Iranian Plant Protection Research
https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 40, No. 3, 2026, p. 649-663

Study of the Production of Spores of the Pathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in Liquid and Solid Culture Media and Evaluation of Its Pathogenicity to the Rice Stem Borer (*Chilo suppressalis*) *in vitro*

Farzad Majidi-Shilsar[1*]

1- Rice Research Institute of Iran Rasht, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran
(*- Corresponding author's Email: f.majidi@areeo.ac.ir, majidi14@yahoo.com)

Received: 09-12-2025
Revised: 15-08-2026
Accepted: 19-08-2026
Available Online: 22-06-2026

How to cite this article:
Majidi-Shilsar, F. (2026). Study of the production of spores of the pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid and solid culture media and evaluation of its pathogenicity to the rice stem borer (*Chilo suppressalis*) *in vitro*. *Iranian Plant Protection Research*, *40*(3), 649-663. (In Persian). https://doi.org/10.22067/JPP.2026.96878.1267

Introduction

Rice strip stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lep., Crambidae) is considered as a dangerous pest in rice fields in the north of the country and for more than four decades, the control of this pest is based on the application of chemical insecticides (Solutions and Granules). The use of chemical insecticides and consideration of environmental, economic and ecological considerations in rice fields. The possibility of using *B. bassiana* fungus in the framework of integrated pest management program and in the form of biological control was examined and emphasized. Also, to reduce the use of chemical insecticides, agricultural entomologists today design pest control operations so that living natural agents are more involved in agricultural crops. In this regard, as in the rice agricultural ecosystem, pests are under the influence of numerous enemies, including fungi, viruses and fungi, meanwhile, *B. bassiana* the fungus is of special importance in the control of rice stem borer due to its distribution and abundance in the north of the country. This fungus is now used as a biological control agent and bioinsecticide to control pests of agricultural and horticultural products. Under natural conditions, the fungus causes 10 to 11 percent mortality in the stem-eating pest population.

Materials and Methods

To conduct this study, the *Beauveria bassiana* isolate Mcb18, originally isolated from the rice stem borer and obtained from the Rice Research Institute of Rasht, Iran, was initially cultured on Sabouraud Dextrose Agar supplemented with Yeast Extract (SDAY) medium. The cultures were then incubated at 25 ± 1°C to allow conidial germination. After complete sporulation (14–21 days), the conidia were gently scraped from the surface of the culture medium using a sterile inoculating loop. Sterile distilled water containing 0.02% (v/v) Tween 80 was added to detach the conidia from the culture surface, and the resulting suspension was transferred into a sterile Erlenmeyer flask. After this step, the special suspension was passed through the muslin cloth (mesh 0.5 mm) until it was smooth and only the fungal spores remained.

Solid Culture Media:

Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)

https://doi.org/10.22067/JPP.2026.96878.1267

Four solid culture media consisting of rice grains (Hashemi cultivar), wheat grains (Durum cultivar), maize kernels (Chavosh cultivar), and barley grains (Sahand cultivar) were evaluated. Initially, healthy rice grains were boiled for 8–10 min. Wheat grains were immersed in boiling water for 10 min. Cracked maize kernels were soaked in water for 60 min, while barley grains, which had been broken into small pieces, were soaked in water for 10 min.

Liquid Culture Media Tested:

Liquid culture media including potato extract, corn grits extract, corn syrup, washed rice water, and the artificial media SPMB and CSYE were also evaluated Spore Germination Assay. A spore germination assay was conducted for the fungal isolate. Initially, a conidial suspension with a concentration of 1×10^6 conidia mL^{-1} was prepared using a hemocytometer. One milliliter of the conidial suspension obtained from each liquid culture medium was transferred into 10 mL of sterile distilled water supplemented with 0.02% (v/v) Tween 80. Subsequently, 100 µL of the resulting suspension was spread onto PDA plates and incubated at 26 ± 0.5°C under a 12 /12 h light//dark photoperiod for 16–18 h to allow spore germination.

Determination of Fungal Colony-Forming Units (CFU)

To determine the number of fungal colony-forming units (CFU), 250-mL Erlenmeyer flasks, each containing 1 L of the previously prepared liquid culture medium, were used. The flasks were sealed with cotton plugs and aluminum foil and sterilized in an autoclave at 120°C for 20 min. After sterilization, the media were allowed to cool, and tetracycline was aseptically added to each flask at a final concentration of 50 mg L^{-1} (50 ppm) to suppress bacterial contamination.

Insect Rearing

The rice stem borer colony was established using adult moths collected with light traps. Following collection, five pairs of male and female moths were introduced into 1-L Erlenmeyer flasks containing freshly cut rice leaves for oviposition. The flasks were maintained under laboratory conditions at 25 ± 1°C**,** 85% relative humidity, and a 16:8 h (light/ dark) photoperiod. Egg masses were deposited on the rice leaves within 24–48 h after the adults were introduced into the flasks. The egg masses were then carefully removed from the leaves and transferred to test tubes for incubation. Approximately 5 days later, the first-instar larvae hatched from the egg masses. Newly hatched larvae were transferred to plastic containers supplied with fresh rice stems as a food source.

Bioassay of *Beauveria bassiana* and Estimation of LC_{50} and LT_{50}

Larvae of different instars were individually reared in Petri dishes from the beginning of the experiment until the sixth instar. The larvae were fed daily with freshly collected, surface-sterilized rice stems. Each treatment was performed with three replicates, with 10 larvae per replicate. Daily mortality was recorded, and the occurrence of fungal infection in dead larvae was monitored. The observed mortality rates were corrected using Abbott's formula (Abbott, 1925), and the mean time to mortality was calculated.

Results and Discussion

The results of this study showed that the highest conidial production on solid culture media was obtained from rice grains. Moreover, the highest conidial yields in liquid culture media were achieved in CSYE, SPMB, and washed rice water, followed by potato extract, corn syrup, and corn meal media, respectively. The highest dry mycelial biomass in solid and liquid media was recorded in rice grains and wheat grains, SPMB, CSYE, and washed rice water, respectively

Conclussion

Furthermore, the calculated LC_{50} values at 10 days' post-inoculation indicated that conidial concentrations ranging from 7.5×10^5 to 1.8×10^6 conidia mL^{-1} resulted in increased larval cumulative mortality, with mortality rates ranging from 56.8% to 70.34%. The findings of this study highlight the potential of solid culture media for the development of large-scale production systems of the entomopathogenic fungus B. bassiana, which can be incorporated into integrated pest management (IPM) programs, particularly for the control of the rice striped stem borer under field conditions.

Keywords: Bioassay, Conidia, Stem borer

پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۴۰ شماره ۳، پاییز ۱۴۰۵، ص. ۶۶۳-۶۴۹

مطالعه تولید اسپورهای قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* در محیط‌های کشت مایع و جامد و ارزیابی میزان زهرآگینی آن نسبت به کرم ساقه‌خوار نواری برنج (*Chilo suppressalis*) در شرایط آزمایشگاهی

فرزاد مجیدی شیل‌سر[۱*]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۲۸

چکیده

قارچ *Beauveria bassiana* برای رشد و تولید اسپور، نیاز غذایی خود را از منابع کربن، فسفر و نیتروژن تـأمین می‌کنـد. تحقیـق حاضـر بـه‌منظور معرفی محیط کشت مناسب برای تولید انبوه در بستر مواد غذایی جامد و مایع می‌باشد. در این پژوهش، اثر چند محیط کشت جامد شامل دانـه جـو (*Hordeum vulgare* L.)، دانه برنج(*Oryza sativa* L.) ، دانه گندم (*Triticum aestivum* L.) و دانه ذرت (*Zea mays* L.) و محیط‌های کشـت مـایع شامل عصاره سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.)، بلغور ذرت، شربت ذرت، آب برنج شسته‌شده، محیط کشـت SPMB و محـیط کشـت CSYE مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش، از جدایه MCB18 قارچ *Beauveria* جداشده از کرم ساقه خوار نواری برنج (*Chilo suppressalis*) اسـتفاده شد. برای تهیه اسپور پایه، محیط کشت[۲] PDA مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اسپورزایی، اسپورهای مورد نظر قارچ به ارلن‌های ضدعفونی‌شده حـاوی مواد جامد و مایع، به محیط‌های کشت اضافه شد. سپس محتویات ارلن‌ها تا سه هفته در انکوباتور با دمای ۲ ± ۲۵ نگهداری شدند. نتایج این پـژوهش نشان داد که بیشترین تعداد اسپورها در محیط کشت جامد مربوط به دانه برنج بود. همچنین بیشترین اسپورهای تولیدشده برای محیط‌های کشت مـایع، به‌ترتیب در SPMB، CSYE و آب برنج شسته‌شده، عصاره سیب‌زمینی، شربت ذرت و بلغور ذرت استحصـال شـد. بیشـترین وزن خشـک میسـلیوم در محیط کشت جامد و مایع به‌ترتیب در دانه برنج و دانه گندم، SPMB، CSYE و برنج شسته‌شده مشاهده گردید. در این پژوهش، بیشترین تراکم اسـپور تولیدشده در ماده غذایی برنج شسته‌شده به دست آمد. نتایج بررسی‌های این پژوهش نشان داد که بیشترین میزان کلنی (CFU) در محیط مایع مربـوط به SPMB و CSYE بود. همچنین در این بررسی، محیط‌های غذایی با منشأ گیاهی(دانه برنج و دانه برنج شسته‌شده) در مقایسه با مواد غذایی ترکیبی و مصنوعی از قبیل CSYE و SPMB به‌دلیل ارزان بودن می‌تواند جایگزین مناسبی برای تولید قارچ *B. bassiana* باشد. سرانجام، زهرآگینی اسـپورهای به‌دست‌آمده در محیط مایع و کنیدیوم‌های برداشت‌شده از محیط کشت جامد نسبت به لاروهای آفت ساقه‌خوار (*C. suppressalis*) مورد مقایسـه قـرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون زیست‌سنجی کنیدیوم‌های قارچ رشدیافته روی دانه شسته‌شده برنج نشان داد که قدرت زهرآگینی غلظت ۱×۱۰^{۷} کنیـدیوم در میلی‌لیتر روی لارو سن ششم بیشتر از سنین اولیه (۷۳/۳۳ درصد) بود. همچنین نتایج مقدار LC_{50} محاسبه‌شده در ۱۰ روز پس از تلقیح نشان داد که تراکم $۷/۱\times۱۰^{۵}$ تا $۱/۸\times۱۰^{۶}$ کنیدی در میلی‌لیتر، مرگ و میر تجمعی لاروها روند افزایشی داشت، به‌طوری کـه از ۵۶/۸ تـا ۷۰/۳۴ درصـد متغیـر بـود. اهمیت این تحقیق حاکی از آن است که محیط‌های کشت جامد می‌توانند در توسعه برنامه‌های تولید انبوه قـارچ بیمـارگر *B. bassiana* در برنامـه‌های مدیریت تلفیقی آفات به‌ویژه کرم ساقه‌خوار نواری برنج در شرایط مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آفت ساقه‌خوار،کنیدی، زیست سنجی

۱- مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: majidi14@yahoo.com)
https://doi.org/10.22067/JPP.2026.96878.1267

2-Potato Dextrose Agar

مقدمه

کرم ساقه‌خوار نواری برنج Walker (Lep., Crambidae) (*Chilo suppressalis*) به‌عنوان آفت خطرناک در مزارع برنج (*O. sativa L.*) شمال کشور محسوب می‌گردد و بیش از چهار دهه است که مهار این آفت برپایه کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی (محلول و گرانول) صورت می‌گیرد. سالانه حدود تا ۸۰۰۰ تن از این سموم به شالیزارهای کشور وارد می‌شود که پیامدهای نامطلوب و زیان‌باری برای سلامت جامعه و محیط زیست (انسان، دشمنان طبیعی، آلودگی آب‌های سطحی چاه‌ها، رودخانه‌ها و دریاها) به دنبال دارد (Majidi Shilsar, 2015)، لذا به‌منظور کاهش مخاطرات ناشی از مصرف حشره‌کش‌های شیمیایی و توجه به ملاحظات زیست‌محیطی، اقتصادی و بوم‌شناختی در شالیزارها، امکان استفاده قارچ *B. Bassiana* در چارچوب برنامه مدیریت تلفیقی آفات[1] و در قالب مهار بیولوژیک مورد بررسی و تأکید قرار می‌گیرد (Majdi Shilsar, 2017). همچنین برای کاهش مصرف حشره‌کش‌های شیمیایی، امروزه متخصصان حشره‌شناسی کشاورزی عملیات مهار آفات را طوری طراحی می‌کنند که عوامل طبیعی زنده دخالت بیشتری داشته باشند (Ghasemi et al., 2022). در این ارتباط چون در بوم‌نظام زراعی برنج، حشرات زیان‌آور تحت تأثیر دشمنان متعددی از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌های بیمارگر حشرات قرار می‌گیرند، در این میان، قارچ *B. Bassiana* به‌لحاظ پراکنش و فراوانی بیشتر در شمال کشور از اهمیت ویژه‌ای در مهار کرم ساقه خوار برنج برخوردار است (Majidi Shilsar et al., 2013). این قارچ امروزه به‌عنوان یک عامل مهار بیولوژیک و حشره‌کش زیستی[2] برای مبارزه با آفات محصولات زراعی و باغی مورد توجه و مصرف می‌شود. در شرایط طبیعی شالیزار، قارچ *B. Bassiana* میزان ۱۰ تا ۱۱ درصد تلفات در جمعیت آفت ساقه‌خوار ایجاد می‌نماید (Majidi Shilsar et al., 2007; Majidi Shilsar, 2017). بنابراین به‌منظور افزایش کارآیی تأثیر بیشتر این عامل در شرایط طبیعی و در سطح مزرعه، نیاز به تولید انبوه قارچ و کاربرد گسترده آن با استفاده از فرمولاسیون‌های مناسب در بوم‌نظام زراعی برنج ضروری به نظر می‌رسد. شایان ذکر است که نزدیک به دو قرن از اثبات توانایی قارچ‌های بیمارگر حشرات در تنظیم و مهار جمعیت برخی حشرات زیان‌آور به محصولات کشاورزی می‌گذرد (Gillespie, 1988).

در بین قارچ‌های بیمارگر حشرات، قارچ (Balsamo) *B. bassiana* Vuillemin (Sordariomycetes, Hypocreales) به‌دلیل دارا بودن توانایی قابل ملاحظه برای مهار جمعیت حشره آفت، بیشترین توجهات را به خود اختصاص داده است (Feng et al., 1994). بنا به گزارش سامسیناکووا و همکاران (Samsinakova et al., 1981)، تولید اسپورهای قارچ *Beauveria* به روش‌های زیر انجام می‌شود: الف-کشت در محیط مایع و تولید اسپورهای درشت (بلاستوسپور)، ب-کشت در محیط جامد و تولید اسپورهای ریز، ج-کشت در دو فاز مایع و جامد. در این ارتباط، نعیمی و همکاران (Naemi et al., 2010) در بررسی کارآیی تراکم‌های مختلف قارچ *B. bassiana* حاصل از محیط‌های غذایی برنج، گندم و سویا (*Glycine max* (L.) Merr.) علیه کرم ساقه‌خوار نواری برنج، دانه برنج را به‌عنوان سوبسترای بهینه برای تولید اسپور معرفی نمودند. همچنین براساس نتایج مطالعات بناموالایی و همکاران (Bana-Molaei et al., 2010) بررسی تأثیر محیط کشت روی زهرآگینی قارچ *B.bassiana* علیه شب‌پره دم قهوه‌ای نشان داد که اسپورهای حاصل از محیط کشت سبوس برنج با ۸۴/۹۵ درصد بیشترین مرگ و میر را روی لارو شب پره داشته است. در مطالعه‌ای دیگر، بناموالایی و همکاران (Bana-Molaei et al., 2008) در ارزیابی محیط‌های جامد طبیعی برای تولید کنیدی قارچ *B.bassiana*، محیط حاوی سبوس گندم به اضافه آب پنیر را به‌عنوان محیطی که بیشترین میزان تولید کنیدی را به خود اختصاص داد، معرفی کردند.

مطالعات اولیه در زمینه تولید اسپور قارچ *B.bassiana* مک لود (Macleod, 1954) نشان داد که این قارچ در محیط کشت جامد، اسپورهای کروی تولید کرده و این اسپورها به‌راحتی در هوا پراکنده و پخش شده و هنگام آلوده‌سازی حشره میزبان به اسپورهای بیضی شکل تبدیل می‌شوند. در مقابل، سامسیناکف (Samsinakova, 1966) در بررسی‌های خود مشاهده کرد که قارچ *B. bassiana* در محیط‌های کشت مایع فقط اسپورهای بیضی شکل تولید می‌کند. پژوهش‌های متعددی روی جنبه‌های مختلف فیزیولوژی و متابولیسم *B.bassiana* متمرکز شد، از جمله تولید آنزیم‌های برون سلولی توسط لئوپلد و سامسیناکووا (Leopold & Samsinakova, 1970)، تولید توکسین توسط سوزوکی وهمکاران (Suzuki et al., 1977) و تولید زیست‌توده در محیط کشت‌های گوناگون توسط توماس و همکاران (Thomas et al., 1987) و سامسیناکف (Samsinakova, 1966). این تحقیقات در نهایت به تولید تجارتی قارچ *B.bassiana* برای استفاده به‌عنوان یک حشره‌کش زیستی انجامید. در زمینه تولید انبوه قارچ *B.bassiana*، گرایس و جارونسکی (Grace & Jaronski, 2005) در سه مرحله بسترهای مختلف از جمله دانه‌های گندم (*T. aestivum*)، جو (*H. vulgare*) و برنج، (*O. sativa*) محیط کشت مایع و مواد جامد را ارزیابی کردند. براساس یافته‌های آن‌ها، دانه جو و محیط کشت CSYP به‌عنوان

1- Integrated pest managemen
2- Bioinsecticide

مناسب‌ترین بسترها معرفی شدند. در مطالعه دیگر، سانتا و همکاران (Santa et al., 2005) با استفاده از بقایای صنایع تبدیلی کشاورزی نشان دادند که ترکیب ۶۰ درصد پوست سیب‌زمینی و ۴۰ درصد تفاله نیشکر بیشترین تولید اسپورهای هوازی قارچ *B. bassiana* با 10^{10} ×۳/۴ کنیدی بر گرم توده خشک را در ارلن مایر افزایش داده است. مطالعات لو و همکاران (Lou et al., 2024) به‌منظور بهینه‌سازی محیط کشت قارچ *Beauveria bassiana* و میزان اسپورزایی آن از محصولات جانبی کشاورزی کم‌هزینه نشان دادند که سیب‌زمینی (*S. tuberosum*) سبوس‌گندم و گندم (*T. aestivum*) بیشترین تأثیر را بر تولید هاگ پس از ۱۴ روز کشت داشتند. همچنین آن‌ها اظهار داشتند که گندم، سبوس گندم و چوب بلال بیشترین تأثیر را بر تولید اسپور قارچ داشتند. هدف از انجام این پژوهش، دستیابی به محیط یا محیط‌های کشت بهینه جهت تولید انبوه قارچ *B.bassiana* به‌عنوان یک عامل مهار زیستی علیه *C. suppressalis*، با بررسی اثرات آن در مراحل مختلف لاروی و غلظت‌های مختلف اسپور انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای اجرای این پژوهش، ابتدا جدایه Mcb18 قارچ *B.bassian* (جداشده از حشره کرم ساقه‌خوار برنج در مؤسسه تحقیقات برنج، رشت) روی محیط SDAY[1] کشت داده شد و سپس برای جوانه‌زنی در انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. بعد از اسپوردهی کامل (۱۴ تا ۲۱ روز)، اسپورها از سطح محیط کشت به‌وسیله میله لوپ خراشیده شدند و سپس با افزودن آب مقطر حاوی محلول توئین ۸۰ (۰/۰۲ درصد) اسپورها از سطح جدا و مجدداً در داخل ارلن سترون برای ایجاد محلول سوسپانسیون ریخته شد. بعد از این مرحله، سوسپانسیون حاصل از پارچه ململ (مش ۰/۵ میلی‌متر) عبور داده شد تا صاف شده و فقط اسپور قارچ باقی بماند. بعد از این مرحله، شمارش اسپورها در سوسپانسیون مادر[2] با استفاده از لام گلبول‌شمار انجام گردید و تراکم 10^{8}×۱ کنیدیوم در میلی‌لیتر برای انجام کار تهیه شد.

محیط کشت جامد

چهار نوع محیط کشت جامد شامل دانه برنج (رقم هاشمی)، دانه گندم (رقم دوروم)، دانه ذرت (رقم چاووش) و دانه جو (رقم سهند) مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا دانه‌های برنج سالم به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه جوشانده شد. دانه‌های گندم به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. همچنین دانه‌های شکسته ذرت به مدت ۶۰ دقیقه در آب نگهداری گردید. دانه‌های جو که به قطعات کوچک تبدیل شده بودند به مدت ۱۰ دقیقه در آب نگهداری شد. برای تولید اسپور قارچ *B.bassian* از روش آلوز و پریرا (Alves & Pereira, 1989) که از طبق یا سینی[3] استفاده شده بود به‌کار گرفته شد، در این پژوهش ابتدا ۳۰۰ گرم از دانه‌های موجود به‌طور جداگانه در فلاسک‌های شیشه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری برای رشد قارچ پخته شد. درب فلاسک‌های شیشه‌ای با پنبه و فویل آلومینیوم بسته شده و در فشار ۱۵ psi به مدت یک ساعت و در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس استریل گردیدند. سپس فلاسک‌های شیشه‌ای برای سرد شدن به زیر هود منتقل شدند. بعد از سرد شدن، درب فلاسک‌ها باز شده و حدود پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ با تراکم 10^{8} کنیدیوم در میلی‌لیتر اسپور قارچ به‌وسیله میکروپیپت درون هر فلاسک اضافه گردید. مجدداً درب فلاسک‌ها بسته شده و برای پراکنده شدن یکنواخت اسپورها، به‌خوبی تکان داده شدند. سپس در دمای ۰/۵±۲۶ درجه سلسیوس با دوره نوری (L:D) ۱۲:۱۲ به مدت سه هفته در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از گذشت ۵۶ تا ۷۲ ساعت، رشد میسلیوم روی سطح دانه‌ها مشاهده گردید. در چهارمین روز، درب فلاسک‌ها باز شدند تا هوادهی و فرآیند اسپورزایی قارچ تسهیل گردد و بعد از هفت روز، رشد یکنواخت میسلیوم و اسپورزایی آشکار شد. در این مرحله، درب فلاسک‌ها باز شده و محتویات آن‌ها روی سینی‌های پلاستیکی استریل با ابعاد ۱۲/۵ × ۴۵ × ۳۰ پخش شد. محتویات هر تیمار در چهار سینی ریخته شده و به مدت چهار روز در زیر هود استریل با دمای ۱±۲۹ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. به‌منظور اجتناب از کلوخه شدن دانه‌های داخل فلاسک شیشه‌ای، بعد از هفت روز فلاسک‌ها به‌شدت تکان داده شدند تا دانه‌ها و توده میسلیومی از همدیگر جدا شوند.

محیط کشت مایع

همچنین از محیط‌های کشت مایع عصاره سیب‌زمینی، بلغور ذرت، شربت ذرت، آب برنج شسته‌شده، محیط‌های کشت مصنوعی[4] SPMB و CSYE[5] مورد بررسی قرار گرفت. محیط‌های کشت مایع شامل عصاره سیب‌زمینی (شامل ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی پوست‌کنده، ۲۰ گرم دکستروز و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب)، بلغور ذرت (شامل ۲۰ گرم بلغور ذرت، ۲۰ گرم پپتون، دو گرم دکستروز و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب)، شربت ذرت (CPY)[6] (شامل ۴۰ گرم شربت ذرت، ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم پپتون و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب)، آب برنج شسته‌شده، و

1-Sabouraud Dextrose Agar Yeast
2-Stock

3-Tray
4- Sabouraud Potato Malt Broth
5- Casein Sucrose Yeast Extract
6- Corn Peptone Yeast

CSYE (شامل ۴۰ گرم گلوکز، ۱۰ گرم KNO3، پنج گرم KH_2PO_4، دو گرم $MgSO_4$، ۰/۰۵ گرم $CaCl_2$، ۲/۵ گرم عصاره مخمر و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب) و SPMB (شامل ۳۰ گرم گلوکز، ۱۵ گرم عصاره مخمر، چهار گرم K_2HPO_4، ۸۰ میلی‌لیتر توین و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب) برای رشد و اسپورزایی قارچ *B. bassiana* مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین ترتیب، ابتدا به‌میزان یک لیتر از محیط را آماده کرده و سپس به‌مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت را در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و در فشار psi15 به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. هم‌زمان با سرد شدن، ۵۰ پی پی ام (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) آنتی بیوتیک (تتراسیکلین) به هر ارلن اضافه شد. در نهایت، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچی (تهیه‌شده از محیط کشت SDAY در چهار ارلن از هر محیط کشت به‌طور جداگانه ریخته و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت دو تا سه هفته در انکوباتور نگهداری شدند.

آزمون جوانه‌زنی اسپور

آزمون جوانه‌زنی اسپور برای این جدایه انجام شد. برای انجام آزمون جوانه‌زنی، ابتدا، اقدام به تهیه سوسپانسیون با غلظت 1×10^6 کنیدی در میلی‌لیتر با استفاده از لام گلبول شمارش شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپورهای حاصل از هر محیط مایع را در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به اضافه محلول توئین ۸۰ دوصدم درصد ریخته و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق را داخل تشتک پتری حاوی PDA[1] ریخته و بعد از ۱۶ تا ۱۸ ساعت در دمای ۰/۵± ۲۶ در دوره نوری ۱۲:۱۲ نگهداری گردید تا اسپورها جوانه زدند و پس از ۲۴ ساعت یک لامل استریل را روی لام قرار داده و در محیط این لامل تعداد ۱۰۰ کنیدی که دارای لوله جوانه‌زنی با هر طولی که بودند و کنیدی‌هایی که فاقد لوله جوانه‌زنی بودند شمارش شدند و درصد جوانه‌زنی با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد (Petlamul & Prasertsan, 2012). برای صحت شمارش، این عمل سه بار تکرار گردید. جوانه‌زنی اسپور ۹۸ درصد را نشان داد.

$$\text{Germination (\%)} = (a/\ a + b) \times 100 \qquad (۱)$$

که در آن، Germination: (%) درصد جوانه‌زنی، a: تعداد اسپور جوانه‌زده و b: تعداد اسپور جوانه‌نزده است.

تعیین تعداد واحد کلنی قارچ[2]

برای این کار، ابتدا یک لیتر از محیط‌های کشت مایع را که از قبل آماده‌شده را در چهار ارلن مایری ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و درب هرکدام را با پنبه و فویل محکم بسته بسته و در دمای ۱۲۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه داخل اتوکلاو استریل گردیدند. هنگام سرد شدن، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۵۰ پی پی ام) آنتی بیوتیک (تتراسیکلین) به هر ارلن اضافه شد. در مرحله بعدی، یک دیسک به قطر دو میلی‌متر از قارچ را که در محیط کشت SDAY تهیه شده به ارلن‌ها اضافه گردیدند. این ارلن‌ها روی شیکر چرخان با ۲۲۰ دور در دقیقه در دمای ۱ ±۲۶ درجه سلسیوس به مدت چهار روز نگهداری شدند. در همین مرحله پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون روی شیکر چرخان، میزان یک میلی‌لیتر از هر تکرار به لوله آزمایش استریل با نُه میلی‌لیتر آب مقطر و توئین ۸۰ دو صدم درصد به‌عنوان ماده فعال‌کننده و جداکننده ریخته شد. سوسپانسیون قارچی فوق تا جایی که امکان داشت، رقیق شد (10^{-3} یا 10^{-4}). مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون قارچی را به‌وسیله سمپلر به داخل محیط کشت PDA ریخته و با لوله‌های استریل پیپت پاستور به‌طور یکنواخت پخش شد. در مرحله بعد، سه عدد تشتک پتری از هر تکرار را که تلقیح شده بودند در دمای ۱±۲۶ درجه سلسیوس و با دوره نوری (L:D) ۱۲:۱۲ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. اسپورهای قارچ بعد از ۱۵ تا ۱۷ ساعت شروع به تندش کردند. سپس تا ۲۴ ساعت در دمای ۱۰ درجه سلسیوس در یخچال نگه‌داری شدند، پس از آن شمارش کلنی‌های تشکیل‌شده انجام شد (Javar et al., 2025). تعداد کلنی‌های تشکیل‌شده (CFU) با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد.

$$\text{تعداد واحدهای کلنی (CFU)} = \frac{\text{مجموع تعداد CFU آلوده‌کننده}}{\text{تعداد کل CFU}} \times ۱۰۰ \qquad (۲)$$

پرورش حشره

پرورش حشره ساقه‌خوار با شکار شب‌پره‌های آفت توسط تله‌های نوری صورت گرفت. افراد بالغ شب‌پره‌های بعد از جمع‌آوری به تعداد ۵ جفت فرد نر و ماده با برگ گیاه برنج که از دمبرگ بریده شده بودند در داخل ارلن مایر به حجم یک لیتر برای تخمگذاری قرار داده و در شرایط اتاق (دمای۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۸۵ درصد با دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی) منتقل شدند. ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد، تخمریزی روی برگ‌های داخل ارلن صورت گرفت. سپس دسته‌های تخم از برگ جدا و در لوله آزمایش قرار داده شدند. بعداز ۵ روز لاروها از دسته‌های تخم خارج شدند. سپس لاروهای سن اول به ظرف پلاستیکی که حاوی ساقه‌های تازه برنج بودند انتقال داده شدند. لاروها تا شش سن در آزمایشگاه پرورش داده شدند. درضمن، هر ۴۸ ساعت ساقه‌های برنج قدیمی که زرد و تغییر رنگ داده بودند، تعویض شده و ساقه‌های جدید برای تغذیه لاروهای در ظرف قرار داده شدند. سپس زیست‌سنجی برای لاروها به‌روش غوطه‌وری انجام گردید. در روش غوطه‌وری، هر سن لاروی به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه داخل سوسپانسیون قارچی با سه غلظت مشخص 1×10^5، 1×10^6 و 1×10^7 کنیدی بر میلی‌لیتر غوطه‌ور شدند و سپس

1- Potato dextrose agar
2- Colony-forming unit

لاروهای غوطه‌ور به‌وسیله قیف‌های با سیم توری به‌طور همزمان خارج شدند. برای هر لارو ساقه‌خوار، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول فوق استفاده شد. در تیمار شاهد، لاروهای سن پنجم در محلول Tween 80 ۰/۲ درصد به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه فرو برده شدند. در همه تیمارها، کف داخل تشتک پتری با کاغذ صافی استریل و پنبه استریل آغشته به آب مقطر استریل برای حفظ رطوبت صورت گرفت، سپس ساقه‌های برنج به قطعات پنج سانتی‌متری برش داده و در اختیار لاروهای ساقه‌خوار برنج قرار داده شدند. سپس تشتک‌های پتری به اطاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. قطعات ساقه داخل تشتک پتری در مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت همزمان با تغییر رنگ ساقه تعویض شدند. برای یک دورهٔ دو هفته‌ای، هر روز مرگ‌و میر ثبت گردید. لاروهای مرده از تشتک‌های پتری خارج و با الکل اتیلیک ۷۵ درصد (یک دقیقه)، سدیم هیپوکلریت پنج درصد (یک دقیقه) و سه بار آب‌شویی با آب مقطر استریل ضدعفونی شدند و به تشتک‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب و استریل انتقال یافتند و بعد از مرگ، لاروها در انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد در رطوبت نسبی ۵±۸۵ درصد نگهداری شدند تا اسپورزایی روی لاشه‌ها امکان‌پذیر گردد.



شکل ۱- تخم‌گذاری افراد ماده در داخل ارلن‌مایر روی برگ‌های گیاه برنج
Figure 1- Females laying eggs inside erlenmeyer flasks on rice plant leaves

زیست‌سنجی قارچ *B.bassian* و محاسبه LC_{50} و LT_{50}

لاروهای سنین مختلف از همان ابتدا به‌صورت انفرادی تا سن ششم در پتری‌دیش پرورش داده شدند. لاروها روزانه با ساقه‌های تازه و ضدعفونی‌سطحی‌شده تغذیه می‌شدند. هر تیمار در سه تکرار و با ۱۰ لارو در هر تکرار انجام شد. میزان مرگ‌ومیر روزانه ثبت و بروز آلودگی قارچی در لاروها مشاهده گردید.

تحلیل آماری

کشت محیط‌های جامد و مایع در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و چهار تکرار در آزمایشگاه انجام شد. در آزمون زیست سنجی، درصد مرگ و میر با فرمول ابوت اصلاح شد و میانگین زمان تا وقوع مرگ محاسبه گردید. داده‌هایی که توزیع نرمال نداشتند، با تغییر شکل داده‌ها به Arcsin دارای توزیع نرمال جهت ورود به تجزیه و تحلیل آماری شدند آزمون توکی برای مقایسه‌های چندگانه بین غلظت‌های ۱×۱۰^{۵} اسپور ۱×۱۰^{۶} و ۱×۱۰^{۷} کنیدی در میلی‌لیتر انجام شد. آنالیز پروبیت برای تخمین غلظت‌های کشنده LC_{50} و زمان‌های کشنده LT_{50} برای هر سن لاروی و غلظت اسپور قارچ انجام گردید. محدودیت‌های مرجع برای مقادیر LC و LT با فاصله اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شدند. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از این آزمایش به‌شرح جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشد.

مقایسه میانگین تغییرات pH در محیط‌های غذایی جامد (تولید اسپور) و مایع (بلاستوسپور) در جدول ۱ قابل مشاهده است. براساس ان جدول، بیشترین تغییرات در عصاره سیب‌زمینی و کمترین تغییرات در دانه برنج و دانه جو رخ داده است. پس از بررسی تغییرات pH در محیط‌های کشت مایع و جامد در زمان تولید بلاستوسپور و اسپور در هر مورد pH اولیه محیط در اثر فعالیت قارچ به سمت اسیدی شدن پیش رفته است.

جدول ۱- مقایسه میانگین محیط‌های کشت جامد و مایع جهت تولید قارچ بووریا

Table 1- The comparison of the average traits studied in solid and liquid culture mediums for the production for the production of *Beauveria bassiana*

Culture mediums	PH before the test	PH after the test	Spore density Con. ml^{-1} 10^{-7}	Biomass (grams per 200 grams of material)	Colony formed number
CSYE	6.07 ± .05 a*	5.47 ± .10 a	422 ± .01 b	3.92 ± .006 b	301 ±.48 b
Potato extract	6.07 ± .14 a	4.9 ± .07 ab	288± .12 d	1.56 ± .004 d	199 ±.29 d
Corn kernels	6 ± .04 ab	5.37 ± .15 a	251± .12 e	1.23 ± .12 a	109 ±.48
Washed rice grains	5.97 ± .16 ab	5.05 ± .10 ab	620.5 ± .12 a	3.87 ± .12 b	235.5 ± .25 c
Corn grits	5.87 ± .08 ab	4.85 ± .26 ab	187.50 ± .10 f	1.33 ± .008 ed	183 ± .95 c
Barley seed	5.87 ± .14 ab	5.32 ± .20 a	198.75 ± .12 f	1.26 ± .004 ed	110 ±.82
SPMB	5.82 ± .14 ab	5.15 ± .12 ab	458 ± .12 b	4.53 ± .209 a	317± 6.4 a
Rice grain	5.75 ± .06 ab	5.22 ± .09 ab	425.75 ± .12 c	2.38 ± .01 a	179±6.48
Corn syrup	5.52 ± .21 ab	4.45 ± .21 b	202.50 ± .12 f	1.47 ± .006 ed	197.5±.41 d
Wheat grain	535 ± .23 b	4.77 ± .26 ab	250.25 ± .25 e	1.29 ± .004 ed	169±5.35

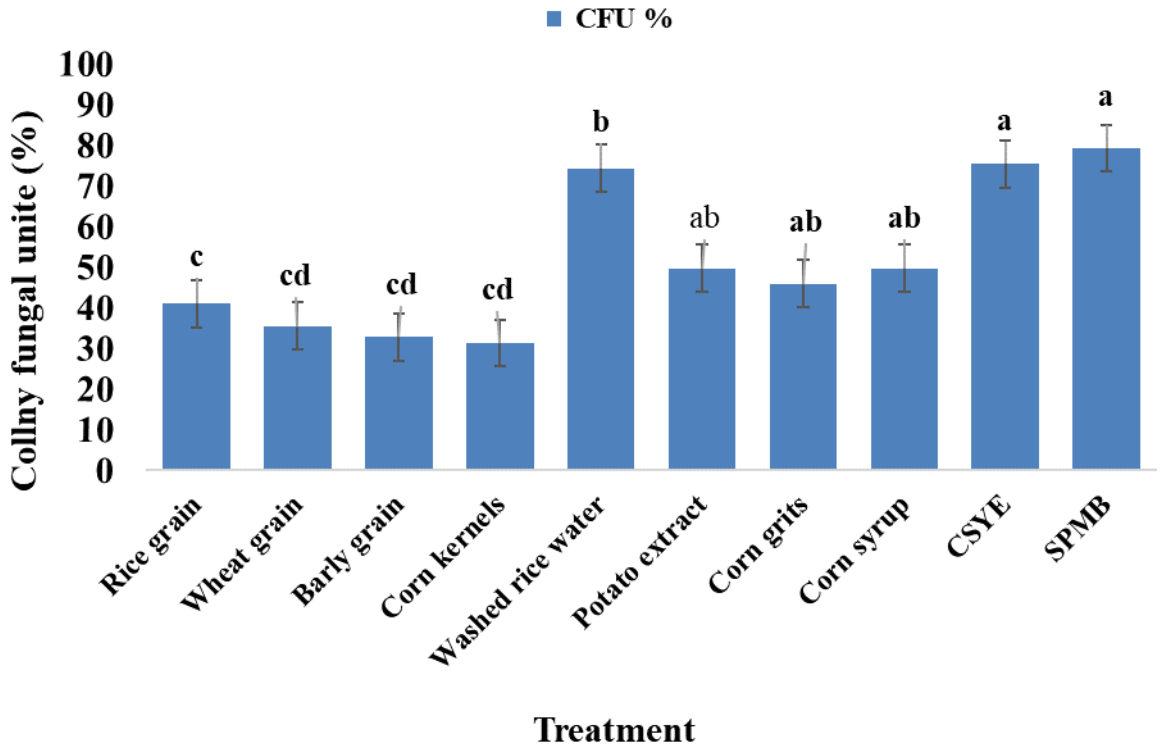
*میانگین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد.

*Means with similar letters do not differ significantly from each other. Mean comparison was done by Tukey's test.

در همین ارتباط، عسکری و همکاران (Askari et al., 2008) نشان دادند که بیشترین تغییرات pH در محیط کشت ملاس چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) و کمترین آن در محیط کشت با عصاره سیب‌زمینی برای تولید قارچ B. bassiana بوده است. آن‌ها بیان کردند که بیشترین بلاستوسپور تولیدشده مربوط به محیط کشت ملاس چغندر بود. همین پژوهشگران اظهار داشتند که تولید بلاستوسپور در محیط کشت ملاس چغندرقند با افزودن هیدروکربور افزایش یافته است. در مطالعه صورت‌گرفته توسط استفان و زیمرمن (Stephan & Zimmermann, 1997) برای تولید بلاستوسپور قارچ Metarhizium *flavoviride* از منابع غذایی مختلف حاوی مقادیر متفاوت نیتروژن و قند استفاده گردید. آن‌ها بیشترین تولید بلاستوسپور قارچ را سه روز پس از تیمار در مخلوطی از ملاس چغندر قند با مواد حاوی هیدروکربور و نیتروژن مشاهده کردند. همچنین بررسی‌های لتیفیان و راد(Latifian & Rad, 2012) در تولید انبوه قارچ *B. bassiana* روی محیط‌های کشت جامد و مایع شامل آرد گندم، آرد برنج، آرد ذرت، ملاس چغندر قند، ذرت، جو، برنج و سورگوم (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) نشان دادند که اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های کشت به‌لحاظ تولید اسپور وجود دارد. همچنین آن‌ها گزارش کردند که بیشترین کلامیدوسپور و کنیدیوفورهای تولیدشده مربوط به ملاس چغندر قند و برنج بود. نتایج پژوهش حاضر برای تولید انبوه قارچ با محیط کشت برنج مطابقت دارد. پاتل و همکاران (Patel et al., 1990) برای تولید قارچ *Metarhizium anisopliae* به‌عنوان عامل بیمارگر حشرات روی محیط کشت‌های مختلف نشان دادند که آب برنج شسته‌شده بیشترین تعداد اسپور را داشته است. همچنین براساس بررسی‌های دیگر پژوهشگران، در تولید انبوه قارچ *B. bassiana*، دانه برنج مناسب‌ترین محیط کشت برای تولید انبوه قارچ عنوان شد (Ibrahim & Low, 1993; Sharma et al., 2002). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که از بین همه محیط‌های کشت مورد آزمایش، بیشترین بلاستوسپور تولیدشده در محیط‌های کشت مایع مربوط به دانه برنج شسته‌شده بوده و به‌لحاظ آماری در گروه اول و سپس دو محیط CSYE و SPMB در گروه دوم قرار گرفتند، و نتایج حاصل از پژوهش حاضر با تحقیقات پاتل و همکاران (Patel et al., 1990) مطابقت دارد. همچنین در آزمایش حاضر، در بین محیط‌های کشت جامد، بیشترین اسپور تولیدشده در دانه برنج به دست آمد که با نتایج تحقیق شرما و همکاران (Sharma et al., 2002) مطابقت دارد. جدول ۲ نشان می‌دهد که بیشترین زیست‌توده تولیدشده در محیط‌های کشت مورد آزمایش مربوط به محیط کشت SPMB به‌مقدار ۴/۵۳ گرم در ۲۰۰ گرم ماده غذایی بود. بعد از آن، در دو نوع مواد غذایی CSYE و دانه برنج شسته‌شده مشاهده شد. در این آزمون، کمترین زیست‌توده تولیدشده مربوط به محیط کشت حاوی دانه ذرت بود. در پژوهش‌های دیگر، گوپلاکریشنان و موهان (Gopalakrishnan & Mohan, 2000)، گوپلاکریشنان و همکاران (Gopalakrishnan et al., 1999) تنسلی و همکاران (Tincilly et al., 2000) گزارش کردند که هویج مناسب‌ترین و ارزان‌ترین محیط کشت برای تولید قارچ‌های ناقص (*Deuteromycetes*) به‌ویژه قارچ *B.bassiana* در مقایس بزرگ می‌باشد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که محیط‌های غذایی با منشأ گیاهی (دانه برنج و دانه برنج شسته‌شده) از بین مواد غذایی جامد نیز در مقایسه با مواد غذایی ترکیبی و مصنوعی از قبیل CSYE و SPMB به‌دلیل ارزان‌تر بودن، جایگزین مناسبی برای مواد غذایی مصنوعی برای تولید قارچ *B. bassiana* بوده و می‌توان از آن در تولید قارچ بیمارگر حشرات استفاده نمود. در این ارتباط، ابراهام و همکاران (Abraham et al., 2003) بررسی‌هایی برای تولید قارچ

B. bassiana روی مواد مختلف گیاهی انجام داده‌اند. آن‌ها مقادیر مختلف از ملاس چغندر قند را برای تولید قارچ به کار برده و ملاحظه کردند که بیشترین رشد رویشی و تولید اسپور قارچ در غلظت سه تا شش درصد بود.



شکل ۲- درصد رشدکلنی قارچ *Beauveria bassiana* در محیط کشت مختلف

Figure 2- Percentage of colony growth *of Beauveria bassiana* fungus in different culture

همچنین آن‌ها در ادامه پژوهش‌های خود نشان دادند که از بین دانه‌های غلات نظیر سورگوم، انواع ارزن Panicum miliaceum (Blanco.) و برنج و همچنین گیاهان غده‌ای نظیر سیب‌زمینی، هویج (*Daucus carota* L.)، چغندرقند و تاپیوکا[1] (نشاسته‌ای است که از گیاه کاسوا (Manihot esculenta *Crantz*) استخراج می‌شود)، بیشترین رشد میسلیوم روی برنج و سپس سورگوم اتفاق افتاد. این در حالی است که در مقایسه با محیط کشت PDA، بیشترین اسپورزایی روی تکه‌های هویج، تاپیوکا و سیب‌زمینی رخ داد. تأثیر نوع محیط کشت تنها به میزان رشد رویشی و اسپورزایی قارچ مربوط نمی‌شود. در همین رابطه، پژوهش‌های سیواچ و جایپال (Siwach & Jaipal, 2004) نشان داده است که بستر غذایی نه‌تنها روی میزان اسپورزایی بلکه روی میزان بیمارگری قارچ نیز تأثیرگذار است. آن‌ها نشان دادند که قارچ *B. bassiana* روی محیط‌های جامد سبوس ذرت و سبوس گندم بیشترین اسپورزایی را داشت و روی میزبان خود حدود ۷۰ درصد مرگ‌ومیر ایجاد کرد. درحالی‌که اسپورهای تولیدشده روی پوسته برنج ۸۱/۵ درصد مرگ‌ومیر را روی کرم ساقه‌خوار ذرت (*Chilo auricilius*) ایجاد نمود.

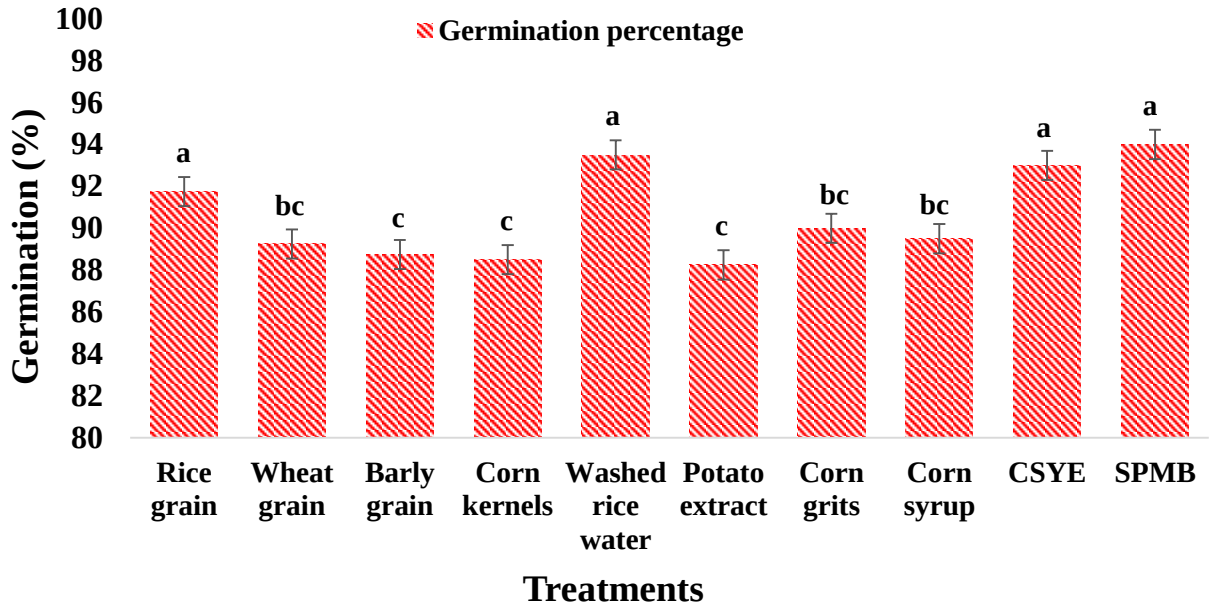
شکل ۲ نشان می‌دهد که بیشترین آلودگی (توده میسیلیومی) در بین محیط‌های کشت مایع مربوط به مواد غذایی SPMB با مقدار ۷۹/۱۸ درصد و بعد از آن ماده غذایی مصنوعی CSYE با مقدار ۷۵/۸۱ درصد می‌باشد. بعد از دو محیط کشت مصنوعی مذکور، آب برنج شسته‌شده به‌لحاظ آلودگی به قارچ *B.bassiana* با مقدار ۵۸/۸۷ درصد در گروه بعدی قرار گرفت. در این ارتباط، چون دو محیط کشت مصنوعی گران بوده و مقرون‌به‌صرفه نمی‌باشد، پیشنهاد می‌گردد که از محیط کشت برنج شسته‌شده برای تولید انبوه قارچ استفاده شود. همچنین در این پژوهش، بیشترین کلنی تشکیل‌شده، روی مواد غذایی SPMB و CSYE و نیز دانه برنج شسته‌شده حاصل شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که دو محیط کشت مایع SPMB و CSYE از مواد غذایی مصنوعی بوده و گران قیمت می‌باشند، لذا، می‌توان از دانه برنج شسته‌شده به‌عنوان مواد غذایی مایع و از دانه

1- Tapioca

برنج به‌عنوان مواد جامد برای تولید قارچ *B. bassiana* استفاده نمود.

شکل ۳، درصد جوانه‌زنی قارچ *B.bassiana* در محیط‌های کشت مختلف را نشان می‌دهد. در این شکل، بیشترین جوانه‌زنی به‌ترتیب در سه محیط کشت SPMB، CSYE و Washed rice grains و Rice grain به دست آمد و به‌لحاظ آماری در یک گروه قرار گرفتند. در همین شکل، نتایج این پژوهش نشان داد که کمترین جوانه‌زنی قارچ در محیط‌های کشت، شربت ذرت، بلغور ذرت، عصاره سیب‌زمینی، دانه ذرت، و دانه گندم مشاهده شد و همگی در گروه بعدی طبقه‌بندی شدند.

در این پژوهش، اثر زهرآگینی اسپورهای تولید شده قارچ *B.bassiana* از دانه برنج شسته‌شده روی لاروهای کرم ساقه‌خوار نواری برنج آزمایش شد. در این مطالعه، همچنین LC_{50} محاسبه‌شده برای هر سن لاروی با استفاده از آنالیز پروبیت در حد اطمینان ۹۵ درصد ارائه شده است (جدول ۲).



شکل ۳-درصد جوانه‌زنی از قارچ *Beauveria bassiana* در محیط‌های کشت جامد و مایع

Figure 3- Germination percentage of *Beauveria bassaina* fungus in solid and liquid culture media

جدول ۲-مقادیر غلظت کشنده قارچ *Beauveria bassiana* علیه سنین مختلف لاروی *Chilo suppressalis* با حدود اطمینان ۹۵ درصد

Table 2- Lethal concentration of *Beauveria bassiana* against *Chilo suppressalis* larvae at 95% fiducial limit

Larval stage	No. larvae	LC_{50} (con ml^{-1}) (95% fiducial limits)	Regression equation	X^2 test
L1	30	7.1×10^5 (39971.56-101867.87)	Y=1.55X-2.55	0.02
L2	30	7.1×10^5 (35853.75-109402.88)	Y=1.27X-1.15	0.16
L3	30	6.8×10^5 (28649.37-122579.36)	Y=0.88X+0.74	1.55
L4	30	1.1×10^6 (60596.36-184455.16)	Y=0.96X+0.09	0.85
L5	30	1.5×10^6 151015.76-254347.06)	Y=0.79X+0.90	0.002
L6	30	1.8×10^6 (95033.26-296624.72)	Y=0.88X+0.37	0.001

جدول ۳، میزان مرگ‌ومیر ناشی از تأثیر قارچ *B.bassiana* روی لاروهای سنین مختلف کرم ساقه‌خوار نواری برنج را نشان می‌دهد. در این جدول، کمترین مرگ‌ومیر لارو در سن اول مربوط به تراکم 10^5 کنیدی بر میلی‌لیتر با مقدار ۴۳/۰۸ و بیشترین

مرگ‌ومیر در تراکم 10^7 کنیدی بر میلی‌لیتر با مقدار ۵۳/۳۳ درصد بود. بیشترین مرگ‌ومیر در تراکم‌های مختلف برای لارو سن ششم با مقدار ۷۳/۳۳ درصد در تراکم 10^7 کنیدی بر میلی‌لیتر مشاهده شد.

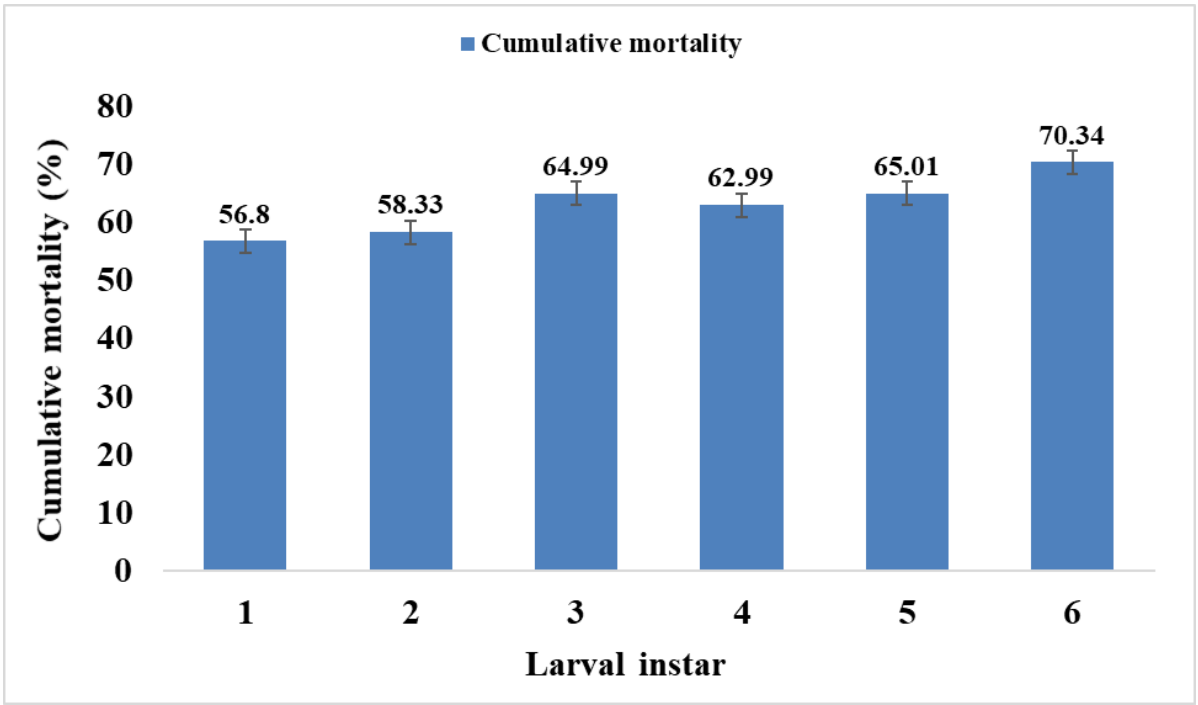
شکل ۴، مرگ و میر تجمعی لاروهای سنین مختلف کرم ساقه‌خوارنواری برنج با تراکم‌های $7/1\times10^5$ تا $1/8\times10^6$ کنیدی در میلی‌لیتر در ۱۰ روز پس از تلقیح با قارچ *B.bassiana*، نشان می‌دهد. همان‌طور که در در این شکل مشاهده میشود مرگ و میر لاروها روند افزایشی داشت، به‌طوری که از ۵۶/۸ تا ۷۰/۳۴ درصد متغیر بود (شکل ۴). شواهد حاصل از این پژوهش، نویدبخش آن است که در فرآیند تجاری‌سازی قارچ‌های بیمارگر حشرات، می‌توان بر پتانسیل بلاستوسپورهای تولیدشده در محیط‌های کشت مایع به‌عنوان یک جایگزین عملی و اقتصادی اتکا نمود.

در این پژوهش، بیشترین مقدار LC_{50} مربوط به لاروهای سن پنجم و ششم ساقه‌خوار به‌ترتیب برابر با $1/5\times10^6$ و $1/8\times10^6$ (کنیدیوم در میلی‌لیتر) به‌ترتیب با حدود اطمینان (95033.26-296624.72; 151015.76-254347.06) محاسبه گردید. در مقابل، در جدول ۲، کمترین مقدار LC_{50} مربوط به لاروهای سن اول و دوم این آفت بود که نشان‌دهنده حساسیت کمتر آن‌ها به قارچ *B. bassiana* می‌باشد، به‌طوری که با افزایش غلظت کنیدی، میزان مرگ‌ومیر لاروها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین اسپورزایی قارچ روی سنین مختلف لاروی با تراکم‌های مختلف متفاوت بود. درصد اسپورزایی با افزایش سن لاروی از لاروهای سن اول تا ششم در هر تراکم افزایش یافت (شکل ۵).

جدول ۳- درصد (میانگین ± خطای استاندارد) مرگ‌ومیر روی مراحل مختلف لاروی کرم ساقه‌خوار *Chilo suppressalis* ناشی از قارچ *Beauveria bassiana* و درصد (میانگین±خطای استاندارد)

Table 3- Percentages (mean±SE) of mortality on differnt larval instars of *Chilo suppressalis* caused by *Beauveria bassiana*

Larval stage	No. larvae	10^5	10^6	10^7
L1	30	43.08 ±5.77	50.00 ±10.00	53.33 ±5.77
L2	30	44.99 ±5.77	53.33 ±5.77	53.33 ±5.77
L3	30	46.66 ±5.77	53.33 ±5.77	53.33 ±5.77
L4	30	50.85 ±5.77	53.53 ±5.77	56.67 ±5.77
L5	30	52.77 ±5.77	53.33 ±5.77	56.67 ±5.77
L6	30	56.99 ±5.77	66.66 ±5.77	73.33 ±5.77



شکل ٤- مرگ و میر تجمعی کرم ساقه‌خوار نواری برنج (*C. suppressalis*) تحت تأثیر غلظت‌های کنیدی قارچ *B. bassiana*

Figure 4- Cumulative mortality of *C. suppressalis* as affected by conidial concentrations of *B. bassiana*

میله‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد میانگین‌ها هستند.

Bars represent the standard error of the means.



شکل ۵- آلودگی لارو سن ششم *C. suppressalis* توسط *B. bassiana*

Figure 5- Infection of sixth-instar Chilo suppressalis larvae by Beauveria bassiana

نتایج این بررسی نشان داد که هرچه تراکم قارچ *B. bassiana* افزایش یابد، مدت زمان کمتری (LT_{50}) لازم است تا آلودگی قارچ روی لاروهای ساقه‌خوار انجام شود، به‌طوری که با تراکم بیشتر کنیدی در میلی‌لیتر، سریع‌ترین مدت زمان (LT_{50})، به مدت ۶/۹۶ روز به دست آمد. این موضوع با بررسی‌های بادی و همکاران (Budi et al., 2013) مطابقت دارد که هرچه حمله بیشتر باشد، لاروها سریع‌تر از عفونت می‌میرند. نتایج بررسی‌های ماسکارین و همکاران (Mascarin et al., 2010) در تولید قارچ‌های *Isaria fumosorosea* و *Isaria farinosa* در تخمیر دو فازی با استفاده از محصولات و پسماندهای کشاورزی-صنعتی نشان داد که بهترین محیط‌های کشت مایع، ملاس نیشکر + آبگوشت برنج، آبگوشت برنج + مخمر و ملاس نیشکر + مخمر + آبگوشت برنج بودند که منجر به بالاترین غلظت کنیدی قابل دوام شدند. در این ارتباط، آنها محیط کشت ملاس + آبگوشت برنج برای مرحله بعدی مطالعه انتخاب شد که در آن تولید هر دو جدایه قارچی در بسترهای دانه جامد ارزیابی شد. در تخمیر حالت جامد، بهترین تولید کنیدی برای *I. farinosa* با کنجاله سویا و ذرت شکسته و برای *I. fumosorosea* با برنج کامل و برنج شکسته حاصل شد. نتایج نشان داد که این دو گونه قارچی را می‌توان با استفاده از تکنیک‌های تخمیر دو فازی به سرعت و با بازده بالاتر کنیدی در منابع کشاورزی-صنعتی تولید کرد. همچنین هاسبیوان و همکاران (Hasibuan et al., 2024) عنوان کردند که تفاوت‌های ایجادشده در LT_{50} در تیمارها ناشی از تعداد کنیدی‌های قارچ *B. bassiana* است که روی بدن لارو قرار گرفته و موجب مرگ آن می‌شوند. در این ارتباط، بررسی‌های هاسیبون و همکاران (Budi et al., 2013)، میزان بیماری‌زایی *B. bassiana* بر مرگ‌ومیر لاروهای کرم ساقه‌خوار سفید برنج (*Scirpophaga innotata*) را در سه سطح تقسیم کرد: بالاترین سطح با درصد مرگ‌ومیر بیش از ۶۴/۴۹ درصد با سریع‌ترین مرگ‌ومیر در مدت ۱۱/۱۱ ساعت، بیماری‌زایی متوسط با مرگ‌ومیر ۳۰/۹۹ تا ۴۹/۶۴ درصد در مدت ۱۷/۳۲ ساعت و بیماری‌زایی کم با مرگ و میر کمتر از ۳۰/۹۹ درصد در مدت ۲۰/۲۹ ساعت. نتایج پژوهش عده‌ای از نعیمی جوبینی و همکاران (Naimi Jobni et al., 2010) در بررسی تاثیر چند محیط کشت به روش تخمیر در بستر جامد توسط سوسبتراهای دانه گندم، دانه برنج و سویا نشان دادند که دانه برنج با بیشترین راندمان تولید اسپور به عنوان سوسترای بهینه معرفی گردید. پژوهشگران نشان داد که بیشترین مرگ‌ومیر مراحل لاروی *Spodoptera exigua* با قارچ *Metarhizium rileyi* در غلظت‌های 1×10^{8} و 1×10^{9} کنیدی در میلی‌لیتر تا ۱۰۰ درصد بود، درحالی‌که در غلظت‌های پایین‌تر، مرگ و میر کمتر و کُندتری را در ۱۰ روز پس از تلقیح ایجاد کرد (از ۳۳/۸۸ درصد در 1×10^{5} کنیدی در میلی‌لیتر؛ ۴۱/۴۸ درصد در 1×10^{6} کنیدی در میلی‌لیتر و ۴۵/۱۹ درصد در 1×10^{7} کنیدی در میلی‌لیتر) (Montecalvo et al., 2022). طبق بیان آلفیان و همکاران (Alfian et al., 2022)، یکی از عوامل مهم در کاهش مرگ‌ومیر، افت توانایی بیماری‌زایی ناشی از کشت‌هایی است که بارها به محیط‌های کشت جدید منتقل شده‌اند، به‌طوری که سازوکار بیماری‌زایی به‌طور بهینه روی محیط کشت عمل نکند. همچنین آن‌ها بیان کردند که تکثیر و کشت مداوم قارچ *B. bassiana* جدا شده از کرم ساقه‌خوار سفید برنج (Scirpophaga innotata) از کشور اندونزی (مرکز بذر و حفاظت از گیاهان[1]) در محیط کشت PDA توانست جهش‌های تصادفی را ایجاد کند تا بیماری‌زایی جدایه‌های *B. bassiana* را کاهش دهد. در این ارتباط، کائور و همکاران (Kaur et al., 2011) گزارش دادند که مقدار LC_{50} محاسبه‌شده در ۱۰ روز پس از تلقیح *S. litura* با از $5/59\times10^{5}$ تا $10^{6}\times5/95$ کنیدی در میلی‌لیتر متغیر بود. به‌طوری که در آن، مقادیر LC_{50} با افزایش سن لاروی افزایش یافت. به همین ترتیب، افزایش غلظت کنیدی‌های LC_{50} جدایه *M. rileyi* هنگام آلودگی روی *Spodoptera frugiperda* با افزایش مقادیر LC_{50} از $1/44\times10^{5}$ تا $10^{8}\times9/36$ کنیدی در میلی‌لیتر برای لاروهای جوان تا مسن مشاهده شد (Montecalvo & Navasero, 2021). همان‌طور که توسط هاران و همکاران (Harun et al., 2022) بیان

1- BBPPTP

شده است، فرآیند آلودگی قارچی *B. bassiana* علیه لارو کرم برگ‌خوار (*Spodoptera frugiperda*) حداقل دو روز و حداکثر ۱۰ روز طول می‌کشد، به‌طوری که بعد از دو روز نخست لاروها تغییر رنگ داده و قرمز شده و ۱۰ روز بعد، مرگ کامل ظاهر می شود.

نتایج پژوهش جاور و همکاران (Javar et al., 2022) در زیست سنجی آزمایشگاهی اثر قارچ *B. bassiana* علیه سفیدبالک نشان داد که کلیه تیمارها بین ۸۰ تا ۸۵ درصد تلفات نشان دادند، امّا در زیست سنجی گلخانه‌ای، کنیدیوم تولیدشده روی سبوس برنج، سبوس ذرت و سبوس گندم به‌ترتیب با ۱/۸ ±۵۶، ۲/۵۶ ± ۵۲ و ۲/۹۱ ±۴۹ درصد مرگ‌ومیر بالاترین میزان تلفات را ایجاد کردند. براساس نتایج پژوهش آن‌ها، سبوس برنج، سبوس ذرت و سبوس گندم به‌عنوان بسترهای مناسب برای این جدایه قارچی معرفی شدند. در این ارتباط، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با افزایش تراکم کنیدی از $۷/۱\times۱۰^{۵}$ تا $۱/۸\times۱۰^{۶}$ کنیدی در میلی‌لیتر، مرگ‌ومیر لاروها روند افزایشی داشته است و مرگ‌ومیر ایجادشده روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج از ۵۶/۸ تا ۷۰/۳۴ درصد متغیر بود. این یافته با یافته‌های پژوهشگران مذکور مطابقت دارد. نتایج مطالعه یاداو و همکاران (Yadav et al., 2025) روی هشت محیط کشت جامد و مایع برای تولید انبوه قارچ *Beauveria bassiana* نشان دادند که تعداد کنیدی‌ها ۱۰ روز پس از تلقیح، ۲۰ روز پس از تلقیح و ۳۰ روز پس از تلقیح، برنج به‌ترتیب حداکثر تعداد کنیدی‌ها ($۶۳/۹۰/\times۱۰^{۷}$ کنیدی در میلی‌لیتر، $۷۰/۷۹\times۱۰^{۷}$ کنیدی در میلی‌لیتر و $۷۷/۹۵\times۱۰^{۷}$ کنیدی در میلی‌لیتر) را نشان داد. همچنین آن‌ها اظهار داشتند که کمترین تعداد کنیدی به‌ترتیب در نخود کبوتری ($۳/۴۱\times۱۰^{۷}$ کنیدی در میلی‌لیتر)، ($۵/۴۰\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر) و ($۸/۰۸۰\times۱۰^{۷}$ کنیدی در میلی‌لیتر) مشاهده شد. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش کمک شایانی به تسهیل تولید انبوه قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* در محیط‌های کشت جامد می‌کند و می‌تواند در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات به ویژه کرم ساقه‌خوارنواری برنج در شرایط مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج بررسی‌های این پژوهش نشان داد که بیشترین میزان کلنی (CFU) در محیط مایع مربوط به SPMB و CSYE بود. همچنین در این بررسی، محیط‌های غذایی با منشأ گیاهی(دانه برنج و دانه برنج شسته‌شده) در مقایسه با مواد غذایی ترکیبی و مصنوعی از قبیل CSYE و SPMB به‌دلیل ارزان بودن می‌توانند جایگزین مناسبی برای تولید قارچ *B. bassiana* باشد. سرانجام، زهرآگینی اسپورهای به‌دست‌آمده در محیط مایع و کنیدیوم‌های برداشت‌شده از محیط کشت جامد نسبت به لاروهای آفت ساقه‌خوار (*C. suppressalis*) مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون زیست‌سنجی کنیدیوم‌های قارچ رشدیافته روی دانه شسته‌شده برنج نشان داد که قدرت زهرآگینی غلظت ۱×۱۰^{۷} کنیدیوم در میلی‌لیتر روی لارو سن ششم بیشتر از سنین اولیه (۷۳/۳۳ درصد) بود. همچنین نتایج مقدار LC_{50} محاسبه‌شده در ۱۰ روز پس از تلقیح نشان داد که تراکم $۷/۱\times۱۰^{۵}$ تا $۱/۸\times۱۰^{۶}$ کنیدی در میلی‌لیتر، مرگ و میر تجمعی لاروها روند افزایشی داشت، به‌طوری که از ۵۶/۸ تا ۷۰/۳۴ درصد متغیر بود. اهمیت این تحقیق حاکی از آن است که محیط‌های کشت جامد می‌توانند در توسعه برنامه‌های تولید انبوه قارچ بیمارگر *B. bassiana* در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات به‌ویژه کرم ساقه‌خوار نواری برنج در شرایط مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از نتایج پروژه تحقیقاتی به‌شماره مصوب ۹۱۱۰۷-۰۴-۰۴-۲ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی است که با حمایت مالی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و مؤسسه تحقیقات برنج کشور انجام شده است. به این جهت، نگارندگان از تمام همکارانی که ما را در اجرای پروژه یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Abraham, T., Easwaramoorthy, S., & Santhalakshmi, G. (2003). Mass production of *Beauveria bassiana* isolated from sugarcane root borer, *Emmalocera depresella*. Swinhoe. *Sugar Technology, 5*(4), 225-229. https://doi.org/10.1007/BF02942477
2. Alfian, R., Solichah, C., & Rizal, A. (2022). Uji kualitas dan patogenisitas jamur Metarhizium anisopliae dan *Beauveria bassiana* berbagai konsentrasi terhadap hama ulat krop (*Crocidolomia pavonana*) pada kubis. *Agrivet, 28*(2), 110-120. https://doi.org/10.31315/agrivet.v28i2.8357
3. Alves, S. B., & Pereira, R. M. (1989). Produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em bandejas. *Ecossistema, 4*, 188-192.
4. Askari, H., Zamani, S. M., & Ashuri, A. (2008). Investigating the effect of several solid and liquid culture media on the sporulation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales). *Iranian Journal of Plant Protection Science, 39*(1), 31-43. (In Persian). https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.20084781.1387.39.1.4.9
5. Bana Molaei, P., Tolai-Hasanloui, R., Askari, H., & Kharazi Pakdel, A. (2008). Evaluation of natural solid culture

medium in the production of *B. bassiana* fungi. Proceedings of 18th Iranian Plant Protection Congress. 24-27 Aguust 2008. University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran. Vol. 18, p. 58. (In Persian).
6. Bana Molaei, P., Talai-Hasanloui, R., & Askari, H. (2010). The effect of culture medium on the toxicity of B. bassiana conidia against the brown-tailed moth, Euproctis Chrysorrhoea (Lep., Lymantridae). Proceedings of 19th Iranian Plant Protection Congress. 24-27 Aguust 2008. University of Tehran, Iran. Vol. 19, p. 110.
7. Budi, A. S., Afandhi, A., & Puspitarini, R. D. (2013). Patogenisitas jamur entomopatogen *Beauveria bassiana* Balsamo (Deuteromycetes: Moniliales) pada larva *Spodoptera litura* Fabricus (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal HPT (Hama Penyakit Tumbuhan), 1*(1), 57-65. (In Persian).
8. Feng, M. G., Poprawski, Y. J., & Khachatourians, G. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control. *Biocontrol Science and Technology*, *4*, 3-34. https://doi.org/10.1080/09583159409355309
9. Ghasemi, M. H., Bahloulbandi, E., Naseri, M., Thaghafi, R., & Yarahmadi G. (2022). New strategies in controlling agricultural pests using chemicals. 8th International Conference on Knowledge and Technology of Agricultural Sciences, Natural Resources, and Environment of Iran, pp. 593 (In Persian).
10. Gillespie, A. T. (1988). Use of fungi to control pests of agriculture importance. pp. 37-60. In: M. N. Burge (ed). Fungi in Biological Control System. Manchester University Press, UK, 269 p.
11. Gopalakrishnan, C., & Mohan, S. C. (2000). A simple and cost effective *In vitro* method for the mass production of conidia of *Nomuraea rileyi*. *Insect Enviromental, 6*, 52-53.
12. Gopalakrishnan, C., Anusuya, D., & Narayanan, D. (1999). *In vitro* production of conidia of entomopathogenic fungus *Pycilomyces farinosus*. *Entomology, 24*, 389-392.
13. Grace, J., & Jaronski, S. (2005). Solid substrate fermentation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. USDA. ARS. Northern Sidney, Montana. Workshop.
14. Harun, Y., Parawonsa, A. K., & HARIS, A. (2022). Kajian patogenisitas *Beauveria bassiana* dan *Metarhizium* sp terhadap Larva Ulat Grayak (*Spodoptera frugiperda*) pada Tanaman Jagung. *Journal Agrotek, 6*(2), 81-93.
15. Hasibuan, S., Simbolon, Z. & Candra, I. A. (2024). Pathogenicity efficacy of entomopathogen fungus *Beauveria bassiana* against *in vitro* rice stem borer (*Scirpophaga innotata*). *Journal Teknik Pertanian Lampung, 13*(2), 441–448.
16. Ibrahim, Y. B., & Low W. (1993). Potential of mass production and field efficacy of isolates of the Entomopathoghenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* on *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology, 39*, 222-232.
17. Javar, S., Farrokhi, S., Sharifi, M., Ghaderi, K., & Hosseini, S. F. (2025). Comparative efficacy of two oil-based liquids of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of Applied Research in Plant Protection, 14*(3), 207–220, https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2025.20280 .
18. Kaur, S., Kaur, H. P., Kaur, K., & Kaur, A. (2011). Effect of different concentrations of *Beauveria bassiana* on development and reproductive potential of *Spodoptera litura* (Fabricius). *Journal of Biopest, 4*(2), 161.
19. Latifian, M., & Rad, B. (2012). Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin, *Beauveria brongniartii* Saccardo and *Metarhizium anisopliae* Metsch to adult *Oryctes elegans* Prell and effects on feeding and fecundity. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 4*(14), 1026-1032.
20. Leopold, J., & Samsinakova, A. (1970). Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology, 17*, 34-42 https://doi.org/10.1016/0022-2011(70)90095-9
21. Lou, H., Lou, Q., Guo, Q., Su, R., Liu, J., He, H., & Cheng, Y. (2024). Optimization of the culture medium of *Beauveria bassiana* and spore yield using response surface methodology. *Fermentation, 10*(11), 587. https://doi.org/10.3390/fermentation10110587 .
22. Macleod, D. M. (1954). Investigations on the genera Beauveria Vull. and *Tritirachium* Limber. *Canadian Journal of Biotechnology, 32*, 818-890. https://doi.org/10.1139/b54-070
23. Majidi Shilsar, F., Amouoghli Tabari, M., & Amini-Khalafbadam, M. (2013). Evaluation of the effectiveness of fipronil insecticide in control of *Chilo suppressalis* Walker in the paddy field. *Journal of Iranian Plant Protection Research, 27*(3), 333-341. (In Persian). https://doi.org/10.22067/jpp.v27i3.26760
24. Majidi-Shilsar, F. (2015). Crop loss assessment of rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker on Hashemi rice variety under field conditions. *Plant Pests Research, 5*(2), 25-37. (In Persian).
25. Majidi-Shilsar, F. (2017). Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and Met*arhizium anisopliae* to the striped rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *Schilar Academic & Scintific Publishers, Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences (SJAVS), India, 12*, 552-559.
26. Majidi-Shilsar, F., Ershad, D. J., & Padashat, F. (2007). A study of pathogenic effect of two species of fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, on rice striped stem borer *Chilo suppressalis* Walker (Lep., Pyralidae) in Guilan province, Iran. *Journal of Agricultural Science, 1*, 135-143.
27. Mascarin, G. M., Alves, S. B., & Lopez, R. B. (2010). Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinose*. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 53*, 4.

https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000400002
28. Montecalvo, M. P., Macaraig J. S. T., Navasero, M. M., & Navasero M. V. (2022). Bicontrol efficacy of natine *Metarhizium rileyi* to various life stages of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences, 28*(1), 1-11.
29. Montecalvo, M. P., & Navasero, M. M. (2021). Metarhizium (Nomuraea) rileyi (Farlow) Samson from *Spodoptera exigua* (Hübner) cross infects fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Philipp. *Journal of Science, 150*(1), 193-199.
30. Naimi Jobni, M., Majidi-Shilsar, F., & Arjamand, M. (2010). Investigating the effectiveness of different concentrations of *B. bassiana* (Balsamo) Vuill. resulting from food culture media of rice, wheat and soybean on the larvae of the rice striped stem borer. Proceedings of 19th Iranian Plant Protection Congress. 31 July-3 Aguust 2010. University of Tehran, Tehran, Iran. Vol. 19, p. 76. (In Persian).
31. Patel, K. C., Yadaw, D. V., Dube, H. C., & Patel, R. J. (1990). Laboratory and mass production studies with Metarhizium anisopliae. *Annual Biology, 6*, 135-138.
32. Petlamul W., & Prasertsan P. (2012). Evaluation of strains of Metarhizium anisopliae and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. *Mycobiology, 40*(2), 111-116. https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.2.111
33. Samsinakova, A. (1966). Growth and sporulation of submersed cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. *Journal of Invertebrate Pathology, 8*, 395-400. https://doi.org/10.1016/0022-2011(66)90056-5
34. Samsinakova, A. S., Kalakova, J. D., Vlcek, V., & Kybal, J. (1981). Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* population. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38, 169-174. https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90119-1 .
35. Santa, H. S. D., Santa, O. R. D., Brand, D., Vandenberghe, L. P. de S., & Soccol, C. R. (2005). Spore production of Beauveria bassiana from agro-industrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 48*, 51-61. https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000400007 .
36. 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.
37. Siwach, P., & Jaipal. S. (2004). Evaluation of industrial wastes for the mass production of *Beauveria bassiana* and their effects against *Chilo auricillus*. *Annals of Plant Protection Sciences, 12*(1), 193-195.
38. Stephan, D., & Zimmermann, G. (1997). Mass production of *Metarhzium flavoviride* in submerged culture using waste products. p. 227-229, In: S. Krall, R. Peveling & D. Ba Diallo9eds. New Strategies in Locust Control. Birkhauser Verlag, Basel.
39. Suzuki, A., Kanaoka, M., Murakoshi, A., Ichnoe, M., & Tamura, S. (1977). Brassianolide a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tetrahedron Letters, 25*, 2170-2187.
40. Thomas, K. C., Khachatorians, G. G., & Ingledew, W. M. (1987). Production and properties of Beauveria bassiana conidia cultured in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology, 33*, 12-20. https://doi.org/10.1139/m87-003 .
41. Tincilly, A., Easwaramoothy, S., & Santhanalakshim, G. (2000). Attempts on mass production of Nomuraea rileyi on various agricultural products and by products. *Journal of Biological Control, 18*(1), 33-40.
42. Yadav, H., Singh, R., Yadav, S. S., Singh, A., Dixit, A., & Vikrant, R. (2025). Study the mass production of Beauveria bassiana (Balsamo) on different media under laboratory conditions. *International Journal of Advanced Biochemistry Research, 9*(8), 1103-1106.