بررسی اثر کشندگی عصاره‌های گیاهی و اثرات سینرژیستی آن‌ها با قارچ *Beauveria bassiana* برای کنترل جمعیت شپشه‌دندانه‌دار *Oryzaephilus surinaemensis* در شرایط تغذیه از خرما

مسعود لطیفیان[۱]، بهار راد[۲]، جهانشیر شاکرمی[۳]، اسماعیل راه‌خدایی[۲]

۱- دفتر امور میوه‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

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

۳- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

مسئول مکاتبات: مسعود لطیفیان، پست الکترونیک: masoud_latifian@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۲۳ ۷(۲) ۱۷-۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۴/۰۴

چکیده

در صورت سازگار بودن عصاره‌های گیاهی با قارچ *Beauveria bassiana*، و وجود اثرات تشدیدکنندگی بین این دو، امکان افزایش کارآیی در کنترل میکروبی آفت انباری خرما وجود دارد. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات کشندگی و سینرژیستی عصاره‌های گیاهی در تلفیق با *B. bassiana* به منظور امکان سنجی کنترل جمعیت شپشه دندانه دار *Oryzaephilus surinaemensis* در شرایط انبارداری خرما بود. قسمت‌های رویشی و زایشی هوایی گیاهان مورد، درمنه کوهی، پونه ، بومادارن و چریش آزمایش شدند. اثر عصاره‌های گیاهان بر رشد میسلیومی و درصد جوانه‌زنی *B. bassiana* به روش اختلاط عصاره مایع الکلی با محیط کشت بررسی شد. قدرت کشندگی عصاره‌های گیاهی سازگار به صورت منفرد و در تلفیق با *B. bassiana* روی حشره کامل و لارو شپشه دندانه‌دار ارزیابی شد. نتایج نشان داد *B. bassiana* در محیط‌های عصاره درمنه و چریش توانایی رشد میسلیومی و جوانه‌زنی اسپور دارد. درصد جوانه‌زنی اسپور در تمام غلظت‌ها در چریش بالاتر از درمنه بود. برای کاهش ۵۰ درصد قدرت جوانه‌زنی قارچ توسط چریش غلظتی معادل ۱۹۴۹/۴ میکرولیتر/لیتر نیاز بود. کمترین درصد کاهش رشد میسیلیومی در غلظت ۲۵۰ میکرولیتر/لیتر چریش و معادل ۳/۱ درصد و بیشترین آن در ۱۰۰۰ میکرولیتر/لیتر درمنه و معادل ۲۰/۱ درصد بود. برای کاهش ۵۰ درصدی رشد میسیلیومی قارچ توسط چریش به غلظتی معادل ۳۶۶۷۹/۴ میکرولیتر/لیتر نیاز بود. بالاترین شاخص سازگاری در غلظت ۵۰۰ میکرولیتر/لیتر چریش و معادل ۷۶/۸۹ درصد و کم‌ترین در ۱۰۰۰ میکرولیتر/لیتر درمنه بود. هر دو عصاره دارای اثرات سینرژیستی در بیمارگری *B. bassiana* روی حشره کامل و لارو بودند. اما عصاره چریش اثرات سینرژیستی بالاتری نشان داد.

واژه‌های کلیدی: *Beauveria bassiana*، عصاره گیاهی، سازگاری، سینرژیستی

مقدمه:

شپشه دندانه‌دار *Oryzaephilus surinamensis* (Linneaus) از آفات انباری مهم خرما است(Bagherizenoz, 1375; Latifian, 2004). یکی از روش‌های کنترل این آفت تدخین است. گازدهی با متیل بروماید برای کنترل آفات در محصولات انباری از جمله خرما استفاده می‌شود. با وجود اقدامات شایسته ایران درخصوص کاهش مصرف متیل بروماید به نظر می‌رسد که صنعت خرمای کشور از این روند عقب مانده است. به طوری که هنوز از این گاز در ایران و بسیاری از کشورهای خاورمیانه به عنوان مهمترین روش ضدعفونی استفاده می‌شود (Moore *et al.*, Latifian, 2004; Naphade, 2020; 2000).

پایه مدیریت تلفیقی آفات مبتنی بر استفاده از روش‌های بیولوژیکی می‌باشد. مدیریت آفات با تلفیق کنترل بیولوژیک و سایر روش‌های مجاز، جایگزین مناسبی برای متیل بروماید در ضدعفونی محصولات کشاورزی است (Latifian, 2004). قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌توانند به

عنوان یک عامل در کنترل جمعیت حشرات انباری استفاده شوند (Canhilal, 2016; Rajendran 2020). یکی از ویژگی‌های مثبت قارچ‌های بیمارگر حشرات به ویژه *B. bassiana* سازگاری آن با آفت‌کش‌ها می‌باشد (Oliveira & Neves, 2004). پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که جدایه‌های ایرانی قارچ *B. bassiana* بیشتر از سایر عوامل میکروبی توانایی بیمارگری در جمعیت شپشه‌دندانه‌دار دارند. در میان عوامل بیمارگر قارچی بررسی شده کمترین غلظت کشنده ۵۰ درصد مربوط به جدایه 441c این قارچ روی حشرات‌کامل و لارو به ترتیب معادل $۲/۵۱\times۱۰^{۴}$ و $۳/۳۱\times۱۰^{۳}$ اسپور در میلی‌لیتر است (Latifian *et al*., 2009; Latifian *et al*., 2010). این جدایه قارچی در طیف دمایی وسیع‌تر و بالاتر، دارای رشد میسیلیومی و جوانه‌زنی مناسب است (Latifian *et al*., 2018). سرعت کنترل این قارچ بیمارگر نیز خوب بوده و طول دوره ۵۰ درصد تلفات آن بین ۴ تا ۷ روز متغیر است (Latifian *et al*., 2010). اگرچه نوع رقم خرما در توانایی کنترل آن مؤثر است، اما قارچ توانایی کنترل شپشه‌دندانه‌دار را در شرایط تغذیه از ارقام مختلف خرما دارد. عامل بیمارگر توانایی انتقال از یک نسل به نسل دیگر آفت (انتقال عمودی) و یا در میان افراد یک نسل (انتقال افقی) را داشته و درون توده خرما توسط میزبان خود قابلیت انتشار دارد (Latifian & Rahkhodaei, 2012). بنابراین از دیدگاه همه‌گیرشناسی عامل بیمارگر شامل نحوه انتشار بیماری و عامل بیمارگر، توزیع بیماری در جمعیت در زمان‌ها و مکان‌ها، از بیشتر صفات ضروری برای کنترل میکروبی موفق یک آفت برخوردار است (Latifian *et al*., 2017).

کنترل میکروبی را می‌توان همراه با آفت‌کش‌های مصنوعی و گیاهی و یا به تنهایی برای کنترل آفات کلیدی به کاربرد برد و استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی را به میزان قابل توجهی کاهش داد (Lacey & Goettel, 1995). آفت-کش‌های گیاهی حامل طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه فرار هستند که در روابط متقابل گیاه و حشره نقش مهمی دارند. بررسی‌هایی که روی اثر متقابل عصاره بذرهای *Azadirachta indica* A. Juss. روی آفات مختلف انجام شده نشان می‌دهد که گیاهان خانواده Meliaceae به ویژه درخت چریش دارای مواد شیمیایی گوناگونی بوده و دارای اثر آفت‌کشی بالایی است. حشره کش نیم آزال تی/اس (Neem Azal – T/S) از عصاره مغز میوه گیاه چریش به دست آمده و برای کنترل آفات مکنده و جونده و کنه‌های تارتن برای درختان میوه، گیاهان گلخانه‌ایی، گیاهان زینتی، مزارع و جنگل‌ها، خزانه‌های تولید نهال، فضای سبز شهرها، گیاهان آپارتمانی و در انبارهای ذخیره مواد غذایی مؤثر است. کاربرد قارچ‌ها به تنهایی اغلب در کنترل آفات ناکافی بوده و اضافه کردن مواد شیمیایی سازگار در فرمولاسیون‌های یک آفت‌کش میکروبی با ماده مؤثره اسپور قارچ‌های بیمارگر ممکن است اثرات قارچ را روی حشرات آفت افزایش دهد (Kaakeh *et al*., 1997; Quintela & Mccoy, 1998; Lacey *et al*., 1999; Ramakrishana *et al*., 1999; Furlong & Groden, 2001; Ying *et al*., 2003;De souza *et al*., 2005; Nascimento *et al*., 2008; Shoukat *et al*., 2016; Otieno *et al*., 2017; Ali & Sajjad, 2018; Damalas & Koutroubas, 2018). استفاده تلفیقی از *B. bassiana* و عصاره چریش توانسته است که سرعت کنترل آفات را افزایش دهد. در مطالعه‌ای که در شرایط مزرعه‌ای برای کنترل *Bemisia tabaci* Gennadius انجام شد. نتایج نشان داده است که تلفیق چریش با *B. bassiana* دارای اثرات سینرژیستی بوده و دارای حداقل زمان متوسط کشنده (LT_{50}) در زمان کاربرد تلفیقی به دست آمد (Touhidul *et al*., 2009). در مطالعه‌ای، سازگاری ۳۰ جدایه از *B. bassiana* با عصاره چریش روی لارو شب‌پره *Spodoptera litura* Fabricius مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که ۲۷ جدایه از آن‌ها قابلیت اختلاط با عصاره چریش را دارد (Mohan *et al*., 2007). در مطالعه دیگری فعالیت حشره‌کشی و اثرات هم افزایی قارچ *B. bassiana* و سه عصاره گیاهی بومادارن، چریش مرکبات روی لاروهای سن سوم شب‌پره *Ephestia kuehniella* Zeller مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تمام عصاره‌های گیاهی و قارچ بیمارگر خاصیت لاروکشی نشان دادند. تلفیق عصاره چریش و قارچ *B. bassiana* بیشترین اثر هم افزایی را روی مرگ و میر لارو داشتند (Shakarami *et al*., 2015). این

فرضیه که امکان افزایش کارایی این عامل بیمارگر با استفاده از اثرات سینرژیستی عصاره‌های گیاهی در کنترل میکروبی آفات انباری خرما وجود دارد، در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه قارچ و کشت آن در محیط کشت

در این پژوهش جدایه‌ای از قارچ *B. bassiana* با کد Iran 441c که در سیستان و بلوچستان و از روی سوسک سرخرطومی حنایی خرما *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier جدا گردیده استفاده شد. پس از خالص‌سازی به روش تک اسپور، در محیط SDAY کشت شد. بعد از اسپورزایی کامل (کشت ۱۲–۱۴ روزه) سطح محیط کشت بوسیله سوزن انتقال خراش داده شد. اسپورها در داخل ارلن‌های جداگانه‌ای که حاوی ۱۰ سی سی آب مقطر استریل با محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ بود، جمع‌آوری گردید.

پرورش شپشه دندانه‌دار

سوسک شپشه دندانه‌دار با نمونه‌برداری از خرماهای آلوده از انبارهای خرمای استان خوزستان جمع‌آوری و به آزمایشگاه حشره‌شناسی پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری انتقال داده شدند. پرورش آفت در دمای ۵±۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵ ± ۶۰ درصد درون ظروف پلاستیکی درب‌دار به ابعاد ۸/۵×۷/۵ سانتی‌متر که در قسمت درب آنها سوراخی جهت تهویه در نظر گرفته شد بر روی خرمای رقم سایر انجام گرفت.

عصاره‌گیری از گیاهان

نمونه‌های گیاهی در این پژوهش با توجه به بررسی منابع مختلف مبنی بر داشتن اثر حشره‌کشی انتخاب شدند (Pires *et al*., 2009; Shakarami *et al*., 2015). گیاهانی که در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفتند شامل مورد (*Myrtus communed* L.)، درمنه کوهی (*Artemisia aucheri* Boiss)، پونه (*Menthe longifolia* L.)، بومادارن (*Achilla millefolium* Yrrow) و چریش (*A. indica*) بودند. همه گونه‌ها به غیر از چریش که از استان هرمزگان جمع‌آوری شد به کمک متخصصین گیاه‌شناس منطقه از رویشگاه طبیعی آنها در فصل گلدهی در منطقه زاگرس در استان لرستان جمع‌آوری و شناسایی شدند (Veiskarami & Sharifi–Tehrani2017; Mehrabian *et al*., 2020). گیاهان پس از جمع‌آوری با آب مقطر شسته شده در اتاق با دمای ۲±۲۸ درجه سلسیوس دور از تابش نور خورشید خشک و سپس در کیسه‌های نایلونی تیره (برای عصاره‌گیری) نگهداری شدند. برای تسریع در خشک شدن بافت‌های گیاهی از پنکه استفاده شد. گل‌ها بعد از سه تا پنج روز، برگ‌ها بعد از دو تا چهار روز و ساقه‌ها بعد از چهار تا پنج روز خشک شدند که این بستگی به میزان آب بافت مورد نظر داشت. به منظور عصاره‌گیری ۲۰ گرم از پودر خیس شده گیاه را داخل کارتوش ریخته و درون دستگاه سوکسله قرار داده شد و در بالن دستگاه ۱۲۰ میلی لیتر استون + ۳۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته شد. عصاره‌ها در مدت ۲ ساعت کار دستگاه جمع‌آوری شد. عصاره استخراج شده توسط دستگاه تقطیر در خلاء دوار در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه تغلیظ شد. به طوری که در پایان استخراج حجم عصاره نهایی تغلیظ شده به ۳۰ میلی لیتر رسید. عصاره‌های تهیه شده درون ظروف شیشه‌ای تیره ریخته شده و درب آن‌ها با پوشش آلومینیوم پوشانده و درون یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Mahdavi Arab *et al*., 2008).

تأثیر عصاره در رشد میسیلومی

سازگاری عصاره‌های گیاهی روی رشد میسیلومی *B. bassiana* به روش اختلاط عصاره با محیط کشت بررسی شد. در ابتدا قارچ *B. bassiana* در محیط PDA کشت داده شد. فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDA پس از اتوکلاو، در دمای اطاق قرار داده شد تا دمای آنها به ۴۵–۴۲ درجه سلسیوس کاهش یابد. برای تهیه غلظت‌های مختلف عصاره مقدار ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر عصاره در فلاسک‌های ۱۰۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس طبق روش De Oliveira & Neves (۲۰۰۴) مابه تفاوت حجم

۱۰۰۰ میلی‌لیتر فلاسک‌ها، محیط PDA اضافه و به هم زده شد تا امولسیون یکنواخت بوجود آید. محیط‌های حاصل درون ظروف پتری به قطر ۸ سانتی‌متر (مقدار تقریبی ۱۰–۱۵ میلی لیتر) اضافه گردید و اجازه داده شد تا محیط جامد شود. سپس دیسک‌های قارچی به قطر ۵ میلی متر توسط چوب پنبه سوراخ کن از کشت‌های جوان *B. bassiana* تهیه و یک دیسک قارچ در قسمت وسط ظروف پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. برای هر یک از غلظت‌ها ۴ تکرار و ۴ تکرار هم بدون عصاره (محیط کشت شاهد)، در نظر گرفته شد. ظروف پتری مایه‌زنی شده در انکوباتور در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۵۵ درصد و دوره روشنایی ۸ : ۱۶ ساعت قرار داده شد. زمانی که سطح محیط کشت ظروف پتری شاهد توسط قارچ بطور کامل اشغال شد (پس از گذشت سه هفته) اندازه‌گیری قطر رشد میسیلیومی هر یک از تیمارها انجام شد و غلظت کاهش دهنده ۵۰ درصد رشد میسلیومی محاسبه گردید.

تأثیر عصاره در جوانه زنی اسپور

درصد جوانه زنی روی محیط کشت PDB بررسی شد. پس از سرد شدن محیط، به آن عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر/لیتر اضافه شد و اثر آن‌ها روی قارچ بررسی شد و مقداری از محیط کشت PDB نیز بدون عصاره به عنوان کنترل نگه داشته شد. برای تهیه غلظت مشخصی از سوسپانسیون اسپور قارچ، پس از استریل کردن مواد و وسایل، به وسیله یک سوزن سطح محیط کشت خراش داده شد تا میسیلیوم‌ها و اسپور قارچ جدا شوند. اسپور و میسیلیوم‌های برداشت شده به درون ارلن حاوی مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول Tween80 ۰/۰۲ درصد ریخته شد و به آن آب مقطر سترون اضافه شد تا حجم به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسد. سپس سوسپانسیون به هم زده شد تا یکنواخت شود. سپس سوسپانسیون حاصله از پارچه ململ استریل دو لایه عبور داده شده تا قطعات میسلیوم از آن جدا شوند. برای شمارش اسپورها و تعیین غلظت سوسپانسیون از لام نئوبار استفاده شد. بعد از اضافه کردن سوسپانسیون قارچ به محیط PDB حاوی عصاره و محیط کنترل، و گذشت ۲۴ ساعت، نمونه‌ای از این محیط برداشته و روی لام گلبول‌شمار ریخته شد. درصد اسپورهای جوانه‌زده تعیین شد. با محاسبه میزان جوانه‌زنی اسپور قارچ در هر یک از تیمارها و مقایسه تیمارها با هم، میزان بازدارندگی عصاره در جوانه‌زنی قارچ مشخص شد و غلظت کاهش دهنده ۵۰ درصد جوانه زنی محاسبه گردید.

محاسبه سازگاری

درجه سازگاری بر اساس روش Alves و همکاران (Alves *et al*., 1998) به شرح ذیل محاسبه گردید.

$$T= [(20(M)+80(G)]/100$$

در این رابطه M متوسط رشد میسیلومی و G متوسط درصد جوانه‌زنی قارچ در شرایط اختلاط می‌باشد. پس از محاسبه مقدار پارامتر سازگاری بر اساس جدول ۱ سازگاری برآورد شد (Alves *et al*., 1998).

جدول ۱- درجه سازگاری براساس محاسبه شاخص T

Table 1. Degree of compatibility based on the T index calculation

	T index
Very toxic	0–30
Toxic	31–45
Slightly toxic	46–60
Non– toxic	>60

تعیین قدرت کشندگی (زیست‌سنجی) قارچ بیمارگر

برای محاسبه غلظت کشنده جدایه قارچی ازمحلول آب استریل حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ به عنوان حامل استفاده شد. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی که نظیر سایر روش‌های زیست‌سنجی انجام گرفت و تعیین غلظت‌های حداقل و حداکثر، پنج غلظت لگاریتمی‌شامل ۵×۱۰^{۲}، $۱۰^{۳}$، ۵×۱۰^{۳}، $۱۰^{۴}$ و ۵×۱۰^{۴} اسپور در میلی‌لیتر برای مرحله لارو و ۵×۱۰^{۳}، $۱۰^{۴}$ و ۵×۱۰^{۴}، $۱۰^{۵}$ و ۵×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر برای مرحله حشره‌کامل تهیه و آزمون‌های حیاتی با آن‌ها انجام شد. زیست‌سنجی‌ها با حشرات کامل و لاروهای پرورش یافته بر روی خرما در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. برای

هـر تکـرار ۲۰ عـدد از هـر مرحلـه رشـدی اسـتفاده شـد. آزمایش‌ها در ۶ تیمـار (غلظـت‌هـای مختلـف و شـاهد) و ۴ تکرار انجام گرفت. بـرای آلـوده سـاختن حشـرات از روش غوطه‌ورسـازی اسـتفاده شـد. سـپس حشـرات هـر تکـرار در قفس‌های مخصوص که کف آن‌ها بـرای تغذیـه خرمـا قـرار داده شده بود قرار گرفتند و به داخل اتاقک رشـد در دمـای ۲۵±۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۵±۵ درصد و دوره روشنایی ۸ : ۱۶ ساعت منتقل شدند. مرگ و میر حشرات هر روز و به مدت ۱۰ روز ثبت و جـدول مـرگ و میـر تجمعـی آن‌ها تهیه شد.

عصاره‌های گیاهی

عصاره‌های مـورد آزمـایش درون محلـول ۰/۰۵ درصـد تـوئین ۸۰ بـه حالـت امولسـیون درآمدنـد. پـس از انجـام آزمایش‌ها مقدماتی نظیـر سـایر روش‌هـای زیسـت‌سـنجی و تعیین غلظت‌های حداقل و حداکثر، پـنج غلظـت شـامل ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرولیتـر/لیتـر تهیـه و آزمـون‌هـای حیاتی با آن‌ها انجام شد. زیست‌سنجی‌ها با حشرات کامـل و لاروهای پرورش یافته روی خرمـا در شـرایط آزمایشـگاهی انجام شـد. بـرای هـر تکـرار ۲۰ عـدد از هـر مرحلـه رشـدی استفاده شد. آزمایش‌ها در ۶ تیمـار (غلظـت‌هـای مختلـف و شاهد) و ۴ تکرار انجام گرفت. برای آلوده ساختن حشـرات مشابه روش قبل اقدام گردید.

تلفیق عصاره گیاهی و عامل بیمارگر

غلظت ۵۰ درصد کشـندگی عامـل بیمـارگر قـارچی بـا غلظت کشنده ۵۰ درصد هر یک از عصـاره‌هـای گیـاهی بـه صورت جداگانه در محیط آب مقطر سترون و تـوئین ۸۰ بـه صـورت مخلـوط درآمـده و اثـرات کشـندگی هـر یـک از تیمارهــای تلفیقــی روی لارو و حشــره کامــل در شــرایط آزمایشگاهی بررسی شد. بـرای آلـوده سـاختن و نگهـداری حشرات مشابه روش قبل اقدام شد.

روش تحلیل داده‌ها

برای نرمال کردن توزیع پراکنش داده‌های درصد مرگ و میر طبیعی بدست آمده براساس روش آبوت به arcsin√x تبدیل شدند. متوسط زمان و غلظت ۵۰ درصد مرگ و میر [LT_{50}، LC_{50}] با استفاده از رگرسیون لجستیک تخمین زده شدند. برای تعیین اثرات سینرژیستی یا آنتاگونیستی شاخص (synergistic, additive and antagonistic SR index) مطابق رابطه زیر محاسبه شد (Latifian & Rad, 2019).

$$SR=[LT_{50}(\text{عامل تلفیقی})/LT_{50}(\text{عصاره گیاهی})+LT_{50}(\text{بیمارگر})]$$

چنانچه SR< ۱ باشد، آنگاه عصاره گیاهی دارای اثـرات آنتاگونیستی اگر SR =۱ باشد، آنگاه عصـاره گیـاهی دارای اثرات افزایشی و اگـر SR> ۱ باشـد، آنگـاه عصـاره گیـاهی دارای اثر سینرژیستی بوده است.

نتایج

نتایج جوانه‌زنی و رشد میسلیومی قارچ *B. bassiana* در محیط کشت PDB حاوی عصاره‌های مختلف شامل مورد (*M. communed*)، درمنه کوهی (*A. aucheri*)، پونه (*M. longifolia*)، بومادارن (*A. millefolium*) و چریش (*A. indica*) در جدول ۲ درج گردیده است.

جدول ۲– امکان جوانه‌زنی اسپور *B. bassiana* در محیط کشت حاوی عصاره‌های مختلف گیاهی

Table 2. *B. bassiana* mycelium growth and spore germination possibility in medium containing different plant compounds

Plant name	Germination possibility	Mycelial growth possibility
M. communed	–	–
A. aucheri	+	+
M. longifolia	–	–
A. millefolium	–	–
A. indica	+	+

قابلیت اختلاط عصاره‌های گیاهی و *B. bassiana*

نتایج تجزیه واریانس صفات درصد جوانه‌زنی، میزان رشد میسیلیومی و پارامتر تعیین کننده سازگاری (T) *B. bassiana* با عصاره چریش و درمنه در جدول ۳ درج گردیده است.

جدول۳- تجزیه واریانس صفات تعیین کننده قابلیت اختلاط عصاره‌های گیاهی و *B. bassiana*

Table 3. Analysis of variance of attributes determining mixture of plant extracts and *B. bassiana*

Factores	Degrees of freedom	Mean squares of characters		
		Germination percentage	Mycelial growth	T
Plant extracts (A)	1	1134.38 **	723.02 **	0.14 **
Concentration(B)	2	343.79**	221.66 **	0.18 **
A×B	2	6.13 *	4.00 *	0.02 **
Error	18	3.04	1.94	0.001
CV		5.08	7.16	4.64

** Indicates significance at the 1% probability level
* Indicates significance at 5% probability level

نوع عصاره گیاهی و غلظت آن‌ها دارای اثرات معنی‌داری روی سه صفت تعیین کننده قابلیت اختلاط عصاره گیاهی با قارچ بیمارگر داشته است. به منظور مشخص شدن نحوه تأثیر آنها، میانگین‌ها با هم مقایسه شدند که نتایج آن‌ها در ادامه ارائه شده است.

درصد جوانه زنی

نتایج مقایسه میانگین درصد جوانه زنی اسپور قارچ *B. bassiana* در شرایط اختلاط با عصاره چریش و اسانس درمنه در جدول ۴ درج گردیده است. بین دو عصاره گیاهی و غلظت‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌دار وجود دارد. به طوری که درصد جوانه‌زنی اسپور*B. bassiana* در تمام غلظت‌ها در شرایط استفاده از عصاره چریش بالاتر از درمنه بود. از طرفی با افزایش غلظت به تدریج از توانایی جوانه‌زنی اسپور *B. bassiana* در شرایط استفاده از هر دو نوع عصاره گیاهی کاسته شد. کم‌ترین درصد کاهش در شرایط استفاده از غلظت ۵۰۰ میکرولیتر/لیتر از چریش و معادل ۲/۵ درصد و بیشترین آن در شرایط استفاده از غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر/لیتر درمنه و معادل ۲۹/۹ درصد نسبت به شاهد بوده است. جهت تعیین متوسط غلظت کاهش دهنده ۵۰ درصد قدرت جوانه‌زنی اسپور *B.bassiana* در شرایط کاربرد تلفیقی هر دو نوع عصاره گیاهی از روش زیست سنجی استفاده شد که نتایج آن در جدول ۵ درج شده است.

میزان سمیت درمنه در کاهش توانایی جوانه‌زنی اسپور *B. bassiana* بیشتر از چریش بوده و در غلظت معادل ۱۸۳۲/۸ میکرولیتر/لیتر می‌تواند کاهش ۵۰ درصدی در قدرت جوانه‌زنی آن ایجاد کند. در صورت افزایش غلظت تا ۳۳۴۲/۴ میکرولیتر/لیتر قدرت جوانه‌زنی قارچ را ۹۰ درصد کاهش می‌داد. این در حالی است که برای کاهش ۵۰ و۹۰ درصد قدرت جوانه‌زنی قارچ توسط چریش به غلظتی به ترتیب معادل ۱۹۴۹/۴ و ۳۷۴۲/۸ میکرولیتر/لیتر نیاز بود. هر چند تفاوت‌ها بر اساس جدول ۴ معنی‌دار بود. اما تفاوت غلظت برای کاهش قدرت جوانه زنی کم و معادل ۱۱۶/۷ میکرولیتر/لیتر بوده است.

رشد میسلیومی

نتایج مقایسه میانگین رشد میسیلیومی *B. bassiana* در شرایط اختلاط با عصاره چریش و درمنه در جدول۶ درج گردیده است. بین دو عصاره گیاهی و غلظت‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. به طوری که میزان رشد میسیلیومی *B. bassiana* در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر/لیتر بالاتر از درمنه بوده است. رشد میسیلومی قارچ در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر/لیتر از هر دو عصاره گیاهی یکسان و در پایین‌ترین سطح بوده است. از طرفی با افزایش غلظت به تدریج از رشد میسیلیومی *B.bassiana* در شرایط استفاده از هر دو نوع عصاره گیاهی کاسته شده است. کمترین درصد کاهش در شرایط استفاده از غلظت ۲۵۰ میکرولیتر/لیتر چریش و معادل ۳/۱ درصد و بیشترین آن در شرایط استفاده از غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر/لیتر درمنه و معادل ۲۰/۱ درصد بوده است.

متوسط غلظت کاهش دهنده ۵۰ درصد رشد میسیلومی *B. bassiana* در شرایط کاربرد تلفیقی هر دو نوع عصاره گیاهی در جدول ۷ نشان داده شده است.

میزان سمیت درمنه در کاهش توانایی رشد میسیلیومی *B. bassiana* بیشتر از چریش بود. به طوری که در غلظت کم‌تری معادل ۳۱۷۹/۸ میکرولیتر/لیتر می‌تواند کاهش ۵۰ درصدی در رشد میسیلیومی آن ایجاد کند و در صورت افزایش غلظت تا ۵۷۸۹/۷ میکرولیتر/لیتر رشد میسیلیومی قارچ را ۹۰ درصد کاهش می‌داد. این در حالی است که برای کاهش ۵۰ و ۹۰ درصدی رشد میسیلیومی قارچ توسط چریش به غلظتی به ترتیب معادل ۳۶۶۷/۴ و ۶۵۲۹/۶ میکرولیتر/لیتر نیاز بود. تفاوت‌ها بر اساس جدول ۶ معنی‌دار و معادل ۴۸۷/۶ میکرولیتر/لیتر است.

شاخص سازگاری (T)

نتایج مقایسه میانگین شاخص سازگاری *B. bassiana* در شرایط اختلاط با چریش و درمنه در جدول ۸ درج گردیده است. براساس نتایج، بین دو عصاره گیاهی و غلظت‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌دار وجود داشت. به طوری که شاخص سازگاری اسپور قارچ *B. bassiana* در تمام غلظت‌ها در شرایط اختلاط با چریش بالاتر از درمنه بود. از طرفی با افزایش غلظت به تدریج مقدار شاخص T در شرایط استفاده از هر دو نوع عصاره گیاهی کاسته شد. به طوری که بالاترین شاخص سازگاری در شرایط اختلاط با غلظت ۵۰۰ میکرولیتر/لیتر چریش و معادل ۷۶/۸۹ و کم‌ترین شاخص سازگاری در شرایط اختلاط با غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر/لیتر درمنه بود. از طرفی بر اساس شاخص T،کیفیت دو عصاره گیاهی از نظر قابلیت اختلاط به گونه‌ای بود که کلیه غلظت‌های مورد آزمایش به غیر از غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر/لیتر درمنه از نظر قابلیت اختلاط با سوسپانسیون قارچ *B. bassiana* سازگاری نشان دادند.

جدول ۴- مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی قارچ *B. bassiana* در شرایط اختلاط با عصاره‌های گیاهی

Table 4. Comparison of mean germination percentage of *B. bassiana* under mixing with plant extracts

Plant extracts	Concentrations	Germination percentage± SE	Average percentage reduction compared to control
A. aucheri	250	95.5±1.7 a	2.5
	500	92.5±0.9 b	5.6
	1000	84.5±0.7 c	13.8
A. indica	250	83±0.8 c	15.3
	500	79.5±0.9 d	18.9
	100	68.7±0.5 e	29.9

جدول ۵– زیست‌سنجی اثرات عصاره‌های گیاهی بر درصد جوانه‌زنی قارچ *B.bassiana*

Table 5. Bioassay the effects of plant extracts on germination percentage of *B. bassiana*

Plant extracts	LC_{50} (95% confidence limit)	LC_{90} (95% confidence limit)	Slop±SE	Chi Square (χ^2)
A. aucheri	1833.7 (1588.9–2076.5)	3342.4 (3156–3579)	1.17±0.83	0.54
A. indica	1949.4 (1856.9–2192.7)	3742.8 (3618–3951)	1.58±0.53	0.82

جدول ۶– مقایسه میانگین رشد میسلیومی قارچ *B. bassiana* در شرایط اختلاط با عصاره‌های گیاهی

Table 6. Comparison of mean mycelial growth of *B. bassiana* under mixing with plant extracts

Plant extracts	Concentrations	Mycelial growth ± SE	Average percentage reduction compared to control
A. aucheri	250	2.47±0.21 a	3.1
	500	2.33±0.18 b	8.5
	1000	2.07±0.11 c	18.8
A. indica	250	2.22±0.16 c	13.0
	500	2.17±0.19 d	15.1
	100	2.04±0.9 e	20.1

جدول ۷– زیست‌سنجی اثرات عصاره‌ها گیاهی بر درصد جوانه‌زنی قارچ *B. bassiana*

Table 5. Bioassay the effects of plant extracts on mycelial growth of *B. bassiana*

Plant extracts	LC_{50} (95% confidence limit)	LC_{90} (95% confidence limit)	Slop±SE	Chi Square (χ^2)
A. aucheri	3179 (2758.3–3601.3)	5789.7 (5139.8–5974.3)	1.53±0.48	0.67
A. indica	3667.4 (2866.7–3914.1)	6529.6 (6154.3–6789.7)	1.61±0.32	0.89

جدول ۸– مقایسه میانگین شاخص (T) قارچ *B. bassiana* در شرایط اختلاط با عصاره‌های گیاهی

Table 4. Comparison of T index of *B. bassiana* under mixing with plant extracts

Plant extracts	Concentrations	T index	Mixing quality
A. aucheri	250	76.89 a	CO
	500	74.31 b	CO
	1000	68.01 c	CO
A. indica	250	66.85 c	CO
	500	64.03 d	CO
	100	55.41 e	MT

Slightly toxic: MT, Compatible: CO

زیست سنجی *B. bassiana* و عصاره‌های گیاهی

قارچ *B. bassiana*، عصاره‌های چریش و اسانس درمنه توانایی ایجاد مرگ و میر روی لارو و حشره کامل شپشه دندانه‌دار را داشتند. پس از انجام آزمایش‌ها به روش غوطه‌وری و سپری شدن دوره ۱۰ روزه با استفاده از آمار مرگ و میر تجمعی غلظت‌های کشنده ۵۰ و ۹۰ درصد هر تیمار به تفکیک برای حشره کامل و لارو محاسبه شد که مقادیر آنها در جدول ۹ نشان داده شده است.

زمان کشندگی نیز برای هر سه تیمار برای مراحل رشدی حشره کامل و لارو برای گروه‌هایی که تا پایان آزمایش نیمی از حشرات تلف شدند، محاسبه گردید که نتایج آن در جدول ۱۰ درج گردیده است. پایین‌ترین زمان کشندگی مربوط به حشره کامل و غلظت ۵۰۰ میکرولیتر/لیتر درمنه معادل ۴/۹۲ روز و بالاترین آن مربوط به غلظت $۵×۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر از *B. bassiana* و معادل ۹/۱۷ روز بود. پایین‌ترین زمان کشندگی نیز در مرحله لاروی آفات و در غلظت ۵۰۰ میکرولیتر/لیتر درمنه و معادل ۳/۷۲ و بالاترین آن مربوط به غلظت $۱۰^{۴}$ اسپور در میلی لیتر از *B. bassiana* بود.

جدول ۹– غلظت کشنده تیمارهای مختلف در جمعیت لارو و حشره کامل شپشه دندانه‌دار

Table 9. Lethal concentrations of different treatments in the larval and adult population of sawtoothed beetle

Treatments	Growth stages	LC_{50} (95% confidence limit)	LC_{90} (95% confidence limit)	Slop±SE	Chi Square (χ^2)
B. bassiana	Adult	$2.5×10^4$ ($1.81–4.45× 10^4$)	$3.6×10^6$ ($8.2×10^5–1.32×10^8$)	2.09±0.45	0.54
	Larvae	$3.131×10^3$ ($5.4×10^2–6.03×10^2$)	$2.26×10^5$ ($5.3×10^4–1.99×10^7$)	1.26±0.64	0.64
A. aucheri	Adult	647.6(576.5–718.72)	1231.7(1159.31251.4)	1.16±0.78	0.89
	Larvae	429.32(362.7–495.9)	1209.4(1195.7–1236.4)	1.17±0.56	0.91
A. indica	Adult	696.4(624.1–768.7)	1568(1491.7–1597.4)	1.05±0.11	0.51
	Larvae	386.1(317.2–455.3)	1219.9(1193.9–1241.5)	1.07±0.57	0.59

جدول ۱۰– زمان کشندگی تیمارهای مختلف در جمعیت لارو و حشره‌کامل شپشه دندانه دار

Table 9. Lethal times of different treatments in the larval and adult population of sawtoothed beetle

Treatments	Growth stages	Concentrations	LT_{10}	LT_{50}	LT_{90}
B. bassiana	Adult	5×10^4	8.22	9.17	11.07
		10^5	7.16	8.53	9.24
		5×10^5	4.97	6.68	7.93
	Larvae	10^4	5.84	7.92	9.41
		5×10^4	4.72	6.31	8.24
		10^5	3.61	4.69	6.54
A. aucheri	Adult	1000	1.08	4.29	9.4
	Larvae	500	1.49	5.18	11.82
		1000	1.16	3.72	10.32
A. indica	Adult	1000	3.7	5.58	16.44
	Larvae	500	3.06	6.78	18.35
		1000	1.75	4.58	9.34

اثرات متقابل *B. bassiana* و عصاره‌های گیاهی

به منظور بررسی اثرات سینرژیستی یا آنتاگونیستی چریش و درمنه روی توانایی بیمارگری *B. bassiana* در جمعیت لارو و حشره کامل شپشه دندانه‌دار، ضمن محاسبه زمان کشندگی تیمارهای تلفیقی، شاخص SR محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۱۱ درج شده است. براساس نتایج هر دو عصاره دارای اثرات سینرژیستی در قدرت بیمارگری *B. bassiana* روی حشره کامل و لارو شپشه دندانه‌دار بوده‌اند. اما چریش روی هر دو مرحله رشدی اثرات سینرژیستی بالاتری نسبت به درمنه نشان داد. در هر دو عصاره گیاهی اثرات سیترزیستی در افزایش بیمارگری قارچ روی مرحله رشدی لارو بالاتر از حشره کامل بود.

جدول ۱۱– زمان کشندگی و شاخص SR تیمارهای تلفیقی در جمعیت لارو و حشره‌کامل شپشه دندانه دار

Table 11. Lethality time and SR index of the combined treatments in the larval and adult population of sawtoothed beetle

Combined treatments	Life stages	LT_{10}	LT_{50}	LT_{90}	SR
LC_{50}(*B. bassiana*)+LC_{50} (*A. indica*)	Adult	0.84	1.93	5.18	0.198
	Larvae	0.82	1.84	4.94	0.157
LC_{50}(*B. bassiana*)+LC_{50} (*A. aucheri*)	Adult	0.91	2.71	8.02	0.234
	Larvae	0.92	1.89	5.02	0.221

بحث

مطالعات انجام شده در شرایط انباری نشان داد که قارچ *B. bassiana* برای مدیریت طولانی مدت کنترل آفات انباری خرما از جمله شپشه دندانه‌دار در شرایط انبارهای خرما مناسب می‌باشد. یکی از مشکلات کاربرد عملی این عصاره سرعت پایین کنترل نسبت به میتل بروماید است. مطالعات پژوهشگران قبلی نشان داده بود که می‌توان از اثرات سینرژیستی سموم دیگر به خصوص سموم گیاهی در افزایش کارایی این قارچ و جبران سرعت پایین آن استفاده نمود (Shakarami *et al.*, 2015). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در میان عصاره‌های گیاهی مورد آزمایش هر دو عصاره گیاهی درمنه و چریش قابلیت اختلاط با سوسپانسیون اسپور *B. bassiana* را دارند و کاملاً سازگار می‌باشند. اگر چه تفاوت‌های سازگاری دو عصاره بسیار نزدیک است. اما در کل چریش قابلیت اختلاط مناسب‌تری نشان داد. از طرفی زیست‌سنجی‌های انجام شده به صورت جداگانه و در حالت ترکیبی نشان داد که دو عصاره دارای

اثرات سینرژیستی در افزایش قدرت بیمارگری *B. bassiana* در لارو و حشره کامل شپشه دندانه‌دار در شرایط تغذیه از خرما می‌باشند. در این مورد نیز اگر چه ضرایب هر دو عصاره به یکدیگر نزدیک است اما چریش ضرایب مناسب‌تری را نشان داد. چریش به صورت هورمونی عمل نموده و از طریق تأثیر روی سنتز کیتین و جلد بدن حشره زمینه را برای نفوذپذیری قارچ بیشتر فراهم می‌کند. تأثیر بیشتر این عصاره روی مرحله لارو نسبت به حشره کامل به همین دلیل می‌باشد (Harðardóttir *et al.*, 2019). مطالعات سایر پژوهشگران نیز نتایج مشابهی نشان داده است. به عنوان مثال در پژوهشی که درخصوص اثرات سموم ضد سنتزکیتین در قدرت بیمارگری *B. bassiana* روی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) انجام شد، مشخص گردید که این عصاره‌ها نسبت به سایر سموم شیمیایی اثرات سینرژیستی بالاتری نشان داده‌اند. اثر این عصاره‌ها نیز روی لارو این حشره بالاتر از سایر مراحل رشدی بوده است (Sirota & Grafius, 1994). قارچ *B. bassiana* و عصاره‌ها گیاهی مورد استفاده دارای روش تأثیر متفاوتی می‌باشد. بنابراین، اثرات تلفیقی می‌بایست در طی یکی از مراحل آلودگی چسبندگی اسپور به بدن حشره جوانه‌زنی اسپور، نفوذ به درون جلد، رشد میسیلیوم قارچ درون هوسل اتفاق بیفتد (Robertsn & Preisler, 1992).

درخصوص هر دو عصاره گیاهی اگر چه اثرات منفی آن‌ها در جوانه‌زنی و رشد میسیلیومی به گونه‌ای بود که جزء عصاره‌های سمی برای *B. bassiana* محسوب نمی‌شدند. ولی اثرات افزایشی نیز از آن‌ها ملاحظه نشد. بنابراین اثرات سیترزیستی نمی‌تواند ناشی از تأثیر آن‌ها در افزایش جوانه-زنی اسپور و رشد میسیلیومی قارچ درون هموسل حشره باشد. اما این دو عصاره می‌توانند از طریق تضعیف بدن حشره مکانیسم‌های مقاومت در برابر نفوذ قارچ را کاهش داده و در مرحله نفوذ در بدن حشره مؤثر باشند. این شرایط به خصوص برای چریش که خواص بازدارنده ستیزکیتین دارد بارزتر از درمنه بود. مطالعات سایر پژوهشگران با استفاده از میکروسکپ فلورسنت نشان داد که مراحل چسبندگی، جوانه‌زنی و رشد میسلیومی قارچ *B. bassiana* در شرایط خالص و در عصاره با سموم بازدارنده سنتزکیتین تفاوت نشان نداده است (Boucias *et al.*, 1996; Quintela & mccoy, 1997 a; 1997b; 1998a; 1998b).

در رابطه با سایر قارچ‌های بیمارگر حشرات نیز نتایج مشابهی وجود دارد. تلفیق قارچ *Metarhizium anisopliae* Metsch. با عصاره‌های گیاهی مختلف اثرات متفاوتی بر رشد میسلیوم و جوانه‌زنی اسپور آن داشته است. استخراج عصاره‌های روغن نیم از میوه چریش به ترتیب باعث کاهش ۲۱/۲۸ و ۱۷/۲۶ درصدی جوانه‌زنی و رشد میسیلیوم گردیده است (Gonzalez *et al.*, 1996; Aguda *et al.*, 1986).

مطالعات برخی پژوهشگران نشان داد که تفاوت وجود اسیدهای آلی موجود در این عصاره‌ها می‌تواند عامل اختلاف عصاره‌های گیاهی در بروز اثرات زیستی منفی آنها روی قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* باشد (Bajan *et al.*, 1998) اثرات سمی بالای برخی از آفت‌کش‌ها روی توانایی بیمارگری قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه‌ای متفاوت است (Loria *et al.*, 1993). به طوری که در شرایط کاربرد عملی اثرات منفی آنها در قدرت بیمارگری کمتر از شرایط آزمایشگاهی است.

درخصوص کاربرد عصاره‌های مستخرج از چریش روی *B. bassiana* گزارش مختلفی وجود دارد. برخی اثرات منفی عصاره Neem را روی جوانه‌زنی و رشد میسیلیومی *B. bassiana* گزارش نموده‌اند (Bajan *et al.*, 1998) برخی دیگر نیز حتی در غلظت‌های بالا هیچ گونه اثرات قارچ‌کشی از عصاره Neem گزارش نکرده‌اند (Rodrigues – Lagunes *et al.*, 1997) به نظر می‌رسد که دو عامل در بروز واکنش‌های مختلف مؤثر باشند. عامل اول نوع جدایه می‌باشد. برخی جدایه‌ها نظیر IRAN 441C که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته حساسیت ندارند. لذا نوع جدایه کاربردی در انتخاب فرمولاسیون تلفیقی عصاره چریش با *B. bassiana* مؤثر است. عامل دوم نیز انتخاب قسمت‌های مختلف گیاه برای عصاره‌گیری است. در مطالعاتی که از عصاره میوه چریش برای اختلاط استفاده نموده‌اند، بروز اثرات سمی بیشتر از مطالعاتی بوده که نظیر

این پژوهش از برگ درخت برای عصاره‌گیری استفاده شده است.

گاهی اوقات برخی از سموم از طریق ایجاد تغییر رفتار اثرات سینرژیستی یا آنتاگونیستی روی قدرت بیمارگری قارچ *B. bassiana* ایجاد نموده‌اند. نظیر چنین شرایطی در هنگام کاربرد آفت‌کش ایمیداکلروپراید دیده شده که با تغییر رفتار لارو شب‌پره برگخوار سویا *Chrysodeixis includens* (Walker) باعث حذف کنیدی‌ها از روی بدن شده و از چسبندگی اسپور روی بدن می‌کاهند و به این ترتیب دارای اثرات آنتاگونیستی هستند (Boucias & pendland, 1991). چنین حالتی در آزمایش‌های انجام شده این تحقیق ملاحظه نگردید.

مطالعات انجام شده نشان داده است که بروز انواع استرس باعث ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی خاص می‌گردد که می‌تواند در افزایش یا کاهش حساسیت یک حشره به عوامل میکروبی مؤثر باشد. یکی از این استرس‌ها، کاهش توانایی تغذیه است (Baines *et al*., 1992).

اگر چه مطالعات قبلی نشان داده است که *B. bassiana* دارای اثرات ضد تغذیه‌ای روی مراحل مختلف شپشه دندانه‌دار در شرایط تغذیه از خرما می‌باشد (Latifian *et al*., 2011). در موارد مشابه اثرات ضد تغذیه‌ای سموم گیاهی روی آفات انباری نیز گزارش گردیده است که می‌توانند در تشدید تنش فیزیولوژیکی گرسنگی و افزایش حساسیت حشره میزبان مورد مطالعه به *B. bassiana* مؤثر باشند (Rodríguez–González *et al*., 2017). انجام آزمایش‌های تکمیلی برای درک مکانیسم اثر مشابه ضروری می‌باشد.

در نهایت بکارگیری خواص سینرژیستی عصاره‌های گیاهی مورد آزمایش با قارچ *B. bassiana* ترکیب مناسبی در مدیریت شپشه دندانه‌دار در شرایط انبارهای انتظار خرما می‌باشد. این عصاره‌ها می‌توانند کارایی *B. bassiana* را افزایش داده، ضمن کاهش غلظت مصرفی در شرایط انبار، سرعت تأثیر را افزایش داده و فرمولاسیون نهایی را به عنوان ابزاری قدرتمند و اقتصادی در اختیار مدیریت تلفیقی آفات انباری خرما قرار دهند.

References

Aguda, R.M., M.C. Rombach, & B.M. Shepard. 1986. Effect of "neem" oil on germination & sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*, International Rice Research Newsletter, 11: 34–35.

Ali, S., Farooqi, M.A., & Sajjad, A. 2018. Compatibility of entomopathogenic fungi and botanical extracts against the wheat aphid, Sitobion avenae (Fab.) (Hemiptera: Aphididae). Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28: 97.

Alves, S.B., Jr., Moino A. & J.E.M. Almeida. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In–Controle microbiano de insetos, ed. S.B. Alves. Fealq, São Paulo, pp. 217–238.

Bagherizenoz, A. 1375. Pests of stored products & control methods the first volume, food & industrial products harmful beetles. Second edition. Sepehr Publication Center, Tehran. 309 pp.

Baines, D., DeSantis, T. & Downer, R.G.H. 1992. Octopamine and 5–hydroxytryptamine enhance the phagocytic and nodule formation activities of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes. Journal of Insect Physiology, 38: 905–914.

Bajan, C., Kmitowa, K. & Popowska Nowak, E. 1998. Reaction of various ecotypes of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the botanical preparation NEEM . & pyrethroid Fastak. Archive of Phytopathology and Plant Protection, 31: 369–375.

Boucias, D.G., & Pendl, J.C. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event of mycoses in arthropod hosts, pp. 101–128. *In* G. T. Cole & H. C. Hoch [eds.], The fungal spore & disease initiation in plants and animals. Plenum, New York.

Boucias, D.G., Stokes, C. Storey, G. & Pendland, J.C. 1996. The effects of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* & its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. Pbanzenschutz–Nachr. Bayer, 49: 103–144.

Canhilal, R. 2016. The use of entomopathogens in the controlling of insect pests of stored product. Sci. Pap. Ser. A Agron, 59: 235–240.

Damalas, C.A., & Koutroubas, S.D. 2018. Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. Agriculture, 8: 13

De Souza, A.P. & J.D. Vendramim. 2005. Translaminar, systemic & topical effect of aqueous extract of neem seed on *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B on tomato plants. Neotropical Entomology, 34U 83–87.

Furlong, M.J. & Groden, E. 2001. Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (coleopteran chysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* & the insecticides, imidacloprid, & cyromazine. Journal of Economic Entomology, 94: 344 – 356.

Gonzalez, D., Valbuena, M. E., Rivera, B.F., Bustillo, M. A. P.A.E. & Chaves, B. 1996. Viabilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* en mezcla con agroquimicos, 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, Jakson MC & Magan N (Eds), Fungi as biocontrol agenta. CAB International, walling ford, UK., pp. 346 – 347.

Harðardóttir, H.M., Male, R., Nilsen, F. & Dalvin, S. 2019. Effects of chitin synthesis inhibitor treatment on *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda, Caligidae) larvae. PLoS ONE 14(9): e0222520.

Iranmanesh, C.M. 2000. The first compact book, Introduction to Applied Technology of Date Production, Storage, Processing, Packaging & Export. First Edition. Aida Publishing. 274 pages.

Kaakeh, W., Reid, B.L. Bohnerl, T.J. & Bennett, G.W. 1997. Toxicity of imidacloprid in the German cockroack (Dictyoptera: Blattellidae) and the synergism between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect fungi: Hyphomycetes). Journal of Economic Entomology, 90: 473 – 482.

Kumar, P. 2008. Studies on loss of bio–efficacy of two indirect neem applications over time (seed and soil) against *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) under semifield conditions, Journal of Asia–Pacific Entomology, 11: 185– 190.

Lacey, L.A. & Goettel, M.S. 1995. Current development in of microbial control of insect pests and prospects for the early 21 century. Entomophaga, 40: 1–25.

Latifian, M. 2004. Date pest control technology. Mashhad, Ghalam Publishing House. 100 pages.

Latifian, M., Soleimannnejadian, E., Ghazavi, M., Hayati, J., Mosadegh, S. & Nikbakht, P. 2009. Evaluation of three *Beauvaria bassiana* isolates on Sawtoothed beetle *Oryzaephilus surinaemensis* and the effect of different temperature on their germination and mycelium growth. Journal of Applied Entomology and Phytopathology, 77(1): 151–168.

Latifian, M. Soleimannnejadian, E., Ghazavi, M., Hayati, J., Mosadegh, S.M. & Nikbakht, P. 2010. Study the pathogenecity of *Beauveria bassiana* on the Larvae and adult stages of sawtoothed beetle *Oryzaephilus surinaemensis* on date palm cultivars. Journal of Scientific Agriculture Plant Protection, 31(1): 21–35.

Latifian, M. Soleimannnejadian, E.; Ghazavi, M., Hayati, J. & Mosadegh, S.M. 2011. Effects bassiana of sublethal concentrations of fungus *Beauveria bassiana* of the reproductive and nutition potentials of Sawtoothed beetle *Oryzaephilus sirinaemensison* on commercial date cultivars. Plant Protection Journal, 2(4): 297–310.

Latifian, M. & Rahkhodaei, E. 2012. Development of a novel bioassay for evaluating of the infectivity and between generation transmission effects of entomopathogenic fungi *Beauvaria bassiana* (Balsamo) vuilleminon on population of sawtoothed beetle (*Oryzaephilus surinamensis* L.) fed on date palm cultivars. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 4: 811–817.

Latifian, M., Solymannejadian E. & Ghazavi, M. 2017. The epizootic models of *Beauveria bassiana* in sawtoothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* populations feeding on date fruits. Biological Control Pest Plants and Disease, 6: 207–220.

Latifian, M., Ghazavi, M. & Soleimannejadian, E. 2018. The role of temperature on the pathogenicity of *Beauveria bassiana* in populations of sawtoothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) fed on stored date fruits. Journal of Crop Protection, 7: 395–402.

Latifian, M., & Rad, B. 2019. Study the synergistic effects of ecdysoids & diatomaceous earth on *Metarhizium anisopliae* for control of date horned beetle larvae, *Oryctes elegans* Prell. BioControl in Plant Protection, 7(1): 15–27.

Mahdavi Arab, N., Ebadi. R., Hatami, B. & Talebi Jahromi, Kh. 2008. Insecticidal effects of some plant extracts on *Callosobrochus maculates* F. under laboratory conditions & Laphigma exigua H. in greenhouse. Journal of Science & Technology of Agriculture & Natural Resources, 11: 42.221–235.

Mehrabian, A.R., Sayadi, S., Majidi, M., Kuhbenani,V., Hashemi, Y. & Abdoljabari, M. 2020. Priorities for conservation of endemic trees and shrubs of Iran: Important Plant Areas (IPAs) and Alliance for Zero Extinction (AZE) in SW Asia. Journal of Asia–Pacific Biodiversity, 13(2):295–305.

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.

Moore. D., Lord, J.C. & Smith. S.M. 2000. Pathogens. In : Subramanyam, Bh. Agstrum, D. W. (Eds.) Alternatives to pesticides in Stored – product IPM. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, 193–227.

Naphade, A. 2020. Trends of Modified Atmosphere Packaging Market Reviewed for 2020 with Industry Outlook to 2025. http://itresearchbrief.com/business.

Nascimento, F.J.D., Diniz Filho, E.T., Mesquita, L.X., De Oliveira, A.M.D. & Pereira T.F.C. 2008. Extratos plant in control of pests. Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentavel, Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentavel, 3: 1–5.

Neves, P.M.O.J., Hirose, E., Tchujo, P.T. & Moino, A.R.J. 2001. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. Neotropical Entomology, 30(2): 263 – 268.

Oliveira, R.C. & Neves, P.M.O.J. 2004. Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. Neotropical Entomology, 33(3): 353–358.

Otieno, J.A., Pallmann, P. & Poehling, H.M. 2017. Additive and synergistic interactions amongst *Orius laevigatus* (Heteroptera: Anthocoridae), entomopathogens and azadirachtin for controlling western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). BioControl, 62: 85–95.

Pires, J.M., Mendes, F.R., Negri, G., Duarte–Almeida, J.M., Carlini, E.A. 2009.Antinociceptive peripheral effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: both plants known popularly by brand names of analgesic drugs. Phytotherapy Research, 23(2): 212–219.

Quintela, E.D. & McCoy, C.W. 1998. Synergistic effect of imidacloprid & two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviates* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. Journal of Economic Entomology, 91:110–122.

Quintela, E.D., & McCoy, C.W. 1997a. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* Þrst 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 Þrst 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 aisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. Journal of Invertebrate Pathology, 72: 220–230.

Rajendran, S. . 2020. Insect Pest Management in Stored Products. Outlooks Pest Manag, 31, 24–35.

Ramakrishnan, R., suiter, D.R., Nakatsu, C. H., Humber, R. A. & Bennett, G. W. 1999. Imidaclopridenhanced *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) susceptibility to the entomopathogen *Metarhizium anisopliae.* Journal of Economic Entomology, 92: 1125–1132.

Rodríguez–González, Á., Mayo, S., González–López, Ó., Reinoso, B., Gutierrez, S., Casquero, P.A. 2017. Inhibitory activity of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma* spp. on the insect pests *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrisomelidae: Bruchinae). Environmental Monitoring and Assessment, 189(1): 12.

Shakarami, J., Eftekharifar, R., Latifian, M. & Jafari, S. 2015. Insecticidal activity and synergistic effect of *Beauvaria bassiana* (Bals.) Vuill. and three botanical compounds against third instar larvae of *Ephestia kuehniella* Zeller. Research on Crops, 16: 296–303.

Shoukat, R.F., Freed, S., Ahmad, K.W. 2016. Evaluation of binary mixtures of entomogenous fungi and botanicals on biological parameters of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) under laboratory and field conditions. International Journal of Mosquito Research, 3: 17–24.

Touhidul M.d., Castle, S.J. & Ren, S. 2009. Compatability of insect pathogen fungus *Beauveria bassiana*. With neem against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, on egg plant. Entomologia Experimentalis et applicata, 134 (1): 28 – 34.

Veiskarami, G. & Sharifi–Tehrani, M. 2017. Plant species diversity in the Central Zagros Region of Iran. Phytologia Balcanica, 23(1): 101–118.

Ying, S. H., Feng, M.G. & Xu, S.T. 2003. Field efficacy of emulsifiable suspensions of *beauveria bassiana* conidia for control of *Mysus persicae* population on cabbage. Chinese Journal of Applied Entomology, 14: 545–548.

Evaluation of the lethal effect of plant extracts and their synergistic effect with *Beauveria bassiana* to control the population of *Oryzaephilus surinaemensis* fed on date palm

Masoud Latifian[1], Bahar Rad[2], Jahanshir Shakarami[3], Esmaeil Rahkhodaei[2]

1. Tropical and Subtropical Fruit Office, Horticulture Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

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

3. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Corresponding author: Masoud Latifian: masoud_latifian@yahoo.com

Received: March, 13, 2020 7(2) 17-30 Accepted: June, 24, 2020

Abstract

Given the compatibility of *Beauveria bassiana* and plant extracts, it is feasible to increase efficacy of the fungus in microbial control of date storage pests. The aim of this study was to evaluate the interaction of plant extracts and *B. bassiana* on sawtoothed beetle populations. The vegetative and reproductive parts of myrtle, mugwort, mentha, yarrow, and neem plants were evaluated. The fungal mycelium growth and spore germination were evaluated to checking the consistency of extracted from plants by extract medium mixing method. Then, the compounds toxicity were evaluated individually and conjunction with *B. bassiana* by bioassay on the adult and larvae of sawtoothed beetle. Studies have shown that mycelial growth and spore germination of *B. bassiana* occur only in artemisia and neem. The spore germination rate of *B. bassiana* in neem was higher than artemisia in all concentrations. A concentration equivalent to 1949.4 microliters/liter of neem was required to reduce 50% of the germination of the fungus. The lowest and highest mycelial growth reduction (3.1% and 20.1%) were observed in 250 microliters/liter of neem and 1000 microliters/liter of artemisia, respectively. So, the concentration of neem equivalent of 36679.4 microliters/liter was required for 50% reduction of mycelial growth. The highest compatibility index (T) was 76.89 for 500 microliters/liter in combination with neem and the lowest level consistent with artemisia in 1000 microliters/liter. Both plant extracts had synergistic effect on the pathogenicity of *B. bassiana* on adult and larva of sawtoothed beetle. However, synergistic effect of neem extract was higher.

Keywords: *Beauveria bassiana*, plant extracts, consistency, synergistic