تحقیقات آفات گیاهی
۱۰۲-۸۹ :(۳) ۸- ۱۳۹۷

بررسی تاثیر *Bacillus thuringiensis* درکنترل پروانه برگخوار *Ennomos quercinaria* (Hafngel)

امین وطن دوست[۱]، محمدرضا دماوندیان[۲*]، حسن بریمانی ورندی[۱] و محمدرضا بابایی[۱]

۱- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ساری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مازندران، ایران، ۲- گروه گیاه پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۲۴)

چکیده

در این تحقیق به منظور کنترل پروانه برگخوار *Ennomus quercinaria* سمیت غلظت‌های مختلف *Bacillus thuringiensis* روی لاروهای این آفت بررسی و میزان LC_{50} آن تخمین زده شد. ارزیابی‌های آزمایشگاهی به روش غوطه‌ورسازی مبین حساسیت بیشتر لارو سن دوم نسبت به اول است، به طوری‌که LC_{50} محاسبه شده برای لارو سن اول و دوم به ترتیب ۲/۱۴و ۰/۶ پی‌پی‌ام برآورد شد. سپس با توجه به غلظت‌های محاسبه شده، سه غلظت ۱، ۲، ۳ پی‌پی‌ام *B. thuringiensis* روی نهال‌های ۲ ساله درخت انجیلی و با استفاده از سمپاشی دستی پاشیده شده، سپس ۳۰ عدد لارو سن دوم روی نهال‌ها رهاسازی شدند. نتایج آزمون مقایسه میانگین‌های LSD نشان داد که از یک سو تفاوت شاهد (آب) با هر یک از سه تیمار *B. thuringiensis* از نظر تلفات لاروها در سن دوم در سطح یک درصد معنی‌دار شده ($p<۰/۰۱$) و از سوی دیگر بیشترین میزان تلفات توسط تیمار ۲ پی‌پی‌ام به میزان ۶۲ درصد حاصل شد. در شرایط میدانی حشره‌کش بیولوژیک *B. thuringiensis* سبب ۳۵ درصد مرگ و میر آفت شده، در صورتی‌که میزان تلفات شاهد ۲/۸ درصد بود. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند گامی مهم در معرفی یک ترکیب کم‌خطر و سالم برای مبارزه با آفات در اکوسیستم جنگل و حشرات مفید آن باشد.

واژه‌های کلیدی: زیست‌سنجی، *Bacillus thuringiensis*، *Ennomus quercinaria*، جنگل‌های مازندران

نویسنده مسئول: m.r.damavandian@gmail.com

مقدمه

از مهم‌ترین منابع طبیعی تجدید شونده، جنگل‌ها و مراتع می‌باشند که نقش اساسی در تأمین نیازمندی‌های انسان دارند. استان مازندران در بین استان‌های شمالی کشور (گیلان و گلستان) ۵۳/۴ درصد سطح جنگل‌های شمال را به خود اختصاص داده است (Barimani Varandi *et al*., 2007; Kooch *et al*., 2010). جنگل‌های مازندران با گونه‌های با ارزش جنگلی از لحاظ تولید انواع چوب‌آلات صنعتی، حائز اهمیت فراوان و سهم بسزائی در اقتصاد ملی و رونق صنعت دارند (Pourbabaei and Dado, 2005)، بنابراین لزوم حفظ و حمایت از این منابع عظیم ملی و سرمایه‌های خدادادی بسیار ضروری می‌باشد.

خسارت آفات و عوامل بیماریزای گیاهی در جنگل‌ها و مراتع مهم هستند (Draganova *et al*., 2013). درختان و درختچه‌های جنگلی نیز مانند سایر درختان میوه و گیاهان زراعی و زینتی دارای آفات و بیماری‌های بسیار هستند که به دلیل وجود آب و هوای معتدل و مرطوب در مازندران بیشتر از سایر استان‌ها یافت می‌شوند (Babaei, 2014). گاهی اوقات متأسفانه شاهد طغیان آفات و بیماری‌ها در این استان هستیم که در واقع ثروت ملی را به یغما می‌برند.

یکی از آفات مهم درختان جنگلی در مازندران پروانه برگخوار درختان جنگلی با نام علمی *Ennomus quercinaria* (Hufnagel) (Lep.: Geometridae) می‌باشد (Manley, 2008; Naom, 2011). این آفت در عرصه‌های جنگلی به ویژه در نقاط مرکزی مازندران خسارت زیادی به درختان جنگلی به خصوص انجیلی و بلوط وارد نموده است. به طوری که در اواخر اردیبهشت ماه منجر به بی‌برگی کامل سطح وسیعی از مناطق جنگلی می‌شود (Barimani Varandi *et al*., 2007). به علت محدودیت کاربرد روش‌های شیمیایی در مناطق جنگلی، استفاده از روش‌های مبارزه سالم و کم‌خطر برای محیط زیست و دشمنان طبیعی ضروری به نظر می‌رسد (Solter *et al*., 2000, 2002)، لذا کاربرد فرآورده‌های بیولوژیک نظیر *Bacillus thuringiensis* Berliner از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا کنترل میکروبی نسبت به روش‌های کنترل شیمیایی سالم‌تر و ایمن‌تر است، ضمن اینکه آفت‌کش میکروبی در زنجیره غذایی جمع و ذخیره نمی‌شوند (Jankevica, 2004; Polovinko *et al*., 2010). باکتری *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* اغلب روی راسته بالپولکداران موثر است. جدایه‌های مختلف باکتریایی حتی در یک گونه ممکن است در میزان بیماریزایی برای یک حشره خاص متفاوت باشند که به دلیل توکسین‌های مختلف تولید شده توسط سویه‌ها می‌باشد (Karimi *et al*., 2013 به نقل از Dulmage, 1970).

به خوبی اثبات شده است که بسیاری از حشرات به فعالیت سمی Bt حساس می‌باشند که از میان آنها، بالپولکداران به طور ویژه مطالعه شده‌اند و توکسین‌های بسیاری علیه آن‌ها فعالیت نشان داده‌اند (Rosas-Garcia, 2009). راسته بالپولکداران بیشتر گونه‌های حساس را در بر می‌گیرد که به خانواده‌های مهمی مانند Cossidae، Gelechiidae، Lymantriidae، Noctuidae، Pieridae، Thaumetopoetidae، Tortricidae و Yponomeutidae تعلق دارند (Iriarte and Caballero, 2001). توکسین زیر گونه *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* به طور وسیع جهت کنترل آفات جنگلی مانند پروانه ابریشم باف ناجور، کرم جوانه‌خوار صنوبر، شب‌پره جوانه‌خوار کاج، شب‌پره جوانه‌خوار اروپایی کاج و شب‌پره شمشاد مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Li *et al*., 2001).

زیبایی و همکاران (Zibaee *et al*.,2010) اثر *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* را روی پروانه سفید آمریکایی، *Hyphantria cunea* Drury مورد بررسی قرار دادند. آنها بیان داشتند که سم میکروبی فوق روی آفت مورد نظر تاثیرگذار بوده است. نیکدل و همکاران (Nikdel *et al*., 2014) تاثیر دو فرآورده *B. thuringiensis* شامل dipel® و BTH® را در کنترل لاروهای پروانه ابریشم باف ناجور در

جنگل‌های ارسباران مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که فرآورده دایپل® در مقایسه با ®BTH درصد بالاتری از مرگ و میر لاروی را حاصل کرده است و همچنین با گذشت زمان تاثیر تیمارهای مورد مطالعه افزایش داشته است.

اگرچه عقیده بر این است که نیمه عمر *B. thuringiensis* در طبیعت کوتاه است و حداقل تاثیر را روی پروانه‌های غیر هدف دارد، اما بررسی‌های سال‌های اخیر نشان می‌دهد که این ترکیب برای بعضی از پروانه‌های غیر هدف حداقل تا ۳۰ روز بعد از محلول‌پاشی مضر می‌باشد (Johnson *et al*., 1995; Luciano *et al*., 1998; Whaley *et al*., 1998). اما هیچ‌گونه اثر سوئی روی لاروها و شفیره‌های پارازیتوئیدها و شکارگرها (از جمله سوسک‌های خانواده کارابیده (Carabidae) (Luciano *et al*., 1992; Sklodowski, 1996) و انسان ندارد (Bernner, 1992). لذا باید در استفاده از این ترکیبات تمام جوانب را در نظر گرفت تا خللی بر اکوسیستم طبیعی وارد نشود.

کریستال پروتئین یا توکسین باکتری *B. thuringiensis* (دلتا-اندوتوکسین) به صورت حشره‌کش اختصاصی عمل کرده و روی موجودات غیر هدف اثر سوء کمی دارد (Avilla *et al*., 2005). باکتری *B. thuringiensis* همزمان با تشکیل اسپور داخل اسپورانژیوم، بلورهای سمی تولید می‌کند که به طور عمده لوزی شکل بوده و حاوی دلتا اندوتوکسین می‌باشند (Khorramvatan *et al*., 2017). این بلورهای لوزی شکل خاصیت بیماری‌زایی روی حشرات ایجاد نموده و نیز وجه تمایز *B.thuringiensis* از سایر گونه‌های باسیلوس هستند (Marzban *et al*., 2014; Marzban *et al*., 2016). عوامل کنترل میکروبی به سبب ماندگاری کوتاه نسبت به آفت‌کش‌های شیمیایی و انتخابی بودن، اثر کمتری بر تعادل اکولوژیکی محیط زیست می‌گذارند، به خصوص، توده دشمنان طبیعی را از بین نمی‌برد و همین‌طور اغلب با سایر روش‌های کنترل سازگار است (Sedaratian Jahromi, 2013; Veloorvalappil *et al*., 2013).

طغیان‌های دوره‌ای یکی از خصوصیات پروانه‌های برگخوار خانواده ژئومتریده در مناطق جنگلی است (Babaei, 2014). این آفات در هر بار طغیان، سطح وسیعی از جنگل‌ها را آلوده کرده و موجب بی‌برگی درختان جنگلی می‌شوند. بنابراین، این آفات باید همیشه تحت نظر قرار گیرند تا در صورت لزوم به موقع با آن مبارزه صورت گیرد. تحقیق حاضر با هدف تعیین غلظت‌های موثر بایولپ® روی سنین لاروی آفت *E.quercinaria* در آزمایشگاه و ارزیابی کارایی این غلظت‌ها در شرایط نیمه‌صحرایی (نهال‌ها) و عرصه جنگل به منظور تعیین بهترین غلظت این ترکیب جهت کنترل این آفت در جنگل‌های شمال کشور می‌باشدکه گامی مهم در معرفی یک ترکیب کم خطر و سالم برای اکوسیستم پیچیده جنگلی و حشرات مفید آن خواهد بود.

مواد و روش‌ها

محل اجرای تحقیق

محل اجرای طرح پارک جنگلی شهید زارع و جنگل‌های زرین‌آباد از توابع شهرستان ساری مرکز استان مازندران انتخاب شد. این منطقه در سه کیلومتری شرق رودخانه تجن و شرق شهرستان ساری و در فاصله یک کیلومتری جنوب جاده ساری- نکا قرار دارد. این منطقه در عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۳۲ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۲ درجه و ۸ دقیقه شرقی و ارتفاع ۳۲ متر از سطح دریای آزاد واقع شده است.

در این پژوهش از حشره‌کش بیولوژیک بایولپ® با ماده مؤثره *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* با فرمولاسیون مایع (SC) از شرکت فن‌آوری زیستی طبیعت‌گرا استفاده شده و میزان مصرف توصیه شده ۱/۵ تا ۲ لیتر در هکتار علیه لارو پروانه‌های برگخوار محصولات کشاورزی توصیه شده است.

زیست‌سنجی آزمایشگاهی حشره‌کش *B. thuringiensis* روی *E. quercinaria* به روش غوطه‌وری

تخم‌های آفت *E.quercinaria* در اواخر زمستان از روی سرشاخه‌های درختان میزبان به ویژه انجیلی واقع در جنگل زرین‌آباد ساری جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه داخل یخچال نگهداری شد. در اوایل فروردین به محض جوانه زدن و سبز شدن درختان، تخم‌ها از داخل یخچال خارج تا تفریخ شوند. ابتدا یک آزمایش مقدماتی برای انتخاب غلظت‌های مؤثر از بایولپ® انجام شد. آزمایش اصلی با ۶ غلظت (۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ پی‌پی‌ام) و در نظر گرفتن تیمار شاهد انجام شد. برای هر یک از غلظت‌ها، برگ‌هایی از درخت انجیلی تهیه و سپس به مدت ۳۰ ثانیه هر برگ داخل غلظت تعیین شده غوطه‌ور شد. پس از خشک شدن سطح برگ، هر برگ داخل یک ظرف پتری به قطر ۱۰ سانتی‌متر قرار گرفته و روی هر برگ تعداد ۳۰ عدد لارو به کمک قلم‌موی ظریف به آرامی قرار گرفت. سپس ظروف پتری درون سینی قرار گرفته و به ژرمیناتور با دمای ۲±۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۰ درصد و ۱۲ ساعت روشنایی منتقل شدند. تعداد لاروهای مرده و زنده پس از گذشت ۷۲ ساعت ثبت شد. تغییر رنگ و عدم تحرک معیار مرگ لاروها بود. این آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند. بدین‌ترتیب برای هر تیمار واکنش ۹۰ لارو مورد بررسی قرار گرفت و آزمایش برای لاروهای سن اول و دوم به طور جداگانه انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها در زیست‌سنجی آزمایشگاهی

در صورت وجود مرگ و میر در شاهد، درصد مرگ و میر تیمارها با فرمول ابوت تصحیح شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش پروبیت و توسط برنامه کامپیوتری P/PROBAN، LSTATS انجام شد. لازم به ذکر است جهت پیش‌بینی غلظت‌های مورد نیاز از معادله خط رگرسیون استفاده شد.

ارزیابی کارایی غلظت‌های مختلف حشره‌کش *B. thuringiensis* روی لاروهای سن اول و دوم *E. quercinaria* در شرایط آزمایشگاهی

تخم‌های آفت *E. quercinaria* مانند آزمایش قبلی در اواخر زمستان از سرشاخه‌های درختان میزبان جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شده و در یخچال نگهداری شد. به محض جوانه زدن و سبز شدن درختان در اوایل فروردین تخم‌ها از یخچال خارج شده و در محیط آزمایشگاه تفریخ شدند. این آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۷ تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل شش غلظت باکتری *B. thuringiensis* (فرآورده داخلی بایولپ) با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ پی‌پی‌ام و آب مقطر به عنوان شاهد بودند. برای هر تیمار یک برگ انجیلی انتخاب و سپس برگ‌ها داخل غلظت‌های تعیین شده به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شده و داخل ظروف پتری ۱۰ سانتی‌متری قرار گرفتند. برای هر تیمار تعداد ۳۰ عدد لارو به کمک قلم‌مو روی برگ داخل ظرف پتری به آرامی رها شدند. سپس ظروف پتری به ژرمیناتور باهمان شرایط دمایی، رطوبت و روشنایی مشابه آزمایش قبلی منتقل شدند. تعداد لاروهای مرده و زنده پس از گذشت ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز ثبت شد. آزمایش برای لاروهای سن اول و دوم جداگانه انجام شد. برای هر تیمار واکنش ۹۰ لارو مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی کارایی غلظت‌های مختلف حشره‌کش *B. thuringiensis* روی *E. quercinaria* روی نهال‌های آزمایشگاهی

نهال‌های مورد آزمایش انجیلی ۲ ساله بودند. آزمایش در قالب طرح پایه نتایج آزمایشگاهی، سه غلظت ۱، ۲ و ۳ پی‌پی‌ام از آفت‌کش مذکور و آب خالص به عنوان شاهد روی نهال‌های آزمایشی پاشیده شدند. از هر تیمار ۲۵۰ سی‌سی توسط سمپاش دستی یک لیتری روی هر نهال پاشیده شد، به صورتی که تمام قسمت‌های برگ به طور کامل به بایولپ® آغشته شد. سپس روی هر نهال تعداد ۳۰ عدد لارو سن دوم رهاسازی شد. برای جلوگیری از فرار لاروها، هر نهال با پارچه توری ریزباف به ابعاد ۳۰ × ۷۵ سانتی‌متر به شکل استوانه محصور شد. در این بررسی از ۱۲ اصله نهال به طول ۴۰ الی ۶۰ سانتی‌متر استفاده شد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. درصد مرگ و

میر لاروها بعد از ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز ثبت و در هر مرحله تعداد لاروهای مرده شمارش و از پارچه توری خارج شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها در مطالعات کارایی غلظت‌های حشره‌کش *B. thuringiensis* در شرایط آزمایشگاهی (آزمایشگاه و نهال)

درصد مرگ و میر تیمارها در صورت وجود مرگ و میر شاهد، با فرمول ابوت تصحیح شد. تجزیه واریانس داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد و مقایسات میانگین با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

سمپاشی درختان انجیلی در عرصه جنگل

به منظور بررسی میزان اثرغلظت به‌دست آمده از زیست‌سنجی لاروها در مطالعات آزمایشگاهی، ابتدا ۵ اصله درخت انجیلی حدود ۲۰ ساله حاشیه جاده داخلی پارک شهید زارع ساری (منطقه آلوده به آفت) به طور تصادفی انتخاب، سپس با آفت‌کش بایولپ و با غلظت ۲ پی‌پی‌ام به وسیله سمپاش پشتی۱۶ لیتری مدل اتومایزر (با قدرت پاشش به طول ۱۰ متر) محدوده نمونه‌برداری روی درخت (۱۰ متر پائین درخت) به طور کامل سمپاشی شد. ضمن اینکه تعداد ۵ اصله درخت هم به طور تصادفی به عنوان شاهد انتخاب شدند. سپس سه روز بعد از زمان سمپاشی، آماربرداری از میزان مرگ و میر لاروها انجام شد. نحوه نمونه‌برداری بدین‌ترتیب بود که از هر یک از درخت‌های تیمار شده، تعداد ۵ شاخه به طول ۲۰سانتی متر به طور تصادفی انتخاب و تعداد لاروهای زنده و مرده شمارش شدند و به همین طریق آماربرداری از میزان مرگ و میر لاروها از درختان شاهد انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها در آزمایش در عرصه جنگل

مقایسه میانگین درصد مرگ و میر در تیمارهای آزمایشی با استفاده از آزمون t انجام شد.

نتایج

زیست‌سنجی آزمایشگاهی حشره‌کش *B. thuringiensis* روی *E. quercinaria*

نتایج به دست آمده از غلظت‌های کشنده بایولپ® روی لاروهای پروانه *E. quercinaria* در آزمایشگاه در جدول ۱ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، مقادیر LC_{50} در آزمایشگاه برای لارو سن دوم کمتر از این مقادیر برای لارو سن اول برآورد شد. همانطور که مشاهده می‌شود، مقدار LC_{50} برای لارو سن اول بیشتر از لارو سن دوم به دست آمد. این نتایج به این نکته اشاره دارد که لارو سن دوم در مقایسه با لارو سن اول حساسیت بیشتری به حشره‌کش بیولوژیک بایولپ® داشته است(جدول ۱).

جدول ۱-مقادیر LC_{50} و محدوده اطمینان ۹۵ درصد محاسبه شده حشره‌کش *B. thuringiensis* روی لاروهای سن اول و دوم *E. quercinaria* سه روز (۷۲ ساعت) بعد از تیمار

Table 1. The LC50 values and 95% confidence interval calculated for biopesticide, *Bacillus thuringiensis* on 1st and 2nd instar larvae of *Ennomus quercinaria* three days (72 hrs) after treatment

Larval instar	N*	Slope±SE	LC50 (ppm)	95% CI	
				upper	lower
L_1	540	4.59±0.13	2.14	3.002	1.179
L_2	540	5.47±0.10	0.6	1.345	0.027

*N= number of larva

ارزیابی کارایی غلظت‌های مختلف حشره‌کش *B. thuringiensis* روی لاروهای سن اول و دوم *E. quercinaria* در شرایط آزمایشگاهی

با توجه به اینکه در روزهای ۶، ۹ و ۱۲ بعد از سمپاشی، حداقل در دو غلظت مورد آزمایش تلفات لاروی ۱۰۰ درصد حاصل شد، لذا امکان محاسبه LC_{50} در این زمان‌ها وجود نداشت. نتایج محاسبه LC_{50} برای روز سوم مشابه نتایج به دست آمده برای مدت زمان ۷۲ ساعت بعد از سمپاشی بود که در جدول ۱ ارائه شده است. از آنجا که امکان محاسبه LC_{50} برای سایر زمان‌ها نبود، بنابراین برای مقایسه تاثیر غلظت‌های مورد مطالعه، از داده‌های درصد تلفات لاروی استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف بایولپ® روی مرگ و میر لاروهای سن اول آفت سه روز بعد از سمپاشی نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف بایولپ® بر میزان مرگ و میر لارو از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار شده است (p=۰/۰۰۰۱، df=۵، f=۱۷/۶۷). با توجه به نتایج مقایسه میانگین تیمارها که در جدول ۲ نشان داده شده است، بالاترین درصد مرگ و میر لاروها ۳ روز بعد ازسمپاشی (۹۷/۷۳ درصد) در غلظت‌های ۴ و ۵ پی‌پی‌ام رخ داده است که تفاوت آماری با درصد مرگ و میر به دست آمده در سایر غلظت‌ها داشته است. همچنین کمترین درصد مرگ و میر مربوط به غلظت‌های ۰/۵ و ۱ پی‌پی‌ام بایولپ® بوده است. نتایج آنالیز واریانس تاثیر غلظت‌ها به ترتیب ۶، ۹ و ۱۲ روز بعد از سمپاشی نیز نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین آنها در سطح یک درصد بود (f_{12}=۲۰/۲۶، df=۵، p=۰/۰۰۰۱؛ f_9=۲۰/۱۹؛f_6=۷/۶۶). با توجه به درصد تلفات لاروی به دست آمده برای لارو سن اول ۶، ۹ و ۱۲ روز بعد از سمپاشی (جدول ۲)، بالاترین درصد تلفات لاروی (۱۰۰ درصد) در غلظت‌های ۴ و ۵ پی‌پی‌ام حاصل شد که اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری با یکدیگر نداشتند. از طرف دیگر، کمترین میزان تلفات لاروی در هر سه زمان فوق به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ پی‌پی‌ام حاصل شد که اختلاف معنی‌داری نداشته و در یک گروه آماری قرار گرفتند. همچنین با توجه به جدول۲، درصد مرگ و میر لاروها با گذشت زمان پس از تیمار، روند افزایشی داشته و در روز ۱۲ به بالاترین میزان خود رسیده است، هر چند در غلظت‌های ۴ و ۵ پی پی ام، درصد مرگ و میر ۶ روز بعد از سمپاشی به ۱۰۰ درصد رسید.

نتایج تجزیه واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف بایولپ® را روی لارو سن دوم آفت نشان می‌دهد که تاثیر تیمارهای مورد بررسی به ترتیب در ۳، ۶ و ۹ روز بعد از سمپاشی بر میزان مرگ و میر لاروها از لحاظ آماری در سطح پنج درصد معنی‌دار شده است (p=۰/۰۱۱۹، df=۵، f_9=۴/۸۳؛ p=۰/۰۱۷۶، df=۵، f_6=۴/۳۲؛ p=۰/۰۲۰۶، df=۵، f_3=۴/۱۲). نتایج مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف بایولپ® ۳، ۶ و ۹ روز بعد از سمپاشی (جدول ۲) نشان می‌دهد که ۳ روز بعد از سمپاشی، بالاترین درصد مرگ و میر لاروی به ترتیب در غلظت‌های ۳ و ۴ پی‌پی‌ام و کمترین میزان تلفات لاروی در غلظت ۵ پی‌پی‌ام به دست آمده است که اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری با میزان تلفات لاروی در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ پی‌پی‌ام نداشته است. همچنین، بالاترین درصد تلفات لاروی ۶ و ۹ روز بعد از سمپاشی در دو غلظت ۴ و ۳ پی‌پی‌ام به دست آمده که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. از طرف دیگر، کمترین درصد تلفات لاروی ۶ روز بعد از سمپاشی، به ترتیب در غلظت‌های ۰/۵، ۵، ۲ و ۳ پی‌پی‌ام حاصل شده که در یک گروه آماری قرار گرفته و اختلافی با یکدیگر نداشتند. کمترین درصد تلفات لاروی ۹ روز بعد از سمپاشی به ترتیب در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ پی‌پی‌ام به دست آمده که در یک گروه آماری قرار گرفتند.

نتایج تجزیه واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف بایولپ® روی لارو سن دوم *E. quercinaria* ۱۲ روز بعد از سمپاشی نشان داد که تاثیر غلظت‌های مختلف بر میزان تلفات لاروی به لحاظ آماری معنی‌دار نشده است و به عبارت دیگر این غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (p=۰/۰۸۵۵، df=۵، f=۲/۵۵). در این زمان، بالاترین درصد تلفات لاروی

(۱۰۰ درصد) در غلظت‌های ۲، ۳ و ۴ پی‌پی‌ام و کمترین آن در غلظت ۰/۵ پی‌پی‌ام حاصل شد (جدول ۲). بررسی روند تغییرات درصد تلفات لاروی روی لارو سن دوم نیز نشان می‌دهد که درصد مرگ و میر با گذشت زمان بعد از سمپاشی افزایش یافته است، به‌طوری‌که درصد تلفات لاروی ۶ روز بعد از سمپاشی در غلظت ۴ پی‌پی‌ام و همچنین ۱۲ روز بعد از سمپاشی در غلظت‌های ۲ و ۳ پی‌پی‌ام به ۱۰۰ درصد رسید (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین درصد مرگ و میر (± خطای استاندارد) لاروهای سن اول و دوم *Ennomus quercinaria* تیمار شده با غلظت‌های مختلف *Bacillus thuringiensis* در روزهای متفاوت پس از تیمار در شرایط آزمایشگاهی

Table 2. The mean mortality percentage (±SE) of L_1 and L_2 of *Ennomus quercinaria* treated with the different concentrations of *Bacillus thuringiensis* at the different days after treatment in the laboratory conditions

Larval stage	Dose (ppm)	Mean mortality percentage (±SE)*			
		Days after treatment			
		3	6	9	12
L_1	0.5	17.07±6.01c	34.51±5.53c	40.24±4.56c	46.91±5.11c
	1	25.02±9.02c	46.00±6.49bc	49.99±6.45c	55.56±5.66c
	2	42.06±5.74bc	62.08±7.01bc	74.39±7.32b	81.48±4.28b
	3	61.37±6.91b	72.42±6.89ab	89.02±2.11ab	92.59±2.13ab
	4	97.73±2.27a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
	5	97.73±1.14a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
L_2	0.5	60.77±4.13b	65.32±6.67c	72.22±5.35c	87.33±4.45b
	1	69.63±2.19ab	71.99±2.31bc	81.94±3.67bc	94.37±2.82ab
	2	72.04±4.60b	80.66±5.72bc	86.11±4.73abc	100.00±0.00a
	3	86.08±3.35a	92.00±2.31ab	98.61±1.39a	100.00±0.00a
	4	84.81±4.38a	100.00±0.00a	100.00±0.00a	100.00±0.00a
	5	73.18±3.32b	87.99±4.33c	90.28±2.78ab	92.96±3.72ab

*Means within column followed by the same letter for each larval stage not found significant (p>0.05)

نتایج تجزیه واریانس تاثیر سن لاروی در غلظت‌های مختلف بایولپ® بر درصد مرگ و میر لاروها نشان داد که اثر سن لاروی از نظر آماری در سطح یک درصد معنی‌دار شده‌اند (p=۰/۰۰۰۱، df=۷، f=۹۹/۴۳). همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، بالاترین درصد مرگ و میر در غلظت‌های مختلف مورد مطالعه در سن دوم لاروی به دست آمده است، هر چند در غلظت‌های ۴ و ۵ پی‌پی‌ام از نظر میزان تلفات لاروی اختلاف آماری بین دو سن لاروی وجود نداشته است. همانطور که مشاهده می‌شود، سن دوم لاروی این آفت به این حشره‌کش بیولوژیک حساس‌تر بوده، به طوری‌که در غلظت ۲ پی‌پی‌ام و بالاتر از آن به تلفات لاروی ۱۰۰ درصد رسید.

B. ارزیابی کارایی غلظت‌های مختلف حشره‌کش *thuringiensis* روی *E. quercinaria* روی نهال‌های آزمایشگاهی

نتایج ارائه شده از تجزیه واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف بایولپ® روی نهال‌های دو ساله انجیلی نشان می‌دهد که اثر تیمارها (غلظت‌های مختلف بایولپ®) بر درصد مرگ و میر لارو سن دوم آفت از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار شده است (p=۰/۰۰۰۱، df=۳، f=۱۰/۹۴).

با توجه به نتایج مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف بایولپ® (جدول ۳)، ۳ روز بعد از تیمار با غلظت‌های مورد مطالعه، درصد مرگ و میر لاروها برای سه غلظت از نظر آماری اختلاف نداشته و در یک سطح قرار گرفتند، در حالی

که با شاهد تفاوت آماری داشتند. در روز های ۶، ۹ و ۱۲ پس از تیمار نیز غلظت‌های ۱ و ۲ پی پی ام با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشته و در یک سطح قرار گرفتند. همانطور که مشاهده می‌شود بالاترین درصد تلفات لاروی در روزهای مختلف بعد از سمپاشی در غلظت ۲ پی‌پی‌ام بدست آمد. درصد تلفات لاروی در روزهای متفاوت پس از تیمار با بایولپ® در غلظت‌های مختلف و آب به عنوان شاهد نشان می‌دهد که درصد مرگ و میر با گذشت زمان افزایش یافته است، به صورتی‌که بالاترین درصد مرگ و میر لاروها در تمام تیمارها در روز ۱۲ پس از تیمار به دست آمده است (جدول ۳).

جدول ۳-میانگین درصد مرگ و میر (± خطای استاندارد) لارو سن دوم *Ennomus quercinaria* تیمار شده با غلظت‌های مختلف*Bacillus thuringiensis* روی نهال‌های دو ساله انجیلی در روزهای متفاوت پس از تیمار در شرایط آزمایشگاهی

Table 3. The mean mortality percentage (±SE) of L_2 of *Ennomus quercinaria* treated with the different concentrations of *Bacillus thuringiensis* on 2-year-old plants of *Parrotia persica* at the different days after treatment in the laboratory conditions

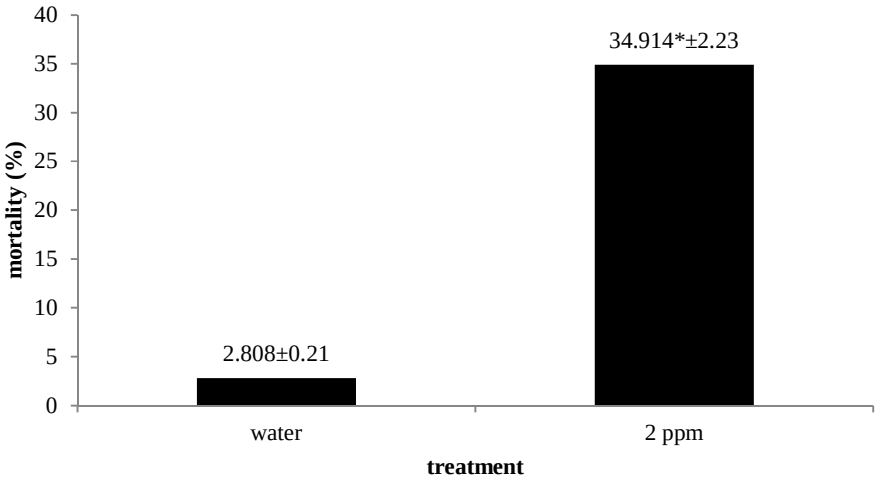
Treatment	N*	Mean mortality (%) after treatment (day)** (±SE)			
		3	6	9	12
1 ppm	3	16.67±1.92a	32.22±4.78ab	41.11±4.84ab	50.00±5.77ab
2 ppm	3	21.11±2.11a	37.77±4.02a	51.11±3.94a	66.67±5.09a
3 ppm	3	11.11±1.64a	18.89±2.22bc	27.77±2.68b	32.22±2.94bc
control	3	0.00±0.00b	4.44±0.94c	8.89±1.24c	22.22±2.88c

*N= number of sampling

** Means within column followed by the same letter not found significant (P>0.05)

سمپاشی درختان انجیلی در عرصه جنگل

نتایج آنالیز واریانس از آزمون میدانی تاثیر غلظت ۲ در هزار *B. thuringiensis* روی آفت مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را از تاثیر تیمار با شاهد (آب) در کنترل آفت مورد نظر از لحاظ آماری در سطح یک درصد نشان داد (p=۰/۰۰۲، t=-۵/۷۰). نتایج مقایسه میانگین تیمارها (غلظت ۲ در هزار و شاهد) در شکل ۱ نشان می‌دهد که غلظت ۲ در هزار حشره‌کش بیولوژیک از نظر درصد تلفات تفاوت معنی‌داری با شاهد دارد. همانطور که مشاهده می‌شود، غلظت ۲ در هزار این حشره‌کش تلفات تقریباً ۳۵ درصدی را موجب شده است.



شکل۱- میانگین درصد مرگ میر ناشی از غلظت ۲ در هزار *Bacillus thuringiensis* و شاهد روی سن دوم لاروی *Ennomus quercinaria*، در عرصه جنگلی (علامت * نشان‌دهنده معنی‌داری بین تیمارها در سطح یک درصد می‌باشد)

Figure. 1. The average percent mortality caused by the concentration of *Bacillus thuringiensis* (2 ppm) and water (control) on 2nd instar larvae of *Ennomus quercinaria* in forest area (the sign (*) indicate significantly difference between treatments)

بحث

حشره‌کش میکروبی بایولپ® ابزار اصلی مدیریتی مورد استفاده برای کنترل آفات جنگلی به سبب گستره میزبانی محدود، ایمن بودن از لحاظ زیست محیطی، مقبولیت عمومی و سازگاری با دیگر راهکارهای مدیریتی در کنترل بیولوژیک می‌باشند (Bauer *et al.*, 2005).

طبق نتایج به دست آمده، در سن اول لاروی *E. quercinaria* مرگ و میربالای ۹۰ درصد۳ و ۶ روز بعد از سمپاشی در غلظت‌های ۴ و ۵ پی‌پی‌ام و ۱۲ روز بعد از سمپاشی در غلظت‌های ۳ پی پی ام و بالای آن حاصل شد. از طرف دیگر، تلفات لاروی ۹۰ درصدی برای سن دوم ۶ روز بعد از سمپاشی در غلظت‌های ۳ و ۴ پی‌پی‌ام و ۹ روز بعد از سمپاشی در غلظت ۳، ۴ و ۵ پی‌پی‌ام حاصل شد. در ۱۲ روز بعد از سمپاشی، مرگ و میر بالای ۹۰ درصد در غلظت ۱ پی‌پی‌ام و بالاتر از آن به دست آمد. همچنین مقایسه درصد تلفات لاروی سنین اول و دوم لاروی این آفت نشان داد که درصد تلفات در سن دوم لاروی *E. quercinaria* بیشتر از سن اول بوده است، همچنان‌که نتایج حاصل از زیست‌سنجی آزمایشگاهی و مقادیر به‌دست آمده LC_{50} حشره‌کش بیولوژیک Bt برای سنین لاروی، حساسیت بیشتر سن دوم لاروی را نسبت به سن اول تائید کرده است. وب و همکاران (Web *et al.*, 1998) معتقدند که *B. thuringiensis* بیشترین تاثیر کشندگی را روی سن دوم لاروی این آفت دارد. راسل و همکاران (Rausell *et al.*, 2000) دلیل حساسیت متفاوت سنین مختلف لاروی آفات به *B. thuringiensis* را تغییر میل ترکیبی کریستال پروتئین Cry1Ab به وزیکول‌های غشایی روده همراه با تغییر مرحله نشو و نمایی لاروی ذکر کردند. حساسیت کمتر لارو سن یک آفت در مطالعه حاضر را شاید بتوان به تغذیه کمتر این سن در مقایسه با سن دوم آفت نسبت داد که در این مطالعه تغذیه کمتر لارو سن یک مشاهده شده است (مشاهدات نگارندگان). همانطور که پیش‌تر بیان شد گونه حشره هدف یکی از عوامل تاثیرگذار بر کارایی *B. thuringiensis* می‌باشد. لذا با توجه به اینکه گونه حشره مورد مطالعه با

مطالعات دیگر متفاوت است، در نتیجه این امکان وجود دارد که نتایجی متفاوت به دست آید.

درصد تلفات لاروی در مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلظت این حشره‌کش بیولوژیک، درصد مرگ و میر نیز افزایش می‌یابد. حج‌گزار و همکاران (Hajgozar *et al*., 2013) و ییلماز و همکاران (Yilmaz *et al*., 2013) در پژوهش‌های خود به منظور بررسی اثرات *B. thuringiensis* به ترتیب روی مراحل لاروی شب‌پره برگ پیچان بلوط *Tortrix viridana* L. و شب‌پره جوانه‌خوار کاج *Thaumetopoea wilkinsoni* بیان داشتند که با افزایش غلظت حشره کش بیولوژیک Bt، درصد مرگ و میر لاروها افزایش می‌یابد که با نتایج این پژوهش مشابهت دارد.

نتایج مقایسه میانگین تلفات لاروی در عرصه جنگلی نیز نشان داد که درختان انجیلی تیمار شده با غلظت ۲ در هزار حشره‌کش بیولوژیک بایولپ®، مرگ و میر تقریباً ۳۵ درصدی را ایجاد کرده‌اند که تفاوت معنی‌داری با درصد مرگ و میر درختان تیمار شده با آب داشتند. چندین مطالعه به طور واضح آشکار ساختند که عوامل محیطی (نور خورشید، دما)، گونه حشره هدف و مراحل لاروی، آماده‌سازی و شیوه کاربرد (غلظت و روش‌های پاشش در سطح گیاه) و گیاهی که آفت از آن تغذیه می‌کند، می‌تواند بر کارایی Bt تاثیرگذار باشد (Bauce *et al*., 2002; Carisey *et al*., 2004; Kouassi *et al*., 2001). تلفات لاروی پائین به‌دست آمده در عرصه جنگل (۳۵ درصد) در مقایسه با نتایج آزمایشگاهی را می‌توان به تاثیر شرایط محیطی نسبت داد.

همانطور که نتایج مطالعه حاضر نشان داد، با افزایش غلظت حشره‌کش و زمان، میزان مرگ و میر افزایش داشت، تنها در غلظت‌های ۴ و ۵ پی‌پی‌ام به دلیل اینکه در روز ششم پس از سمپاشی میزان مرگ و میر به ۱۰۰ درصد رسید، روند تغییرات ثابت شد. در رابطه با لارو سن دوم نیز با افزایش غلظت حشره‌کش تا ۴ پی‌پی‌ام میزان مرگ و میر افزایش داشت، ولی در غلظت ۵ پی‌پی‌ام کاهش پیدا کرد، در حالی‌که با افزایش زمان در تمامی غلظت‌ها میزان مرگ و میر افزایش داشت. در آزمایش نیمه‌صحرایی روی نهال‌های دو ساله انجیلی، با افزایش زمان میزان مرگ و میر در تمامی غلظت‌ها افزایش داشت، اما با افزایش غلظت حشره‌کش تا ۲ پی‌پی‌ام مرگ و میر افزایش و در غلظت ۳ پی‌پی‌ام با کاهش همراه بود. کریمی و همکاران (Karimi *et al*., 2013) در بررسی توانایی باکتری *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* علیه آفات بالپولکدار شالیزارهای برنج و نیکدل و همکاران (Nikdel *et al*., 2014) در رابطه با تاثیر این باکتری روی لاروهای پروانه ابریشم باف ناجور بیان داشتند که با افزایش غلظت و زمان، میزان مرگ و میر لاروی افزایش می‌یابد که با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر تا حد زیادی همخوانی دارد.

اندرسون و کایا (Anderson and Kaya, 1945) کاربرد باکتری *B. thuringiensis* (Berliner) را در کنترل آفت *Ennomos subsignarius* (Hubner) به ویژه در سال‌های طغیان آنها موثر عنوان کرده‌اند و گزارش نمودند اثر منفی روی دشمنان طبیعی آنها نداشته است. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که این باکتری روی *E. quercinaria* موثر بوده است که با نتایج مطالعات فوق همخوانی دارد. همانطور که مشاهده شده است بالاترین درصد مرگ و میر لاروی در روز ۱۲ پس از تیمار به دست آمده است. بارتنیکیت و زیوگاس (Bartninkaite and Ziogas, 1996) و وب و همکاران (Web *et al*., 1998) این مطلب را تایید کرده و نشان دادند که بیشترین تلفات لاروهای ابریشم باف ناجور به ترتیب ۵ و ۷ روز اول پس از محلول‌پاشی با *B. thuringiensis* اتفاق افتاد.

کاربرد سموم شیمیایی در جنگل‌های شمال در مبارزه با آفت پروانه *E. quercinaria*، ابریشم‌باف ناجور و علیه آفات دیگر بدون اتکا به داده‌های تحقیقاتی و منطقه‌ای موجب از بین رفتن تعادل بیولوژیک و بروز مشکلات بعدی خواهد بود. پروانه *E. quercinaria* یکی از مهمترین آفات

برگخوار در جنگل‌های مازندران در سال‌های اخیر بوده و خسارت آن بسیار شدید می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که حشره‌کش بیولوژیک *B. thuringiensis* با غلظت ۲ پی‌پی‌ام روی لاروهای سن دوم پروانه *E. quercinaria* در شرایط آزمایشگاهی و جنگلی موثر بوده است. ذکر این نکته لازم است که با توجه به تاثیرگذاری مناسب و مورد انتظار روی لارو سن اول این انتظار می‌رود که در عرصه جنگل مبارزه با این آفت در مرحله لاروی سن اول نتایج بهتری را نتیجه دهد. با توجه به داده‌های به‌دست آمده در این پژوهش و ماهیت انتخابی Bt می‌توان نتیجه گرفت که این حشره‌کش بیولوژیک می‌تواند برای کنترل قابل قبول این آفت مورد استفاده قرار گیرد که امروزه این آفت همراه با آفات دیگر در دنیا به وسیله حشره‌کش‌های شیمیایی کنترل می‌شود و گاهی اوقات چندین مرحله مبارزه جهت کنترل ضروری می‌باشد. از طرف دیگر، به دلیل اینکه این ترکیب نسبت به حشره‌کش‌های وسیع‌الطیف به سبب نیمه عمر کوتاه و انتخابی بودن اثرات مخرب کمتری دارد، می‌تواند جایگزین مناسبی برای آفت‌کش‌های شیمیایی باشد. در حال حاضر و در سال‌های اخیر در کشور ما تحقیقات مبارزه بیولوژیک مسیر تازه‌ای را در مبارزه با آفات گشوده است. به یقین چنین برنامه‌ای در جنگل‌ها و مراتع کشور میدان عمل بیشتری را به علت غنای طبیعی مجموعه بندپایان و میکرواورگانیسم‌های مفید خواهد داشت. یکی از مشکلات عمده استفاده از باکتری Bt در کنترل آفات، تاثیرپذیری باکتری از شرایط آب و هوایی، روش کاربرد، سن لارو، گیاه میزبان و تنوع ژنوتیپی در لاروهای آفات می‌باشد (Farrar *et al*., 1996; Rossiter*et al*., 1990). بنابراین لازم است در هر یک از کانون‌های آلوده به آفات، بررسی‌هایی در رابطه با نحوه و میزان اثرگذاری فاکتورهای فوق الذکر در تاثیر Bt صورت پذیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله نگارندگان این مقاله از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به سبب در اختیار قرار دادن امکانات و تجهیزات مورد نیاز تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

Anderson, J. F. and Kaya, H. K. 1945. Biological control of the elm spanworm *Ennomos subsignarius*. VIII International Plant Protection Congress, Moscow Reports and Information, Section V., Biological and Genetic Control. 13 May, Russia. pp. 8–15.

Avilla, C., Vargas-Osuna, E., Gonzalez-Cabrera, J., Ferre, J. and Gonzalez-Zamora, J. E. 2005.Toxicity of several δ-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. **Journal of Invertebrate Pathology** 90: 51-54.

Babaei, M. R. 2014. Supplementary study of biology of *Ennomus quercinaria* (Lep.: Geometridae) in Mazandaran province. **Iranian Journal of Forest and Range Protection Research**11(1): 1-9. (in Farsi)

Barimani Varandi, H., Babaee, M. R. and Vatandost, A. 2007. Some biological notes on *Ennomos quercinaria* (Lep.: Geometridae) in Mazandaran. **Iranian Journal of Forest and Range Protection Research** 4(2): 71-79. (in Farsi)

Bartninkaite, I. and Ziogas, A. 1996. Dynamics of elimination of entomopathogenic bacteria included in the composition of the preparation Foray 48B in the forest following its industrial application. **Ekologija** 2: 8-16.

Bauce, E., Bidon, Y., and Berthiaume, R. 2002. Effects of food nutritive quality and *Bacillus thuringiensis* on feeding behaviour, food utilization, and larval growth of spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) when exposed as fourth- and sixth-instar larvae. **Agricultural and Forest Entomology** 4(1): 57–70.

Bauer, L. S., Dean, D. and Handelsman, J. 2005.*Bacillus thuringeniensis*: Potential for management of Emerald Ash Borer. Emerald Ash Borer Research and Technology Development Meeting. 26-27 September, USA. pp. 38 – 39.

Bernner, L. 1992. Asian gypsy moth update: helicopters spray *B.t* while residents' questions are left unanswered. **Journal of Pesticide Reform** 12(4): 16-23.

Carisey, N., Bauce, E., Dupont, A. and Miron, S. 2004. Effects of bud phenology and foliage chemistry of balsam fir and white spruce trees on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* against the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Agricultural and Forest Entomology** 6(1): 55–69.

Draganova, S., Takov, D., Pilarska, D., Doychev, D., Mirchev, P. and Georgiev, G. 2013. Fungal Pathogens on Some Lepidopteran Forest Pests in Bulgaria. **Acta Zoologica Bulgarica** 65(2): 179 – 186.

Dulmage, H.T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology** 15(2): 232-239.

Farrar, R. R., Martin, P. A. W. and Ridgway, R. L. 1996. Host plant effects on activity of *Bacillus thuringiensis* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. **Environmental Entomology** 25(5): 1215-1223.

Hajgozar, A., Pourbehi, H., Eskuruchi, F., Zare Khormizi, M., Sharifnezhad, H. and Biranvand, A. 2013. Effects of *Bacillus thuringiensis* on the larval stages of *Tortrix viridana* on oak trees. **International Research Journal of Applied and Basic Sciences** 5(6): 762 – 765.

Iriarte, J. and Caballero, P. 2001. Biología y Ecología de *Bacillus thuringiensis*. **Phytoma España**3: 15-44.

Jankevica, L. 2004. Ecological associations between entomopathogenic fungi and pest insects in Latvia. **Latvijas entomologs** 41: 60-65.

Johnson, K. S., Scriber, J. M., Nitao, J. K. and Smithley, D. R. 1995. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* to three nontarget Lepidotera in field studies. **Environmental Entomology** 24(2): 288-297.

Karimi, J., Hassanshahi, G.H., Abbasipour, H., Nasiri Moghadam, M. and Talei, D. 2013. Survey of ability of bacterium, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (3a 3b) against *Mythimna unipuncta* and *Chilo suppressalis*. 15th National Rice Conference. 19-20 March, Iran.pp. 1-5. (in Farsi)

Khorramvatan, S., Marzban, R., Ardjmand, M., Seifkordi, A. and Askary, H. 2017. Optimizing microencapsulated formulation stability of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Bt-KD2) against ultraviolet condition using response surface methodology. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 50(5-6): 275-285.

Kooch, Y., Hosseini, S. M., Akbarinia, M., Tabari, M. and Jalali, S. G. H. 2010. The role of dead tree in regeneration density of mixed beech stand (case study: Sardabrood forests, Chalous, Mazandaran). **Iranian Journal of Forest** 2(2): 93-103. (in Farsi)

Kouassi, K. C., Lorenzetti, E., Guertin, C., Cabana, J. and Mauffette, Y. 2001. Variation in the susceptibility of the forest tent caterpillar (Lepidoptera: Lasiocampidae) to *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* HD-1: effect of the host plant. **Journal of Economic Entomology** 94(5): 1135–1141.

Li, G. M., Zhang, X. Y. and Wang, L. Q. 2001. The Use of *Bacillus thuringiensis* on forest integrated pest management. **Journal of Forestry Research** 12(1): 51-54.

Luciano, P., Floris, I., Lentini, A., Prota, R., Deiana, P. and Langiu, G. 1992. Utilization of *Bacillus thuringiensis* Berl. To control *Lymantria dispar* in sardinian cork oak forests. **Redia** 75: 549-563.

Luciano, P., Lentini, A. and Villemant, C. 1998. Effects of *Bacillus thuringiensis* and defoliation by gypsy moth on lepidopteran fauna in cork-oak forests. Proceeding of integrated protection of *Quercus* spp. Forests. October 26-29, Morocco. pp. 115-119.

Manley, C. 2008. British Moth and Butterflies (1sted.). Bloomsbury Publication.

Marzban, R., Saberi, F. and Shirazi, M. M. 2014. Separation of *Bacillus thuringiensis* from fermentation broth using microfiltration: Optimization approach. **Research Journal of Biotechnology** 9: 33-37.

Marzban, R., Saberi, F. and Shirazi, M. M. 2016. Microfiltration and ultrafiltration of *Bacillus thuringiensis* fermentation broth: membrane performance and spore-crystal recovery approaches. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** 33(4): 783-791.

Naoum, J. 2011.*Ennomos quercinaria* (1st ed.). International book marketing service.

Nikdel, M., Omid, R. and Dordaei, A. A. 2014. Evaluation the effect of two products of *Bacillus thuringiensis* on *Lymantria dispar* L. (Lep.: Lymantriidae) larvae in the Arasbaran forests, Iran. **Journal of Entomological Research** 5(2): 171-181. (in Farsi)

Polovinko, G., Yaroslavtseva, O., Teshebaeva, Z. and Kryukov, V. 2010. Dominating species of entomophilous Ascomycetes anamorphs in West Siberia, Primorsky Krai, and Kyrgyzstan. **Contemporary Problems of Ecology** 3(5): 515-521.

Pourbabaei, H. and Dado, K. H. 2005. Species diversity of woody plants in the district No.1 forests, Kelardasht, Mazandaran province. **Iranian Journal of Biology** 18(4): 307-322.

Rausell, C., Martínez-Ramírez, A. C., García-Robles, I. and Real, M. D. 2000. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 1553–1558.

Rosas-García, N. M. 2009. Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An Environmentally Friendly Alternative. **Recent Patents in Biotechnology** 3(1): 28-36.

Rossiter, M., Yendol, W. G. and Dubois, N. R. 1990. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae): genetic and environmental causes. **Journal of Economic Entomology** 83(6): 2211-2218.

Sedaratian Jahromi, A. 2013. Sublethal effects of bacterium, *Bacillus thuringiensis* on some ecophysiological parameters of *Helicoverpa armigera* and parasitoid *Habrobracon hebetor*. PhD.Thesis. Tarbiat Modarres University. (in Farsi)

Sklodowski, J. J. W. 1996. Communities of epigeic insects (Col.: Carabidae) one year after spraying the nun moth with the preparations Trebon, Decis, Foray and Dimilin. **Sylwan**140: 83-97.

Solter, L., Pilarska, D. and Vossbrinck, C. 2000. Host specificity of Microsporidia pathogenic to forest Lepidoptera. **Biological Control** 19(1): 48-56.

Solter, L., Siegel, J., Pilarska, D. and Higgs, C. 2002. The impact of mixed infection of three species of microsporidia from the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). **Journal of Invertebrate Pathology** 81(2): 103-113.

Veloorvalappil, N. J., Robinson, B. S. and Sailas, B. 2013. An Overview on the Crystal Toxins from*Bacillus thuringiensis*. **Advances in Microbiology** 3: 462-472.

Webb, R. E., Peiffer, R., Fuester, R. W., Thorpe, K. W., Calabrese, L. and McLaughlin, J. M. 1998. An evaluation of the residual activity of traditional, safe, and biological insecticides against the gypsy moth. **Journal of Arboriculture** 24: 286-293.

Whaley, W. H., Anhold, J. and Schaalje, G. B. 1998. Canyon drift and dispersion of *Bacillus thuringiensis* and its effects on select nontarget Lepidopterans in Utah. **Environmental Entomology** 27(3): 539-548.

Yilmaz, S., Karabörklü, S., Azizoğlu, U., Ayvaz, A., Akbulut, M. and Yildiz, M. 2013. Toxicity of native *Bacillus thuringiensis* isolates on the larval stages of pine processionary moth *Thaumetopoea wilkinsoni* at different temperatures. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry** 37: 163 – 172.

Zibaee, I., Bandani, A.R., Sendi, J.J., Talaei-Hassanloei, R.and Kouchaki, B. 2010. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and medicinal plants on *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). **Invertebrate Survival Journal** 7: 251 – 261.

Plant Pest Research
2018- 8(3): 89-102

Study on the effect of *Bacillus thuringiensis* on control of *Ennomus quercinaria* (Hafngel)

A. Vatandoost[1], M.R. Damavandian[2*], H. Barimani Varandi[1] and M.R. Babaee[1]
1. Sari Agricultural and Natural Resources Research Center, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mazandaran, Iran, 2. Department of Plant Protection, College of Cultural Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

(Received: October 30, 2018- Accepted: December 15, 2018)

Abstract

In order to control *Ennomus quercinaria*, toxicity of different concentrations of *Bacillus thuringiensis* on was studied against the larvae of this pest to estimate LC50 levels of this biopesticide in this study. Laboratory evaluations by dipping method indicated more sensitivity of second instar larvae than the first ones, so that LC_{50} values of 2.14 and 0.6 ppm were calculated for the first and second instar larvae, respectively. Then, three calculated concentrations (1, 2, 3 ppm) of *B. thuringiensis* were sprayed on 2-year-old *Parrotia* seedlings using a back mounted sprayer, followed by releasing 30 second instar larvae on the seedlings. Results of LSD test showed significant differences in the mortality of second instar larvae between the control (water) and each of the three *B. thuringiensis* concentrations ($p<0.01$). The highest mortality rate (62%) caused by a concentration of 2 ppm. In the field conditions, *B. thuringiensis* caused 35% mortality versus a mortality rate of 2.8% in the control. The results of this study can be an important step in introducing a low-risk and healthy compound for pest control in the forest ecosystem and its beneficial insects.

Key words: Bioassay, *Bacillus thuringiensis*, *Ennomus quercinaria*, Mazandaran forests

Corresponding author: m.r.damavandian@gmail.com