

## بررسی تأثیر خصوصیات فیزیوشیمیایی روغن‌های گیاهی بر طول دوره بقای کنیدی قارچ *Beauveria bassiana* Balsamo

مسعود لطیفیان

استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری کشور (masoudlatifian@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۹

### چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر روغن‌های گیاهی و خصوصیات فیزیوشیمیایی مختلف آن‌ها در طول دوره بقای کنیدی قارچ *Beauveria bassiana* Balsamo جدایه Iran441C بود. آزمایشات با روغن‌های گیاهی شامل کلزا، سویا، کنجد، ذرت، نارگیل، هسته انگور، زیتون، بادام، آفتابگردان و شاهد انجام گردید. خصوصیات فیزیوشیمیایی مختلف روغن‌های گیاهی از جمله ویسکوزیته، اندیس صابونی و اندیس غیرصابونی برآورد شد. نرخ خطر کاهش قدرت بقای قارچ در طول زمان با استفاده از محاسبه ضریب خطر و میانه امید بقای کنیدی قارچ و مقادیر  $LT_{10}$  و  $LT_{50}$  برای کاهش درصد جوانه‌زنی در هر روغن گیاهی و شاهد با استفاده از رگرسیون لجستیک تخمین زده شدند. نتایج نشان داد که بالاترین میانه بقا و کم‌ترین نرخ خطر جوانه‌زنی در روغن کنجد و کم‌ترین میانه بقاء و بیش‌ترین نرخ خطر جوانه‌زنی کنیدی قارچ *B. bassiana* در روغن زیتون ثبت شده است. کم‌ترین گرادیان کاهش نرخ جوانه‌زنی کنیدی قارچ در روغن کلزا و بیش‌ترین آن مربوط به روغن بادام بود. بالاترین و پایین‌ترین حد مجاز نگهداری کنیدی قارچ *B. bassiana* به ترتیب در روغن کلزا و روغن بادام و معادل ۲۹/۸۴ و ۲/۴۲ روز بود. خصوصیات ویسکوزیته ( $f=۸۶/۵$ )، اندیس غیرصابونی ( $f=۲۵/۱۲$ ) و اندیس صابونی ( $f=۵۲/۸۷$ ) روغن‌های مورد استفاده در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌دار داشتند. گرادیان کاهش قدرت جوانه‌زنی در اثر تغییرات خصوصیات ویسکوزیته و اندیس صابونی منفی و در اثر تغییرات خصوصیت اندیس غیرصابونی مثبت بود. براساس نتایج، روغن‌های گیاهی کنجد، کلزا و آفتابگردان برای فرمولاسیون قارچ *B. bassiana* جدایه Iran441C قابل توصیه است.

کلید واژه‌ها: *Beauveria bassiana*، دوره ماندگاری، روغن گیاهی، خصوصیات فیزیوشیمیایی

### مقدمه

قارچ‌های هیفومیست<sup>۱</sup> از جمله *Beauveria bassiana* دارای پتانسیل بالایی جهت کاربرد در کنترل میکروبی حشرات هستند (واریت و همکاران، ۲۰۰۱). توسعه حشره‌کش‌های قارچی به انتخاب مناسب جدایه قارچ بیمارگر، داشتن روش‌های مناسب تولید انبوه و کافی و فرمولاسیون‌های متناسب با شرایط آب و هوایی منطقه بستگی دارد (کنسولو و همکاران، ۲۰۰۳). قابلیت نگهداری قارچ‌های بیمارگر به توانایی

فرمولاسیون آن‌ها در مهار اثرات مضر عوامل طبیعی بر بقای کنیدیشان بستگی دارد (واریت و همکاران، ۱۹۹۹ و ونگ و همکاران ۲۰۰۱).

مهم‌ترین عوامل محدودکننده کاربرد این قارچ‌ها به عنوان یک حشره‌کش اشعه ماوراء بنفش خورشید، دما، رطوبت محیط و پخش شدن در سطح می‌باشد (تادانا و کایا، ۱۹۹۳). در شرایط کاربرد مزرعه‌ای نیز فرمولاسیون مناسب در غلبه قارچ بر شرایط نامساعد محیطی و افزایش کارایی بیمارگری آن مؤثر است (کوئندراوگو و همکاران، ۱۹۹۷). مطالعات انجام شده نشان داده است که فرمولاسیون قارچ‌های *B. bassiana* و *M.*

موجود در روغن های گیاهی اسیدهای چرب مارگاریک و اوراسیک دارای اثر افزایشی و اسیدهای چرب پالمولیتیک و لینولتیک دارای اثر کاهش در قدرت کشندگی قارچ *B. bassiana* جدایه C ۴۴۱ Iran بوده‌اند (لطیفیان، ۲۰۱۲).

هدف از اجرای این پژوهش بررسی اثر خصوصیات فیزیکی شیمیایی مختلف روغن های گیاهی در طول دوره بقای کنیدی قارچ *B. bassiana* جدایه C ۴۴۱ Iran بود.

### مواد و روش ها

#### کشت جدایه های قارچی

جدایه C ۴۴۱ Iran در این پژوهش از طریق موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه گردید. پس از خالص سازی به روش تک کنیدی، جدایه قارچی مورد نظر در محیط غذایی 'SDA+Y' کشت گردید (آلیکونادا و پاتریشیا، ۲۰۰۶). بعد از کنیدی زایی کامل (کشت ۱۲-۱۴ روزه) سطح محیط کشت به وسیله سوزن انتقال خراش داده شد. کنیدی ها در داخل ارلن های جداگانه ای که حاوی ۱۰ سی سی آب مقطر استریل با محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰<sup>۲</sup> بود، جمع آوری گردیدند (توماس و همکاران، ۱۹۸۷). سوسپانسیون فوق به منظور پراکنده شدن یکنواخت کنیدی ها در داخل آن به مدت ۵ دقیقه به طور پاندولی به هم زده شد. برای افزایش تولید کنیدی از محیط کشت SDA+Y استفاده شد. این محیط کشت با دارا بودن شرایط اسیدی (PH=۵/۶) شرایط اختصاصی رشد قارچ را فراهم کرده و از رشد باکتری های ساپروفیت جلوگیری می نماید زیرا اکثر باکتری های ساپروفیت توانایی رشد در محیط اسیدی را ندارند (توماس و همکاران، ۱۹۸۷).

#### بررسی قدرت بقای کنیدی در روغن گیاهی

بقای کنیدی در روغن های گیاهی در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار برای روغن های گیاهی تصفیه

*anisopliae* کارایی کاربرد آن ها را در کنترل لاروهای پشه های آنوفل افزایش می دهد (بوخاری و همکاران، ۲۰۱۱). نوع فرمولاسیون توانایی های زیستی کنیدی قارچ میزبان از جمله رشد رویشی، توانایی تکثیر، قدرت جوانه زنی و توانایی بیماریگری را نیز تحت تأثیر قرار می دهد (لیو و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین تحقیقات نشان داده است که فرمولاسیون قارچ های بیمارگر با فرمولاسیون های مناسبی از جمله روغن های گیاهی طول دوره تأثیر و بقای آن را افزایش می دهد (کریستوفر و استینکراوز، ۲۰۰۳). لذا انتخاب فرمولاسیون مناسب با توانایی محافظت کنیدی قارچ های بیمارگر حشرات در مقابل عوامل نامساعد محیطی از گام های اساسی در تدوین برنامه کنترل میکروبی موفق است (استفان و زیمرمن، ۲۰۰۱). به کارگیری فرمولاسیون های روغنی نسبت به فرمولاسیون های آبی مزیت های فراوانی دارد. برای مثال فرمولاسیون های روغنی به وسیله سم پاش های با حجم کم پاشیده می شوند و لذا کم ترین ماده مؤثره را علیه آفت هدف می توان به کاربرد. همچنین کنیدی های قارچ را در برابر استرس های دمایی محیط حفظ نموده و چسبندگی و گسترش آن ها را روی سطح آب گریز گیاه و کوتیکول حشرات افزایش می دهند (کنسولو و همکاران، ۲۰۰۳). روغن هایی که در فرمولاسیون قارچ ها به کار می روند شامل دو نوع معدنی و گیاهی می باشند. از مزایای روغن های گیاهی این است که اولاً در وسایل محلول پاشی خوردگی به وجود نمی آورند، ثانیاً نسبتاً ارزان تر از سایر روغن ها بوده و معمولاً راحت تر از روغن های معدنی در دسترس هستند (فنگ و همکاران، ۲۰۰۴). نتایج تحقیقات نشان داده است که فرمولاسیون قارچ *B. bassiana* جدایه C ۴۴۱ با روغن های گیاهی باعث کاهش طول دوره انکوباسیون و افزایش میزان تلفات قارچ نسبت به شاهد می شود. در میان روغن های گیاهی روغن کنجد و روغن بادام به ترتیب دارای بیشترین اثر سینرژیستی و آنتاگونیستی در خواص زهر آگینی قارچ بوده‌اند. در میان اسید چرب های

انتخاب گردیده و با توجه به خروج هیف از اسپور جوانه زده یا زنده بودن آن‌ها ثبت می‌گردید.

### روش تحلیل داده‌ها:

#### الف- تعیین منحنی بقای کنیدی

براساس مطالعات مشابه مدل تغییرات درصد جوانه زنی کنیدی قارچ در طی دوره ذخیره از رابطه یک تبعیت می‌کند.

$$V=K-CrLn(t) \quad \text{رابطه ۱:}$$

در این رابطه  $V$  درصد جوانه‌زنی،  $Cr$  گرادیان کاهش قدرت جوانه‌زنی در روغن‌های مختلف و شاهد در طی زمان،  $K$  ثابت معادله و  $t$  طول دوره ذخیره کنیدی در واحد روز بود (هونگ و همکاران، ۱۹۹۷).

نرخ خطر کاهش قدرت بقای قارچ در طول زمان با استفاده از محاسبه ضریب خطر<sup>۱</sup> و میانه امید بقای قارچ<sup>۲</sup> در روغن‌های گیاهی مورد بررسی و شاهد با استفاده از روابط دو و سه محاسبه شد (سانتی‌گو-آلوارز و همکاران، ۲۰۰۶).

$$HR = \frac{2qi}{bi(1+pi)} \quad \text{رابطه ۲:}$$

$$M=(t_j+t_i)+\frac{bj(s_j-\frac{s_j}{2})}{s_j-s_j+1} \quad \text{رابطه ۳:}$$

در این روابط  $q_i$  درجه کاهش جوانه‌زنی در فاصله زمانی  $\Delta t$  که عبارتست از نسبت کاهش قدرت جوانه زنی در هر فاصله زمانی به زمان نمونه‌برداری قبلی،  $b_i$  فاصله دو زمان نمونه‌برداری،  $p_i$  احتمال تجمعی کاهش جوانه‌زنی تا فاصله زمانی  $\Delta t$ ،  $b_j$  فاصله شروع آزمایش تا زمان  $\Delta t$ ،  $s_j$  بقای تجمعی قدرت جوانه‌زنی تا زمان  $\Delta t$ ،  $t_i$  و  $t_j$  به ترتیب دو فاصله نمونه‌برداری  $\Delta t$  و  $\Delta t$  می‌باشند. محاسبات رگرسیون با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گردید (استوکز و همکاران، ۲۰۰۰).

شده شامل روغن کلزا، سویا، کنجد، ذرت، نارگیل، هسته انگور، زیتون، بادام، آفتابگردان و شاهد بررسی گردید. برای این منظور از هر روغن گیاهی مورد مطالعه مقدار ۲۵۰ میلی‌لیتر تهیه شد. پس از آن روغن‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت ضد عفونی شدند. کنیدی‌های قارچ با غلظت  $10^4$  کنیدی در لیتر در روغن‌های گیاهی سوسپانسیون گردیدند. ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ برای یکنواخت کردن پخش کنیدی‌ها در روغن به سوسپانسیون اضافه گردید (لطیفیان، ۲۰۱۲). هر تکرار در ظروف پلی‌استیرنی استوانه‌ای به ابعاد  $5 \times 10$  سانتی‌متر بسته بندی شده و با سلفون پوشش داده شد. بسته‌های حاوی روغن‌های گیاهی و کنیدی قارچ *B. bassiana* در شرایط آزمایشگاهی با متوسط دمای  $25 \pm 5$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی  $40 \pm 5$  درصد به مدت سه هفته نگهداری شدند. شاهد شامل ۱۰۰ گرم پودر کنیدی قارچ بود که در ظروف و شرایط مشابه سایر تیمارها نگهداری می‌شد. سپس به فواصل هر ۲ روز یک بار و در طول دوره ۳ هفته بررسی قدرت جوانه‌زنی عامل بیمارگر از هر فرمولاسیون نمونه‌برداری گردید. برای این منظور ابتدا به مدت ۲ دقیقه بسته حاوی فرمولاسیون را به هم زده و سپس از هر یک، ۵ میلی‌لیتر به صورت تصادفی برداشت شد. کنیدی‌های جمع آوری شده به منظور بررسی جوانه‌زنی جدایه‌های قارچی با پخش کردن ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون روی محیط کشت SDA+Y داخل تشتک پتری بررسی شد. سوسپانسیون فوق به صورت یک لایه نازک روی SDA+Y پوشش داده شد. درب تشتک پتری‌های با پارافیلیم بسته و در دمای  $25 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور در شرایط کاملاً تاریک قرار داده شدند. ۲۴ ساعت پس از تلقیح یک میلی‌لیتر فرمالدئید ۰/۵ درصد به منظور توقف جوانه‌زنی کنیدی‌ها به داخل هر تشتک پتری ریخته شد. درصد جوانه‌زنی با شمارش ۱۰۰ کنیدی از هر پتری با بزرگ‌نمایی  $40 \times$  محاسبه شد. برای این منظور در قطر پتری حرکت نموده و ۱۰۰ اسپور به صورت تصادفی

1 -Hazard rate

2 - Median life expectancy

نشده و آنگیزی به طور کامل انجام گیرد. سپس فاز زیرین را دور ریخته و ترکیبات غیر صابونی شونده و اتر باقی مانده را همراه با یک قاشق چای خوری سدیم سولفات بی آب در یک ارلن کوچک ریخته سپس با کاغذ صافی درون قیف صاف شد. ترکیبات غیر صابونی در یک لوله آزمایش که قبلاً وزن شده منتقل و پس از تبخیر اتر نیز دوباره وزن شدند. وزن لوله آزمایش از مجموع وزن لوله آزمایش و نمونه کم شد و درصد وزنی ترکیبات غیر صابونی با واحد mg/100g به دست آمد (سزبلدگ و تانای، ۱۹۳۶).

### تعیین اندیس صابونی

دو گرم روغن مورد نظر به همراه ۲۵ میلی لیتر پتاس الکی نیم نرمال در بالن ریخته و پس از اتصال به مبرد به مدت یک ساعت جوشانده شد. چند قطره فنل فتالین به آن اضافه نموده و سپس عمل تیتراسیون به وسیله بورت با استفاده از اسید کلریدریک نیم نرمال انجام گردید تا محلول بی رنگ شود. تیتراسیون شاهد (پتاس الکی نیم نرمال) با اسید کلریدریک انجام شد. در نتیجه جای گذاری اعداد حاصله در فرمول ۴، اندیس صابونی (S.V) بر حسب mg/100g به دست آمد (سزبلدگ و تانای، ۱۹۳۶).

$$SV = \frac{(B-A) \times 56.1 \times N}{W} \text{ : رابطه ۴}$$

B = میلی لیتر شاهد

A = میلی لیتر اسید کلریدریک مصرفی جهت تیتراسیون

N = نرمالیت اسید که برابر ۰/۵ بود

W = وزن اولیه نمونه به گرم

### اندازه گیری ویسکوزیته

ابتدا ویسکومتر با آب معمولی کالیبره شد و سپس دمای روغن‌ها در زمان انجام آزمایش (۲۵ درجه سانتی گراد) اندازه گیری گردید. روغن را در یک بشر مناسب ریخته و اسکراپر ویسکومتر در روغن قرار گرفت. اعداد به دست آمده شامل تعداد دور در دقیقه،

### ب- برآورد طول دوره کاهش جوانه زنی کنیدی

آزمایش‌ها در ۱۱ تیمار (شامل ۲۱ روز دوره نگهداری کنیدی به فاصله هر دو روز یک بار) در ۴ تکرار مطابق روش قبل انجام گرفت.

ارتباط رگرسیونی بین لگاریتم زمان در مقابل پروبیت درصد کاهش جوانه زنی محاسبه شد. درصد کاهش جوانه زنی در هر روغن در مقایسه با شاهد و به کمک رابطه آبوت برآورد گردید.

سپس از داده‌های آن در مدل زیست‌سنجی استفاده شد. به این ترتیب مقادیر  $LT_{50}$  (معادل نیمه عمر) برای کاهش درصد جوانه زنی در هر روغن و شاهد با استفاده از رگرسیون لجستیک تخمین زده شدند (استوکز و همکاران، ۲۰۰۰).

### بررسی اثرات خصوصیات روغن‌های گیاهی بر

#### طول دوره بقای کنیدی

#### الف- تعیین خصوصیات روغن‌های گیاهی

#### تعیین اندیس غیر صابونی

پنج گرم از روغن مورد آزمایش، ۶۰ میلی لیتر اتانول و ۱۰۰ میلی لیتر اتر نفتی را در یک بالن متصل به مبرد طی مدت نیم ساعت جوشانده و پس از برداشتن آن از روی اجاق برق و اضافه نمودن ۸۰ میلی لیتر آب مقطر به آن، محتویات بالن به دکانتور منتقل گردید. سپس بالن با ۸۰ میلی لیتر آب مقطر آبشویه شده و به محتویات دکانتور افزوده شد. با اضافه نمودن ۱۰۰ میلی لیتر دی اتیل اتر به دکانتور و اختلاط کامل آن ۲ فاز تشکیل گردید. فاز زیرین به دکانتور دیگر انتقال یافته و کاملاً با ۵۰ میلی لیتر دی اتیل اتر خوب مخلوط شده و بار دیگر ۲ فاز مجزا از هم تشکیل گردید، این بار فاز زیرین دور ریخته شد و فاز رویی به دکانتور اول منتقل و پس از اختلاط کامل با ۱۰۰ میلی لیتر آب، گاز حاصله تخلیه گردید. پس از دو فاز شدن، فاز زیرین را دور ریخته و مجدداً با آب مقطر آنقدر شستشو داده شد تا وقتی که در تیتراسیون فاز زیرین با فنل فتالین تغییر رنگی حاصل

قارچ *B. bassiana* در روغن کنجد و کمترین میانه بقاء و بیشترین نرخ خطر جوانه‌زنی کنیدی قارچ *B. bassiana* در روغن زیتون ثبت شده است. کمترین گرادیان کاهش نرخ جوانه‌زنی کنیدی قارچ *B. bassiana* که نشان دهنده سرعت کاهش بقای کنیدی بوده در روغن کلزا و بیشترین آن مربوط به روغن بادام بود. کلیه روغن‌ها در افزایش قدرت بقاء، کاهش نرخ خطر و افت سرعت کاهش قدرت جوانه‌زنی قارچ *B. bassiana* مؤثر بوده‌اند.

### مقایسه طول دوره بقای کنیدی قارچ *B. bassiana* در روغن‌های گیاهی

مدت زمان کاهش ۵۰ و ۱۰ درصد قدرت جوانه‌زنی کنیدی قارچ *B. bassiana* در روغن‌های گیاهی و شاهد در شرایط انجام آزمایش براساس روش زیست-سنجی محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۲ درج شده است. چنانچه حد مجاز ۱۰ درصد کاهش قدرت جوانه‌زنی، به عنوان طول مدت نگهداری کنیدی قارچ *B. bassiana* فرموله شده با روغن‌های گیاهی در نظر گرفته شود (جنکینز و همکاران، ۱۹۹۸). براساس جدول ۲ بالاترین و پایین‌ترین حد مجاز نگهداری کنیدی قارچ *B. bassiana* به ترتیب در روغن کلزا و روغن بادام بود. از طرفی کلیه روغن‌های مورد آزمایش در افزایش ماندگاری کنیدی قارچ *B. bassiana* مؤثر بودند. به طوری که با مقایسه  $LT_{50}$  روغن‌ها نسبت به شاهد مشخص شد که روغن گیاهی حداقل ۲ روز (زیتون) و حداکثر ۶۳ روز (کلزا) باعث افزایش ماندگاری کنیدی قارچ *B. bassiana* گردید.

### اثرات خصوصیات فرمولاسیون روغن‌های گیاهی بر طول دوره بقای کنیدی قارچ *B. bassiana*

#### الف: مقایسه خواص فیزیکو شیمیایی روغن‌های گیاهی

خواص فیزیکوشیمیایی روغن‌های گیاهی مورد استفاده در فرمولاسیون کنیدی قارچ *B. bassiana*

خطای دستگاه<sup>۱</sup> و عدد نهایی غلظت روغن بودند. ویسکوزیتی با واحد<sup>۲</sup> (cps) سنجیده شد (سزبلدگ و تانای، ۱۹۳۶).

### ب- روش تحلیل داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار شامل روغن‌های گیاهی مورد آزمایش با ۴ تکرار بود. ضمن مقایسه میانگین صفات مورد بررسی با آزمون میانگین‌ها براساس روش SNK<sup>۳</sup> در سطح ۰/۰۵ درصد مقایسه گردیدند. براساس مطالعات مشابه مدل تغییرات درصد جوانه‌زنی کنیدی قارچ در اثر تغییر خصوصیات روغن‌های گیاهی از رابطه ۵ تبعیت می‌کند.

$$\text{رابطه ۵: } \text{Log}(Q) = K - C_w \text{Log}(I)$$

در این رابطه Q تغییرات استاندارد میانگین درصد جوانه‌زنی،  $C_w$  گرادیان کاهش قدرت جوانه‌زنی در روغن‌های مختلف در اثر تغییرات صفات، I دامنه تغییرات خصوصیات مختلف مورد بررسی در روغن‌های گیاهی و K ثابت معادله بود (هونگ و همکاران، ۱۹۹۷).

### نتایج

#### مقایسه بقای کنیدی قارچ *B. bassiana* در روغن‌های گیاهی و شاهد

منحنی بقای قدرت جوانه‌زنی قارچ *B. bassiana* بر اساس معادله رابطه ۱ برای روغن‌های گیاهی مورد بررسی و شاهد برازش شد که نتایج آن در شکل یک ملاحظه می‌شود.

بر اساس معادلات مندرج در شکل یک مقدار  $C_r$  یا گرادیان کاهش قدرت جوانه‌زنی و براساس روابط ۲ و ۳ نرخ خطر و میانه امید جوانه‌زنی قارچ *B. bassiana* در روغن‌های گیاهی و شاهد برآورد گردید که نتایج آن در جدول ۱ درج شده است.

همان‌طور که در جدول ۱ ملاحظه می‌گردد، بالاترین میانه بقاء و کمترین نرخ خطر جوانه‌زنی کنیدی

1 - Sol

2 - Centipoise

3 - Student-Newman-Keuls

لطیفیان: بررسی تأثیر خصوصیات فیزیکی شیمیایی ...

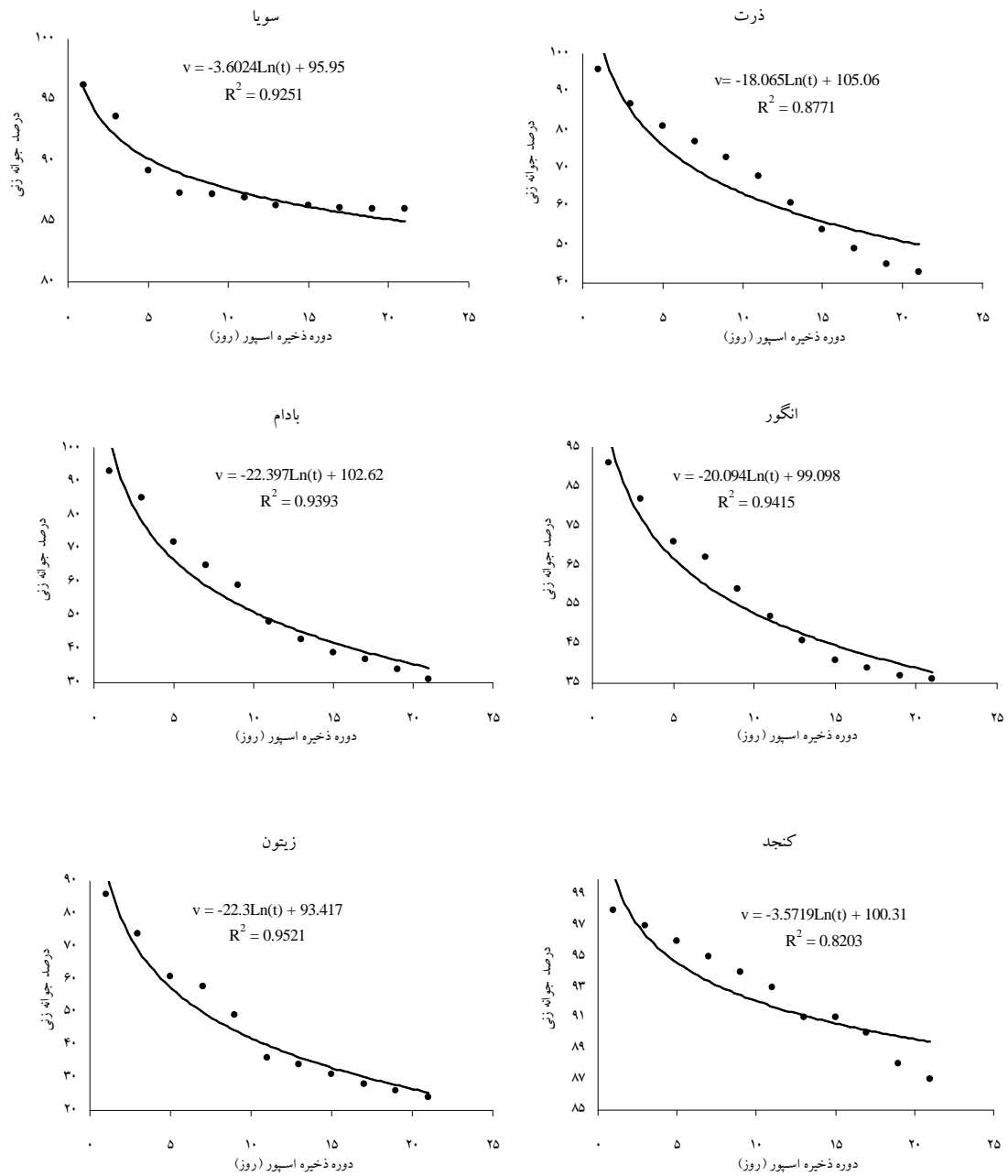
شامل سویا، ذرت، بادام، کنجد، هسته انگور، زیتون، کلزا، آفتابگردان و نارگیل مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که خصوصیات ویسکوزیته ( $f=۸۶/۵$ )، اندیس غیرصابونی ( $f=۲۵/۱۲$ ) و اندیس صابونی ( $f=۵۲/۸۷$ ) روغن های مورد استفاده در فرمولاسیون کنیدی قارچ در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی دار داشتند. نتایج مقایسه میانگین خصوصیات روغن های گیاهی در شکل ۲ درج گردیده است. همان طور که در شکل ۲ ملاحظه می گردد، بالاترین مقدار کمی خصوصیات ویسکوزیته، اندیس غیرصابونی و اندیس صابونی به ترتیب در روغن های کلزا، هسته انگور و کلزا و کمترین آن ها نیز به ترتیب در زیتون، زیتون و هسته انگور برآورد شد. بین روغن های کلزا و آفتابگردان از نظر مقدار اندیس غیرصابونی تفاوت معنی داری ملاحظه نشد.

**جدول ۱- برآورد گرادیان کاهش قدرت جوانه زنی  $C_r$ ، نرخ خطر کاهش جوانه زنی (HR) و میانه امید بقای جوانه زنی (M) قارچ *B. bassiana* در روغن های گیاهی و شاهد**

M	HR	$C_r$	فرمولاسیون
۶۴/۴۶	۴/۱۲	-۳/۶۰	سویا
۴۸/۷۱	۶/۷۷	-۱۸/۰۶	ذرت
۴۰/۷۲	۶/۸۷	-۲۳/۳۹	بادام
۶۷/۶۹	۳/۳۶	-۳/۵۷	کنجد
۴۱/۲۱	۷/۱۳	-۲۰/۰۹	هسته انگور
۳۳/۶۴	۷/۸۶	-۲۲/۳	زیتون
۶۳/۴۴	۴/۰۲	-۲/۹۳	کلزا
۶۲/۸۵	۴/۸۷	-۴/۰۴	آفتابگردان
۵۰/۳۰	۵/۰۳	-۱۲/۳۹	نارگیل
۲۶/۶۱	۱۱/۰۳	-۳۴/۳۹	شاهد

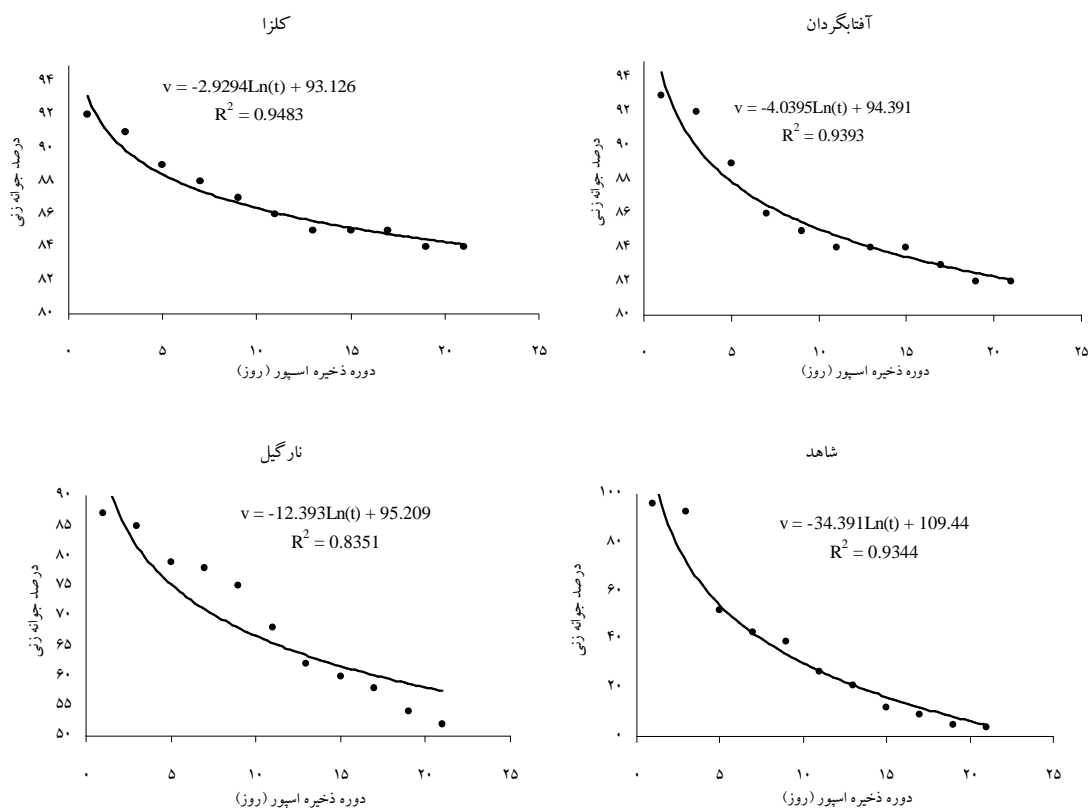
**جدول ۲- محاسبه مقادیر  $LT_{50}$  (نیمه عمر) برای کاهش درصد جوانه زنی کنیدی قارچ *B. bassiana* در روغن های گیاهی و شاهد**

روغن ها	$LT_{50}$ (حدود اطمینان ۹۵ درصد)	Slope SE(±)	کای اسکویئر ( $X^2$ )
سویا	۶۷/۱۷ (۶۲/۸۹-۶۸/۱۶)	۳/۵۴ ± ۰/۰۳	۱/۳
ذرت	۱۷/۱۲ (۱۶/۰۱-۱۸/۲۴)	۳/۶۵ ± ۰/۰۲	۱/۶
بادام	۱۲/۷۳ (۱۱/۷۴-۱۳/۷۲)	۳/۹۲ ± ۰/۰۲	۱/۴
کنجد	۴۷/۰۲ (۴۴/۳۱-۴۹/۷۳)	۳/۰۳ ± ۰/۰۳	۱/۳
هسته انگور	۱۳/۴۱ (۱۲/۲۹-۱۴/۵۱)	۳/۹۸ ± ۰/۰۲	۱/۱
زیتون	۹/۶۹ (۸/۶۷-۱۰/۷۱)	۴/۲۳ ± ۰/۰۲	۱/۹
کلزا	۷۰/۴۲ (۶۶/۰۲-۷۴/۸۲)	۳/۶۶ ± ۰/۰۳	۱/۳
آفتابگردان	۵۵/۹۷ (۵۲/۴۹-۵۹/۴۵)	۳/۶۵ ± ۰/۰۳	۱/۹
نارگیل	۲۰/۴۷ (۱۸/۹۵-۲۱/۹۷)	۳/۸۱ ± ۰/۰۲	۱/۶
شاهد	۷/۵۸ (۶/۹۴-۸/۲۲)	۳/۸۳ ± ۰/۰۳	۱/۳



شکل ۱- منحنی بقای کنیدی قارچ *B. bassiana* در نگهداری در روغن‌های گیاهی و شاهد

لطیفیان: بررسی تأثیر خصوصیات فیزیکوشیمیایی ...



ادامه شکل ۱ - منحنی بقای کنیدی قارچ *B. bassiana* در نگهداری در روغن های گیاهی و شاهد

کارایی روغن گیاهی در حفظ بقای کنیدی قارچ *B. bassiana* اثر مثبت و اندیس غیرصابونی اثر منفی داشته است.

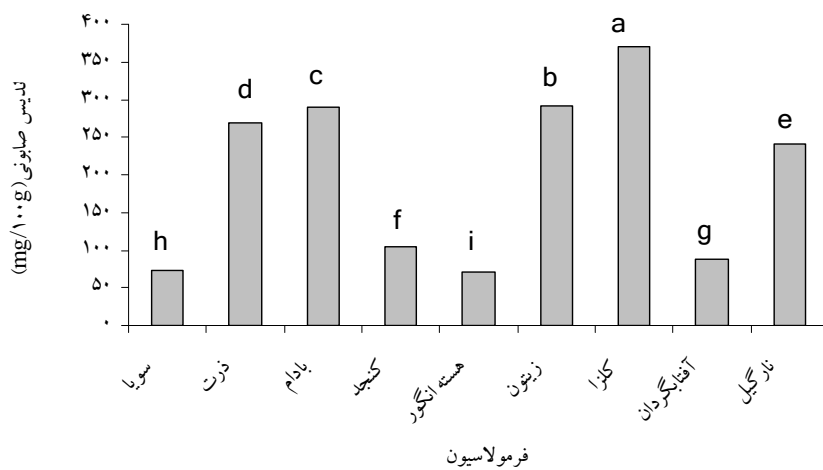
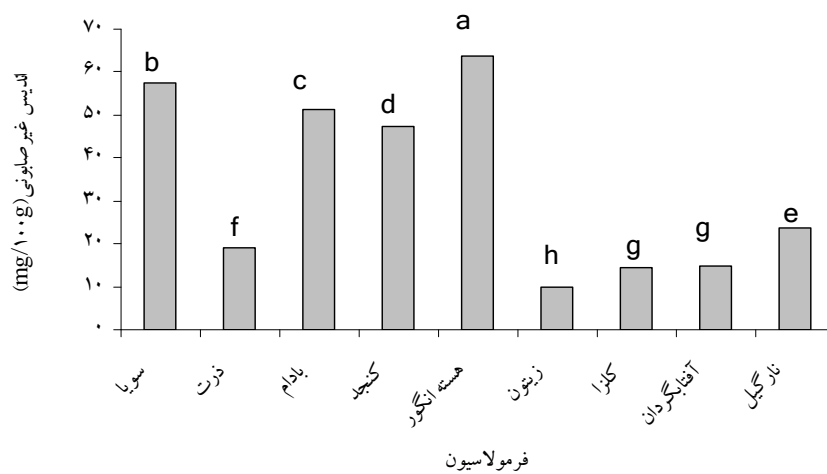
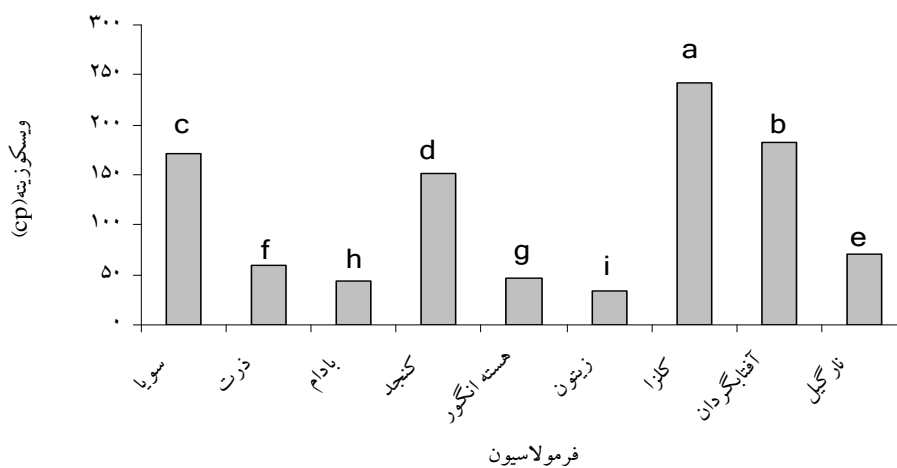
همان طور که در شکل ۳ ملاحظه می گردد،  $C_w$  گرادیان کاهش قدرت جوانه زنی در اثر تغییرات خصوصیات ویسکوزیته و اندیس صابونی منفی و در اثر تغییرات خصوصیت اندیس غیرصابونی مثبت بوده است. به عبارت دیگر ویسکوزیته و اندیس صابونی در افزایش کارایی روغن گیاهی در حفظ بقای کنیدی قارچ *B. bassiana* اثر مثبت و اندیس غیرصابونی اثر منفی داشته است.

ب- مقایسه نحوه اثر خصوصیات روغن های گیاهی در طول دوره بقا کنیدی قارچ *B. bassiana*

مدل ارتباط تغییرات بقای قدرت جوانه زنی قارچ *B. bassiana* در طی دوره آزمایش با تغییرات خصوصیات فیزیکوشیمیایی روغن های گیاهی مورد استفاده براساس معادله رابطه ۶ برازش شد که نتایج آن در شکل ۳ ملاحظه می شود.

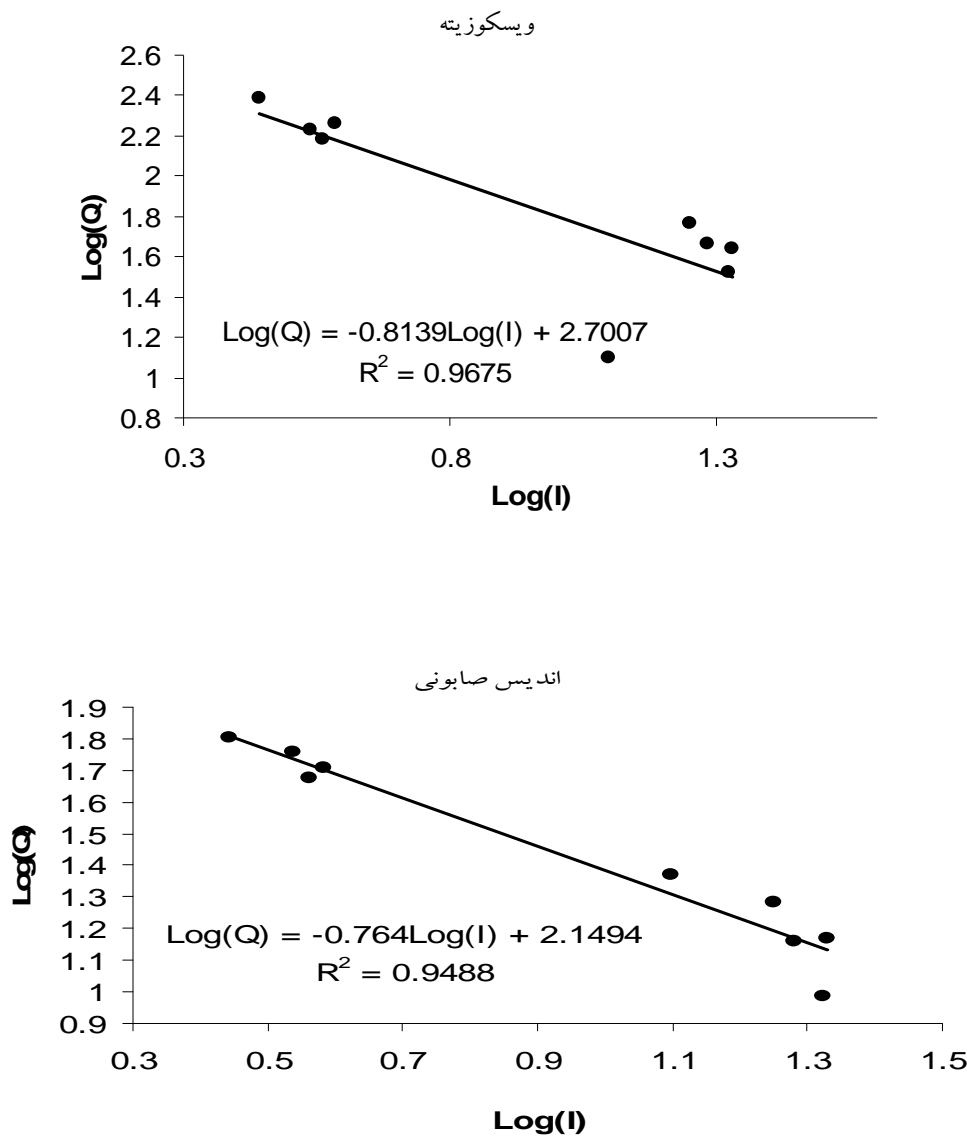
همان طور که در شکل ۳ ملاحظه می گردد،  $C_w$  گرادیان کاهش قدرت جوانه زنی در اثر تغییرات خصوصیات ویسکوزیته و اندیس صابونی منفی و در اثر تغییرات خصوصیت اندیس غیرصابونی مثبت بوده است. به عبارت دیگر ویسکوزیته و اندیس صابونی در افزایش





شکل ۲- مقایسه خصوصیات روغن‌های گیاهی مورد استفاده در به روش SNK

لطیفیان: بررسی تأثیر خصوصیات فیزیکوشیمیایی ...



شکل ۳- مدل ارتباط تغییرات بقای قدرت جوانه‌زنی قارچ *B. bassiana* با تغییرات خصوصیات فیزیکوشیمیایی روغن‌های گیاهی

محلول‌پاشی، قطرات آب تبخیر شده و در مدت زمان لازم برای تندش‌کنیدی، رطوبت کافی در اطراف آن وجود نداشته باشد. لذا فرمولاسیون‌هایی که آب را در اطراف‌کنیدی نگه دارند، اهمیت زیاد دارند (کونیک و همکاران، ۱۹۹۰). در این پژوهش نشان داده شد که روغن‌های گیاهی نظیر کنجد، کلزا و آفتابگردان که

### بحث

هیدروکربن‌های افزوده شده به برخی از فرمولاسیون‌ها از جمله روغن‌های گیاهی تندش‌کنیدی را در میزان حساس تحریک می‌کند و باعث افزایش پایداری‌کنیدی قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌شوند (گلیسپی و همکاران، ۱۹۹۸). ممکن است پس از

بود. مطالعات مشابه نشان دادند که فرمولاسیون‌های روغنی، کنیدی‌ها را تا حدودی در برابر اشعه ماوراء بنفش محفوظ می‌دارد (مور و پریور، ۱۹۹۳).

ارزیابی فرمولاسیون‌های مختلف از کنیدی‌های هوایی و کنیدی‌های غوطه‌ور *M. anisopliae* var. *acridum* در سطح آزمایشگاهی و مزرعه‌ای انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان به دو فرمولاسیون بر پایه آب (شامل ۴/۳ درصدی کنیدی در آب، بانضمام ۲۰ درصد شیره قند و آب)، ۳ فرمولاسیون به صورت امولسیون روغنی (شامل ۴/۳ درصد کنیدی در ۱۵ درصد روغن Telmion و آب، ۴/۳ درصد کنیدی باضافه یک درصد لیستین با ۱۰ درصد روغن سویا و آب) و فرمولاسیون دارای ۴/۳ درصد کنیدی هوایی و گازوئیل اشاره کرد. نتایج نشان داد که کنیدی‌های هوایی فرموله شده در گازوئیل در شرایط مزرعه‌ای بیش از ۹۵ درصد مرگ و میر در طی ۳-۸ روز نشان دادند. این نتایج به کارگیری حامل‌های روغنی را برای حفاظت کنیدی‌ها در برابر استرس‌های محیطی تایید می‌کنند. در تمام فرمولاسیون‌ها کنیدی‌ها بیش از ۵ روز در محیط وجود داشته و ۶۲-۱۰۰ درصد مرگ و میر در ملخ‌های بومی سالم که در معرض گیاهان تیمار شده بودند ایجاد کردند. (کاسا، ۲۰۰۳).

تحقیقات سایر پژوهشگران نشان داد که روغن‌های چریش، پنبه، نارگیل و پالم برای کنیدی‌های *M. anisopliae* سمی هستند. اما روغن‌های بادام زمینی، آفتابگردان، ذرت و سویا سمیتی برای کنیدی‌های این قارچ ندارند (لومر و لومر، ۱۹۹۹). نتایج پژوهش حاضر نیز نتایج مشابهی برای قارچ *B. bassiana* نشان داد به طوری که روغن‌های آفتابگردان، سویا و کلزا مناسب بودند. اما تفاوت‌هایی نیز وجود داشت به طوری که روغن نارگیل برای کنیدی‌های قارچ *B. bassiana* مناسب ولی برای کنیدی‌های *M. anisopliae* سمی بودند. بر این اساس می‌توان چنین استنباط کرد که انتخاب روغن گیاهی مناسب برای فرمولاسیون قارچ‌های

اندیس صابونی بالاتری نشان دادند، قدرت بالاتری در حفظ توانایی جوانه‌زنی قارچ *B. bassiana* داشتند. زیرا همان‌طور که در قسمت نتایج نشان داده شد، خصوصیت اندیس صابونی در ایجاد گرادیان منفی از تغییرات توانایی جوانه‌زنی در طی دوره نگهداری کنیدی قارچ مؤثر بوده است و آن به این دلیل است که این خصوصیت در ایجاد شرایط قطبی و حفظ رطوبت در اطراف کنیدی فرموله شده مؤثر بوده است. تحقیقات مشابه نشان داد که کاربرد فرمولاسیون‌های روغنی در مناطق خشک در مقایسه با فرمولاسیون‌های آبی (رطوبت نسبی کمتر از ۳۵ درصد) موجب افزایش کارایی قارچ *M. anisopliae* شده است (کاسا، ۲۰۰۳).

خصوصیت اندیس صابونی همچنین در کاهش اثرات منفی تنش‌های حرارتی بر کنیدی قارچ‌های بیمارگر حشرات تأثیر دارد. در پژوهشی چندین نوع فرمولاسیون شامل کنیدی‌های دارای پوشش رسی - آب، کنیدی‌های مخلوط با دانه گندم، کنیدی‌های همراه روغن با مواد امولسیون کننده و پودر و تابل آزمایش شدند. نتایج نشان داد که افزودن روغن به فرمولاسیون تحت شرایط خشک در بقای کنیدی در دمای بالا مؤثر بوده است (دلگادو و همکاران، ۱۹۹۷). همچنین کنیدی‌های ذخیره شده قارچ *B. bassiana* در گلیسرین ۲۰ درصد و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد پس از ۱۴ روز قدرت زنده مانی ۹۵ درصد داشتند (موهان و همکاران، ۱۹۹۹).

خصوصیت ویسکوزیته روغن گیاهی مورد استفاده در فرمولاسیون روغن گیاهی از عوامل کاهش دهنده اثرات مضر اشعه ماوراء بنفش بر توانایی جوانه‌زنی و بقای کنیدی قارچ می‌باشد. در این پژوهش نیز نشان داده شد که خصوصیت ویسکوزیته باعث کاهش گرادیان منفی تغییرات جوانه‌زنی قارچ *B. bassiana* شد. روغن‌هایی نظیر کلزا و آفتابگردان که از نظر این خصوصیت شاخص بودند، طول دوره بقای کنیدی قارچ *B. bassiana* در فرمولاسیون کاربردی آن‌ها بالاتر

نتایج قبلی نشان داد کنجد، سویا، کلزا، آفتابگردان، ذرت، هسته انگور و نارگیل دارای اثرات سینرژیستی و دو روغن گیاهی بادام و زیتون دارای اثرات آنتاگونیستی بر قدرت کشندگی جدایه انتخابی قارچ *B. bassiana* جدایه Iran 441c بوده‌اند (لطیفیان، ۲۰۱۲). از طرف دیگر براساس نتایج این پژوهش روغن‌های کنجد، کلزا و آفتابگردان در حفظ قدرت بقای این قارچ مؤثر بوده است. لذا روغن‌های گیاهی کنجد، کلزا و آفتابگردان برای فرمولاسیون قارچ *B. bassiana* جدایه Iran 441c قابل توصیه است.

### سپاس‌گزاری

کلیه هزینه‌ای انجام این پروژه از طریق موسسه تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری تامین گردیده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

بیمارگر حشرات بسته به نوع گونه و گاهی جدایه قارچ متفاوت است. به عنوان مثال کاربرد مشتقات نفت خام برای ذخیره‌سازی کنیدی‌های *M. anisopliae* موفقیت آمیز بوده است، اما برای ذخیره‌سازی کنیدی‌های *B. bassiana* نتیجه بخش نبوده است (بن، ۱۹۸۱).

علاوه بر خصوصیات فیزیکی شیمیایی، خواص بیوشیمیایی روغن‌های مورد استفاده در فرمولاسیون قارچ‌های بیمارگر حشرات در کارایی آن‌ها برای حفظ بقای کنیدی و ماندگاری آن‌ها مؤثرند. به عنوان مثال تحقیقات نشان داد که به کارگیری آنتی‌اکسیدان‌های *Butylated hydroxyanisole* و *Butylated oloxytoluene* به نسبت ۰/۰۱ درصد بقای کنیدی‌ها را در روغن بادام زمینی و سویا ۲۶-۲۳ درصد افزایش می‌دهد (ساترز و همکاران، ۱۹۹۳).

### منابع

۱. لطیفیان، م. ۱۳۹۱. بررسی اثر فرمولاسیون قارچ *Beauveria bassiana* با روغن‌های گیاهی مختلف و ترکیب شیمیایی آن‌ها بر قدرت کشندگی آن در جمعیت شیشه دندانه دار *Oryzaephilus surinaemensis* در ترکیب شرایط تغذیه از خرما. گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، ۳۵(۳): ۴۵-۵۷.
2. Aliconada, T.M., and Patrica, M.J. 2006. Acyl-coA oxidase activity from *Beauveria bassiana* an entomopathogenic fungus. *Journal basic microbiology*, 46(6):435-443.
3. Bukhari, T. Takken, W., and Koenraadt, C.J. 2011. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasites & Vectors*. 4: 23-29.
4. Connik, W., Lewis, J.A., and. Quimby, P.C 1990. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. In: Baker, P. R. and Dunn, P. E. (eds) *New directions in biocontrol*. Alan Liss, New York. pp: 345-732.
5. Consolo, V.F., Salerno, G.L., and Beron, C.M. 2003. Pathogenecity formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. *Biocontrol*, 48: 705-712.

6. Christopher, C.J., and Stenkraus, D.C. 2003. Evaluation of three formulations for control of Lesser mealworm and hide beetle in Georgia poultry houses. *Ecological Entomology*, 96(5): 1602-1607.
7. Delgado, F.X., Lobo-Lima, M.L., Bradley, C., Britton, J.H., Henry, J.E., and SweAaringen, W. 1997. Laboratoty and field evaluations of *Beauveria bassiana* against grasshopper and locusts in Africa. *Memoris of Entomological Society of Canada*, 171: 239-251.
8. Feng, M.G., Pu, X.Y., Ying, S.H., and Wang, Y.G. 2004. Field trials of an oil-based emulsifiable formulation of *Beauveria bassiana* conidia and low application rates of imidacloprid for control of false-eye leafhopper *Empoasca vitis* in southern China. *Crop Protection*, 23:489-496.
9. Gillespie, J.P., Bateman, R., and Charnley, A.K. 1998. Role of cuticle degrading protease in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71(2): 128-137.
10. Hong, T.D., Gunn, J., Ellis, R.H., Jenkins, N.E., and Moore, D. 2001. The effect of storage environment on the longevity of *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*, 105: 597-602.
11. Hong, T.D., Ellis, R.H., and Moore, D. 1997. Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity, *Annals of Botany*, 79:121-128.
12. Jenkins, N.E., Heviefo, G., Langewald J., Cherry, A.J., and Lomer, C.J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*, 19 (1) 29-39
13. Kassa, A. 2003. Development and testing of mycoinsecticides based on submerged spores and aerial conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of locusts, grasshoppers and storage pests. Ph.D Thesis. Chap. 4. Gottingen University, Germany, 2003.
14. Liu, Q., Ying, S.H., and Feng, M.G. 2009. Physiological implication of intracellular trehalose and mannitol changes in response of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to thermal stress. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95: 65-67.
15. Lomer, C.H., and Lomer, C.J. 1999. Formulation and application of mycopathogenes. In: Lomer, C.H. and C.J. Lomer (eds.). *Insect pathology Manual*. seclV. [on line] Available on <http://www.lobilosa>. Org. pp: 1-45.
16. Mohan, C.M., Lakshmi, K.A., and Deri, K.U. 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta Americana*). *Bicontrol Society of Technology*, 9: 29-33.
17. Moore, D., and Prior, C.1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Information*, 14(2): 331-340.

18. Quedraogo A., Fargues J., Goettel M.S., and Lomer, C.J. 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*, 137 (1): 37–43.
19. Santiago-Alvarez, C.E. Maranhao, A., and Moraga, E.Q. 2006. Host plant influences pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Bemisia tabaci* and its sporulation on cadavers. *Biocontrol*, 51: 519-532.
20. Stathers, T.E., Moore, D., and Prior, C. 1993. The effect of different temperatures on the stability of *Metarhizium flavoviride* conidia. Stored in vegetable and mineral oils. *Journal of invertebrate pathology*, 62: 111-5.
21. Stephan, D., and Zimmermann, G. 2001. Locust control with *Metarhizium flavoviride* : drying and formulation of submerged spores. In EUR 19692 – COST action 830 – Formulation of microbial inoculants ed. Koch, E. and Leinonen, pp: 27–34
22. Stokes, M.E., Davis, C.S., and Koch, G.G. 2000. Categorical data analysis using the SAS System. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
23. Szebellede, L., Tanny, J., and Analyt, Z. 1936. Teil analysis Nahrungs fette. *Belin*. pp: 45-47.
24. Tanada, Y., and Kaya. H.K. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, London, 666 p.
25. Thomas, K.C., Khachatourians, G.G., and Langedew. W.M. 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 12-20
26. Wang, C.S., Wang, S., Fan, M.Z., and Li, Z.Z. 1999. Relationship between shelf-life and heat tolerance of the conidia of *Beauveria bassiana*. *Chinese Journal of biological Control*, 15: 162–165.
27. Wraight, S.P., Jackson, M.A., and de Kock, S.L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biological agents. In Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N. Wallingford (eds.) *Fungi as Biocontrol Agents*. CAB International, pp: 253–287
28. Yin, F.M. 1981. Screening and application of ultra low volume diluent of *Beauveria bassiana* preparation. *Forest Science of Technology (LinYE Keji Tongscum)*, 11: 25-8.