Archive of SID

مقاله تحقیقی

اثرات دوره نوری، زمان انکوباسیون و سرعت چرخش انکوباتور شیکردار در تولید *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* در فرمانتاسیون مایع

مسعود لطیفیان[1]، بهار راد[2]

۱- دفتر امور میوه‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲- پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری کشور، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
مسئول مکاتبات: مسعود لطیفیان، پست الکترونیک: masoud_latifian@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۲۳ ۷(۲) ۱۳۹ -۱۵۲ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۷/۲۱

چکیده

موفقیت کنترل زیستی آفات با استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات مانند *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* به روش‌های عملی و اقتصادی برای تولید انبوه آن‌ها بستگی دارد. در این پژوهش تأثیر دوره نوری (شامل ۱۲-۱۲، ۱۸-۶ و ۶-۱۸ روشنایی و تاریکی)، زمان انکوباسیون (دوره ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) و سرعت چرخش انکوباتور (۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ دور در دقیقه انکوباتور شیکر دار) در تولید بلاستوسپور این دو قارچ در چهار تکرار بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که اثر تیمارهای مختلف دوره نوری، دور انکوباتور و دوره انکوباسیون در چرخه تولید بلاستوسپور قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* از نظر غلظت اسپور تولیدی، توانایی جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک دارای تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد است. بالاترین غلظت بلاستوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط دوره نوری ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی، دور انکوباتور ۱۵۰ دور در دقیقه و دوره انکوباسیون ۷۲ ساعت بود. براساس نتایج این پژوهش دو گونه قارچ بیمارگر می‌توانند با استفاده از ترکیب شرایط محیطی و تنظیمات دستگاهی انکوباتور بدست آمده با عملکرد خوبی از تولید و بازده اقتصادی مناسب تولید شوند.

واژه‌های کلیدی: قارچ بیمارگر حشرات، تولید انبوه، فرمانتاسیون مایع، تنظیمات دستگاهی

مقدمه

مدیریت تلفیقی آفات به ویژه پس از مشاهده گسترده مقاومت آفات در برابر آفت‌کش‌ها و مسائل زیست محیطی مختلف آن‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. مدیریت تلفیقی آفات از روش‌های نوین و کم خطر مانند انواع روش‌های زراعی، زیستی، مکانیکی، فیزیکی و آفت کش‌های جدید میکروبی بهره می‌برد (Blanco-Metzler, 2004). در این روش قارچ‌های بیمارگر حشرات اغلب به عنوان عوامل کنترل زیستی در کاهش جمعیت آفات در اکوسیستم‌های مختلف کشاورزی با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته اند (Bradley *et al.*, 1992; Inglis *et al.*, 2001). قارچ‌های بیمارگر حشرات دارای مکانیزم‌های منحصر به فرد برای تهاجم، پایداری و تکثیر هستند که آن‌ها را به عنوان عوامل مهمی برای کنترل زیستی آفات مختلف مناسب می‌کند (Charnley, 1997; Hajek & Delalibera, 2010; Santos *et al.*, 2007; Shah & Pell, 2003). در میان قارچ‌های بیمارگر حشرات سه گونه *Beauveria bassiana*، *Metarhizium anisopliae* Balsamo و *Lecanicillium lecanii* Zimmerman Metchnikoff بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.

روش کنترل زیستی با استفاده از قارچ‌های بیمارگر تنها زمانی امکان پذیر بوده که روش‌های عملی و اقتصادی تولید انبوه آن‌ها در دسترس باشد (Kleespies & Zimmermann, 1992; Pham *et al.*, 2009). با این حال، فقط تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

محدودی از روش‌های تولید انبوه برخی از قارچ‌های بیمارگر حشرات مورد مطالعه قرار گرفته و توسعه روش‌های کنترل زیستی جهت به روز رسانی آنها امری ضروری به نظر می‌رسد. در فاز مایع میسلیوم‌های فعال و بلاستوسپورها تکثیر می‌شوند و محصولات این مرحله جهت تولید کنیدیوسپور در فاز جامد مورد استفاده قرار می‌گیرد. کنیدیوسپورهای تولید شده در این فاز می‌توانند پس از برداشت جهت تهیه فرمولاسیون مناسب حشره‌کش زیستی به طور مستقیم مورد استفاده قرار گیرند. این روش دو مرحله‌ای را در اصطلاح دوفازی مایع – جامد می‌نامند (Faria & Wraight, 2007; Lecuona, 1996).

تجاری‌ترین روش برای تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر، روش فرمانتاسیون دو فازی مایع – جامد می‌باشد. استانداردهای پایه محیط‌های کشت این روش در منابع علمی موجود است (Thakre *et al*., 2011). در این روش معمولاً از محیط‌های کشت حاصل از ضایعات کم ارزش محصولات کشاورزی در کشورهای در حال توسعه استفاده می‌شود (Jaronski & Mascarin., 2017; Prakash *et al*., 2008; Wraight *et al*., 2001). محیط‌های کشت مختلفی برای تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر آفات از مواد مختلف گیاهی مانند دانه برنج، برنج شکسته، سبوس برنج، پوسته برنج، جو، تراشه‌های کاج، نیشکر، گندم، سبوس گندم و موارد مختلف دیگر مورد مطالعه قرار گرفته است (Taylor *et al*., 2013). همچنین از کمپوست مصرف شده قارچ دکمه‌ای برای تکثیر این قارچ‌ها استفاده شده است(Eslamizadeh *et al*., 2015). درشرایط فرمانتاسیون خاص یعنی زمانی که نیتروژن غیر آلی به جای آلی باشد، *Beauveria* و *Metarhizium* می‌توانند Microcyele Conidia ایجاد کنند (Tall & Meyling, 2018) . میزان فرآورده کنیدی تولیدی براساس گونه قارچ بیمارگر متفاوت است. برای مثال یک جدایه *B. bassiana* سه برابر دیگر جدایه‌ها اسپور در شرایط فرمانتاسیون یکسان تولید می‌کند. در معرض نور بودن، تولید میزان کنیدی *B. bassiana* را افزایش داده است (Xu *et al*., 2008). در چندین جدایه از *B. bassiana* نیز تولید کنیدی در محیط فرمانتاسیون کاملاً تاریک امکان پذیراست (Vega, 2018). در آزمایشات مشخص شدکه نور دادن پیوسته ۵- ۲/۵ برابر تولید اسپور *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal را افزایش می‌دهد (Téllez-Martínez *et al*., 2016). بنابراین نیاز به نور یک ویژگی وابسته به گونه است. همچنین فرمانتاسیون مایع به هوادهی قوی نیاز دارد که می‌تواند با استفاده از انکوباتور شیکردار با قدرت ۲۰۰- ۲۵۰ دور در دقیقه بسته به نوع گونه به دست آید. چرخه فرمانتاسیون مایع به منظور کشت بلاستوسپور ۲۴ تا ۷۲ ساعت و برای بعضی گونه‌ها بیشتر طول می‌کشد (Butt *et al*., 2001; Wraight *et al*., 2000).

موفقیت کنترل زیستی آفات نه تنها به جداسازی و تشخیص عامل بیمارگر، بلکه به تولید انبوه موفقیت آمیز عوامل میکروبی بستگی دارد (Prakash *et al*., 2008). برای توسعه و استفاده از یک آفت‌کش زیستی مبتنی بر قارچ‌های بیمارگر حشرات اغلب به مقدار زیادی از عامل کنترل زیستی برای استفاده در مزرعه نیاز است (Babu *et al*., 2008; Gao, 2011; Ibrahim *et al*., 2002; Pham *et al*., 2010). هیف (زیست توده) و اسپور قارچ بیمارگر ساختارهای اصلی مورد استفاده در استراتژی‌های کنترل زیستی هستند (Inglis *et al*., 2001; James, 2001; Jaronski & Mascarin., 2017; Jaronski, 2014; Mascarin & Jaronski; 2016).

روش فرمانتاسیون دو فازی جامد-مایع تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر تحت تأثیر شرایط مختلف در مرحله فرمانتاسیون مایع مانند دوره نوری، زمان انکوباسیون و سرعت چرخش انکوباتور است که در این پژوهش برای تولید انبوه یک جدایه *B. bassiana* و یک جدایه *M. anisopliae* مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر

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

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات جدایه قارچ بیمارگر مورد استفاده

Table 1. Characteristics of fungal isolates used in this study

Fungal isolate	Isolate code	Place of collection
Beauveria bassiana	IRAN 441C	Saravan
Metarhizium anisopliae	DEMI D01	Saravan

پس از خالص‌سازی به روش تک اسپور، هر کدام از دو جدایه قارچی مورد نظر در محیط غذایی SDA+Y کشت شدند. بعد از اسپورزایی کامل (کشت ۱۴-۱۲ روزه) سطح محیط کشت به وسیله سوزن انتقال خراش داده شد. اسپورها در داخل ظروف ارلن جداگانه‌ای که حاوی ۱۰ سی‌سی آب مقطر سترون با محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ بود، جمع‌آوری شدند. سوسپانسیون فوق به منظور پراکنده شدن یکنواخت اسپورها در داخل آن به مدت پنج دقیقه به طور پاندولی به هم زده شد. برای افزایش تولید اسپور از محیط کشت SDA+Y استفاده شد. این محیط کشت با دارا بودن شرایط اسیدی (pH=۵/۶) از رشد باکتری‌های ساپروفیت جلوگیری می‌نماید. برای نگهداری جدایه‌ها به مدت طولانی از محیط کشت Potato Carrot Agar (PCA) استفاده گردید. محیط اخیر به علت ضعیف بودن از اسپورزایی شدید جلوگیری نموده و باعث می‌شود جدایه‌ها به مدت طولانی در دمای ۱۰ درجه سلسیوس قدرت حیاتی خود را حفظ نمایند (Ghazavii *et al*., 2002).

تهیه محیط کشت برای تکثیر قارچ‌های بیمارگر در فاز مایع

برای این منظور ۴۰ میلی‌لیتر از ملاس باقیمانده کارخانه استحصال شکر از نیشکر را در یک لیتر آب مخلوط نموده سپس محلول حاصل در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار PSI ۱۵به مدت ۴۰ دقیقه ضدعفونی شد. پس از سرد شدن کامل محلول ضدعفونی شده و سوسپانسیون کنیدیوسپور جدایه قارچی با غلظت 10^4 اسپور در میلی‌لیتر در شرایط سترون به محلول اضافه شد. در آزمایشات انجام شده نیاز به تهیه غلظت مناسب از سوسپانسیون قارچ بود بنابراین چنان‌چه مقدار آن از غلظت سوسپانسیون پایه تهیه شده کمتر بود، از طریق رقیق سازی پی در پی و با استفاده از میکروپیپت مدرج با قدرت تشخیص ۱ میکرولیتر انجام شد. اما در صورت بالاتر بودن غلظت مورد نیاز از دستگاه سانتریفیوژ با قدرت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه استفاده شد (Gao, 2011).

تعیین مناسب‌ترین ترکیب دوره نوری، سرعت گردش و دوره انکوباسیون برای تکثیر قارچ‌های بیمارگر در فاز مایع

تیمارهای فرمانتاسیون در شرایط انکوباتور شیکردار با نُه تیمار شامل سه دوره نوری شامل ۱۲-۱۲، ۱۸-۶ و ۶-۱۸ روشنایی و تاریکی، سه دور ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ دور در دقیقه انکوباتور شیکر دار و دوره زمانی ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت زمان انکوباسیون شیکردار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در چهار تکرار انجام شد (Latifian *et al*., 2014).

صفات مورد ارزیابی در فاز مایع

الف- تخمین تولید بلاستوسپور

پس از طی دوره انکوباسیون به مدت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محیط کشت مایع درون انکوباتور شیکردار از هر ظرف ارلن مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر برداشت شده و غلظت محصول بلاستوسپور تولیدی با استفاده از لام نئوبار تعیین گردید. برای این منظور لام نئوبار مورد استفاده ابتدا کاملاً توسط الکل تمیز شد. برای شروع کار، لام را در زیر میکروسکپ قرار داده و خطوط شطرنجی قسمت‌های بالا و پایین آن با درشت‌نمایی ۴۰X تشخیص داده شدند. سپس به کمک پیپت پاستور مقدار کمی از سوسپانسیون قارچ برداشت شده و به درون شیارهای اسلاید منتقل شد. دقت شد که شیارهای اسلاید از سوسپانسیون پر شده ولی سرریز نشود. پس از قرار دادن لامل به مدت پنج دقیقه اسلاید بی‌حرکت نگهداشته شد تا حرکت اسپورها متوقف شود. ۲۵ عدد مربع بزرگ در هر طرف اسلاید وجود دارد. برای شمارش اسپورها پنج عدد از مربع‌های بزرگ را در قطر اسلاید انتخاب نموده و تعداد کل اسپورها درون آن‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

شمارش‌شد. همین عملیات برای شمارش اسپورها در قسمت دوم اسلاید تکرار شد (Ghazavii *et al*., 2002).

ب- قدرت جوانه‌زنی

برای بررسی قدرت جوانه‌زنی بلاستوسپور جدایه قارچی تکثیر شده در محیط کشت مایع ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون روی محیط کشت PDA داخل ظرف پتری پخش شد. سوسپانسیون فوق به صورت یک لایه نازک روی PDA پوشش داده شد. درب ظرف پتری با پارافیلم بسته و در دمای ۵±۲۵ درجه سلسیوس در داخل انکوباتور در شرایط کاملاً تاریک قرار داده شد. ۲۴ ساعت پس از تلقیح یک میلی‌لیتر فرمالدئید ۰/۵ درصد به منظور توقف جوانه‌زنی اسپورها به داخل هر ظرف پتری ریخته شد. درصد جوانه‌زنی با شمارش ۱۰۰ اسپور از هر پتری با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر محاسبه شد. برای هر تیمار، چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت (Ghazavii *et al*., 2002).

ج-تعیین وزن قارچ تولیدی

سوسپانسیون اسپور تولیدی از روی پارچه ململ عبور داده شد. سپس وزن تر کل قارچ تولیدی که معادل وزن قارچ در هر تیمار پس از انکوباسیون بود، محاسبه شد. محصول تولیدی تکرارهای هر تیمار به طور جداگانه به درون آون در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت منتقل شد. سپس وزن خشک محصول تولیدی محاسبه شد (Latifian *et al*., 2014).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مربوط به صفات تولید قارچ‌ها در فاز مایع براساس طرح کاملاً تصادفی با نرم افزار SPSS (IBM) تجزیه واریانس گردید. سپس میانگین صفات در تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون SNK مقایسه شدند. در تحلیل نهایی از دو پارامتر کارایی تولید و کارایی اقتصادی به شرح ذیل استفاده شد (Latifian *et al*., 2014).

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

$$\text{کارایی اقتصادی} = \text{LOG}\frac{(\text{وزن پودر خشک} \times \text{تراکم اسپور در واحد وزن محصول} \times \text{قدرت جوانه زنی})}{\text{تیمار نهاده}}$$

نتایج

نتایج تجزیه واریانس بررسی اثرات دوره نوری، دور انکوباتور و دوره انکوباسیون بر صفات غلظت بلاستوسپور، توانایی جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در جدول ۲ درج شده است. براساس جدول ۲ اثر تیمارهای مختلف دوره نوری، دورانکوباتور و دوره انکوباسیون در صفات تولید بلاستوسپور قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* شامل غلظت اسپور تولیدی، توانایی جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد.

مناسب‌ترین دوره نوری برای تکثیر قارچ‌های بیمارگر در فاز مایع

به منظور مقایسه میانگین غلظت بلاستوسپورتولیدی، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در تیمارهای دوره نوری با ۱۵۰ دور در دقیقه انکوباتور شیکر دار از روش مقایسه میانگین به روش SNK استفاده شده که نتایج آن در شکل ۱ درج شده است.

همان طور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، بالاترین غلظت بلاستوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط دوره نوری ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی بوده است. نسبت نور و تاریکی در هر دوره اثر مثبت معنی داری در تولید هر دو قارچ بیمارگر داشت. اما افزایش بیشتر از ۱۸ ساعت روشنایی باعث کاهش تولید اسپور و درصد جوانه‌زنی آن گردید. اما بر وزن خشک و وزن تر قارچ‌های تولیدی اثری نداشت. افزایش دوره روشنایی تا حدی موجب ارتقاء رشد میکروارگانیسم می‌شد، به عبارت دیگر مقدار کم نور منجر به تعداد کم سلول‌ها در محیط کشت می‌شد. درحالی که افزایش بیشتر نیز به دلیل محدودیت منابع غذایی باعث کاهش فعالیت اسپورها شد.

مناسب‌ترین ترکیب دور انکوباتور برای تکثیر قارچ‌های بیمارگر در فاز مایع

www.SID.ir

Archive of SID

به منظور مقایسه میانگین غلظت بلاستوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در تیمارهای مورد بررسی از مقایسه میانگین‌ها به روش SNK استفاده شده که نتایج آن در شکل ۲ درج شده است.

تأمین مقدار کافی اکسیژن محلول طی فرآیند تولید اهمیت دارد. از جمله عملکردهای مهم انکوباتور شیکردار تأمین مقدار کافی اکسیژن محلول برای رفع نیاز اسپورها می‌باشد. درصد اکسیژن محلول طی فرآیند به واسطه تنظیم سرعت همزن کنترل می‌شد و شدت هوادهی در طی دوره تخمیر ثابت بود. همان طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد، بالاترین غلظت بلاستوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط دور انکوباتور ۱۵۰ دور در دقیقه بوده است. در شرایط فرمانتاسیون مایع افزایش دور انکوباتور بیش از ۱۵۰ دور در دقیقه باعث کاهش وزن خشک، وزن تر و میزان اسپور تولیدی شده اما بر درصد جوانه‌زنی تأثیر منفی نداشت.

مناسب‌ترین دوره انکوباسیون برای تکثیر قارچ‌های بیمارگر در فاز مایع

به منظور مقایسه میانگین میزان تولید بلاستوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در تیمارهای مورد بررسی از روش مقایسه میانگین به روش SNK استفاده شده که نتایج آن در شکل ۳ درج شده است.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف دوره نوری، دور انکوباتور و دوره انکوباسیون روی صفات تولید بلاستوسپوردر قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae*

Table 2. Results of analysis of variances of different photoperiod, incubator round and incubation period on characteristics of blastospores production in *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*

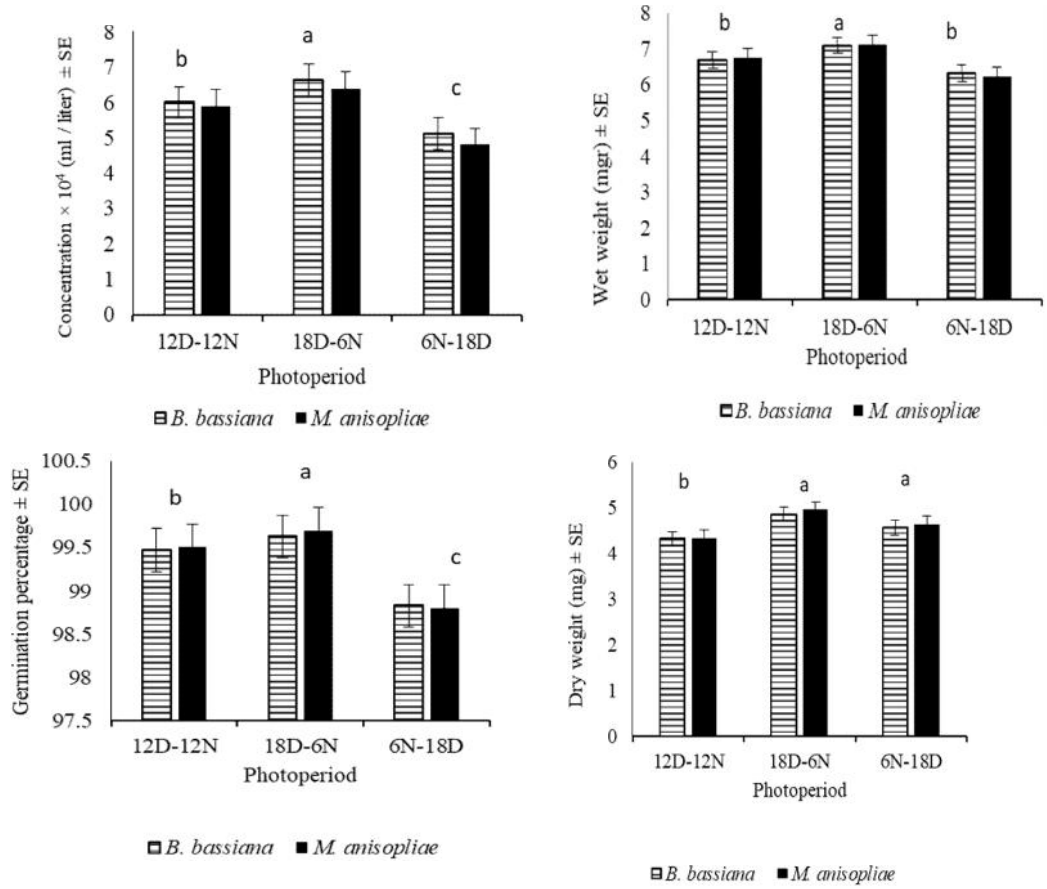
Treatments	Characteristics	*B. bassiana*		*M. anisopliae*	
		MS	CV (%)	MS	CV (%)
Photoperiod	Concentration of blastospore	2.354**	3.41	1.159**	2.39
	Germination percentage	0.723**	0.39	0.877**	0.8
	Wet weight	0.594**	1.70	0.169**	2.09
	Dry weight	0.571**	1.95	0.187**	8.09
Incubator round	Concentration of blastospore	51.72**	4.01	55.83**	3.77
	Germination percentage	128.11**	0.54	13.913**	0.87
	Wet weight	58.59**	2.8	55.281**	3.37
	Dry weight	36.42**	3.33	26.77**	10.2
Incubation period	Concentration of blastospore	0.422**	2.03	0.105**	2.45
	Germination percentage	0.351**	0. 39	1.13**	0.47
	Wet weight	0.161**	1.54	0.365**	2.26
	Dry weight	0.204**	1.89	0.123**	6.49

** نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**Indicates a significant difference at the 1% probability level

www.SID.ir

Archive of SID

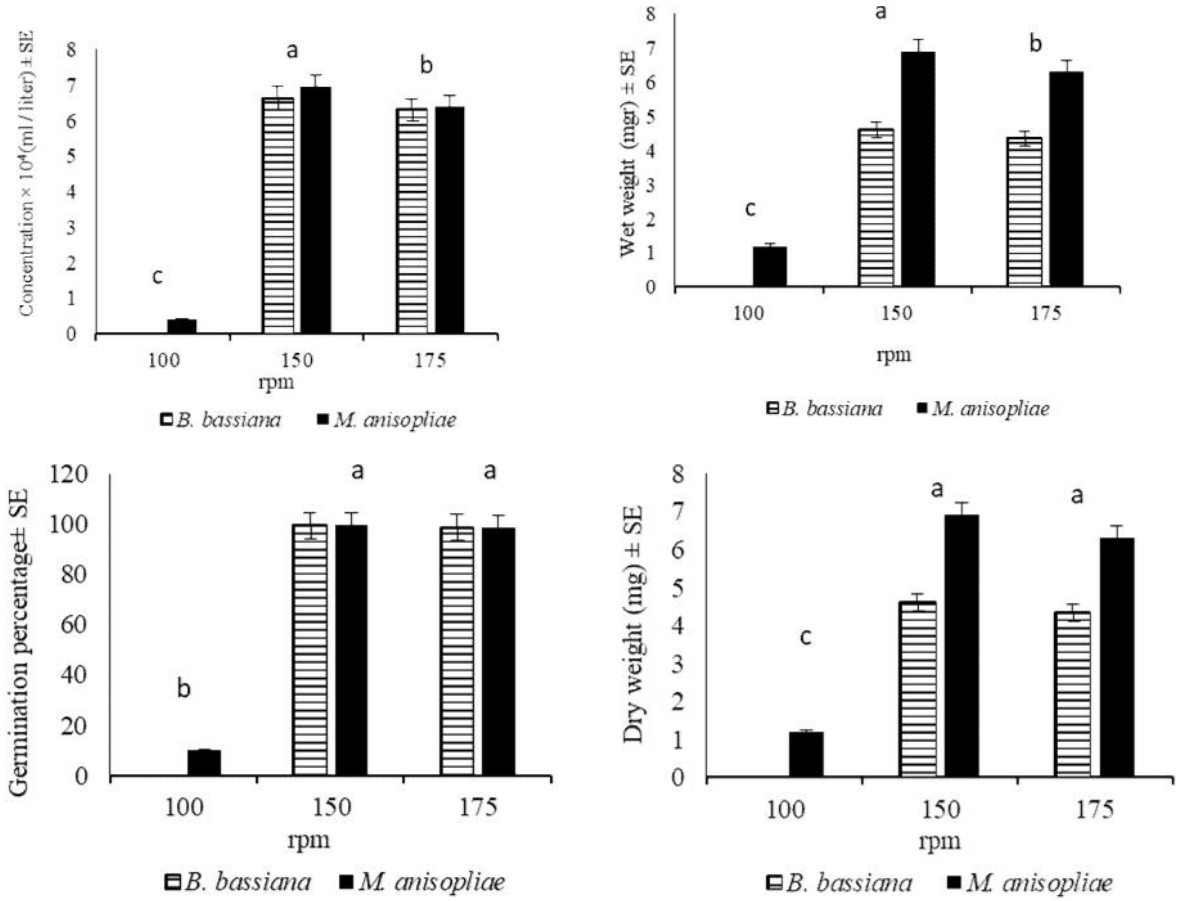


شکل ۱- مقایسه میانگین غلظت بلاستوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* در تیمارهای مختلف دوره نوری

Fig. 1. Comparison of mean concentration of blastospore, germination percentage, wet weight and dry weight of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* at different photoperiod treatments

www.SID.ir

Archive of SID

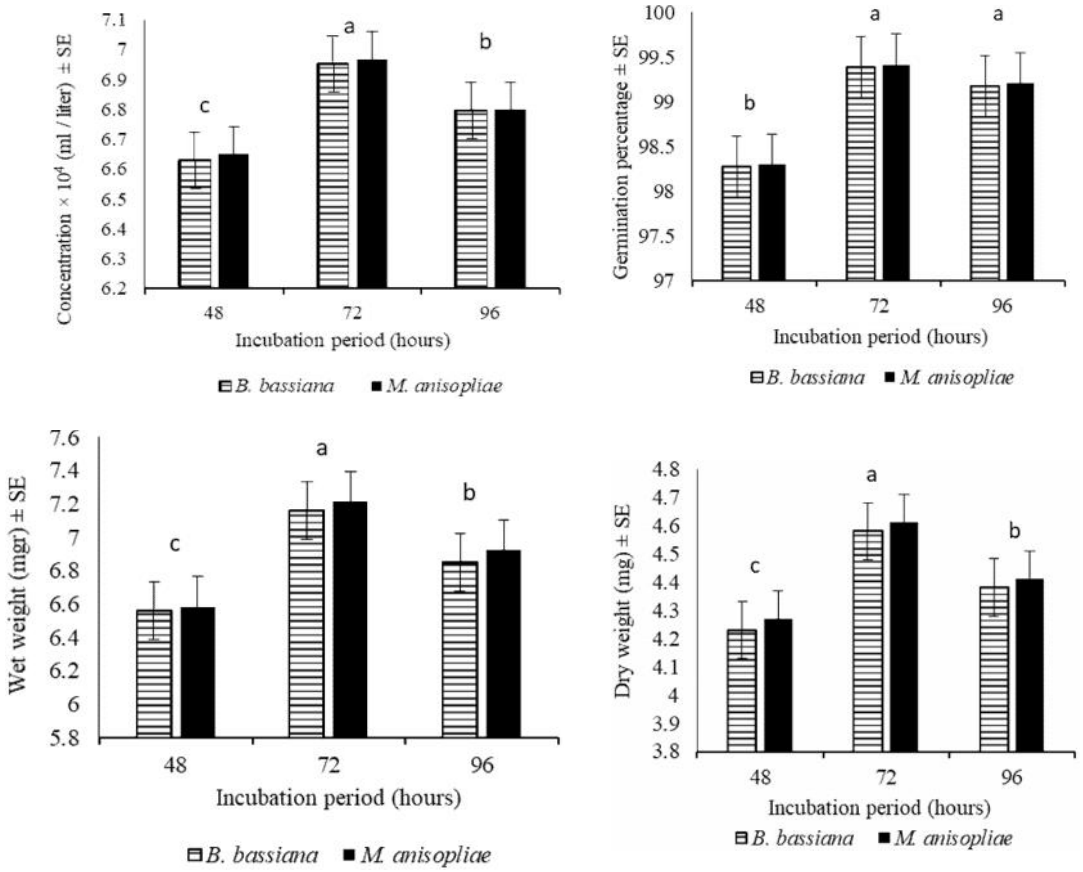


شکل ۲- مقایسه میانگین غلظت بلاستوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* تولید شده در دورهای متفاوت انکوباتور

Fig. 2. Comparison of mean concentration of blastospore, germination percentage, wet and dry weight of *B. bassiana* and *M. anisopliae* produced at different incubation periods

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- مقایسه میانگین غلظت بلاستوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *Metarhizium anisopliae* و *Metarhizium anisopliae* در تیمارهای مختلف دوره انکوباسیون

Fig. 3. Comparison of mean concentration of blastospore, germination percentage, wet weight and dry weight of *B. bassiana* and *M. anisopliae* in different incubation treatments

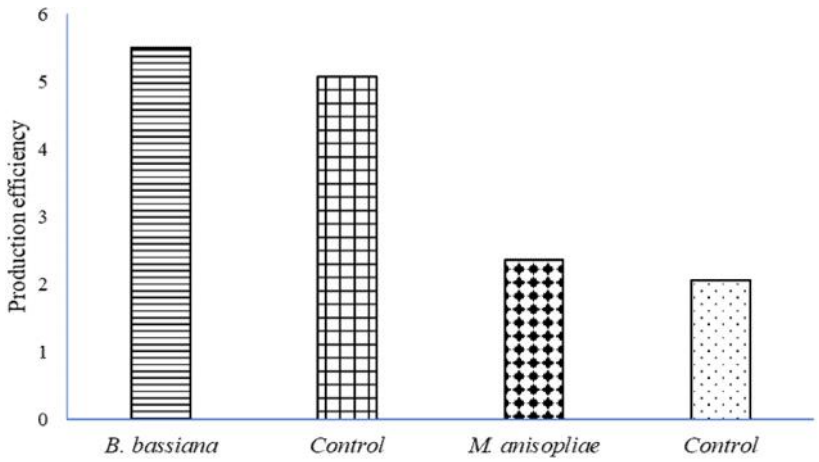
با افزایش زمان تلقیح، فاز تاخیری رشد جدایه‌های مورد مطالعه کاهش یافته ولی شاخص‌های رشد افزایش پیدا کرده است. همان طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌گردد، بالاترین غلظت بلاستوسپور، درصد جوانه‌زنی، وزن تر و وزن خشک قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط دوره انکوباسیون ۷۲ ساعت بوده است. در ارزیابی همزمان تأثیر دوره انکوباسیون در شرایط فرمانتاسیون مایع افزایش بیش از ۷۲ ساعت، همانند اثرات دور انکوباتور شیکردار اگر چه باعث کاهش وزن خشک، وزن تر و میزان اسپور تولیدی شده اما بر درصد جوانه‌زنی تأثیر منفی نداشت.

کارایی تولید

کارایی اقتصادی تولید، پارامتری تعین کننده است که براساس کمیت و کیفیت محصول تولیدی به ازای واحد وزن ماده خام مصرفی است که در شکل ۴ محاسبه شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



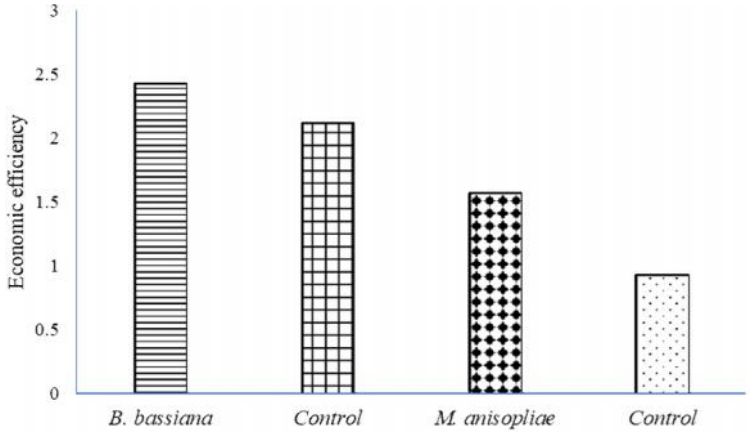
شکل۴- مقایسه کارایی تولید به ازای واحد وزن ماده اولیه مصرفی برای قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* نسبت به شاهد

Fig. 4. Comparison of production efficiency per unit weight of raw material used for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* related to control

همان‌طور که در شکل ۴ ملاحظه می‌شود بالاترین کارایی برای تولید قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط دوره نوری ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی، دور انکوباتور ۱۵۰ دور در دقیقه و دوره انکوباسیون ۷۵ ساعت بوده است. به طوری که کارایی تولید را نسبت به شاهد به ترتیب به میزان ۴/۲ و ۳/۱ درصد افزایش داده است.

کارایی اقتصادی

کارایی اقتصادی تولید نیز شاخصی تعیین کننده است که ضمن در نظر گرفتن کمیت و کیفیت محصول تولیدی به ازای واحد وزن ماده اولیه، ارزش اقتصادی بکارگیری شرایط تولیدی را براساس نتایج این پژوهش در برنامه تولید انبوه عامل کنترل میکروبی بیان می‌کند. مقدار این پارامتر در شکل ۵ برای تولید قارچ‌های مورد بررسی محاسبه شده است.



شکل۵- مقایسه کارایی اقتصادی به ازای واحد وزن ماده اولیه مصرفی برای قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* نسبت به شاهد

Fig. 5. Comparison of economic efficiency per unit weight of raw material used for *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* related to the control

www.SID.ir

Archive of SID

همان‌طور که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود بالاترین کارایی اقتصادی برای تولید قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط دوره نوری ۱۸ ساعت روشنایی و ۶ ساعت تاریکی، دور انکوباتور ۱۵۰ دور در دقیقه و دوره انکوباسیون ۷۲ ساعت بوده است. به عبارت دیگر این شرایط ضمن داشتن حداکثر کمیت و کیفیت محصول از نظر اقتصادی نیز بیشترین سود را خواهد داشت. در مجموع بکارگیری این شرایط کارایی تولید قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* را به ترتیب ۳/۰۷ و ۶/۴ درصد افزایش داده است.

بحث

کارایی تولید پارامتر تعیین کننده کمیت و کیفیت محصول تولیدی به ازای واحد وزن ماده خام مصرفی است. بالاترین کارایی در شرایط استفاده از فاز مایع اصلاح شده بوده است. به طوری که کارایی تولید را به ترتیب برای قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* به میزان ۴/۲ و ۳/۱ درصد افزایش داده است.

کارایی اقتصادی تولید نیز شاخصی است تعیین‌کننده که ضمن در نظر گرفتن کمیت و کیفیت محصول تولیدی به ازای واحد وزن ماده اولیه، ارزش اقتصادی بکارگیری 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* در حالت بکارگیری شرایط تولیدی در فاز مایع ضمن داشتن حداکثر کمیت و کیفیت محصول، از نظر اقتصادی نیز بیشترین سود را خواهد داشت. در مجموع بکارگیری این شرایط کارایی اقتصادی را به ترتیب برای قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* به میزان ۳/۰۷ و ۶/۴ درصد افزایش داده است.

نتایج این پژوهش نشان داد که در میان گونه‌های قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *M. anisopliae* تنها 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 ماده بود. همچنین نتایج نشان داد که اسپوردهی این قارچ‌ها تحت تأثیر دوره نوری، طول دوره انکوباسیون و سرعت پرخش انکوباتور متفاوت بود. در آغاز فرمانتاسیون میزان زیست توده خشک افزایش می‌یابد زیرا قارچ‌ها میسلیوم تولید می‌کنند. پس از ۷۲ ساعت کاهش ناگهانی مشاهده شد. سپس وزن خشک زیست توده کاهش یافت که با کاهش قابل توجه میسلیوم همراه بود. داده‌های مطالعات مشابه نشان دهنده تشکیل اگزالات بوده و در این زمان غلظت اسپور شروع به افزایش تا پایان فرمانتاسیون می‌کند. با این حال، بیش از ۹۵٪ زیست توده در ۷۲ ساعت اول تشکیل می‌شود. در طی فرآیند فرمانتاسیون مایع غلظت اسپورهای زنده به تدریج کاهش می‌یابد که مرتبط با کاهش میزان ساکارز در انتهای فرمانتاسیون است. مقایسه شاخص‌های تولید در این پژوهش با مطالعات مشابه بر روی قارچ *B. bassiana* بر روی محیط کشت برنج (Sahayaraj & Namasivayam, 2008) و بر روی مواد گیاهی مختلف از جمله نیشکر، ذرت، جو، برنج، ارزن و سورگوم (Ibrahim *et al*., 2015; Latifian *et al*., 2014; Latifian *et al*., 2013; Mar & Lumyong, 2012) کارایی بالاتری نشان داده است.

نتایج این پژوهش همچنین نشان داد که ترکیب دوره نوری دارای اثر مثبت قابل توجهی در تولید اسپور توسط قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *M. anisopliae* است. به طوری که دوره نوری با ۱۸ساعت روشنایی بیشتر از سایر تیمارها تولید اسپور کرده و توانایی جوانه‌زنی اسپورها نیز بالاتر بود. مطالعات مشابه دیگر نیز نشان دهنده اثرات مثبت افزایش دوره نوری روشنایی برای رشد و اسپوردهی قارچ *B. bassiana* بوده است (Zhang *et al*., 2009). همچنین یافته‌های سایر پژوهشگران نشان داده است که افزایش دوره نوری می‌تواند تولید اسپور قارچ *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal را ۲/۵ تا ۵ برابر بیشتر کند (Onofre *et al*., 2001). در پژوهشی دیگری نشان داده شد که قارچ *Metarhizium robertsii* Bisch., Rehner & Humber در شرایط نور آبی بیشتر رشد و اسپوردهی می‌کند (Oliveira *et al*., 2017). آن‌ها همچنین دریافتند

www.SID.ir

Archive of SID

که نور سفید موجب افزایش تولید اسپور در قارچ‌های جنس *Metarhizium* شده، اسپورهای حاصله سریع‌تر جوانه زده، قدرت کشندگی و بیمارگری بالاتری داشتند. آن‌ها علت این فرآیند را تولید مقادیر زیادتر پروتئین‌های قارچی کشنده بیان کردند (Ibrahim *et al*., 2002).

کارایی تولید اسپور در قارچ‌های بیمارگر با توجه به پارامترهای کلیدی مختلف مانند نوع محیط کشت مورد استفاده، اسیدیته، دما، رطوبت، نور، هوادهی، افزودنی‌های مختلف و سایر شاخص‌ها متفاوت است. شرایط مطلوب برای هر گونه قارچ بیمارگر و حتی هر جدایه خاص متفاوت بوده و لازم است قبل از ورود به فاز تولید صنعتی مورد مطالعه قرار گیرد (Loera *et al*., 2016; Mar & umyong, 2012; Mascarin G.M., Alves & Lopes, 2010; Muniz-Paredes *et al*., 2017). در میان شاخص‌های تنظیم دستگاهی که برای تولید در مقیاس بزرگ اهمیت خاص دارد، امکان هوادهی مداوم بستر است. هوادهی و تنظیم دور فرمانتور شاخص مهمی در تنظیم سیستم برای تولید بهینه اسپور است. با این حال، در سیستم‌های تولیدی صنعتی هوادهی همراه با کنترل دما و رطوبت ضروری است (Taylor *et al*., 2013).

نتایج این مطالعه نشان داد که تنظیمات دستگاهی پروتکل تولید این دو قارچ از جمله دوره نوری، دوره انکوباسیون و سرعت چرخش انکوباتور شیکردار شرایط بهتری برای تولید انبوه جدایه‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* بود. پارامترهای ارزیابی شده در این مطالعه یک راهکار امیدوارکننده حتی برای تولیدکنندگان در مقیاس متوسط با هزینه کم خواهد بود. نتایج حاصل از پژوهش حاضر تأیید می‌کند که هر گونه قارچ شرایط بهینه دستگاهی خاصی برای افزایش ضریب تولید نیاز دارد. علاوه بر این نتایج بدست آمده اطلاعاتی را برای درک بهتر از نیازهای کلیدی تنظیم دستگاهی تکثیر در مرحله فرمانتاسیون مایع ارائه می‌دهد. ذکر این نکته ضروری است که تولید اسپور در مقیاس کوچک و متوسط با توجه به شاخص‌های کلیدی مختلفی مانند نوع محیط کشت مورد استفاده در فرمانتاسیون، اسیدیته، دما، رطوبت، نور، هوادهی، مواد افزودنی مختلف وابسته بوده و باید شرایط بهینه برای هر گونه قارچی بیمارگر مورد بررسی قرار گیرد.

References

Babu, J., Venkatachalapathy, C.M. & Anitha, C.N. 2008. Evaluation of locally available substrates for mass multiplication of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin. Journal of Invertebrate Pathology, 46: 335–336.

Blanco–Metzler, H. 2004. Pheromones and their uses in integrated pest management. Manejo, 71: 112–118 (in Spanish)

Bradley, C.A., Black, W.E., Kearns, R. & Wood, P. 1992. Role of production technology in mycoinsecticide development. In: Frontiers in Industrial Microbiology. Springer, Boston, MA, 160–173.

Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N. 2001. Fungi as biocontrol agents: progress problems & potential. In: Fungi as biocontrol agents, 1–8.

Charnley, A.K. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: The mycota IV environmental and microbial relationships, 185–201.

Eslamizadeh, R., Sajap, A.S.B., Omar, D.B., Azura, N. & Adam, B. 2015. Evaluation of dierent isolates of the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Biological Control in Plant Protection, 2: 82–90.

Faria, M.R. & Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control, 43: 237–256.

Gao, L. 2011. A novel method to optimize culture conditions for biomass and sporulation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* IBC1201, Brazilian Journal of Microbiology, 42: 1574–1584.

Ghazavii, M., Kharazi– Pakdel, A., Ershad, J. & Bagherizonouz, E. 2002. Efficiency of Iranian isolates of Beauveria *bassiana* against *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). Appied Eentomoly and Phytopathology, 69(2): 111–128

Hajek, A.E. & Delalibera, I. 2010. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. BioControl, 55: 147–158.

www.SID.ir

Archive of SID

Ibrahim, L., Butt, T.M. & Jenkinson, P. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. Mycological Research, 106: 705–715.

Ibrahim, L., Laham, L., Touma, A. & Ibrahim, S. 2015. Mass production, yield, quality, formulation and efficacy of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* conidia. British Journal of Applied Science and Technology, 9(5): 427–440.

Inglis, G.D., Goettel, T.M. & Strasser, B. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest. In: Fungi as Biocontrol Agents, 23–69.

James, R. 2001. Effects of Exogenous Nutrients on Conidial Germination and Virulence against Silverleaf Whitefly for Two Hyphomycetes. Journal of Invertebrate Pathology, 77: 99–107.

Jaronski, S.T. & Mascarin, G.M. 2017. Mass Production of Fungal Entomopathogens. In: Microbial Control of Insect and Mite Pests, 9: 141–155.

Jaronski, S.T. 2014. Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art. In: Mass production of beneficial organisms invertebrates and entomopathogens, 357–413.

Kleespies, R.G. & Zimmermann, G. 1992. Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorotkin in submerged culture. Biocontrol Science Technology, 2: 127–135.

Latifian, M., Rad, B. & Amani, M. 2014. Mass production of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* by using agricultural products based on liquid–solid diphasic method for date palm pest control. International Journal of Farming and Allied Sciences, 3(4): 368–372.

Latifian, M., Rad, B., Amani, M. & Rahkhodaei, E. 2013. Mass production of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) by using agricultural products based on liquid–solid diphasic method for date palm pest control. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 5(19): 23–37.

Lecuona, R.E. 1996. Pathogenic microorganisms used in the microbial control of insects plague. Buenos Aires: Martin Mass, 338 pp. (in Spanish)

Loera, O., Porcayo, J., Loza, R., Montesinos, M. & Favela, E. 2016. Production of Conidia by the Fungus *Metarhizium anisopliae* Using Solid–State Fermentation. Methods in Molecular Biology, 1477: 61–69.

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.

Mascarin, G.M., Alves, S.B. & Lopes, R.B. 2010. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53(4): 753–761.

Mascarin, G.A. & Jaronski, S.T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(11): 177.

Muniz –Paredes, F., Miranda, F. & Loera, O. 2017. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33: 57.

Oliveira, A.S., Braga, G.U.L. & Rangel, D.E.N. 2017. *Metarhizium robertsii* illuminated during mycelial growth produces conidia with increased germination speed and virulence. Fungal Biology. doi: 10.1016/j.funbio.2017.12.009

Onofre, S.B., Miniuk, C.M., de Barros, M. & Azevedo, J.L. 2001. Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. flavoviride on culture media and lighting regimes. Science Agriculture, 58: 613–616.

Pham, T.A., Kim, J.J. & Kim, K. 2010. Optimization of Solid–State Fermentation for Improved Conidia Production of *Beauveria bassiana* as a Mycoinsecticide. Microbiology, 38: 137–143.

Pham, T.A., Kim, J.J., Kim, S.G. & Kim, K. 2009. Production of Blastospore of Entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a Submerged Batch Culture. Mycobiology, 37: 218–224.

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.

Sahayaraj, K. & Namasivayam, S.K.R. 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. African Journal of Biotechnology, 7(12).

Santos, A., de Oliveira, A. & Samuels, R. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub–lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leafcutting ant *Atta sexdens* rubropilosa Forel (Hymenoptera: Formicidae). Mycopathologia, 163: 233–240.

Shah, P.A. & Pell, J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Applied Microbiology and Biotechnology, 61: 413–423.

Tall, S. & Meyling, N.V. 2018. Probiotics for plants? Growth promotion by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* depends on nutrient availability. Microbial Ecology, 76: 1002–1008.

Taylor, B., Edgington, S., Luke, B. & Moore, D. 2013. Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations. Journal of Stored Products Research, 53: 23–26.

www.SID.ir

Archive of SID

Téllez–Martínez, M., Alcalá–Gómez, G.G., Jiménez–Islas, H. & Navarrete–Bolaños, J.L. 2016. Design of an efficient fermentation process for the production of Metarhizium acridum blastospores, Biocontrol Science and Technology, 26:12, 1652–1667.

Thakre, M., Thakur, M., Malik, N. & Ganger, S. 2011. Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro wastes. Journal of Biopesticides, 4(2): 176–179.

Vega, F.E. 2018.The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: A review. Mycologia, 110: 4–30.

Wraight, S.P., Jackson, M.A. & de Kock, S.L. 2001. Production, Stabilization and Formulation of Fungal Biocontrol Agents. In: Fungi as biocontrol agents, 253–288.

Wraight, S.P., Carruthers, R.I., Jaronski, S.T., Bradley, C.A., Garza, C.J. & Galaini–Wraight, S. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, Bemisia argentifolii. Biological Control, 17(3): 203–217.

Xu, Y., Orozco, R., Wijeratne, E.K., Gunatilaka, A.L., Stock, S.P. & Molnár, I. 2008. Biosynthesis of the cyclooligomer *depsipeptide beauvericin*, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Chemistry & Biology, 15: 898–907.

Zhang, Y.J., Li, Z.H., Luo, Z.B., Zhang, J.Q., Fan, Y.H. and Pei, Y. 2009. Light stimulates conidiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Biocontrol Science Technology, 19: 91–101.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of photoperiod, incubation time and shaker incubation rotation speed on production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in liquid fermentation

Masoud Latifian[1], Bahar Rad[2]

1. Tropical and Subtropical Fruit Office, Horticulture Science Research Institute, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran
2. Date Palm and Tropical Fruits Research Center, Horticulture Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran
Corresponding author: Masoud Latifian: masoud_latifian@yahoo.com

Received: Aug., 13, 2020 7(2) 139-152 Accepted: Oct., 12, 2020

Abstract

The success of pest control using insect pathogenic fungi such as *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* depends on practical and economical methods for their mass production. In this study, the effects of light periods (including 12-12, 18-6 and 18-6 light and dark), incubation times (48, 72- and 96-hours) and incubator rotations (100, 150 and 200 rpm) were investigated based on blastospore concentrations of the two fungi in 4 replications. The results showed that different treatments including light periods, incubation times and incubator rotations had significant difference on *B. bassiana* and *M. anisopliae* fungi in terms of spores concentrations, germination percentage, wet and dry weights production in complete liquid phase for blastospore at 1% probability level. The highest concentration of blastospore, germination percentage, wet weight and dry weight of *B. bassiana* and *M. anisopliae* were 18 hours of light and 6 hours of darkness, rotation rate of incubator of 150 rpm and incubation period of 75 hours. Also, the results of this study showed that *B. bassiana* and *M. anisopliae* can be replicated with good performance of sugarcane byproducts and maintain the germination capacity of blastospore. The highest concentration of blastospore, germination percentage, fresh weight and dry weight of *B. bassiana* and *M. anisopliae* were incubated at 150 rpm. According to the results of this study, two species of pathogenic fungi can be produced by using a combination of environmental conditions and incubator device settings with good production performance and appropriate economic efficiency.

Keywords: entomopathogenic fungi, mass production, liquid fermentation, machine settings

www.SID.ir