



مقاله پژوهشی

اثرات کشندگی خاک دیاتومه و عصاره آبی- متانولی زیتون تلخ *Melia azedarach* روی حشرات کامل*Callosobruchus maculatus* و *Tribolium confusum*فائزه باقری^۱✉، ندا مفیدی^۲، محمدعلی اکرمی^۳

۱، ۲، ۳- به ترتیب استادیار، کارشناس، استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

(تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۱؛ تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۱)

چکیده

بررسی اثرات جداگانه و تلفیقی خاک دیاتومه با عصاره میوه زیتون تلخ، *Melia azedarach*، علیه حشرات کامل ۱ تا ۳ روزه شپشه آرد، *Tribolium confusum* (Col., Tenebrionidae) و سوسک چهارنقطه‌ای *Callosobruchus maculatus* (Col., Chrysomelidae)، در سه تکرار به‌شیوه تماس با باقیمانده آفت‌کش روی کاغذ صافی انجام و سنجش تلفات ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد انجام شد. بعد از ۴۸ ساعت، میزان LC₅₀ فرمولاسیون Permaguard® خاک دیاتومه علیه شپشه آرد ۴/۶ برابر کمتر از بازه ۲۴ ساعت به‌دست آمد. در مورد گونه دیگر نیز این میزان ۳/۲ برابر کاهش یافت. با گذر زمان از ۲۴ به ۴۸ ساعت، اثر عصاره زیتون تلخ بر هر دو گونه افزایش یافت. همچنین بین عصاره میوه زیتون تلخ و خاک دیاتومه، در هر دو گونه و هر دو زمان مورد بررسی، رابطه سینرژیستی وجود داشت که با افزایش زمان در معرض بودن این میزان افزایش یافت. لذا کاربرد هم‌زمان این دو ترکیب باعث بهبود اثر بخشی این ترکیب‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آفات انباری، اثر تلفیقی، خاک دیاتومه، زیتون تلخ

The lethal effects of diatomaceous earth and aqueous-methanolic neem extract, *Melia azedarach* as a single and mixed application on *Tribolium confusum* and *Callosobruchus maculatus*

F. BAGHERI¹✉, N. MOFIDI², M. ALI AKRAMI³

1, 2, 3. Assistant Professor, Assistant, Professor, of Dept. Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Abstract

Evaluation of single and integrated effects of diatomaceous earth and neem fruit extract, *Melia azedarach*, against 1-to-3-day-old insects of flour weevil, *Tribolium confusum* (Col., Tenebrionidae) and cowpea seed beetle *Callosobruchus maculatus* (Col., Chrysomelidae). Three replications were performed by contact toxicity by filter paper residue test and the mortality was measured 24 and 48 hours later. After 48 hours interval, the LC₅₀ level of Permaguard® formulation of diatomaceous earth against flour weevil was 4.6 times less than 24 hours interval. In the case of other species, this amount decreased by 3.2 times. Over time, from 24 to 48 hours intervals, the effect of the neem extract on both species increased. Also, there was a synergistic relationship between neem fruit extract and diatomaceous earth in both species and both times studied, which increased with increasing exposure time. Therefore, the simultaneous use of these two compounds could improve the effectiveness of these compounds.

Keywords: Diatomaceous earth, integrated effects, neem fruit, pests of stored products

مقدمه

برای حفظ کمیت و کیفیت مواد غذایی انبار شده، کاهش انبوهی جمعیت حشرات انباری ضروری است و در حال حاضر برای نیل به این هدف از ترکیبات تدخین شونده استفاده می‌کنند. باید اذعان نمود که شمار حشره کش‌های تماسی کم خطر برای انسان و محیط زیست، بسیار محدود می‌باشد (Arthur, 2004 ; Leesch, 1995).

هر یک از ترکیبات تدخینی که در گذشته رایج بوده دارای کاستی‌هایی هستند که سبب محدود شدن مصرف آن‌ها می‌گردد. جایگزین‌های جدید باید شامل استفاده از روش‌های ساده و مؤثر باشند (Navarro, 2006). متخصصین به‌طور جدی در پی یافتن ترکیب‌های مناسب‌تری برای کنترل آفات انباری می‌باشند؛ روش‌هایی که ضمن نداشتن اثرات سو جانبی، با محیط زیست نیز سازگار باشند (Strait & Mason, 1998). لذا به تدریج ترکیباتی نظیر خاک‌های دیاتومه و مشتقات گیاهی از جمله اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی برای کنترل آفات در نظر گرفته شده‌اند (Sabbour et al., 2012). ترکیبات گیاهی دارای سمیت تنفسی، تماسی، خاصیت دورکنندگی و ضد تغذیه‌ای بوده و با توجه به تأثیر این ترکیبات روی پارامترهای زیستی حشره، خطرات کم آن‌ها برای انسان و پستانداران، تجزیه سریع‌تر آن‌ها در طبیعت و اثرات زیست محیطی به مراتب کمتر نسبت به سموم شیمیایی، جایگاه ویژه‌ای در کنترل آفات پیدا کرده‌اند (Negahban et al., 2007). پس از نتایج موفقی که گیاه زیتون تلخ و چریش در امر کنترل آفات نشان دادند، موج وسیعی از تحقیق را در سایر گیاهان برای به‌دست آوردن مواد حشره‌کش جدید ایجاد نمود (Negahban et al., 2007). آفت‌کش‌های گیاهی اغلب قابلیت تجزیه به متابولیت‌های غیر سمی را در طبیعت دارند، لذا برای کاربرد در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات مناسب می‌باشند. بنا به گزارش محققان، در آینده اثر سمیت تنفسی ترکیبات گیاهی، پتانسیل کاربرد بیشتری از محافظت‌کننده‌های کنونی غلات خواهد داشت و این امر ناشی از کارایی بهتر این ترکیبات، ارزش اقتصادی بالاتر و امکان کاربرد آن‌ها در انبارهای با مقیاس وسیع است (Shakhsi Zare et al., 2012).

علاوه بر این، یکی از روش‌های متداول برای جلوگیری از خسارت و تغذیه آفات انباری استفاده از حشره کش‌های غیر شیمیایی ز قبیل انواع خاک دیاتومه می‌باشد که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (Arthur, 1996). خاک دیاتومه دارای خاصیت سایندگی و قدرت جذب بالا بوده و اولین بار در دهه ۱۹۶۰ در آمریکا برای حفاظت از محصولات گندم و ذرت مورد استفاده قرار گرفتند (Golob, 1997). خاک‌های دیاتومه علاوه بر این‌که باقیمانده شیمیایی خطرناک روی مواد غذایی از خود به‌جا نمی‌گذارند به راحتی در جریان فرآوری توسط شستشوی محصولات انباری حذف می‌شوند (Athanasios et al., 2005)؛ هم‌چنین ضمن حفظ پایداری در دماهای بالا و پایین برای کنترل آفات مقاوم به آفت‌کش‌ها بسیار مؤثر هستند و در آمریکا و کانادا به‌عنوان افزودنی غذا ثبت شده‌اند (Fields, 1998; Collins & Cook, 2006).

تاکنون اثرات خاک‌های دیاتومه روی بسیاری از حشرات آفت انباری بررسی شده که از آن جمله می‌توان به مطالعات (Athanasios et al., 2008; Demissie et al., 2008) که فرمولاسیون‌هایی از خاک دیاتومه را روی *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) و *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) بررسی نمودند و همچنین Kavallieratos و همکاران در سال ۲۰۰۶ حساسیت گونه‌های *S. oryzae*، *T. confusum* و *R. dominica* را در برابر خاک دیاتومه ترکیب شده با قارچ *Metarhizium anisopliae* مطالعه نمودند اشاره کرد (Kavallieratos et al., 2006).

در پژوهشی لیما و همکاران اثر چهار عصاره گیاهی ترکیب شده با خاک رس را روی سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات بررسی نمودند که نشانگر اثر قابل توجه حشره‌کشی این ترکیبات بود (Lima et al., 2020) و اثرات تکی و ترکیبی حشره‌کش‌های گرد بی‌اثر از جمله کائولن و سایپرترین با تلفیق دمای بالا روی حشرات کامل *Callosobruchus maculatus* ارزیابی شدند (Karim zadeh et al., 2020).

تهیه نمونه گیاهی و عصاره‌گیری

میوه‌ی رسیده گیاه زیتون تلخ در مهر ماه ۱۳۹۸ از شهرستان یزد جمع‌آوری شد. برای عصاره‌گیری مقدار ۵۰ گرم از پودر خشک میوه گیاه با ۳۰۰ میلی‌لیتر از حلال متانول ۸۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت عصاره با کاغذ صافی از تفاله جداسازی شد؛ سپس عصاره به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس درون روتاری ساخت شرکت ایلا (EYELA) قرار داده شد تا حلال آن تبخیر شده و به حالت خشک درآید.

زیست‌سنجی اثر تماسی عصاره متانولی زیتون تلخ

به منظور بررسی اثر کشندگی عصاره روی حشرات کامل شپشه آرد و سوسک چهارنقطه‌ای حیوانات از روش باقیمانده آفت‌کش روی کاغذ صافی استفاده شد. غلظت‌های مختلف عصاره از این محلول ساخته شده و حلال مورد استفاده برای محلول‌سازی متانول بود. غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از آزمون‌های مقدماتی ۵۲۶، ۸۴۲، ۱۲۶۳، ۱۵۷۸ و ۲۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر برای شپشه آرد و ۱۵۳، ۲۱۵، ۴۰۰، ۹۲۳ و ۲۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر برای سوسک چهارنقطه‌ای حیوانات به دست آمد. برای انجام آزمایش، مقدار ۸۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره تهیه شده در مرکز کاغذ صافی که به اندازه مساحت کف پتری بریده شده بود، به آرامی تخلیه شد. پس از گذشت دو ساعت از پخش محلول روی کاغذ صافی و اطمینان از تبخیر شدن متانول، ۲۰ عدد حشره کامل هم‌سن یک تا سه روزه داخل ظروف پتری با قطر داخلی ۷/۵ سانتی‌متر و مساحت ۴۴/۱۵ سانتی‌متر مربع رها سازی شدند و حشرات تیمار شده و شاهد، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از در معرض تماس بودن با عصاره مورد بررسی قرار گرفتند. در تیمار شاهد تنها از حلال متانول ۸۰ درصد استفاده شد. تلفات مشاهده شده به ازای هر غلظت و تکرار ثبت شد. ملاک مرده بودن حشرات عدم حرکت پا و شاخک با تحریک قلم مو بود.

لازم به ذکر است که پژوهش‌های کمی روی اثر حشره‌کشی عصاره زیتون تلخ صورت گرفته است. سمیت و دورکنندگی عصاره‌های متانول و کلروفرم *M. azedarach* روی لارو و حشرات کامل *T. castaneum* بررسی و اثر بخشی آن هم به اثبات رسیده است (Sabih et al., 2017) و از طرفی اثر پودر دانه و برگ‌های زیتون تلخ علیه سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات روی دانه‌های لوبیا رقم *Vigna unguiculata* مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به معایب کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی، نیاز روزافزون انسان به تأمین مواد غذایی و جستجو برای پیدا کردن روشی کاربردی و برگرفته از مواد طبیعی برای کنترل آفات انباری، در این پژوهش اثرات کشندگی خاک دیاتومه و عصاره آبی-متانولی زیتون تلخ به صورت کاربرد جداگانه و مخلوط روی حشرات کامل شپشه‌ی آرد و سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش حشرات

در این پژوهش دو گونه سخت‌بالپوش مهم از آفات انباری به نام‌های شپشه آرد *T. confusum* و سوسک چهارنقطه‌ای حیوبات *C. maculatus* استفاده شد. حشرات کامل شپشه آرد و سوسک چهارنقطه‌ای حیوبات به ترتیب از آردها و لوبیاهای چشم بلبلی آلوده جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پرورش حشرات پس از شناسایی گونه‌ها انجام شد. برای تغذیه شپشه آرد از مخلوط آرد گندم و مخمر به نسبت یک به ده و برای تغذیه سوسک چهار نقطه‌ای حیوبات از لوبیا چشم بلبلی استفاده شد، سپس حشرات به ژرمیناتور در دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰ تا ۶۰ درصد منتقل شدند. لازم به ذکر است که در این پژوهش از حشرات کامل هم‌سن یک تا سه روزه استفاده شد. حشرات هم‌سن با بازدید روزانه ظرف‌های پرورش حشرات و جداسازی حشرات کامل به دست آمدند و برای آزمایش‌های زیست‌سنجی استفاده شدند.

خاک دیاتومه

در این تحقیق از فرمولاسیون پرماگارد[®] Permugard ساخت شرکت کیمیا سبزاور استفاده شد. ترکیبات تشکیل دهنده این فرمولاسیون شامل ۹۳ درصد سیلیس SiO_2 ، ۳ درصد اکسید آلومینیوم Al_2O_3 ، ۱/۳ درصد اکسید آهن Fe_2O_3 ، ۱/۱ درصد اکسید کلسیم CaO ، ۰/۶ درصد سدیم اکسید Na_2O ، ۰/۳ درصد پتاسیم اکسید K_2O و ۰/۲ درصد تیتانیوم اکسید TiO_3 می باشد و میانگین اندازه ذرات آن ۷/۱۱ میکرومتر است (Ziaee & Moharrampour 2012).

زیست سنجی اثر تماسی خاک دیاتومه

برای تعیین محدوده غلظت‌ها پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی، مقادیر مورد استفاده در زیست‌سنجی برای سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۷ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع و مقادیر استفاده شده برای شپشه آرد ۲۰، ۳۰، ۶۵، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع به دست آمدند. غلظت‌های مورد نظر برای انجام زیست سنجی اصلی با ترازوی یک کفه‌ای مدل Sartorius Praxum وزن شدند. به منظور پوشش یکنواخت خاک دیاتومه در کف ظروف پتری پلاستیکی، درب آنها گذاشته شد و به مدت یک دقیقه با حرکت دورانی در خلاف جهت حرکت عقربه‌های ساعت تکان داده شد. بعد از گذشت ۵ دقیقه، زمانی که برای نشست ذرات لازم است، درب ظروف پتری باز شده و ۲۰ عدد حشره کامل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات و شپشه آرد بدون تفکیک جنس در ظرف‌ها رها سازی شدند. از ظرف پتری فاقد خاک دیاتومه به عنوان تیمار شاهد استفاده شد. سپس تلفات در بازه زمانی یک و دو روز بعد از تیمار شمارش شد.

زیست سنجی اثر تلفیقی عصاره متانولی زیتون تلخ و خاک دیاتومه

بررسی اثر تلفیقی خاک دیاتومه و عصاره گیاهی زیتون تلخ به روش کوربل و همکاران انجام گرفت (Corbel et al., 2000). در این رابطه عصاره زیتون تلخ به عنوان آفت کش اول و خاک دیاتومه به عنوان آفت کش دوم در نظر گرفته شد. برای تعیین اثر تلفیقی دو ترکیب خاک دیاتومه و عصاره گیاهی زیتون تلخ، ابتدا غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد برای عصاره‌ی زیتون تلخ تعیین شد. پس از آن، بالاترین غلظت از خاک دیاتومه که هیچ گونه اثر

کشندگی روی آفت مورد نظر نداشته باشد (LC₀) تعیین شد. غلظت کشنده‌ی صفر درصد خاک دیاتومه برای شپشه آرد با غلظت، ۸۷/۳ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع و برای سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات ۱۱/۰۳ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع به عنوان LC₀ ترکیب شد. بعد از آن برای بررسی اثر تلفیقی خاک دیاتومه و عصاره زیتون تلخ، غلظت کشنده صفر درصد به دست آمده برای خاک دیاتومه به غلظت‌های مختلف آفت کش اول اضافه شده و دوباره غلظت‌های مختلف کشنده در حالت مخلوط محاسبه شدند. در این آزمون پنج غلظت عصاره زیتون تلخ برای شپشه آرد ۲۸، ۵۷۱، ۸۵۷، ۱۲۵۸ و ۲۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر بود. برای سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات نیز از غلظت‌های ۳۵۲، ۵۸۸، ۱۱۷۶، ۲۰۰۰ و ۳۵۲۹ میکرولیتر بر لیتر از عصاره زیتون تلخ استفاده شد. در تیمار شاهد هم از حلال مورد استفاده در تهیه عصاره استفاده شده و هیچ مقداری از خاک دیاتومه استفاده نشد. در انجام زیست سنجی برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد و در هر تکرار تعداد ۲۰ عدد حشره کامل ۱ تا ۳ روزه در ظروف پتری رهاسازی شد. تلفات حشرات کامل ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار شمارش شد. حشراتی که با تحریک قلم‌مو حرکت شاخک و پا نشان ندادند و قادر به حرکت نبودند مرده تلقی شدند. بررسی اثر تلفیقی خاک دیاتومه و عصاره گیاهی زیتون تلخ به روش کوربل و همکاران انجام گرفت (Corbel et al., 2000). در این رابطه عصاره زیتون تلخ به عنوان آفت کش اول و خاک دیاتومه به عنوان آفت کش دوم در نظر گرفته شد.

تجزیه آماری داده‌ها

تجزیه‌ی پروبیت داده‌های زیست سنجی با استفاده از نرم‌افزار آماری PoloPlus (version 2.0) انجام شد. در آزمایش‌های مربوط به مقایسه میانگین داده‌ها برای اصلاح مرگ و میر تیمارها نسبت به شاهد از فرمول آبوت استفاده شد (Abbott, 1925). لازم به ذکر است که برای آزمایش‌های زیست سنجی از طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و تعداد کل ۳۶۰ حشره استفاده شد و همچنین برای انجام سایر محاسبات آماری از نرم افزار، Excel 16 و رسم گراف‌ها از نرم افزار SigmaPlot 12.0 استفاده شد.

نتایج

و ۴۰/۹۱۵ و برای سوسک چهار نقطه ای حیوانات ۵۷/۶۳۰ و ۱۴/۶۰۴ میکرولیتر بر لیتر به دست آمد (جدول ۲). نتایج حاصل از بررسی اثر تلفیقی خاک دیاتومه Permaguard® و عصاره میوه زیتون تلخ روی حشرات کامل شپشه آرد و سوسک چهارنقطه‌ای حیوانات پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض بودن نشان داد که غلظت کشنده پنجاه درصد حاصل در این اثر تلفیقی به ترتیب ۶۱/۰۸۲ و ۳۶/۷۱۰ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع برای شپشه آرد و ۵۰/۵۳۲ و ۱۷/۲۶۱ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع برای سوسک چهارنقطه ای حیوانات می‌باشد (جدول ۳).

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری برای پرماگارد نشان داد میزان غلظت کشنده پنجاه درصد برای سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب معادل ۵/۵۳۰ و ۱۷/۵۷ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع می‌باشد و این مقادیر برای شپشه آرد در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت ۱۸۲/۶۷ و ۳۹/۹۸ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع به دست آمد (جدول ۱). در بررسی اثر تماسی عصاره‌ی میوه زیتون تلخ روی ۳۶۰ عدد از حشرات کامل هم‌سن بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، غلظت کشنده پنجاه درصد برای شپشه آرد به ترتیب ۸۳/۹۰۴

جدول ۱- ارزیابی کشندگی ۵۰ درصد پرماگارد روی حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات و شپشه آرد بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت.

Table 1. Evaluation of the LC₅₀ of Permagard® on *Callosobruchus maculatus* adult and *Tribolium confusum* insects After 24 and 48 hours.

Insect	Chi-square	Degrees of freedom	Slope ±SE	LC ₅₀ (Upper limit-lower limit) mg/cm ²	Time (hr.)
<i>Callosobruchus maculatus</i> adult	2.105	13	1.804 ± 0.334	17.572 (29.178- 13.373)	24
<i>Callosobruchus maculatus</i> adult	2.757	13	0.295 ± 1.319	5.530 (7.129-3.852)	48
<i>Tribolium confusum</i>	1.343	13	1.041 ± 0.305	182.678 (108.271-1025.911)	24
<i>Tribolium confusum</i>	4.070	13	1.885 ± 0.290	39.989 (32.044-47.990)	48

جدول ۲- ارزیابی کشندگی ۵۰٪ عصاره زیتون تلخ (*Melia azedarach*) روی حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات و شپشه آرد بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت.

Table 2. Evaluation of the LC₅₀ of Bitter Olive extract (*Melia azedarach*) on *Callosobruchus maculatus* adult and *Tribolium confusum* adult insects After 24 and 48 hours

Insect	Chi-square	Degrees of freedom	Slope ±SE	LC ₅₀ (Upper limit-lower limit) µl/l	Time (hr.)
<i>Tribolium confusum</i>	1.271	13	2.471 ± 0.481	83.904 (70.379- 109.453)	24
<i>Tribolium confusum</i>	1.607	13	2.436 ± 0.425	40.915 (31.608-48.877)	48
<i>Callosobruchus maculatus</i> adult	2.546	13	1.223 ± 0.253	57.67830 (36.779-119.325)	24
<i>Callosobruchus maculatus</i> adult	3.998	13	1.438 ± 0.226	14.604 (9.990-20.313)	48

جدول ۳- بررسی اثر کشندگی ۵۰ درصد حاصل تلفیق پرماگارد و عصاره زیتون تلخ روی حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات و شپشه آرد بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت.

Table 3. Investigation of the combined effect of Permagard® and bitter olive extract (*Melia azedarach*) on *Callosobruchus maculatus* adult and *Tribolium confusum* adult insects after 24 and 48 hours.

Insect	Chi-square	Degrees of freedom	Slope ±SE	LC ₅₀ (Upper limit-lower limit) µl/l	Time (hr.)
<i>Tribolium confusum</i>	1.053	13	2.118 ± 0.401	61.082 (48.662- 87.524)	24
<i>Tribolium confusum</i>	0.691	13	2.137 ± 0.370	36.710 (29.59-45.862)	48
<i>Callosobruchus maculatus</i> adult	1.157	13	1.295 ± 0.343	50.532 (30.450-756.183)	24
<i>Callosobruchus maculatus</i> adult	3.409	13	1.381 ± 0.283	17.261 (12.067-26.484)	48

فراهم می‌کند که نتیجه این مقایسه در جدول ۵ ذکر شده است. بر اساس این جدول تمام مقایسه‌ها به جز اثر مخلوط خاک دیاتومه و عصاره زیتون تلخ بعد از ۲۴ ساعت علیه حشرات کامل هم‌سن سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات و شپشه آرد معنی‌دار شده است (جدول ۵).

با توجه به حدود اطمینان ۹۵ درصد مقادیر LC₅₀ روی دو گونه حشره مورد مطالعه در جدول ۴ می‌توان به وجود اختلاف معنی‌دار بین ترکیبات مختلف با یکدیگر پی برد. نسبت غلظت کشنده ۵۰ درصد ترکیب‌های مختلف با یکدیگر و در زمان‌های مختلف امکان مقایسه کشندگی آن‌ها را

جدول ۴- بررسی اختلاف معنی‌دار در قدرت کشندگی ترکیبات مختلف با یکدیگر و در زمان‌های مختلف، بر اساس نسبت غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد برای شپشه آرد و سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* adult and *Tribolium confusum*.

Table 4. Study of significant differences in the lethal strength of different compounds with each other and at different times, based on the lethal concentration ratio of 50% for *C. maculatus* and *T. confusum*.

Comparison	LC ₅₀ ratio	Significance	LC ₅₀ ratio	Significance
	(Upper limit-lower limit) flour weevil		(Upper limit-lower limit) µl/l Four-point beetle	
LC ₅₀ of Permagard® in two-time intervals 24 and 48 hrs.	4.568 10.343-2.018	Yes	3.177 (2.026-4.983)	Yes
LC ₅₀ of <i>Melia azedarach</i> extract in two-time intervals of 24 and 48 hrs.	2.501 (1.535-2.739)	Yes	3.946 (2.093-7.441)	Yes
LC ₅₀ of combined effect of Permagard® and <i>Melia azedarach</i> extract in 24 and 48 hrs.	1.664 (1.181-2.345)	Yes	2.928 (1.323-6.478)	Yes
LC ₅₀ of Permagard® and <i>Melia azedarach</i> extract after 24 hrs.	2.177 (0.960-4.939)	No	0.305 (0.161-0.589)	Yes
LC ₅₀ of Permagard® and <i>Melia azedarach</i> extract after 48 hrs.	0.997 (0.736-1.298)	No	0.379 (0.243-0.589)	Yes
LC ₅₀ of combined effect of Permagard® and <i>Melia azedarach</i> extract with bitter olive fruit extract after 24 hrs.	0.728 (0.519-1.022)	No	0.877 (0.362-2.122)	No
LC ₅₀ of combined effect of Permagard® <i>Melia azedarach</i> extract with Permagard® after 24 hrs.	0.334 (0.415-0.773)	No	2.876 (1.307-6.329)	Yes
LC ₅₀ of combined effect of Permagard® and <i>Melia azedarach</i> extract with bitter olive fruit extract after 48 hrs.	0.897 (0.669-1.204)	No	1.182 (0.716-1.952)	No
LC ₅₀ of combined effect of Permagard® and <i>Melia azedarach</i> extract with Permagard® after 48 hrs.	0.918 (0.689-1.224)	No	3.121 (1.971-4.942)	Yes

جدول ۵- مقایسه قدرت کشندگی ترکیبات مختلف با یکدیگر و در زمان‌های مختلف، بر اساس نسبت غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد.

Table 5. Comparison of lethality of different compounds with each other and at different times, based on 50% lethal concentration ratio.

Comparison	LC ₅₀ ratio	Significance
	(Upper limit-lower limit) µl/l	
LC ₅₀ of Permagard® after 24 hrs. against <i>Callosobruchus maculatus</i> adult and <i>Tribolium confusum</i>	10.396 (4.361-24.780)	Yes
LC ₅₀ of Permagard® after 48 hours against <i>Callosobruchus maculatus</i> adult and <i>Tribolium confusum</i>	7.231 (5.145-10.161)	Yes
LC ₅₀ of <i>Melia azedarach</i> fruit extract after 24 hours against <i>Callosobruchus maculatus</i> adult and <i>Tribolium confusum</i>	1.456 (0.823-2.576)	Yes
LC ₅₀ of <i>Melia azedarach</i> fruit extract after 48 hrs. against <i>Callosobruchus maculatus</i> adult and <i>Tribolium confusum</i>	2.802 (1.877-4.181)	Yes
LC ₅₀ of combined effect of Permagard® and <i>Melia azedarach</i> fruit extract after 24 hrs. against <i>Callosobruchus maculatus</i> adult and <i>Tribolium confusum</i>	1.209 (0.568-2.573)	No
LC ₅₀ of combined effect of Permagard® and <i>Melia azedarach</i> fruit extract after 48 hours against <i>Callosobruchus maculatus</i> adult and <i>Tribolium confusum</i>	2.127 (1.395-3.243)	Yes

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی غلظت کشنده ۵۰ درصد خاک دیاتومه علیه حشرات کامل هم‌سن شده *T. confusum* و *C. maculatus* مشخص شد که با افزایش مدت زمان در معرض قرارگیری حشرات کامل در برابر فرمولاسیون Permaguard® خاک دیاتومه درصد تلفات به طور معنی‌داری افزایش یافت؛ به گونه‌ای که بعد از ۴۸ ساعت در معرض بودن شپشه آرد، غلظت مورد نیاز برای از بین بردن نیمی از جمعیت، به میزان ۴/۶ برابر کمتر از غلظت مورد نیاز بعد از ۲۴ ساعت می‌باشد (جدول ۴). همچنین در مورد سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات نیز این میزان ۳/۲ برابر کاهش یافته (جدول ۴) و این یافته دال بر افزایش اثرگذاری معنی‌دار این آفت‌کش فیزیکی روی دو گونه مورد بررسی با گذشت یک شبانه روز می‌باشد. نکته جالب توجه دیگر در این بین، حساسیت دو گونه مورد مطالعه نسبت به این ترکیب می‌باشد. همان‌طور که نتایج مقایسه غلظت کشنده ۵۰ درصد بعد از ۲۴ ساعت نشان می‌دهد، سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات ۱۰/۴ برابر حساس‌تر از شپشه آرد به این ترکیب است (جدول ۵) که البته این اختلاف بعد از ۴۸ ساعت، به ۷/۲ برابر کاهش یافت (جدول ۵)؛ ولی همچنان *C. maculatus* نسبت به *T. confusum* به طور معنی‌داری حساس‌تر است. از جمله دلایلی که می‌توان برای این اختلاف حساسیت در برابر این ترکیب فیزیکی قایل بود، اختلاف جثه این دو گونه است. از آنجا که سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات بزرگ‌تر از شپشه آرد بوده و سطح بیشتری نسبت به این حشره در معرض محیط قرار می‌دهد، لذا آسیب بیشتری از این پودر می‌بیند؛ ضمن اینکه به دلیل تحرک بیشتر سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات نسبت به شپشه آرد، برخورد بیشتری بین *C. maculatus* و ذرات خاک دیاتومه اتفاق می‌افتد که این موضوع نیز به نوبه خود منجر به ایجاد خراش بیشتر در کوتیکول این حشره، از دست رفتن آب بدن و بروز تلفات بیشتر می‌شود. البته عوامل دیگری از جمله ضخامت و ماهیت کوتیکول این دو گونه نیز به دلیل تفاوت‌های ذاتی با یکدیگر متفاوت بوده و این خود می‌تواند

منجر به بروز اختلاف در حساسیت آن‌ها شود. نتایج حاصل با یافته‌های فیلد و کورنیک مطابقت دارد و آن‌ها گزارش دادند که گونه‌های *Tribolium spp.* تحمل بالایی نسبت به خاک دیاتومه در مقایسه با سایر گونه‌های آفت انباری دارند (Fields and Korunic, 2000).

همچنین نتایج پژوهش درباره اثر کشندگی عصاره میوه زیتون تلخ با برآورد غلظت کشنده پنجاه درصد این ترکیب علیه دو گونه مورد بررسی نشان داد که با افزایش زمان در معرض بودن، میزان تلفات در حشرات کامل هم‌سن به شکلی معنی‌دار افزایش یافت. به گونه‌ای که بعد از ۴۸ ساعت، غلظت کشنده پنجاه درصد برای شپشه آرد ۲/۱ برابر این برآورد بعد از ۲۴ ساعت می‌باشد و این اختلاف مشاهده شده، معنی‌دار می‌باشد. همچنین برای سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات نیز این اختلاف ۳/۲ برابر بوده و معنی‌دار می‌باشد (جدول ۵)؛ به عبارتی در هر دو گونه، با گذر زمان، اثرگذاری ملکول‌های عصاره بر حشره افزایش یافته و این می‌تواند به افزایش نفوذ ملکول‌های موثر به درون بدن و رسیدن بیشتر آن‌ها به جایگاه‌های اثر بدن این حشرات و در نتیجه افزایش بروز تلفات کمک کرده باشد. در مطالعه پهلوان و محمدی روی اثر حشره‌کشی پودر و عصاره گیاه زیتون تلخ علیه حشرات کامل شپشه قرمز آرد *T. castaneum* مشخص شد که در غلظت ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۳۶ ساعت، ۸۱ درصد تلفات ایجاد شد و عصاره گیاه سمیت بیشتری نسبت به پودر از خود نشان داد (Pahlavan & Mohammadi, 2013).

اما در مقایسه حساسیت دو گونه مورد مطالعه در این پژوهش تحت تأثیر عصاره میوه زیتون تلخ، با بررسی مقادیر LC_{50} برای حشرات کامل هم‌سن شپشه آرد و سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، مشخص شد که حساسیت حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات و شپشه آرد در بازه زمانی ۲۴ ساعت بعد از تیمار، اختلاف آماری معنی‌داری ندارد (جدول ۵)؛ در حالی که با گذشت ۲۴ ساعت دیگر، اختلاف تلفات مشاهده شده بین دو گونه، معنی‌دار شده و برای سوسک

معرض بودن افزایش یافت. لذا کاربرد هم‌زمان این دو ترکیب نه تنها باعث بهبود اثر بخشی این ترکیب‌ها می‌شود؛ بلکه باعث می‌شود تا میزان مصرف خاک دیاتومه پرمگارد که برای مصرف در صنعت غذا نیز هست کمتر مصرف شده و عوارض ناشی از آن کاهش یابد (Fields, 1998). کاهش مصرف خاک دیاتومه به شیوه مصرف همراه آن با سایر ترکیبات برای حل مشکلات این چنینی پیشنهادی است که توسط برخی محققین دیگر نیز ارائه شده است (Golib, 1997; Fields et al., 1997). از طرفی میزان مصرف عصاره زیتون تلخ نیز به این شیوه کاهش یافته و این موضوع از نظر اقتصادی مقرون به صرفه خواهد بود.

با توجه اثر عصاره آبی - متانولی زیتون تلخ روی سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات و شپشه آرد و کم خطر بودن آن برای انسان و سایر موجودات، به نظر می‌رسد استفاده از این ترکیبات به‌عنوان جایگزین برای حشره‌کش‌های شیمیایی مصنوعی مناسب باشد. تلفیق خاک دیاتومه و عصاره آبی - متانولی زیتون تلخ روی حشرات مورد آزمایش مبین خاصیت تشدیدکنندگی این دو ترکیب در کنترل آفات مذکور و به‌نظر می‌رسد تلفیق عصاره آبی - متانولی زیتون تلخ با خاک دیاتومه گامی مؤثر به‌سوی کاربردی کردن آن‌ها در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شیراز که در تأمین هزینه‌های انجام این پژوهش کمک نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

چهار نقطه‌ای حبوبات حدود ۲/۸ برابر مؤثرتر عمل می‌کند (جدول ۵). به عبارتی سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات حساسیت بیشتری به این ترکیب بعد از ۴۸ ساعت نشان می‌دهد که این موضوع به نوبه خود بار دیگر حساسیت بیشتر این گونه را نسبت به شپشه آرد نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که یکی از دلایل عمده این اختلاف حساسیت، تفاوت فیزیولوژی و رفتاری این دو حشره با یکدیگر باشد. از آنجا که طبق مشاهدات نظری، سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات حشره پر تحرک‌تری نسبت به شپشه آرد محسوب می‌شود، به نظر می‌رسد بیشتر از شپشه آرد در معرض سطح آلوده به عصاره قرار داشته باشد؛ این موضوع در کنار اختلاف‌های ژنتیکی دو گونه در برابر مولکول‌های عصاره وارد شده به بدن به‌عنوان یک ترکیب ناخواسته، می‌تواند عامل بروز اختلاف در حساسیت این دو گونه باشد؛ البته ظاهراً اختلاف بین دو گونه در زمان طولانی‌تر بهتر خود را نشان می‌دهد و در این پژوهش تنها بعد از ۴۸ ساعت بود که اختلاف حساسیت این دو حشره به شکلی معنی‌دار خود را نشان داد. نسبت‌های سینرژیستی محاسبه شده، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار، برای شپشه آرد به ترتیب ۱/۳۷۳ و ۱/۱۱۴ پی پی ام به دست آمدند. از آنجا که نسبت سینرژیستی محاسبه شده برای شپشه آرد و سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات به‌طور معنی‌داری برای هر دو زمان بیشتر از یک است (زیرا LC₅₀ تلفیقی محاسبه شده برای هر چهار حالت معنی‌دار بوده و عدد یک را در دامنه خود ندارد؛ جدول‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵)؛ لذا بین عصاره میوه زیتون تلخ و خاک دیاتومه، در هر دو گونه و در هر دو زمان مورد بررسی رابطه سینرژیستی وجود داشت. جالب توجه است که نسبت سینرژیستی با افزایش زمان در

References

- ABBOTT, W. S, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265-267.
- ARTHUR, F. H, 2004. Evaluation of a new insecticide formulation (F2) as a protectant of stored wheat, maize and rice. *Journal of Stored Products Research*. 40: 317-330.
- ARTHUR, F. H. 1996. Grain protectants: current status and prospects for the future. *Journal of Stored Products Research*, 32: 293-302.
- ASHRAFJU, M., AHMADI, K., and HAMIDI, H, 2014. Different concentrations of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) ethanolic extract on the developmental time and egg laying of *Tetranychus urticae* Koch. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 47: 2242-2247.
- ATHANASSIOU, C. G., VAYIAS, B. J., DIMIZAS, C. B., KAVALLIERATOS, N. G., PAPAGREGORIOU, A. S., and BUCHELOS, C. T, 2005. Insecticidal efficacy of diatomaceous earth against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) on stored wheat: influence of dose rate, temperature and exposure interval. *Journal of Stored Products Research*. 41:47-55.
- CORBEL, V., RAYMOND, M., CHANDRE, F., DARRIET, F., and HOUGARD, J. M, 2004. Efficacy of insecticide mixtures against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids and carbamates. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*. 60: 375-380.
- COOK, D, A., COLLINS, L. E. AND ARMITAGE, D. M. 2006. Diatomaceous earth structural treatment against *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Cucujidae) under fluctuating UK conditions. In Proc. 8th Int. Working Conference on Stored-Product Protection. York. U.K. pp. 675-679.
- DEMISSIE, G., TEFERA, T. AND TADESSE, A. 2008. Efficacy of Silicosec filter cake and wood ash against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) on three maize genotypes. *Journal of Stored Products Research*. 44: 227-231.
- FIELDS, P., AND KORUNIC, Z, 2000. The effect of grain moisture content and temperature on the efficacy of diatomaceous earths from different geographical locations against stored-product beetles. *Journal of Stored Products Research*. 36: 1-13.
- FIELDS, P. G. 1998, October. Diatomaceous earth: Advantages and limitations. In Proceedings of the 7th International Conference on Stored-product Protection, 14-19.
- FIELDS, P. G., A. K. DOWDY, AND MARCOTTE. E. 1997. The use of diatomaceous earth in combination with heat treatment for the control of insect pests in food processing facilities: Report prepared for Environment Bureau Agriculture and Agri – Food Canada.
- GOLOB, P. 1997. Current status and future perspectives for inert dusts for control of stored product insects. *Journal of Stored Products Research*. 33: 69-79.
- KARIMZADEH, R., JAVANSHIR, M., and HEJAZI, M. J, 2020. Individual and combined effects of insecticides, inert dusts and high temperatures on *Callosobruchus maculatus* (coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Stored Products Research*. 89: 101-109.
- KAVALLIERATOS, N. G., ATHANASSIOU, C. G., VAYIAS, B. J., KOTZAMANIDIS, S., & SYNODIS, S. D. 2010. Efficacy and adherence ratio of diatomaceous earth and spinosad in three wheat varieties against three stored-product insect pests. *Journal of Stored Products Research*. 46: 73-80.
- LIMA, J. K. A., CHICUTA, C. P. D. L., DE MACEDO COSTA, M., DA COSTA, M. L. A., GRILLO, L. A. M., DOS SANTOS, A. F., & GOMES, F. S, 2020. Biototoxicity of aqueous extract of *Genipa americana* L. bark on red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). *Industrial Crops and Products*. 156: 112-874.
- LEESCH, J. G. 1995. Fumigant action of acrolein on stored product insects. *Journal of Economic Entomology*, 88: 326-330.

- MASON, L. J. AND STRAIT, C. A. 1998. Stored product integrated pest management with extreme temperatures. Available on: http://cipm.cipm.ncsu.edu/ipm_text/chap6.pdf (accessed 02 April 2011).
- NAVARRO, S. 2006. Modified atmospheres for the control of stored-product insects and mites. *In: Insect Management for Food Storage and Processing*. 2nd edition, Heaps, J.W., ed., American Association of Cereal Chemists, ACC International, St. Paul, Minnesota, U.S.A., 231 pp., 105- 145.
- SABIHA, S., ALI, H., HASAN, K., RAHMAN, A. S. M. S., & ISLAM, N. 2017. Bioactive potentials of *Melia azedarach* L. with special reference to insecticidal, larvicidal and insect repellent activities. *Journal of Entomological and Zoological Studies*. 5: 1799-1802.
- SHAKHSI ZARE, F., GHASEMZADEH, M., SABETGHADAM, A. AND BAGHAEI, N. 2012. Integrated effects of diatomaceous earth and Gamma ray on mortality of Red Flour beetle *Tribolium castaneum* (Col.: Tenebrionidae) in laboratory conditions. 20th Iranian Plant Protection Congress. Shiraz, Iran, pp 328.
- SABBOUR, M. M., ABD-EL-AZIZ, SH. E. AND ADEL-SHERIEF, M. 2012. Efficacy of three entomopathogenic fungi alone or in combination with diatomaceous earth modifications for the control of three pyralid moths in stored grains. *Journal of Plant Protection Research*. 52: 359-363.
- WINKS, R. G., & RUSSELL, G. F. 1994, April. Effectiveness of SIROFLO® in vertical silos. In *Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection*. 2: 1245-1249.
- ZIAEE, M., and MOHARRAMIPOUR, S. 2012. Efficacy of Iranian diatomaceous earth deposits against *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 15: 547-553.