دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ٤٦٦٨-٢٠٠٨
http://jer.iau-arak.ac.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد ۱۱ ، شماره۲، سال ۱۳۹۸، (۱۵۵-۱٤۳)

بررسی اثرات مکمل‌های پروتئینی و ویتامین‌ها بر شاخص‌های رشد قارچ‌های بیمارگر حشرات *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* در مرحله تکثیر بلاستوسپور

مسعود لطیفیان[1]*، *بهار راد*[1]

۱- به‌ترتیب دانشیار و مربی، پژوهشکده خرما و میوه های گرمسیری

چکیده

موفقیت هر ماده خام مورد استفاده در تولید صنعتی و انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات وابسته به این است که تا چه حدی می‌تواند اپتیمم غذایی مورد نیاز قارچ را تأمین کند. استراتژی کنترل زیستی با استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات مانند *B. bassiana* و *M. anisopliae* می‌تواند مفید باشد اگر روش‌های عملی و اقتصادی برای تولید انبوه آن‌ها در دسترس باشد. در این پژوهش تأثیر مکمل‌های پروتئینی و مولتی ویتامین در کارایی تولید کلامیدوسپور این دو قارچ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که تیمارهای مختلف مکمل پروتئین و مولتی ویتامین در محیط کشت مایع پایه برای افزایش کارایی چرخه تولید کلامیدوسپور قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* مؤثر هستند. میانگین صفات غلظت اسپور تولیدی، توانایی جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد دارند. بالاترین غلظت کلامیدوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط مکمل عصاره مخمر ومولتی ویتامین با غلظت ٦ میلی‌لیتر در لیتر بوده است.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های بیمارگر حشرات، کلامیدوسپور، مکمل، پروتئین، مولتی ویتامین

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *masoud_latifian@yahoo.com*

تاریخ دریافت مقاله:۹۷/۱۰/٤ - تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸/٤/۳

مقدمه

تلاش برای کاهش مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی، حفظ سلامتی انسان، حفاظت از محیط زیست و ذخایر ژنتیکی انگیزه‌ای بسیار قوی برای تولید حشره‌کش‌های میکروبی در برنامه مدیریت تلفیقی آفات بوده است (Roberts & Yendol, 1971). در این ارتباط کوشش قابل ملاحظه‌ای برای تولید و بهره‌برداری از قارچ‌های بیمارگر هیفومیست به عمل آمده است (Inglis *et al*., 2001). مقدار مواد غذایی مورد نیاز برای رشد قارچ‌های بیمارگر حشرات در انواع محیط‌های کشت با منشاء گیاهی متفاوت است (Bidochka *et al*., 1987). اطلاعات لازم درخصوص نوع مواد ضروری برای رشد دو نوع قارچ *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisoliae* که قابل استفاده در تکثیر انبوه باشند، کم است. موفقیت یک محیط کشت مصنوعی برای تولید تجاری وابسته به تأمین مواد غذایی ضروری مورد نیاز رشد قارچ بیمارگر می‌باشد (Clarkson & Charnley, 1996 ،Burges, 1998). به‌طور کلی قارچ‌های بیمارگر حشرات نیازمند منابع اکسیژن، آب، منبع انرژی کربن آلی، منابع آلی و غیر آلی تغذیه‌ای، مواد معدنی و فاکتورهای رشد می‌باشند. منبع کربن اغلب دکستروز بوده که می‌تواند با پلی ساکاریدهای طبیعی جایگزین شود. نیتروژن مورد نیاز نیز می‌تواند از طریق انواع نیتریت‌ها، آمینوها و یا ترکیبات آلی نظیر آمینواسیدها و پروتئین‌ها تأمین گردد. از دیگر مواد ضروری مورد نیاز برای رشد قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌توان به فسفر، پتاسیم، منیزیوم وگوگرد اشاره کرد. ریز مغذی‌های ضروری رشد آن‌ها اغلب شامل کلسیم، مس، روی، آهن، منگنز، مولیبدن، ویتأمین ب – کمپلکس قابل انحلال به خصوص بیوتین و تیامین می‌باشند. این مواد اغلب در محیط‌های کشت مصنوعی با منشاء گیاهی با نسبت‌های مختلف وجود دارد. موفقیت هر ماده خام مورد استفاده در تولید صنعتی و انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات وابسته به این است که تا چه حدی می‌تواند اپتیمم غذایی مورد نیاز قارچ را تأمین کند (Broome, 1974). انتخاب یک محیط کشت مناسب باید منجر به تولید بلاستوسپور بیشتر و میسیلیوم کم‌تر گردد. اطلاعات تولید تجاری بسیاری از جدایه‌های قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisoliae* بر روی محیط‌های تکثیر نظیر بقایای نیشکر (Clark *et al*., 1968) پودر شفیره کرم ابریشم (Askary, 2001)، آگار (Broome, 1974)، ساقه برنج (Bartlett and Jaronski, 1988) و مواد مشابه دیگر وجود دارد. تا به حال بیش از ١٤ کمپانی بین المللی نسبت به تولید تجاری قارچ‌های *B.bassiana* و *M. anisoliae* برای کنترل آفات مختلف از جمله موریانه‌ها، سوسری‌ها، سرخرطومی‌ها، مگس‌های سفید، شته‌ها و دیگر حشرات اقدام نموده‌اند (Akbar *et al*., 2005). در برخی موارد برای اصلاح محیط، جداسازی ذرات از یکدیگر و افزایش سطح اسپورزایی از مواد خنثی و اصلاح‌کننده استفاده شده است (Jenkins and Goettel, 1997 ،Jenkins *et al*., 1998). شناخت شرایط و عوامل محیطی مؤثر در رشد، اسپورزایی و کیفیت محصول اولین گام در تولید انبوه یک آفت‌کش میکروبی می‌باشد (Siwach & Jaipal, 2004). شناخت این عوامل، کنترل مناسب‌تر و اقتصادی‌تر آفات را فراهم می‌سازد (Jenkins *et al*., 1998). این پژوهش به‌منظور تعیین مناسب‌ترین و اقتصادی‌ترین منبع تأمین پروتئین و ویتامین‌های مورد نیاز قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisoliae* برای تکثیر در محیط تخمیر مایع انجام شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر

جدایه‌های قارچی که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفته مطابق جدول یک می‌باشند.

جدول ۱- مشخصات جدایه قارچ بیمارگر حشرات

the isolates of entomopathogenic fungus Table 1. Characteristics of

Name of fungi	Isolate code	Collection place
B. bassiana	IRAN 441C	Saravan
M. anisopliae	DEMI D01	Saravan

پس از خالص‌سازی به روش تک اسپور، هر کدام از دو جدایه قارچی مورد نظر در محیط غذایی کشت گردیدند. بعد از اسپورزایی کامل (کشت ۱۲-۱٤ روزه) سطح محیط کشت به‌وسیله سوزن انتقال خراش داده شد. اسپورها در داخل ارلن‌های جداگانه‌ای که حاوی ۱۰ سی‌سی آب مقطر استریل با محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ بود، جمع‌آوری گردیدند. سوسپانسیون فوق به‌منظور پراکنده شدن یکنواخت اسپورها در داخل آن به مدت ۵ دقیقه به‌طور پاندولی به هم زده شد. برای افزایش تولید اسپور از محیط کشت SDA+Y[5] استفاده شد. این محیط کشت با دارا بودن شرایط اسیدی (PH=۵/٦) از رشد باکتری‌های ساپروفیت جلوگیری می‌نماید. برای نگاهداری جدایه‌ها به مدت طولانی از محیط کشت PCA[6] استفاده گردید. محیط اخیر به علت ضعیف بودن از اسپورزایی شدید جلوگیری نموده و باعث می‌شود جدایه‌ها به‌مدت طولانی (در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد) قدرت حیاتی خود را حفظ نمایند.

تهیه محیط کشت پایه برای تکثیر قارچ‌های بیمارگر در فاز مایع

برای این منظور ٤۰ میلی‌لیتر از ملاس باقی‌مانده کارخانه استحصال شکر از نیشکر را در یک لیتر آب مخلوط نموده سپس محلول حاصل در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع[7] به مدت ٤۰ دقیقه ضدعفونی گردید. پس از سرد شدن کامل محلول ضدعفونی شده و سوسپانسیون کنیدیوسپور جدایه قارچی با غلظت 10^4 اسپور در میلی‌لیتر در شرایط استریل به محلول اضافه شد.

تعیین مناسب‌ترین منبع و غلظت برای تأمین پروتئین مورد نیاز برای تکثیر قارچ‌های بیمارگر

منابع تأمین پروتئین شامل سه ماده آب پنیر، عصاره مخمر و عصاره جوشانده لارو شب پره آرد بودند. جهت تعیین ترکیبات و میزان درصد پروتئین هر منبع از روش کلدال استفاده گردید. این روش یکی از روش‌های ساده و در عین حال دقیق اندازه گیری پروتئین است. پایه روش عبارت است از تعیین مقدار ازت خام در نمونه مورد آزمایش که با در نظر گرفتن ضریب پروتئین مقدار پروتئین موجود در ماده محاسبه می شود. غلظت‌های محیط پایه شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر در لیتر آب پنیر، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مخمر و ۱۰۰ گرم در لیتر از عصاره لارو شب‌پره آرد بودند. از هرکدام از این سه منبع پایه سه غلظت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌لیتر در لیتر استفاده شد. مقدار ترکیبات پروتئینی براساس نتایج روش کلدال در هریک از تیمارها مطابق جدول ۲ می‌باشد.

5 -Sabouraud *Dextrose Agar + Yeast exract*
6 - Potato Carrot Agar
7 -PSI

جدول ۲- مقادیر درصد پروتئین در تیمارهای مختلف آب پنیر، عصاره مخمر و عصاره بدن لارو شب‌پره آرد

Table 2: Protein percentage values in different treatments of whey, yeast extract and extracts of larvae.

Protein source	Concentration (ml / liter)	Protein percentage
Whey	10	**2.8**
	20	**5.6**
	30	**8.4**
Yeast extract	10	**4.7**
	20	**9.4**
	30	**14.1**
Extract of larvae	10	**5.2**
	20	**10.4**
	30	**15.6**

سپس محلول حاصل در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع به مدت ٤٠ دقیقه ضدعفونی گردید. پس از سرد شدن کامل محلول ضدعفونی شده و سوسپانسیون کنیدیوسپور جدایه قارچی در شرایط استریل به محلول اضافه شد. سوسپاسیون حاصل به‌مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور شیکردار با دور چرخشی ۱۵۰ دور در دقیقه و در دمای ٥ ± ۲٥ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آزمایشات مربوط به هر تیمار در ٤ تکرار انجام گرفت.

۲-تعیین مناسب‌ترین غلظت مولتی ویتامین مورد نیاز برای تکثیر قارچ‌های بیمارگر

پس از تعیین مناسب‌ترین نوع و غلظت منبع ازت مورد نیاز برای تکثیر قارچ، محیط کشت مایع پایه مطابق روش قبل آماده شده و پس از ضدعفونی منبع مولتی ویتامین با غلظت‌های ۲، ٤ و ٦ در هزار به محیط مایع پایه اضافه شده و سپس مراحل ضدعفونی، تلقیح و تولید کلامیدسپور مطابق روش قبل پی‌گیری گردید. ترکیب ویتامین‌های موجود در هر تیمار مطابق جدول ۳ می‌باشد.

جدول ۳- مقادیر ویتامین‌ها در تیمارهای مختلف مکمل محیط کشت مایع پایه

Table 3. The amounts of vitamins in different treatments supplement the base medium

Treatment	Types of vitamins	The amount of vitamin in the treatment
per thousand 2	A	**300 IU**
	D3	**200 IU**
	B1	**1 mg**
	B2	**0.5 mg**
	B3	**5 mg**
	B6	**0.6 mg**
	B12	**1 mcg**
per thousand 4	A	**600 IU**
	D3	**400 IU**
	B1	**2 mg**
	B2	**1 mg**
	B3	**10 mg**
	B6	**1.2 mg**
	B12	**2 mcg**
6per thousand	A	**900 IU**
	D3	**600 IU**
	B1	**3 mg**
	B2	**.5 mg۱**
	B3	**15 mg**
	B6	**1.8 mg**
	B12	**3 mcg**

صفات مورد ارزیابی

الف- تخمین تولید کلامیدوسپور

پس طی دوره انکوباسیون محیط کشت مایع درون انکوباتور شیکر دار از هر ارلن مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر برداشت شده و غلظت محصول کلامیدوسپور تولیدی با استفاده از لام نئوبار تعیین گردید (Ghazavii, 2002).

ب- قدرت جوانه‌زنی

برای بررسی قدرت جوانه‌زنی کلامیدسپور جدایه قارچی تکثیر شده در محیط کشت جامد مایع ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون روی محیط کشت PDA داخل ظرف پتری پخش شد. سوسپانسیون فوق به‌صورت یک لایه نازک روی PDA[8] پوشش داده شد. درب ظرف پتری با پارافیلم بسته و در دمای ۲۵±۵ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور در شرایط کاملا تاریک قرار داده شد. ۲٤ ساعت پس از تلقیح یک میلی‌لیتر فرمالدئید ۰/۵ درصد به‌منظور توقف جوانه‌زنی اسپورها به داخل هر ظرف پتری ریخته شد. درصد جوانه‌زنی با شمارش ۱۰۰ اسپور از هر پتری با بزرگ‌نمایی ٤۰ محاسبه شد. هر تیمار با ٤ تکرار انجام گردید(Ghazavii, 2002).

ج-تعیین وزن قارچ تولیدی

برای این منظور سوسپاسیون تولیدی را از روی پارچه ململ صاف نموده در این شرایط وزن تر کل قارچ تولیدی معادل وزن قارچ در تیمار پس از انکوباسیون بود. محصول تولیدی تکرارهای هر تیمار به‌طور جداگانه به درون آون در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت منتقل شد. سپس وزن خشک محصول تولیدی محاسبه شد.

تحلیل آماری

داده‌های مربوط به صفات تولید قارچ‌ها در فاز مایع براساس طرح کاملا تصادفی تجزیه واریانس گردید. سپس میانگین صفات در تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون SNK[9] مقایسه شدند. در تحلیل نهایی از دو پارامتر کارایی تولید و کارایی اقتصادی به شرح ذیل استفاده شد.

LOG(کارایی تولید =وزن پودرخشک ×تراکم اسپور در واحد وزن محصول ×قدرت جوانه‌زنی)

LOG(کارایی اقتصادی =وزن پودرخشک ×تراکم اسپور در واحد وزن محصول ×قدرت جوانه‌زنی)/قیمت نهاده)

نتایج

نتایج تجزیه واریانس بررسی اثرات منابع پروتئین و مولتی ویتامین بر میانگین‌های صفات غلظت کلامیدسپور، توانایی جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در جدول ٤ درج شده است. همان‌طور که در جدول ٤ ملاحظه می‌شود در تیمارهای مختلف درمحیط کشت مایع تکمیلی برای چرخه تولید کلامیدسپور قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* از نظر میانگین غلظت اسپور تولیدی، توانایی جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک متفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد دارند.

[8] - Potato Dextrose Agar
[9] - Student–Newman–Keuls method

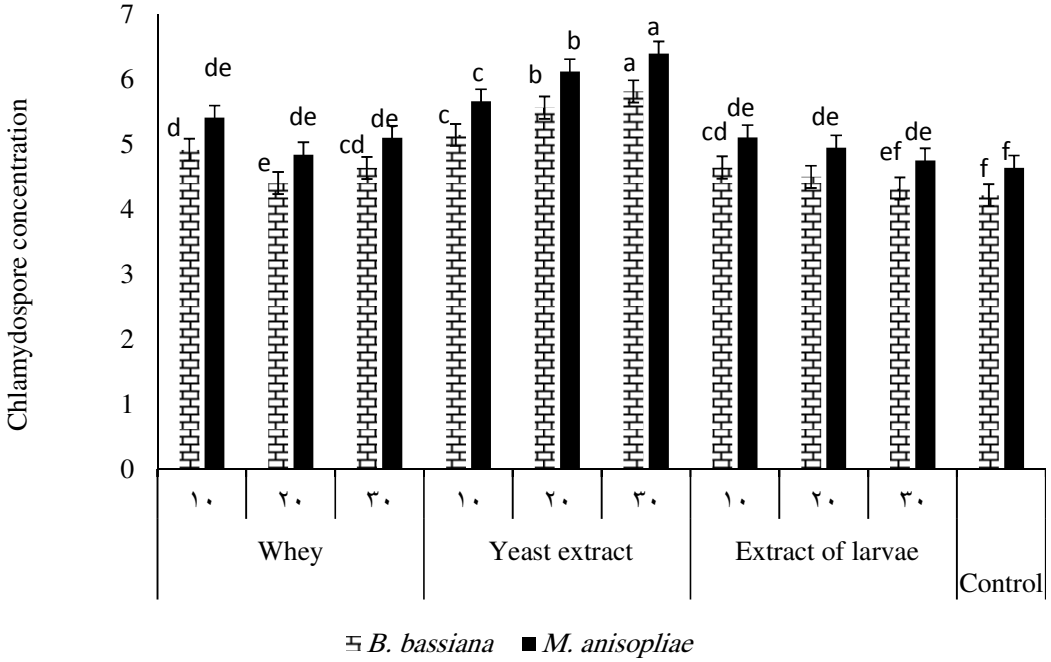
جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس تفاوت میانگین صفات تولید کلامیدوسپور قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در اثر تیمارهای مختلف

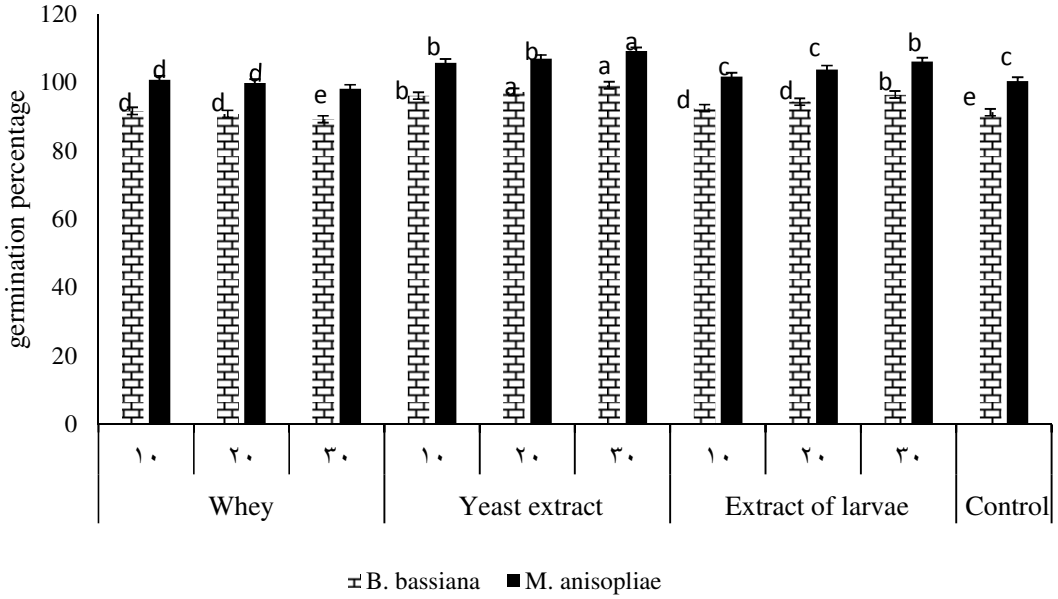
Table 4. Results of analysis of variance of differences between the traits of Chlamydospore *of B. bassiana* and *M. anisopliae* in different treatments

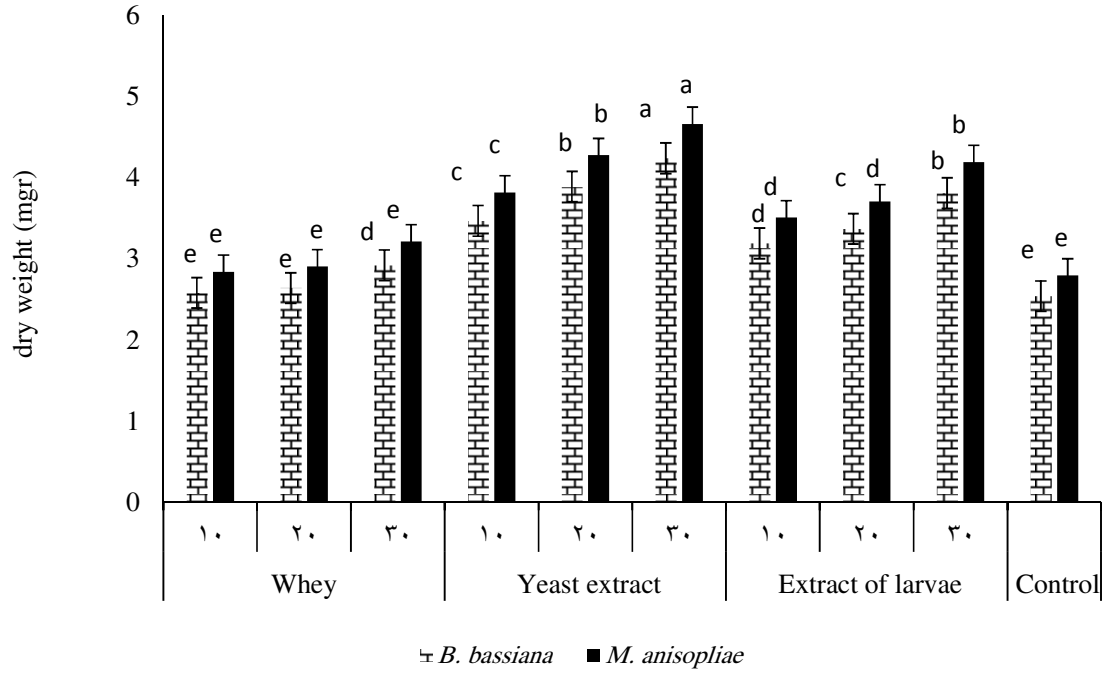
Treatments	Characteristics	*M. anisopliae*		*B. bassiana*	
		Ms	Cv	Ms	Cv
Protein Supplements	Chlamydospore concentration	**1.436	0.59	1.169**	**3.54**
	germination percentage	18.013**	0.59	42.568**	**1.09**
	wet weight	0.677**	0.08	3.274**	**2.72**
	dry weight	1.522**	2.22	1.595**	**5.595**
Vitamins Supplements	Chlamydospore concentration	1.082**	3.06	0.746**	**3.89**
	germination percentage	1.044**	0.35	0.012**	**0.62**
	wet weight	0.062**	0.87	0.625**	**3.66**
	dry weight	0.822**	2.27	1.503**	**5.29**

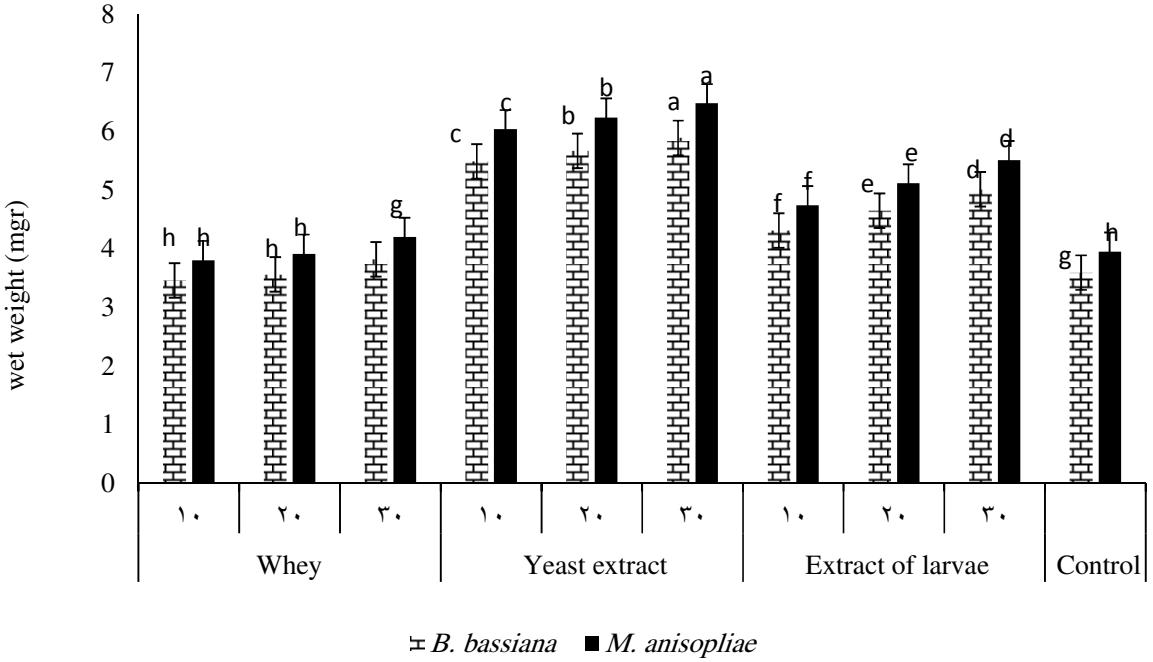
مناسب‌ترین مکمل پروتئینی برای تکثیر قارچ‌های بیمارگر در فاز مایع

به‌منظور مقایسه میانگین غلظت کلامیدوسپور تولیدی، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در تیمارهای مختلف مکمل پروتئینی از روش مقایسه میانگین‌های به روش SNK استفاده شده که نتایج آن در شکل ۱ درج شده است.




germination percentage
120
100
80
60
40
20
0
۱۰
۲۰
۳۰
Whey
Yeast extract
Extract of larvae
Control
B. bassiana
M. anisopliae


dry weight (mgr)
6
5
4
3
2
1
0
۱۰
۲۰
۳۰
Whey
Yeast extract
Extract of larvae
Control
B. bassiana
M. anisopliae



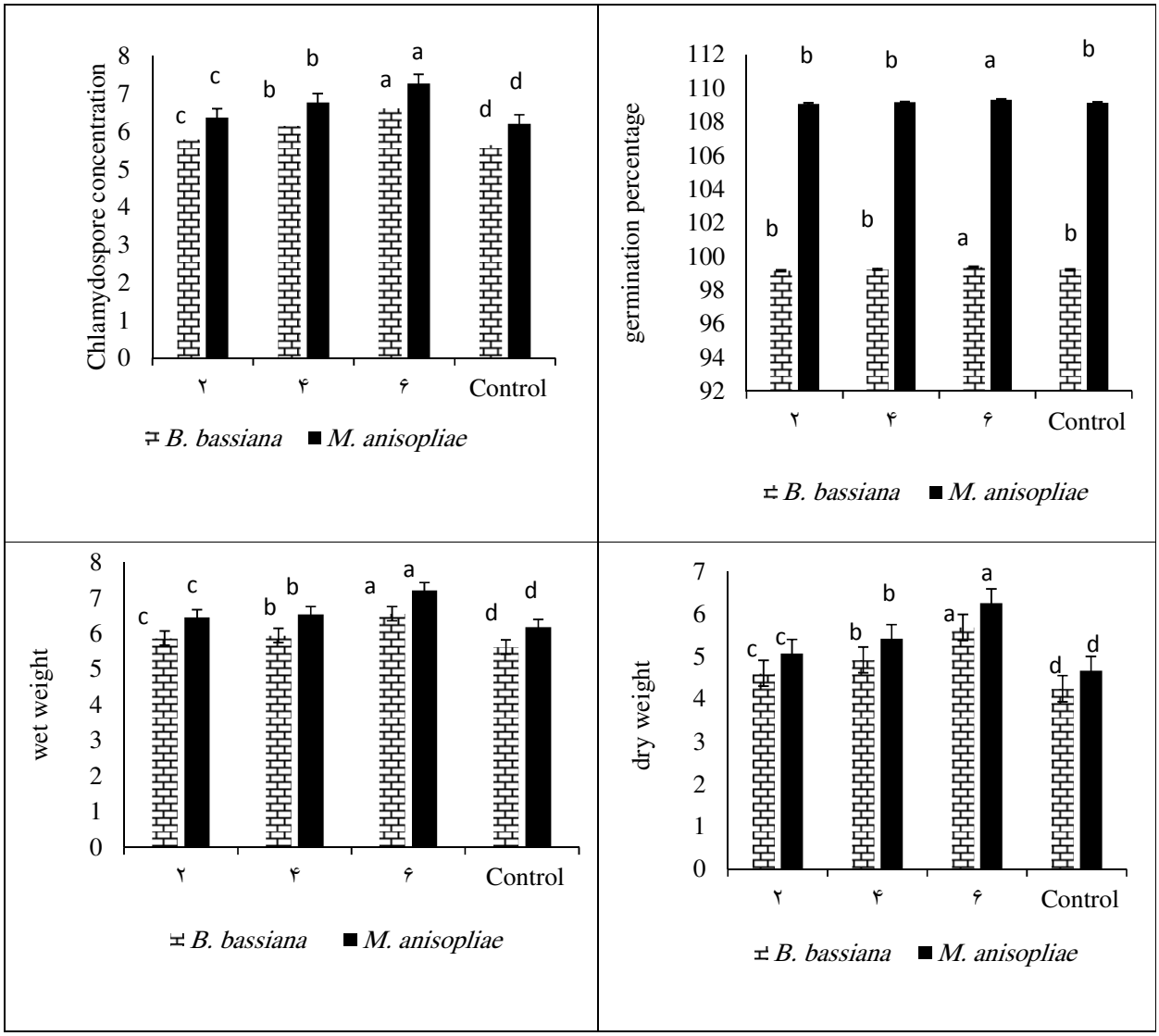
شکل ۱- مقایسه میانگین غلظت کلامیدوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در اثر تیمارهای مختلف مکمل پروتئینی

Fig. 1- Comparison of mean chlamydospore concentration, germination percentage, wet weight and dry weight of *B. bassiana* and *M. anisopliae* in different protein supplementation treatments

همان‌طور که در شکل ۱ ملاحظه می‌گردد، بالاترین میانگین غلظت کلامیدوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن‌تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط مکمل پروتئینی عصاره مخمر بوده است.

مناسب‌ترین مکمل مولتی ویتامین برای تکثیر قارچ‌های بیمارگر در فاز مایع

به‌منظور مقایسه میانگین غلظت کلامیدوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در تیمارهای مورد بررسی از روش مقایسه میانگین‌های به روش SNK استفاده شده که درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* نتایج آن در شکل 2 درج شده است.



شکل 2- مقایسه میانگین غلظت کلامیدوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* تولید در تیمارهای مختلف مکمل مولتی ویتامین

Fig. 2. Comparison of mean chlamydospore concentration, germination percentage, wet weight and dry weight of *B. bassiana* and *M. anisopliae* in different multivitamin supplementation treatments.

همان‌طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد، بالاترین غلظت کلامیدوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در مکمل مولتی ویتامین با غلظت ٦ میلی‌لیتر در لیتر بوده است.

بحث

کارایی تولید پارامتر تعیین کننده کمیت و کیفیت محصول تولیدی به ازای واحد وزن ماده خام مصرفی است. بالاترین کارایی در شرایط فاز مایع اصلاح شده بوده است. به‌طوری‌که کارایی تولید را برای قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* ۱٤/۹و ۸/۳ درصد نسبت به شاهد افزایش داده است.

کارایی اقتصادی تولید نیز شاخصی است تعیین کننده که ضمن در نظر گرفتن کمیت و کیفیت محصول تولیدی به ازای واحد وزن ماده اولیه، ارزش اقتصادی به‌کارگیری شرایط تولیدی در فاز مایع را براساس نتایج این پژوهش در برنامه تولید انبوه عامل کنترل میکروبی بیان می‌کند. بالاترین کارایی اقتصادی برای تولید قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* ضمن داشتن حداکثر کمیت و کیفیت محصول از نظر اقتصادی نیز بیشترین سود را خواهد داشت. در مجموع بکارگیری این شرایط کارایی اقتصادی را به‌ترتیب برای قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* ۱٤/۵ و ٦/۹ درصد نسبت به شاهد افزایش داده است.

نتایج این پژوهش نشان داد که در میان گونه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *M. anisopliae* تفاوت‌های کم آماری در میزان اسپور تولیدی در شرایط انجام آزمایش‌ها وجود دارد. با این حال، اسپوردهی قارچ *M. anisopliae* بیشتر از *B. bassiana* در هر گرم محیط کشت بود. همچنین نتایج نشان داد که اسپوردهی این قارچ‌ها تحت تأثیر مکمل‌های مختلف پروتئینی و مولتی ویتامین متفاوت بود.

استفاده از محیط مایع مناسب برای تولید حداکثر بلاستوسپور موضوع تحقیقات برخی پژوهشگران بوده است. برای تولید بلاستوسپور *Metarhizium flavoviridae* از منابع مختلف حاوی مقادیر مختلف نیتروژن و قند استفاده شده است. بیشترین تولید از مخلوط ملاس چغندرقند با سایر مواد حاوی هیدروکربونی و ازت به‌دست آمده است (Stephan *et al.* 1997). نتایج این تحقیق با تحقیقات اخیر هماهنگی داشته و تولید بیشتر بلاستوسپور روی ملاس نیشکرکه حاوی هیدروکربونی بیشتری بوده، انجام شد. انتظار می‌رود که کشت مداوم این قارچ‌ها روی محیط‌های مصنوعی و نیمه مصنوعی سبب کاهش قدرت بیمارگری آن‌ها شود. برای جلوگیری از این مشکل لازم است با انتقال قارچ روی حشرات میزبان توان تهاجمی آن‌ها را حفظ کرد (Aizawa, 1971، Daoust & Roberts, 1982 ، Goettel, 1992، Shelton *et al.*, 1998) تأثیر نوع محیط کشت تنها به میزان رشد رویشی و اسپورزایی قارچ مربوط نمی‌شود. تحقیقات نشان داده است که بستر غذایی نه تنها بر اسپورزایی بلکه بر میزان بیمارگری قارچ نیز تأثیر گذار است. به‌عنوان مثال قارچ *B. bassiana* روی محیط کشت سبوس ذرت و سبوس گندم بیشترین اسپورزایی را داشته و حدود ۷۰ درصد مرگ و میر ایجاد کرده است. در حالی‌که اسپورهای تولید شده روی پوسته برنج، ۸۱/۵ درصد مرگ و میر روی *Chilo auricillus* ایجاد نموده است (Pousti, 1994). در تحقیق حاضر نیز تفاوت در قدرت جوانه‌زنی قارچ در محیط‌های کشت اصلاح شده وجود داشته و اثرات آن در محاسبه کیفیت محصول تولیدی در نظر گرفته شده است. تازه‌ترین پیشرفت‌ها در تولید آزمایشگاهی Entomophthoralean استفاده از کشت سلول حشره همراه با مکمل سرم جنین گاو است که در واقع شبیه‌سازی همولنف حشره است. برخی گونه‌ها نیز می‌توانند در ترکیبی شامل کلستروز با زرده تخم مرغ و شیر یا تخم مرغ رشد کنند. روش تولید با واسطه گلوکز، عصاره مخمر، آب، نمک، لاکتال بومین[10] و ۱۰ درصد سرم جنین گاو نیز استفاده شده است. بستر رشدکم هزینه‌ای برای تولید قارچ *E. aulive* تهیه شده که متشکل از یک سری از نمک‌ها، آمینو اسیدها، ساکاروز، گلوکز، هشت درصد مایع بلغور، چهار درصد آب پنیر کم چرب و کلسیم بود (Freimoser *et al.*, 2003).

مناسب‌ترین محیط کشت برای تولید انبوه قارچ بیمارگر *Entomphthora virulent* از شربت ذرت و دکستروز به‌عنوان منابع کربن و عصاره مخمر، آرد سبوس لوبیا یا آرد دانه کتان به‌عنوان منبع نیتروژن تشکیل شده است. در این محیط کشت تولید هاگ‌های جنسی رشد ۷۰ درصدی داشت (Latge *et al.*, 2004).

[10] -Lactal bumin

تولید بلاستوسپور *B. bassiana* به نیتروژن غیر آلی و سطوح بسیار بالای کربوهیدرات نیاز دارد. تولید بلاستوسپور *B. bassiana* محیط مایعه‌ای شامل KNO_3 یک درصد و ۵ درصد گلوکز انجام شده است. تغییر در نسبت کربن و نیتروژن و نوع منبع کربن بر نوع و میزان فرآورده‌های حاصل از تخمیر مایع تأثیر دارد. برای مثال استفاده از ۵ درصد ساکاروز به‌عنوان منبع کربن در تولید *B. bassiana* مقدار بلاستوسپور را به سطح $4/6_{\times}\ 10^{8}$ اسپور در میلی‌لیتر و نسبت بلاستوسپور به سایر فرآورده‌های تخمیر را به سطح ۹:۱ می‌رساند. از طرفی استفاده از شیره ۵ درصد نیشکر میزان تولید را به 2×10^{9} اسپور در میلی‌متر می‌رساند. کاربرد نیتروژن ارگانیک نظیرمخمر آبجو و سطوح بالای ساکاروز برای تولید کنیدی در شرایط تخمیر مایع مناسب است. محیط‌های مایع مختلفی از لحاظ پارامترهای تخمیر بررسی شده و عصاره مخمر و ساکاروز به نسبت بهینه کربن به ازت برابر ۱:٦ را برای بلاستوسپورها معرفی شده است (Chong-Rodríguez *et al.*, 2011).

Reference

Aizawa, K. 1971. Strain improvement and preservation of virulence of pathogens. Pp. 655-699. In: H. D. Burges and N. W. Hussey (eds.), Microbial Control of Insects and mites. **Academic Press, New York.**

Akbar, W., Lord, J. C., Nechols, R. J. and Loughin,,T. M. 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.

Askary, H. 2001. Possibility of using super absorbent polymers in fungi mass production. **Proceeding of 3th chemical congress**. Azad Univ. Tehran.

Bartlett, M. C., , and Jaronski, S. T. 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.

Bidochka, M. J., Pfeifer, T. A. and Khachatourians, G. G. 1987. Development of the entomopathogeneic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. **Mycopathologia**, 99: 77-83.

Broome, J. R. 1974. Microbial control of the imported fire ant, *Solenopsis richteri* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae). M. Sc. thesis, **Mississippi State University, Starkville.**

Burges, H. D. 1998. Formulation of mycoinsecticides. Pp. 131-185. In: H. D. Burges (ed.), Formulation of Microbial Biopesticides. **Kluwer Academic Publishes, Dordrecht**.

Clark, T. B., Kellen, W., Fukuda, T. and Lindegren, J. E. 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.

Chong-Rodríguez, M. J., Maldonado-Blanco, M. G., Hernández-Escareño, J. J., Galán-Wong, L. J. and Sandoval-Coronado, C. F. 2011. Study of Beauveria bassiana growth, blastospore yield, desiccation tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. **African ournal of Biotechnology.** 10 (30), 5736–5742.

Clarkson, J. M. and Charnley, A. K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, 4: 199-203.

Daoust, R. A. and Roberts, D. W. 1982. Virulence of natural and insect- passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, 40: 107-117.

Freimoser, F.vM., Grundschober, A., Tuor, U. and Aebi, M. 2003. Regulation of hyphal growth and sporulation of the insect pathogenic fungus *Entomophthora thripidum* in vitro. FEMS **Microbiology Letter**. 222 (2), 281–287.

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.

Goettel, M. S. 1992. Fungal agents for biocontrol, In: C. J. Lomer and 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**.

Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M.and Strasser, **H. 2001**. Use of hyphomycetous fungi for managing biocontrol agents. Pp. 23-69. In: T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds.), Fungi as Biocontrol Agents. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Jaronski, S. T., Axtell, R. C., Fagan, S. M. and Domnas, A. J. 1983. In vitro production of zoospores by Lagenidium giganteum (Oomycetes: Lagenidiales) from solid media. **Journal of Invertebrate Pathology.** 41, 305–309.

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

Jenkins, N. E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry A. J. and Lomer, C. J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for us e as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, 19(1): 21N-31N.

Latge, J. P., Hall, R. A., Cabrera, R. I. and kerwin, J. C. 1986. Liquid fermentation of entomogenous fungi. Pp. 603- 606. In Samson. R. A. , J . M. Vlak. And D. peters. (eds.). Fimdamentals and Applied Aspects of Inrertebrate pathology. **Foundation the International Colloquium on Invertebrate Pathology**. Wageningen. The Netherlands.

Latge, J. P., Soper, R. S. and Madore, C. D. 2004. Media suitable for industrial production of Entomophthora virulenta zygospores. Biotechnology Bioengineering. 19 (9), 1269–1284.

Li, Z., Lin, J., Ma, J., Wu, D. and Zhang, Y. 2008. Influence of different drying temperatures for solid substrate after fermentation on conidia characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Wei Sheng Wu Xue Bao** 48 (7), 887–892.

Pousti, I., 1994. Comparative histology and histotechnique. **Tehran University, 3th edition**, 520p.

Roberts, D. W. and Yendol, **W. J. 1971**. Use of fungi for microbial control of insects. Pp.125-149. In: H. D. Burges and N. W. Hussey (eds.), Microbial Control of Insects and Mites. **Academic Press, New York.**

Shelton, A. M., Vandenberg, J. D., Ramos, M. and Wilsey, **W. T. 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.

Siwach, P., and Jaipal, **S. 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.

Stephan, D. and Zimmermann, **G. 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.

Journal of Entomological Research
Volume 11, Issue 2, pages: 143-155

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
http://jer.iau-arak.ac.ir

Effect of Protein and Vitamins Supplements on Growth Indices of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* at blastospore proliferation stage

M. latifiyan[1*], B. rad[1]

1- Respectively Associate Professor and Lecturer Date palm and tropical fruits research center

Abstract.

The success of any raw material used in the industrial and mass production of entomopathogenic fungi depends on the extent to which it can provide the optimum food requirement for the fungus. The biological control strategy using entomopathogenic fungi like *B. bassiana* and *M. anisopliae* can only be useful if practical and economic methods of mass multiplication are available. In this study, the effects of Protein and Vitamins Supplements on chlamydospores production of these two fungi were investigated. The results of this study showed that different treatments of Protein and Vitamins Supplements in complete liquid culture for chlamydespore cycle of *B. bassiana* and *M. anisopliae* fungi in terms of production spores, germination percentage, wet weight and dry weight difference Significant at 1% probability level. The highest concentration of chlamydosporum, germination percentage, wet weight and dry weight of *B. bassiana* and *M. anisopliae* were whey protein supplement and multivitamin at a concentration of 6 ml / liter. Also, the results of this study showed that these two species of pathogenic fungus can be replicated with good performance of sugarcane by products and maintain the germination capacity of chlamydospores.

Key words: entomopathogenic fungi, Protein, Vitamins, Supplements, production.

* Corresponding Author, E-mail*: masoud_latifian@yahoo.com*
Received:25 Dec. 2018– Accepted: 24 Jun. 2019