

## طراحی تله پیشرفته رهاسازی اسپور قارچ *Metarhizium anisopliae* برای کنترل سوسک شاخدار خرما *Oryctes elegans*

مسعود لطیفیان\* و احمد مستعان

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵

### چکیده

هدف از انجام این پژوهش، بررسی امکان استفاده از تله برای رهاسازی *Metarhizium anisopliae* Metsch در جمعیت سوسک شاخدار خرما *Oryctes elegans* Prell بود. ساختار مورد استفاده در تله شامل بخش جذب کننده، صفحات متوقف کننده، قیف جمع کننده و محفظه تله بود. برای بررسی ترکیبات مختلف فرمونی و غذایی در میزان شکار تله، سه تیمار با سه تکرار شامل فرمون تجمعی، تلفیقی (فرمون تجمعی و جاذب غذایی) و جاذب غذایی شامل ۲۰ گرم بافت مریستم نخل خرما در نظر گرفته شدند. برای رسیدن به بیشینه‌ی کارایی تله در تلقیح حشرات کامل، مدت زمان باقی ماندن حشرات کامل در اتاقک تلقیح و غلظت مایع تلقیح استاندارد شد. برای این منظور، ۵ بازه‌ی زمانی ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ ثانیه و ۵ غلظت ۱۰<sup>۴</sup>، ۱۰<sup>۵</sup>، ۱۰<sup>۶</sup>، ۱۰<sup>۷</sup> و ۱۰<sup>۸</sup> میلی‌لیتر در لیتر در نظر گرفته شد. اندازه نهایی تله ۳۵۰×۳۵۰×۶۵۰ میلی‌متر با استفاده از روش‌های معمول کارگاهی ساخته شد. نتایج نشان داد که نوع ماده جلب کننده دارای تاثیر معنی‌داری روی شکار حشرات کامل توسط تله بود. بیشترین میزان شکار حشرات در تلفیق فرمون تجمعی با مریستم خرما و کمترین آن در مریستم مغز خرما به تنهایی بود و بیشترین میزان شکار در ساعت ۸ غروب مشاهده شد. مناسب‌ترین زمان و غلظت برای بیشترین تلقیح حشرات کامل نر و ماده به ترتیب معادل ۵۴/۳ و ۵۵/۷ ثانیه و ۴/۱۴×۱۰<sup>۴</sup> و ۴/۳۶×۱۰<sup>۴</sup> اسپور در میلی‌لیتر بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تله هوشمند رهاسازی *M. anisopliae* به عنوان عامل بیمارگر جمعیت سوسک شاخ دار خرما در شرایط آزمایشگاهی از کارایی لازم برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: *Oryctes elegans*، *Metarhizium anisopliae*، تله پیشرفته، شکار و انتشار

## مقدمه

از چهار تله در هر هکتار و تکرار روزانه به مدت سه هفته بوده است. در این شرایط، کارایی کنترل بالای ۹۰ درصد بود و هزینه عملیات با روش کنترل میکروبی کمتر از ۱۰ درصد کنترل شیمیایی است. بنابراین، استفاده از این عامل بیمارگر در کنترل بیولوژیک آفت بسیار مناسب است (Latifian and Rad, 2019).

انواع مختلفی از تله‌ها در مدیریت جمعیت سوسک‌های بالا خانواده Scarabaeoidea از جمله تله‌های چاله‌ای<sup>۱</sup>، تله‌های شیشه‌ای دو طرفه<sup>۲</sup> و تله‌های نوری<sup>۳</sup> مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Thary and Rosli, 2018). تله‌های رهاسازی و شکار برای سوسک ژاپنی به صورت تجاری در دسترس است. این تله‌ها حاوی یک اتافک تلقیح می‌باشند. سوسک از طریق یک سوراخ به اتاق تلقیح جلب می‌شود. کارایی بالای این تله در شرایط آزمایشگاهی برای افزایش مرگ و میر سوسک ژاپنی تایید شده است (Michael et al., 1999; Lacey et al., 2010). نوعی تله برای رهاسازی عامل کنترل میکروبی برای سوسک سرخرطومی حنایی خرما *Rhynchophorus ferrugineus* Fabricius ابداع شده است. زیست‌سنجی‌ها در آزمایشگاه نشان داد که این تله توانایی انتقال و انتشار قارچ‌های *M. anisopliae* و *B. bassiana* در جمعیت حشرات کامل را دارد. کارایی این نوع تله در رهاسازی *M. anisopliae* بالا بود، به طوری که باعث مرگ و میر ۷۵٪ شد (Francardi et al., 2013). در مطالعه‌ای دیگر، اثربخشی یک تله فرمونی برای رهاسازی اسپور *Zoophthora radicans* Brefeld در جمعیت *Plutella xylostella* L. مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها نشان داد که استفاده از طعمه مصنوعی با فرمون داخل محفظه تلقیح، کارایی انتقال عامل بیمارگر را به میزان ۸۷ درصد افزایش می‌دهد (Furlong and Pell., 1995).

تله مخصوصی برای شکار سرخرطومی حنایی نخل خرما *R. ferrugineus* و رهاسازی مخلوطی از عوامل بیمارگر شامل باکتری *Bacillus thuringiensis* و قارچ *M. anisopliae* طراحی شده است. در این تله حشرات کامل

سوسک شاخدار *Oryctes elegans* Prell در ایران، عراق (Buxton, 1920; Endrödi, 1985; Rochat, et al., 2004; Payandeh and Dehghan, 2010)، شمال پاکستان (Ratcliffe and Ahmed, 2010)، عربستان سعودی (Al-Deghairi, 2007)، امارات متحده، بحرین و قطر (El-Haidari and Al-Hafidh, 1986) پراکنش دارد. این آفت از طریق تبادل پاجوش بین کشورهای مختلف گسترش یافته است (Soltani, 2009, 2008a,b). توسعه کشت نخل‌های جوان در مناطق جدید خرماخیز جهان و واردات پاجوش در سال‌های اخیر دامنه گسترش آفت را زیاد کرده است (Soltani, 2009, 2010).

در ایران بررسی‌های زیادی در ارتباط با کاربرد بیولوژیک این آفت انجام شده است. مرور منابع نشان می‌دهد که قارچ‌های *M. anisopliae* و *Beauveria bassiana* به ترتیب با  $LC_{50}$  معادل  $۱۰^۸ \times ۵/۶۹$  و  $۱۰^۹ \times ۱/۵۳$  اسپور در میلی‌لیتر دارای بالاترین و پایین‌ترین قدرت کشندگی هستند. در چند روز اول، شروع رهاسازی اسپور *M. anisopliae* در جمعیت سوسک شاخدار، میزان آسیب‌پذیری جمعیت آن نسبت به عامل بیمارگر و مرگ و میر ناشی از آن زیاد است (Latifian et al., 2012). همچنین، این قارچ توانایی تغذیه مراحل رشدی، قدرت زنده‌مانی، سرعت رشد، نرخ باروری، قدرت تخم‌گذاری و توانایی تفریح تخم‌ها را به صورت چشم‌گیری کاهش می‌دهد. بنابراین، از دیدگاه همه‌گیرشناسی *M. anisopliae* سوسک شاخدار خرما را به گونه‌ای تحت تأثیر قرار می‌دهد که شاخص‌های مهم تعیین‌کننده رشد و زنده‌مانی آفت در جهت افزایش تأثیر کنترل میکروبی کاهش چشم‌گیری نشان می‌دهند (Latifian and Rad, 2014).

نتایج مقایسه کارایی سه روش مختلف رهاسازی تلقیحی اسپور *M. anisopliae* در کاهش جمعیت لارو سوسک شاخدار خرما نشان داد که بالاترین کارایی در شرایط استفاده

<sup>3</sup>. Photo tarp

<sup>1</sup>. Pit fall trap

<sup>2</sup>. Bidirectional glass trap

جدایه‌ی قارچ *M. anisopliae* مورد استفاده در این تحقیق از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه شدند. پس از خالص‌سازی، جدایه‌های قارچ مورد نظر در محیط غذایی (SDAY) (Suberbed Dextrose Agar + Yeast extract) کشت شد. برای تهیه محیط کشت SDAY از ترکیب آگار ۱۵ گرم، دکستروز ۲۰ گرم، باکتوپیتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۲ گرم و آب مقطر به میزان ۱۰۰۰ میلی‌لیتر استفاده شد. پس از حل کردن مواد درون ارلن با حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر و به وسیله هم‌زن الکتریکی حرارتی، ارلن‌های حاوی محیط کشت برای ضدعفونی به دستگاه اتوکلاو با فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه منتقل شدند. بعد از اسپورزایی کامل (کشت ۱۴-۱۲ روزه) سطح محیط کشت با سوزن انتقال خراش داده شد و داخل ارلن‌هایی با حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل با محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ (Tween 80) بود، به صورت جداگانه جمع‌آوری شدند. محلول فوق به مدت ۵ دقیقه به طور پاندولی به هم زده شد. سپس، سوسپانسیون حاصل از پارچه ملامل دو لایه عبور داده شد تا قطعات میسیلیوم از آن جدا شدند. برای جدا شدن اسپورها از هم و عدم تشکیل زنجیر در هنگام شمارش، درون لوله‌های حاوی سوسپانسیون قارچ، مهره‌های شیشه‌ای ریخته شد و برای چند دقیقه به شدت تکان داده شد. به منظور شمارش اسپورها و تهیه تراکم‌های مختلف اسپور در واحد حجم از لام گلبول شمار (Improved Neubauer) استفاده شد. برای اندازه‌گیری زنده‌مانی اسپورها، روز قبل از آزمایش ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون  $5 \times 10^6$  اسپور در میلی‌لیتر از جدایه قارچ روی محیط کشت SDA داخل تشتک پتری به صورت یک لایه نازک پوشش داده شد. درب تشتک پتری با پارافیلم مسدود و تشتک‌های پتری در دمای  $26 \pm 2$  درجه سلسیوس داخل انکوباتور در شرایط تاریک قرار داده شدند. پس از ۱۸-۱۵ ساعت یک میلی‌لیتر فرمالدئید ۰/۰۵ درصد به منظور توقف جوانه‌زنی اسپورها داخل هر تشتک ریخته شد. درصد جوانه‌زنی با شمارش ۱۰۰ اسپور از هر تشتک پتری با بزرگ-نمایی  $40 \times$  محاسبه شد. روز بعد فقط از کشت‌هایی استفاده شد که بیش از ۸۵ درصد اسپورهای آن جوانه زده بودند. در

سرخرطومی با استفاده از یک فرمون تجمعی به اتاقک تلقیح جلب شده و سپس، سوسپانسیون عوامل میکروبی روی آن‌ها با استفاده از یک حسگر نوری روی آن‌ها اسپری می‌شود. حشرات کامل با انعکاس نور خارج شده و در جمعیت‌های طبیعی آزاد می‌شوند. استفاده از این تله در شرایط نخلستان باعث افزایش مرگ و میر لارو آفت به میزان ۹۳٪ در مدت ۳۰ روز شد (Nabawy, 2013).

با توجه به اهمیت استفاده از روش کنترل میکروبی در مدیریت جمعیت سوسک شاخدار خرما، این فرضیه مطرح شده که امکان افزایش استفاده از تله برای رهاسازی قارچ *M. anisopliae* در کنترل میکروبی این آفت وجود دارد. برای اثبات این فرضیه، ابتدا طراحی تله استاندارد برای استفاده در روش شکار-آلوده‌سازی انجام شد. سپس، کارایی تله با ترکیبات مختلف (فرمونی و غذایی) در شکار حشرات کامل سوسک شاخ‌دار نخل خرما و کارایی آن در تلقیح حشرات کامل با اسپور قارچ *M. anisopliae* مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### پرورش سوسک شاخدار

حشرات کامل سوسک شاخدار خرما *O. elegans* در طی ماه‌های فصل بهار از نخلستان‌های آلوده اطراف آبادان جمع‌آوری شدند. این حشرات درون ظروف پلاستیکی مخصوص به ارتفاع ۱۰ و قطر ۷ سانتی‌متر که حاوی ۴۰۰ گرم بافت مریستم انتهایی پاجوش خرما به عنوان منبع تغذیه بود به آزمایشگاه منتقل شدند. هر جفت سوسک نر و ماده درون یک ظرف حاوی ۴۰۰ گرم بافت مریستم انتهایی پاجوش خرما منتقل شدند. ظروف درون اتاقک پرورش در دمای  $25 \pm 5$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $75 \pm 5$  درصد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تخم‌های آفت به صورت روزانه از طریق خرد کردن بافت مریستم جداسازی و به ظروف مشابه جدید منتقل می‌شدند تا لاروها ظاهر شوند.

### کشت جدایه‌ی قارچی

به گونه‌ای که بتوان با اختلال در حرکت حشره آن را از طریق روزنه‌ای تنگ به محفظه‌ای بزرگ هدایت کرد. این عمل باعث می‌شود که حشره در محفظه به دام بیفتد و با توجه به کوچک بودن منفذ ورود، امکان برگشت و فرار حشره به حداقل برسد. ساختار مورد استفاده شامل یک بخش جذب کننده، صفحات متوقف کننده، قیف جمع کننده و محفظه تله می‌باشد.

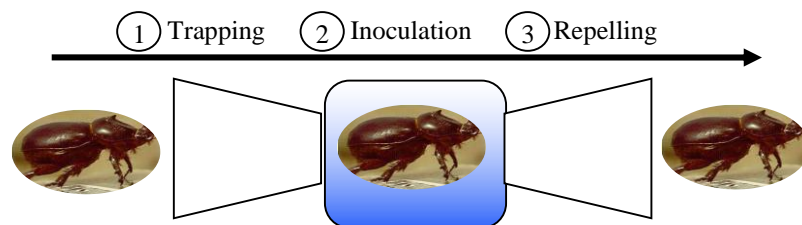
تمام فرآیند طراحی بر اساس اندازه حشره انجام شد. با توجه به نقش کلیدی دریچه ورود حشره به محفظه تله، ابعاد این دریچه به عنوان نقطه شروع طراحی انتخاب شد. با توجه به طراحی متقارن تله، شعاع دریچه برابر با متوسط اندازه حشره ۳۰ میلی‌متر در نظر گرفته شد. سایر موارد مهم تله شامل اندازه‌های صفحات متوقف کننده بود. این صفحه‌ها به اندازه کافی بزرگ در نظر گرفته شدند تا بتوانند بیشترین حشرات جذب شده به هدف را متوقف کند تا در تله گرفتار شوند. با این وجود، بزرگ گرفتن اندازه صفحه‌ها سبب حجیم شدن و بزرگ شدن بیش از حد تله نیز می‌شود. از این رو، به عنوان مبنایی برای طراحی از تعاریف مهندسی اندازه‌گیری خواص مواد بیولوژیک برای صفحات بزرگ استفاده شد. بر مبنای این تعریف، صفحات بزرگ صفحاتی هستند که اندازه آن‌ها حداقل ۱۰ برابر اندازه شیء مورد آزمون باشد. بر این اساس با توجه به اندازه حشره، مجموع اندازه عرضی و اندازه ارتفاع بال‌های صفحات جمع کننده برابر با ۳۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد.

آزمایش‌های انجام شده نیاز به تهیه غلظت‌های متفاوتی از سوسپانسیون قارچ بود. برای رسیدن به یک غلظت مشخص چنانچه مقدار آن از غلظت سوسپانسیون پایه تهیه شده کمتر بود، از طریق رقیق‌سازی پی در پی و با استفاده از میکروپیپت مدرج با دقت تشخیص ۱ میلی‌لیتر انجام می‌شد. اما در صورت بالاتر بودن غلظت مورد نیاز از دستگاه سانتریفوژ با قدرت ۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای  $25 \pm 5$  درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه استفاده شد (Butt and Goettel, 2000).

### طراحی تله شکار - آلوده‌سازی

تله مخصوص شکار و رهاسازی پیشرفته از مواد فلزی از جنس حلبی ساخته شد. این تله دارای یک اتاقک شکار ورودی، اتاقک تلقیح با سوراخ‌های خروجی بود که در مقابل هم قرار می‌گرفتند. حشرات کامل سوسک شاخدار خرما با استفاده از جلب کننده مناسب (غذا، فرمون تجمعی یا تلقیح غذا و فرمون تجمعی) وارد اتاقک شکار می‌شدند. حشرات کامل جذب شده وقتی به بخش مرکزی اتاقک شکار رسیدند، وارد اتاقک تلقیح حاوی محفظه نگهداری اسپور *M. anisopliae* شدند و با حجم مشخصی از اسپور قارچ آلوده شدند. بعد از اتاقک دوم، حشرات تلقیح شده در اثر روشن شدن خودکار دو چراغ LED برای مدت مشخصی رو به درب‌های خروجی حرکت و در جمعیت طبیعی آفت آزاد شدند (شکل ۱).

بخش مورد استفاده برای به دام انداختن حشره از دو منظر شکل و ابعاد طراحی شد. طراحی بر مبنای شکل شامل برقراری نقطه جذب حشره و قراردادن مانع در این مسیر بود،



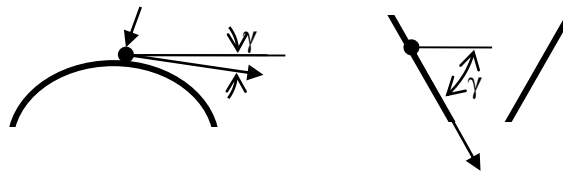
شکل ۱- مبنای تله هوشمند رهاسازی اسپور قارچ *Metarhizium anisopliae*

Figure 1. Intelligent trap basics for releasing *Metarhizium anisopliae* spores

برخوردار است و موجب تأمین سطح ثابتی از سوسپانسیون اسپور قارچ در ظرف تلقیح می‌شد (شکل ۳).  
 طرح دورکننده شامل سامانه‌ی نوردهی زمان‌دار بود و پس از به دام افتادن حشره و سقوط آن در ظرف حاوی اسپور قارچ، با نوردهی در بازه‌های زمانی مشخصی حشره را به فرار ترغیب می‌کرد. این سامانه شامل نوردهی متغیر بود که در این طرح به منظور تنظیم زمان نوردهی، از مدار پایه آردوینو مدل UNO استفاده شد. به منظور نوردهی محفظه نیز ۴ عدد لامپ LED سفید در چهار سوی جدار داخلی محفظه در نظر گرفته شد. همچنین به منظور امکان خروج حشره پس از نوردهی، دریچه‌هایی به ابعاد  $70 \times 35$  میلی‌متر در چهار جهت دیواره پایینی محفظه تله در نظر گرفته شد.

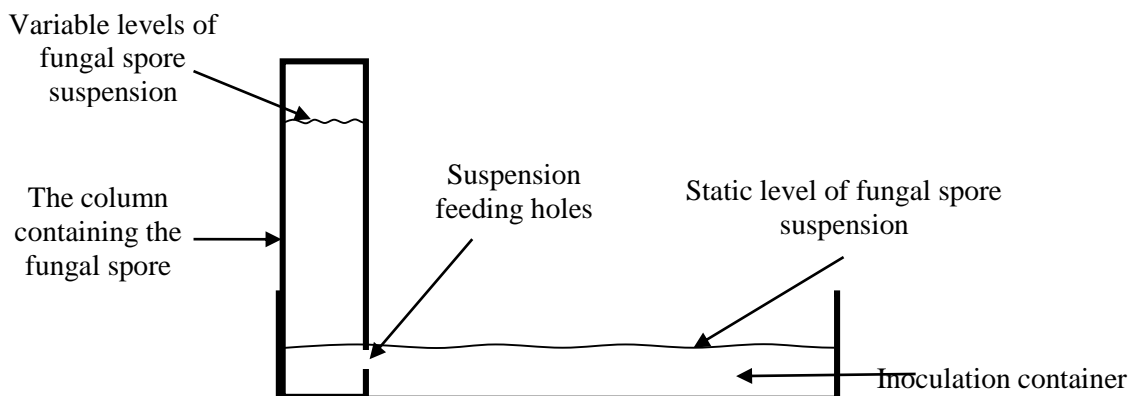
به منظور هدایت حشرات به سمت دریچه از طرح مخروطی استفاده شد. این طرح با شیب ثابت خود باعث می‌شد تا در صورت سقوط در هر نقطه از سطح جمع‌کننده، حشره با شیب ثابتی به سمت دریچه هدایت شود. به منظور به دست آوردن بیشترین تناسب هندسی و بیشترین سطح جمع‌کننده، زاویه سطح شیب‌دار  $60^\circ$  درجه در نظر گرفته شد. این امر با توجه به مجهول بودن اندازه ضریب زاویه اصطکاک لغزشی میان حشره و سطح شیب‌دار، بیشترین زاویه ممکن برای به دام افتادن حشره را فراهم می‌سازد (شکل ۲).  
 در قسمت تلقیح از ساختار ساده ظروف و فشار جو استفاده شد. این طرح از مزیت سادگی طراحی و کاربرد

The probable point of collapse near the tip of the dome



شکل ۲- زاویه سطح لغزش حشره در بدو سقوط: سمت چپ در حالت استفاده از طرح گنبدی و سمت راست در حالت استفاده از سطح شیب‌دار ثابت

Figure 2. Angle of slip surface at fall: Left side using dome design and right side using fixed slope



شکل ۳- طرح ساده بخش تلقیح اسپور قارچ *Metarhizium anisopliae*

Figure 3. Simple layout of *Metarhizium anisopliae* spore inoculation section

## بررسی کارایی تله در شکار حشرات کامل

برای محدود کردن فضای رهاسازی از یک محفظه چوبی به ابعاد ۹۰×۱۰۰×۲۰ سانتی متر استفاده شد. درب خروجی به طور کامل عایق شد تا احتمال خروج حشرات کامل از داخل محفظه رهاسازی وجود نداشته باشد. تله طراحی شده در انتهای محفظه مقابل درب ورودی قرار داده شد. سپس، تأثیر ترکیبات جاذب فرومونی و غذایی در میزان شکار تله با سه تیمار و سه تکرار اعمال شد. تیمارها به ترتیب شامل جاذب فرمون تجمعی *O. elegans*، جاذب تلفیقی (فرمون تجمعی + جاذب غذایی) که جاذب غذایی شامل ۲۰ گرم مریستم انتهایی نخل خرما (پنیر خرما رقم سایر) و جاذب غذایی بودند.

جاذبها در محفظه مخصوصی در بالای اتاقک شکار قرار می گرفتند. در هر تکرار تعداد ۲۰ عدد حشره کامل سوسک شاخدار نخل خرما به نسبت جنسی مساوی نر و ماده روی سینی مخصوصی به ابعاد ۴۰×۲۵ سانتی متر در ابتدای درب ورودی قرار داده شد. برای هر بار اندازه گیری میزان جلب حشرات پس از اعمال هر کدام از تیمارها، دریچه محفظه رهاسازی به مدت یک ساعت بسته می شد. در انتهای هر ساعت تعداد سوسک های نر و ماده موجود در محفظه تلقیح شمارش می شدند. آزمایشها از ساعت ۱۹ تا ۲۴ به فاصله هر یک ساعت یکبار تکرار شد.

## تحلیل دادهها

ضمن تجزیه واریانس دادههای حاصل از اعمال تیمارها در قالب طرح کامل تصادفی، میانگین شکار تله در تیمارها با آزمون اسان کی مقایسه شدند. تغییرات میزان شکار تله طی زمان و در شرایط استفاده از جاذبهای مختلف برای تعیین اوج شکار در شرایط کاربرد تیمارها رسم شد.

## استاندارد سازی زمان تلقیح

برای رسیدن به بیشترین کارایی تله در تلقیح حشرات کامل مدت زمان باقی ماندن آنها در اتاقک تلقیح تنظیم شد. فاصله زمان روشن شدن چراغهای LED که باعث خروج

حشرات کامل از اتاقک تلقیح شد، به این طریق مشخص می شد. برای این منظور ۵ زمان مختلف ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ ثانیه در نظر گرفته شد. ۵۰ میلی لیتر از سوسپانسیون قارچ تهیه شد. حشرات کامل در زمانهای مختلف مورد بررسی درون سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت ۱۰<sup>۸</sup> اسپور در میلی لیتر قرار گرفته و پس از خروج، درون آب مقطر استریل همراه با توئین ۸۰ به میزان ۲۰ میلی لیتر شستشو می شدند. سپس، غلظت اسپور قارچ در سوسپانسیون که نشانگر مقدار برداشت اسپور توسط حشره کامل در اثر تلقیح است، با استفاده از لام نئوبار تعیین شد. هر آزمایش دارای چهار تکرار بود. رابطه میان زمان تلقیح با میزان اسپور برداشت شده با یک رابطه پلی نومیال به شرح ذیل توصیف شد:

$$N = at^2 + bt + c \quad \text{رابطه ۱:}$$

در این رابطه N تعداد اسپور برداشت شده در واحد زمان، t مدت زمان قرار گرفتن حشره در اتاقک تلقیح و a، b و c ثابتهای معادله هستند. برای به دست آوردن مناسبترین زمان، نقطه عطف این معادله محاسبه شد که معادل مناسبترین زمان برای توقف حشره در اتاقک تلقیح و فاصله زمانی روشن شدن لامپهای LED بود و با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد:

$$N_{\max} = \lim_{n \rightarrow \infty} (at^2 + bt + c) \quad \text{رابطه ۲:}$$

$$t_{\text{Optimum}} = \frac{b}{a}$$

## استاندارد سازی غلظت مایع تلقیح

برای رسیدن به بیشترین کارایی تله در تلقیح حشرات کامل، غلظت سوسپانسیون قارچ در اتاقک تلقیح تنظیم شد. برای این منظور، ۵ غلظت مختلف ۱۰<sup>۴</sup>، ۱۰<sup>۵</sup>، ۱۰<sup>۶</sup>، ۱۰<sup>۷</sup> و ۱۰<sup>۸</sup> میلی لیتر در لیتر در نظر گرفته شد و پنجاه میلی لیتر از هر سوسپانسیون قارچی تهیه شد. حشرات کامل در غلظت های مختلف مورد بررسی درون سوسپانسیون اسپور قارچ با زمان ۵۰ ثانیه که در آزمایش قبلی به عنوان مناسبترین زمان تشخیص داده شد، قرار گرفت و پس از خروج، درون آب مقطر استریل همراه با توئین ۸۰ به میزان ۲۰ میلی لیتر شستشو شدند. سپس، غلظت اسپور قارچ در سوسپانسیون که نشانگر

## نتایج

## طرح تله شکار- آلوده‌سازی

با تاکید بر طراحی شکلی و ابعادی، ساختار نهایی تله با ابعاد نهایی ۳۵۰×۳۵۰×۶۵۰ میلی‌متر با استفاده از روش‌های معمول کارگاهی حاصل شد. طرح ترسیمی در شکل ۴ مشاهده می‌شود.

## تعیین مناسب‌ترین جاذب در شکار حشرات کامل

نتایج تجزیه واریانس تعداد شکار حشرات کامل نر، ماده و کل جمعیت در جدول ۱ درج شده است. نوع ترکیب جلب‌کننده تاثیر معنی‌داری روی شکار جمعیت حشرات کامل نر، ماده و کل توسط تله داشت.

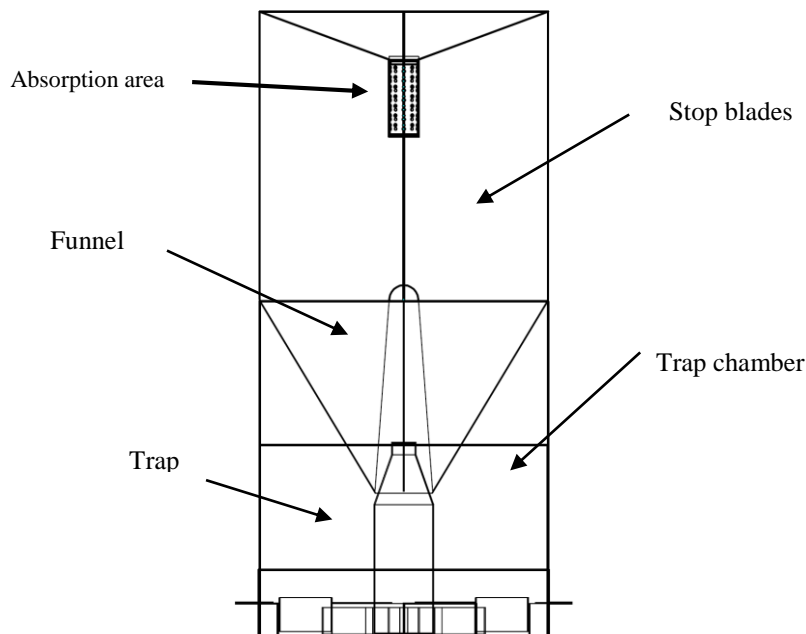
مقدار برداشت اسپور توسط حشره کامل در اثر تلقیح است، با استفاده از لام نئوبار تعیین شد. رابطه میان غلظت سوسپانسیون با میزان اسپور برداشت شده با یک رابطه پلی‌نومیال محاسبه شد (رابطه ۳).

$$N = a \log M^2 + b \log M + c \quad \text{رابطه ۳}$$

در این رابطه  $N$  تعداد اسپور برداشت شده در واحد زمان،  $M$  غلظت مایع تلقیح حشره در اتاقک تلقیح و  $a$ ،  $b$  و  $c$  ثابت‌های معادله هستند. برای به دست آوردن مناسب‌ترین غلظت، نقطه عطف این معادله محاسبه شد. برای این منظور از معادله مشتق گرفته و آن را معادل صفر قرار دهیم که معادل مناسب‌ترین غلظت مایع تلقیح مورد استفاده در تله بود که با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شد.

$$N_{max} = \lim_{n \rightarrow \infty} (aM^2 + bM + C) \quad \text{رابطه ۴}$$

$$M_{Optimum} = \frac{b}{2a}$$



شکل ۴- طرح ترسیمی نمای روبروی تله هوشمند رهاسازی اسپور قارچ *Metarhizium anisopliae*

Figure 4. Drawing view of the intelligent trap release of *Metarhizium anisopliae* spore

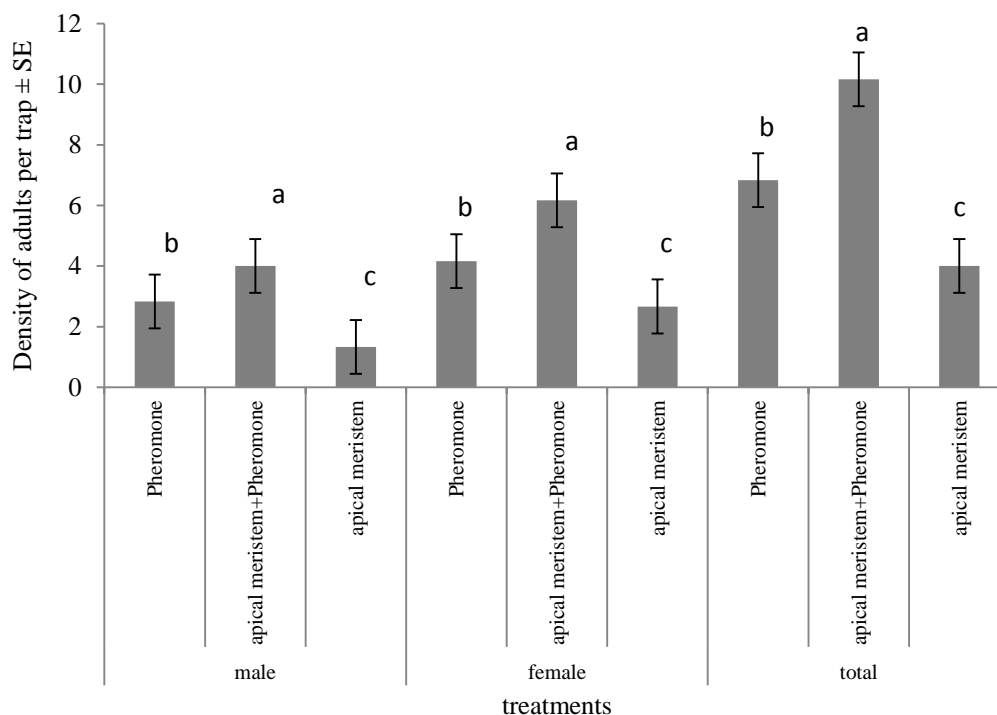
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس میزان شکار حشرات کامل سوسک شاخدار نخل خرما

Table 1. Results of analysis of variance of hunting of date palm horned beetls adults

Factors	Degrees of freedom	Mean squares of traits		
		Male	Female	Total
Prey density	6	6**	0.33**	0.33**
Error	2	4.11	8.44	27
CV		2.18	4.31	5.32

\*\* Indicates significance at 1% probability level

\*\* نشان دهنده معنی دار بودن در سطح احتمال یک درصد



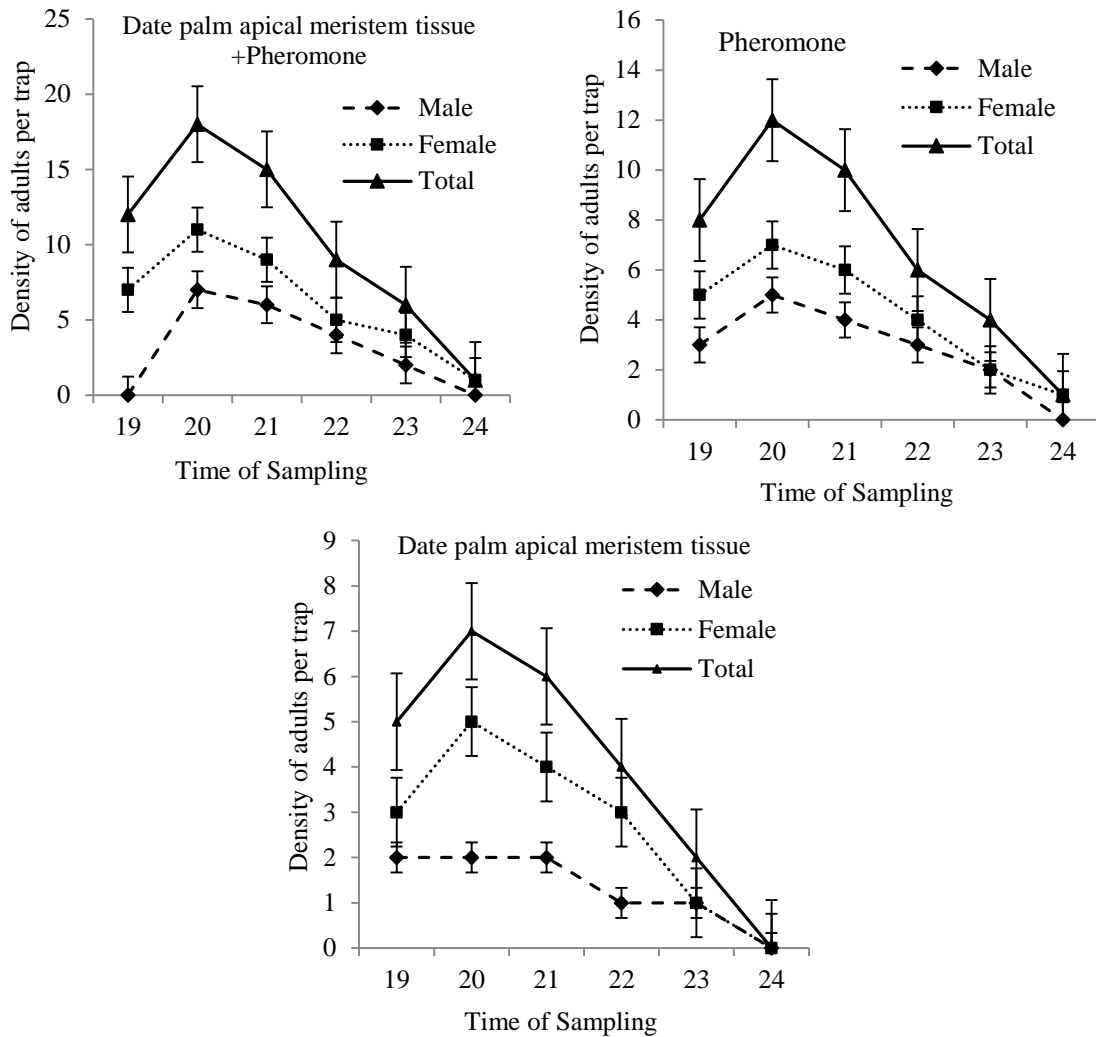
شکل ۵- میانگین میزان شکار حشرات کامل سوسک شاخدار نخل خرما در تیمارهای مختلف جلب کننده به اتاقک شکار

Figure 5. Average hunting rate of date palm horned beetle adults in different trapping treatments

کمترین آن در جاذب مریستم خرما به تنهایی بود. به منظور بررسی تغییرات ساعتی روند شکار در تیمارهای مختلف، منحنی تغییرات ساعتی شکار در سه تیمار اعمال شده رسم شد که نتایج آن در شکل ۶ درج شده است.

به منظور مشخص شدن نحوه تأثیر آن‌ها، میانگین‌ها با استفاده از آزمون SNK با هم مقایسه شدند که نتایج آن‌ها در شکل ۵ ارائه شده است. بر اساس نتایج، بیشترین میزان شکار حشرات کامل در جاذب تلفیقی فرمون تجمعی و مریستم انتهایی خرما و





شکل ۶- منحنی تغییرات ساعتی میزان به تله افتادن در تیمارهای مختلف جلب کننده سوسک شاخدار نخل خرما  
 Fig. 6. Time-fluctuation curve of predation rate in different date palm horned beetle-trapping treatments

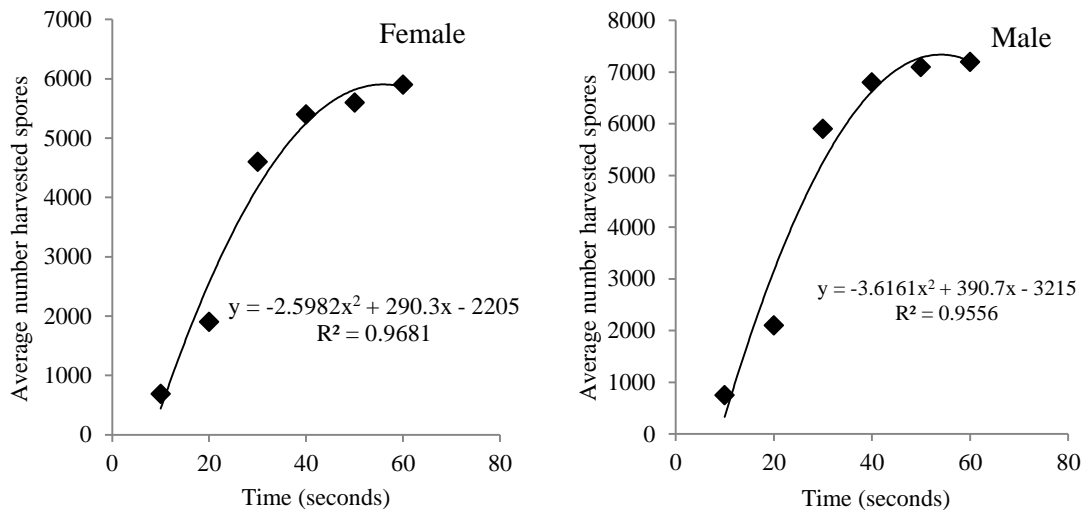
کامل نر و ماده نیز در تمام تیمارها مشابه بود و از روند کلی به تله افتادن جمعیت تیمارها تبعیت می کرد.

#### استاندارد زمان تلقیح حشرات کامل

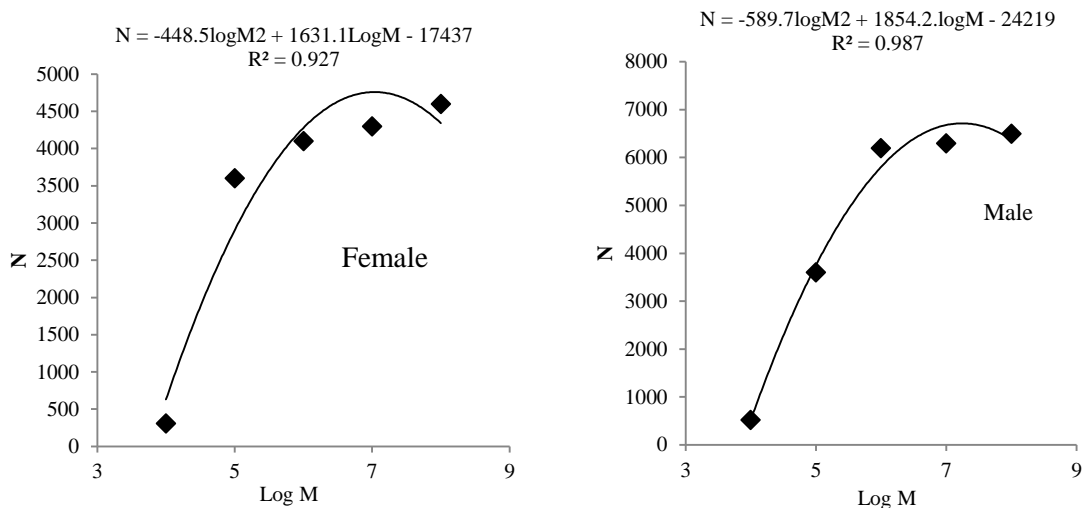
منحنی تغییرات برداشت اسپور طی زمان بر اساس مدل ارائه شده در رابطه ۲ محاسبه شد که نتایج آن در شکل ۷ درج شده است.

#### کارایی تله در تلقیح حشرات کامل

بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان شکار در تمام تیمارهای جلب کننده در ابتدای شب یعنی ساعت ۸ غروب بود. از این ساعت به بعد، به تدریج از میزان شکار کاسته شد، به طوری که در نیمه شب به کمترین مقدار خود رسید. این روند در تمام تیمارها یکسان بود. روند به تله افتادن حشرات



شکل ۷- منحنی مدل تغییرات میزان تلقیح حشرات کامل توسط اسپور قارچ *Metarhizium anisopliae* طی زمان  
 Figure 7. Model curve of changes in the rate of adult inoculation by *Metarhizium anisopliae* spores over time



شکل ۸- منحنی مدل تغییرات دریافت اسپور قارچ *Metarhizium anisopliae* توسط حشرات کامل نسبت به متغیر غلظت مایع تلقیح  
 Figure 8. Model curve of changes in *Metarhizium anisopliae* spore intake by adults related to the inoculum concentration variable

#### استاندارد غلظت اسپور *M. anisopliae*

منحنی مدل تغییرات برداشت اسپور با افزایش غلظت مایع تلقیح بر اساس مدل ارائه شده در رابطه ۳ و ۴ محاسبه شد که نتایج آن در شکل ۸ درج شد.

با استفاده از مدل‌های برازش شده و محاسبه‌های رابطه ۳ و ۴، مناسب‌ترین غلظت مایع تلقیح برای بیشترین تلقیح حشرات کامل نر و ماده به ترتیب معادل  $4/14 \times 10^4$  و

با استفاده از مدل‌های برازش شده و محاسبه‌های رابطه ۱ و ۲، مناسب‌ترین زمان برای بیشترین تلقیح حشرات کامل نر و ماده به ترتیب معادل  $54/3$  و  $55/7$  ثانیه بود. بنابراین، متوسط زمان ۵۵ ثانیه برای رسیدن به بیشترین کارایی تلقیح تله پیشنهاد شد.

کاهش احتمال تماس آنها با اسپور قارچ دارد. بنابراین، رهاسازی مستقیم از طریق پاشش سوسپانسیون اسپور روی نخل خرما از کارایی مناسبی برای کنترل میکروبی برخوردار نیست. نتایج تحقیقات مشابه در رهاسازی *M. anisopliae* برای کنترل سوسک سرخرطومی حنایی خرما این موضوع را اثبات نموده است (Gindin et al., 2006).

از طرفی شرایط محیطی به ویژه دمای بالا، رطوبت به نسبت کم و نور ماوراء بنفش، می‌توانند تاثیر منفی روی جوانه‌زنی اسپور، پایداری و شدت بیماری در شرایط رهاسازی به صورت پاشش مستقیم داشته باشد (Zhang et al., 2011). استفاده از تله هوشمند طراحی شده با از بین بردن این موانع تا حد زیادی اثربخشی عامل بیمارگر را به عنوان عوامل کنترل‌کننده زیستی افزایش می‌دهد. علاوه بر این، تله هوشمند طراحی شده در این پژوهش می‌تواند در راهکار مدیریت تلفیقی آفات برای کنترل جمعیت سوسک شاخدار خرما، به عنوان روشی ایمن و سازگار با محیط زیست استفاده شود. نتایج سایر پژوهش‌های انجام شده در این زمینه نیز نشان داده است که در مدیریت تلفیقی آفات، استفاده از تله‌ها برای رهاسازی قارچ‌های بیمارگر حشرات بهترین ابزار برای به حداقل رساندن آلودگی محیط زیست و همچنین کاهش تأثیر آن بر موجودات غیر هدف است (Toledo et al., 2016). اگرچه در بعضی از پژوهش‌های انجام شده نیز نشان داده شده است که نمی‌توان این روش را به طور کامل بی‌خطر دانست و تهدیدهای بسیار کمی برای گرده‌افشان‌ها و حشرات سودمند گزارش شده است (Hamiduzzaman et al., 2012; Smaghe et al., 2013).

این مطالعه، برای آزمایش اثربخشی رهاسازی قارچ *M. anisopliae* موجود در نخلستان‌های ایران تنظیم شده است. از آنجا که آزمایش‌های اولیه اثربخشی مناسب این قارچ را روی لاروهای سوسک شاخ‌دار خرما در خاک نیز نشان داده است، انجام مطالعات تکمیلی با تکنیک خاک کاربرد نیز بسیار مهم است. نتایج این پژوهش برای اولین بار در ایران با هدف تلقیح قارچ *M. anisopliae* در جمعیت حشرات کامل سوسک شاخدار خرما انجام شد؛ اما در تحقیقات مشابه

۴/۳۶×۱۰<sup>۴</sup> اسپور در میلی‌لیتر بود. بنابراین متوسط غلظت ۴/۲۵×۱۰<sup>۴</sup> اسپور در میلی‌لیتر برای رسیدن به بیشترین کارایی تلقیح تله پیشنهاد شد.

## بحث

رویکرد جدید در کنترل میکروبی، استفاده از وسایل مختلفی است که به عنوان ابزار "رهاسازی متمرکز عوامل بیمارگر حشرات" عمل می‌کنند. این تکنیک دارای مزایای زیادی برای ایجاد اپیدمی عفونت انتخابی روی آفات هدف، بدون آسیب‌رسانی به دشمنان طبیعی است و امکان انتشار عامل بیمارگر را درون جمعیت آفت هدف فراهم می‌کند (Vega et al., 2007). عدم تماس مستقیم عامل بیمارگر با حشرات کامل به ویژه در قارچ‌های بیمارگر از مشکلات کاهش توانایی زنده‌مانی و جوانه‌زنی اسپور قارچ است. استفاده از این روش همراه با در دسترس بودن روش تولید تجاری اسپور، کنترل میکروبی را به عنوان ابزاری قدرتمند در مدیریت تلفیقی آفات مطرح می‌سازد (Zhang et al., 2011; Latifian et al., 2014; Latifian, 2018).

نتایج بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که تله هوشمند رهاسازی *M. anisopliae* به عنوان عامل بیمارگر جمعیت سوسک شاخ‌دار خرما در شرایط آزمایشگاهی از کارایی لازم برخوردار است. این تله توانایی جلب هر دو جنس نر و ماده سوسک را دارد. در این پژوهش نشان داده شد که شرایط فراهم شده در اتاقک تلقیح همراه با متوسط غلظت ۴/۲۵×۱۰<sup>۴</sup> اسپور در میلی‌لیتر و متوسط زمان ۵۵ ثانیه برای رسیدن به بیشترین کارایی تلقیح تله ضرورت دارد. در این پژوهش همچنین نشان داده شد که سوسک‌های بیمار شده با قارچ پس از تلقیح، توانایی خروج از تله و پراکنده شدن در جمعیت را دارند. بنابراین، تله هوشمند طراحی شده پتانسیل بسیار خوبی برای انتشار *M. anisopliae* در جمعیت حشرات کامل سوسک شاخدار خرما دارد. تماس سوسک‌های تلقیح شده با سایر حشرات باعث انتقال افقی قارچ از حشره‌ای به حشره دیگر می‌شود. در شرایط طبیعی حشرات کامل این آفت به طور معمول بین پایه‌های برگ‌های نخل خرما پناه می‌گیرند. این رفتار حشرات کامل نقش مهمی در

صورت همه‌گیری گسترده در جمعیت شود. البته ضریب انتقال قارچ را می‌توان با تغییر رفتار حشرات نر و ماده با استفاده از جاذب‌های تغذیه‌ای در جهت افزایش کارایی تله افزایش داد که در تحقیقات مربوط به سایر آفات نیز نتایج مشابهی حاصل شده است (Fleming, 1972; Tigrerson *et al.*, 2010).

تله رهاسازی طراحی شده در این پژوهش از نظر ساختاری ساده و به راحتی قابل تنظیم است. بررسی‌های لازم برای ارزیابی مدت زمان و عملکرد دستگاه در طول زمان به دقت انجام شده است. این تله می‌تواند برای نظارت و تشخیص ابتدای فصل مفید باشد. بر اساس پژوهش مشابه برای بهبود اثربخشی تله، ارزیابی رنگ بدنه تله (به عنوان مثال قرمز) در میزان شکار و کارایی آن بسیار مؤثر است (Al-Saoud *et al.*, 2010). بنابراین، انجام بررسی‌های تکمیلی با رنگ‌های مختلف در تکمیل پژوهش ضرورت دارد. آزمایش‌های مزرعه‌ای دیگری برای اعتبارسنجی بیشتر استفاده از تله هوشمند رهاسازی اسپور در شرایط کاربردی و ارزیابی توانایی حشرات کامل آلوده در انتقال قارچ به زیستگاه لارو و ایجاد همه‌گیری در جمعیت آفت مورد نیاز است.

در سایر مناطق جهان با استفاده از روش‌های خاص نظیر نشانه‌گذاری رادیو اکتیو امکان توزیع مایع تلقیح عامل بیمارگر را از طریق تماس مستقیم بین حشرات کامل آلوده و سالم پس از رهاسازی در جمعیت آفات مختلف بررسی کرده‌اند (Vega *et al.*, 2007; Kaya and Vega, 2012; Lacey *et al.*, 2015). اعتبار این روش به عنوان ابزاری برای کنترل حشرات کامل سوسک شاخدار خرما بر عدم وجود تفاوت معنی‌دار در جنس نر و ماده آفت از نظر تعداد بازدید از تله و میزان دریافت اسپور قارچ است. این جنبه از عملکرد تله رهاسازی برای موفقیت روش کنترل پیشنهادی مهم است و به عنوان یک پیش‌نیاز برای توسعه تجاری تله جدید طراحی شده برای کنترل حشرات کامل سوسک شاخدار خرما است.

در این پژوهش، توانایی دریافت اسپور قارچ *M. anisopliae* توسط دو جنس حشرات کامل سوسک شاخدار بررسی شد و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اهمیت این موضوع در انتقال افقی بیماری از یک حشره کامل آلوده به یک حشره سالم در حین جفت‌گیری می‌باشد، که شرایط انتشار خودکار قارچ در جمعیت سوسک شاخدار را پس از رهاسازی اولیه فراهم کرده و می‌تواند باعث بروز بیماری به

## References

- Al-Deghairi, M.** 2007. Seasonal fluctuation of the date palm fruit stalk borer, *Oryctes elegans* Prell (Coleoptera: Scarabaeidae), in date palm plantations in Al-Qassim region, Saudi Arabia. **Agricultural and Marine Sciences** 12: 67–70.
- Al-Saoud, A. H., Al-Deeb, M. A. and Murchie, A. K.** 2010. Effect of color on the trapping effectiveness of red palm weevil pheromone traps. **Journal of Entomology** 7: 54-59.
- Butt, T. M. and Goettel, S.** 2000. Bioassay of entomogenous fungi. In: (eds.) Navon, A. and K. R. S. Ascher. Bioassay of entomopathogenic microbes and nematodes. pp. 141-195. CABI publishing, U. K.
- Buxton, P. A.** 1920. Insect pests of dates and the date palm in Mesopotamia and elsewhere. **Bulletin of Entomological Research** 11: 287–303.
- El-Haidari, H. S. and Al-Hafidh, E. M.** 1986. Palm and date arthropod pests in the Near East and North Africa (126 pp). Regional Project for Palm and Dates Research Center in the Near East and North Africa, Food and Agriculture Organization. Baghdad: Al-Watan Press.
- Endrödi, S.** 1985. The Dynastinae of the World (Series Entomologica 28, 800 pp). The Hague: Junk.
- Francardi, V., Benvenuti C., Barzanti G. and Roversi P. F.** 2013. Autocontamination trap with entomopathogenic fungi: a possible strategy in the control of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). **REDIA** XCVI.57-67.
- Fleming, W. E.** 1972. Biology of the Japanese beetle. United States Department of Agriculture. **Technical Bulletin** 1449: 1-129.
- Furlong, M. J. and Pell, J. K.** 1995. Evaluation of a sex pheromone trap for the autodissemination of the fungal entomopathogen *Zoophthora radicans* by the diamondback moth *Plutella xylostella*.

- Program and Abstracts 28th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Ithaca, 16-21 July 1995. pp. 20-21.
- Gindin, G., Levski, S., Glazer, I. and Soroker, V.** 2006. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. **Phytoparasitica** 34 (4): 370-379.
- Hamiduzzaman, M. D., Sinal, A., Guzman-Novoa, E. and Goodwin, P. H.** 2012. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ecto-parasitic mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Invertebrate Pathology** 111: 237-243.
- Kaya, H. K. and Vega, F. E.** 2012. Scope and basic principles of insect pathology, pp. 1-12. In: Insect pathology (2nd ed.) (Vega F. E., Kaya H. K., Eds). Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro, I., Frutos, R., Brownberidge, M. and Gottel, M. S.** 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology** 132: 1-41.
- Latifian, M. and Rad, B.** 2012. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Beauveria brongniartii* Saccardo and *Metarhizium anisopliae* Metsch. To adult *Oryctes elegans* Prell, and effects on feeding and mortality. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences** 4: 1026-1032.
- Latifian, M. and Rad, B.** 2014. Anti-feeding effects of sublethal concentrations of fungus *Beauveria bassiana* Balsamo, *Beauveria brongniartii* Saccardo and *Metarhizium anisopliae* Metsch on the date's horn beetle larvae *Oryctes elegans*. **Journal of Entomological Research** 6(1): 53-65.
- Latifian, M., Rad, B. and Amani, M.** 2014. Mass production of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* by using agricultural products based on liquid-solid diphasic method for date palm pest control. **International Journal of Farming and Allied Sciences** 3: 368-372.
- Latifian, M.** 2018. Physicochemical properties affects on different oil formulations on fungus *Metarhizium anisopliae* for control of *Oryctes elegans*. **Journal Entomology** 15: 83-92.
- Latifian, M. and Rad, B.** 2019. Efficacy evaluation of *Metarhizium anisopliae* inoculative release for biological control of date palm horned beetle *Oryctes elegans* in garden. **Journal of Entomological Society of Iran** 39: 33-45.
- Michael, G., Klen, L., Lawer, C. E. and Lacy, A.** 1999. An attractant trap for autodissemination of entomopathogenic fungi into populations of the japanese beetle *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Biocontrol Science and Technology** 9: 151-158.
- Mohan, M. C., Reddy, N. P., Devi, U. K., Kongara, R. and Sharma, H. C.** 2007. Growth and insect assays of *Beauveria bassiana* with neem to test their compatibility and synergism. **Biocontrol Science and Technology** 17: 1059-1069.
- Nabawy, M.** 2013. An advanced catch-and-release trap for controlling the red palm weevil. **Journal of Life Sciences** 7: 84-88
- Payandeh, A. and Dehghan, A.** 2010. Demography of date palm fruit stalk borer, *Oryctes elegans* (Col.: Scarabaeidae), on date palm under laboratory conditions. **Plant Protection Journal** 2: 255-263.
- Ratcliffe, B. C. and Ahmed, Z.** 2010. Additions to the distribution of Scarabaeidae (Insecta: Coleoptera) in northern Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology** 42: 827-830.
- Rochat, D.** 2006. Trapping: Drawbacks and prospects: need for more research. In Proceedings of the first international workshop on red palm weevil, November 28-29, 2005, Valencia, Spain. Fundacion Agroalimed Valencia, Spain, 99-104.
- Smaghe, G., DeE Meyer, L., Meeus, I. and Mommaerts, V.** 2013. Safety and acquisition potential of *Metarhizium anisopliae* in entomovectoring with bumble bees, *Bombus terrestris*. **Journal of Economic Entomology** 106: 277-282.
- Soltani, R.** 2009. *Oryctes agamemnon* arabicus Fairmaire (1896): Etude bioécologique et éthologique dans les oasis de Rjim Maâtoug au sud ouest Tunisien (181 pp). Thèse de Doctorat, Institut des Sciences Agronomique, Chott Mariem, Tunisie.
- Soltani, R., Chaieb, I. and Ben Hamouda, M.** 2008a. The life cycle of the root borer, *Oryctes agamemnon*, under laboratory conditions. **Journal of Insect Science** 8: 61.

- Soltani, R., Ikbel, C. and Ben Hamouda, M.** 2008b. Descriptive study of damage caused by the rhinoceros beetle, *Oryctes agamemnon*, and its influence on date palm oases of Rjim Maatoug, Tunisia. **Journal of Insect Science** 8: 57.
- Thary, G. G. and Rosli, H.** 2018. A Comparison of the dung beetle (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) collecting performance of pitfall traps and burrowing interception traps. **The Coleopterists Bulletin** 72 :195-202.
- Tigrerson, N., Jadhav, R., Kowles, K. A., Nathan, B. P. and Switzer, P. V.** 2010. Physiological status of male and female *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) affects mating and grouping behaviour. **Environmental Entomology** 39: 892-897.
- Toledo-Hernandez, R. A., Ruiz-Toledo, J., Toledo J. and Sanches, D.** 2016. Effect of three entomopathogenic fungi on three species of stingless bees (Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology** 109: 1015-1019.
- Vega, F. E., Dowd, P. F., Lacey, L. A., Pell, J. K., Jackson, D. M. and Klein, M. G.** 2007. Dissemination of beneficial microbial agents by insects. In: Lacey L. A. and Kaya H. K., Eds., Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 127-146.
- Zhang, L. W., Liuy, J., Yao, J., Wang, B., Huang, B., Li, Z. Z., Fan, N. M. Z. and Sun, J. H.** 2011. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) isolates as potential agents for control of *Dendroctonus valens*. **Insect Science** 18: 209-216.

## Advanced trap design of *Metarhizium anisopliae* spore release for controlling date palm horned beetle *Oryctes elegans*

M. Latifian\* and A. Mostaan

Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Horticulture Science Research Institute, Date Palm and Tropical Research Center

(Received: March 15, 2020- Accepted: May 21, 2020)

### Abstract

The aim of this study was to investigate the potential of traps for releasing *Metarhizium anisopliae* Metsch in a population of date palm horned beetle *Oryctes elegans* Prell. The structure used in the trap consisted of an absorber section, stopper plates, pickup hopper, and trap chamber. In order to study different pheromone and dietary compounds in the trap predation rate, three treatments in three replications were cumulative pheromone, integration (cumulative pheromone and nutrient absorber) and nutrient absorber containing 20 g of date palm meristem. Insect retention time and concentration of inoculum were standardized to achieve maximum trap efficiency in adult insemination. Hence, five times of 20, 30, 40, 50 and 60 seconds and 5 concentrations of  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  spore/mL were considered. The final dimensions of 350×350×650 mm trap were made using standard workshop methods. The results showed that the type of attractant had significant effects on trapping efficiency of adults. The highest rate of insect trapping was observed in the combination of cumulative pheromone and date meristem and the lowest was found in the date meristem alone. The highest rate of trapping occurred at 8 pm. The best time and concentration for maximum male and female inoculation were 54.3 and 55.7 seconds as well as  $4.14 \times 10^4$  and  $4.36 \times 10^4$  spores/ml, respectively. The results of the present research showed that the smart releasing trap of *M. anisopliae* as a pathogenic agent of the population of palm horned beetles possess the required efficiency in laboratory conditions.

**Key words:** *Metarhizium anisopliae*, *Oryctes elegans*, advanced trap, trapping and releasing

\*Corresponding author: masoud\_latifian@yahoo.com