



استفاده تلفیقی از اسانس گیاه پونه *Beauveria bassiana* و *Mentha longifolia* برای مدیریت جمعیت *Tribolium castaneum* در شرایط آزمایشگاهی

مرتضی باقری خانیمنی^۱

<https://orcid.org/0009-0006-7855-6537>

امین صدارتیان جهرمی*^۲

<https://orcid.org/0000-0002-2588-2359>

حجت‌اله محمدی^۳

<https://orcid.org/0000-0003-3905-7066>

مصطفی حقانی^۴

<https://orcid.org/0009-0003-3855-4922>

۱ تا ۴- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

چکیده: در پژوهش حاضر، اثرات تلفیقی اسانس استخراج شده از گیاه پونه و اسپورهای بیماری‌زای جدایه OZ1 قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill در کاهش جمعیت شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* (Herbst) مورد بررسی قرار گرفت. بیش‌ترین درصد تلفات حشرات بالغ شپشه قرمز آرد (۸۲/۵ درصد) در بالاترین غلظت مورد استفاده از اسانس پونه (۲۶/۶۷ میکرولیتر اسانس در لیتر هوا) مشاهده شد. غلظت لازم برای نابودی ۵۰ درصد حشرات مورد مطالعه (LC₅₀) برابر ۱۵/۲۶ میکرولیتر اسانس در لیتر هوا) برآورد شد. اسانس پونه قادر به حفظ اثرات کشندگی مطلوب خود تا حدود ۲۰ روز بود. تیمار حشرات بالغ با غلظت‌های مختلف اسانس پونه (LC₁₀، LC₂₀، LC₃₀ و LC₄₀) روند افزایش جمعیت و تغذیه شپشه قرمز آرد را طی یک دوره سه ماهه با اختلال مواجه نمود. ارزیابی پتانسیل بیماری‌زایی قارچ بیمارگر *B. bassiana* نشان داد که حشرات بالغ پس از مواجهه با بالاترین غلظت مورد استفاده (۱۰^۸ کنیدی بر میلی‌لیتر)، تنها متحمل مرگ و میر حدود ۶ درصدی شدند. در مرحله نهایی، اثرات تیمارهای تلفیقی شامل ۱- استفاده هم‌زمان از غلظت‌های مختلف زیرکشنده اسانس (LC₅، LC₁₀، LC₁₅، LC₂₀ و LC₂₅) و اسپورهای بیماری‌زای قارچ بیمارگر (غلظت ۱۰^۶ کنیدی بر میلی‌لیتر)، ۲- تقدم استفاده از اسانس و ۳- تقدم استفاده از قارچ بیمارگر، در ایجاد تلفات در جمعیت حشرات بالغ شپشه قرمز آرد مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که درصد تلفات حشرات بالغ شپشه قرمز آرد در تیمارهای تلفیقی کاربرد هم‌زمان اسانس و قارچ و تقدم استفاده از اسانس، به‌مراتب بیش‌تر بود. یافته‌های پژوهش حاضر اثرات هم‌افزایی تیمارهای تلفیقی را تأیید می‌کند.

تاریخ دریافت:

۱۴۰۳/۱۰/۵

تاریخ پذیرش:

۱۴۰۳/۱۲/۲۰

واژه‌های کلیدی: آفات انباری، اسانس‌های گیاهی، قارچ‌های بیمارگر حشرات، مدیریت تلفیقی آفات

Citation: Bagheri-Khanimani, M., Sedartian-Jahromi, A., Mohammadi, H. & Haghani, M. (2025). Integrated application of essential oil of *Mentha longifolia* and *Beauveria bassiana* for managing the population of *Tribolium castaneum* under laboratory conditions. *Plant Pest Research*, 14(4), 71-89. **Doi:** <https://doi.org/10.22124/ijprj.2025.29979.1627>



*Corresponding author: Sedartian@yu.ac.ir

مقدمه

محصولات کشاورزی پس از برداشت تا زمان مصرف باید به مدت زمان طولانی در انبارها نگهداری شوند و طی این دوره، ممکن است مورد حمله آفات انباری قرار گیرند. متأسفانه هر ساله مقدار قابل توجهی از تولیدات کشاورزی به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه، در اثر خسارت آفات در انبارها از بین می‌روند. آفات انباری به‌صورت کمی و کیفی به محصولات انباری خسارت وارد کرده و در برخی موارد آن‌ها را غیرقابل مصرف می‌نمایند (Hamel et al., 2020). دارا بودن ویژگی‌هایی مانند پراکندگی جهانی، قدرت تکثیر قابل توجه، تعداد نسل زیاد، کوتاه بودن طول نسل و دامنه میزبانی گسترده، از جمله علت‌های اصلی بروز خسارت‌های قابل توجه توسط بسیاری از آفات در شرایط مساعد محیط انبار می‌باشند (Hagstrum & Flinn, 2014).

شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* (Herbst) از جمله مهم‌ترین آفات انباری است که لاروها و حشرات کامل آن به طیف گسترده‌ای از محصولات انباری حمله نموده و باعث کاهش کمیت و کیفیت محصولات انبار شده می‌شوند (Jung et al., 2020). مدیریت مؤثر آفات انباری مانند شپشه قرمز آرد که می‌تواند به‌شدت به محصولات ذخیره‌شده از جمله برنج آسیب رسانند، یکی از چالش‌های اساسی در حوزه حفاظت از ذخایر غذایی است. با توجه به مقاومت روزافزون این آفات به حشره‌کش‌های شیمیایی و نگرانی‌های مرتبط با استفاده گسترده از این سموم (Negi et al., 2022)، توجه پژوهشگران به استفاده از روش‌های جایگزین و کم‌خطر در برنامه‌های مدیریتی این گروه از آفات معطوف شده است. در سال‌های اخیر، کاربرد روش‌های مدیریت تلفیقی با استفاده از ترکیبات طبیعی و عوامل بیولوژیک به‌عنوان راهکاری مؤثر و ایمن برای کاهش جمعیت این گروه از آفات مطرح شده است (Stejskal et al., 2015).

گیاهان از متابولیت‌های ثانویه خود مانند آلکالوئیدها، تریپنوئیدها، استروئیدها و سایر ترکیبات آروماتیک، برای مقابله با عوامل خسارت‌زا استفاده می‌کنند (Isman, 2006). اسانس‌های گیاهی حاوی ترکیبات فوق‌العاده قوی هستند که علاوه بر خاصیت دورکنندگی و بازدارندگی تخم‌ریزی، قادر به ایجاد کشندگی در جمعیت حشرات مورد مطالعه نیز می‌باشند (Fields & White, 2002). اسانس‌های استخراج شده از گیاهان مختلف مانند پونه *Mentha longifolia* L. به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال زیستی متنوع (Shahmirzaei et al., 2016)، اثرات دفع‌کنندگی و کشندگی قابل توجهی علیه گونه‌های مختلف آفات انباری از خود نشان داده و بر همین اساس در پژوهش‌های مختلف پتانسیل آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است (Laing et al., 2012; Moharrampour & Negahban, 2014; Ziaee et al., 2014).

قارچ‌های بیمارگر حشرات گروهی از دشمنان طبیعی مورد استفاده در کاهش جمعیت آفات می‌باشند، که در سال‌های اخیر توجهات بسیاری را به خود معطوف نموده‌اند (Betta, 2018). قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. به‌دلیل پتانسیل بیماری‌زایی مطلوب، دامنه میزبانی قابل توجه و سهولت پرورش آزمایشگاهی، به‌عنوان گزینه‌ای کارآمد در برنامه‌های کنترل بیولوژیک آفات مورد توجه قرار گرفته است (Charnley, 2003). اسپورهای بیماری‌زای تولید شده توسط این بیمارگر با نفوذ به بدن حشرات میزبان و ایجاد آلودگی، موجبات مرگ تدریجی آن‌ها را فراهم می‌آورند (Gabarty et al., 2014; Yanar et al., 2019). عملکرد مطلوب این بیمارگر در کاهش جمعیت آفات، زمینه ارزیابی پتانسیل آن‌ها در کاهش جمعیت آفات انباری را نیز فراهم نموده است. از جمله بررسی‌های صورت گرفته در این زمینه می‌توان به مطالعه کارایی زیستی این بیمارگر در کاهش جمعیت سوسک چهارنقطه‌ای *Callosobruchus maculatus* (F.) (Cherry et al., 2005) و شپشه برنج *Sitophilus oryzae* (L.) (Sheeba et al., 2005) اشاره نمود.

یکی از راهکارهای بالقوه جهت مدیریت جمعیت آفات انباری، استفاده تلفیقی از اسانس‌های گیاهی و عوامل بیولوژیک مانند قارچ‌های بیمارگر حشرات می‌باشد. با وجود این که بررسی‌های متعددی در خصوص ارزیابی اثرات مستقل اسانس‌های گیاهی و قارچ‌های بیمارگر حشرات در کاهش جمعیت آفات صورت گرفته است، اما هیچ‌گونه اطلاعاتی در خصوص میزان اثرگذاری عوامل مذکور در شرایط استفاده هم‌زمان در دسترس نیست. این امر در حالی است که نتایج اغلب پژوهش‌های صورت گرفته نشان می‌دهند

که استفاده تلفیقی از روش‌های مختلف کنترلی آفات می‌تواند اثرات به‌مراتب مناسب‌تری نسبت به شرایط استفاده مستقل آن‌ها، به‌دنبال داشته باشد (Athanasassiou et al., 2009; Reihani et al., 2016; Zarasvandi et al., 2023). بر همین اساس، در پژوهش حاضر اثرات استفاده مستقل و تلفیقی از اسانس پونه و اسپوره‌های بیماری‌زای قارچ بیمارگر *B. bassiana* در مدیریت جمعیت شپشه قرمز آرد مورد مطالعه قرار گرفت. امید است یافته‌های پژوهش حاضر تأثیر به‌سزایی در افزایش میزان پایداری برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات انباری و به‌ویژه شپشه قرمز آرد داشته باشد.

مواد و روش‌ها

کلنی شپشه قرمز آرد

به‌منظور تشکیل کلنی شپشه قرمز آرد، نمونه‌های اولیه حشرات کامل این آفت از انبارهای برنج شهر خانیمن (استان فارس، شهرستان مرودشت، بخش کامفیروز) جمع‌آوری شدند. شناسایی نمونه‌ها با بررسی خصوصیات مورفولوژیک حشرات کامل و بر اساس کلید شناسایی ارائه شده توسط ریز (Rees, 2007) صورت گرفت. نمونه‌ها پس از انتقال به شرایط آزمایشگاه به‌دقت مورد بررسی قرار گرفته و حشرات بالغ آفت با استفاده از اسپیراتور از برنج‌های آلوده جمع‌آوری شده و در تشکیل کلنی آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفتند. حشرات بالغ، به ظروف پلاستیکی به قطر ۱۵ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر انتقال یافته و ۲۵۰ گرم برنج ایرانی رقم کامفیروز به‌منظور تغذیه و تخم‌ریزی در اختیار آن‌ها قرار گرفت. ظروف پرورش تا زمان ازدیاد جمعیت حشرات در شرایط آزمایشگاه با تاریکی مطلق و دمای 25 ± 3 درجه سلسیوس نگهداری شدند. دمای محیط پرورش به‌صورت روزانه با استفاده از دماسنج جیوه‌ای ثبت و در حالت بهینه حفظ شد.

جمع‌آوری گیاه پونه و استخراج اسانس

اندام‌های هوایی گیاه پونه از مزارع برنج شهر خانیمن جمع‌آوری شده و برای شناسایی به هرباریوم دانشگاه یاسوج ارسال شدند. گیاهان جمع‌آوری شده روی کاغذ و در شرایط تاریکی مطلق کاملاً خشک شده و پس از خشک شدن، درون پاکت‌های کاغذی قرار گرفتند. در فرآیند خشک کردن، هوادهی روزانه گیاهان برای ممانعت از رشد قارچ انجام شد. اندام‌های گیاهی خشک شده به‌منظور استخراج اسانس به آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج منتقل شده و با استفاده از دستگاه آسیاب برقی (Model 2568, Arshia Co.) پودر شدند. برای استخراج اسانس از دستگاه کلونجر استفاده شد. اسانس استخراج شده به میکروتیوب‌های با حجم دو میلی‌لیتر منتقل شد. به‌منظور آبگیری نهایی از اسانس استخراج شده، از انیدرید سولفات سدیم استفاده شد. در نهایت، اسانس استخراج شده با استفاده از سمپلر به آرامی از میکروتیوب برداشته شده و به میکروتیوب دیگری منتقل شد. اطراف درب میکروتیوب‌ها ابتدا با نوار پارافیلیم محصور شده و برای ممانعت از برخورد نور، بدنه ظروف به‌طور کامل با استفاده از سه لایه ورق فویل آلومینیومی پوشانده شد. اسانس‌های استخراج شده تا زمان استفاده در آزمایش‌ها، درون یخچال آزمایشگاهی و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تکثیر قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana*

نمونه اولیه از جدایه OZ1 قارچ بیمارگر *B. bassiana* از مجموعه قارچ‌های بیمارگر حشرات موجود در آزمایشگاه کنترل بیولوژیک گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج تهیه شد. این نمونه ابتدا در شرایط کاملاً سترون روی محیط کشت Sabouraud dextrose agar + Yeast (SDAY)، تکثیر شد. در کشت قارچ از ظروف پتری سترون با قطر ۶ سانتی‌متر استفاده شد. نمونه‌ها پس از کشت به مدت ۱۴ روز درون دستگاه انکوباتور با دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس و شرایط تاریکی کامل نگهداری

شده و سپس، اسپورهای غیرجنسی تولید شده از سطح محیط کشت برداشت شد. اسپورهای به دست آمده در انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمون زیست‌سنجی و ارزیابی اثرات کشندگی اسانس پونه علیه شپشه قرمز آرد

در این آزمون، از شیشه‌های با رنگ قهوه‌ای تیره و حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر (شیشه مک کارتی) استفاده شد. حجم‌های مختلف اسانس با استفاده از سمپلر روی یک تکه کاغذ صافی سترون که به صورت دایره‌ای با قطر دو سانتی‌متر بریده شده و درون درب ظروف مک کارتی تعبیه شده بودند، ریخته شدند. سپس، تعداد ۱۰ حشره بالغ با طول عمر کم‌تر از ۲۴ ساعت از کلنی موجود در شرایط آزمایشگاه انتخاب و به همراه ۲۰ عدد دانه برنج درون هر شیشه منتقل شدند. پس از انتقال حشرات کامل، درب شیشه‌ها ابتدا با استفاده از تورهای بسیار نازک بسته شد. تورهای مورد استفاده در بستن درب ظروف حدود دو میلی‌متر با قطعات کاغذ صافی آغشته به اسانس فاصله داشته و از تماس حشرات با آن‌ها ممانعت می‌نمودند. با استفاده از این شیوه، از ایجاد اثرات تماسی جلوگیری شد. سپس، درب ظروف که درون آن‌ها کاغذهای صافی آغشته به اسانس قرار گرفته بود، روی شیشه‌ها بسته شد. برای جلوگیری از خروج اسانس، اطراف درب‌ها با استفاده از چند لایه نوار پارافیلیم به خوبی محصور شد. آزمایش در غلظت‌های مختلف (۶/۶۷، ۱۰/۰، ۱۳/۳۳، ۱۶/۶۷، ۲۰ و ۲۶/۶۷ میکرولیتر اسانس بر لیتر هوا) با حداقل پنج تکرار صورت پذیرفت. بررسی‌ها در تیمار شاهد نیز همانند آن‌چه که در بالا شرح داده شد، اما با استفاده از آب مقطر استریل انجام گرفت. ظروف آزمایش در دمای 25 ± 3 درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مطلق قرار گرفته و با گذشت ۲۴ ساعت، میزان تلفات حشرات کامل در هر غلظت به دقت شمارش و ثبت شد.

ارزیابی میزان ماندگاری خاصیت کشندگی اسانس

پس از انجام آزمون زیست‌سنجی، برای تعیین میزان ماندگاری خاصیت کشندگی اسانس استخراج شده از گیاه پونه علیه حشرات کامل شپشه آرد در طی زمان مشخص، غلظت ۱۵/۲۹ میکرولیتر بر لیتر هوا از اسانس به عنوان غلظت کشنده ۵۰ درصد افراد جمعیت (LC₅₀) تعیین شده (بر اساس نتایج به دست آمده در آزمون زیست‌سنجی) و بررسی‌هایی به شرح زیر انجام پذیرفت. ابتدا، غلظت LC₅₀ همانند آن‌چه که آزمون زیست‌سنجی بیان شد، درون ۵۵ شیشه مک کارتی اضافه شده و درب تمام شیشه‌ها بسته و اطراف آن با نوار پارافیلیم مسدود شدند. از ۵۵ شیشه آماده شده، درب پنج شیشه بلافاصله پس از استفاده از اسانس باز شده، تعداد ۱۰ حشره هم‌سن با طول عمر کم‌تر از ۲۴ ساعت به همراه ۲۰ دانه برنج به هر شیشه اضافه شده و دوباره درب‌ها بسته و با نوار پارافیلیم مسدود شدند. این تیمار به عنوان تیمار با فاصله زمانی صفر در نظر گرفته شد. با گذشت چهار روز، پنج شیشه دیگر از ۵۰ شیشه باقی‌مانده انتخاب شده و تعداد ۱۰ حشره هم‌سن با طول عمر کم‌تر از ۲۴ ساعت به همراه ۲۰ دانه برنج به هر کدام اضافه شده و دوباره درب‌ها بسته و با نوار پارافیلیم مسدود شدند. این آزمون در زمان‌های ۱۰، ۱۳، ۱۶، ۱۹، ۲۲، ۲۵، ۲۸ و ۳۱ روز نیز مشابه با همین رویه انجام پذیرفت. در تمام بررسی‌ها، تعداد مرگ و میر حشرات بعد از ۲۴ ساعت شمارش و ثبت شد.

ارزیابی اثرات اسانس بر روند رشد جمعیت و میزان تغذیه

آزمون‌های این مرحله با هدف ارزیابی اثرات غلظت‌های LC₁₀ (5.19 μL/L air)، LC₂₀ (7.52 μL/L air)، LC₃₀ (9.83 μL/L air) و LC₄₀ (12.35 μL/L air) اسانس پونه بر روند رشد جمعیت و میزان تغذیه شپشه آرد طی سه ماه متوالی صورت پذیرفت. بدین منظور، ابتدا دو کیلوگرم برنج به مدت ۷۲ ساعت درون فریزر قرار گرفت تا آلودگی‌های احتمالی به شپشه قرمز آرد از بین رفته و اختلالی در روند ثبت نتایج ایجاد نشود. برنج‌های مذکور پس از اتمام این مدت توسط الک تمیز شده و در بررسی‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. در مرحله بعد، به هر شیشه مک کارتی ۱۵ گرم برنج اضافه شد. وزن برنج‌ها به دقت و به کمک ترازوی دیجیتال (Model EJ-303, A&D Co.) با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. برای هر غلظت و تیمار شاهد ۱۰ شیشه در نظر گرفته شد (در مجموع ۵۰ شیشه). در ۱۰ شیشه هیچ اسانسی استفاده نشده و ۱۰ حشره بالغ هم‌سن با طول عمر کم‌تر از ۲۴ ساعت به هر یک از آن‌ها

اضافه شد. داده‌های به‌دست آمده از این ظروف به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شدند. غلظت‌های مورد مطالعه (LC₁₀، LC₂₀، LC₃₀ و LC₄₀) نیز هر کدام در ۱۰ شیشه (به روش بیان شده) اضافه شدند. سپس، به هر شیشه ۱۰ حشره هم‌سن با طول عمر کم‌تر از ۲۴ ساعت و ۱۵ گرم برنج اضافه شد. تمام شیشه‌ها در شرایط دمایی ۲۵±۳ درجه سلسیوس و تاریکی مطلق قرار گرفته و در فواصل زمانی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز، درب آن‌ها باز و ثبت اطلاعات انجام پذیرفت. در پایان ماه اول، تعداد حشرات کامل به‌همراه وزن دانه‌های برنج در هر شیشه ثبت شده و دوباره نمونه‌ها به درون شیشه منتقل و درب آن‌ها مسدود شد. ثبت اطلاعات در زمان‌های دو و سه ماه نیز مشابه با همین رویه انجام پذیرفت؛ با این تفاوت که علاوه بر شمارش حشرات کامل، تعداد لاروهای درون هر ظرف نیز شمارش و ثبت شد.

آزمون زیست‌سنجی قارچ بیمارگر

در آزمون زیست‌سنجی قارچ بیمارگر، ابتدا اسپورهای غیرجنسی و بیماری‌زای قارچ بیمارگر *B. bassiana* از سطح محیط کشت برداشت شده و سپس غلظت اسپور در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده با استفاده از لام گلوبول‌شمار تعیین شد. در مرحله بعد، ابتدا غلظت اسپور در سوسپانسیون تهیه شده به ۱۰^۸ اسپور در میلی‌لیتر رسیده و این سوسپانسیون به عنوان سوسپانسیون پایه (مادری) در تهیه سایر غلظت‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای جدا شدن اسپورها از یکدیگر و تهیه سوسپانسیون یکنواخت، ۵۰۰ میکرولیتر محلول توئین ۸۰ با غلظت ۰/۰۲ درصد به ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از دستگاه شیکر، مخلوط شد. غلظت‌های ۱۰، ۱۰^۲، ۱۰^۳، ۱۰^۴، ۱۰^۵، ۱۰^۶ و ۱۰^۷ از محلول پایه تهیه و هر یک به‌صورت جداگانه درون ظروف اسپری دستی با حجم ۲۰ میلی‌لیتر ریخته شدند.

برای انجام بررسی‌ها، از ظروف پتری سترون با قطر شش سانتی‌متر استفاده شد. به هر ظرف تعداد ۱۰ حشره بالغ با طول عمر کم‌تر از ۲۴ ساعت منتقل شد. غلظت‌های تهیه شده به صورت جداگانه در سطح پنج ظرف پتری که حاوی حشرات بالغ بودند، پاشیده شدند. سپس، به هر ظرف تعداد ۲۰ دانه برنج اضافه شده و درب آن‌ها با استفاده از نوار پارافیلیم به مدت ۲۴ ساعت محصور شد. ظروف مورد مطالعه در شرایط دمایی ۲۵±۳ درجه سلسیوس و تاریکی مطلق قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، نوار پارافیلیم از اطراف درب ظروف باز شد. مرگ و میر حشرات پس از گذشت شش روز شمارش و ثبت شد. به‌منظور حصول اطمینان از دقت داده‌های به‌دست آمده، آزمایش دو بار در طول زمان تکرار شد.

بررسی‌های صورت گرفته با تلفیق اسانس پونه و قارچ بیمارگر *B. bassiana*

آزمون‌های این مرحله با هدف ارزیابی اثرات متقابل موجود میان اسانس استخراج شده از گیاه پونه و اسپورهای بیماری‌زای قارچ بیمارگر *B. bassiana* بر مرگ و میر حشرات بالغ شپشه قرمز آرد انجام شد. در این مرحله، ابتدا درصد تلفات حشرات بالغ شپشه قرمز آرد در تیمار شاهد و غلظت‌های LC₅ (۴ میکرولیتر بر لیتر هوا)، LC₁₀ (۵/۳۴ میکرولیتر بر لیتر هوا)، LC₁₅ (۶/۶۷ میکرولیتر بر لیتر هوا)، LC₂₀ (۷/۳۴ میکرولیتر بر لیتر هوا) و LC₂₅ (۸/۶۷ میکرولیتر بر لیتر هوا) اسانس پونه به‌صورت جداگانه مورد مطالعه قرار گرفت. سپس، اثرات تلفیقی غلظت‌های فوق و غلظت ۱۰^۶ اسپور از قارچ بیمارگر *B. bassiana* در ایجاد مرگ و میر حشرات مورد مطالعه، ارزیابی شد. ارزیابی‌های این مرحله در قالب سه آزمایش شامل ۱- استفاده هم‌زمان، ۲- تقدم استفاده از اسانس و ۳- تقدم استفاده از قارچ بیمارگر و با استفاده از پنج تکرار در هر تیمار انجام پذیرفت.

در آزمون استفاده هم‌زمان، ۳۵ شیشه مک‌کارتی آماده و درون هر کدام ۱۰ حشره بالغ هم‌سن با طول عمر کم‌تر از ۲۴ ساعت اضافه شد. در پنج شیشه به عنوان تیمار شاهد، هیچ تیماری اعمال نشد. در پنج شیشه فقط از اسپورهای بیماری‌زای قارچ بیمارگر *B. bassiana* با غلظت ۱۰^۶ استفاده شد. سایر تیمارها (غلظت ۱۰^۶ قارچ+غلظت LC₅ اسانس، غلظت ۱۰^۶ قارچ+غلظت LC₁₀ اسانس،

غلظت ۱۰^۶ قارچ+غلظت LC₁₅ اسانس، غلظت ۱۰^۶ قارچ+غلظت LC₂₀ اسانس و غلظت ۱۰^۶ قارچ+غلظت LC₂₅ اسانس) نیز به صورت جداگانه و هر کدام در پنج تکرار مورد بررسی قرار گرفتند.

در آزمون تقدم استفاده از اسانس، ابتدا غلظت‌های مختلف اسانس مورد استفاده قرار گرفته و درب ظروف به مدت ۲۴ ساعت بسته شد. سپس، درب ظروف باز شده و تیمار قارچ بیمارگر با فاصله زمانی ۲۴ ساعت پس از استفاده از اسانس اعمال شد. در این مرحله، آزمون دیگری نیز مشابه با همین رویه انجام پذیرفت، اما پاشش اسپورهای بیماری‌زای قارچ بیمارگر در فاصله زمانی ۴۸ ساعت پس از استفاده از اسانس صورت پذیرفت. مشابه با همین رویه، در آزمون تقدم استفاده از قارچ نیز ابتدا غلظت ۱۰^۶ قارچ بیمارگر مورد استفاده قرار گرفته و درب ظروف به مدت ۲۴ ساعت بسته شد. سپس، درب ظروف باز شده و تیمار اسانس با فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از استفاده از قارچ بیمارگر اعمال شد. در تمام آزمون‌های تلفیقی، با گذشت ۷۲ ساعت از اعمال تیمارهای مورد مطالعه، مرگ و میر حشرات شمارش و ثبت شد.

تجزیه آماری داده‌ها

در تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده در آزمون‌های زیست‌سنجی از رویه Probit در محیط نرم‌افزار آماری SPSS (ver.25) استفاده شد. مقایسه آماری درصد تلفات حشرات کامل در تیمارهای مختلف مورد مطالعه با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و نرم‌افزار آماری SAS (ver.99) صورت پذیرفت. در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف مورد مطالعه، از آزمون SNK و در سطح احتمال ۵ درصد برای گروه‌بندی میانگین‌ها استفاده شد. ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excell (ver.2021) صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

ارزیابی اثرات اسانس استخراج شده از اندام‌های هوایی گیاه پونه بر شپشه قرمز آرد درصد تلفات حشرات کامل شپشه آرد و آزمون زیست‌سنجی

پس از بررسی اثرات کشندگی غلظت‌های مختلف اسانس پونه، غلظت‌های ۶/۶۷، ۱۰/۰، ۱۳/۳۳، ۱۶/۶۷، ۲۰ و ۲۶/۶۷ میکرولیتر اسانس بر لیتر هوا برای انجام آزمون‌های اصلی مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده، میانگین درصد تلفات مشاهده شده در غلظت‌های بالا از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار بود ($F_{6,21} = 14.50, P < 0.0001$). علاوه بر این، هیچ گونه مرگ و میری در تیمار شاهد مشاهده نشد. درصد تلفات حشرات بالغ شپشه قرمز آرد در غلظت‌های فوق به صورت وابسته به غلظت اسانس افزایش یافته و به ترتیب برابر با ۲۰، ۳۲/۵، ۳۵، ۵۲/۵، ۵۷/۵ و ۸۲/۵ درصد محاسبه شد. از آنجا که درصد تلفات مشاهده شده در دامنه بین ۲۰ تا ۸۰ درصد قرار داشت، نتایج این مرحله در انجام آزمون زیست‌سنجی نیز مورد استفاده قرار گرفت.

اطلاعات ارائه شده در جدول ۱ نشان‌دهنده نتایج حاصل از آزمون زیست‌سنجی اسانس استخراج شده از گیاه پونه علیه حشرات کامل شپشه قرمز آرد می‌باشند. بر اساس تجزیه و تحلیل صورت گرفته، مقدار محاسبه شده آماره P در آزمون پروبیت برابر با ۰/۹۳۶ محاسبه شد که بیانگر برآزش مناسب مدل خطی پروبیت با داده‌های به دست آمده در پژوهش حاضر می‌باشد. علاوه بر این، مقدار بسیار پایین آماره مربع کای (۰/۸۱۸)، بیانگر نزدیکی زیاد فراوانی مورد انتظار و مشاهده شده در تجزیه و تحلیل‌های صورت گرفته در این مرحله است. بر اساس اطلاعات ارائه شده در جدول ۱، استفاده از مقدار ۱۵/۲۹ میکرولیتر اسانس در هر لیتر هوا قادر به از بین بردن ۵۰ درصد جمعیت مورد مطالعه شپشه قرمز آرد طی زمان ۲۴ ساعت است.

جدول ۱- سمیت تنفسی اسانس استخراج شده از گیاه *Mentha longifolia* علیه حشرات کامل شپشه قرمز آرد

Tribolium castaneum

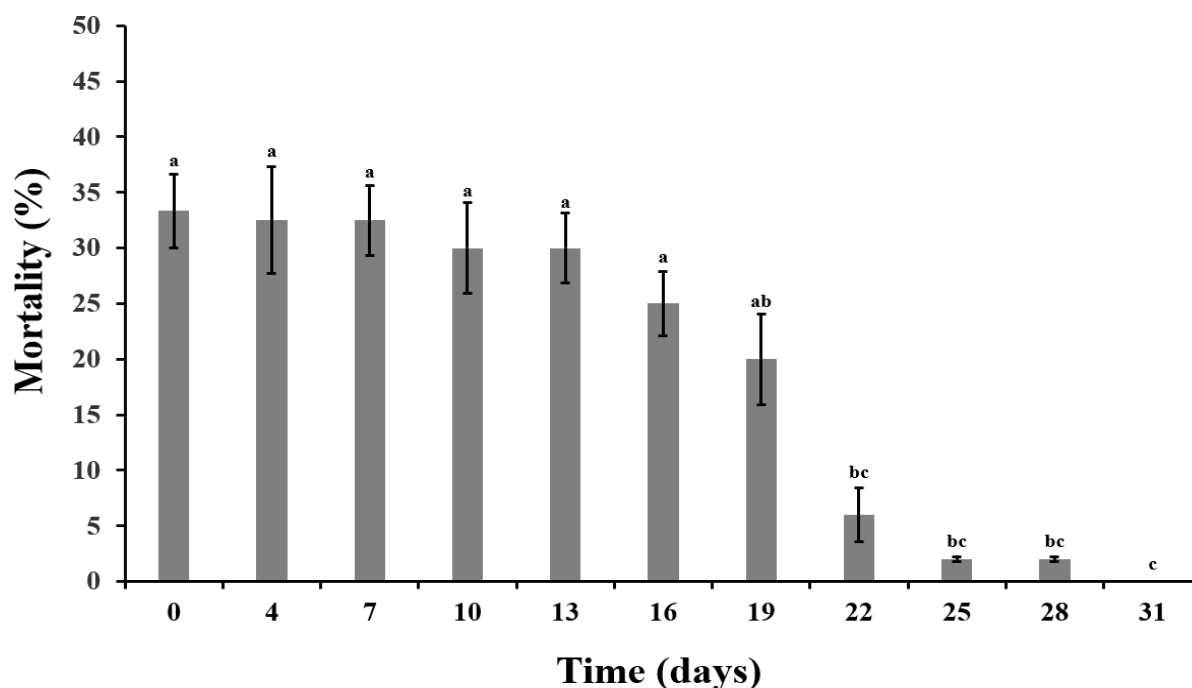
Table 1. Fumigant toxicity of essential oil extracted from *Mentha longifolia* on the adult of red flour beetle *Tribolium castaneum*

Concentrations ($\mu\text{L/L}$ air) (Fiducial limits)					Slope \pm SE	χ^2 (df)
LC ₁₀	LC ₂₀	LC ₃₀	LC ₄₀	LC ₅₀		
5.19 (0.69-8.24)	7.52 (1.98-10.62)	9.83 (4.11-13.11)	12.35 (7.25-16.62)	15.29 (10.94-23.40)	2.73 \pm 0.93	0.818 (4)

در پژوهش حاضر، LC₅₀ اسانس پونه برابر با ۱۵/۲۹ میکرولیتر بر لیتر هوا به دست آمد. در بررسی صنفی و همکاران (Senfi et al., 2014) مقدار محاسبه شده LC₅₀ برای اسانس استخراج شده از گیاه برگ بو *Laurus nobilis* L. به میزان ۲۴۳/۷۸ میکرولیتر بر لیتر هوا و برای اسانس مورد *Myrtus communis* L. برابر با ۵۶/۱۱ میکرولیتر بر لیتر هوا به دست آمد که به طور قابل توجهی از مقدار محاسبه شده در پژوهش حاضر بالاتر می باشد. در بررسی صادقی و همکاران (Sadeghi et al., 2016) نیز مقدار محاسبه شده برای LC₅₀ اسانس گیاه بنه *Pistacia atlantica* Desf. برابر با ۲۹ میکرولیتر بر لیتر هوا محاسبه شد. مقایسه این گزارش ها با مقدار محاسبه شده در پژوهش حاضر بیانگر آن است که اسانس پونه به واسطه داشتن مقدار LC₅₀ پایین تر، سمیت بالاتری علیه حشرات کامل شپشه قرمز آرد دارا است. به بیان دیگر، برای ایجاد تلفات مدنظر در جمعیت حشرات بالغ شپشه قرمز آرد، به مقادیر کمتری اسانس گیاه پونه نیاز است که این مسأله تأثیر به سزایی در کاهش هزینه های مبارزه خواهد داشت. علاوه بر تفاوت در نوع اسانس مورد مطالعه، متفاوت بودن شرایط انجام آزمایش، غذای مورد استفاده در پرورش حشرات و جمعیت حشرات مورد مطالعه نیز از جمله مهم ترین عواملی است که در مشاهده چنین تفاوت هایی می توان مدنظر قرار داد. با در نظر گرفتن این نکته که سمیت تنفسی اسانس پونه بیش از سمیت تماسی آن می باشد (Shahmirzaei et al., 2016; Louni et al., 2018)، اثرات قابل توجه این اسانس علیه حشرات بالغ شپشه قرمز آرد بیانگر آن است که این ترکیب گیاهی از پتانسیل قابل توجهی به منظور استفاده در برنامه های مدیریتی آفات انباری برخوردار می باشد.

آزمون ماندگاری خاصیت کشندگی اسانس پونه علیه حشرات کامل شپشه آرد

اطلاعات ارائه شده در شکل ۱ میزان سمیت اسانس پونه علیه حشرات کامل *T. castaneum* را طی یک دوره ۳۱ روزه نشان می دهد. میزان کشندگی اسانس پونه علیه حشرات کامل شپشه قرمز آرد طی زمان به صورت معنی داری کاهش می یابد ($F_{10,37} = 8.57, P < 0.0001$). بیش ترین درصد کشندگی (۳۳/۳۳ درصد) در تیمار با فاصله زمانی صفر مشاهده شد، اما نکته قابل توجه، عدم اختلاف معنی دار درصد کشندگی ثبت شده در زمان های ۴، ۷، ۱۰، ۱۳، ۱۶ و ۱۹ روز با این زمان می باشد. نتایج به دست آمده در این آزمون نشانگر آن است که در صورت ایجاد و حفظ شرایط نفوذناپذیری در محیط انبار، اسانس پونه تا حدود ۲۰ روز خاصیت کشندگی خود را حفظ کرده و کشندگی ایجاد شده طی این مدت، اختلاف معنی داری با روز اول ندارد. علاوه بر این، اگرچه با افزایش زمان اثرات کشندگی اسانس مورد مطالعه کاهش یافت، اما نتایج به دست آمده نشان داد که با گذشت ۲۸ روز نیز اسانس پونه اثرات کشندگی خود را هر چند اندک (۲ درصد) حفظ نموده است. با گذشت ۳۱ روز، هیچ گونه خاصیت کشندگی مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱- ماندگاری اثرات کشندگی غلظت LC_{50} اسانس استخراج شده از گیاه *Mentha longifolia* علیه حشرات کامل شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum*

Figure 1. Durability of lethal effects of essential oil extracted from *Mentha longifolia* on the adult of red flour beetle *Tribolium castaneum*

* Different letters in each bar indicate significant difference (SNK, $P < 0.05$).

پایداری خاصیت کشندگی اسانس تا ۲۰ روز، مسأله‌ای بسیار قابل توجه و یک ویژگی مثبت برای اسانس مورد مطالعه می‌باشد و تأثیر به‌سزایی در قابلیت استفاده از آن در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات انباری دارد. در بسیاری از پژوهش‌های مشابه، دوام اثرات کشندگی اسانس‌ها به‌طور مشابه مورد بررسی قرار گرفته است. اثرات کشندگی اسانس درمنه کوهی *Artemisia herba alba* Asso. علیه شپشه قرمز آرد بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در ابتدا اثرات کشندگی اسانس بسیار بالا است، اما با گذشت زمان و افزایش مدت زمان تماس، اثرات کشندگی کاهش می‌یابد (Mohamed et al., 2014). مشابه با یافته‌های پژوهش حاضر، در این بررسی نیز با گذشت ۳۰ روز از آغاز آزمایش، میزان کشندگی به‌طور چشمگیری کاهش یافته و تلفاتی در جمعیت مورد مطالعه مشاهده نشد. طی یک بررسی مشخص شد که اسانس‌های استخراج شده از گیاهان میخک و گل محمدی پس از ۳۰ روز خاصیت کشندگی خود را به‌صورت کامل از دست می‌دهند (Elnabawy et al., 2021). پژوهش‌های صورت گرفته نشان می‌دهند که دوام اثرات کشندگی اسانس‌ها با گذشت زمان کاهش می‌یابد. از آنجا که اسانس‌ها ترکیباتی فرار و ناپایدار می‌باشند، کاهش دوام اثرات کشندگی آن‌ها طی زمان طبیعی است (Nath et al., 2019). برای غلبه بر این محدودیت و افزایش دوام اثرات کشندگی اسانس‌ها، برخی از پژوهشگران تولید فرمولاسیون‌های نانو از اسانس‌های گیاهی را پیشنهاد کرده‌اند (Louni et al., 2018). نانوفرمولاسیون‌ها می‌توانند ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی اسانس‌ها را بهبود بخشند و از فرار سریع آن‌ها جلوگیری کنند (Sabbour & El-Aziz, 2019).

اثرات اسانس پونه بر میزان تغذیه و روند افزایش جمعیت شپشه آرد طی سه ماه متوالی

آزمون‌های این مرحله با هدف ارزیابی اثرات غلظت‌های LC_{10} (5.19 $\mu\text{L/L air}$), LC_{20} (7.52 $\mu\text{L/L air}$), LC_{30} (9.83 $\mu\text{L/L air}$) و LC_{40} (12.35 $\mu\text{L/L air}$) اسانس پونه بر روند رشد جمعیت و میزان تغذیه شپشه قرمز آرد طی سه ماه متوالی انجام پذیرفت.

جدول‌های ۲ و ۳ به ترتیب میانگین جمعیت لارو و حشرات کامل شپشه قرمز آرد طی سه ماه متوالی و پس از تیمارهای مختلف LC₁₀، LC₂₀، LC₃₀ و LC₄₀ اسانس پونه را نشان می‌دهند. جمعیت حشرات کامل در فاصله زمانی یک و دو ماه پس از شروع آزمایش تفاوت چشم‌گیری با یکدیگر نداشت، هرچند این تفاوت در تیمار شاهد بیش از سایر غلظت‌های مورد مطالعه بود. با وجود این، همانند تیمار شاهد، بیش‌ترین رشد جمعیت حشرات کامل در تمام غلظت‌های مورد مطالعه در فاصله زمانی بین ماه‌های دوم و سوم مشاهده شد. تفاوت در میانگین حشرات کامل بین ماه‌های دوم و سوم در تیمار شاهد و غلظت‌های مختلف LC₁₀، LC₂₀، LC₃₀ و LC₄₀ به ترتیب برابر با ۵/۷۰، ۴/۴۶، ۲/۸۰، ۱/۴۲ و ۱/۲۵ حشره کامل بود. این نتایج نشان می‌دهند که اگرچه در تمام تیمارهای مورد مطالعه روند افزایشی در جمعیت حشرات کامل بین ماه‌های دوم و سوم مشاهده شد، اما با افزایش غلظت مورد مطالعه از شدت این روند افزایشی کاسته شده است (جدول ۲).

جدول ۲- جمعیت حشرات کامل شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* (میانگین \pm خطای معیار) در غلظت‌های مختلف اسانس پونه *Mentha longifolia* طی سه ماه متوالی

Table 2. Population of adult of red flour beetle *Tribolium castaneum* (Mean \pm SE) at different concentrations of essential oil extracted from *Mentha longifolia* during three consequent months

Time	Different concentrations					F (df)	P
	Control	LC ₁₀	LC ₂₀	LC ₃₀	LC ₄₀		
1 th month	10.00 \pm 0.00 ^a	7.40 \pm 0.62 ^b	7.10 \pm 0.48 ^b	6.22 \pm 0.49 ^b	5.88 \pm 0.61 ^b	11.16 _(4,42)	<0.0001
2 nd month	11.20 \pm 0.42 ^a	7.40 \pm 0.64 ^b	7.00 \pm 0.50 ^b	6.25 \pm 0.56 ^b	5.75 \pm 0.75 ^b	14.62 _(4,41)	<0.0001
3 rd month	16.90 \pm 0.59 ^a	11.86 \pm 0.63 ^b	9.80 \pm 0.79 ^{bc}	7.67 \pm 1.21 ^c	7.00 \pm 0.98 ^c	21.56 _(4,41)	<0.0001

* Different letters in each row indicate significant difference (SNK, $P < 0.05$).

جدول ۳- جمعیت لاروهای شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* (میانگین \pm خطای معیار) در غلظت‌های مختلف اسانس پونه طی سه ماه متوالی

Table 3. Population of larva of red flour beetle *Tribolium castaneum* (Mean \pm SE) at different concentrations of essential oil extracted from *Mentha longifolia* during three consequent months

Time	Different concentrations					F (df)	P
	Control	LC ₁₀	LC ₂₀	LC ₃₀	LC ₄₀		
1 th month	nd	nd	nd	nd	nd	-	-
2 nd month	10.90 \pm 1.59 ^a	8.63 \pm 1.28 ^{ab}	7.00 \pm 0.96 ^{ab}	4.50 \pm 1.19 ^b	4.20 \pm 1.13 ^b	5.24 _(4,42)	0.0016
3 rd month	5.00 \pm 1.15 ^a	4.30 \pm 0.78 ^a	3.89 \pm 0.31 ^a	3.38 \pm 0.94 ^a	3.11 \pm 0.51 ^a	0.87 _(4,41)	0.4895

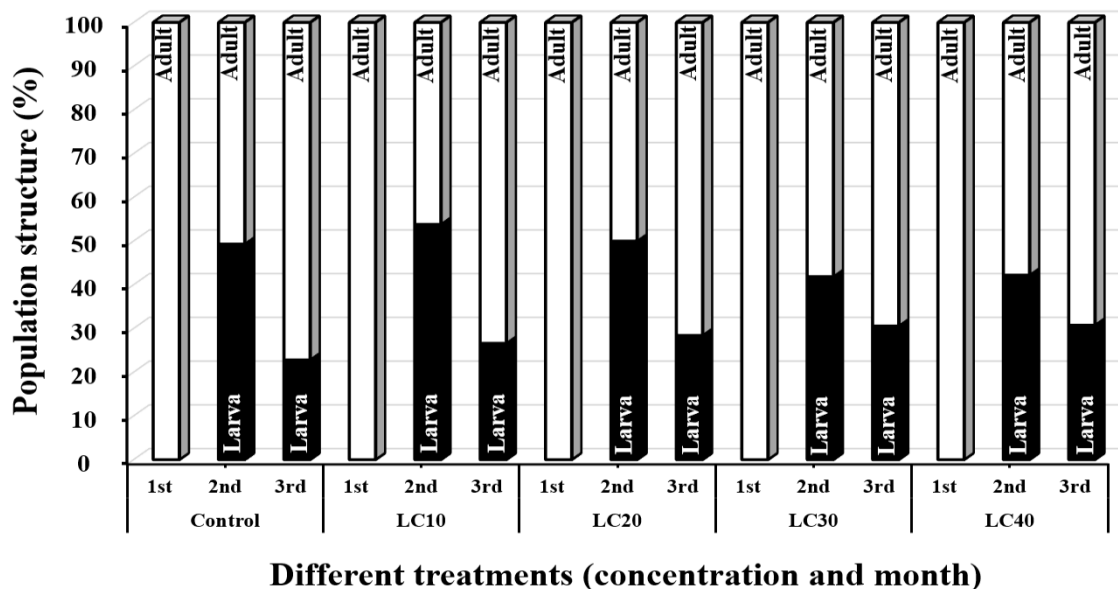
* Different letters in each row indicate significant difference (SNK, $P < 0.05$).

nd = no data

در ماه اول شمارش لاروها صورت نگرفت. در تمام تیمارها میانگین جمعیت لارو در ماه دوم بالاتر از ماه سوم بود (جدول ۳). علاوه بر این، بیش‌ترین تفاوت در جمعیت لاروهای شمارش‌شده در ماه‌های دوم و سوم در تیمار شاهد مشاهده شد که این مسأله نشان می‌دهد که ظهور حشرات بالغ در این تیمار روند افزایشی سریع‌تری در مقایسه با سایر تیمارهای مورد مطالعه داشته است. تفاوت در جمعیت لارو در سایر تیمارهای مورد مطالعه نیز مشاهده شد، اما با افزایش غلظت مورد استفاده از شدت این تفاوت کاسته شد (جدول ۳). این شواهد بیانگر آن می‌باشند که استفاده از غلظت‌های مختلف اسانس گیاه پونه توانسته است اختلالاتی را در روند رشد جمعیت شپشه قرمز آرد ایجاد نماید (جدول‌های ۲ و ۳).

شکل ۲ نشان‌دهنده ساختار جمعیت (لارو و حشره کامل) شپشه قرمز آرد *T. castaneum* در تیمارهای مختلف مورد مطالعه طی سه ماه متوالی می‌باشد. در تیمارهای شاهد، LC₁₀ و LC₂₀ طی ماه دوم، لاروها و حشرات کامل به صورت تقریبی ۵۰ درصد جمعیت شمارش‌شده را تشکیل دادند، اما با افزایش غلظت و در تیمارهای LC₃₀ و LC₄₀ درصد بیش‌تری (به ترتیب ۵۸/۱۴ و ۶۹/۲۳ درصد در غلظت‌های LC₃₀ و LC₄₀) از جمعیت شمارش‌شده را حشرات کامل به خود اختصاص دادند. این شواهد نشان‌دهنده اثرات نامطلوب این غلظت‌ها بر جمعیت لاروها می‌باشند. به بیان دیگر، حساسیت لاروها نسبت به اسانس گیاه پونه با

افزایش غلظت مورد مطالعه افزایش می‌یابد. در تمام تیمارهای مورد مطالعه در ماه سوم، درصد بیش‌تری (به ترتیب با ۷۷/۱۷، ۷۳/۳۹، ۷۱/۵۹، ۶۹/۴۳ و ۶۹/۲۳ درصد) از جمعیت شمارش شده به حشرات بالغ اختصاص داشت که این مسأله به دلیل تکمیل دوره لاروی و تبدیل آن‌ها به حشرات کامل می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- ساختار جمعیت (لارو و حشره کامل) شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* در غلظت‌های مختلف اسانس

پونه *Mentha longifolia* طی سه ماه متوالی

Figure 2. Population structure (Larva and Adult) of red flour beetle *Tribolium castaneum* at different concentrations of essential oil extracted from *Mentha longifolia* during three consequent months

هم‌سو با یافته‌های پژوهش حاضر، پژوهش‌های متعددی نشان داده‌اند که لاروهای شپشه قرمز آرد نسبت به اسانس‌های گیاهی حساسیت بیش‌تری دارند. لاروهای شپشه قرمز آرد نسبت به افراد بالغ در برابر اسانس روغن کرچک حساسیت بیش‌تری از خود نشان داده‌اند (Jenan, 2014). این مطالعه نشان داد که غلظت ۱۰ درصد اسانس کرچک باعث مرگ ۶۶/۶ درصدی در لاروهای سنین ابتدایی شپشه آرد شد و درصد مرگ و میر حشرات بالغ در این غلظت بسیار پایین‌تر بود. در بررسی دیگری تأثیر اسانس‌های روغن چریش و کانابیدیول روی لاروهای سن چهارم و حشرات بالغ شپشه آرد، شپشه برنج و شب‌پره هندی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که در تمام گونه‌های مورد بررسی میزان مرگ‌ومیر لاروها در مواجهه با اسانس‌های مورد مطالعه بالاتر از افراد بالغ بود (Mantzoukas et al., 2020). در بررسی سمیت نانوفرمولاسیون اسانس *Hazomalania voyronii* (Jum.) روی شپشه قرمز آرد مشخص شد که لاروهای این آفت حساسیت بیش‌تری نسبت به حشرات بالغ دارند (Kavallieratos et al., 2021). نتایج این پژوهشگران نشان داد که پس از هفت روز، میزان مرگ و میر لاروها به ۹۷/۴ درصد رسید، در حالی که میزان مرگ‌ومیر در افراد بالغ تنها ۱۸/۷ درصد بود. فعالیت پایین‌تر آنزیم‌های سم‌زدا مانند گلوکوتایون اس-ترانسفراز (Laing et al., 2020)، نرخ متابولیسم پایین‌تر و کاهش ذخایر چربی و پروتئین (Elnabawy et al., 2021) و عدم تکامل سیستم ایمنی (Corzo et al., 2020) از جمله دلایل احتمالی در توصیف حساسیت بالاتر لاروها نسبت به حشرات کامل در مواجهه با ترکیبات سمی می‌باشند.

جدول ۴ میزان تغذیه لاروها و حشرات کامل شپشه قرمز آرد *T. castaneum* در تیمارهای مختلف مورد مطالعه طی سه ماه متوالی را نمایش می‌دهد. با افزایش مدت زمان انجام آزمایش، میزان کاهش وزن دانه‌های برنج افزایش یافته که این مسأله افزایش میزان تغذیه در حشرات مورد مطالعه با گذشت زمان را نشان می‌دهد. البته لازم به بیان است که اطلاعات ثبت شده در این جدول

داده‌های تجمعی می‌باشند. این بدان معنی است که کاهش وزن دانه‌ها در ماه دوم ناشی از تغذیه حشرات مورد مطالعه طی ماه‌های اول و دوم و کاهش وزن دانه‌ها در پایان ماه سوم نیز بیانگر میزان تغذیه صورت گرفته طی ماه‌های اول، دوم و سوم می‌باشد.

جدول ۴- میانگین تغذیه (گرم) شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* (\pm خطای معیار) در غلظت‌های مختلف اسانس پونه طی سه ماه متوالی

Table 4. Mean feeding (g) of red flour beetle *Tribolium castaneum* (\pm SE) at different concentrations of essential oil extracted from *Mentha longifolia* during three consequent months

Time	Different concentrations					F (df)	P
	Control	LC ₁₀	LC ₂₀	LC ₃₀	LC ₄₀		
1 th month	0.075 \pm 0.005 ^a	0.068 \pm 0.028 ^a	0.054 \pm 0.009 ^a	0.046 \pm 0.009 ^a	0.040 \pm 0.011 ^a	0.87 _(4,42)	0.4925
2 nd month	0.136 \pm 0.010 ^a	0.113 \pm 0.027 ^a	0.088 \pm 0.010 ^a	0.086 \pm 0.007 ^a	0.085 \pm 0.010 ^a	2.34 _(4,45)	0.0692
3 rd month	0.253 \pm 0.015 ^a	0.211 \pm 0.029 ^{ab}	0.185 \pm 0.008 ^b	0.156 \pm 0.011 ^b	0.150 \pm 0.012 ^b	5.49 _(4,41)	0.0012

* Different letters in each row indicate significant difference (SNK, $P < 0.05$).

اگرچه با افزایش میزان غلظت مورد استفاده از مقدار تغذیه حشرات مورد مطالعه در تمام زمان‌های مورد بررسی کاسته شد (جدول ۴)، اما تفاوت مشاهده‌شده در میزان تغذیه صورت گرفته طی ماه‌های اول و دوم از نظر آماری معنی‌دار نبود. جمعیت حشرات مورد مطالعه در تمام تیمارها طی ماه‌های دوم و سوم در مقایسه با ماه اول افزایش یافت و بر همین اساس، در تمام تیمارهای مورد مطالعه بیشترین میزان تغذیه در ماه سوم بررسی مشاهده شد (جدول ۴). نکته دیگری نیز که در این جا باید بدان اشاره نمود، افزایش جمعیت مورد مطالعه طی ماه‌های دوم و سوم می‌باشد (جدول‌های ۲ و ۳) که در نتیجه آن میزان تغذیه ثبت شده افزایش یافته است (جدول ۴). عمده‌ترین دلیل افزایش میزان تغذیه، رشد و نمو لاروها و افزایش سهم حشرات بالغ در ساختار جمعیت در مقایسه با لاروها می‌باشد (شکل ۲). این شواهد حاکی از قدرت تغذیه‌ای بالاتر در حشرات کامل نسبت به لاروها بوده و به احتمال فراوان می‌توان بیان نمود که در جمعیت‌های این آفت در شرایط انبار، احتمال خسارت حشرات کامل بیش‌تر از لاروها می‌باشد. طی یک گزارش تفاوت در استراتژی تغذیه‌ای لاروها و حشرات بالغ شپشه قرمز آرد مورد اشاره قرار گرفته و بیان شده است که حشرات بالغ به دلیل نیاز به ذخیره انرژی برای تولیدمثل، غذای بیش‌تری در مقایسه با لاروها مصرف می‌کنند (Astuti et al., 2020). نکته دیگری که از اطلاعات ارائه‌شده در جدول ۴ می‌توان استنباط نمود آن است که اگر چه اطلاعات ثبت شده برای میزان تغذیه حشرات مورد مطالعه نشان داد که بالاترین میانگین ثبت شده در تمام تیمارها در ماه سوم می‌باشد، اما در این ماه کم‌ترین میزان تغذیه در بالاترین غلظت مورد مطالعه (LC₄₀) مشاهده شد. بدون تردید این مسأله نشأت گرفته از پایین بودن تراکم جمعیت حشرات مورد مطالعه در این تیمار در مقایسه با سایر تیمارهای مورد مطالعه (جدول‌های ۲ و ۳) و اختلالاتی است که اسانس پونه در روند افزایش جمعیت شپشه قرمز آرد ایجاد نموده است.

ارزیابی اثرات قارچ بیمارگر *B. bassiana* بر حشرات بالغ شپشه قرمز آرد

نتایج حاصل از ارزیابی‌های صورت گرفته در خصوص بررسی درصد تلفات حشرات بالغ شپشه قرمز آرد پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف اسپورهای بیماری‌زای قارچ بیمارگر *B. bassiana* نشان داد که جدایه مورد مطالعه، پتانسیل بسیار کمی در کاهش جمعیت حشرات بالغ این حشره دارد. بررسی‌های صورت گرفته نشان داد که اگر چه درصد کشندگی اسپورهای بیماری‌زای قارچ بیمارگر *B. bassiana* در جمعیت مورد مطالعه شپشه قرمز آرد بسیار ناچیز بود، اما اختلاف‌های اندک مشاهده‌شده نیز از نظر آماری معنی‌دار بود ($F_{8,81} = 11.22, P < 0.0001$). در تیمار شاهد هیچ‌گونه تلفاتی در حشرات مورد مطالعه مشاهده نشد. با وجود این، در بالاترین غلظت مورد استفاده (10^8 کنیدی بر میلی‌لیتر) تنها ۵/۲ درصد مرگ و میر در حشرات مورد مطالعه مشاهده شد.

علاوه بر این، نتایج به دست آمده نشان داد که درصد تلفات حشرات در غلظت‌های مختلف 10^7 ، 10^6 ، 10^5 ، 10^4 ، 10^3 ، 10^2 و 10^1 نیز به ترتیب برابر با ۵، ۲/۶، ۰/۸، ۰/۸، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۶ درصد می‌باشد.

بر اساس نتایج به دست آمده، انجام آزمون زیست‌سنجی با توجه به حساسیت پایین شپشه قرمز آرد نسبت به قارچ بیمارگر *B. bassiana* میسر نشد. دلایل مختلفی را می‌توان برای این شواهد مطرح نمود. در ارتباط با فرآیند بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر حشرات، رطوبت نسبی محیط تأثیر به‌سزایی در شروع آلودگی داشته و فقدان رطوبت در شروع فرآیند، منجر به القای اثرات منفی بر جوانه‌زنی اسپوره‌های بیماری‌زا خواهد شد. البته با توجه به این که در پژوهش حاضر پس از پاشش اسپوره‌های بیماری‌زا، درب ظروف آزمایش به منظور تأمین رطوبت مورد نیاز برای جوانه‌زنی به مدت ۲۴ ساعت بسته نگه داشته شد، سعی بر آن شد که رطوبت بهینه فراهم شده و بر همین اساس، این مسأله نمی‌تواند دلیلی برای حساسیت پایین شپشه آرد نسبت به جدایه OZ1 قارچ بیمارگر *B. bassiana* باشد. استحکام کوتیکول و عدم توانایی اسپوره‌های جوانه‌زده در نفوذ به درون هموسل، مسأله دیگری است که می‌تواند فرآیند بیماری‌زایی را مختل نماید. شپشه‌های آرد کوتیکول به شدت اسکروتیزه و ملانیزه‌ای دارند و این مسأله می‌تواند اختلالاتی را در نفوذ قارچ ایجاد نماید. این مسأله را می‌توان به‌عنوان یکی از دلایل احتمالی در نظر گرفت هرچند با انتخاب حشرات هم‌سن و با طول عمر کم‌تر از ۲۴ ساعت که در آن‌ها بافت کوتیکول هنوز به استحکام کامل نرسیده است، با اطمینان کامل نمی‌توان در این خصوص نیز اظهار نظر نمود. در نهایت پاسخ ایمنی حشرات نسبت به عوامل بیماری‌زا می‌تواند منجر به کاهش میزان حساسیت آن‌ها نسبت به این گروه از دشمنان طبیعی شود. البته در این خصوص انجام بررسی‌های بیش‌تر مورد نیاز می‌باشد.

ارزیابی اثرات تلفیقی اسانس پونه و قارچ بیمارگر *B. bassiana*

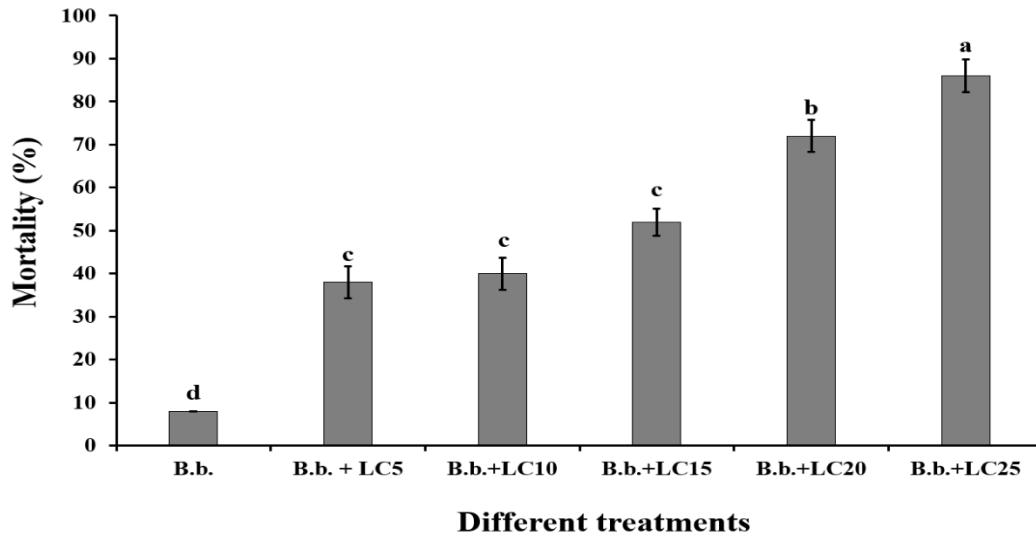
در آزمون‌های این مرحله اثرات تلفیقی غلظت‌های زیرکشنده LC_{10} ، LC_5 ، LC_{20} و LC_{25} از اسانس گیاه پونه و غلظت 10^6 کنیدی بر میلی‌لیتر از جدایه OZ1 قارچ بیمارگر *B. bassiana* در ایجاد مرگ و میر در جمعیت حشرات بالغ شپشه قرمز آرد *T. castaneum* مورد بررسی قرار گرفت. از آن‌جا که در ارزیابی اثرات کشندگی غلظت‌های مختلف اسپوره‌های بیماری‌زای قارچ بیمارگر *B. bassiana* مشخص شد که درصد تلفات حشرات بالغ در غلظت 10^6 کنیدی بر میلی‌لیتر تنها ۲/۶ درصد می‌باشد، قبل از انجام آزمون‌های تلفیقی درصد تلفات حشرات بالغ در تیمارهای مستقل از غلظت‌های مختلف زیرکشنده اسانس پونه نیز مورد سنجش قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، تفاوت‌های مشاهده شده در درصد تلفات حشرات بالغ در غلظت‌های مختلف مورد مطالعه از نظر آماری معنی‌دار بود ($F_{5,12} = 20.37$, $P < 0.0001$). درصد تلفات حشرات کامل پس از استفاده از غلظت‌های LC_5 ، LC_{10} ، LC_{20} و LC_{25} از اسانس گیاه پونه به ترتیب برابر با ۱۶/۶۷، ۲۶/۶۷، ۳۰/۰۰، ۳۶/۶۷ و ۴۶/۶۷ درصد ثبت شد.

استفاده تلفیقی از غلظت 10^6 کنیدی بر میلی‌لیتر قارچ بیمارگر *B. bassiana* با توانایی ایجاد تلفات ۲/۶ درصدی و غلظت‌های مختلف زیرکشنده اسانس گیاه پونه با ایجاد تلفات بین ۱۶/۶۷ تا ۴۶/۶۷ درصدی باعث افزایش تلفات در جمعیت حشرات بالغ شپشه قرمز آرد می‌باشد. نتایج به دست آمده در این مرحله که آزمون‌های آن در سه بخش استفاده هم‌زمان، تقدم استفاده از اسانس و تقدم استفاده از قارچ بیمارگر انجام پذیرفته است، در ادامه مورد بحث و بررسی قرار خواهند گرفت.

آزمون اول (استفاده هم‌زمان از قارچ و اسانس)

نتایج حاصل از تأثیر استفاده هم‌زمان از غلظت‌های مختلف زیرکشنده اسانس پونه و اسپوره‌های بیماری‌زای قارچ بیمارگر *B. bassiana* در شکل ۳ ارائه شده است. تفاوت مشاهده شده میان درصد تلفات حشرات بالغ در تیمارهای مختلف مورد مطالعه از نظر آماری معنی‌دار بود ($F_{6,28} = 95.20$, $P < 0.0001$). در این بررسی، در تیمار شاهد هیچ‌گونه تلفاتی در جمعیت حشرات مورد مطالعه مشاهده نشد. در تیمار استفاده مستقل از قارچ بیمارگر تنها ۳/۷۴ درصد تلفات در جمعیت مشاهده شد. نکته قابل توجه در این مرحله، افزایش میزان کشندگی در تمام تیمارهای تلفیقی در مقایسه با تیمارهای مستقل بود. بر همین اساس، اگرچه غلظت‌های

مختلف زیرکشنده LC_5 ، LC_{10} ، LC_{20} و LC_{25} در استفاده مستقل به ترتیب تلفات ۱۶/۶۷، ۲۶/۶۷، ۳۰/۰۰، ۳۶/۶۷ و ۴۶/۶۷ درصدی را در جمعیت حشرات مورد مطالعه ایجاد نمودند، اما در شرایط استفاده هم‌زمان با اسپورهای بیماری‌زای قارچ بیمارگر، درصد کشندگی برابر با ۳۸، ۴۰، ۵۲، ۷۲ و ۸۶ درصد ثبت شد که افزایش ۱۴ تا ۴۰ درصدی را نشان می‌دهد. این شواهد حاکی از اثرات هم‌افزایی (سینرژیستی) اسانس و قارچ بیمارگر *B. bassiana* در ایجاد مرگ و میر در جمعیت شپشه قرمز آرد می‌باشد.



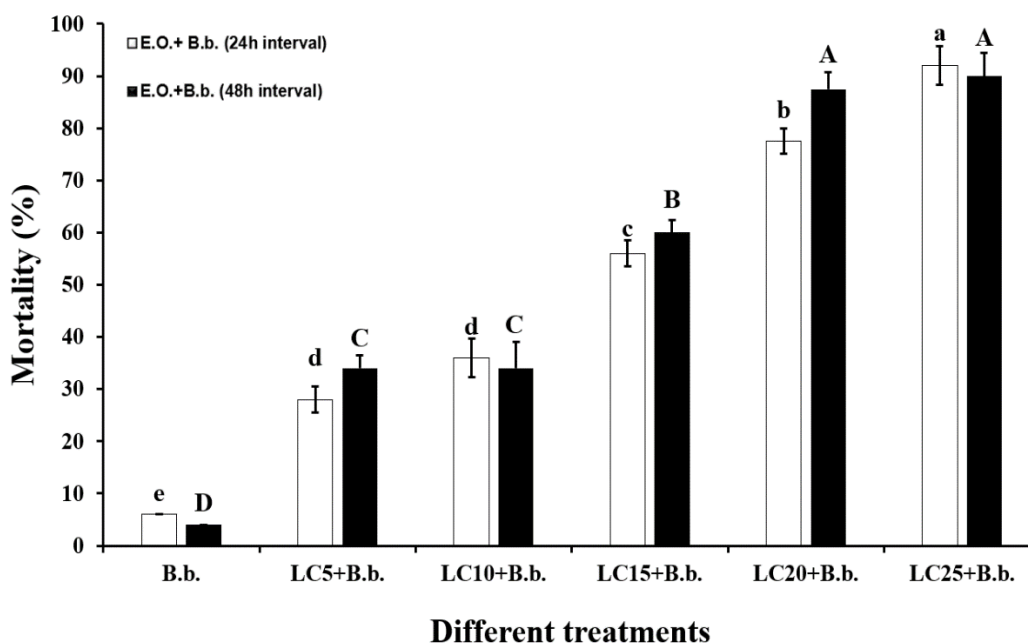
شکل ۳- درصد تلفات (میانگین \pm خطای معیار) شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* پس از استفاده هم‌زمان از غلظت‌های زیرکشنده اسانس پونه *Mentha longifolia* و اسپورهای بیماری‌زای قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana*

Figure 3. Mortality percentage (Mean \pm SE) of red flour beetle *Tribolium castaneum* at simultaneous application of sublethal concentrations of essential oil extracted from *Mentha longifolia* and pathogenic spores of *Beauveria bassiana*

* Different letters indicate significant difference (SNK, $P < 0.05$).

آزمون دوم (تقدم استفاده از اسانس)

در این مرحله، حشرات مورد بررسی ابتدا با غلظت‌های مختلف زیرکشنده اسانس تیمار شده و سپس طی دو بررسی جداگانه در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از استفاده از اسانس، تیمار قارچ بیمارگر اعمال شد. نتایج به‌دست آمده در شکل ۴ ارائه شده است. همان‌گونه که اطلاعات ارائه شده در این شکل نمایش می‌دهند، در هر دو تیمار مورد استفاده درصد مرگ و میر ثبت شده بالاتر از تیمارهای مستقل قارچ بیمارگر و اسانس پونه بود. البته لازم به بیان است که مقایسه نتایج به‌دست آمده در آزمون استفاده تلفیقی هم‌زمان (شکل ۳) با نتایج به‌دست آمده در این آزمون (شکل ۴) حاکی از آن است که ایجاد تأخیر ۲۴ و ۴۸ ساعته در استفاده از قارچ بیمارگر پس از تیمار اسانس، کارایی تقریباً مشابهی با کاربرد هم‌زمان این عوامل داشته و اثرات منفی قابل توجهی در این تیمار تلفیقی مشاهده نشد. در هر دو آزمون مورد بررسی در این مرحله، اختلافات مشاهده شده در میان تیمارهای مختلف مورد مطالعه از نظر آماری معنی‌دار بود (تأخیر ۲۴ ساعته: $F_{6,28} = 123.67$, $P < 0.0001$; تأخیر ۴۸ ساعته: $F_{6,28} = 100.92$, $P < 0.0001$). روند افزایشی مشاهده شده در درصد مرگ و میر حشرات مورد مطالعه وابسته به افزایش غلظت اسانس بوده و بیش‌ترین درصد تلفات در هر دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط تلفیق غلظت LC_{25} اسانس با قارچ بیمارگر *B. bassiana* مشاهده شد (شکل ۴).

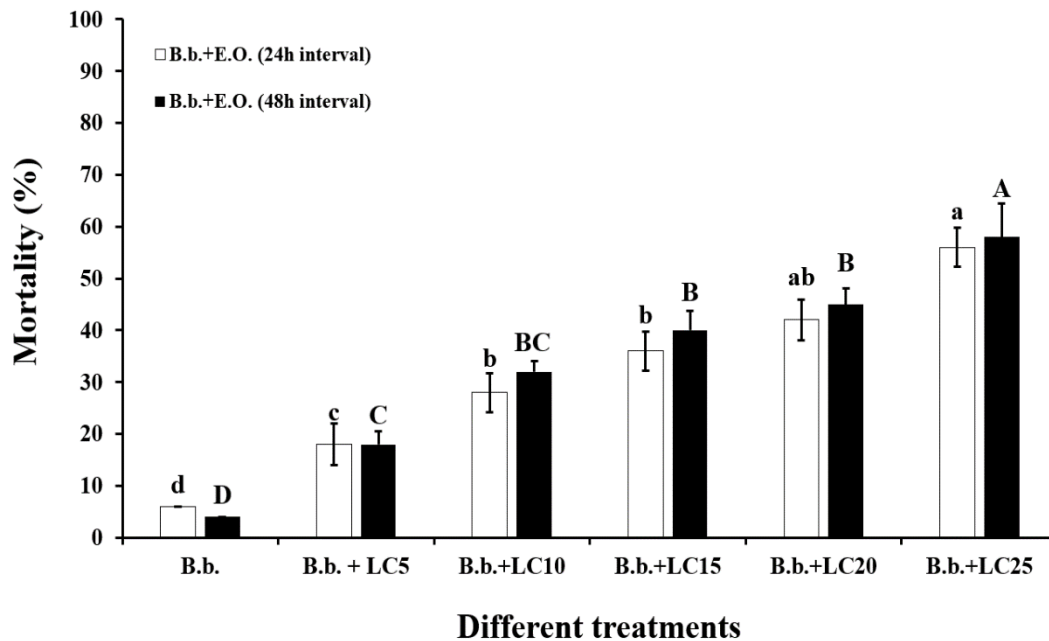


شکل ۴- درصد تلفات (میانگین \pm خطای معیار) شیشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* در آزمون تقدم استفاده از غلظت‌های زیرکشنده اسانس پونه *Mentha longifolia* و استفاده از اسپورهای بیماری‌زای قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت

Figure 4. Mortality percentage (Mean \pm SE) of red flour beetle *Tribolium castaneum* at priority in application of sublethal concentrations of essential oil extracted from *Mentha longifolia* and subsequent treatment by pathogenic spores of *Beauveria bassiana* with 24 and 48 h intervals
* Lowercase and uppercase letters indicate differences at 24 and 48-hour periods, respectively (SNK, $P < 0.05$).

آزمون سوم (تقدم استفاده از قارچ بیمارگر)

شکل ۵ نتایج حاصل از تلفیق قارچ بیمارگر *B. bassiana* و غلظت‌های زیرکشنده اسانس پونه در شرایط تقدم استفاده از قارچ بیمارگر و استفاده از اسانس در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آن را نمایش می‌دهد. در دو آزمون مورد بررسی، روند افزایشی مرگ و میر حشرات بالغ شیشه قرمز آرد با افزایش غلظت مورد استفاده از اسانس مشاهده شده و بالاترین درصد تلفات در شرایط تلفیق قارچ بیمارگر و غلظت زیرکشنده LC₂₅ اسانس پونه ثبت شد (تلفات ۵۶ درصدی در فاصله زمانی ۲۴ ساعت و ۵۸ درصدی در فاصله زمانی ۴۸ ساعت). علاوه بر این، تفاوت‌های مشاهده شده در هر دو آزمون نیز از نظر آماری معنی‌دار بود (تأخیر ۲۴ ساعته: $F_{6,27} = 30.04, P < 0.0001$; تأخیر ۴۸ ساعته: $F_{6,28} = 27.97, P < 0.0001$). مقایسه نتایج به‌دست آمده در این آزمون (شکل ۵) با بررسی‌های صورت گرفته در شرایط استفاده هم‌زمان از اسانس و قارچ بیمارگر (شکل ۳) و تیمارهای تقدم استفاده از اسانس (شکل ۴) نشان می‌دهند که درصد تلفات حشرات کامل شیشه قرمز آرد در شرایط تقدم استفاده از قارچ بیمارگر، به‌مراتب کم‌تر از سایر آزمون‌های تلفیقی می‌باشد. علاوه بر این، در تیمارهای این مرحله و در شرایط استفاده از اسانس در بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از قارچ بیمارگر، درصد تلفات بالاتری نسبت به بازه زمانی ۲۴ ساعت مشاهده شد.



شکل ۵- درصد تلفات (میانگین \pm خطای معیار) شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* در آزمون تقدم استفاده از قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* و استفاده از غلظت‌های زیر کشنده اسانس پونه *Mentha longifolia* در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت

Figure 5. Mortality percentage (Mean \pm SE) of red flour beetle *Tribolium castaneum* at priority in application of pathogenic spores of *Beauveria bassiana* and subsequent treatment by sublethal concentrations of essential oil extracted from *Mentha longifolia* with 24 and 48 h intervals
* Lowercase and uppercase letters indicate differences at 24 and 48-hour periods, respectively (SNK, $P < 0.05$).

در بررسی‌های صورت گرفته توسط شاکرمی و همکاران (Shakarami et al., 2015) اثرات هم‌زمان قارچ *B. bassiana* و اسانس‌های استخراج شده از گیاهان درمنه کوهی، نارنج و عصاره چریش روی لاروهای شب‌پره آرد مدیترانه‌ای *Ephestia kuehniella* Zeller مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب اسانس نارنج و قارچ بیمارگر *B. bassiana* دارای اثرات هم‌افزایی در مرگ و میر لاروهای شب‌پره مدیترانه‌ای آرد می‌باشند. در پژوهشی دیگر، اثرات هم‌زمان اسانس استخراج شده از گیاه اکالیپتوس و قارچ بیمارگر *B. bassiana* در کنترل کنه قرمز پرندگان، *Dermanyssus gallinae* (De Geer)، مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس اکالیپتوس در ترکیب با قارچ بیمارگر *B. bassiana* باعث افزایش سرعت مرگ و میر کنه قرمز پرندگان در مقایسه با استفاده مستقل هر یک از این عوامل شد (Immediato et al., 2016). در تحقیق دیگری اثرات قارچ بیمارگر *B. bassiana* و اسانس‌های بابونه و زیره روی شته پنبه مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های این مطالعه نشان داد که استفاده هم‌زمان از ترکیبات فوق باعث کاهش بیش‌تر نرخ تولیدمثل و افزایش درصد تلفات در حشرات بالغ مورد مطالعه شد (Mousavi et al., 2020).

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که اسانس‌های گیاهی با اثرگذاری بر ساختمان کوتیکول حشرات، نفوذپذیری آن را افزایش داده و نفوذ لوله‌های تندشی خارج شده از اسپور قارچ‌های بیمارگر حشرات را تسهیل می‌نمایند. در یک تحقیق، استفاده تلفیقی از قارچ بیمارگر *B. bassiana* و روغن گیاهی کلزا برای کنترل سوسک‌های گرده‌خوار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که استفاده تلفیقی از این مواد باعث افزایش قابل توجه درصد تلفات آفات مورد مطالعه شد. این پژوهشگران بیان می‌نمایند

که روغن کلزا ساختار کوتیکول را تغییر داده و نفوذ قارچ به درون بدن حشرات مورد مطالعه را تسهیل می کند (Kaiser et al., 2020).

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نشان می دهند که اسانس پونه از کارایی مناسبی به منظور استفاده در برنامه های مدیریت تلفیقی شپشه قرمز آرد برخوردار می باشد. علاوه بر این، بررسی های صورت گرفته نشان داد که اگرچه قارچ بیمارگر *B. bassiana* قادر به ایجاد تلفات قابل توجه در جمعیت حشرات بالغ شپشه قرمز آرد نمی باشد، اما استفاده تلفیقی از اسپورهای بیماری زای این بیمارگر و اسانس پونه، اثرات ملموسی در افزایش تلفات جمعیت حشرات مورد مطالعه دارد. با وجود این، نتایج بررسی های صورت گرفته نشان داد که اثرات هم افزایی مشاهده شده در استفاده تلفیقی این عوامل به شدت تحت تأثیر تقدم استفاده از آن ها قرار گرفته و این مسأله باید به منظور به حداکثر رساندن کارایی برنامه های مدیریتی آفات انباری، مورد توجه ویژه قرار گیرد.

سپاسگزاری

اطلاعات ارائه شده در مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می باشد که حمایت مالی آن توسط دانشگاه یاسوج صورت گرفته است و بدینوسیله سپاسگزاری می شود.

References

- Astuti, L. P., Lestari, Y. E., & Rachmawati, R. (2020). Preference and development of *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) in whole grain and flour form of five corn varieties. *Journal of Biological Diversity*, 21(2), 564-569. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210218>
- Athanassiou, C. G., Korunic, Z., & Vayias, B. J. (2009). Diatomaceous earths enhance the insecticidal effect of bitterbarkomycin against stored-grain insects. *Crop Protection*, 28, 123-127. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.09.012>
- Batta, Y. A. (2018). Efficacy of two species of entomopathogenic fungi against the stored-grain pest, *Sitophilus granarius* L. (Curculionidae: Coleoptera), via oral ingestion. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(44). DOI: <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0048-x>
- Charnley, A. K. (2003). Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research*, 40, 241-321.
- Cherry, A.J., Abalo, P., & Hell. K. (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. *Journal of Stored Products Research*, 41(3), 295-309. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2004.04.002>
- Corzo, F. L., Traverso, L., Sterkel, M., Benavente, A., Ajmat, M. T., & Ons, S. (2020). *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): Intoxication with essential oils isolated from *Lippia turbinata* (Griseb.) and analysis of neuropeptides and neuropeptide receptors, putative targets for pest control. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(3), e21684. DOI: <https://doi.org/10.1002/arch.21684>
- Elnabawy, E. S. M., Hassan, S., & Taha, E. K. A. (2021). Repellent and toxicant effects of eight essential oils against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Biology*, 11(1), 3. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology11010003>
- Fields, S., & White, D. G. (2002). Alternatives to Methyl bromide treatments for stored product and Quarantine insects. *Annual Review of Entomology*, 47, 331-359. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145217>
- Gabarty, A., Salem, H. M., Fouda, M. A., Abad, A. A., & Ibrahim, A. A. (2014). Pathogenicity induced by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in *Agrotis ipsilon*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7, 95-100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2013.12.004>
- Hagstrum, D. W., & Flinn, P. W. (2014). Modern stored-product insect pest management. *Journal of Plant Protection Research*, 54, 205-210. DOI: <https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0031>

- Hamel, D., Rozman, V., & Liška, A. (2020). Storage of cereals in warehouses with or without pesticides. *Insects*, 11, 846. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects11120846>
- Immediato, D., Figueredo, L.A., Iatta, R., Camarda, A., de Luna, R. L. N., Giangaspero, A., Brandao-Filho, S. P., Otranto, D., & Cafarchia, C. (2016). Essential oils and *Beauveria bassiana* against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae): towards new natural acaricides. *Veterinary Parasitology*, 229, 159-165. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.018>
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Jenan, U. (2014). Fumigant toxicity of *Ricinus communis* L. oil on adults and larva of some stored product insects. *Journal of Natural Sciences Research*, 4, 26-29.
- Jung, J. M., Byeon, D. H., Kim, S.H., & Lee, W. H. (2020). Estimating economic damage to cocoa bean production with changes in the spatial distribution of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) in response to climate change. *Journal of Stored Product Research*, 89, 101681. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101681>
- Kaiser, D., Handschin, S., Rohr, R. P., Bacher, S., & Grabenweger, G. (2020). Co-formulation of *Beauveria bassiana* with natural substances to control pollen beetles—Synergy between fungal spores and colza oil. *Biological Control*, 140, 104106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104106>
- Kavallieratos, N. G., Nika, E. P., Skourti, A., Ntalli, N., Boukouvala, M. C., Ntalaka, C. T., Maggi, F., Rakotosaona, R., Cespi, M., Perinelli, D. R., Canale, A., Bonacucina, G., & Benelli, G. (2021). Developing a *Hazomalania voyronii* essential oil nanoemulsion for the eco-friendly management of *Tribolium confusum*, *Tribolium castaneum* and *Tenebrio molitor* larvae and adults on stored wheat. *Molecules*, 26(6), 1812. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26061812>
- Laing, R., Xu, S., Shoemaker, C. F., Li, Y., Zhong, F., & Huang, Q. (2012). Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 7548-7555. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf301129k>
- Liang, J. Y., Xu, J., Yang, Y. Y., Shao, Y. Z., Zhou, F., & Wang, J. L. (2020). Toxicity and synergistic effect of *Elsholtzia ciliata* essential oil and its main components against the adult and larval stages of *Tribolium castaneum*. *Foods*, 9(3), 345. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9030345>
- Louni, M., Shakarami, J., & Negahban, M. (2018). Insecticidal efficacy of nanoemulsion containing *Mentha longifolia* essential oil against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Crop Protection*, 7(2), 171-182.
- Mantzoukas, S., Ntoukas, A., Lagogiannis, I., Kalyvas, N., Eliopoulos, P., & Poulas, K. (2020). Larvicidal action of cannabidiol oil and neem oil against three stored product insect pests: effect on survival time and in progeny. *Biology*, 9(10), 321. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology9100321>
- Mohammed, M., Lahcen, P. E., Abderahmane, K., & Abdelmonaim, H. B. (2014). Insecticidal activity of the essential oil from seven accessions of *Artemisia herba-alba* asso domesticated in Errachidia (south-east of Morocco) against *Tribolium castaneum*. *International Journal of Engineering Research and Applications*, 4(6), 33-36.
- Moharrampour, S., & Negahban, M. (2014). Plant essential oils and pest management. In Sahayaraj, K. (Ed.). *Basic and Applied Aspects of Biopesticides*. Springer, pp. 129-154.
- Mousavi, M., Ghosta, Y., & Maroofpour, N. (2020). Insecticidal activity and sublethal effects of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. isolates and essential oils against *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae). *Acta Agriculturae Slovenica*, 115(2), 463-472. DOI: <https://doi.org/10.14720/aas.2020.115.2.1306>
- Nath, R., Singh, G., & Deep, G. (2019). Efficacy of some botanical extracts against *Tribolium castaneum*: Coleoptera (Tenebrionidae). *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 20(15-16), 660-666.
- Negi, A., Pare, A., Manickam, L., & Rajamani, M. (2022). Effects of defect action level of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) fragments on quality of wheat flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102, 223-232. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11349>
- Rees, D. (2007). *Insect of stored grain, a pocket reference*. CSIRO Publishing, Australia, 77 pp.

- Reihani, M., Yazdanian, M., & Afshar, A. (2016). Enhancing insecticidal efficacy and remedying dilatory effect of diatomaceous earth Sayan® against adults of the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) in combination with myrtle essential oil, *Myrtus communis* (L.). *Journal of Applied Research in Plant Protection*, 5, 65-78.
- Sabbour, M. M., & Abd El-Aziz, S. E. S. (2019). Impact of certain nano oils against *Ephestia kuehniella* and *Ephestia cutella* (Lepidoptera-Pyralidae) under laboratory and store conditions. *Bulletin of the National Research Centre*, 43, 80. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0129-3>
- Sadeghi, A., Pourya, M., & Smaghe, G. (2016). Insecticidal activity and composition of essential oils from *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* against the model and stored product pest beetle *Tribolium castaneum*. *Phytoparasitica*, 44, 601-607. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12600-016-0551-0>
- Senfi, F., Safaralizadeh, M.H., Safavi, S.A., & Aramideh, S. (2014). Fumigant toxicity of *Laurus nobilis* and *Myrtus communis* essential oils on larvae and adults of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Col.: Tenebrionidae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(4), 472-476. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.812819>
- Shahmirzaei, Z., Izadi, H., & Imani, S. (2016). Study on the contact and fumigant toxicity of *Mentha longifolia* L. against the confused flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32, 555-559. DOI: <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2016.106835>
- Shakarami, J., Eftekharifar, R., Latifian, M., & Jafari, S. (2015). Insecticidal activity and synergistic effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and three botanical compounds against third instar larvae of *Ephestia kuehniella* Zeller. *Research on Crops*, 16(2), 296-303. DOI: <https://doi.org/10.5958/2348-7542.2015.00044.3>
- Sheeba G., Sundaram S., Raja N., Janarthanan S., & Ignacimuthu S. (2001). Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Applied Entomology and Zoology*, 36(1), 117-120. DOI: <https://doi.org/10.1303/aez.2001.117>
- Stejskal, V., Hubert, J., Aulicky, R., & Kucerova, Z. (2015). Overview of present and past and pest-associated risks in stored food and feed products: European perspective. *Journal of Stored Product Research*, 64, 122-132. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.12.006>
- Yanar, Y., Yanar, D., Demir, B., & Karan, Y. B. (2019). Effects of local entomopathogenic *Beauveria bassiana* isolates against *Sitophilus granarius* (Coleoptera). *Agriculture & Forestry*, 65(1), 49-55. DOI: <https://doi.org/10.17707/AgricultForest.65.1.05>
- Zarasvandi, F., Seraj, A.A. & Ziaee, M. (2023) Insecticidal activity of Iranian diatomaceous earth, alone or in combination with *Mentha longifolia* plant extract to control *Rhyzopertha dominica* adults on different cereals. *Journal of Entomological Society of Iran*, 43(3), 207-217. DOI: <https://doi.org/10.61186/jesi.43.3.2>
- Ziaee, M., Moharrampour, S., & Mohsenifar, A. 2014. Toxicity of *Carum copitum* essential oil-loaded nanogel against *Sitophilus granarius* and *Tribolium confusum*. *Journal of Applied Entomology*, 138, 763-771. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1187616>

Integrated application of *Mentha longifolia* essential oil and *Beauveria bassiana* for managing the population of *Tribolium castaneum* under laboratory conditions

M. Bagheri-Khanimani¹, A. Sedaratian-Jahromi^{2*}, H. Mohammadi³ and M. Haghani⁴

1 - 4. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

✉ motezabagheri6@gmail.com

 <https://orcid.org/0009-0006-7855-6537>

✉ Sedaratian@yu.ac.ir

 <https://orcid.org/0000-0002-2588-2359>

✉ h.mohammadi@yu.ac.ir

 <https://orcid.org/0000-0003-3905-7066>

✉ mhaghani@yu.ac.ir

 <https://orcid.org/0009-0003-3855-4922>

Received: 25 December 2024 | Accepted: 10 March 2025 |

Abstract

In the present study, integrated application of essential oil extracted from *Mentha longifolia* and entomopathogenic spores of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Strain OZ1 to decrease the population of red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst), was investigated. The highest mortality of adult insects of red flour beetle (82.5%) was observed at the highest concentration of *M. longifolia* (26.67 µL/L air). The estimated lethal concentration required to eliminate 50% of the tested insects was determined to be LC₅₀: 15.26 µL/L air. The *M. longifolia* successfully preserved its toxic properties in a suitable form for a duration of 20 days. The application of various concentrations of *M. longifolia* essential oil (LC₁₀, LC₂₀, LC₃₀, and LC₄₀) to adult insects significantly altered the patterns of population growth and feeding behavior over a three-month duration. The pathogenicity of *B. bassiana* in adult beetles indicated that those subjected to the highest concentration tested (10⁸ conidia/ml) experienced a mortality rate of merely 6%. The study examined the impacts of integrated treatments, which included: 1. The concurrent use of various sublethal concentrations of *M. longifolia* essential oil (LC₅, LC₁₀, LC₁₅, LC₂₀, and LC₂₅) alongside *B. bassiana* at a concentration of 10⁶ conidia/ml, 2. The prioritized application of *M. longifolia* essential oil, and 3. The precedence of the pathogenic fungus *B. bassiana* in inducing mortality among the adult population of *T. castaneum*. The obtained results revealed that the mortality rate of adult stage of red flour beetle was higher in the treatments involving simultaneous application of essential oil and pathogenic fungus and the priority for application of essential oil. The findings of the present study confirm the synergistic effects of integrated treatments.

Key words: Entomopathogenic fungi, essential oils, integrated pest management, stored product pests

Citation: Bagheri-Khanimani, M., Sedaratian-Jahromi, A., Mohammadi, H. & Haghani, M. (2025). Integrated application of essential oil of *Mentha longifolia* and *Beauveria bassiana* for managing the population of *Tribolium castaneum* under laboratory conditions. *Plant Pest Research*, 14(4), 71-89. Doi: <https://doi.org/10.22124/iprj.2025.29979.1627>



*Corresponding author: Sedaratian@yu.ac.ir