دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ٤٦٦٨-٢٠٠٨
http://jer.iau-arak.ac.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد ۱۱، شماره٤، سال ۱۳۹۸، (۳۱۳-۲۹۷)

# قدرت کشندگی و قابلیت اختلاط باکتری *Bacillus thuringiensis* با قارچ‌های *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* در کنترل آفات انباری خرما (*Ephestia kuehniella* و *Oryzaephilus surinamensis*)

**نگار بهمنی**[۱]، هادی استوان[۱*]، مسعود لطیفیان[۲]، شهرام حسامی[۱]

۱- گروه حشره‌شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، کرج، ایران

## چکیده

غالب‌ترین آفات انباری خرما در استان خوزستان شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* Zeller و شپشه دندانه‌دار *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus) می‌باشند. با در نظر گرفتن اهمیت استفاده از عوامل کنترل میکروبی در مدیریت تلفیقی آفات انباری نخل خرما، چگونگی برهم‌کنش این عوامل بیمارگر بر کنترل این آفات انباری بررسی شد. در این پژوهش ضمن مطالعه توانایی کشندگی و قابلیت اختلاط، اثرات متقابل باکتری *Bacillus thuringiensis* و قارچ‌های بیمارگر *Metarhizium anisopliae* و *Beauveria bassiana* بر جمعیت دو گونه آفت انباری بررسی شد. برای این‌منظور پس از آلوده ساختن لاروها با استفاده از جدایه‌های انتخابی مورد آزمایش و سپری شدن ۱۰ روز با استفاده از آمار مرگ و میر تجمعی، ترکیب غلظت‌های کشنده ۵۰ و ۹۹ درصد به‌تفکیک برای لارو شپشه دندانه‌دار و شب‌پره آرد محاسبه شد. در میان موارد آزمایش کمترین $LC_{50}$ مربوط به قارچ *M. anisopliae* روی لارو شپ‌پره آرد و معادل $۳/٤۹\times۱۰^{۳}$ اسپور در میلی‌لیتر بود. بیشترین مقدار $LC_{50}$ مربوط به باکتری *B. thuringiensis* روی لارو شپشه دندانه‌دار معادل $۲/٦۹\times۱۰^{٤}$ اسپور در میلی‌لیتر بود. بالاترین زمان ۵۰ درصد کشندگی به‌ترتیب برای لارو شپشه دندانه‌دار تحت تاثیر باکتری *B. thuringiensis* معادل ۷/۰۷ روز بود. پایین‌ترین زمان ۵۰ درصد کشندگی مربوط به لارو شپشه دندانه‌دار تحت تاثیر قارچ *B. bassiana* و ٤/٦۹ روز بود. اسپور قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در تمام غلظت‌ها در شرایط اختلاط با باکتری *B. thuringiensis* سازگاری نشان داده و قابل اختلاط بوده‌اند. از طرفی با افزایش غلظت باکتری *B. thuringiensis* به‌تدریج مقدار شاخص سازگاری کاسته شده است. باکتری *B. thuringiensis* در کلیه تیمارها دارای اثرات سینرژیستی بوده اما بالاترین سینرژیستی در شرایط اختلاط $LC_{50\ B.\ bassiana} + LC_{50Bt}$ روی مرحله رشدی تخم شب‌پره آرد بوده است. با توجه به پتانسیل بالای سازگاری *B. bassiana* و Bt، امکان بهره‌برداری از این هم افزایی برای تولید کنترل زیستی بسیار کارآمد است.

**واژه‌های کلیدی:** شب‌پره آرد، شپشه دندانه‌دار، *Bacillus thuringiensis*، قارچ بیمارگر، سازگاری

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *ostovan2001@yahoo.com*

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۸/۲- تاریخ پذیرش مقاله:۹۸/۱۰/۷

## مقدمه

در کشور ایران به‌طور متوسط سالیانه ۱۰ تا ۲۰ درصد محصولات کشاورزی در انبارها، به‌وسیله آفات از بین می‌روند. مسلم است که این خسارت در بعضی از نقاط کشور و در پاره‌ای از مواقع در محصولات به‌مراتب بیشتر از این مقدار است. از مهم‌ترین آفات انباری خرما شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* Zeller(lep, Pyralidae و شپشه دندانه‌دار (Col, Cucujeidae) *Oryzaephilus surinamensis* Linnaeus هستند که نه تنها به خرما بلکه به سایر محصولات کشاورزی نیز خسارت وارد می‌سازد (Bagheri Zenouz, 2007; Latifian, 2004). یکی از روش‌های مهم و عمومی مبارزه با این آفت استفاده از گازدهی با مواد شیمیایی است. از آن‌جایی که گازها خاصیت سرطان‌زایی داشته و موجب تخریب لایه ازن می‌گردند. لذا می‌بایست از روش‌های جایگزین نظیر عوامل کنترل میکروبی استفاده نمود. قارچ‌های بیمارگر *Metarhizium anisopliae* و *Beauveria bassiana* از عوامل کنترل میکروبی می‌باشند (James *et al*., 2003). گزارش‌ها نشان می‌دهد که این قارچ بر روی آفات انباری خرما با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته و کارایی آن‌ها بالا و قابل رقابت با عوامل کنترل شیمیایی است (Charnley, 1992). قارچ *B. bassiana* به نسبت $۳\times۱۰^{۵}$ اسپور در مترمکعب در شرایط انبارداری خرما به‌کار برده شده و تا ۴۶ درصد جمعیت Walker *Carda cautella* را کاهش داده است (Jassim *et al*., 1998). قدرت بیمارگری قارچ *B. bassiana* برای کنترل انواع آفات انباری از جمله L *O. surinamensis* بیشتر از سایر قارچ‌های حشره‌خوار از جمله *M. anisopliae* و Farlow *Nomura earileyi* می‌باشد (Padine *et al*., 1994).

سویه‌های مختلف باکتری Bt و قارچ‌های آنتوموپاتوژنیک دارای اثرات سینرژیستی مختلفی در کنترل آفات هستند (Wraight & Ramos, 2005; Navon, 2000). در مطالعات مختلفی اثرات تلفیقی بین گونه‌های *Bacillus* و قارچ‌های بیمارگر مطالعه شده است. ترکیب *B. bassiana* با باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *B. amyloliquefaciens* اثرات سینرژیستی نشان داده است. در حالی‌که تلفیق این باکتری‌ها با قارچ بیمارگر *Beuveria brongniartii* بی‌اثر بوده و تلفیق آن‌ها با قارچ بیمارگر *M. anisopliae* اثرات آنتاگونیستی نشان داده است (Park *et al*., 1988). اثرات آنتاگونیستی حاصل از تلقیح مشترک قارچ‌های بیمارگر با سایر عوامل مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داد سرعت رشد اسپور عوامل بیمارگر قارچی در لاروهای آلوده به‌صورت مجزا و در تلفیق با سایر عوامل بیمارگر متفاوت نیست (Boomsma *et al*., 2014; Pauli *et al*., 2018).

در این پژوهش فرضیه امکان اختلاط باکتری *B. thuringiensis* و قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* برای کنترل میکروبی مؤثرتر آفات انباری خرما بدون محدودیت رشدی برای عوامل میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. برای این‌منظور زیست‌سنجی قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *M. anisopliae* و باکتری *B. thuringiensis* به‌صورت جداگانه و تلفیقی روی جمعیت شپشه دندانه‌دار و شب‌پره آرد و اثرات باکتری Bt بر رشد میسیلیومی و جوانه‌زنی قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق از طریق مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی تهیه گردیدند. خصوصیات جدایه‌های مورد مطالعه در جدول۱ درج گردیده است.

**جدول ۱- خصوصیات جدایه‌های ایرانی مورد استفاده در پژوهش**

**Table 1- Characteristics of Iranian isolates used in the study**

| Fungus | Place collected | Isolate code | colony color | Spore shape |
|---|---|---|---|---|
| *B. bassiana* | Saravan | IRAN 441C | White | Spherical to nearly spherical |
| *M. anisopliae* | Saravan | DEMID01 | Gray | Spherical to nearly spherical |

پس از آلوده نمودن حشرات کامل به اسپورهای هر یک از جدایه‌ها نسبت به آلوده‌سازی متوالی و مکرر حشره میزبان به‌دفعات ۱۰ بار اقدام شد. آزمایش‌ها نشان داده است که آلوده‌سازی متوالی و مکرر حشره میزبان نه تنها از زهرآگینی قارچ جلوگیری نمی‌کند، بلکه به میزان زهرآگینی و خاصیت تهاجمی آن می‌افزاید (Daoust & Roberts, 1982, 1983).

پس از خالص‌سازی به‌روش تک اسپور، هر کدام از دو جدایه‌ی قارچی مورد نظر در محیط غذایی SDAY کشت گردیدند. بعد از اسپورزایی کامل (کشت ۱۲-۱٤ روزه) سطح محیط‌کشت به‌وسیله‌ی سوزن انتقال خراش داده شد. اسپورها در داخل ارلن‌های جداگانه‌ای که حاوی ۱۰ سی‌سی آب مقطر استریل با محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ بود، جمع‌آوری گردیدند (Thomas *et al*., 1987). سوسپانسیون فوق به‌منظور پراکنده شدن یکنواخت اسپورها در داخل آن به‌مدت ۵ دقیقه به‌طور پاندولی به‌هم زده شد. برای افزایش تولید اسپور از محیط‌کشت SDA+Y استفاده شد. این محیط‌کشت با دارا بودن شرایط اسیدی (PH=۵/٦) از رشد باکتری‌های ساپروفیت جلوگیری می‌نماید (Thomas *et al*., 1987). برای نگهداری جدایه‌ها به‌مدت طولانی از محیط‌کشت PCA استفاده گردید. محیط اخیر به‌علت ضعیف بودن از اسپورزایی شدید جلوگیری نموده و باعث می‌شود جدایه‌ها به‌مدت طولانی (در دمای C ۱۰°) قدرت حیاتی خود را حفظ نمایند (Kaya, 1993). برای مطالعه شکل کلنی و مطالعات قارچ‌شناسی از محیط PDA ساخت شرکت دیفکو استفاده شد (Majidi-Shilsar *et al*., 2003). برای انجام این آزمایش از جدایه کروستاکی باکتری که از طریق مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی تهیه گردید، استفاده شد.

### پرورش آفات انباری

### الف- شب‌پره آرد

جهت پرورش لارو میزبان بر روی خرما رقم سایر، مخلوط آب و مقداری مخمر نانوایی بر روی خرماهایی که هسته‌گیری شده‌اند، پاشیده شده سپس به‌تعداد مساوی در ظرف‌های پلاستیکی بدون در که روی سر آن‌ها با توری صدفی تمیز به‌وسیله کش کاملا بسته شده، قرار داده و به‌تعداد مساوی در همه آن‌ها لارو شب‌پره آرد رها شده است. لاروها از آرد آلوده به تخم‌های شب‌پره پس از تفریخ، به‌دست آمده‌اند. بعد از گذشت چند روز که لارو تبدیل به شفیره گشت، لاروهایی را که در درون خرماها به شفیره تبدیل شدند، همراه با خرما به ظرف بزرگ‌تری منتقل نموده، تا شب‌پره فضای مناسبی جهت پرواز و جفت‌گیری داشته باشد. پروانه‌ها پس از جفت‌گیری، تخم‌ریزی نموده، تخم‌ها تفریخ شده و لارو

خارج شده شروع به رشد کرده، به شفیره و سپس به پروانه بالغ تبدیل می‌شود. این سیکل چندین بار در چندین نسل تکرار گردید. هر چه تعداد نسل بالاتر می‌رفت، شب‌پره سازگاری بیشتری با خرما پیدا می‌کرد.

**ب- تکثیر شپشه دندانه‌دار**

مراحل مختلف رشدی شپشه دندانه‌دار با نمونه‌برداری از انبارهای خرماهای آلوده استان خوزستان جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌برداری‌ها عمدتا از انبارهای نگهداری خرما واقع در شهرستان‌های آبادان، شادگان و اهواز و از روی ارقام مهم منطقه از جمله سایر، زاهدی و دیری انجام شد. حشرات کامل (ماده و نر) به‌وسیله اسپیراتور جداسازی شدند. پرورش آفت در دمای ۵±۲۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد درون اتاقک رشد و درون ظروف پلاستیکی درب‌دار به ابعاد ۸/۵×۷/۵ سانتی‌متر که در قسمت درب آن‌ها سوراخی جهت تهویه در نظر گرفته شده بود بر روی خرمای رقم سایر انجام گرفت. روی سوراخ با پارچه توری که امکان عبور حشره از آن وجود نداشت پوشیده شده بود.

**زیست‌سنجی عوامل میکروبی**

**الف- زیست‌سنجی قارچ‌ها**

برای انجام آزمون بیمارگری از جمعیت لاروها (با اندازه متوسط حدود سن سوم) استفاده شد. برای آلوده‌سازی مراحل رشدی تعداد ۲۰ عدد از آن‌ها را به‌مدت ۲۰ ثانیه درون سوسپانسیون اسپور فرو برده و پس از خروج درون انکوباتور با درجه حرارت ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت‌نسبی ۵±۸۵ درصد و دوره روشنایی : تاریکی (۱۲:۱۲) برای دو روز نگهداری شدند. برای روزهای بعد در رطوبت‌نسبی ۴۰ درصد و دوره روشنایی : تاریکی (۱۲:۱۲) در قفس‌های مخصوص که کف آن‌ها برای تغذیه خرما قرار داده شده بود قرار گرفتند و به‌داخل اتاقک رشد مشابه روش قبل منتقل گردیدند. در بازدید روزانه مراحل رشدی مرده جمع‌آوری و پس از ضدعفونی سطحی بدن آن‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد درون اتاقک مرطوب که از نوع ظروف پلاستیکی بوده و کف آن با قرار دادن پنبه خیس به‌صورت اشباع درآمده بود، قرار داده شدند، تا بار قارچ در سطح بدن آن‌ها ظاهر گردد. این قارچ‌ها مجددا کشت داده شد و لاروها به‌وسیله آن آلوده گردیدند. پس از مرگ و ظهور مجدد اسپورها در سطح بدن مراحل مختلف رشدی مورد آزمایش، اصول کخ برای اثبات بیمارگری جدایه مورد آزمایش کامل گردید (Hokkanen & Pimentel, 1984).

برای محاسبه غلظت کشنده جدایه‌های مختلف از ۰/۰۵ درصد آب و توئین۸۰ به‌عنوان حامل استفاده شد. به‌این ترتیب که ابتدا اسپورهای جدایه‌های مورد آزمایش از سطح پتری خراشیده شده و درون محلول به‌حالت معلق در آمدند. سپس سوسپانسیون حاصله از پارچه ململ دو لایه عبور داده شد تا قطعات میسلیوم از آن جدا گردند. برای جدا شدن اسپورها از هم و عدم تشکیل زنجیر در هنگام شمارش آن‌ها درون لوله‌های حاوی سوسپانسیون قارچ مهره‌های شیشه‌ای ریخته و برای چند دقیقه به‌شدت تکان داده شد. جهت شمارش اسپورها و تهیه تراکم‌های مختلف اسپور در واحد حجم از لام نئوبار استفاده شد. برای اندازه‌گیری زنده‌مانی اسپورها روز قبل از آزمایش مقدار اندکی از اسپورهای مورد آزمایش به‌صورت استریل درون محلول ۰/۰۵ درصد توئین۸۰ به‌حالت تعلیق در آمده و روی محیط SDA+Y کشت شد. روز بعد فقط از کشت‌هایی استفاده می‌گردید که بیش از ۸۵ درصد اسپورهای آن جوانه زده بود. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی که نظیر سایر روش‌های زیست‌سنجی انجام گرفت و تعیین غلظت‌های حداقل و حداکثر، پنج غلظت لگاریتمی تهیه و

آزمون‌های حیاتی با آن‌ها انجام شد. برای هر تکرار ۲۰ عدد از هر مرحله رشدی استفاده شد. آزمایش‌ها در ٦ تیمار (غلظت‌های مختلف و شاهد) و ۳ تکرار انجام گرفت. برای آلوده ساختن حشرات مشابه روش قبل اقدام گردید. سپس حشرات هر تکرار در قفس‌های مخصوص که کف آن‌ها برای تغذیه خرما قرار داده شده بود قرار گرفتند و به‌داخل اتاقک رشد مشابه روش قبل منتقل گردیدند. مرگ و میر حشرات هر روز و به‌مدت ۱۰ روز ثبت و جدول مرگ و میر تجمعی آن‌ها تهیه شد (Gross *et al*., 1985).

**ب- زیست‌سنجی باکتری**

ابتدا غلظت‌های مختلف باکتری با فواصل لگاریتمی بین حداقل و حداکثر غلظت ۱۰٦ CFU/ml[1] و ۱۰۸ CFU/ml انتخاب و تهیه شدند. برای جدایه‌ی باکتری دو ظرف شیشه‌ای حاوی آگار غذایی(NA) به‌صورت خطی در تمام سطح ظرف با رعایت شرایط استریل کشت داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ روز نگهداری و بعد از این مدت اسپور در کلنی باکتری تشکیل شده و آن‌ها را داخل آب مقطر استریل به‌صورت سوسپانسیون یکنواختی درآورده و آن‌قدر باکتری به سوسپانسیون اضافه شد تا از لحاظ کدورت مانند لوله شماره یک استاندارد مک فارلند شدند. برای تعیین دقیق تعداد اسپور زنده در سوسپانسیون فوق از روش پلیت کانت استفاده شد. در زیست‌سنجی لاروها از روش جانسون و همکاران با کمی تغییر استفاده گردید. به‌این ترتیب که برای هر غلظت ۱۵ عدد تیوب فیلم عکاسی آماده شد. سپس اطراف تیوب‌ها را با سوزن کوچکی سوراخ نموده و در داخل هر تیوب یک تکه خرمای رقم سایر به‌وزن تقریبی ۸-۱۰ گرم قرار داده شد. به‌وسیله‌ی میکروپیپتبه‌مقدار دو میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری از غلظت‌های مذکور روی هر برش خرما داخل تیوب قرار داده شد. برای شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. بعد از ۲٤ ساعت به‌داخل هر تیوب یک عدد لارو متوسط اضافه گردید. برای جلوگیری از فرار لاروها در تیوب‌ها را بسته سپس به انکوباتور با دمای ۲±۲۷ و رطوبت‌نسبی ۵۰ تا ٦۰ درصد منتقل شد. تیوب‌ها به‌صورت روزانه بررسی و میزان مرگ و میر آن‌ها ثبت گردید. سپس درصد مرگ و میر لاروها با استفاده از فرمول آبوت اصلاح و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Navon & Ascher, 2000).

**بررسی سازگاری و قابلیت اختلاط باکتری با قارچ‌های بیمارگر**

**الف- تاثیر باکتری در رشد میسیلیومی**

برای بررسی اثر سازگاری ترکیبات باکتری روی رشد میسیلیومی قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* با روش اختلاط ترکیب با محیط‌کشت بررسی شد. برای این‌منظور با اندازه‌گیری رشد رویشی قارچ روی محیط‌کشت حاوی ترکیب ابتدا قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* در چند پتری حاوی محیط‌کشت SDA کشت داده شد و به‌این صورت چند منبع تهیه گردید. فلاسک‌های حاوی محیط‌کشت SDA پس از اتوکلاو، در دمای اتاق قرار داده شد تا دمای آن‌ها به ۴۲-۴۵ درجه سلسیوس کاهش یابند. محیط‌کشت SDA به‌همراه غلظت‌های ۷۵۰،۲۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر ترکیب باکتری در لیتر محیط‌کشت به‌هم زده شد تا امولسیون یکنواخت به وجود آید. محیط‌های حاصل درون ظروف پتری به‌قطر ۸ سانتی-متری تقسیم (مقدار تقریبی ۱۰-۱۵میلی‌لیتر) و اجازه داده شد تا محیط جامد گردد. سپس دیسک‌های قارچی به‌قطر ۵ میلی‌متر توسط چوب‌پنبه سوراخ‌کن از کشت‌های جوان قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* تهیه و یک دیسک قارچ در

[1]-CFU یک واحد تشکیل کلنی به انگلیسی(Colony-forming unit )، واحدی است که برای تخمین تعداد سلول‌های باکتریایی یا قارچی زنده در یک نمونه به‌کار می‌رود.

قسمت وسط ظروف پتری حاوی محیط‌کشت قرار داده شد. برای هر یک از غلظت‌ها ٤ تکرار هم بدون ترکیب (محیط-کشت شاهد)، در نظر گرفته شد. پتری‌های مایه‌زنی شده در انکوباتور در دمای ۲ ± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت‌نسبی ۵ ± ۵۵ درصد و دوره روشنایی : تاریکی (۸ : ١٦) قرار داده شد. اندازه‌گیری قطرهای رشد میسیلیومی هر یک از تیمارها هر سه روز یک‌بار و به‌مدت ۱۲ روز انجام شد.

**ب- تاثیر ترکیبات باکتری در جوانه‌زنی اسپور**

برای بررسی اثر سازگاری ترکیبات باکتری روی جوانه‌زنی اسپور قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* به‌روش اختلاط ترکیب با محیط‌کشت بررسی شد. برای تهیه محیط‌های کشت و غلظت‌های مربوطه مطابق روش قبل اقدام شد. جهت تهیه سوسپانسیون مشخصی از اسپورهای قارچ‌ها، ابتدا با استریل کردن مواد و وسایل به‌وسیله یک میله سطح محیط‌کشت را خراش داده، در ارلن ریخته و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۲ توئین ۸۰ به آن افزوده و هم‌زده و سوسپانسیون حاصله از پارچه ململ دو لایه عبور داده شد تا قطعات میسیلیوم از آن جدا شوند. برای شمارش اسپورها و تعیین غلظت سوسپانسیون از لام نئوبار استفاده شد. بعد از اضافه کردن سوسپانسیون قارچ‌ها به محیط‌کشت حاوی ترکیب باکتری و محیط کنترل، و گذشت ٢٤ ساعت درصد اسپورهای جوانه‌زده تعیین شد. با محاسبه میزان جوانه‌زنی اسپور قارچ‌ها در هر یک از تیمارها و مقایسه تیمارها با هم، اثرات تلفیقی باکتری در جوانه‌زنی قارچ‌ها مشخص شد. با به‌دست آوردن اثرات تلفیقی، سازگاری قارچ‌ها و باکتری مشخص شد.

**ج- محاسبه سازگاری**

درجه سازگاری بر اساس روش Alves و همکاران (Alves *et al.*,1998) به‌شرح 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 می‌باشند. پس از محاسبه مقدار آماری سازگاری بر اساس جدول ۲، سازگاری باکتری با قارچ‌ها برآورد شد.

جدول ۲ - درجه سازگاری براساس محاسبه شاخص T

Table 2 - Degree of compatibility based on T index calculation

| Compatibility quality | T value |
|---|---|
| Very toxic | 0.30 |
| Toxic | 31-45 |
| Slightly toxic | 46-60 |
| Compatible | 60> |

اثرات تشدیدکنندگی یا بازدارندگی تلفیق ترکیبات نیز با استفاده از شاخص SR ارزیابی شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار شامل پنج دُز مصرفی و تیمار شاهد بود. پس از تجزیه واریانس، میانگین‌ها با استفاده از روش چند دامنه‌ای دانکن مقایسه گردیدند.

## بررسی اثرات تلفیقی عوامل بیمارگر باکتری و قارچی

به‌منظور بررسی اثرات تلفیقی قارچ‌ها و باکتری مورد آزمایش روی مرگ و میر لاروهای سوسک شپشه دندانه‌دار و شب‌پره آرد خرما، با توجه به نتایج حاصل از زیست‌سنجی هر دو قارچ و باکتری روی مراحل لاروهای سن ۳ هر دو انجام گردید. غلظت‌های لازم برای انجام این آزمایش به‌صورت زیر تعریف شدند:

1- $LC_{50\ M.\ anisopliae}$
2- $LC_{50\ Bt}$
3- $LC_{50\ B.\ bassiana}$
4- $LC_{50\ M.\ anisopliae} + LC_{50\ Bt}$
5- $LC_{50\ B.\ bassiana} + LC_{50Bt}$
6- $LC_{50\ M.\ anisopliae} + LC_{50\ B.\ bassiana}$

برای این آزمایش‌ها $LC_{50}$ جدایه قارچ‌ها و باکتری را که روی لاروها طی چندین مرتبه آزمایش به‌دست آمده بود را در لوله آزمایش مخلوط نموده و برای شاهد از محلول Tween80٪0.05 بدون اضافه نمودن اسپور قارچ یا باکتری استفاده شد.

## تحلیل داده‌ها

مقدار مرگ و میر مورد انتظار و $X_2$ (مطابق مدل آزمون Z) طبق فرمول افزایشی زیر محاسبه شد.

$$E= O_{Bt} + O_{Metarhizium\ \text{or}\ Beauveria}\ (1-O_{Bt})$$
$$X_2= ((O-E)^2)/E$$

E= مرگ و میر مورد انتظار مربوط به مخلوط باکتری و قارچ، $O_{Bt}$ = مرگ و میر مربوط به باکتری، $O_{Metarhizium\ \text{or}\ Beauveria}$ = مرگ و میر مربوط به قارچ مورد نظر و O = مرگ و میر مشاهده شده مربوط به مخلوط باکتری و قارچ بود. برای تعیین اثرات سینرژیستی یا آنتاگونیستی شاخص SR مطابق رابطه زیر محاسبه شد.

$$SR=[LT_{50}(\text{عامل بیمارگر باکتریایی+عامل بیمارگر قارچی})/LT_{50}(\text{عامل بیمارگر قارچی})]$$

چنانچه SR>۱ باشد، آن‌گاه ترکیب دارای اثرات سینرژیستی و اگر SR< ۱ باشد، آن‌گاه ترکیب دارای اثر آنتاگونیستی بود.

## نتایج

### زیست‌سنجی عوامل بیمارگر روی آفات انباری

توانایی بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر و باکتری Bt روی مراحل رشدی لارو شپشه دندانه‌دار و شب‌پره آرد بررسی شد. پس از آلوده ساختن لاروها با استفاده از جدایه انتخابی مورد آزمایش و سپری شدن ۱۰ روز با استفاده از آمار مرگ و میر تجمعی، ترکیبی از پراکنش و مدل‌های رگرسیونی انتخاب گردید که کمترین AIC را داشتند. سپس دُز کشنده ۵۰ و ۹۹ درصد به‌تفکیک برای لارو شپشه دندانه‌دار و شب‌پره آرد محاسبه شد که در جدول ۲ منعکس شده است.

در مورد داده‌های حاصل از کاربرد جدایه‌های انتخابی بر روی شپشه دندانه‌دار و شب‌پره آرد پرورش یافته بر روی رقم خرمای سایر، کمترین AICها از ترکیب پراکنش لجستیک و لگاریتم – لگاریتم با مدل ترجیحی با پاسخ طبیعی حاصل گردید.

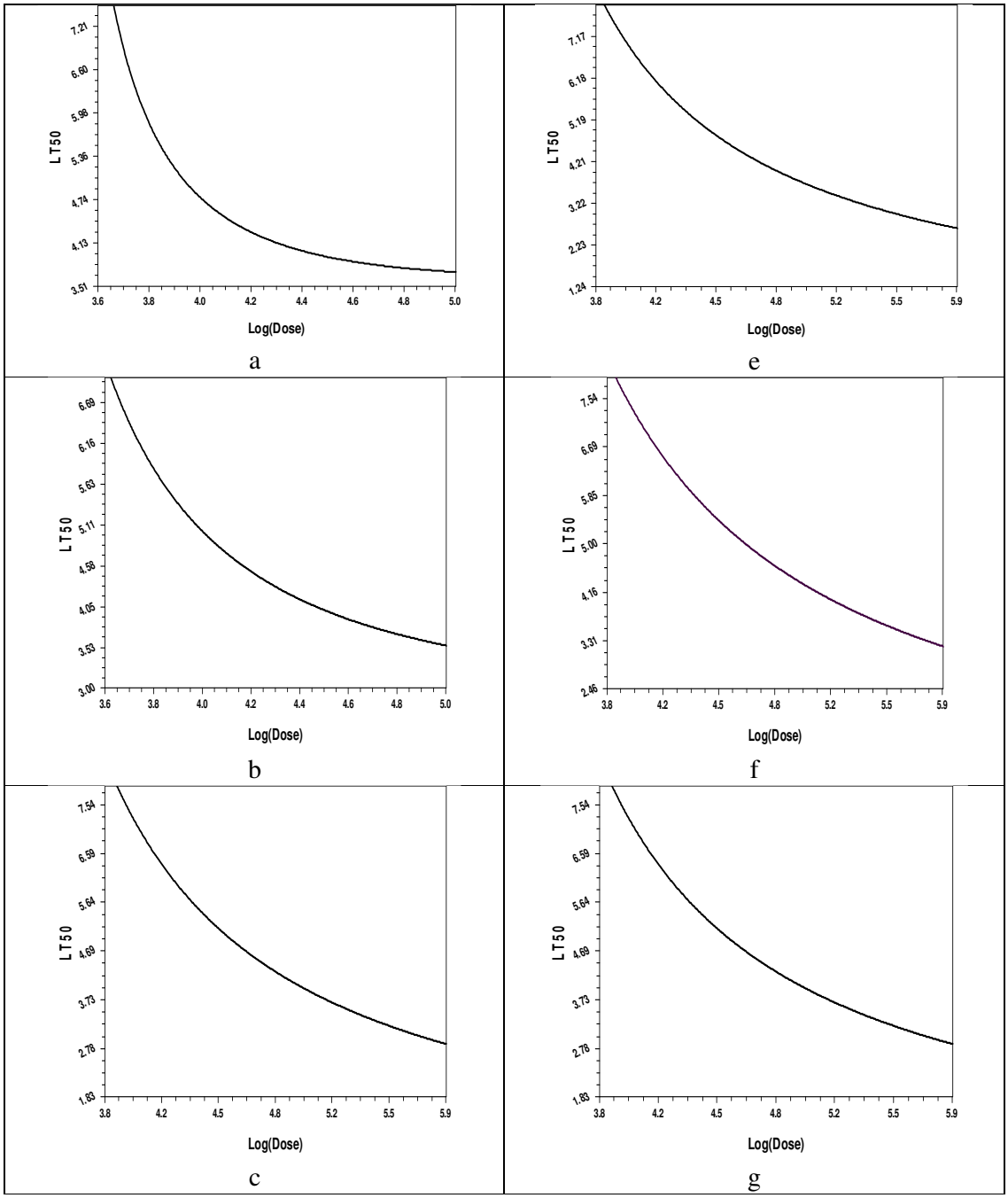
در میان موارد آزمایش کمترین $LC_{50}$ مربوط به جدایه ۰۱ روی لارو شب‌پره آرد و معادل $۳/٤۹\times۱۰^{۳}$ اسپور در میلی-لیتر قارچ *M. anisopliae* بود. بیشترین مقدار $LC_{50}$ روی لارو شپشه دندانه‌دار معادل $۲/٦۹\times۱۰^{٤}$ اسپور در میلی‌لیتر باکتری *B. thuringiensis* بود. بنابراین دُز کشنده بسته به نوع گونه‌ی عامل بیمارگر و آفت مورد آزمایش متفاوت بود. این دُز در شب‌پره آرد بیشتر از شپشه دندانه‌دار بود.

زمان‌های کشندگی *B. bassiana*، *M. anisopliae* و *B. thuringiensis* به‌تفکیک برای شپشه دندانه‌دار و شب‌پره آرد در غلظت‌هایی که تا پایان آزمایش نیمی از حشرات تلف شدند، محاسبه گردید .بالاترین زمان ۵۰ درصد کشندگی برای لارو شپشه دندانه‌دار تحت تاثیر باکتری *B. thuringiensis* معادل ۷/۰۷ روز بود. پایین‌ترین زمان ۵۰ درصد کشندگی مربوط به لارو شپشه دندانه‌دار تحت تأثیر قارچ *B. bassiana* و ٤/٦۹ روز بود (شکل ۱).

**جدول ۲- دُز کشنده جدایه‌های قارچ *B. bassiana*، *M. anisopliae* و *B.thuringiensis* روی لارو شپشه دندانه‌دار و شب‌پره آرد**

**Table 2. Lethal dose of *B. bassiana*, *M. anisopliae*, and *B. thuringiensis* isolates on saw-toothed beetle and Fourmoth larvae**

| Pathogen | Pest | AIC | Square k | $LC_{50}$ (Spores per ml) (95% level) | Distribution Function |
|---|---|---|---|---|---|
| *B. bassiana* | *O. surinamensis* | 0.53 | 0.54 | $2.51\times10^{4}$ ($1.18\times10^{4}$and $4.45\times10^{4}$) | Logestic |
| | *E. kuehniella* | 0.76 | 0.64 | $1.49\times10^{4}$ ($9.53\times10^{3}$and $2.48\times10^{4}$) | Logestic |
| *M. anisopliae* | *O. surinamensis* | 0.45 | 0.61 | $2.46\times10^{4}$ ($5.47\times10^{3}$and $5.36\times10^{4}$) | Logestic |
| | *E. kuehniella* | 0.93 | 0.69 | $3.49\times10^{3}$ ($4.06\times10^{2}$and $1.62\times10^{4}$) | Log-Log |
| *B. thuringiensis* | *O. surinamensis* | 0.39 | 0.57 | $2.69\times10^{4}$ ($7.72\times10^{3}$and $5.28\times10^{4}$) | Log-Log |
| | *E. kuehniella* | 0.39 | 0.71 | $6.29\times10^{3}$ ($2.28\times10^{2}$and $6.06\times10^{4}$) | Log-Log |




**شکل ۱- زمان ۵۰ درصد کشندگی (روز) در دُزهای متفاوت بر لارو الف: شپشه دندانه‌دار(*B.bassiana*)، ب: شپشه دندانه‌دار ( *M. anisopliae*)، ج:شپشه دندانه‌دار(*B. thuringiensis*) د: شب‌پره آرد (*B. bassiana*) ه: شب‌پره آرد (*M. anisopliae*)و: شب‌پره آرد (*B. thuringiensis*)**

**Fig. 1. 50% lethal time at different doses on larvae: a: Saw-toothed beetele (*B. bassiana*),b: Saw- toothed beetle (*M. anisopliae*), c:Saw-toothed beetle (*B. thuringiensis*) d: flour moth (*B. bassiana*), e: flour moth (*M. anisopliae*) and flour moth (*B. thuringiensis*)**

**قابلیت اختلاط باکتری و عامل کنترل میکروبی**

نتایج تجزیه واریانس صفات درصد جوانه‌زنی (ms=1.75, df=4, CV=4.17)، میزان رشد میسیلیومی ( ,ms=0.113 df=4, CV=5.43) و پارامتر تعیین کننده سازگاری (T) (ms=1.14, df=4, CV=1.51) قارچ‌ها با باکتری اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد نشان داد. به‌منظور مشخص شدن نحوه تأثیر آن‌ها، میانگین‌ها با استفاده از آزمون SNK با هم مقایسه شدند که نتایج آن‌ها در ادامه ارائه شده است.

**الف) درصد جوانه‌زنی**

نتایج مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی اسپور قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط اختلاط با باکتری *B. thuringiensis* در جدول ۳ درج گردیده است. براساس نتایج بین غلظت‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. به‌طوری که درصد جوانه‌زنی اسپور قارچ *M. anisopliae* در تمام غلظت‌ها در شرایط استفاده از باکتری کمتر بوده است. از طرفی با افزایش غلظت به‌تدریج از توانایی جوانه‌زنی اسپور قارچ *M. anisopliae* در شرایط استفاده از کلیه ترکیبات باکتری کاسته شده است.

جدول۳– مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* در شرایط اختلاط با باکتری *B. thuringiensis*

Table 3 - Comparison the mean of germination percentage of *M. anisopliae* and *B. bassiana* Fungi under mixing with *B. thuringiensis*

| Pathogenic fungi | Bacterial Concentration | germination percentage±SE |
|---|---|---|
| *B. bassiana* | 250 | 93.5 ±1.5 a |
| | 750 | 90.5 ±1.6 b |
| | 1000 | 85.25 ±0.5 c |
| *M. anisopliae* | 250 | 91.5 ±0.5 c |
| | 750 | 88.5 ±1.7 c |
| | 1000 | 83.25 ±0.5 e |

**ب ) رشد میسیلیومی**

نتایج مقایسه میانگین رشد میسیلیومی قارچ‌های *B.bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط اختلاط با غلظت‌های مختلف باکتری *B. thuringiensis* در جدول ٤ درج گردیده است. براساس این جدول، بین رشد میسیلیومی قارچ‌ها در غلظت‌های مختلف باکتری *B. thuringiensis* مورد بررسی تفاوت معنی‌دار وجود دارد. به‌طوری که میزان رشد میسیلیومی قارچ *B. bassiana* در غلظت‌های ۲۵۰ باکتری *B. thuringiensis* بالاتر از سایر تیمارها بوده است. رشد میسیلیومی قارچ در غلظت ۱۰۰۰ اسپور در میلی‌لیتر *B. thuringiensis* در پایین‌ترین سطح بوده است. از طرفی با افزایش غلظت به‌تدریج از رشد میسیلیومی دو قارچ *M. anisopliae* و *B. bassiana* در شرایط استفاده از باکتری *B. thuringiensis* کاسته شده است.

**جدول٤- مقایسه میانگین رشد میسیلیومی قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط اختلاط با باکتری *B. thuringiensis***

**Table 4 - Comparison the mean of mycelial growth of *M. anisopliae* and *B. bassiana* Fungi under mixing with *B. thuringiensis***

| Pathogenic fungi | Bacterial Concentration | mycelial growth ±SE |
|---|---|---|
| *B. bassiana* | 250 | 3.38 ±0.41a |
| | 750 | 3.11 ±0.17 b |
| | 1000 | 2.96 ±0.32 c |
| *M. anisopliae* | 250 | 3.32 ±0.15 b |
| | 750 | 3.14 ±0.41b |
| | 1000 | 2.78 ±0.27d |

## ج) شاخص سازگاری (T)

نتایج مقایسه میانگین شاخص سازگاری قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط اختلاط با باکتری *B. thuringiensis* در جدول ۵ درج گردیده است. نتایج نشان می‌دهد که بین باکتری *B. thuringiensis* و در غلظت‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌دار وجود دارد. به‌طوری‌که شاخص سازگاری اسپور قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* در تمام غلظت‌ها در شرایط اختلاط با باکتری *B. thuringiensis* دارای اختلاف بوده است. از طرفی با افزایش غلظت به‌تدریج مقدار شاخص T در شرایط استفاده از باکتری *B. thuringiensis* کاسته شده است. به‌طوری‌که بالاترین شاخص سازگاری در شرایط اختلاط با غلظت۲۵۰ و کمترین شاخص سازگاری در شرایط اختلاط با غلظت ۱۰۰۰ اسپور در میلی‌لیتر باکتری *B. thuringiensis* بوده است. از طرفی بر اساس شاخص T کیفیت ترکیب باکتری با قارچ‌ها از نظر قابلیت اختلاط به‌گونه‌ای است که کلیه غلظت‌های مورد آزمایش از نظر قابلیت اختلاط با سوسپانسیون دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* سازگاری دارند.

**جدول ۵- مقایسه میانگین شاخص (T) دو قارچ *B. bassiana* و *M. anisopliae* در شرایط اختلاط با باکتری *B. thuringiensis***

**Table 5 - Comparison the mean of Index (T) of *M. anisopliae* and *B. bassiana* Fungi under mixing with *B. thuringiensis***

| Pathogenic fungi | Bacterial Concentration | Index (T)±SE | Mixing quality |
|---|---|---|---|
| *B. bassiana* | 250 | 75.47 ±0.47a | Compatible |
| | 750 | 73.04 ±0.04 b | |
| | 1000 | 68.76 ±0.32 d | |
| *M. anisopliae* | 250 | 77.89 ±0.14 b | Compatible |
| | 750 | 76.14 ±0.31 b | |
| | 1000 | 73.01 ±0.23d | |

### اثرات متقابل قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* با باکتری *B. thuringiensis*

به‌منظور بررسی اثرات سینرژیستی یا آنتاگونیستی تلفیق باکتری *B. thuringiensis* روی قدرت بیمارگری قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* روی لارو شب‌پره‌ی آرد و شپشه‌ی دندانه‌دار ضمن محاسبه‌ی زمان کشندگی تیمارهای تلفیقی، شاخص SR محاسبه گردید که نتایج آن در جدول ٦ درج گردیده است.

**جدول ٦- زمان کشندگی و شاخص SR تیمارهای تلفیقی**

**Table 6. Lethal time and SR index of the combined treatments**

| Store pests | Treatments | $LT_{10}$ | $LT_{50}$ | $LT_{90}$ | SR |
|---|---|---|---|---|---|
| *O. surinamensis* | $LC_{50}$ *B. bassiana* + $LC_{50}$ Bt | 6.49 | 12.82 | 17.75 | 1.18 |
| | $LC_{50}$ *M. anisopliae* + $LC_{50}$ Bt | 5.77 | 13.88 | 20.21 | 1.05 |
| | $LC_{50}$ *M. anisopliae* + $LC_{50}$ *B. bassiana* | 5.26 | 13.33 | 19.62 | 1.05 |
| *E. kuehniella* | $LC_{50}$ *B. bassiana* + $LC_{50}$ Bt | 0.26 | 1.45 | 5.31 | 2.94 |
| | $LC_{50}$ *M. anisopliae* + $LC_{50}$ Bt | 0.31 | 1.49 | 5.58 | 2.86 |
| | $LC_{50}$ *M. anisopliae* + $LC_{50}$ *B. bassiana* | 0.16 | 1.17 | 6.24 | 3.64 |

براساس نتایج جدول ٦، باکتری *B. thuringiensis* در کلیه تیمارها دارای اثرات سینرژیستی بوده اما بالاترین سینرژیستی در شرایط اختلاط $LC_{50\ B.\ bassiana}$ + $LC_{50Bt}$ روی مرحله رشدی تخم شب‌پره آرد بوده‌اند.

## بحث

نتایج تحقیقات انجام شده به‌عنوان یک برنامه کاربردی از طریق اسپری تلفیقی قارچ *B. bassiana* + باکتری *B. thuringiensis* در مدیریت کنترل آفات انباری خرما قابل برنامه‌ریزی می‌باشد. مطالعات تغییرات جمعیت نشان داد که تیمار تلفیقی به‌دلیل عوامل مرگ و میر لاروی و جلوگیری از ظهور حشرات کامل به‌صورت کوتاه‌مدت و بلندمدت در مدیریت آفات انباری خرما کارایی دارد. علاوه بر این، تلفیق کاربردی سوسپانسیون قارچ *B. bassiana* + باکتری *B. thuringiensis* منجر به کنترل بهتر لاروشپشه دندانه‌دار و شب‌پره آرد نسبت به کاربرد آن‌ها به‌صورت جداگانه می‌شود. علاوه بر این، هیچ اثری از تعامل آنتاگونیست قارچ *B. bassiana* + باکتری *B. thuringiensis* وجود نداشت. از سوی دیگر، *B. bassiana* به‌تنهایی در کنترل جمعیت لاروی نسبت به مراحل رشدی دیگر بسیار مؤثر نبود (Wraight & Ramos,2002,2005). علاوه بر این، زمان قرار گرفتن در معرض یک عامل مهم است. نتایج تحقیقات سایر محققان نشان می‌دهد که کاربرد مکرر در شرایط تراکم‌های بالای لاروی مؤثرتر خواهند بود (Johnson *et al*., 1992; Johnson & Goettel, 1993; Inglis *et al*., 1996). در این مطالعه کاهش معادل ١١/٢ و ٥/٣٦ برابری به‌ترتیب برای مرحله رشدی لارو سوسک شپشه دندانه‌دار و شب‌پره آرد ملاحظه شد.

البته باید در نظر داشت که پتانسیل کنترل *B. bassiana* در دمای بالا محدود می‌شود (Carruthers *et al*., 1985; Ferron *et a.l*, 1991; Vestegarrd *et al*, 1995; Ekesi *et al*., 1999). لذا اثربخشی *B. bassiana* رامی‌توان با ایجاد فرمولاسیون‌های تلفیقی نظیر باکتری Bt در برنامه‌های کاربردی افزایش داد. بقای بیشتر *B. bassiana* در توده خرما نیز اجازه می‌دهد که آفات زمان بیشتری نسبت به باکتری از طریق تماسی در معرض اسپورهای قارچ قرار بگیرند.

اگر چه این مکانیزم ترکیبی عوامل میکروبی برای کنترل حشرات اغلب پیچیده هستند. اما همه‌گیری‌های بیماری به‌وسیله بیش از یک عامل میکروبی معمولاگسترده‌تر بوده، منجر به افزایش کارایی کنترل می‌شوند. مرگ و میر جمعیت میزبان، به‌ویژه هنگامی‌که دو عامل بیمارگر از نظر فضایی جدا باشند، به‌عنوان مثال یکی تماسی و دیگری گوارشی باشد،

افزایش نشان می‌دهد (Jacques & Morris, 1981). یافته‌های حاصل از این پژوهش نیزحاکی از اثرات سینرژیستی تعامل افزودنی بین *B. bassiana* و Bt است. نتایج تحقیقات انجام شده توسط سایر محققان نیز این موضوع را تایید می‌کند (Sandner & Cichy, 1967; Costa *et al*, 2001; Ma *et al*, 2008).

گزارشات متعددی از اثر متقابل همبستگی بین Bt و *B. bassiana* وجود دارد. به‌عنوان مثال، لوئیس و همکاران (۱۹۹٦) گزارش داد که استفاده از Bt ذرت (*Zea mays*) موجب افزایش حساسیت سوسک ذرت اروپایی به *B. bassiana* می‌شود. همچنین اثر متقابل همبستگی بین *B. bassiana* strain GHA و *B. tenebrionis* بر روی جمعیت لاروی سوسک کلرادو سیب‌زمینی گزارش شده است (Wraight & Ramos, 2005). مکانیسم‌های متعددی در خصوص نحوه اثرات سینرژیستی *B. bassiana* و Bt ارائه شده است. عده‌ای اثرات سینرژیستی را نتیجه طولانی شدن فاصله زمانی بین پوست-اندازی در اثر سموم اندوتوکسین ناشی از فعالیت Bt گزارش کرده‌اند، در نتیجه *B. bassiana* زمان بیشتری برای نفوذ به کوتیکول بدن قبل از این‌که از بین برود، دارد (Wraight & Ramos, 2005). از طرفی لاروهای تغذیه شده با غذای آلوده به اسپور *B. bassiana* عفونت باکتریایی را سریع‌تر از طریق روده به‌دست آوردند (Ma *et al*., 2008). از سوی دیگر گزارش شده است که گرسنگی حساسیت به اسپور *B. bassiana* را افزایش می‌دهد و باکتری Bt با مختل کردن سیستم گوارشی به این روش باعث گسترش همه‌گیری در جمعیت میزبان آلوده به قارچ می‌گردد (Miranpuri & Khachatourians, 1991).

عفونت ناشی از فعالیت بیمارگری *B. bassiana*، با طولانی شدن دوره بین پوست‌اندازی لارو و کاهش دفع کوتیکول روده‌ای که در اثر فعالیت باکتری در روده است، افزایش می‌یابد. این مکانیسم نیز می‌تواند افزایش اثر *B.bassiana* + Bt را توضیح دهد. اندوتوکسین حاصل از فعالیت باکتری لاروهای زودرس زمینه‌ی فعالیت بیشتر قارچ‌های بیمارگر را چند روز بعد از ورود باکتری به دستگاه گوارش فراهم کرده و زمینه سینرژیستی بروز کامل بیماری و مرگ آفت را قبل از ورود به مرحله شفیرگی فراهم می‌کند (Furlong & Groden, 2001).

نتایج تحقیقات حاضر برای دست‌یابی به یک آفت‌کش مبتنی بر عملکرد سینرژیستی *B. thuringiensis* و *B. bassiana* بود. هرچند محققین دیگری نیز به نتایج مشابهی پیش از این دست یافته بودند. اما در هر سیستمی متغیرهای مختلفی وجود دارد که می‌تواند اثرات متفاوتی بر کارآیی نهایی داشته باشد. نظیر چنین تفاوت‌هایی در مطالعات سایر پژوهشگران مشاهده شده است (Sandner & Cichy ,1967; Lewis & Bing ,1996; Costa *et al*. ,2001).

اثرات متقابل بین قارچ *M. anisopliae* و باکتری *Serratia entomophila* در لارو سخت‌بال‌پوشان مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعات مختلف سطح بالای هم‌افزایی در بیمارگری این قارچ با باکتری Bt گزارش شده است (Cloutier & Jean, 1998; Costa *et al*., 2000; Hough-Goldstein *et al*., 1991; Zehnder & Gelernter, 1989).

با توجه به پتانسیل بالای سازگاری *B. bassiana* و Bt، امکان بهره‌برداری از این همزیستی برای تولید آفت‌کش‌های بیولوژیک بسیار کارآمد و مقرون به‌صرفه است. آفت‌کش‌های میکروبی دارای هزینه زیادی هستند و هر استراتژی‌ای که امکان کاهش میزان غلظت را فراهم کند، کاربرد آن‌ها را در مدیریت تلفیقی آفات جذاب‌تر می‌کند. *B. bassiana* بیشتر تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد و دوره‌ی اثر آن طولانی‌تر است. در حالی‌که Bt دوره‌ی اثرسریع‌تری داشته و دوام کوتاه‌مدت دارد. لذا تلفیق این‌دو، کنترل مناسب را در بسیاری از موارد برای لارو آفات فراهم می‌کند.

## References

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

**Bagheri-Zenouz, E. 2007.** Pests of Stored Products & Management to Maintain Bioecology of Insects, Acari and Microorganism. University of Tehran Publication, Iran.

**Bartett, M. C. and Jaronski. S. T. 1988.** Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects, pp.61-85. Burge, M.N. (Ed). Fungi in Brologied Control systems. Manchester, U.K.

**Boomsma J. J., Jensen A. B. Meyling N. V., Eilenberg. J. and Evolutionary. J. 2014 .**Interaction Networks of Insect Pathogenic Fungi. Annual Review of Entomolomology. 59:467–485.

**Carruthers, R. I., Feng, Z. Robson, D. S. & Roberts. D. W. 1985.** In vivo temperature-dependent development of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) mycosis of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Invertebrate Pathology. 46:305–311.

**Charnley, A. K. 1992.** Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In C. J. Lomer & C. Prior:(Eds) Biological control of locusts and grasshoppers, proceeding of a workshop held at International Institute of Tropical AgricultureCotonou, Republic ofBenin. CAB International UK.

**Cloutier, C. and Jean, C. 1998.** Synergism between natural enemies and biopesticides: a test case using the stinkbug *Perillus bioculatus* (Hemiptera: Pentatomidae) and *Bacillus thuringiensis* tenebrionis against Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal Economic Entomology. 91, 1096–1108.

**Costa, S. D. Barbercheck,M. E. and Kennedy, G. 2001.** Mortality of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) after sublethal stress with the CryIIIA deltaendotoxin of *Bacillus thuringiensis* and subsequent exposure to *Beauveria bassiana*.Journal of Invertebrate Pathology. 77:173–179.

**Daoust, R. A. and Roberts, D. W. 1983.** Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology.Journal of Invertebrate Pathology.41: 161-170.

**Ekesi, S., N. Maniania, K. and Ampong-Nyarko, F. 1999.** Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*.Biocontrol Science Technology. 9:177–185.

**Ferron, P. Fargues, J. and Riba, G. 1991.** Fungi as microbial insecticides against pests.Vol. 2. Pages 662–706 in Handbook of Applied Mycology.D. K. Arora, L. Ajello, and K. G. Mukerji, ed. Marcel Dekker Inc., New York, NY.

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

**Gross, H. R. Jr. Pair, S. D. and Jackson, R. D. 1985.** Behavioral responses of primary entomophagous predators to larval homogenates of *Heliotbis zea* and *podoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in whorl-stage corn. Environmental Entomology, 14:360-364.

**Hokkanen, H. and Pimentel, D. 1984.** new approach for selecting biological control agents.The Canadian Entomologists. 116:1109-1121.

**Hough-Goldstein, J. Tisler, A. M. Zehnder, G. W. and Uyeda, K. A. 1991.** Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) consumption of foliage treated with *Bacillus thuringiensis* var. san diego and various feeding stimulants. Journal Economic Entomology. 84, 87–93.

**Inglis, G. D. Johnson, D. L. and Goettel, M. S. 1996.** Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. Biological. Control 7:131–139.

**Jacques, R. P. and Morris, O. N. 1981.** Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops. Pages 695–715 in Microbial Control of Insect and Mites.H. D. Burges and N. W. Hussey, ed. Academic Press, New York, NY.

**James, E. T. and Lord, J. C. 2003.** Tritrophic interactions and storage pest control: interaction of the fungus *Beauveria bassiana*with resistant oat varieties for control of *Oryzaephilus surinamensis*. Insect Pathology and Microbial Control,4: 153-170

**Jassim, H. K. Abdullah, L. M. and Abd-Al-Ahad, I 1998.** Determination of the exact concentration of *Beauveria bassianato* control the larvae of the Fig moth *Ephestia cautella* on stored dates in Iraq. Arab Journal of Plant Protection, 6: 44-45.

**Johnson, D. L. and. Goettel, M. S. 1993.** Reduction of grasshopper populations following field application of the fungus *Beauveria bassiana*.Biocontrol Science Technology. 3:165–175.

**Johnson, D. L. Goettel, M. S. Bradley, C. van der Paauw, H. and Maiga, B. 1992.** Field trials with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against grasshoppers in Mali, West Africa, July, 1990.Pages 296–310 in Biological Control of Locusts and Grasshoppers.C. J. Lomer & C. Prior, ed. CAB International, Wallingford, UK.

**Kaya, G. P. 1993.** Humeral Antibacterial Immunity in Insect Immunity. Kluwer Academic Press, London. Pp 93-115.

**Latifian, M. 2004.** Date palm Stored Pests, Control Technology. AhangGhalamPublicher. Mashhad, Iran.

**Lewis, L. C. Berry, E. C. Obrycki,J. J. and Bing, L. A. 1996.** Aptness of insecticides (*Bacillus thuringiensis* and carbofuran) with endophytic *Beauveria bassiana* in suppressing larval populations of European corn borer.Agriculture Ecosystems Environment. 57:27–34.

**Liu, M, X.M., X.-X. Ning,X. Zhang,B. Han,F. Guan,X.M. Tan, Y. F. and Zhang, Q.W. 2008.** Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae). Journal of Invertebrate Pathology. 99:123–128.

**Majidi-Shilsar, Kamali, F. Alinia, .K. F. and Ershad, J. 2003.** Effect of temperature on germination, mycelial radial growth and virulence of *Beauveria bassiana* on *Chilo supressalis* Walker (Lep: Pyralidae). Applied Entomology and Phytopatho;ogy. 71(1): 123-138.

**Miranpuri, G. S. and Khachatourians, G. G. 1991.** Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. Entomological. Experimental Applied. 59:19–27.

**Navon, A. and Ascher, K. R. S. 2000.** Bioassay of entomophathogenic microbes and nematodes.CABI publishing. 324pp.

**Padin, S. B., Dal bello, G. M. and Vasicek, L. 1994.** Bioinsecticide Potential of Entomopathogenic Fungi in Stored Grain Pests. Rev. Fac. Agron. Univ. Nac. La Plata. 15: 1-7.

**Park, C. Paulitz, T. C. and Baker, R. 1988.** Biocontrol of Fusarium wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum.* Phytopathology 78:190-194.

**Pauli, G. Moura Mascarin, G. Eilenberg, J. and Delalibera Júnior, I. 2018.** in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Insects, 9(2), 64.

**Sandner, H., & Cichy, D. 1967.** Research on the effectiveness of fungal and bacterial insecticides.Ekol. Pol. Ser. A 15:325–333.

**Thomas, K. C. Khachatourians, G. G. and Langledew,W. M. 1987.** Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Canadian Journal of Microbiology. 33: 12-20.

**Vestergaard, S. Gillespie, A. T. Butt,Schreiter,T. M. and Eilenberg, J. 1995.** Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*.Biocontrol Science Technology.5:185– 192.

**Wraight, S. P. and Ramos, M. E. 2002.** Application parameters affecting field efficacy of *Beauveria bassiana* foliar treatments against Colorado potato beetle *Leptinotarsadecemlineata.* Biological Control 23:164–178.

**Wraight, S. P. and Ramos, M. E. 2005.** Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis*tenebrionis-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 90, 139–150.

**Zehnder, G.W. and Gelernter, W.D. 1989.** Activity of the M-ONE formulation of a new strain of *Bacillus thuringiensis* against the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): relationship between susceptibility and insect life stage. Journal Economic Entomology. 82, 756–761.

*Journal of Entomological Research*
Volume 11, Issue 4, pages: 297-313

*Islamic Azad University, Arak Branch*
*ISSN 2008-4668*
*http://jer.iau-arak.ac.ir*

# Lethal Strength and Compatability of *Bacillus thuringiensis* with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in Stored Date Pest (*Oryzaephilus surinamensis* and *Ephestia kuehniella*) Control

***N. bahmani[1], H. Ostovan[1*], M. latifian[2], SH. Hesami[1]***

1- Department of Entomology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
*2-* Agricultural Research, Education and Extension Organization. Horticulture Science Research Institute. Karaj, Iran.

## Abstract

The most common stored pests of date palm in Khuzestan province are *Ephestia kuehniella* Zeller and *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus). Considering the importance of using microbial control agents in the integrated management of date palm pests, the interaction of these pathogens on control of these pests was investigated. In this study, we investigated the lethal concentration, compatibility and interaction effects of *Bacillus thuringiensis* and pathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on populations of two species of pest. For this purpose, after larvae infestation using selective isolates tested and 10 days elapsed using combined cumulative mortality data of 50 and 99% for saw-toothed beetle larvae and the flour moth was calculated. Among the tested cases, the lowest $LC_{50}$ was for *M. anisopliae* on moth larvae with $3.49\times10^3$ spores/ml. The highest amount of $LC_{50}$ belonged to *B. thuringiensis* on saw-toothed beetle larvae equivalent to $2.69\times 10^4$ spores/ml. The highest mortality time of 50% for *B. thuringiensis* was 7.07 days. The lowest time of 50% lethality was 4.69 days for saw-toothed beetle larvae affected by *B. bassiana*. Spores of *B. bassiana* and *M. anisopliae* at all concentrations showed good computability with *B. thuringiensis* On the other hand, with increasing concentration of *B. thuringiensis*, the amount of compatibility index decreased. *B. thuringiensis* had synergistic effects in all treatments but the highest synergistic effect was observed in $LC_{50}$ *B. bassiana* + $LC_{50}$ Bt mixing on moth egg. Given the high compatible potential of *B. bassiana* and Bt, the possibility of exploiting this synergy is highly efficient to produce biocontrol.

**Keywords:** Flour moth, Saw toothed beetle, Bt, Entomopathogenic fungus, compatibility

* Corresponding Author, E-mail*: ostovan2001@yahoo.com*
Received:24 Oct 2019 – Accepted: 28 Dec. 2019