

## برهمکنش سینرژیستی قارچ *Beauveria bassiana* و دو فرمولاسیون تجاری خاک دیاتومه روی لمبه

### گندم، *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae)

افسانه شهبازی<sup>۱</sup>، مرضیه علیزاده<sup>۲\*</sup>، حمیدرضا پوریان<sup>۲</sup>

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲. استادیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶)

### چکیده

عوامل حفاظت زیستی شامل عوامل زنده بیوکنترل و مواد غیرزنده با پایه طبیعی نظیر خاک دیاتومه، در کنترل آفات انباری، نقش مهمی را به لحاظ حفظ سلامت غذایی ایفا می‌کنند. مشکل کاربرد خاک‌های دیاتومه در انبار این است که دوز توصیه شده آنها سبب افزایش توده‌ای شدن و کاهش جریان‌پذیری بذرها می‌شود. بنابراین پژوهش حاضر با هدف تعیین سازگاری زیستی بین دو فرمولاسیون تجاری خاک دیاتومه ایرانی *Sayan* و خارجی *Celite 610* با جدایه بومی قارچ بیمارگر حشرات، (*Beauveria bassiana* DE (Hypocreales)، و نیز رفع مشکل کاهش جریان‌پذیری بذرها با استفاده از دوز کم‌کننده خاک دیاتومه در مخلوط انجام شد. به این منظور، ابتدا آزمون‌های زیست‌سنجی ۱۴ روزه به روش آغشته کردن بذور گندم به‌طور جداگانه با قارچ و دو خاک دیاتومه علیه حشرات بالغ لمبه گندم، *Trogoderma granarium* Everts، انجام شد. سپس به منظور تعیین برهمکنش، پنج دوز از قارچ *B. bassiana* با LD<sub>25</sub> هر یک از خاک‌های دیاتومه مخلوط شدند. طبق نتایج مقادیر LD<sub>50</sub> برای قارچ، *Sayan*<sup>®</sup> و سلایت<sup>®</sup> ۶۱۰ به ترتیب، ۲۹۵/۳، ۴۴۳۹/۵ و ۹۹۲/۳ پی‌پی‌ام محاسبه شدند. بر اساس آزمون نسبت دوزهای کشنده مشخص شد که قدرت کشندگی سلایت<sup>®</sup> ۶۱۰، ۴/۴۷ برابر *Sayan*<sup>®</sup> است. همچنین برهمکنش در تمام مخلوط‌های حاصل از قارچ و دوز کم‌کننده هر یک از خاک‌های دیاتومه، سینرژیستی بود به‌جز بالاترین دوز که از نوع افزایشی تخمین زده شد. همچنین کلیه دوزهای اختلاط بر کاهش تولید نتاج، طی دوره ذخیره سازی هشت هفته‌ای موثر واقع شدند که بیانگر سازگاری این دو عامل برای کاربرد هم‌زمان در برنامه‌های مدیریت تلفیقی *T. granarium* می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** اختلاط، قارچ‌های بیمارگر حشرات، *Sayan*<sup>®</sup>، سلایت<sup>®</sup> ۶۱۰، بیوکنترل.

### Synergistic interaction of *Beauveria bassiana* and two commercial formulations of diatomaceous earth on *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae)

Afsaneh Shahbazi<sup>1</sup>, Marzieh Alizadeh<sup>2\*</sup>, Hamid-Reza Pourian<sup>2</sup>

1. Former M.Sc. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

(Received: August 22, 2022- Accepted: January 16, 2022)

### Abstract

Bioprotection agents, including living biocontrol agents and naturally occurring non-living substances such as diatomaceous earth, play a crucial role in controlling stored commodity pests to maintain food health. The problem with using diatomaceous earth in storage is that their recommended dose increases grains' bulk density and decreases flowability. Therefore, the present study aimed to determine the biocompatibility between two commercial formulations of Iranian diatomaceous earth, *Sayan*, and foreign *Celite 610* with the indigenous entomopathogenic fungus isolate, *Beauveria bassiana* DE (Hypocreales), and to solve the problem of reducing grains' flowability using a low-lethal dose of diatomaceous earth in the mixture. For this purpose, 14-day bioassays were first performed by impregnating wheat seeds separately with the fungus and two diatomaceous earths against adults of Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts. Then, to determine the interaction effects, five different doses of *B. bassiana* were mixed with LD<sub>25</sub> of each diatomaceous earth. Based on the results, LD<sub>50</sub> values for fungus, *Sayan*<sup>®</sup>, and *Celite 610*<sup>®</sup> were calculated at 295.3, 4439.5, and 992.3 ppm, respectively. According to the lethal dose ratio test, the insecticidal activity of *Celite 610*<sup>®</sup> was estimated to be 4.47 times more than *Sayan*<sup>®</sup>. Moreover, the interaction was synergistic in all mixtures of *B. bassiana* with the low-lethal dose of each diatomaceous earth except for the highest dose of the fungus, which was estimated additive. In addition, all mixtures effectively reduced progeny production during the eight-week storage period, indicating the compatibility of these two agents for co-application in the integrated *T. granarium* management programs.

**Keywords:** combination, entomopathogenic fungi, *Sayan*<sup>®</sup>, *Celite 610*<sup>®</sup>, biocontrol.

### مقدمه

متاسفانه علی‌رغم ایمن بودن و پرکاربرد بودن، این خاک‌ها در دوز توصیه شده (۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) به دلیل کاهش تهویه محصول موجبات چسبندگی و توده‌ای شدن محصول را فراهم می‌آورند (Korunić *et al.* 2020). یکی از راهکارهای رفع این مشکل کاربرد غلظت‌های پایین‌تر خاک دیاتومه (غلظت‌های کم-کشنده و زیرکشنده) به صورت ترکیب با عوامل کنترل زیستی می‌باشد (Korunić *et al.* 1998; Korunić *et al.* 2020). در بین عوامل بیولوژیک، قارچ‌های بیمارگر حشرات به‌ویژه *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) یکی از نویدبخش‌ترین عوامل میکروبی در مدیریت تلفیقی آفات هستند چرا که در شرایط انبار کارایی دارند (Khoobdel *et al.* 2019). علاوه بر این به علت تخصص میزبانی بالای جدایه‌های این گونه قارچ، از نظر ایمنی زیستی برای گونه‌های غیر هدف مثل انسان بی‌خطر می‌باشد (Uma Devi *et al.* 2008). اختلاط دو یا چند عامل حشره‌کش به دلیل افزایش تأثیر آنها نسبت به کاربرد تکی، جلوگیری از مقاوم شدن آفات یا به تعویق انداختن آن و یا شکستن مقاومت ایجاد شده اهمیت بسیاری دارد (McGrath 2013). اما همه اینها به شرطی است که عوامل کنترل کننده حشرات که قرار است با هم مخلوط شوند با یکدیگر سازگار باشند. این سازگاری از سه جنبه بیولوژیک، فیزیکی یا شیمیایی مطرح است. به ترکیباتی سازگار گفته می‌شود که پس از اختلاط، خواص فیزیکی و شیمیایی آنها تغییر نکند و تأثیر آنها نسبت به کاربرد تکی اجزای مخلوط کم نشود. سازگاری بیولوژیک که شامل سه نوع برهمکنش سینرژیستی، آنتاگونیستی و افزایشی است، از نظر کنترل آفات اهمیت دارد (Talebi jahromi 2007). هر چند که برهمکنش خاک‌های دیاتومه و قارچ‌های مختلف می‌تواند نتایج گوناگونی به دنبال داشته باشد (Korunić *et al.* 2020). اما پژوهش‌ها روی آفات مختلف نشان داده‌اند که معمولاً خاک‌های دیاتومه با ایجاد خراش در کوتیکول، چسبندگی و بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر حشرات را افزایش می‌دهند و به این ترتیب باعث کنترل مطلوب‌تر آفت می‌شوند (Akbar *et al.* 2004; Lord 2007; Athanassiou *et al.*

لمبه گندم، *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae)، یکی از آفات کلیدی محصولات انباری است و در بسیاری از کشورها جزو آفات قرنطینه‌ای محسوب می‌شود (Eppo 2013, Gourgouta *et al.* 2020). در ایران نیز تقریباً در اکثر مناطق به‌ویژه مناطق گرم و مرطوب گزارش شده است (Borzoui *et al.* 2015, Pourian *et al.* 2019). دامنه میزبانی این حشره گسترده است و روی بیش از ۱۰۰ محصول مختلف با منشأ گیاهی و جانوری حتی با رطوبت کمتر از دو درصد می‌تواند رشد کند (Kavallieratos *et al.* 2019). در انبار به غلات، پوست و چرم، سویا و منابع پروتئینی خسارات کمی، کیفی و بهداشتی وارد می‌کند (Bagheri-Zenouz 2019; Athanassiou *et al.* 2013). کنترل این آفت عمدتاً توسط حشره‌کش‌های تماسی (ارگانوفسفره‌ها، پیریتروئیدها و خاک‌های دیاتومه)، ترکیبات تنظیم‌کننده رشد حشرات و ترکیبات تدخینی (متیل بروماید، فسفین)، به دو صورت ضدعفونی انبار و یا کاربرد مستقیم روی محصول انجام می‌شود (Athanassiou *et al.* 2015; Kavallieratos *et al.* 2016; Ghimire *et al.* 2016; Kavallieratos *et al.* 2018; Arthur *et al.* 2017). استفاده مکرر از حشره‌کش‌های شیمیایی در شرایط انبار، سلامت مصرف کننده را با خطر مواجه ساخته و همچنین باعث بروز مقاومت در این حشره به این ترکیبات شده است (Benhalima *et al.* 2004; Subramanyam 2018; Amjad *et al.* 2021). بنابراین برای حفظ ایمنی محصولات انباری باید از روش‌های کنترل بی‌خطر و یا حداقل کم‌خطر مثل روش‌های فیزیکی و کنترل بیولوژیک استفاده نمود. در میان روش‌های کم‌خطر، پودرهای خنثی (خاک دیاتومه) به دلیل سمیت فوق‌العاده کم برای پستانداران، در اکثر کشورهای جهان به عنوان یک روش سالم برای مدیریت آفات انباری به ثبت رسیده‌اند (Kavallieratos *et al.* 2015; Korunić *et al.* 2020). خاک‌های دیاتومه از طریق خراش دادن کوتیکول، جذب لپیده‌های پوستی و دهیدراته کردن حشرات، باعث مرگ آنها می‌شوند (Lord 2007). اما

بذر منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت به آنها اجازه تخم‌ریزی داده شد. پس از این زمان، حشرات بالغ با آسپیراتور از داخل ظروف مذکور جمع‌آوری شدند. سپس بذره‌های حاوی تخم حشره در شرایط کنترل شده انکوباتور نگهداری شدند.

### کشت قارچ

در این پژوهش از جدایه قارچ *B. bassiana* DE با منشا خاک و تهیه شده از آزمایشگاه بیوکنترل گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران استفاده شد. جدایه مذکور روی PDA کشت داده شد و سپس در شرایط کنترل شده (دمای  $28 \pm 1$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $5 \pm 65$  درصد و ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنائی) به مدت ۱۸ روز نگهداری گردید. بعد از اسپورزایی کامل قارچ، پروپاگول‌های آن جمع‌آوری و درون فالكون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شدند (Goettel *et al.*, 2000). سپس ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی توپین ۸۰ به نسبت پنج صدم درصد و چند مهره شیشه‌ای به آن افزوده و برای پنج دقیقه ورتکس شدند و پس از خالص‌سازی با کاغذ واتمن شماره یک، غلظت سوسپانسیون حاصل به‌وسیله لام هموسیستمتر نئوبار محاسبه و سایر غلظت‌ها از غلظت اصلی ساخته شدند. برای بررسی قابلیت زنده‌مانی کنیدیوم‌ها، ابتدا یک‌دهم میلی‌لیتر از سوسپانسیون رقیق شده ( $10^4$  کنیدیا در میلی‌لیتر) روی محیط کشت PDA (به‌قطر پنج سانتیمتر) پخش و سپس در شرایط کنترل شده مذکور نگهداری گردید. برای محاسبه درصد جوانه‌زنی اسپورها بعد از ۲۰ ساعت، چهار پلیت از محیط کشت انتخاب و تعداد ۱۰۰ اسپور در هر پلیت شمارش شد. در طول آزمایش‌ها درصد جوانه‌زنی اسپورها بالاتر از ۹۵ درصد بود (Pourian *et al.*, 2011).

### خاک دیاتومه

در این مطالعه به‌ترتیب از دو نوع خاک دیاتومه فرموله شده با نام‌های Sayan® (ساخت شرکت کیمیا سبز آور ایران) به صورت پودر سفید تا کرمی رنگ و حاوی ۸۰

گاهی اوقات ناسازگاری بین خاک دیاتومه و قارچ، ناشی از تنش آبی است که به‌دلیل خاصیت خشک‌کنندگی و اثر منفی برخی خاک‌های دیاتومه بر ساختار فیزیولوژیک اسپور وارد می‌شود (Feofilova *et al.* 2012).

در این پژوهش کاربرد همزمان دو خاک دیاتومه ایرانی و خارجی با جدایه‌ی بومی قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* جهت تعیین سازگاری زیستی بین آنها برای کنترل آفت لمبه‌گندم مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین به‌منظور رفع مشکل کاهش جریان-پذیری دانه‌ها در اثر کاربرد دوز توصیه شده خاک‌های دیاتومه، در بررسی اختلاط، از دوز کم‌کننده این دو خاک استفاده شد تا کارایی آنها در این حالت نیز مورد بررسی قرار گیرد. نتایج حاصل از این تحقیق علاوه بر تعیین فعالیت حشره‌کشی و برهمکنش عوامل مورد استفاده می‌تواند به مرحله پیش‌تجاری سازی *B. bassiana* در برنامه‌های کنترل بیولوژیک آفات کمک شایانی نماید.

## مواد و روش‌ها

### پرورش حشره

در این پژوهش از کلنی موجود در آزمایشگاه حشره-شناسی دانشگاه رازی که تا قبل از شروع آزمایش‌ها، حداقل برای ۱۰ نسل پرورش داده شده بود استفاده گردید. کلنی مذکور از یک از سیلوی گندم واقع در شهرستان ماهیدشت کرمانشاه جمع‌آوری شده بود. پرورش در ظروف پلاستیکی تهویه‌دار مکعبی به ابعاد  $6 \times 10 \times 20$  سانتی‌متر و روی بذور گندم نیم‌کوب رقم سیروان درون انکوباتور (دمای  $1 \pm 33$  درجه سلسیوس و رطوبت نسبی  $5 \pm 35$  درصد و تاریکی کامل) انجام شد. به منظور از بین بردن هرگونه آلودگی احتمالی، بذور گندم قبل از مصرف به‌مدت سه روز در فریزر دمای  $-18$  درجه سلسیوس قرار داده شدند. میانگین محتوای رطوبتی بذور مورد استفاده برابر  $12/4\%$  بود. به‌منظور تشکیل گروه هم‌سن برای انجام آزمایش‌ها، تعداد ۱۰۰ حشره بالغ (مخلوط نر و ماده) دو روزه درون ظروف مکعبی حاوی ۵۰۰ گرم

دیاتومه سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> با دوزهای ۳۰۰، ۴۸۴، ۷۷۷، ۱۲۴۵ و ۲۰۰۰ (میلی‌گرم سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> بر کیلوگرم بذر) و یک تیمار شاهد انجام شد. در هر تیمار برای هر دوز، چهار ظرف پلاستیکی استوانه‌ای شفاف تهویه‌دار به ابعاد ۳ × ۱۰ سانتی‌متر مربع حاوی ۲۵ گرم بذر گندم تیمار شده (تیمارهای قارچ، سایان<sup>®</sup>، سلایت ۶۱۰<sup>®</sup>) و تیمار نشده (شاهد) در نظر گرفته شد و سپس تعداد ۱۰ حشره بالغ (با نسبت جنسی برابر) درون هر ظرف انتقال داده شد. این ظروف در انکوباتور با شرایط دمایی ۱ ± ۲۹ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۳۵ درصد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از آن میزان تلفات در روزهای پنجم، دهم و چهاردهم بعد از تیمار ثبت شد. حشراتی به عنوان مرده ثبت شدند که پس از تحریک شدن با قلم مو هیچ حرکتی نمی‌کردند. به منظور تأیید مرگ ناشی از آلودگی جدایه قارچی موردنظر، ابتدا حشرات مرده جداسازی شده و درون اتانول ۷۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه استریل شدند. بعد از آن سه بار درون آب مقطر شسته شده و سپس روی کاغذ صافی قرار داده شدند تا خشک شوند. حشرات مذکور سپس درون ظرف پتری حاوی SDAY قرار داده شده و اطراف آن با پارافیلیم مسدود گردید و به مدت هفت روز در انکوباتور با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵ درصد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بعد از این مدت با تهیه اسلاید از پوشش قارچ روی بدن حشره مشاهده نوع کنیدیوم و کنیدیوفورها در زیر میکروسکوپ نوری، آلودگی به قارچ *B. bassiana* تأیید گردید.

#### تعیین نوع برهمکنش قارچ *B. bassiana* و خاک-

##### های دیاتومه سایان<sup>®</sup> و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup>

در این مرحله از پژوهش، اثر حشره‌کشی مخلوط قارچ و خاک دیاتومه روی حشرات کامل *T. granarium* ارزیابی گردید. از آنجا که در صورت استفاده از دوز توصیه شده خاک دیاتومه (یک گرم در کیلوگرم بذر) احتمال توده‌ای شدن محموله بذر و کاهش تهویه‌ی

درصد اکسید سیلیسیم (SiO<sub>2</sub>) و خاک Celite 610<sup>®</sup> (ساخت شرکت BRANDT اسپانیا) به صورت پودر کرمی رنگ و دارای بیش از ۸۵ درصد اکسید سیلیسیم استفاده شد. قطر ذرات سایان<sup>®</sup> و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> به ترتیب کمتر از ۵۰ میکرومتر و کمتر از ۲۰ میکرومتر می‌باشد.

#### تعیین فعالیت حشره‌کشی قارچ *B. bassiana* DE

##### و خاک‌های دیاتومه در برابر *T. granarium*

سه آزمون زیست‌سنجی مقدماتی با هدف تعیین دوز-های کشنده ۱۰ و ۹۰ درصد برای قارچ *B. bassiana*، خاک‌های دیاتومه سایان<sup>®</sup> و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> به روش رهاسازی سوسک‌های بالغ (سن کمتر از ۲۴ ساعت) درون بذور گندم آغشته به هر یک از عوامل کشنده فوق انجام شد. برای تیمار شاهد هم از گندم‌های تیمار نشده استفاده گردید. برای تهیه دوزهای مختلف، ابتدا مخلوط پایه با بالاترین دوز از هر یک از عوامل کشنده تهیه شد. برای این کار مقادیر لازم از کنیدیوم قارچ و خاک‌های دیاتومه با استفاده از ترازوی دیجیتال OHAUS با دقت 10<sup>-5</sup> گرم وزن شده و سپس هر یک به‌طور جداگانه درون یک ظرف پلاستیکی حاوی ۵۰۰ گرم بذر گندم نیم‌کوب ریخته شدند. هر میلی‌گرم پودر قارچ، غلظتی معادل ۳/۴ × ۱۰<sup>۱۰</sup> کنیدیا بر میلی‌لیتر داشت که با لام هموسیئومتر شمارش گردید. برای اطمینان از پخش یکنواخت و چسبیدن کنیدیوم‌ها و ذرات خاک دیاتومه به بذور گندم، ظروف مذکور به مدت ده دقیقه با استفاده از یک شیکر تکان داده شدند و در نهایت سایر دوزها از این دوز پایه تهیه شدند. طبق نتایج آزمون‌های زیست‌سنجی مقدماتی و با استفاده از فرمول فاصله لگاریتمی سه دوز بین دو دوز کشنده آستانه هر سه عامل کنترل تعیین گردید. بر این اساس، آزمون زیست‌سنجی نهایی برای قارچ با دوزهای ۱۵۰، ۲۲۳، ۳۲۷، ۴۸۱، ۷۰۰ (میلی‌گرم کنیدیا بر کیلوگرم بذر)، خاک دیاتومه سایان با دوزهای ۲۰۰۰، ۲۷۰۰، ۳۷۰۰، ۵۰۶۰ و ۷۰۰۰ (میلی‌گرم سایان<sup>®</sup> بر کیلوگرم بذر) و برای خاک

### T. اثر اختلاط قارچ و خاک دیاتومه بر تولید نتاج *granarium*

در پایان آزمایش تعیین نوع برهمکنش (پس از ۱۴ روز از زمان تیمار)، تمام حشرات بالغ زنده و مرده از داخل ظروف آزمایش حذف شدند و این ظروف به مدت هشت هفته درون انکوباتور قرار داده شدند. سپس حشرات بالغ ظاهر شده نسل جدید اعم از زنده و مرده شمارش شدند.

### تجزیه آماری

ابتدا در صورت وجود تلفات در شاهد، درصد مرگ و میر تجمعی به وسیله فرمول Schneider-Orelli اصلاح شد (Püntener 1981). سپس برای تعیین تفاوت آماری مرگ و میر وابسته به دوز، تجزیه پروبیت با استفاده از نرم افزار PoloPlus انجام شد (Leora Software 2018). مقایسه بین فعالیت حشره کشی تیمارها براساس آزمون نسبت دوزهای کشنده (lethal dose ratios (LDR) با حدود اطمینان ۹۵٪ صورت گرفت. در این آزمون، اگر حدود اطمینان LDR شامل یک نباشد، نشان دهنده تفاوت معنی دار بین دو تیمار در سطح ۵ درصد است (Robertson et al., 2017). برای تعیین نوع برهمکنش بین خاک دیاتومه و قارچ تیمارگر از فرمول Robertson and Preisler (1992) استفاده شد.

$$P_e = p_1 + (1-p_0)p_1 + (1-p_0)(1-p_1)p_2$$

از خاک دیاتومه است. همچنین از توزیع کای اسکوتر (فرمول ۲) برای تست فرضیه مستقل بودن با  $df=1$  و  $p=0.05$  استفاده شد.

$$\chi^2 = \frac{(LO - LE)^2}{LE} + \frac{(DO - DE)^2}{DE}$$

حشره مرده مشاهده شده در شاهد و  $D_E$ : تعداد حشره مرده مورد انتظار است. در این صورت چنانچه

آن وجود دارد لذا تلفیق دوزهای کمتر آن ( $LD_{30} <$ ) همراه با سایر عوامل کشنده توصیه شده است (Korunić et al. 2020). از طرف دیگر چون اسپور قارچ زنده است و به همین دلیل در دوزهای مختلف می تواند، رفتار متفاوتی از نظر تلفات نشان دهد، لذا برای نتیجه بهتر، چند دوز از قارچ برای اختلاط دوتایی با یک دوز از هر خاک دیاتومه ( $LD_{25}$ ) برای ادامه کار انتخاب و نوع برهمکنش آنها بررسی شد. به این منظور، مقادیر  $LD_{25}$  هر دو فرمولاسیون خاک دیاتومه تهیه شدند و به طور جداگانه به نسبت یک به یک با دوزهای کشنده ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۰ درصد قارچ مخلوط شدند. کلیه شرایط از جمله ظروف آزمایش و تعداد تکرار هر تیمار مشابه آزمون های زیست سنجی ذکر شده در بخش قبل بود. تنها موردی که متفاوت بود، وزن دانه گندم در هر ظرف آزمایش بود که شامل ۳۰ گرم دانه (۱۵ گرم گندم آغشته به هر یک از دوزهای قارچ و ۱۵ گرم گندم آغشته به  $LD_{25}$  هر یک از خاک های دیاتومه) بود که پس از اختلاط با تکان دادن ظرف به طور کامل بایکدیگر مخلوط شدند. تیمار شاهد شامل بذره های تیمار نشده بود. تمام ظروف آزمایش در یک انکوباتور تحت شرایط دمایی ۲۹ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $5 \pm 35$  درصد و تاریکی کامل نگهداری شدند. سپس میزان تلفات، روزانه تا ۱۴ روز پس از تیمار ثبت شد و در نهایت نوع برهمکنش اختلاط های مختلف دوز قارچ و هر دو خاک دیاتومه اعم از سینرژیستی، آنتاگونیستی و یا افزایشی تعیین گردید.

(۱)

که در آن  $p_e$ : مرگ و میر مورد انتظار در اثر ترکیب قارچ و خاک دیاتومه،  $p_0$ : مرگ و میر مشاهده شده در شاهد،  $p_1$ : مرگ و میر مشاهده شده ناشی از قارچ *B. bassiana*،  $p_2$ : مرگ و میر مشاهده شده ناشی

(۲)

که در آن  $L_O$ : تعداد حشره زنده مشاهده شده در شاهد،  $L_E$ : تعداد حشره زنده مورد انتظار،  $D_O$ : تعداد

مورد انتظار باشد، برهمکنش از نوع آنتاگونیستی است. درصد کاهش تولید نتاج طی دوره ذخیره سازی در هر یک از تیمارهای اختلاط قارچ و خاک دیاتومه براساس معادله (۳) محاسبه شد (Aldryhim 1990):

$$100 * \frac{(\text{تعداد نتاج در تیمار} - \text{تعداد نتاج در شاهد})}{\text{تعداد نتاج در شاهد}} = \text{کاهش } \% \text{ نتاج} \quad (3)$$

$F_{5,18} = 8.35$  ,  $P < 0.001$  ) دهم ،  $F_{5,18} = 8.09$  ,  $P < 0.001$  ) و چهاردهم  $F_{5,18} = 6.33$  ,  $P = 0.002$  ) تفاوت معنی‌دار وجود داشت که نشان‌دهنده رابطه مستقیم تلفات با مدت زمان در معرض قرار گرفتن حشره با قارچ است (شکل ۱A). همچنین از روز پنجم تا چهاردهم پس از تیمار، نسبت درصد تلفات لمبه گندم در پایین‌ترین و بالاترین دوز قارچ به ترتیب ۱۲ و ۲/۱۵ برابر شد که نشان می‌دهد در دوزهای بالاتر قارچ، زمان از بین رفتن حشره کوتاه‌تر شده است. در حشرات تیمار شده با خاک دیاتومه سایان<sup>®</sup> تا روز پنجم در هیچ‌یک از دوزها تلفاتی مشاهده نشد ولی در این تیمار نیز در روزهای دهم (  $F_{5,18} = 6.40$  ,  $P < 0.001$  ) و چهاردهم  $F_{5,18} = 45.29$  ,  $P < 0.001$  ) میزان مرگ و میر روندی وابسته به دوز داشت (شکل ۱B). تلفات ناشی از سایان<sup>®</sup> در روز چهاردهم، در کمترین (۲۰۰۰ پی پی ام) و بیشترین (۷۰۰۰ پی پی ام) دوز، به ترتیب ۲۵ و ۶۷/۵ درصد به دست آمد. فعالیت حشره‌کشی خاک دیاتومه سلایت ۶۱۰<sup>®</sup>، در روزهای پنجم  $F_{5,18} = 8.35$  ,  $P < 0.001$  ) دهم (  $F_{5,18} = 37.80$  ,  $P < 0.001$  ) و چهاردهم (  $F_{5,18} = 90.18$  ,  $P < 0.001$  ) پس از تماس حشره آفت با بذر گندم تیمار شده با افزایش دوز زیاد شد. در تمام دوزهای سلایت ۶۱۰<sup>®</sup>، سرعت افزایش تلفات با فاصله گرفتن از زمان تیمار، تقریباً در یک حدود بود. برای نمونه در دوزهای ۳۰۰ (کمترین دوز) و ۲۰۰۰ (بالاترین دوز) میلی‌گرم سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> بر کیلوگرم گندم، درصد تلفات از روز پنجم تا چهاردهم به ترتیب پنج و شش برابر شد (شکل ۱C).

$\chi^2 < 3.84$  شود، برهمکنش از نوع افزایشی است. اگر  $\chi^2 > 3.84$  و مرگ و میر مشاهده شده بزرگ‌تر از مرگ و میر مورد انتظار باشد، برهمکنش از نوع سینرژیستی است. در نهایت چنانچه  $\chi^2 > 3.84$  و مرگ و میر مشاهده شده کوچک‌تر از مرگ و میر

تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها و سایر محاسبات آماری با نرم افزار SYSTAT version 13 انجام شد (SYSTAT Software, San Jose, CA). صورت لزوم داده‌ها قبل از تجزیه با آزمون Kolmogorov-Smirnov نرمال شدند.

### نتایج

#### فعالیت حشره‌کشی قارچ *B. bassiana* DE و

#### خاک‌های دیاتومه در برابر *T. granarium*

فعالیت حشره‌کشی جدایه *B. bassiana* DE و خاک-های دیاتومه سایان<sup>®</sup> و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> علیه حشرات بالغ لمبه گندم در تماس با بذر گندم آغشته به این عوامل، بر اساس آزمون دوز-پاسخ بررسی شد. مقادیر دوزهای معادل با درصدهای کشندگی مختلف برای هر سه عامل کشنده به تفصیل در **Error! Reference source not found.** آورده شده است. بر اساس نتایج، مقدار LD<sub>50</sub> این جدایه برای لمبه گندم برابر ۲۷۲/۲۵ میلی‌گرم پودر کنیدیوم بر کیلوگرم بذر تخمین زده شد. همچنین مقادیر LD<sub>25</sub> برای خاک‌های دیاتومه ایرانی و خارجی به ترتیب برابر با ۲۱۱۱/۲ و ۵۰۵/۶ میلی‌گرم خاک بر کیلوگرم بذر محاسبه شدند (جدول ۱). تجزیه داده‌های آزمایش زیست‌سنجی با آزمون LDR نشان داد که بین دو خاک دیاتومه ایرانی و خارجی از نظر قدرت حشره‌کشی علیه حشرات بالغ لمبه گندم تفاوت معنی‌دار وجود دارد به این ترتیب که قدرت حشره‌کشی سلایت ۶۱۰<sup>®</sup>، ۴/۴۷ برابر سایان<sup>®</sup> می‌باشد (Robertson et al., 2017) (جدول ۱). در دوزهای مختلف قارچ، بین تلفات روزهای پنجم

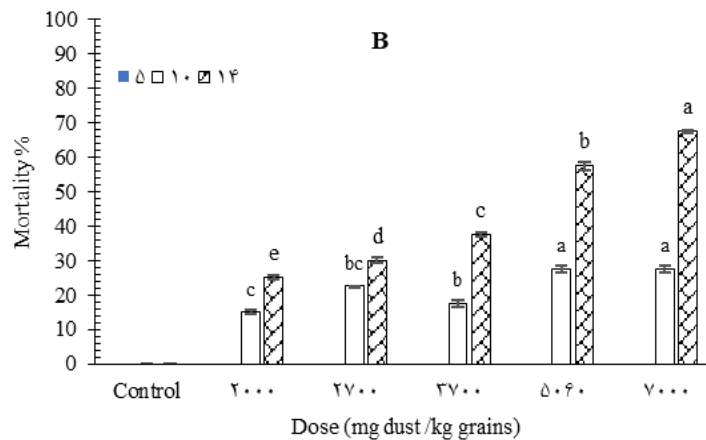
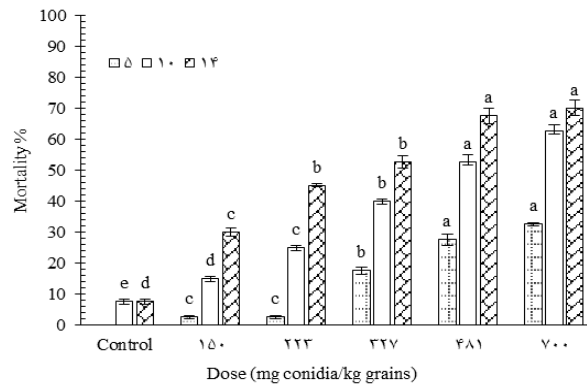
جدول ۱- حساسیت حشرات بالغ *Trogoderma granarium*، پس از ۱۴ روز تماس با بذره‌های گندم تیمار شده با کنیدیوم‌های خشک قارچ *Baeuveria bassiana* و دو خاک دیاتومه سایان® و سلایت ۶۱۰®

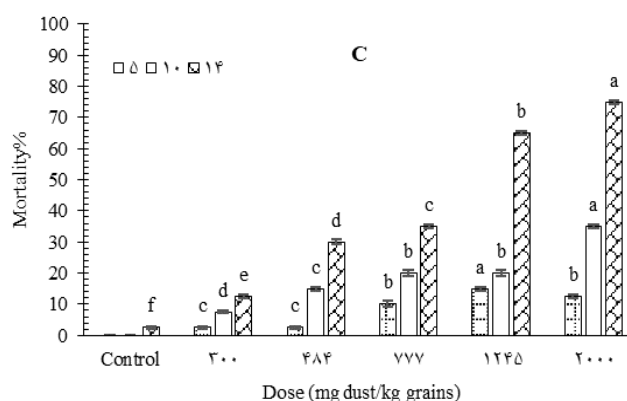
Table 1- Susceptibility of *Trogoderma granarium* adults after 14 days of contact with wheat seeds treated with *Beauveria bassiana*-DE dry conidia and two diatomaceous earth, Sayan® and Celite 610®

Treatments	No. of insect	Dose (95% CL) <sup>a</sup> (ppm) <sup>b</sup>	$\chi^2$ (df=18)	Slope ± SE	p-value	LDR <sup>c</sup> (95% CL) <sup>d</sup>
<i>B. bassiana</i> (DE)	240	LD <sub>10</sub> 74.42 (25.93-120.03)	8.87	2.27± 0.46	0.56	-
		LD <sub>25</sub> 137.56 (70.15-190.99)				
		LD <sub>50</sub> 272.25 (198.17-342.4)				
		LD <sub>75</sub> 538.82 (422.54- 812.73)				
		LD <sub>90</sub> 996.04 (694.39-2129.01)				
Sayan®	240	LD <sub>25</sub> 2111.2 (1216.1 – 2708.8)	5.11	2.26± 0.45	0.44	4.47 (3.29-6.09)
		LD <sub>50</sub> 4439.4 (3639.8-5889.1)				
Celite 610®	240	LD <sub>25</sub> 505.56 (343.11- 645.06)	4.77	2.30± 0.39	0.49	
		LD <sub>50</sub> 992.25 (796.8 -1253.3)				

<sup>a</sup> حدود اطمینان ۹۵ درصد، <sup>b</sup> پی‌پی‌ام برای قارچ معادل میلی‌گرم کنیدیا بر کیلوگرم بذر گندم و برای خاک‌های دیاتومه معادل میلی‌گرم گرد بر کیلوگرم بذر گندم است، <sup>c</sup> نسبت‌های دوز کشندگی <sup>d</sup> حدود اطمینان برای نسبت‌های دوز کشندگی LD<sub>50</sub> که اگر شامل عدد یک نباشد نشانه تفاوت معنی‌دار بین قدرت حشره‌کشی دو خاک دیاتومه در سطح ۵ درصد است.

<sup>a</sup> 95% confidence limits, <sup>b</sup> ppm: mg dry conidia /kg wheat seeds for *Beauveria bassiana*, and mg dust /kg wheat seeds for diatomaceous earth, <sup>c</sup> LDR: lethal dose ratios, <sup>d</sup> 95% confidence limits for lethal dose ratios of LD<sub>50</sub> if it does not include 1.0 then there is a significant difference between two diatomaceous earths (Robertson *et al.*, 2017).





شکل ۱- درصد مرگ و میر تجمعی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) حشرات بالغ *Trogoderma granarium*. ۵، ۱۰ و ۱۴ روز پس از تماس با بذره‌های گندم تیمار شده با کنیدیوم‌های خشک قارچ *Baeuveria bassiana* (A) و دو خاک دیاتومه سایان<sup>®</sup> (B) و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> (C). حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار بین دوزهای مختلف در هر روز می‌باشد (Tukey HSD;  $P < 0.05$ ).

Figure 1. Percent cumulative mortality (mean  $\pm$  SE) of *Trogoderma granarium* adults 5, 10, and 14-days following contact with wheat seeds treated with different doses of *Beauveria bassiana*-DE dry conidia (A) and two diatomaceous earth, Sayan<sup>®</sup> (B) and Celite 610<sup>®</sup> (C). Different letters indicate a significant difference among different doses at each day (Tukey HSD test,  $P > 0.05$ ).

آخرین دوز قارچ (LD<sub>90</sub>) که در کنار هر دو خاک، برهمکنشی از نوع افزایشی نشان داد (جزییات بیشتر در جدول ۲). خاک دیاتومه سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> در حالت ترکیبی با قارچ عملکرد بهتری از نظر قدرت حشره-کشی نسبت به سایان<sup>®</sup> داشت.

تعیین نوع برهمکنش قارچ *B. bassiana* و خاک-های دیاتومه سایان<sup>®</sup> و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> نتایج آزمون کای اسکوئر با مرگ و میر مشاهده شده و مورد انتظار نشان داد که اختلاط هر یک از دوزهای قارچ *B. bassiana* DE با LD<sub>25</sub> هر دو خاک دیاتومه سینرژیستی بود ( $\chi^2$ -value > 3.84,  $P > 0.05$ ) به‌جز

جدول ۲- مرگ و میر مشاهده شده و مورد انتظار حشرات بالغ *Trogoderma granarium* در دهمین روز پس از تیمار با مخلوط قارچ *Baeuveria bassiana* (دوزهای مختلف) و هر یک از دو خاک دیاتومه سایان<sup>®</sup> و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> (دوز LD<sub>25</sub>) و نوع برهمکنش آنها

Table 2- Observed and expected mortality of *Trogoderma granarium* adults on 10<sup>th</sup> day after treatment to mixtures of *Baeuveria bassiana* (different doses) and each of two diatomaceous earth, Sayan<sup>®</sup> and Celite 610<sup>®</sup> (LD<sub>25</sub>) and their interactions type

Diatomaceous earth	<i>B. bassiana</i> doses	<i>B. bassiana</i> +LD <sub>25</sub> of diatomaceous earth			Effect
		% OM <sup>a</sup>	% EM <sup>b</sup>	$\chi^2$ (df=1, $p=0.05$ )	
Sayan <sup>®</sup>	LD <sub>10</sub>	12.50	9.47	6.15	Synergism
	LD <sub>25</sub>	27.50	16.54	4.19	Synergism
	LD <sub>50</sub>	50.00	30.93	5.78	Synergism
	LD <sub>75</sub>	62.50	51.01	6.08	Synergism
	LD <sub>90</sub>	70.00	69.76	3.70	Additive
Celite 610 <sup>®</sup>	LD <sub>10</sub>	25.00	9.59	6.02	Synergism
	LD <sub>25</sub>	32.50	17.08	3.87	Synergism
	LD <sub>50</sub>	52.50	32.82	4.76	Synergism
	LD <sub>75</sub>	77.50	55.19	6.62	Synergism
	LD <sub>90</sub>	85	75.47	1.70	Additive

<sup>a</sup>درصد مرگ و میر مشاهده شده، <sup>b</sup>درصد مرگ و میر مورد انتظار (Robertson and Preisler 1992). تعداد حشرات هر تیمار ۴۰ عدد است.

<sup>a</sup> Observed mortality, <sup>b</sup> expected mortality (Robertson and Preisler 1992). The number of insects in each treatment is 40.



به دوز قارچ در مخلوط با هر دو خاک دیاتومه افزایش یافت به جز دو دوز  $LD_{90}^{Bb}$  و  $LD_{75}^{Bb} + LD_{25}$  (+LD<sub>25</sub>) که اختلافشان با هم معنی‌دار نبود. مقایسات دوتایی بین مخلوط‌های حاصل از قارچ و دو نوع خاک دیاتومه نشان داد که فقط در دوزهای LD<sub>25</sub>، LD<sub>50</sub> و LD<sub>90</sub> قارچ تفاوت وجود داشت (جدول ۳).

### تولید نتاج تحت تاثیر تیمارهای اختلاط قارچ و خاک دیاتومه

در پایان دوره ذخیره سازی بذرو تیمار شده (هشت هفته)، کاهش تولید نتاج بین مخلوط‌های مختلف قارچ و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> ( $F_{4,15} = 64.17$ ,  $P < 0.001$ ) و قارچ و سایان<sup>®</sup> ( $F_{4,15} = 149.19$ ,  $P < 0.001$ ) معنی‌دار بود (جدول ۳). کاهش نتاج به‌طور معنی‌دار و وابسته

جدول ۳- اثر مخلوط دوزهای مختلف قارچ *Beauveria bassiana* DE و خاک‌های دیاتومه سایان<sup>®</sup> و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> روی کاهش نتاج بالغ *Trogoderma granarium* پس از هشت هفته ذخیره‌سازی بذور

Table 3- Effect of different doses of *Beauveria bassiana* and diatomaceous earth of Sayan<sup>®</sup> and Celite 610<sup>®</sup> mixtures on progeny reduction of *Trogoderma granarium* adults following eight weeks of seeds storage

Combinations (mg lethal agent kg <sup>-1</sup> grains)	% Progeny reduction (±SE)		t-test (df=6)	P-value
	Sayan <sup>*</sup>	Celite 610 <sup>*</sup>		
LD <sub>10</sub> <sup>Bb</sup> + LD <sub>25</sub> <sup>†</sup>	39.2 (± 2.09) d	46.1 (± 3.90) d	1.47	0.19
LD <sub>25</sub> <sup>Bb</sup> + LD <sub>25</sub>	59.6 (± 1.02) b	67.3 (± 3.17) b	2.97	0.04*
LD <sub>50</sub> <sup>Bb</sup> + LD <sub>25</sub>	75.7 (± 1.91) c	82.9 (± 1.68) c	2.63	0.04*
LD <sub>75</sub> <sup>Bb</sup> + LD <sub>25</sub>	89.7 (± 2.35) a	92.2 (± 2.49) a	0.66	0.53
LD <sub>95</sub> <sup>Bb</sup> + LD <sub>25</sub>	90.7 (± 1.14) a	97.8 (± 0.45) a	5.28	0.007*

Bb: *Beauveria bassiana*, LD<sub>25</sub><sup>†</sup>: Diatomaceous sub-lethal dose, Progeny reduction= [(no. of progenies in control - no. of progeny in treatments) / no. of progeny in control × 100] (Aldryhim 1990). Mean within a column followed by the same letter are not significantly different among combination doses (Tukey-HSD test,  $P < 0.05$ ).

Eilenberg 2007). جدایه مورد استفاده در این مطالعه

از خاک مناطق گرم (دزفول) جداسازی و نیز تحت شرایط رطوبت کم ارزیابی شد. کارایی بالای کنیدیوم-های خشک این جدایه در ایجاد تلفات روی لمبه گندم بیانگر توانایی بالای عملکرد آن در شرایط نسبتاً خشک انبار است. جایی که معمولاً انتظار می‌رود به دلیل رطوبت کم محیط برای قارچ‌های بیمارگر نامساعد باشد. در تایید نتایج این مطالعه، Khoobdel *et al.* (2019) نیز نشان دادند که جدایه‌های بومی جداسازی شده *B. bassiana* از مناطق با آب و هوای گرم و خشک (شرایط تنش آب) عملکرد مطلوبی برای کنترل آفات انباری دارند.

در این مطالعه بر اساس آزمایش‌های اولیه مشخص شد که جدایه مذکور معمولاً بیش از ۱۰ روز برای ایجاد تلفات قابل قبول در حشره، نیاز دارد. در پژوهش دیگری نشان داده شد که سوسک‌های چهار نقطه‌ای *Callosobruchus maculatus* (F.) حبوبات،

### بحث

در شرایط محیطی انبار، کاربرد جدایه‌های موثر و به-ویژه بومی، برای کنترل بیولوژیک آفات از ارزش بالایی برخوردار است. نتایج پژوهش حاضر، بیانگر زهرآگینی بالای جدایه بومی قارچ *B. bassiana* DE در برابر حشرات بالغ لمبه گندم بود. همچنین تلفات این حشره در اثر قارچ، به‌طور وابسته به دوز افزایش یافت. مطالعات قبلی نیز کارایی بالای جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* روی آفات انباری (به‌ویژه در راسته سخت بالپوشان) را تایید کرده‌اند (Rumbos and Athanassiou 2017; Batta, YA and Kavallieratos 2018; Khoobdel *et al.* 2019; Ozdemir *et al.* 2020). همه این موارد نشان‌دهنده توان بالای بیماری‌زایی و سازگاری کنیدیوم‌های قارچ مزبور با شرایط انبار هستند. اکوسیستم خاکی، خاستگاه اکثر قارچ‌های بیمارگر حشرات است و جدایه‌هایی که از خاک جداسازی می‌شوند معمولاً توان بیماری‌زایی بالاتری نسبت به سایرین دارند (Meyling and

۶۱۰<sup>®</sup> در کیلوگرم بذر نیاز است که بیانگر بهتر بودن این فرمولاسیون برای کنترل آفات انباری می‌باشد. در یک مطالعه اثر دو فرمولاسیون خاک دیاتومه علیه *O. surinamensis* بررسی شد و مشابه نتایج ما از نظر کارایی بین این فرمولاسیون‌ها اختلاف مشاهده شد به طوری که خاک دیاتومه PyriSec<sup>®</sup> پس از ۱۴ روز نسبت به SilicoSec<sup>®</sup> مؤثرتر بود (Athanassiou et al. 2016). همچنین مقایسه فرمولاسیون‌های مختلف خاک دیاتومه بومی و تجاری روی حشرات کامل *T. castaneum* نشان دادند که فرمولاسیون Protect-It<sup>®</sup> نسبت به سایر فرمولاسیون‌های مورد بررسی از کارایی بالاتری برخوردار است (Arnaud et al. 2005). عوامل چندی از جمله شکل و اندازه ذرات، میزان دی اکسید سیلیسوم، pH و میزان چسبندگی ذرات آن به سطح دانه‌ها در اثربخشی خاک‌های دیاتومه تأثیرگذارند (Korunić et al. 2020). ذرات پهن (به علت داشتن سطح فعال بیشتر)، ذرات با قطر کمتر از ۱۰ میکرومتر (Vayias and Stephou 2009)، داشتن بیش از ۸۰ درصد SiO<sub>2</sub> و pH ۴/۴ - ۸/۵ خصوصیتی هستند که باعث می‌شوند یک فرمولاسیون خاک دیاتومه قدرت حشره‌کشی بیشتری داشته باشد (Korunić et al. 1998). در مطالعه حاضر کوچکتر بودن اندازه ذرات و بالاتر بودن سیلیس سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> احتمالاً سبب سمیت بیشتر آن نسبت به سایان<sup>®</sup> شده‌اند. همچنین رابطه بین دوز-پاسخ در هر دو فرمولاسیون خاک دیاتومه (سایان<sup>®</sup> و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup>) مستقیم بود. مطابق نتایج ما در تحقیقات دیگر نیز ارتباط بین افزایش تلفات با افزایش دوز خاک دیاتومه گزارش شده است برای مثال در مطالعه Awais et al. (2020)، ۸۴/۹ درصد مرگ و میر برای حشرات کامل *T. granarium* تیمار شده با بالاترین غلظت خاک دیاتومه ثبت شد. همچنین بیشترین میزان مرگ و میر *C. maculatus* در مواجهه با بالاترین دوز خاک دیاتومه تجاری و استاندارد Selico-Sec مشاهده شد (Khoobdel et al. 2019). خاک‌های دیاتومه به‌طور فیزیکی عمل کرده و پس از قرار گرفتن روی سطح بدن حشره سطح کوتیکول را خراش داده و لیپیدها و

(Coleoptera: Bruchidae) تیمار شده با یک جدایه از *B. bassiana* در کمتر از ده روز تلف می‌شوند (Cherry et al. 2005) در حالی که جدایه دیگری از *Oryzaephilus surinamensis* (L.) در (Coleoptera: Silvanidae) روی گندم، علی‌رغم جثه کوچک‌تر این حشره، برای ایجاد تلفات به حدود دو هفته یا بیشتر زمان نیاز داشت (Searle and Doberski 1984). به‌طور کلی درجه و سرعت بیماری-زایی قارچ‌های انتوموپاتوزن بخشی به ویژگی‌های آنها از قبیل نوع آنزیم‌ها و توکسین‌های ترش‌چی، قدرت چسبیدن اسپور به بدن میزبان و بخش دیگر به ویژگی‌های زیستی گونه آفت از قبیل چربی‌های ضد میکروبی پوست و سیستم ایمنی آن (به‌ویژه هیومرال) بستگی دارد (Ortiz-Urquiza and Keyhani 2013, Lu and Leger 2016, Batta, YA et al. 2018).

خاک‌های دیاتومه از فسیل دیاتوم‌ها حاصل شده-اند و دارای تنوع بالا و به‌تبع آن کارایی متفاوت در گونه‌های مختلف حشرات هستند (Korunić 2013). تغییرات در میزان عملکرد این خاک‌ها می‌تواند به دلیل اجزای مختلف تشکیل دهنده آنها باشد (Athanassiou et al. 2006). نتایج این پژوهش نشان داد که هر دو فرمولاسیون تجاری داخلی و خارجی مورد مطالعه از قدرت حشره‌کشی قابل قبولی علیه لمبه گندم برخوردار هستند اما ترکیب خارجی (Celite 610<sup>®</sup>) در این زمینه قدرتمندتر از سایان<sup>®</sup> عمل نمود به‌طوری‌که مقدار لازم از خاک دیاتومه سایان<sup>®</sup> برای کشتن نصف جمعیت حشره، ۴/۴۷ برابر سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> بود. استفاده از مقادیر زیاد خاک دیاتومه سبب کاهش وزن هکتولتری دانه‌های غلات و کاهش جریان پذیری هوا در آنها می‌شود و همچنین روی خواص فیزیکی و شیمیایی دانه‌های غلات اثر منفی دارد. بنابراین فرآورده تجاری سلایت ۶۱۰-به دلیل کاهش امکان چسبندگی بذور نسبت به فرآورده دیگر می‌تواند به‌طور مؤثرتری در کنترل سخت-بالپوشان انباری عمل نماید (Korunić et al. 2020). این یعنی که برای رسیدن به یک عملکرد مشابه بین سایان<sup>®</sup> و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup>، به مقدار کمتری از سلایت

ارتباط با حشره میزبان است. همچنین سرعت کشتن حشرات به صورت وابسته به دوز قارچ افزایش یافت که نشان می‌دهد تراکم بیشتر اسپور در محیط سبب بیشتر شدن تاثیر اختلاط شده است. در مدیریت تلفیقی آفات، عملکرد بالاتر و سریعتر فرآورده کنترل کننده، یک مزیت محسوب می‌شود چرا که با حذف فعالیت‌های حیاتی حشره، شانس زنده‌مانی، تغذیه، جفت‌یابی و تخم‌ریزی او نیز از دست می‌رود.

دما و رطوبت، ترکیب هیدروکربن‌های کوتیکولی، رفتار حشرات، نوع جدایه قارچ مورد استفاده و زیستگاه آن، قدرت چسبندگی اسپور، نوع خاک دیاتومه و مقدار سیلیکای آن، قابلیت زیست و قدرت جوانه زنی اسپور همگی نقش حیاتی در سازگاری این دو عامل و ایجاد اثر سینرژیسیم دارند (Lord 2001, Akbar et al. 2004, Ortiz-Urquiza and Keyhani 2013). جوانه زنی کنیدیوم و سرعت نفوذ آن به درون بدن حشره، تجزیه و استفاده از چربی‌های پوست حشره و تنوع ترکیبات ضد میکروبی موجود در پوست حشره نیز می‌توانند روی برهمکنش میزبان-کنیدیوم-خاک دیاتومه تاثیر مثبت یا منفی به جا گذارند (Ortiz-Urquiza and Keyhani 2013, Pedrini et al. 2013). همچنین اثبات شده که خاک دیاتومه با حذف موانع فیزیکی، سبب دستیابی کنیدیوم به مواد غذایی مانند هیدروکربن‌های مطلوب برای رشد قارچ شده و رشد آن را بیشتر و سریع‌تر می‌کند (Prasanth et al. 2015).

پس از اتمام دوره ذخیره سازی بذرو تیمار شده، تولید نتاج *T. granarium* در اکثر مخلوط‌های حاصل از دوزهای مختلف قارچ با دوز زیر کشنده خاک دیاتومه کاهش یافت. در این بین اختلاط قارچ با خاک دیاتومه سلایت ۶۱۰® نقش موثرتری در کاهش جمعیت بالغ نسل جدید داشت. به طوری که در مخلوط بالاترین دوز قارچ با سلایت ۶۱۰®، تولید و رشد جمعیت لمبه گندم تقریباً به طور کامل سرکوب شد. قدرت حفاظتی بالای ترکیب قارچ و خاک دیاتومه نشان از حفظ سازگاری بین دو عامل طی یک دوره زمانی دارد. برخی تحقیقات قبلی روی آفات انباری همین مطلب را تایید می‌کنند که وقتی بذور با مخلوط

اسیده‌های چرب اپی‌کوتیکول را در حفره‌های متخلخل خود جذب نموده و با از دست رفتن آب بدن حشره منجر به خشک شدن بدن و نهایتاً مرگ آن می‌گردند (Korunic et al. 1998, Prasanth et al. 2015). به طور کلی در غلظت‌های بالاتر خاک دیاتومه، جذب موم و ساینده‌های سریعتر اتفاق افتاده و باعث مرگ سریعتر می‌شود (Shams et al. 2011)، اما همانطور که قبلاً گفته شد خاک‌های دیاتومه در دوزهای توصیه شده باعث مشکلاتی مثل توده‌ای شدن محصول (شاخص کیفی بذری) می‌شوند. یکی دیگر از معایب آنها این است که در مقایسه با حشره-کش‌های شیمیایی تماسی و تدخینی، کند عمل می‌کنند (Korunic et al. 1998). هر دو این نقایص را می‌توان با کاربرد غلظت‌های کمتر خاک‌های دیاتومه، برای کاهش توده ای شدن محصول در کنار ترکیبات سالم مانند عوامل کنترل بیولوژیک برای سرعت بخشیدن به سرکوب حشرات در برنامه‌های کنترل تلفیقی آفات انباری مرتفع ساخت (Khoobdel et al. 2019). وقتی اپی‌کوتیکول حشرات توسط خاک دیاتومه خراش داده شود زمینه برای نفوذ عوامل میکروبی مثل قارچ‌های بیمارگر تسهیل می‌شود و این موجب اتصال قوی‌تر کنیدیوم‌ها به جلد حشره می‌شود (Akbar et al. 2004).

نتایج مطالعه برهمکنش نشان داد که اختلاط دوزهای مختلف قارچ با خاک دیاتومه منجر به تشدید فعالیت حشره‌کشی هر دو عامل حشره‌کش می‌شود و به عبارتی نوع برهمکنش آنها سینرژیسم است. همچنین با افزایش دوز قارچ در ترکیب، مرگ و میر افزایش می‌یابد. این مورد نیز تایید کننده نتایج محققینی است که قبلاً عنوان نموده بودند کاربرد توام قارچ و خاک دیاتومه باعث افزایش کارایی هر دو آنها نسبت به حالت کاربرد تکی می‌شود (Lord 2001, Akbar et al. 2004, Khoobdel et al. 2019).

علاوه بر این مشخص شد که اختلاط قارچ با خاک دیاتومه سرعت کشتن لمبه گندم را نیز افزایش داده و از چهارده روز به ده روز رساند. بروز اثرات سینرژیستی و افزایش سرعت کشتن حشره هدف، بیانگر وجود برهمکنش‌های مثبت بین قارچ و خاک دیاتومه در

توان از اثر سینرژیستی آنها در کنار هم در برنامه‌های کنترل بیولوژیک آفات انباری بهره برد. هیچگونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

سپاسگزاری: بدین وسیله مولفین از آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران جهت در اختیار قرار دادن جدایه قارچ بیمارگر حشرات برای انجام این پروژه قدرانی می‌کنند.

خاک دیاتومه و قارچ تیمار می‌شوند اثرات کنترلی بیشتری در برابر آفات انباری نسبت به کاربرد تکی آنها پیدا می‌کند (Lord 2001, Akbar *et al.* 2004, Athanassiou *et al.* 2006, Khoobdel *et al.* 2019). به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که قدرت حشره‌کشی فرمولاسیون خاک دیاتومه سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> بیشتر از سایان<sup>®</sup> است. همچنین جدایه بومی قارچ *B. bassiana* DE با دو فرمولاسیون خاک دیاتومه سایان<sup>®</sup> و سلایت ۶۱۰<sup>®</sup> سازگار است و می-

## REFERECES

- Akbar, W., J. C. Lord, J. R. Nechols, and R. W. Howard. 2004. Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. *J. Econ. Entomol.* 97: 273–280.
- Aldryhim, Y. 1990. Efficacy of the amorphous silica dust, and *Sitophilus Granarius* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae and Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 26: 207–210.
- Arnaud, L., H. T. T. Lan, Y. Brostaux, and E. Haubruge. 2005. Efficacy of diatomaceous earth formulations admixed with grain against populations of *Tribolium castaneum*. *J. Stored Prod. Res.* 41: 121–130.
- Athanassiou, C. G. A., N. G. K. Avallieratos, A. C. Hiriloaie, and T. N. V Assilakos. 2016. Insecticidal efficacy of natural diatomaceous earth deposits from Greece and Romania against four stored grain beetles: the effect of temperature and relative humidity. *Bull. Insectology.* 69: 25–34.
- Athanassiou, C. G., M. M. Hasan, T. W. Phillips, M. J. Aikins, and J. E. Throne. 2015. Efficacy of methyl bromide for control of different life stages of stored-product psocids. *J. Econ. Entomol.* 108: 1422–1428.
- Athanassiou, C. G., N. G. Kavallieratos, C. B. Dimizas, B. J. Vayias, and Ž. Tomanović. 2006. Factors affecting the insecticidal efficacy of the diatomaceous earth formulation SilicoSec<sup>®</sup> against adults of the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Appl. Entomol. Zool.* 41: 201–207.
- Awais, M., M. Zeeshan, M. Sagheer, M. U. Asif, and Q. Ali. 2020. Combined effect of diatomaceous earth and insect growth regulators against *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). *Sci. Lett.* 8: 55–60.
- Bagheri-Zenouz, A. 2013. Pest of stored products and management to maintain, *Biology of insects, Acari and microorganisms.* 4, editor, Tehran Univ. Tehran Press. Persian 2013].
- Batta, YA, and N. G. Kavallieratos. 2018. The use of entomopathogenic fungi for the control of stored-grain insects. *Int. J. Pest Manag.* 64: 77–87.
- Batta, YA, N. G. Kavallieratos, Y. A. Batta, and N. G. Kavallieratos. 2018. The use of entomopathogenic fungi for the control of stored-grain insects. *Int. J. Pest Manag.* 64: 77–87.
- Benhalima, H., M. Q. Chaudhry, K. A. Mills, and N. R. Price. 2004. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. *J. Stored Prod. Res.* 40: 241–249.
- Borzoui, E., B. Naseri, and F. Rahimi Namin. 2015. Different diets affecting biology and digestive physiology of the Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *J. Stored Prod. Res.* 62: 1–7.
- Cherry, A. J., P. Abalo, and K. Hell. 2005. A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *J. Stored Prod. Res.* 41: 295–309.
- Eppo. 2013. European and Mediterranean Plant Protection Organization. PM 7/13 (2) *Trogoderma granarium*. EPPO Bull.
- Feofilova, E. P., A. A. Ivashechkin, A. I. Alekhin, and Y. E. Sergeeva. 2012. Fungal spores: Dormancy, germination, chemical composition, and role in biotechnology (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 48: 1–11.

- Goettel, M. S., G. D. Inglis, and S. P. Wraight. 2000. Fungi, pp. 255–282. In Kaya, H.K., Lacey, L.A. (eds.), *F. Man. Invertebr. Pathol.* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Gourgouta, M., P. Agrafioti, and C. G. Athanassiou. 2020. Insecticidal Effect of Phosphine for the Control of Different Life Stages of the Khapra Beetle, *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae). *Crop Prot.* 105409.
- Kavallieratos, N. G., C. G. Athanassiou, M. C. Boukouvala, and G. T. Tsekos. 2019. Influence of different non-grain commodities on the population growth of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *J. Stored Prod. Res.* 81: 31–39.
- Kavallieratos, N. G., C. G. Athanassiou, Z. Korunic, and N. H. Mikeli. 2015. Evaluation of three novel diatomaceous earths against three stored-grain beetle species on wheat and maize. *Crop Prot.* 75: 132–138.
- Khoobdel, M., H. R. Pourian, and M. Alizadeh. 2019. Bio-efficacy of the indigenous entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* in conjunction with desiccant dust to control of coleopteran stored product pests. *J. Invertebr. Pathol.* 168: 107254.
- Korunić, Z. 2013. Diatomaceous earths: Natural insecticides. *Pestic. i fitomedicina.* 28: 77–95.
- Korunic, Z., S. Cenkowski, and P. Fields. 1998. Grain bulk density as affected by diatomaceous earth and application method. *Postharvest Biol. Technol.* 13: 81–89.
- Korunić, Z., A. Liška, P. Lucić, D. Hamel, and V. Rozman. 2020. Evaluation of diatomaceous earth formulations enhanced with natural products against stored product insects. *J. Stored Prod. Res.* 86.
- Lord, J. C. 2001. Desiccant dusts synergize the effect of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) on stored-grain beetles. *J. Econ. Entomol.* 94: 367–72.
- Lord, J. C. 2007. Desiccation increases the efficacy of *Beauveria bassiana* for stored-grain pest insect control. *J. Stored Prod. Res.* 43: 535–539.
- Lu, H.-L., and R. J. S. Leger. 2016. Insect immunity to entomopathogenic fungi, pp. 251–285. In *Adv. Genet.* Elsevier.
- McGrath, M. T. 2013. Ways of overcoming insecticide resistance: use of mixtures and rotations of insecticides. *A Biannu. Newsl. Cent. Integr. Plant Syst. Coop. with Insectic. Resist. Action Comm. West. Reg. Coord. Comm.* 22: 10.
- Meyling, N. V., and J. Eilenberg. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol. Control.* 43: 145–155.
- Ortiz-Urquiza, A., and N. O. Keyhani. 2013. Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects.* 4: 357–374.
- Ozdemir, I. O., C. Tuncer, I. Erper, and R. Kushiyeu. 2020. Efficacy of the entomopathogenic fungi; *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* F.(Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 30: 1–5.
- Pedrini, N., A. Ortiz-Urquiza, S. Zhang, and N. O. Keyhani. 2013. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Front. Microbiol.* 4: 24.
- Pourian, H. R., M. Khoobdel, and M. Alizadeh. 2019. Stored-grains pests and their control with emphasis on military food warehouses in Iran: A review. *J. Mil. Med.* 21: 313–324.
- Prasantha, B. D. R., C. Reichmuth, C. Adler, and D. Felgentreu. 2015. Lipid adsorption of diatomaceous earths and increased water permeability in the epicuticle layer of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) and the bean weevil *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Chrysomelidae). *J. Stored Prod. Res.* 64: 36–41.
- Püntener, W. 1981. Manual for field trials in plant protection. Ciba-Geigy.
- Robertson, J. L., and H. K. Preisler. 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC Press.
- Rumbos, C. I., and C. G. Athanassiou. 2017. Use of entomopathogenic fungi for the control of stored-product insects: can fungi protect durable commodities? *J. Pest Sci.* (2004). 90: 839–854.
- Searle, T., and J. Doberski. 1984. An investigation of the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as a potential biological control agent for *Oryzaephilus surinamensis* (L.). *J. Stored Prod. Res.* 20: 17–23.
- Shams, G., M. H. Safaralizadeh, and S. Imani. 2011. Insecticidal effect of diatomaceous earth against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. *African J. Microbiol. Res.* 5: 3574–3578.
- Software, L. 2018. Poloplus, a user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.
- Talebi jahromi, K. 2007. Pesticides toxicology. University of Tehran press.

- Uma Devi, K., J. Padmavathi, C. Uma Maheswara Rao, A. A. P. Khan, and M. C. Mohan. 2008.** A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Biocontrol Sci. Technol.* 18: 975–989.
- Vayias, B. J., and V. K. Stephou. 2009.** Factors affecting the insecticidal efficacy of an enhanced diatomaceous earth formulation against three stored-product insect species. *J. Stored Prod. Res.* 45: 226–231.