تأثير بعض المصادر الكاربونية في بعض معايير نمو الفطر *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill.

حسين مكطوف ديوان، *منى حمودي خماس

قسم المكافحة الاحيائية للامراض النباتية، مركز المكافحة المتكاملة، دائرة البحوث الزراعية، وزارة العلوم والتكنولوجيا. بغداد-العراق.

*قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد. بغداد-العراق.

الملخص

تضمنت الدراسة اختبار تاثير سبعة مصادر كاربونية ؛ الكلوكوز و السكروز والنشا المذاب والبكتين و الدبس و مستخلص بذور الحنطة و مستخلص حبوب الرز ضمن اوساط زرعية سائلة كل على حـدة فـي بعض معايير نمو الفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vill (التبوغ و النسبة المئوية للانبات والوزن الجاف للكتلة الحيوية) لاربع مدد من الحضن ؛ 1 و2 و3 و4 ايام عند درجة حـرارة 28 ±1م.اسـتخدمت المصادر الكاربونية في تحضير الاوساط الزرعية على اساس تركيز الكاربون (8غـم/لتـر) . اوضـحت النتائج تفوق سكر الكلوكوز ومستخلص حبوب الرز و مستخلص بذور الحنطة بصورة معنوية($P<0.05$) على بقية المصادر الكاربونية في تبويغ الفطر والذي بلغ معدله 67 و69و68×10^5 بوغ/مل على التـوالي بعد اربعة ايام من الحضن. كما تفوق النشا المذاب بصورة معنوية($P<0.05$) على بقية المصادر الكاربونية في حث ابواغ الفطرعلى الانبات اذ بلغت النسبة المئوية لانباتها 24.3% بعد اربعة ايام من الحضن . كما اوضحت النتائج تفوق مستخلص حبوب الرز بصورة معنوية($P<0.05$) على بقية المصادر الكاربونية في تحفيز الفطر على انتاج الكتلة الحيوية اذ بلغ معدل وزنها الجاف 0.507 غ/50مل بعد اربعـة ايـام مـن الحضن .ومن ناحية اخرى كان البكتين و النشا المذاب اقل المصادر الكاربونية كفاءة فـي تبويـغ الفطـر والذي بلغ معدله 19 و 30 ×10^5 بوغ/مل على التوالي بعد اربعة ايام من الحضن، فيما كان النشا المذاب الاقل كفاءة في تحفيز الفطر على انتاج الكتلة الحيوية(وزنها الجاف0.2غ/50مل).

THE EFFECT OF SOME CARBON SOURCES ON GROWTH PARAMETERS OF THE *BEAUVRIA BASSIANA* (BALS.)VUILL

Hussein Magtoff Diwan, *Muna Hemudi Khamas

Department of Biological Control of Plant Pathogens, Center of Integrated Control, Directorate of Agricultural Research, Ministry of Science & Technology. Baghdad - Iraq.

*Department of Biology, College of Science, University of Baghdad. Baghdad - Iraq.

Abstract

Seven carbon sources; Glucose,Sucrose,Soluble starch,Pectine,Dibis,Wheat seeds extract and Rice grains extract extract individually incorporated in different liquid media were evaluated for their effects on sporulation,percent of spores germination and fungal biomass dry weight of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for four incubation periods ;1,2,3 and 4days at 28±1c. Carbon used in the basal medium as 8g/l.The results showed that glucose,rice grains extract,wheat seeds extract were significantely superior($p<0.05$) to induce the fungal sporulation which recorded 67,69,68×10^5spore/ml after 4 days of incubation, respectively.Soluble starch was

more efficiency for spores germination,whereas the percent of spores germination was 24.3 after 4 days of incubation. Rice grains extract increased significantly the dry weight of fungus which recorded 0.507g/ml after 4days of incubation.Pectine,soluble starch,sodium nitrate,methionin and glycin were less efficiency for biomass production(0.2g/50ml).

المقدمـة

هنالك اهتمام متزايد بموضوع الانتاج الواسـع للفطر *Beauveria bassiana* لما له من ميزات مهمة اهلت استخدامه كعامل للمكافحة الإحيائيـة للآفـات الحشـرية، اذ استخدمت تقانات عدة لإنتاج لقاح هذا الفطـر(1، 2) . تنـتج الكويندات الهوائية لهذا الفطر في الاوساط الزرعية الصـلبة (3) فيما تنتج بلاستوسبوراته وابواغه المغمورة في الاوسـاط الزرعية السائلة (4) .ان اول انتاج لهذا الفطر بصورة تجارية كان في منتصف القرن العشـرين فـي روسـيا والبرازيـل واستراليا وفرنسا والولايات المتحدة الامريكية (5) وان اشهر منتجاته الحيويـة المعروفـة هـو مبيـد الـ Boverin و Mycotrol (6) . تهدف عملية انتاج الفطر*B . bassiana* الى الحصول على اكبر كمية ممكنة من الوحدات التكاثريـة الحية المتمثلة بالابواغ او قطع من الغزل الفطري والاجسـام الهايفية(عبارة عن اجسام فطرية وحيدة الخلية) ذات الفعاليـة التي تدخل في انتاج مستحضراته الاحيائية واستخدمت لهـذا الغرض العديد من المصادر الكربونيـة التـي تعـد احـدى المتطلبات الرئيسة لانبات ابواغ الفطـر *B .bassiana* (7) وانتاج الطاقة للكائنات الحية الاخرى(8). بصورة عامة تعـد السكريات الاحادية و السكريات الثنائية اكثر كفاءة وفعالية في نمو الفطريات، اذ يحفز الكلوكـوز والمـانوز والتريهـالوز وجميعها من السكريات الاحادية من النمو الخضري لمعظـم عزلات فطريات المكافحة الاحيائية وكـذلك الحـال بالنسـبة للفركتوز والزايلوز والمالتوز والسكروز وهي سكريات ثنائية ومصادر كربونية جيدة اسوة بالسكريات الاحادية التي كان لها اثرها الايجابي والمتفوق في نمو فطريات المكافحة الاحيائيـة وخصوصا السكروز الذي تميز بتفوقه على بقيـة المصـادر الكاربونية في تحفيز الفطر *B. bassiana* العزلـة (IBC 1201) على النمو الخضري (5). لكن قد يـؤثر الكلوكـوز سلبيا في انتاج انواع معينة من الابـواغ Specific spores ومنهـا البلاستوسـبورات اذ وجـد (9) عـدم تكـون البلاستوسبورات للفطـر *B. bassiana* بعد تنميتـه علـى الوسط الزرعي السائل الذي يتكون من الكلوكوز فقط ولم يعط تفسيرا لذلك .تعد انواع الحبوب النجيلية والنشأ من المصـادر الكربونية الملائمة اقتصاديا اذا ما اخذ بنظر الاعتبار الفائـدة الاقتصادية للمنتوج الحيوي المستحصـل عليـه (9، 10)،اذ استخدمت المنتجات الزراعية مثل النشأ (نشأ الذرة وطحـين الذرة Corn flour ومستخلص نقيع الذرة) والرز والحنطـة بكميات كبيرة وبصورة واسعة لرخصها وتوافرها في معظـم انحاء العالم (11، 10). استخدم الرز بشكل واسع في بلـدان عديدة من العالم خصوصا دول جنوب شـرق اسـيا كوسـط زرعي كفوء ورخيص الثمن وذا محتـوى غـذائي متـوازن لانتاج بعض فطريات المكافحة الاحيائية للحشـرات ومنهـا الفطـر *B . bassiana* (12، 13، 14) . بـين (5) أثـر البكتين الايجابي في زيادة معـدل النمـو والفطـري للفطـر *Paecilomyces lilacinus* (السـلالةIPC-P) و *Sterile hyphum* (العزلة ARF907) المسـتعملة ضـد الديـدان الثعبانيـــــة *Meliodgyne incognita* و *glycines Heterodera* وأزديـاد معـدل الانتـاج للكتلـة الحيويـة للفطر*Trichoderma viride*، وبينت نتائجها ايضا سـهولة اســتغلال البكتــين مــن لــدن الفطــر *Pochnia chlamydosporia* (HSY-12-14) وحثه في انتاج الابواغ بكميات جيدة.

يعتمد اختيار المصدر الكربوني على مدى ملاءمته للانتاج الواسع المطلوب فضلا عن وفرته ونوعيته وتكلفته (9)، لـذا تم اختيارنا لمصادر كاربونية متداولـة محليـا علـى شـكل مستخلصات مائية (مستخلص بـذور الحنطـة و مسـتخلص حبوب الرز) وعصير التمر المركـز(الـدبس) و مقارنتهـا بمصادر كاربونية اخرى جاهزة مختلفة في كفاءتها لدعم نمو الفطر *B. bassiana*.

المواد وطرائق العمل

الفطـــر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill وتحضير لقاحه الفطري

استخدمت في هذه الدراسـة عزلـة مـن الفطـر *B. bassiana* تم الحصول عليها من كلية الزراعـة - جامعـة بغداد - قسم وقاية النبات و نشطت على الوسـط الزرعـي اجار مستخلص البطاطا سكروز (PSA) معقم محضـر فـي

عدد من أطباق بتري، وحفظت الاطباق في الثلاجة لمدة اسبوع لغرض استعمالها في تنفيذ التجارب.

حضر اللقاح الفطري (معلق الابواغ) للفطر *B. bassiana* من غمر المستعمرات النامية على الوسط الزرعي PDA (عمر المستعمرات 10 ايام) بـ 10 مل من محلول تويين 20 المعقم (0.05%) وفق الطريقة الموصوفة من لدن (5)، وتم حصد الابواغ وضبط تركيزها على (2.3×10^6 بوغ/مل) باستعمال شريحة عد الابواغ Haemocytometer وفقا للمعادلة التالية:

معدل عدد الابواغ/مل = معدل عدد الابواغ في المربع (0.2 × 0.2 ملم) × 25 × 10^4× مقلوب التخفيف

تحضير الاوساط الزرعية السائلة ذات المصادر الكربونية المختلفة

اتبعت طريقة (5) في تحضيرالاوساط الزرعية السائلة التي تتكون من الحلول الملحي الاساس بمصادر الذي يحتوي على (1غم) K2HPO4 و(0.5غم) MgSO4 و(0.5 غم) KCl و(0.01 غم) FeSO4 ولتر من الماء المقطر و(100 ppm) كلورومفنيكول.

حضرت الاوساط الزرعية باضافة المصادر الكاربونية؛ الكلوكوز(20غم) والسكروز(10غم) والنشا المذاب (22.2غم) والبكتين (22.6غم) والدبس (28.6غم) ومستخلص بذور الحنطة(٤٠غم) ومستخلص حبوب الرز(36.4غم) تم حساب هذه التراكيز استنادا الى المصادر(15، 16). تم ضبط الدالة الهيدروجينية للاوساط الزرعية عند pH 6.5 باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم 1N NaOH او حامض الهايدروكلوريك المركز 1N HCl.

اختبار تاثير المصادر الكاربونية في معايير نمو و الفطر *Beauveria bassiana*:

لاختبار تاثير المصادر الكاربونية في تبوغ الفطر و النسبة المئوية لانبات ابواغه والوزن الجاف لكتلته الحيوية، تم توزيع الاوساط الزرعية السائلة في قناني زجاجية بمعدل 50مل/قنينة وبواقع ثلاثة مكررات/وسط زرعي. وبعد تعقيم الاوساط الزرعية بجهاز الموصدة وتبريدها تحت ظروف المختبر تم اضافة اللقاح الفطري بمعدل مل واحد/قنينة ووضعت القناني في حاضنة هزازة عند درجة حرارة 28±1م واخذت القراءات بعد 1 و 2 و 3 و4 ايام من الحضن.

ولحساب عدد الابواغ الكلي في واحد مل/مزرعة فطرية اتبعت طريقة (10) والتي تتلخص باضافة قطرة من كل مزرعة فطرية بعد كل مدة حضن في حقل الفحص الخاص بشريحة عد الابواغ haemocytometer وباستعمال المجهر الضوئي المركب امكن حساب عدد الابواغ الكلي وعدد الابواغ النابتة في خمسة مربعات بطريقة AB ووفقا للمعادلة الخاصة بحساب الابواغ الموصوفة في المصدر اعلاه، وفي الوقت ذاته وبالطريقة نفسها تم استخراج النسبة المئوية لانبات الابواغ، اذ تم حساب عدد الابواغ النابتة وتقسيمها على العدد الكلي للابواغ في المربعات الخمس وضرب الناتج في مئة.كما تم حساب الوزن الجاف للكتلة الحيوية للفطر *B. bassiana* لكل معاملة ووفقا للطريقة الموصوفة في المصدر(17).

التحليل الإحصائي

تم تحليل النتائج باستعمال البرنامج الجاهز SPSS عند مستوى احتمالية (p=0.05).

النتائج والمناقشة

تأثير المصادر الكربونية في تبوغ الفطر *Beauveria bassiana*

بيّنت النتائج في (الجدول 1) تفوق الكلوكوز والسكروز بصورة معنوية($P < 0.05$) على بقية المصادر الكاربونية في تحفيز الفطر *B. bassiana* على انتاج الابواغ بعد يوم واحد من الحضن، اذ بلغ معدل الانتاج 17 × 10^5 بوغ / مل، وارتفع معدل الإنتاج تحت تاثيرهما بعد يومين من الحضن الى 36 و 33 × 10^5 بوغ / مل، على التوالي. كما تفوق الكلوكوز بعد ثلاثة ايام من الحضن بصورة معنوية على النشا المذاب والبكتين والدبس في تحفيز الفطر *B . bassiana* على انتاج الابواغ اذ بلغ معدل انتاجه 43 × 10^5 بوغ / مل و 21 × 10^5 بوغ / مل و11 × 10^5 بوغ / مل و 15 × 10^5 بوغ / مل، فيما اثر الكلوكوز و مستخلص حبوب الرز ومستخلص بذور الحنطة بمستوى أعلى ($P < 0.05$) في معدل انتاج الابواغ (67 و 69و 68 × 10^5 بوغ / مل) على التوالي بعد اربعة ايام من الحضن مقارنة بتاثير السكروز والنشا المذاب والبكتين والدبس، اذ بلغ معدل إنتاج الفطر للابواغ 50 و 30 و 19 و 50 × 10^5 بوغ / مل، على التوالي.

كما لوحظ من النتائج، أن الفطر ازدادت قابليته على انتاج الابواغ بعد اربعة ايام من الحضن بما يعادل ثلاثة مرات من

إنتاجه بعد ثلاثة ايام من الحضن في الوسط الزرعي المـ زود بالدبس.

جدول ١: تأثير بعض المصادر الكاربوينة في القابلية على التبوغ والنسبة المئوية لإنبات الابواغ والوزن الجاف للفطر *B. bassiana* بعد مدد حضن مختلفة عند درجة حرارة 28±1 م°

المصدر الكربوني	معيار النمو	1 يوم	2 يوم	3 يوم	4 يوم
كلوكوز	انتاج الابواغ ×10³ ابوغ/مل	C 16.7 ᵃ ± 4.40	B 35.8ᵃᵇ ± 2.20	B 43.3ᵃᵇ ± 1.66	A 66.7ᵃ ± 7.26
	نسبة الانبات %	A 3.3ᵃ ± 3.3	A 15.4ᵃ ± 7.98	A 15.3ᵃ ± 1.4	A 4.4ᵈ ± 2.73
	الوزن الجاف غ/50مل	C 0.233ᵃ ± 0.00	B 0.350ᵃ ± 0.00	B 0.387ᵃ ± 0.00	A 0.443ᵇ ± 0.02
سكروز	انتاج الابواغ ×10³ ابوغ/مل	C 16.7ᵃ ± 4.16	B 32.5ᵃ ± 3.81	B 36.7ᵇ ± 3.33	A 50ᵇ ± 1.44
	نسبة الانبات %	A 6.7ᵃ ± 6.66	A 10.5ᵃ ± 6.18	A 20.4ᵃ ± 3.39	A 8.3ᵇ ± 1.49
	الوزن الجاف غ/50مل	D 0.100ᵇ ± 0.01	C 0.220ᵇ ± 0.00	B 0.313ᵇ ± 0.04	A 0.393ᶜ ± 0.00
نشا	انتاج الابواغ ×10³ ابوغ/مل	C 1.9ᵇᶜ ± 0.22	B 18.3ᵇᶜ ± 0.06	B 21.4ᶜ ± 2.03	A 29.7ᶜ ± 2.95
	نسبة الانبات %	A 21.3ᵃ ± 2.43	B 2.7ᵃ ± 1.55	15.6ᵃA ± 7.2B	A 24.3ᵃ ± 3.73
	الوزن الجاف غ/50مل	D 0.043ᶜ ± 0.00	C 0.123ᶜ ± 0.00	B 0.190ᶜ ± 0.00	A 0.200ᵈ ± 0.00
بكتين	انتاج الابواغ ×10³ ابوغ/مل	C 2.2ᵇ ± 0.57	B 9.5ᶜ ± 0.14	B 10.9ᶜ ± 0.37	A 19.4ᶜ ± 3.13
	نسبة الانبات %	A 6.9ᵃ ± 6.9	A 4.4ᵃ ± 3.15	A 4.4ᵃ ± 2.21	A 3.3ᶜ ± 2.14
	الوزن الجاف غ/50مل	C 0.193ᵃ ± 0.04	B 0.300ᵃ ± 0.01	A 0.363ᵃ ± 0.00	A 0.423ᵇ ± 0.01
دبس	انتاج الابواغ ×10³ ابوغ/مل	B 3.1ᵇ ± 2.9	B 11.6ᶜ ± 0.52	B 14.9ᶜ ± 1.36	A 44.9ᵇ ± 5.03
	نسبة الانبات %	A 16.0 ᵃ ± 8.30	A 4.2ᵃ ± 2.72	A 28.5ᵃ ± 15.06	A 12.5ᵇ ± 2.7
	الوزن الجاف غ/50مل	B 0.240ᵃ ± 0.00	B 0.283ᵃ ± 0.00	A 0.403ᵃ ± 0.02	A 0.370ᶜ ± 0.02
مستخلص حبوب الرز	انتاج الابواغ ×10³ ابوغ/مل	D 3.0ᵇ ± 0.57	C 23.7ᵇ ± 2.68	B 55.8ᵃ ± 6.00	A 69.1ᵃ ± 2.52
	نسبة الانبات %	A 16.0ᵃ ± 1.85	B 1.7ᵃ ± 1.66	AB 8.1ᵃ ± 3.86	AB 9.7ᵇ ± 2.46
	الوزن الجاف غ/50مل	D 0.080ᵇᶜ ± 0.00	C 0.203ᵇᶜ ± 0.01	B 0.410ᵃ ± 0.03	A 0.507ᵃ ± 0.02
مستخلص بذور الحنطة	انتاج الابواغ ×10³ ابوغ/مل	C 1.7ᵇ ± 0.16	C 13.3ᶜ ± 1.49	B 50.8ᵃ ± 8.45	A 67.5ᵃ ± 2.50
	نسبة الانبات %	A 11.1ᵃ ± 11.1	A 19.6ᵃ ± 7.1	A 7.7ᵃ ± 1.72	A 9.8ᵇ ± 0.9
	الوزن الجاف غ/50مل	D 0.040ᶜ ± 0.00	C 0.123ᶜ ± 0.00	B 0.363ᵃ ± 0.03	A 0.447ᵇ ± 0.00

***الحروف الصغيرة للمقارنة بين المعاملات ضمن العمود الواحد والحروف الكبيرة للمقارنة بين المعاملات ضمن الصف الواحد لكـل مصـدر كاربوني.**

كما تفوق مستخلص حبوب الرز ومستخلص بذور الحنطة بعد ثلاثة ايام من الحضن بصورة معنوية ($P<0.05$) في تحفيز الفطر على انتاج الابواغ الذي بلغ معدله 56×10^5 بوغ / مل و 51×10^5 بوغ / مل على التوالي مقارنة ببقية المصادر الكاربونية باستثناء الكلوكوز الذي لم يفرق عنهما معنويا والذي حقق الفطر بتاثيره معدل تبوغ 43×10^5 بوغ/مل. ففيما يخص تاثير الكلوكوز والسكروز في تبوغ الفطر *B . bassiana* لوحظ خلال الفحص المجهري بعد يوم من الحضن وجود كمية لا بأس بها من الأبواغ النابتة يرافقها عدد كبير من الأبواغ الكروية global spores المنتفخة ذات الحجم الكبير التي عادلت ضعف حجم الأبواغ الباقية المتواجدة في حقل الفحص المجهري وطابقت هذه النتيجة والملاحظة بعض ما تم تسجيله من لدن (9) من ملاحظات و نتائج خلال دراستهم لتاثير بعض المصادر الكاربونية والنايتروجينية في مراحل نمو الفطر *B . bassiana* إذ اظهرت الدراسة حصول زيادة في حجم ابواغ الفطر (تراوحت بين 30 – 100%) بعد 12 ساعة من مدة حضنها في الوسط الزرعي السائل المزود بالكلوكوز فقط قياسا الى حجمها بعد 6 ساعات من مدة حضنها في الوسط نفسه ، وذكر (18) أنه على العموم يعد الكلوكوز ضروريا لانتفاخ الأبواغ في العديد من الفطريات مما يوحي بأن النشاط الأيضي ضروري في عملية امتصاص الماء وأن الكونيدات الكبيرة Macroconidia للفطر *Fusarium SP* يمكن أن تصل إلى أقصى مستوى من الانتفاخ فقط عند وجود الكلوكوز ومصدر نيتروجيني . أما فيما يخص ضعف قابلية الفطر *B . bassiana* على انتاج الابواغ في الأوساط الزرعية السائلة المزودة بالبكتين والمزودة بالنشا المذاب فانه يدل على محدودية هذا الفطر في استخدام هذين المصدرين الكاربونيين، وتوافقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (5) التي أظهرت نتائجهما خفضا في معدلات إنتاج الأبواغ للفطر *B. bassiana* المنمى في الأوساط السائلة المزودة بالبكتين والنشا كل على حدة والتي بلغت 15.1 و 29.4×10^7 بوغ / مستعمرة ، على التوالي . مقارنة بالسكريات سداسية الكاربون

قد يعود سبب تفوق الفطر في إنتاج الأبواغ في الأوساط التي تحتوي على مستخلص حبوب الرز ومستخلص بذور الحنطة إلى ما يتميز به هذين المصدرين الكاربونيين من مكونات تختلف عن بقية المصادر الأخرى فهما فضلا عما تشكله فيهما الكاربوهيدرات من نسبة معتدلة (55% و 50%) على التوالي (على وفق التحليل المختبري الذي تم إجراؤه وفق طريقة (15) فانهما يحتويان ايضا على كمية كبيرة من البروتينات تم تقديرها من لدن المختبر المركزي العائد لقسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة بغداد وفقا لطريقة (16)إذ بلغت كمية البروتينات في مستخلص حبوب الرز (42.5 مايكروغرام/مل) وفي مستخلص بذور الحنطة (46 مايكروغرام/مل)، وقد أيدت هذه النتائج البيانات التي قدمها (26) خلال دراستهما والتي بينا فيها تفوق الرز والحنطة كأوساط زرعية سائلة في تحفيز فطريات المكافحة الاحيائية *Metarhizium anisopliae* و *Nomuraea rileyi* و *B . bassiana* على إنتاج الأبواغ بكميات كبيرة اذ حققت معدل تبوغ $0.03 \pm 0.01 \times 10^8$ و $0.01 \pm 1.1 \times 10^8$ بوغ / مل و $0.1 \pm 4.3 \times 10^8$ بوغ / مل ، على التوالي ، كما جاءت هذه النتائج مطابقة لما توصل إليه (3) اللاذان أكدا تفوق الرز (كوسط زرعي صلب) في استحثاث الفطر *B. bassiana* و *B. brongniartii* على إنتاج الابواغ أذ حققا اعلى معدل من الانتاج والذي بلغ 4.38×10^9 بوغ / غم من الوزن الجاف و 3×10^9 بوغ/ غم من الوزن الجاف، على التوالي.

إن هذا التفوق لهذين المصدرين الكاربونيين (مستخلص حبوب الرز ومستخلص بذور الحنطة) يؤكد على أهمية وجود البروتينات والأملاح والفيتامينات في تركيبهما ودورها المهم في دعم المصادر الكاربونية النقية لتحفيز الفطر *B . bassiana* على إنتاج الأبواغ بكميات اكبر. وعلى العموم يمكن الاستنتاج أن هذه الاختلافات الواضحة في كمية إنتاج الأبواغ يعود بالدرجة الاساس إلى الطبيعة التركيبية المختلفة لكل مصدر كاربوني ومميزاته التي تؤهله أو لا تؤهله لدعم إنتاج الأبواغ بالمستوى المطلوب .

تأثير المصادر الكربونية في النسبة المئوية لإنبات ابواغ الفطر *B . bassiana*

بينت النتائج في (الجدول 1) تباين المصادر الكربونية في مستوى تأثيرها على نسبة إنبات ابواغ الفطر *B . bassiana* ، كما بينت النتائج ايضا ان لمدد الحضن المختلفة تاثير في ذلك،ففي اليوم الاول من الحضن تفوق النشا المذاب على بقية المصادر الكاربونية في مستوى تحفيزه لابواغ الفطر على الانبات (21.3%) غير انه انخفض هذا المستوى بعد 2 و3 ايام من الحضن اذ بلغت نسبة الانبات

لابواغ الفطر2.7% و15.6%على التوالي فيما استعادت ابواغ الفطر تفوقها في تحقيق نسبة انبات عالية بوجود النشا بعد اربعة ايام من الحضن والتي بلغت 24.3%. وتفوق مستخلص بذور الحنطة بعد يومين من الحضن على بقية المصادر الكاربونية في تحفيز ابواغ الفطر على الانبات الذي بلغت نسبته 19.6% كما اظهرالدبس كفاءة عالية في تحفيز ابواغ الفطر على الانبات بنسبة اعلى (28.5%) قياسا الى بقية المصادر الكاربونية التي اظهرت كفاءة اقل.

قد تعد نسب الإنبات المنخفضة لابواغ الفطر امام العدد الكبير من الابواغ المنتجة مؤشرا جيدا على اتباع الفطر مسلكا آخرا ومختصرا لانتاج البلاستوسبورات وذلك اما بطريقة تبرعم خيوط الغزل الفطري اوانتاج الابواغ من البلاستوسبورات نفسها بطريقة تدعى microcycle conidiation في أوساط زرعية معينة(7، 20، 21، 22) وقد لا ينطبق ذلك في بعض الاوساط الزرعية الأخرى كما موضح في (الجدول 1). وعلى الرغم مما قد يبدو ذلك حالة غير مطلقة ولا يمكن تعميمها على كل القيم أو النسب % بسبب عدم إمكانية تفسيرها إلا في حدود الظروف الغذائية الخاصة بكل وسط زرعي ومدة حضن معينة ويبدو ذلك من الممكن في حال توافر المحفزات الغذائية او بعض المواد الايضية الثانوية المؤثرة في داخل الاوساط الزرعية (23) بعد مدة حضن معينة إذ بدا ذلك واضحا في انخفاض نسبة انبات ابواغ الفطر في الوسط الزرعي المزود بالكلوكوز بعد 2 و4 ايام من الحضن الى 3.3% و 4.4% على التوالي والذي قابل ذلك ارتفاع في معدل التبوغ في الوسط والمدد نفسها ، كما لوحظ ذلك ايضا في نسبة الإنبات المنخفضة لابواغ الفطر في الوسط المزود بالسكروز بعد 1 و4 ايام من الحضن والتي بلغت 6.7% و 8.3%، على التوالي والتي سجل الفطر في غضون ذلك مستويات عالية من إنتاج الأبواغ وتكرر الحال في الوسط المزود بالدبس اذ سجلت ابواغ الفطر بعد يومين من الحضن نسبة إنبات منخفضة 4.2% قابلها زيادة في معدل التبوغ وقد ازداد وضوح مثل هذه العلاقة في الوسط المزود بالنشا المذاب ، إذ كانت نسبة إنبات الفطر عالية والتي بلغت 21.3% قابلها انخفاض كبير($P < 0.05$) في معدل التبوغ للفطر في الوسط الزرعي نفسه ومدة الحضن نفسها، وقد لوحظت هذه الحالة ايضا بعد تنمية الفطر في الاوساط الزرعية المزودة بمستخلص حبوب الرز ومستخلص بذور الحنطة اذ سجل الفطر نسبة مرتفعة من الانبات بعد يوم واحد من الحضن والتي بلغت 16.6% و 11.1% على التوالي في حين كان هنالك انخفاض في معدل انتاج الابواغ .

وعلى ما يبدو من النتائج يصعب الاعتماد بصورة قاطعة على نسب الإنبات ضمن ظروف بيئية داخلية متغيرة في تقويم الاوساط الزرعية السائلة لغرض استخدامها في مجال الإنتاج الواسع للفطر *B. bassiana* بسبب تذبذبها نتيجة للتغايرات المحتملة قي كميات او تراكيز بعض المواد الثانوية المفرزة (المؤثرة سلبا ام ايجابا) من الفطر نتيجة لنشاطه الحيوي والتي يعتمد طبيعة تركيبها على نوع المصدر الكاربوني المدخل في كل وسط زرعي، إذ أكد (9) إن الفطر *B. bassiana* يفرز نتيجة لنشاطه الحيوي عددا من السموم الفطرية والتي منها Bassianolide أو بعض الأنزيمات خارج خلوية التي أحدثت خلال تجربته تغايرا مظهريا للفطر، كما أكدت (24) في دراستها أن قسما من البلاستوسبورات تعاني من التحلل الذاتي وفقدان للقدرة على الإنبات نتيجة لتفاقم عدد الأبواغ المنتجة.

تأثير المصادر الكربونية في الوزن الجاف للفطر *B. bassiana*

بينت النتائج في (الجدول 1) تباين معدلات الكتلة الحية المنتجة للفطر *B. bassiana* خلال مدد الحضن المختلفة، تبعا لنوع المصادر الكاربونية المدخلة في الأوساط الزرعية السائلة وتبعا لكل مدة حضن. إذ أوضحت النتائج أن الفطر قد حافظ على كتلته الحيوية خلال مدد الحضن الاربع بمستوى متفوق ($P < 0.05$) في الوسط الزرعي المزود بالكلوكوز (بلغ معدل وزنه الجاف 0.233 و 0.350 و 0.387 و0.443غم/ 50 مل) والوسط الزرعي المزود بالبكتين (بلغ معدل وزنه الجاف 0.193 و 0.300 و 0.363 و0.423غم / 50 مل) بعد 1 و2 و3و4 ايام من الحضن على التوالي.

كما تفوق الدبس بصورة معنوية ($P < 0.05$) على بقية المصادر الكاربونية في تحفيز الفطر على انتاج الكتلة الحية بعد 1 و3 ايام من الحضن اذ بلغ معدل الوزن الجاف للفطر 0.240 و 0.403 غم / 50 مل ، على التوالي. أما فيما يخص مستخلص بذور الحنطة ومستخلص حبوب الرز فأنهما لم يظهرا اي تفوق معنوي في تحفيز الفطرعلى انتاج الكتلة الحية إلا بعد 3 و4 ايام من الحضن إذ بلغ معدل الوزن الجاف للفطر في الوسط الزرعي الذي يحتوي على مستخلص بذور

الحنطة 0.363 و 0.447 غم / 50 مل على التوالي وفي الوسط الذي يحتوي على مستخلص حبوب الرز 0.41 و 0.507 غم / 50 مل، على التوالي. كما أظهرت النتائج أن السكروز والنشا المذاب بعد 1 و3 ايام من الحضن لم يكونا بالمستوى المطلوب لتحفيز الفطر على إنتاج الكتلة الحية اذ كان معدل الوزن الجاف للفطر منخفضا بشكل معنوي مقارنة ببقية المصادر الكاربونية . وبصورة عامة أظهرت النتائج أزدياد الأوزان الجافة للفطر طيلة بقاءه في الاوساط الزرعية وأن أعلى معدل لها كان بعد ٤ ايام من الحضن والذي بلغ ذروته ($P < 0.05$) في الاوساط التي تحتوي على مستخلص حبوب الرز(0.507 غم/50مل)ومستخلص بذور الحنطة (0.447غم/50مل) والكلوكوز (0.443غم/50مل) وكما موضح في (الجدول1).

على الرغم من تشابه النشأ والبكتين كونهما يحتويان على نسبة عالية من الاميلوبكتين اذ يشكل الأخير نسبة 65 – 85 % في النشأ والباقي 16 – 30% عبارة عن أميلوز (25). تفوق الفطر بصورة معنوية في إنتاجه للكتلة الحية بعد 1 و2 و3 ايام من الحضن وقد يعود سبب حالة التفوق هذه إلى وجود بعض السكريات المهمة والمحفزة للنمو الخضري في البكتين ومنها Galactose، xylans ، mannan ، Arabinose (24) والتي ربما يفتقد إليها النشأ، أما فيما يخص تفوق $P < 0.05$ تاثير مستخلص حبوب الرز في زيادة الوزن الجاف للفطر فيعود السبب إلى الزيادة في كمية الكتلة الحية وعدد الأبواغ المنتجة في الوسط الزرعي السائل ومن بينها نسبة عالية من البلاستوسبورات والأجسام الهايفية التي رافقت نشوء الفطر خصوصا بعد 3و 4ايام من الحضن .إن هاتين الصفتين التي تمثلت بإنتاج الكتل الحية النموذجية للفطر *B . bassiana* والأعداد الهائلة من الأبواغ في الاوساط الزرعية التي تحتوي اما على مستخلص حبوب الرز او مستخلص بذور الحنطة تشجع أن يكونا موضعا اهتمام في إنتاج اللقاحات الفطرية التي تضاف إلى أوساط التخمر للإنتاج الموسع وأن ما يؤيد هذا الرأي هو لجوء الكثير من البـاحثين إلى استخدام حبوب الرز كوسط زرعي لانتاج الفطريات *B . bassiana* و *M. anisopliae* و *P. fumosoroseus* وإجراء اختباراتهم على أوساط زرعية من مخلفات زراعية مختلفة (26) ليس لتنمية الفطر *B . bassiana* فقط وإنما لتنمية فطريات اخرى ومنها الفطر *Trichoderma spp.* خصوصا إذا كانت هذه المخلفات مصدرها من أوساط ثبت كفاءتها في إنتاج الفطر ولكنها مكلفة من الناحية الاقتصادية .اذ يعد الرز إلى جانب الحنطة والشعير من المصادر المفضلة عالميا لإنتاج الفطر *B . bassiana* و *B . brongniartii* بمستويات إنتاجية واسعة مع مراعاة الحد الأدنى من التكلفة والحد الأعلى من الحيوية وتحقيق هدف الإصابة (3).

Reference (المصادر)

1. Lewis, L.C. and J.E. Cossentine **.(1986)** . Season long intraplant epizootics of entomopathogens, *Beauveria bassiana* and *Nosema pyrausta* in a corn agroecosystem. Entomophaga 31:364-369.
2. Burges, H. D. **(1998).** Formulation of Microbial Biopsticides. Kluwer Academic publishers. London, U.K. 412pp
3. Nelson, T. L. , A. low and T. R. Glare. **(1996)** .Large scale production of New Zealand strains of *Beauveria* and *Metarhizium* .In: Proceeding of the 49th New Zealand Plant Protection Conference; 1996 Aug.13-15;Nelson,New Zealand Plant Protection Society;P.257-261.
4. Rombach,M.C.,R.M. Aguda and D.W. Roberts. **(1988).**Production of *Beauveria bassiana* in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium.Entomophaga.33:315-324.
5. Sun, M. H. and X. Z. Liu. **(2006)** . Carbon requirements of some nematophagous entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents . Myopathological. 161 : 295 – 305 .
6. Wan, H**. (2003)** . Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and development of a new selection marker for fungal transformation. A thesis submitted to University of Heidelberg in partial fulfillment of the requirements for degree of Doctor of philosophy in Natural Sciences. 165pp.
7. Thomas,K.C.,G. Khachatourians and W. M. Ingledew, **(1987).**Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Can.J.Microbiol. 33: 12-20.

8. Stanbury, P. F., A. Whitaker and S. J. Hall. **(1995).** Media for industrial fermentations. In principles of fermentation technology Edited by P. F. Stanbury, A. Whitaker, and S. J. Hall. Elsevier science Litd, New York, Tokyo pp. 93-122.
9. Bidochka, M. J., T. A. Pfeifer and G. G. khachatourians. **(1987).** Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. Mycopathologia 99: 77-83.
10. Lacey, A. L. **(1997)**. Manual of techniques in insect pathology. Academic press, New yourk 410 pp.
11. Boyette, C. D., P. C. J. Quimby, W. J. Connick, D. J. Daigle and F. E. Fulgham**.(1991).** Progress in the production, formulation, and application of mycoherbicides. In Microbial control of weeds. Edited by D.O. Te Beest. Capman and hall, New York, pp.209-222.
12. Parker, B. L., M. Skinner, M. Brownbridge and M. EL-Bouhssini **(2000).** Control of insect pests with entomopathogenic fungi. Arab. J.pl. prot. 18: 133-138.
13. Jenkins, N. E., G. Heviefo, J. Langewald , A. J. Cherry and, C .J. lower . **(1998).** Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol New and Informa .19:21N-31N.
14. Posada-Florez. J. **(2008)** . Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borrer, *Hypothenemus hampei* , in Colombia .J. Ins . Sci.8: 1536 -2442.
15. Dubios, N., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F.Smith. **(1956).** Colorimetric method for detection of sugars and related substances. Annal. Chem .28: 350-356.
16. Lowry, O.H., NJ Rosbrough, Al- Farr, and RJ Randall. **(1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
17. .Diwan,H.M**.(2010).**Preparation of bio-formula of *Beauveria bassiana*(Bols.) Vuill.and evaluate its efficiency against the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.).A thesis submitted to college of science,University of Bagdad in partial fulfillment of the requirements for degree of Doctor of philosophy in Biology / Botany.165pp.
18. Bilgrami, K. S. and R. N. Verma. **(1988).** Physiology of fungi. Translated by Sarhan, A.R.T. and sharif, F.M. Saladin University High Education and Scientific research Ministry.Mosul University Puplication-Mosul. 596pp.
19. Deshpande, M.V.and, U. Tuor . **(2001).** Microbial control of Pests: Entomopathogenic Fungi as Mycoinsecticides. Eidgenossische Technische Hochschule ETH,Institut fÜr Mikrobiolgie, Switzerland. (Report).
20. Feng,M.G.;T.J.PoprawskiandG.G.Khac hatourians**.(1994).**Production,formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control :Current status .Biocont.Sci.Technol.4:3-34.
21. Jaronski,S.T.andM.S.Goettel**.(1997).**De velopment of *Beauveria bassiana* for control of grasshoppers and locusts.Mem. Entomol. Soc. Can. 171:225-237**.**
22. Jenkins, N.E. and C. Prior. **(1993)**. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium . Mycol. Res . 97: 1489-1494.
23. Müller,E. and W. Loeffler. **(1976).**Mycology.Translated by Bryce Kendrick and Barlocher.Georg Thieme Publishers Stuttgart.306pp.
24. Samsinakova,A**.(1966).**Growth and sporulation of submersed cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media.J Invertb.Pathol.8:395-400
25. Perry, D.F. and J.P. Latge. **(1980)** Chemically defined media for growth and sporulation of *Entomophthora Virulenta*. J.Invertb. Pathol . 35: 43-48.
26. Vaughan, L. and H. Warren**. (2000)**. steam – exploded agricultural wastes as a novel source of nutrients for production of *Metarhizium anisopliae*. Abstracts of 33th Ann. Meeting Guanajuato, Mexico . University of Guanajuato. PP.114