

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-Associate Prof., Rice Research Institute of Iran Rasht, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran.

majidi14@yahoo.com

<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). About 8,000 tons of these toxins are introduced into the country's rice fields annually, which has adverse and harmful consequences for the health of society and the environment (human, natural enemies, surface water pollution of wells, rivers and seas). 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 is being 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. Therefore, in order to increase the efficiency of the effect of this factor in natural conditions and at the farm level, the need for mass production of fungus and its widespread application using appropriate formulations in the rice agricultural ecosystem seems necessary. It is worth noting that nearly two centuries have passed since the ability of insect-pathogenic fungi to regulate and control the population of some insects harmful to agricultural crops has been proven.

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 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 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. Following this step, the spores in the stock suspension were counted using a hemocytometer, and the concentration of 1×10^8 conidia mL^{-1} was prepared for the experiment

Solid Culture Media:

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 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ under a 12/12 h light/dark photoperiod for 16–18 h to allow spore germination. After 24 h of incubation, a sterile coverslip was placed on a microscope slide, and 100 conidia beneath the coverslip were examined under a light microscope. Conidia bearing a germ tube, regardless of its length, were considered germinated, whereas those lacking a germ tube were recorded as non-germinated. The percentage of spore germination was calculated using Equation (1) according to Petlamul and Prasertsan (2012). To ensure counting accuracy, the assay was performed in three independent replicates. The conidial germination rate was 98%.

Equation (1):

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

where:

- **Germination (%)** = percentage of conidial germination;
- **a** = number of germinated conidia;
- **b** = number of non-germinated conidia

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. The percentage of colony-forming units (CFU) was calculated using Equation (2):

$$\text{CFU (\%)} = \text{Number of contaminating CFUs} / \text{Total number of CFUs} \times 100$$

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 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 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. The larvae were reared under laboratory conditions until the sixth instar. To ensure an adequate food supply, the old rice stems, which had become yellow or senescent, were replaced with fresh stems every 48 h.

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. Data that did not follow a normal distribution were transformed using the arcsine transformation to achieve normality before statistical analysis. Multiple comparisons among fungal concentrations (1×10^5 , 1×10^6 , and 1×10^7 conidia mL^{-1}) were performed using Tukey's test. Probit analysis was conducted to estimate the median lethal concentrations (LC_{50}) and median lethal times (LT_{50}) for each larval instar and fungal conidial concentration. The confidence limits for LC_{50} and LT_{50} values were calculated at the 95% confidence interval.

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. In this study, the highest conidial concentration was obtained in washed rice water medium. The results further indicated that the highest colony-forming unit (CFU) counts in liquid media were observed in SPMB and CSYE. In addition, plant-based culture media (rice grains and washed rice water), due to their low cost, could serve as suitable alternatives to synthetic and complex media such as CSYE and SPMB for the mass production of *B. bassiana*. Finally, the virulence of conidia produced in liquid media and conidia harvested from solid culture media was compared against larvae of the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis*. The bioassay results of conidia produced on washed rice grains demonstrated that the virulence of *B. bassiana* at a concentration of 1×10^7 conidia mL^{-1} against sixth-instar larvae was higher than that against early instars, resulting in 90% mortality. 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: Pest, Rice, Fungus, Spore, Bioassay

مطالعه تولید اسپورهای قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* در

محیطهای کشت مایع و جامد و ارزیابی میزان زهراگینی آن نسبت به کرم ساقه خوار

نواری برنج (*Chilo suppressalis*) در شرایط آزمایشگاهی

فرزاد مجیدی شیل سر^{*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۱۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۵/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۲۸

دانشیار پژوهشی موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران.

چکیده:

قارچ *Beauveria bassiana* برای رشد و تولید اسپور نیاز غذایی خود را از منابع کربن، فسفر و نیتروژن تامین می‌کند. تحقیق حاضر به منظور معرفی محیط کشت مناسب برای تولید انبوه در بستر مواد غذایی جامد و مایع می باشد. در این پژوهش اثر چند محیط کشت جامد شامل دانه جو، دانه برنج، دانه گندم و دانه ذرت و محیط‌های کشت مایع شامل عصاره سیب‌زمینی، بلغور ذرت، شربت ذرت، آب برنج شسته شده، محیط کشت SPMB و محیط کشت CSYE مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش از جدایه MCB18 قارچ بووریا جداشده از کرم ساقه خوار نواری برنج (*Chilo suppressalis*) استفاده شد. برای تهیه اسپور پایه از محیط کشت^۱ PDA استفاده شد. بعد از اسپورزایی، اسپورهای مورد نظر قارچ به ارلن‌های ضد عفونی شده حاوی مواد جامد و مایع، به محیط‌های کشت اضافه شد. سپس، محتویات ارلن‌ها تا سه هفته در انکوباتور در دمای 25 ± 2 نگهداری شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین تعداد اسپورها در محیط کشت جامد مربوط به دانه برنج بود. همچنین بیشترین اسپورهای تولید شده برای محیط‌های کشت مایع، به ترتیب در SPMB، CSYE و آب برنج شسته شده، عصاره سیب زمینی، شربت ذرت و بلغور ذرت استحصال شد. بیشترین وزن خشک میسلیم در محیط کشت جامد و مایع به ترتیب در دانه برنج و دانه گندم، SPMB، CSYE و برنج شسته شده مشاهده شد. در این پژوهش بیشترین تراکم اسپور تولید شده در ماده غذایی برنج شسته شده بدست آمد. 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 منشا گیاهی (دانه برنج و دانه برنج شسته شده) در مقایسه با مواد غذایی ترکیبی و مصنوعی از قبیل CSYE و SPMB به دلیل ارزان بودن می‌تواند جایگزین مناسبی برای تولید قارچ *B. bassiana* باشد. سرانجام، زهرآگینی اسپورهای به دست آمده در محیط مایع و کنیدیوم‌های برداشت شده از محیط کشت جامد نسبت به لاروهای آفت ساقه خوار (*C. suppressalis*) مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون زیست‌سنجی کنیدیوم‌های قارچ رشد یافته روی دانه شسته شده برنج نشان داد که قدرت زهرآگینی غلظت 1×10^7 کنیدیوم در میلی لیتر روی لارو سن ششم بیشتر از سنین اولیه ($73/33$ درصد) بود. همچنین، نتایج مقدار LC_{50} محاسبه شده در ۱۰ روز پس از تلقیح نشان داد که تراکم $7/1 \times 10^5$ تا $1/8 \times 10^6$ کنیدی در میلی لیتر، مرگ و میر تجمعی لاروها روند افزایشی نشان داد به طوری که از $56/8$ تا $70/34$ 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.

کلمات کلیدی: آفت ساقه‌خوار، برنج، قارچ، اسپور، زیست سنجی

مقدمه

- ۱ کرم ساقه‌خوار نواری برنج (*Chilo suppressalis*) Walker (Lep., Crambidae) به‌عنوان آفت خطرناک در مزارع
- ۲ برنج شمال کشور محسوب می‌گردد و بیش از چهار دهه است که کنترل این آفت برپایه کاربرد حشره‌کش‌های شیمیائی
- ۳ (محلول و گرانول) صورت می‌گیرد. سالانه حدود تا ۸۰۰۰ تن از این سموم به شالیزارهای کشور وارد می‌شود که پیامدهای
- ۴ نامطلوب و زیان‌باری برای سلامت جامعه و محیط زیست (انسان، دشمنان طبیعی، آلودگی آب‌های سطحی چاه‌ها، رودخانه‌ها
- ۵ و دریاها) به دنبال دارد (Majidi Shilsar, 2015) لذا به‌منظور کاهش مخاطرات ناشی از مصرف حشره‌کش‌های شیمیائی
- ۶ و توجه به ملاحظات زیست محیطی، اقتصادی و اکولوژیکی در شالیزارها امکان استفاده قارچ *B. Bassiana* در چارچوب
- ۷ برنامه مدیریت تلفیقی آفات^۱ و در قالب کنترل بیولوژیک مورد بررسی و تاکید قرار می‌گیرد (Majidi Shilsar, 2017).
- ۸ همچنین برای کاهش مصرف حشره‌کش‌های شیمیائی، امروزه متخصصان حشره‌شناسی کشاورزی عملیات کنترل آفات را
- ۹ طوری طراحی می‌کنند که عوامل طبیعی زنده دخالت بیشتری داشته باشند (Ghasemi et al., 2022). در این ارتباط چون
- ۱۰ در اکوسیستم زراعی برنج، حشرات زیان‌آور تحت تأثیر دشمنان متعددی از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌های
- ۱۱ بیمارگر حشرات قرار می‌گیرند، در این میان قارچ *B. Bassiana* به لحاظ پراکنش و فراوانی بیشتر در شمال کشور از
- ۱۲ اهمیت ویژه‌ای در کنترل کرم ساقه‌خوار برنج از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Majidi Shilsar et al., 2013). این
- ۱۳ قارچ امروزه بعنوان یک عامل کنترل بیولوژیک و حشره‌کش زیستی^۲ برای مبارزه با آفات محصولات زراعی و باغی مورد
- ۱۴ توجه و مصرف می‌شود. در شرایط طبیعی شالیزار قارچ *B. Bassiana* میزان ۱۰ تا ۱۱ درصد تلفات در جمعیت آفت
- ۱۵ ساقه‌خوار ایجاد می‌نماید (Majidi Shilsar et al., 2007; Majidi Shilsar, 2017). بنابراین به منظور افزایش کارایی
- ۱۶ تاثیر بیشتر این عامل در شرایط طبیعی و در سطح مزرعه، نیاز به تولید انبوه قارچ و کاربرد گسترده آن با استفاده از
- ۱۷ فرمولاسیون‌های مناسب در اکوسیستم زراعی برنج ضروری به‌نظر می‌رسد. شایان ذکر است نزدیک به دو قرن از اثبات
- ۱۸ توانایی قارچ‌های بیمارگر حشرات در تنظیم و کنترل جمعیت برخی حشرات زیان‌آور به محصولات کشاورزی می‌گذرد
- ۱۹ (Gillespie, 1988).
- ۲۰ در بین قارچ‌های بیمارگر حشرات قارچ (*Sordariomycetes, Hypocreales*) Vuillemin (*B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin
- ۲۱ به دلیل دارا بودن توانایی قابل ملاحظه برای کنترل جمعیت حشره آفت، بیشترین توجهات را به خود اختصاص داده است
- ۲۲ (Feng, et al., 1994). بنا به گزارش سامسیناکووا و همکاران (Samsinakova, et al., 1981) تولید اسپورهای قارچ
- ۲۳ بووریا به روش‌های زیر انجام می‌شود: الف) کشت در محیط مایع و تولید اسپورهای درشت (بلاستوسپور) ب) کشت در
- ۲۴ محیط جامد و تولید اسپورهای ریز ج) کشت در دو فاز مایع و جامد. در این ارتباط نعیمی و همکاران (Naemi et al.
- ۲۵ 2010) در بررسی کارایی تراکم‌های مختلف قارچ *B. bassiana* حاصل از محیط‌های غذایی برنج، گندم و سویا علیه کرم
- ۲۶ ساقه‌خوار نواری برنج، دانه برنج را به‌عنوان سوبسترای بهینه برای تولید اسپور معرفی نمودند. همچنین براساس نتایج
- ۲۷ مطالعات بنامولایی و همکاران (Bana-Mollaie et al., 2010) در بررسی تاثیر محیط کشت روی زهرآگینی قارچ بووریا
- ۲۸ باسیانا علیه شب پره دم قهوه‌ای نشان داد که اسپورهای حاصل از محیط کشت سبوس برنج با ۸۴/۹۵ درصد بیشترین
- ۲۹ مرگ و میر را روی لارو شب پره داشته است. در مطالعه‌ای دیگر، بنامولایی و همکاران (Bana-Mollaie et al., 2008)

^۱ -Integrated Pest Managemen

^۲ -Bioinsecticide

- ۱ در ارزیابی محیط‌های جامد طبیعی برای تولید کنیدی قارچ *B.bassiana* محیط حاوی سبوس گندم به اضافه آب پنیر را
- ۲ به‌عنوان محیطی که بیشترین میزان تولید کنیدی را به خود اختصاص داد معرفی کردند.
- ۳ مطالعات اولیه در زمینه تولید اسپور قارچ *B.bassiana* مک لود (Macleod, 1954) نشان داد که این قارچ در محیط
- ۴ کشت جامد اسپورهای کروی تولید کرده و این اسپورها به راحتی در هوا پراکنده و پخش شده و هنگام آلوده‌سازی حشره
- ۵ میزبان به اسپورهای بیضی شکل تبدیل می‌شوند. در مقابل سامسیناکوف (Samsinakova, 1966) در بررسی‌های خود
- ۶ مشاهده کرد که قارچ *B. bassiana* در محیط‌های کشت مایع فقط اسپورهای بیضی شکل تولید می‌کند. پژوهش‌های
- ۷ متعددی روی جنبه‌های مختلف فیزیولوژی و متابولیسم *B.bassiana* متمرکز شد، از جمله تولید آنزیم‌های برون سلولی
- ۸ توسط لئوپلد و سامسیناکووا (Leopold & Samsinakova, 1970)، تولید توکسین توسط سوزوکی و همکاران (Suzuki
- ۹ *et al.*, 1977) و تولید بیوماس در محیط کشت‌های گوناگون توسط توماس و همکاران (Thomas *et al.*, 1987) و
- ۱۰ سامسیناکوف (Samsinakova, 1966) این تحقیقات در نهایت به تولید تجارتي قارچ *B.bassiana* برای استفاده به عنوان
- ۱۱ یک حشره‌کش زیستی انجامید. در زمینه تولید انبوه قارچ *B.bassiana*، گرایس و جارونسکی (Grace & Jaronski,
- ۱۲ 2005) در سه مرحله بسترهای مختلف از جمله دانه‌های گندم، جو و برنج، محیط کشت مایع و مواد جامد، را ارزیابی کردند.
- ۱۳ براساس یافته‌های آن‌ها، دانه جو و محیط کشت CSYP به‌عنوان مناسب‌ترین بسترها معرفی شدند. در مطالعه دیگر، سانتا و
- ۱۴ همکاران (Santa *et al.*, 2005) با استفاده از بقایای صنایع تبدیلی کشاورزی نشان دادند که ترکیب ۶۰ درصد پوست سیب
- ۱۵ زمینی و ۴۰ درصد تفاله نیشکر بیشترین تولید اسپورهای هوازی قارچ *B. bassiana* با $10^{10} \times 3/4$ کنیدی بر گرم توده
- ۱۶ خشک را در ارلن مایر افزایش داده است. مطالعات لو و همکاران (Lou *et al.*, 2024) به‌منظور بهینه‌سازی محیط کشت
- ۱۷ قارچ *Beauveria bassiana* و میزان اسپورزایی آن از محصولات جانبی کشاورزی کم‌هزینه نشان دادند که سیب‌زمینی،
- ۱۸ سبوس‌گندم و گندم بیشترین تأثیر را بر تولید هاگ پس از ۱۴ روز کشت داشتند. همچنین آنها اظهار داشتند که گندم،
- ۱۹ سبوس‌گندم و چوب بلال بیشترین تأثیر را بر تولید اسپور قارچ داشتند. هدف از انجام این پژوهش دستیابی به محیط یا
- ۲۰ محیط‌های کشت بهینه جهت تولید انبوه قارچ *B.bassiana* به عنوان یک عامل کنترل زیستی علیه *C. suppressalis*، با
- ۲۱ بررسی اثرات آن در مراحل مختلف لاروی و غلظت‌های مختلف اسپور انجام شد.
- ۲۲ **مواد و روش تحقیق**
- ۲۳ برای اجرای این پژوهش ابتدا جدایه Mcb18 قارچ *B.bassiana* (جدا شده از حشره کرم ساقه‌خوار برنج در مؤسسه تحقیقات
- ۲۴ برنج، رشت) روی محیط SDAY^۱ کشت داده شد و سپس برای جوانه‌زنی در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس در انکوباتور
- ۲۵ نگهداری گردید. بعد از اسپوردهی کامل (۱۴ تا ۲۱ روز)، اسپورها از سطح محیط کشت بوسیله میله لوپ خراشیده شدند و
- ۲۶ سپس با افزودن آب مقطر حاوی محلول توئین ۸۰ (دو صدم درصد) اسپورها از سطح جدا و مجدداً در داخل ارلن سترون
- ۲۷ برای ایجاد محلول سوسپانسیون ریخته شد. بعد از این مرحله، سوسپانسیون خاص از پارچه ملل (مش ۰/۵ میلی‌متر) عبور
- ۲۸ داده شد تا صاف شده و فقط اسپور قارچ باقی بماند. بعد از این مرحله شمارش اسپورها در سوسپانسیون مادر^۲ با استفاده از
- ۲۹ لام گلیول شمار انجام گردیده و تراکم $10^8 \times 1$ کنیدیوم در میلی‌لیتر برای انجام کار، تهیه شد.
- ۳۰ **محیط کشت جامد:**

^۱-Sabouraud Dextrose Agar Yeast

^۲-Stock

- ۱ چهار نوع محیط کشت جامد شامل دانه برنج (رقم هاشمی)، دانه گندم (رقم دوروم)، دانه ذرت (رقم چاووش) و دانه جو
- ۲ (رقم سه‌پند) مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا دانه‌های برنج سالم به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه جوشانده شد. دانه‌های گندم به مدت
- ۳ ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. همچنین، دانه‌های شکسته ذرت به مدت ۶۰ دقیقه در آب نگهداری شد. دانه‌های جو
- ۴ به قطعات کوچک تبدیل شده بودند به مدت ۱۰ دقیقه در آب نگهداری شد. براساس روش آلوز و پیرا (Alves & Pereira, 1989)
- ۵ که از طبق یا سینی^۱ استفاده نمودند، در این پژوهش ابتدا ۳۰۰ گرم از دانه‌های موجود به‌طور جداگانه در
- ۶ فلاسک‌های شیشه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری برای رشد قارچ پخته شد. درب فلاسک‌های شیشه‌ای با پنبه و فویل آلومینیوم
- ۷ بسته‌شده و در فشار ۱۵ psi برای یک ساعت و در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس در اتوکلاو استریل گردیدند. سپس، فلاسک
- ۸ های شیشه‌ای را برای سرد شدن به زیر هود منتقل نمودند. بعد از سرد شدن درب فلاسک‌ها باز شده و حدود ۵ میلی‌لیتر
- ۹ از سوسپانسیون اسپور قارچ با تراکم 10^8 کنیدیوم در میلی‌لیتر اسپور قارچ بوسیله میکروپیپت درون هر فلاسک اضافه شد.
- ۱۰ مجدداً درب فلاسک‌ها بسته شده و برای پراکنده شدن یکنواخت اسپورها، به خوبی تکان داده شدند. سپس در دمای
- ۱۱ 26 ± 0.5 درجه سلسیوس با دوره نوری (L:D) ۱۲:۱۲ به مدت سه هفته در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از گذشت ۵۶ تا
- ۱۲ ۷۲ ساعت، رشد میسلیم روی سطح دانه‌ها مشاهده گردید. در چهارمین روز درب فلاسک‌ها باز شدند، تا هوادهی و فرآیند
- ۱۳ اسپورزایی قارچ تسهیل گردد و بعد از ۷ روز رشد یکنواخت میسلیم و اسپورزایی آشکار شد. در این مرحله درب فلاسک‌ها را
- ۱۴ باز شده و محتویات آنها روی سینی‌های پلاستیکی استریل با ابعاد $30 \times 45 \times 12/5$ پخش شد. محتویات هر تیمار در چهار
- ۱۵ سینی ریخته‌شده و به مدت چهار روز در زیر هود استریل در دمای 29 ± 1 درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. به
- ۱۶ منظور اجتناب از کلوخه شدن دانه‌های داخل فلاسک شیشه‌ای بعد از ۷ روز فلاسک‌ها به شدت تکان داده شدند تا دانه‌ها
- ۱۷ وتوده میسلیمی از همدیگر جدا شوند.
- ۱۸ محیط کشت مایع
- ۱۹ همچنین از محیط‌های کشت مایع عصاره سیب زمینی، بلغور ذرت، شربت ذرت، آب برنج شسته شده، محیط‌های کشت
- ۲۰ مصنوعی^۲ SPMB و CSYE^۳ مورد بررسی قرار گرفت. محیط‌های کشت مایع شامل عصاره سیب‌زمینی شامل (۲۰۰ گرم
- ۲۱ سیب‌زمینی پوست کنده، ۲۰ گرم دکستروز و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب)، بلغور ذرت شامل (۲۰ گرم بلغور ذرت، پپتون ۲۰ گرم، ۲
- ۲۲ گرم دکستروز و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب)، شربت ذرت (CPY)^۴ شامل (۴۰ گرم شربت ذرت، ۱۰ گرم عصاره مخمر؛ ۱۰ گرم
- ۲۳ پپتون و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب)، آب برنج شسته شده، و CSYE شامل (۴۰ گرم گلوکز، ۱۰ گرم KNO_3 ، ۵ گرم KH_2PO_4 ،
- ۲۴ ۲ گرم $MgSO_4$ ، ۰/۰۵ گرم $CaCl_2$ ، ۲/۵ گرم عصاره مخمر و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب) و SPMB شامل (۳۰ گرم گلوکز، ۱۵
- ۲۵ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم K_2HPO_4 میلی‌لیتر توپین ۸۰ و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب) برای رشد و اسپورزایی قارچ B.
- ۲۶ *bassiana* مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین ترتیب، ابتدا به میزان یک لیتر از محیط را آماده کرده و سپس به مقدار ۱۰۰
- ۲۷ میلی‌لیتر از محیط کشت را در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و در فشار ۱۵ psi برای ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. همزمان با
- ۲۸ سرد شدن ۵۰ پی پی ام (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) از آنتی بیوتیک (تتراسیکلین) را به هر ارلن اضافه شد. در نهایت، یک میلی‌لیتر

^۱ -Tray

^۲ Sabouraud Potato Malt Broth

^۳ Casein Sucrose Yeast Extrac

^۴ - Corn Peptone Yeast

- ۱ از سوسپانسیون قارچی (تهیه شده از محیط کشت SDAY را در ۴ ارلن از هر محیط کشت به‌طور جداگانه ریخته و در دمای
- ۲ ۲۸ درجه سلسیوس برای دو تا سه هفته در انکوباتور نگهداری شدند.
- ۳ آزمون جوانه‌زنی اسپور
- ۴ آزمون جوانه‌زنی اسپور برای این جدایه انجام شد. برای انجام آزمون جوانه‌زنی در ابتدا، اقدام به تهیه‌ی سوسپانسیون با
- ۵ غلظت 1×10^6 کنیدی در میلی‌لیتر با استفاده از لام گلبول شمارش شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپورهای حاصل از
- ۶ هر محیط مایع را در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل باضافه محلول توئین ۸۰ دوصدم درصد ریخته و سپس ۱۰۰ میکرولیتر
- ۷ از سوسپانسیون فوق را داخل تشتک پتری حاوی ^۱PDA ریخته و بعد از ۱۶ تا ۱۸ ساعت در دمای 26 ± 0.5 در دوره نوری
- ۸ ۱۲:۱۲ نگهداری تا اسپورها جوانه زدند و پس از ۲۴ ساعت یک لامل استریل را بر روی لام قرار داده و در محیط این
- ۹ لامل تعداد ۱۰۰ کنیدی که دارای لوله جوانه‌زنی با هر طولی که بودند و کنیدی‌هایی که فاقد لوله جوانه‌زنی بودند شمارش
- ۱۰ شدند و درصد جوانه زنی با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد پتالامول و پراسرتسان (Petlamul & Prasertsan,
- ۱۱ 2012). برای صحت شمارش، این عمل سه بار تکرار شد. جوانه زنی اسپور ۹۸ درصد را نشان داد. معادله (۱).
- ۱۲
$$\text{Germination (\%)} = (a / a + b) \times 100 \quad (1)$$
- ۱۳ Germination (%) = درصد جوانه‌زنی
- ۱۴ a = تعداد اسپور جوانه‌زده
- ۱۵ b = تعداد اسپور جوانه‌نزده
- ۱۶ تعیین تعداد واحد کلنی قارچ^۲
- ۱۷ برای این کار ابتدا یک لیتر از محیط‌های کشت مایع را که از قبل آماده شده را در چهار ارلن مایری ۲۵۰ میلی
- ۱۸ لیتری ریخته و درب هر کدام را با پنبه و فویل محکم بسته و در دمای ۱۲۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه داخل
- ۱۹ اتوکلاو استریل شدند. در هنگام سرد شدن ۵۰ میلی‌گرم در لیتر (۵۰ پی پی ام) از آنتی بیوتیک (تتراسیکلین) به
- ۲۰ هر ارلن اضافه شد. در مرحله بعدی یک دیسک به قطر دو میلی‌متر از قارچ را که در محیط کشت SDAY
- ۲۱ تهیه شده به ارلن‌ها اضافه گردیدند. این ارلن‌ها روی شیکر چرخان با ۲۲۰ دور در دقیقه در دمای 26 ± 1 درجه
- ۲۲ سلسیوس برای مدت ۴ روز نگهداری شدند. در همین مرحله پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون روی شیکر چرخان
- ۲۳ به میزان ۱ میلی‌لیتر از هر تکرار را به لوله آزمایش استریل با ۹ میلی لیتر آب مقطر و توئین ۸۰ دو صدم درصد
- ۲۴ بعنوان ماده فعال کننده و جدا کننده ریخته شد. سوسپانسیون قارچی فوق را تا جایی که امکان داشت رقیق شد
- ۲۵ (10^{-3} یا 10^{-4}) مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون قارچی را به‌وسیله سمپلر به داخل محیط کشت PDA
- ۲۶ ریخته و با لوله‌های استریل پیپت پاستور به‌طوریکه نواخت پخش شد. در مرحله بعد سه عدد تشتک پتری از هر
- ۲۷ تکرار را که تلقیح شده بودند در دمای 26 ± 1 درجه سلسیوس و با دوره نوری (L:D) ۱۲:۱۲ ساعت در انکوباتور
- ۲۸ نگهداری شدند. اسپورهای قارچ بعد از ۱۵ تا ۱۷ ساعت شروع به تندش کرد. سپس تا ۲۴ ساعت در دمای ۱۰
- ۲۹ درجه سلسیوس در یخچال نگه داری شدند، سپس شمارش کلنی‌های تشکیل شده انجام شد جاور و همکاران
- ۳۰ (Javar et al., 2025). تعداد کلنی‌های تشکیل شده (CFU) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

^۱ Potato dextrose agar

^۲ -Colony-forming unit

$$(2) \quad 100 \times \frac{\text{تعداد CFU آلوده کننده}}{\text{تعداد کل CFU}} = \text{تعداد واحدهای کلنی (CFU)}$$

۳ پرورش حشره

۴ پرورش حشره ساقه‌خوار با شکار شبپره‌های آفت توسط تله‌های نوری صورت گرفت. افراد بالغ شبپره‌های بعد
۵ از جمع‌آوری به تعداد ۵ جفت فرد نر و ماده با برگ گیاه برنج که از دمبرگ بریده شده بودند در داخل ارلن مایر
۶ به حجم یک لیتر برای تخمگذاری قرار داده و در شرایط اتاق (دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۸۵
۷ درصد با دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنائی) منتقل شدند. ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد، تخم‌ریزی روی
۸ برگ‌های داخل ارلن صورت گرفت. سپس دسته‌های تخم از برگ جدا و در لوله آزمایش قرار داده شدند. بعد از ۵
۹ روز لاروها از دسته‌های تخم خارج شدند. سپس لاروهای سن اول به ظرف پلاستیکی که حاوی ساقه‌های تازه
۱۰ برنج بودند انتقال داده شدند. لاروها تا ۶ سن در آزمایشگاه پرورش داده شدند. در ضمن هر ۴۸ ساعت ساقه‌های
۱۱ برنج قدیمی که زرد و تغییر رنگ داده بودند، تعویض شده و ساقه‌های جدید برای تغذیه لاروهای در ظرف
۱۲ قرار داده شدند. سپس زیست‌سنجی برای لاروها به روش غوطه‌وری انجام شد. در روش غوطه‌وری هر
۱۳ سن لاروی به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه داخل سوسپانسیون قارچی با سه غلظت مشخص 1×10^5 ، 1×10^6
۱۴ و 1×10^7 کنیدی بر میلی‌لیتر غوطه‌ور شدند و سپس لاروهای غوطه‌ور بوسیله قیف‌های با سیم توری بطور
۱۵ همزمان خارج شدند. برای هر لارو ساقه‌خوار ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول فوق استفاده شد. در تیمار شاهد، لاروهای
۱۶ سن پنجم در محلول Tween 80 ۰/۲ درصد به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه فرو برده شدند. کف داخل تشتک پتری
۱۷ همه تیمارها با کاغذ صافی استریل و پنبه استریل آغشته به آب مقطر استریل به جهت حفظ رطوبت و قطعات
۱۸ ۵ سانتی‌متری ساقه‌های برنج در اختیار لاروهای ساقه‌خوار برنج قرار داده شدند. سپس تشتک‌های پتری به
۱۹ اتاقک رشد با دمای $25 \pm 1^\circ\text{C}$ انتقال داده شدند. قطعات ساقه داخل تشتک پتری در مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت
۲۰ همزمان با تغییر رنگ ساقه تعویض شدند. برای یک دوره دو هفته‌ای هر روز مرگ و میر ثبت گردید. لاروهای
۲۱ مرده از تشتک‌های پتری خارج و با الکل اتیلیک ۷۵ درصد (یک دقیقه)، هیپوکلریت سدیم ۵٪ (یک دقیقه) و ۳
۲۲ بار آب‌شوئی با آب مقطر استریل ضد عفونی شدند و به تشتک‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب و استریل انتقال
۲۳ یافتند و بعد از مرگ، لاروها در انکوباتور در دمای 25 ± 1 در رطوبت نسبی 85 ± 5 درصد نگهداری شدند تا
۲۴ 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.

زیست سنجی قارچ *B.bassiana* و محاسبه LC_{50} و LT_{50}

لاروهای سنین مختلف از همان ابتدا به صورت انفرادی تا سن ششم در پتری‌دیش پرورش داده شدند. لاروها روزانه با ساقه‌های تازه و ضدعفونی‌شده و تغذیه می‌شدند. هر تیمار در سه تکرار و با ۱۰ لارو در هر تکرار انجام شد. میزان مرگ و میر روزانه ثبت و بروز آلودگی قارچی در لاروها مشاهده گردید. درصد مرگ و میر اصلاح شد (فرمول ابوت، ۱۹۲۵) و میانگین زمان تا وقوع مرگ و میر 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 (1×10^5 اسپور 1×10^6 و 1×10^7 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 شد. محدودیت‌های مرجع برای مقادیر LC^1 و LT^2 با فاصله اطمینان ۹۵٪ محاسبه شدند.

تحلیل آماری

کشت محیط‌های جامد و مایع در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار در ۴ تکرار در آزمایشگاه انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ در ویندوز انجام شد.

نتایج و بحث:

نتایج حاصل از این آزمایش به شرح جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشد.

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 *B. bassiana*

Culture mediums	Ph before the test	Ph after the test	Spore density con. /ml.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

¹ Lethal concentration 50

² lethal time 50

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

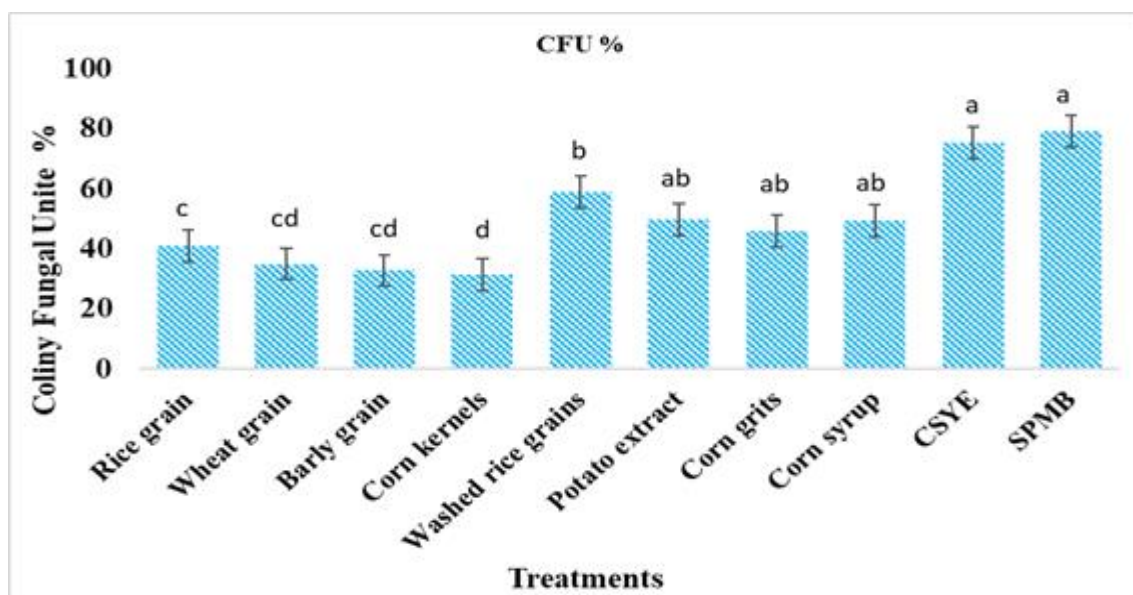
Means with similar letters do not differ significantly from each other. Mean comparison was done by Tukey's test.

مقایسه میانگین تغییرات PH در محیط‌های غذایی جامد (تولید اسپور) و مایع (بلاستوسپور) در جدول ۱ قابل مشاهده است. براساس همین جدول، بیشترین تغییرات PH 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.

در همین ارتباط عسکری و همکاران (Askari et al., 2008) نشان دادند که بیشترین تغییرات PH در محیط کشت ملاس چغندر قند و کمترین آن محیط کشت با عصاره سیب‌زمینی برای تولید قارچ *B. bassiana* بوده است. آن‌ها بیان کردند که بیشترین بلاستوسپور تولید شده مربوط به محیط کشت ملاس چغندر بود. همین پژوهشگران اظهار داشتند که تولید بلاستوسپور در محیط کشت ملاس چغندر قند با افزودن هیدروکربور افزایش یافته است. در مطالعه صورت گرفته توسط استفان و زیمرمن (Stephan & Zimmermann, 1997) برای تولید بلاستوسپور قارچ *Metarhizium flavoviride* از منابع غذایی مختلف حاوی مقادیر متفاوت نیتروژن و قند استفاده نمودند. 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 نشان دادند که اختلاف معنی‌داری بین محیط‌های کشت به لحاظ تولید اسپور وجود دارد. همچنین آن‌ها گزارش کردند که بیشترین کل‌امیدوسپور و کنیدیوفورهای تولید شده 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* به عنوان عامل بیمارگر حشرات روی محیط کشت‌های مختلف، نشان دادند که آب برنج شسته شده بیشترین تعداد اسپور را داشته است. همچنین براساس بررسی‌های دیگر پژوهشگران، در تولید انبوه قارچ *B. bassiana* دانه‌ی برنج را مناسب‌ترین محیط کشت برای تولید انبوه قارچ عنوان کردند (Ibrahim & Low, 1993; Sharma et al., 2002). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که از میان همه محیط‌های کشت مورد آزمایش، بیشترین بلاستوسپور تولید شده در محیط‌های کشت مایع مربوط به دانه برنج شسته شده بوده و به لحاظ 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 میان محیط‌های کشت جامد، بیشترین اسپور تولید شده در دانه برنج بدست آمد، که با نتایج تحقیق شرما و همکاران (Sharma et al., 2002) مطابقت دارد. جدول ۲ نشان می‌دهد که بیشترین بیوماس تولید شده در محیط‌های کشت مورد آزمایش مربوط به محیط کشت SPMB به مقدار ۴/۵۳ گرم در ۲۰۰ گرم ماده غذایی بود. بعد از آن، در دو نوع مواد غذایی CSYE و دانه برنج شسته شده مشاهده شد. در این آزمون کمترین بیوماس تولید شده مربوط به محیط کشت حاوی دانه ذرت بدست آمد. در پژوهشی دیگر، گوپالاکریشنان و موهان (Gopalakrishnan & Mohan, 2001)، گوپالاکریشنان و همکاران (Gopalakrishnan et al., 1999) تنسلی و همکاران (Tincilly et al. 2000) گزارش کردند که هویچ مناسب‌ترین و

- ۱ ارزان‌ترین محیط کشت برای تولید قارچ‌های ناقص (Deuteromycetes) به‌ویژه قارچ *B. bassiana* در مقایس بزرگ می باشد.
- ۲
- ۳ نتایج پژوهش حاضر نشان داد که محیط‌های غذایی با منشا گیاهی (دانه برنج و دانه برنج شسته شده) از بین مواد غذایی جامد نیز در مقایسه با مواد غذایی ترکیبی و مصنوعی از قبیل CSYE و SPMB به دلیل ارزان‌تر بودن جایگزین مناسبی برای مواد غذایی مصنوعی برای تولید قارچ *B. bassiana* بوده و می‌توان در تولید قارچ بیمارگر حشرات استفاده نمود. در این ارتباط ابراهام و همکاران (Abraham et al., 2003) بررسی‌های برای تولید قارچ *B. bassiana* روی مواد مختلف گیاهی انجام داده‌اند. آن‌ها مقادیر مختلف از ملاس چغندر قند را برای تولید قارچ بکار برده و ملاحظه کردند که بیشترین رشد رویشی و تولید اسپور قارچ در غلظت ۳ تا ۶ درصد بود. همچنین، آن‌ها در ادامه پژوهش‌های خود نشان دادند که از میان دانه‌های غلات نظیر سورگوم انواع ارزن و برنج و همچنین گیاهان غده‌ای نظیر سیب‌زمینی، هویج، چغندر قند و **تاپیوکا**^۱ (نشاسته‌ای است که از گیاه کاسوا استخراج می‌شود) بیشترین رشد میسلیم 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. تاثیر نوع محیط کشت تنها به میزان رشد رویشی و اسپورزایی قارچ مربوط نمی‌شود. در همین رابطه، پژوهش‌های سیواج و جاپال (Siwach & Jaipal, 2004) نشان داده است که بستر غذایی نه تنها روی میزان اسپورزایی بلکه روی میزان بیمارگری قارچ نیز تاثیرگذار است. آن‌ها نشان دادند که قارچ *B. bassiana* روی محیط‌های جامد سبوس ذرت و سبوس گندم بیشترین اسپورزایی را داشته و روی میزبان خود حدود ۷۰ درصد مرگ و میر ایجاد کرد. در حالی که اسپورهای تولید شده روی پوسته برنج ۸۱/۵ درصد مرگ و میر را روی کرم ساقه‌خوار ذرت، *Chilo auricilius* ایجاد نمود.
- ۱۶
- ۱۷ شکل ۲ نشان می‌دهد که بیشترین آلودگی (توده میسلیمومی) در بین محیط‌های کشت مایع مربوط به مواد غذایی SPMB با ۷۹/۱۸ درصد و بعد از آن ماده غذایی مصنوعی CSYE با ۷۵/۸۱ درصد می‌باشد. بعد از دو محیط کشت مصنوعی مذکور، آب برنج شسته شده به لحاظ آلودگی به قارچ بووریا با ۵۸/۸۷ درصد در گروه بعدی قرار گرفت. در این ارتباط چون دو محیط کشت مصنوعی گران بوده و مقرون به صرفه نمی‌باشد، پیشنهاد می‌گردد که از محیط کشت برنج شسته شده برای تولید انبوه قارچ استفاده شود. همچنین، در این پژوهش بیشترین کلنی تشکیل شده در روی مواد غذایی SPMB و CSYE و نیز دانه برنج شسته شده 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 شسته شده به عنوان مواد غذایی مایع و از دانه برنج به عنوان مواد جامد برای تولید قارچ *B. bassiana* استفاده نمود.
- ۲۴

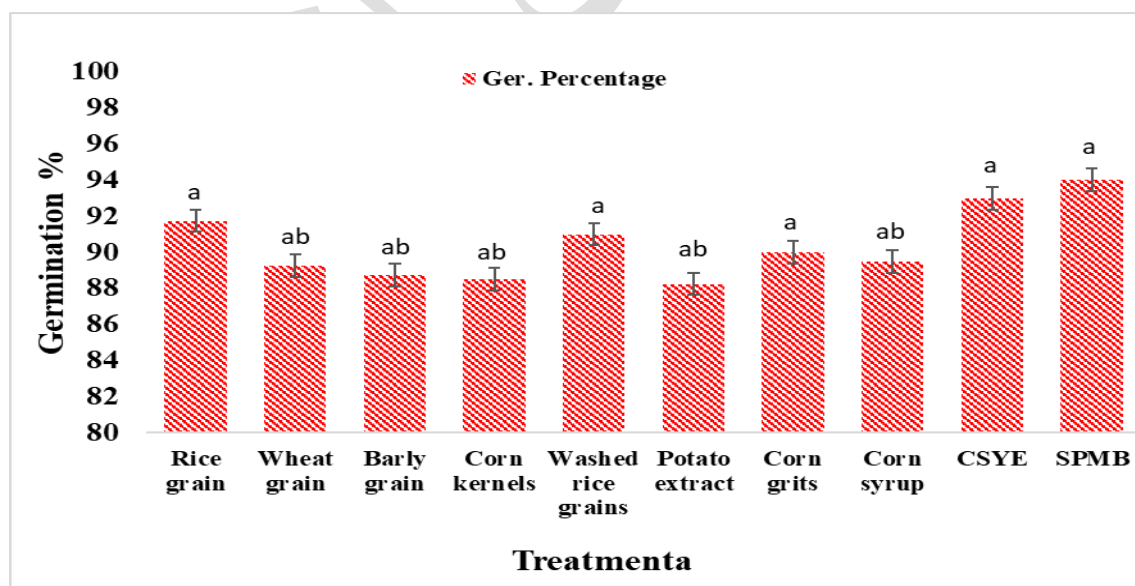
^۱ Tapioca



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

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

شکل ۳ درصد جوانه زنی قارچ بووریا در محیط‌های کشت مختلف را نشان می‌دهد. در این شکل بیشترین جوانه زنی به ترتیب در سه محیط کشت SPMB، CSYE و Washed rice grains و Rice grain به دست آمد و به لحاظ آماری در یک گروه قرار گرفتند. در همین شکل، نتایج این پژوهش نشان داد که کمترین جوانه زنی قارچ در محیط‌های کشت، شربت ذرت، بلغور ذرت، عصاره سیب زمینی، دانه ذرت، و دانه گندم مشاهده شد و همگی در گروه بعدی طبقه‌بندی شدند.



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

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

۱ در این پژوهش برای اثر زهرآگینی قارچ بووریا باسیانا از اسپوره‌های تولید شده در دانه برنج شسته شده روی
 ۲ لاروهای کرم ساقه‌خوار نواری برنج آزمایش شد. در این مطالعه همچنین LC_{50} محاسبه شده برای هر سن
 ۳ لاروی را با استفاده از آنالیز پروبیت در حد اطمینان ۹۵٪ ارائه شده است (جدول ۲).
 ۴ جدول ۲-مقادیر غلظت کشنده قارچ *Beauveria bassiana* علیه سنین مختلف لاروی *Chilo suppressalis* با حدود
 ۵ اطمینان ۹۵ درصد

۶ **Table 2- Lethal concentration of *Beauveria bassiana* against *Chilo suppressalis* larvae at**
 ۷ **95% fiducial limit**

Larval Stage	No. Larvae	LC_{50} (con/ml) (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

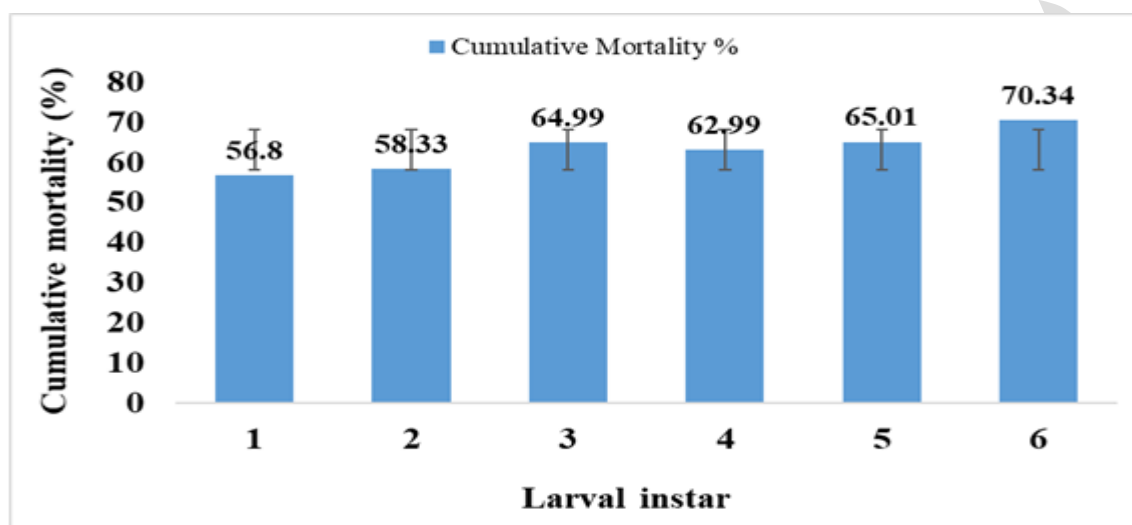
۸ جدول ۳ میسران مرگ و میر ناشی از تاثیر قارچ *B.bassiana* روی لاروهای سنین مختلف کرم ساقه‌خوار نواری
 ۹ برنج را نشان می‌دهد. در این جدول کمترین مرگ و میر لارو در سن اول مربوط به تراکم 10^5 کنیدی بر میلی
 ۱۰ لیتر با ۴۳/۰۸ و بیشترین مرگ و میر در تراکم 10^7 کنیدی بر میلی‌لیتر با ۵۳/۳۳ درصد بود. بیشترین مرگ و میر
 ۱۱ در تراکم‌های مختلف برای لارو سن ششم با ۷۳/۳۳ درصد در تراکم 10^7 کنیدی بر میلی‌لیتر مشاهده شد.
 ۱۲ جدول ۳-درصد (میانگین $\pm$ خطای استاندارد) مرگ و میر روی مراحل مختلف لاروی کرم ساقه‌خوار *Chilo*
 ۱۳ *suppressalis* ناشی از قارچ *Beauveria bassiana* و درصد (میانگین $\pm$ خطای استاندارد)

۱۴ **Table 3-Percentages (Mean $\pm$ SE) of mortality on differnt larval instars of *Chilo***
 ۱۵ ***suppressalis* caused by *Beauveria bassiana***

Larval Stage	No. Larvae	10^5	10^6	10^7
L1	30	43.08 $\pm$ 5.77	50.00 $\pm$ 10.00	53.33 $\pm$ 5.77
L2	30	44.99 $\pm$ 5.77	53.33 $\pm$ 5.77	53.33 $\pm$ 5.77
L3	30	46.66 $\pm$ 5.77	53.33 $\pm$ 5.77	53.33 $\pm$ 5.77
L4	30	50.85 $\pm$ 5.77	53.53 $\pm$ 5.77	56.67 $\pm$ 5.77
L5	30	52.77 $\pm$ 5.77	53.33 $\pm$ 5.77	56.67 $\pm$ 5.77
L6	30	56.99 $\pm$ 5.77	66.66 $\pm$ 5.77	73.33 $\pm$ 5.77

۱ شکل ۴ مقدار LC_{50} محاسبه شده در ۱۰ روز پس از تلقیح $7/1 \times 10^5$ تا $1/8 \times 10^6$ کنیدی در میلی‌لیتر، مرگ و
 ۲ میر تجمعی لاروها روند افزایشی نشان داد به‌طوری‌که از $56/8$ تا $70/34$ درصد متغیر بود (شکل ۴). شواهد
 ۳ حاصل از این پژوهش، نویدبخش آن است که فرآیند تجاری‌سازی قارچ‌های بیمارگر حشرات، می‌توان بر
 ۴ پتانسیل بلاستوسپورهای تولید شده در محیط‌های کشت مایع به‌عنوان یک جایگزین عملی و اقتصادی اتکا
 ۵ نمود.

۶ شکل ۴-مرگ و میر تجمعی کرم ساقه‌خوار نواری برنج (*C. suppressalis*) تحت تأثیر غلظت‌های کنیدی قارچ *B.*



۷ *bassiana* میله‌ها نشان دهنده خطای استاندارد میانگین‌ها هستند.

۸ **Figure 4-Cumulative mortality of *C. suppressalis* as affected by conidial concentrations of *B.***
 ۹ ***bassiana*. Bars represent the standard error of the means.**

۱۰ در این پژوهش، بیشترین مقدار LC_{50} مربوط به لاروهای سن پنجم و ششم ساقه‌خوار به ترتیب برابر با
 ۱۱ $1/5 \times 10^6$ و $1/8 \times 10^6$ (کنیدیوم در میلی‌لیتر) به ترتیب با حدود اطمینان (95033.26-296624.72
 ۱۲ (151015.76-254347.06) محاسبه گردید. در مقابل در جدول ۲ کمترین مقدار LC_{50} مربوط به لاروهای سن
 ۱۳ اول و دوم این آفت بود که نشان دهنده حساسیت کمتر آن‌ها به قارچ *B. bassiana* می‌باشد به‌طوری‌که با
 ۱۴ افزایش غلظت کنیدی، میزان مرگ و میر لاروها به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین، اسپورزایی قارچ
 ۱۵ روی سنین مختلف لاروی با تراکم‌های مختلف متفاوت بود. درصد اسپورزایی با افزایش سن لاروی از لاروهای
 ۱۶ سن اول تا ششم در هر تراکم افزایش یافت (شکل ۵).



۲۴ 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، به طوری که با تراکم بیشتر کنیدی در میلی‌لیتر، در سریع‌ترین زمان، به مدت ۶/۹۶ روز بود. این موضوع با بررسی‌های بادی و همکاران (Budi et al., 2013) مطابقت دارد که هرچه حمله بیشتر باشد، لاروها سریع‌تر از عفونت می‌میرند. همچنین، هاسیبیوان و همکاران (Hasibuan et al., 2024) عنوان کردند که تفاوت‌های ایجاد شده 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 هاسیبیوان و همکاران (Budi et al., 2013) میزان بیماری‌زایی *B. bassiana* بر مرگ و میر لاروهای کرم ساقه‌خوار سفید برنج (*Scirpophaga innotata*) را در سه سطح تقسیم کرد: بالاترین سطح با درصد مرگ و میر بیش از ۶۴/۴۹ درصد با سریع‌ترین مرگ و میر در مدت ۱۱/۱۱ ساعت، بیماری‌زایی متوسط با مرگ و میر ۳۰/۹۹ تا ۴۹/۶۴ درصد در مدت ۱۷/۳۲ ساعت و کمتر از ۳۰/۹۹ درصد در مدت ۲۰/۲۹ ساعت که به عنوان بیماری‌زایی کم طبقه‌بندی نمودند. نتایج پژوهش عده‌ای از پژوهشگران نشان داد که بیشترین مرگ و میر مراحل لاروی *Spodoptera exigua* با قارچ *Metarhizium rileyi* در غلظت‌های 1×10^8 و 1×10^9 کنیدی در میلی‌لیتر تا ۱۰۰ درصد بود، در حالی که در غلظت‌های پایین‌تر، مرگ و میر کمتر و کندتری را در ۱۰ روز پس از تلقیح ایجاد شد (تا ۳۳/۸۸٪ تا در $10^5 \times 1$ کنیدی در میلی‌لیتر؛ ۴۱/۴۸٪ در $10^6 \times 1$ کنیدی در میلی‌لیتر و ۴۵/۱۹٪ در $10^7 \times 1$ کنیدی در میلی‌لیتر) (Montecalvo et al., 2022). طبق بیان آلفیان و همکاران (Alfian et al., 2022)، یکی از عوامل مهم در کاهش مرگ و میر، افت توانایی بیماری‌زایی ناشی از کشت‌هایی که بارها به محیط‌های کشت جدید منتقل شده‌اند، به طوری که مکانیسم بیماری‌زایی به طور بهینه روی محیط کشت عمل نکند. همچنین آن‌ها بیان کردند که تکثیر و کشت مداوم قارچ *B. bassiana* که از مرکز بذر و حفاظت از گیاهان^۱ کشور اندونزی از کرم ساقه‌خوار سفید برنج جدا شده از (*Scirpophaga innotata*) از طریق محیط کشت PDA می‌تواند جهش‌های تصادفی را ایجاد کند که در نتیجه توانایی بیماری‌زایی جدایه‌های *B. bassiana* را کاهش دهد. در این ارتباط کائور و همکاران (Kaur 2011) گزارش دادند که مقدار LC_{50} محاسبه‌شده در ۱۰ روز پس از تلقیح *S. litura* با $5/59 \times 10^5$ تا $5/95 \times 10^6$ کنیدی در میلی‌لیتر متغیر بود. به طوری 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 $1/44 \times 10^5$ تا $9/36 \times 10^8$ کنیدی در میلی‌لیتر برای لاروهای جوان تا مسن مشاهده شد (Montecalvo & Navasero, 2021). همان‌طور که توسط هاران و همکاران (Harun et al., 2022) بیان شده است، فرآیند آلودگی قارچی *B. bassiana* علیه لارو کرم برگ‌خوار *Spodoptera frugiperda* حداقل ۲ روز و حداکثر ۱۰ روز طول می‌کشد، به طوری که بعد از دو روز نخست لاروها تغییر رنگ داده و قرمز شده و ۱۰ روز بعد مرگ کامل ظاهر می‌شود.

- ۱ نتایج پژوهش جاور و همکاران (Javar et al., 2022) در زیست‌سنجی آزمایشگاهی اثر قارچ *B.*
- ۲ *bassiana* علیه سفیدبالک نشان داد که کلیه تیمارها بین ۸۰ تا ۸۵ درصد تلفات نشان دادند اما در زیست
- ۳ سنجی گلخانه‌ای، کنیدیوم تولید شده روی سبوس برنج، سبوس ذرت و سبوس گندم به ترتیب با $۱/۸ \pm ۵۶$ ،
- ۴ $۲/۵۶ \pm ۵۲$ و $۲/۹۱ \pm ۴۹$ درصد مرگ و میر بالاترین میزان تلفات را ایجاد کردند. براساس نتایج پژوهش آن‌ها
- ۵ سبوس برنج، سبوس ذرت و سبوس گندم به‌عنوان بسترهای مناسب برای این جدایه قارچی معرفی شدند. در
- ۶ این ارتباط نتایج پژوهش حاضر که با LC_{50} محاسبه شده در ۱۰ روز پس از تلقیح نشان داد که با افزایش تراکم
- ۷ کنیدی از $۷/۱ \times ۱۰^۵$ تا $۱/۸ \times ۱۰^۶$ کنیدی در میلی‌لیتر، مرگ و میر لاروها روند افزایشی داشته است و مرگ و
- ۸ میر ایجاد شده روی کرم ساقه‌خوار نواری برنج از $۵۶/۸$ تا $۷۰/۳۴$ درصد متغیر بود. این یافته با یافته‌های
- ۹ پژوهشگران مذکور مطابقت دارد. نتایج مطالعه یاداو و همکاران (Yadav et al., 2025) روی هشت محیط
- ۱۰ کشت جامد و مایع برای تولید انبوه قارچ *Beauveria bassiana* نشان دادند که تعداد کنیدی‌ها ۱۰ روز پس از
- ۱۱ تلقیح، ۲۰ روز پس از تلقیح و ۳۰ روز پس از تلقیح، برنج به ترتیب حداکثر تعداد کنیدی‌ها ($۶۳/۹۰ \times ۱۰^۷$) کنیدی
- ۱۲ در میلی‌لیتر)، ($۷۰/۷۹ \times ۱۰^۷$ کنیدی در میلی‌لیتر) و ($۷۷/۹۵ \times ۱۰^۷$ کنیدی در میلی‌لیتر) را نشان داد. همچنین آن‌ها
- ۱۳ اظهار داشتند که کمترین تعداد کنیدی به ترتیب در نخود کبوتری ($۳/۴۱ \times ۱۰^۷$ کنیدی در میلی‌لیتر)، ($۵/۴۰ \times ۱۰^۷$)
- ۱۴ اسپور در میلی‌لیتر) و ($۸/۰۸ \times ۱۰^۷$ کنیدی در میلی‌لیتر) مشاهده شد. نتایج به دست آمده از این پژوهش کمک
- ۱۵ شایانی به تسهیل تولید انبوه قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* در محیط‌های کشت جامد می‌توانند، در
- ۱۶ برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات به‌ویژه کرم ساقه‌خوار نواری برنج در شرایط مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گیرند.
- ۱۷ **سپاسگزاری**
- ۱۸ این پژوهش بخشی از نتایج پروژه تحقیقاتی به شماره ی مصوب ۹۱۱۰۷-۰۴-۰۴-۲ سازمان تحقیقات، آموزش
- ۱۹ و ترویج کشاورزی است که با حمایت مالی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و موسسه تحقیقات برنج
- ۲۰ کشور انجام شده است. به این جهت، نگارندگان از تمام همکارانی که ما را در اجرای پروژه یاری نمودند، کمال
- ۲۱ تشکر و قدردانی را دارند.

References

- ۲۲ 1. Abraham, T., Easwaramoorthy, S., & Santhalakshmi, G. (2003). Mass production
- ۲۳ of *Beauveria bassiana* isolated from sugarcane root borer, *Emmalocera depressella*.
- ۲۴ *Swinhoe. Sugar Technology*, 5(4), 225-229.
- ۲۵ 2. Alfian, R., Solichah, C., & Rizal, A. (2022). Uji kualitas dan patogenisitas jamur
- ۲۶ *Metarhizium anisopliae* dan *Beauveria bassiana* berbagai konsentrasi terhadap
- ۲۷ hama ulat krop (*Crocidolomia pavonana*) pada kubis. *Agrivet*, 28(2), 110-120.
- ۲۸ <https://doi.org/10.31315/agrivet.v28i2.8357>
- ۲۹ 3. Alves, S. B., & Pereira, R.M. (1989), Produção do *Metarhizium anisopliae*
- ۳۰ (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill em bandejas. *Ecossistema*, 4,
- ۳۱ 188-192.
- ۳۲ 4. Askari, H., Zamani, S. M., & Ashuri, A. (2008). Investigating the effect of several
- ۳۳ solid and liquid culture media on the sporulation of *Beauveria bassiana*
- ۳۴ (Hyphomycetes: Moniliales). *Iranian Journal of Plant Protection Science*. 39 (1),
- ۳۵ 31- 43. (In Persian with English abstract).
- ۳۶

5. Bana Moulai, 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 August 2008. University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran (Vol. 18, p. 58). 1
2
3
4
6. Bena Molai, 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 August 2008. University of Tehran, Iran (Vol. 19, p. 110). 5
6
7
8
9
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*). *Jurnal HPT (Hama Penyakit Tumbuhan)*, 1 (1), 57-65. 10
11
12
13
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. 14
15
16
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, pp593. 17
18
19
20
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. 21
22
23
11. Gopalakrishnan, C., & Mohan, S.C. (2000). A simple and cost effective Invitro method for the mass production of conidia of *Nomuraea rileyi*. *Insect Enviromental*, 6, 52-53. 24
25
26
12. Gopalakrishnan, C., Anusuya, D., & Narayanan, D. (1999). In vitro production of conidia of Entomopathogenic fungus *Pycilomyces farinosus*, *Entomology*, 24, 389-392. 27
28
29
13. Grace, J., & Jaronski, S. (2005). Solid substrate fermentation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. USDA. ARS. Northern Sidney, Montana. Workshop. 30
31
32
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. 33
34
35
15. Hasibuan, S., Simbolon, Z. & Candra, I. A. (2024). Pathogenicity Efficacy of Entomopathogen Fungus *Beauveria bassiana* Against in Vitro Rice Stem Borer (*Scirpophaga innotata*). *Jurnal Teknik Pertanian Lampung*, 13(2), 441–448. <http://dx.doi.org/10.23960/jtep-l.v13i2>. 36
37
38
39
16. Ibrahim, Y. B., & Low W. (1993). Potential of Mass Production and Field Efficacy of Isolates of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* on *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 39, 222-232. 40
41
42
43
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* 44
45
46

- Applied Research in Plant Protection*, 14 (3), 207–220, ۱
<https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2025.20280>. ۲
18. Kaur, S., H.P. Kaur, K. Kaur, & A. Kaur. (2011). Effect of different concentrations of *Beauveria bassiana* on development and reproductive potential of *Spodoptera litura* (Fabricius). *Journal of Biopest.* 4 (2), 161. ۳
 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. ۴
 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](https://doi.org/10.1016/0022-2011(70)90095-9) . ۵
 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. ۶
<https://doi.org/10.3390/fermentation10110587>. ۷
 22. Macleod, D. M. (1954). Investigations on the genera *Beauveria* Vull. And *Tritirachium* Limber. *Canadian Journal of Biotechnology*, 32, 818-890. ۸
<https://doi.org/10.1139/b54-070>. ۹
 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. <https://doi.org/10.22067/jpp.v27i3.26760>. (In Persian with English abstract). ۱۰
 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 with English abstract). ۱۱
 25. Majidi-Shilsar, F. (2017). Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium 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 ۱۲
 26. Majidi-Shilsar, F., Ershad, DJ. and 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. ۱۳
 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> . ۱۴
 28. Montecalvo, M. P., Macaraig J. S. T., Navasero, M. M. & Navasero M. V. 2022. Bicontrol efficacy of native *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. ۱۵
 29. Montecalvo, M.P. & M.M. Navasero. 2021. *Metarhizium* (Nomuraea) *rileyi* (Farlow) Samson from *Spodoptera exigua* (Hübner) cross infects fall armyworm, ۱۶

- Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Philipp. *Journal of Science*, 150 (1), 193-199. 1
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 August 2010. University of Tehran, Iran. (Vol. 19, p. 76). 2
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. 3
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. 4
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](https://doi.org/10.1016/0022-2011(66)90056-5). 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. DOI: 10.1016/0022-2011(81)90119-1. 6
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. DOI:10.1590/S1516-89132005000400007. 7
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. 8
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. 9
38. Stephan D., & Zimmermann, G. (1997). Mass production of *Metarhizium flavoviride* in submerged culture using waste products. P. 227- 229, In: S. Krall, R. Peveling, D. Ba Diallo (eds), *New Strategies in Locust Control*. Birkhauser Verlag, Basel. 10
39. Suzuki, A., Kanaoka, M., Murakoshi, A., ichnoe, M., & Tamura, S. (1977). Bassianolide a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tetrahedron Letters*, 25, 2170-2187. 11
40. Thomas, K. C., Khachatorians, G. G., & Ingledew, W. M. (1978). Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultured in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 33, 12-20. DOI: 10.1139/m87-003. 12
41. Tincilly, A., Easwaramoorthy, 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. 13
42. Yadav, H., Singh, R., Yadav, S. S., Singh, A., Dixit, A., & Vikrant. (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. <https://www.doi.org/10.33545/26174693.2025.v9.i8Sp.5323> . 14