تحقیقات آفات گیاهی
۱۴۰۳ -۱۴(۱): ۸۷ -۹۸
Open access
doi: 10.22124/iprj.2024.27403.1574
pISSN:2322-2409
eISSN: 2538-6123

علمی پژوهشی

امکان‌سنجی تولید بلاستوسپورهای قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* روی محیط‌های کشت مایع و ارزیابی میزان زهرآگینی آن نسبت به کنه تارتن دولکه‌ای *Tetranychus urticae* در شرایط آزمایشگاهی

الهه حمزه‌ای[۱]، امین صدارتیان جهرمی[۲] و کتایون خردمند*[۳]

۱ و ۳- گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران، ۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

1. 0000-0002-1849-9554, 2. 0000-0002-2588-2359, 3. 0000-0003-2612-6632

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۲۰)

چکیده

در پژوهش حاضر، تأثیر استفاده از مکمل‌های غذایی مختلف بر میزان تولید بلاستوسپور قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (جدایه IRAN 1395C) مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله نخست، تأثیر عصاره فرآورده‌های کشاورزی مختلف مانند سبوس برنج، سبوس گندم، سبوس جو، سبوس ذرت و ضایعات سیب‌زمینی بر میزان تولید بلاستوسپور مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های به‌دست آمده نشان داد که محیط حاوی عصاره سبوس برنج بهترین شرایط را برای اسپورزایی فراهم نمود. سپس، مکمل‌های پروتئینی مختلف مانند پودر آب پنیر، سویا و پودر سفیده تخم مرغ با غلظت ۴ درصد به محیط کشت تهیه‌شده از عصاره سبوس برنج اضافه شده و تأثیر آن‌ها بر میزان تولید بلاستوسپور ارزیابی شد. استفاده از این مکمل‌ها تأثیر مثبتی در افزایش میزان تولید بلاستوسپور نداشتند. در مرحله پایانی، تأثیر افزودن نمک‌های کلرید مختلف (KCl، $MgCl_2$ و $CaCl_2$) به محیط کشت منتخب بر افزایش میزان تولید بلاستوسپور مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که استفاده از کلرید کلسیم ($CaCl_2$) در مقایسه با سایر نمک‌های مورد مطالعه اثربخشی بیشتری در افزایش میزان تولید بلاستوسپور داشته است. سرانجام، زهرآگینی بلاستوسپورهای به‌دست‌آمده در محیط مایع و کنیدیوم‌های برداشت‌شده از محیط کشت جامد نسبت به کنه تارتن دولکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون زیست‌سنجی نشان داد که قدرت زهرآگینی بلاستوسپورهای به‌دست‌آمده در محیط مایع (LC_{50} = 3.29 × 10^6 Blastospore/ml) اختلاف معنی‌داری با کنیدیوم‌های تولید شده در محیط جامد (LC_{50} = 3.23 × 10^6 Conidium/ml) ندارد. یافته‌های حاضر حاکی از آن است که محیط‌های کشت مایع می‌توانند در توسعه برنامه‌های تولید انبوه قارچ بیمارگر *B. bassiana* مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: بلاستوسپور، زهرآگینی، قارچ‌های بیمارگر، کنترل بیولوژیک، محیط کشت طبیعی

نویسنده مسئول: kkheradmand@ut.ac.ir

CC BY

مقدمه

استفاده از سموم شیمیایی به اصلی‌ترین روش مورد استفاده در برنامه‌های مدیریتی آفات گیاه‌خوار تبدیل شده است. متأسفانه اتکای بیش از اندازه به این روش، علاوه بر ایجاد اثرات جانبی نامطلوب، افزایش مخاطرات زیست-محیطی و تهدید روزافزون سلامتی انسان را به دنبال داشته است (Wang *et al*., 2016). بر همین اساس، استفاده از جایگزین‌های مناسب مانند برنامه‌های کنترل بیولوژیک مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. مجموعه گوناگونی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مانند قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. به‌عنوان عوامل کنترل میکروبی بندپایان شناخته شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند (Goettel *et al*., 1995; Inglis *et al*., 2001; Singh *et al*., 2017). قارچ‌های بیمارگر به واسطه دارا بودن آنزیم کیتیناز و توانایی نفوذ مستقیم به کوتیکول میزبان از سایر بیمارگرها متمایز می‌باشند. علاوه بر این، استفاده از آنزیم‌هایی مانند لیپاز نیز باعث تجزیه درونی بافت‌های بدن میزبان شده و موجب مرگ و میر آن‌ها می‌شود (Frazzon *et al*., 2000; Kamp & Bidochka, 2002; Sujatha *et al*., 2016; Sanchez-Rodriguez *et al*., 2018).

در استفاده گسترده از قارچ‌های بیمارگر حشرات در برنامه‌های کنترل بیولوژیک، تولید انبوه اسپورهای بیماری‌زا گامی بسیار اساسی محسوب شده و بررسی‌های انجام‌شده در این زمینه از لحاظ اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشند (Ottati-de-Lima, 2014). این گروه از عوامل بیماری‌زا با دارا بودن ویژگی‌های مطلوب مانند شدت بیمارگری مناسب، دامنه میزبانی وسیع، توانایی ایجاد همه‌گیری در جمعیت آفات میزبان، توانایی رشد روی محیط‌های غذایی مختلف و در عین حال بی‌خطر بودن برای انسان و جانوران غیرهدف، جایگاه ارزنده‌ای در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات دارند (Charnley *et al*., 2003).

استفاده تجاری از قارچ‌های بیمارگر در برنامه‌های مدیریتی آفات گیاه‌خوار مستلزم تولید انبوه آن‌ها با مواد مقرون به‌صرفه می‌باشد. در تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات، محیط کشت مورد استفاده به میزان قابل توجهی بر تعداد کنیدیوم‌های تولید شده، میزان پایداری و زهرآگینی آن‌ها اثرگذار می‌باشد (Rangel *et al*., 2023). با وجود توجه جامعه جهانی به قارچ‌های بیمارگر حشرات، کاربرد تجاری آن‌ها روند آهسته‌ای داشته و استفاده گسترده از این گروه از عوامل بیولوژیک در برنامه‌های مدیریتی آفات وابسته به هزینه‌های اقتصادی قابل‌توجیه و تولید حجم بالای اسپورهای بیماری‌زا می‌باشد (Zimmermann, 2007).

یکی از مزیت‌های مهم قارچ‌های بیمارگر حشرات، توانایی تولید اسپورهای بیماری‌زا در محیط‌های مصنوعی است (Santa *et al*., 2005). پرورش انبوه این عوامل بیولوژیک با سه روش تخمیری مایع، جامد (کشت سطحی) و دو مرحله‌ای مایع-جامد امکان‌پذیر می‌باشد که حاصل آن تولید کنیدیوم‌های هوایی در محیط جامد و بلاستوسپور در محیط مایع است (Seema *et al*., 2013; Prasad & Pal, 2014). بلاستوسپورها در مقایسه با کنیدیوم، در مدت زمان کوتاه‌تری تولید شده و قدرت بیماری‌زایی بالاتری دارند. لاسی و همکاران (Lacey *et al*., 1999) نشان دادند که بلاستوسپورهای قارچ *Isaria fumosoroseus*، زهرآگینی بیش‌تری روی *Bemisia argentifolii* در مقایسه با کنیدیوم‌های آن دارند. رشید و همکارن (Rashid *et al*., 2019) تأثیر استفاده از محیط‌های غذایی مایع بر میزان تولید بلاستوسپور قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *M. anisoplia* را مورد بررسی قرار دادند. بررسی‌های صورت‌گرفته نشان می‌دهند که پرورش قارچ‌های بیمارگر حشرات با استفاده از مواد طبیعی، تأثیر قابل توجهی در کاهش هزینه‌های تولید انبوه آن‌ها دارد (Rangel *et al*., 2023).

کنه تارتن دولکه‌ای *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)، از جمله مهم‌ترین آفات گیاهخوار می‌باشد که دارا بودن دامنه میزبانی وسیع، پتانسیل تغذیه‌ای بالا، طول نسل کوتاه، قدرت تولیدمثل قابل توجه و توانایی ایجاد مقاومت نسبت به سموم شیمیایی، همواره کنترل آن را بسیار دشوار نموده است (Luczynski *et al*.,

1990; Sedaratian *et al*., 2009). از آن‌جا که این آفت در شرایط گلخانه نیز خسارت بسیار قابل توجهی به گیاهان وارد می‌کند، استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌تواند در کاهش جمعیت و میزان خسارت آن مؤثر باشد. بر همین اساس، در پژوهش حاضر قدرت بیماری‌زایی بلاستوسپورهای جدایه IRAN 1395C قارچ بیمارگر *B. bassiana* که در محیط تخمیری مایع تولید شده بودند، روی کنه‌های بالغ مورد ارزیابی قرار گرفته و با کنیدیوم‌های به‌دست‌آمده از محیط کشت جامد مقایسه شد. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش کمک شایانی به تسهیل تجاری‌سازی استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات در برنامه‌های مدیریتی تلفیقی آفات به‌ویژه در شرایط گلخانه خواهد نمود.

مواد و روش‌ها

پرورش قارچ بیمارگر *B. bassiana* و تهیه مایه تلقیح

در پژوهش حاضر، جدایه IRAN 1395C از قارچ بیمارگر *B. bassiana* از مجموعه قارچ‌های مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. این جدایه به دلیل قدرت بیمارگری بالا برای انجام آزمایش‌ها انتخاب شد. جدایه مذکور روی محیط کشت جامد PDA[1]، درون ظرف‌های پتری پلاستیکی (قطر ۹۰ میلی‌متر) و در شرایط کاملاً سترون کشت شد. سپس، اطراف درب ظروف پتری توسط نوار پارافیلم کاملاً محصور شده و به‌منظور اسپورزایی، به مدت ۱۴ روز درون انکوباتور (دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد) نگهداری شدند. پس از اسپورزایی، قارچ از سطح محیط کشت به‌وسیله یک اسکالپل سترون برداشت شده و درون لوله‌های فالکون حاوی آب مقطر و توئین ۸۰ (۰/۰۲ درصد) منتقل شد. لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه روی ورتکس قرار گرفتند تا سوسپانسیونی کاملاً یکنواخت به‌دست آید. سوسپانسیون به‌دست‌آمده به‌منظور جداسازی قطعات میسلیوم از قیف بوخنر توسط کاغذ صافی واتمن (شماره یک) عبور داده شد. در شمارش تعداد کنیدیوم‌ها در سوسپانسیون به‌دست‌آمده از لام گلبول‌شمار (Haemocytometer, Improved neubauer) و میکروسکوپ ZIESS با بزرگنمایی ۱۰۰ استفاده شد. تعداد کنیدیوم‌ها در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون به غلظت پایه (10^7 کنیدیوم در هر میلی‌لیتر) رسید.

تهیه محیط‌های کشت طبیعی مایع به‌منظور تولید بلاستوسپور

تهیه محیط کشت مایع بر اساس آن‌چه رشید و همکاران (Rashid *et al*., 2019) بیان کرده‌اند، در سه مرحله انجام شد. در مرحله اول، به‌منظور تهیه محیط‌های کشت مایع از محصولات جانبی کشاورزی و صنایع غذایی استفاده شد. بدین‌منظور، در تیمارهای مختلف از ۵۰ گرم سبوس گندم، سبوس برنج، سبوس جو، سبوس ذرت و ضایعات سیب‌زمینی استفاده شد. مواد نام‌برده پس از ۲۴ ساعت خیساندن در یک لیتر آب مقطر سترون، از پارچه ململ دو لایه سترون عبور داده شده و عصاره حاصل از آن‌ها در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. درون هر ظرف ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، ۱۰۰ میلی‌لیتر از عصاره‌های تهیه‌شده فوق ریخته شده و سپس با استفاده از اسیدکلریدریک (HCl) و هیدروکسید پتاسیم (KOH)، اسیدیته (pH) تمام محیط‌ها در حدود ۵/۶ که اسیدیته مناسب برای رشد قارچ‌ها می‌باشد، تنظیم شد. ظروف ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار یک اتمسفر سترون شدند. پس از اتمام سترون‌سازی و سرد شدن محیط‌های تهیه‌شده، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون کنیدیوم‌های برداشت‌شده از محیط کشت جامد (غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر) به‌منظور تولید بلاستوسپور و در شرایط استریل به ارلن‌های مذکور انتقال یافت. ظروف مایه‌زنیشده، به مدت سه روز (۷۲ ساعت) درون شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در پایان، محتوای هر ارلن ابتدا از پارچه ململ عبور داده شده و سپس با استفاده از لام گلبول شمار، غلظت بلاستوسپور در سوسپانسیون تعیین شد. لازم به ذکر است که در این بررسی‌ها، محیط مایع حاوی عصاره

[1]. Potato Dextrose Agar

سیب‌زمینی+دکستروز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که جدایه مورد مطالعه بیش‌ترین میزان اسپورزایی را در محیط حاوی عصاره سبوس برنج داشته است. بر همین اساس، این محیط به‌عنوان محیط پایه برای ادامه بررسی‌ها انتخاب شد.

بررسی تأثیر مکمل‌های پروتئینی بر میزان اسپورزایی

در مرحله دوم، به محیط کشت پایه که در مرحله قبل بیشترین میزان تولید بلاستوسپور را به همراه داشت (عصاره سبوس برنج)، مکمل‌های پروتئینی پودر آب پنیر، سویا و سفیده تخم مرغ با غلظت ۴ درصد اضافه شده و تأثیر آن‌ها بر میزان تولید بلاستوسپور مورد ارزیابی قرار گرفت. روند انجام آزمایش‌های این مرحله نیز همانند مرحله قبل بود. محیط مایع حاوی عصاره سبوس برنج نیز به‌عنوان تیمار شاهد مورد استفاده قرار گرفت. از آن‌جا که پس از ارزیابی‌های صورت‌گرفته مشخص شد که در جدایه مورد مطالعه، افزودن مکمل‌های پروتئینی به محیط مایع حاوی عصاره سبوس برنج موجب کاهش میزان تولید بلاستوسپور خواهد شد، ادامه بررسی‌ها با محیط مایع حاوی عصاره سبوس برنج صورت پذیرفت.

بررسی تأثیر نمک‌های کلرید مختلف بر میزان اسپورزایی

در مرحله سوم، تأثیر افزودن نمک‌های کلرید مختلف شامل کلریدکلسیم ($CaCl_2$)، کلریدپتاسیم (KCl) و کلریدمنیزیم ($MgCl_2$) (غلظت ۰/۱ مولار) به محیط کشت حاوی عصاره سبوس برنج و تأثیر آن‌ها بر تعداد بلاستوسپورهای تولید شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش‌های این مرحله نیز همانند مراحل قبل انجام پذیرفت. در انجام بررسی‌های این مرحله، محیط مایع حاوی عصاره سبوس برنج به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

در پایان این سه مرحله، محیط کشت مایع مناسب برای تولید بلاستوسپور قارچ بیمارگر *B. bassiana* انتخاب شد و بلاستوسپورهای تهیه‌شده در این محیط در انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفتند.

پرورش کلنی کنه تارتن دولکه‌ای

جمعیت اولیه کنه تارتن دولکه‌ای طی نمونه‌برداری از گلخانه‌های آلوده در شهرستان پاکدشت جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده برای تکثیر، روی گیاهان لوبیا چیتی مستقر شدند. زمانی که گیاهان به مرحله ۶–۸ برگی رسیدند، آلوده‌سازی با نمونه‌های جمع‌آوری‌شده صورت پذیرفت. کلنی کنه تارتن در شرایط دمایی ۵ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۵±۶۵ درصد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در گلخانه دانشکده کشاورزی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران نگهداری شد.

آزمون زیست‌سنجی

در انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی از کنه‌های بالغ ماده هم‌سن (طول عمر کم‌تر از ۲۴ ساعت) استفاده شد. بدین‌منظور، برگ‌های جوان گیاه لوبیا به‌صورت دیسک‌های برگی دایره‌ای‌شکل بریده شده و به‌گونه‌ای که سطح پشتی آن‌ها به سمت بالا باشد، درون ظروف پتری که کف آن‌ها یک لایه نازک پنبه مرطوب وجود داشت، قرار داده شدند. به‌منظور جلوگیری از فرار کنه‌ها، اطراف برگ‌ها با یک لایه پنبه مرطوب محصور شد. سپس، ۱۰ جفت کنه بالغ توسط قلم‌موی ظریف به آرامی از کلنی آزمایشگاهی برداشته و به دیسک‌های برگی منتقل شدند. افراد منتقل‌شده، به مدت ۲۴ ساعت برای انجام تخم‌ریزی در دیسک‌های بیان‌شده نگهداری شدند. پس از گذشت این زمان، کنه‌های بالغ از سطح دیسک‌های برگی حذف شده و تنها تخم‌ها باقی ماندند. دیسک‌های برگی تا زمان بالغ شدن افراد در اتاقک رشد با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. کنه‌های هم‌سن تازه ظاهر شده در انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفتند.

پس از انتخاب ترکیبات مناسب برای تولید محیط کشت مایع برای قارچ بیمارگر *B. bassiana*، در این مرحله قدرت بیماری‌زایی بلاستوسپورهای تولید شده در محیط مایع با کنیدیوم‌هایی که از سطح محیط کشت جامد برداشت شده بودند، مورد مقایسه قرار گرفت. بدین‌منظور، ابتدا سوسپانسیون مادری از کنیدیوم‌های جمع‌آوری‌شده از

محیط کشت جامد و بلاستوسپورهای تولید شده در محیط کشت مایع با غلظت $۱۰^{۹}$ (کنیدیوم/بلاستوسپور بر میلی‌متر) تهیه شد. سپس، غلظت‌های $۱۰^{۸}$، $۱۰^{۷}$، $۱۰^{۶}$، $۱۰^{۵}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۳}$ و $۱۰^{۲}$ (کنیدیوم/بلاستوسپور بر میلی‌لیتر) از غلظت مادری تهیه شدند. از آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد استفاده شد.

غلظت‌های تهیه شده به‌صورت جداگانه و با استفاده از اسپری دستی در سطح ظروف پتری که در هر کدام از آن‌ها ۱۰ کنه بالغ ماده هم‌سن قرار داده شده بود، پاشیده شدند. پتری‌ها حدود ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند تا رطوبت اضافی خارج شود. پس از خشک شدن سطح آن‌ها، درب آن‌ها بسته شده و درون دستگاه انکوباتور با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵ درصد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، درب پتری‌ها با درب‌های سوراخ‌دار تعویض شد. پتری‌های بیان‌شده به‌مدت ۵ روز درون انکوباتور با شرایط فوق نگهداری شده و میزان تلفات کنه‌های تارتن در تیمارهای مختلف به دقت شمارش و ثبت شد. بررسی‌ها در هر غلظت با حداقل ۱۰ تکرار انجام پذیرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) برای مقایسه میزان اسپورزایی قارچ بیمارگر در محیط‌های مختلف مایع مورد استفاده قرار گرفت. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار میان تیمارهای مختلف مورد مطالعه، گروه‌بندی میانگین‌ها با استفاده از آزمون SNK و در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت. آزمون‌های این مرحله با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (ver. 9.1.3) انجام شد. به‌منظور مقایسه قدرت زهرآگینی کنیدیوم‌ها و بلاستوسپورهای مورد مطالعه، از آزمون زیست‌سنجی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (ver. 18) استفاده شد.

نتایج و بحث

ارزیابی تأثیر محصولات جانبی کشاورزی بر میزان تولید بلاستوسپور

جدول ۱ نشان‌دهنده تعداد بلاستوسپورهای تولید شده در محیط‌های کشت حاوی عصاره فرآورده‌های جانبی کشاورزی و صنایع غذایی می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، استفاده از این مواد تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید بلاستوسپور در جدایه مورد مطالعه داشته است ($df = 5$; $F = 588.23$; $P < 0.0001$). بر همین اساس، محیط کشت حاوی عصاره سبوس برنج با تولید میانگین $۱۰^{۸} \times$ ۱/۸۹ بلاستوسپور بر میلی‌لیتر، مناسب‌ترین محیط برای پرورش بلاستوسپورهای جدایه IRAN 1395C قارچ بیمارگر *B. bassiana* بوده است.

جدول ۱- بلاستوسپور تولید شده (میانگین ± خطای معیار) توسط جدایه IRAN 1395C قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* روی محیط‌های کشت حاوی عصاره محصولات جانبی کشاورزی

Table 1. Blastospore produced (Mean ± SE) by *Beauveria bassiana* strain IRAN 1395C on different media containing agricultural waste

	Different media					
	Control	**Potato**	**Barley**	**Wheat**	**Maize**	**Rice**
Blastospore/ml	8.66×10^{7}	5.25×10^{7}	9.03×10^{7}	4.78×10^{7}	1.58×10^{8}	1.89×10^{8}
Mean (±SE)	(3.27×10^{6})**c**	(4.40×10^{5})**d**	(10.04×10^{5})**c**	(4.19×10^{5})**d**	(2.65×10^{6})**b**	(3.04×10^{6})**a**

* Means followed by different letters are significantly different (SNK, $P < 0.05$).

مطلوبیت عصاره برنج در پژوهش‌های پیشین نیز مورد اشاره قرار گرفته است. در مطالعه‌ای میزان تولید بلاستوسپور قارچ‌های بیمارگر *Metarhizium flavoviride*، *Purpureocillium lilacinus*، *B. bassiana* و *Isaria tenuipes* در محیط‌های مایع حاوی عصاره‌های مختلف مانند برنج، گندم، چاودار، ذرت و سورگوم مورد بررسی

قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان تولید کنیدیوم برای قارچ *M. flavoviride* روی سورگوم و برای *B. bassiana* روی برنج به دست آمد (Mar & Lumyong, 2012). هم‌چنین، در بررسی دیگری ثابت شد که قارچ بیمارگر *M. anisopliae* روی مخلوطی از عصاره‌های سبوس و شلتوک برنج نسبت به خود برنج، بلاستوسپورهای بیش‌تری تولید می‌نماید (Dorta *et al*., 1990). در بررسی‌های صورت گرفته توسط بی‌غم و طلایی‌حسنلوئی (Bigham & Talaei-Hassanloui, 2017) پتانسیل چند محیط غذایی طبیعی شامل سبوس گندم، کاه گندم، ضایعات ماکارونی و پوست سیب‌زمینی بر میزان تولید کنیدیوم هوایی در دو قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* مورد مطالعه قرار گرفت. مشابه با یافته‌های پژوهش حاضر، مشخص شد که مواد مختلف مورد استفاده میزان اسپورزایی بیمارگرهای مورد مطالعه را به‌صورت معنی‌داری تحت تأثیر قرار می‌دهند. بر اساس نتایج گزارش‌شده، بیمارگر *B. bassiana* در محیط کشت حاوی سبوس گندم بیشترین میزان تولید اسپور را داشت. متفاوت بودن جدایه‌های مورد مطالعه می‌تواند دلیلی بر تفاوت‌های مشاهده شده باشد. این مسأله در پژوهش صورت گرفته توسط گولی و همکاران (Gouli *et al*., 2013) مورد اشاره قرار گرفته است. این پژوهشگران بیان کردند که اسپورهای تولید شده به‌وسیله جدایه ARSF-9337 قارچ بیمارگر *B. bassiana* در محیط حاوی عصاره ارزن سه برابر بیش‌تر از جدایه‌های ARSF-9587 و GHA می‌باشد.

ارزیابی تأثیر مکمل‌های پروتئینی بر میزان تولید بلاستوسپور

تأثیر مکمل‌های پروتئینی پودر آب پنیر، پودر سویا و پودر سفیده تخم‌مرغ بر میزان تولید بلاستوسپور قارچ بیمارگر *B. bassiana* در جدول ۲ نمایش داده شده است. اگرچه اختلاف‌های مشاهده‌شده میان تیمارهای مختلف مورد مطالعه از نظر آماری معنی‌دار بود، اما نتایج به‌دست آمده نشان داد که استفاده از مکمل‌های پروتئینی نه تنها افزایش میزان اسپورزایی را در کشت مایع به دنبال نداشت، بلکه در تمام تیمارهای مورد مطالعه، میزان بلاستوسپور شمارش‌شده کم‌تر از مقدار تولید شده در تیمار شاهد بود ($df = 3$; $F = 993.80$; $P < 0.0001$).

جدول ۲- بلاستوسپور تولید شده (میانگین ± خطای معیار) توسط جدایه IRAN 1395C قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* روی محیط‌های کشت حاوی مکمل‌های پروتئینی

Table 2. Blastospore produced (Mean ± SE) by *Beauveria bassiana* strain IRAN 1395C on different media containing protein supplements

	Different media			
	Control	**Whey**	**Soybean**	**Egg white**
Blastospore/ml	1.27×10^{8}	3.73×10^{7}	3.81×10^{7}	4.79×10^{7}
Mean (±SE)	(1.80×10^{6})**a**	(7.99×10^{5})**c**	(1.04×10^{6})**c**	(1.62×10^{6})**b**

* Means followed by different letters are significantly different (SNK, $P < 0.05$).

تأثیر منفی استفاده از مکمل‌های پروتئینی بر میزان تولید بلاستوسپور در IRAN 1395C قارچ بیمارگر *B. bassiana* (جدول ۲) یافته بسیار جالبی است که مغایر با نتایج گزارش‌شده توسط سایر پژوهشگران می‌باشد. رشید و همکاران (Rashid *et al*., 2019) بیان کردند که مکمل آب پنیر به دلیل دارا بودن اسیدهای آمینه گلوتامین، آسپارتیک اسید، ترئونین، متیونین، لوسین و لیزین موجب افزایش میزان اسپورزایی قارچ‌های بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* می‌شود. در پژوهشی دیگر مشخص شد که افزودن مکمل آب پنیر، شرایط محیط کشت را برای رشد و اسپورزایی قارچ‌های بیمارگر حشرات مساعدتر می‌کند (Kim & Kin, 2008). این مسأله در پژوهش صورت گرفته توسط کاسا و همکاران (Kassa *et al*., 2008) نیز مورد اشاره قرار گرفته است. مغایرت نتایج

به‌دست‌آمده در این مرحله با یافته‌های سایر پژوهشگران مؤید این نکته است که گونه‌ها و جدایه‌های مختلف این گروه از عوامل بیماری‌زا نیازهای تغذیه‌ای متفاوتی داشته (Prakash *et al*., 2008) و این مسأله باید در برنامه‌های تکثیر و پرورش انبوه آن‌ها به‌خوبی مورد توجه قرار گیرد.

ارزیابی تأثیر نمک‌های کلرید بر میزان تولید بلاستوسپور

پس از ارزیابی تأثیر استفاده از فرآورده‌های مختلف کشاورزی و مکمل‌های پروتئینی بر میزان تولید بلاستوسپور جدایه IRAN 1395C قارچ بیمارگر *B. bassiana*، تأثیر افزودن نمک‌های کلریدکلسیم، کلریدپتاسیم و کلریدمنیزیم بر میزان تولید بلاستوسپور این جدایه مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های این مرحله در جدول ۳ ارائه شده است. همان‌گونه که در این جدول مشخص است، افزودن نمک‌های مورد مطالعه تأثیر مثبتی بر فرآیند تولید بلاستوسپور داشته و اختلاف‌های مشاهده‌شده میان تیمارهای مورد مطالعه از نظر آماری معنی‌دار بود ($df = 3$; $F = 108.56$; $P < 0.0001$). در این جدایه، بیشترین میزان تولید بلاستوسپور پس از افزودن نمک کلریدکلسیم به دست آمد (۱/۳۸×۱۰^{۸} بلاستوسپور بر میلی‌لیتر) و پس از آن نمک‌های کلریدپتاسیم و کلرید منیزیم بیش‌ترین میزان اثرگذاری بر تولید بلاستوسپور را از خود نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۳- بلاستوسپور تولید شده (میانگین ± خطای معیار) توسط جدایه IRAN 1395C قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* روی محیط‌های کشت حاوی نمک‌های مختلف کلراید

Table 3. Blastospore produced (Mean ± SE) by *Beauveria bassiana* strain IRAN 1395C on different media containing chloride salts

	Different media			
	Control	**KCl**	**$CaCl_2$**	**$MgCl_2$**
Blastospore/ml	1.09×10^{8}	1.30×10^{8}	1.38×10^{8}	1.22×10^{8}
Mean (±SE)	(1.96×10^{6})**d**	(5.89×10^{5})**b**	(7.12×10^{5})**a**	(9.01×10^{5})**c**

* Means followed by different letters are significantly different (SNK, $P < 0.05$).

مشابه با یافته‌های ارائه شده در این بخش، بالاکریشنان و همکاران (Balakrishnan *et al*., 2011) نیز گزارش نمودند که افزودن نمک کلریدکلسیم به محیط کشت حاوی ملاس چغندرقند سبب افزایش میزان تولید بلاستوسپور در قارچ‌های بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* می‌شود. رشید و همکاران (Rashid *et al*., 2019) نیز بیان کردند که افزودن مخلوطی از نمک‌های مختلف سبب افزایش میزان تولید بلاستوسپور در قارچ بیمارگر *M. anisopliae* می‌شود.

مقایسه زهرآگینی بلاستوسپورهای برداشت‌شده از محیط کشت مایع با کنیدیوم‌های جدا شده از محیط کشت جامد روی کنه تارتن دولکه‌ای

از آن‌جا که افزایش کمیت اسپورهای تولید شده الزاماً تضمین‌کننده کیفیت بالای آن‌ها نمی‌باشد (Wekesa *et al*., 2005)، لازم است که بررسی‌های زیست‌سنجی برای ارزیابی میزان زهرآگینی انجام پذیرد. در این مرحله از پژوهش، پس از انجام بررسی‌های اولیه و تولید محیط مایع مناسب (عصاره سبوس برنج+کلرید کلسیم) به‌منظور تولید بلاستوسپور جدایه IRAN 1395C قارچ بیمارگر *B. bassiana*، میزان زهرآگینی بلاستوسپورهای تولید شده در محیط کشت انتخابی روی کنه‌های تارتن ماده بالغ در مقایسه با کنیدیوم‌های برداشت‌شده از محیط کشت جامد (PDA) مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌های زیست‌سنجی به منظور مقایسه میزان زهرآگینی بلاستوسپورها و کنیدیوم‌های جدایه IRAN 1395C روی کنه تارتن دولکه‌ای در جدول ۴ نشان داده شده است. مقادیر بالای *P*-value محاسبه‌شده نشان می‌دهند که داده‌های به‌دست‌آمده برازش مناسبی با

مدل پروبیت مورد استفاده داشته‌اند (جدول ۴). علاوه بر این، مقادیر محاسبه‌شده ضریب وابستگی نیز نشان می‌دهند که تغییرات در درصد مرگ و میر کنه‌های ماده در هر دو آزمون مورد بررسی بیش از ۸۰ درصد وابسته به تغییر در غلظت کنیدیوم/بلاستوسپورهای مورد استفاده بوده است.

جدول ۴- زهرآگینی کنیدیوم و بلاستوسپورهای جدایه IRAN 1395C قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* علیه کنه *Tetranychus urticae*

Table 4. Pathogenicity of conidium and blastospre of *Beauveria bassiana* strain IRAN 1395C against *Tetranychus urticae*

Spore types	LC_{50}[a] (95% FL)	No.[b]	Slope ± SE	χ^2 (*df*)	P_{val}	R^2
Conidium	3.23×10^6 ($1.57 \times 10^6 – 7.44 \times 10^6$)	690	0.453 ± 0.047	30.40 (58)	0.999	0.83
Blastospore	3.29×10^6 ($1.14 \times 10^6 – 4.93 \times 10^6$)	690	0.472 ± 0.047	19.54 (58)	1.000	0.88

[a] Lethal concentration of 50% and 95% fiducial limits.
[b] Number of insects evaluated.

همان‌گونه که اطلاعات این جدول نشان می‌دهند، مقادیر LC_{50} محاسبه‌شده برای اسپورهای تولید شده در محیط‌های کشت مایع و جامد به‌ترتیب برابر با ۱۰^۶ × ۳/۲۹ و ۱۰^۶ × ۳/۲۳ بلاستوسپور/کنیدیوم بر میلی‌لیتر می‌باشد. با توجه هم‌پوشانی حدود اطمینان محاسبه‌شده برای مقادیر LC_{50} در دو آزمایش صورت‌گرفته (جدول ۴)، می‌توان بیان نمود که تفاوت‌های مشاهده‌شده از نظر آماری معنی‌دار نبوده و هر دو نوع اسپور مورد مطالعه زهرآگینی یکسانی نسبت به کنه‌های تارتن بالغ از خود نشان داده‌اند. این شواهد نویدبخش آن است که در تجاری‌سازی استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات، می‌توان به پتانسیل بلاستوسپورهای به‌دست‌آمده در محیط‌های کشت مایع اتکا نمود. در همین راستا، می‌توان یافته‌های سایر پژوهشگران را نیز مورد بررسی قرار داد. به‌عنوان مثال، رشید و همکاران (Rashid *et al.*, 2019) دریافتند که بلاستوسپورهای تولید شده قارچ بیمارگر *B. bassiana* در محیط مایع، توانایی ایجاد تلفات ۸۰ تا ۹۰ درصدی در جمعیت کنه تارتن دولکه‌ای را دارا می‌باشند. علاوه بر این، برخی پژوهش‌های صورت‌گرفته نشان می‌دهند که زهرآگینی بلاستوسپورها می‌تواند بیش‌تر از کنیدیوم‌ها باشد. در پژوهشی مشخص شد که بلاستوسپورهای قارچ بیمارگر *P. fumosoroseus* تلفات بیش‌تری نسبت به کنیدیوم‌ها در جمعیت سفیدبالک *B. argentifoli* ایجاد می‌نمایند (Lacey *et al.*, 1999). همچنین، آگودلو و فالکون (Agudelo & Falcon, 1983) بیان کردند که بلاستوسپورهای قارچ‌های بیمارگر حشرات پتانسیل قابل توجهی در کنترل لاروهای *Spodoptera exigua* دارا می‌باشند. وگا (Vega, 2008) بیان کرد که بلاستوسپورها در مقایسه با کنیدیوم‌ها سرعت تندش بالاتری دارند و این مسأله می‌تواند نقش به‌سزایی در موفقیت آن‌ها در ایجاد بیماری در جمعیت بندپایان میزبان ایفا نماید.

پتانسیل قارچ بیمارگر *B. bassiana* در ایجاد تلفات در جمعیت کنه تارتن دولکه‌ای توسط پژوهشگران دیگر نیز مورد اشاره قرار گرفته است. بررسی‌های صورت‌گرفته توسط سید طالبی و همکاران (Seyed-Talebi *et al.*, 2012) نشان داد که کنیدیوم‌های جدایه EUT105 قارچ بیمارگر *B. bassiana* در غلظت ۱۰^۷، باعث ایجاد تلفات ۶۸ درصدی در جمعیت کنه‌های تارتن روی گیاه خیار شده است. تأثیر قابل‌توجه بیمارگرهای *B. bassiana*، *M. anisopliae* و *P. fumosoroseus* بر میزان باروری و طول عمر کنه‌های تارتن در گزارش ارائه‌شده توسط شی و همکاران (Shi *et al.*, 2006) نیز مورد اشاره قرار گرفته است.

به طور کلی، یکی از مهم‌ترین موانع در مسیر کاربرد موفقیت‌آمیز قارچ‌های بیمارگر حشرات در برنامه‌های مدیریتی آفات، تولید انبوه و اقتصادی آن‌ها است. به بیان دیگر، تولید تعداد زیاد کنیدیوم با قدرت بیماری‌زایی مناسب، یکی از معیارهای اصلی در انتخاب یک بیمارگر قارچی برای کنترل میکروبی آفات در شرایط گلخانه، مزرعه، باغ و ... می‌باشد (Robl *et al*., 2009). یافته‌های ارائه‌شده در پژوهش حاضر نشان دادند که در فرآیند تکثیر قارچ‌های بیمارگر حشرات در محیط‌های کشت مایع، علاوه بر کاهش هزینه‌های تولید، کمیت و کیفیت اسپورهای تولید شده نیز قابل تأمل می‌باشد. علاوه بر این، مقایسه یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج سایر پژوهشگران مؤید آن است که جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر حشرات، نیازهای تغذیه‌ای متفاوتی داشته و این مسأله باید به خوبی در برنامه‌های تولید انبوه و تجاری‌سازی آن‌ها مورد توجه قرار گیرد. بدون تردید، استفاده از محیط‌های کشت مایع در برنامه‌های پرورش انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات بسیار مقرون به صرفه بوده و این مسأله تأثیر به‌سزایی در کاهش معنی‌دار هزینه‌های تولید آن‌ها خواهد داشت. بر همین اساس، انجام بررسی‌های بیش‌تر در این زمینه بسیار ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

نتایج ارائه شده در این پژوهش، بخشی از یافته‌های پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول می‌باشد که با حمایت مالی دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران صورت پذیرفته است و نویسندگان بدین‌وسیله مراتب قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

References

Agudelo, F., & Falcon, L. A. (1983). Mass production, infectivity, and field application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus. Journal of Invertebrate Pathology*, *42*, 124-132. **DOI: https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90210-0**

Balakrishnan, S., Srikanth, J., Santhalakshmi, G., Hari, K., & Sankaranarayanan, C. (2011). Response of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to molasses media fortified with supplements. *Journal of Sugarcane Research*, *1*(2), 57-65.

Bigham, Z., & Talaei-Hassanloui, R. (2017). Production of two entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on natural substrates using diphasic production method. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, *6*(1), 103-109 (In Farsi). **DOI: https://doi.org/ 10.22059/JBIOC.2017.202734.137**

Charnley, A. K. (2003). Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research*, *40*, 241-321. **DOI: https://doi.org/10.1016/S0065-2296(05)40006-3**

Dorta, B., Bosch, A., Arcas J. A., & Ertola. R. J. (1990). High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *33*, 712-715. **DOI: https://doi.org/10.1007/BF00604944**

Frazzon, A. P. G., Junior, I. D. S. V., Masuda, A., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2000). In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, *94*(1-2), 117-125. **DOI: https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00368-x**

Goettel, M. S., Johnson, D. L., & Inglis, G. D. (1995). The role of fungi in the control of grasshoppers. *Canadian Journal of Botany*, *73*(S1), 71-75. **DOI: https://doi.org/10.1139/b95-227.**

Gouli, V., Provost, C., Gouli, S., Parker, B. L., & Skinner, M. (2013). Productivity of different species of entomopathogenic fungi based on one type of technology. *Journal of Agricultural Technology*, *9* (3): 571-580.

Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In Butt, T. M., Jackson, C. W. and Magan, N. (Eds.). Fungi as Biocontrol Agents. CABI International, United Kingdom, pp. 23-70. **DOI: https://doi.org/10.1079/ 9780851993560.0023**

Kamp, A. M., & Bidochka, M. J. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology*, *35*(1), 74-77. **DOI: https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01128.x**

Kassa, A., Brownbridge, M., Parker, B.L., Skinner, M., Gouli, V., Gouli, S., Guo, M., Lee, F. & Hata, T. (2008). Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, *112*(5), 583-591. **DOI: https://doi.org/10.1016/j.mycres. 2007. 12.004**

Kim, J. J., & Kim, K. C. (2008). Selection of a highly virulent isolate of *Lecanicillium attenuatum* against cotton aphid. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *11*(1), 1-4. **DOI: https://doi.org/10.1016/j.aspen.2008.02.001**

Lacey, L. A., Kirk, A. A., Millar, L., Mercadier, G.m & Vidal, C. (1999). Ovicidal and larvicidal activity of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay system allowing prolonged survival of control insects. *Journal of Biocontrol Science and Technology*, *9*, 9-18. **DOI: https://doi.org/10.1080/09583159929866**

Luczynski, A., Islam, M. B., Raworth, D. A., & Chan, C. K. (1990). Chemical and morphological factors of resistance against the two-spotted spider mite in beach strawberry. *Journal of Economic Entomology*, *83*(2): 564-569. **DOI: https://doi.org/10.1093/jee/83.2.564**

Mar, T. T., & Lumyong, S. (2012). Conidial production of entomopathogenic fungi in solid-state fermentation. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, *17*(5), 762-768.

Ottati-de-Lima, E. L., Batista Filho, A., Almeida, J. E., Gassen, M. H., Wenzel, I. M., Almeida, A. M., & Zapellini, L. O. (2014). Liquid production of entomopathogenic fungi and ultraviolet radiation and temperature effects on produced propagules. *Journal of Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, *81*(4), 342- 350. **DOI: https://doi.org/10.1590/1808-1657001352012**

Prakash, G. B., Padmaja, V., & Kiran, R. S. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, *99*(6), 1530-1537. **DOI: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.031**

Prasad, C. S., & Pal, R. (2014). Mass production and economics of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Verticillium lecanii* on agricultural and industrial waste. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences, 1*(1), 28-32. **DOI: https://doi.org/10.36347/sjavs.2014.v01i01.005**

Rangel, D. E. N., Acheampong, M. A., Bignayan, H. G., Golez, H. G., & Roberts, D. W. (2023). Conidial mass production of entomopathogenic fungi and tolerance of their mass-produced conidia to UV-B radiation and heat. *Fungal Biology*, *127*(12), 1524-1533. **DOI: https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.07.001**

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 Biosystems Engineering*, *50*(2): 489-497 (In Farsi). **DOI: https://doi.org/10.22059/ijbse.2019.271507.665131**

Robl, D., Sung, L. B., Novakovich, J. H., Marangoni, P. R., Zawadneak, M. A. C., Dalzoto, P. R. & Pimentel, I. C. (2009). Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson strains on agro-industrial residues. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*(2), 296-300. **DOI: https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200016**

Sanchez-Rodriguez, A. R., Raya-Díaz, S., Zamarreño, A. M., García-Mina, J. M., del Campillo, M. C., & Quesada-Moraga, E. (2018). An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological Control 116*, 90-102. **DOI: https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.012**

Santa, H. S. D., Santa, O. R. D., Brand, D., Vandenberghe, L. P. D. S., & Soccol, C. R. (2005). Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *48*(SPE), 51-60. **DOI: https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000400007**

Sedaratian, A., Fathipour, Y., & Moharramipour, S. (2009). Evaluation of resistance in 14 soybean genotypes to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Pest Science*, *82*(2), 163-170. **DOI: https://doi.org/10.1007/s10340-008-0235-8**

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

Seyed-Talebi, F., Tork, P., Dilmagani, M. R., & Talaei-Hassanloui, R. (2012). Potential synergism between *Beauveria bassiana* and ether - extract of *Ginkgo biloba* for control of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Journal of Crop Protection*, *1*, 49 55.

Shi, W. B., & Feng, M. G. (2006). Field efficacy of application of *Beauveria bassiana* formulation and low rate pyridaben for sustainable control of citrus red mite *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) in orchards. *Biological Control*, *39*(2), 210-217. **DOI: https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.06.016**

Singh, R., Verma, K. D., Singh, J., Nigam, R., Singh, M., & Kumar, A. (2017). Multiplication of entomopathogenic fungus *Beauberia bassiana* (Balsamo) on solid and liquid media. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *SP1*, 345-351.

Sujatha, K., Srilakshmi, C., & Lenin, A. (2016). Selection of a suitable medium for the mass production of some selected entomopathogenic fungus. *International Journal of Recent Scientific Research*, *7*(7), 12370-12372. **DOI: https://doi.org/10.5555/20183008153**

Vega, F. E. (2008). Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, *98*, 277-279. **DOI: https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.008**

Wang, L., Zhang, Y., Xie, W., Wu, Q., & Wang. S. (2016). Sublethal effects of spinetoram on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *132*, 102-107. **DOI: https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.02.002**

Wekesa, V. W., Maniania, N. K., Knapp, M., & Boga, H. I. (2005). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. *Experimental and Applied Acarology*, *36*(1), 41-50. **DOI: https://doi.org/10.1007/s10493-005-0508-3**

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, *17*(9), 879-920. **DOI: https://doi.org/10.1080/09583150701593963**

Plant Pest Research
2024- 14 (1): 87-98

Open access
doi: 10.22124/iprj.2024.27403.1574
pISSN: 2322-2409
eISSN: 2538-6123

Research paper

Feasibility of producing blastospores of *Beauveria bassiana* on different liquid media and its pathogenicity against *Tetranychus urticae* under laboratory conditions

E. Hamzehei[1], A. Sedaratian-Jahromi[2] and K. Kheradmand[3*]

1. 3. Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran, 2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

1. 0000-0002-1849-9554, 2. 0000-0002-2588-2359, 3. 0000-0003-2612-6632

(Received: April 5, 2024- Accepted: June 9, 2024)

Abstract

In the present study, the effects of different supplementary ingredients on blastospore production of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Strain IRAN 1395C were evaluated. In the first step, effects of extracts of different agricultural products including rice bran, wheat bran, barley bran, maize bran, and potato waste on blastospore production were evaluated. Our findings revealed that the medium containing rice bran extract provides the best conditions for sporulation. Then, different supplementary proteins including whey, soybean, and egg white with a concentration of 4% were added into the rice bran medium, and their effects on blastospore production were investigated. Different proteins had no positive effects on sporulation. In the last step, effects of adding different chloride salts (KCl, $MgCl_2$, and $CaCl_2$) to the selected culture medium on the increase of blastospore production was studied. The results obtained indicated that use of calcium chloride ($CaCl_2$) had the highest effectiveness on blastospore production than other salts tested. Finally, the pathogenicity of blastospores obtained from liquid medium and conidia harvested from solid culture was compared on *Tetranychus urticae* Koch. The bioassay output revealed no statistical differences between the pathogenicity of blastospore obtained in liquid medium (LC_{50} = 3.29 × 10^6 Blastospore/ml) with conidium produced in solid medium (LC_{50} = 3.23 × 10^6 Conidium/ml). The present findings revealed that liquid media could be so helpful for developing mass rearing programs of *B. bassiana*.

Key words: Biological control, blastospore, entomopathogenic fungi, natural media, pathogenicity

* Corresponding author: kkheradmand@ut.ac.ir