The University of Tehran Press

Biological Control of Pests and Plant Diseases

Online ISNN: 2322-2883

Homepage: https://jbiocontrol.ut.ac.ir/

Mass production of two entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* using diphasic fermentation

Maryam Rashki✉

Department of Biodiversity, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail: ma_rashkigh@yahoo.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 2 April 2024

Revised: 29 May 2024

Accepted: 9 June 2024

Published online: Spring 2023

Keywords:

Conidia,

entomopathogenic fungi,

solid substrate,

whey.

ABSTRACT

The aim of this research was the laboratory production of two efficient and native strains, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Beauveria bassiana* Z1, using a diphasic fermentation method using solid substrates (wheat, cooked rice, barley, sorghum and wheat bran) followed by a liquid substrate (whey) at 25 ºC. The maximum number of submerged conidia was significantly produced in 50 ml whey compared to dextrose agar liquid medium. The solid substrates were then inoculated by submerged conidia obtained from whey. After 14 days, 1 gram of each solid substrate was immersed in 100 ml of Tween. The highest average number of aerial conidia of *M. anisopliae* in one ml was obtained in rice substrate ($1.08\times10^7\pm2.42\times10^5$) and wheat bran ($1.06\times10^7\pm1.86\times10^5$) without any significant difference. The survival percentage was 100% for all solid substrates except sorghum (98.90%). The highest number of conidia produced by *B. bassiana* was observed on the wheat bran (5.14×10^6 conidia/ml). However, it was much easier to handle the wheat, which produced $4.30\times10^6\pm3.71\times10^4$ conidia per ml, than wheat bran for mass production of *B. bassiana*. The lowest percentage of survival (39.20%) was observed in barley. The number of conidia in one gram of *M. anisopliae* obtained by sieving rice and *B. bassiana* obtained by sieving wheat was 2.85×10^{10} and 3.09×10^{10} conidia, respectively. The results clarified that the diphasic method using whey with the applied concentration was successful for both strains and produced an appropriate amount in the solid fermentation phase.

Cite this article: Rashki, M. (2023). Mass production of two entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* using diphasic fermentation. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 12 (1), 11-28. DOI: https://doi.org/10.22059/JBIOC.2024.374002.338

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/JBIOC.2024.374002.338

Extended Abstract

Entomopathogenic fungi often cause high levels of epizootic disease in nature, and biological control agents are broad-spectrum and environmentally safe. Global cheese production generates more than 100 million tonnes of liquid whey per year, which, if discarded, is considered an environmental pollutant. Cereals and agricultural wastes are used as the main substrates for the mass production of entomopathogenic fungi in different regions of the world, depending on their suitable transport characteristics and cost. In the current research, a diphasic fermentation method involving the production of spores in whey and then injection into solid substrates including rice, wheat, sorghum, barley and wheat bran was used to produce aerial conidia and various parameters such as the number of spores produced, the percentage of viability and the amount of resistance to different temperatures were investigated. Two isolates of pathogenic fungi, including *Metarhizium anisopliae* var *acridum* and *Beauveria bassiana* Z1, whose pathogenicity on various pests had been previously studied, were used to carry out the experiments and investigate the mass production process of conidia. For the first stage, cultivation and multiplication of spores in the whey, the liquid culture medium containing 87.5 g of whey powder in one litre of distilled water was prepared and autoclaved. In contrast, another culture medium containing 20 g of dextrose plus 20 g of yeast in one litre of distilled water was prepared and autoclaved. In the case of solid substrate fermentation, five substrates were prepared, including wheat, barley, rice, sorghum,

and wheat bran. Two hundred grams of each substrate except bran were washed with tap water and then dried and poured into five-litre plastic bags with 100 ml of water. All substrates were autoclaved. To aerate the substrates, the open part of the bag was passed through a plastic cylinder and then covered with a layer of cloth, paper towels, and aluminium foil, respectively. After 72 hours, the amount of spores obtained in liquid culture media was checked. Whey was a more suitable culture medium for the cultivation and production of submerged spores. The results showed that the highest amount of conidia of *M. anisopliae* per ml was significantly obtained from rice and wheat bran. The lowest amount of conidia production also belonged significantly to sorghum. The highest number of *B. bassiana* conidia per ml was obtained from wheat bran. Then, the wheat substrate produced the highest amount of conidia. The lowest amount of conidia also belonged significantly to barley. For *M. anisopliae*, the viability of conidia obtained from all substrates except sorghum was 100% and there was a significant difference between these two groups. The results showed that for *B. bassiana*, the viability of conidia obtained from all substrates except barley was 100% and there was a significant difference between these two groups. The viability percentages of both isolates were determined at ambient temperature on rice and wheat, respectively, after 11 days.The mean viability percentage of *M. anisopliae* was 97.2%. This value was 100% for *B. bassiana*. The moisture content of cooked rice and wheat was 60.96% and 40.96%, respectively. One gram of conidial powder of *M. anisopliae* obtained from sieving rice and *B. bassiana* obtained from wheat sieving contained about 2.85×10^{10} and 3.09×10^{10} conidia, respectively. The results for *B. bassiana* Z1 showed that the viability percentage of conidia after eight weeks of storage was maintained at the same level of 100% in all ratios of talc powder and without talc powder. However, for *M. anisopliae*, the viability percentage of conidia increased significantly with the increase in talc powder. In addition, without the presence of talc powder, the viability rate of *M. anisopliae* var *acridum* decreased from 97.2 to 72.40%. The results of the present research showed that the two-phase method using whey was successful for both isolates and led to proper conidia production in the solid fermentation phase. This diphasic method with the described combination was carried out for the first time for insect pathogenic fungi mass production. Future studies should aim to optimise the mass production process based on whey, cereal grains and agricultural waste. An important issue in the mass production of entomopathogenic fungi is screening the substrates to harvest conidia, especially wheat bran. Using advanced technologies, equipped digital sieves and shakers with specific settings for each substrate should be designed and built to obtain the maximum yield by avoiding conidial waste.

.

نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی، دوره ۱۲، شماره ۱

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۸۰۹۰

Homepage: https://jbiocontrol.ut.ac.ir/

تولید دو قارچ بیمارگر حشرات، *Metarhizium anisopliae* و *Beauveria bassiana*، با استفاده از روش تخمیر دو مرحله‌ای

مریم راشکی✉

نویسندهٔ مسئول، گروه تنوع زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: ma_rashkigh@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۱۴
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۳/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۰
تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۲

کلیدواژه‌ها:
آب پنیر، بستر جامد، قارچ بیمارگر حشرات، کنیدی.

چکیده

هدف از این تحقیق، تولید آزمایشگاهی دو سویهٔ کارآمد و بومی، *Metarhizium anisopliae var. acridum* و *Beauveria bassiana* Z1 ، با استفاده از روش تخمیر دو مرحله‌ای باکاربرد بسترهای جامد (گندم، برنج پخته، جو، سورگوم و سبوس گندم) به‌دنبال بستر مایع (آب پنیر) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بود. حداکثر کنیدی‌های غوطه‌ور به‌طور معنی‌دار در ۵۰ میلی‌لیتر آب پنیر در مقایسه با محیط کشت مایع دکستروز آگار تولید شد. سپس، بسترهای جامد توسط کنیدی‌های غوطه‌ور بدست‌آمده از آب پنیر تلقیح‌شدند. پس از ۱۴ روز، یک گرم از هر بستر جامد در ۱۰۰ میلی‌لیتر توئین غوطه‌ور شد. بیشترین میانگین تعداد کنیدی‌های M. anisopliae در یک میلی‌لیتر از بستر برنج (۱۰۵×۲/۴۲±۱۰۷×۱/۰۸) و سبوس گندم (۱۰۵×۱/۸۶±۱۰۷×۱/۰۶) بدون تفاوت معنی‌دار به‌دست‌آمد. درصد زنده‌مانی برای تمامی بسترهای جامد به‌استثنای سورگوم (۹۸/۹۰ درصد) ۱۰۰ درصد بود. بیشترین تعداد کنیدی تولیدشده توسط قارچ *B. bassiana* روی بستر سبوس گندم مشاهده شد (۱۰۵×۱۰۶/۰۹±۱۰۷×۵/۱۴ کنیدی در میلی‌لیتر). کار با گندم که ۱۰۵×۱۰۶±۱۰۷×۴/۳۰ کنیدی در میلی‌لیتر تولید کرد، بسیار آسان‌تر از سبوس گندم بود. در بستر جو کمترین درصد زنده‌مانی (۳۹/۲۰ درصد) مشاهده شد. تعداد کنیدی‌ها در یک گرم از قارچ *M. anisopliae* حاصل از الک‌کردن بستر برنج و قارچ *B. bassiana* حاصل الک‌کردن بستر گندم، به ترتیب ۱۰۱۰ × ۲/۸۵ و ۱۰۱۰× ۳/۰۹ کنیدی بود. نتایج نشان‌داد که روش دو مرحله‌ای با استفاده از آب پنیر با غلظت استفاده‌شده، در مورد هر دو جدایه موفقیت‌آمیز بود و میزان مناسبی از کنیدی هر دو جدایه را در مرحلهٔ تخمیر جامد تولید کرد.

استناد: راشکی، مریم (۱۴۰۲). تولید دو قارچ بیمارگر حشرات، *Metarhizium anisopliae* و *Beauveria bassiana*، با استفاده از روش تخمیر دو مرحله‌ای. *نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی*، ۱۲ (۱)، ۲۸-۱۱. DOI: https://doi.org/10.22059/JBIOC.2024.374002.338

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/JBIOC.2024.374002.338

مقدمه

آفت‌کش‌های زیستی مبتنی بر باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و نماتدهای بیماری‌زا اغلب بعنوان عوامل حفاظت از گیاهان در برابر حشرات متعدد مورد توجه هستند (Noris *et al.*, 2002). قارچ‌های بیمارگر حشرات مانند *Metarhizium anisopliae* و *Beauveria bassiana* انگل‌های قارچی اختیاری هستند و توانایی رشد روی هر دو محیط کشت غیرزنده و زنده را دارند. کنترل میکروبی، ابزار مهمی در مدیریت تلفیقی آفات است و انتخاب آن از نظر اکولوژیکی یک راهبرد مطلوب برای کاهش جمعیت آفات و در نتیجه کاهش خسارات آن‌ها در اکوسیستم‌های مختلف کشاورزی، در مقایسه با کنترل شیمیایی معمول، محسوب می‌شود (Barrancoflorido *et al*., 2002; Inglis *et al*., 2001).

قارچ‌های بیمارگر حشرات، اغلب سطوح بالایی از همه‌گیری را در طبیعت ایجادمی‌کنند و به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک با دامنهٔ اثر نسبتاً گسترده و از نظر زیست‌محیطی بی‌خطر محسوب‌می‌شوند. از ویژگی‌های قابل‌توجه این قارچ‌ها نحوه اثر از طریق تماس و نفوذ بداخل بدن میزبان است. این قارچ‌ها گروه متنوعی از بیش از ۱۰۰ جنس با تقریباً ۷۵۰ گونه را شامل‌می‌شوند که از حشرات مختلف جدا شده‌اند (St. Leger and Wang, 2010). بسیاری از این قارچ‌ها از لحاظ کاربرد در مدیریت آفات پتانسیل بالایی دارند. جنس‌های قابل توجه به قارچ‌های *Beauveria*، *Metarhizium*، *Nomuraea*، *Lecanicillium* و *Hirsutella* تعلق دارند (Jaronski, 2012). قارچ *M. anisopliae* دومین قارچ بیمارگر حشرات است که به‌طور گسترده در آزمایشات کنترل زیستی مورد بهره‌برداری قرارگرفته است و بیش از ۲۰۰ گونه از حشرات متعلق به راسته‌های سخت‌بالپوشان، گوشخیزک‌ها، ناجوربالان و جوربالان، بالپولکداران و راست‌بالان را مورد حمله قرار می‌دهد (Agale *et al*., 2018).

آمارها نشان داد که ۱۲۹ محصول فعال بر پایه حشره‌کش‌های قارچی وجود دارد (De Faria and Wraight, 2007). متعاقباً بیش از ۶۷ محصول براساس گونهٔ *Beauveria bassiana* شناسایی‌شد (Mascarin and Jaronski, 2016). بیش از ۲۰۰ محصول تجاری براساس قارچ های‌بیمارگر حشرات موجود است (Jaronski, 2023). یک ویژگی مشترک قارچ‌های بیمارگر فوق‌الذکر این است که چرخه آلودگی با تماس اسپور با کوتیکول بندپایان آغازمی‌شود و هیف به‌وسیله چندین آنزیم و فشار مکانیکی به داخل کوتیکول بندپایان نفوذمی‌کند. قارچ به‌محض ورود به حفرهٔ عمومی بدن، از طریق تولید اجسام هیفی، بلاستوسپورها و میسلیوم تکثیر می‌شود (Jaronski, 2023). برای تولید قارچ‌های بیمارگر حشرات نیاز به تشکیل فرم آلودگی مانند کنیدی یا بلاستوسپور است که این اشکال به روش‌های مختلف شامل تخمیر بستر جامد[۲]، کشت مایع[۳] و تخمیر دو مرحله‌ای[۴] تولید می‌شوند (Vegă *et al*., 2012).

کارآمدترین روش برای تولید انبوه قارچ‌های آسکومیست، تخمیر دو مرحله‌ای است (Jaronski, 2023). این روش ترکیبی از کشت مایع و جامد است و به‌عنوان تخمیر بستر جامد شناخته‌می‌شود که شامل تولید حداکثری اسپورها در محیط‌های مایع و به‌دنبال آن تلقیح یک بستر جامد مانند جو یا برنج است که محیط مایع را جذب‌می‌کند (Grace and Jaronski, 2005). طیف وسیعی از محیط‌های کشت برای مرحلهٔ تخمیر مایع استفاده شده‌است. ساده‌ترین محیط، دکستروز/ساکارز به‌عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به‌عنوان منبع ترکیبات نیتروژن‌دار و ویتامین‌ها است (Jaronski and Jackson, 2012).

آب پنیر محصول جانبی تولید پنیر و کازئین است (Pintado *et al*., 1999a). با تولید جهانی پنیر، سالانه بیش از ۱۰۰ میلیون تن آب پنیر مایع تولید می‌شود (Morales *et al*., 2006) و اگر دور ریخته شود یک آلاینده زیست محیطی محسوب می‌شود (Yang and Silva, 1995). آب پنیر مایعی رقیق حاوی لاکتوز، پروتئین، مواد معدنی و مقادیری از چربی است و محتوای پروتئین تقریباً ۱۲ درصد، میزان لاکتوز آب پنیر حدود ۷۳ درصد و محتوای مواد معدنی حدود هشت درصد است

1- Blastospores
2- Solid-substrate fermentation
3- Liquid culture
4- Diphasic fermentation

(Zall, 1992). بنابراین، به‌دلیل داشتن میزان بالای قند به همراه پروتئین و مواد معدنی می‌تواند محیط کشت مناسبی برای تولید قارچ‌های بیمارگر حشرات محسوب شود.

طیف گسترده‌ای از مواد آلی به‌عنوان بستر برای تولید آسکومیست‌ها مورد ارزیابی قرارگرفته است. به‌عنوان مثال، برنج و جو به‌عنوان بسترهای اصلی در مناطق استوایی و نیم‌کره شمالی مورد استفاده قرار می‌گیرد و در هند، پاکستان و چین مواد کشاورزی ارزان قیمت به‌ویژه محصولات جانبی و ضایعات به عنوان بسترهای مناسب شناسایی شده است و در آمریکای شمالی و اروپا، جو، به‌ویژه جو پرک به‌دلیل ویژگی‌های خوب حمل و نقل و هزینه کمتر، نسبت به برنج ترجیح داده می‌شود (Jaronski and Jackson, 2012).

در تحقیق حاضر، از روش تخمیر دو مرحله‌ای شامل تولید اسپور غوطه‌ور در آب پنیر و سپس تلقیح به بسترهای جامد شامل دانه‌های برنج، گندم، سورگوم، جو و سبوس گندم برای تولید کنیدی هوایی استفاده شد و پارامترهای مختلف مانند میزان اسپور تولیدشده، درصد تندش و مقاومت در برابر دماهای مختلف مورد بررسی قرارگرفت. دو جدایه از قارچ‌های بیمارگر شامل *Metarhizium anisopliae* var *acridum* و *Beauveria bassiana* Z1 که قبلا بیمارگری آن‌ها روی آفات مختلف بررسی شده بود، برای انجام آزمایش‌ها و بررسی فرایند تولید انبوه کنیدی استفاده شد.

روش‌شناسی پژوهش

بررسی و انتخاب قارچ‌های بیمارگر حشرات

با توجه به نتایج تحقیقات گذشته (کاظمی و همکاران، ۱۳۹۹؛ رحمانی و همکاران،۱۴۰۰؛ Sohrabi *et al*., 2019) درخصوص تأثیر قارچ‌های بیمارگر حشرات علیه برخی آفات انباری، قارچ‌های *B. bassiana* جدایهٔ Z1 (گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران) و *M. anisopliae* واریته *acridum* (گروه تنوع زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران) برای تولید انبوه انتخاب شدند. منشأ قارچ *M. anisopliae* از ملخ صحرایی و قارچ *B. bassiana*از *Spodoptera exigua* Hubner. (Lepidoptera: Noctuidae) گزارش شده است.

تهیه و نگهداری کنیدی‌های قارچ‌های بیمارگر حشرات

پس از آلوده‌سازی سوسک قرمز آرد، *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) و لارو موم‌خوار بزرگ، *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)، (موجود در آزمایشگاه گروه تنوع زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران) توسط دو جدایه، قارچ‌های به‌دست‌آمده روی محیط کشت حاوی Potato dextrose agar (PDA) به‌مدت دو هفته کشت‌شدند. پس از تولید کنیدی، محیط‌های کشت طی شب زیر هود خشک و پس از جمع‌آوری در لوله‌های شیشه‌ای (Hansen and Steenbery, 2007) در داخل دسیکاتور حاوی سیلیکاژل در دمای چهار درجهٔ‌سلسیوس ذخیره شدند. بدین‌ترتیب، قدرت تندش کنیدی‌ها به‌مدت طولانی حفظ خواهدشد.

تهیه و آماده‌سازی بسترهای کشت

بستر کشت مایع

محیط کشت مایع حاوی ۸۷/۵ گرم پودر آب پنیر در یک لیتر آب مقطر (Kassa *et al*., 2008) تهیه و اتوکلاو شد. درمقابل، محیط کشت دیگری، حاوی ۲۰ گرم دکستروز بعلاوه ۲۰ گرم مخمر در یک لیتر آب مقطر تهیه و اتوکلاو شد.

[5]- Submerged conidia

بستر کشت جامد

پنج بستر جامد تهیه شد که شامل بذر چهار غلهٔ گندم، جو، برنج، سورگوم و سبوس گندم جزو ضایعات کشاورزی بود. مقدار ۲۰۰ گرم از هر بستر بجز سبوس ابتدا با آب شیر شستشو داده شد و سپس، خشک و از هر بستر به میزان ۲۰۰ گرم داخل کیسه‌های پلاستیکی (به حجم پنج لیتر) به‌همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ریخته‌شد. تمامی بسترها اتوکلاو شدند. به‌منظور تهویه بسترها، دهانه کیسه از یک استوانه پلاستیکی عبور داده‌شد و سپس، به‌ترتیب با یک لایه پارچهٔ توری، دستمال‌کاغذی و فویل آلومینیومی پوشانده شد (Belay *et al*., 2017).

تلقیح بسترهای کشت با اسپور قارچ‌های بیمارگر حشرات

تلقیح بسترهای کشت مایع با کنیدی

غلظت ۱×۱۰^{۷} کنیدی از هر قارچ بیمارگر به‌میزان یک میلی‌لیتر به ۵۰ سی‌سی از هر محیط کشت مایع شامل آب پنیر و دکستروز بعلاوهٔ مخمر اتوکلاو و سرد شده اضافه شد. برای تعیین غلظت هر دو قارچ ابتدا سوسپانسیونی از کنیدی قارچ در توین ۸۰ (۰/۰۲٪ درصد) تهیه و سپس، به‌منظور جداسازی رشته‌های میسلیومی از کنیدی‌ها، از گلوله‌های شیشه‌ای و شیکر استفاده شد. بعد از عبوردادن سوسپانسیون از پارچه توری دو لایهٔ استریل، تراکم کنیدی در واحد حجم با استفاده از لام گلبول‌شمار و فرمول $۵\text{x} \times ۱۰^{۴}$ محاسبه و از طریق معادله $C_1V_1 = C_2V_2$ غلظت موردنظر یعنی ۱×۱۰^{۷} کنیدی در میلی‌لیتر تهیه شد.

محیط‌های کشت حاوی کنیدی قارچها (۵۰ میلی‌لیتر) در ارلن‌های ۲۵۰ سی‌سی برای ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ-سلسیوس داخل شیکر–انکوباتور با ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شدند.

تلقیح بسترهای کشت جامد با اسپورهای غوطه‌ور

پس از گذشت ۷۲ ساعت از کشت کنیدی‌های دو قارچ در محیط‌های مایع (آب پنیر و دکستروز بعلاوهٔ مخمر)، یک سی‌سی از کشت‌های مایع حاوی اسپور غوطه‌ور به کیسه‌های حاوی بسترهای جامد تزریق‌شد. سپس، کیسه‌ها در دمای ۲۵ درجهٔ-سلسیوس به‌مدت ۱۴ روز در تاریکی نگهداری‌شدند. هر سه تا چهار روز پس از تلقیح، بدون بازکردن درب کیسه‌ها، مواد به آرامی با دست خرد و مخلوط‌شدند. همچنین، پس از چهار روز، پوشش آلومینیومی درب کیسه‌ها برداشته‌شد (Belay *et al*., 2017).

شمارش تعداد اسپورهای تولیدشده

بسترهای مایع

پس از گذشت ۷۲ ساعت از کشت کنیدی‌های دو قارچ در دو محیط کشت مایع (آب پنیر و دکستروز بعلاوهٔ مخمر)، تعداد اسپورهای غوطه‌ور تولیدشده در آن‌ها شمارش‌شدند. از هر محیط کشت مایع حاوی اسپور غوطه‌ور پنج تکرارآماده‌شد. تراکم کنیدی در واحد حجم با استفاده از لام گلبول‌شمار و فرمول $۵\text{x} \times ۱۰^{۴}$ محاسبه‌شد.

بسترهای جامد

پس از ۱۴ روز، کنیدی‌های تولیدشده برای شمارش، از بسترهای جامد جداسازی‌شدند. برای این‌منظور، یک گرم از هر بستر جامد در ۱۰۰ میلی‌لیتر توین ۸۰ (۰/۰۲ درصد) برای ۱۰ دقیقه روی شیکر غوطه‌ورشد. سپس، کنیدی‌های جداشده

جمع‌آوری و تراکم در واحد حجم با استفاده از لام گلبول‌شمار و فرمول $5x \times 10^4$ محاسبه‌شد. از هر بستر کشت جامد (بذر چهار غلهٔ گندم، جو، برنج، سورگوم و سبوس گندم) حاوی کنیدی، پنج تکرار وجودداشت.

بررسی درصد زنده‌مانی کنیدی‌های تولیدشده در بسترهای جامد

دمای ۲۵ درجه سلسیوس

برای انجام آزمون زنده‌مانی[1] کنیدی‌ها، پنج ظرف‌پتری حاوی PDA با سوسپانسیونی از کنیدی به غلظت 1×10^7 کنیدی در میلی‌لیتر تلقیح و به‌مدت ۲۰ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ‌سلسیوس نگهداری‌شدند. سپس، تعداد کنیدی‌های جوانه‌زده در میان ۲۰۰ کنیدی، شمارش و درصد آن محاسبه‌شد. دراین‌حالت، حداقل طول لولهٔ تندشی برابر با قطر کنیدی در نظرگرفته‌شد. لازم به‌ذکراست که بسترها برای کنیدی‌زایی قارچ‌ها، ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجهٔ‌سلسیوس نگهداری‌شده‌بودند.

دمای ۴۵ درجه سلسیوس

بدین‌منظور، لوله‌های آزمایش شیشه‌ای حاوی یک سی‌سی سوسپانسیون کنیدی‌های بدست‌آمده از هر بستر جامد، در بشر آب با دمای ۴۵ درجهٔ‌سلسیوس به‌مدت سه ساعت نگه‌داشته‌شدند و سپس، تعداد کنیدی‌های جوانه‌زده در میان ۲۰۰ کنیدی روی محیط کشت PDA پس از ۲۰ ساعت، شمارش و درصد آن محاسبه‌شد.

دمای محیط آزمایشگاه

بدین‌منظور، کنیدی‌های تولیدشده روی بسترهای جامد منتخب، به‌مدت ۱۱ روز در دمای محیط آزمایشگاه ($۲۸ \pm ۳\ ^oC$) نگهداری‌شدند و سپس، تعداد کنیدی‌های جوانه‌زده در میان ۲۰۰ کنیدی، پس از ۲۰ ساعت، شمارش و درصد آن محاسبه‌شد.

تعیین میزان رطوبت بسترهای جامد منتخب

برای تعیین میزان رطوبت موجود در بسترهای جامد منتخب، میزان ۵۰ گرم از هر بستر قبل از اتوکلاو به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴۵ درجهٔ‌سلسیوس در آون نگهداری و پس از این زمان، مجدد وزن‌شدند. اختلاف این دو وزن، میزان رطوبت موجود در هر بستر را نشان‌داد.

برداشت کنیدی‌های تولیدشده از بسترهای کشت جامد

بسترهای جامد پس از ۱۱ روز، خشک و کنیدی‌ها بوسیله پارچه توری (۷۰۰ منفذ در یک میلی‌متر مربع) الک و جداسازی‌شدند. کنیدی‌ها در ظرف غیرشفاف جمع‌آوری و با درب باز داخل دسیکاتور حاوی سیلیکاژل در یخچال (دمای ۴ درجهٔ‌سلسیوس) نگهداری‌شد. گرانول‌های غلات خشک‌شده و پوشیده با قارچ‌های بیمارگر نیز جمع‌آوری‌شدند. تعداد کنیدی تولیدشده در سوسپانسیون ۰/۳۵ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر توین ۸۰ (۰/۰۲ درصد) محاسبه‌شد.

بررسی اثر انبارداری برزنده‌مانی کنیدی‌های تولیدشده

برای این منظور، پودر کنیدی‌های برداشت‌شده (۰/۵گرم) از هر قارچ با مقادیر ۱۰، ۳۰ و ۵۰ درصد وزنی، با پودر تالک (ویژه مصارف بهداشتی و آرایشی) مخلوط و به‌مدت هشت هفته داخل لوله آزمایش شیشه‌ای در یخچال (دمای ۴ درجهٔ‌سلسیوس) نگهداری‌شدند. پودر کنیدی بدون افزودن تالک نیز تهیه و از هر تیمار پنج تکرار تهیه‌شد.

1- Viability

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی طراحی و برای تجزیه واریانس (ANOVA) از نرم‌افزار SAS استفاده‌شد (SAS, 1989). سپس، مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح پنج درصد انجام‌شد.

یافته‌های پژوهش

تولید قارچ‌های بیمارگر حشرات به‌روش دو مرحله‌ای

مرحله اول: کشت روی بستر مایع

در این روش، پودر آب پنیر و دکستروز بعلاوهٔ مخمر برای تهیه دو محیط کشت مایع مختلف جهت تولید و مقایسه تعداد اسپورهای غوطه‌ور دو قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* در هر میلی‌لیتر محیط کشت استفاده‌شد. نتایج نشان‌داد که در مورد هر دو جدایه قارچ *M. anisopliae* (F=۱۶۵۲/۵۶; df= ۱ و ۸; P< ۰/۰۰۰۱) و *B. bassiana* (F=۱۵۸۴/۶۰; df= ۱ و ۸; P= ۰/۰۰۰۱)، میانگین تعداد اسپورهای غوطه‌ور تحت تأثیر نوع محیط کشت قرارگرفت و بطور معنی‌دار تعداد اسپور کمتری در هر میلی‌لیتر از محیط کشت دکستروز بعلاوهٔ مخمر تولیدشد (جدول ۱). به‌عبارت‌دیگر، آب پنیر محیط کشت مناسب‌تری برای کشت و تولید اسپورهای غوطه‌ور بوده‌است.

جدول ۱. میانگین (± خطای استاندارد) تعداد اسپورهای غوطه‌ور دو قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* تولیدشده در ۵۰ میلی‌لیتر از دو بستر کشت مایع مختلف

Pathogenic fungus	Liquid culture medium (50 ml)	No. of submerged spore/ml
M. anisopliae	whey	$8.33 \times 10^7 \pm 1.65 \times 10^{6a}$
	dextrose + yeast	$1.55 \times 10^7 \pm 2.38 \times 10^{5b}$
B. bassiana	whey	$1.96 \times 10^7 \pm 4.18 \times 10^{5A}$
	dextrose + yeast	$2.82 \times 10^6 \pm 5.19 \times 10^{4B}$

میانگین‌ها با حروف متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی دار دارند (آزمون دانکن، $P< ۰/۰۵$).

مرحله دوم: تلقیح بستر جامد

پس از بدست‌آوردن اسپورهای غوطه‌ور متعلق به هر دو قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و*B. bassiana* از مرحله کشت در آب پنیر، این اسپورها برای تولید کنیدی‌های هوایی، به بسترهای جامد شامل برنج، گندم، جو، سورگوم و سبوس‌گندم تزریق‌شدند. میزان کنیدی تولیدشده در میلی‌لیتر در هر بستر محاسبه و مقایسه‌شد (جدول ۲). نتایج نشان‌داد زمانی‌که ۱ گرم بستر آلوده به قارچ در ۱۰۰ میلی‌لیتر توین ۸۰ غوطه‌ور و شیک‌شد، بیشترین میزان کنیدی قارچ *M. anisopliae* در هر میلی‌لیتر بطورمعنی‌دار از بستر دانه برنج و سبوس‌گندم بدست‌آمد (F=۱۱۳۰/۴۱; df= ۴ و ۲۰; P< ۰/۰۰۰۱). کمترین میزان تولید کنیدی نیز بطورمعنی‌دار متعلق به بستر سورگوم بود.

جدول۲. میانگین (± خطای استاندارد) تعداد کنیدی‌های قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* در یک میلی‌لیتر زمانی‌که ۱ گرم بستر در ۱۰۰ میلی‌لیتر توین ۸۰ غوطه‌ور شد.

Pathogenic fungus	Solid substrate	No. of conidia/ml
M. anisopliae	Rice	$1.08 \times 10^7 \pm 2.42 \times 10^{5a}$
	Wheat	$5.68 \times 10^6 \pm 8.00 \times 10^{4b}$

	Barley	$1.73 \times 10^6 \pm 6.79 \times 10^{4c}$
	Sorghum	$2.82 \times 10^6 \pm 5.19 \times 10^{4d}$
	Wheat bran	$1.06 \times 10^7 \pm 1.86 \times 10^{5a}$
B. bassiana	Rice	$2.71 \times 10^6 \pm 4.15 \times 10^{4C}$
	Wheat	$4.30 \times 10^6 \pm 3.71 \times 10^{4B}$
	Barley	$1.06 \times 10^6 \pm 2.61 \times 10^{4D}$
	Sorghum	$2.72 \times 10^6 \pm 4.58 \times 10^{4C}$
	Wheat bran	$1.06 \times 10^7 \pm 1.86 \times 10^{5A}$

میانگین‌ها با حروف متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند (آزمون دانکن P<۰/۰۵).

زمانی‌که ۱ گرم بستر آلوده به قارچ در ۱۰۰ میلی‌لیتر توین ۸۰ غوطه‌ور و شیک‌شد، نتایج نشان‌داد که بطورمعنی‌دار بیشترین میزان کنیدی قارچ *B. bassiana* در هر میلی‌لیتر از بستر سبوس‌گندم بدست‌آمد (F=۷۰۹/۱۵; df= ۴ و ۲۰; P< ۰/۰۰۰۱) (جدول ۲). پس از آن، بستر گندم بیشترین میزان کنیدی را تولیدکرد. کمترین میزان تولید کنیدی نیز بطورمعنی‌دار متعلق به بستر جو بود.

بررسی درصد جوانه‌زنی کنیدی‌های تولیدشده در بسترهای جامد دمای ۲۵ درجه سلسیوس

در ادامه، درصد زنده‌مانی کنیدی قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* تولیدشده روی بسترهای مختلف جامد محاسبه‌شد. نتایج نشان‌داد که در مورد *M. anisopliae* میزان زنده‌مانی کنیدی‌های بدست‌آمده از تمام بسترها بجز بستر سورگوم ۱۰۰ درصد بود و بین این دو گروه تفاوت معنی‌دار وجودداشت (F=۱۲۱; df= ۴ و ۲۰; P< ۰/۰۰۰۱) (جدول ۴).

همچنین، نتایج نشان‌داد که در مورد *B. bassiana* میزان زنده‌مانی کنیدی‌های بدست‌آمده از تمام بسترها بجز بستر جو ۱۰۰ درصد بود و بین این دو گروه تفاوت معنی‌دار وجودداشت (F=۹۷۷۱/۷۶; df= ۴ و ۲۰; P< ۰/۰۰۰۱) (جدول ۴).

جدول۳. میانگین (± انحراف معیار) درصد زنده‌مانی کنیدی‌های قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* تولیدشده روی بسترهای جامد مختلف

Pathogenic fungus	Solid substrate	Percentage of viability
M. anisopliae	Rice	100.00 ± 0.00^a
	Wheat	100.00 ± 0.00^a
	Barley	100.00 ± 0.00^a
	Sorghum	98.90 ± 0.10^b
	Wheat bran	100.00 ± 0.00^a
B. bassiana	Rice	100.00 ± 0.00^A
	Wheat	100.00 ± 0.00^A
	Barley	39.20 ± 0.61^B
	Sorghum	100.00 ± 0.00^A
	Wheat bran	100.00 ± 0.00^A

میانگین‌ها با حروف متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند (آزمون دانکن P<۰/۰۵).

دمای ۴۵ درجه سلسیوس

درصد جوانه‌زنی هر دو جدایه قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana*، در دمای ۴۵ درجهٔسلسیوس پس از سه ساعت صفر شد.

دمای محیط آزمایشگاه

لازم به‌ذکراست به‌دلیل دشواری جداکردن کنیدی‌ها و کارکردن با بستر سبوس‌گندم، بررسی‌های بعدی با استفاده از بستر برنج برای تولید کنیدی قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و بستر گندم برای تولید کنیدی قارچ بیمارگر *B. bassiana* انجام‌شد. بنابراین، درصد زنده‌مانی هر دو جدایه قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana*، در دمای محیط آزمایشگاه (۲۸ ± ۳ °C) به ترتیب تولیدشده روی بسترهای برنج و گندم پس از ۱۱ روز تعیین‌شد. میانگین درصد زنده‌مانی قارچ بیمارگر *M. anisopliae*، ۹۷/۲ درصد بدست‌آمد. این میزان برای قارچ بیمارگر *B. bassiana*، ۱۰۰ درصد بود.

درصد رطوبت بسترهای جامد منتخب

وزن خشک ۵۰ گرم از بسترهای منتخب شامل برنج پخته برای تولید کنیدی‌های قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و گندم برای تولید کنیدی‌های *B. bassiana* اندازه‌گیری‌شد و بدین‌ترتیب، میزان رطوبت بستر برنج پخته و گندم به‌ترتیب ۶۰/۹۶ و ۴۰/۹۶ محاسبه‌شد.

میزان کنیدی‌های حاصل از روش دو مرحله‌ای

همان‌گونه که شرح داده‌شد، سوسپانسیونی از ۰/۳۵ گرم پودر کنیدی از قارچ بیمارگر *M. anisopliae* حاصل از الک‌کردن بستر برنج و قارچ بیمارگر *B. bassiana* حاصل از الک‌کردن بستر گندم در ۵۰ میلی‌لیتر توئین ۸۰ (۰/۰۲ درصد) تهیه‌شد و مقدار کنیدی به‌ترتیب $۱/۹۰ \times ۱۰^{۸}$ و $۲/۰۶ \times ۱۰^{۸}$ در میلی‌لیتر بدست‌آمد. یک گرم پودر کنیدی از قارچ بیمارگر *M. anisopliae* حاصل از الک‌کردن بستر برنج و قارچ بیمارگر *B. bassiana* حاصل از الک‌کردن بستر گندم به‌ترتیب حاوی حدود $۲/۸۵ \times ۱۰^{۱۰}$ و $۳/۰۹ \times ۱۰^{۱۰}$ کنیدی بود.

برای جلوگیری از اثرات اشعهٔ ماوراءبنفش، پودر کنیدی‌های بدست‌آمده در ظروف غیرشفاف ریخته و در یخچال نگهداری‌شد. همچنین، مقداری از گرانول‌های برنج و گندم به‌ترتیب پوشیده‌شده با قارچ‌های بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* نیز در ظروف غیرشفاف نگهداری‌شدند و برای جلوگیری از اثر رطوبت، کریستال‌های سیلیکاژل بطور غیرمستقیم داخل ظروف قرارگرفتند. قابل ذکراست که از هر یک کیلوگرم بستر جامد حدود ۳۰ گرم پودر قارچ بیمارگر بدست‌آمد (شکل ۱).

شکل ۱. قارچ بیمارگر *M. anisopliae*: دانه‌های برنج پوشیده‌شده با قارچ بیمارگر (الف) و پودر حاوی کنیدی قارچ بیمارگر و پودر تالک (ب)؛ قارچ بیمارگر *B. bassiana*: دانه‌های گندم پوشیده‌شده با قارچ بیمارگر (ج) و پودر حاوی کنیدی قارچ بیمارگر و پودر تالک (د).

اثر انبارداری بر زنده‌مانی کنیدی‌های تولیدشده

به‌منظور بررسی اثر انبارداری به مدت هشت هفته بر درصد زنده‌مانی کنیدی‌های بدست‌آمده، پودر کنیدی‌ها با نسبت‌های مختلف پودر تالک مخلوط و در دمای چهار درجهٔ‌سلسیوس قرارگرفت. نتایج در مورد قارچ *B. bassiana* Z1 نشان‌داد که درصد زنده‌مانی کنیدی‌ها پس از هشت هفته در تمام نسبت‌های پودر تالک و بدون پودر تالک به همان میزان ۱۰۰ درصد حفظ‌شده‌است (جدول ۴). اما، در مورد قارچ بیمارگر *M. anisopliae*، با افزایش میزان پودر تالک درصد زنده‌مانی کنیدی‌ها بطور معنی‌داری افزایش‌یافت ($F=۵۱۵/۶۲$; $df= ۳$ و ۱۶; $P< ۰/۰۰۰۱$). همچنین، بدون وجود پودر تالک، میزان زنده‌مانی قارچ بیمارگر *M. anisopliae* var *acridum* از ۹۷/۲ به ۷۲/۴۰ درصد تقلیل‌یافت.

جدول ۴. میانگین (± انحراف معیار) درصد زنده‌مانی کنیدی‌های قارچ بیمارگر *M. anisopliae* مخلوط‌شده با پودر تالک پس از هشت هفته انبارداری

Talc (%)	Percentage of viability
0	72.40 ± 0.80^{d}
10	89.00 ± 0.35^{c}
30	93.40 ± 0.25^{b}
50	95.60 ± 0.19^{a}

میانگین‌ها با حروف متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند (آزمون دانکن $P<۰/۰۵$).

بحث

در سال‌های گذشته توانایی قارچ‌های بیمارگر حشرات در کنترل آفات انباری مخصوصا حشرات راسته سخت‌بالپوشان توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته و به اثبات رسیده است (Khashaveh *et al.*, 2008; Mahdneshin *et al.*, 2009; Shams *et al.*, 2011). محققین زیادی روی اثرات حشره‌کشی قارچ *M. anisopliae* علیه آفات انباری مطالعه‌کرده‌اند. به‌طورمثال، گزارش‌شد که خسارت واردشده به حبوبات و ذرت توسط *Sitophilus zeamais* (Motsch) (Coleoptera: Curculionidae) و *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) در اثر تیمار با قارچ‌های *B. brongiartii* و *M. anisopliae* کاهش یافته‌است (Rodrigues and Pratissoli,1990). سهرابی و علت کاربرد قارچ بیمارگر *B. bassiana* جدایهٔ Z1 به‌عنوان یک عامل کنترل کارامد در مطالعهٔ حاضر این بود که سهرابی و همکاران نشان دادند مرگ‌ومیر حاصل از این جدایه در لاروهای سن هفت شب‌پرهٔ‌موم‌خوار بزرگ حدود ۱۰۰ درصد است (Sohrabi *et al.*, 2019).

در پژوهش حاضر، در مرحلهٔ اول یعنی تخمیر مایع از بسترهای دکستروز–آگار و آب پنیر استفاده‌شد. طیف وسیعی از محیط‌های کشت برای مرحلهٔ تخمیر مایع استفاده شده‌است. ساده‌ترین محیط، دکستروز/ساکارز به عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به‌عنوان منبع ترکیبات نیتروژن‌دار و ویتامین‌ها است؛ نمک‌های کمیاب ضروری نیستند (Jaronski and Jackson, 2012). در تحقیق دیگری، تولید اسپور *B. bassiana* و *M. anisopliae* در محیط کشت مبتنی بر آب پنیر مورد مطالعه قرارگرفت (Kassa *et al*., 2008). عملکرد و زنده‌مانی اسپور برای دو جدایه از *B. bassiana* (GHA-726, CA-603) و دو جدایه از *M. anisopliae* (CA-1, IMI 330189)، پس از تولید در سیستم دو مرحله‌ای مبتنی بر آب پنیر تعیین‌شد. مشابه تحقیق حاضر، مطالعه کاسا و همکاران نشان‌داد که آب پنیر می‌تواند به‌طور موثر برای تولید اسپور قارچ‌های بیمارگر حشرات استفاده‌شود. با این‌حال، عملکرد تولید به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر جدایه قارچ، غلظت آب پنیر و نوع فرآیند تولید قرارگرفت. به‌طوری‌که، اسپور بیشتری در بالاترین غلظت بدست‌آمد (Kassa *et al*., 2008). بر این اساس، در پژوهش حاضر از بالاترین غلظت آب پنیر استفاده‌شد.

تحت شرایط تعریف‌شده در مطالعه حاضر، بازده اسپور مشابه حداقل تعداد اسپور تولیدشده در تحقیق کاسا و همکاران (Kassa *et al*., 2008) بدست‌آمد. آب پنیر می‌تواند به‌عنوان بستر رشد برای تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات استفاده شود؛ چراکه، بسیاری از آب پنیر تولیدشده توسط این صنعت برای خوراک دام استفاده‌می‌کنند و به‌عنوان کود روی خاک اسپری یا به‌عنوان افزودنی در مواد خوراکی خشک‌می‌شود (Pintado *et al*. 1999b). آب پنیر مایعی رقیق حاوی لاکتوز، پروتئین، مواد معدنی و مقادیری از چربی است و محتوای پروتئین تقریباً ۱۲ درصد، میزان لاکتوز آب پنیر حدود ۷۳ درصد و محتوای مواد معدنی حدود هشت درصد است (Zall, 1992). بنابراین، به‌دلیل داشتن میزان بالایی قند به همراه پروتئین و مواد معدنی می‌تواند محیط کشت مناسبی برای تولید قارچ‌های بیمارگر حشرات محسوب‌شود. در پژوهشی دیگر مشابه تحقیق حاضر نشان داده‌شد که محیط کشت حاوی آب پنیر برای تولید انبوه بلاستوسپورهای قارچ *B. bassiana* مناسب است (Bena-Molaei *et al*., 2015).

درخصوص بسترهای جامد در مرحلهٔ دوم از سیستم دومرحله‌ای، نتاج نشان‌داد که دانه‌های برنج و سبوس گندم درخصوص قارچ بیمارگر *M. anisopliae* جدایهٔ *acridum* بدون تفاوت معنی‌دار بیشترین بازده را داشتند و سبوس گندم و سپس دانه‌های گندم در خصوص قارچ بیمارگر *B. bassiana* جدایهٔ Z1 بیشترین تولید کنیدی را به خود اختصاص‌دادند. مسأله‌ای که طی انجام آزمایش‌ها به‌طور مشخص خود را نشان‌داد جداسازی و کار با بستر سبوس گندم بود. سبوس پس از ۱۴ روز از تلقیح و رشد و کنیدی‌زایی هر دو قارچ، بصورت گلوله‌های درشت درمی‌آمد که خردکردن این گلوله‌ها برای الک‌کردن و جداسازی کنیدی‌ها کار بسیار دشوار و غیر ممکن بود. بنابراین، دانهٔ برنج برای تولید قارچ بیمارگر *M. anisopliae* واریته *acridum* و بذر گندم برای تولید قارچ بیمارگر *B. bassiana* جدایهٔ Z1 استفاده‌شد. محققان دریافتند که آرد برنج بستر مناسبی برای تولید کنیدی قارچ *M. anisopliae* بودهاست و کمترین کنیدی در بستر سبوس گندم تولیدشد (Roshandel *et al*., 2016). نتایج تحقیق اخیر در مورد بستر سبوس گندم کاملاً با نتایج تحقیق حاضر متفاوت است که این مسأله اهمیت مرحلهٔ تخمیر مایع با استفاده از آب پنیر را برای تولید کنیدی *M. anisopliae* به خوبی نشان می‌دهد. درحالی‌که، سبوس گندم به تنهایی نیز بستر مناسبی برای تولید کنیدی قارچ *B. bassiana* بود و افزودن آب پنیر به بستر سبوس، کارایی آن را در تولید کنیدی قارچ افزایش‌داد (بنا مولایی و همکاران، ۱۳۸۹؛ بی‌غم و طلایی حسنلویی، ۱۳۹۶؛ رشید و همکاران، ۱۳۹۸). در پژوهش‌های اخیر روش کار با تحقیق حاضر متفاوت بود ولی نتایج مشابهی حاصل شد.

در تحقیق دیگر، تولید انبوه قارچ بیمارگر *M. anisopliae* در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از محیط کشت‌های مایع و جامد بررسی (Soundarapandian and Chandra, 2007) و چهار نوع بستر جامد مانند برنج، ذرت، گندم و یک نوع ارزن استفاده‌شد. بیشترین اسپورزایی روی بستر گندم بدست‌آمد. درحالی‌که، در مطالعهٔ حاضر، دو بستر برنج پخته و سبوس گندم بهترین بستر برای اسپورزایی این قارچ بودند. البته، برنجی که در تحقیق حاضر استفاده‌شد رقم متفاوت (طارم) با تحقیق قبل

داشت و قبل از تلقیح با قارچ پخته‌شده‌بود. در تحقیق گذشته، کیسه‌های پلاستیکی بهترین وسیله برای پرورش انبوه قارچ در مقایسه با ظروف شیشه‌ای مانند ارلن و ظروف پتری تشخیص‌داده‌شد (Soundarapandian and Chandra, 2007).

لطیفیان و همکاران طی تحقیق روی تولید انبوه قارچ بیمارگر *B. bassiana* با استفاده از محصولات کشاورزی مبتنی بر روش دو مرحله‌ای مایع–جامد برای کنترل آفات نخل خرما، مناسب‌ترین محیط را برای تولید کنیدی قارچ بیمارگر مذکور در مراحل مایع و جامد معرفی‌کردند (Latifian *et al*., 2013). برای مرحلهٔ مایع غذاهای گیاهی شامل سیب زمینی، آرد گندم، آرد برنج، آرد ذرت و ملاس نیشکر و برای مرحلهٔ جامد مواد گیاهی شامل نیشکر، ذرت، جو، برنج، ارزن و سورگوم مورد ارزیابی قرارگرفت. مقایسهٔ ویژگی‌های عملکرد مرحلهٔ مایع با غلظت اسپور صورت‌گرفت. درنهایت، عصارهٔ ملاس نیشکر و برنج به‌دلیل حداکثر تولید و عملکرد اقتصادی به‌ترتیب برای تولید کلامید اسپور و کنیدی‌های *B. bassiana* انتخاب شدند.

درحالی‌که، در تحقیق حاضر، به‌ترتیب بیشترین اسپور غوطه‌ور و کنیدی قارچ بیمارگر *B. bassiana* روی بسترهای آب پنیر (محیط مایع) و سبوس گندم در رتبه اول و در رتبه دوم گندم (محیط جامد) بدست‌آمد که از میزان بدست‌آمده در تحقیق اخیر بسیار بیشتر است. تفاوت‌هایی که در میزان تولید کنیدی در بسترهای مختلف مشاهده‌می‌شود می‌تواند مربوط به فراوانی گلوکز و مواد معدنی در محیط کشت باشد که رشد و تولید اسپور قارچ ها را افزایش می‌دهد (Dangar *et al*., 1991). بررسی محتوای شیمیایی سبوس گندم نشان‌داده‌است که میزان کربوهیدرات و فیبر موجود در آن (مانند سلولز) تقریباً سه برابر پروتئین است (Javed et al., 2012; Curti *et al*., 2013). همچنین، به نظر می‌رسد از لحاظ فیزیکی به‌دلیل خرد و ریز بودن بستر سبوس سطح تماس قارچ با بستر بیشتر بوده و باعث استفادهٔ بهینهٔ قارچ از مواد مغذی بستر سبوس گندم شده است.

پژوهش‌های گذشته نشان‌داد که برنج خام به عنوان محیط مناسب برای کشت انبوه *B. bassiana* محسوب‌می‌شود (Ibrahim and Low, 1993; Sharma *et al*., 2002). گزارش‌شده است که سورگوم غله ایده‌آل برای تولید انبوه *Paecilomyces farinosus* است (Gopalakrishnan *et al*., 1999). در مورد *Lecanicillium lecanii*، سورگوم به‌عنوان غله ایده‌آل برای تولید انبوه شناخته شده‌است (Lakshmi *et al*. 2001). درحالی‌که بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر، سورگوم برای پرورش و تولید انبوه جدایه‌های موردبررسی مناسب نبود.

در ادامه، درصد زنده‌مانی کنیدی‌های قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* تولیدشده روی بسترهای مختلف جامد محاسبه‌شد. نتایج نشان‌داد که در مورد *M. anisopliae* میزان زنده‌مانی کنیدی‌های بدست‌آمده از تمام بسترها بجز بستر سورگوم و در مورد *B. bassiana* میزان زنده‌مانی کنیدی‌های بدست‌آمده از تمام بسترها بجز بستر جو ۱۰۰ درصد بود. لطیفیان و همکاران نشان‌دادند که بیشترین جوانه‌زنی قارچ بیمارگر مذکور بطورمعنی‌دار روی بستر چغندرقند و کمترین روی بستر سورگوم بدست‌آمد (Latifian *et al*., 2013) که در مورد سورگوم مشابه تحقیق حاضر بود.

به‌طورکلی، کنیدی‌های *Beauveria* spp. را می‌توان بدون کاهش زنده‌مانی نسبتاً سریع خشک‌کرد، درحالی‌که کنیدی‌های متاریزیوم به مدت زمان بیشتری نیاز دارند (Hong *et al*., 2000). در یک مطالعه، تأثیر دما و مدت زمان خشک‌کردن *B. bassiana* به دقت بررسی شده‌است (Li *et al*., 2008). به این‌صورت‌که، زنده‌مانی کنیدی‌ها تحت تأثیر دماهای مختلف خشک‌کردن و سرعت‌های خشک شدن قرارگرفت؛ پنج ساعت در دمای ۳۵ درجهٔ‌سلسیوس تأثیری بر زنده‌مانی کنیدی نداشت. تحقیق حاضر نیز نشان‌داد که ۱۱ روز دمای محیط ($۲۸ \pm ۳\ ^{o}C$) تأثیری منفی بر درصد جوانه‌زنی قارچ بیمارگر *B. bassiana* نداشت. درحالی‌که، در مورد *M. anisopliae*، مقداری کاهش نشان‌داد.

تحقیقات گذشته نشان‌داده است که برای بستر جوپرک، رطوبت بهینه ۵۲–۵۶٪ قبل از اتوکلاو است (Jaronski and Jackson, 2012). برای برنج رطوبت مطلوب ۲۲٪–۳۰٪ به‌دست‌آمد (Prakash *et al*., 2008). درحالی‌که، در تحقیق حاضر رطوبت بهینه در بستر برنج برای جدایهٔ *M. anisopliae* تقریبا دو برابر بدست‌آمد و برای بستر گندم تقریبا مشابه جو پرک برای تولید قارچ بیمارگر *B. bassiana* محاسبه‌شد. برای تولید یک جدایه جدید از قارچ‌ها باید سطوح رطوبت بهینه طی آزمایش تعیین‌شود زیرا از این نظر بین جدایه‌ها تفاوت وجوددارد.

در خصوص مدت زمان انبارداری قارچ‌های بیمارگر مورد بررسی در این تحقیق، افزودن پودر تالک، باعث جلوگیری از کاهش شدید میزان زنده‌مانی قارچ بیمارگر *M. anisopliae* جدایه *acridum* در مدت هشت هفته شد و با افزایش میزان پودر تالک، زنده‌مانی قارچ افزایش‌یافت. بهینه‌سازی تکنیک‌های تولید باید تضمین‌کند که فعالیت زیستی و زنده‌مانی اندام‌های تکثیری طی یک دوره طولانی انبارداری حفظ‌می‌شود (Wyss et al., 2001). تحقیق حاضر نشان‌داد که افزودن پودر تالک بعنوان یک جاذب رطوبت بدون داشتن اثرات سوء به‌ویژه در مورد جدایهٔ *B. bassiana* Z1، می‌تواند باعث حفظ زنده‌مانی کنیدی‌ها شود.

مقداری از دانه‌های برنج و گندم به‌ترتیب پوشیده‌شده با قارچ‌های بیمارگر *M. anisopliae* و *B. bassiana* نیز تولیدشد. دانه‌های خشک‌شده و کلونیزه‌شده توسط *B. bassiana* یا *M. anisopliae* پس از آبرسانی مجدد، بستر مناسبی برای رشد مجدد و اسپورزایی خواهندبود. این دانه‌ها توسط ماشین کاشت با یک کلوخ‌شکن دوار در خاک قرارمی‌گیرند (Kirchmair *et al*., 2007) یا در خاک باغبانی مخلوط (Skinner *et al*., 2012) و بدین وسیله کانون‌هایی از کنیدی‌های قارچ‌های بیمارگر حشرات در زیستگاه حشره هدف ایجاد می‌شود.

روش‌های عملی مختلف برای تلقیح مصنوعی قارچ‌های بیمارگر حشرات درون‌زی[1]به داخل گیاهان زراعی از جمله پاشیدن سوسپانسیونی از کنیدی روی برگ‌ها، خیساندن دانه‌ها در سوسپانسیونی از کنیدی، تزریق مایهٔ قارچی به داخل ساقه، غوطه‌ورکردن ریشه نهال در سوسپانسیونی از کنیدی و خیس‌کردن خاک با سوسپانسیونی از کنیدی آزمایش شده‌است (Bagheri *et al*., 2021). در صورتی‌که ثابت‌شود این دو جدایه بعنوان قارچ‌های بیمارگر حشرات درون‌زی بخوبی گیاه میزبان را کلونیزه‌می‌کنند، تولید و استفاده از دانه‌های برنج و گندم پوشیده‌شده با این قارچ‌ها در خاک می تواند بر کارایی آن‌ها بیفزاید.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش دو مرحله‌ای با استفاده از آب پنیر در مرحلهٔ تخمیر مایع با غلظت استفاده‌شده، در مورد هر دو جدایهٔ قارچ بیمارگر حشرات موفقیت‌آمیز بود و منجر به تولید مناسب کنیدی هر دو جدایه در مرحلهٔ بستر جامد شد. این روش دو مرحله‌ای با این ترکیب شرح داده‌شده، برای اولین بار برای تولید انبوه کنیدی قارچ‌های بیمارگر حشرات انجام‌شده‌است. کارآمدترین تخمیر بستر جامد دو مرحله‌ای است و مرحله اولیه آن تخمیر مایع برای تولید مایه تلقیح، رایج‌ترین روش است (Jaronski, 2023). کنیدی‌ها برای جوانه‌زنی کامل و شروع کلونیزاسیون بستر به ۲۴ ساعت زمان نیازدارند؛ درحالی‌که، تخمیر مایع (بلاستوسپورها و میسلیوم‌ها) بلافاصله شروع می‌شود. علاوه‌براین، یک مرحله تخمیر مایع پتانسیل تلقیح را در مقایسه با کنیدی‌ها به‌میزان زیادی چند برابر می‌کند، زیرا مایهٔ تلقیح باید حاوی $۱۰^{۷}$–$۱۰^{۸}$ اندام تکثیری در هر میلی‌لیتر باشد. غلظت مایهٔ تلقیح بر مدت زمان مرحلهٔ بستر جامد برای رسیدن به حداکثر بازدهٔ کنیدیایی تأثیرمی‌گذارد (Jaronski, 2023).

مطالعات آینده باید در جهت بهینه‌سازی فرآیند تولید انبوه مبتنی بر آب پنیر، دانه‌های غلات و ضایعات کشاورزی و مقایسه هزینه تولید آن با تکنیک‌های موجود تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات و همچنین هزینه‌های دفع آب پنیر مایع باشد. پیشنهاد می‌شود سایر مواد بخصوص ضایعات کشاورزی مخصوص استان کرمان که در دسترس و ارزان قیمت هستند برای تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات آزمایش شوند. این ضایعات می‌تواند شامل پوست پسته، گردو، ضایعات مربوط به قهوه، گل محمدی، زیتون، پوسته و کاه و کلش غلات باشد. با توجه به کارآمد بودن روش دومرحله‌ای در این تحقیق، پیشنهادمی‌شود سایر قارچ‌های بیمارگر حشرات که برای کنترل آفات موثر هستند نیز با این روش بصورت انبوه تولیدشوند. یک مسأله مهم در خصوص تولید انبوه قارچ‌ها، جداسازی کنیدی‌ها از بسترهای کشت بخصوص سبوس گندم است. باید با استفاده از فناوری‌های

[1]- Endophytic entomopathogenic fungi

پیشرفته، الک‌ها و شیکرهای مجهز دیجیتال با تنظیمات خاص برای هر بستر، طراحی و ساخته‌شوند تا با جلوگیری از هدر رفتن کنیدی‌ها، بیشترین برداشت صورت‌گیرد.

سپاس‌گزاری

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی با شرکت کیاسم کارمانیا به شماره قرارداد بیرونی ک/۰۲۳۰۷ و قرارداد داخلی با دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته به شمارهٔ ۰۲/۵۳۲/ص/۷ انجام شده‌است که بدین وسیله تشکر و قدردانی‌می‌شود.

منابع

بنا مولایی، پریسا؛ طلایی حسنلویی، رضا؛ عسکری، حسن و خرازی پاکدل، عزیز (۱۳۸۹). بررسی پتانسیل چند ماده‌ی طبیعی جامد در تولید کنیدی قارچ بیمارگر حشرات، *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Cordycipitaceae). *نامه انجمن حشره‌شناسی ایران*، ۳۰(۲): ۱-۱۵.

بی‌غم، ضرغام و طلایی حسنلویی، رضا (۱۳۹۶). تولید دو قارچ بیمارگر حشرات *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* با کشت دو مرحله‌ای بر روی مواد طبیعی. *کنترل بیولوژیک آفات و بیماری های گیاهی*، ۶(۱): ۱۰۳-۱۰۹.

رحمانی، آ.، شیروانی، ا. و م. راشکی. (۱۴۰۰). بررسی اثر کشندگی قارچ *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) روی شپشه آرد *Tribolium castaneum* (Herbst). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، بخش گیاه‌پزشکی، دانشگاه شهید باهنرکرمان، ۶۰ صفحه.

رشید، مرضیه؛ طلایی حسنلویی، رضا؛ خدائیان چگنی، فرامرز و گوتل، مارک (۱۳۹۸). بررسی پتانسیل استفاده از چند محیط کشت طبیعی مایع برای تولید بلاستوسپورهای دو قارچ بیمارگرحشرات *Metarhizium anisopliae* و *Beauveria bassiana* . *مهندسی بیوسیستم ایران*، ۵۰(۲): ۴۹۰-۴۹۷.

کاظمی، س.، شیروانی، ا. و م. راشکی. (۱۳۹۹). بررسی اثر کشندگی قارچ *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) روی سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) . پایان‌نامه کارشناسی ارشد، بخش گیاه‌پزشکی، دانشگاه شهید باهنرکرمان، ۵۸ صفحه.

REFERENCES

Agale, S. V., Gopalakrishnan, S., Ambhure, K. G., Chandravanshi, H., Gupta, R. & Wani, S. P., (2018). Mass production of entomopathogenic fungi (*Metarhizium anisopliae*) using different grains as a substrate. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 7(1),* 2227-2232.

Bagheri, A., Askari Seyahooei, M. & Fathipour, Y., (2021). The Endophytes. In: Omkar (Ed.) Microbial approaches for insect pest management. Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-3595-3_4.

Barrancoflorido, J. E., Alatorrerosas, R, Gutierrezrojas, M., Viniegragonzalez, G. & Saucedocastaneda, G., (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid-state cultivation. *Enzyme and microbial technology, 30,* 910-915.

Belay, Y. C. & Tenkegna, T. A., (2017). Bioassay and pilot mass production of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* for the control of coffee berry borer (Hypothenemus hampei: Scolytidae), Ferrari. *Journal of Applied Bioscience, 117,* 11669-11683.

Bena-Molaei, P., Talaei-Hassanloui, R., Askary, H. & Kharazi-Pakdel, A., (2010). Study on potential of some solid natural substances in production of *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Cordycipitaceae) conidia. *Journal of Entomological Society of Iran, 30(2),* 1-15. (*In Persia*).

Bena-Molaei, P., Talaei-Hassanloui, R. & Askary, H., (2015). Comparison of some natural broth media for production and virulence of *Beauveria bassiana* blastospores against the browntail moth, *Euproctis chrysorrhoea* (Lep.: Lymantriidae). *Journal of Crop Protection, 4 (3),* 313-320.

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 Persia*)

Curti, E., Carini, E., Bonacini, G., Tribuzio, G. & Vittadini, E. (2013). Effect of the addition of bran fractions on bread properties. *Journal of Cereal Science, 57,* 325-332.

Dangar, T. K., Geetha, L., Jayapal, S. D. & Pillai, G. B., (1999). Mass production of the entomopathogens *Metarhizium anisopliae* in coconut water. *Journal of Plant Crop, 19,* 54-59.

De Faria, M. & Wraight, S., (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control, 43,* 237-256.

Grace, J. & Jaronski, S., (2005). *The joy of Zen and the art of fermentation or the tao fungi. Solid substrate fermentation workshop manual*. February 16-18, 2005. USDA/ARS/NPARL, Sidney.

Hansen, L. S. & Steenberg, T., (2007). Combining larval parasitoids and an entomopathogenic fungus for biological control of *Sitophilus granaries* (Coleoptera: Curculionidae) in stored grain. *Biological Control, 40,* 237-242.

Hong, T. D., Jenkins, N. E. & Ellis, R. H., (2000). The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycological Research, 104 (6),* 662-665.

Ibrahim, Y. B. & Low, W., (1993). Potential of mass production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. *International Journal of Pest Management, 39, (3),* 288-292.

Inglis, G. D., Goettel, T. M. & Strasser, B., (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest. In: T. M., Butt, Jackson, C. & Magan, N. (Eds.), Fungi as biocontrol agents (pp. 23-69). Wallingford, CAB International.

Jaronski, S. T., Jackson, M. A., (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In: L.A., Lacey (Ed.), Manual of techniques in invertebrate pathology, (pp. 255-284). Academic Press, New York.

Jaronski, S. T. (2023). Mass production of entomopathogenic fungi-state of the art. In: J. A., Morales-Ramos, M. G., Rojas & D. I., Shapiro-Ilan (Eds.), Mass production of beneficial organisms: Invertebrates and entomopathogens, 2nd edition (pp. 317-358). Academic Press, Elsevier Inc, New York.

Javed, M. M., Zahoor, S., Shafaat, S., Mehmooda, I., Gul, A., Rasheed, H., Bukhari, S. A. I., Aftab, M. N. & Haq, I.-U., (2012). Wheat bran as a brown gold: nutritious value and its biotechnological applications. *African Journal of Microbiology Research, 6,* 724-733.

Kassa, A., Brownbridge, M., Parker, B. L., Skinner, M., Gouli, V., Gouli, S., Guo, M. O., Lee, F. & Hata, T., (2008). Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research, 112,* 583-591.

Kazemi, S., Shirvani, A. & Rashki, M., (2020). Lethal effect survey of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) on Four-spotted been weevil (Callosobruchus maculatus) (Coleoptera: Bruchidae) (M.Sc. Thesis, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran) (*In Persia*).

Khashaveh, A., Safaralizade, M. H and Ghosta, Y., (2008). Pathogenicity of three Iranian isolates of the fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against granary weevil, *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Biological Science, 8(4),* 804-808.

Kirchmair, M., Hoffmann, M., Neuhauser, S., Strasser, H. & Huber, L., (2007). Persistence of GRANMETs, a *Metarhizium anisopliae* based product, in grape *phylloxera*-infested vineyards. *IOBC wprs Bulletin, 30 (7),* 137-142.

Lakshmi, S. M., Alagammai, P. L. & Jayaraj, K., (2001). Studies on mass culturing of the entomopathogen whitehalo fungus *Verticillium lecanii* on three grain media and its inefficacy on *Helicoverpa armigera*, In: S., Igbachimuthu & S., Sen (Eds.), Microbials in insect pest management, (pp. 23- 27). Oxford and IBH publishing Pvt Ltd, New Delhi.

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 Agricultural and Crop Science, 5 (19),* 2337-2341.

Mahdneshin, Z., Safaralizadae, M. H., Ghosta, Y., (2009). Study on the efficacy of Iranian isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin against *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Biological Science, 9(2),* 170-174.

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

Morales, J., Joong-So, C. & Dong-Shik, K., (2006). Production rate of propionic acid in fermentation of cheese whey with enzyme inhibitors. *Environmental Progress, 25*, 228–234.

Noris, R. F., Chen, E. P., & Kogn, M., 2002. *Concepts integrated Pest Management,* Premise Hall of India Private Limited, New Delhi.

Pintado, M. E., Pintado, A. I. E., Malcata, F. X., (1999a). Fate of nitrogen during metabolism of whey lactose by *Rahnella aquatilis*. *Journal of Dairy Science, 82,* 2315–2326.

Pintado, M. E., Pintado, A. I. E. & Malcata, F. X., (1999b). Production of polysaccharide by *Rahnella aquatilis* with whey feedstock. *Journal of Food Science,* 64, 348–352.

Prakash, G. V. S. B., Padmaja, V. & Kiran, R. 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.

Rahmani, A., Shirvani, A. & Rashki, M., (2021). Survey of the lethal effect of *Metarhizium anisopliae* (Metchinkoff) on *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) (M.Sc. Thesis, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran) (*In Persia*).

Rashid, M., Talaei-Hassanloui, R., Khodayian, F. & Goettel, M., (2019). Potential use of some liquid natural media for the production of blastospores of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Iranian Journal of Biosystem Engineering, 50(2),* 490-497. (*In Persia*).

Rees, D., (2004). *Insects of Stored Products*, CSIRO publishing.

Rodrigues, C. & Pratissoli, D., (1990). Pathogenicity of *Beauveria brongniartii* (Sacc). Petch and *Metharhizium anisopliae* (Mots) Sorok. and its effect on the corn weevil and the bean beetle. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil, 19, 302-306.*

Roshandel, S., Askary, H., Talaei Hassanlouei, R. & Allahyari, H., (2016). The effects of natural substrates on the sporulation and viability of conidia and blastospores of *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol in Plant Protection, 4 (1),* 94-1104.

Shams, G., Safaralizadeh, M. H., Imani, S., Shojai, M. & Aramideh, Sh., (2011). A laboratory assessment of the potential of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Beauvarin®) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae*). African Journal of Microbiological Research, 5(10),* 1192-1196.

Sharma, S. P., Gupta, R. B. L. & Yadava, C. P. S., (2002). Selection of a suitable medium for mass multiplication of entomofungal pathogens. *Indian Journal of Entomology, 14,* 255-261.

Skinner, M., Gouli, S., Frank, C. E., Parker, B. L. & Kim, J. S., (2012). Management of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) with granular formulations of entomopathogenic fungi. *Biological Control, 63 (3),* 246-252.

Sohrabi, F., Jamali, F., Morammazi, S., Saber, M. & Kamita, S. G., (2019). Evaluation of the compatibility of entomopathogenic fungi and two botanical insecticides tondexir and palizin for controlling *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Crop Protection, 117,* 20-25.

Soundarapandian, P. & Chandra, R., (2007). Mass production of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota; Hyphomycetes) in the laboratory. Research Journal of Microbiology, 9, 690-695.

St. Leger, R. J., & Wang, C., (2010). Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology, 85,* 901–907.

Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J. & Blackwell, M., (2012). Fungal Entomopathogens.

In: F. E. Vega & H. K. Kaya (Eds.), Insect pathology (pp. 171-220). Elsevier Inc., USA.

Wyss, G. S., Charudattan, R., De Valerio, J. T., (2001). Evaluation of agar and grain media for mass production of conidia of *Dactylaria higginsii*. *Plant Disease, 85*, 1165-1170.

Yang, S. T. & Silva, E. M., (1995). Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *Journal of Dairy Science, 78*, 2541–2562.

Zall, R. R., (1992). Sources and composition of whey and permeate. In: J. G. Zadow (Ed.), Whey and lactose processing. Springer, Dordrecht.