فرمانتاسیون جامد و ماندگاری *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* و *Purpureocillium lilacinum* روی بسترهای آلی

راحله سادات شیرازی[۱]، صدیقه فاطمی[۲]، شهرام نعیمی[۲]، زهرا مجد طاهری[۲]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع‌غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: صدیقه فاطمی، پست الکترونیک: sfatemy@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۲۴ ۶(۲) ۱-۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۶

چکیده

قارچ‌های *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* و *Purpureocillium lilacinum* از عوامل کنترل بیولوژیک مهم نماتدهای گره ریشه و سیست نماتدها هستند. هر دو قارچ اولین بار از نماتد سیست چغندر قند از خراسان جدا سازی شدند و کارآیی امیدوار کننده‌ای روی کنترل نماتدهای *Heterodera schachtii*، *Globodera rostochiensis* و *Meloidogyne* spp. نشان داده‌اند. در این مطالعه میزان اسپورزایی و ماندگاری قارچ ها روی بسترهای جامد طی دو ماه بررسی شد. قارچ‌ها روی بسترهای غلات شامل بذر گندم، بذر جو، سبوس گندم، سبوس برنج و پوسته شلتوک کشت داده شدند و اسپور دهی و پایداری آن‌ها در دماهای ۲۵ و ۱۰ درجه سلسیوس ارزیابی شد. بسته به نوع بستر، زمان نگهداری و دما و نیز میزان اسپوردهی قارچ‌ها متفاوت بود. *P. chlamydosporia* روی بذرگندم، بذر جو، سبوس گندم و سبوس برنج پس از ۳۰ روز و روی پوسته شلتوک پس از دو ماه اسپوردهی نمود. *P. lilacinum* همه بسترها را پس از ۳۰ روز کلونیزه کرد و روی بذر جو و پوسته شلتوک برنج بیشترین اسپورزایی را داشت. ماندگاری *P. chlamydosporia* و *P. lilacinum* پس از ۶۰ روز نگهداری در ۲۵ درجه سلسیوس مقداری کاهش نشان داد، ولی در دمای ۱۰ درجه سلسیوس تغییر معنی‌داری نیافت. بالاترین جمعیت پوکونیا روی سبوس‌های گندم و برنج به میزان $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ و روی بقیه بسترها ۷×۱۰^{۷} اسپور در هر گرم بستر و برای پورپوریوسیلیوم روی سبوس گندم و جو به ترتیب $۲/۷ \times ۱۰^{۸}$ و $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ اسپور در هر گرم پس از ۶۰ روز بود. کلامیدوسپورها مرحله استراحتی پوکونیا و یکی از رایج ترین منابع تلقیح در خاک هستند. پوکونیا روی جو جمعیتی معادل $۱/۱ \times ۱۰^{۵}$ و روی سبوس برنج و گندم معادل ۵×۱۰^{۳} کلامیدوسپور تولید نمود.

واژه‌های کلیدی: زنده‌مانی، بسترهای کشت، تولید انبوه، غلات

مقدمه

نماتدهای انگل گیاهی، آفت مهم بسیاری از محصولات کشاورزی هستند. خسارت سالانه ناشی از نماتدها برای ۴۰ محصول ۱۳/۵ ٪ تخمین زده شده است (Abd-Elgawad, 2014). نماتدهای گره ریشه *Meloidogyne* spp. و سیست نماتدها انگل اجباری و از مهمترین آفات اقتصادی محصولات کشاورزی در جهان به شمار می‌روند (Jones *et al*., 2013). علی‌رغم تأثیر منفی سموم نماتدکش روی موجودات غیر هدف و محیط زیست و ممنوعیت کامل یا محدودیت استفاده از بعضی آن‌ها، این سموم چه به تنهایی یا در یک برنامه کنترل تلفیقی یکی از اجزاء مهم برنامه‌های مدیریت نماتدها باقی می‌مانند (Wesemael *et al*., 2011). در هر صورت توسعه روش‌های جدید مدیریت آفات که برای محیط زیست سالم و بی‌خطر باشند کاملاً ضروری می‌باشد. در حال حاضر تناوب زراعی، ضد عفونی خاک توسط تدخین زیستی (biofumigation)، آفتابدهی خاک، کود های آلی و ارقام مقاوم از راهکارهای مدیریتی نماتدها در نظر گرفته

می‌شوند. اخیراً بکارگیری دشمنان طبیعی به عنوان یکی از جایگزین‌های مهم کنترل شیمیایی آفات مطرح شده است و در این بین قارچ‌های آنتاگونیست از امیدبخش‌ترین عوامل کنترل میکروبی نماتدها هستند (Stirling, 2011; Lamovsek *et al.*, 2013).

قارچ‌های *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddart) Zare & Gams و *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard *et al.* (سابقاً *Paecilomyces lilacinus*) از آنتاگونیست‌های شاخص نماتدهای خسارت‌زایی چون سیست نماتدها (*Globodera* spp., *Heterodera* spp.) و نماتدهای گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) به شمار می‌روند و جزو عوامل کنترل بیولوژیکی هستند که بیشترین حجم مطالعات را به خود اختصاص داده‌اند (Atkins *et al*., 2005; Moosavi *et al*., 2010; Manzanilla-Lopez *et al*., 2011).

هر دو گونه قارچ رشته‌ای، ساپروفیت با دامنه انتشار وسیع بوده که از خاک، ریشه و بعضی بی‌مهره‌گان جدا شده‌اند و داشتن صفاتی چون کلونیزه کردن ریزوسفر، اندوفیت ریشه بودن، افزایش دهنده رشد گیاهان و قابلیت تولید انبوه، آن ها را کاندیداهای مناسبی جهت تهیه نماتدکش‌های زیستی ساخته است (De Leij & Kerry, 1991; Kerry & Hidalgo-Diaz, 2004; Rumbos & Kiewnick, 2006).

پوکونیا انگل اختیاری عمدتاً تخم و ماده نماتدهای گره ریشه و سیست نماتدها می‌باشد. فرم تجاری آن در بعضی کشورها مانند کوبا (Hernandez & Hidalgo - Diaz, 2008) و هندوستان (Rao *et al*., 1997) تولید شده است. قارچ اولین بار از انگلستان (Willcox & Tribe, 1974) گزارش شد و نقش آن در کاهش آلودگی نماتد غلات *Heterodera avenae* به اثبات رسید (Kerry *et al*., 1982). پس از آن تأثیر گذاری قارچ روی کاهش جمعیت نماتدهای مختلفی چون *H. avenae* از اروپا (Kerry, 1975) و استرالیا (Stirling & Kerry, 1983)، *H. schachtii* از هلند (Heijbroek, 1983) و ایران (Ayatollahy *et al*., 2008)، *H. glycines* از آمریکای شمالی (Gintis *et al*., 1983)، و چین (Meyer *et al*., 2004)، *Meloidogyne* spp. از کوبا (Hidalgo-Diaz *et al*., 2000)، ایران (Ebadi *et al*., 2009; Moosavi *et al*., 2010) پاکستان (Zaki & Maqbool, 1993)، آمریکا (Loffredo *et al*., 2007) و چین (Sun *et al*., 2006)، و *Nacobbus aberrans* از مکزیک (Flores-Camacho *et al*., 2007) گزارش شده است. کلیه این نماتدها دارای ماده های ساکن متورمی هستند که صدها تخم را در یک توده ژلاتینی در داخل یا بیرون بدن تولید می‌کنند و توسط *P. chlamydosporia* کلونیزه شده و از بین می‌روند. دیکتیوکلامیدسپورهای تولید شده توسط قارچ مرحله مقاوم و یک منبع مهم بقای آن در خاک می‌باشند.

افزودن *P. lilacinum* به خاک جمعیت توده‌های تخم *M. incognita* را روی گوجه فرنگی و تنباکو کاهش داده است (Dube & Smart, 1987). کاربرد *P. lilacinum* قبل یا در زمان کشت محصول گوجه فرنگی را در خاک آلوده به *M. incognita* افزایش داد (Cabanillas & Barker, 1989). خاک تیمار شده با *P. lilacinum* و کنجاله کرچک کمترین جمعیت *Tylenchulus semipentrans* را در مقایسه با سایر تیمارها دارا بود (Reddy *et al*, 1991). افزایش رشد نهال‌های گوجه فرنگی به همراه کاهش گال *M. incognita* در نتیجه کاربرد *P. lilacinum* در خزانه مشاهده شده است (Wagh & Pramanik, 2014). هزمی و همکاران (Hazmi *et al*., 2019) کاهش گال‌های ریشه گوجه فرنگی و تولید مثل *M. incognita* را توسط *P. lilacinum* گزارش نمودند.

کاربرد عوامل کنترل بیولوژیک به عنوان یکی از اجزای برنامه‌های مدیریت تلفیقی نماتدها و شاید جایگزین مناسب سموم نماتدکش بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تولید موفق آفت‌کش‌های میکروبی در وحله نخست مستلزم انتخاب صحیح عامل بیوکنترل قبل از تولید محصول نهایی تجاری می‌باشد (Ravensberg, 2011). از طرفی یافتن بستری مناسب و قابل اعتماد جهت تولید انبوه عوامل میکروبی، مصرف در سطح وسیع آزمایشی و نیز محصول تجاری یکی از موارد بازدارنده تولید محصولات میکروبی است. کنیدی یا کلامیدوسپور مراحل قابل انبارداری قارچ

هستند که فاز جامد بستر حمایتی مناسب برای آن‌ها ایجاد می‌کند. غلات شامل ارزن، ذرت، برنج و سبوس گندم از بسترهای رایج کشت جامد قارچ هستند. اصولاً بسترهایی با نسبت بالای سطح به حجم و فضای کافی بین دانه‌بندی از نظر هوادهی و تشکیل کنیدی ایده آل هستند (Hadapad & Zebitz, 2006). ماندگاری (shelf life) یک فاکتور مهم محدود کننده فرآورده‌های کنترل بیولوژیک است، که تا آنجایی که ممکن است باید طولانی مدت باشد و ترجیحاً نیازی به یخچال یا فضای خاصی نداشته باشد (Jones & Burges, 1998). از فاکتورهای دخیل در ماندگاری محصولات قارچی، عناصر غذایی، شرایط حاکم در طول دوره فرمانتاسیون، برداشت، فرمولاسیون و بسته بندی را می‌توان نام برد (Magan, 2001).

هر دو قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* و *P. lilacinum* اولین بار از نماتد سیست چغندر قند از خراسان جدا سازی شده‌اند و طی بررسی‌های متعددی با خاصیت کنترل کنندگی بالا به عنوان عامل کنترل بیولوژیک نماتدهای سیستی و نماتدهای گره ریشه انتخاب شدند (Fatemy *et al.*, 1999). در این تحقیق میزان اسپورزایی و ماندگاری قارچ‌های *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* و *P. lilacinum* روی چند بستر آلی شامل بذرگندم، بذرجو، سبوس گندم، سبوس برنج و پوسته شلتوک مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام آزمایشات از سویه‌های قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Pcc5.2) و *P. lilacinum* (Pl25.2) که هر دو از نماتد سیست چغندر قند از خراسان جدا شده‌اند و در کلکسیون قارچ‌های زنده آنتاگونیست نماتدها در بخش نماتدشناسی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور نگهداری می‌شوند، استفاده شد.

بررسی تأثیر بسترهای غذایی روی اسپوردهی قارچ‌ها

قارچ‌ها روی بسترهای دانه سالم گندم، دانه سالم جو، سبوس گندم، سبوس برنج و پوسته شلتوک برنج کشت داده شدند. مقدار ۳۰۰ گرم از هر بستر در کیسه‌های قابل اتوکلاو (از جنس پلی‌اتیلن) ریخته شد، ۹۰ میلی لیتر آب به هر کیسه اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت درب کیسه‌ها با نوار نایلون محکم بسته و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. این عمل در سه روز متوالی تکرار گردید. در زیر هود سترون با چوب پنبه سوراخ کن ۱۰ دیسک با قطر یک سانتی‌متر از سطح PDA حاوی کشت ۱۰ روزه قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* و *P. lilacinum* تهیه نموده و به هر کیسه اضافه شد. کیسه‌ها به مدت چهار هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور رشد یکنواخت قارچ ها کیسه‌ها به صورت هفتگی تکان داده شدند.

یک ماه پس از کشت، جهت کاهش رطوبت محتویات هر کیسه روی یک سینی مسطح پهن شد و عمل خشک کردن در دمای محیط صورت گرفت. جهت شمارش تعداد اسپور، محتویات هر بستر را کاملاً مخلوط نموده از هر بستر یک گرم زیر نمونه (sub-sample) به یک بِشر حاوی نُه میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل کرده و یک قطره Tween 80 به آن اضافه و هم زده شد. برای جدا کردن ذرات درشت از اسپور، محتویات بِشر را روی الک ۴۵ میکرومتر خالی نموده و سوسپانسیون اسپورها پس از انتقال به یک بِشر ۱۰ دقیقه دیگر با هم زن مغناطیسی هم زده شد. جمعیت اسپور و کلامیدوسپور به صورت مجزا در یک میلی‌لیتر سوسپانسیون توسط هموسیتومتر تخمین زده شد. این عمل سه بار تکرار گردید.

بررسی تأثیر زمان و دما روی ماندگاری قارچ‌ها

جهت بررسی تأثیر بسترها روی ماندگاری قارچ‌ها مقدار ۲۰ گرم از هر بستر حاوی هر کدام از قارچ‌ها در دو دمای ۱۰ و ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از ۶۰ روز میزان جمعیت اسپورها در شرایط مختلف طبق روش ذکر شده بالا در یک گرم بستر تعیین شد.

آنالیز آماری

اسپورزایی قارچ ها روی بسترهای غلات در دو زمان شمارش اسپور در دماهای مختلف با آنالیز واریانس

ANOVA مقایسه و اختلافات بین میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح ۵٪ بررسی شدند. تست های نرمالیته و همگنی واریانس طبق روش شاپیرو و ویلک (Shapiro-Wilk) صورت گرفت. برنامه SPSS (Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA, VERSION 18) برای انجام عملیات آماری مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

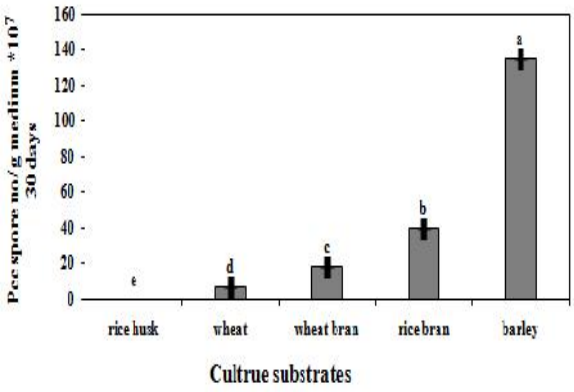
Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia

یک ماه پس از کشت، قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* روی همه بسترهای دانه گندم، سبوس گندم، دانه جو و سبوس برنج به جز شلتوک برنج اسپورزایی نمود. میزان اسپورزایی قارچ روی بسترهای استفاده شده به طور معنی‌داری با هم تفاوت داشت ($F= 3889.1$, $df = 4$; $P< 0.001$). بیشترین جمعیت اسپور روی دانه جو و سپس سبوس برنج شمارش شد. در حالی که دانه گندم کمترین میزان اسپور را به خود اختصاص داد، هیچ اسپوری روی شلتوک برنج در این مرحله مشاهده نشد (شکل ۱).

پس از گذشت ۶۰ روز از نگهداری بسترها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، جمعیت اسپورها مقداری کاهش نشان داد ($F= 8.306$, $df = 9$, $P< 0.001$) (شکل ۲). جمعیت قارچ روی سبوس گندم بالاترین و روی دانه گندم و شلتوک برنج کمترین بود. کلونیزه شدن شلتوک برنج توسط قارچ با تأخیر دو ماهه صورت گرفت. ماندگاری اسپورها در دمای ۱۰ درجه سلسیوس و در مقایسه با دمای ۲۵ درجه سلسیوس پایدارتر و جمعیت روی بعضی بسترها بیشتر بود.

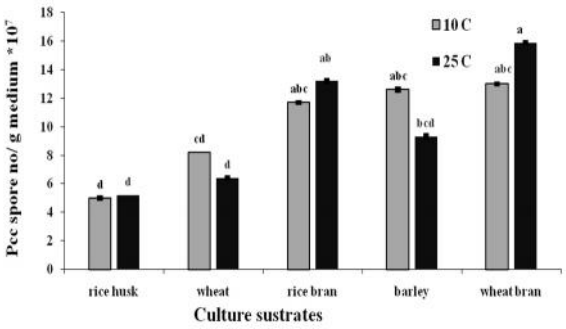
Purpuriocillium lilacinum

قارچ همه بسترها را پس از گذشت ۳۰ روز کلونیزه نمود ($F = 33.849$, $df = 4$, $P< 0.0001$) (شکل ۳). دانه جو و شلتوک برنج به یک نسبت بالاترین سطح اسپور را تولید کردند. کمترین جمعیت اسپور روی سبوس برنج تولید شد هر چند از نظر آماری تفاوت‌ها با سبوس گندم و دانه گندم معنی‌دار نبودند.



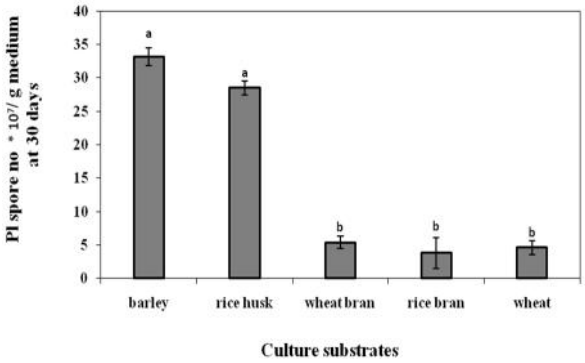
شکل ۱- تعداد اسپور (*Pcc*) *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بعد از ۳۰ روز کشت روی بسترهای غلات. ستون‌های دارای حروف مشترک طبق آزمون دانکن تفاوت معنی داری در سطح ۵٪ ندارند. میله‌ها خطای استاندارد میانگین هستند.

Fig. 1. *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (*Pcc*) spore count on cereal substrates after 30 days. Columns with similar letters are not significantly different at 5% level based on Duncan`s test. Vertical bars: standard errors.



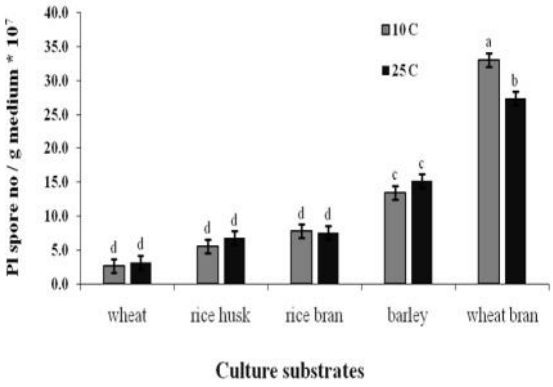
شکل ۲- تعداد اسپور (*Pcc*) *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* روی غلات بعد از ۶۰ روز نگهداری در دمای ۱۰ و ۲۵ درجه سلسیوس. ستون‌های دارای حروف مشترک طبق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ ندارند. میله‌ها خطای استاندارد میانگین هستند.

Fig. 2. *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (*Pcc*) spore count on cereal substrates after 60 days at 10 ºC and 25 ºC. Columns with similar letters are not significantly different at 5% level based on Duncan`s test. Vertical bars: standard errors.



شکل ۳- تعداد اسپور *Purpuriocillium lilacinum* (*Pl*) بعد از ۳۰ روز کشت روی بسترهای غلات. ستون‌های دارای حروف مشترک طبق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ ندارند. میله‌ها خطای استاندارد هستند.

Fig. 3. *Purpuriocillium lilacinum* (*Pl*) spore count on cereal substrates after 30 days. Columns with similar letters are not significantly different at 5% level based on Duncan`s test. Vertical bars: standard errors.



شکل ۴- تعداد اسپور *Purpuriocillium lilacinum* (*Pl*) بعد از ۶۰ روز نگهداری در ۱۰ و ۲۵ درجه سلسیوس. ستون‌های دارای حروف مشترک طبق آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ ندارند. میله‌ها خطای استاندارد میانگین هستند.

Fig. 4. *Purpuriocillium lilacinum* (*Pl*) spore count after 60 days at 10 ºC and 25 ºC. Columns with similar letters are not significantly different at 5% level based on Duncan`s test. Vertical bars: standard errors.

پس از ۶۰ روز در ۲۵ درجه سلسیوس، تراکم اسپور پورپوریوسیلیوم روی سبوس گندم و دانه جو بیش از بقیه بسترها بود هر چند در مقایسه با شمارش در مرحله اول روی جو کاهش یافته و در سبوس گندم افزایش یافته بود ($F = 38.325$, $df = 9$, $P < 0.0001$) (شکل ۴). پایداری اسپورها در شرایط ۱۰ درجه سلسیوس از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با نگهداری در ۲۵ درجه سلسیوس نداشت به هر حال میزان تعداد اسپور روی سبوس گندم در سرما بیشتر بود.

بحث

موفقیت یک ترکیب نماتدکش میکروبی جهت کاربرد در برنامه‌های مدیریتی به جدایه، میزان آلوده‌کنندگی، تولید انبوه آن در آزمایشگاه و همچنین امکان تولید انبوه آسان و ارزان آن بستگی دارد. یکی از موارد بازدارنده کاربرد نماتدکش‌های میکروبی پایدار نبودن تأثیر آن‌ها به دلیل کیفیت پایین، نزول سریع پروپاگول‌های میکروبی بعد از استفاده در خاک، و مقابله با تنش‌های غیر زنده است (Moosavi & Askary, 2015). مواد متعددی چون بسترهای جامد آلی، حبوبات، غلات، محصولات و ضایعات کشاورزی چون باگاس چغندرقند و نیشکر، ضایعات میگو، کنجاله‌های نارگیل، پنبه دانه، چریش، کنجد و مواد معدنی چون دیاتومه، جهت تولید انبوه عوامل بیولوژیک بررسی شده‌اند (Sahayaraj & Namaslvayam, 2008).

قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* جزو خانواده Clavicipitaceae در راسته Hypocreales شاخه Ascomycota (Zare *et al*., 2001) می باشد. این قارچ پارازیت اختیاری است و توانایی زندگی به صورت ساپروفیت در خاک و انگل تخم و ماده نماتدها را دارا می‌باشد. همچنین قادر است ریشه طیف وسیعی از گیاهان تک لپه و دو لپه را به صورت اندوفیت کلونیزه نموده و رشد گیاه و سیستم دفاعی گیاه میزبان را تحریک نماید (Larriba *et al*., 2014). در زمان حمله به توده‌های تخم نماتد، با ایجاد شبکه میسلیوم و سپس رشد لوله تندشی به داخل تخم‌ها نفوذ

می‌کند، در روند تخریب دیواره و هضم محتویات تخم آنزیم‌های مختلفی چون VCP1، یک پروتئاز سرین قلیایی، نیز دخالت می‌کنند، احتمال داده می‌شود که آنزیم VCP1 در تجزیه منابع مختلف غذایی در دوره ساپروفیتی قارچ نیز نقش داشته باشد (Segers *et al*., 1996). قارچ به آسانی در شرایط آزمایشگاهی قابل کشت است که شاخصی مهم برای یک قارچ عامل کنترل بیولوژیک به شمار می‌رود در غیر این صورت نمی‌توان آن را به صورت تجاری تولید نمود (Kerry, 2000). قارچ تولید اسپور استراحتی کلامیدوسپور می‌نماید که قادر است آن را در شرایط تنش‌زای محیطی مانند خشکی یا سرما زنده نگهدارد (Hallman *et al*., 2009). کلامیدوسپورها همچنین ابزار مفیدی جهت تولید تجاری محسوب می‌شوند زیرا قابلیت انبارداری بالایی داشته و برای تلقیح در شرایط مزرعه یا حجم‌های زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرند. *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* در اسیدیته ۴-۷ و دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس به خوبی رشد می‌کند (Ebadi *et al*., 2009; Karakas *et al*, 2012)، و در ۱۲ درجه سلسیوس قادر به ایجاد آلودگی می‌باشد (Irving & Kerry, 1986). قارچ به آسانی روی غلات رشد و اسپورزایی می‌نماید (Crump & Irving, 1992) ، اضافه کردن مواد پوسیده (چون خاک ارّه بعضی درختان و بلال) به خاک، رشد ساپروفیتی پوکونیا را افزایش داده است (Luambano *et al*., 2015).

عناصر غذایی مورد نیاز رشد و کنیدی زایی قارچ‌های آنتاگونیست شامل ماکرو و میکرو المانت‌ها هستند. کربن، هیدروژن، اکسیژن، فسفر، پتاسیم، نیتروژن، سولفور و منیزیوم در بین عناصر ماکرو هستند (Griffin, 1994) که میزان و نوع آنها بسته به شرایط محیطی و نوع قارچ متفاوت است (Maheshwari, 2012). عناصر مکملی چون $MnSO_4$ $ZnSO_4$ $7H_2O$, H_2O, و H_3BO_4 برای *P. chlamydosporia* نام برده شده اند (Gao, 2011). غلات منبع غنی از عناصر ماکرو، میکرو و ویتامین‌ها هستند و نیاز چندانی به مواد تکمیلی ندارند (McKevith, 2004).

در آزمایشات حاضر قارچ های *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* و *P. lilacinum* با درجات متفاوتی روی بسترهای مختلف غلات اسپورزایی نمودند که در هر حال میزان آن بسیار بالاتر از محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) بود. پوکونیا روی شلتوک برنج جمعیتی برابر ۵×۱۰^{۷} اسپور در گرم در حالی‌که روی PDA (ظرف پتری با قطر ۸ سانتیمتر) برابر $۰/۵۴ \times ۱۰^{۷}$ اسپور تولید نمود. همچنین میزان اسپورزایی روی هر گرم گندم توسط پورپوریوسیلیوم معادل $۳/۲ \times ۱۰^{۷}$ و روی PDA حدود $۰/۹ \times ۱۰^{۷}$ بود. با گذشت زمان (۶۰ روز) جمعیت پوکونیا روی جو و پورپوریوسیلیوم روی سبوس برنج مقداری کاهش نشان داد. در آزمایش آمالا و همکاران (Amala *et al*., 2012)، پورپوریوسیلیوم روی سبوس برنج و سپس سبوس گندم بیشترین اسپور را تولید نمود، و بعد از ۲۸ روز تعداد آن ها رو به کاهش نهاد. در آزمایشی دیگر *P. lilacinum* روی گندم، برنج، چاودار، ذرت و سورگوم بیشترین رشد را در مقایسه با سایر قارچ ها نشان داد، و بیشترین تراکم اسپور روی سورگوم ایجاد گردید (Mar & Lumyong, 2012). محققان دیگری نشان دادند که در تولید قارچ های حشره خوار توسط فرآیند فرمانتاسیون جامد، بالاترین میزان کنیدی *Isaria farinosa* روی کنجاله سویا و بلغور ذرت، و برای *I. fumosorosea* روی برنج قهوه‌ای و بلغور برنج تولید شد (Mascarin *et al*., 2010).

در بین قارچ های آنتاگونیست حشرات، *Paecilomyces fumosoroseous* (Wize) Brown & Smith روی سورگوم بیشترین میزان اسپور را در مقایسه با برنج، گندم و ارزن تولید نمود. در صورتی که *Beauveria bassiana* (Balsamo) روی گندم محصول بهتری داشت (Sahayaraj & Namasivayam, 2008).

در بررسی حاضر، نگهداری بسترهای حاوی هر دو قارچ در دمای ۱۰ درجه سلسیوس درحفظ طول عمر آن‌ها بی‌تأثیر نبود و روی دانه گندم و جو در مقایسه با دمای ۲۵ درجه سلسیوس از نظر عددی تراکم بیشتری داشتند. دمای بهینه رشد *P. chlamydosporia* بسته به جدایه قارچ یا بیوتیپ بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس می باشد (Bourne & Kerry, 2000; Ebadi *et al*., 2009). بعضی از جدایه‌های قارچ در دماهای ۱۰، ۳۳ و ۳۵ درجه سلسیوس رشد نکردند

(Vieira dos Santos *et al*., 013; Ebadi *et al*., 2009)، ولی زنده ماندند و مجدداً رشد عادی خود را در ۲۵ درجه سلسیوس از سر گرفتند (Vieira dos Santos *et al*., 2013).

کلامیدوسپور مرحله استراحتی پوکونیا است که به دلیل داشتن ذخیره غذایی کافی نیازی به منابع انرژی کمکی برای استقرار در خاک ندارد، در صورتی که کنیدی و هیف به دلیل ذاتی بقای ضعیفی در خاک دارند و در غیاب منبع انرژی کمکی نمی‌توانند با پدیده قارچ ایستایی مقابله نمایند (Kerry *et al*., 1993; Mauchline *et al*., 2002). برای کنترل نماتدهای پارازیت گیاهی کلامیدسپورها یکی از رایج‌ترین منابع تلقیح خاک هستند.

در تحقیقات متعددی تأثیر نوع بستر غذایی در شدت یا ضعف اسپورزایی محرز شده است. افزودن کلامیدوسپور پوکونیا همراه با سبوس گندم به خاک جمعیت کلامیدوسپور را حدود ۳۰۰ برابر افزایش داده است و بعد از گذشت ۱۲ هفته جمعیت ۱۵۰ برابر بیشتر از زمان تلقیح بوده است. همچنین، کلامیدوسپور فقط روی بستر جامد جمعیت بالایی تولید کرده و به دلیل داشتن دیواره ضخیم در مقایسه با اسپور، دوره ماندگاری طولانی‌تری در خاک و شرایط انبارداری دارد (Kerry *et al*., 1993). در این تحقیق نیز یافته‌های مشابهی کسب گردید ضمن این که زمان آغاز تولید کلامیدوسپور با تأخیر و با شدت‌های متفاوتی روی بسترهای غلات صورت گرفت. پوکونیا روی PDA $۱۰^{۴}$ × ۳/۸ کلامیدوسپور طی دو ماه تولید نمود، روی همه بسترها دو ماه طول کشید تا کلامیدوسپور تولید کند، ولی روی جو به میزان $۱۰^{۴}$ × ۴/۸ کلامیدوسپور در گرم در کشت ۳۰ روزه تولید کرد. پس از گذشت ۶۰ روز، بیشترین میزان کلامیدوسپور در بسترهای سبوس گندم و برنج تولید شد (جدول ۱).

در طی این مطالعه هیچ کلامیدوسپوری روی دانه گندم تشکیل نشد که احتمال دارد به مدت طولانی‌تری نیاز داشته است. بعضی جدایه‌های پوکونیا روی بسترهای جامد در یک بازه زمانی کلامیدوسپور تولید نکردند و امکان دارد که به محرک‌های محیطی مناسب نیاز داشته باشند. یک جدایه از *P. chlamydosporia* هفت ماه بعد از کشت در شرایط آزمایشگاهی و در دمای رشد بهینه، کلامیدوسپور تولید نمود (Clyde, 1993).

در تحقیقات متعدد صورت گرفته کارآیی سویه بومی ایران گونه *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* روی کاهش آلودگی نماتدهای گره ریشه روی پسته، خیار و گوجه؛ نماتد سیست چغندر قند *H. shcachtii* و نماتد سیست سیب زمینی *Globodera rostochiensis* به اثبات رسیده است (Ayatollahy *et al*., 2008; Ebadi *et al*., 2009; Moosavi *et al*., 2010; Jamalirad & Fatemy, 2013; Dehghan Nasrabad & Fatemy, 2016; Ebadi *et al*., 2018).

قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* به طور مشخص خصوصیات بارز یک نماتدکش میکروبی را داراست؛ انگل دو گروه از مهمترین نماتدهای عمده محصولات کشاورزی در جهان است؛ قادر به ایجاد رابطه تنگاتنگ با ریزوسفر میزبان هدف می باشد؛ در غیاب میزبان به صورت کلامیدوسپور و یا ساپروفیتی زنده می‌ماند؛ و قابلیت کشت روی طیف وسیعی از بسترهای مختلف را داراست (Stirling, 2014). بعضی محصولات تجاری شده پوکونیا مانند Rizotec در برزیل، KlamiC® در کوبا و محصول نیمه تجاری دیگری در مکزیک با بیش از $۱۰^{۷}$ کلامیدوسپور در گرم روی بسترهای برنج و یا بلغور ذرت تولید شده اند (Hidalgo-Diaz *et al*., 2017).

مطالعه حاضر مقدمه‌ای است بر آغاز تولید انبوه *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. که بنا بر اطلاعات موجود برای اولین بار در کشور صورت گرفته است. از نظر اقتصادی، هر چه میزان اسپورزایی قارچ روی

جدول ۱- تعداد کلامیدوسپور *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* تولید شده روی بسترهای مختلف پس از ۶۰ روز نگهداری در دمای ۱۰ و ۲۵ درجه سلسیوس

Table 1. Number of chlamydospores of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* produced on different substrates 60 days after storing at 10 and 25 ºC

	Chlamydospore No. $\times 10^3$/g			
	25 ºC		10 ºC	
Substrates	60 days	SE (log)	60 days	SE (log)
Rice bran	4.4 de	0.71	10.7 c	0.29
Barley seed	114.2 a	0.88	43.8 b	0.59
Rice husk	0.8 f	0.42	3.3 e	0.74
Wheat seed	0.0 g	0.0	0.0 g	0.0
Wheat bran	5.6 d	0.69	12.1 c	0.18

SE: خطای استاندارد. ستون‌ها و ردیف‌های دارای حروف مشترک طبق آزمون دانکن فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ هستند.

(F=4272.8, df=4, *P*<0.001). SE: standard errors. Columns and rows with similar letters are not significantly different at 5% level based on Duncan's test.

یک بستر در فرمانتاسیون جامد بیشتر باشد، مقدار مصرف بستر جامد در سطح مزرعه کمتر و ارزان‌تر خواهد بود. عوامل مختلفی چون نوع بستر کشت، قیمت و در دسترس بودن مواد اولیه،گونه و سویه قارچ، شرایط فرمانتاسیون و مکمل‌ها در تولید انبوه ماده میکروبی جامد دخالت دارند. در بین انواع بسترها، جو و برنج در نقاط مختلف دنیا عمومیت بیشتری دارند (Jaronski, 2014). انتظار می‌رود که در تولید انبوه تجاری یک ماده میکروبی حداقل جمعیتی معادل $۱۰^{۷}$–$۱۰^{۸}$ پروپاگول در گرم بستر غلات تولید شود (Jaronski, 2014). در یافته‌های حاضر بسترهای جو، سبوس گندم و برنج کارآیی مناسبی در ایجاد اسپورزایی و بقای *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* داشتند. سبوس گندم و برنج کارآیی مناسبی در ایجاد اسپورزایی و بقای *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* داشتند. جمعیت پوکونیا روی سبوس‌های گندم و برنج $۱۰^{۸} \times ۱/۵$ و روی بقیه بستر ها متوسط $۱۰^{۷} \times ۷$ اسپور در گرم بود. ماندگاری، زنده بودن اسپورها در زمان‌های طولانی‌تر انبارداری مانند شش ماه و یک سال به بررسی‌های بیشتر نیاز دارد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر قسمتی از یک پروژه تحقیقاتی و پایان نامه کارشناسی ارشد است که با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور انجام گرفت.

References

Abd-Elgawad, M.M.M. 2014. Plant-parasitic nematodes threats to global food security. Journal of Nematology, 46: 130–260.

Amala, U., Jiji, T. & Naseema, A. 2012. Mass multiplication of entomopathogenic fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson with solid sunstrates. Journal of Biopesticides, 5(2): 168–170.

Atkins, S.D., Clark, I.M., Hirsch, P.R. & Kerry, B.R. 2005. The use of real-time and species specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiology Ecology, 51: 257–264.

Ayatollahy, E., Fatemy, S. & Etebarian, H.R. 2008. Potential for biological control of *Heterodera schachtii* by *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* on sugar beet. Biocontrol Science & Technology, 18: 157–167.

Bourne, J.M. & Kerry, B.R. 2000. Observations on the survival and competitive ability of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in soil. International Journal of Nematology, 10: 9–18.

Cabanillas, E. & Barker, K.R. 1989. Impact of *Paecilomyces lilacinus* inoculum level and application time on control of *Meloidogyne incognita* on tomato. Journal of Nematology, 21, 1: 115–120.

Clyde, J.M.F. 1993. The cyst nematode pathogen *Verticillium chlamydosporium*. PhD Thesis, The University of Leeds, Department of Pure and Applied Biology.

Crump, D.A. & Irving, F. 1992. Selection of isolates and methods of culturing *Verticillium chlamydosporium* and its efficacy as a biological control agent of beet and potato cyst nematodes. Nematologica, 38: 367–374.

De Leij, F.A.A.M. & Kerry, B.R. 1991. The nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. Revue de Nematologie, 14: 157–194.

Dehghan Nasrabd, A. & Fatemy, S. 2016. Effect of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* on potato cyst nematode. 3rd National meeting on Biocontrol in Agriculture and Natural Resources, 2-3 Feb, Ferdowsi University, Mashad, Iran. 89.

Dube, B. & Smart, G.C.Jr. 1987. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology, 19, 2: 222–227.

Ebadi, M., Fatemy, S. & Riahi, H. 2009. Evaluation of the efficacy of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* as a biological control agent of *Meloidogyne javanica* on pistachio. Biocontrol Science and Technology, 19(7): 689–700.

Ebadi, M., Fatemy, S. & Riahi, H. 2018. Biocontrol potential of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* isolates against *Meloidogyne javanica* on pistachio. Egyptian J. Biological Pest Control 28(45): doi.org/10.1186/s41938-018-0047-y.

Fatemy, S., Ahmadian Yazdi, A., Ahmadi, A., Parvizy, R., Pakniat, M., Barooti, S., Askari, F. & Ershad, J. 1999. Fungal parasites of *Heterodera schachtii* in Iran. Pakistan J. Nematology, 7, 1: 61–66.

Flores-Camacho, R., Manzanilla-Lopez, R.H., Ciddel Prado-Vera, I., & Martnez-Garza, A. 2007. Control of *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne and Allen with *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams and Zare. Revista Mexicana Fitopatologia, 25: 26–34.

Gao, L. 2011. Optimize culture conditions for biomass and sporulation of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*, isolate HSY-12-14 by “two-step” cultivation. African Journal of Microbiology Research, 5: 4731–4738.

Gintis, B.O., Morgan-Jones, G. & Rodriguez-kabana, R. 1983. Fungi associated with several developmental stages of *Heterodera glycines* from an Alabama soybean field soil. Nematropica, 13: 181–200.

Griffin, D.H. 1994. Chemical requirements for growth. pp. 130–157. In: Griffin, D.H. (ed). Fungal Physiology, 2nd, Wiley-Liss. New York.

Hadapad, A.B. & Zebita, C.P. 2006. Mass production, survival and evaluation of solid substrate inocula of *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch against *Holotrichia serrata* (Coleoptera: Scarabaeidae). Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 71, 2B: 433–441.

Hallman, J., Davies, K.G. & Sikora, R. 2009. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. In: Perry, R.N., Moens, M. & Starr, J.L. (eds.), Root-knot Nematodes. CABI, UK.

Hazmi, A.S., Yahya, F.A., AbdelRafaa, O.A. & Lafi, H.A. 2019. Effects of humic acid, *Trichoderma harzianum* and *Paecilomyces lilacinus* on *Meloidogyne javanica*. International Journal of Agriculture, Environment and Bioresearch, 4(1): 61–74.

Heijbroek, W. 1983. Some effects of fungal parasites on the population development of the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.). Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 48: 433–439.

Hernández, M.A. & Hidalgo-Díaz, L. 2008. KlamiC: Bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Revista de Protección Vegetal, 23: 131–134.

Hidalgo-Diaz, L., Bourne, J.M., Kerry, B.R. & Rodriguez, M.G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: Isolation and screening. International Journal of Pest Management, 46(4): 277–284.

Hidalgo-Diaz, L., Franco-Navarro, F. & de Freitas, L.G. 2017. *Pochonia chlamydosporia* microbial products to manage plant –parasitic nematodes: Case studies from Cuba, Mexico and Brazil. pp. 311-342. In: Manzanilla-López, R.H., Lopez-Llorca, L. V. (eds.), Prospectives in sustainable nematode management through *Pochonia chlamydosporia* applications for root and rhizosphere health. Springer.

Irving, F. & Kerry, B.R. 1986. Variation between strains of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. Nematologica, 32: 474–485.

Jamalirad, N., & Fatemy, S. 2013. Pathogenicity of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* on root-knot nematode on cucumber. 1st National Conference on Sustainable Agriculture Development and Healthy Environment, 26 Feb. Islamic Azad University, Hamandan, Iran. 1–12, (in Persian)

Jaronski, S.T. 2014. Mass production of entomopathogenic fungi: state of art. pp. 357-413. In: Morales-Ramos, J.A.; Guadalupe Rojas, M.; Shapiro-llan, D. (eds.), Mass production of beneficial organisms, invertebrates and entomopathogens. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00011-X

Jones, K.A. & Burges, H.D. 1998. Technology of formulation and application. Pp 7-30. In: Burges, H.D (eds.), Formulation of microbial biopesticides. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-Lopez, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L. & Perry, R.N. 2013. Top 10 plant parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 14: 946–961.

Karakas, M., Benli, M. & Cebesoy, S. 2012. Effects of some cultural conditions on the growth of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* (Fungi: *Clavicipitaceae*) isolated from *Meloidogyne incognita* eggs. Journal of Animal and Veterinary Advances, 11(24): 4644–4647.

Kerry, B.R. 1975. Fungi and the decrease of cereal cyst-nematode populations in cereal monoculture. EPPO Bull, 5:353–361.

Kerry, B.R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology, 38: 423–441.

Kerry, B.R. & Hidalgo-Diaz, L. 2004. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on organically grown vegetable crops in Cuba. Multitrophic Interactions in the Integrated Control, 27: 123–126.

Kerry, B.R., Crump, D.H. & Mullen, L.A. 1982. Studies of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae*, under continuous cereals, 1974–1978. II. Fungal parasitism of nematode females and eggs. Annals of Applied Biology, 100: 489–499.

Kerry, B.R., Kirkwood, I.A., De Leij, F.A.A.M., Barba, J., Leijdens, M.B. & Broes, P.C. 1993. Growth and survival of *Verticillium* Goddard, a parasite of nematodes in soil. Biocontrol Science and Technology, 3: 355–365.

Larriba, E., Jaime, M., Carbonell-Caballero, J., Conesa, A., Dopazo, J., Nislow, C., Martin-Nieto, J. & Lopez-Llorca, L. 2014. Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus *Pochonia chlamydosporia*. Fungal Genetics and Biology, 65: 69–80.

Lamovsek, J., Urek, G. & Trdan, S. 2013. Biological control of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): Microbes against pests. Acta Agriculture Slovenia, 101(2): 263–275.

Loffredo, A., Bent, E., McKenry, M.V., Borneman, J. & Becker, Jo. 2007. Understanding a root-knot nematode suppressive soil. Journal of Nematology, 39: 86.

Luambano, N.D., Manzanilla-Lopez, R.H., Kimenju, J.W., Powers, S.J., Naria, R.D., Wanjohi, W.J. & Kerry, B.R. 2015. Effects of temperature, pH, carbon and nitrogen ratios on the parasitic activity of *Pochonia chlamydosporia* on *Meloidogyne incognita*. Biological Control, 80: 23–29.

Magan, N. 2001. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. Pp 239-251. In: Jackson TMC, Magan, N. (eds.), Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI, UK.

Maheshwari, R. 2012. Fungi. Experimental methods in biology, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.

Manzanilla-López, R.H., Esteves, I., Powers, S.J. & Kerry, B.R. 2011. Effects of crop plants on abundance of *Pochonia chlamydosporia* and other fungal parasites of root-knot and potato cyst nematodes. Annals of Applied Biology, 159: 118–129.

Mar, T.T. & Lumyong, S. 2012. Conidial production of entomopathogenic fungi in solid-state fermentation. KKU Research Journal, 17(5): 762–768.

Mascarin, G.M., Alves, S.B. & Biaggioni Lopes, R. 2010. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53(4): 753–761.

Mauchline, T.H., Kerry, B.R. & Hirsch, P. 2002. Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating. Applied and Environmental Microbiology, 68: 1846–1853.

McKevith, B. 2004. Nutritional aspects of cereals. Nutrition Bulletin, 29: 111–142.

Meyer, S.L.F., Huettel, R.N., Liu, X.Z., Humber, R.A. & Juba, J. 2004. Activity of fungal culture filtrates against soybean cyst nematode and root-knot nematode egg hatch and juvenile motility. Nematology, 6: 23–32.

Moosavi, M.R. & Askary, T.H. 2015. Nematophagous fungi commercialization. pp. 187–202. In: Askary, T.H. & Martinelli, P.R.P. (eds.). Biocontrol Agents of Phytonematodes. CABI, UK.

Moosavi, M., Zare, R., Zamani zadeh, H. & Fatemy, S. 2010. Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. Journal of Invertebrate Pathology, 104: 125–133.

Rao, M.S., Kerry, B.R., Gowen, S.R., Bourne, J.M., & Reddy, P.P. 1997. Management of *Meloidogyne incognita* in tomato nurseries by integration of *Glomus deserticola* with *Verticillium chlamydosporium*. Z Pflanzenk Pflanzen – J. Plant Diseases and Protection, 104: 419–422.

Ravensber, W.J. 2011. A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods. Springer.

Reddy, P.P., Khan, R.M. & Rao, M.S. 1991. Integrated management of the citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* using oil-cakes and *Paecilomyces lilacinus*. Afro-Asian Journal of Nematology, 1, 2: 221–222

Rumbos, C.I. & Kiewnick, S. 2006. Effect of plant species on persistence of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 in soil and on root colonization by the fungus. Plant and Soil, 283: 25–31.

Sahayaraj, K. & Namasivayam, S.K.R. 2008. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. African Journal of Biotechnology, 7(12): 1907–1910.

Segers, R., Butt, T.M., Kerry, B.R., Beckett, A. & Peberdy, J.F. 1996. The role of the proteinase VCP1 produced by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematode eggs. Mycological Research, 100: 421–428.

Stirling, G.R. 2011. Biological control of plant-parasitic nematodes: An ecological perspective, a review of progress and opportunities for further research. In: pp. 1-38. Davies, K.G. & Spiegel, Y. (eds.), Biological control of plant –parasitic nematodes: Building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms, Progress in Biological Control. Springer.

Stirling, G.R. 2014. Biological control as a component of integrated nematode management: the way forward. pp. 393–407.In: Stirling, G.R. (ed.) Biological control of plant parasitic nematodes: soil ecosystem management in sustainable agriculture, second revised edition. CABI, UK.

Stirling, G.R. & Kerry, B.R. 1983. Antagonists of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae* Woll. in Australian soils. Australian Journal of Eexperimental Agriculture and Animal Husbandry, 23: 318–324.

Sun, M.H., Gao, L., Shi, Y.X., Li, Bao. Jü. & Liu, X.Z. 2006. Fungi and Actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. J. Invertebrate Pathology, 93: 22–28.

Vieira dos Santos, M.C., Esteves, I., Kerry, B. & Abrantes, I. 2013. Biology, growth parameters and enzymatic activity of *Pochonia chlamydosporia* isolated from potato cyst and root-knot nematodes. Nematology, 15: 493– 504.

Wagh, V.H. & Pramanik, A. 2014. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* for management of root knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato. The Bioscan, 9(1): 407–411.

Wesemael, W.M.L., Viaene, N. & Moens, M. 2011. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. Nematology, 13: 3–16.

Willcox, J. & Tribe, H.T. 1974. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera* I. Preliminary investigations. Transactions of the British Mycological Society, 62: 585–594.

Zaki, M.J. & Maqbool, M.A. 1993. Occurrence of *Verticillium chlamydosporium* egg parasite of root knot nematodes *Meloidogyne Javanica* and *M. incognita* in Pakistan. Journal of Nematology, 11: 37–40.

Zare, R., Gams, W. & Evans, H.C. 2001. A revision of *Verticillium* section Prostrata. V. The genus *Pochonia* with notes on *Rotiferophthora*. Nova Hedwigia, 73: 51–86.

Solid-state fermentation and viability of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* on some organic substrates

Rahele Sadat Shirazi[1], Seddigheh Fatemy[2], Shahram Naeimi[2], Zahra Majd Taheri[2]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science & Research Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Tehran, Iran

Corresponding author: Seddigheh Fatemy, sfatemy@yahoo.com

Received: Jan., 14, 2019 6(2) 1-14 Accepted: Mar., 17, 2019

Abstract

Pochonia chlamydosporia and *Purpureocillium lilacinum* are important biocontrol agents of root-knot and cyst nematodes. Both fungi were first reported from sugar beet cyst nematode from Khorasan province and have shown promising potential as biocontrol agents of *Heterodera schachtii*, *Globodera rostochiensis* and *Meloidogyne* spp. In this study, sporulation and shelf life of fungi were evaluated on solid substrates for 2 months. The fungi were grown on cereals, their spore production and stability at 10 °C and 25 °C were evaluated. Based on media, storage duration and temperature regime, spore production of fungi differed. *Pochonia* produced spores on wheat grain, barley grain, wheat and rice bran after 30 days, and on rice husk after 60 days. *P. lilacinum* colonized all the substrates and yield of spore was highest on barley grain and rice husk. Viability of both fungi was slightly decreased after 60 days storage at 25 ºC, but at 10 ºC with some discrepancy did not change significantly. After 60 days, *Pochonia* produced average 1.5×10^8 and 7×10^7 spores / g of wheat and rice bran, and other cereals, respectively. Meanwhile, *P. lilacinum* produced 2.7×10^8 and 1.5×10^8 spores /g wheat and barley bran, respectively. Chlamydospores are resting spores of *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* and one of the most common sources of inoculation in soil. On barley 1.1×10^5 and on wheat and rice bran average 5×10^3 chlamydospores were produced.

Keywords: cereals, culture substrates, mass production, storage