



تأثیر ترکیبات حفاظتی از اشعه ماوراءبنفش در بیماری زایی باکتری *Bacillus thuringiensis* علیه برگ خوار چغندر قند *Spodoptera exigua* در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی

مهديه موسوی^۱
<https://orcid.org/0000-0002-6475-7489>
شهرام آرمیده*^۲
<https://orcid.org/0000-0003-4220-6165>
سمانه اکبری^۳
<https://orcid.org/0009-0000-2662-8136>

۱، ۲ و ۳ - گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده: باکتری *Bacillus thuringiensis* به عنوان یک آفت کش بیولوژیک در کنترل جمعیت بعضی از آفات نقش موثری دارد. با این وجود تابش ماوراءبنفش خورشیدی یکی از عوامل تخریب اسپور و کریستال این باکتری است. بنابراین تحقیق روی ترکیبات حفاظتی در برابر تابش ماوراءبنفش ضروری می باشد. در این تحقیق، اثر زغال فعال، گرافن اکسید و نانوغرافن اکسید در حفظ بیماری زایی باکتری *Btk* در برابر اشعه ماوراءبنفش روی آفت برگ خوار چغندر قند (کارادرینا) *Spodoptera exigua* (Hübner) در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه پروبیت تأثیر غلظت های باکتری *Btk* روی لاروهای سن دوم آفت بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط آزمایشگاهی نشان داد غلظت کشته شده ۵۰ درصد به ترتیب ۱۱۴۹/۶۲ و ۷۲۹/۱۳ پی پی ام می باشد. نتایج بررسی تأثیر اشعه ماوراءبنفش روی بیماری زایی باکتری *Btk* نشان داد که باکتری در معرض این اشعه نسبت به باکتری بدون پرتو دهی، روی لاروهای سن دوم کشندگی کمتری دارد. تجزیه واریانس حاصل از تأثیر اشعه ماوراءبنفش روی جوانه زنی اسپور باکتری همراه با مواد حفاظتی در مقایسه با شاهد نشان داد که زغال فعال دارای عملکرد موثرتری می باشد. همچنین تجزیه واریانس خاصیت حفاظت کنندگی تیمارها از اشعه ماوراءبنفش روی اثربخشی باکتری *Btk* علیه سن دوم لاروی آفت در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی نشان داد تیمار زغال فعال اثر حفاظتی بیشتری نسبت به سایر تیمارها دارد. با توجه به نتایج، زغال فعال در استفاده هم زمان با باکتری *Btk* علیه این آفت توصیه می شود. زغال فعال را می توان در تهیه فرمولاسیون های این آفت کش به منظور حفاظت از آن در برابر اشعه ماوراءبنفش خورشید پیشنهاد نمود.

تاریخ دریافت:

۱۴۰۳/۷/۱۹

تاریخ پذیرش:

۱۴۰۳/۹/۳

واژه های کلیدی: آفت کش بیولوژیک، تابش خورشیدی، ترکیبات حفاظتی، کارادرینا، کنترل بیولوژیک

Citation: Mousavi, M., Aramideh, sh. & Akbari, S. (2024). Effect of protective compounds from ultraviolet rays in pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* in laboratory and field conditions. *Plant Pest Research*, 14(3), 29-43. Doi: <https://doi.org/10.22124/iprj.2024.28656.1599>



*Corresponding author: Sh.aramideh@urmia.ac.ir

مقدمه

برگ‌خوار چغندر قند یا کاردرینا (*Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) بومی جنوب آسیا بوده و به‌طور وسیعی در سراسر جهان گسترش یافته است (Si et al., 2012). این آفت به بیش از ۱۳۰ گونه گیاهی از جمله چغندر قند، پنبه، سویا، ذرت، بادام زمینی و تنباکو خسارت وارد می‌کند (Fu et al., 2017; Hafeez et al., 2022). در کنترل این آفت از ترکیبات شیمیایی مختلفی استفاده می‌شود که به‌دلیل اثرات مضر آنها روی محیط زیست، گرایش‌ها به استفاده از محصولات ارگانیک و استفاده از آفت‌کش‌های بیولوژیک افزایش یافته است (Vilas-Boas et al., 2007; Che et al., 2013). باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*) یک آفت‌کش بیولوژیک و عامل بیماری‌زای حشرات بوده و از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین عوامل بیولوژیک محسوب می‌شود که به‌طور گسترده به‌منظور کنترل آفات در کشاورزی و جنگل‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این باکتری ایمن و دوست‌دار محیط زیست شناخته می‌شود و همچنین به‌دلیل ارزان بودن آن توسط کشاورز به‌راحتی مورد پذیرش قرار گرفته و توسعه می‌یابد (van Bokhorst-van de Veen et al., 2015; Moustafa et al., 2018; Federici, 2022; Ortiz & Sansinenea, 2023). این باکتری قدرت بیماری‌زایی روی حشرات راسته Lepidoptera، Diptera و Coleoptera داشته و خاصیت حشره‌کشی آن در ارتباط با تأثیر اسپور و توکسین پروتئینی بنام دلتا‌اندوتوکسین می‌باشد. دلتا‌اندوتوکسین پس از تغذیه و هضم توسط لارو حشرات حساس، در محیط قلیایی روده فعال شده و موجب تخریب سلول‌های پوششی و فلج میزبان می‌شود و همچنین اسپور باکتری با ورود به حفره خونی و تکثیر موجب عفونت عمومی و مرگ حشره می‌شود (Aramideh, 2016; Federici, 2022; Ortiz & Sansinenea, 2023). اشعه ماوراءبنفش خورشیدی موجب تجزیه اسپور و کریستال پروتئین می‌شود (Jalali et al., 2018). اشعه ماوراءبنفش علت اصلی تجزیه دلتا‌اندوتوکسین این باکتری بوده و همچنین عامل اصلی غیرفعال شدن *Bt* توسط کاهش زنده‌مانی اسپور و یکپارچگی توکسین می‌باشد (Pan et al., 2017; Zogo et al., 2019; Jalali et al., 2020a; Lahlali et al., 2022). اشعه ماوراءبنفش موجب یونیزه شدن آب درون اسپور و کریستال پروتئین باکتری *Bt* شده، بنابراین، سبب کاهش ماندگاری، زنده‌مانی و اثر آن‌ها می‌شود. بنابراین، اشعه ماوراءبنفش یک عامل محدود کننده در استفاده از باکتری در طبیعت می‌باشد (Pusztai, 2016; Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2016). بنابراین، به‌کارگیری ترکیبات مناسب برای حفاظت باکتری در برابر پرتوهای ماوراءبنفش خورشیدی موجب افزایش و دوام فعالیت حشره‌کشی این باکتری می‌شود (de Oliveira et al., 2022). در سال‌های گذشته چندین ماده طبیعی و مصنوعی به‌عنوان محافظ باکتری در برابر پرتو ماوراءبنفش خورشید مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از بین آن‌ها ترکیبات آروماتیک مانند اسیداوریک، اسید پارا آمینوبنزوئیک، ۲-هیدروکسی ۴-متوکسی - ترمون، اسید فولیک و تینوپال را می‌توان نام برد. این ترکیبات به‌دلیل جذب پرتو ماوراءبنفش خورشید، آفت‌کش‌های میکروبی را از اثرهای زیان‌بار آن محافظت می‌کنند (Jalali et al., 2020b). در واقع بهبود فرمولاسیون باکتری *Bt* در مقابل اشعه ماوراءبنفش می‌تواند نقش کلیدی در افزایش فعالیت و کاهش تعداد دفعات کاربرد آن در مزرعه ایفا کند. به‌منظور رسیدن به این اهداف *Bt* با جاذب‌های اشعه ماوراءبنفش ترکیب شده و محصور می‌شوند (Brar et al., 2006; Alkassab et al., 2022). بررسی‌های قبلی نشان می‌دهد که پروتئین‌های پروتوکسین و توکسین *Bt* می‌توانند به‌سرعت در ترکیبات آلی-معدنی جذب شده (Zhou et al., 2005; Muchaonyerwa et al., 2006; Helassa et al., 2009) و فعالیت حشره‌کشی آن‌ها نسبت به پروتئین‌های آزاد برابر یا بیشتر شود (Saxena et al., 2010). کربن فعال که به آن زغال فعال هم گفته می‌شود، به گروهی از مواد با پایه کربنی اطلاق می‌شود که دارای سطح متخلخل بوده و به دلیل قدرت جذب بالا در موارد مختلف کاربرد دارد (Moraes et al., 2005; Eliane et al., 2012). گرافن دارای ساختار دوبعدی است که اتم‌های کربن در آرایشی پنج ضلعی به صورت صفحه‌های نازک با ضخامت یک اتم در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. اکسید گرافن یک نانو ذره مشتق شده از گرافن به همراه گروه‌های عاملی مختلف مانند کربوکسیل، هیدروکسیل و اپوکسی است که باعث افزایش پایداری آن شده است. گرافن و اکسید گرافن دارای خواص فیزیکی مانند پایداری

گرمایی، رسانایی الکتریکی و جاذب اشعه ماوراء بنفش می‌باشد (Soldano et al., 2010; Zhang et al., 2019). نانو اکسید گرافن دارای ساختاری لایه‌ای از جنس کربن است که به علت داشتن خواص فوق‌العاده سطحی توانایی بالایی در جذب، انتقال و رهایش الکترون و ترکیبات یونی و ملکولی دارد. این خواص باعث شده تا نانو اکسید گرافن به ماده‌ای منحصر به فرد در صنایع مختلف از جمله کشاورزی تبدیل شود (Wang et al., 2010; Bolibok et al., 2018).

با توجه به اثرات سوء اشعه ماوراء بنفش بر عملکرد اسپور و کریستال باکتری *Bt*، بررسی حاضر در راستای تاثیر مثبت سه ترکیب گرافن اکسید، نانو گرافن اکسید و زغال فعال در ماندگاری و اثربخشی آن مورد استفاده قرار گرفت و پتانسیل حفاظتی هر سه ترکیب روی باکتری *Btk* علیه برگ خوار چغندر قند *S. exigua* در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی مقایسه شد.

مواد و روش‌ها پرورش میزبان

در تحقیق حاضر رقم دوروتی^۱ چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) که به طور متداول در منطقه آذربایجان غربی کشت می‌شود، انتخاب شد. بذر رقم مورد مطالعه از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان آذربایجان غربی تهیه شد. بذرها در گلدان‌های پلاستیکی با ابعاد ۲۵×۲۰ سانتی‌متر در اواخر فروردین ماه کشت شدند. آبیاری گلدان‌ها به فواصل منظم سه روز یک‌بار صورت گرفت. همچنین، در این آزمایش از مصرف حشره کش‌ها اجتناب شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۲۶±۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰±۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی برای پرورش آفت نگه‌داری شدند.

پرورش حشره مورد آزمایش

جمعیت اولیه پروانه برگ‌خوار چغندر قند *S. exigua* از مزارع چغندر قند نوشین شهر از توابع شهرستان ارومیه جمع‌آوری و به بخش حشره‌شناسی دانشگاه ارومیه انتقال یافت. این آفت دو نسل در شرایط آزمایشگاهی در اتاق پرورش روی غذای مصنوعی (لویا چیتی، آگار، مخمر آبجوی خشک، متیل پراهایدروکسی بنزوات، اسید سوربیک، اسید اسکوربیک، فرمالدئید و آب مقطر) در شرایط کنترل‌شده، دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۵±۴ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی پرورش یافت (Aramideh et al., 2005). سپس برای تخم‌گیری از حشرات کامل از ظروف تخم‌گیری استوانه‌ای به ارتفاع ۱۵ و قطر دهانه ۱۰ سانتی‌متر که درب آنها با پارچه توری پوشانده شده بود، استفاده شد. به منظور جمع‌آوری دسته‌های تخم از کاغذ صافی رول که به صورت بادبزی تا خورده بودند درون ظروف تخم‌گیری استفاده شد. برای تغذیه حشرات کامل از آب و عسل ۱۰ درصد استفاده شد. تخم‌ها هر ۱۲ ساعت برداشت شده و به منظور حفظ جمعیت کلنی و یا انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (Shargi et al., 2021). از مرحله لاروهای سن دوم پروانه برگ‌خوار چغندر قند بعد از تفکیک با استفاده از عرض کپسول سر در آزمایش‌های زیست‌سنجی استفاده شد.

ترکیبات مورد استفاده در تحقیق

باکتری *B. thuriugiensis* subsp. *kurstaki* با فرمولاسیون تجاری پودر ترشونده به نام بلتیروول^۲ (32000 IU/mg) تولید کشور اسپانیا شرکت پروبلت مادرید، زغال فعال به قطر ذرات ۰/۲ تا ۵ میلی‌متر با نام تجاری چار کوکپس^۳ ساخت شرکت جیگانتیک-هند^۴ با خاصیت داروئی و تصفیه‌کننده هوا و مواد شیمیایی، پودر نانو گرافن اکسید با اندازه ۳/۴ تا ۷ نانومتر تولید شرکت پیشگامان

1. Dorotea

2. Belthirul

3. Charcocaps

4. Gigantic Carbon Co., Ltd, India

نانومواد ایرانیان و گرافن اکسید ساخت شرکت یونایتد نانو تک^۵ هند با ضخامت ۳-۶ نانومتر در ۵-۱۰ میکرون مورد استفاده قرار گرفت.

پرتو دهی با اشعه ماوراء بنفش

به منظور پرتو دهی به لاروها از لامپ اشعه ماوراء بنفش UVC با طول موج ۲۵۴ نانومتر با توان ۳۰ وات با طول ۴۰ و عرض ۲ سانتی متر ساخت کشور روسیه که داخل هود جاگذاری شده بود، استفاده شد (Proo et al., 2023).

تاثیر کشندگی باکتری *Btk* روی لاروهای سن دوم پروانه برگ‌خوار چغندر قند

به منظور تعیین میزان کشندگی (LC₅₀) باکتری روی سن دوم لاروی، ابتدا در یک سری آزمایش‌های مقدماتی غلظت‌هایی با کمترین و بیشترین تلفات (۲۰ الی ۸۰ درصد) تعیین، سپس در فاصله این دو غلظت، سه غلظت به روش لگاریتمی مشخص شد (Pourmirza, 2005). پنج غلظت (۳۰۰، ۷۲۵، ۱۱۵۰، ۱۵۷۵ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام) به همراه یک غلظت آب مقطر و هر غلظت در سه تکرار و تمام غلظت‌ها به همراه یک درصد پخش‌کننده ان‌یو فیلم-۱۷ به وسیله دستگاه برج پاشش با حجم ۷۰۰ میکرو لیتر با فشار پاشش ۱ بار بر اینچ روی برگ چغندر قند ۵-۶ برگه اسپری شد. گلدان‌های چغندر قند توسط ظروف به ابعاد ۱۰×۸×۵ سانتی متر محصور شده بودند. تعداد ۱۰ عدد لارو سن دوم در هر تکرار رهاسازی شدند. نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت ثبت شد (Abdollahzadeh Bavani et al., 2019).

تاثیر اشعه ماوراءبنفش روی جوانه‌زنی اسپور باکتری *Btk* همراه با مواد حفاظتی

مقدار یک گرم از فرم تجاری باکتری بلتیرول در پنج سی‌سی آب یونیزه حل شد. سپس روی محیط آگار لوریا لیزوژنیک LB^۶ حاوی ۱٪ تریپتون، ۰/۰۵٪ عصاره مخمر، ۱٪ NaCl با pH 7.0 در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس از کلنی‌های ایجاد شده، به وسیله لوپ روی محیط کشت T3 حاوی تریپتون به مقدار ۳ گرم، تریپتوز ۲ گرم، مخمر ۱/۵ گرم، سولفات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH=۶/۸)، ۰/۰۰۵ گرم کلرید منیزیم و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر انتقال یافت که مناسب تولید اسپور و کریستال می‌باشد. سپس محیط تهیه شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکر قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت، کریستال‌ها و اسپورها بر اساس دستورالعمل منصف و همکاران (Mounsef et al., 2014) جدا و از اسپورها در آزمایش جوانه‌زنی استفاده شد. در این آزمایش مقدار ۳۰ میلی لیتر از محلول اسپور *Btk* با غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام به همراه ۰/۵ گرم در لیتر از مواد حفاظتی شامل گرافن اکسید، نانو گرافن اکسید، زغال فعال و بدون ماده حفاظتی (به عنوان شاهد)، هر تیمار در سه تکرار درون ظروف پتری حاوی محیط کشت نوترینت آگار^۷ ریخته شدند و به مدت ۴۸ ساعت در فاصله ۲۰ سانتی متری از لامپ ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار داده شدند. سپس در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت نمونه برداری انجام شد. نمونه زمان‌های مختلف برای بررسی مقدار اسپور زنده درون محیط کشت غذایی آگار کشت داده شدند و کلنی‌های ایجاد شده بعد از ۴۸ ساعت مورد شمارش قرار گرفتند (Sansinenea et al., 2015). درصد زنده‌مانی اسپورهای باکتری بعد از تابش اشعه ماوراءبنفش در تیمارها در هر زمان نسبت به تعداد اسپورهای باکتری تیمار شاهد با استفاده از فرمول زیر محاسبه و مقایسه شد (معادله ۱) (Jalali & Maghsoudi, 2024).

$$V_{spore} (\%) = \frac{CFU_T}{CFU_C} \quad \text{معادله (۱)}$$

$V_{spore} (\%)$: درصد زنده‌مانی اسپور

CFU_C : تعداد کلنی‌های ایجاد شده در تیمار شاهد (*Btk* بدون ماده حفاظتی - تابش دیده)

CFU_T : تعداد کلنی‌های ایجاد شده در تیمارها (*Btk* به همراه ماده حفاظتی - تابش دیده)

^۵. United Nanotech

^۶. Luria lysogenic

^۷. Nutrient agar

تاثیر UVC بر کشندگی باکتری *Btk* روی لاروهای سن دوم پروانه برگ‌خوار چغندرقد

شش عدد گلدان حاوی گیاه چغندرقد تهیه شد و روی آن‌ها غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام از باکتری *Btk* محلول‌پاشی شد. سپس سه عدد از گلدان‌های محلول‌پاشی شده به مدت ۱۰ دقیقه در ارتفاع ۲۰ سانتی‌متری از منبع لامپ UVC قرار داده شد و سه گلدان باقی‌مانده بدون تاثیر UVC و به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. سپس تعداد شش برگ از هر تیمار انتخاب و بدون جدا کردن برگ داخل ظرف یک‌بار مصرف به ابعاد ۱۰×۸×۵ سانتی‌متر محصور و تعداد ۱۰ عدد لارو سن دوم داخل آن‌ها رهاسازی شدند و درب ظروف با توری آرگانزا که غیرقابل عبور برای لاروها می‌باشد بسته شد. مرگ و میر لاروها در هر دو تیمار (هر کدام در شش تکرار) بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت شمارش و مقایسه شد.

تاثیر اشعه UVC بر کشندگی باکتری *Btk* ترکیب‌شده با مواد حفاظتی روی لاروهای سن دوم پروانه برگ‌خوار چغندرقد

برای انجام این آزمایش تعداد چهار عدد گلدان چغندرقد با غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام از باکتری *Btk* به تنهایی و همچنین ترکیب شده با مواد حفاظتی به صورت جداگانه و تیمار شاهد با آب مقطر محلول‌پاشی شد. گلدان‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ارتفاع ۲۰ سانتی‌متری از منبع لامپ UVC قرار داده شدند. سپس تعداد پنج برگ از هر کدام از گلدان‌ها انتخاب و داخل ظروف به ابعاد ۱۰×۸×۵ سانتی‌متر محصور و تعداد ۱۰ عدد لارو سن دوم داخل آن‌ها رهاسازی شدند و درب ظرف‌ها با توری آرگانزا بسته شدند. مرگ و میر لاروها در همه تیمارها بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت شمارش و مقایسه شد.

بررسی تاثیر تابش نور خورشید بر کشندگی باکتری *Btk* ترکیب‌شده با مواد حفاظتی روی لاروهای سن دوم پروانه برگ‌خوار چغندرقد در شرایط صحرائی

برای انجام این آزمایش تعداد چهار عدد گلدان چغندرقد با غلظت ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام از باکتری *Btk* به تنهایی و همچنین ترکیب شده با مواد حفاظتی به صورت جداگانه و تیمار شاهد با آب مقطر محلول‌پاشی شد. گلدان‌ها بعد از محلول‌پاشی به مدت شش ساعت در برابر نور خورشید قرار داده شدند. بعد از انتقال گلدان‌ها به آزمایشگاه تعداد پنج برگ از هر کدام از گلدان‌ها انتخاب و داخل ظروف به ابعاد ۱۰×۸×۵ سانتی‌متر محصور و تعداد ۱۰ عدد لارو سن دوم داخل آن‌ها رهاسازی شدند و درب ظروف با توری آرگانزا بسته شد. مرگ و میر لاروها در همه تیمارها بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت شمارش و مقایسه شد.

تاثیر ترکیب‌های حفاظتی روی شاخص کلروفیل^۸ SPAD^۸ کل برگ

برای ارزیابی اثرات ترکیب‌های حفاظت‌کننده باکتری *Btk* بر شاخص کلروفیل برگ، بعد از قرار گرفتن برگ‌های آغشته به مواد حفاظت‌کننده به مدت سه روز در معرض نور خورشید، میزان کلروفیل برگ تیمارها با استفاده از دستگاه کلروفیل سنج (مدل SPAD-Japan, Minolta 502) در روز اول، دوم و سوم تعیین و با تیمار شاهد (گیاه بدون ماده حفاظتی) مقایسه شد. اصول اندازه‌گیری بر اساس اندازه‌گیری عبور طول موج‌های محدوده نور قرمز (۶۵۰ نانومتر) و مادون قرمز (۹۵۰ نانومتر) از برگ استوار است. کلروفیل نور قرمز را جذب می‌کند، اما نور مادون قرمز را از خود عبور می‌دهد. بر اساس اختلاف بین میزان عبور نور در محدوده این دو طول موج، دستگاه یک عدد را که کاملاً همبستگی نزدیکی با مقدار کلروفیل دارد، محاسبه می‌کند (Hosseini et al., 2022).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

به‌منظور تعیین مقادیر کشندگی LC₅₀ باکتری *Btk* در آزمایشگاه، داده‌های حاصل از مرگ‌ومیر لاروها بعد از اصلاح با معادله آبوت به روش تجزیه پرویت تجزیه و تحلیل شدند (معادله ۲) (Abbott, 1925).

⁸. Soil Plant Analysis Development

$$\text{معادله (۲)} \quad \text{تلفات شاهد} - \text{تلفات تیمار} = \left(\frac{\text{تلفات شاهد}}{\text{تلفات شاهد}} \right) \times 100 = \text{درصد مرگ و میر}$$

برای ارزیابی تاثیر اشعه UVC بر کشندگی باکتری *Btk* روی لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار چغندر قند از آزمون تی زوجی (paired t-test) و همچنین برای ارزیابی معنی داری تاثیر اشعه ماوراءبنفش روی جوانه زنی اسپور باکتری همراه با مواد حفاظتی، تاثیر اشعه UVC بر کشندگی باکتری *Btk* ترکیب شده با مواد حفاظتی در شرایط آزمایشگاهی، تاثیر تابش نور خورشید بر کشندگی باکتری *Btk* ترکیب شده با مواد حفاظتی در شرایط صحرائی و اندازه گیری شاخص کلروفیل کل برگ ناشی از مواد حفاظتی از تجزیه واریانس یک طرفه ANOVA و برای مقایسه میانگین ها از آزمون توکی با استفاده از نرم افزار SPSS ver. 22 استفاده شد.

نتایج

تاثیر کشندگی باکتری *Btk* روی لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار چغندر قند

تجزیه پروبیت حاصل از تاثیر غلظت های مختلف باکتری *Btk* روی لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار چغندر قند بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط آزمایشگاهی نشان داد غلظت کشنده ۵۰ درصد روی سن دوم این آفت به ترتیب معادل ۱۱۴۹/۶۲ و ۷۲۹/۱۳ پی پی ام می باشد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه پروبیت اثر غلظت های مختلف باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* روی لاروهای سن دوم

پروانه برگ خوار چغندر قند بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط آزمایشگاهی

Table 1. Probit analysis of the effect of different concentrations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on second instar larvae of *Spodoptera exigua* after 48 and 72 hours under laboratory conditions

Treatment	Con. (ppm)	Time (h)	Slope ± SE	Intercept	X ² (df)	LC ₂₅ (95% CLs)	LC ₅₀ (95% CLs)
<i>Btk</i>	300.00	48	2.81 ± 0.48	-3.611	0.79 (3)	661.93 (470.58-816.64)	1149.62 (950.45- 1402.34)
	725.00						
<i>Btk</i>	1150.00	72	2.09 ± 0.39	-0.976	3.56 (3)	346.48 (180.58- 485.94)	729.13 (531.89- 925.63)
	1575.00						
	2000.00						
Control							

تاثیر اشعه ماوراءبنفش روی جوانه زنی اسپور باکتری همراه با مواد حفاظتی

تجزیه واریانس حاصل از تاثیر اشعه ماوراءبنفش روی جوانه زنی اسپور باکتری همراه با مواد حفاظتی در مقایسه با شاهد (باکتری فاقد مواد حفاظتی) نشان داد که همه تیمارها با شاهد اختلاف معنی داری دارند، اما زغال فعال دارای خاصیت حفاظتی بسیار بالایی نسبت به سایر تیمارها می باشد (جدول ۲).

جدول ۲- درصد جوانه زنی اسپور باکتری همراه با مواد حفاظتی تحت تاثیر اشعه ماوراءبنفش

Table 2. The percentage of bacterial spore germination with protective substances under the influence of ultraviolet ray

Treatments	Spore germination %			
	12 h	24 h	36 h	48 h
<i>Btk</i> +Graphene oxide	66.67±1.67 ^b	60.00±2.89 ^b	49.67±0.88 ^b	40.67±0.67 ^b
<i>Btk</i> +Nano graphene oxide	70.00±0.00 ^b	63.33±1.67 ^b	48.33±1.67 ^{bc}	44.00±1.00 ^b
<i>Btk</i> +Active charcoal	86.33±0.88 ^a	80.00±0.00 ^a	68.33±1.67 ^a	62.67±2.33 ^a
<i>Btk</i> (control)	56.67±3.33 ^c	46.67±3.33 ^c	40.00±2.89 ^c	28.33±1.67 ^c
<i>F</i> (3, 8)	41.42	33.83	38.00	83.44
<i>P</i>	0.001	0.001	0.001	0.001

تاثیر اشعه UVC بر کشندگی باکتری *Btk* روی لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار چغندر قند

نتایج آزمون تی زوجی تاثیر باکتری تحت تاثیر اشعه UVC و باکتری بدون پرتو دهی روی لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار چغندر قند در شرایط آزمایشگاهی نشان داد بین تیمار باکتری *Btk* تحت تاثیر اشعه با باکتری بدون پرتو دهی بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معنی داری وجود دارد (جدول ۳). نتایج نشان داد در هر دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت باکتری های در معرض UVC کشندگی کمتری نسبت به باکتری بدون پرتو دهی داشتند.

جدول ۳- تجزیه تی-تست تاثیر باکتری *Btk* تحت تاثیر اشعه UVC و باکتری بدون پرتو دهی روی مرگ و میر لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار چغندر قند بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط آزمایشگاهی

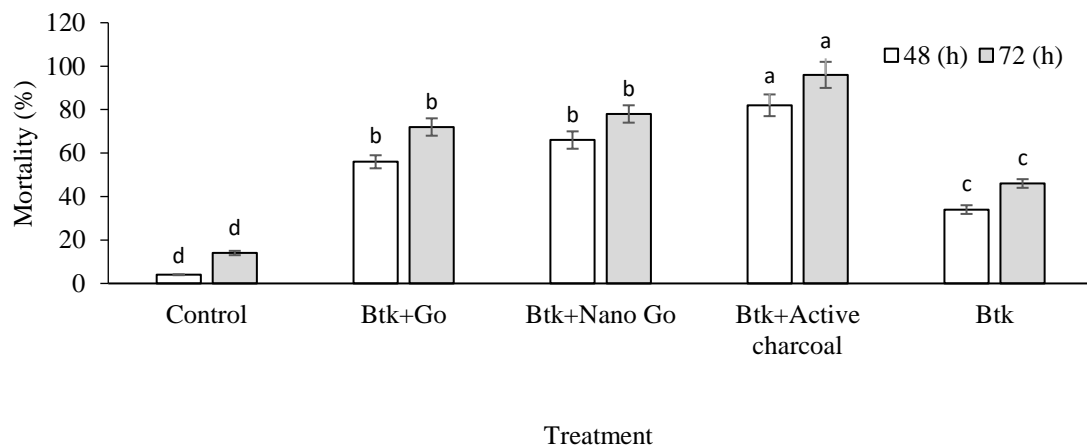
Table 3. T-test analysis of the effect of *Btk* with UVC radiation treatment and bacteria without radiation treatments on the mortality of second instar larvae of *Spodoptera exigua* after 48 and 72 hours in laboratory conditions

Time (h)	Treatment	% Mortality \pm SE*	T (df)	P
48	<i>Btk</i> -UV	21.70 \pm 2.41 ^b	-3.464(5)	0.018
	<i>Btk</i>	41.70 \pm 3.17 ^a		
72	<i>Btk</i> -UV	40.00 \pm 3.63 ^b	-15.492(5)	0.001
	<i>Btk</i>	80.00 \pm 4.63 ^a		

* درصد مرگ و میر با حروف غیر مشابه نشانه معنی داری تیمارها می باشد.

تاثیر مواد حفاظتی بر عملکرد باکتری *Btk* در مقابل اشعه UVC روی لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار چغندر قند در شرایط آزمایشگاهی

تجزیه واریانس نشان داد که تاثیر مواد حفاظتی بر عملکرد باکتری *Btk* در مقایسه با تیمار بدون ماده حفاظتی و تیمار شاهد روی لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف معنی داری داشت (به ترتیب $F_{4, 20}=164.071$; $p=0.001$ و $F_{4, 20}=77.89$; $p=0.001$).



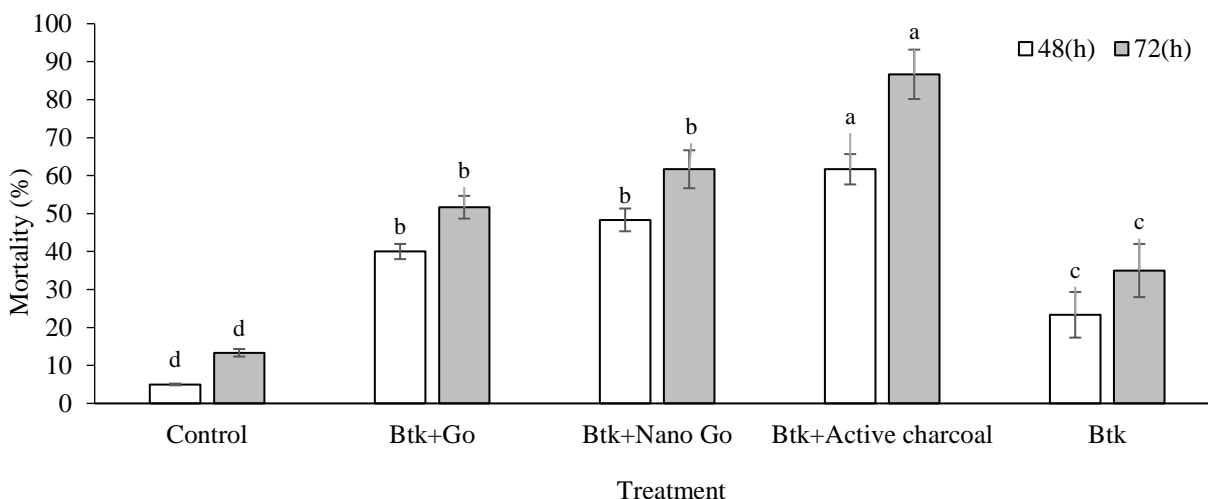
شکل ۱- مقایسه درصد مرگ و میر لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار چغندر قند تحت تیمارهای باکتری در اختلاط با مواد حفاظتی، باکتری بدون ماده حفاظتی و شاهد بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت در سطح احتمال ۵٪ با آزمون توکی. ستون های با حروف یکسان اختلاف معنی داری با هم ندارند.

Figure 1. Comparison of the mortality percentage of the second instar larvae of *Spodoptera exigua* under bacterial treatments mixed with protective substances, bacteria without protective substances and the control after 48 and 72 hours, with a 5% probability level by Tukey test. The columns with the same letters indicate non-significant difference between treatments.

مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که همه تیمارها با شاهد اختلاف معنی داری داشتند و بیشترین حفاظت از باکتری مربوط به تیمار باکتری در اختلاط با زغال فعال می باشد (شکل ۱).

تاثیر تابش نور خورشید بر کشندگی باکتری *Btk* ترکیب شده با مواد حفاظتی روی لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار چغندر قند در شرایط صحرائی

تجزیه واریانس حاصل از تاثیر مواد حفاظتی بر عملکرد باکتری *Btk* روی لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار در مقایسه در مقایسه با شاهد (باکتری بدون ماده حفاظتی) بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط صحرائی و تحت تابش نور خورشید اختلاف معنی داری داشتند. ($F_{4, 25}=45.78$; $p=0.001$) و ($F_{4, 25}=50.37$; $p=0.001$)



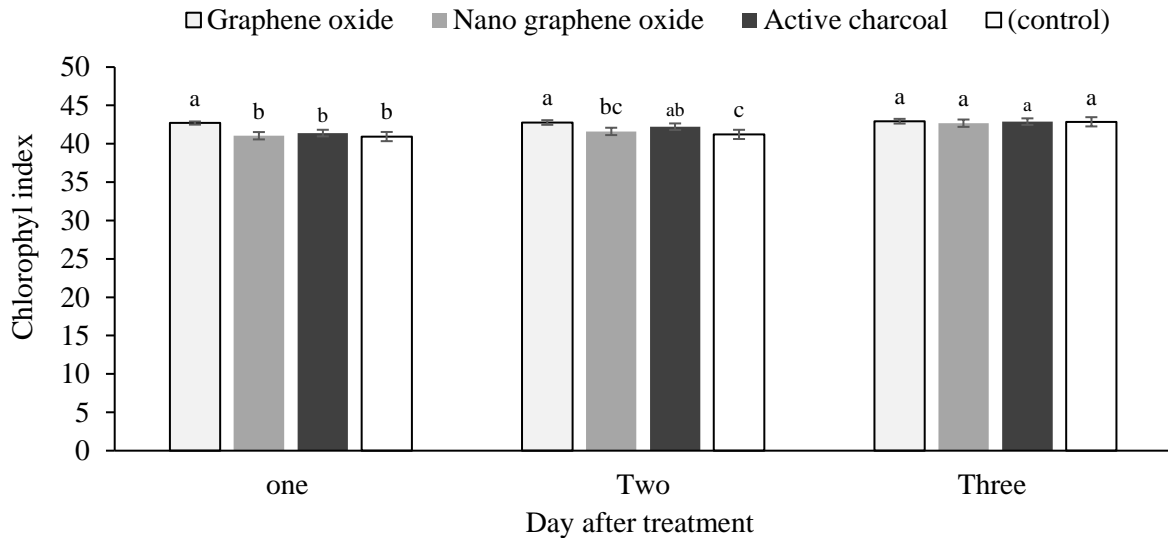
شکل ۲- مقایسه درصد مرگ و میر لاروهای سن دوم پروانه برگ خوار چغندر قند تحت تیمارهای باکتری در اختلاط با مواد حفاظتی، باکتری بدون ماده حفاظتی و شاهد بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط صحرائی و در سطح احتمال ۵٪ با آزمون توکی. ستون‌های با حروف یکسان اختلاف معنی داری با هم ندارند.

Figure 2. Comparison of the mortality percentage of the second instar larvae of *Spodoptera exigua* under bacterial treatments mixed with protective substances, bacteria without protective substances and the control after 48 and 72 hours in field conditions with 5% probability level by Tukey test. The columns with the same letters indicate non-significant difference between treatments.

مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد بیشترین حفاظت از باکتری در شرایط صحرائی همانند شرایط آزمایشگاهی مربوط به تیمار باکتری در اختلاط با زغال فعال بود (شکل ۲).

تاثیر ترکیب‌های حفاظتی روی شاخص کلروفیل کل برگ

تجزیه واریانس حاصل از آنالیز شاخص کلروفیل کل برگ تحت تاثیر مواد حفاظتی در برابر اشعه نور خورشید و تیمار شاهد (بدون ماده حفاظتی) نشان داد بین میزان شاخص کلروفیل بعد از یک روز ($F_{3, 20}=8.20$; $P=0.001$) و دو روز ($F_{3, 20}=9.68$; $P=0.001$) اختلاف معنی داری وجود دارد، اما در روز سوم اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($F_{3, 20}=1.18$; $P=0.344$).



شکل ۳- مقایسه شاخص کلروفیل برگ تحت تاثیر مواد حفاظتی در برابر اشعه نور خورشید و تیمار شاهد (بدون ماده حفاظتی) بعد از یک، دو و سه روز در سطح احتمال ۵٪ با آزمون توکی. ستون‌های با حروف یکسان اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

Figure 3. Comparison of leaf chlorophyll index under the influence of sunlight rays and control treatment (without sunlight rays) after one, two, and three days at the 5% probability level by Tukey test. The columns with the same letters indicate non-significant difference between treatments.

بحث

باکتری *B. thuringiensis* یک حشره کش میکروبی است که به طور گسترده در کنترل آفات مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما اثربخشی این باکتری به دلیل تخریب اسپور و کریستال‌های آن تحت اشعه ماوراءبنفش خورشیدی محدود می‌شود (Saxena et al., 2014; Jallouli et al., 2014; Behle et al., 2010; Hadapad et al., 2009; Ruan et al., 2004; al., 2002). تحقیق حاضر نیز نشان داد اشعه ماوراءبنفش در هر دو شرایط آزمایشگاهی و صحرایی قدرت بیماری‌زایی باکتری *Btk* را روی لاروهای برگ‌خوار چغندر قند کاهش می‌دهد. ساکسنا و همکاران (Saxena et al., 2002) نیز گزارش کردند که قرار گرفتن طولانی مدت در معرض اشعه ماوراءبنفش تا ۴۰ ساعت منجر به تخریب مقادیر زیادی از اسپور *Bt* می‌شود. همچنین هداپاد و همکاران (Hadapad et al., 2009) به این نتیجه رسیدند که قرار گرفتن *Bt* در معرض این اشعه به مدت ۹۶ ساعت منجر به از بین رفتن اغلب اسپورها می‌شود. در تحقیق حاضر نیز تیمار باکتری بدون ماده حفاظتی در معرض اشعه ماوراءبنفش کمترین تلفات را روی لاروهای برگ‌خوار چغندر قند سبب شد که نشانگر اثر سوء روی این باکتری می‌باشد. همچنین در ارزیابی جوانه‌زنی اسپور باکتری *Btk* در معرض این اشعه میزان جوانه‌زنی بعد از ۴۸ ساعت کاهش یافت.

نانوصفحات گرافن اکسید از دسته نانومواد با پایه کربنی با دارا بودن ویژگی منحصر به فرد از جمله خواص کودی در رشد گیاهان و خاصیت جذب اشعه ماوراءبنفش می‌توانند گزینه مناسبی برای افزایش مقاومت *Bt* باشند (Suresh Kumar et al., 2013; Sarlak et al., 2014; Zhu et al., 2014; Maghsoudi & Jalali, 2017). جلالی و همکاران (Jalali et al., 2018) اثر نانوصفحات گرافن اکسید در حفاظت باکتری *Bt* را در مقابل اشعه ماوراءبنفش با استفاده از زنده‌مانی اسپورها و نیز زیست‌سنجی *Bt* به صورت تنها و نیز به صورت ترکیب با مواد محافظت کننده روی لارو سن دو شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* Z. مورد ارزیابی قرار دادند و نتایج نشان داد نانو صفحات گرافن اکسید می‌توانند به عنوان محافظ اشعه ماوراءبنفش استفاده شوند. به نظر می‌رسد که نانوصفحات گرافن اکسید به دلیل داشتن خاصیت فوتولومینسانس اطراف باکتری را می‌پوشانند و از باکتری در برابر این اشعه محافظت می‌کند و بدین ترتیب باعث افزایش ماندگاری *Bt* می‌شوند (Hong et al., 2012; Zhu et al., 2014). همچنین کارایی گرافن

اکسید روی اثر محافظت‌کنندگی روغن زیتون در باکتری *Bt* پس از قرارگیری در معرض اشعه ماوراءبنفش مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که گرافن اکسید اثر افزایشی روی عملکرد روغن زیتون به‌عنوان محافظت‌کننده در زنده‌مانی اسپور و نیز کشندگی باکتری *Bt* دارد (Maghsoudi & Jalali, 2017). اما در تحقیق حاضر با وجود خاصیت حفاظتی گرافن اکسید و نانو گرافن اکسید روی باکتری *Btk* در برابر اشعه ماوراءبنفش در هر دو شرایط آزمایشگاهی و صحرایی، زغال فعال حفاظت‌کنندگی بیشتری نشان داد.

در زمینه حفاظت از باکتری *Bt* در برابر اشعه ماوراءبنفش می‌توان به استفاده از ملانین توسط ساروجا و همکاران (Saroja et al., 2018) و اورتیز و سانسینا (Sansinena & Ortiz, 2015)، سیپولیت توسط ژنو و همکاران (Zhou et al., 2018) و عصاره فلفل و زردچوبه توسط سوکیرنو و همکاران (Sukirno et al., 2023) اشاره نمود. در مطالعه‌ای دیگر اسپور و کریستال غیرمیکروکپسول به‌عنوان شاهد در برابر اشعه ماوراءبنفش فعالیت کشندگی آن از ۹۳ به ۱۵ درصد کاهش یافت. این نتیجه عدم پایداری اسپور و کریستال بدون پوشش را در برابر اشعه ماوراءبنفش نشان می‌دهد. زیرا کریستال باکتری که از جنس پروتئین است در برابر اشعه ماوراءبنفش تخریب می‌شود و فعالیت کشندگی خود را از دست می‌دهد (Tamez-Guerra et al., 2000). نتایج بررسی آرمیده (Aramideh, 2016) روی نقش حفاظتی زغال فعال و نشاسته در دوام بیماری‌زایی باکتری *Bt* علیه لاروهای سن دوم برگ‌خوار درختان زبان‌گنجشک (*Nyssia graecarius* Staudinger) نشان داد زغال فعال قابلیت حفاظت از باکتری و همچنین حفظ اثربخشی آن را به‌خوبی دارد. همچنین در یک تحقیق مشابه، مختارنژاد و همکاران (Moxtarnejad et al., 2014) اثر حفاظتی چندین عامل از جمله زغال فعال را روی دوام بیماری‌زایی باکتری *Bt* در برابر لارو سن دوم پروانه سفید کلم *Pieris brassicae* L. مورد آزمایش قرار داده و نشان دادند که تیمار مخلوط *Bt* با زغال فعال نسبت به تیمار *Bt* به‌تنهایی در همه زمان‌های آزمایش (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) سبب افزایش مرگ و میر لاروها می‌شود که با تحقیق حاضر مطابق و هم‌سو می‌باشد. در آزمایشی دیگر اثرات چندین ماده محافظ UV از جمله زغال چوب روی دوام فعالیت حشره‌کشی ویروس آلفاباکلوویروس (Alphabaculovirus) در برابر آفت *Chrysodeixis chalcites* (ChchNPV-TF1) روی درخت موز (*Musa acuminata*) در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که زغال چوب در هر دو شرایط بالاترین حفاظت را داشته است (Çakmak et al., 2021). در تحقیق حاضر نیز افزودن مواد محافظ بر پایه کربن به *Bt* در هر دو شرایط آزمایشگاهی و صحرایی موجب دوام و تأثیر بیشتر باکتری روی لاروهای آفت پروانه برگ‌خوار چغندر قند شد که با نتایج بررسی‌های بالا مطابقت دارد.

با توجه به بررسی‌های مختلف این تحقیق، نتایج نشان داد که زغال فعال نسبت به دو ترکیب دیگر اثر محافظتی بیشتری در برابر اشعه ماوراءبنفش دارد. با در نظر گرفتن قیمت هر سه ترکیب حفاظتی، زغال فعال نسبت به دو ترکیب دیگر ارزان‌تر بوده و بنابراین، استفاده از آن در فرمولاسیون‌های باکتری *Bt* قابل توصیه و مقرون به‌صرفه می‌باشد.

سپاسگزاری

از آقای دکتر عباس حسین‌زاده عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد مهاباد به‌جهت همکاری در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.
- Abdollahzadeh Bavani, M., Aramideh, Sh., & Hosseinzadeh, A. (2019). Effect of *Bacillus thuringiensis*, *SeNPV*, Spinosad and Emamectin on third larval instar of *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae) in laboratory and field conditions. *Plant Pest Research*, 9(1), 1-12. DOI: <https://doi.org/10.22124/iprj.1970.3427>

- Alkassab, A. T., Beims, H., Janke, M., & Pistorius, J. (2022). Determination, distribution, and environmental fate of *Bacillus thuringiensis* spores in various honeybee matrices after field Page 10/20 application as plant protection product. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(17), 25995–26001. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19414-5>
- Aramideh, Sh. (2016). Effect of active charcoal and starch on enhancement pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against second instars larvae of ash tree pest *Nyssia graecarius* Staudinger (Lep.: Geometridae). *Forest Research and Development*, 2(2), 145-154.
- Aramideh, Sh., Safaralizadeh, M. H., Pourmirza, A. A., & Parvizi, R. (2005). Studies on the susceptibility of different larval, prepupa, and pupa stages of beet armyworm (*Spodoptera exigua* H.) to *Steinernema carpocapsae* on sugar beet under laboratory conditions. *Journal of Agricultural Science and Nature Resource*, 12(5), 159-166.
- Behle, R., Compton, D., Kenar, J., & Shapiro-Ilan, D. (2010). Improving formulations for biopesticides: enhanced UV protection for beneficial microbes. *Journal of ASTM International*, 8(1), 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1520/JAI102793>
- Bolibok, P., Roszek, K., & Wiśniewski, M. (2018). Graphene oxide-mediated protection from Photodamage. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 9(12), 3241-3244. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.8b01349>
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R., & Valéro, J. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *Process Biochemistry*, 41, 323–342. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.015>
- Çakmak, T., Simón, O., Kaydan, M. B., Tange, D. A., González Rodríguez, A. M., Piedra-Buena Diaz, A., & Hernandez Suarez, E. (2021). Effects of several UV-protective substances on the persistence of the insecticidal activity of the Alphabaculovirus of *Chrysodeixis chalcites* (ChchNPV-TF1) on banana (*Musa acuminata*, Musaceae, Colla) under laboratory and open-field conditions. *Plos One*, 16(5), e0250217. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250217>
- Che, W. N., Shi, T., Wu, Y. D., & Yang, Y. H. (2013). Insecticide resistance status of field populations of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from China. *Journal of Economic Entomology*, 106, 1855-1862. DOI: <https://doi.org/10.1603/EC13128>
- Da-Yong, J., & Yong-Man, Y. (2010). Isolated and bioassay of *Bacillus thuringiensis* with high insecticidal activity to *Spodoptera exigua*. *Journal of Agricultural Science Yanbian University*, 32(4), 238–242.
- De Oliveira, J. L., Gómez, I., Sánchez, J., Soberón, M., Polanczyk, R. A., & Bravo, A. (2022). Performance of microencapsulated *Bacillus thuringiensis* Cry pesticidal proteins. *Research Square*, 1-21. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1949207/v1>
- Eliane, C. P., Leticia, M., Gonçalves, M., Auxiliadora, M. G., Claudete, A. M., & Maria, F. (2012). Activated charcoal and graphite for the micropropagation of *Cattleya bicolor* Lindl. and a orchid double-hybrid 'BLC Pastoral Innocence. *Maringá*, 34(2), 157-161. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v34i2.12257>
- Federici, B. (2022). A primer on the extraordinary efficacy and safety of bacterial insecticides based on *Bacillus Thuringiensis*. *Good Microbes in Medicine, Food Production, Biotechnology, Bioremediation, and Agriculture*, 14, 476–487. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119762621.ch38>.
- Fu, X. W., Feng, H. Q., Liu, Z. F., & Wu, K. M. (2017). Trans-regional migration of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), in North-East Asia. *PLoS ONE*, 12, 183582. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183582>
- Hadapad, A. B., Hire, R. S., Vijayalakshmi, N., & Dongre, T. K. (2009). UV protectants for the biopesticide based on *Bacillus sphaericus* Neide and their role in protecting the binary toxins from UV radiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3), 147-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.12.003>
- Hafeez, M., Ullah, F., Khan, M. M., Li, X., Zhang, Z., Shah, S., Imran, M., Assiri, M. A., Fernández-Grandon, G. M., Desneux, N., Rehman, M., Fahad, S., & Lu, Y. (2022). Metabolic-based insecticide resistance mechanism and ecofriendly approaches for controlling of beet armyworm *Spodoptera exigua*: a review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 29, 1746–1762. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16974-w>

- Helassa, N., Quiquampoix, H., Noinville, S., Szponarski, W., & Staunton, S. (2009). Adsorption and desorption of monomeric *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) Cry1Aa toxin on montmorillonite and kaolinite. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(3), 498-504. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.12.008>
- Hong, B. J., An, Z., Compton, O. C., & Nguyen, S. T. (2012). Tunable biomolecular interaction and fluorescence quenching ability of graphene oxide: Application to “Turn-on” DNA sensing in biological media. *Small*, 8(16), 2469-2476. DOI: <https://doi.org/10.1002/sml.201200264>
- Hosseini, E., Aramideh, Sh., & Mirfakhraie, Sh. (2022). Efficiency of diatomaceous earth, silica nanoparticles, kaolin, micronized sulfur and their mixing on *Tetranychus urticae* Koch. in greenhouse conditions. *Plant Pest Research*, 12(1), 43-58. DOI: <https://doi.org/10.22124/iprj.2022.5607>
- Jalali, A., Maghsoudi, Sh., & Marzban, R. (2018). Study effect of graphene oxide nanosheets on *Bacillus thuringiensis* biopesticide performance. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 7(1), 85-92. (in Farsi)
- Jalali, E., & Maghsoudi, S. (2024). Enhancing UV radiation protection of *Bacillus thuringiensis* formulations using sulfur quantum dots: synthesis and efficacy evaluation. *Scientific Reports*, 14(1), 17384. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68595-1>
- Jalali, E., Maghsoudi, S., & Noroozian, E. (2020a). A novel method for biosynthesis of different polymorphs of TiO₂ nanoparticles as a protector for *Bacillus thuringiensis* from Ultra Violet. *Scientific Reports*, 10(1), 426. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57407-6>
- Jalali, E., Maghsoudi, S., & Noroozian, E. (2020b). Ultraviolet protection of *Bacillus thuringiensis* through microencapsulation with Pickering emulsion method. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77721-8>
- Jallouli, W., Sellami, S., Sellami, M., & Tounsi, S. (2014). Efficacy of olive mill wastewater for protecting *Bacillus thuringiensis* formulation from UV radiations. *Acta Tropica*, 140, 19–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.016>
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmael, Q., El Hamss, H., & Barka, E. A. (2022). Biological control of plant pathogens: A global perspective. *Microorganisms*, 10(3), 596. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
- Maghsoudi, S., & Jalali, E. (2017). Noble UV protective agent for *Bacillus thuringiensis* based on a combination of graphene oxide and olive oil. *Scientific Reports*, 7(1), 11019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11080-9>
- Moraes, L., Faria, R. T., & Cuquel, F. L. (2005). Activated charcoal for in vitro propagation of Brazilian orchids. *Acta Horticulturae*, 683(3), 383-389. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.683.50>
- Mounsef, J. R., Salameh, D., kallassy Awad, M., Chamy, L., Brandam, C., & Lteif, R. (2014). A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 147-149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.10.003>
- Moustafa, M. A., Saleh, M. A., Ateya, I. R., & Kandil, M. A. (2018). Influence of some environmental conditions on stability and activity of *Bacillus thuringiensis* formulations against the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28, 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0064-x>
- Moxtarnejad, E., Safaralizade, M. H., & Aramideh, S. (2014). The protective material effect in combination with *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) against UV for control *Pieris brassicae* L. (Lep.: Pieridae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(20), 2414-2420. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2014.880558>
- Muchaonyerwa, P., Chevallier, T., Pantani, O. L., Nyamugafata, P., Mpeperekwi, S., & Chenu, C. (2006). Adsorption of the pesticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* on tropical soils and their particle-size fractions. *Geoderma*, 133(3-4), 244-257. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.07.011>
- Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2023). Microbial-based biopesticides: commercialization and regulatory perspectives. Elsevier. pp. 103–118. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95290-3.00020-0>
- Pan, X., Xu, Z., Li, L., Shao, E., Chen, S., Huang, T., Chen, Z., Rao, W., Huang, T., Zhang, L., & Wu, S. (2017). Adsorption of insecticidal crystal protein Cry11Aa onto nano-Mg (OH)₂: Effects on

- bioactivity and anti-ultraviolet ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 9428-9434. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03410>
- Pourmirza, A. A. (2005). Local variation in susceptibility of Colorado potato beetle (Col.: Chrysomelidae) to insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 98, 2176-80. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/98.6.2176>
- Proo, B., Aramideh, Sh., Mirfakhraie, Sh., & Hosseinzadeh, A. (2023). An investigation on the effect of ultraviolet rays and parasitoid wasp, *Trichogramma brassicae* in controlling the egg stage of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*. *Plant Pest Research*, 12(4), 37-49. DOI: <https://doi.org/10.22124/iprj.2023.23127.1500>
- Pusztai, M., Fast, P., Gringorten, L., Kaplan, H., Lessard, T., & Carey, P. R. (1991). The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochemical Journal*, 273(1), 43-47. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj2730043>
- Ruan, L., Yu, Z., Fang, B., He, W., Wang, Y., & Shen, P. (2004). Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(3), 286-289. DOI: <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00265>
- Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2015). Melanin: a photoprotection for *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides. *Biotechnology Letters*, 37, 483-490.
- Sansinenea, E., Salazar, F., Ramirez, M., & Ortiz, A. (2015). An Ultra-Violet Tolerant Wild-Type Strain of Melanin-Producing *Bacillus thuringiensis*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(7), 1-6. DOI: <https://doi.org/10.5812/jjm.20910v2>
- Sarlak, N., Taherifar, A., & Salehi, F. (2014). Synthesis of nano-pesticides by encapsulating pesticide nanoparticles using functionalized carbon nanotubes and application of new nanocomposite for plant disease treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62, 4833-4838. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf404720d>
- Saroja Kalmath, B., Bheemanna, M., & Prabhuraj, A. (2018). Evaluation of UV protectants for wettable powder formulation of native *Bacillus thuringiensis* (Berliner) isolates against *Helicoverpa armigera* (Hubner) in the laboratory. *Informatics Journal*, 32(3), 179-186. DOI: <https://doi.org/10.18311/jbc/2018/21661>
- Saxena, D., Ben-Dov, E., Manasherob, R., Barak, Z. E., Boussiba, S., & Zaritsky, A. (2002). A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* producing melanin. *Current Microbiology*, 44, 25-30.
- Saxena, D., Pushalkar, S., & Stotzky, G. (2010). Fate and effects in soil of Cry proteins from *Bacillus thuringiensis*: Influence of physicochemical and biological characteristics of soil. *The Open Toxinology Journal*, 3(1), 151-171.
- Shargi, H., Eivazian Kary, N., & Mohammadi, D. (2021). Compatibility of *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* with cypermethrin against the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, 10(3), 1-14. DOI: <https://doi.org/10.22034/arpp.2021.13315>
- Si, S. Y., Zhou, L. L., Wang, S. L., Jiang, X. F., Xu, Z. F., Mu, W., Wang, D. S., Wang, X. P., Chen, H. T., Yang, Y. H., & Ji, X. C. (2012). Progress in research on prevention and control of beet armyworm, *Spodoptera exigua* in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49, 1432-1438.
- Soldano, C., Mahmood, A., & Dujardin, E. (2010). Production, properties and potential of graphene. *Carbon*, 48, 2127-2159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2010.01.058>
- Sukirno, S., Sumarmi, S., Soesilohadi, R. H., Sudaryadi, I., Purwanto, H., & Aldawood, A. S. (2023). The effects of ultraviolet B on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* formulations against tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *HAYATI Journal of Biosciences*, 30(1), 17-27.
- Suresh Kumar, R. S., Shiny, P. J., Anjali, C. H., Jerobin, J., Goshen, K. M., Magdassi, S., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Distinctive effects of nano-sized permethrin in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 2593-2602.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M. R., Behle, R. W., Shasha, B. S., & Galn Wong, L. J. (2000). Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 93(2), 219-225. DOI: <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.2.219>

- van Bokhorst-van de Veen, H., Xie, H., Esveld, E., Abee, T., Mastwijk, H., & Groot, M. N. (2015). Inactivation of chemical and heat-resistant spores of *Bacillus* and *Geobacillus* by nitrogen-cold atmospheric plasma evokes distinct changes in the morphology and integrity of spores. *Food Microbiology*, 45, 26-33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.018>
- Vilas-Boas, G. T., Peruca, A. P. S., & Arantes, O. M. N. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 673–687. DOI: <https://doi.org/10.1139/W07-029>
- Wang, S., Ang, P. K., Wang, Z., Tang, A. L., Thong, J. T., & Loh, K. P. (2010). High mobility, printable, and solution processed graphene electronics. *Nano Letters*, 10, 92-98. DOI: <https://doi.org/10.1021/nl9028736>
- Zhang, J. T., Yan, J. P., Zheng, D. S., Sun, Y. J., & Yuan, Z. M. (2008). Expression of *mel* gene improves the UV resistance of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 151–157. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03729.x>
- Zhang, L., Zhang, X., Zhang, Y., Wu, S., Gelbič, I., Xu, L., & Guan, X. (2016). A new formulation of *Bacillus thuringiensis*: UV protection and sustained release mosquito larvae studies. *Scientific Reports*, 6(1), 39425. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep39425>
- Zhang, T., Zhu, G. Y., Yu, C. H., Xie, Y., Xia, M. Y., Lu, B. Y., Fei, X., & Peng, Q. (2019). The UV absorption of graphene oxide is size-dependent: possible calibration pitfalls. *Microchimica Acta*, 186, 1-7.
- Zhou, X., Huang, Q., Chen, S., & Yu, Z. (2005). Adsorption of the insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* on montmorillonite, kaolinite, silica, goethite and Red soil. *Applied Clay Science*, 30, 87–93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2005.04.003>
- Zhou, X., Li, H., Liu, Y., Hao, J., Liu, H., & Lu, X. (2018). Improvement of stability of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* against UV-irradiation by adsorption on sepiolite. *Adsorption Science & Technology*, 36(5-6), 1233-1245. DOI: <https://doi.org/10.1177/0263617418759777>
- Zhu, H., Zhang, Y., Zhang, L., Yu, T., Zhang, K., Jiang, H., Wu, L., & Wang, S. (2014). Highly photostable and biocompatible graphene oxides with amino acid functionalities. *Journal of Materials Chemistry C*, 2(34), 7126-32. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4TC00589A>
- Zogo, B., Tchiekoi, B. N. C., Koffi, A. A., Dahounto, A., Alou, L. P. A., Dabiré, R. K., Baba-Moussa, L., Moiroux, N., & Pennetier, C. (2019). Impact of sunlight exposure on the residual efficacy of biolarvicides *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* against the main malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 18, 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2687-0>

Effect of protective compounds from ultraviolet rays in pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* in laboratory and field conditions

M. Mousavi¹, Sh. Aramideh^{2*} and S. Akbari³

1, 2, & 3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

✉ mousavimahdieh@yahoo.com

✉ Sh.aramideh@urmia.ac.ir

✉ sama8akbari@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-6475-7489>

 <https://orcid.org/0000-0003-4220-6165>

 <https://orcid.org/0009-0000-2662-8136>

Received: 10 October 2024 | Accepted: 23 November 2024 |

Abstract

Bacillus thuringiensis serves as an effective biopesticide in controlling specific pests. Nonetheless, exposure to solar ultraviolet (UV) radiation is a significant factor that contributes to the degradation of the spores and crystals of this bacterium. Therefore, research on protective compounds against UV radiation is essential. In this study, the effects of activated charcoal, graphene oxide, and nanographene oxide in preserving the pathogenicity of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) against ultraviolet radiation on the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) were investigated under laboratory and field conditions. The probit analysis of concentrations of *Btk* on second-instar larvae of the *S. exigua* after 48 and 72 hours in the laboratory showed that LC_{50} was 1149.62 and 729.13 ppm, respectively. Additionally, the study examining the impact of UVC on the pathogenicity of *Btk* indicated that larvae exposed to UVC-treated *Btk* experienced lower mortality rates compared to those exposed to the non-irradiated bacterium. The variance analysis regarding the impact of UV radiation on spore germination, when using protective agents in comparison to the control group, demonstrated that activated charcoal showed the more effective results. Additionally, an analysis of variance regarding the UV-protective properties of the treatments in preserving the effectiveness of *Btk* against second-instar larvae conducted under both laboratory and field conditions revealed that activated charcoal had a higher protective effect compared to other treatments. Based on the results, activated charcoal is recommended for use with *Btk* against this pest. Activated charcoal can be suggested for inclusion in formulations of this biopesticide to protect it from solar UV radiation.

Key words: Biopesticide, biological control, *Caradrina*, protective compounds, solar radiation

Citation: Mousavi, M., Aramideh, sh. & Akbari, S. (2024). Effect of protective compounds from ultraviolet rays in pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* in laboratory and field conditions. *Plant Pest Research*, 14(3), 29-43. **Doi:** <https://doi.org/10.22124/iprj.2024.28656.1599>



*Corresponding author: Sh.aramideh@uma.ac.ir