مجله دانش گیاهپزشکی ایران
دوره ۳۹، شماره ۱، ۱۳۸۷ (۴۳-۳۱)

بررسي اثر چند محيط كشت جامد و مايع روي اسپورزايي قارچ *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales)

حسن عسكري*[۱]، سيده معصومه زمانی[۲] و احمد عاشوری[۳]
۱، استاديار پژوهش مؤسسه تحقيقات گياهپزشكي كشور ۲، كارشناس ارشد موسسه تحقيقات جنگلها و مراتع كشور
۳، دانشيار پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران
(تاريخ دريافت: ۸۵/۵/۳۰- تاريخ تصويب: ۸۷/۳/۸)

چكيده

شناسايي شرايط محيطي بهينه و فاكتورهاي موثر در رشد و اسپورزائي قارچهاي بيمارگر حشرات در توليد انبوه و بكارگيري آنها ضروري است. در اين راستا، در تحقيق حاضر اثر چند محيط كشت مايع و جامد روي رشد قارچ ***Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin** مورد بررسي قرار گرفته است. نتايج آزمايشها روي ***B. bassiana*** نشان داد كه اثر نور (**p**=۰/۰۰۰۱)، محيطهاي غذايي مختلف (**p**=۰/۰۰۰۱) و اثر متقابل آنها (**p**=۰/۰۰۲۷) در توليد بلاستوسپور معني‌دار بوده و عصاره سيب‌زميني بالاترين توليد بلاستوسپور را داشت. اما مشخص گرديد كه برخلاف نور (**p**=۰/۰۰۰٦) و محيطهاي غذايي مختلف (**p**=۰/۰۰۰۱) كه در وزن خشك بلاستوسپور توليد شده موثرند، اثر متقابل آنها در اين مورد موثر نمي‌باشد (**p**=۰/۱۵٤۷). ارزيابي توليد روزانه بلاستوسپور مشخص نمود كه بين روند توليد بلاستوسپور در روزهاي مختلف اختلاف معني‌دار وجود دارد (**p**=۰/۰۰۰۱)؛ اين روند در روزهاي اول تا سوم زياد و در روزهاي بعد كند گرديد. استفاده از محيطهاي غذايي مايع جايگزين براي توليد بلاستوسپور قارچ نيز نشان داد اثر كيفيت اين محيطهاي غذايي در توليد بلاستوسپور معني‌دار بوده (**p**=۰/۰۰۰٤) و بر اين اساس عصاره سيب‌زميني بالاترين و عصاره ارزن پايين‌ترين ميزان اسپور توليد شده را داشت. در هر يك از اين آزمون‌ها، با بررسي تغييرات **pH** در محيطهاي كشت مايع در زمان توليد بلاستوسپور مشخص گرديد كه فعاليت قارچ باعث كاهش **pH** اوليه محيطها و اسيدي شدن آنها شده است. نتايج آزمايشها نشان داد كيفيت محيطهاي غذايي جامد نيز بر ميزان اسپورزايي اين قارچ اثر معني‌دار داشته (**p**=۰/۰۰۸٦) و بين آنها آرد گندم به همراه ماده جذب كننده رطوبت بالاترين ميزان اسپور توليدي را داشت. همچنين در آزمون ديگري پس از استفاده از ارزن بعنوان محيط پايه جامد براي توليد اسپور مشخص شد كه در اين مورد نيز اثر مواد همراه و تيمارهاي مختلف در توليد اسپور معني‌دار است (**p**=۰/۰۰۰۱) و تيمار ارزن پخته بيشترين ميزان توليد اسپور را داشت.

واژه‌هاي كليدي: ***Beauveria bassiana***، محيط كشت، اسپورزايي، توليد انبوه، قارچ‌هاي حشره كش.

مقدمه

تلاش براي كاهش مصرف آفت‌كش‌هاي شيميائي، حفظ بهداشت انساني، حفاظت از محيط زيست و ذخاير ژنتيكي عوامل كنترل كننده بيولوژيک آفات؛ انگيزه‌اي بسيار قوي براي توليد حشره‌كش‌هاي ميكروبي و استفاده از آنها به عنوان يكي از اجزاي بسيار مطلوب در مبارزه تلفيقي با آفات

نويسنده مسئول: حسن عسكري تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۰۱۲۴۲ E-mail: askary@ppdri.ac.ir

شده است (۳۳، ٤۷). بالغ بر صد و پنجاه سال است که توانايي تعدادي از قارچ‌هاي بيمارگر در تنظيم جمعيت‌هاي برخي حشرات خسارتزا به توليدات كشاورزي، به اثبات رسيده است (۲۱). در اين ارتباط كوشش قابل ملاحظه‌اي براي توليد و بهره‌برداري از قارچ‌هاي بيمارگر هيفوميست به عمل آمده است (۲۹).

در بين قارچ‌هاي بيمارگر حشرات، قارچ *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hyphomycetes: Moniliales) به دليل دارا بودن پتانسيل قابل ملاحظه براي كنترل جمعيت آفات، بالاترين توجهات را به خود اختصاص داده است (۲۲، ۱۸). اين گونه وسيع‌ترين و متنوع‌ترين طيف ميزباني حشرات را داشته (۷، ۱۲، ۲۹) و داراي جدايه‌هايي است كه عامل بيمارگر اختصاصي روي گروه هايي از حشرات مي باشد (۴۴). برخي از ميزبانان جدايه‌هاي اين قارچ عبارتند از انواع شته (۲٤، ۳۸، ۳۹)، آلرود (٤۰)، تريپس (۱۷)، پروانه‌ها (۵۰،۲۶)، سخت بالپوشان (۴۱)، دوبالان (۱۱)، جوربالان (٤۵)، سوسري‌ها (۱۹)، موريانه‌ها (۱٤)، ناجوربالان (۳٤)، بال‌غشائيان (۹) و عنكبوتيان (۲۵).

قارچ *B. bassiana* به علت دارا بودن توانايي رشد روي محيط‌هاي كشت مصنوعي و سهولت در توليد انبوه مورد استقبال متخصصان قرار گرفته است. اين قارچ روي محيط‌هاي كشت جامد و لاشه حشرات كنيدي‌هاي معمولي و در محيط كشت مايع بلاستوسپور توليد مي نمايد (۸). بلاستوسپورها يا بطور انفرادي در انتهاي سلولهاي كنيدي‌زا كه از ميسليوم منشا مي‌گيرند، پديد مي‌آيند يا در نوك لوله‌هاي تندشي كوتاه كه مستقيما از بلاستوسپور خارج مي‌گردند، ظاهر مي‌شوند (۲۸).

توليد اين قارچ به سه شكل انجام شده است: الف) روي محيط مايع و توليد بلاستوسپور ب) روي محيط جامد و توليد كنيدي ج) روي محيط مايع و سپس روي محيط جامد. رايج‌ترين و شايد كارآمدترين روش، تلفيقي از محيط مايع و جامد بوده است. در اين روش ابتدا بلاستوسپور در حد زياد توليد شده و محيط جامد كه از مواد مختلف تشكيل شده است با آن تلقيح و سپس كنيدي‌هاي توليد شده از اين محيط جمع‌آوري مي‌شود (۴۹،۵). در مرحله اول براي توليد بلاستوسپور با كيفيت نياز به منبع كافي از نيتروژن و هيدروكربور و منابع فسفات مي باشد (۲۳). هر چند اين يک اصل كلي است اما بايد گفت كه نياز غذايي براي هر گونه و جدايه متفاوت مي باشد. براي مثال روي *Metarihizium flavoviride* Gams & Rozsypal محيط كشت حاوي شيرابه مخمر و آبجو و قند كه از نسبت مناسبي برخوردار باشد، خوب رشد كرده است. انتخاب يک محيط كشت مناسب بايد منجر به توليد بيشتر بلاستوسپور و توليد كمتر ميسليوم گردد. توصيه شده است كه بعد از مرحله انتخاب محيط كشت، بهترين زمان برداشت محصول نيز بايد تعيين گردد (۳۱). در حاليكه محدوديت هايي براي انتخاب يک محيط كشت مايع خوب وجود دارد، براي محيط كشت هاي جامد تنوع بيشتري از مواد وجود داشته به طوريكه تعداد زيادي از آنها توسط جنكينز و همكاران (۱۹۹۸) و فنگ و همكاران(۱۹۹٤)معرفي شده‌اند (۳۱،۱۵). در بين اين مواد انواع غلات نظير برنج، گندم، سورگوم، جو، ذرت، ارزن، يولاف، و ساير مواد گياهي نظير سيب زميني، نان، بادام زميني و غيره ديده مي شود. برخي از اين مواد توسط محققيني نظير روميناخ (۱۹۸۹)؛آبراهام (۲۰۰۳) و سيواچ و جيپال (۲۰۰۴) بررسي شده است (۵۱،۴۸،۱). انتخاب يک محيط غذايي كشت مناسب تنها به مناسب بودن آن از نظر مواد غذايي عنوان نشده است، بلكه بايد از نظر حفظ شرايط فيزيكي محيط براي توليد بيشتر اسپور مناسب باشد. در برخي موارد براي اصلاح محيط و جداسازي ذرات از يكديگر براي افزايش سطح اسپورزايي از مواد خنثي و اصلاح كننده نيز استفاده شده است (۳۱،۳۰).

به طور كلي در فرآورده‌هاي بيولوژيك توليد شده از قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* Vuillemin (Metschnikoff) Sorokin بيشتر از كنيدي‌ها استفاده شده است كه دليل اصلي آن طول عمر بيشتر كنيدي ها نسبت به بلاستوسپور و همچنين طبيعت چربي دوست بودن آنها و سهولت پخش شدنشان در روغنها بوده است (۵). فرمولاسيون‌هاي روغني اين قارچ موجب چسبندگي بالاتر كنيدي‌ها به كوتيكول آبگريز حشرات شده (۳)، بنابراين پايداري و قدرت آلوده‌سازي آنها را افزايش مي‌دهد. هرچند پيشرفت‌هاي چشمگيري در زمينه توليد اسپور قارچ *B. bassiana* صورت گرفته است، اما هنوز در زمينه‌هاي مختلف توليد و شرايط بهينه محيطي كشت اطلاعات

بيشتري نياز مي‌باشد (۳۵). جنكينز و همكاران (۱۹۹۸) معتقدند كه نه تنها براي گونه‌هاي مختلف قارچ‌هاي بيمارگر بلكه جدايه‌هاي آنها عواملي نظير نيازهاي غذايي،pH محيط كشت، دما، نور، هوادهي، در ميزان كيفيت و كميت مرحله رويشي و زايشي شامل بلاستوسپور و كنيدي موثر بوده و براي داشتن كنيدي‌هايي با كيفيت بالا بايد هر يک از آنها مورد بررسي قرارگيرند. به اعتقاد ايشان اثر هر يک از عوامل ممكن است با عامل ديگر وابسته باشد (۳۱). به همين دليل محققين بررسيهاي خود را به صورت آزمايش فاكتوريل براي مقايسه محيط‌هاي كشت در توليد انبوه *Colletotrichum truncatum* (Schwein) Andrus & Moore استفاده نمودند. اين روش نه تنها اثرات توام تيمارها را نشان مي‌دهد بلكه از آزمايش‌هاي متعدد براي بررسي هر فاكتور به صورت جداگانه جلوگيري مي كند (۳۱، ۵۴).

منابع اطلاعاتي موجود حاكي از آن است كه شناخت شرايط و عوامل محيطي موثر در رشد، اسپورزايي و كيفيت محصول توليد شده، اولين گام در توليد انبوه يک آفت كش ميكروبي موثر مي‌باشد (۱۰). درك و شناخت اين عوامل به ما اجازه غلبه بر مشكلات را داده و دستيابي به توليد و فرمولاسيون مناسب‌تر و در نتيجه كنترل بيشتر حشرات آفت را فراهم مي‌سازد (۳۰،۲۹). در اين تحقيق اثر عوامل محيطي و غذايي در رشد و اسپورزايي جدايه‌اي از قارچ *B. bassiana* كه از ملخ جدا شده و بررسي‌هاي اوليه بيمارگري خوب اين جدايه را (۲۰) نشان داده است، مورد بررسي قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهيه، كشت و نگهداري قارچ بيمارگر

جدايه فشند قارچ *B. bassiana* از موسسه تحقيقات گياه پزشكي كشور (جناب آقاي دكتر غزوي) دريافت گرديد. اين قارچ روي محيط غذايي سيب‌زميني، دكستروز، آگار داخل تشتك پتري يا لوله‌هاي آزمايشي كشت و در يخچال نگهداري شد. براي تهيه سوسپانسيون مايع قارچ از محيط عصاره سيب زميني (۲۰۰ گرم سيب‌زميني به ازاي هر ليتر آب مقطر) داخل شيشه‌هاي ارلن مايز شياردار استفاده گرديد. پس از مايه‌زني محيط كشت در شيشه‌هاي ارلن مايز با حلقه‌هاي ۵ ميلي‌متري از قارچ، تكثير روي دستگاه شيكر با چرخش ۱۰۰ دور در دقيقه و دماي ۱ ± ۲٤ درجه سانتي‌گراد به مدت ۵ روز صورت گرفت.

بررسي تاثير انواع محيط‌هاي غذايي مايع و اثر همزمان نور در ميزان توليد بلاستوسپور ***B. bassiana***

در اين بررسي ٤ نوع محيط غذايي و دو تيمار نوري در سه تكرار در قالب آزمايش فاكتوريل در طرح پايه كاملا تصادفي استفاده گرديد. تيمار نور شامل نور فلورسنت با شدت ٤۰۰۰ لوكس با دوره زماني ١٦ ساعت روشنايي و ٨ ساعت تاريكي، و تيمار ديگر كاملا تاريكي بود. محيط‌هاي غذايي شامل عصاره سيب‌زميني (محيط P با pH اوليه ۶/۹)؛ عصاره سيب‌زميني همراه با۲۰ گرم دكستروز و ۵ گرم عصاره مخمر به ازاي هر ليتر (محيط PYD با pH اوليه ٦)؛ عصاره سيب‌زميني همراه با ملاس ۵% چغندر قند به ازاي هر ليتر (محيط PM با pH اوليه ۵/٤) و ملاس ۵% چغندر قند (محيط M با pH اوليه ۵/٤) بود. ۳۰۰ ميلي‌ليتر از محيط‌ها به درون شيشه هاي ارلن مايز شياردار نيم ليتري ريخته و استريل شد. هر يك از محيط‌ها با دايره‌اي ۵ ميلي‌متري از قارچ مايه زني و روي شيكر با چرخش ۱۰۰ دور در دقيقه و دماي ۱ ± ۲٤ درجه سانتي‌گراد به مدت ۵ روز و تحت تيمارهاي نوري مورد نظر نگهداري شدند. پس از اين مدت pH نهايي محيط‌ها اندازه‌گيري و سپس بلاستوسپورها توسط پارچه توري جداسازي و ضمن شمارش وزن خشك آنها نيز اندازه‌گيري و ثبت گرديد.

ارزيابي توليد روزانه بلاستوسپور بمنظور تعيين بهترين زمان برداشت قارچ

محيط عصاره سيب‌زميني طبق روش‌هاي قبل تهيه و سپس به ميزان نيم ليتر داخل شيشه هاي ارلن‌مايز شياردار ريخته، پس از استريل نمودن روي شيكر با دوران ۱۰۰ دور در دقيقه قرار داده شد.

اين آزمون در سه تكرار و در شرايط ١٦ ساعت نور و ٨ ساعت تاريكي و در دماي ۱ ± ۲٤ درجه سانتي‌گراد به مدت ۱۰ روز ادامه يافت. در هر روز تحت شرايط استريل يک ميلي‌ليتر از محيط برداشت و ميزان بلاستوسپور توليد شده توسط پارچه توري جداسازي و شمارش گرديد. در طول آزمايش pH محيط نيز اندازه‌گيري و به صورت روزانه يادداشت شد.

بررسي انواع محيط‌هاي غذايي مايع جايگزين بر ميزان توليد بلاستوسپور و بيوماس قارچ

پنج نوع ماده غذايي شامل عصاره‌هاي شلتوک برنج، گندم، ارزن، سيب زميني و ملاس 5% چغندر قند به عنوان مواد غذايي طبيعي و جايگزين ترکيبات آزمايشگاهي، در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفي مورد بررسي قرار گرفت.

مقدار ۲۰۰ گرم از اين مواد در يک ليتر آب مقطر پخته و عصاره حاصل پس از عبور دادن از چند لايه پارچه ململ، توسط آب مقطر به حجم يک ليتر رسانده شد. همچنين براي تهيه ملاس 5% چغندر قند از ملاس خام کارخانه‌اي استفاده شد.

هر يك از محيط‌ها در شيشه هاي ارلن مايز شياردار نيم‌ليتري به سه قسمت ۳۰۰ ميلي‌ليتري تقسيم و استريل شدند. محيط‌ها با حلقه 5 ميلي‌متري از قارچ مايه زني و در دماي ۱±۲٤ درجه سانتيگراد روي دستگاه شيکر با چرخش ۱۰۰ دور در دقيقه به مدت 5 روز صورت نگهداري شدند.

pH اوليه براي هر محيط غذايي قبل از استريل شدن اندازه‌گيري شد که براي عصاره سيب زميني٦/٤، شلتوک برنج 5/5، ارزن 5/۸، گندم ٦ و ملاس 5/٤ بود. پس از 5 روز pH نهايي محيط، اندازه‌گيري و ميزان بلاستوسپور توليدي قارچ توسط پارچه توري جداسازي و در هر تکرار شمارش و پس از خشك شدن نيز وزن گرديد.

بررسي تاثير انواع مواد افزودني در محيط غذايي جامد جايگزين روي ميزان توليد اسپور قارچ

از آنجايي که در آزمايش‌هاي اوليه آرد گندم و ارزن شرايط مناسبي را براي توليد قارچ روي محيط جامد جايگزين و همچنين تهيه فورمولاسيون‌هايي بر پايه پودر سوسپانسيون و گرانولي از خود نشان دادند، در دو آزمايش جداگانه اثر مواد افزودني و تيمارهاي مختلف روي ميزان توليد اسپور بررسي گرديد.

آرد گندم به عنوان ماده غذايي پايه

اسپورزايي قارچ روي آرد گندم به همراه ترکيب‌هاي مختلف در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفي مورد بررسي قرار گرفت. براي تهيه محيط غذايي از آرد گندم به ميزان ۲۰۰ گرم براي هر تيمار پس از اضافه کردن رطوبت لازم (در حدي که آرد خمير نگردد) و مواد همراه به شرح زير استفاده شد. ۱) آرد گندم به تنهايي؛ ۲) آرد گندم و يک گرم پليمر جذب کننده رطوبت؛ ۳)آرد گندم به همراه ۰/٦۱ گرم کربنات کلسيم (به عنوان سينرژيست[1]) و ۲/٤ گرم سولفات‌منيزيم (به عنوان سينرژيست و تثبيت کننده[2])؛ ٤) آرد گندم و ۰/٦۱ گرم پرليت معدني (بعنوان نگهدارنده رطوبت[3])؛ 5) آرد گندم و مخلوط کليه مواد افزودني فوق.

تيمارها پس از مخلوط شدن درون کيسه‌هاي مقاوم به حرارت ريخته و درب آنها پرس شد. پس از استريل شدن، تيمارها با ۲ ميلي‌ليتر از سوسپانسيون کنيدي قارچ به غلظت ۲×۱۰[۸] کنيدي در ميلي‌ليتر مايه زني و سپس در دماي ۱ ± ۲٤ درجه سانتي‌گراد و شرايط نوري ۱٦ ساعت نور و ۸ ساعت تاريکي به مدت ۱5 روز نگهداري شدند.

براي شمارش اسپورهاي توليد شده در محيط از رنگ آميزي افتراقي استفاده گرديد (۴۲). ابتدا سوسپانسيون رقيقي از هر تيمار به نسبت معين تهيه و سپس به ازاي هر ۵۰ ميلي‌ليتر از آن 5 تا ۷ قطره از معرف ملزر[4] به آن اضافه گرديد و به مدت ۱5 دقيقه توسط مگنت به هم زده شد تا ذرات نشاسته موجود در محيط کاملا" رنگ آميزي و سياه شوند. در اين شرايط اسپورها نيز رنگ قرمز مايل به قهوه اي به خود گرفتند. در مرحله بعد به ازاي ۵۰ ميلي ليتر از سوسپانسيون، ۱۰ قطره معرف فلوکسين بي[5] استفاده گرديد. در اين مرحله اسپورها قرمز رنگ شدند. سپس ۳ تا 5 قطره معرف متيلن بلو[6] به ازاي ۵۰ ميلي‌ليتر از محيط استفاده شد تا ديواره سلولي اسپورها رنگ‌آميزي گردد. براي شفاف‌تر شدن اسپورها چند قطره هيدروکسيد پتاسيم[7] ۷ درصد به سوسپانسيون اضافه و کاملا" به هم زده شد. سپس تعداد اسپورها شمارش و ثبت گرديد.

ارزن به عنوان ماده غذايي پايه

اسپورزايي قارچ روي ٦ نوع محيط غذايي بر پايه ارزن، در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفي بررسي شد. براي تهيه محيط‌هاي غذايي از ۲۰۰ گرم ارزن به ازاي هر تيمار و

1. Synergist
2. Stabilizer
3. Humectant
4. Melzer
5. Phloxin B
6. Methylene blue
7. Potassium hydroxid

به همراه مواد افزودني مختلف استفاده گرديد. تيمارها عبارت بودند از: ۱) ارزن پخته: ارزن به مدت يک ساعت در آب خيسانده و سپس به مدت نيم ساعت پخته شد تا پوسته سخت آن تا حدي شكافته شود؛ ۲) ارزن پخته و سه گرم پليمر جذب كننده رطوبت؛ ۳) ارزن پخته و اسيد شويي شده: ارزن پس از پخته شدن، با اسيد سولفوريک يك نرمال به مدت ۱۵ دقيقه اسيدشويي شد؛ ٤) ارزن خيس خورده و اسيد شويي شده با اسيد سولفوريک نرمال به مدت ۱۵ دقيقه به همراه ۲/٤ گرم سولفات منيزيم و ۰/٦۱ گرم كربنات كلسيم؛ ۵) ارزن خيس خورده به همراه ۰/٦۱ گرم پودر پرليت معدني (ماده جذب كننده رطوبت)؛ ٦) ارزن و مخلوطي از كليه مواد افزودني فوق.

تيمارها پس از مخلوط شدن درون كيسه‌هاي مقاوم به حرارت ريخته و درب آنها پرس شد. پس از استريل نمودن، هر تكرار با ۲ ميلي‌ليتر محيط مايع حاوي ۲×۱۰^{۸} اسپور در ميلي‌ليتر مايه‌زني و كاملاً با محيط مخلوط گرديد. سپس تيمارها در دماي ۱ ± ۲٤ درجه سانتي‌گراد در شرايط نوري ۱٦ ساعت روشنايي و ۸ ساعت تاريكي به مدت ۱۵ روز قرار داده شدند.

براي ارزيابي ميزان توليد اسپور، مقدار ۱ گرم از هر تكرار مربوط به هر تيمار در ۱۰۰ميلي‌ليتر آب مقطر استريل حاوي تريتون به غلظت۰/۰۰۵ ريخته و به مدت ۱۰ دقيقه كاملاً به هم زده شد تا اسپورهاي موجود در سطح دانه‌ها در آب غوطه‌ور و سپس شمارش شوند.

تجزيه آماري اطلاعات

رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار اكسل، آناليزها پس از بررسي اوليه براي توزيع نرمال داده ها به كمك نرم‌افزار اس پي اس اس[1] و ام استت ـ سي[2] در قالب طرح آزمايشي مربوطه و مقايسه ميانگين‌ها با آزمون دانكن[3] در سطح پنج يا يك درصد صورت‌گرفت. در تجزيه واريانس تعداد اسپور توليدي به منظور جمع‌پذير كردن داده‌ها، از لگاريتم تعداد اسپور در ميلي‌ليتر استفاده شد.

نتايج

بررسي تاثير انواع محيط‌هاي غذايي مايع و اثر همزمان نور در ميزان توليد بلاستوسپور ***B. bassiana***

نتايج تجزيه واريانس نشان داد كه اثر نور (۲۳ و df=۱، F=٤٤/٤، p=۰/۰۰۰۱)، محيط‌هاي غذايي مختلف (۲۳ و df=۳، F=۸۵/۷، p=۰/۰۰۰۱) و اثر متقابل آنها (۲۳ و df=۳، F=۷/۲، p=۰/۰۰۲۷) در توليد اسپور معني‌دار است. مقايسه ميانگين لگاريتم اسپور توليدي به روش دانكن در سطح ۱ درصد نشان داد كه محيط P با ميانگين ۸/۱۰۹ لگاريتم اسپور در ميلي‌ليتر بالاترين و محيط PYD با ميانگين ٦/۸۵۹ لگاريتم اسپور در ميلي‌ليتر پايين‌ترين ميزان اسپور توليدي را داشت؛ در تركيب تيمارها نيز تيمار P, L بالاترين و تيمار PYD, D پايين‌ترين اسپور توليدي را داشت. مقايسه ميانگين‌هاي مربوطه در جدول ۱ آمده است.

در اين بررسي نتايج تجزيه واريانس نشان داد كه نور (۲۳ و df=۱، F=۱۸,۳۹٤، p=۰,۰۰۰٦) و محيط‌هاي غذايي مختلف (۲۳ و df=۳، F=۲۵۵/۵، p=۰/۰۰۰۱) در وزن خشك بلاستوسپور توليد شده موثر هستند، اما اثر متقابل آنها (۲۳ و df=۳، F=۲، p=۰/۱۵) در اين مورد موثر نمي‌باشد. مقايسه ميانگين‌ها به روش دانكن در سطح يك درصد نشان داد كه محيط PM با ميانگين ۱/۸۳۲ گرم بالاترين و محيط P با ميانگين ۰/٤۲۸ گرم پايين‌ترين وزن خشك اسپور توليدي را داشت. در تركيب تيمارها، تيمار PM, L بالاترين و تيمار P, D پايين‌ترين وزن خشك اسپور توليدي را داشت. مقايسه ميانگين‌هاي مربوطه در جدول ۲ آمده است.

در همين آزمايش پس از بررسي نتايج تجزيه واريانس، مشخص گرديد كه در محيط‌هاي كشت مايع هنگام توليد بلاستوسپور، فعاليت قارچ باعث كاهش pH اوليه محيط و اسيدي شدن آن شده است. نقش نور (۲۳ و df=۱، F=۱۳/۰۱، p=۰/۰۰۲۴) و محيط‌هاي غذايي مختلف (۲۳ و df=۳، F=٤۵/۵، p=۰/۰۰۰۱) در تغييرات pH موثر و اثر متقابل آنها (۲۳ و df=۳، F=۱/۷، p=۰/۲۰۴) غير موثر شناخته شدند (شكل ۱).

مقايسه ميانگين تغييرات pH محيط‌هاي غذايي مايع در زمان توليد بلاستوسپور در جدول ۳ آمده است. بر اين اساس بيشترين تغييرات pH در عصاره سيب‌زميني به همراه دكستروز و عصاره مخمر و كمترين آن در عصاره سيب‌زميني به همراه ملاس رخ داده است.

1. SPSS
2. MSTAT-C
3. Duncan

جدول ۱- مقایسه میانگین بلاستوسپور تولید شده در هر میلي‌لیتر توسط قارچ *B. bassiana* در محیط‌هاي غذایي مایع به همراه اثر همزمان نور

SE ± میانگین لگاریتم اسپور در میلي‌لیتر	تیمار نوري × محیط غذایي	میانگین لگاریتم اسپور در میلي‌لیتر	تیمار نوري	میانگین لگاریتم اسپور در میلي‌لیتر	محیط غذایي
۷/۱۲٦ ± ۰/۰٦۷	M, D	۷/۲۰۹ a	تاریکي	٦/۸۵۹ a	PYD
۷/٤۸۰ ± ۰/۰۲٦	M, L				
۸/۰٦۰ ± ۰/۰۳۱	P, D			۷/۳۰۳ b	M
۸/۱۵۹ ± ۰/۰٤۸	P, L				
۷/۱۹٤ ± ۰/۰۲۵	PM, D	۷/۵۸٤ b	نور	۷/۳۱۵ b	PM
۷/٤۳۷ ± ۰/۱۲۰	PM, L				
٦/٤۵۸ ± ۰/۰۸۸	PYD, D			۸/۱۰۹ c	P
۷/۲۵۹ ± ۰/۱۳۹	PYD, L				

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معني‌دار در سطح یك درصد است.

جدول ۲- مقایسه میانگین وزن خشك بلاستوسپور تولید شده در میلي‌لیتر توسط قارچ *B. bassiana* تحت شرایط نور و محیط‌هاي غذایي مختلف

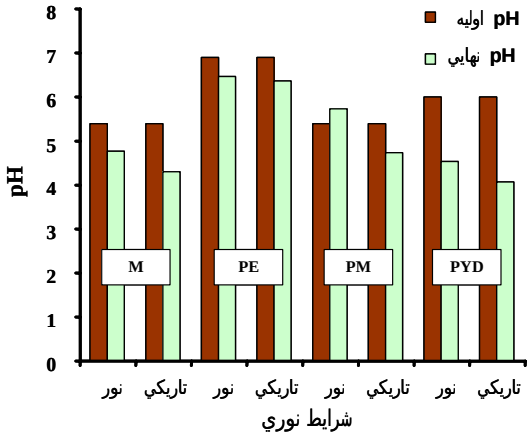
SE ± میانگین وزن بلاستوسپور در میلي‌لیتر (g)	تیمار نوري × محیط غذایي	میانگین وزن بلاستوسپور در میلي‌لیتر (g)	تیمار نوري	میانگین وزن بلاستوسپور در میلي‌لیتر (g)	محیط غذایي
۱/۲٦۰ ± ۰/۰۳۲	M, D	۱/۰۸٦ a	تاریکي	۰/٤۲۸ a	P
۱/٤۳۷ ± ۰/۰۳۸	M, L				
۰/٤۰۷ ± ۰/۰۱۳	P, D			۱/۰۵۰ b	PYD
۰/٤۵۰ ± ۰/۰۱۵	P, L				
۱/٦۸۷ ± ۰/۰۸٤	PM, D	۱/۲٤۳ b	نور	۱/۳٤۸ c	M
۱/۹۷۷ ± ۰/۱۰۱	PM, L				
۰/۹۹۰ ± ۰/۰۰٦	PYD, D			۱/۸۳۲ d	PM
۱/۱۱۰ ± ۰/۰۳۸	PYD, L				

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معني‌دار در سطح یك درصد است.

جدول ۳ - مقایسه میانگین تغییرات pH توسط قارچ *B. bassiana* در محیط‌هاي غذایي در سطح ۱ درصد

S E ± میانگین pH نهایي محیط	تیمار نوري × محیط غذایي	میانگین pH نهایي محیط	تیمار نوري	اختلاف pH ایجاد شده	میانگین pH نهایي محیط	pH اولیه محیط	محیط غذایي
٤/۳۰۰ ± ۰/۰۵۸	M, D	٤/۸٦۷ a	تاریکي	۱/۷	٤/۳۰۰a	٦	PYD
٤/۷٦۷ ± ۰/۰٦۷	M, L						
٦/۳٦۷ ± ۰/۰۳۳	P, D			۰/۹	٤/۵۳۳a	۵/٤	M
٦/٤٦۷ ± ۰/۰۳۳	P, L						
٤/۷۳۳ ± ۰/۰۳۳	PM, D	۵/۳۷۵ b	نور	۰/۲	۵/۲۳۳ b	۵/٤	PM
۵/۷۳۳ ± ۰/۱٤۵	PM, L						
٤/۰٦۷ ± ۰/۰۳۳	PYD, D			۰/۵	٦/٤۱۷ c	٦/۹	P
٤/۵۳۳ ± ۰/۵۳۳	PYD, L						

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معني‌دار در سطح یك درصد است.

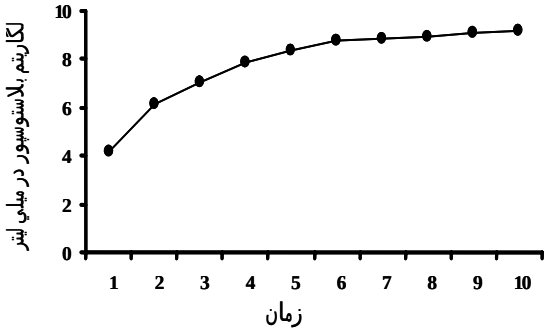


شكل ۱- تغيير pH محيط‌هاي غذايي مايع هنگام توليد بلاستوسپور توسط قارچ *B. bassiana* پس از ۵ روز

ارزيابي توليد روزانه بلاستوسپور بمنظور تعيين بهترين زمان برداشت قارچ

توليد بلاستوسپور در روزهاي مختلف از نظر آماري متفاوت بود (۲۹ و df=۹، F=۱۳۲۶/۶، p=۰/۰۰۰۱). ميزان توليد در روزهاي اول تا سوم زياد و در روزهاي بعد كند گرديد (شكل ۲).

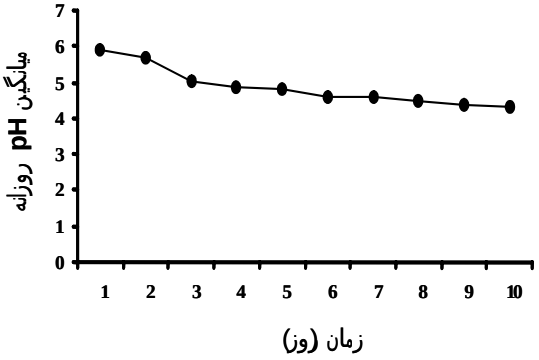
مقايسه ميانگين لگاريتم بلاستوسپور توليدي در ميلي‌ليتر در روزهاي مختلف در جدول ٤ آمده است. در همين بررسي مشخص شد كه بين pH محيط رشد قارچ در روزهاي مختلف اختلاف معني‌دار وجود دارد (۲۹ و df=۹، F=۱۸۶/۱، p=۰/۰۰۰۱) (شكل ۳). مقايسه ميانگين‌ها به روش دانكن در سطح يك درصد وضعيت اين تغييرات را نسبت به هم مشخص نمود (جدول ۵).



شكل ۲- ميانگين لگاريتم بلاستوسپور توليد شده توسط قارچ *B.bassiana* در روزهاي مختلف و در محيط عصاره سيب‌زميني

جدول ٤- مقايسه ميانگين لگاريتم بلاستوسپور توليدي در هر ميلي‌ليتر مواد غذايي توسط قارچ *B. bassiana*.

سطح ميانگين	SE ± ميانگين لگاريتم بلاستوسپور در ميلي‌ليتر	زمان نمونه برداري (روز)
a	٤/۲۰۱ ± ۰/۱	۱
b	٦/۱٤۳ ± ۰/۰۳٦	۲
c	۷/۰٤۰ ± ۰/۰۲۳	۳
d	۷/۸۹۱ ± ۰/۰۲۰	٤
e	۸/۳۲۸ ± ۰/۰۲۵	۵
f	۸/۷۳۸ ± ۰/۰۰۹	٦
fg	۸/۸۵۰ ± ۰/۰۳٦	۷
gh	۸/۹٦۸ ± ۰/۰۰۷	۸
hi	۹/۰۸۵ ± ۰/۰۵۱	۹
i	۹/۱٦۰ ± ۰/۰۵۱	۱۰



شكل ۳- ميانگين تغييرات pH روزانه در محيط مايع رشد قارچ *B. bassiana*.

جدول ۵- مقايسه ميانگين pH محيط رشد قارچ *B. bassiana* در روزهاي مختلف آزمايش

سطح ميانگين	ميانگين pH روزانه محيط مايع	زمان نمونه‌برداري (روز)
a	٤/۳۰۰	۱۰
ab	٤/۳٦۷	۹
bc	٤/۵۰۰	۸
c	٤/۵٦۷	۷
c	٤/٦۰۰	٦
d	٤/۸۰۰	۵
d	٤/۸٦۷	٤
e	۵/۰۳۳	۳
f	۵/٦٦۷	۲
g	۵/۹۰۰	۱

حروف غيرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معني‌داردر سطح يك درصد است.

بررسي تاثير انواع محيط‌هاي غذايي مايع جايگزين بر ميزان توليد بلاستوسپور و بيوماس قارچ

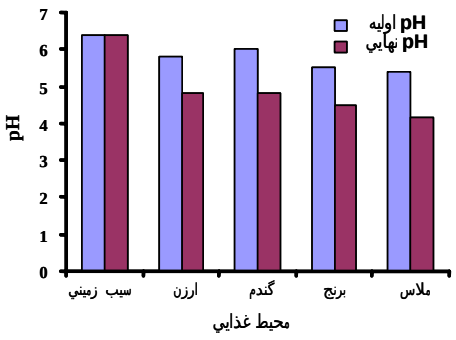
نتايج تجزيه واريانس نشان داد اثر انوع محيط‌هاي غذايي مايع در توليد بلاستوسپور معني‌دار بود (١٤ و ٤=df، F=١٤/٠٨، p=٠/٠٠٠٤). بر اساس مقايسه ميانگين لگاريتم بلاستوسپور توليدي به روش دانكن در سطح ١ درصد، عصاره سيب‌زميني با ميانگين ٨/٠٥٢ لگاريتم اسپور در ميلي‌ليتر بالاترين ميزان اسپور توليد شده و عصاره ارزن با ميانگين ٧/٤١٣ پايين‌ترين اسپور توليدي را داشت. مقايسه اين ميانگين‌ها در جدول ٦ آمده است. در همين آزمون پس از بررسي تغييرات pH در محيط‌هاي كشت مايع در زمان توليد بلاستوسپور مشخص گرديد كه در هر مورد pH اوليه محيط در اثر فعاليت قارچ به سمت اسيدي شدن پيش رفته است (١٤ و ٤=df، F=١١٩/٠٧، p=٠/٠٠٠١) (شكل٤).

مقايسه ميانگين تغييرات pH محيط‌هاي غذايي در انتهاي مرحله توليد بلاستوسپور در سطح يك درصد در جدول ٧ آمده است. بر اين اساس بيشترين تغييرات pH در ملاس چغندر قند و كمترين آن در عصاره سيب‌زميني رخ داده است.

جدول ٦ - مقايسه ميانگين بلاستوسپور توليد شده در هر ميلي ليتر محيط غذايي مايع توسط قارچ *B. bassiana*.

سطح ميانگين	SE ± ميانگين لگاريتم بلاستوسپور در ميلي‌ليتر	محيط غذايي (عصاره)
a	٧/٤١٣ ± ٠/٠٦٠	ارزن
a	٧/٤٢٥ ±٠/٠١٥	ملاس
ab	٧/٧١٤ ±٠/٠٩٧	برنج
b	٧/٨٩٧ ± ٠/٠٥٢	گندم
b	٨/٠٥٢ ± ٠/١١٢	سيب‌زميني

حروف غيرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معني‌داردر سطح يك درصد است.



شكل ۴ - تغييرات pH محيط‌هاي غذايي در زمان توليد بلاستوسپور قارچ *B. bassiana* پس از ۵ روز

جدول ٧ - مقايسه ميانگين تغييرات pH محيط‌هاي غذايي در اثر فعاليت قارچ *B. bassiana*

سطح ميانگين	تفاوت PH ايجاد شده	SE ± ميانگين pH نهايي محيط غذايي رشد قارچ	PH اوليه	محيط غذايي
a	١,٣	٤/١٦٧ ± ٠/٠٨٨	٥,٤	ملاس
ab	١	٤/٥٠٠ ± ٠/٠٥٨	٥,٥	برنج
b	١,٢	٤/٨٠٠ ± ٠/٠٥٨	٦	گندم
b	١	٤/٨٣٣ ± ٠/٠٨٨	٥,٨	ارزن
c	٠,١	٦/٣٦٧ ± ٠/٠٨٨	٦,٤	سيب‌زميني

حروف غيرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معني‌داردر سطح يك درصد است.

بررسي تاثير انواع مواد افزودني در محيط غذايي جامد جايگزين روي ميزان توليد اسپور قارچ

آرد گندم به عنوان ماده غذايي پايه: نتايج تجزيه واريانس نشان داد بين تيمارهاي مورد آزمايش اختلاف معني‌داري وجود دارد (١٤ و ٤=df، ٦/٢=F، ٠/٠٠٨٦=p). مقايسه ميانگين‌ها به روش دانكن و در سطح يك درصد نشان داد كه تيمار آرد گندم و پليمر جذب كننده رطوبت با ميانگين $٦/٥٨٨ \times ١٠^{٧}$ لگاريتم اسپور در ميلي‌ليتر بيشترين و آرد گندم به اضافه كليه مواد افزودني با ميانگين $٥/٦٦٨ \times ١٠^{٧}$ لگاريتم اسپور در ميلي‌ليتر كمترين ميزان توليد را داشتند (جدول ٨).

جدول ٨ - مقايسه ميانگين لگاريتم اسپور توليد شده توسط قارچ *B. bassiana* روي گندم به عنوان ماده غذايي پايه در هر ميلي‌ليتر به روش دانكن در سطح ١ درصد

سطح ميانگين	SE ± ميانگين لگاريتم اسپور در ميلي ليتر	محيط غذايي
a	٥/٦٦٨ ± ٠/١٩٩	آرد گندم + مخلوط مواد افزودني
a	٥/٧٠٠ ± ٠/١٧٢	آرد گندم + پرليت
a	٥/٨٥٩ ± ٠/١٦٠	آرد گندم
ab	٥/٩٦٤ ± ٠/١٢٦	آرد گندم + كربنات كلسيم+ سولفات منيزيم
b	٦/٥٨٨ ±٠/٠١٩	آرد گندم + پليمر جذب كننده رطوبت

حروف غيرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معني‌داردر سطح يك درصد است.

ارزن بعنوان ماده غذايي پايه: اثر تيمارهاي مختلف روي ارزن بعنوان محيط پايه جامد براي توليد اسپور نتايج

متفاوتي را بدنبال داشت. بطوريكه نتايج تجزيه واريانس نشان داد كه اثر مواد همراه و تيمارها در توليد اسپور معني‌دار است (۱۷ و df=5، F=۷٦/۲، p=۰/۰۰۰۱). در مقايسه ميانگين تيمار ارزن پخته با ميانگين ٤/۸۷٤ لگاريتم اسپور در ميلي‌ليتر بيشترين و ارزن به همراه پرليت با ميانگين ۳/۵۹۳ لگاريتم اسپور در ميلي‌ليتر كمترين ميزان توليد را داشتند. مقايسه ميانگين‌هاي مربوطه در جدول ۹ آمده است.

جدول ۹ - مقايسه ميانگين لگاريتم اسپور توليدشده توسط قارچ *B. bassiana* روي ارزن به عنوان ماده غذايي پايه در هر ميلي‌ليتر به روش دانكن در سطح ۱ درصد

سطح ميانگين	SE ± ميانگين لگاريتم اسپور در ميلي‌ليتر	محيط غذايي و مواد همراه
a	۳/۵۹۳ ± ۰/۰٦٤	ارزن + پرليت
a	۳/٦۷٤ ± ۰/۱۰۷	ارزن اسيدشويي شده + كربنات كلسيم + سولفات منيزيم
b	٤/۲٤۵ ± ۰/۰۲۹	ارزن اسيدشويي شده
b	٤/۳۲۱ ± ۰/۰۲۱	ارزن + كليه مواد افزوده شده به ساير تيمارها
b	٤/۳۹٦ ± ۰/۰۲٦	ارزن+پليمر جذب كننده رطوبت
c	٤/۸۷٤ ± ۰/۰۲۵	ارزن پخته

حروف غيرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معني‌داردر سطح يك درصد است.

بحث

استفاده از محيط مايع مناسب براي توليد حداكثر بلاستوسپور موضوع تحقيقات برخي محققين بوده است. براي مثال استفان و زيمرمن (۱۹۹۷) براي توليد بلاستوسپور *M. flavoviride* از منابع غذايي مختلف حاوي مقادير متفاوت نيتروژن و قند استفاده نمود. ايشان بيشترين توليد را پس از ۳ روز از روي مخلوطي از ملاس چغندر قند با ساير مواد كه حاوي هيدروكربور و ازت بيشتر بود، بدست آورد (۵۳). نتايج حاصل از تحقيق حاضر با تحقيقات اخير هماهنگي داشته و توليد بلاستوسپور بيشتر روي ملاس و عصاره سيب‌زميني كه حاوي هيدروكربور زيادي است، مطابقت دارد. تعيين بهترين زمان برداشت محصول و ارزيابي روزانه ميزان توليد بلاستوسپور در محيط مايع رشد قارچ *B. bassiana* داراي اهميت است. زيرا از طريق آن مي‌توان كوتاه‌ترين و اقتصادي‌ترين زمان برداشت بلاستوسپور توليدي را پيدا كرد (۵۵،۳۱). همچنين برداشت بلاستوسپور قبل از مسن شدن آنها انجام شده و مي توان نتيجه بهتري را در بيمارگري آنها انتظار داشت (۲۷). نتايج نشان داد كه در برخي موارد بر خلاف تعداد بيشتر بلاستوسپور توليد شده در محيط مايع، وزن خشك آنها كمتر است. وزن خشك متاثر از دو شاخصه مهم شامل ميزان آب داخل بلاستوسپور و اندازه بزرگي آنهاست. بر اساس نتايج بدست آمده به نظر مي رسد محيطهاي غذايي مايع روي اين دو شاخصه تاثير گذار بوده و مي توانند در ذخيره سازي مواد غذايي، اندازه بلاستوسپور و ميزان جذب آب موثر باشند (۵۳).

نتايج اين تحقيق نشان داد كه محيط‌هاي غذايي با منشا گياهي و ارزان قيمت جايگزين مناسبي براي مواد آزمايشگاهي براي توليد قارچ *B. bassiana* بوده و در توليد اين قارچ بيمارگر حشرات مي‌توان از اين مواد استفاده نمود. محققين مختلفي نظير آبراهام و همكاران (۲۰۰۳) نيز تلاش كرده‌اند تا قارچ *B. bassiana* را روي مواد مختلف گياهي توليد نمايند. آنها غلظت‌هاي مختلف از ملاس چغندر قند را به كار برده و ملاحظه كردند كه قارچ بيشترين رشد رويشي و توليد اسپور خود را روي غلظت ۳ تا ٦ درصد داشت. در بين دانه‌هاي غلات نظير سورگوم انواع ارزن و برنج و همچنين روي گياهان غده اي نظير سيب زميني، هويج، چغندر قند و tapioca بيشترين رشد رويشي ميسليوم روي برنج و سپس سورگوم اتفاق افتاد در حاليكه در مقايسه با PDA، (۱/٤×۱۰^{۱۰} spores/100 ml) بيشترين اسپورزايي روي قطعات هويج (۲×۱۰^{۱۰} spores/100 ml)، تاپيوكا (۱/۷×۱۰^{۱۰} spores/100 ml) و سيب‌زميني (۱/٦×۱۰^{۱۰} spores/100 ml) رخ داد. همچنين در بين مواد زايد كشاورزي مختلف قارچ بوريا بيشترين اسپورزايي را روي كيك كنجد (۵/۳×۱۰^{۱۰} spores/100 ml) و سپس روي پس مانده كيك بذرپنبه(۵/۳×۱۰^{۱۰} spores/100 ml) و كيك نيم (۳/۸×۱۰^{۱۰} spores/100 ml) داشته است (۱). موفقيت در يافتن مواد گياهي ارزان قيمت براي توليد قارچ هاي حشره كش موجب كاهش هزينه‌هاي توليد و استفاده بهينه از محصولات جانبي و ضايعات كشاورزي مي‌شود. چرا كه مي‌توان از اين منابع غذايي ارزان قيمت و در شرايط معمولي آزمايشگاهي براي توليد بلاستوسپور و يا

کنیدي این قارچ استفاده نمود. اما انتظار مي رود که کشت مداوم این قارچ‌ها روي محیط‌هاي مصنوعي و نیمه مصنوعي سبب کاهش قدرت بیمارگري آنها شود. براي جلوگیري از این مشکل لازم است با انتقال قارچ روي حشرات میزبان توان تهاجمي آن را حفظ کرد (۲، ۱۵، ۲۲ ،۵۰). تاثیر نوع محیط کشت تنها به میزان رشد رویشي و اسپورزایي قارچ مربوط نمي شود. تحقیقات سیواچ و جیپال (۲۰۰٤) نشان داده است که بستر غذایي نه تنها روي میزان اسپورزایي بلکه روي میزان بیمارگري قارچ نیز تاثیز گذار است. آنها نشان دادند که قارچ *B. bassiana* روي محیط‌هاي جامد سبوس ذرت conidia/ml $۵/۵\times۱۰^{۷}$ و سبوس گندم conidia/ml $۵/۵\times۱۰^{۷}$ بیشترین اسپور زایي را داشته و روي میزبان خود حدود ۷۰ درصد مرگ و میر ایجاد کرد. در حالیکه اسپورهاي تولید شده روي پوسته برنج ۸۱/۵ درصد مرگ و میر را روي *Chilo auricillus* ایجاد نمود (٤۲).

جنکینز و همکاران (۱۹۹۸) حفظ شرایط مطلوب محیط را براي اسپورزایي قارچ مورد تاکید قرار داده و افزودن مواد مختلف نظیر ورمي کولیت، رس و غیره را توصیه نموده است (۳۱). در این تحقیق بین مواد افزوده شده به محیط غذایي آرد گندم، پلیمر جذب کننده رطوبت تاثیر مطلوبي در میزان اسپورزایي قارچ *B. bassiana* داشته و بهترین رشد قارچ در این تیمار دیده شد. پلیمر فوق قادر است چندین برابر حجم خود آب را جذب کرده و در فضاهاي بین مولکولي خود نگهداري و سپس به تدریج آزاد سازند.این پلیمر براي حفظ و نگهداري آب در خاک استفاده مي شود. این پلیمر نه تنها اثر سوئي در رشد قارچ ندارد، بلکه میسلیوم هاي آن قادر است درون ماده فوق رشد نماید (٤). وجود شرایط فیزیکي مناسب در بستر آردي با افزودن پلیمر جذب کننده رطوبت (از لحاظ خمیري نشدن)، پس از سترون کردن بسیار حائز اهمیت بود و شرایط خوبي را براي یکنواخت پخش شدن قارچ و رشد مطلوب آن فراهم آورده بود. از طرفي در طول مدت انکوباسیون نیز این ماده به صورت ذرات ژله‌اي ریز رطوبت لازم را براي رشد قارچ ذخیره و فراهم آورده بود که مي‌توان آن را مهمترین عامل نتیجه خوب با اسپور زایي فراوان در این تیمار برشمرد. رطوبت نسبي و یا میزان آب موجود در محیط، فاکتور مهمي براي جوانه‌زني و رشد قارچ چه در محیط کشت و چه روي میزبان مي‌باشد(٦، ١٦، ۳۷). بنابراین با افزودن این پلیمر انتظار مي‌رود علاوه بر اصلاح محیط کشت، هنگام جوانه زني قارچ روي سطح بدن حشره میزبان رطوبت مورد نیاز را از محیط اطراف اسپور دریافت و در اختیار قارچ قرار دهد (۳٦).

فعالیت قارچ در محیط‌هاي غذایي موجب کاهش pH اولیه شده و در جهت اسیدي شدن آنها پیش رفت. دلیل این پدیده احتمالا مربوط به تولید متابولیت‌هاي ثانویه قارچي با pH اسیدي مي‌باشد (۵۰،٤۳). چنین نتیجه‌اي نیز توسط استفان و زیمرمن (۱۹۹۷) در مورد قارچ *M. flavoviride* مشاهده گردید (۵۳). به نظر مي‌رسد اسیدي شدن محیط کشت قارچ مربوط به توانایي تولید و ترشح متابولیت‌هاي ثانویه از جمله اسیدهاي آلي مي‌باشد (٤٦). چندین گونه از قارچ‌هاي بیمارگر حشرات قادر به تولید اسیدهاي آلي هستند که برخي از آنها در فرآیند بیماري‌زایي دخالت دارند. مشاهده شده است که *B. bassiana*؛ در محیط کشت متابولیت‌هاي غیرپپتید همانند اسید اکسالیك و اسید سیتریك تولید و ترشح مي‌کند که ممکن است در بیمارگري آن روي حشرات میزبان دخالت داشته باشند (۳۲). تولید اسید در برخي دیگر از قارچ‌هاي بیمارگر حشرات از جمله *M. anisopliae* با قدرت بیمارگري همبستگي مشخصي را نشان نداده است.

بررسي‌هاي برخي محققین و همچنین تحقیق حاضر نشان داده است که رشد میسلیومي و اسپورزایي قارچ *B. bassiana* توسط نور تحریك شده و افزایش مي‌یابد (۱۳). سریع بودن رشد هیفي ممکن است یك امتیاز براي جدایه‌ها و نژادهاي قارچي باشد. زیرا با این ویژگي زمان لازم براي تولید حشره‌کش‌هاي میکروبي کوتاه مي‌شود. همچنین این ویژگي در رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها و غلبه بر آنها به خصوص در طول زندگي ساپروفیتي قارچ بسیار با اهمیت بوده و احتمالا سطح کنترل آفت به دلیل آلودگي سریعتر حشره، تسریع و افزایش مي‌یابد. در آزمایش‌هاي این تحقیق نیز مشاهده شد که در تیمارهاي همراه با نور میانگین لگاریتم اسپور در هر میلي‌لیتر و

همچنين ميانگين وزن خشك اسپور توليد يبيشر از تيمار تاريكي مي‌باشد. بنابراين توصيه مي‌گردد كيسه‌هاي توليد قارچ در معرض نور قرار گرفته تا سرعت رويش و زايشي آنها بيشتر شده و ميزان توليد به حداكثر برسد.

سپاسگزاري

نگارندگان مراتب سپاسگزاري خود را از مسئولين محترم موسسه تحقيقات جنگلها و مراتع كشور براي تامين ملزومات مورد نياز، اعلام مي‌دارند.

REFERENCES

1. Abraham, T., S. Easwaramoorthy, G. Santhalakshmi, 2003. Mass production of *Beauveria bassiana* isolated from sugarcane root borer, *Emmalocera depresella* Swinhoe. Sugar Technology, 5(4): 225-229
2. Aizawa, K. 1971. Strain improvement and preservation of virulence of pathogens. Pp. 655-699. In: H. D. Burges & N. W. Hussey (eds.), Microbial Control of Insects and mites. Academic Press, New York.
3. Akbar, W., J. C., Lord, J. R. Nechols, & T. M. Loughin, 2005. Efficacy of *Beauveria bassiana* for red flour beetle when applied with plant essential oils or in mineral oil and organosilicone carriers. Journal of Economic Entomology, 98(3): 683-688.
4. Askary, H. 2001. Possibility of using super absorbent polymers in fungi mass production. Proceeding of 3th chemical congress. Azad Univ. Tehran.
5. Bartlett, M. C., & S. T. Jaronski, 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. Pp. 61-85. In: M. N. Burge (ed.), Fungi in Biological Control System. Manchester University Press, UK, 269p.
6. Bateman, R. P., M. Carey, D. Moore, & C. Prior, 1993. The enhanced infectivity of *Metarehizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. Annales of Applied Biology, 122: 145-152.
7. Bidochka, M. J., A. M. Kamp & J. N. Amritha De Croos, 2000. Insect pathogenic fungi: from genes to populations. Pp. 171-193. In: J. W. Kronstad (ed.), Fungal Pathology. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
8. Bidochka, M. J., T. A. Pfeifer, & G. G. Khachatourians, 1987. Development of the entomopathogeneic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. Mycopathologia, 99: 77-83.
9. Broome, J. R. 1974. Microbial control of the imported fire ant, *Solenopsis richteri* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae). M. Sc. thesis, Mississippi State University, Starkville.
10. Burges, H. D. 1998. Formulation of mycoinsecticides. Pp. 131-185. In: H. D. Burges (ed.), Formulation of Microbial Biopesticides. Kluwer Academic Publishes, Dordrecht.
11. Clark, T. B., W., Kellen, T. Fukuda, & J. E. Lindegren, 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology, 11: 1-7.
12. Clarkson, J. M., & A. K. Charnley, 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends in Microbiology, 4: 199-203.
13. Clayton, W. M., R. A., Samson, & D. G. Boucias, 1985. Entomogenous fungi. Pp.151-236. In: C. M. Ignoffo & N. B. Mandara (eds.), Natural Pesticides Vol. V. Microbial Insecticides Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi. CRC Press, USA.
14. Culliney, T. W. & J. K. Grace, 2000. Prospects for the biological control of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae), with special reference to *Coptotermes formosanus*. Bulletin of Entomological Research, 90: 9-21.
15. Daoust, R. A. & D. W. Roberts, 1982. Virulence of natural and insect- passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 40: 107-117.
16. Drummond, J., J. B. Heale, & A. T. Gillespie, 1987. Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenisity in *Verticillium lecanii* against the glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. Annals of Applied. Biology, 111: 193-201.

17. Ekesi, S., N. K., Maniania, I. Onu, & B. Lohr, 1998. Pathogenicty of entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) to the legume fiower thrips, *Megalurothrips sjostedti* (Trybom) (Thysan.: Thripidae). Journal of Applied Entomology, 122: 629-634.
18. Feng. M. G., Y. J. Poprawski, & G. G. Khachatourians, 1994. Production, Formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. Biocontrol Science and Technology, 4: 3-34.
19. Foster, R. N., K. C., Reuter, J. Britton, & C. Bradley, 2000. Lab studies and field trials with fungus *Beauveria bassiana* agains grasshoppers. Journal of Invertebrate Pathology, 48: 259-264.
20. Ghazavi, M. 2003. Study on Iranian isolates of *Beauveria basiana* and its mode action on *Locusta migratoria*. Ph. D. Thesis for Agricultural Entomology. Tehran University, 171 pp.
21. Gillespie, A. T., 1988. Use of fungi to control pests of agricultural importance. Pp. 37-60. In: M. N. Burge (ed.), Fungi in Biological Control System. Manchester University Press, UK, 269p.
22. Goettel, M. S. 1992. Fungal agents for biocontrol, In: C. J. Lomer & C. Prior (eds.), Biological control of locusts and grasshoppers. Proceeding of a workshop held at International Institute of Tropical Agricalture Cotonou, Republic of Benin, CAB International UK.
23. Goettel, M. S. & S. T. Jaronski, 1997. Safety and registration of microbial control agents of grasshoppers and locusts. Pp. 83-99, In: M. S. Goettel & D. L. Johnson (eds.), Microbial Control of Grasshoppers and Locusts. Memoirs of the Entomological Society of Canada.
24. Gouli, S., B. L. Parker, & M. Skinner, 1997. Isolation of fungi associated with hemlock wooly adelgid (Homoptera: Adelgidae). Journal of Invertbrate Pathology, 70(1): 76-77.
25. Grindin, G., M., Samish, E. & I. Glazer, 2001. The suceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. Biocontrol Science and Technology, 11(1): 111-118.
26. Hajek, A. E., J. S. Elkinton, & R. A. Humber, 1997. Entomopathogenic Hyphomycetes associated with gypsy moth larvae. Mycologia, 89(6): 825-829.
27. Hall, R. A., D. D., Peterkins, B. Ali, & V. F. Lopez, 1994. Influence of culture age on rate of germination in four deutromycetous entomogenous fungi. Mycological Research, 98(7): 763-768.
28. Hegedus, D. D., M. J., Bidochka, G. S. Miranpuri, & G. G. Khachatourians, 1992. A comparison of the virulence, stability and cell-wall surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied Microbiology and Biotechnology, 36: 785-789.
29. Inglis, G. D., M. S., Goettel, T. M. Butt, & H. Strasser, 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing biocontrol agents. Pp. 23-69. In: T. M. Butt, C. Jackson & N. Magan (eds.), Fungi as Biocontrol Agents. CABI Publishing, Wallingford, UK.
30. Jenkins, N. E. & M. S. Goettel, 1997. Methods for mass- production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. Memoirs of the Entomological Society of Canada, 171: 37-48.
31. Jenkins, N. E., G. Heviefo, J. Langewald, A. J. Cherry & C. J. Lomer, 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information, 19(1): 21N-31N.
32. Khachatourians, G. G. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi.Pp. 613–663. In: D. K. Arora, L. Ajello & K. G. Mukerji (eds.), Humans, Animals, and Insects. Handbook of Applied Mycology,. Marcel Dekker, Inc. New York.
33. King, E. G. & R. J. Coleman, 1989. Potential for biological control of *Heliothis* species. Annul Review Entomology, 34: 53-75.
34. Luz, C., J., Fargues, C. A., Romaña, J., Moreno, R., Goujet, M. Rougier, & J. Grunewald, 1994. Potential of entomopathogenic hyphomycetes for the control of the triatomine vectors of Chagas' disease. Proc 6 Int Coll Invertebr Path Microbiol Control, 1: 272- 276.
35. Magan, N. 2001. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. Pp. 239-251. In: T. M. Butt, C. Jackson & N. Magan (eds.), Fungi as Biocontrol Agents. CABI Publishing, Wallingford, UK.
36. Marcandier, S. & G. G. Khachatourians, 1987. Susceptibility of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Fab.) (Orthoptera, Acrididae), to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (Hyphomycete): Influence of relative humidity. Canadian Entomologist, 119: 901-907.

37. Milner, R. J. & G. G. Lutton, 1986. Dependence of *Verticillium lecanii* on high humidities for infection and sporulation using *Myzus persicae* as host. Environmental Entomology, 15: 380-382.
38. Miranpuri, G. S. & G. G. Khachatourians, 1996. Bionomics and fungal control of wooly elm aphid, *Eriosoma americanum* (Riley) (Homoptera: Eriosomatidae) on saskaton berry, *Amelanchier alinifolia*. Journal of Insect Science, 9(1): 33-37.
39. Miranpuri, G. S. & G. G. Khachatourians, 1995. Application of *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* agaist saskaton berry leaf aphid, *Acyrthosiphum macrosiphum* (Wilson). Jounal of Insect Science, 8(1): 93-95.
40. Negasi, A., B. L. Parker, & M. Brownbridge, 1998. Screening and bioassay of entomopathogenic fungi for the control of silver leaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Insect Science and Its Application, 18(1): 37-44.
41. Neves, P. M. O. J. & E. Hirose, 2005. *Beauveria bassiana* strains selection for biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Neotropical Entomology, 34 (1): 77-82
42. Pousti, I., 1994. Comparative histology and histotechnique. Tehran University, 3th edition, 520p.
43. Powel, K. A. 1995. The production of chemicals by biological control agents. Pesticide Science, 44: 395-397.
44. Prior, C.; D. J. Greathead, 1989. Biological control of locusts: the potential for the exploitation of pathogens. FAO Plant Protection Bulletin, 37: 37–48.
45. Puterka, G. J., R. A. Humber, & T. J. Poprawski, 1994. Virulence of fungal pathogens (Imperfect fungi: Hyphomycetes) to pear psylla (Homoptera: Psyllidae). Environmental Entomology, 23(2): 514-520.
46. Roberts, D. W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. Pp. 441-464. In: H. D. Burges (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Academic Press, London.
47. Roberts, D. W. & W. J. Yendol, 1971. Use of fungi for microbial control of insects. Pp. 125-149. In: H. D. Burges & N. W. Hussey (eds.), Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press, New York.
48. Rombach, M. C., 1989. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromicotina: Hyphomycetes) Sympoduloconidia in submerged culture. Entomophaga, 34:45-52.
49. Samsinalova, A., S. Kalalova, V. Vlcek & J. Kybal 1981. Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. Journal of Invertebrate Pathology, 38: 169-174.
50. Shelton, A. M., J. D., Vandenberg, M. Ramos, & W. T. Wilsey, 1998. Efficacy and persistence of *Beauveria bassiana* and other fungi for control of diamondback moth on cabbage seedlings. Journal of Entomological Science, 33: 142-151.
51. Siwach, P., S. Jaipal, 2004. Evaluation of industrial wastes for the mass production of *Beauveria bassiana* and their effects against *Chilo auricillus*. Annals of Plant Protection Sciences, 12(1): 193-195.
52. Soman, A. G., J. B., Gloer, R. F., Angawi, D. T. Wicklow, & P. F. Dawd, 2001. Vertilecanins: new phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. Journal of Natural Products, 64(2): 189-192.
53. Stephan D. & G. Zimmermann (1997) Mass production of *Metarhizium flavoviride* in submerged culture using waste products. p. 227-229, In: S. Krall, R. Peveling, D. Ba Diallo (eds.), New Strategies in Locust Control. Birkhäuser Verlag, Basel.
54. Thomas, K. C., G. C. Khachatourians, & W. M. Langledew, 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Canadian Journal of Microbiology, 33: 12-20.
55. Wraight, S. P., M. A. Jackson, & S. L. de Kock, 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. Pp. 233-287. In: T. M. Butt, C. Jackson & N. Magan (eds.), Fungi as Biocontrol Agents. CABI Publishing, Wallingford, UK.