسب (۱۴۰۴). کارایی تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات *Beauveria bassiana*، *Metarhizium anisopliae* و *Purpureocillium lilacinum* روی چند بستر طبیعی جامد. نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، ۵۵ (۲)، ۳۹۴-۳۷۹. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.402251.1007093>



## مقدمه

مدیریت تلفیقی آفات (Integrated pest management; IPM) رویکردی جامع و پایدار برای کنترل آفات است که با بهره‌گیری از روش‌های زراعی و سایر روش‌های کنترلی، منجر به کاهش بلندمدت جمعیت آفات و خسارت ناشی از آن‌ها می‌شود (Sabbahi et al., 2022). کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات، با پیامدهایی نظیر بروز پدیده مقاومت در جمعیت آفات، آلودگی محیط‌زیست و تهدید سلامت انسان و سایر موجودات زنده همراه است. این چالش‌ها موجب افزایش تمایل به استفاده از روش‌های جایگزین، به‌ویژه کنترل زیستی با استفاده از عوامل میکروبی شده است (Wilson & Tisdall, 2001; Mascarin et al., 2024).

در میان عوامل میکروبی کنترل زیستی آفات، قارچ‌های بیمارگر به دلیل توانایی نفوذ مستقیم از طریق کوتیکول حشرات، سهولت کاربرد، قابلیت بهبود فرمولاسیون‌ها و تولید ساختارهای مقاوم مانند کنیدیوم‌ها، به عنوان عوامل مؤثر در کنترل طیف وسیعی از آفات شناخته شده‌اند (St. Leger et al., 1996; Butt et al., 2001; St. Leger & Wang, 2009). در سال‌های اخیر، حدود ۱۰۰ جنس و بیش از ۱۰۰۰ گونه قارچ بیمارگر از رده‌های مختلف قارچی شناسایی شده‌اند که برخی از آن‌ها در تولید آفت‌کش‌های زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Maina et al., 2018). از جمله مهم‌ترین و پرکاربردترین قارچ‌های بیمارگر می‌توان به *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin، *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff)، *Purpureocillium lilacinum* (Thom) و *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare and Gams، Sorokin، Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones and Samson اشاره کرد که فرمولاسیون‌های تجاری آن‌ها در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه جهت کنترل آفات مورد استفاده قرار می‌گیرند (Chen et al., 2021; Barranco-Florido et al., 2002).

تولید انبوه کنیدیوم قارچ در مقیاس اقتصادی، یکی از مراحل کلیدی تجاری‌سازی عوامل میکروبی قارچی به‌عنوان آفت‌کش‌های زیستی به شمار می‌رود. در میان روش‌های موجود، تخمیر در بستر جامد (Solid State Fermentation, SSF) با استفاده از بسترهای طبیعی نظیر ضایعات محصولات برنج، سبوس گندم، ذرت و سایر پسماندهای کشاورزی، به دلیل هزینه کم، سهولت اجرا و بهره‌وری بالا در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار گرفته است (Lomer et al., 1997; Mascarin et al., 2024). کارایی این روش به عواملی مانند ترکیب غذایی بستر، رطوبت، تهویه و سویه قارچ بستگی دارد (Jaronski & Jackson, 2012). در این فرآیند، میسلیم قارچ ابتدا سطح بستر را پوشانده و سپس کنیدیوم‌ها به‌طور طبیعی در سطح بستر تشکیل می‌شوند. افزون بر این، روش دو مرحله‌ای تخمیر مایع-جامد نیز برای افزایش بازده تولید توسعه یافته است، به‌گونه‌ای که در فاز مایع بلاستوسپورها و میسلیم‌ها تولید می‌شوند و سپس در فاز جامد شرایط مناسب برای تشکیل کنیدیوم‌های هوایی فراهم می‌گردد (Lomer et al., 1997; Rangel et al., 2008).

کنیدیوم‌های تولیدشده را می‌توان بسته به نوع آفت هدف و شرایط کاربرد، به صورت مستقیم (گرانول طبیعی) یا پس از جمع‌آوری در قالب پودر خشک، سوسپانسیون روغنی یا سایر فرمولاسیون‌های پایدار مورد استفاده قرار داد. پس از کاربرد اولیه این فرمولاسیون‌ها در مزرعه، کنترل جمعیت آفات می‌تواند از طریق گسترش طبیعی اپیدمی قارچی ادامه یابد، به این ترتیب که کنیدیوم‌ها و میسلیم‌های تولیدشده در بدن حشرات آلوده، به‌طور طبیعی به سایر حشرات سالم منتقل شده و موجب شیوع بیماری در جمعیت آفات می‌شوند (Karanja et al., 2010; Mascarin & Jaronski, 2016; Sayed et al., 2025).

با وجود مطالعات متعدد بر روی روش‌های کشت قارچ‌های بیمارگر، انتخاب بستر جامد مناسب برای تولید انبوه، اقتصادی و پایدار این قارچ‌ها همچنان یکی از چالش‌های اساسی به‌شمار می‌رود (Agale et al., 2018). بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی تأثیر نوع بستر جامد بر میزان تولید، زنده‌مانی و شاخص اقتصادی تولید انبوه کنیدیوم در چهار گونه قارچ بیمارگر حشرات طراحی شد تا بستر بهینه از نظر زیستی و اقتصادی برای تولید تجاری این عوامل زیستی شناسایی شود.

## پیشینه پژوهش

امروزه روش‌های نوین بهینه‌سازی تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر، بر افزایش تولید و بهبود کیفیت کنیدیوم‌ها تمرکز دارند، زیرا هر دو عامل برای تولید آفت‌کش‌های زیستی مبتنی بر قارچ‌های بیمارگر حشرات ضروری هستند و این فرایند نیز تحت تأثیر عواملی مانند نوع بستر کشت، تهویه، رطوبت و سویه قارچی قرار دارد (Muñiz-Paredes et al., 2017; Jaronski & Jackson, 2012). تاکنون تحقیقات گسترده‌ای در زمینه کشت انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات روی بسترهای مختلف انجام شده است (Santa et al., 2005; Chen et al., 2009; Pham et al., 2010; Bena-Molaei et al., 2011; Roshandel et al., 2016; Bigham & Talaei-Hassanloui, 2017; Muñiz-Paredes et al., 2017).

قارچ *B. bassiana* به‌طور موفقیت‌آمیز روی بسترهای گوناگون از جمله ضایعات نیشکر (Somasekhar et al., 1998)، پودر سفیره کرم ابریشم (Chavan et al., 1998)، محیط آگار (Ovruski et al., 2003) و برنج پخته شده (Feng et al., 1994, 2004) کشت داده شده است. در مطالعه‌ای، ترکیب برنج با محیط حاوی عصاره حشره موجب افزایش چشمگیر تولید کنیدیوم‌های *B. bassiana* تا  $2/8 \times 10^{12}$  کنیدیوم در گرم شد (Santoro et al., 2005). علاوه بر میزان تولید، ویژگی‌هایی نظیر میزان چسبندگی ذرات و سهولت جداسازی کنیدیوم‌ها نیز در کارآمدی بستر نقش تعیین‌کننده دارند (Feng et al., 1994). تفاوت عملکرد بین جدایه‌های مختلف *B. bassiana* نیز نشان‌دهنده اهمیت انتخاب سویه مناسب است (Jaronski & Jackson, 2012). قارچ بیمارگر *M. anisopliae* از دیگر قارچ‌های مهم و پرکاربرد در کنترل زیستی حشرات است که روی بسترهایی مانند برنج، گندم، نخود و ذرت کشت داده شده است. نتایج تحقیقات نشان داده‌اند که بسترهای برنج و نخود تولید کنیدیوم‌های این قارچ را به‌طور معناداری افزایش می‌دهند. ویژگی‌هایی همچون اندازه ذرات، قابلیت تهویه و ظرفیت نگهداری رطوبت بستر، از عوامل اساسی در موفقیت رشد و اسپوردهی این قارچ به‌شمار می‌روند (Muñiz-Paredes et al., 2017). همچنین، کنیدیوم‌های این گونه نسبت به فرآیند خشک شدن حساس بوده و خشک کردن تدریجی برای حفظ قوه نامیه کنیدیوم‌ها ضروری است (Rangel et al., 2008b). قارچ *P. lilacinum*، که پیش‌تر با نام *Paecilomyces lilacinus* شناخته می‌شد، به‌دلیل توانایی در کنترل نماتدها و آفات مکنده‌ای نظیر سفیدبالک، به‌عنوان یک عامل کنترل زیستی امیدبخش شناخته شده است. استفاده از بسترهایی مانند برنج و ذرت در تخمیر حالت جامد، امکان تولید کنیدیوم‌ها با تراکم زیاد ( $2 \times 10^{10}$  کنیدیوم در گرم بستر) را فراهم کرده است؛ به‌طوری که در آزمایش‌های میدانی، کاهش بیش از ۷۰ درصدی جمعیت آفات مشاهده شده است (Nguyen et al., 2023). قارچ *L. lecanii* نیز در کنترل زیستی شته‌ها و سفیدبالک‌ها کاربرد دارد. محققان گزارش کردند که سیستم‌های دو مرحله‌ای شامل پیش‌کشت مایع حاوی ملاس نیشکر و انتقال به بستر جامد مانند برنج می‌تواند میزان اسپوردهی را به‌طور قابل‌توجهی افزایش دهد (Derakhshan et al., 2008). در برخی مطالعات، این روش منجر به بیش از دو برابر شدن تولید کنیدیوم‌ها نسبت به سایر روش‌ها شده است (Machado et al., 2010). در سال‌های اخیر، مطالعاتی بر بهینه‌سازی شرایط نور، رطوبت و ترکیب مواد آلی برای بهبود تولید و پایداری کنیدیوم‌ها انجام شده است. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که نور تأثیر مثبت قابل‌توجهی بر تولید کنیدیوم و ویژگی‌های هیدروفوبی آن‌ها دارد (Medina & Rangel, 2025).

با وجود پیشرفت‌های یادشده، اطلاعات کافی درباره مقایسه هم‌زمان گونه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر در بسترهای طبیعی گوناگون و از منظر زیستی و اقتصادی وجود ندارد. پژوهش حاضر با هدف تعیین کارایی بسترهای طبیعی پوسته برنج، گندم، سبوس گندم، ذرت خردشده و جو پرک‌شده در تولید انبوه کنیدیوم‌های چهار گونه قارچ بیمارگر *M. B. bassiana*، *P. lilacinum*، *L. lecanii* و *M. anisopliae* انجام شده است. افزون بر ارزیابی عملکرد زیستی، برآورد اقتصادی بسترها نیز در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت تا بسترهای دارای بازدهی بیشتر و هزینه تولید کمتر شناسایی و معرفی شوند. نتایج این

پژوهش می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه انتخاب بسترهای جامد کشت مناسب برای تولید انبوه مؤثر و اقتصادی این عوامل کنترل زیستی فراهم کند.

## روش‌شناسی پژوهش

### کشت جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر

در این مطالعه، چهار جدایه از قارچ‌های بیمارگر حشرات مورد استفاده قرار گرفتند. دو جدایه بومی *B. bassiana* B2 و *P. lilacinum* Ento1 از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران تهیه شدند. جدایه *B. bassiana* B2 از شب‌پره شمشاد، *Cydalis perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) در استان مازندران و جدایه *P. lilacinum* Ento1 از درخت بلوط *Quercus infectoria* (Fagales: Fagaceae) در استان گیلان، جداسازی شده‌اند. جدایه *Metarhizium anisopliae* M1 از فرآورده تجاری Green Muscle® تهیه گردید. همچنین جدایه غیربومی *L. lecanii* V198499 با کد V198499 که از کرم سیب، *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) در کبک کانادا جداسازی شده، از مرکز تحقیقات و توسعه باغبانی وزارت کشاورزی و صنایع غذایی کانادا تهیه گردید (جدول ۱). هریک از جدایه‌های قارچی روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت داده شدند. از هر جدایه، قرصی به قطر هفت میلی‌متر از لبه کشت خالص برداشته و به مرکز ظرف پتری حاوی محیط PDA منتقل شد. ظروف پتری با پارافیلیم بسته و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۵±۷۵ درصد به مدت هفت روز نگهداری شدند.

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* *Lecanicillium lecanii* و *Purpureocillium lilacinum*

| Fungal species                   | Isolates | Host or source of origin                             | Site of origin   | Source             |
|----------------------------------|----------|------------------------------------------------------|------------------|--------------------|
| <i>Beauveria bassiana</i>        | B2       | <i>Cydalis perspectalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) | Mazandaran, Iran | RIFR <sup>a</sup>  |
| <i>Metarhizium anisopliae</i>    | M1       | Commercial formulation Green Muscle®                 | Imported         | RIFR <sup>a</sup>  |
| <i>Lecanicillium lecanii</i>     | V198499  | <i>Cydia pomonella</i> (Lepidoptera: Tortricidae)    | Quebec (Canada)  | HRSAC <sup>b</sup> |
| <i>Purpureocillium lilacinum</i> | Ento1    | <i>Quercus infectoria</i> (Fagales: Fagaceae)        | Gilan, Iran      | RIFR <sup>a</sup>  |

<sup>a</sup>Research Institute of Forests and Rangelands of Iran

<sup>b</sup>Harrow Research Station, Agriculture and Agri-Food Canada

## آماده‌سازی و مایه‌زنی بسترهای جامد

مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر عصاره سیب‌زمینی در ظروف ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ دقیقه و فشار یک اتمسفر اتوکلاو و استریل شدند. پس از خنک شدن محیط کشت، تعداد سه قرص هفت میلی‌متری از کشت خالص هر جدایه قارچی زیر هود لامینار به هریک از ظروف ارلن منتقل گردید. ظروف ارلن روی شیکر اوربیتالی با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۲۵±۱ درجه سلسیوس و به مدت ۱۰ روز قرار داده شدند تا زادمایه جهت مایه‌زنی بسترهای جامد کشت فراهم شود. برای بستر جامد کشت قارچ‌ها از محیط‌های غذایی پوسته برنج، گندم، سیوس گندم، ذرت خرد شده و جو پرک شده استفاده شد. مقدار ۲۰۰ گرم از هر محیط غذایی در کیسه‌های قابل اتوکلاو (۳۰ × ۲۵ سانتی‌متر) قرار داده شد و برای ایجاد رطوبت نسبی مناسب، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به هریک از آن‌ها افزوده شد. رطوبت اولیه بسترها حدود ۶۵-۶۰ درصد و pH در محدوده طبیعی ۳/۵±۰/۶ تنظیم شد. کیسه‌ها پس از بستن، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۲۱

درجه سلسیوس و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شدند (Sala et al., 2024). برای مایه‌زنی، ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های قارچی تهیه‌شده با غلظت  $10^7$  کنیدیوم در میلی‌لیتر به هر کیسه حاوی محیط کشت جامد افزوده شد. سپس کیسه‌ها به آرامی تکان داده شدند تا توزیع یکنواخت زادمایه در بستر جامد صورت گیرد. کیسه‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $75 \pm 5$  درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انکوبه شدند. برای افزایش سطح تماس بستر جهت رشد یکنواخت قارچ و کنیدیوم‌زایی بیشتر، هر ۴۸ ساعت یکبار هر یک از کیسه‌ها با دست و به آرامی ورز داده شد. تمامی مراحل آماده‌سازی و تلقیح در شرایط استریل زیر هود لامینار انجام شد تا از آلودگی میکروبی جلوگیری شود.

### خشک کردن بستر و برداشت کنیدیوم‌ها

برای خشک کردن تدریجی، کشت‌های حاوی کنیدیوم به پاکت‌های کاغذی ضخیم با ابعاد  $30 \times 9 \times 15$  سانتی‌متر منتقل شدند. روش خشک کردن به صورت تدریجی و در دمای پایین انجام شد تا از کاهش قوه نامیه و آسیب به دیواره کنیدیوم‌ها جلوگیری شود (Rangel et al., 2008a; Jackson & Jaronski, 2009). بستر حاوی کنیدیوم با دقت و به آرامی منتقل شد تا از پخش شدن کنیدیوم‌ها در هوا جلوگیری شود. سپس بستر کشت با دست به آرامی خرد شد و پاکت‌ها پس از دو بار تا زدن بسته شدند. سپس پاکت‌ها روی قفسه‌های سیمی اتاقک رشد قرار گرفتند تا جریان هوا به طور یکنواخت از آنها عبور کند. فرآیند خشک شدن در دمای  $26 \pm 1$  درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۵ درصد انجام شد. برای اندازه‌گیری رطوبت، پاکت‌ها روزانه وزن شدند و با ثابت ماندن وزن پس از ۸ تا ۱۰ روز، خشک شدن کامل آنها تایید شد. کیسه‌های حاوی قارچ خشک‌شده به آرامی با دست فشرده شدند تا بسترهای کشت از هم جدا شوند. سپس بسترها روی یک الک با اندازه سوراخ ۱۵۰ میکرومتر که روی الک دیگری با اندازه سوراخ ۱۰۶ میکرومتر و یک سینی جمع‌آوری قرار داده شده بود، ریخته شدند. یک پوشش روی کل مجموعه قرار گرفت و به آرامی تکان داده شد تا کنیدیوم‌ها از بستر جدا شوند.

### ارزیابی میزان تولید کنیدیوم‌ها در بسترهای طبیعی جامد

برای تخمین میزان تولید کنیدیوم‌ها، یک گرم نمونه از هر یک از بسترهای جامد حاوی قارچ برداشته و با ۹ میلی‌لیتر آب حاوی توئین ۸۰ (غلظت ۰/۰۱ درصد) مخلوط گردید. مخلوط به دست‌آمده جهت جداسازی کنیدیوم‌ها از پارچه ملل سه لایه عبور داده شد. پس از انجام چند مرحله رقیق‌سازی، یک میلی‌لیتر نمونه از هر رقت برداشته و تعداد کنیدیوم‌ها با استفاده از لام گلبول‌شمار (هموسیتمتر) (Neubauer, 25.4 x 76.2 x 1 mm, catalog number: 7102) شمارش شد. این مراحل برای ارزیابی تفاوت در میزان تولید کنیدیوم‌ها در جدایه‌های قارچی و بسترهای مختلف تکرار شد.

### تعیین زنده‌مانی و میزان تندش کنیدیوم‌ها

نمونه‌ای حاوی یک گرم از کنیدیوم‌های به دست آمده از بسترهای جامد مختلف، در میکروتیوب‌های استریل با ظرفیت ۲ میلی‌لیتر قرار داده شد. میکروتیوب‌ها در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۸ هفته (۵۶ روز) نگهداری شدند. هر هفته یکبار، حدود ۰/۰۱ گرم کنیدیوم میکروتیوب‌ها برداشته، در ۹ میلی‌لیتر محلول توئین (غلظت ۰/۰۵ درصد) ریخته شد و با رقیق کردن آن، غلظت  $10^7$  کنیدیوم در میلی‌لیتر تهیه گردید. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی اسپورها روی ظرف پتری حاوی محیط کشت SDA+Y (Sabouraud dextrose agar+yeast) ۲ درصد) به قطر ۹ سانتی‌متر با لوپ استریل پخش گردید. ظروف در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوبه شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت، درصد تندش کنیدیوم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر تشتک پتری، چهار میدان میکروسکوپی حاوی حداقل ۱۰۰ کنیدیوم بررسی شد و کنیدیومی که طول لوله تندش از قطر آن بیشتر بود، به عنوان تندش کرده در نظر گرفته شدند. با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگمایی  $\times 400$ ، تعداد کنیدیوم‌های تندش کرده (کنیدیوم دارای لوله تندش) شمارش شد. نسبت کنیدیوم‌های تندش یافته به کل تعداد کنیدیوم‌ها شمارش شده برای تعیین درصد تندش محاسبه گردید و این بررسی به صورت هفتگی به مدت ۸ هفته برای همه

جدایه‌ها انجام شد تا تأثیر زمان نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بر میزان درصد تندش و زنده‌مانی کنیدیوم‌ها ارزیابی شود. شش تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد و کل آزمایش سه بار تکرار شد.

### ارزیابی هزینه اقتصادی تولید کنیدیوم

برای ارزیابی اقتصادی بسترهای مختلف مورد استفاده در تولید انبوه کنیدیوم قارچ‌های بیمارگر، شاخصی با عنوان «هزینه بستر به‌ازای تولید  $10^9$  کنیدیوم» تعریف و محاسبه شد. در این راستا، هزینه هر بستر به‌ازای یک گرم (بر حسب تومان) ثبت گردید. سپس با استفاده از میانگین تعداد کنیدیوم تولیدشده در هر گرم بستر، نسبت هزینه به تولید کنیدیوم محاسبه و برحسب تومان به‌ازای  $10^9$  کنیدیوم گزارش شد. از آن‌جا که در مطالعات پیشین، هزینه تولید کنیدیوم قارچ‌های بیمارگر به‌صورت کلی یا بر اساس حجم محلول گزارش شده است (Kankale et al., 2017; Tekam et al., 2018)، این پژوهش برای نخستین‌بار این شاخص را معرفی می‌نماید. استفاده از این شاخص، امکان مقایسه دقیق‌تر اقتصادی بین بسترهای مختلف را فراهم کرده و می‌تواند در پژوهش‌های آتی نیز به‌عنوان معیاری کمی، کاربردی و قابل تکرار مورد استفاده قرار گیرد.

### تجزیه آماری

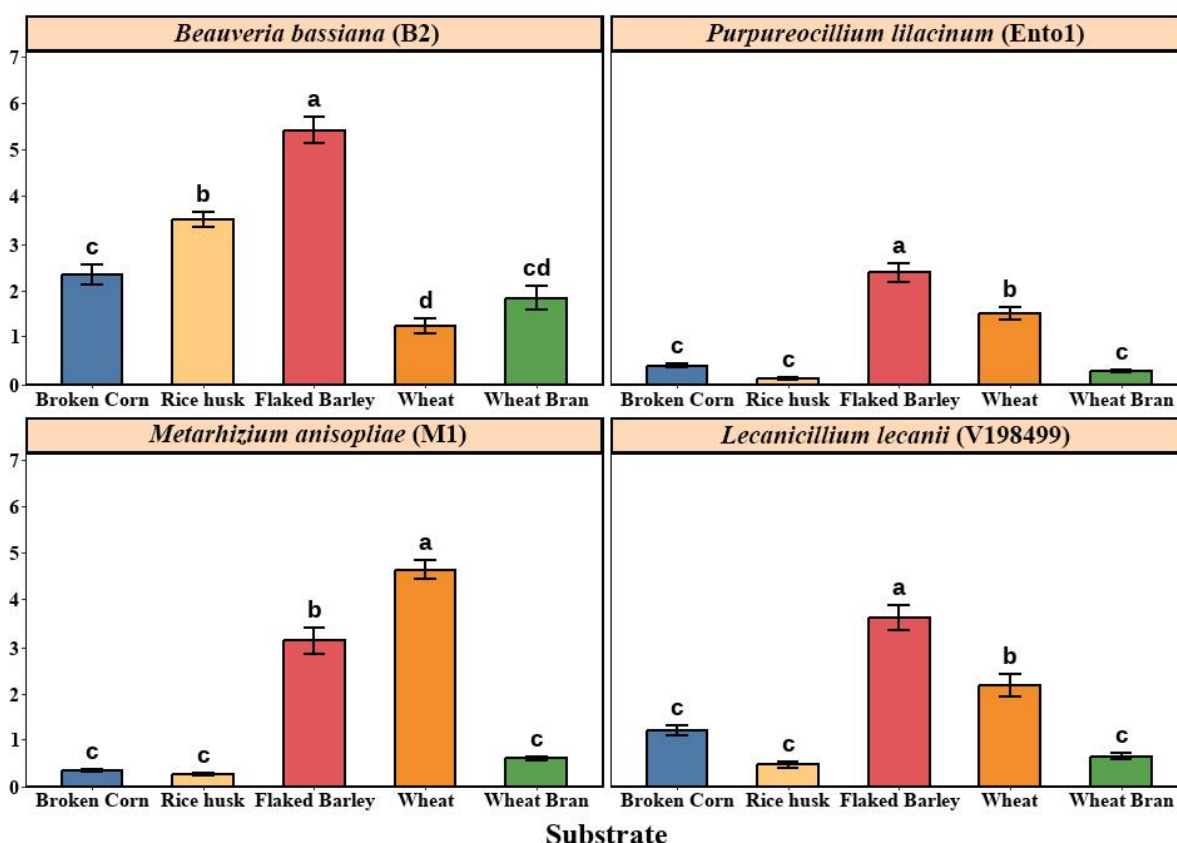
داده‌های مربوط به میانگین تولید با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) در نرم‌افزار R تجزیه و تحلیل شدند (RStudio Team, 2020). درصد تندش کنیدیوم‌ها با استفاده از تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون توکی بین بسترها و جدایه‌های قارچی مقایسه گردید. فاصله اطمینان ۹۵ درصد نیز برای تحلیل تغییرات تندش کنیدیوم‌ها در بسترهای مختلف محاسبه شد.

### یافته‌های پژوهش

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که در هر چهار جدایه بین تیمارهای بستر کشت اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.01$ ). در قارچ *B. bassiana* B2، بستر جو پرک شده با میانگین  $5/3 \times 10^9$  کنیدیوم در گرم بیشترین میزان تولید کنیدیوم را نشان داد و این مقدار به‌طور معنی‌داری از سایر بسترها بیشتر بود ( $F_{3,2} = 56/2$ ,  $P < 0.01$ ). پس از آن بستر پوسته برنج با میانگین  $3/5 \times 10^9$  کنیدیوم در گرم قرار گرفت و کمترین تولید کنیدیوم در بستر گندم با میانگین  $1/2 \times 10^9$  کنیدیوم در گرم ثبت شد. در قارچ *M. anisopliae* M1، بیشترین میزان تولید کنیدیوم در بستر گندم با میانگین  $4/6 \times 10^9$  کنیدیوم در گرم مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری از سایر بسترها بیشتر بود ( $F_{3,2} = 162/6$ ,  $P < 0.01$ ). پس از آن، بستر جو پرک شده با میانگین  $3/1 \times 10^9$  کنیدیوم در گرم قرار گرفت و کمترین تولید کنیدیوم در بستر سیوس گندم با میانگین  $6 \times 10^8$  کنیدیوم در گرم ثبت شد. در قارچ *L. lecanii* V198499، نیز بستر جو پرک شده با میانگین  $3/6 \times 10^9$  کنیدیوم در گرم بیشترین تولید کنیدیوم را داشت که به‌طور معنی‌داری از سایر تیمارها بیشتر بود ( $F_{3,2} = 54/4$ ,  $P < 0.01$ ). همچنین، کمترین تولید کنیدیوم در این جدایه در بستر سیوس گندم با میانگین  $4/6 \times 10^8$  کنیدیوم در گرم ثبت شد. در قارچ *P. lilacinum* Ento1، بیشترین تولید کنیدیوم با میانگین  $2/8 \times 10^9$  کنیدیوم در گرم در بستر جو پرک شده ثبت گردید ( $F_{3,2} = 78/2$ ,  $P < 0.01$ ) و کمترین تولید کنیدیوم در بستر پوسته برنج با میانگین  $1/5 \times 10^8$  کنیدیوم در گرم به دست آمد (شکل ۱).

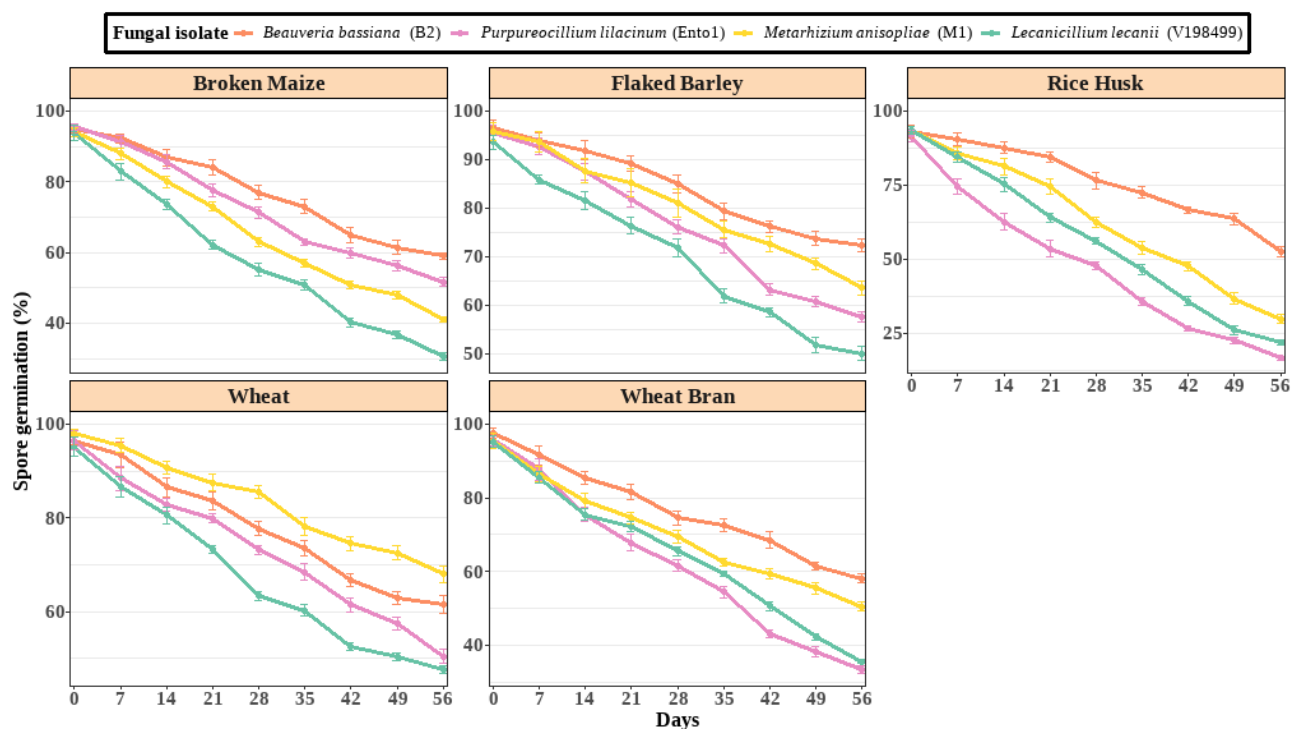
تجزیه واریانس درصد تندش کنیدیوم‌ها نیز نشان داد که بین بسترهای مختلف، جدایه‌های قارچی و زمان‌های ارزیابی تفاوت معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.001$ ). همچنین، اثر متقابل بین بسترهای مختلف، جدایه‌های قارچی و زمان‌های ارزیابی معنی‌دار بود ( $P < 0.001$ ) که نشان‌دهنده وابستگی روند درصد تندش کنیدیوم‌ها به ترکیب این عوامل است. در آغاز دوره، جو پرک شده بیشترین میانگین درصد تندش (۹۸ درصد) را نشان داد و پس از آن، گندم (۹۷ درصد)، پوسته برنج (۹۵/۲ درصد)، ذرت خرد شده (۹۴/۴ درصد) و سیوس گندم (۹۰ درصد) قرار گرفتند. نتایج نشان داد که گونه *B. bassiana* (جدایه B2) در میان تمام بسترها بالاترین میانگین درصد تندش را داشت، در حالی که گونه *L. lecanii* (جدایه V198499) کمترین درصد

تندش را نشان داد. درصد تندش کنیدیوم‌ها روی جو پرک شده در تمامی جدایه‌ها به طور معنی‌داری بیشتر از سایر بسترها بود، در حالی که پوسته برنج کمترین درصد تندش را نشان داد. همچنین درصد تندش کنیدیوم‌ها به طور معناداری با گذشت زمان کاهش یافت. درصد تندش کنیدیوم‌ها در قارچ *M. anisopliae* M1 در بسترهای پوسته برنج، سبوس گندم و ذرت خرد شده به کمتر از ۵۰ درصد رسید، اما در بسترهای جو پرک‌شده و گندم، درصد تندش در پایان دوره نسبت به زمان آغازین کاهش کمتری داشت. گونه *B. bassiana* (جدایه B2) روی بستر جو پرک‌شده پس از ۵۶ روز همچنان تندش ۶۰ درصد و روی بستر گندم نیز تندش ۵۵ درصد را حفظ کرد. در مقابل، درصد تندش گونه *L. lecanii* (جدایه V198499) در تمامی بسترها به کمتر از ۵۰ درصد کاهش یافت (شکل ۲).



شکل ۱. میزان تولید کنیدیوم چهار جدایه *Beauveria bassiana* B2، *Purpureocillium lilacinum* Ento1، *Metarhizium anisopliae* M1 و *Lecanicillium lecanii* V198499 روی بسترهای جامد مختلف. حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

هزینه تولید به ازای  $10^9$  کنیدیوم در هر گرم بستر در میان بسترهای کشت مختلف و جدایه‌های قارچی تفاوت قابل توجهی نشان داد. در قارچ *B. bassiana* B2، کمترین هزینه به‌ترتیب در بسترهای پوسته برنج (۳/۲۴ تومان) و جو پرک‌شده (۳/۹۱ تومان) مشاهده شد. در *M. anisopliae* M1، کمترین هزینه مربوط به بستر جو پرک‌شده با ۵/۵۶ تومان بود. در قارچ *P. lilacinum* Ento1، کمترین هزینه در بستر جو پرک‌شده (۹/۲۶ تومان) و بیشترین در بستر ذرت شکسته (۵۵ تومان) ثبت شد. همچنین، در *L. lecanii* V198499 بستر جو پرک‌شده با ۸/۶۲ تومان کمترین و بستر پوسته برنج با ۳۰ تومان بیشترین هزینه تولید را داشت (جدول ۲).



شکل ۲. تأثیر نوع بستر کشت بر درصد تندش اسپور چهار جدایه قارچی *Purpureocillium lilacinum* Ento1، *Beauveria bassiana* B2 و *Metarhizium anisopliae* M1 و *Lecanicillium lecanii* V198499 طی ۵۶ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس.

جدول ۲. هزینه تولید به ازای  $10^9$  کنیدیوم در هر گرم بستر برای جدایه‌های قارچی *Purpureocillium lilacinum* Ento1، *Beauveria bassiana* B2 و *Metarhizium anisopliae* M1 و *Lecanicillium lecanii* V198499 در بسترهای کشت مختلف (تومان)

| جدایه قارچ                           | نوع بستر   | میانگین تعداد کنیدیوم در هر گرم بستر ( $10^9 \times$ ) | هزینه بستر به ازای هر گرم (تومان) | هزینه بستر به ازای تولید $10^9$ کنیدیوم (تومان) |
|--------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|
| <i>Beauveria bassiana</i> B2         | ذرت        | ۲/۴                                                    | ۱۱                                | ۴/۵۸                                            |
|                                      | شکسته      |                                                        |                                   |                                                 |
|                                      | پوسته برنج | ۳/۷                                                    | ۱۲                                | ۳/۲۴                                            |
|                                      | جو         | ۶/۴                                                    | ۲۵                                | ۳/۹۱                                            |
|                                      | پرک‌شده    |                                                        |                                   |                                                 |
| <i>Lecanicillium lecanii</i> V198499 | گندم       | ۱/۸                                                    | ۲۰                                | ۱۱/۱۱                                           |
|                                      | سبوس       | ۲/۲                                                    | ۱۰                                | ۴/۵۵                                            |
|                                      | گندم       |                                                        |                                   |                                                 |
|                                      | ذرت        | ۰/۷                                                    | ۱۱                                | ۱۵/۷۱                                           |
|                                      | شکسته      |                                                        |                                   |                                                 |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> M1     | پوسته برنج | ۰/۴                                                    | ۱۲                                | ۳۰                                              |
|                                      | جو         | ۲/۹                                                    | ۲۵                                | ۸/۶۲                                            |
|                                      | پرک‌شده    |                                                        |                                   |                                                 |
|                                      | گندم       | ۱/۶                                                    | ۲۰                                | ۱۲/۵                                            |
|                                      | سبوس       | ۰/۴                                                    | ۱۰                                | ۲۵                                              |
|                                      | گندم       |                                                        |                                   |                                                 |

ادامه جدول ۲.

| جدایه قارچ                                | نوع بستر   | میانگین تعداد کنیدیوم<br>در هر گرم بستر<br>( $\times 10^9$ ) | هزینه بستر به ازای<br>هر گرم (تومان) | هزینه بستر به ازای تولید $10^9$<br>کنیدیوم (تومان) |
|-------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <i>Metarhizium anisopliae</i> M1          | ذرت        | ۰/۲                                                          | ۱۱                                   | ۵۵                                                 |
|                                           | شکسته      |                                                              |                                      |                                                    |
|                                           | پوسته برنج | ۰/۴                                                          | ۱۲                                   | ۳۰                                                 |
|                                           | جو         | ۴/۵                                                          | ۲۵                                   | ۵/۵۶                                               |
|                                           | پرک‌شده    |                                                              |                                      |                                                    |
| <i>Purpureocillium lilacinum</i><br>Ento1 | گندم       | ۱                                                            | ۲۰                                   | ۲۰                                                 |
|                                           | سبوس       | ۰/۴                                                          | ۱۰                                   | ۲۵                                                 |
|                                           | گندم       |                                                              |                                      |                                                    |
|                                           | ذرت        | ۰/۲                                                          | ۱۱                                   | ۵۵                                                 |
|                                           | شکسته      |                                                              |                                      |                                                    |
| <i>Purpureocillium lilacinum</i><br>Ento1 | پوسته برنج | ۰/۴                                                          | ۱۲                                   | ۳۰                                                 |
|                                           | جو         | ۲/۷                                                          | ۲۵                                   | ۹/۲۶                                               |
|                                           | پرک‌شده    |                                                              |                                      |                                                    |
|                                           | گندم       | ۱/۴                                                          | ۲۰                                   | ۱۴/۲۹                                              |
|                                           | سبوس       | ۰/۴                                                          | ۱۰                                   | ۲۵                                                 |
|                                           | گندم       |                                                              |                                      |                                                    |

## بحث

با توجه به افزایش نگرانی‌های زیست‌محیطی و بهداشتی ناشی از مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی و رشد تقاضا برای محصولات کشاورزی سالم، استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات به‌عنوان عوامل کنترل زیستی پایدار و سازگار با محیط‌زیست مورد توجه گسترده قرار گرفته است. یکی از مراحل کلیدی در تجاری‌سازی این قارچ‌ها، تولید انبوه کنیدیوم‌ها با کیفیت زیستی بالا و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است. در این فرآیند، انتخاب بستر کشت مناسب، نقشی تعیین‌کننده دارد؛ چرا که ساختار فیزیکی، ترکیب تغذیه‌ای و ظرفیت نگهداری رطوبت بستر می‌تواند به‌طور مستقیم بر رشد قارچ، میزان تولید، کیفیت و زنده‌مانی کنیدیوم‌ها اثرگذار باشد (Mascarin et al., 2024). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که قارچ‌ها قابلیت تولید انبوه روی انواع مختلف بسترهای جامد را دارند (Agale et al., 2018; da Cunha et al., 2020; Sala et al., 2019; Sala et al., 2021; Santos et al., 2021).

مطالعه حاضر نشان داد که تولید کنیدیوم‌ها در بسترهای مختلف، تحت‌تأثیر گونه قارچی قرار دارد. در سه گونه-جدایه *B. bassiana* B2، *P. lilacinum* Ento1 و *L. lecanii* V198499، بیشترین تولید کنیدیوم‌ها روی بستر جو پرک‌شده ثبت شد. کمترین میزان تولید کنیدیوم‌ها در این سه گونه به ترتیب در بستر گندم، سبوس گندم و پوسته برنج مشاهده شد. شیرازی و همکاران نیز بیشترین تولید کنیدیوم *P. lilacinum* Pl25.2 را در بستر سبوس گندم و کمترین تولید کنیدیوم‌ها را در بستر گندم گزارش کردند (Shirazi et al., 2019). همچنین، در پژوهشی بسترهای برنج و ذرت بیشترین کارایی را در تولید کنیدیوم *P. lilacinum* (PL1) داشتند (به ترتیب  $2/2 \times 10^{10}$  و  $2 \times 10^{10}$  کنیدیوم در گرم)، در حالی که پوسته برنج کمترین کارایی ( $2/5 \times 10^9$  کنیدیوم در گرم) را داشته است (Nguyen et al., 2023). علت اختلاف نتایج با پژوهش حاضر، احتمالاً تفاوت در جدایه قارچ، نوع فرآوری بستر و شرایط تخمیر (مانند رطوبت و تهویه) است. بر اساس گزارش محققان، بستر برنج بالاترین میزان تولید کنیدیوم *B. bassiana* را نشان داده است ( $1 \times 10^9$  تا  $3 \times 10^9$  کنیدیوم در گرم)، در حالی که بسترهای

ذرت یا ترکیب برنج-ذرت با حدود  $1 \times 10^9$  کنیدیوم در گرم تولید کمتری داشته‌اند (Sala et al., 2019; Roswanjaya et al., 2021). در مطالعه حاضر، جو پرک‌شده میانگین تولید کنیدیوم بیشتری نشان داد، که احتمالاً دلیل آن تهویه‌پذیری بهتر، ظرفیت نگهداری رطوبت و ساختار فیزیکی مناسب‌تر آن برای رشد میسلیم است. برخلاف سایر گونه‌های مورد مطالعه، *M. anisopliae* M1 روی بستر گندم بیشترین تولید کنیدیوم را داشت و پس از آن، جو پرک‌شده به‌عنوان دومین بستر مؤثر برای این جدایه ثبت شد. بی‌غم و طلایی حس‌نوی (۲۰۱۷) تولید *B. bassiana* و *M. anisopliae* روی بستر سبوس گندم را به ترتیب  $2/1 \times 10^{10}$  و  $8 \times 10^9$  کنیدیوم در هر گرم گزارش کردند. این یافته‌ها نشان‌دهنده تفاوت فیزیولوژیکی و نیازهای تغذیه‌ای میان گونه‌ها و جدایه‌هاست که در انتخاب بستر باید مدنظر قرار گیرد. علت تفاوت نتایج این پژوهش با مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از اختلاف در جدایه‌های قارچی، نوع و فرآوری بستر کشت یا شرایط محیطی باشد.

بررسی روند تندش کنیدیوم‌ها در طی زمان نشان داد که نوع بستر کشت نقش تعیین‌کننده‌ای در حفظ قابلیت زیستی اسپورها دارد. در میان بسترهای مورد بررسی، جو پرک‌شده به طور معنی‌داری بهترین عملکرد را در حفظ درصد تندش اسپورها از خود نشان داد. این بستر نه تنها در آغاز آزمایش تندش بالایی ایجاد کرد، بلکه در پایان دوره نیز درصد قابل توجهی از اسپورها همچنان قادر به تندش بودند. در مقابل، بسترهای پوسته برنج و سبوس گندم کاهش قابل‌ملاحظه‌ای در درصد تندش طی زمان نشان دادند، به‌طوری که در برخی جدایه‌ها، زنده‌مانی اسپورها به کمتر از ۵۰ درصد رسید. این تفاوت‌ها احتمالاً به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بسترها از جمله تهویه‌پذیری، اندازه ذرات و ظرفیت نگهداری رطوبت مربوط می‌شود. جو پرک‌شده با ساختار خلل و فرج بیشتر، امکان تهویه بهتر و پایداری رطوبتی مناسب‌تری را برای رشد میسلیم و تشکیل کنیدیوم‌ها فراهم می‌کند. از سوی دیگر، سبوس گندم و پوسته برنج ممکن است به دلیل تراکم بالا، جذب رطوبت کمتر یا تهویه نامناسب، باعث ایجاد تنش‌های محیطی شده و زنده‌مانی اسپورها را کاهش دهند. یافته‌های این پژوهش با نتایج مطالعه بارا و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت داشت. طبق نتایج این محققان، بالاترین درصد تندش و زنده‌مانی برای دو جدایه *P. lilacinum* JQ926212-JQ926223 در بستر گندم ثبت شد، در حالی که ورمیکولیت عملکرد ضعیفی داشت. اگرچه در پژوهش حاضر بستر گندم پس از جو پرک‌شده بالاترین درصد تندش را در طی زمان نشان داد، اما باید توجه داشت در مطالعه بارا و همکاران (۲۰۱۸) بستر جو پرک‌شده مورد بررسی قرار نگرفته بود. مطالعه دیگری نشان داد که اگرچه درصد تندش اولیه اسپور در تمامی بسترها بیش از ۹۰ درصد بود، اما این میزان با گذشت زمان کاهش یافت به‌گونه‌ای که برای جدایه *B. bassiana* Bb575 درصد تندش در بستر برنج به ۷۴ درصد و در ذرت شکسته به ۶۹ درصد رسید، که این روند با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد (Karanja et al., 2010). همچنین گزارش شده است که کیفیت بستر و وجود تنش‌های تغذیه‌ای و محیطی در زمان تشکیل کنیدیوم‌ها، می‌تواند بر مقاومت و زنده‌مانی اسپورها تأثیرگذار باشد و این مسئله ممکن است عملکرد بهتر برخی بسترها را در حفظ تندش توضیح دهد (Rangel et al., 2008b). بر اساس نتایج پژوهش دیگری، برتری بستر جو پرک‌شده و دانه‌های جو برای رشد و تولید گونه‌های جنس *Metarhizium* به توانایی این بسترها در حفظ رطوبت و بهبود تهویه نسبت داده شده است؛ عواملی که احتمالاً در بهبود درصد تندش و پایداری اسپورها در مطالعه حاضر نیز نقش داشته‌اند (Jaronski & Jackson, 2012).

از منظر اقتصادی، تفاوت‌های قابل توجهی میان بسترهای کشت مشاهده شد. بستر جو پرک‌شده در هر چهار جدایه قارچی مورد آزمایش کمترین هزینه تولید به ازای  $10^9$  کنیدیوم در هر گرم بستر را داشت. در مقابل، بستر گندم با وجود بازده بالا برای *M. anisopliae* M1، در سایر جدایه‌ها مانند *B. bassiana* B2 و *P. lilacinum* Ento1، دارای هزینه بالاتر و راندمان تولید پایین‌تر بود. بستر سبوس گندم نیز در میان همه بسترها و جدایه‌های مورد بررسی عملکرد اقتصادی و تولید کنیدیوم پایین‌تری داشت. این یافته‌ها با نتایج تحقیقات بارا-بوکاری و همکاران مطابقت دارد (Barra-Bucarei et al., 2016). این

پژوهشگران نشان داده‌اند نوع بستر کشت می‌تواند هزینه نهایی تولید را تا چندین برابر تغییر دهد و به‌طور مستقیم بر کارایی تولید صنعتی قارچ‌های بیمارگر اثرگذار باشد.

تفاوت در عملکرد جدایه‌ها در بسترهای مختلف نشان‌دهنده تفاوت‌های فیزیولوژیکی و نیازهای تغذیه‌ای خاص هر گونه قارچی است. برای نمونه، *B. bassiana* B2 ممکن است به بسترهایی با رطوبت کنترل شده و تهویه مناسب مانند جو پرک شده واکنش بهتری نشان دهد، در حالی که *M. anisopliae* M1 عملکرد بهتری در بسترهای مغذی‌تری مانند گندم دارد. در مجموع، عواملی مانند اندازه ذرات، ظرفیت نگهداری رطوبت، تهویه‌پذیری و ساختار فیزیکی بستر، نقش مهمی در رشد میسلیم و تشکیل کنیدیوم‌ها ایفا می‌کنند (Barra et al., 2018; Hallsworth & Magan, 1999).

### نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج این پژوهش نشان داد که نوع بستر کشت نقش تعیین‌کننده‌ای در میزان تولید کنیدیوم‌ها، حفظ زنده‌مانی در طول زمان و هزینه نهایی تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات دارد. در میان بسترهای مورد بررسی، بستر جو پرک شده در سه جدایه *B. bassiana* B2، *P. lilacinum* Ento1 و *L. lecanii* V198499 عملکرد بهتری از تولید کنیدیوم‌ها و حفظ درصد تندش اسپورها در طول زمان داشت. در مقابل، جدایه *M. anisopliae* M1 بیشترین میزان تولید کنیدیوم را در بستر گندم نشان داد که بیانگر تفاوت نیازهای فیزیولوژیکی میان گونه‌های قارچی مورد مطالعه است. از منظر اقتصادی، هزینه تولید کنیدیوم‌ها هر چهار جدایه مورد آزمایش، روی بستر جو پرک شده نسبت به سایر بسترها به‌طور قابل توجهی کمتر بود. در مقابل، بستر سبوس گندم در هیچ‌یک از جدایه‌ها بازده مناسبی نداشت و از نظر شاخص هزینه نیز گران‌قیمت‌ترین بستر بود.

به‌طور کلی و با در نظر گرفتن جنبه‌های زیستی و اقتصادی ارزیابی شده، جو پرک شده به‌عنوان بستر مناسب برای تولید انبوه کنیدیوم‌های جدایه‌های *B. bassiana* B2، *P. lilacinum* Ento1، *L. lecanii* V198499 و *M. anisopliae* M1 توصیه می‌گردد. در مقیاس صنعتی، بستر جو پرک شده نه تنها بیشترین تولید کنیدیوم و پایداری بیشتر قوه نامیه را فراهم می‌کند، بلکه به دلیل هزینه کمتر، دسترسی آسان و سهولت در حمل‌ونقل نسبت به سایر بسترهای طبیعی، در کشورهای توسعه‌یافته نیز به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jaronski & Jackson, 2012). این مزایا، جو پرک شده را به بستر مناسب برای تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر مورد مطالعه تبدیل کرده و به توسعه کشاورزی پایدار کمک کند.

در این مطالعه، ترکیب شیمیایی بسترها و برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی (مانند اندازه ذرات، تخلخل و ظرفیت نگهداری رطوبت) به‌طور مستقیم اندازه‌گیری نشد؛ از این‌رو تفسیر تفاوت‌های عملکردی بر مبنای این عوامل با محدودیت همراه است. با وجود این، شواهد پژوهشی پیشین نشان داده‌اند که عواملی مانند محتوای کربوهیدرات، پروتئین، نسبت کربن به نیتروژن، مقادیر اسیدهای آمینه، رطوبت و عناصر معدنی می‌توانند بر رشد میسلیم، تولید کنیدیوم‌ها و زنده‌مانی اسپورها تأثیرگذار باشند (Chen et al., 2021; Rangel et al., 2008b; Jaronski & Jackson, 2012; Rashid et al., 2019). از این رو، پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده با تمرکز بر تجزیه شیمیایی و تغذیه‌ای بسترها و بهینه‌سازی شرایط تخمیر، گامی مؤثر در افزایش کیفیت و پایداری تولید صنعتی این قارچ‌ها بردارند.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت‌های دانشگاه تهران با شماره پرونده ۷۳۱۳۲۸۰۰/۶/۳۹ برای انجام این پژوهش صمیمانه سپاس‌گزاری می‌شود. همچنین از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور جهت فراهم نمودن بخشی از امکانات پژوهشی این تحقیق قدردانی می‌گردد.

## REFERENCES

- Agale, S. V., Gopalakrishnan, S., Ambhure, K. G., Chandravanshi, H., Gupta, R., & Wani, S. P. (2018). Mass Production of Entomopathogenic Fungi (*Metarhizium anisopliae*) using Different Grains as a Substrate. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1), 2227–2232. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.268>
- Barra, P., Barros, G., Etcheverry, M., & Nesci, A. (2018). Mass production studies in solid substrates with the entomopathogenic fungus *Purpureocillium lilacinum*. *International Journal of Advance Agricultural Research*, 6, 78–84.
- Barranco-Flrido, J. E., Alatorre-Rosas, R., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., & Saucedo-Castañeda, G. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(7), 910–915. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00032-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00032-7)
- Bena-Molaei, P., Talaei-Hassanlouei, R., Askary, H. and 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.
- Bigham, Z., & Talaei-Hassanlouei, R. (2017). Production of two entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on natural substrates using a diphasic production method. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 6(1), 103–109. <https://doi.org/10.22059/jbioc.2017.202734.137>
- Butt, T. M., Jackson, C., & Magan, N. (2001). Introduction. In T. M. Butt, C. Jackson, & N. Magan (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* (pp. 1–8). CAB International. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851993560.0000>
- Chavan, S., Chinnaswamy, K. P., & Changalarayappa. (1998). Silkworm pupal powder as ingredient of culture media of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Insect Environment*, 4(1), 21.
- Chen, C., Wang, Z., Ye, S., & Feng, M. (2010). Synchronous production of conidial powder of several fungal biocontrol agents in series fermentation chamber system. *African Journal of Biotechnology*, 8(15). <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i15.61867>
- Chen, W., Xie, W., Cai, W., Thaochan, N., & Hu, Q. (2021). Entomopathogenic fungi biodiversity in the soil of three provinces located in Southwest China and first approach to evaluate their biocontrol potential. *Journal of Fungi*, 7(11), 984. <https://doi.org/10.3390/jof7110984>
- da Cunha, L. P., Casciatori, F. P., Vicente, I. V., Garcia, R. L., & Thoméo, J. C. (2020). *Metarhizium anisopliae* conidia production in packed-bed bioreactor using rice as substrate in successive cultivations. *Process Biochemistry*, 97, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.002>
- Derakhshan, A., Rabindra, R. J., Ramanujam, B., & Rahimi, M. (2008). Evaluation of different media and methods of cultivation on the production and viability of entomopathogenic fungi, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(11), 1506–1509. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1506.1509>
- 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(1), 3–34. <https://doi.org/10.1080/09583159409355309>
- Feng, M.-G., Pu, X.-Y., Ying, S.-H., & Wang, Y.-G. (2004). Field trials of an oil-based emulsifiable formulation of *Beauveria bassiana* conidia and low application rates of imidacloprid for control of false-eye leafhopper *Empoasca vitis* on tea in southern China. *Crop Protection*, 23(6), 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.004>
- Hallsworth, J. E., & 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. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4883>
- Jackson, M. A., & Jaronski, S. T. (2009). Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting

- insects. *Mycological Research*, 113(8), 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.03.004>
- Jaronski, S. T., & Jackson, M. A. (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in invertebrate pathology* (2nd ed., pp. 255–284). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00008-7>
- Kankale, M. D., Keliwatkar, N. M., Das, S. B., & Sontakke, B. K. (2017). Selection of suitable and economic substrate for mass production of fungus, *Beauveria bassiana*. *Journal of Applied Zoological Research*, 28(2), 157–163.
- Karanja, L. W., Phiri, N. A., & Oduor, G. I. (2010). Effect of different solid substrates on mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* entomopathogens. In *Proceedings of the 12th KARI Biennial Science Conference*, Nairobi, Kenya, 8–12 November 2010, 789–797.
- Lomer, C. J., Bateman, R. P., Johnson, D. L., Langewald, J., & Thomas, M. (2001). Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, 46, 667–702. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.667>
- Maina, U. M., Galadima, I. B., Gambo, F. M., & Zakaria, D. (2018). A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1), 27–32.
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). *The production and uses of Beauveria bassiana as a microbial insecticide*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 177. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Mascarin, G. M., Golo, P. S., de Souza Ribeiro-Silva, C., & others. (2024). Advances in submerged liquid fermentation and formulation of entomopathogenic fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108, 451. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13287-z>
- Medina, H. R., & Rangel, D. E. N. (2025). Light enhances the production of conidia and influences their hydrophobicity in *Tolypocladium inflatum*. *Fungal Biology*, 129(1), 101483. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2024.07.005>
- Muñiz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F., & Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: From inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 57. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2229-2>
- Nguyen Thi, H., Nguyen, Q. N., Dang Thi, N. Q., & others. (2023). Mass production of entomopathogenic fungi *Purpureocillium lilacinum* PL1 as a biopesticide for the management of *Amrasca devastans* (Hemiptera: Cicadellidae) in okra plantation. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 33, 85. <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00730-y>
- Ovruski, S., Schliserman, P., & Aluja, M. (2003). Native and introduced host plants of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in northwestern Argentina. *Journal of Economic Entomology*, 96(4), 1108–1118. <https://doi.org/10.1093/jee/96.4.1108>
- Pham, T. A., Kim, J. J., & Kim, K. (2010). Optimization of Solid-State Fermentation for Improved Conidia Production of *Beauveria bassiana* as a Mycoinsecticide. *Mycobiology*, 38(2), 137–143. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2010.38.2.137>
- Rangel, D. E. N., Alston, D. G., & Roberts, D. W. (2008). Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research*, 112(11), 1355–1361. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.04.011>
- Rangel, D. E. N., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2008). Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycological Research*, 112(11), 1362–1372. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.04.013>
- Rashid, M., Talaei-Hassanloui, R., Khodaiyan, F., & Goettel, M. (2019). Potential use of some liquid natural media for the production of blastospores of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Iranian Journal of Biosystem Engineering*, 50(2), 489–497.
- Roshandel, S., Askary, H., Talaei-Hassanloui, R., & Allahyari, H. (2016). The effects of natural

- substrates on the sporulation and viability of conidia and blastospores of *Metarhizium anisopliae*. *BioControl in Plant Protection*, 4(1), 94–104.
- Roswanjaya, Y. P., Saryanah, N. A., & Devy, . L. (2022). Conidia Production of *Beauveria Bassiana* in Solid Substrate Fermentation Using a Biphasic System. *KnE Life Sciences*, 7(3), 648–663. <https://doi.org/10.18502/kls.v7i3.11169>
- RStudio Team. (2020). *RStudio: Integrated development environment for R*. RStudio, PBC. <https://www.rstudio.com/>
- Sabbahi, R., Hock, V., Azzaoui, K., Saoiabi, S., & Hammouti, B. (2022). A global perspective of entomopathogens as microbial biocontrol agents of insect pests. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100376. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100376>
- Sala, A., Artola, A., Barrena, R., & Sánchez, A. (2024). Harnessing packed-bed bioreactors' potential in solid-state fermentation: The case of *Beauveria bassiana* conidia production. *Fermentation*, 10(9), 481. <https://doi.org/10.3390/fermentation10090481>
- Sala, A., Barrena, R., Artola, A., & Sánchez, A. (2019). Current developments in the production of fungal biological control agents by solid-state fermentation using organic solid waste. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(8), 655–694. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1557497>
- Sala, A., Vittone, S., Barrena, R., Sánchez, A., & Artola, A. (2021). Scanning agro-industrial wastes as substrates for fungal biopesticide production: Use of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management*, 295, 113113. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113113>
- Santa, H. S. D., Santa, O. R. D., 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(Spe), 51–60. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000400007>
- Santos, P. de S., Abati, K., Mendoza, N. V. R., Mascarín, G. M., & Delalibera Júnior, Í. (2021). Nutritional impact of low-cost substrates on biphasic fermentation for conidia production of the fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae*. *Bioresource Technology Reports*, 13, 100619. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100619>
- Sayed, S. M., El Hussein, M. M., Agamy, E., & Farag, M. M. A. (2025). Field evaluation of entomopathogenic fungi and *Calotropis procera* extract for controlling aphids and whiteflies on pepper. *Scientific Reports*, 15, 24044. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-06100-y>
- Shirazi, R. S., Fatemy, S., Naeimi, S., & Taheri, Z. M. (2019). Solid-state fermentation and viability of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* on some organic substrates. *Biocontrol in Plant Protection*, 6(2), 1–14. <https://doi.org/10.22092/bcpp.2019.119398>
- Somasekhar, N., Mehta, U. K., & Hari, K. (1998). Evaluation of sugarcane by-products for mass multiplication of nematode antagonistic fungi. In: *Nematology: Challenges and Opportunities in 21st Century. Proceedings of the Third International Symposium of Afro-Asian Society of Nematologists (TISAASN)*, Sugarcane Breeding Institute (ICAR), Coimbatore, India, 199–202.
- St. Leger, R. J., & Wang, C. (2009). Entomopathogenic fungi and the genomic era. In: Stock, S. P., Vandenberg, J., Glazer, I., & Boemare, N. (Eds.), *Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques* (pp. 366–400). CABI, Wallingford, UK. <https://doi.org/10.1079/9781845934781.0365>
- St. Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J., & Roberts, D. W. (1996). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6349–6354. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6349>
- Tekam, K. D., Kelwatkar, N. M., & Das, S. B. (2018). Evaluation of economic medium for mass multiplication of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 2790–2795.
- Wilson, C., & Tisdell, C. (2001). Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health, and sustainability costs. *Ecological Economics*, 39(3), 449–462. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(01\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(01)00238-5)