بررسی اثر برخی عوامل اکولوژیکی در رشد و اسپورزایی قارچ *Lecanicillium muscarium* روی محیط غذایی جامد

محمد جعفر فارسی[۱]، حسن عسکری[۱]، خلیل طالبی جهرمی[۲] و عزیز خرازی پاکدل[۲]

چکیده

در این بررسی تاثیر کیفیت مواد غذایی، نور، درجه حرارت، رطوبت نسبی، pH، محیط‌های غذایی جایگزین و فرم فیزیکی محیط در رشد و اسپورزایی قارچ *Lecanicillium muscarium* مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد که اثر کیفیت مواد غذایی و نور در رشد رویشی و تولید اسپور معنی‌دار بود ($\alpha = 0.01$). محیط غذایی PDA و نور سفید همراه با نیم ساعت اشعه ماورا بنفش خورشیدی بهتر از سایر تیمارها بود. اثر کیفیت غذا و حرارت در تولید اسپور معنی‌دار بود ($\alpha = 0.01$). اثر کیفیت غذا در رشد رویشی معنی‌دار نبود، ولی اثر درجه حرارت در سطح یک درصد معنی‌دار بود. محیط PDA و دمای ۲۲ درجه سانتیگراد از نظر تولید اسپور بهتر از سایر تیمارها بود. اما همین محیط غذایی در دمای ۱۲ درجه از نظر رشد رویشی بهترین تیمار بود. اثر pH محیط در تولید اسپور در سطح ۱ درصد، و در رشد رویشی در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. pH مساوی ٦ با میانگین $٤/٧\times١٠^{٧}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر و ٥٥/٦٦ میلیمتر قطر پرگنه در مدت دو هفته، بهترین تیمار بود. اثر رطوبت نسبی در محدوده ۹۵- ۷۰ درصد در تولید اسپور معنی‌دار نبود، ولی در رطوبت ٦٠ درصد و پایین‌تر که محیط کشت خشک شد، رشد قارچ متوقف گردید. اثر فرم فیزیکی محیط در تولید اسپور قارچ مورد نظر معنی‌دار بود ($\alpha = 0.01$). محیط PD به صورت لایه نازک مایع با میانگین $٥/٠٢\times١٠^{٧}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر بیشترین تولید را داشت. تولید اسپور روی محیط‌های غذایی جایگزین مورد آزمایش اختلاف معنی‌دار داشت ($\alpha = 0.01$). سویا با میانگین تولید $٥/٧٣\times١٠^{٧}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر بیشترین میزان تولید را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: *Lecanicillium muscarium* شرایط محیطی، اسپورزایی قارچ، محیط غذایی.

۱- موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران - ص. پ. ۱۱٦-۱۳۱۸۵. (مکاتبه کننده نگارنده اول).
E-Mail: farsimj@rifr-ac.ir
۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: آذر ماه ۱۳۸۳

مقدمه

مصرف بی‌رویه حشره‌کشها باعث بروز اثرات زیانبار در محیط زیست گردیده است و به همین علت توجهات به سمت کاربرد عوامل کنترل کننده بیولوژیکی در قالب برنامه مدیریت تلفیقی آفات (IPM) جلب شده است. در میان قارچ‌ها، هیفومیست‌ها گروهی هستند که توانایی کنترل آفات را دارند و کوشش قابل ملاحظه‌ای در جهت تولید و بهره‌برداری از آنها صورت گرفته است (Inglis et al., 2001). قارچ *L. muscarium* گونه‌ای از قارچ‌های ناقص است که کارآیی خوبی را در کنترل انواع شته ها نشان داده است (Hall, 1981). همچنین کارآیی این قارچ در کنترل عوامل خسارتزای دیگر مثل تریپس‌ها، آلورودها، کنه‌ها، نماتدها، سفیدک پودری خیار و زنگ‌ها در برخی از محصولات گلخانه‌ای نشان داده شده است (Askary *et al*., 1998, Verhaar *et al*., 1996). بیمارگری جدایه DAOM 198499 از قارچ *L. muscarium* روی لارو پروانه دم‌قهوه‌ای بلوط نیز برای اولین بار اثبات شده است (فارسی و همکاران، ۱۳۸۲).

فرآورده‌های تولید شده از جدایه‌های مختلف این قارچ دارای اثر انتخابی روی گروههای مختلف حشرات هستند. به عنوان مثال ورتالک روی شته‌ها و میکوتال روی آلورودها و تریپس‌ها موثر می‌باشد. اختصاصی بودن این فرآورده‌ها و نیاز به مصرف چند باره این ترکیبها برای دستیابی به کنترل موثر آفات و افزایش هزینه موجب شده است که چندان مورد استقبال قرار نگیرند (Wraight *et al*., 2001). جدایه DAOM 198499 که از شفیره کرم سیب جدا شده است می‌تواند همزمان شته‌ها و سفیدک‌های سطحی را کنترل نماید (Askary *et al*., 1998). به عبارت دیگر با استفاده از این جدایه می‌توان همزمان یک تیر دو هدف را نشانه گرفت. این امر مورد توجه اکولوژیست‌ها قرار گرفته است، زیرا تصور براین است که با کمک این قارچ می‌توان به تولیدات کشاورزی بدون سم (بیولوژیک) نزدیک تر شد (Brodeur,1998). ضمن اینکه رشد

این جدایه در دمای بالا محدود و در ۳۷ درجه متوقف می‌شود و خطری برای انسان ندارد. با توجه به اینکه شته‌ها، آلورودها و سفیدک‌ها از مشکلات اصلی اغلب گیاهان هستند، استفاده از این جدایه می‌تواند حائز اهمیت بسیار باشد.

قارچ *L. muscarium* روی محیط جامد، مایع و سیستم دو فازی (جامد و مایع) قابل تولید است. اما نتیجه تولید در محیط جامد کنیدیوم است که لیپوفیل بوده و با روغن بهتر فرموله شده، و برای کاربرد به صورت ULV مناسبتر است. کنیدیوم هوایی نسبت به عوامل نامساعد محیطی مقاومتر بوده و پایداری آن در محیط و انبار نسبت به بلاستوسپور که در محیط مایع تولید می شود، بیشتر است (Jenkins and Goettel, 1997).

از آنجایی که برای تولید هر قارچ عامل بیماریزای حشرات، شناخت شرایط محیطی و غذایی مناسب برای رشد و اسپورزایی و فرمولاسیون مناسب برای نگهداری و کاربرد آن ضروری است (Burges, 1998) و از طرفی جدایه DAOM 198499 دارای ویژگیهای خاص می باشد، بنابراین در این تحقیق اثر عوامل محیطی و غذایی در رشد و اسپورزایی جدایه فوق‌الذکر در محیط جامد مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روشها

۱- بررسی تاثیر کیفیت محیط غذایی و نور

در این آزمایش ۲ نوع محیط غذایی (WA, PDA) و سه تیمار نوری در ۵ تکرار در دمای ۱±۲۲ درجه سانتیگراد با دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت تقریبا اشباع در قالب آزمایش فاکتوریل در طرح پایه کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای نوری شامل نور لامپ مهتابی در حد ٤۰۰۰ لوکس، همین میزان نور لامپ مهتابی همراه با نیم ساعت اشعه ماوراء بنفش (UV) خورشیدی

(لامپ ٤٠ وات به طول ٦٠ سانتي‌متر ساخت شرکت فیلیپس) و تاریکی بود. برای انجام آزمایش محیط‌های غذایی، طبق استاندارد تهیه و ١٥ میلی‌لیتر از آن به درون طشتك های پتری استریل ریخته شد. سپس برای تلقیح، در مرکز مواد غذایی قطعه ای از قارچ به شکل دایره به قطر ٥ میلیمتر (رشد یافته روی محیط PDA) قرار داده شد. طشتک‌های آماده شده در شرایط نوری مورد نظر قرار داده شد. به منظور تامین رطوبت نسبی محیط در حد اشباع، از سینی های محتوی آب مقطر استفاده شد. هنگام تاباندن اشعه UV در طشتک‌های پتری برداشته شد. رشد رویشی از طریق اندازه‌گیری قطر پرگنه به صورت یک رور میان تا آخر آزمایش انجام‌گردید. برای تعیین میزان اسپور تولیدی هر پتری با ١٥ میلی‌لیتر آب مقطر محتوی٠/٠٢ درصد تریتون X-100 شستشو و با کمک لام گلبول‌شمار شمارش انجام گردید.

٢- بررسی تاثیر کیفیت محیط غذایی و درجه حرارت

در این آزمایش ٢ نوع محیط غذایی (WA, PDA) و ٦ تیمار حرارتی (شامل درجه حرارت‌های ١±٧، ١±١٢، ١±١٧، ١±٢٢، ١±٢٧ سانتیگراد و درجه حرارت متغیر محیط آزمایشگاه در پنج تکرار در قالب آزمایش فاکتوریل در طرح پایه کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. میزان نور حدود ٤٠٠٠ لوکس نور لامپ فلوئورسنت، ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی بود. نحوه تهیه محیط و کشت قارچ مشابه آزمایش قبل بود. پس از کشت، دهانه ظرفهای پتری با پارافیلم کاملا پوشانده شد و در دمای مورد نظر قرار داده شد. این آزمایش در دمای ٣٢ و ٣٧ درجه سانتیگراد در داخل انکوباتور نیز انجام گردید که به دلیل خشک شدن محط و رشد نکردن قارچ از تیمارهای مورد آزمایش حذف گردید. اندازه‌گیری رشد رویشی و میزان اسپور تولید شده مشابه آزمایش قبل انجام گردید.

۳- بررسی تاثیرpH اولیه محیط غذایی

در این آزمایش ۵ تیمار pH شامل ۵، ٦، ۷، ۸، و ۹ در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه محیط غذایی از پودر PDA شرکت Merck آلمان استفاده شد. در داخل ارلن‌های جداگانه ۵۰ سانتیمترمکعب محیط غذایی PDA آماده گردید. به کمک محلول نرمال HCl و NaOH به pH مورد نظر رسانده و اتوکلاو گردید. مشابه آزمایشهای قبلی پس از کشت قارچ در داخل طشتکهای پتری با قطر ۹ سانتیمتر، دهانه در آنها با پارافیلم کاملا مسدود و در داخل انسکتاریوم با شرایط ۱±۲۲ درجه سانتیگراد و ۱۵۰۰ لوکس نور لامپ مهتابی و فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد. پس از دو هفته میزان رشد رویشی از طریق اندازه‌گیری قطر پرگنه و میزان اسپور تولیدی مشابه آزمایش قبل شمارش و ثبت گردید.

٤- بررسی تاثیر رطوبت نسبی محیط اطراف

در این آزمایش از محلول اشباع نمک‌های $NaCl$, KCl, NH_4Cl, $MgSO_4$, Na_2CO_3 و آب مقطر برای تولید رطوبت‌های نسبی متفاوت استفاده گردید (Winston and Bates, 1960). برای تهیه محیط‌های غذایی پودر PDA مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتوکلاوکردن محیط و سردشدن آن، به‌میزان ۱۵ میلی‌لیتر در داخل طشتک‌های پتری استریل با قطر ۹ سانتیمتر ریخته شد. کشت قارچ مشابه آزمایش قبل بود. برای تهیه محلول اشباع نمک‌های فوق الذکر ٦۰۰ سانتیمتر مکعب آب مقطر را در حد جوش حرارت داده و بعد به تدریج نمک به آن اضافه و مخلوط گردید. این عمل تا آنجا ادامه یافت که دیگر نمک در آب حل نگردید. محلول اشباع تهیه شده داخل ارلن ۱ لیتری ریخته و اتوکلاو شد. برای دستیابی به رطوبت مورد نظر از ظرفهای پلکسی‌گلاس با ظرفیت حدود یک لیتر به عنوان واحد آزمایشی استفاده شد. بدین ترتیب که داخل چهار ظرف هرکدام به میزان ۱۵۰ میلی لیتر از محلول‌های فوق‌الذکر ریخته و یک عدد

بشر به صورت وارونه داخل آن قرار گرفت، و سپس طشتک پتری حاوی قارچ، روی بشر در داخل ظرف قرار داده شد. در پتری را با احتیاط برداشته و در ظرف را بسته و با پارافیلم دآن کاملا مسدود گردید. برای جلوگیری از آلودگی کلیه ظرفهای مورد استفاده ابتدا با الکل اتیلیک خالص شستشو داده شد و بعد به مدت یک ساعت زیر تابش اشعه Germicide UV در زیر لامینارفلو قرار گرفت. در سه ظرف از این ظرفها، طشتک‌های پتری قرار داده شد. ظرف چهارم برای اندازه‌گیری میزان رطوبت نسبی در طول آزمایش (۱۱ روز) مورد استفاده قرارگرفت. شرایط اتاق رشد در طول آزمایش ۲±۲۲ درجه سانتیگراد، ۱۵۰۰ لوکس نور لامپ مهتابی و ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. در پایان آزمایش رشد رویشی و میزان اسپور تولید شده مشابه آزمایشهای قبل اندازه‌گیری و ثبت شد.

۵- بررسی اثر مواد غذایی جایگزین

در این آزمایش ۷ نوع ماده غذایی جایگزین شامل گندم، برنج، ارزن، سویا، ماش، جو و بلغور جو در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. مواد غذایی مورد استفاده در آب معمولی به مدت چند ساعت در حد اشباع خیسانده شد. پس از گرفتن آب اضافی، ۱۲ گرم از مواد خیس شده توزین و داخل طشتک پتری با قطر ۹ سانتیمتر ریخته شد. به طوری که سطح طشتک از یک لایه ماده غذایی پوشیده شد. طشتک‌ها پس از آماده شدن اتوکلاو و پس از سرد شدن با ۵ میلی لیتر سوسپانسیون کنیدیوم قارچ رشد یافته روی محیط PDA با غلظت $٤/٢٥\times١٠^{٧}$ کنیدیوم در میلی لیتر تلقیح و در آنها با پارافیلم محکم بسته شد. برای تهیه سوسپانسیون کنیدیوم، سه طشتک پتری قارچ رشد یافته روی محیط غذایی PDA به مدت ۱۰ روز را با ۱۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل در زیر لامینارفلو شستشو و صاف گردید. طشتک‌ها در داخل اتاق رشد با درجه حرارت ۲±۲۲، نور مهتابی ۱۵۰۰ لوکس و فتوپریود ۱٦ : ۸

ساعت (روشنایی:اریکی) قرار گرفت. پس از ۱۱ روز هر طشتک پتری مورد آزمایش با ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ درصد تریتون X-100 با میله شیشه‌ای خوب هم زده و محتویات آن به داخل بشر منتقل گردید. مجددا دیواره طشتک با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر دیگر شسته و به داخل بشر انتقال داده شد. محتویات بشر با کمک ماگنت به مدت ۲-۱ دقیقه خوب هم زده شد و صاف گردید. برای جمع‌آوری کامل اسپورها محتویات بشر با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر آبکشی و از صافی عبور داده شد. بدین ترتیب هر طشتک با ٤۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی تریتون شستشو و صاف گردید. سوسپانسیون حاصل دو بار رقیق و شمارش اسپور انجام گردید.

٦- بررسی تاثیر شکل فیزیکی محیط در تولید اسپور

در این آزمایش ۲ تیمار نوری (نورلامپ مهتابی در حد ٤۰۰۰ لوکس و همین مقدار نور همراه با نیم ساعت UV خورشیدی مورد استفاده در آزمایشهای قبل) و ۳ شکل فیزیکی محیط غذایی جامد (PDA)، مایع (PD) و نیمه‌جامد (PD+Super Absorbent) همراه با شاهد (آب مقطر+SA) در چهار تکرار در قالب آزمایش فاکتوریل در طرح پایه کاملا تصادفی مورد بررسی قرارگرفت. ۳۲ طشتک پتری به قطر ۱۵ سانتیمتر انتخاب و در آون (۲۰۰ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت) استریل گردید. برای تهیه محیط کشت ۱۰۰ گرم سیب‌زمینی تازه و پوست‌کنده را با آب مقطر جوشانده و عصاره حاصل با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسانده شد و ۵ گرم دکستروز به آن اضافه گردید. به ۱۵۰سانتیمترمکعب از این محیط، ۲/۲۵ گرم آگار اضافه شد و پس از اتوکلاو کردن به عنوان محیط غذایی جامد مورد استفاده قرار گرفت. از ۳۵۰ سانتیمترمکعب محیط باقیمانده برای محیط‌های مایع و نیمه جامد استفاده گردید. در تیمارهای نیمه جامد و شاهد از پودر ماده جذب‌کننده رطوبت به میزان ۰/۰۸ گرم در هر طشتک پتری استفاده شد تا محیط مورد نظر به صورت ژل درآید. داخل هر طشتک پتری ۱۵

میلی‌لیتر از محیط غذایی ریخته و با یک میلی‌لیتر سوسپانسیون کنیدیوم جدایه مورد نظر رشد یافته روی محیط PDA با غلظت 3×10^{6} کنیدیوم در میلی‌لیتر تلقیح گردید. طشتک‌های پتری در داخل اتاق رشد با دمای ۲±۲۲ درجه سانتیگراد و نور ٤۰۰۰ لوکس لامپ مهتابی و رطوبت اشباع (قراردادن طشتک‌ها در داخل سینی محتوی آب مقطر) قرار داده شد. تیمارهای مربوط به نور+UV روزانه به مدت نیم ساعت تحت تاثیر اشعه UV خورشیدی قرار گرفت. هنگام تاباندن اشعه UV در طشتک‌ها برداشته شد. پس از ۲ هفته هر طشتک پتری با ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو و پس از گذراندن از صافی تعداد اسپور در میلی‌لیتر شمارش و ثبت گردید.

۷- وسایل اندازه‌گیری و آنالیز آماری

رشد رویشی با اندازه‌گیری قطر پرگنه در ۲ جهت و ثبت میانگین آنها انجام‌شد. شمارش اسپور به وسیله لام گلبول‌شمار (Neubauer Improved Haemocytometer) انجام گردید. اندازه‌گیری pH با pH متر دیجیتالی (Jenco Electronics LTD. Microcomputer pH-vision 6071) و اندازه‌گیری رطوبت نسبی و درجه حرارت با ترموهیگرومتر دیجیتالی صورت‌گرفت. تجزیه واریانس به کمک نرم‌افزار رایانه‌ای SAS در قالب طرح مربوطه انجام و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و LSD صورت‌گرفت. در تجزیه واریانس تعداد اسپورتولیدی به منظور جمع‌پذیر کردن داده‌ها، از لگاریتم تعداد اسپور در میلی‌لیتر استفاده شد.

نتایج

۱- بررسی تاثیر کیفیت محیط غذایی و نور: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر محیط غذایی ($F_{1,36}$=۱۱۷٤/۸۱) و نور ($F_{2,36}$=۹۸۸/٤٦) و اثر متقابل آنها ($F_{2,36}$=۲٤۳/٤٦) در تولید اسپور در سطح یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها در سطح

یک درصد نشان داد که محیط PDA با میانگین $۳/۷\times۱۰^{۷}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر از محیط WA با میانگین $۹/۸۵\times۱۰^{۵}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر بهتر بود. تیمار نور معمولی همراه با UV با میانگین $۳/۵\times۱۰^{۷}$ در سطح A و نور معمولی با میانگین $۲/٤\times۱۰^{۷}$ در سطح B و تیمار تاریکی با میانگین $۳/۰٤\times۱۰^{۵}$ در سطح C قرارداشت (جدول شماره ۱).

اثر محیط غذایی ($F_{۱,۲٦}$=۷۳۷/۵۵) و نور ($F_{۲,۲٦}$=۷/٦۳) و اثر متقابل آنها ($F_{۲,۲٦}$=۳٦/۳۳) در رشد رویشی نیز در سطح یک درصد معنی‌دار بود. محیط PDA با میانگین قطر پرگنه ٤۵/۳٪ میلیمتر از محیط WA با میانگین ۳٦/۵ میلیمتر بهتر بود. نور معمولی همراه با UV خورشیدی و تاریکی به ترتیب با میانگین‌های ٤۱/۳۷، ٤۱/۱ میلیمتر در سطح A و تیمار نور معمولی با میانگین ۳۹/۸۸ میلیمتر در سطح B قرارداشتند (جدول شماره ۲).

۲- بررسی تاثیرکیفیت محیط غذایی و درجه‌حرارت: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرمحیط غذایی ($F_{۱,۵۸}$=۱۲۸/۵۵) و درجه حرارت ($F_{۵۸,۲}$=۸/۱۲) و اثر متقابل آنها ($F_{۵۸,۲}$=٤/۰٤) در تولید اسپور در سطح یک درصد معنی‌دار است. مقایسه میانگین‌ها در سطح یک درصد نشان داد که محیطPDA با میانگین $٤/۷\times۱۰^{٦}$ کنیدیوم در میلی‌لیتردر سطح A و محیط WA با میانگین $۱/٤\times۱۰^{۵}$ در سطح B قرار داشت. دمای ۲۲ درجه سانتیگراد با میانگین $۸/٦\times۱۰^{٦}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر بیشترین (سطحA) و ۷ درجه سانتیگراد با میانگین $۳/۵\times۱۰^{۵}$ کمترین میزان تولید (سطحC) را داشتند (جدول شماره ۳).

اثر محیط غذایی در رشد رویشی قارچ معنی‌دار نبود. ولی اثر درجه حرارت در سطح یک درصد معنی‌دار بود ($F_{۵۸,۲}$=٦۵/٦۰). درجه حرارت ۱±۱۲ درجه سانتیگراد با میانگین قطر پرگنه ٤۳/۳۵ میلیمتر در سطحA و درجه حرارت ۷ درجه با میانگین ۲۲/۷ میلیمتر در سطح E قرار داشتند (جدول شماره ٤).

۳- بررسی تاثیر pH اولیه محیط غذایی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر pH در تولید اسپور در سطح یک درصد معنی‌دار است ($F_{۴،۱۴}$=۸۹/۷۸). در مقایسه میانگین‌ها در تیمار ۲ (pH=٦) با $۴/۷\times۱۰^{۷}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر بیشترین تولید (سطح A) و در تیمار ۵ (PH=۹) با $۲/۲۳\times۱۰^{٦}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر کمترین تولید (سطح B) مشاهده شد (جدول شماره ۵).

تجزیه واریانس قطر په نشان داد که اثر pH در رشد رویشی در سطح ۵% معنی‌دار است ($F_{۴،۱۴}$=۳/۳۱). مقایسه میانگین به روش LSD و دانکن در سطح ۵% نشان داد که pH مساوی ٦ با قطر پرگنه ۵۵/٦۷ میلیمتر بیشترین میزان رشد را داشته (سطح A) و pH مساوی ۹ با قطر پرگنه ٤۹ میلیمتر از کمترین میزان رشد برخوردار بوده و در سطح B قرار داشت (جدول شماره ٦).

٤- بررسی تاثیر رطوبت نسبی محیط اطراف: تجزیه واریانس لگاریتم تعداد کنیدیوم اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. به رغم استفاده از محلول اشباع نمک‌های مختلف و تامین رطوبت در حد ۹۵-۷۰ درصد در تولید اسپور اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. ولی در رطوبت ٦۰ درصد و پائین تر که محیط کشت آب خود را به تدریج ازدست داد، رشد قارچ نیز محدود گردید. در این آزمایش تیمار مربوط به KCl با تولید رطوبت نسبی در حدود ۸۰-۷۵ درصد با میانگین $٦/٦\times۱۰^{٦}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر بیشترین تولید و تیمار مربوط به NH_4Cl با تولید رطوبت نسبی محیط در حدود ۷۰٪ با میانگین $۳/۹\times۱۰^{٦}$ کمترین تولید را داشتند.

۵- بررسی اثر مواد غذایی جایگزین: نتایج تجزیه واریانس لگاریتم تعداد اسپور تولیدی اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مورد آزمایش در سطح یک درصد نشان داد ($F_{٦،۲۰}$=۷/۹). در مقایسه میانگین‌ها بر اساس روش دانکن و LSD در سطح یک

درصد، سویا با $۵/۷۳\times۱۰^{۷}$ کنیدیوم در میلی لیتر بیشترین میزان و برنج با $۱/٦۷\times۱۰^{۷}$ کنیدیوم در میلی لیتر کمترین میزان تولید را داشتند (جدول شماره ۷).

٦- بررسی تاثیر شکل فیزیکی محیط غذایی در کنیدیوم‌زایی: نتایج تجزیه واریانس لگاریتم تعداد اسپور در میلی‌لیتر نشان داد که اثر تیمار نوری در تعداد اسپور تولیدی معنی‌دار نبود. ولی شکل فیزیکی محیط در سطح یک درصد معنی‌دار بود ($F_{۳,۳۰}$ =۵۹٤/۲۲). مقایسه میانگین‌ها به روش LSD و دانکن در سطح یک درصد نشان داد که محیط مایع (PD) با میانگین $۵/۰۲\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی لیتر و محیط جامد (PDA) با میانگین $٤/۷۸\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی لیتر در سطح A و محیط نیمه جامد (PD+SA) با میانگین $۲/۷۲\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی لیتر در سطح B و تیمار کنترل (SA+آب مقطر) با میانگین $٤/٤۵\times۱۰^{٤}$ اسپور در میلی‌لیتر در سطح C قرار داشت (جدول شماره ۸).

بحث

تجزیه واریانس تعداد کنیدیوم تولیدشده در میلی‌لیتر و قطر پرگنه در آزمایش اثر کیفیت غذا و نور نشان داد که اثر کیفیت محیط غذایی و نور و اثر متقابل آنها در سطح یک درصد معنی‌دار بود. محیط غذایی PDA و تیمار نور سفید (لامپ مهتابی) همراه با نیم ساعت UV خورشیدی در روز از نظر تولید کنیدیوم و قطر پرگنه از تیمارهای دیگر بهتر بود (جدولهای ۱ و ۲). هرچند که تیمار نور سفید همراه با UV و تیمار تاریکی از نظر رشد رویشی تفاوت معنی‌دار نداشتند (جدول شماره ۲).

باپای اهری (۱۳۷۸) با شستن دایره‌ای به قطر پنج میلی‌متر از قارچ رشد کرده در محیط غذایی در سه میلی‌لیتر آب مقطر میانگین میزان تولید کنیدیوم برای جدایه ورتالک روی محیط PDA و روشنایی ۱٤ ساعت، $۱/۵۹\times۱۰^{۷}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر

گزارش نموده و متذکر شده است که روشنایی ١٤ ساعت در روز میزان اسپورزایی را در بعضی از محیطها تا پنج برابر افزایش داد. هرچند که جدایه‌های مورد استفاده و روش کار ایشان با روش استفاده شده در این مطالعه متفاوت بوده و از این جهت ممکن است که نتایج قابل مقایسه نباشد، ولی‌در هر دو مورد می‌توان گفت که محیط غذایی جامد و غنی و روشنایی باعث تولید اسپور بیشتر شده است. در حالی که در محیط مایع اثر نور در تولید بلاستوسپور معنی‌دار نیست (فارسی و همکاران، ١٣٨٤).

Li و همکاران (١٩٩١) محیط MEA (Malt Extract Agar) را بهترین محیط و میزان اسپورزایی قارچ را به طور متوسط $٦/٣-٦/٩\times١٠^{٩}$ کنیدیوم در هر پتری گزارش کردند. Khalil and Taborsky (١٩٨٢) محیط غذایی مالت لاکتوز و لاکتوز پپتون را بهترین محیط در بین ١٠ نوع محیط غذایی مصنوعی و طبیعی ذکر کرده و گزارش نمودند که قارچ در محیط سلولز قادر به رشد و تولید اسپور نود. برگ نخل روغنی *Chamaerops humilis* به عنوان ماده‌ای عالی برای اسپورزایی گزارش شده است (Lopez-Llorca *et al.*, 1999). میزان تولید کنیدیوم بدست آمده در هر گرم ماده خشک سبوس گندم، خمیر نیشکر و مخلوط دو ماده فوق‌الذکر به ترتیب ٣×١٠^{٩}، $١/٦\times١٠^{٩}$ و $٣/٢\times١٠^{٩}$ گزارش شده است (Grajek, 1994).

تجزیه واریانس میزان کنیدیوم تولید شده در میلی‌لیتر و قطر پرگنه در آزمایش اثر کیفیت غذا و حرارت نشان داد که اثر کیفیت غذا و درجه حرارت و اثر متقابل آنها در سطح یک درصد معنی‌دار بود. اثر کیفیت غذا در قطر پرگنه معنی‌دار نبود. در حالی که اثر حرارت و اثر آنها درسطح یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها در سطوح عوامل مورد مطالعه نشان داد که محیط PDA و دمای ٢٢ درجه سانتیگراد از نظر میزان اسپور بدی و همان محیط در دمای ١٢ درجه سانتیگراد از نظر قطر پرگنه بهتر از سایر تیمارها بود (جدولهای شماره ٣ و ٤).

بابای اهری (۱۳۷۸) محیط غـذایی PDA بـا دمـای ۲۱ و۲۵ درجـه را بهتـر از سـایر تیمارها و بیشترین اسپور تولیدی را در دمای ۲۵ درجـه بـه میـزان $۷/۳\times۱۰^{۶}$ کنیـدی در میلی‌لیتر گزارش کرده است. Li و همکارن (۱۹۹۱) دمای بهینه بـرای رشـد رویشـی را ۲۳ تا ۲۸ درجه و برای اسپورزایی ۲۳ تا ۲۵ درجه ذکـر کـرده‌انـد. Khalil و همکـاران (۱۹۸۳) ظهور پرگنه قارچ را در دمای پنج درجه سانتیگراد بعـد از پـنج روز، در دمـای ۱۰ درجه بعد از چهار روز، در دمای ۱۵ و ۲۰ درجه بعد از دو روز و در دمـای ۲۵و ۳۰ درجه بعد از یک روز گزارش کرده‌اند. بر اساس همین گزارش حداکثر رشد شعاعی در دمای ۲۵ درجه و حداکثر وزن خشک قارچ در دمای ۲۰ درجه مشاهده گردیـد. Hsiao و همکاران (۱۹۹۲) در هشت درجه سانتیگراد، مرگ و میر شته‌هـای آلـوده را مشـاهده نکردند. با افزایش دما تا ۱۵ درجه، ۱۰۰ درصد مرگ و میر در چهار روز و در دمای ۲۱ و ۲۷ درجه، در سه روز مشاهده شد. در ۳۷ درجه نیز همـه شـته‌هـای آلـوده و شـاهد مردند (Hsiao *et al.*, 1992). لوپز-لورکا و کاربونل (۱۹۹۹) دمای ۲۵ درجه سـانتیگراد را بهترین دما برای رشد جدایه‌های اسپانیایی گزارش نمودند. بر اساس همـین گـزارش در دمای ٤۰ درجه هیچ کدام از جدایه‌ها رشد نکرده و در چهار و هفت درجه نیز رشـد قارچ، کند گردید.

نتایج گزارش شده در مجموع نشان می‌دهد که دمای ۲۰ تـا ۲۵ درجـه بـرای تولیـد کنیدیوم مناسبتر می‌باشد که با یافته‌های این تحقیـق کـاملا سـازگاری دارد. بهتـر بـودن رشد رویشی جدایه ۱۹۸٤۹۹ در دمای ۱۲ درجه سانتیگراد احتمالا بـا منشـا سردسـیری آن (کانادا) مرتبط می‌باشد.

تجزیه واریانس لگاریتم تعداد کنیدیوم و قطر پرگنه در آزمایش بررسی اثر pH نشان داد که اثر pH در تولید کنیدیوم در سطح یک درصد و در رشد رویشی در سـطح پنج درصد معنی‌دار بود. بیشترین میزان تولید کنیدیوم و قطر پرگنـه در٦=pH مشـاهده گردید. Khalil و همکاران (۱۹۸۳و۱۹۸۵) بهترین pH را برای رشد رویشـی شـش و

برای اسپورزایی پنج گزارش کرده‌اند. لوپز-لورکا و کاربونـل (۱۹۹۹) رشـد قـارچ را در pH نزدیک به هفت بهتر دانسته‌انـد. Beyer و همکـاران (۱۹۹۷) دامنـه تحمـل قـارچ برای pH را ۹-۵ و برای جوانه‌زنی و تشکیل پرگنه، در pH=۷ بهتر دانسته‌اند.

فعالیت قارچ در محیط امد نیز مثل محیط مـایع (فارسـی و همکـاران، ۱۳۸٤،زیـر چاپ) باعث تغییر pH محیط می‌گردد، که احتمالا ناشی از ترشـحات اسـیدی قـارچ در محیط می‌باشد (Powel, 1995, Soman *et al*., 2001). نتایـج ایـن بررسـی نشـان داد کـه pH حـدود ۷-۵ از نظر تولید اسپور در وضعیت بهتـری قـرار داشـت و تغییـر pH محیط نیز در این محدوده کمتر بود.

تجزیه واریانس لگاریتم کنیدیوم تولید شده در آزمایش بررسـی اثـر رطوبـت نسـبی هوای اطراف محیط غذایی نشان داد که در محدوده ۹۵-۷۰ درصد رطوبت ایجـاد شـده اختلاف معنی‌دار وجود نداشت، ولی مشاهدات نشان داد که در رطوبت‌هـای پـایینتر بـا خشک شدن تدریجی محیط، رشد قارچ نیز متوقف گردید. Hsiao و همکـاران (۱۹۹۲) گزارش کردند که بین مرگ و میر مشـاهده شـده در شـته‌هـای آلـوده در رطوبـت‌هـای مختلف اختلاف معنی‌دار مشاهده نشـد. ولـی اسـپورزایی روی لاشـه شـته‌هـای مـرده متفاوت بود. و تنها در رطوبت ۷٦ و ۱۰۰ درصد کل لاشـه‌هـا بـا تـوده میسـلیوم قـارچ پوشیده شد. Chandler و همکاران (۱۹۹٤) گزارش کردند که هـر چـه فشـار اسـمزی محیط بیشتر (رطوبت کمتر) باشد جوانه‌زنی و رشد پرگنه کـاهش مـی‌یابـد. همبسـتگی مثبت بین رطوبت نسبی و شیوع *V. lecanii* مشاهده شـده اسـت (Reddy and Bhat, 1989). بر اساس گزارش Verhaar و همکـاران (۱۹۹۹) در رطوبـت ٦۰ درصـد کنتـرل سفیدک سطحی خیار شدیدا کاهش یافته است.

از نتایج بدست‌آمده چنین استنباط می‌شود کـه در محـدوده رطوبـت نسـبی ۹۵-۷۰ درصد، محیط کشت جامد رطوبت کافی را برای رشد در اختیار قرچ قرار می‌دهد. و به همین دلیل اختلاف معنی‌داری در نتایج ما مشاهده نگردید. اگر رطوبت محـیط غـذایی،

(نه هوای اطراف آن) به اندازه‌های مورد نظر رسانده شود، احتمالا اختلاف در تولید کنیدیوم مشاهده خواهد شد. همان طور که در رطوبت‌های پایینتر با خشک شدن محیط رشد قارچ نیز متوقف می‌گردد.

همان طور که از جدول شماره ۷ استنباط می‌شود قارچ مورد بررسی روی محیط‌های غذایی جایگزین تولید مناسب از نظر کمی دارد که با توجه به هزینه تولید و دسترسی، دانه گندم برای تولید مناسبتر می‌باشد. البته در جهت کاهش هزینه‌ها لازم است که محیط‌های غذایی جایگزین ارزانتر (از جمله ضایعات بخش کشاورزی) نیز مورد بررسی قرار گیرند.

در مجموع نتایج بدست آمده از ایرآزمایشها نشان داد که جدایه DAOM 198499 از قارچ *Lecanicillium muscarium* در محیط غذایی PDA، دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد، و PH حدود ۷-۵، رطوبت نسبی بالاتر از ۷۰ درصد و روشنایی ۱۵۰۰ لوکس تولید کنیدیوم مناسب از نظر کمی می‌نماید. با توجه به منحصر به فرد بودن این جدایه از جهت تاثیر روی حشرات از راسته‌های مختلف و بیماریها (سفیدک‌های سطحی و زنگ‌ها) و تاثیر همزمان روی شته و سفیدک سطحی، لازم‌است که بررسی منابع غذایی جایگزین ارزان قیمت و کیفیت اسپور تولیدی در آزمایشهای زیست‌سنجی 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 که زمینه انجم این تحقیق را فراهم نموده‌است، و همچنین از آقای دکتر رسول زارع که قارچ مورد نظر را مورد شناسایی مجدد قرار دادنابراز می‌دارند.

جدول شماره ۱- میانگین کنیدیوم تولیدشده در میلی‌لیتر در سطوح عوامل مورد مطالعه در محیط جامد پس از ۲ هفته.

میانگین اسپور تولید شده در میلي ليتر		تعداد مشاهدات	تیمار توری	توری	میانگین اسپور در میلی لیتر		تعداد مشاهدات	محیط غذایی
۳۵۰۱۶۲۵۰	a	۸	نور سفید+uv	a	۳۷۴۷۳۸۶٤	a	۱۳	PDA
۲٤۱۹۷۷۷۸	b	۹	نور سفید	b	۹۸۵۰۰۰	b	۱٤	WA
۳۰٤۰۰۰	c	۱۰	تاریکی					

*حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد است.

جدول شماره ۲- میانگین رشد رویشی در سطوح عوامل مورد مطالعه در محیط جامد پس از ۲ هفته.

میانگین قطر پرگنه (میلیمتر)		تعداد مشاهدات	تیمار توری	میانگین قطرپرگنه (میلیمتر)		تعداد مشاهدات	محیط غذایی
٤۱/۳۷۵	a	۸	نور سفید+uv	٤۵/۳۸٤٦	a	۱۳	PDA
٤۱/۱۰۰	a	۱۰	تاریکی	۳٦/۵۰۰۰	b	۱٤	WA
۳۹/۸۸۹	b	۹	نور سفید				

*حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد است.

جدول شماره ۳- میانگین لگاریتم کنیدیوم تولید شده در میلی‌لیتر در سطوح عوامل مورد مطالعه در محیط جامد پس از۲ هفته.

میانگین لگاریتم تعداد کنیدیوم		تعداد مشاهدات	حرارت (درجه سانتیگراد)	میانگین لگاریتم تعداد کنیدیوم	ارت زاد)	تعداد مشاهدات	محیط
٦/۳۷۰	a	۱۰	۲۲	٦/۱۹۸	a	۳۰	PDA
۵/۸۸۵	ab	۱۰	۱۷				
۵/۷٤٤	ab	۱۰	۱۲				
۵/۳۹۲	bc	۹	۲۷	٤/۸٦۸	b	۲۹	WA
۵/۱۳۰	c	۱۰	متغییر				
۵/۰٦۲	c	۱۰	۷				

*حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد است.

جدول شماره ۴- میانگین قطر پرگنه در سطوح عوامل مورد مطالعه در محیط جامد پس از ۲ هفته.

میانگین قطر پرگنه (میلیمتر)		تعداد مشاهدات	درجه حرارت	میانگین قطر پرگنه (میلیمتر)	تعداد مشاهدات	محیط
٤٣/٣٥	a	١٠	١٢	٣٠/٥٨ a	٣٠	PDA
٣٤/٣٠	b	١٠	١٧			
٢٩/٣٠	c	١٠	٢٢			
٢٦/٥٠	cd	١٠	متغیر	٢٩/٧٥ a	٢٩	WA
٢٤/٢٢	ed	٩	٢٧			
٢٢/٧٠	e	١٠	٧			

* حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد است.

جدول شماره ۵- مقایسه میانگین تولید کنیدیوم در میلی لیتر در pH های مورد آزمایش در محیط جامد به روش دانکن در سطح یک درصد.

سطح میانگین	میانگین کنیدیوم در میلی لیتر	تعداد مشاهدات	تیمار pH
a	٤/٦٦×١٠^{٧}	٣	٥
a	٤/٧٧×١٠^{٧}	٣	٦
a	٤/١١×١٠^{٧}	٣	٧
a	٣/١١×١٠^{٧}	٣	٨
b	٢/٣٣×١٠^{١}	٣	٩

* حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد است.

جدول شماره ٦- مقایسه میانگین تولید کنیدیوم در میلی لیتر در pH های مورد آزمایش در محیط جامد به روش دانکن در سطح پنج درصد.

سطح میانگین	میانگین قطر پرگنه (میلیمتر)	تعداد مشاهدات	تیمار pH
ab	٥١/٦٧	٣	٥
a	٥٥/٦٧	٣	٦
ab	٥٣/٦٧	٣	٧
b	٥٠/٠٠	٣	٨
b	٤٩/٠٠	٣	٩

* حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد است.

جدول شماره ۷- مقایسه میانگین تولید کنیدیوم در میلی لیتر در آزمایش اثر مواد غذایی جایگزین به روش دانکن در سطح یک درصد.

سطح میانگین	میانگین کنیدیوم در میلی لیتر	تعداد مشاهدات	تعداد	محیط غذایی جایگزین
a	۵/۷۳×۱۰^۷	۳		سویا
a	۵/۶۵۵×۱۰^۷	۳		ماش
ab	۴/۵×۱۰^۷	۳		ارزن
ab	۴/۲۸×۱۰^۷	۳		گندم
b	۲/۶×۱۰^۷	۳		جو
b	۲/۲۵×۱۰^۷	۳		بلغور جو
b	۱/۶۷×۱۰^۷	۳		برنج

* حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد است.

جدول شماره ۸- میانگین کنیدیوم تولیدشده در سطوح عوامل مورد مطالعه در بررسی اثر نور و شکل فیزیکی محیط.

میانگین تعداد اسپور در میلی‌لیتر	تعداد مشاهدات	شکل فیزیکی محیط	میانگین تعداد اسپور در میلی لیتر	تعداد مشاهدات	نوع نور
a ۵۰۲۷۵۰۰۰	۸	محیط غذایی مایع (pd)	a ۳۵۹۳۹۸۷۵	۱۶	نور معمولی
a ۴۷۸۱۲۵۰۰	۸	محیط غذایی جامد (pda)			
b ۲۷۲۱۴۲۸۶	۷	محیط نیمه‌جامد (pd+sa)	a ۲۶۷۰۱۲۳۳	۱۵	نور معمولی با uv
c ۴۴۵۶۳	۸	کنترل (water+sa)			

* حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد است.

منابع مورد استفاده

۱- بابای اهری، ا. ۱۳۷۸. بررسی اثرات دما، نور و محیط کشت در رشد و اسپورزایی *Verticillium lecanii*. دانش کشاورزی، ۸ (۳ و ٤): ۱۷۱-۱۸۷.

۲- فارسی، م. ج.، عسکری، ح.، طالبی جهرمی، خ. و خرازی پاکدل، ع. ۱۳۸۲. بیمارگری قارچ *Verticillium lecanii* (=*Lecanicillium muscarium*) روی لارو سن سوم پروانه دم قهوه‌ای بلوط *Euproctis chrysorrhoea* L. در شرایط آزمایشگاهی. پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی ٦۰: ۵۸-۵۲.

۳- فارسی، م. ج.، عسکری، ح.، طالبی جهرمی، خ. و خرازی پاکدل، ع. ۱۳۸٤. بررسی اثر عوامل عمده اکولوژیک در تولید بلاستوسپور قارچ *Verticillium lecanii* (=*Lecanicillium muscarium*) در محیط مایع. علوم کشاورزی ایران، ۳٦ (۱): ۱۱۹-۱۰۹.

4- Askary, H., Carrier, Y., Belanger, R. R. and Brodeur, J., 1998. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildow. Biocontrol science and technology, 8: 23-32.

5- Beyer, P. U., Hirte, W. F. and Sermann, H., 1997. The behaviour of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas in soil: 1. Viability in soil at different ecological conditions. Zeitchrift fur pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz, 104 (1): 54-64.

6- Brodeur, J., 1998. Un champignon pour remplacer les pesticides. Available at: http://www.cyberscience.com /cyber/3.0/n887.asp.

7- Burges, H. D., 1998. Formulation of mycoinsecticides. pp.131-185. in: Burges H. D. (ed.). Formulation of Microbial biopesticides. Kluwer Academic publishers, Dordrecht.

8- Chandler, D., Heale, J. B. and Gillespie, A. T., 1994. Effect of osmotic potential on the germination of conidia and colony growth of *Verticillium lecanii*. Mycological research, 98 (4): 384-388.

9- Grajek, W., 1994. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid state culture. Folia microbiologica, 39 (1): 29-32.

10- Hall, R. A., 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphid and scale. pp. 483-498. in: Burges, H. D.

(ed.) Microbial control of pests and plant diseases. Academic Press, London.

11- Hsiao, W. F., Bidochka, M. J. and Khachatorians, G. G., 1992. Effect of temperature and relative humidity on the virulance of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii* toward the oat-bird berry aphid, *Rhopalosiphum padi* (Hom.: Aphididae). Journal of Applied Entomology, 114 (5): 484-490.

12- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M. and Stathers, H., 2001. Use of hyphomycetous fungi for insect pests. pp. 23-69. in: T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds.). Fungi as biocontrol agents. CABI Publishing, UK.

13- Jenkins, N. E. and Goettel, M. S., 1997. Method for mass–production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. Memories of the entomological society of Canada, 171: 37-48.

14- Khalil, S. K. and Taborsky, V., 1982. The effect of different media on the growth and sporulation of entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. Agricultura tropica et subtropica, Universitas Agriculturae Praga, 15: 251-268.

15- Khalil, S. K., Bartos, J. and Taborsky, V., 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, 16: 255-274.

16- Khalil, S. K., Hussain, N. and Naeem, M., 1985. Influence of pH of the medium on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. Sarhad journal of agriculture, 1 (1): 51-55.

17- Li, G., Yan, Y. and Wang, L., 1991. Influence of temperature and nutrition on the growth of an entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*. Chineese. journal of biological control, 7 (3): 115-119.

18- Lopez–Llorca, L. V. and Carbonell, T., 1999. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. Revista iberoamericana de micologia, 16 (3): 136-142.

19- Lopez–Llorca, L. V. and Carbonell, T. and Salinas, J., 1999. Colonization of plant waste substrates by entomopathogenic and mycoparasitic fungi, a SEM syudy. Micron, 30 (4): 325-333.

20- Powel, K. A., 1995. The production of chemicals by biological control agents. Pesticide science, 44: 395-397.

21- Reddy, K. B. and Bhat, P. K., 1989. Effect of relative humidity and temperature on the biotic agent of green scale *Coccus viridis* (Green). Journal of Coffee Research Institute, 19 (2): 82-87.
22- Soman, A. G., Gloer, J. B., Angawi, R. F., Wicklow, D. T. and Dowd, P. F., 2001. Vertilecanins: new phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. Journal of Natural Product, 64 (2): 189-192.
23- Verhaar, M. A., Hijwegen, T. and Zadocks, J. C., 1996. Glasshouse experiments on biocontrol of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by the mycoparasites *Verticillium lecanii* and *Sporothrix rugolosa*. Biological Control, 6: 353-360.
24- Verhaar, M. A., Hijwegen, T. and Zadocks, J. C., 1999. Improvement of the efficacy of *Verticillium lecanii* used in biocontrol of *Sphaerotheca fuliginea* by addition of oil formulations. Biocontrol, 44 (1): 73-87.
25- Winston, P. W. and Bates, D. H., 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. Ecology, 41 (1): 232-237.
26- Wraight, S. P., Jackson, M. A. and de Kock, S. L., 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. pp. 233-287. in: T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds.). Fungi as biocontrol agents. CABI Publishing, UK.