جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۱، سال ۱۳۸۴ (۱۱۹-۱۰۹)

بررسی اثر عوامل عمده اکولوژیک در تولید بلاستوسپور قارچ *Verticillium lecanii* DAOM 198499 در محیط‌مایع

محمد جعفر فارسی[۱]، حسن عسکری[۲]، خلیل طالبی‌جهرمی[۳] و عزیز خرازی پاکدل[٤]
۱، ۳، ٤، دانشجوی دوره دکتری و دانشیاران، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
۲، استادیار پژوهش موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۲/۹

خلاصه

شناسایی شرایط بهینه محیطی برای رشد و اسپورزائی عوامل کنترل‌کننده بیولوژیک در تولید انبوه آنها ضروری است. از آنجائیکه پاسخ این عوامل بیولوژیک نه تنها در سطح گونه، بلکه در حد جدایه نسبت به عوامل محیطی متفاوت می‌باشد، در این بررسی تاثیر کیفیت محیط غذایی، نور، درجه حرارت، و pH محیط در رشد و اسپورزائی قارچ *V. lecanii* DAOM 198499 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کیفیت محیط غذایی در تولید بلاستوسپور در سطح یک درصد معنی‌دار بود. عصاره سیب‌زمینی غنی‌شده با دکستروز، پپتون و مخمر بهتر از محیط عصاره سیب‌زمینی بود. در حالیکه اثر نور معنی‌دار نبود. دمای بالای ۳۰ درجه سانتیگراد تولید بلاستوسپور را محدود ساخته ولی دماهای ۱۲، ۱۷ ، ۲۲ و ۲۷ درجه سانتیگراد با همدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند (α =۰ /۰۱). تولید بلاستوسپور در طول چهار روز پس از کشت با شدت افزایش یافته و به میزان $۱۰^{۸}$ ×٤/۷ بلاستوسپور در میلی‌لیتر رسید. از آن پس این روند افزایش کند شده و پس از ۱۰ روز به $۹/۰٦\times۱۰^{۸}$ رسید. بطوریکه مقایسه آماری تولید بلاستوسپور در روز های چهارم تا دهم با همدیگر اختلاف معنی‌دار نشان نداد. اثر pH محیط مایع در تولید بلاستوسپور معنی‌دار نبود. در طول دوره رشدی قارچ pH محیط را تغییر داده و به حد مطلوب٤-٦ رساند. تولید بلاستوسپور در مواد غذایی جایگزین مورد آزمایش با همدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند (α = ۰/۰۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ملاس چغندرقند با $۱/۰۲\times۱۰^{۸}$ کنیدی در میلی‌لیتر بیشترین وعصاره شلتوک با $۱/٦\times۱۰^{۷}$ کمترین تولید را داشت. عصاره سیب‌زمینی با $٦/۸\times۱۰^{۷}$ در حد وسط قرار داشت.

واژه‌های کلیدی: *V. lecanii* DAOM 198499، تولید بلاستوسپور، کیفیت محیط غذایی، محیط‌مایع، نور، درجه‌حرارت، pH .

مقدمه

بروز مقاومت نسبت به حشره‌کشهای شیمیایی و آثار زیانبار این ترکیبات در محیط زیست و بهداشت انسانی انگیزه ای بسیار قوی برای تولید عوامل کنترل میکروبی و استفاده از آنها در مدیریت آفات ایجاد کرده‌است. در بین قارچ ها کوشش قابل ملاحظه‌ای روی تولید و بهره‌برداری از قارچهای پاتوژن هیفومیست متمرکز شده است(۱۴).

Verticillium lecanii یکی از قارچهای هیفومیست متشکل از گونه‌های ناهمگون است که در همه جا گسترده است (۹). این قارچ در ابتدا به عنوان پاتوژن جوربالان، عمدتا شته‌ها و شپشکهای نباتی شناخته شده بود (۱۲)، این قارچ از راسته‌های دیگر حشرات، عنکبوتیان و کنه ها نیز جدا شده است(۵، ۶، ۱۰،

مکاتبه کننده: محمدجعفر فارسی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۲۴). *V. lecanii* همچنین یک پارازیت برای زنگها (۲، ۲۶)، و قارچهای بیماریزای گیاهی دیگر مثل سفیدک‌های سطحی (۱۱، ۲۳) نیز می‌باشد. بعلاوه هال (۱۹۸۱) ایزوله‌های این قارچ را از قارچهای بیمارگر گیاهی که قادر به آلوده کردن شته *Macrosiphoniella sanbornii* نیز می‌باشند، جدا نمود. علیرغم گستردگی این قارچ در مناطق مختلف اطلاعات دقیق از تخصص میزبانی آن وجود ندارد (۴). گستردگی و ناهمگونی گونه‌های این جنس باعث گردید تا طبقه‌بندی گونه‌های آن مورد تجدید نظر قرار گیرد(۲۹).

فرآورده‌های تولیدشده از جدایه‌های مختلف این قارچ تاکنون دارای اثر انتخابی روی گروهی خاص هستند. به عنوان مثال ورتالک روی شته‌ها و میکوتال روی سفیدبالک‌ها (آلرودها) و تریپس‌ها به صورت اختصاصی موثر می‌باشند. اختصاصی بودن این فرآورده‌ها و نیاز به مصرف چند بار این ترکیبات برای دستیابی به کنترل موثر و در نتیجه افزایش هزینه باعث شده‌است که چندان مورد استقبال قرار نگیرند (۲۸). قارچ *Verticillium lecanii* روی محیط‌های غذایی جامد، مایع و سیستم دوفازی (مایع و جامد) قابل تولید است. این قارچ در محیط مایع تولید بلاستوسپور می‌کند، که دیواره آن شبیه میسلیوم، بدون رنگدانه و هیدروفیل است. بلاستوسپور در مقایسه با کنیدی نسبت به عوامل نامساعد محیطی حساستر است. با این وجود بلاستوسپورها قابلیت استفاده در کنترل بیولوژیک را دارند، چون در کنترل آفات هدف موثر بوده و امکان تولید آنها در فرمانتورهای بزرگ نیز وجود دارد. تولید در محیط مایع برای تکثیر انبوه قارچهای بیمارگر می‌تواند با موفقیت مورد استفاده قرارگیرد. اما روش کشت، پارامترهای فیزیکی و احتیاجات غذایی نه تنها برای هر جنس یا گونه، بلکه برای هر جدایه بایستی مورد بررسی قرارگیرد. چون عکس‌العمل آنها نسبت به این عوامل متفاوت می‌باشد (۱۵).

جدایه‌های متعددی از قارچ *Verticillium lecanii* شناخته شده است. جدایه DAOM 198499 که اخیرا توسط عسکری و همکاران (۱۹۹۸) شناسایی شده‌است می‌تواند همزمان شته‌ها و سفیدک‌های سطحی را کنترل نماید. به عبارت دیگر با استفاده از این جدایه می‌توان به طور همزمان با یک بار عملیات کنترل دو آفت را مورد هدف قرار داد. این امر مورد توجه اکولوژیست‌ها قرارگرفته است، زیرا به کمک این قارچ میتوان به تولیدات کشاورزی بدون سموم شیمیایی دسترسی پیدا کرد (۷). ضمن اینکه رشد این جدایه در دمای بالای ۳۰ درجه سانتیگراد کند شده و در ۳۷ درجه متوقف می‌شود و خطری برای انسان ندارد. با توجه به اینکه در گلخانه‌ها، شته‌ها، سفیدبالک‌ها (آلرودها) و سفیدک‌های سطحی از جمله آفات و بیماری‌های اصلی هستند و محصولات گلخانه‌ای هم بیشتر به صورت خام و سبز مصرف می‌شود، استفاده از این جدایه می‌تواند حائز اهمیت بسیار باشد. این مقاله اثر عوامل محیطی و غذایی را در تولید بلاستوسپور جدایه DAOM 198499 قارچ *Verticillium lecanii* در محیط مایع مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

قارچ

جدایه DAOM 198499 شناسایی شده توسط عسکری و همکاران از دانشگاه لاوال کانادا دریافت و روی محیط غذایی PDA به مدت ۱۴ روز پرورش داده شد. برای تلقیح محیط‌های غذایی مایع مورد آزمایش دایره‌ای به قطر ۵ میلی‌متر از قارچ برداشت و مورد استفاده قرارگرفت.

بررسی تاثیر کیفیت محیط غذایی و نور

در این آزمایش ۲ نوع محیط غذایی و ۲ تیمار نوری در سه تکرار در قالب آزمایش فاکتوریل در طرح پایه کاملا تصادفی مورد بررسی قرارگرفت. عصاره سیب‌زمینی به عنوان محیط معمولی و عصاره سیب‌زمینی همراه با دکستروز (۱۰ گرم در لیتر)، پپتون (۵ گرم در لیتر) و مخمر (۳ گرم در لیتر) به عنوان محیط غنی‌شده در نظرگرفته شد. تیمارهای نوری شامل شرایط نوری آزمایشگاه (۱۵۰۰ لوکس و ۱۶: ۸ساعت دوره نوری) و تاریکی بود. واحد آزمایشی، ارلن ۲۵۰ سانتیمتر مکعبی بود که در داخل هر کدام ۱۵۰ میلی لیتر محیط غذایی ریخته شده بود. pH اولیه محیط مورد استفاده ۵/۴ بود. پس از اتوکلاو کردن و سرد شدن محیط داخل هر ارلن، دایره‌ای به قطر ۵ میلی‌متر قارچ پرورش یافته روی محیط غذایی PDA ریخته و روی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دستگاه تکان دهنده[1] رفت و برگشتی با ۸۰ دور در دقیقه در دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از ۵ روز میزان بلاستوسپور و pH محیط و وزن‌خشک قارچ تولیدی اندازه‌گیری شد.

بررسی تاثیر درجه حرارت

در این آزمایش ۵ تیمار حرارتی (۱۲، ۱۷، ۲۲، ۲۷، ۳۲ درجه سانتیگراد) در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرارگرفت. ۳ لیتر عصاره سیب‌زمینی تهیه و به آن ۳۰ گرم دکستروز اضافه نموده و به ۶ قسمت ۰/۵ لیتری تقسیم و اتوکلاو گردید. هر قسمت برای یک تیمار آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. میزان قارچ ریخته‌شده در هر ارلن و شیکر مشابه آزمایش قبل و شدت نور ۱۵۰۰ لوکس با ۱۶ : ۸ ساعت دوره نوری بود. پس از ۵ روز میزان بلاستوسپور تولیدشده و pH نهایی اندازه‌گیری و ثبت گردید.

بررسی بهترین زمان برداشت بلاستوسپور

دراین آزمایش محیط PD را طبق استاندارد (عصاره ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی در یک لیتر آب مقطر+ ۱۰گرم دکستروز) تهیه و به میزان ۵۰۰ سانتیمتر مکعب در داخل هر ارلن یک لیتری شیاردار ریخته و اتوکلاو شد. پس از سرد شدن داخل هر ارلن دایره‌ای به قطر ۵ میلیمتر قارچ رشد یافته روی محیط PDA ریخته و روی دستگاه تکان دهنده دوار با ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. شرایط نوری مشابه آزمایش قبل بود. به صورت روزانه ۱ میلی‌لیتر از محیط را برداشته و میزان بلاستوسپور شمارش گردید. شمارش بلاستوسپور تا روز دهم ادامه‌یافت. این آزمایش در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گردید.

بررسی تاثیر pH اولیه محیط در تولید بلاستوسپور

تاثیر pH اولیه در تولید بلاستوسپور به دو روش بررسی گردید. در آزمایش اول ۵ تیمار pH (۴، ۵، ۶، ۷، ۸) در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرارگرفت. محیطPD طبق استاندارد تهیه و به کمک محلول نرمال اسید کلریدریک و سود سوزآور به pH مورد نظر رسانده شد. از هر تیمار سه تکرار (۱۵۰ سانتیمترمکعب داخل هر ارلن) ریخته و اتوکلاو شد. پس از سردشدن داخل هر ارلن دایره‌ای به قطر ۵ میلی‌متر قارچ رشد یافته روی محیط PDA انداخته و روی دستگاه تکان دهنده دوار با ۱۰۰ دور دقیقه در دمای۲ ± ۲۴ درجه سانتیگراد و نور ۱۵۰۰ لوکس و ۱۶ : ۸ ساعت دوره نوری قرار داده‌شد. در روزهای دوم، سوم و چهارم آزمایش pH محیط‌ها اندازه‌گیری و مجددا به pH قبلی رسانده شد. پس از ۵ روز pH نهایی اندازه‌گیری و تعداد بلاستوسپور تولید شده شمارش گردید. آزمایش دوم با استفاده از بافر فسفات - ستیرات[2] انجام شد. این آزمایش شامل ۵ تیمار pH همراه با شاهد (محیط PD بدون بافر) بود که در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام‌گردید. ۳ لیتر عصاره PD طبق استاندارد تهیه و به ۶ قسمت ۰/۵ لیتری تقسیم گردید. pH آنها اندازه‌گیری شد که برابر ۶/۱۵ بود. یک قسمت را به عنوان شاهد نگه داشته و مابقی را به کمک بافر فوق‌الذکر تهیه شده براساس آنه‌جا (۲۰۰۱)، به pH مورد نظر (۴/۷، ۵/۷، ۶/۴، ۷ و ۷/۸) رسانده شد. روش کار و شرایط محیطی آزمایشگاه مشابه آزمایش اول بود. با این تفاوت که در طول آزمایش pH محیط اندازه‌گیری و تنظیم مجدد نگردید. پس از ۵ روز pH نهایی محیط اندازه‌گیری و تعداد بلاستوسپور تولید شده شمارش گردید.

ارزیابی محیط‌های غذایی جایگزین

در این آزمایش انواع محیط‌های غذایی با منشا گیاهی و ارزان قیمت به عنوان جایگزین ترکیبات آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. مواد غذایی جایگزین شامل شلتوک برنج، گندم، ارزن، سیب‌زمینی و ملاس ۵٪ چغندر قند در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرارگرفت. برای تهیه عصاره، ۲۰۰ گرم از ۴ ماده جامد فوق‌الذکر را جداگانه در آب مقطر پخته و عصاره حاصل را صاف نموده و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد. یک لیتر ملاس چغندرقند ۵ درصد نیز با رقیق کردن ملاس دریافت شده از کارخانه با آب مقطر تهیه‌شد. هر تیمار شامل ۱۵۰ سانتیمتر مکعب از هر ماده غذایی

1. Shaker

2 .Phosphate-citrate buffer

بود که در داخل ارلن شیاردار ریخته شده و اتوکلاو گردید. پس از سرد شدن محیط‌های غذایی همانند آزمایشهای قبلی با دایره‌ای به قطر ۵ میلیمتر قارچ رشد یافته در محیط PDA تلقیح و روی دستگاه تکان دهنده دوار با ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از ۵ روز میزان بلاستوسپور تولید شده شمارش‌گردید

وسائل اندازه‌گیری و آنالیز آماری

اندازه‌گیری pH با pH متردیجیتالی[1] و شمارش بلاستوسپور با برداشتن چند میلی لیتر از سوسپانسیون با پیپت استریل وصاف کردن و رقیق کردن آن در حد مورد لزوم با استفاده از لام گلبول شمار[2] انجام گردید. تجزیه واریانس آزمایشهای مختلف با نرم‌افزار رایانه‌أی SAS در قالب طرح‌های مورد آزمایش و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن و رسم نمودارها با استفاده از برنامه Excel انجام‌گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک قارچ تولیدی محتویات هر ارلن از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس کاغذ صافی و قارچ باقیمانده روی آن در آون ۶۰ درجه سانتیگراد خشک گردید. عمل خشک‌کردن تا زمانی ادامه یافت که دیگر کاهش وزن مشاهده نشد. تفاوت وزن کاغذ صافی و قارچ خشک شده با وزن اولیه کاغذ صافی به عنوان وزن خشک قارچ تولیدی ثبت گردید.

نتایج

بررسی تاثیر کیفیت محیط غذایی و نور

جدایه DAOM 198499 قارچ *Verticillium lecanii* در محیط غنی‌شده (عصاره سیب زمینی به همراه دکستروز، پپتون و مخمر) نسبت به محیط معمولی (عصاره سیب زمینی) تولید بلاستوسپور بیشتری نمود (جدول ۱). میانگین تولید بلاستوسپور در محیط غنی شده و معمولی به ترتیب $۵/۲۶\times۱۰^{۸}$ و $۱/۹\times۱۰^{۸}$ بود که از نظر آماری با همدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند (α=۰/۰۱). میزان وزن خشک قارچ نیز در ۲ محیط فوق متفاوت بود (جدول ۲). اثر نور در تولید بلاستوسپور معنی‌دار نبود. میانگین تولید بلاستوسپور در نور و تاریکی به ترتیب $۳/۶\times۱۰^{۸}$ و $۳/۵\times۱۰^{۸}$ بود، که در مقایسه میانگین‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. بین وزن خشک قارچ تولیدی و لگاریتم میزان بلاستوسپور تولیدشده در میلی‌لیتر همبستگی مثبت معنی‌دار وجود داشت (r=۰/۹۳). اثر نور و محیط غذایی در pH نهایی محیط غذایی به ترتیب در سطح ۵٪ و۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۳). تغییرpH و اسیدی‌شدن آن در شرایط نور ۱۵۰۰ لوکس و عصاره سیب‌زمینی غنی‌شده بیشتر از تاریکی و عصاره سیب‌زمینی بود.

جدول ۱- تجزیه واریانس لگاریتم تعداد بلاستوسپور در آزمایش بررسی اثر کیفیت محیط غذایی و نور در قالب آزمایش فاکتوریل در طرح کاملا"تصادفی با سه تکرار

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
لگاریتم‌بلاستوسپور	۳	۰/۶۲۴	۰/۲۰۸	۷/۹۱	۰/۰۰۸۹**
نور	۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۱۳	۰/۷۳۱۰
محیط غذایی	۱	۰/۵۹۸	۰/۵۹۸	۲۲/۷۶	۰/۰۰۱۴**
نور× محیط غذایی	۱	۰/۰۲۲	۰/۰۲۲	۰/۸۶	۰/۳۸۱۷
خطا	۸	۰/۲۱۰	۰/۰۲۶		
کل	۱۱	۰/۸۳۴			

** اختلاف معنی دار در سطح ۱ در صد C.V.=۱/۹۱

جدول ۲- تجزیه واریانس وزن خشک قارچ در آزمایش بررسی اثر کیفیت محیط غذایی و نور در قالب آزمایش فاکتوریل در طرح کاملا تصادفی با سه تکرار.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
تیمار(وزن خشک)	۳	۱/۲۲	۰/۴۰۹	۱۴/۳۲	۰/۰۰۱۴**
نور	۱	۰/۰۰۷	۰/۰۰۷	۰/۲۴	۰/۶۳۴۰
محیط غذایی	۱	۱/۲۲۲	۱/۲۲۲	۴۲/۷۰	۰/۰۰۰۲**
نور× محیط غذایی	۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۲	۰/۰۱	۰/۹۳۴۱
خطا	۸	۰/۲۲۹	۰/۰۲۸		
کل	۱۱	۱/۴۵۸			

**= اختلاف معنی دار در سطح ۱ در صد C.V.=۱۵/۳۴

1. Jenco Electronics LTD Microcomputer pH-Vision 6071
2. Neubauer improved haemocytometer

جدول۳- تجزیه واریانس pH نهایی محیط غذایی در آزمایش بررسی اثر کیفیت محیط غذایی و نور در قالب آزمایش فاکتوریل در طرح کاملا"تصادفی با سه تکرار.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
تیمار (pH):	۳	۱۹/۷۹	۶/۵۹	۲۰/۹۱	۰/۰۰۰۴**
نور	۱	۲/۵۳	۲/۵۳	۸/۰۴	۰/۰۲۱۹*
محیط غذایی	۱	۱۳/۸۲	۱۳/۸۲	۴۳/۸۰	۰/۰۰۰۲**
نور× محیط غذایی	۱	۳/۴۳	۳/۴۳	۱۰/۸۸	۰/۰۱۰۹**
خطا	۸	۲/۵۲	۰/۳۱		
کل	۱۱	۲۲/۳۲			

*= اختلاف معنی دار در سطح ۵ در صد C.V.=۱۱/۰۴

**= اختلاف معنی دار در سطح ۱ در صد

بررسی تاثیر دمای محیط

نتایج تجزیه واریانس لگاریتم تعداد بلاستوسپور تولید شده نشان دادکه بین تیمارهای دما از نظرتولید بلاستوسپوردر سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۴). دمای ۱۷ درجه سانتیگراد با میانگین $۳/۰۶\times۱۰^{۸}$ بیشترین و۳۲ درجه سانتیگراد با میانگین $۶/۶\times۱۰^{۴}$ کمترین میزان تولید بلاستوسپور در هر میلی‌لیتر را داشتند. در مقایسه میانگین‌ها در مقیاس لگاریتمی براساس دانکن درجه حرارت‌های ۱۲، ۱۷، ۲۲ و ۲۷ همگی در سطح A و تیمار ۳۲ درجه سانتیگراد در سطح B قرارگرفت.

بررسی بهترین زمان برداشت بلاستوسپور

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین تولید بلاستوسپور در روزهای مختلف در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۵). شدت افزایش بلاستوسپور در محیط در روزهای اول تا سوم زیاد بود. بطوریکه پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب $۵/۵۳\times۱۰^{۵}$ و $۱/۳۳\times۱۰^{۶}$ و $۲/۳۸\times۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر شمارش‌گردید. در روزهای بعد این روند کند گردید. پس از ۱۰ روز این رقم به $۹/۵۳\times۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر رسید (نمودار ۱). مقایسه میانگین‌ها در مقیاس لگاریتمی نشان داد که میانگین روزهای چهارم تا دهم همگی در سطح A و میانگین روزهای سوم، دوم و اول به ترتیب در سطوح B، C و D قرارداشتند.

جدول۴- تجزیه واریانس لگاریتم بلاستوسپوردر آزمایش اثر درجه حرارت در تولید بلاستوسپور در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار.

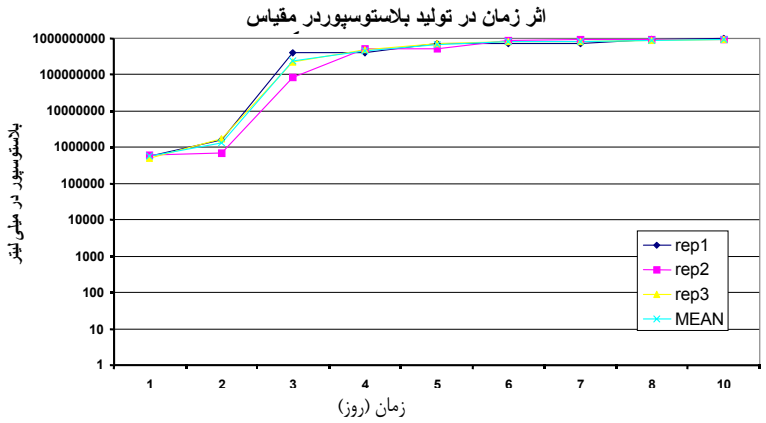
منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
لگاریتم بلاستوسپور	۴	۳۰/۷۲	۷/۶۸	۴۷۶/۵۴	۰/۰۰۰۱**
خطا	۱۰	۰/۱۶۱	۰/۰۱۶		
کل	۱۴	۳۰/۸۸			

**= اختلاف معنی دار در سطح ۱ در صد C.V.=۱/۶۵

جدول۵- تجزیه واریانس اثر زمان در لگاریتم بلاستوسپور درآزمایش بررسی بهترین زمان برداشت در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
زمان (روز)	۸	۳۹/۸۰	۴/۹۷	۲۳۸/۰۷	۰/۰۰۰۱**
خطا	۱۸	۰/۳۷۶	۰/۰۲		
کل	۲۶	۴۰/۱۸			

**= اختلاف معنی دار در سطح ۱ در صد C.V.=۱/۷۷



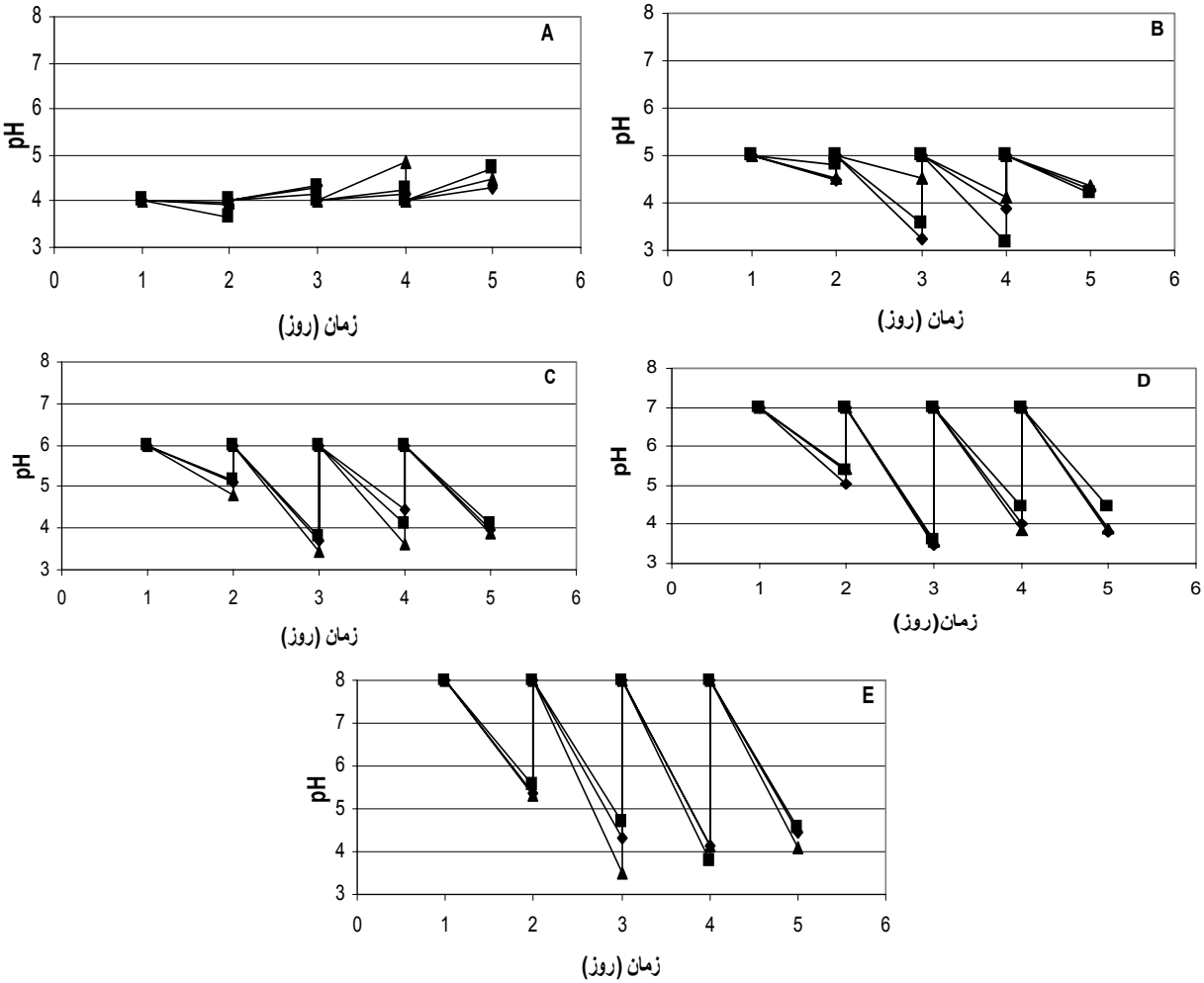
نمودار ۱- اثر زمان در تولید بلاستوسپور قارچ *Verticillium lecanii* در محیط مایع (PD) در طول ۱۰ روز

بررسی تاثیر pH اولیه محیط غذایی در تولید بلاستوسپور

نتایج تجزیه واریانس آزمایش نخست نشان داد که تعداد بلاستوسپور تولید شده در تیمار های مورد آزمایش در سطح ۵ درصد متفاوت بود (جدول۶). pH مساوی ۴ با میانگین $۵/۷\times۱۰^{۸}$ بیشترین (سطح A) و pH مساوی ۸ با میانگین $۲/۴۲\times۱۰^{۸}$ کمترین تولید (سطح B) را داشتند. سایر تیمار ها در سطح AB قرار داشتند. اندازه گیری pH در طول دوره و انتهای آزمایش نشان داد که فعالیت قارچ باعث تغییر pH محیط و اسیدی‌شدن آن گردید (نمودار ۲). نتایج آزمایش دوم که با استفاده از بافر همراه بود اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مورد آزمایش نشان نداد. pH اولیه ۴/۷ که در پایان آزمایش به حدود ۵ رسیده بود با میانگین $۱/۶۸\times۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر بیشترین تولید را داشت. pH نهایی محیط‌ها در محدوده ۵-۶/۸ بود.

ارزیابی محیط‌های غذایی جایگزین

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارهای مورد آزمایش در سطح یک در صد اختلاف معنی دار وجود داشت (جدول ۷). ملاس چغندر قند با میانگین $۱/۰۲\times۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی لیتر بیشترین تولید و عصاره شلتوک برنج با $۱/۶۳\times۱۰^{۷}$ کمترین میزان تولید را داشت. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که عصاره گندم با میانگین $۹/۵۳\times۱۰^{۷}$ همراه با ملاس چغندر قند در سطحA وعصاره ارزن با میانگین $۲/۳۷\times۱۰^{۷}$ همراه با شلتوک در سطح B و عصاره سیب زمینی با میانگین $۶/۸۶\times۱۰^{۷}$ در سطح AB قرارداشت.



نمودار ۲- تغییرات pH محیط مایع در طول آزمایش بررسی اثر pH در تولید بلاستوسپور قارچ *Verticillium lecanii* DAOM 198499 با سه تکرار در مدت پنج روز (pH محیط ها به صورت روزانه اندازه گیری و با کمک محلول نرمال اسید کلریدریک و سود سوزآور به pH اولیه رسانده شده است).

A= pH 4 B= pH 5 C= pH 6 D= pH 7 E= pH 8

جدول۶- تجزیه واریانس لگاریتم بلاستوسپورتولیدشده در آزمایش اثر pH محیط غذایی (بدون استفاده از بافر) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
لگاریتم بلاستوسپور	۴	۰/۱۹۴	۰/۰۴۸	۳/۴۹	۰/۰۴۹۷*
خطا	۱۰	۰/۱۳۹	۰/۰۱۳		
کل	۱۴	۰/۳۳۳			

*= اختلاف معنی دار در سطح ۵ در صد C.V.=۱/۳۸

جدول۷- آنالیز واریانس اثر محیط‌های غذایی جایگزین در لگاریتم تعداد بلاستوسپور در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
محیط غذایی	۴	۲/۵۴	۰/۶۳	۳/۸۸	۰/۰۳۷۴*
خطا	۱۰	۱/۶۴	۰/۱۶۴		
کل	۱۴	۴/۱۸			

*= اختلاف معنی دار در سطح ۵ در صد C.V.=۵/۳۳

بحث

تجزیه واریانس میزان بلاستوسپور و وزن‌خشک قارچ تولیدی نشان داد که جدایه DAOM198499 قارچ *Verticillium lecanii* در محیط غنی‌شده نسبت به محیط معمولی بهتر رشد کرده و تولید بلاستوسپور بیشتری می‌نماید. اثر کیفیت محیط غذایی در هر دو مورد در سطح یک درصد معنی‌دار بود، در حالیکه اثر نور معنی‌دار نبود (جدول۱و۲). این موضوع از جدول میانگین سطوح عوامل مورد مطالعه نیز بخوبی قابل درک است (جدول ۸ و ۹). به همین دلیل تکثیر اسپور قارچ پس از نفوذ در داخل بدن حشره و اشغال اندام‌های داخلی آن قابل توجیه است. این امر با یافته‌های محققین هماهنگی داشته، بطوریکه در بسیاری از موارد تولید قارچ برای انجام آزمایشات در کنترل بیولوژیک در شرایط تاریکی توصیه شده‌است (۲۱، ۲۷)، که از نظر اقتصادی هم مقرون به صرفه می‌باشد. نتایج حاصل در مورد کیفیت محیط غذایی با یافته‌های بابای اهری (۱۳۷۸) در مورد جدایه ورتالک در محیط جامد نیز مطابقت دارد.

بابای اهری (۱۳۷۸) دمای ۲۱ تا ۲۵ درجه سانتیگراد را برای رشد و اسپورزایی جدایه ورتالک در محیط جامد ذکر کرده است. لی و همکاران (۱۹۹۱) دمای اپتیمم برای رشد را ۲۸-۲۳ درجه و برای اسپورزایی، ۲۵-۲۳ درجه گزارش کرده‌اند. ورهار و هیجوگن (۱۹۹۳)، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد را برای تولید در محیط مایع مطرح کرده‌اند. لوپز و کاربونل (۱۹۹۹)، نیز دمای ۲۵درجه سانتیگراد را بهترین دما برای رشد سویه‌های اسپانیایی ذکرکرده و متذکر شده‌اند که در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد هیچکدام ازجدایه‌ها رشد نکرده و در دمای زیر ۱۰درجه سانتیگراد نیز رشد کند گردیده است.

جدول ۸ - میانگین سطوح عوامل مورد مطالعه در میزان تولید بلاستوسپور در میلی‌لیتر در مدت ۵ روز.

تعداد بلاستوسپور	تعداد مشاهدات	محیط کشت	تعداد بلاستوسپور	تعداد مشاهدات	شرایط نوری
$۵/۲۶\times۱۰^{۸}$ a	۶	PDPY[1]	$۳/۶\times۱۰^{۸}$ a	۶	نور(۱۵۰۰ لوکس)
$۱/۹\times۱۰^{۸}$ b	۶	P[2]	$۳/۵\times۱۰^{۸}$ a	۶	تاریکی

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح یک درصد می‌باشد. 1=Potato Dextrose Peptone Yeast 2=Potato.

جدول ۹- میانگین سطوح عوامل مورد مطالعه در میزان وزن خشک قارچ تولیدی در مدت ۵ روز.

وزن خشک (گرم)	تعداد مشاهدات	محیط کشت	وزن خشک (گرم)	تعداد مشاهدات	شرایط نوری
۱/۴۲ a	۶	PDPY[1]	۱/۰۷ a	۶	نور(۱۵۰۰ لوکس)
۰/۷۸ b	۶	P[2]	۱/۱۲ a	۶	تاریکی

حروف غیر مشابه نشاندهنده وجود اختلاف در سطح یک درصد می‌باشد. 1=Potato Dextrose Peptone Yeast 2=Potato.

نتایج ما نشان داد که طیف دمایی برای تولید بلاستوسپور این جدایه وسیع بود بطوریکه تولید بلاستوسپور در دمای ۱۲ - ۲۷ درجه سانتیگراد با همدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند، هرچند که بیشترین تولید در ۱۷ درجه بود و در۳۲ درجه تولید بلاستوسپور محدودگردید. با توجه به این نتایج امکان تولید این سویه در دمای معمولی محیط امکان‌پذیر بوده و نیاز به هزینه اضافی برای تامین درجه حرارت مطلوب نمی‌باشد.

تولید بلاستوسپور در محیط مایع در روزهای اول سریع بود بطوریکه در روز چهارم به میزان مطلوب ($۱۰^{۸}$ بلاستوسپور در میلی‌لیتر) رسید. از آن پس این روند کند شده و بین میزان

تولید روز چهارم و روز دهم اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید. این امر از نظر صرفه‌جویی در زمان و دسترسی سریعتر به قارچ و برنامه‌ریزی برای تولید انبوه حائز اهمیت بسیار است(۲۸). ضمنا اسپور جوان سریعتر جوانه زده و لوله تندشی آن نیز بلندتر از اسپور مسن بوده (۱۳) که از جنبه بیمارگری با اهمیت می‌باشد.

فعالیت قارچ در محیط غذایی مایع باعث تغییر pH اولیه محیط گردید و این تغییرعمدتا در جهت اسیدی‌شدن محیط بود که احتمالا به دلیل تولید اسید و متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (۲۲، ۲۵). تعیین نوع و مقدار متابولیت‌ها نیاز به بررسی‌های دقیق‌تر دارد. علیرغم مصرف بافر نیز این تغییرات، در حد کمتری مشاهده شد. pH نهایی محیط‌ها در حد ۶/۸-۵/۵ بود، اما در تولید بلاستوسپور در این رابطه اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید. خلیل و همکاران (۱۹۸۳) و (۱۹۸۵) دامنه pH بین ۷-۵ را برای رشد و اسپورزایی متذکر شده‌اند. لوپز و کاربونل (۱۹۹۹) نیز pH نزدیک به ۷ را بهتر گزارش‌کرده‌اند که با یافته‌های ما هماهنگی دارد.

تولید بلاستوسپور در محیط‌های غذایی جایگزین نشان داد که تولید در ملاس ۵٪ چغندر قند و عصاره گندم بهتر از برنج و ارزن بود. عصاره سیب‌زمینی از این نظر در حد متوسط قرار داشت. از نتایج حاصل می‌توان دریافت که منابع جایگزین و ارزان قیمت توانایی تولید این جدایه را دارند و می‌توان از آنها برای تولید عوامل بیولوژیک مفید استفاده نمود، که هم باعث کاهش هزینه تولید و هم استفاده از ضایعات و محصولات جانبی بخش کشاورزی می‌گردد.

قارچ *Verticillium lecanii* روی انواع منابع غذایی به صورت ساپروفیت رشد می‌کند، اما نوع محیط کشت در رشد و میزان اسپور تولیدی و توانایی تندش و قدرت بیمارگری آنها مؤثر می‌باشد (۲۸). کشت قارچ در محیط مایع ارزان بوده و با توجه به نوع جدایه از 10^{9}تا 10^{11} بلاستوسپور در هر گرم محیط کشت تولید می‌شود (۸، ۱۲، ۱۵). آینده تولید قارچ در محیط جامد یا مایع هنوز کاملا روشن نمی‌باشد (۸). مزایای تولید در محیط جامد تولید کنیدی با امکان نگهداری طولانی‌مدت می‌باشد. اما مزایای تولید در محیط مایع آسان‌بودن تولید در مقیاس وسیع، رشد سریع قارچ و امکان دستکاری آسانتر در محیط غذایی می‌باشد که زمینه افزایش تولید و بهبود کیفیت بلاستوسپوررا فراهم می‌سازد (۸).

در مجموع یافته‌های ما نشان می‌دهد که جدایه DOMA198499 قارچ *Verticillium lecanii* روی منابع ارزان قیمت و در شرایط معمولی آزمایشگاهی، تولید بلاستوسپور مناسب می‌نماید. با توجه به منحصر به فرد بودن این جدایه از جهت تاثیر روی حشرات از راسته‌های مختلف (جوربالان و لارو پروانه‌ها) و سفیدک‌های سطحی و تاثیر همزمان روی شته و سفیدک سطحی، لازم‌است بررسی کیفیت بلاستوسپور تولیدی در آزمایشات زیست‌سنجی[1] و تهیه فرمولاسیون مناسب برای افزایش کارایی آن مورد توجه قرارگیرد.

سپاسگزاری

نگارندگان مراتب قدردانی خود را از بخش حمایت و حفاظت موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور که زمینه انجام این تحقیق را فراهم نموده‌است، ابراز می‌دارند.

1 . Bioassay

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱. بابای اهری، ا. ۱۳۷۸. بررسی اثرات دما، نور و محیط کشت در رشد و اسپورزایی *Verticillium lecanii*.مجله دانش کشاورزی، شماره های (۳و۴)، جلد ۸، صفحه ۱۸۷-۱۷۱.

2. Allen, D. J. 1982. *Verticillium lecanii* on the bean rust fungus, *Uromyces appendiculatus*. Transaction of the British Mycological Society, Vol. 79: 362-364.
3. Aneja, K. R. 2001. Experiment in microbiology, plant pathology, tissue culture and mushroom production technology. New Age International Publishers. New Dehli, India 568 pp.

4. Askary, H., Y. Carrier, R. R. Belanger, & J. Brodeur. 1998. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. Biocontrol Science and Technology, Vol. 8: 23-32.
5. Ballard, E. M. & F. W. Knapp. 1984. Occurance of the fungus *Verticillium lecanii* on a new host species, *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. Vol. 21: 751.
6. Barson, G. 1976. Laboratory studies on the fungus *Verticillium lecanii* a larval pathogen of the Elm Bark Beetle. Annals of Applied Biology. Vol. 83: 207-214.
7. Brodeur, J. 1998. Un champignons pour remplacer les pesticides. Available at: http://www. cyberscience. com/cyber/3.0/n887.asp.
8. Burges, H. D. (1998). Formulation of mycoinsecticides. In: Formulation of Microbial Biopesticides. Burges, H. D. (ed.). Kluwer Academic Publishes, Dordrecht, pp. 131-185.
9. Evans, H. C. & R. A. Samson. 1981. The genus *Verticillium*: Taxonomic problems in species with invertebrate host. In: Foundemental and applied aspects of invertebrate pathology. Samson, R. A., Clarck, J. M. and Peters, D. (eds.). Fourth International Colloquium of Invertebrate. Pathology. Wageningen, The Netherlands, pp.186-189.
10. Gopal akrishnan, C. 1989. Susceptibility of cabbage diamondback moth *Plutella xylostella* L. to the entomofungal pathogen *Verticillium lecanii* (Zimm.)Viegas. Current science,Vol. 58: 1256-1275.
11. Hall, R. A. 1980. Laboratory infection of insects by *Verticillium lecanii* strains isolated from phytopathogenic fungi. Transaction of the British Mycological Society Vol. 74: 445-446.
12. Hall, R. A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphid and scale. In: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Burges, H. D. (ed.) Academic Press, London pp.483-498.
13. Hall, R. A., D. D. Peterkin, B. Ali, & V. F. Lopez. 1994. Influence of culture age on rate of germination in four deuteromycetous entomogenous fungi. Mycological Research, Vol. 98:7 763-798.
14. Inglis, G. D., M. S. Goettel, T. M. Butt, & H. Stathers. 2001. Use of hyphomycetous fungi for insect pests. In: Fungi as biocontrol agents. Butt, T. M. Jackson, C. and Magon, N. (eds.). CABI publishing, UK. pp. 23-69.
15. Jenkins, N. E. & M. S. Goettel. 1997. Method for mass–production of microbial control agents of grasshoppers nd locusts. Memories of the Entomological Society of Canada Vol. 171: 37-48.
16. Khalil, S. K., J. Bartos, & V. Taborsky. 1983. Effect of temperature, pH of the medium and sugar on the germination of spores, development of mycelium and sporulation of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*(Zimm.) Viegas. Agricultura Tropica Et Subtropica, Universitas Agriculturae Praga, Vol. 16: 255-274.
17. Khalil, S. K., N. Hussain, & M. Naeem. 1985. Influence of pH of the medium on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. Sarhad Journal of Agriculture, Vol. 1: 1 51-55.
18. Li, G., Y. Yan, & L. Wang. 1991. Influence of temperature and nutrition on the growth of an entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii.* Chinese Journal of Biological Control, Vol. 7: 3 115-119.
19. Lopez–Llorca, L. V. & T. Carbonell. 1999.Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. Revista Iberoamericana de Micologia, Vol. 16: 3, 136-142.
20. Lopez–Llorca, L. V., T. Carbonell, & J. Salinas. 1999. Colonization of plant waste substrates by entomopathogenic and mycoparasitic fungi, a SEM syudy. Micron, Vol. 30:4 325-333.
21. Melouk, H. A. 1993. *Verticillium lecanii*. In: Method for research on soilborne phytopathogenic fungi. Singleton, L. L., Mihail, J. D. and Rush, C. M. (eds). APS press, New York. pp. 175-186.
22. Powel, K. A. 1995. The production of chemicals by biological control agents. Pesticide Science, Vol. 44: 395-397.
23. Ragliavendra Rao, N. N. & M. S. Pavgi. 1977. Two mycoparasites on powdery mildews. Sydovia, Vol. 30: 145-147.
24. Skinner, M., B. L. Parri, & D. R. Bergdahl. 1991. *Verticillium lecanii*, isolated from larvae of pear thrips,

Taemothrips inconsequence in Vermont. Journal of Invertebrate Pathology, Vol. 58: 157-163.

25. Soman, A. G., J. B. Gloer, R. F. Angawi, D. T. Wicklow, & P. F. Dowd. 2001. Vertilecanins: New phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. Journal of Natural Product, Vol. 64: 2 189-192.
26. Spencer,D. M. & P. T. Atkey. 1981. Parasitic effects of *Verticillium lecanii* on two rust fungi. Transaction of the British Mycological Society, Vol. 77: 535-542.
27. Verhaar, M. A. & T. Hijwegen. 1993. Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Spherotheca fuliginea* .Netherlands Journal of Plant Pathology, Vol. 99: 2 101-103.
28. Wraight, S. P., M. A. Jackson, & S. L. de Kock. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Fungi as biocontrol agents. Butt, T. M., Jackson, C. and Magon, N. (eds.). CABI, PP. 233-287.
29. Zare, R. & W. Gams. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. Nova Hedvigia, Vol.73: 1-2 1-50.

Iranian, J. Agric. Sci. Vol. 36, No. 1, 2005

Effect of Important Ecological Factors on Blastospore Production of *Verticillium lecanii* DAOM 198499 in Liquid Medium

M. J. FARSI[1], H. ASKARI[2], KH. TALEBI JAHROMI[3], AND A. KHARAZI PAKDEL[4]

1, 3, 4, Ph. D. Scholar and Associate Professors, Faculty of Agriculture, University of Tehran, 2, Assistant Professor, Research Institute of Forests and Ranglands

Accepted. April. 28, 2004

SUMMARY

Identification of optimal environmental conditions for growth and sporulation of biological control agents is necessary for their mass production. The response of these agents to environmental conditions differs not only among species, but also among strains. Therefore the effects of food quality, light, temperature and pH of medium on growth and sporulation of *Verticillium lecanii* DAOM 198499 were investigated. Results indicated that, the effect of food quality on sporulation was significant (α=0.01). Potato extract enriched with dextrose, peptone and yeast lead to higher sporulation than potato extract alone. Effect of light was not significant. Temperature above 30˚C restricted blastospore production, but sporulation at 12, 17, 22, and 27˚C were not significantly different (α=0.01). Blastospore production increased intensively during the first four days after inoculation, the number of blastospore/ml reaching 4.7×10^8. Then the rate of increase was reduced, reaching to 9.06×10^8 after 10 days, which was not statistically different from the 4 day, production. Effect of medium pH on sporulation was not significant. Fungus activity caused change of pH of media toward its favourite acidity. Difference of blastospore production in alternative media was significant (α=0.01). Comparison of means revealed that sugar beet molasses and rough rice extract with numbers of 1.02×10^8 and 1.06×10^7 blastospores/ml had the highest and lowest rates of sporulation, respectively.

Key words: *Verticillium lecanii* DAOM 198499, Food quality, Blastospore production, Liquid media, Light, Temperature, pH.