Journal of Applied Research in Plant Protection

University of Tabriz Press
https://arpp.tabrizu.ac.ir/

Research Article

# Effect of the integrated use of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and some plant essential oils against the red flour beetle, *Tribolium castaneum*

**Fariba Sohrabi[✉1], Fatemeh Jamali[1], Moosa Saber[2]**

[1] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
[2] Department of Plant *Protection, Faculty of* Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

**Corresponding author**
✉fsohrabi@pgu.ac.ir

**Keywords**

Stored-product pest, pennyroyal, rosemary, peppermint, biological control

**Received:** 11 February 2024
**Revised:** 22 April 2024
**Accepted:** 28 Aprily 2024

**Available online:** 19 February 2025

## Abstact

This research was conducted to evaluate the compatibility of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* with some plant essential oils (EOs) against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* under laboratory conditions. Three isolates of *B. bassiana*, including IRAN1395C, OZ1 and OZ2, were assayed against the adult insects by the method of wheat diet incorporation. Mortality caused by fungi at a concentration of $10^8$ conidia $ml^{-1}$ ranged from 68.3 to 73.3%. Also, fumigant toxicity of EOs from pennyroyal (*Mentha pulegium*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and peppermint (*Mentha piperita*) was evaluated on adult insects. All EOs were effective against *T. castaneum*, and among them, pennyroyal EO with the lowest $LC_{50}$ value (7.33 µl/l air) was the most toxic compound. Effects of the sublethal concentration ($LC_{10}$) of plant EOs on mycelial growth and sporulation of the fungi were evaluated and found that all EOs were compatible with *B. bassiana* isolates, except peppermint and rosemary EOs, which were toxic to OZ1 isolate. Investigating the effects of the integrated application of plant EOs and fungi showed that sublethal $LC_{10}$ concentrations of pennyroyal, rosemary, and peppermint EOs, increased the sensitivity of *T. castaneum* adults to *B. bassiana* infection (additive effect), except for the combination of peppermint and rosemary EOs with OZ1 isolate, where antagonistic interaction was observed. Our results suggest that isolates of *B. bassiana* have the potential to combine with the tested plant EOs for the integrated control of *T. castaneum* in stored products.

**Cite this article:**
Sohrabi F, Jamali F, Saber M, 2024. Effect of the integrated use of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and some plant essential oils against the red flour beetle, *Tribolium castaneum. J Appl Res Plant Prot* 13 (4): 399–412.
https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2024.18597

Copyright© 2023 University of Tabriz, Published by the University of Tabriz.
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۳ (۴): ۴۱۲-۳۹۹ (۱۴۰۳)
**مقاله پژوهشی**

# تاثیر تلفیقی قارچ بیماری‌زای حشرات، *Beauveria bassiana* و چند اسانس گیاهی علیه شپشه آرد، *Tribolium castaneum*

**فریبا سهرابی[1]✉، فاطمه جمالی[1]، موسی صابر[2]**

[1] گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
[2] گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

**نویسنده مسئول:** ✉fsohrabi@pgu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۲ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۲/۰۳ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۹

## چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی میزان سازگاری قارچ *Beauveria bassiana* و چند اسانس گیاهی در کاربرد تلفیقی علیه شپشه آرد *Tribolium castaneum* در شرایط آزمایشگاهی اجرا شد. سه جدایه قارچ *B. bassiana* شامل IRAN1395C، OZ1 و OZ2 با روش تیمار گندم با قارچ علیه حشرات کامل آفت مورد آزمایش قرار گرفتند. مرگ و میر ایجاد شده تحت تاثیر قارچها در غلظت $10^8$ کنیدی بر میلی‌لیتر از ۶۸/۳ تا ۷۳/۳ درصد متغیر بود. همچنین سمیت تدخینی اسانس گیاه پونه (*Mentha pulegium*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) روی حشرات کامل ارزیابی شد. نتایج نشان داد همه اسانس‌ها علیه شپشه آرد موثر بودند و در بین آن‌ها، اسانس پونه با کمترین مقدار $LC_{50}$ (۷/۳۳ میکرولیتر بر لیتر هوا) سمی‌ترین ترکیب برای حشرات کامل بود. اثر غلظت زیرکشنده ($LC_{10}$) اسانس‌های گیاهی روی رشد میسلیومی و اسپورزایی قارچها بررسی و مشخص شد که همه اسانس‌ها با جدایه‌های قارچ *B. bassiana* سازگار بودند به جز اسانس نعناع و رزماری که برای جدایه OZ1 سمی بودند و ناسازگاری نشان دادند. بررسی اثر کاربرد تلفیقی اسانس‌های گیاهی و قارچها نشان داد که غلظت‌های زیرکشنده $LC_{10}$ اسانس پونه، رزماری و نعناع فلفلی، حساسیت حشرات کامل *T. castaneum* را به آلودگی قارچ *B. bassiana* افزایش داد (اثر هم‌افزایی)، بجز در ترکیب اسانس نعناع فلفلی و رزماری با جدایه OZ1 که برهمکنش آنتاگونیستی مشاهده شد. نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند که جدایه‌های قارچ *B. bassiana* پتانسیل تلفیق با اسانس‌های گیاهی مورد آزمایش برای کنترل تلفیقی *T. castaneum* در محصولات انباری را دارند.

**کلمات کلیدی:** آفت انباری، پونه، رزماری، نعناع فلفلی، کنترل بیولوژیکی

## مقدمه

سالانه بخش قابل توجهی از محصولات کشاورزی انباری به دلیل خسارات کمی و کیفی ناشی از حشرات آفت از بین می‌روند. آفات علاوه بر تلفات سنگین در تولید محصول، سلامت مصرف-کنندگان از جمله انسان، دام و طیور را به خطر می‌اندازند (Lak *et al*. 2022).

شپشه قرمز آرد، *T. castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)، پراکنش جهانی دارد و از نظر اقتصادی از مهم-ترین گونه‌های آفت در محصولات انباری است. *Tribolium castaneum* دارای طیف گسترده‌ای از ترجیحات غذایی است و به‌وفور در کارخانه‌های آرد، مغازه‌های مواد غذایی و غلات ذخیره شده یافت می‌شود (Lu *et al*. 2010; Jamali *et al*. 2021). هم لاروها و هم حشرات کامل این سوسک با تغذیه از محصولات و غذاهای فرآوری شده باعث خسارت جدی می‌شوند (Erdogus 2021). علاوه بر خسارت تغذیه‌ای، محصولات آلوده به دلیل ایجاد بوی نامطبوع در اثر ترشح ترکیبات بنزوکینون از غدد شکمی و آلودگی به پوسته‌های تغییر جلد لاروی و اجساد، کیفیت پایین‌تری دارند (Li *et al*. 2013). کنترل شپشه آرد مانند سایر آفات محصولات انباری در حال حاضر به شدت به استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی، به ویژه سموم تدخینی وابسته است که این امر می‌تواند منجر به باقی‌مانده‌های سمی و آلودگی محصولات غذایی شود. همچنین با توجه به هزینه‌های بالای این آفت‌کش‌ها و تکامل اجتناب‌ناپذیر مقاومت در آفات هدف، نیاز فوری به تاکتیک‌های مدیریتی جایگزین و سازگار با محیط زیست مانند کنترل بیولوژیکی می‌باشد (Talukder 2009; Pimentel *et al*. 2010).

قارچ‌های بیماری‌زای حشرات ابزاری امیدوارکننده برای کنترل بیولوژیکی آفات در سطح جهانی در نظر گرفته می‌شوند. اسپورهای قارچ با تجزیه کوتیکول حشره وارد بدن شده و باعث مرگ حشره می‌شوند (Kavallieratos *et al*. 2006). قارچ

بیماری‌زای حشرات، *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin، به طور گسترده در طبیعت پراکنده است (St. Leger *et al*. 1992) و پتانسیل کنترل انواع حشرات آفت، شامل گونه‌های آفت انباری را دارد (Faraji *et al*. 2013; Golshan *et al*. 2014; Shafighi *et al*. 2014; Sohrabi *et al*. 2021). علاوه بر این، به نظر می‌رسد که این قارچ برای اکثر موجودات غیر هدف بی‌ضرر است (Goettel *et al*. 1990).

از طرف دیگر، اسانس‌های گیاهی نیز با توجه به جنبه‌های سازگاری با محیط زیست، سمیت کم برای پستانداران و فرار بودن بالا، به عنوان جایگزین امیدوارکننده‌ای برای آفت‌کش‌های شیمیایی در نظر گرفته شده‌اند (Islam *et al*. 2009; Ebadollahi *et al*. 2020; Oviedo-Sarmiento *et al*. 2021). در پژوهشی، Lee *et al*. (2002) سمیت اسانس‌های مختلف و ترکیبات فرار آن‌ها را علیه *T. castaneum* مورد ارزیابی قرار دادند. بیشترین سمیت تنفسی در اسانس رزماری ($LD_{50}$ = 7.8 میکرولیتر در لیتر هوا) و سپس اسانس‌های لیمو ($LD_{50}$ = 16.2 میکرولیتر در لیتر هوا)، ریحان ($LD_{50}$ = 17.8 میکرولیتر در لیتر هوا) و نعناع فلفلی ($LD_{50}$ = 25.8 میکرولیتر در لیتر هوا) گزارش شد. همچنین در مطالعه‌ای دیگر، فعالیت حشره‌کشی اسانس دو گونه مختلف از جنس مرزه *Satureja* شامل *S. bachtiarica* Bung و *S. khuzestanica* Jamzad علیه حشرات کامل *T. castaneum* گزارش شده است (Taban *et al*. 2017).

کاربرد تلفیقی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات و اسانس‌های گیاهی یک روش جالب درکنترل حشرات است زیرا قارچ و اسانس ممکن است در ترکیب با هم به صورت سینرژیستی عمل کنند که کارایی کنترل حشرات را افزایش می‌دهد (Borgio *et al*. 2008; Mohamed 2009; Radha *et al*. 2014; Lak *et al*. 2022). با این حال، ناسازگاری‌هایی بین قارچ‌های بیماری‌زای حشرات و اسانس‌های گیاهی یافت شده است که کاربرد همزمان این ابزارهای کنترلی را محدود می‌سازد (Immediato *et al*. 2016; Nardoni *et al*. 2018; Jamali *et al*. 2021). بنابراین، برهمکنش‌های قارچ‌های بیماری‌زا و اسانس‌های گیاهی نیاز به بررسی قبل از کاربرد تلفیقی آن‌ها در برابر حشرات آفت دارد. بنابراین در تحقیق حاضر به منظور تعیین پتانسیل کاربرد تلفیقی قارچ بیماری‌زای حشرات *B. bassiana* و اسانس‌های گیاهی در مدیریت *T. castaneum* در محصولات انباری، بیماریزایی جدایه‌های IRAN1395C، OZ1 و OZ2 قارچ *B. bassiana* علیه حشرات کامل شپشه آرد و سازگاری آن‌ها با اسانس گیاه پونه (*Mentha pulegium* L.)، رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) و نعناع فلفلی (*M. piperita* L.) مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

*پرورش شپشه آرد*

حشرات کامل شپشه آرد از گروه گیاهپزشکی دانشگاه خلیج فارس تهیه و روی مخلوط آرد گندم و مخمر (۱۰:۱) درون ظروف پلاستیکی تهویه‌دار در دمای ۱ ± ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد در تاریکی در انکوباتور پرورش یافتند.

*اسانس‌های گیاهی و جدایه های قارچی مورد آزمایش*

اسانس‌های پونه، رزماری و نعناع فلفلی با خلوص ۱۰۰٪ از شرکت داروسازی گیاه اسانس (گلستان، ایران) تهیه شدند. جدایه IRAN1395C قارچ *B. bassiana* از مرکز تحقیقات گیاهپزشکی کشور و جدایه‌های OZ1 و OZ2 از آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. جدایه IRAN1395C از لارو *Zeuzera pyrina* Linnaeus روی درختان گردو در کرمان و دو جدایه OZ1 و OZ2 به ترتیب از خاک منطقه نظرآباد در کرج جداسازی شده‌اند.

*کشت جدایه‌های قارچی و تهیه سوسپانسیون اسپوری از جدایه‌های قارچ Beauveria bassiana*

قارچ‌ها در محیط کشت جامد سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) به مدت ۱۴ روز در دمای ۱ ± ۲۶ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵ درصد در تاریکی در انکوباتور برای تولید انبوه کنیدی‌ها کشت داده شدند. سپس برای تهیه سوسپانسیون کنیدیومی، کنیدیوم‌ها از سطح محیط کشت خراش داده شد و داخل لوله‌های آزمایش حاوی آب مقطر استریل که به آن ۰/۰۲ درصد توئین ۸۰ (Tween 80) اضافه شده بود، ریخته شد. سوسپانسیون اسپوری به مدت پنج دقیقه روی یک شیکر با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به شدت هم زده شد و سپس برای حذف میسلیوم‌های قارچ، از پارچه ململ عبور داده شد. غلظت کنیدی‌های قارچی در سوسپانسیون اسپوری با استفاده از لام گلبول شمار نئوبار تعیین و غلظت‌های مورد نظر کنیدی با روش رقیق‌سازی سریالی تهیه شدند.

*اثر اسانس‌های گیاهی روی رشد میسلیومی و اسپورزایی جدایه های قارچ Beauveria bassiana*

در این آزمایش خواص ضد قارچی اسانس‌های گیاهی پونه، رزماری و نعناع فلفلی از طریق بررسی اثرات تدخینی آن‌ها روی رشد میسلیومی و اسپورزایی جدایه‌های قارچ *B. bassiana* بر اساس روش Soylu *et al.* (2007) و Nana *et al.* (2016) ارزیابی شد. در این روش، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور حاوی $۱ \times ۱۰^{۷}$ کنیدی بر میلی‌لیتر روی محیط سیب‌زمینی-دکستروز-آگار درون تشتک پتری پخش شد و تشتک‌های پتری در دمای ۱ ± ۲۶ درجه سلسیوس به مدت سه روز به منظور تولید لایه میسلیوم نگهداری شدند. سپس لایه میسلیوم بدون اسپور قارچ با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن به قطر پنج میلی‌متر به شکل قطعات گرد آگار بریده شدند. پس از آن، هر قطعه آگار به تنهایی به مرکز یک تشتک پتری (۲۰ × ۹۰ میلی‌متر) شامل ۲۰ میلی‌لیتر محیط سیب‌زمینی-دکستروز-آگار جدید منتقل شد. غلظت $LC_{10}$ از هر اسانس، به ترتیب معادل ۰/۵، ۵/۸ و ۶/۳ میکرولیتر/ لیتر هوا برای اسانس پونه، رزماری و نعناع فلفلی، به کمک سمپلر بر روی یک قطعه کاغذ صافی به قطر ۱۰ میلی‌متر که به سطح داخلی درب تشتک پتری چسبانده شده بود، ریخته شد. درب تشتک‌های پتری شاهد نیز فاقد کاغذ صافی حاوی اسانس بود. سه تشتک پتری (تکرار) برای هر تیمار استفاده شد و آزمایش دو بار تکرار گردید. ظروف پتری با پارافیلم بسته شدند و در تاریکی کامل در دمای ۱ ± ۲۶ درجه سلسیوس به مدت هفت روز انکوبه شدند. رشد شعاعی هر قارچ هفت روز پس از تیمار ثبت شد. سپس برای ارزیابی اسپورزایی، لایه‌های میسلیوم اسپوردار از تشتک‌های پتری کشت با استفاده از چوب-پنبه سوراخ‌کن به قطر پنج میلی‌متر به شکل قطعات گرد آگار بریده شدند. هر قطعه آگار به تنهایی به یک بطری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۲ درصد توین ۸۰ منتقل شد. سپس بطری به مدت چهار دقیقه ورتکس شد و غلظت اسپور با استفاده از لام گلبول شمار نئوبار تعیین شد.

*بیماریزایی قارچ‌ها روی حشرات کامل Tribolium castaneum*

زیست‌سنجی بر اساس روش Kavallieratos *et al.* (2006) با برخی تغییرات انجام شد. غلظت‌های مورد استفاده از جدایه IRAN1395C برابر با $۱ \times ۱۰^{۷}$ و $۱ \times ۱۰^{۸}$، برای جدایه OZ1 مقادیر $۰/۴ \times ۱۰^{۷}$ و $۰/۴ \times ۱۰^{۸}$ و برای جدایه OZ2 برابر با $۰/۲ \times ۱۰^{۷}$ و $۰/۲ \times ۱۰^{۸}$ کنیدی بر میلی‌لیتر بود. در این روش ۶۰ گرم گندم آسیب دیده استریل شده با ۲/۵ میلی‌لیتر از غلظت-های مورد نظر کنیدی با استفاده از سمپاش دستی اسپری شد. به این‌صورت که مقدار مناسبی از دانه گندم به صورت یک لایه نازک روی سینی پخش شده و سم‌پاشی صورت گرفت. دانه‌های گندم تیمار شده به مدت ۲۴ ساعت پس از سمپاشی در دمای اتاق (۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس) خشک شدند. پس از خشک شدن کامل دانه‌های تیمار شده با کنیدی، مقادیر ۱۰ گرمی در ظروف استوانه‌ای پلاستیکی تهویه‌دار (قطر ۴۰ میلی‌متر و ارتفاع ۵۲ میلی‌متر) قرار داده شدند. گندم‌های تیمار شده با آب مقطر حاوی ۰/۰۲ درصد توین ۸۰، به عنوان شاهد استفاده شدند. تعداد ۱۰ عدد حشره کامل *T. castaneum* به هر ظرف منتقل شد. تمامی ظروف در دمای ۱ ± ۲۶ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵ درصد در تاریکی در انکوباتور نگهداری شدند. برای هر غلظت قارچ از سه تکرار استفاده شد و آزمایش دو بار تکرار شد. تعداد حشرات مرده در فواصل زمانی ۷ و ۱۴ روز پس از تیمار شمارش شد.

*آزمایش‌های زیست‌سنجی اسانس‌های گیاهی*

برای تعیین سمیت تدخینی اسانس‌های مورد آزمایش، از روش توصیف شده توسط Keita *et al.* (2001) استفاده شد. در این آزمایش از ظروف پلاستیکی درب‌دار با حجم ۹۰ میلی-لیتراستفاده شد. غلظت‌های مورد استفاده از اسانس پونه ۵/۵، ۶/۷، ۷/۸، ۹/۰ و ۱۱/۱ میکرولیتر/ لیتر هوا، برای اسانس رزماری ۷۷/۸، ۹۴/۴، ۱۱۱/۱، ۱۳۳/۳ و ۱۶۶/۷ میکرولیتر/ لیتر هوا و برای نعناع فلفلی ۵۵/۵، ۷۷/۸، ۱۰۰/۰، ۱۳۳/۳ و ۱۵۵/۵ میکرولیتر/ لیتر هوا بود. غلظت مورد نظر از هر اسانس به کمک سمپلر بر روی یک قطعه کاغذ صافی به قطر دو سانتی‌متر که به سطح داخلی درب ظرف آزمایش چسبانده شده بود، ریخته شد. سپس در هر ظرف ۱۰ عدد حشره کامل قرار داده شد و درب ظروف بسته شد و توسط پارافیلم نیز غیرقابل نفوذ گردید، به طوری که بخار اسانس به بیرون نفوذ نکند. برای هر غلظت اسانس سه تکرار در نظر گرفته شد. درپوش ظروف شاهد نیز فاقد کاغذ صافی حاوی اسانس بود. ظروف آزمایش در انکوباتور با دمای ۱ ± ۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵ درصد و شرایط تاریکی قرار داده شد. شمارش تعداد حشرات مرده در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اسانس‌دهی صورت گرفت.

*اثر تلفیقی اسانس‌های گیاهی و جدایه های قارچ Beauveria bassiana*

هدف از انجام این آزمایش افزایش خاصیت حشره‌کشی قارچ‌ها برای کنترل *T. castaneum* بود. تیمارها شامل کاربرد تلفیقی قارچ و اسانس، قارچ به تنهایی (جدایه IRAN1395C، OZ1 یا OZ2)، اسانس به تنهایی (پونه، رزماری یا نعناع فلفلی)، و شاهد (بدون قارچ و یا اسانس) بود. در این آزمایشات از غلظت $LC_{10}$ اسانس‌های پونه، رزماری و نعناع فلفلی و غلظت‌های $10^8$ × ۱، $10^8$ × ۰/۴ و $10^8$ × ۰/۲ کنیدی بر میلی‌لیتر به ترتیب برای جدایه IRAN1395C، OZ1 و OZ2 استفاده شد. به منظور کاربرد تلفیقی قارچ و اسانس، ابتدا گندم‌ها با روش شرح داده شده در آزمایش بررسی بیماریزایی قارچ‌ها روی حشرات کامل *T. castaneum*، با غلظت‌های مورد نظر از قارچ تیمار شده و سپس به ظروف پلاستیکی درب‌دار با حجم ۹۰ میلی‌لیتر منتقل شدند. سپس در هر ظرف ۱۰ عدد حشره کامل قرار داده شد. غلظت مورد نظر از اسانس‌های گیاهی روی کاغذ صافی تعبیه شده در درب ظروف آزمایش ریخته شد و درب‌ها محکم پیچ شدند. برای جلوگیری از خروج بخار اسانس، درب‌ها توسط پارافیلم نیز غیرقابل نفوذ گردیدند. این آزمایش در شش تکرار انجام شد و مرگ و میر حشرات کامل پس از ۱۴ روز ثبت شد.

*تجزیه و تحلیل داده‌ها*

داده‌های درصد مرگ و میر حشرات کامل *T. castaneum* در آزمایش بیماریزایی قارچ‌ها و نیز آزمایش اثرات تلفیقی اسانس-های گیاهی و قارچ، در صورت مشاهده مرگ و میر در شاهد، بوسیله فرمول ابوت (Abbott 1925) اصلاح شدند. همچنین نرمالیته داده‌های اصلاح شده قبل از تجزیه آماری توسط نرم‌افزار آماری SPSS 16 بررسی و در صورت نیاز تبدیل آرک سینوس

$$SR = \frac{EX}{Ob} = \frac{A+B}{(A+B)}$$

که در آن A میانگین درصد مرگ و میر غلظت زیر کشنده اسانس، B درصد مرگ و میر جدایه قارچ *B. bassiana* و A + B و (A + B) به ترتیب درصد مرگ و میر مورد انتظار و مشاهده شده است. مقادیر SR کمتر از ۰/۷، ۰/۷-۱/۸ و بیشتر از ۱/۸ به ترتیب نشان دهنده برهم‌کنش از نوع هم‌افزایی، تجمعی و متضاد (آنتاگونیستی) می‌باشد (Ebadollahi *et al*. 2017).

## نتایج

*بیماریزایی قارچ‌ها علیه حشرات کامل Tribolium castaneum*

روی داده‌ها انجام شد. سپس داده‌های مرگ و میر در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه واریانس شده (ANOVA) و میانگین‌ها با استفاده از آزمون Fisher's LSD در سطح احتمال ۵٪ مقایسه شدند (SAS Institute 2003). مقادیر غلظت کشنده ($LC_{50}$ و $LC_{90}$) و حدود اطمینان مربوطه برای اسانس‌های گیاهی توسط آنالیز پروبیت برآورد شد (SAS Institute 2003). در آزمایش بررسی اثر اسانس‌ها روی رشد شعاعی و اسپورزایی قارچ‌ها، درصد بازدارندگی رشد میسلیومی و اسپورزایی (*I*) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$I = \frac{C-T}{C} \times 100$$

که در آن *C* و *T* رشد شعاعی و یا اسپورزایی قارچ به ترتیب در شاهد و تیمار مربوطه می‌باشند (Farzaneh *et al*. 2015). برای محاسبه سازگاری اسانس‌های گیاهی با قارچ‌ها، فرمول پیشنهاد شده توسط Neves *et al*. (2001) برای طبقه‌بندی سمیت استفاده شد:

$$T = \frac{20(VG) + 80(SP)}{100}$$

در این فرمول، VG و SP به ترتیب برابر با درصد رشد میسلیومی و اسپورزایی نسبت به شاهد هستند. سپس، درجه سازگاری اسانس‌ها با توجه به مقدار T محاسبه شده تعیین شد (۰ تا ۳۰ = بسیار سمی؛ ۳۱ تا ۴۵ = سمی؛ ۴۶ تا ۶۰ = نسبتاً سمی؛ > ۶۰ = سازگار). برای تعیین نوع برهمکنش اسانس-قارچ، نسبت هم افزایی (سینرژیستی) (SR) برای هر یک از اسانس‌های گیاهی و قارچ‌های بیماری‌زا طبق فرمول زیر محاسبه شد:

جدایه‌های IRAN1395C، OZ1 و OZ2 قارچ *B. bassiana* تفاوت‌هایی از نظر بیماریزایی علیه حشرات کامل *T. castaneum* نشان دادند (جدول ۱). به طور کلی، درصد مرگ و میر حشرات کامل شپشه آرد در مدت زمان هفت روز پس از تیمار با جدایه-های مختلف قارچ پایین‌تر از ۱۰ درصد بود. در مدت زمان ۱۴ روز پس از تیمار، افزایش قابل توجهی در میزان تلفات حشرات کامل شپشه آرد مشاهده شد به طوری که در بالاترین غلظت مصرفی قارچ‌ها، درصد مرگ و میر از ۶۸/۳ درصد در جدایه OZ1 تا ۷۳/۳ درصد برای جدایه IRAN1395C متغیر بود. تفاوت کشندگی سه جدایه قارچ *B. bassiana* در بالاترین غلظت مصرفی، در مدت زمان ۱۴ روز پس از تیمار، از نظر آماری معنی-دار نبود (جدول ۱).

**جدول ۱.** میانگین درصد مرگ و میر (± SE) حشرات کامل شپشه آرد *Tribolium castaneum* بعد از ۷ و ۱۴ روز قرارگرفتن در معرض گندم تیمار شده با دو غلظت مختلف از جدایه‌های قارچ پاتوژن *Beauveria bassiana* .

**Table 1.** Mean percentage mortality (± SE) of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* adults after 7 days and 14 days of exposure in wheat treated with two concentration rates (expressed as conidia $ml^{-1}$) of *Beauveria bassiana* isolates.

| Treatment | Exposure interval | |
|---|---|---|
| | 7 days | 14 days |
| *B. bassiana* IRAN1395C | | |
| $1\times 10^7$ conidia $ml^{-1}$ | $3.3 \pm 2.1^{bc}$ | $36.7 \pm 2.1^{c}$ |
| $1\times 10^8$ conidia $ml^{-1}$ | $5.0 \pm 2.2^{ab}$ | $73.3 \pm 2.1^{a}$ |
| *B. bassiana* OZ1 | | |
| $0.4\times 10^7$ conidia $ml^{-1}$ | $0.0 \pm 0.0^{c}$ | $55.0 \pm 2.2^{b}$ |
| $0.4\times 10^8$ conidia $ml^{-1}$ | $8.3 \pm 1.7^{a}$ | $68.3 \pm 5.4^{ab}$ |
| *B. bassiana* OZ2 | | |
| $0.2\times 10^7$ conidia $ml^{-1}$ | $0.0 \pm 0.0^{c}$ | $35.0 \pm 2.2^{c}$ |
| $0.2\times 10^8$ conidia $ml^{-1}$ | $3.3 \pm 2.1^{bc}$ | $70.0 \pm 6.3^{a}$ |

Means in the same exposure interval followed by the same letter are not significantly different; Fisher's LSD test at P = 0.05.

*سمیت تدخینی اسانس‌های گیاهی علیه حشرات کامل Tribolium castaneum*

نتایج بررسی سمیت تدخینی اسانس پونه، رزماری و نعناع فلفلی علیه حشرات کامل *T. castaneum* در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس مقادیر $LC_{50}$ و حدود اطمینان محاسبه شده، اسانس پونه (۷/۳۳ میکرولیتر بر لیتر هوا) سمیت بیشتری نسبت به اسانس رزماری (۱۰۵/۷۸ میکرولیتر بر لیتر هوا ) و نعناع فلفلی (۱۰۵/۲۲ میکرولیتر بر لیتر هوا) علیه حشرات کامل آفت نشان داد. سمیت دو اسانس رزماری و نعناع فلفلی با توجه به هم-پوشانی حدود اطمینان غلظت کشنده ۵۰ درصد از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲).

*اثر اسانس‌های گیاهی بر رشد میسلیومی و اسپورزایی جدایه‌های Beauveria bassiana*

نتایج آزمایش بررسی اثر سه اسانس پونه، رزماری و نعناع فلفلی روی جدایه‌های قارچ *B. bassiana* نشان داد که همه اسانس‌های گیاهی اثر بازدارندگی بر رشد میسلیومی و اسپورزایی قارچ‌ها داشتند (جدول ۳). درصد بازدارندگی رشد میسلیومی از ۳/۵ درصد با اسانس پونه روی جدایه OZ2 تا ۳۸/۰ درصد با اسانس نعناع فلفلی روی جدایه OZ1 متغیر بود. بیشترین اثر بازدارندگی اسپورزایی با دو اسانس رزماری (۵۸/۱ درصد) و نعناع فلفلی (۵۰/۵ درصد) روی جدایه OZ1 مشاهده شد. با این حال، تعیین درجه سازگاری اسانس‌ها با توجه به مقدار T محاسبه شده نشان داد که همه اسانس‌های گیاهی با جدایه‌های قارچ *B. bassiana* سازگار بودند به جز اسانس نعناع و رزماری که برای جدایه OZ1 سمی بودند و ناسازگاری نشان دادند (جدول ۳).

**جدول ۲.** سمیت تدخینی اسانس‌های گیاهی علیه حشرات کامل شپشه آرد *Tribolium castaneum*.

**Table 2.** Fumigant toxicity of essential oils against the adults of the red flour beetle, *Tribolium castaneum.*

| Treatment | Slope ± SE | $LC_{50}$ (µl/l air)* (95%FL) | $LC_{90}$ (µl/l air) (95%FL) | $x^2$ (df=3) |
|---|---|---|---|---|
| *M. piperita* | 7.3 ± 1.0 | 105.22 (97.1-114.2) | 158 (141.3-187.5) | 4.6 |
| *R. officinalis* | 6.0 ± 1.1 | 105.78 (96-115.2) | 173.11 (151.1-224) | 6.0 |
| *M. pulegium* | 9.5 ± 1.4 | 7.33 (6.9-7.8) | 10.00 (9.2-11.4) | 2.0 |

* Lethal concentration and Fiducial Limits (FL) based on standard scale

*اثر تلفیقی اسانس‌های گیاهی و جدایه‌های Beauveria bassiana*

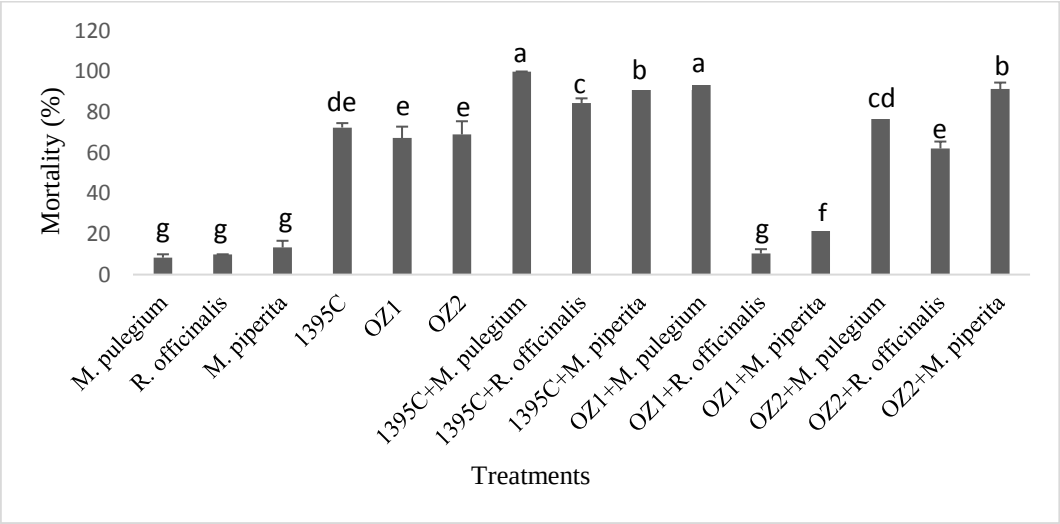
مرگ و میر حشرات کامل *T. castaneum* تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان داد (F=83.4; df=14, 75; *P*<0.0001). بالاترین میزان مرگ و میر در تیمار تلفیقی اسانس پونه و دو جدایه IRAN1395C و OZ1 دیده شد (۱۰۰ درصد مرگ و میر) (شکل ۱). خاصیت حشره‌کشی جدایه IRAN1395C در ترکیب با هر سه اسانس گیاهی به طور معنی-داری نسبت به تیمار قارچ به تنهایی افزایش یافت. در مورد جدایه OZ1 اگرچه افزایش معنی‌داری در کشندگی در ترکیب با اسانس پونه مشاهده شد، ولی کشندگی آن در ترکیب با دو اسانس نعناع فلفلی و رزماری کاهش معنی‌داری را نشان داد. ترکیب جدایه OZ2 و دو اسانس پونه و نعناع فلفلی، مرگ و میر حشرات کامل شپشه آرد را نسبت به کاربرد این جدایه به تنهایی افزایش داد. با این حال، تفاوت معنی‌داری بین مرگ و میر حشرات در ترکیب جدایه OZ2 با اسانس رزماری نسبت به کاربرد OZ2 به تنهایی دیده نشد (شکل ۱).

**جدول ۳.** اثرات اسانس‌های گیاهی در غلظت $LC_{10}$ روی درصد بازدارندگی رشد میسلیومی و اسپورزایی جدایه‌های قارچ *Beauveria bassiana*.

**Table 3.** Effects of essential oils at concentrations equivalent to $LC_{10}$ on percentage of mycelial growth inhibition (MGI) and sporulation inhibition (SI) of *Beauveria bassiana* isolates.

| Essential oil | Fungal isolate | MGI (%±SE) | SI (%±SE) | T value | Compatibility index |
|---|---|---|---|---|---|
| *M. piperita* | IRAN1395C | $15.8 \pm 1.2^{c}$ | $37.0 \pm 2.3^{c}$ | 67.2 | C |
| | OZ1 | $38.0 \pm 0.3^{a}$ | $50.5 \pm 4.3^{ab}$ | 52.0 | I |
| | OZ2 | $34.1 \pm 4.1^{ab}$ | $15.9 \pm 3.7^{de}$ | 80.4 | C |
| *R. officinalis* | | | | | |
| | IRAN1395C | $9.6 \pm 1.4^{cd}$ | $47.2 \pm 2.8^{b}$ | 60.3 | C |
| | OZ1 | $30.1 \pm 4.1^{b}$ | $58.1 \pm 3.2^{a}$ | 47.5 | I |
| | OZ2 | $32.0 \pm 2.8^{ab}$ | $18.8 \pm 3.7^{de}$ | 78.5 | C |
| *M. pulegium* | | | | | |
| | IRAN1395C | $13.8 \pm 2.1^{c}$ | $16.7 \pm 2.5^{de}$ | 83.9 | C |
| | OZ1 | $34.2 \pm 2.6^{ab}$ | $24.7 \pm 2.7^{d}$ | 73.4 | C |
| | OZ2 | $3.5 \pm 0.7^{d}$ | $13.0 \pm 3.8^{e}$ | 90.3 | C |

Means followed by the same letter in a column are not significantly different; Fisher's LSD test at P = 0.05. T, corrected amount of fungal vegetative and reproductive growth; C, compatibility; I, incompatibility; MGI, mycelial growth inhibition; SI, sporulation inhibition; SE, standard error.




**شکل ۱.** مرگ و میر حشرات کامل *Tribolium castaneum* قرار گرفته در معرض اسانس‌های گیاهی به تنهایی، ایزوله‌های قارچ *Beauveria bassiana* به تنهایی (IRAN1395C، OZ1 و OZ2) یا تلفیق این فاکتورها. ستون‌های با حروف آماری متفاوت، اختلاف معنی‌داری دارند (Fisher's LSD test, $p < 0.05$).

**Figure 1.** Mortality of *Tribolium castaneum* adults when exposed to plant essential oils alone, *Beauveria bassiana* isolates (IRAN1395C, OZ1, and OZ2) alone or integration of these factors. Columns bearing different statistical letters were significantly different (Fisher's LSD test, $p < 0.05$).

طبق جدول ۴، نسبت هم افزایی (سینرژیستی) (SR) برای کاربرد تلفیقی جدایه‌های *B. bassiana* با اسانس‌های پونه، رزماری و نعناع فلفلی بین ۱/۸-۰/۷ بود که نشان دهنده یک اثر هم‌افزایی بر مرگ و میر *T. castaneum* می‌باشد، بجز در ترکیب جدایه OZ1 با اسانس نعناع فلفلی و رزماری که اثر آنتاگونیستی داشت (SR به ترتیب ۲/۱ و ۷/۵) (جدول ۴).

**جدول ۴.** سمیت غلظت $LC_{10}$ اسانس‌های گیاهی در تلفیق با غلظت $10^8$ (کنیدی/میلی‌لیتر) جدایه‌های قارچ *Beauveria bassiana* علیه حشرات کامل *Tribolium castaneum* بعد از ۱۴ روز.

**Table 4.** Toxicity of $LC_{10}$ of essential oils in integration with $10^8$ (conidia $ml^{-1}$) of *Beauveria bassiana* isolates against *Tribolium castaneum* adults after 14 d.

| Essential oil | Fungal isolate | EX (%) | OB (%) | SR |
|---|---|---|---|---|
| *M. piperita* | IRAN1395C | 85.7 | 94.8 | 0.9 |
| | OZ1 | 80.6 | 37.9 | 2.1 |
| | OZ2 | 82.3 | 91.4 | 0.9 |
| *R. officinalis* | IRAN1395C | 82.4 | 84.5 | 0.9 |
| | OZ1 | 77.2 | 10.3 | 7.5 |
| | OZ2 | 79.0 | 62.1 | 1.3 |
| *M. pulegium* | IRAN1395C | 80.7 | 100 | 0.8 |
| | OZ1 | 75.6 | 100 | 0.7 |
| | OZ2 | 77.3 | 82.7 | 0.9 |

EX and OB are expected and observed mortality percentage, respectively. SR is synergistic ratio = expected mortality/observed mortality.

## بحث

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که هر سه جدایه مورد آزمایش از قارچ *B. bassiana* پتانسیل بالایی برای کنترل حشرات کامل *T. castaneum* را دارند. قارچ‌های بیماری‌زای حشرات را می‌توان به عنوان عوامل امیدوارکننده‌ای برای استفاده در برنامه‌های کنترل بیولوژیک در نظر گرفت. بیماری‌زایی این قارچ‌ها روی *T. castaneum* و سایر آفات انباری قبلاً گزارش شده است (Ahmed 2010; Barra *et al*. 2013; Komaki *et al*. 2017; Rumbos & Athanassiou 2017; Jamali *et al*. 2021). در پژوهشی، Golshan *et al*. (2014) بیماری‌زایی ۹ جدایه قارچ *B. bassiana* را روی حشرات کامل *T. castaneum* بررسی کردند. تمامی جدایه‌ها برای آفت بیماری‌زا بودند و موثرترین آن‌ها Iran 440C بود که در غلظت $10^8$ کنیدی بر میلی‌لیتر موجب ۶۰ درصد مرگ و میر شد. در مطالعه دیگر، Jamali *et al*. (2021) اثر قارچ‌های بیماری‌زای *B. bassiana*، Zare & *Lecanicillium lecanii* (Zimm.)Gams و (Thom) *Paecilomyces lilacinus* را روی *T. castaneum* با دو روش زیست‌سنجی (غوطه‌وری حشرات و گندم تیمار شده با قارچ) مطالعه نمودند. نتایج ایشان نشان داد همه قارچ‌ها علیه حشرات کامل آفت موثر بودند و در غلظت $10^9$ کنیدی بر میلی‌لیتر در روش غوطه‌وری و تیمار گندم به ترتیب تا ۶۳/۰ و ۶۶/۳ درصد مرگ و میر بعد از ۱۴ روز تیمار ایجاد کردند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه دیگر، Akmal *et al*. (2020) حداکثر ۳۲/۵ درصد تلفات برای قارچ *B. bassiana* روی حشرات کامل *T. castaneum* با روش غوطه‌وری در روز هفتم پس از تیمار گزارش کردند. این مقدار کشندگی (۳۲/۵ درصد) برای غلظت $10^8$ کنیدی بر میلی‌لیتر در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر در هفت روز پس از تیمار با غلظت $10^8$ کنیدی بر میلی‌لیتر (کمتر از ۱۰ درصد) خیلی بیشتر است که این تفاوت در نتایج می‌تواند بخاطر تفاوت در جدایه‌های مورد بررسی و یا روش زیست‌سنجی باشد.

در مطالعه حاضر، اسانس پونه، رزماری و نعناع فلفلی سمیت تدخینی علیه حشرات کامل *T. castaneum* نشان دادند. با این حال، مرگ و میر حشره در اثر اسانس پونه به طور معنی‌دار بیشتر از رزماری و نعناع فلفلی بود. براساس مطالعات Mahmoodvand *et al*. (2015) اسانس پونه از گونه گیاهی *Mentha longifolia* L. برای هر دو گونه *T. castaneum* و *Tribolium confusum* du Val. سمیت تنفسی بالایی داشت و میزان $LC_{50}$ بعد از ۲۴ ساعت اسانس‌دهی به ترتیب برابر با ۱۱/۵۹ و ۱۰/۶۷ میکرولیتر بر لیتر هوا بود که نسبت به اسانس *M. pulegium* مورد بررسی در تحقیق حاضر سمیت تنفسی کمتری روی این آفت داشت. این تفاوت می‌تواند به دلیل اختلاف در ترکیبات موثره گیاه، روش استخراج اسانس از گیاه و یا زمان اسانس‌دهی باشد. در تحقیقی دیگر، Salem *et al*. (2017) سمیت تدخینی بالای اسانس *M. pulegium* را علیه حشرات کامل *T.*

*castaneum* گزارش کردند و میزان $LC_{50}$ برابر با ۱۱/۵۷ میکرولیتر بر لیتر هوا بود. نتایج مطالعه Gokturk *et al*. (2020) نشان داد که اسانس رزماری ۹۸/۳ درصد مرگ و میر روی حشرات کامل *T. confusum* بعد از ۹۶ ساعت اسانس‌دهی ایجاد کرد. خاصیت حشره‌کشی مطلوب اسانس پونه، رزماری و نعناع فلفلی علیه سایر آفات انباری نیز گزارش شده است. در بررسی انجام شده توسط Zandi-Sohani & Ramezani (2012)، اسانس پونه در غلظت ۶۰ میکرولیتر بر لیتـر هـوا تا ۸۹/۷ درصد مرگ و میر در مدت زمان ۲۴ ساعت روی حشـرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* F. ایجاد کرد. همچنین، سمیت تنفسی اسانس رزماری علیه حشرات کامل سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات (Mirkazemi *et al*. 2010) و شپشه دندانه‌دار *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Roozbehani *et al*. 2013) ثابت شده است. اسانس نعناع فلفلی نیز سمیت تدخینی بالایی علیه تخم و حشرات کامل بید غلات *Sitotroga cerealella* Olivier نشان داد (Ganbalani *et al*. 2021). در پژوهش انجام شده توسط Amiri (2020)، اسانس نعناع فلفلی خاصیت کشندگی بالایی علیه تخم *C. maculatus* نشان داد به نحوی که فقط ۳/۳ درصد از تخم‌ها تفریخ پیدا کردند. سمیت دیگر عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی نیز علیه *T. Castaneum* در مطالعات قبلی ثابت شده است. به عنوان مثال، اسانس زنیان، درمنه، اکالیپتوس و رازیانه فعالیت دورکنندگی و حشره‌کشی علیه لاروها و حشرات کامل *T. castaneum* نشان دادند (Wang *et al*. 2006; Chaubey 2007a, b; Khorrami *et al*. 2018; Jamali *et al*. 2021). هنگامی که حشرات در معرض اسانس قرار می‌گیرند، سیستم عصبی حشرات تجزیه می‌شود (Kostyukovsky *et al*. 2002). برخی از محققان همچنین گزارش کردند که فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در حشرات نیز توسط اسانس و ترکیبات آن مهار می‌شود (Picollo *et al*. 2008) که منجر به اخلال در تحریک عصبی، فلج شدن و سپس مرگ حشرات می‌شود. اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها اثر خود را در مهار تخم‌ریزی گونه‌های *Tribolium* نیز نشان داده‌اند. در مطالعه انجام شده توسط Tripathi *et al*. (2002)، اسانس زردچوبه در دوز ۵/۲ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع با روش تدخینی به ترتیب ۷۲ و ۸۰ درصد تخمریزی و تفریخ تخم *T. castaneum* را کاهش داد و در دوز ۴۰/۵ میلی‌گرم بر گرم غذا کلاً از تولید نتاج جلوگیری کرد (Tripathi *et al*. 2002). بنابراین، از آنجایی که اسانس‌ها ترکیبات فرار هستند و اکثر آن‌هایی که در برابر حشرات سمی هستند، $LC_{50}$ پایینی دارند، می‌توانند به راحتی به عنوان سموم تدخینی برای مدیریت گونه‌های *Tribolium* در انبار استفاده شوند.

بر اساس نتایج این مطالعه، رشد میسلیومی و اسپورزایی جدایه‌های قارچ *B. bassiana* تحت تاثیر اسانس‌های گیاهی مورد آزمایش کاهش یافت. کمترین مقدار رشد رویشی و زایشی مربوط به جدایه OZ1 تحت تاثیر اسانس رزماری و نعناع فلفلی بود. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که بعضی از اسانس‌های گیاهی ممکن است خاصیت ضدمیکروبی نشان دهند. برای مثال، در مطالعه انجام شده توسط Lak *et al*. (2022)، اسانس ترخون بیشترین اثر بازدارندگی بر رشد میسلیومی و اسپورزایی جدایه IRAN2252C قارچ *Metarhizium* (Metschn.) Sorokin *anisopliae* را نشان داد. در مطالعه دیگر، غلظت‌های زیرکشنده اسانس اکالیپتوس، رازیانه و زنیان به طور معنی‌داری تمام پارامترهای رشدی مورد بررسی از جمله جوانه‌زنی اسپور، رشد شعاعی، و اسپورزایی قارچ‌های *P. lilacinus*، *B. bassiana* و *L. lecanii* را مهار کردند (Jamali *et al*. 2021). با این حال، در برخی از مطالعات، رشد قارچ تحت تاثیر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی قرار نگرفت. به عنوان مثال، عصاره‌های مختلف بدست آمده از برگ، ریشه، ساقه و دانه (Tulsi) *Ocimum sanctum* Linn.بر اسپورزایی *M. anisopliae* تأثیری نداشت (Borgio *et al*. 2008). تنوع در فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی به تفاوت در ترکیبات فعال آن‌ها مانند فنل‌ها، آلدئیدها و کتون‌ها مربوط می‌شود (Oussalah *et al*. 2007). فاز بخار اسانس‌های گیاهی دارای فعالیت ضدمیکروبی بالاتری علیه قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد (Edris & Farrag 2003; Soylu *et al*. 2006, 2007). این فعالیت ضد میکروبی بالاتر احتمالاً از توانایی میسلیوم قارچ‌ها برای جذب آسان ترکیبات چربی‌دوست اسانس‌ها که در فاز بخار یافت می‌شوند نشات می‌گیرد (Inouye *et al*. 2000; Edris & Farrag 2003). استفاده از اسانس‌های ناسازگار ممکن است از رشد و تولیدمثل قارچ‌های بیماری‌زا جلوگیری کند که منجر به اثرات منفی بر استراتژی‌های مدیریت تلفیقی آفات می‌شود. نتایج ما نشان داد که اسانس رزماری و نعناع فلفلی با جدایه OZ1 ناسازگار هستند. با این حال، این دو اسانس اثر کاملاً منفی بر روی جدایه‌های OZ2 و IRAN1395C نداشتند، اگرچه کاهش رشد میسلیومی و اسپورزایی مشاهده شد. اسانس پونه نیز با همه جدایه‌های قارچ *B. bassiana* سازگار بود.

در مطالعه حاضر، غلظت‌های زیرکشنده اسانس پونه، رزماری و نعناع فلفلی، حساسیت حشرات کامل *T. castaneum* را به آلودگی جدایه‌های قارچ *B. bassiana* افزایش دادند، بجز در

ترکیب اسانس نعناع فلفلی و رزماری با جدایه OZ1 که برهمکنش آنتاگونیستی مشاهده شد. بطور مشابه، کاربرد همزمان اسانس رازیانه، ترخون و اسطوخودوس و جدایه‌های قارچ *M. anisopliae*، اثرات سینرژیستی یا هم‌افزایی بر مرگ و میر حشرات کامل سوسک لوبیا (Say) *Acanthoscelides obtectus*داشت (Lak *et al*. 2022). همچنین در مطالعه انجام شده توسط Mohamed (2009)، کاربرد تلفیقی اسانس جعفری و زیره و قارچ‌های *M. anisopliae* var. *acridum* و *B. bassiana* علیه دو گونه ملخ *Schistocerca gregaria* (Forskal) و *Euprepocnemis plorans* (Charpentier)، تاثیر بهتری در کنترل ملخ‌ها در شرایط آزمایشگاهی داشت، در حالی که ترکیب اسانس پیاز و قارچ‌ها باعث اثر آنتاگونیستی شد. همچنین در شرایط مزرعه، کاربرد اسانس جعفری با غلظت ۰/۱ درصد در ترکیب با دو قارچ، کنترل بهتری به دنبال داشت (Mohamed 2009). در بررسی اثرات جداگانه و همزمان اسانس نعناع فلفلی، پونه و قارچ بیماری‌زای (Petch) Zare & Gams *Lecanicillium muscarium* بر علیه *Aphis gossypii* Glover، ترکیب اسانس‌های گیاهی و قارچ، نتایج خوبی در کنترل آفت نشان داد (Ebadollahi *et al*. 2017). در مطالعه انجام شده توسط Hosseinzadeh *et al*. (2018)، کاربرد تلفیقی سه اسانس گیاهی شامل جعفری، مرزه سهندی و گلپر ایرانی و جدایه‌های IS-1 و IS-75 قارچ *B. bassiana* علیه حشرات کامل *C. maculatus* نشان داد که فقط ترکیب مقادیر $LC_{25}$ هر یک از عوامل دارای اثر سینرژیستی در افزایش درصد مرگ و میر حشرات کامل آفت بوده و سایر ترکیبات غلظت‌های کشنده و زیرکشنده اسانس‌ها و قارچ‌ها، دارای اثرات هم‌افزایی و یا آنتاگونیستی بودند (Hosseinzadeh *et al*. 2018). این برهم-کنش‌های سینرژیستی یا هم‌افزایی اسانس‌ها با قارچ‌های بیماری‌زای حشرات ممکن است به این دلیل باشد که اسانس، مکانیسم‌های سم‌زدایی را که یک حشره آلوده به قارچ ممکن است برای از بین بردن توکسین‌های قارچ استفاده کند، مهار کرده و در نتیجه مرگ حشره را تسریع می‌کند (Ericsson *et al*. 2007).

بطور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده اثر سمی اسانس-های گیاه پونه، رزماری و نعناع فلفلی روی حشرات کامل شپشه آرد بود و از بین سه اسانس گیاهی مورد مطالعه، اسانس پونه بالاترین سمیت تنفسی را برای حشرات کامل شپشه آرد داشت. جدایه‌های IRAN1395C، OZ1 و OZ2 قارچ *B. bassiana* نیز مرگ و میر مناسبی علیه این آفت نشان دادند. کاربرد قارچ‌های بیماری‌زا و اسانس‌های گیاهی به عنوان ترکیبات حشره‌کش طبیعی می‌تواند منجر به کاهش اثرات جانبی مضر در مقایسه با حشره‌کش‌های شیمیایی شود. نتایج بررسی کاربرد توأم این عوامل در مطالعه حاضر نشان داد که جدایه‌های قارچ

اسانس‌ها روی رشد میسلیومی و جوانه‌زنی قارچ‌ها در برنامه‌های کنترل تلفیقی با استفاده از این عوامل باید به دقت مورد بررسی قرار گیرد. انجام مطالعات بیشتر با کاربرد دیگر اسانس‌های گیاهی، در غلظت‌های زیرکشنده مختلف، برای تعیین ترکیبات بهینه اسانس‌ها و قارچ‌ها جهت کنترل تلفیقی *T. castaneum* در محصولات خاص تحت شرایط انبارداری واقعی ضروری است.

**References**


Abbott WS, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomolology* 18: 265–267.

Ahmed BI, 2010. Potentials of entomopathogenic fungi in controlling the menace of maize weevil *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera: Curculionidae) on stored maize grain. *Archives of Phytopathology & Plant Protection* 43(2): 107–115.

Akmal M, Freed S, Bilal M, Malik MN, 2020. A laboratory evaluation for the potential of entomopathogenic fungi against *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science &Technology* 8(6): 1232–1235.

Amiri A, 2020. Effect of four essential oils, including eucalyptus leaf, eucalyptus flower, rosemary leaf, and mint leaf on hatching and larval duration of the cowpea weevil. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 51(1): 121–128.

Armak A, Saber M, Arzanlou M, Sohrabi F, 2024. Lethal effects of entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana in combination with phosalone and lambda-cyhalothrin on the wheat weevil, *Sitophilus granarius* (L.). *Journal of Applied Research in Plant Protection* 13 (1): 111–121.

Barra P, Rosso L, Etcheverry M, 2013. Isolation and identification of entomopathogenic fungi and their evaluation against *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais*, and *Rhyzopertha dominica* in stored maize. *Journal of Pest Science* 86: 217–226.

Borgio JF, Bency B J, Sharma N, 2008. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok. with *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) (Lamiaceae) extracts. *Ethnobotanical Leaflets* 12: 698–704.

Chaubey MK, 2007a. Insecticidal activity of *Trachyspermum ammi* (Umbelliferae), *Anethum graveolens* (Umbelliferae) and *Nigella sativa* (Ranunculaceae) essential oils against stored product beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *African Journal of Agricultural Research* 2(11): 596–600.

Chaubey MK, 2007b. Toxicity of essential oils from *Cuminum cyminum* (Umbelliferae), *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Foeniculum vulgare* (Umbelliferae) against stored-product beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry* 6: 1719–1727.

Ebadollahi A, Davari M, Razmjou J, Naseri B, 2017. Separate and combined effects of *Mentha piperata* and *Mentha pulegium* essential oils and a pathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* against *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomolology* 110: 1025–1030.

Ebadollahi A, Ziaee M, Palla F, 2020. Essential oils extracted from different species of the Lamiaceae plant family as prospective bioagents against several detrimental pests. *Molecules* 25: 1556.

Erdogus FD, 2021. On the efficiency of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) on rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31: 1–5.

Edris AE, Farrag ES, 2003. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapour phase. *Nahrung* 47: 117–121.

Ericsson JD, Todd Kabaluk J, Goettel MS, Myers JH, 2007. Spinosad interacts synergistically with the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* against the exotic wireworms *Agriotes lineatus* and *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae). *Journal of Economic Entomolology* 100: 31–38.

Farzaneh M, Kiani H, Sharifi R, Reisi M, Hadian J, 2015. Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. *Postharvest Biology & Technology* 109: 145–151.

Faraji S, Mehrvar A, Shadmehri AD, 2013. Studies on the virulence of different isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metcsn.) Sorokin against Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *African Journal of Agricultural Research* 8: 4157–4161.

Ganbalani GN, Abedi Z, Mottaghinia L, Nouri A, 2021. Fumigant toxicity and sublethal effects of black cumin (*Bunium persicum* Boiss.), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), and peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oils against the Angoumois grain moth, *Sitotroga cerealella* Olivier (Lepidoptera: Gelechiidae). *Iranian Journal of Plant Protection Science* 52(1): 53–67.

Gokturk T, Kordali S, Ak K, Kesdek M, Bozhuyuk AU, 2020. Insecticidal effects of some essential oils against *Tribolium confusum* (du Val.) and *Acanthoscelides obtectus* (Say), (Coleoptera: Tenebrionidae and Bruchidae) adults. *International Journal of Tropical Insect Science* 40: 637–643.

Golshan H, Saber M, Majidi-Shilsar F, Karimi F, Ebadi AA, 2014. Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* isolates on red flour beetle *Tribolium castaneum* and their characterization by random amplified polymorphic DNA. *Journal of Agricultural Science & Technology* 16: 747–758.

Goettel MS, Poprawski TJ, Vandenberg JD, Li Z, Roberts DW, 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird M, Lacey LA,

Davidson EW (eds). Safety of Microbial Insecticides. CRC Press, Boca Raton, FL. Pp. 209– 231.

Hosseinzadeh R, Mehrvar A, Eivazian KN, 2018. Compatibility of some plant essential oils in combination with the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* against *Callosobruchus maculatus* (Col.: Bruchidae). *Plant Pests Research* 8: 1–14.

Immediato D, Figueredo LA, Iatta R, Camarda A, de Luna RLN, *et al*., 2016. Essential oils and *Beauveria bassiana* against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae): towards new natural acaricides. *Veterinary Parasitology* 229: 159–165.

Inouye S, Tsuruoka T, Watanabe M, Takeo K, Akao M, *et al*., 2000. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses* 43: 17–23.

Islam MS, MahbubHasan M, Xiong W, Zhang SC, Lei CL, 2009. Fumigant and repellent activities of essential oil from *Coriandrum sativum* (L.) (Apiaceae) against red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Pest Science* 82: 171–177.

Jamali F, Sohrabi F, Kohanmoo MA, 2021. Entomopathogenic fungi and plant essential oils are not compatible in controlling *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Plant Diseases & Protection* 128: 799–808.

Kavallieratos NG, Athanassiou CG, Michalaki MP, Batta YA, Rigatos HA, *et al*., 2006. Effect of the combined use of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkof) Sorokin and diatomaceous earth for the control of three stored-product beetle species. *Crop Protection* 25: 1087–1094.

Keita SM, Vincent C, Schmit J, Arnason JT, Belanger A, 2001. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* 37: 339–349.

Khorrami F, Valizadegan O, Forouzan M, Soleymanzade A, 2018. The antagonistic/synergistic effects of some medicinal plant essential oils, extracts and powders combined with diatomaceous earth on red four beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Archives of Phytopathology & Plant Protection* 51(13–14): 685–695.

Komaki A, Kordali S, Bozhuyuk AU, Altinok HH, Kesdek M, *et al*., 2017. Laboratory assessment for biological control of *Tribolium confusum* du Val., 1863 (Coleoptera: Tenebrionidae) by entomopathogenic fungi. *Turkish Journal of Entomology* 41(1): 95–103.

Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E, 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science* 58: 1101–1106.

Lak F, Zandi-Sohani N, Ghodoum Parizipour MH, Ebadollahi A, 2022. Synergic effects of some plant-derived essential oils and Iranian isolates of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* Sorokin to control *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Frontiers in Plant Science* 13: 1075761.

Lee BH, Lee SE, Annis PC, Pratt SJ, Park BS, *et al*., 2002. Fumigant toxicity of essential oils and monoterpenes against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 5(2): 237–40.

Li J, Lehmann S, Weissbecker B, Ojeda Naharros I, Schütz S, *et al*., 2013. Odoriferous defensive stink gland transcriptome to identify novel genes necessary for quinone synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *PLoS Genetics* 9(7): e1003596

Lu H, Zhou J, Xiong S, Zhao S, 2010. Effects of low-intensity microwave radiation on *Tribolium castaneum* physiological and biochemical characteristics and survival. *Journal of Insect Physiology* 56: 1356–1361.

Mahmoodvand S, Shakarami J, Vafaei-Shoushtari R, 2015. Fumigation toxicity of four plant essential oils on adults of *Tribolium castaneum* (Herbst) and *T. confusum* (Du val). *Journal of Entomological Research* 6(4): 367–378.

Mirkazemi F, Bandani A, Sabahi G, 2010. Fumigant toxicity of essential oils from five officinal plants against two stored product insects: cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) and red flour

beetle, *Tribolium castaneum* (Herbest). *Plant Protection* 32(2): 37–53.

Mohamed GA, 2009. Increasing the efficacy of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Metchnikoff) Soroken and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. using certain essential oils against desert locust and grasshoppers. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 19: 67–72.

Nana P, Ekesi S, Nchu F, Maniania NK, 2016. Compatibility of *Metarhizium anisopliae* with *Calpurnia aurea* leaf extracts and virulence against *Rhipicephalus pulchellus*. *Journal of Applied Entomology* 140(8): 590–597.

Nardoni S, Ebani VV, D'Ascenzi C, Pistelli L, Mancianti F, 2018. Sensitivity of entomopathogenic fungi and bacteria to plants secondary metabolites, for an alternative control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in cattle. *Frontiers in Pharmacology* 9: 937.

Neves PMOJ, Hirose E, Tchujo PT, Moino Jr. A, 2001. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology* 30: 263–268.

Oviedo-Sarmiento JS, Cortes JJ, Avila WA, Suarez LE, Daza EH, *et al*., 2021. Fumigant toxicity and biochemical effects of selected essential oils toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pesticide Biochemistry & Physiology* 179: 104941.

Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M, 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18: 414–420.

Picollo MI, Toloza AC, Mougabure CG, Zygadlo J, Zerba E. 2008. Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids. *Fitoterapia* 79: 271–278.

Pimentel MA, Faroni LR, da Silva FH, Batista MD, Guedes RN, 2010. Spread of phosphine resistance among Brazilian populations of three species of stored product insects. *Neotropical Entomology* 39: 101–107.

Radha R, Murugan K, Wei H, Amerasan D, Madhiyazhagan P, *et al.*, 2014. Insecticidal activity of essential oils and entomopathogenic fungi against cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Insecta: Coleoptera: Bruchidae). *International Journal of Current Innovation Research* 1: 12–9.

Roozbehani Z, Kechili F, Shakarami J, Mosadegh MS, 2013. Fumigant toxicity of essential oils from four plant species on adult *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae). *Plant Protection* 36(4): 1–9.

Rumbos CI, Athanassiou CG, 2017. Use of entomopathogenic fungi for the control of stored-product insects: can fungi protect durable commodities? *Journal of Pest Science* 90(3): 839–854.

Salem N, Bachrouch O, Sriti J, Msaada K, Khammassi S, *et al*., 2017. Fumigant and repellent potentials of *Ricinus communis* and *Mentha pulegium* essential oils against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*. *International Journal of Food Properties* 20: S2899–S2913.

Shafighi Y, Ziaee M, Ghosta Y, 2014. Diatomaceous earth used against insect pests, applied alone or in combination with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Journal of Plant Protection Research* 54(1): 62–66.

Sohrabi F, Jamali F, Michaud JP, 2021. Sublethal concentrations of spinosad synergize the pathogenicity of fungi to larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *European Journal of Entomology* 118: 142–147.

Soylu EM, Soylu S, Kurt S, 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161: 119–128.

Soylu S, Yigitbas H, Kurt S, 2007. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1021–1030.

St Leger RJ, Allee LL, May B, Staples RC, Roberts DW, 1992. Worldwide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. *Mycological Research* 96: 1007–1115.

Taban A, Saharkhiz MJ, Hooshmandi M, 2017. Insecticidal and repellent activity of three *Satureja* species against adult red flour beetles, *Tribolium*

*castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae*). Acta Ecologica Sinica* 37: 201–206.

Talukder F, 2009. Pesticide resistance in stored-product insects and alternative biorational management: a brief review. *Journal of Agricultural & Marine Sciences* 14: 9–15.

Tripathi AK, Prajapati V, Verma N, Bahl JR, Bansal RP, *et al*., 2002. Bioactivities of the leaf essential oil of *Curcuma Longa* (Var. Ch-66) on three species of stored-product beetles (Coleoptera). *Journal of Economic Entomology* 95: 183–189.

Wang J, Zhu F, Zhou XM, Niu CY, Lei CL, 2006. Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* 42(3): 339–47.

Zandi Sohani N, Ramezani L, 2012. Investigation into Insecticidal Activity of *Mentha arvensis* and *Mentha pulegium* essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Plant Protection* 35(2): 1–11.