

## مطالعه اثرات سینرژیستی ترکیبات شبه هورمون پوست اندازی و خاک دیاتومه بر قارچ بیمارگر *Metarhizium anisopliae* برای کنترل لارو سوسک شاخدار خرما *Oryctes elegans*

مسعود لطیفیان، بهار راد

پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری کشور، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

مسئول مکاتبات: مسعود لطیفیان، پست الکترونیک: masoud\_latifian@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۲۲

۷(۱) ۱۵-۲۷

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۱۷

### چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات کشندگی و سینرژیستی ترکیبات ضد سنتز کیتین و خاک دیاتومه در کنترل تلفیقی آن‌ها همراه با قارچ *Metarhizium anisopliae* در جمعیت سوسک شاخ‌دار نخل بود. ترکیبات ضد سنتز کیتینی که در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفتند شامل آتابرون، دیمیلین و نیمازول بودند. برای بررسی اثر سازگاری ترکیبات با قارچ *M. anisopliae*، رشد میسلومی و درصد جوانه‌زنی قارچ *M. anisopliae* به روش اختلاط ترکیبات ضد سنتز کیتین با محیط کشت بررسی شد. پس از آن قدرت کشندگی ترکیبات ضد سنتز کیتین سازگار به صورت تکی و در تلفیق با قارچ *M. anisopliae* به روش زیست‌سنجی ارزیابی شد. بررسی‌ها نشان داد که قارچ *M. anisopliae* در تلفیق با کلیه ترکیبات ضد سنتز کیتین توانایی رشد میسلومی و جوانه‌زنی اسپور دارد. درصد جوانه‌زنی اسپور قارچ *M. anisopliae* در تمام غلظت‌ها در شرایط استفاده از نیمازول بالاتر از سایر ترکیبات بوده است. بالاترین شاخص سازگاری در شرایط اختلاط با غلظت ۵۰۰ میلی‌لیتر در لیتر نیمازول و کم‌ترین شاخص سازگاری در شرایط اختلاط با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌لیتر در لیتر دیمیلین بوده است. هر سه ترکیب دارای اثرات سینرژیستی در قدرت بیمارگری قارچ *M. anisopliae* روی مرحله رشدی لارو سوسک شاخ‌دار بوده‌اند. اما نیمازول اثرات سینرژیستی بالاتری نشان داد. خاک دیاتومه مورد آزمایش توانایی ایجاد مرگ و میرروی مرحله رشدی لارو سوسک شاخ‌دار خرما با متوسط غلظت کشندگی معادل ۱۲۶۹/۷ میلی‌گرم بر لیتر را داشت. این ترکیب همچنین دارای اثرات سینرژیستی روی قدرت کشندگی ترکیبات ضد سنتز کیتین و قارچ *M. anisopliae* بود. اما بیشترین قدرت کشندگی و سینرژیستی در شرایط اختلاط غلظت‌های کشنده ۵۰ درصد ترکیبات خاک دیاتومه، نیمازول و قارچ *M. anisopliae* مشاهده شد.

**واژه‌های کلیدی:** قارچ *M. anisopliae*، ترکیبات ضد سنتز کیتین، خاک دیاتومه، هم‌افزایی، سازگاری

### مقدمه

(Soltani, 2009, 2008 a,b). این آفت در نخلستان‌های جوان (۱۰-۱۲ ساله) بیشتر از نخلستان‌های مسن شیوع دارد (Latifian et al., 2012). چنانچه حمله آفت در سنین اولیه کاشت پاجوش اتفاق بیفتد، احتمال مرگ درختان نخل خرماي جوان به ۱۰۰ درصد می‌رسد (Soltani et al., 2008b; Ehsine et al., 2009; Soltani, 2009). مطالعاتی در رابطه با اثرات *Metarhizium anisopliae* در کنترل زیستی آفت سوسک شاخ‌دار نخل خرما در ایران انجام شده است (Latifian et al., 2012). یکی از ویژگی‌های مثبت قارچ‌های بیمارگر حشرات، سازگاری

سوسک شاخ‌دار خرما *Oryctes elegans* از آفات مهم نخل خرما در ایران، عراق (Buxton 1920; Endrödi) و شمال پاکستان (Ratcliffe & Ahmed, 2010)، عربستان سعودی (Al-Deghairi, 2007)، امارات متحده عربی، بحرین و قطر (El-Haidari & Al-Hafidh, 1986; El-Shafie, 2015) می‌باشد. توسعه کشت درختان جوان نخل خرما در مناطق جدید و واردات نخل‌های آلوده به این آفت سبب گسترش آلودگی آن در سال‌های اخیر شده است

مورد اثر اختلاط خاک دیاتومه و قارچ‌های بیمارگر وجود دارد (Lord 2001, 2005, 2007; Akbar *et al.*, 2004; Oliveira & Alves 2007; Dal Bello *et al.*, 2006; Batta 2008; Vassilakos *et al.*, 2006; Athanassiou & Steenberg, 2007).

در این مطالعه، سازگاری و قابلیت اختلاط آفت-کش‌های هورمونی ضد سنتز کیتین و خاک دیاتومه با قارچ بیمارگر *M. anisopliae* و توانایی‌های کشندگی آن‌ها در حالت اختلاط و جداگانه در جمعیت لارو سوسک شاخدار نخل خرما مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### پرورش حشرات

حشرات کامل اولیه سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* از نخلستان‌های آلوده اطراف آبادان جمع‌آوری گردیدند. این حشرات درون ظروف پلاستیکی مخصوص به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر ۷ سانتی‌متر که حاوی ۴۰۰ گرم بافت مریستم انتهایی پاجوش خرما به‌عنوان منبع تغذیه به آزمایشگاه منتقل شدند. برای پرورش حشرات در شرایط آزمایشگاه نیز از ظروف مشابه استفاده شد. به این ترتیب که هر جفت سوسک نر و ماده درون یک ظرف حاوی ۴۰۰ گرم بافت مریستم انتهایی پاجوش خرما به‌عنوان منبع تغذیه و محل تخم‌گذاری بود، منتقل می‌شدند. ظروف درون انکوباتور در درجه حرارت  $25 \pm 5$  درجه سلسیوس و رطوبت نسبی  $75 \pm 5$  درصد نگهداری شدند. تخم‌های آفت به صورت روزانه از طریق خرد کردن بافت مریستم جداسازی شده و به ظروف مشابه جدید منتقل می‌شدند تا لاروها ظاهر گردند.

### کشت جدایه قارچی

جدایه قارچ *M. anisopliae* مورد استفاده در این پژوهش از طریق مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه شدند. جدایه قارچ مورد استفاده در این مطالعه (DEMID 01) از خاک استان سیستان و بلوچستان از مناطق گرمسیری ایران به‌دست آمد. پس از خالص‌سازی، جدایه‌های قارچ مورد نظر در محیط غذایی SDAY

آن‌ها برای اختلاط با آفت‌کش‌ها است (Deoliveira & Neves, 2004). مقدار استفاده از سموم شیمیایی را می‌توان به‌طور قابل توجهی با استفاده از این قابلیت کاهش داد (Lacey & Goettel, 1995). در مواردی استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات برای کنترل آفات کافی نیست و معرفی سموم شیمیایی سازگار در فرمولاسیون‌های آفت‌کش‌های زیستی اثر آن‌ها را بر جمعیت حشرات آفت افزایش می‌دهد (Kaakeh *et al.* 1997; Quintela & Lacey *et al.*, 1999; Ramakrishana *et McCoy*, 1998; *al.*, 1999; Furlong & Groden 2001; Ying *et al.*, 2003).

برخی آزمایش‌های انجام شده نشان داده‌اند که میزان چسبندگی و جوانه‌زنی اسپور و رشد میسلیمی قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* در شرایط کاربرد خالص و در ترکیب با مواد ضد سنتز کیتین متفاوت است (Boucias *et al.*, 1996, Quintela & McCoy, 1997a, 1997b, 1998a, 1998b). همچنین اختلاط *M. anisopliae* با ترکیبات مختلف گیاهی اثر متفاوتی بر رشد میسلیمی و جوانه‌زنی اسپور آن داشته است (Gonzalez *et al.*, 1996; Aguda *et al.*, 1986). آفت‌کش‌های مختلف دارای اثر سینرژیستی یا آنتاگونیستی بر توانایی بیمارگری *B. bassiana* می‌باشند. به‌عنوان مثال آفت‌کش ایمیداکلوپراید به‌علت کاهش چسبندگی اسپور به بدن لارو بر توانایی بیمارگری آن اثر آنتاگونیستی دارد (Boucias & Pendland, 1991). نیم به‌عنوان مواد شبه هورمون جوانی باعث کاهش جوانه‌زنی اسپور قارچ *B. bassiana* شده است (Mohan *et al.*, 2007).

تحقیقات گسترده‌ای برای استفاده از پودرهای معدنی به‌عنوان عوامل کنترل آفات با مخاطرات زیست محیطی کمتر انجام شده است. به‌عنوان مثال کاربرد خاک دیاتومه به‌عنوان جایگزین برخی حشره‌کش‌ها در مدیریت تلفیقی آفات شناخته شده است (Korunic, 1999). خاک دیاتومه متشکل از سیلیسی است که از دیاتوم‌های میکروسکوپی فسیلی تشکیل شده و دارای خواص ساینده‌گی کوتیکول حشرات است (Korunic, 1998). گزارش‌های متعددی در

بود، از طریق رقیق‌سازی متوالی و با استفاده از میکروپیت با دقت تشخیص یک میلی‌لیتر انجام شد. اما در صورت بالاتر بودن غلظت مورد نیاز از دستگاه سانتریفوژ با قدرت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه استفاده می‌شد.

### آفت‌کش‌های ضد سنتز کیتین مورد آزمایش

سه نوع آفت‌کش ضد سنتز کیتین در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفته است. از غلظت‌های ۲۵۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آفت‌کش در محیط کشت برای هر سه آفت‌کش استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- آفت‌کش‌های ضد سنتز کیتین مورد استفاده در پژوهش.

Table 1. Description of the ecdysoid pesticides used in research.

Trade name	Effective substance	Chemical group
Atabron	Chlorfluoresin	Benzoyl urea
Nimazol	Azadirachtin	Molting hormone-like compounds
Dimilin	Diflubenzuron	Benzoyl urea

### تأثیر آفت‌کش‌ها در رشد میسلومی

برای بررسی اثر سازگاری آفت‌کش‌های ضد سنتز کیتین روی رشد میسلومی قارچ *M. anisopliae* به روش اختلاط آفت‌کش با محیط کشت بررسی شد. برای این منظور با اندازه‌گیری رشد رویشی قارچ روی محیط کشت حاوی آفت‌کش، ابتدا قارچ *M. anisopliae* در چند ظرف پتری حاوی محیط کشت PDA کشت داده شد و به این صورت چند منبع تهیه شد. فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDA پس از اتوکلاو، در دمای اطاق قرار داده شد تا دمای آنها به ۴۲-۴۵ درجه سلسیوس کاهش یابد. برای تهیه غلظت‌های ۲۵۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آفت‌کش در محیط کشت طبق روش (Oliveira & Neves ۲۰۰۴) به فلاسک‌های حاوی محیط PDA اضافه و به هم زده شد تا امولسیون یکنواخت بوجود آید. محیط‌های حاصل درون ظروف پتری به قطر هشت سانتی‌متری تقسیم (مقدار تقریبی ۱۰-۱۵ میلی‌لیتر) و اجازه داده شد تا محیط جامد شود.

(Sabouraud Dextrose Agar + Yeast extract) کشت شد. برای تهیه محیط کشت SDAY از ترکیبات آگار ۱۵ گرم، دکستروز ۲۰ گرم، باکتوپتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۲ گرم و آب مقطر به میزان ۱۰۰۰ میلی‌لیتر استفاده شد. پس از حل کردن مواد درون ظرف ارلن و به وسیله هم‌زن الکتریکی حرارتی، ظروف ارلن حاوی محیط کشت جهت ضدعفونی به دستگاه اتوکلاو با فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه منتقل شدند. بعد از اسپورزایی کامل (کشت ۱۴-۱۲ روزه) سطح محیط کشت با سوزن انتقال خراش داده شد و در داخل ظروف ارلن جداگانه جمع‌آوری شد که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون با محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ (Tween 80) بود. محلول فوق به مدت ۵ دقیقه به طور پاندولی به هم زده شد. سپس سوسپانسیون حاصل از پارچه ملامل دو لایه عبور داده شد تا قطعات میسلوم از آن جدا شدند. برای جدا شدن اسپورها از هم و عدم تشکیل زنجیر در هنگام شمارش، درون لوله‌های حاوی سوسپانسیون قارچ، مهره‌های شیشه‌ای ریخته و برای چند دقیقه به شدت تکان داده شد. جهت شمارش اسپورها و تهیه تراکم‌های مختلف اسپور در واحد حجم از لام گلوبول شمار (Improved Neubauer) استفاده شد. برای اندازه‌گیری زنده‌مانی اسپورها روز قبل از آزمایش ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون  $5 \times 10^6$  اسپور در میلی‌لیتر از جدایه‌های قارچ روی محیط کشت SDA داخل تشتک پتری به صورت یک لایه نازک پوشش داده شد. درب تشتک پتری با پارافیلیم بسته و تشتک‌های پتری در دمای  $26 \pm 2$  درجه سلسیوس در داخل انکوباتور در شرایط کاملاً تاریک قرار داده شدند. ۱۵-۱۸ ساعت پس از تلقیح یک میلی‌لیتر فرمالدئید ۰/۰۵ درصد به منظور توقف جوانه زنی اسپورها به داخل هر تشتک ریخته شد. درصد جوانه‌زنی با شمارش ۱۰۰ اسپور از هر تشتک پتری با بزرگ‌نمایی ۴۰ محاسبه شد. روز بعد فقط از کشت‌هایی استفاده شد که بیش از ۸۵ درصد اسپورهای آن جوانه زده بودند. در آزمایش‌های انجام شده نیاز به تهیه غلظت‌های متفاوتی از سوسپانسیون قارچ بود. برای رسیدن به یک غلظت مشخص چنانچه مقدار آن از غلظت سوسپانسیون پایه تهیه شده کمتر

درجه سازگاری رابطه (۱) به شرح ذیل محاسبه شد (Alves et al., 1998). در این رابطه M متوسط رشد میسلومی و G متوسط درصد جوانه‌زنی قارچ در شرایط اختلاط می‌باشد. پس از محاسبه مقدار پارامتر سازگاری بر اساس جدول ۲ سازگاری آفت‌کش با قارچ برآورد شد.

$$\text{رابطه ۱: } T = [(20(M) + 80(G)) / 100]$$

جدول ۲- درجه سازگاری براساس محاسبه شاخص T.

Table 2. Quality of compliance based on the T index calculation.

Quality of compliance	T index
Very toxic	0-30
Toxic	31-45
Slightly toxic	46-60
Non- toxic	>60

## زیست‌سنجی قارچ بیمارگر، آفت‌کش‌های هورمونی و خاک دیاتومه

زیست‌سنجی اولیه برای تعیین غلظت کشندگی مؤثر ۹۰-۱۰ درصد اسپور قارچ، آفت‌کش‌های هورمونی و خاک دیاتومه با اندازه‌گیری ثابت لگاریتم بین حداقل و حداکثر غلظت‌های مورد استفاده روی لارو سن سوم *O. elegans* انجام شد (Robertson & Preisler, 1992). پس از تهیه غلظت‌های لگاریتمی از سه گروه عامل کشنده، از روش غوطه‌ورسازی برای اعمال تیمارها روی لارو آفت استفاده شد. برای این منظور، تعداد ۲۰ عدد لارو به طور جداگانه در ۳۰ میلی‌لیتر از هر غلظت اسپور *M. anisopliae* آفت‌کش‌های هورمونی و غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از خاک دیاتومه (Silicosec® formulation) به مدت ۲۰ ثانیه غوطه‌ور شدند. لاروهای تیمار شده به قفس‌های نگهداری (قطر هفت سانتی‌متر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر) حاوی مریستم انتهایی نخل خرما (تقریباً ۸۰ گرم) منتقل شدند. قفس‌ها در انکوباتور در دمای  $26 \pm 2$  درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰-۷۰ درصد قرار گرفتند. میزان مرگ‌ومیر به مدت ۱۶ روز و به صورت روزانه ثبت شد. تیمارهای مختلف و شاهد چهار بار تکرار شد. آزمایش‌های زیستی برای ارزیابی غلظت‌های

سپس دیسک‌های قارچی به قطر پنج میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ‌کن از کشت‌های جوان قارچ *M. anisopliae* تهیه و در قسمت وسط ظروف پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. برای هر یک از غلظت‌ها پنج تکرار و پنج تکرار هم بدون عصاره (محیط کشت شاهد)، در نظر گرفته شد. ظروف پتری در انکوباتور در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس و رطوبت نسبی  $55 \pm 5$  درصد و دوره روشنایی ۸:۱۶ قرار داده شدند. اندازه‌گیری قطر میسلوم هر یک از تیمارها و تکرارها پس از ۱۰ روز انجام شد.

## تأثیر آفت‌کش‌ها در جوانه زنی اسپور

درصد جوانه زنی روی محیط کشت PDB بررسی شد. غلظت‌های آفت‌کش‌ها در محیط کشت مشابه روش قبل تهیه شد. برای تهیه اسپور قارچ از کشت‌های دو هفته‌ای قارچ که در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس روی محیط کشت SDA و در شرایط نوری طبیعی پرورش داده شده بودند استفاده شد. جهت تهیه سوسپانسیون اسپور، توده قارچ برداشت شده در ظرف ارلن ضد عفونی شده ریخته شد و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول آب مقطر سترون به همراه Tween 80  $0.2\%$  درصد به آن افزوده و به مدت پنج دقیقه به هم زده شد تا اسپورها از میسلوم جدا شدند. سپس محتوی ظرف ارلن از پارچه ملامل دو لایه عبور داده شده و سوسپانسیون یکنواخت اسپور فراهم شد. برای شمارش اسپورها و تعیین غلظت سوسپانسیون از لام نئوبار استفاده شد. برای اندازه‌گیری توانایی جوانه‌زنی اسپورها در غلظت‌های مختلف آفت‌کش، مقدار  $0.1$  میلی‌لیتر از اسپور قارچ با غلظت  $5 \times 10^6$  بر روی محیط‌های PDB حاوی غلظت‌های مختلف آفت‌کش منتقل شد. ظروف پتری در انکوباتور در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس و رطوبت نسبی  $55 \pm 5$  درصد و دوره روشنایی ۸:۱۶ قرار داده شدند. پس از ۱۵-۱۸ ساعت جوانه‌زنی اسپورها در تیمارها و تکرارهای مختلف بررسی شدند. درصد جوانه‌زنی با شمارش ۱۰۰ اسپور از هر ظرف پتری با بزرگنمایی  $40 \times$  تعیین شد. هر تیمار پنج بار تکرار شد.

## محاسبه سازگاری

مرگ‌ومیر مربوط به قارچ مورد نظر،  $O =$  مرگ‌ومیر مشاهده شده مربوط به مخلوط حشره کش مورد نظر یا خاک دیاتومه و قارچ بود.

$$E = O_{IGR/DE} + O_{Metarhizium} (1 - O_{IGR/DE})$$

$$X_2 = ((O-E)^2)/E$$

برای تعیین اثرات سینرژیستی یا آنتاگونیستی شاخص SR مطابق رابطه ۳ محاسبه شد.

رابطه ۳:

$$SR = [LT_{50}(\text{عامل بیمارگر}) / LT_{50}(\text{کیتین ضد سنتز کیتین})] + (\text{عامل بیمارگر})$$

چنانچه  $SR < 1$  باشد، آنگاه ترکیب دارای اثرات آنتاگونیستی و اگر  $SR > 1$  باشد، آنگاه ترکیب دارای اثر سینرژیستی بوده است.

### نتایج

#### سازگاری آفت‌کش‌های هورمونی و عامل کنترل میکروبی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد برای خصوصیات مورد مطالعه در سازگاری قارچ از جمله جوانه‌زنی‌اسپور ( $Df = 2 Ms = 112$ )، رشد میسیلیومی ( $Df = 2 Ms = 0/153$ ) و شاخص T ( $Df = 2 Ms = 73/03$ ) در تیمارهای مختلف آفت‌کش هورمونی وجود دارد. علاوه بر نوع آفت‌کش‌ها، غلظت‌های آنها نیز در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری در میانگین خصوصیات مورد مطالعه شامل جوانه‌زنی‌اسپور ( $Df = 2 Ms = 172/75$ )، رشد میسیلیومی ( $Df = 2 Ms = 0/667$ ) و شاخص T ( $Df = 2 Ms = 114/4$ ) نشان دادند. میانگین شاخص‌ها در تیمارهای مختلف با استفاده از روش SNK (Student-Newman-Keuls) مقایسه شدند که نتایج آن در جدول ۳ درج شده است.

نتایج نشان داد که درصد جوانه‌زنی اسپور *M. anisopliae* در تمام غلظت‌های تیمار نیم‌ازول بالاتر از سایر آفت‌کش‌های ضد سنتز کیتین بود. از سوی دیگر، با افزایش میزان غلظت آفت‌کش‌ها، توانایی جوانه‌زنی اسپور

کشنده ( $LC_{50}$ ،  $LC_{90}$ ) و زمان‌های کشنده ( $LT_{10}$ ،  $LT_{50}$ ) و  $LT_{90}$  انجام شد.

### تحلیل داده‌ها

برای نرمال کردن توزیع پراکنش داده‌های درصد مرگ‌ومیر طبیعی به دست آمده براساس روش آبوت به  $ASin x$  تبدیل شدند (Gomez & Gomez, 1984). متوسط زمان ( $LT_{50}$ ) و غلظت ۵۰ و ۹۰ درصد مرگ‌ومیر ( $LC_{50} / LD_{50}$ ،  $LC_{90} / LD_{90}$ ) با استفاده از رگرسیون لجستیک تخمین زده شدند (Stokes et al., 2000). تمام تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از روش GENMOD SAS انجام شد (SAS Institute, 1990).

#### اثر تلفیقی قارچ *M. anisopliae* و ترکیبات ضد سنتز کیتین روی لارو آفت

به منظور بررسی اثرات تلفیقی جدایه قارچ مورد نظر با آفت‌کش‌های هورمونی و خاک دیاتومه مورد آزمایش روی مرگ‌ومیر لاروهای سوسک شاخ‌دار نخل خرما، باتوجه به نتایج حاصل از زیست‌سنجی هر قارچ و ترکیبات ضد سنتز کیتین روی مراحل لاروهای سن ۳ انجام شد غلظت‌های لازم برای انجام این آزمایش به صورت زیر تعریف شد:

- 1-LC<sub>50</sub> *M. anisopliae*
- 2-LC<sub>50</sub> Atabron
- 3-LC<sub>50</sub> Diflubenzuron
- 4-LC<sub>50</sub> Nimazol
- 5-LC<sub>50</sub> *M. anisopliae* + LC<sub>50</sub> Atabron
- 6-LC<sub>50</sub> *M. anisopliae* + LC<sub>50</sub> Diflubenzuron
- 7-LC<sub>50</sub> *M. anisopliae* + LC<sub>50</sub> Nimazol
- 8-LD<sub>50</sub> Diatomaceous
- 9-LD<sub>50</sub> Diatomaceous + LC<sub>50</sub> Atabron
- 10-LD<sub>50</sub> Diatomaceous + LC<sub>50</sub> Diflubenzuron
- 11-LD<sub>50</sub> Diatomaceous + LC<sub>50</sub> Nimazol
- 12-LD<sub>50</sub> Diatomaceous + LC<sub>50</sub> *M. anisopliae*
- 13-LD<sub>50</sub> Diatomaceous + LC<sub>50</sub> *M. anisopliae* + LC<sub>50</sub> Atabron
- 14-LD<sub>50</sub> Diatomaceous + LC<sub>50</sub> *M. anisopliae* + LC<sub>50</sub> Diflubenzuron
- 15-LD<sub>50</sub> Diatomaceous + LC<sub>50</sub> *M. anisopliae* + LC<sub>50</sub> Nimazol

### تحلیل آماری

مقدار مرگ‌ومیر مورد انتظار و  $X_2$  طبق رابطه ۲ محاسبه شد. در این رابطه  $E =$  مرگ‌ومیر مورد انتظار مربوط به مخلوط حشره کش یا خاک دیاتومه و قارچ،  $O_{IGR/DE} =$  مرگ‌ومیر مربوط به حشره کش مورد نظر،  $O_{Metarhizium} =$

۱۰۰۰ میلی لیتر دیمیلین و آتابرون با قارچ *M. anisopliae* سازگار بوده و قابلیت اختلاط دارند.

### توانایی مرگ و میر قارچ بیماریگر، آفت کش های ضد سنتز کیتین و خاک دیاتومه

آفت کش های مورد مطالعه و قارچ بیماریگر قادر به ایجاد مرگ و میر در جمعیت لارو سوسک شاخدار نخل خرما بودند. غلظت های کشنده از ۵۰ و ۹۰ درصد برای همه عوامل به صورت جداگانه محاسبه شدند (جدول ۴).

زمان مرگ و میر برای گروه های تیماری که نیمی از لارو ها کشته شده اند محاسبه شد که نتایج آنها در جدول ۵ نشان داده شده است. کمترین  $LT_{50}$  مقدار ۷/۷۲ روز بود که برای غلظت ۱۵۰۰ میلی لیتر در لیتر نیمازول ثبت شد. کمترین مقدار  $LT_{50}$  خاک دیاتومه ۱۰/۸۶ روز بود که در غلظت ۱۲۵۰ میلی گرم در لیتر رخ داد.

به تدریج کاهش می یابد. نرخ رشد میسلومی در غلظت ۲۵۰ میلی لیتر در لیتر از تیمار نیمازول و آتابرون و ۷۵۰ میلی لیتر در لیتر نیمازول بالاتر از سایر تیمارها بود. رشد میسلومی در غلظت ۱۰۰۰ میلی لیتر در لیتر تمامی آفت کش ها کمترین میزان بود. از سوی دیگر، با افزایش غلظت، رشد میسلومی نیز به تدریج کاهش می یافت. شاخص سازگاری (T) در تمام غلظت های تیمار نیمازول بالاتر از سایر ترکیبات بود. از سوی دیگر، شاخص T با افزایش غلظت در تمام آفت کش های مورد آزمایش به تدریج کاهش می یافت. به طوری که بالاترین شاخص سازگاری در تیمار ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی لیتر در لیتر آتابرون و ۷۵۰ میلی لیتر در لیتر نیمازول ثبت شد. کمترین شاخص T در غلظت ۱۰۰۰ میلی لیتر در لیتر از تیمار آفت کش دیمیلین ثبت شد. به طور کلی نتایج نشان داد که تمام غلظت های آفت کش های مورد مطالعه به جز

جدول ۳- مقایسه میانگین جوانه زنی اسپور، رشد میسلومی و شاخص T در شرایط اختلاط *M. anisopliae* با آفت کش های ضد سنتز کیتین.

Table 3. The comparisons the mean of spore germination, mycelial growth and T index of *M. anisopliae* in terms of mixing with ecdysoids pesticides.

Pesticides	Concentrations (ml/l)	Spore germination (%)	mycelial growth (cm)	T index
Atabron	250	93.5 ± 1.5a	3.38 ± 0.41a	75.47a
	750	90.5 ± 1.6b	3.11 ± 0.17b	73.04b
	1000	85.25 ± 0.5d	2.96 ± 0.32c	68.76d
Dimilin	250	91.5 ± 0.5c	3.32 ± 0.15b	73.86b
	750	88.5 ± 1.7c	3.14 ± 0.41b	71.42c
	1000	83.25 ± 0.5e	2.78 ± 0.27d	67.16d
Nimazol	250	96.5 ± 0.5a	3.45 ± 0.21 a	77.89a
	750	94.25 ± 1.5a	3.44 ± 0.15a	76.09a
	1000	90.25 ± 0.5b	3.02 ± 0.12b	73.01b

جدول ۴- مقادیر غلظت های کشنده قارچ *M. anisopliae*، سموم ضد سنتز کیتین و خاک دیاتومه روی لاروهای *O. elegans*.

Table 4. Lethal concentration values of *M. anisopliae*, ecdysoids pesticides and diatomaceous earth against larvae of *O. elegans*.

Treatments	LC <sub>50</sub> (95% fiducial limits)	LC <sub>90</sub> (95% fiducial limits)	Slope	<sup>2</sup> <sub>-test</sub>
Atabron	647.6, (576.5-718.72)	1231.7 (1159.3-1251.4)	1.16 ± 0.78	0.89
Dimilin	797.6, (694.7-831.2)	1659.3 (1591.6-1739.2)	1.21 ± 0.09	0.67
Nimazol	696.6, (624.1-768.7)	1568.4 (1491.7-1597.4)	1.05 ± 0.11	0.51
<i>M. anisopliae</i>	5.69 × 10 <sup>8</sup> , (3.87-9.12) × 10 <sup>8</sup>	2.5 × 10 <sup>11</sup> , (1.4-3.21) × 10 <sup>11</sup>	0.4 ± 0.06	0.46
	LD <sub>50</sub> (95% fiducial limits)	LD <sub>90</sub> (95% fiducial limits)	Slope	<sup>2</sup> <sub>-test</sub>
Diatomaceous earth	759.8 (688.9-830.7)	1269.7 (1238/1-1328.9)	0.002 ± 0.007	0.61

براساس نتایج حاصل، سه آفت کش ضد سنتز کیتین دارای اثرات سینرژیستی بر بیمارگری قارچ در لاروهای *O. elegans* بودند. با این حال، آفت کش نیمازول اثرات سینرژیستی بیشتری نسبت به ترکیبات دیگر نشان داد. خاک دیاتومه نیز دارای اثرات سینرژیستی در همه تیمارها بود. بالاترین اثر سینرژیستی در تیمار  $LD_{50} \text{ Diatomaceous} + LC_{50} M. anisopliae + LC_{50} \text{ Nimazol}$  بود.

### اثرات متقابل بین قارچ بیمارگر، آفت کش های ضد سنتز کیتین و خاک دیاتومه

زمان وقوع مرگ و میر ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد ( $LT_{10}$ ،  $LT_{50}$  و  $LT_{90}$ ) برای هر عامل و شاخص SR به منظور بررسی اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی بین آفت کش های ضد سنتز کیتین و خاک دیاتومه بر توانایی قارچ عامل بیمارگر در ایجاد مرگ و میر در جمعیت لارو سوسک شاخدار خرما محاسبه شد (جدول ۶).

جدول ۵- مقادیر  $LT_{50}$  برای *M. anisopliae*، آفت کش های ضد سنتز کیتین و خاک دیاتومه در لاروهای *O. elegans*.

Table 5.  $LT_{50}$  values *M. anisopliae*, ecdysoids pesticides and diatomaceous earth against larvae of *O. elegans*.

Fungal species	Concentration	$LT_{50}$ (days) (95% Fiducial Limits)	Slope(±SE)	$\chi^2$ -test
Atabron	1000	11.88 (11.23-12.37)	1.14±0.13	0.32
	1250	9.8 (8.92-10.3)	0.96±0.21	0.53
	1500	9.6 (8.51-10.1)	0.85±0.18	0.47
Dimilin	1000	11.63 (11.15-12.01)	1.14±0.09	0.81
	1250	10.3 (9.33-10.62)	0.98±0.07	0.49
	1500	8.14 (7.83-8.90)	0.84±0.15	0.93
Nimazol	1000	9.03 (8.01-9.85)	0.95±0.06	0.71
	1250	9.93 (8.69-10.22)	0.83±0.04	0.68
	1500	7.72 (7.12-8.29)	0.67±0.09	0.34
<i>M. anisopliae</i>	$10^9$	8.38 (7.86-8.88)	0.16±0.03	0.19
	$5.0 \times 10^9$	8.34 (7.83-8.85)	0.16±0.03	0.193
	$5.0 \times 10^8$	6.05 (5.7-6.39)	0.22±0.04	0.13
Diatomaceous earth	1000	15.73 (13.69-16.38)	1.96±0.17	0.52
	1250	10.86 (9.14-11.72)	1.37±0.09	0.49

جدول ۶- شاخص SR و زمان وقوع مرگ و میر ۱۰، ۵۰ و ۹۰ درصد ( $LT_{10}$ ،  $LT_{50}$  و  $LT_{90}$ ) در تیمارهای تلفیقی (*M. anisopliae*) آفت کش های ضد سنتز کیتین و خاک دیاتومه).

Table 6. The SR index and lethal time ( $LT_{10}$ ,  $LT_{50}$  &  $LT_{90}$ ) of the integrated treatments (*M. anisopliae*, ecdysoids pesticides and diatomaceous earth).

Treatments	$LT_{10}$	$LT_{50}$	$LT_{90}$	SR index
$LC_{50} M. anisopliae$	0.73	4.26	10.49	-
$LC_{50}$ Atabron	7.16	15.12	21.3	-
$LC_{50}$ Diflubenzuron	6.89	14.57	20.56	-
$LC_{50}$ Nimazol	6.62	13.96	19.69	-
$LC_{50} M. anisopliae + LC_{50}$ Atabron	0.56	2.04	6.42	2.09
$LC_{50} M. anisopliae + LC_{50}$ Diflubenzuron	0.47	2.21	6.64	1.93
$LC_{50} M. anisopliae + LC_{50}$ Nimazol	0.27	1.71	5.44	2.49
$LD_{50}$ Diatomaceous	7.14	14.76	20.70	-
$LD_{50}$ Diatomaceous + $LC_{50}$ Atabron	6.49	12.82	17.75	1.18
$LD_{50}$ Diatomaceous + $LC_{50}$ Diflubenzuron	5.77	13.88	20.21	1.05
$LD_{50}$ Diatomaceous + $LC_{50}$ Nimazol	5.26	13.33	19.62	1.05
$LD_{50}$ Diatomaceous + $LC_{50} M. anisopliae$	0.32	4.17	7.67	1.02
$LD_{50}$ Diatomaceous + $LC_{50} M. anisopliae + LC_{50}$ Atabron	0.26	1.45	5.31	2.94
$LD_{50}$ Diatomaceous + $LC_{50} M. anisopliae + LC_{50}$ Diflubenzuron	0.31	1.49	5.58	2.86
$LD_{50}$ Diatomaceous + $LC_{50} M. anisopliae + LC_{50}$ Nimazol	0.16	1.17	6.24	3.64

## بحث

*M. anisopliae* در بدن حشرات در طی فرآیند مشخص وقوع می‌پوندد. بنابراین، مکانیسم اثرات سینرژیستی آفت‌کش‌های ضد سنتز کیتین با تأثیر بر مراحل این فرآیند شامل چسبندگی اسپور، جوانه‌زنی اسپور، نفوذ و رشد میسلیم در بدن حشره میزبان رخ می‌دهد (Roberts & Preisler, 1992).

اثرات منفی از سموم ضد سنتز کیتین بر جوانه‌زنی اسپور و رشد میسلیمی *M. anisopliae* گزارش نشده است. با این وجود، هیچ اثرات محرک نیز وجود نداشت. بنابراین اثرات سینرژیستی آن‌ها نمی‌تواند به دلیل اثرات مثبت آن‌ها بر جوانه‌زنی اسپور و رشد میسلیمی قارچ در هموسل حشره باشد. با این وجود، این ترکیبات می‌توانند مکانیسم‌های مقاومت به نفوذ قارچی را با تضعیف اسکلت خارجی بدن حشرات کاهش دهند. این شرایط برای نیمازول نسبت به سایر آفت‌کش‌های مورد مطالعه بیشتر بود. مطالعات دیگر پژوهشگران که با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت انجام شده نشان داد که رشد میسلیم و جوانه‌زنی اسپور *M. anisopliae* در ترکیب و بدون آفت‌کش‌های ضد سنتز کیتین اختلاف معنی‌داری ندارد (Boucias et al., 1996, Quintela & McCoy, 1997 a, 1997b, 1998a, 1998b). نتایج مشابهی با سایر قارچ‌های بیماری‌گر حشرات وجود دارد. برای مثال تلفیق *M. anisopliae* با آفت‌کش‌های زیستی گیاهی مختلف اثر متفاوتی بر جوانه‌زنی اسپور و رشد میسلیمی آن داشته است. آفت‌کش نیم باعث کاهش جوانه‌زنی اسپور و رشد میسلیمی *B. bassiana* به ترتیب به میزان 28/21 و 17/26 درصد گردید (Gonzalez et al., 1996; Aguda et al., 1986). در مطالعه دیگری نشان داده شده است که ترکیبی از نیم با *M. anisopliae* اثر سینرژیستی در کنترل *Bemisia tabaci* Gennadius در شرایط مزرعه بادمجان داشته به طوری که حداقل  $LT_{50}$  در حالت تلفیقی بوده است (Touhidul et al., 2009). در مطالعه دیگری، سازگاری 30 جدایه قارچ *B. bassiana* با ترکیب نیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که 27 جدایه آنها با ترکیب نیم سازگار بودند (Mohan et al., 2007).

یکی از مشکلات کاربرد قارچ بیماری‌گر *M. anisopliae* برای کنترل زیستی سوسک شاخدار نخل خرما *O. elegans* پایین بودن سرعت مرگ و میر آفت در شرایط نخلستان بود. نتایج این مطالعه نشان داد که سه نوع آفت‌کش ضد سنتز کیتین قابلیت اختلاط با اسپورهای قارچ را داشته و سازگار هستند. اگر چه تفاوت‌های میان شاخص‌های اختلاط در ترکیبات آزمایش شده بسیار کم بود، اما در میان آن‌ها نیمازول سازگاری بهتر را نشان داد. از سوی دیگر، آزمایش‌های زیست‌سنجی نشان داد که ترکیب نیمازول و قارچ دارای اثرات سینرژیستی در ایجاد مرگ‌ومیر در لاروهای سوسک شاخدار نخل خرما بودند. در این مورد نیز، اگر چه شاخص سینرژیستی سه آفت‌کش ضد سنتز کیتین نزدیک به یکدیگر بودند، اما نیمازول اثرات مناسب‌تری نشان داد. نیمازول به‌عنوان یک هورمون ضد سنتز کیتین شرایط نفوذ بیشتری برای اسپور جوانه‌زده و میسلیم قارچ عامل بیماری‌گر به درون بدن لارو سوسک شاخدار نخل خرما از طریق اثر آن بر سنتز کیتین و پوست بدن لارو فراهم کرد. از سوی دیگر، زیست‌سنجی‌ها نشان داد که ترکیب نیمازول و خاک دیاتومه دارای اثرات سینرژیستی بیشتری بر توانایی بیماری‌گری قارچ دارند. در این مورد، اگر چه شاخص‌های هم‌افزایی نزدیک به یکدیگر هستند، ولی ترکیب مورد اشاره اثرات بهتری نشان داد. حساسیت لارو به عفونت قارچی احتمالاً در اثر از طریق عمل سایشی خاک دیاتومه و خواص ضد سنتز کیتینی نیمازول افزایش می‌یابد.

مطالعات پژوهشگران دیگر نتایج مشابهی نشان داده‌اند. به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای که برای بررسی اثرات سینرژیستی آفت‌کش‌های ضد سنتز کیتین بر توانایی بیماری‌گری قارچ *M. anisopliae* در جمعیت سوسک کلرادوی سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) انجام شد. مشخص گردید که آفت‌کش‌های ضد سنتز کیتین اثرات سینرژیستی بیشتری نسبت به سایر سایر آفت‌کش‌ها در توانایی بیماری‌گری قارچ‌های بیماری‌گر حشرات بودند (Sirota & Grafius, 1994). مراحل ایجاد عفونت و بیماری‌گری قارچ



در نهایت، نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از آفت کش های ضد سنتز کیتین و خاک دیاتومه به صورت اختلاط با قارچ بیمارگر *M. anisopliae* در فرمولاسیون نهایی آفت کش زیستی برای کنترل لارو سوسک شاخدار نخل خرما مناسب است. این ترکیبات می توانند کارایی بیمارگری قارچ را افزایش و میزان مصرف آفت کش ها را در نخلستان کاهش دهند. همچنین سرعت اثربخشی قارچ را افزایش و از خسارت اقتصادی آفت به نخلستان جلوگیری کنند.

سمیت خاک دیاتومه در آزمایش های متعددی که روی حشرات متعدد انجام شده، مشخص گردیده است. محصول طبیعی به صورت های متفاوتی فرمولاسیون شده و برای کنترل انواع آفات شهری یا حشراتی که به محصولات انباری حمله می کنند، استفاده شده است ( Faulde *et al.*, 2006; 2006). در این مطالعه کاربرد تلفیقی خاک دیاتومه با آفت کش های ضد سنتز کیتین و به تنهایی دارای اثرات سینرژیستی در توانایی قارچ بیمارگر برای ایجاد عفونت در بدن لارو سوسک شاخدار نخل خرما بود.

## References

- Aguda, R.M., Rombach, M.C. & Shepard, B.M. 1986. Effect of "neem" oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*, International Rice Research Newsletter, 11: 34–35.
- Akbar, W., Lord, J., Nechols, J.R. & Howard, R.W. 2004. Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. Journal of Economic Entomology, 97: 273–280.
- Al-Deghairi, M. 2007. Seasonal fluctuation of the date palm fruit stalk borer, *Oryctes elegans* Prell (Coleoptera: Scarabaeidae), in date palm plantations in Al-Qassim region, Saudi Arabia. Agricultural & Marine Sciences, 12: 67–70.
- Alves, S.B., Moino, Jr.A. & Almeida, J.E.M. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In- Controle microbiano de insetos, ed. S.B. Alves. Fealq, São Paulo, pp. 217–238.
- Athanassiou, C. & Steenberg, G.T. 2007. Insecticidal effect of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) in combination with three diatomaceous earth formulations against *Sitophilus granaries* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Biological control, 40: 411–416.
- Batta, Y.A. 2008. Control of main stored-grain insects with new formulations of entomopathogenic fungi in diatomaceous earth dusts. International Journal of Food Engineering, 4: 1–18.
- Boucias, D.G. & Pendland, J.C. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event of mycoses in arthropod hosts, pp. 101-128. In: G.T. Cole and H.C. Hoch [eds.], The fungal spore and disease initiation in plants & animals. Plenum, New York.
- Boucias, D.G., Stokes, C., Storey, G. & Pendland, J.C. 1996. The effects of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. Pflanzenschutz-Nachr. Bayer 49: 103–144.
- Buxton, P.A. 1920. Insect pests of dates and the date palm in Mesopotamia and elsewhere. Bulletin of Entomological Research, 11: 287–303.
- Dal Bello, G.M., Padín, S., Juárez, M.P., Pedrini, N. & Giusto, M. 2006. Biocontrol of *Acanthoscelus obtectus* and *Sitophilus orizae* with diatomaceous earth and *Beauveria bassiana* on stored grains. Biocontrol Science and Technology, 16: 215–220.

- Faulde, M.K., Tisch, E.M. & Scharninghausen, J.J. 2006. Efficacy of modified diatomaceous earth on different cockroach species (Orthoptera, Blattellidae) and silverfish (Thysanura, Lepismatidae). *Journal of Pest Science*, 79: 155–161.
- Furlong, M.J. & Groden, E. 2001. Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (coleopteran chysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine. *Journal of Economic Entomology*, 94: 344–356.
- Ehsine, M., Belkadhi, M.S. & Chaieb, M. 2009. Bio-ecologic observations on rhinoceros beetle *Oryctes agamemnon* (Burmeister 1847) on the palm dates oasis of Rjim Maatoug in southwestern Tunisia. *Journal of Arid Land Studies*, 19: 379–382.
- El-Haidari, H.S. & Al-Hafidh, E.M. 1986. Palm and date arthropod pests in the Near East & North Africa (126 pp). Regional Project for Palm & Dates Research Center in the Near East & North Africa, Food & Agriculture Organization. Baghdad: Al-Watan Press.
- El-Shafie, H.A.F. 2015. Biology, ecology and management of the longhorn date palm stem borer *Jebusaea hammerschmidti* (Coleoptera: Cerambycidae). *Outlooks on Pest Management*, 26 (1): 20–23.
- Endrödi, S. 1985. *The Dynastinae of the World* (Series Entomologica 28, 800 pp). The Hague: Junk.
- Gonzalez, D.M.E., Valbuena, P.B.F., Rivera, M.A., Bustillo, P.A.E. & Chaves, B. 1996. Viabilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* en mezcla con agroquímicos, *The Revista Colombiana de Entomología*, 22: 31–36.
- Goettel, M.S., Hajek, A.E., Siegl, J.P. & Evans, H.C. 2001. Safety of fungal biocontrol agents. In: Butt T, Jackson MC & Magan N (Eds), *Fungi as biocontrol agents*. CAB International, Wallingford, UK, 346–347.
- Kaakeh, W., Reid, B.L., Bohnerl, T.J. & Bennett, G.W. 1997. Toxicity of imidacloprid in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). & the synergism between imidacloprid & *Metarhizium anisopliae* (Imperfect fungi: Hyphomycetes). *Journal of Economic Entomology*, 90: 473–482.
- Korunic, Z. 1999. Enhanced diatomaceous earth: an alternative to methyl bromide. *Australian Journal of Technology*, 2: 95–104.
- Lacey, L.A. & Goettel, M.S. 1995. Current development in of microbial control of insect pests & prospects for the early 21 century. *Journal of Entomophaga*, 40: 1–25.
- Latifian, M. & Rad, B. 2012. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Beauveria brongniartii* Saccardo & *Metarhizium anisopliae* Metsch. To adult *Oryctes elegans* Prell, & effects on feeding & mortality. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4: 1026–1032.
- Lord, J.C. 2001. Desiccant dusts synergize the effect of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) on stored grain-beetles. *Journal of Economic Entomology*, 94: 367–372.
- Lord, J.C. 2005. Low humidity, moderate temperature and desiccant dust favor efficacy of *Beauveria bassiana* for the Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha dominica* (Col.: Bruchidae). *Biological Control*, 34: 180–186.
- Lord, J. C. 2007. Desiccation increases the efficacy of *Beauveria bassiana* for stored- grain pest insect control. *Journal of Stored Products Research*, 43: 535–539.
- Mohan, M.C., Reddy, N.P. Devi, U.K., Kongara, R. & Sharma, H.C. 2007. Growth and insect assays of *Beauveria bassiana* with neem to test their compatibility and synergism. *Biocontrol Science and Technology*, 17 (10): 1059–1069.

- Oliveira, R.C. & Neves, P.M.O.J. 2004. Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. Neotropical Entomology, 33(3): 353–358.
- Oliveira, D.G.P. & Alves, L.F.A. 2007. Interac ão do fungo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Com terra diatomácea para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), o cascudinho dos aviários. Bioassay, 2(1): 6–7.
- Pay&eh, A. & Dehghan, A. 2010. Demography of date palm fruit stalk borer, *Oryctes elegans* (Col.: Scarabaeidae), on date palm under laboratory conditions. Plant Protection Journal, 2: 255–263.
- Quintela, E.D. & McCoy, C.W. 1997a. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. Environmental Entomology, 26: 1173–1182.
- Quintela, E.D. & McCoy, C.W. 1997b. Effects of imidacloprid on development, mobility and survival of Prst instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Economic Entomology, 90: 988–995.
- Quintela, E.D. & McCoy, C.W. 1998a. Synergistic effect of imidacloprid & two entomopathogenic fungi on the behavior & survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. Journal of Economic Entomology, 91: 110–122.
- Quintela, E.D., & McCoy, C.W. 1998b. Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. Journal of Invertebrate Pathology, 72: 220–230.
- Ratcliffe, B.C. & Ahmed, Z. 2010. Additions to the distribution of Scarabaeidae (Insecta: Coleoptera) in northern Pakistan. Pakistan Journal of Zoology, 42: 827–830.
- Robertson, J.L., & Preisler, H.K. 1992. Pesticide Bioassays with Arthropods. CRC Press, London, 127pp.
- Rochat, D. 2006. Trapping: Drawbacks & prospects: need for more research. In Proceedings of the first international workshop on red palm weevil, November 28–29, 2005, Valencia, Spain. Fundacion Agroalimed, Valencia, Spain 99–104.
- Soltani, R. 2009. *Oryctes agamemnon* arabicus Fairmaire (1896): Etude bioécologique et éthologique dans les oasis de Rjim Maâtoug au sud ouest Tunisien (181 pp). Thèse de Doctorat, Institut des Sciences Agronomique, Chott Mariem, Tunisie.
- Soltani, R., Chaieb, I., & Ben Hamouda, M. 2008a. The life cycle of the root borer, *Oryctes agamemnon*, under laboratory conditions. Journal of Insect Science, 8(6): 379–382.
- Soltani, R., Ikbel, C.B & Hamouda, M. 2008b. Descriptive study of damage caused by the rhinoceros beetle, *Oryctes agamemnon*, & its influence on date palm oases of Rjim Maatoug, Tunisia. Journal of Insect Science, 8(6): 387–407.
- Touhidul, M.D., castle, S.J. & Ren, S. 2009. Compatability of insect pathogen fuhgus *Beauveria bassiana*. With neen against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, on eggplant. Entomologia Experimentalis et Applicata, 134(1): 28–34.
- Vassilakos, T.N., Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G. & Vayias, B.J. 2006. Influence of temperature on the insecticidal effect of *Beauveria bassiana* in combination with diatomaceous earth against *Rhyzopertha dominica* and *Sitophilus oryzae* on stored wheat. Biological Control, 38: 270–281.

- Vayias, B.J., Athanassiou, C.G. & Buchelos, C.T. 2006. Evaluation of three diatomaceous earth and one natural pyrethrum formulations against pupae of *Tribolium confusum* DuVal (Coleoptera: Tenebrionidae) on wheat & flour. *Journal of Crop Protection*, 25: 766–772.
- Ying, S.H., Feng, M.G., & Xu, S.T. 2003. Field efficacy of emulsifiable suspensions of *Beauveria bassiana* conidia for control of *Myzus persicae* population on cabbage. *The Journal of Applied Ecology*, 14: 545–548.

**Study the synergistic effects of ecdysoids and diatomaceous earth on *Metarhizium anisopliae*  
for control of date horned beetle larvae, *Oryctes elegans* Prell.**

**Masoud Latifian, Bahar Rad**

Date Palm and Tropical Fruits Research Center, Horticulture Science Research Institute, Agricultural Research,  
Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran

Corresponding author: Masoud Latifian: masoud\_latifian@yahoo.com

---

Received: Jun., 07, 2019

7(1) 15-27

Accepted: Jan., 12, 2020

---

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate toxic and synergistic effects of ecdysoids compounds and diatomaceous earth on their integrated control along with the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* on date palm horned beetle larvae. In this study, the evaluated ecdysoids were Atabron, Dimilin and Nimazol. The fungal mycelium growth and spore germination were evaluated to checking the consistency of the ecdysoids compounds by extract medium mixing method. Then, the toxicity of compounds individually and in conjunction with pathogen *M. anisopliae* was evaluated by bioassay method. Studies revealed that mycelial growth and spore germination of *M. anisopliae* occur in all ecdysoids compounds. The highest compatible index was 76.89 for concentration of 500 microliters per liter of Nimazol extract and the lowest level consistent with the incorporation of Dimilin in 1000 microliters per liter concentration. The combination of ecdysoids compounds with fungal pathogen *M. anisopliae* had synergistic effect on larval developmental stage of date palm horned beetle. The synergistic effect of Nimazol was higher. The use of diatomaceous earth showed mortality of horned beetle larvae with average lethal concentration equal to 1269.7 mg per liter. It also has synergistic effects on toxicity of fungal pathogen *M. anisopliae* and anti-synthesis chitin compounds. The most powerful synergistic effects were observed in terms of mixing 50 percent lethal concentrations of diatomaceous earth, Nimazole and *M. anisopliae*.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae*, ecdysoid, diatomaceous earth, compatibility, synergism

---