مقاله تحقیقی

تولید قارچ *Beauveria bassiana* در محیط کشت مایع و بررسی میزان زنده‌مانی و بیمارگری اسپورهای حاصل روی سفیدبالک گلخانه

سعیده جاور[۱]، شهرام فرخی[۲]، شهرام نعیمی[۳]، مریم کلانتری جوشانی[۴]

۱– استادیار، بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.

۲، ۳، ۴– استادیار، دانشیار، کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

مسئول مکاتبات: سعیده جاور، ایمیل: sajavar@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۷ ۹(۲) ۱–۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۱

چکیده

برای استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک تجاری، تولید انبوه آن‌ها ضروری است. در مطالعه حاضر تکثیر جدایه‌ای از قارچ *Beauveria bassiana* با استفاده از محیط‌های مایع شامل محیط کشت TKI مایع به همراه ۵٪ ملاس چغندر قند (TKI)، محیط مایع حاوی ملاس چغندرقند، عصاره مخمر و مولتی ویتامین (MYM) و محیط عصاره سیب‌زمینی (P)، عصاره سیب‌زمینی و آب پنیر ۸٪ (PCh) و عصاره سیب‌زمینی و ملاس ۵٪ (PM) بررسی شد. همچنین میزان زنده‌مانی اسپورهای تولید شده در دو دمای اتاق و یخچال به مدت ۹ ماه ارزیابی شد. در نهایت بیمارگری اسپورهای بدست آمده از بسترهای مختلف، روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه در آزمایشگاه و گلخانه ارزیابی شدند. بیشترین میزان تولید اسپور در محیط TKI و به صورت کنیدی‌های غوطه‌ور بود ($۳/۸۷\times۱۰^{۸}$ کنیدی در میلی‌لیتر). بیشترین میزان بلاستوسپور در محیط PCh با $۲/۳۷\times۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر بدست آمد. در زیست‌سنجی آزمایشگاهی، بلاستوسپورهای حاصل از محیط PCh بیشترین درصد مرگ‌ومیر را با ۸۶/۴۰ درصد تلفات نشان دادند و کمترین میزان تلفات در محیط TKI با ۷۴/۰۳ درصد مرگ‌ومیر مشاهده شد. در زیست‌سنجی گلخانه‌ای میزان تلفات بین ۴۳ تا ۵۰ درصد مرگ ومیر مشاهده شد. پس از ۹ ماه نگهداری اسپورها در یخچال، در زیست‌سنجی آزمایشگاهی، کنیدی‌های غوطه‌ور حاصل از محیط TKI و بلاستوسپورهای حاصل از محیط P، ۲۵ تا ۳۰ درصد تلفات در پوره‌های سفیدبالک ایجاد کردند. ولی در شرایط گلخانه، تلفاتی در پوره‌های مورد آزمایش مشاهده نشد. با توجه به نتایج، بلاستوسپور تولید شده در محیط P برای تولید این جدایه قارچی معرفی می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: *Beauveria bassiana*، *Trialeurodes vaporariorum*، محیط مایع، کنترل زیستی، قارچ بیمارگر حشرات

مقدمه

برای استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک، نیاز به بررسی روی بسترهای مناسب کشت برای تولید و تکثیر این قارچ‌ها می‌باشد. یکی از روش‌های تولید، تکثیر قارچ در بسترهای مایع است. در محیط کشت مایع انواع مختلفی از کنیدی‌های غوطه‌ور، بلاستوسپور و میسلیوم را می‌توان مشاهده کرد که نسبت آن‌ها در محیط کشت مایع به نسبت کربن و نیتروژن و منبع آن‌ها بستگی دارد (Thomas *et al.*, 1987). در یک محیط مایع با ترکیبات مشخص (TKI broth)، پس از گذشت ۹۶

ساعت فقط کنیدی‌های غوطه‌ور در محیط بدست می‌آید که از لحاظ خصوصیات بیوشیمایی با کنیدی‌های هوایی اندکی متفاوت است (Thomas *et al*., 1987; Lohse *et al*., 2015). در محیط‌های پیچیده‌تر با تغییر منابع کربن می‌توان بلاستوسپور بدست آورد. اضافه کردن پنج درصد ملاس چغندرقند به محیط TKI broth منجر به افزایش اسپور کل که حاوی بلاستوسپور و کنیدی‌های غوطه‌ور است می‌گردد. با اضافه کردن پنج درصد ملاس چغندرقند (حاوی ۵۰ درصد ساکاروز) به محیط TKI broth، مقدار اسپور کل در محیط به ۱۱ برابر افزایش یافت در مقایسه با زمانی‌که از ساکاروز پنج درصد استفاده شد (Lohse *et al*., 2014). محققین مختلف محیط‌های کشت مایع مختلف را به منظور دست‌یابی به یک محیط ارزان‌تر با بازده بلاستوسپور بیشتر، تحمل بالا به خشکی و ماندگاری بیشتر مورد آزمایش قرارداده‌اند. در این زمینه بازده بلاستوسپور، تحمل به خشکی، ماندگاری و بیمارگری دو گونه قارچی از *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil و *Isaria fumosorosea* Wize (=*Paecilomyces fumosoroseus*) در دو محیط فرمانتاسیون مایع حاوی کازئین و آرد پنبه‌دانه به‌عنوان منبع نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت. هر دو گونه قارچی در محیط حاوی آرد پنبه‌دانه بازده بلاستوسپور بیشتری را در ظرف سه روز نشان دادند بلاستوسپورهای خشک شده در معرض هوا با رطوبت کمتر از سه درصد، ۶۱ تا ۸۶ درصد زنده‌مانی را نشان دادند. همچنین بلاستوسپورهای خشک شده مرگ‌ومیر بیشتری را در غلظت‌های پایین به نسبت کنیدی‌های هوایی روی پوره‌های سفیدبالک نشان دادند (Mascarin *et al*., 2014). با بررسی چند محیط مایع شامل عصاره‌های شلتوک برنج، گندم، ارزن، سیب‌زمینی و ملاس چغندرقند روی میزان تولید کنیدی قارچ *B. bassiana* گزارش شد که در بین محیط کشت‌های مایع، عصاره سیب‌زمینی بالاترین و عصاره ارزن پایین‌ترین میزان تولید بلاستوسپور قارچ را داشته است (Askary *et al*., 2009).

بلاستوسپور در فرایند فرمانتاسیون مایع به سرعت تولید می‌شود ولی زنده‌مانی و بقا آن تحت فرایند کم شدن آب و همینطور در محیط خارج از فریزر کاهش می‌یابد. Mascarin *et al*. (2016) دو روش خشک کردن بلاستوسپور (خشک کردن بوسیله جریان هوا یا خشک کردن به صورت Spray–dryer) و همینطور روش‌های مختلف بسته‌بندی و دمای نگهداری را مورد مطالعه قرار دادند. زنده‌مانی بلاستوسپورها در هر دو روش خشک کردن هنگامی‌که محتوای آبی آن‌ها کمتر از پنج درصد بود بالای ۸۰ درصد بود. بلاستوسپورهای بسته بندی شده در خلاء هنگامی‌که در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند زنده‌مانی بیشتری داشتند به نسبت زمانی‌که در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند طوریکه ماندگاری بلاستوسپورها تا ۹ ماه تغییری نکرد. همچنین بلاستوسپورهای خشک شده در معرض هوا مرگ‌ومیر بیشتری را روی پوره‌های سفیدبالک نشان دادند. در گزارش دیگری با بررسی تاثیر اکسیژن و غلظت‌های بالای گلوکز روی تولید بلاستوسپور در دو جدایه از قارچ *B. bassiana* در محیط مایع حاوی نمک‌های پایه، ویتامین‌ها و فلزات کمیاب به همراه آرد پنبه‌دانه، نشان دادند هنگامی‌که سطح اکسیژن به اندازه کافی باشد غلظت بالای گلوکز به تولید بیشتر بلاستوسپور می‌انجامد (Mascarin et al. 2015). در این پژوهش بلاستوسپورهای تولید شده در محیط حاوی بالای ۱۴۰ گرم گلوکز در لیتر محیط مایع، بیمارگری بیشتری را روی پوره‌های سفیدبالک نشان دادند.

در کشاورزی امروز با توجه به کاهش نزولات آسمانی در چند سال اخیر کشت‌های گلخانه‌ای با فراهم کردن شرایط مصنوعی تولید، اهمیت ویژه‌ای در پیشبرد فرآیندهای توسعه کشاورزی دارند. یکی از آفات عمده و مشکلات تولید محصولات جالیزی، زینتی و صیفی‌جات در گلخانه‌ها، سفید بالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) است. سفیدبالک‌ها حشراتی کوچک متعلق به راسته Hemiptera، زیرراسته Sternorrhyncha، بالا خانواده Aleyrodoidea و خانواده Aleyrodidae می‌باشند که روی بسیاری از گیاهان زراعی و زینتی دیده می‌شوند (Martin *et al*., 2000). این آفت با داشتن قطعات دهانی زننده–مکنده و مکیدن شیره گیاهی میزبان،

سبب ضعیف شدن بوته‌ها شده و با ترشح عسلک نیز باعث جلب گرد و خاک می‌شود که در روی عسلک ترشح شده قارچ‌های ساپروفیت رشد کرده، باعث کاهش کیفیت و بازارپسندی و کاهش عملکرد محصولات گیاهی می‌شود. این آفت علاوه بر تغذیه مستقیم، ناقل عوامل بیماری‌زا گیاهی نیز است که در صورت عدم کنترل این حشره امکان دارد گیاهان کاملا خشک شوند (Byrne & Bellows, 1991). در حال حاضر، برای کنترل این آفت در درجه اول از آفت‌کش‌های شیمیایی معمول استفاده می‌شود که با توجه به تعداد نسل زیاد آفت مقاوم شدن سریع سفیدبالک به این آفتکش‌ها گزارش شده است (Li *et al.*, 2000; Bi & Tosccano, 2007; Gorman *et al.*, 2007). با توجه به مقاومت به آفتکش‌های متداول و نیز مخاطرات زیست‌محیطی استفاده از آفتکش‌های شیمیایی، تحقیق و توسعه روی روش‌های کنترل جایگزین و مناسب از لحاظ زیست محیطی الزامی است. با توجه به اینکه سفیدبالک با استفاده از قطعات دهانی زننده–مکنده با فرو بردن قطعات دهانی خود به بافت آوندی گیاه، از شیره نباتات تغذیه می‌کند برای کنترل این آفت، استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات که از طریق تماسی عمل می‌کنند حائز اهمیت است.

در تحقیق حاضر تولید انبوه جدایه ای از قارچ *B. bassiana* روی محیط‌های مایع مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به وجود منابع داخلی و خارجی فراوان در خصوص کاربرد بسترهای آلی مایع مختلف در تولید انبوه قارچ‌های بیمارگر حشرات، در تحقیق حاضر تلاش شد تا با بررسی نتایج سایر محققین، محیط‌های مایع که بهترین عملکرد را داشته‌اند انتخاب شود. با توجه به گستردگی نتایج و تنوع قارچ‌ها و نظر به اینکه نیاز غذایی قارچ بر اساس گونه و جدایه قارچ متفاوت است بسترهای کشت مایع شامل محیط کشت TKI Broth به همراه ۵٪ ملاس چغندر قند (TKI)، محیط مایع حاوی ملاس چغندر قند، عصاره مخمر و مولتی ویتامین (MYM) و محیط ساده عصاره سیب‌زمینی (P)، عصاره سیب‌زمینی و آب پنیر ۸٪ (PCh) و محیط حاوی عصاره سیب‌زمینی و ملاس ۵٪ (PM) انتخاب شد. همچنین میزان پایداری و زنده‌مانی فرآورده قارچی پس از برداشت از روی بسترهای مختلف در دو دمای مختلف (در دمای اتاق و در یخچال) به مدت ۹ ماه ارزیابی گردید. در نهایت میزان بیمارگری اسپورهای بدست آمده از بسترهای مختلف، روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جدایه قارچی

در این پژوهش از جدایه‌ای از قارچ *B. bassiana* (Code: A1–1) که در تحقیقات اخیر بهترین عملکرد را روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه نشان داده بود استفاده شده است (Javar *et al.*, 2019). جدایه قارچی مورد نظر قبل از استفاده در آزمایشات، در محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) کشت شده و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۴–۱۲ روز در تاریکی نگهداری شد. تولید انبوه این جدایه قارچی به صورت تخمیر در محیط مایع با استفاده از شیکر انکوباتور انجام شد.

ایجاد کلنی سفیدبالک گلخانه

حشرات کامل سفیدبالک گلخانه *T. vaporariorum*، از گلخانه گوجه‌فرنگی هشتگرد جمع‌آوری شد. پرورش و ایجاد کلنی آن روی توتون رقم وایت بارلی در گلخانه (۲۵±۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰±۵ درصد و دوره روشنایی طبیعی) صورت گرفت.

فرمانتاسیون مایع

محیط‌های مایع مورد بررسی شامل محیط کشت TKI Broth به همراه ۵ ٪ ملاس چغندرقند (TKI) (Thomas *et al.*, 1987; Lohse *et al.*, 2014)، محیط مایع حاوی ملاس چغندرقند، عصاره مخمر و مولتی ویتامین (MYM) بر اساس یافته‌های Latifian & Rad (2019)، محیط ساده عصاره سیب‌زمینی (P)، عصاره سیب‌زمینی و آب پنیر ۸ ٪ (PCh) و محیط حاوی عصاره سیب زمینی و ملاس ۵ ٪ بود (PM).

محیط TKI بر اساس روش Thomas *et al.*(1987) تهیه شد به این صورت که نمک‌های پایه مورد استفاده شامل ۱۰ گرم KNO_3، ۵ گرم KH_2PO_4، ۲ گرم $MgSO_4$، ۵۰ میلی‌گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۱۲ میلی‌گرم $FeCl_3.6H_2O$، ۲/۵ میلی‌گرم $MnSO_4.H_2O$، ۰/۲۵ میلی‌گرم $Co(NO_3)_2.6H_2O$، ۰/۲ میلی‌گرم $Na_2MoO_4.2H_2O$، ۲/۵ میلی‌گرم $ZnSO_4.7H_2O$، ۰/۵ میلی‌گرم $CuSO_4.5H_2O$، در یک لیتر آب مقطر حل شده و در اتوکلاو سترون شدند و مطابق با یافته‌های Lohse *et al.* (2014)، ملاس چغندرقند نیز به‌عنوان منبع کربن به صورت جداگانه سترون و به آن‌ها اضافه شد. محیط حاوی ملاس چغندرقند، عصاره مخمر و مولتی ویتامین طبق روش Latifian & Rad (2019) تهیه شد. به این ترتیب که ۴۰میلی‌لیتر از ملاس را در یک لیتر آب و در ظرف دیگر ۱۰۰ میلی‌گرم از عصاره مخمر را در یک لیتر آب مقطر مخلوط کرده و ۳۰ میلی‌لیتر از آن به بستر پایه ملاس اضافه شد. در انتها به این بستر مولتی ویتامین (شربت مولتی ویتامین داروپخش) با غلظت ۶ در هزار اضافه شد. برای تهیه محیط عصاره سیب‌زمینی، ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی پوست گرفته شده را در یک لیتر آب مقطر جوشانده و پس از پخت، عصاره آن گرفته شد و حجم آن به یک لیتر رسانده شد. به این محیط جداگانه آب پنیر ۸٪ و ملاس چغندر ۵٪ اضافه شد. کلیه محیط‌ها به مقدار ۲۵۰ میلی‌لیتر در داخل فلاسک‌های ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و با دو دیسک قارچی به قطر ۱۰ میلی‌متر که توسط چوب‌پنبه سوراخ‌کن استریل از حاشیه پرگنه ۱۴ روزه قارچ تهیه شد مایه‌کوبی شدند و در داخل شیکر انکوباتور (HYSC–SL–300RF–South Korea) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دور چرخشی rpm150 به مدت پنج روز قرار گرفتند. سوسپانسیون بدست آمده، از پارچه ململ سه لایه عبور داده و یک میلی‌لیتر از آن در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و غلظت بلاستوسپورها در هر میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسیتومتر تخمین زده شد.

زیست‌سنجی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای

در این آزمایش از بسترهایی که در آزمایش‌های قبل، تولید کنیدی بیشتری را داشتند، استفاده شد. در زیست‌سنجی آزمایشگاهی مطابق روش Oreste *et al.* (2016) انجام شد. برای تامین جمعیت هم‌سن سفیدبالک و انجام زیست‌سنجی، گلدان‌های چهار برگی لوبیا سبز به مدت ۲۴ ساعت در داخل کلنی پرورش سفیدبالک قرار گرفته، پس از تخمریزی حشرات بالغ، گلدان‌ها از کلنی خارج شده و در قفس عاری از هر گونه آلودگی قرار گرفتند. با سپری شدن دوره انکوباسیون تخم و ظهور اکثر پوره‌های سن سوم، دوایری از برگ به قطر تقریبی ۳۰ میلی‌متر تهیه شد. دیسک‌های برگی حاوی پوره‌های سن سوم با سوسپانسیون قارچی با غلظت 10^7 کنیدی در هر میلی‌لیتر با استفاده از محلول‌پاش دستی اسپری شد و سپس دیسک‌ها برای مدت پنج دقیقه روی کاغذ صافی برای جذب رطوبت اضافی قرار گرفته و نهایتا به ظروف پتری حاوی آب آگار ۲٪ انتقال داده شدند و داخل انکوباتور با شرایط دمایی ۵±۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند. میزان مرگ‌ومیر روزانه برای مدت هشت روز بررسی و ثبت شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و در پنج تکرار همراه با یک تیمار شاهد انجام شد.

برای انجام زیست‌سنجی در شرایط گلخانه تحت شرایط محیطی کنترل شده با رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد، دمای ۵±۲۵ درجه سلسیوس و دارای نور طبیعی، بذر لوبیا در گلدان‌هایی به قطر ۳۰ سانتی‌متر کاشته شده و پس از رسیدن بوته‌های لوبیا به مرحله چندبرگی، گلدان‌ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل کلنی پرورش (دما ۵±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی) قرار گرفته، پس از ۴۸ ساعت و تخمریزی حشرات بالغ در سطح پشتی برگ لوبیا، گلدان‌ها از کلنی خارج و در گلخانه در داخل قفس عاری از هر گونه آلودگی قرار داده شدند. با سپری شدن دوره انکوباسیون تخم و ظهور اکثر پوره‌های سن سوم، آزمایش با اسپورپاشی غلظت 10^7 کنیدی در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های قارچی منتخب در پنج تکرار (هرتکرار شامل یک برگ لوبیا) انجام شد. تعداد پوره‌ها قبل از انجام آزمایش روی برگ‌های مشخص شده، با استفاده از

ذره‌بین شمارش شدند. هفت روز پس از اسپورپاشی، نمونه‌های برگی به آزمایشگاه منتقل و تعداد سفیدبالک مرده و زنده زیر استرئومیکروسکوپ شمارش شد. پوره‌های سفیدبالک خشک شده و تغییر رنگ داده و یا پوره‌های پوشیده شده با میسلیوم قارچی سفیدرنگ به‌عنوان پوره‌های مرده در نظر گرفته شد.

بررسی روند پایداری و زنده‌مانی اسپورهای رشد کرده در محیط‌های غذایی مختلف

برای تهیه بلاستوسپور و خشک کردن و نگهداری آن‌ها از روش Lohse *et al.* (2014) استفاده شد. به این صورت که سوسپانسیون حاوی بلاستوسپور قارچ در محیط مایع پس از عبور از پارچه ململ سه لایه، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس دو بار با آب مقطر استریل شسته و سانتریفیوژ شدند. نمونه‌ها در داخل پتری‌های سترون در زیر هود استریل قرار گرفتند تا در معرض هوا خشک شوند. این توده قارچی در دمای محیط (۲۵±۵ درجه سلسیوس) و هم در دمای یخچال (۴ درجه سلسیوس) به مدت ۹ ماه نگهداری و هر سه ماه یکبار Colony Forming Unit (CFU) و زنده‌مانی آن‌ها بررسی شد. در پایان ۹ ماه آزمایش زهرآگینی بلاستوسپورها بر پوره‌های سفیدبالک مطابق روش توضیح داده شده در قسمت زیست‌سنجی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انجام شد.

تجزیه آماری

تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین تولید اسپور در بسترهای مختلف با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. زیست‌سنجی در قالب طرح کاملا تصادفی و در پنج تکرار انجام شد. در زیست‌سنجی از تجزیه واریانس (ANOVA) استفاده شده، درصد مرگ‌ومیر پوره‌های سفیدبالک بر اساس فرمول ابوت تصحیح و مقایسه میانگین درصد تلفات آفات با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد با نرم افزار SPSS انجام گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل صورت گرفت.

نتایج

میزان کنیدی‌های غوطه‌ور یا بلاستوسپور تولید شده در محیط‌های مایع

میزان کنیدی‌های غوطه‌ور یا بلاستوسپور تولید شده در محیط‌های مایع شامل محیط کشت TKI Broth به همراه ۵٪ ملاس چغندرقند (TKI)، محیط مایع حاوی ملاس چغندرقند، عصاره مخمر و مولتی ویتامین (MYM) و محیط‌های ساده عصاره سیب‌زمینی (P)، عصاره سیب‌زمینی و آب پنیر ۸٪ (PCh) و محیط حاوی عصاره سیب‌زمینی و ملاس ۵٪ (PM) در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین میزان تولید کنیدی‌های غوطه‌ور یا بلاستوسپور در محیط‌های مایع مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($df=4$, $F=105.481$, $P < 0.00$). مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی، تیمارها را در چهار سطح آماری گروه‌بندی نمود ($P< 0.05$). در محیط TKI اسپور مشاهده شده به صورت کنیدی‌های غوطه‌ور (Submerged conidia) بود که بیشترین میزان تولید اسپور نیز در این محیط مشاهده شد ($۳/۸۷\times۱۰^{۸}$ کنیدی در میلی‌لیتر). در سایر محیط‌های بررسی شده اسپور تولید شده به صورت بلاستوسپور مشاهده شد. بیشترین میزان بلاستوسپور در محیط PCh با $۲/۳۷\times۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر و سپس به ترتیب در محیط‌های P، PM و MYM با میانگین $۱/۲\times۱۰^{۸}$، $۹/۳۷\times۱۰^{۷}$ و $۵/۶۲\times۱۰^{۷}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر بدست آمد (شکل ۱)

با توجه به نتایج میزان تولید اسپور در محیط‌های مایع مختلف (شکل ۱)، اسپورهای بدست آمده از محیط‌های TKI، PCh و P برای انجام زیست‌سنجی و زنده‌مانی و پایداری آن مورد استفاده قرار گرفت. مشاهده شد که محیط‌های حاوی ملاس (PM و MYM) علاوه بر بازده کم در تولید بلاستوسپور، در فرایند جداسازی بلاستوسپور از محیط و خشک شدن نیز، حالت چسبندگی در بلاستوسپورها ایجاد می‌کنند بنابراین در ادامه بررسی‌ها از این محیط‌ها استفاده نشد.

زیست‌سنجی‌ها در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای

نتایج زیست‌سنجی آزمایشگاهی نشان داد همهٔ تیمارها درصد بیمارگری بالایی در پوره‌های سفیدبالک گلخانه (۷۰ درصد≤) ایجاد کردند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین میزان تاثیر اسپورهای برداشت شده از روی بسترهای مختلف روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه وجود دارد ($df=2, F=3.70, P \leq 0.05$). بلاستوسپورهای حاصل از محیط PCh بیشترین درصد مرگ‌ومیر را با ۸۶/۴۰ درصد تلفات نشان دادند و کمترین میزان تلفات در محیط TKI با ۷۴/۰۳ درصد مرگ‌ومیر مشاهده شد.

در زیست‌سنجی گلخانه‌ای در میزان تلفات پوره‌های سفیدبالک در مقایسه با نتایج زیست‌سنجی آزمایشگاهی در تمامی تیمارها کاهش قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد. نتایج تجزیه واریانس زیست‌سنجی گلخانه‌ای نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین میزان تاثیر اسپورهای برداشت شده از روی بسترهای مختلف روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه وجود ندارد ($df=2, F=1.83, P > 0.05$) و میزان تلفات بین ۴۳ تا ۵۰ درصد مرگ‌ومیر مشاهده شد (شکل ۲).

بررسی روند پایداری و زنده‌مانی اسپورهای رشد کرده در محیط‌های مایع مختلف

نتایج بررسی زنده‌مانی (cfu%) بلاستوسپورهای تولید شده در محیط‌های عصاره سیب‌زمینی و محیط عصاره سیب‌زمینی به همراه آب پنیر و همینطور کنیدی‌های غوطه‌ور تولید شده در محیط TKI، در بدو برداشت از محیط و خشک کردن و همینطور ۳، ۶ و ۹ ماه پس از نگهداری در دمای یخچال (شکل ۳) و دمای محیط (شکل ۴) نشان داده شده است. در شرایط نگهداری در یخچال کلیه اسپورهای بدست آمده تا سه ماه بیشتر از ۸۰ درصد زنده‌مانی را نشان دادند.

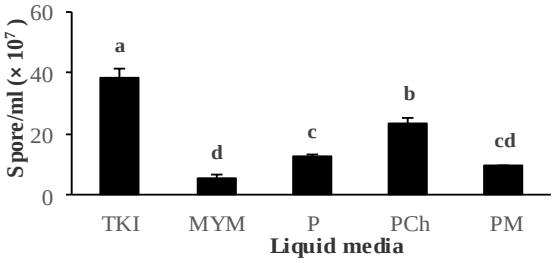
پس از سه ماه زنده‌مانی اسپورها با شیب کند سیر نزولی داشت. بیشترین شیب کاهش در زنده‌مانی، در بلاستوسپورهای بدست آمده از محیط عصاره سیب‌زمینی حاوی آب پنیر مشاهده شد به‌طوریکه پس از ۹ ماه نگهداری در یخچال حدود ده درصد از بلاستوسپورها زنده بودند.

بلاستوسپورهای عصاره سیب‌زمینی بیشترین ثبات در زنده‌مانی را نشان دادند و پس از ۹ ماه نیز بیشتر از ۸۰ درصد اسپورها زنده بودند. زنده‌مانی کنیدی‌های غوطه‌ور در پایان ۹ ماه نگهداری در یخچال به حدود ۵۰ درصد کاهش پیدا کرد.

در شرایط نگهداری در دمای محیط (شکل ۴)، شیب تغییرات در زنده‌مانی اسپورها در همه‌ی محیط‌ها نزولی بود. به‌طوریکه پس از سه ماه نگهداری در دمای محیط، زنده‌مانی بلاستوسپورهای حاصل از محیط عصاره سیب‌زمینی به ۶۳/۸ درصد و سایر اسپورها به حدود ۵۰ درصد کاهش یافت. پس از نُه ماه نگهداری در دمای محیط هیچ یک از اسپورها زنده نبودند.

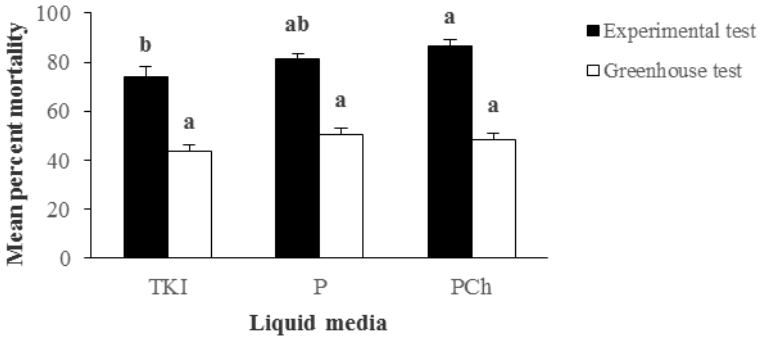
زیست‌سنجی آزمایشگاهی و گلخانه‌ای پس از نُه ماه

به دلیل اینکه پس از نگهداری اسپورها در دمای محیط هیچ یک از اسپورها زنده نبودند در انجام زیست‌سنجی‌ها از اسپورهای نگهداری شده در دمای یخچال استفاده شد. در زیست‌سنجی آزمایشگاهی، کنیدی‌های غوطه‌ور حاصل از محیط TKI و بلاستوسپورهای حاصل از محیط عصاره سیب‌زمینی پس از نُه ماه نگهداری در یخچال، به ترتیب ۲۵ تا ۳۰ درصد تلفات در پوره‌های سفیدبالک ایجاد کردند (شکل ۵). بلاستوسپورهای حاصل از عصاره سیب‌زمینی حاوی آب پنیر قادر به آلوده ساختن پوره‌ها نبودند. با مقایسه درصد تلفات اسپورهای مختلف در بدو تولید و پس از گذشت نُه ماه مشاهده می‌شود که زهرآگینی آن‌ها کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته است. در زیست‌سنجی گلخانه‌ای تلفاتی در پوره‌های مورد آزمایش مشاهده نشد.



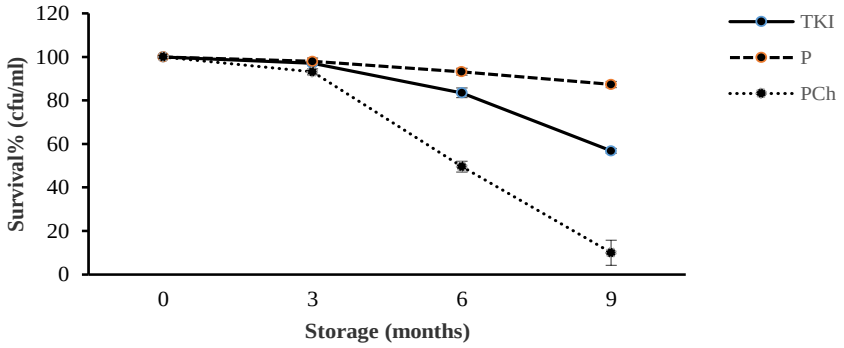
شکل ۱– میزان تولید اسپور قارچ *Beauveria bassiana* در بسترهای مایع مختلف. در محیط TKI کنیدی‌های غوطه‌ور و در سایر محیط‌ها بلاستوسپور شمارش شد. حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P< 0.05: Tukey HSD).

Figure 1. Spore production of *Beauveria bassiana* in different liquid media. In TKI medium, the submerged conidia and in other studied media, the blastospores were counted. Different letters indicate a significant difference between treatments (P< 0.05: Tukey HSD).



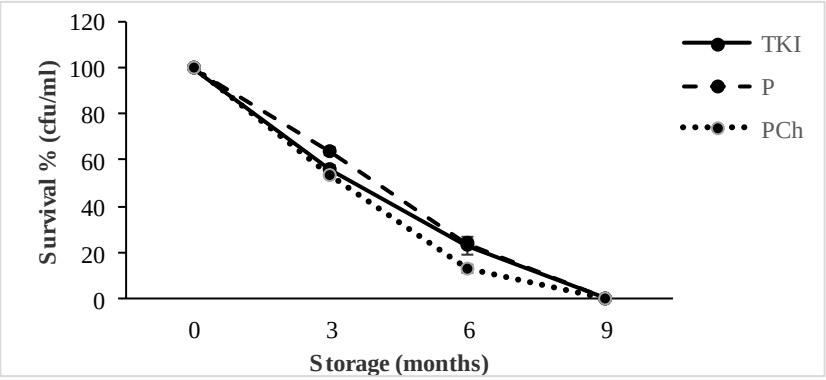
شکل ۲– میانگین درصد مرگ‌ومیر پوره سن سوم سفیدبالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum* پس از آلودگی با کنیدی‌های غوطه‌ور (TKI) و بلاستوسپورهای (P و PCh) *Beauveria bassiana* بدست آمده از بسترهای مایع مختلف در زیست‌سنجی آزمایشگاهی و گلخانه‌ای. حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P< 0.05: Tukey HSD).

Figure 2. Mean percent mortality of greenhouse whitefly nymphs *Trialeurodes vaporariorum*, when infected with submerged conidia (TKI) and blastospores (P and PCh) of *Beauveria bassiana* obtained from different liquid media in laboratory and greenhouse bioassays. Different letters indicate a significant difference between treatments (P< 0.05: Tukey HSD).



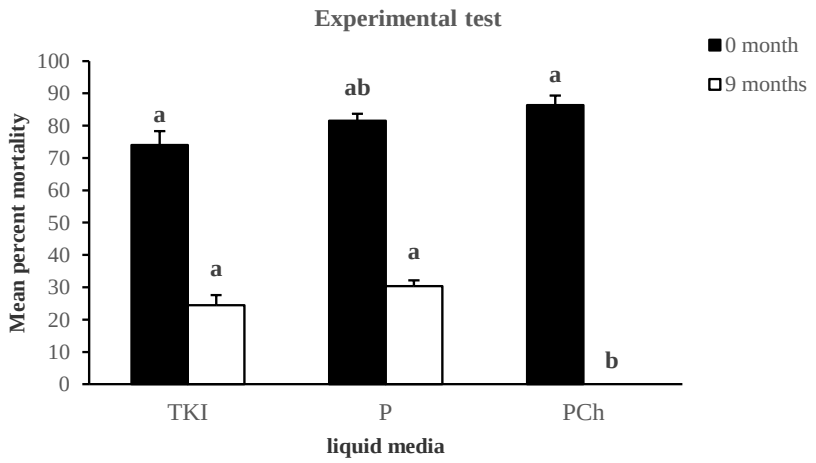
شکل ۳– درصد زنده‌مانی (cfu/ml) کنیدی‌های غوطه‌ور (TKI) و بلاستوسپورهای (P و PCh) تولید شده در محیط‌های مایع مختلف طی نُه ماه نگهداری در دمای یخچال (۴ درجه سلسیوس)

Figure 3. Survival percentage (cfu/ml) of submerged conidia (TKI) and blastospores (P and PCh) produced in different liquid media during 9 months of storage at refrigerator temperature (4 °C)



شکل ۴– درصد زنده‌مانی (cfu/ml) کنیدی‌های غوطه‌ور (TKI) و بلاستوسپورهای (P و PCh) تولید شده در محیط‌های مایع مختلف طی نُه ماه نگهداری در دمای محیط (۵±۲۵ درجه سلسیوس)

Figure 4. Survival percentage (cfu/ml) of submerged conidia (TKI) and blastospores (P and PCh) produced in different liquid media during 9 months of storage at room temperature (25±5 °C)



شکل ۵– زیست‌سنجی آزمایشگاهی پوره سن سوم سفیدبالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum* با کنیدی‌های غوطه‌ور (TKI) و بلاستوسپورهای (P و PCh) جدایه قارچی *Beauveria bassiana* تولید شده روی بسترهای مایع مختلف بلافاصله پس از تولید و نُه ماه پس از تولید. میله‌ها خطای استاندارد میانگین هستند. حروف متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P< 0.05: Tukey HSD).

Figure 5. Laboratory bioassay of third nymphs of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* with submerged conidia (TKI) and blastospores (P and PCh) of *Beauveria bassiana* obtained from different liquid media immediately and nine months after production. The bars are the standard error. Different letters indicate a significant difference between treatments (P< 0.05: Tukey HSD).

بحث

قارچ *B. bassiana* می‌تواند سه نوع کنیدی در محیط‌های کشت تولید کند: کنیدی هوایی، بلاستوسپور و کنیدی‌های غوطه‌ور (Submerged conidia) (Hegedus *et al.* 1992). کنیدی‌های هوایی از میسلیوم‌هایی تولید می‌شود که روی مواد جامد یا نیمه جامد رشد کرده باشند (MacLeod,1954). بلاستوسپور (Bidochka, 1987) و کنیدی‌های غوطه‌ور (Thomas *et al.*, 1987; Rombach 1988) در محیط‌های کشت مایع تولید می‌شوند. بلاستوسپورها اجسام هیفی تک سلولی با دیواره ضخیم هستند که بزرگتر از کنیدی‌های هوایی می‌باشند و تنها در داخل همولنف حشره زنده تولید می‌شوند. کنیدی‌های غوطه‌ور از لحاظ ظاهری شبیه کنیدی‌های هوایی ولی در اندازه کمی بزرگتر از کنیدی‌های هوایی می‌باشند همینطور از نظر خصوصیات بیوشیمیایی سطح کنیدی با هم متفاوت هستند (Thomas *et al.*, 1987). بلاستوسپور در محیط‌های رشد غنی از مواد غذایی و کنیدی‌های غوطه‌ور در محیط‌های رشد با محدودیت در مواد غذایی دیده می‌شوند (Holder & Keyhani, 2005). منابع تامین کننده کربن و نیتروژن در محیط کشت در تولید کنیدی‌های غوطه‌ور تاثیرگذارند (Thomas *et al.*, 1987). تولید کنیدی‌های غوطه‌ور در محیط TKI Broth گزارش شده است (Thomas *et al.*, 1987; Lohse *et al.*, 2014). در پژوهش انجام گرفته نیز در محیط TKI به همراه ۵ ٪ ملاس چغندرقند تنها کنیدی‌های غوطه‌ور مشاهده شد درحالیکه در سایر محیط‌های مایع بررسی شده، بلاستوسپور وجود داشت (شکل ۱). میزان غلظت بلاستوسپور در محیط عصاره سیب‌زمینی حاوی آب پنیر بیشتر از محیط عصاره سیب‌زمینی فاقد آب پنیر بود. تاثیر مثبت افزودن آب پنیر در میزان تولید بلاستوسپور در منابع مختلف اشاره شده است (Rashid *et al.*, 2019; Kassa *et al.*, 2008). آب پنیر از نظر منبع هیدروکربنی بسیار غنی بوده و دارای ماکرومولکول‌ها و میکروالمنت‌های مورد نیاز قارچ می‌باشد

که آن را به محیط مناسبی برای رشد و اسپورزایی قارچ تبدیل کرده و موجب افزایش ذخیرهٔ غذایی محیط‌های رشدی و تولید کنیدی‌های قارچی می‌شود (Kamyab, 2001).

در تحقیق حاضر، بیشترین میزان تولید اسپور در محیط TKI بدست آمد ($۳/۸۷\times۱۰^{۸}$ کنیدی در میلی‌لیتر) که اسپور تولید شده به صورت کنیدی‌های غوطه‌ور بود. در تحقیقات گذشته (Thomas *et al.*, 1987)، میزان کنیدی‌های غوطه‌ور در محیط TKI Broth را ۵×۱۰^{۸} کنیدی در میلی‌لیتر گزارش کرده‌اند. در این محیط از گلوکز به‌عنوان منبع کربن استفاده شده است. Lohse *et al.* (2014) توانستند میزان $۱/۳۳\times۱۰^{۹}$ کنیدی کل *B. bassiana* را در یک میلی‌لیتر محیط TkI Broth بدست آورند. کنیدی کل شامل کنیدی‌های غوطه ور و بلاستوسپور بوده است. در این محیط از ۵٪ ملاس چغندر قند استفاده شده است. در سایر محیط‌های بررسی شده در تحقیق حاضر، اسپور تولید شده به صورت بلاستوسپور مشاهده شد. بیشترین میزان بلاستوسپور در محیط PCh با $۲/۳۷\times۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر بدست آمد. Askary *et al.* (2009)، بالاترین میزان تولید بلاستوسپور *B. bassiana* را در محیط عصاره سیب‌زمینی با میانگین ۸/۱۰۹ لگاریتم اسپور در میلی‌لیتر گزارش دادند. Rashid *et al.* (2019) بیشترین تولید بلاستوسپور برای قارچ *B. bassiana* را در محیط عصاره ضایعات ماهی با ۳×۱۰^{۷} بلاستوسپور در میلی‌لیتر محیط بدست آورد که با اضافه کردن ۸٪ آب پنیر به این محیط میزان تولید بلاستوسپور به ۵×۱۰^{۷} بلاستوسپور در میلی‌لیتر محیط رسید.

با مشاهده شکل ۱ مشخص می‌شود که بلاستوسپور و کنیدی‌های غوطه‌ور تولید شده در محیط مایع بر روی پوره‌های سفیدبالک قدرت بیمارگری دارند. در شرایط آزمایشگاهی، بلاستوسپورها بیمارگری بیشتری را روی پوره‌های سفیدبالک نسبت به کنیدی‌های غوطه‌ور نشان دادند هر چند در شرایط گلخانه اختلاف معنی‌داری بین بیمارگری اسپورهای تولید شده در محیط‌های مایع وجود نداشت. بررسی‌های Hegedus *et al.* (1991) نشان می‌دهد که سطح بیرونی بلاستوسپور نسبت به کنیدی‌های غوطه‌ورکمتر آبگریز است که این مسئله به چسبیدن اسپورها به کوتیکول حشره کمک می‌کنند. بنابراین میزان بیمارگری آن‌ها کمی بیشتر از کنیدی‌های غوطه ور است. در تحقیق اخیر Javar *et al.*(2022)، کنیدی‌های هوایی تولید شده روی بسترهای جامد شامل سبوس برنج، سبوس ذرت و سبوس گندم در زیست‌سنجی آزمایشگاهی، بین ۸۰ تا ۸۷ درصد تلفات را روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه نشان دادند اما در زیست‌سنجی گلخانه‌ای، کنیدی تولید شده روی سبوس برنج، سبوس ذرت و سبوس گندم به ترتیب ۵۶/۸۷±۱، ۵۲/۵۴±۲ و ۲/۹۱±۴۹ درصد مرگ و میر را ایجاد کردند. با مقایسه داده های شکل ۱ با نتایج تحقیقات اخیر (Javar *et al.*, 2022) مشخص می‌شود که بلاستوسپور تولید شده در محیط مایع تقریبا به اندازه کنیدی‌های هوایی تولید شده در محیط جامد، بر روی پوره‌های سفیدبالک قدرت بیمارگری دارند. این در حالیست که مطالعات Lacey *et al.* (1999)، نشان داده است که بلاستوسپور *P. fumosoroseus* در محیط کشت مایع نسبت به کنیدی‌های هوایی در بیمارگری و مرگ *Bemisia argentifolii* (Bellows & Perring) موثرتر بوده است.

فرآورده‌های نهایی تخمیر مایع بیشتر بلاستوسپور می‌باشد که نسبت به کنیدی‌های هوایی قدرت انتشار و بیمارگری بالاتر یا برابر دارند ولی میزان پایداری و زنده‌مانی آن‌ها بخصوص در شرایط خشک و گرم پایین‌تر است بر اساس یافته‌های Mascarin *et al.* (2016) ، زنده‌مانی بلاستوسپورهای خشک شده در معرض هوا پس از نگهداری به مدت ۹ ماه در دمای ۴ درجه سلسیوس به خوبی حفظ شده است (بالای ۸۰ درصد زنده‌مانی). در این مطالعه هنگامیکه بلاستوسپورها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند زنده‌مانی آن‌ها پس از ۱۲ هفته تا ۵۰ درصد کاهش و پس از ۴۰ هفته به کمتر از ۱۰ درصد رسید. یافته‌های تحقیق حاضر نیز موئد همین مطلب است که نگهداری در دمای پایین‌تر (۴ درجه سلسیوس) نسبت به دماهای بالاتر در پایداری و زنده‌مانی بلاستوسپورها و کنیدی‌های غوطه‌ور تاثیر مثبت دارد و نگهداری در دمای محیط (۲۵±۵ درجه سلسیوس) پس از گذشت سه ماه

زنده‌مانی اسپورها را به شدت کاهش می‌دهد. در تحقیق دیگری مشخص شده است که انواع اسپورها (کنیدی‌های هوایی، بلاستوسپور و کنیدی غوطه‌ور) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، به سرعت زنده‌مانی خودشان را از دست می‌دهند (Hegedus *et al*., 1992). در تحقیق حاضر، با توجه به قدرت بیمارگری و زنده مانی بیشتر بلاستوسپور تولید شده در محیط عصاره سیب‌زمینی، این محیط برای تولید بلاستوسپور به منظور کنترل سفیدبالک گلخانه توصیه می‌گردد. در شکل ۳، بلاستوسپورهای حاصل از محیط عصاره سیب زمینی پس از ۹ ماه نگهداری در یخچال، بیشتر از ۸۰ درصد زنده‌مانی داشتند، ولی میزان زهرآگینی آن روی پوره‌های سفیدبالک گلخانه در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای کاهش قابل توجه یافته است و در زیست سنجی‌های آزمایشگاهی فقط ۳۰ درصد و در گلخانه‌ای هیچ تلفاتی ایجاد نکردند. به نظر می‌رسد نگهداری طولانی‌مدت بلاستوسپور و همینطور شرایط محیطی انجام آزمایش‌ها در قدرت تندش قارچ روی کوتیکول حشره و بیمارگری قارچ تاثیر گذاشته است (شکل ۵). با توجه به مزایای تولید و تکثیر قارچ در محیط مایع از جمله نیاز به زمان کمتر برای تکثیر، کنترل بهتر آلودگی‌های ساپروفیت و نیاز به هزینه کمتر در تولید صنعتی با وجود فرمانتورهای قابل کنترل صنعتی، بنابراین برای استفاده از فرآورده‌های نهایی تخمیر مایع چه بلاستوسپور و چه کنیدی‌های غوطه‌ور بایستی روش‌های خاصی برای مقاوم کردن آن‌ها در مقابل خشک شدن بکار برد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر قسمتی از یک پروژه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور است بدین وسیله از این موسسه که امکانات اجرای این پژوهش را فراهم کرد سپاسگزاری می‌شود.

References

Askary, H. Zamani, S.M. & Ashouri, A. 2009. Effect of some liquid and solid media on sporulation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales). Iranian Journal of Plant Protection Science, 39(1): 31–43 (In Persian with English summary).

Bi, J.L. & Tosccano, N.C. 2007. Current status of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, susceptibility to neonicotinoid and conventional insecticides on strawberries in Southern California. Pest Management Science, 63(8): 747–752.

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

Byrne, D.N. & Bellows, T.S. 1991. Whitefly biology. Annual Review of Entomology, 36: 431–457.

Gorman, K., Devine, G.J., Bennison, J., Coussons, P., Punchard, N. & Denholm, I. 2007. Report of resistance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). Pest Management Science, 63(6): 555–558.

Hegedus, D.D., Bidochka, M.J., Miranpuri, G.S. & Khachatourians, G.G. 1992. A comparison of the virulence, stability and cell–wall–surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied Microbiology and Biotechnology, 36:785–789.

Holder, D.J. & Keyhani, N.O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana* to substrata. Applied and Environmental Microbiology, 71: 5260–5266.

Javar S, Farrokhi Sh, Asgari B, & Parsi F. 2019. Investigating on the potential of local isolates of entomopathogenic fungi as biological control agents against greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. BioControl in Plant Protection, 7(1): 127–142 (In Persian with English summary).

Javar, S., Farrokhi, Sh., Naeemi, Sh. & Kalantari Joshani, M. 2022. Effect of moisture content, substrates and additives on conidiation and pathogenicity of fungus *Beauveria bassiana* against greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. Journal of Applied research in Plant Protection, 11(2), accepted.

Kamyab, A. 2001. A User Guide to the Animal Nutrition. 218 pp. Hage– Shenas publication (In Persian with English summary).

Kassa, A., Brownbridge, M., Parker, B.L., Skinner, M., Gouli, V., et al., 2008. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Mycological Research, 112(5): 583–591.

Lacey, L.A., Kirk, A.A., Millar, L., Mercadier, G. & 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.

Latifian, M. & Rad, B. 2019. Effect of Protein and Vitamins Supplements on Growth Indices of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* at blastospore proliferation stage. Journal of Entomological Research, 11(2): 43–55. (In Persian with English abstract).

Li, Y., Dennehy, T.J., Li, X. & Wigert, M.E. 2000. Susceptibility of Arizona whiteflies to chloronicotinyl insecticides and IGRs: new developments in the 1999 season. Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences, 1325–1330.

Lohse, R., Jakobs–Schönwandt, D. & Patel, A.V. 2014. Screening of liquid media and fermentation of an endophytic *Beauveria bassiana* strain in a bioreactor. AMB Express, 4:47. http://www.amb–express.com/content/4/1/47

Lohse, R., Jakobs–Schönwandt, D., Vidal, S. & Patel, A.V. 2015. Evaluation of new fermentation and formulation strategies for a high endophytic establishment of *Beauveria bassiana* in oilseed rape plants. Biological Control, 88: 26–36.

MacLeod, D.M. 1954. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill and *Tritiraehium* Limber. Canadian Journal of Botany, 32: 818–890.

Martin, J.H., Mifsud, D. & Rapisarda, C. 2000. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean Basin. Bulletin of Entomological Research, 90: 407–448.

Mascarin, G.M., Jackson, M.A., Kobori, N.N., Behle, R.W. & Júnior, I.D. 2014. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. Journal of Invertebrate Pathology, http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.001

Mascarin, G.M., Jackson, M.A., Kobori, N.N., Behle, R.W., Dunlap, C.A. and Júnior, I.D. 2015. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. Applied Microbiology and Biotechnology, DOI 10.1007/s00253–015–6620–3

Mascarin, G.M., Jackson, M.A., Behle, R.W., Kobori, N.N. & Júnior, I.D. 2016. Improved shelf life of dried *Beauveria bassiana* blastospores using convective drying and active packaging processes. Applied Microbiology and Biotechnology, DOI 10.1007/s00253–016–7597–2

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 Biosystem Engineering, 50(2): 489–497.

Rombach, M.C. 1988. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina; Hyphomycetes) sympoduloconidia in submerged culture. Entomophaga, 33: 315–324.

Thomas, K.C., Khachatourians, G.G. & Ingledew, W.M. 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Canadian Journal of Microbiology, 33: 12–20.

Liquid fermentation of Beauveria bassiana and its survival and pathogenicity on greenhouse whitefly

Saeedeh Javar [1], Shahram Farrokhi[2], Shahram Naeimi[3], Maryam kalantari Jooshani[4]

1. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran.
2., 3., 4. Assistant Professor, Associate Professor, M.Sc., Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Corresponding author: Saeedeh Javar, email: sajavar@gmail.com

Received: Apr, 27, 2022 9(2) 1–13 Accepted: Jun., 11, 2022

Abstract

In order to use entomopathogenic fungi as a commercial biological agent, their mass production is required. In the present study, the fermentation of one isolate of Beauveria bassiana was investigated using liquid culture media including TKI Broth culture medium with 5% of sugar beet molasses (TKI), liquid medium containing sugar beet molasses, yeast extract and multivitamin (MYM) and potato extract (P), potato extract plus 8% whey (PCh) and potato extract plus 5% molasses (PM). Moreover, the viability of the spores produced at two temperatures (room and refrigerator) was evaluated for nine months. Finally, the pathogenicity of spores obtained from different media was investigated on greenhouse whitefly nymphs under the laboratory and greenhouse conditions. In TKI Medium, the submerged conidia were produced showing the highest amount of conidia production (3.87×108 conidia/ml). The highest amount of blastospores was obtained in PCh medium with 2.37×108 blastospores/ml. In laboratory bioassay, blastospores of PCh medium showed the highest mortality rate (86.40%) on greenhouse whitefly nymphs and the lowest mortality rate were observed in submerged conidia from TKI medium with 74.03% mortality. In greenhouse bioassay, the mortality rate was between 43% and 50%. After nine months of storage at refrigerator, submerged conidia from TKI Broth and blastospores from P medium caused 25–30% mortality in whitefly nymphs in laboratory condition. No mortality was observed in greenhouse condition. According to the results, blastospores obtained from potato extract are introduced as a suitable liquid medium for mass production of this fungal isolate.

Keywords: *Beauveria bassiana*, *Trialeurodes vaporariorum*, Liquid media, Biological control, Insect pathogenic fungus