

Effect of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in mixed with Neemarin and Matrine against forest pest, *Lymantria dispar* L.**Mahdieh Mousavi¹, Shahram Aramideh^{2*} and Samaneh Akbari¹**

1- PhD graduate in Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2*- Corresponding author, Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
Email: Sh.aramideh@urmia.ac.ir

Received: 19.09.2024

Accepted: 21.11.2024

Abstract

Background and objectives: The gypsy moth, *Lymantria dispar* L., is one of the most significant pests of forest and orchard trees, feeding on a wide range of tree and shrub species. Larval feeding on tree leaves is a common occurrence that severely impacts tree growth and productivity. Even if infested trees do not die, they experience significant reductions in growth and yield in subsequent years, leading to irreversible damage. Chemical control poses serious risks, including the destruction of natural enemies, pest resistance, secondary pest outbreaks, and environmental pollution. Therefore, this study aimed to evaluate the efficacy of botanical pesticides Neemarin and Matrine, in combination with the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk), for controlling *L. dispar* larvae.

Methodology: Egg masses of *L. dispar* were collected from infested black poplar (*Populus nigra* L.) trees on the Nazloo campus of Urmia University in 2023 and reared on fresh poplar leaves in a growth chamber. The leaves were replaced daily with fresh ones. The microbial pesticide used was the commercial formulation Belthirul, based on Btk (Problet, Madrid, Spain). Neemarin (Neemarin EC15%) is an *Azadirachta indica* Juss A. extract containing azadirachtin, manufactured in India and procured from the Iranian Research Institute of Plant Protection. Matrine (brand name: Rui Agro) is a contact and oral insecticide derived from *Sophora flavescens* Ait., produced in China under the supervision of Ecocert France. Bioassay experiments were conducted to assess the effects of Neemarin, Matrine, and Btk individually and in combination on second and third instar larvae. Additionally, the impact of sublethal concentrations (LC25) of these compounds on pest metamorphosis (larval-to-pupal and pupal-to-adult transformation) was evaluated under laboratory conditions using a germinator (27±2 °C, 65±5% relative humidity). The effectiveness of recommended concentrations was also tested on third instar larvae under field conditions.

Results: Probit analysis of different concentrations of Neemarin (150.00, 267.50, 385.00, 502.50, 620.00 ppm), Matrine (22.50, 38.25, 54.00, 69.75, 85.50 ppm), and Btk (300.00, 712.50, 1125.00, 1537.50, 1950.00 ppm) after 24 and 48 hours showed that Matrine had higher toxicity (lower LC50) than Neemarin and Btk. The combined treatments demonstrated significant differences (P<0.05), with the Neemarin+Matrine+Btk mixture causing the highest larval mortality after 72 hours in both instars. Under field conditions, the highest third instar larval mortality was observed in the Neemarin+Matrine treatment, followed by Matrine+Btk. Evaluating sublethal concentrations of Neemarin (136.94 ppm), Matrine (15.92 ppm), and Btk (302.75 ppm) on larval metamorphosis revealed that Neemarin had the highest inhibitory effect

on larval transformation to pupae and pupal development into adults.

Conclusion: Given the limitations and adverse effects of chemical pesticides, the use of biological and botanical alternatives for pest control is essential. The results of this study demonstrated that these biological compounds, both individually and in combination, effectively control *L. dispar* larvae under laboratory and field conditions. Additionally, sublethal concentrations significantly disrupted the pest's life cycle. Therefore, these bio-insecticides, particularly in combination, can be recommended as effective alternatives for managing *L. dispar* larvae and similar pests in forests and orchards.

Keywords: Forest pest, plant pesticides, microbial pesticides, biological control

تأثیر باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* در اختلاط با نیمارین و ماترین روی آفت جنگلی پروانه ابریشم‌باف ناجور *Lymantria dispar*

مهديه موسوی^۱، شهرام آرمیده^{۲*} و سمانه اکبری^۱

۱- دانش‌آموخته دکتری حشره‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. پست الکترونیک: Sh.aramideh@urmia.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۹

چکیده

سابقه و هدف: ابریشم‌باف ناجور *Lymantria dispar* L. از آفات مهم درختان جنگلی و باغی محسوب می‌شود. این آفت روی طیف گسترده‌ای از گونه‌های درختی و درختچه‌ای تغذیه می‌کند. تغذیه از برگ‌های درختان توسط لاروهای این آفت موضوعی بسیار شایع است. میزان رشد و تولید درختان آلوده به این آفت، حتی اگر خشک نشوند، در سال‌های بعد کاهش می‌یابد و این درختان متحمل خسارت جبران‌ناپذیری می‌شوند. کنترل شیمیایی آن موجب مخاطرات جدی مانند از بین بردن دشمنان طبیعی، مقاومت آفات، طغیان آفات جدید و آلودگی محیط‌زیست می‌شود، بنابراین، در این پژوهش تأثیر آفت‌کش‌های گیاهی نیمارین و ماترین در اختلاط با آفت‌کش میکروبی باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*) در کنترل لاروهای ابریشم‌باف ناجور *L. dispar* ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: توده‌های تخم پروانه ابریشم‌باف ناجور از صنوبرهای (*Populus nigra* L.) آلوده به این آفت در پردیس نازلوی دانشگاه ارومیه در سال ۱۴۰۲ جمع‌آوری و روی برگ‌های جوان و تازه صنوبر در اتاقک رشد (ژرمیناتور) پرورش داده شدند. برگ‌های صنوبر روزانه بررسی و با برگ‌های جوان و تازه جایگزین شد. باکتری مورد استفاده در این پژوهش فرمولاسیون تجاری Belthirul بر پایه *Btk* تولید کشور اسپانیا و شرکت پروبلت (Probelte) مادرید بود. حشره‌کش گیاهی نیمارین (Neemarin EC15%) عصاره گیاه چریش *Azadirachta indica* Juss A. و حاوی آزادیراختین، ساخت کشور هندوستان است. این حشره‌کش از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه شد. ماترین با نام تجاری روی آگرو (Rui Agro) حشره‌کشی تماسی و گوارشی است و فرآورده عصاره ریشه گیاهی تلخ‌بیان *Sophora flavescens* Ait. ساخت کشور چین است. این حشره‌کش زیر نظر شرکت اکوسرت (Ecocert) فرانسه تولید می‌شود. آزمایش‌های زیست‌سنجی شامل تأثیر نیمارین، ماترین و باکتری *Btk* و اختلاط آنها، همچنین تأثیر غلظت زیرکشنده (LC₂₅) آنها در دگرذیسی آفت شامل تبدیل مرحله لاروی به شفیره و مرحله شفیرگی به حشره کامل در شرایط آزمایشگاهی داخل اتاقک رشد با دمای ۲۷±۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵±۵ درصد روی لاروهای سن دوم و سوم آفت انجام شد. همچنین، اثر غلظت‌های توصیه‌شده ترکیبات در شرایط صحرایی روی لاروهای سن سوم این آفت بررسی و ارزیابی گردید.

نتایج و یافته‌ها: نتایج حاصل از تجزیه پروبیت غلظت‌های مختلف نیمارین ۰/۰۰، ۰/۵۰، ۰/۲۶۷، ۰/۳۸۵، ۰/۵۰۲ و ۰/۶۲۰، ماترین ۰/۰۰، ۰/۲۲، ۰/۳۸، ۰/۵۴، ۰/۶۹ و ۰/۸۵ و باکتری *Btk* ۰/۰۰، ۰/۳۰، ۰/۷۱۲، ۰/۱۱۲۵، ۰/۱۵۳۷ و ۰/۱۹۵۰، پی‌ام بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد با توجه به LC₅₀ حاصل، ماترین سمیت بیشتری نسبت به نیمارین و باکتری *Btk* دارد. همچنین در بررسی اثر تلفیقی ترکیبات، نتایج نشان داد، در سطح اطمینان ۹۵ درصد بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد و ترکیب نیمارین و ماترین با یکدیگر و با باکتری *Btk* بیشترین درصد کنترلی را بعد از ۷۲ ساعت روی هر دو سن لاروی داشت. در بررسی تأثیر ترکیبات روی لاروهای سن سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور در شرایط صحرایی در تمام روزهای بعد از محلول‌پاشی، بیشترین تلفات روی لارو سن سوم مربوط به تیمار ترکیب نیمارین + ماترین و در مرحله بعد ترکیب ماترین + *Btk* به دست آمد و در

ارزیابی تأثیر غلظت زیرکشنده، نیمارین (۱۳۶/۹۴ پی پی ام)، ماترین (۱۵/۹۲ پی پی ام) و باکتری *Btk* (۳۰۲/۷۵ پی پی ام) روی تبدیل مرحله لاروی به شفیره و مرحله شفیرگی به حشره کامل، بیشترین میزان بازدارندگی در تیمار نیمارین مشاهده شد. نتیجه گیری: با در نظر گرفتن محدودیت استفاده و اثرهای سوء آفت کش های شیمیایی، استفاده از ترکیبات بیولوژیک و گیاهی در کنترل آفات ضروریست. نتایج این بررسی نشان داد، در کنترل مرحله لاروی این آفت در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی و تأثیر روی چرخه زندگی با استفاده از غلظت های زیرکشنده، این سه ترکیب زیستی از ظرفیت بالایی برخوردارند، همچنین می توان به صورت اختلاط برای افزایش تأثیر استفاده کرد، بنابراین، در کنترل لاروهای این آفت و آفت های مشابه در باغ ها و جنگل ها توصیه می شود.

واژه های کلیدی: آفت جنگلی، آفت کش گیاهی، آفت کش میکروبی، کنترل بیولوژیک

مقدمه

شب پره ابریشم باف ناجور *Lymantria dispar* L. متعلق به خانواده Lymantriidae، یکی از آفات مخرب درختان جنگلی و باغی در دنیا است (Tavakoli et al., 2018; Woodward & Quinn, 2011). لارو شب پره ابریشم باف ناجور چندخوار است و روی طیف وسیعی از درختان تغذیه می کند (Martemyanov et al., 2019; Liebhold et al., 1995)، در زمان طفیان این آفت، گیاهان میزبان به طور کامل بی برگ می شود، به طوری که در نهایت موجب مرگ میزبان می گردد (Tiberi et al., 2016; Cocco et al., 2016; Hlasny et al., 2010). برخلاف حشره کش های شیمیایی، میکروارگانسیم های بیماری زای حشرات به صورت انتخابی عمل می کنند (Lentini et al., 2019; Pisa et al., 2015) و خطرات اکولوژیکی مرتبط با آلودگی های زیست محیطی را ندارند (Pisa et al., 2017). اگرچه استفاده از حشره کش های زیستی با تعدادی از مشکلات در مدیریت آفات به دلیل مسائلی مانند اثرهای ناپایدار آن، پایین بودن سرعت کشندگی و فعالیت های متفاوت تحت شرایط محیطی متغیر همراه است (Lacey et al., 2015)، اما یکی از راه حل های آن می تواند استفاده از میکروارگانسیم های بیماری زا با روش های دیگر کنترلی مانند روش های فیزیکی (Yaroslavtseva et al., 2017; Kryukov et al., 2009) باشد، همچنین می توان تلفیق عوامل بیماری زا با متابولیت های ثانویه گیاهی (Konecka et al., 2020; Kryukov et al., 2018; Otieno et al., 2017;

Akhanaev et al., 2017)، یا در مواردی با غلظت های زیرکشنده حشره کش های کم خطر شیمیایی را (Dader et al., 2001; Furlong & Groden, 2020) برای افزایش اثر و پایداری استفاده کرد. از جمله راهبردهای کنترلی غیرشیمیایی و بیولوژیکی آفت ابریشم باف ناجور، استفاده از باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*Btk*) است (Ruiu et al., 2021). این باکتری خاک زری و گرم مثبت است (Azimi et al., 2024) و فرمولاسیون های مبتنی بر باکتری *Btk* بر اغلب آفات راسته بال پولک داران مؤثر و حاوی اسپور و کریستال پروتئین می باشد. کریستال پروتئین با اثر روی لوله گوارش به گیرنده های غشای پلاسمایی بافت پوششی روده میانی اتصال می یابد و با به هم زدن جریان طبیعی یونها در داخل سلول های روده موجب تخریب و لیز شدن آنها می شود، در نتیجه لاروهای آلوده فلج و با ورود اسپور به حفره عمومی، سبب عفونت عمومی و مرگ میزبان می شوند (Mannu et al., 2020; Ruiu et al., 2006; Crickmore, 2013). از ترکیبات غیرشیمیایی و گیاهی پایه مؤثر روی آفات برگ خوار می توان به آفت کش های نیمارین و ماترین اشاره کرد. نیمارین یک آفت کش گیاهی شبه استروئیدی تماسی، گوارشی و حاوی آلکالوئید آزادیراختین است که از برگ ها، میوه ها و دانه های درختان چریش *Azadirachta indica* A. Juss. به دست می آید (Bezerra et al., 2021; Benelli et al., 2017). نیمارین دارای اثرهای ضد تغذیه ای، دورکنندگی، اختلال در پوست اندازی، کاهش رشد، اختلال در تکامل و تخم گذاری

مهم برگ‌خوار درختان جنگلی و باغی در شرایط آزمایشگاهی و صحرایی بررسی و ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

پرورش پروانه ابریشم‌باف ناجور

توده تخم پروانه ابریشم‌باف ناجور از صنوبرهای (*Populus nigra* L.) آلوده به این آفت در پردیس نازلوی دانشگاه ارومیه در محدوده جغرافیایی ۳۷ درجه و ۳۹ دقیقه و ۴۶ ثانیه تا ۳۷ درجه و ۳۸ دقیقه و ۵۱ ثانیه عرض شمالی و ۴۴ درجه و ۵۸ دقیقه و ۶ ثانیه تا ۴۴ درجه و ۵۹ دقیقه و ۴۸ ثانیه طول شرقی در فاصله ۱۱ کیلومتری شمال‌غربی شهر ارومیه در سال‌های ۱۴۰۱-۱۴۰۲ جمع‌آوری و روی برگ‌های جوان صنوبر در اتاقک رشد در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۴:۱۰ نور/تاریکی پرورش داده شدند. برگ‌های صنوبر روزانه بررسی و با برگ‌های جوان و تازه جایگزین گردیدند (شکل ۱).

و کشندگی به‌ویژه در حشرات نابالغ است که برای طیف وسیعی از آفات استفاده می‌شود (Nikakhtar *et al.*, 2022; Taheri Sarhozak *et al.*, 2020). ترکیبات آزادیراختینی مانند نيمارين داراي چندین ویژگی هستند که استفاده از آنها جنگل‌ها و باغ‌ها را جذاب می‌کند و می‌توان از آنها به‌صورت محلول‌پاشی روی برگ‌ها یا به شکل سیستمی با تزریق به شاخه استفاده کرد (Helson *et al.*, 2001). همچنین، ماترین یک حشره‌کش گیاهی استخراج‌شده از ریشه گیاه تلخ‌بیان *Sophora flavescens* Ait. است که به‌طور گسترده در آسیا و جزایر اقیانوس آرام پراکنده می‌باشد و عصاره آنها خاصیت حشره‌کشی دارد (Amirfanak *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2019). این آفت‌کش گیاهی در ترکیب با سایر آفت‌کش‌ها نیز استفاده می‌شود (Cheng *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2017; Zanardi *et al.*, 2015). بنابراین، در این پژوهش تأثیر دو آفت‌کش گیاهی شامل نيمارين و ماترین در اختلاط با آفت‌کش میکروبی باکتری *B. thuringiensis* در کنترل لاروهای ابریشم‌باف ناجور *L. dispar* به‌عنوان یک آفت



شکل ۱- محل جمع‌آوری آفت پروانه ابریشم‌باف ناجور و انجام آزمایش‌های صحرایی
Figure 1. Gypsy moth pest collection area and conducting field experiments

حشره‌کش‌های مورد استفاده در پژوهش

باکتری مورد استفاده در این پژوهش فرمولاسیون تجاری پودر ترشونده (Wettable powder) به نام Belthirul 32000 IU/mg بر پایه *B. thuriugiensis* subsp. *kurstaki* تولید کشور اسپانیا و شرکت پروبلت مادرید بود. حشره‌کش گیاهی نیمارین (Neemarin EC15%) عصاره گیاهی چریش *A. indica* حاوی ترکیب آزادیراختین ساخت ایران است که از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه شد. حشره‌کش نیمارین دارای اثر ضد تغذیه‌ای است و روی پوست‌اندازی حشرات تأثیر دارد (Kumar et al., 2005). ماترین با نام تجاری روی آگرو (Rui Agro) حشره‌کشی تماسی و گوارشی و از فراورده‌های عصاره ریشه گیاهی تلخ‌بیان *S. flavescens* ساخت کشور چین زیر نظر شرکت Ecocert فرانسه است که با اثر بر سیستم عصبی و تنفسی موجب مرگ آفات می‌شود. این فراورده توسط مؤسسات بین‌المللی برای استفاده در کشت‌های ارگانیک در اروپا پذیرفته شده است (Amirfanak et al., 2023).

آزمایش‌های زیست‌سنجی در شرایط آزمایشگاهی

زیست‌سنجی روی لاروهای دوم و سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور

ابتدا طی یک مجموعه آزمایش‌های مقدماتی برای به‌دست آوردن غلظت‌های کشنده حداقل و حداکثر (۲۵-۷۵ درصد) آفت‌کش‌های مورد استفاده، روی لاروهای دوم و سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور انجام شد. براساس نتایج حاصل از آزمایش‌ها، پنج غلظت به‌صورت لگاریتمی شامل غلظت‌های نیمارین ۱۵۰/۰۰، ۲۶۷/۵۰، ۳۸۵/۰۰، ۵۰۲/۵۰ و ۶۲۰/۰۰، ماترین ۲۲/۵۰، ۳۸/۲۵، ۵۴/۰۰، ۶۹/۷۵ و ۸۵/۵۰ و باکتری ۳۰۰/۰۰، ۷۱۲/۵۰، ۱۱۲۵/۰۰، ۱۵۳۷/۵۰ و ۱۹۵۰/۰۰ پی‌پی‌ام تعیین شد (Robertson et al., 2007). آنگاه برگ‌های جوان درخت صنوبر به مدت ۲۰ ثانیه در هریک از غلظت‌ها به‌همراه یک درصد مویان غوطه‌ور شد و در شرایط آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری گردید تا کاملاً خشک شود. سپس

برگ‌های تیمار شده به درون پتری‌دیش‌هایی به قطر دهانه ۹ و ارتفاع ۱/۵ سانتی‌متری، که درب آنها به‌منظور تهویه سوراخ و توسط توری آرگانزا پوشانده شده بود، منتقل شدند. تعداد ۱۰ عدد لارو سن دوم و سوم جداگانه داخل هر پتری‌دیش منتقل شد. سپس پتری‌دیش‌ها به اتاقک رشد با دمای 27 ± 2 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد منتقل شدند. با گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تیمار، تعداد لاروهای زنده و مرده در هر تیمار شمارش و ثبت شد. لاروهایی که با وجود تحریک با سوزن داغ پس از گذشت ۵ ثانیه قادر به راه رفتن نبودند، مرده تلقی شدند. در این آزمایش هر غلظت در ۳ تکرار انجام شد.

تأثیر اختلاط نیمارین و ماترین با یکدیگر و با باکتری *Btk*

روی لاروهای سن دوم و سوم

بعد از زیست‌سنجی و تعیین LC_{50} و LC_{25} ماترین و نیمارین، اثرهای اختلاط آنها روی لاروهای سن دوم و سوم ارزیابی شد. در این روش، مقادیر هریک از ترکیبات براساس LC_{50} و LC_{25} به‌دست آمده با استفاده از سمپلر جدا شد و به‌صورت تیمارهایی شامل LC_{50} ماترین، LC_{50} نیمارین، LC_{50} باکتری، LC_{25} نیمارین + LC_{25} ماترین، LC_{25} نیمارین + LC_{25} باکتری و LC_{25} ماترین + LC_{25} باکتری به همراه تیمار شاهد (آب مقطر + یک درصد مویان)، هر تیمار در سه تکرار روی سن دوم و سوم لاروی استفاده شد. سپس نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف هر ترکیب بعد ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت یادداشت گردید.

تأثیر اختلاط نیمارین و ماترین با یکدیگر و با باکتری *Btk*

روی لاروهای سن سوم در شرایط صحرائی

برای انجام این آزمایش، از غلظت‌های توصیه‌شده ترکیبات مورد استفاده (*Btk*، نیمارین و ماترین به‌ترتیب با غلظت‌های ۲/۵ در هزار، دو در هزار و یک در هزار به همراه یک درصد مویان) در این تحقیق تهیه و توسط سم‌پاش دستی ۲۰ لیتری کوبین روی چند درخت صنوبر در هنگام عصر و در شرایط بدون وزش باد محلول‌پاشی شد.

لاروی به شفیره، همچنین تبدیل مرحله شفیرگی به حشره کامل رصد و ثبت شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

بررسی‌های آزمایشگاهی در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver 22 تجزیه و تحلیل شدند. به منظور تعیین کشندگی آفت‌کش‌ها در آزمایشگاه، داده‌های حاصل از مرگ‌ومیر لاروها بعد از اصلاح با معادله آبوت به روش تجزیه پروبیت آنالیز و مقادیر LC_{25} و LC_{50} محاسبه شد (معادله ۱) (Abbott, 1925).

بعد از خشک‌شدن محلول‌ها، شاخه‌ها توسط ظروف یکبارمصرف محصور شد. در هر تیمار ۳۰ لارو و در هر تکرار ۱۰ لارو سن سوم رهاسازی و توسط توری ارگانزا پوشانده شد. مرگ‌ومیر لاروها بعد از یک، سه و هفت روز شمارش و مقایسه میانگین انجام شد.

تأثیر غلظت زیرکشنده (LC_{25}) در دگرذیسی آفت

در این آزمایش لاروهای سن دوم ابریشم‌باف ناجور از برگ‌های شاداب درخت صنوبر آغشته به غلظت زیرکشنده (LC_{25}) هر سه آفت‌کش به همراه تیمار شاهد (برگ‌های آغشته به آب مقطر) تغذیه کردند و میزان تبدیل مرحله

$$\text{معادله (۱)} \quad \text{تلفات شاهد} - \text{تلفات تیمار} = \left(\frac{\text{تلفات تیمار}}{\text{تلفات شاهد}} \right) \times 100 = \text{درصد مرگ و میر}$$

(جدول‌های ۱ و ۲).

تأثیر اختلاط نیمارین، ماترین و باکتری *Btk* روی لاروهای سن دوم پروانه ابریشم‌باف ناجور نتایج حاصل از تجزیه آماری تأثیر تیمارهای نیمارین $LC_{50}(N)$ ، ماترین $LC_{50}(M)$ ، باکتری $LC_{50}(Bt)$ ، $LC_{25}(N)+LC_{25}(M)$ ، $LC_{25}(N)+LC_{25}(Bt)$ و تیمار شاهد روی لاروهای سن دوم پروانه ابریشم‌باف ناجور به ترتیب بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد، در سطح اطمینان ۹۵ درصد بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($F_{6, 14}=67.56$; $P=0.001$) و ($F_{6, 14}=77.33$; $P=0.001$) و ($F_{6, 14}=106.00$; $P=0.001$) (شکل ۲).

برای ارزیابی معنی‌داری تأثیر غلظت زیرکشنده (LC_{25}) روی تبدیل مرحله لاروی به شفیره، تبدیل مرحله شفیرگی به حشره کامل و اثر اختلاط ترکیبات روی لارو سن دوم و سوم از تجزیه واریانس یک‌طرفه آنوا (ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده شد.

تعیین کشندگی

تجزیه پروبیت حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف نیمارین، ماترین و باکتری *Btk* بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت روی لاروهای سن دوم و سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور در جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. با توجه به LC_{50} حاصل از آفت‌کش‌های گیاهی و میکروبی، ماترین دارای سمیت بیشتری نسبت به نیمارین و باکتری *Btk* است

جدول ۱- تجزیه پروبیت اثر کشندگی حشره‌کش‌های نیمارین، ماترین و *Btk* روی لاروهای سن دوم پروانه ابریشم‌باف ناجور بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاهی

Table 1. Probit analysis of Neemarin[®], Matrine[®] and *Btk* insecticides on second instar larvae of *Lymantria dispar* after 24 and 48 hours under laboratory conditions

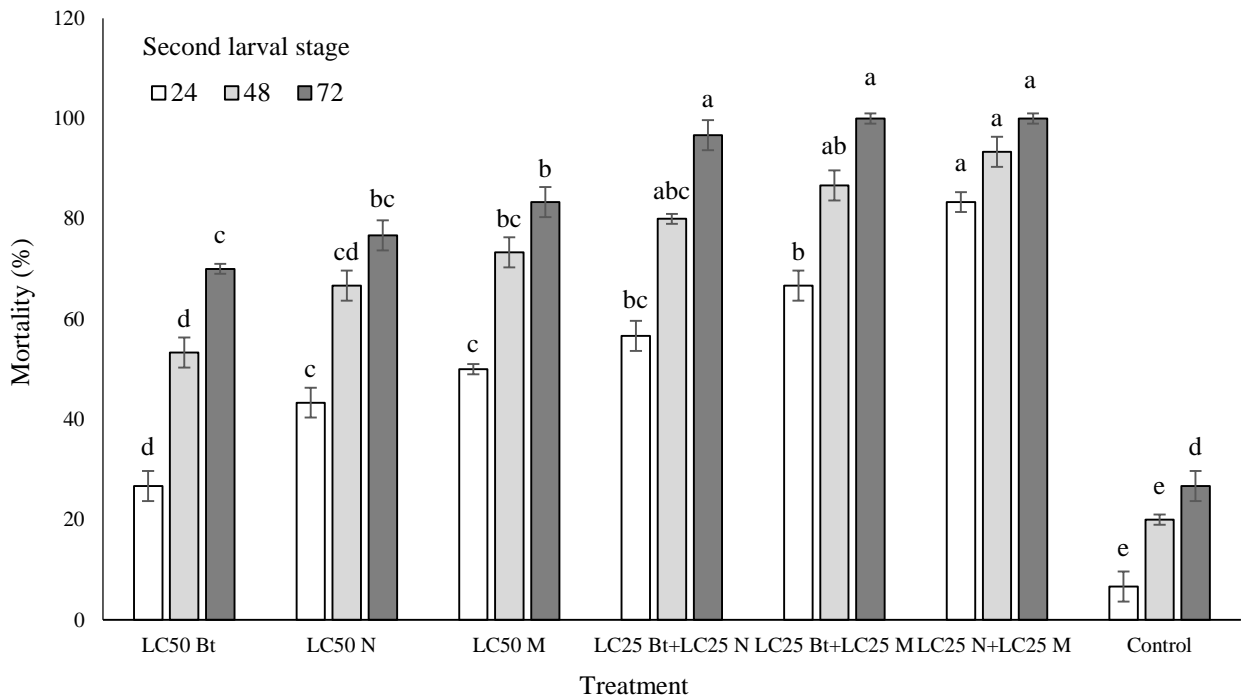
Treatment	Con.* (ppm)	Time (h)	Slope±SE	Intercept	X2 (df)	LC ₂₅ (95% CLs)**	LC ₅₀ (95% CLs)
Neemarin	150.00	24	1.79 ± 0.51	0.239	1.542 (3)	191.70 (80.33-263.08)	456.46 (349.37-741.12)
	267.50						
	385.00						
	502.50	48	2.44 ± 0.51	-0.891	2.537 (3)	136.94 (69.87-186.78)	258.70 (190.97-316.84)
	620.00						
Control							
Matrine	22.50	24	1.63 ± 0.52	2.177	0.663 (3)	20.85 (4.52-31.34)	54.09 (39.06-83.98)
	38.25						
	54.00						
	69.75	48	2.37 ± 0.55	1.478	2.981 (3)	15.92 (6.36-23.13)	30.67 (19.94-38.41)
	85.50						
Control							
<i>Btk</i>	300.00	24	1.68± 0.41	-0.260	1.30 (3)	539.44 (269.29-746.70)	1360.83 (1018.81- 2147.83)
	712.50						
	1125.00						
	1537.50	48	1.86 ± 0.39	-0.296	2.33 (3)	302.75 (131.22- 448.21)	696.95 (480.58- 907.10)
	1950.00						
Control							

**Confidence limits

جدول ۲- تجزیه پروبیت اثر کشندگی حشره‌کش‌های نیمارین، ماترین و *Btk* روی لاروهای سن سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاهی

Table 2. Probit analysis of Neemarin[®], Matrine[®] and *Btk* insecticides on third instar larvae of *Lymantria dispar* after 24 and 48 hours under laboratory conditions

Treatment	Con. (ppm)	Time (h)	Slope±SE	Intercept	X2 (df)	LC ₂₅ (95% CLs)	LC ₅₀ (95% CLs)
Neemarin	150.00	24	1.67 ± 0.52	0.339	0.319 (3)	243.23 (109.64-328.06)	616.15 (448.79-1590.73)
	267.50						
	385.00						
	502.50	48	2.41± 0.52	-1.073	1.780 (3)	175.36 (99.91-229.15)	334.39 (265.21-414.31)
	620.00						
Control							
Matrine	22.50	24	1.47± 0.53	2.278	1.041 (3)	24.96 (4.26-36.88)	72.07 (52.08-202.81)
	38.25						
	54.00						
	69.75	48	1.93± 0.53	1.984	2.407 (3)	16.47 (4.61-25.13)	36.90 (23.45-47.34)
	85.50						
Control							
<i>Btk</i>	300.00	24	1.87± 0.47	-1.175	0.556 (3)	886.44 (580.06-1167.67)	2037.41 (1494.57- 4082.74)
	712.50						
	1125.00						
	1537.50	48	1.85± 0.39	-0.369	1.970 (3)	340.13 (154.87- 493.50)	785.94 (561.23- 1025.03)
	1950.00						
Control							

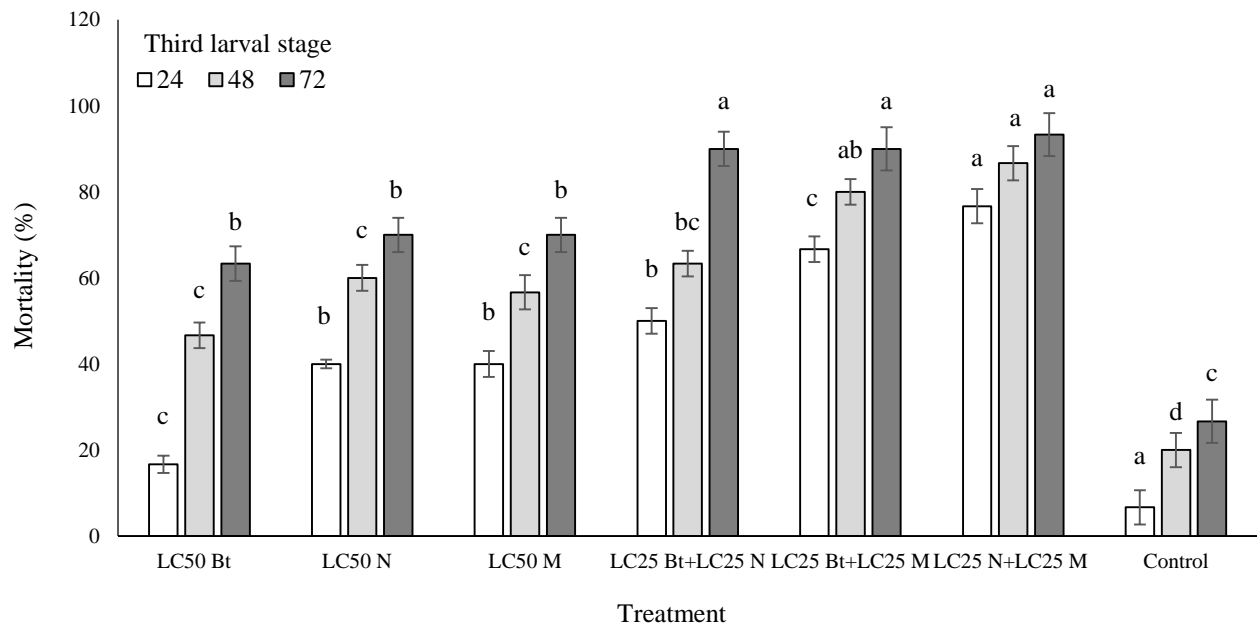


شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر اختلاط حشره‌کش‌های نیمارین، ماترین و باکتری *Btk* روی لاروهای سن دوم پروانه ابریشم‌باف ناجور در شرایط آزمایشگاهی. میانگین‌های با حروف مشابه در گروه آماری یکسان در سطح احتمال ۵ درصد قرار دارند (آزمون توکی).

Figure 2. Means comparison of combination effect of Neemarin[®], Matrine[®] and *Btk* on second instar larvae of *Lymantria dispar* under laboratory conditions. Means with similar letters are in the same statistical group at 5% probability level (Tukey test).

LC₂₅(N)+LC₂₅(Bt) ، LC₂₅(N)+LC₂₅(M)
 LC₂₅(M)+LC₂₅(Bt) و تیمار شاهد روی لاروهای سن سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور به ترتیب بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد. در سطح اطمینان ۹۵ درصد بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد (F_{6, 14}=99.00; P=0.001)، (F_{6, 14}=113.44; P=0.001) و (F_{6, 14}=30.50; P=0.001) (شکل ۳).

با توجه به نتایج تأثیر تیمارها روی لاروهای سن دوم پروانه ابریشم‌باف ناجور، بیشترین درصد کنترلی بعد از ۷۲ ساعت مربوط به تیمارهای ترکیبی نیمارین و ماترین با یکدیگر و با باکتری *Btk* است (شکل ۲).
 تأثیر اختلاط نیمارین، ماترین و باکتری *Btk* روی لاروهای سن سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور نتایج حاصل از تجزیه آماری تأثیر تیمارهای نیمارین ماترین ، LC₅₀(N) ، LC₅₀(M) ، LC₅₀(Bt)



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر اختلاط حشره کش‌های نیمارین، ماترین و باکتری *Btk* روی لاروهای سن سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور در شرایط آزمایشگاهی. میانگین‌های با حروف مشابه در گروه آماری یکسان در سطح احتمال ۵ درصد قرار دارند (آزمون توکی).

Figure 3. Means comparison of combination effect of Neemarin[®], Matriline[®] and *Btk* on third instar larvae of *Lymantria dispar* under laboratory conditions. Means with similar letters are in the same statistical group at 5% probability level (Tukey test).

۳ و ۷ روز بعد از محلول‌پاشی به ترتیب با $F_{2, 12}=1.000$; $F_{2, 12}=0.340$; $F_{2, 12}=0.563$; $P=0.584$) و $(P=0.397$ ، $P=0.719$) عدم معنی‌داری بلوک و فرض همگنی واریانس‌ها محقق شد $(P=0.05)$. با توجه به معنی‌داری تیمارها، مقایسه میانگین تأثیر تیمارها روی لارو سن سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۹۵ درصد مطابق جدول ۳ حاصل شد. در تمام روزهای بعد از محلول‌پاشی، بیشترین تلفات روی لارو سن سوم مربوط به تیمار ترکیب نیمارین+ماترین و در مرحله بعد ترکیب ماترین+*Btk* است (جدول ۳).

با توجه به نتایج تأثیر تیمارها روی لاروهای سن سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور، بیشترین درصد کنترلی بعد از ۷۲ ساعت همانند لارو سن دوم مربوط به تیمارهای ترکیبی نیمارین و ماترین با یکدیگر و با باکتری *Btk* است (شکل ۳).

تأثیر ترکیبات روی لاروهای سن سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور در شرایط صحرایی تجزیه واریانس حاصل از تأثیر نیمارین، ماترین و باکتری *Btk* و ترکیب آنها در شرایط صحرایی در ارزیابی ۱،

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر تیمارها روی لارو سن سوم پروانه ابریشم باف ناجور با استفاده از آزمون توکی ۱، ۳ و ۷ روز بعد از محلول پاشی در شرایط صحرایی ($P=0.05$)

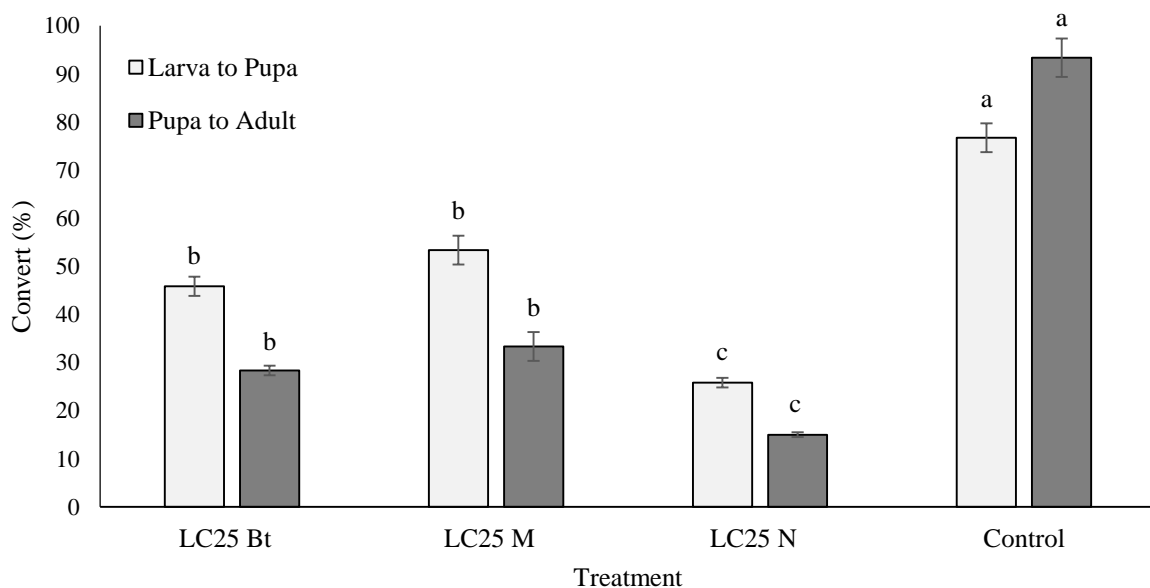
Table 3. Mean comparison of treatments against 3rd larval instar of *Lymantria dispar* by Tukey test at one, three and seven DAT under field conditions ($P=0.05$)

Treatment	(DAT) (Percentage mortality \pm SE) *		
	1	3	7
Neemarin	30.00 \pm 2.00 ^d	46.67 \pm 3.80 ^d	73.33 \pm 4.25 ^{bc}
Matrine	53.33 \pm 3.75 ^{bc}	70.00 \pm 5.50 ^{bc}	86.67 \pm 5.80 ^{ab}
<i>Btk</i>	26.67 \pm 1.45 ^d	43.33 \pm 4.00 ^d	60.00 \pm 4.00 ^c
<i>Btk</i> +Neemarin	43.33 \pm 3.02 ^c	56.67 \pm 4.85 ^{cd}	73.33 \pm 5.55 ^{bc}
<i>Btk</i> +Matrine	60.00 \pm 4.40 ^{ab}	76.67 \pm 6.20 ^{ab}	93.33 \pm 6.60 ^a
Neemarin+Matrine	70.00 \pm 5.11 ^a	86.67 \pm 6.50 ^a	100.00 \pm 0.00 ^a
Control	13.33 \pm 0.36 ^e	20.00 \pm 0.41 ^e	33.33 \pm 0.53 ^d
F _{6,12}	64.000	61.000	36.377
P	0.001	0.001	0.001

* Day after treatment

داد، در سطح اطمینان ۹۵ درصد بین اثر غلظت‌های زیرکشنده نیمارین، ماترین، *Btk* و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($F_{3, 8}=37.91$; $P=0.001$) و ($F_{3, 8}=145$; $P=0.001$) (شکل ۴).

تأثیر غلظت زیرکشنده (LC_{25}) ترکیبات روی دگردیسی آفت نتایج حاصل از تجزیه آماری غلظت زیرکشنده نیمارین، ماترین، *Btk* و تیمار شاهد (آب مقطر) روی تبدیل مرحله لاروی آفت به شفیره و مرحله شفیرگی به حشره کامل نشان



شکل ۴- مقایسه میانگین تأثیر غلظت زیرکشنده حشره‌کش‌های نیمارین، ماترین و باکتری *Btk* بر میزان تبدیل مرحله لاروی به مرحله شفیرگی و مرحله شفیرگی به مرحله حشره کامل ابریشم باف ناجور در شرایط آزمایشگاهی. میانگین‌های با حروف مشابه در گروه آماری یکسان در سطح احتمال ۵ درصد قرار دارند (آزمون توکی).

Figure 4. Means comparison of effect sublethal dose of Neemarin[®], Matrine[®] and *Btk* insecticides on conversion rate of larval to pupal and pupal to adult stages of *Lymantria dispar* under laboratory conditions. Means with similar letters are in the same statistical group at 5% probability level (Tukey test).

سوم پروانه ابریشم‌باف ناجور می‌شود. در لاروهای سن دوم حساسیت بیشتری نسبت به لاروهای سن سوم مشاهده شد. این تفاوت در حساسیت را می‌توان ناشی از سازوکارهای مقاومتی - فیزیولوژیکی در برابر آلودگی‌های باکتریایی در سنین بالای لاروی دانست (Hwang et al., 2023).

در سال‌های گذشته مطالعات زیادی در رابطه با اثرهای کنترلی حشره‌کش‌های گیاهی و باکتری بیماری‌زای *Btk* انجام شده است، به طوری که با توجه به مطالعات انجام شده، Almeida و همکاران (۲۰۱۴) اثر ضدتغذیه‌ای و تغییرات سلول‌های پوششی معده لارو پروانه برگ‌خوار *Anticarsia gemmatalis* Hübner تغذیه‌شده با غذای مصنوعی حاوی نیمازین را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که غلظت‌های بالای ۵۰۰ پی‌پی‌ام موجب مرگ‌ومیر کامل لاروها شده و غلظت‌های پایین‌تر بر میزان باروری و تغذیه آنها اثر گذاشته است و موجب کاهش وزن لارو و شفیره، تورم سلول‌های پوششی معده و جابه‌جایی این سلول‌ها روی غشای پایه و به‌طورکلی سلول‌ها دچار اختلال شدند. همچنین، Kouhjeni Gorji (۲۰۲۳) نشان داد، نیمازین و ماترین با کاهش دادن یا ممانعت کردن از تغذیه موجب کاهش وزن لاروی و در نهایت مرگ آفت شب‌پره شمشاد *Cydalima perspectalis* Walker می‌شود. در آزمایشی دیگر، Karimzadeh Esfahani (۲۰۱۴) حشره‌کش ماترین را به‌تنهایی به میزان دو در هزار و در روش تلفیقی به میزان ۱ تا ۱/۵ در هزار، برای مبارزه با بید کلم در مزارع کلم‌بیج توصیه کرده است. همچنین حشره‌کش گیاهی ماترین می‌تواند آفاتی مانند کنه دونقطه‌ای *Tetranychus urticae* Koch پروانه برگ‌خوار مصری *Spodoptera littoralis* Boisduval و مگس مینوز *Liriomyza sativae* Blanchard را کنترل کند (Moradi Afrapoli et al., 2022; Medo & Marcic, 2013; Elmageed & shalaby, 2011; Adiroubane & Raghuraman, 2008). گزارش‌ها نشان می‌دهند، حشره‌کش ماترین و نیز فرمولاسیون‌های تجارتي باکتری *Btk* جمعیت آفت کرم غوزه *Helicoverpa armigera* Hübner را حدود

با توجه به نتایج تأثیر غلظت زیرکشنده نیمازین، ماترین و باکتری *Btk* روی تبدیل لارو به شفیره و شفیره به حشره کامل، بیشترین میزان بازدارندگی در تیمار نیمازین مشاهده شد (شکل ۴).

بحث

حشره‌کش‌های گیاهی و فرمولاسیون‌های تجارتي باکتری *Btk* از جمله گزینه‌های پذیرفته‌شده برای مدیریت تلفیقی آفات جنگلی و باغی هستند. لاروهای برگ‌خوار راسته بال‌پولک‌داران اهداف مناسبی برای این دو گروه از حشره‌کش‌های زیست‌سازگار با محیط‌زیست می‌باشند (Ojha et al., 2017). این ترکیبات اثرهای سوء آفت‌کش‌های مصنوعی را ندارند و به‌عنوان راهکاری امن در برنامه‌های کنترل تلفیقی آفات جنگلی و باغی هستند (Lengai et al., 2020; Rahman et al., 2016). مزایای متعدد آفت‌کش‌های گیاهی از جمله امنیت بالا نسبت به انسان و محیط‌زیست، نبود بقایای مضر و قابلیت تلفیق با سایر روش‌های کنترل، آنها را به‌عنوان جایگزین مناسب برای حشره‌کش‌های شیمیایی در برنامه‌های مدیریت آفات قرار داده است (Souto et al., 2021; Göldel et al., 2020).

حشره‌کش‌های گیاهی ماترین و نیمازین بر مبنای عصاره گیاهی توسط پژوهشگران مختلف علیه آفات گوناگون استفاده و تأیید شده است (Azimi et al., 2024; Amirfanak et al., 2023; Ojha et al., 2017; Massaguni & Latip, 2012). از سوی دیگر، امروزه باکتری *Btk* به‌عنوان یک ماده بیولوژیک و آفت‌کش زیستی با قابلیت استفاده در جنگل‌ها، باغ‌ها و مزارع نقش بسیار مهمی در کنترل آفات برعهده دارد (Ruii et al., 2021; Aramideh, Hosseinzadeh & Aramideh, 2016; 2016). مطالعه پیش‌رو نشان داد، اختلاط *Btk* با حشره‌کش‌های ماترین، نیمازین و نیز اختلاط نیمازین و ماترین با یکدیگر سبب بروز هم‌افزایی در کشندگی آنها نسبت به استفاده این ترکیبات به‌تنهایی روی سنین دوم و

چریش (نیمارین) روی پروانه شب‌پره هندی *Plodia interpunctella* Hubner نشان داده‌اند. همچنین، Mohamadi و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که تلفیق باکتری *Btk* با عصاره گیاهی موجب افزایش کارایی آن و افزایش مرگ‌ومیر لاروهای کرم برگ‌خوار چغندر قند می‌شود. در بررسی دیگری، Mhalla و همکاران (۲۰۱۸) استفاده *Btk* و عصاره هگزانی گیاه *Rumex tingitanus* L. را به‌تنهایی و در تلفیق با یکدیگر علیه لاروهای کرم برگ‌خوار پنبه *Spodoptera littoralis* Boisduval بررسی کردند و نشان دادند، تلفیق این دو عامل روی مرگ‌ومیر لاروها اثرهای هم‌افزایی داشته است. این پژوهشگران ممانعت از غیرسمی‌کردن دلتا-اندوتوکسین را به‌دلیل حضور متابولیت‌های گیاهی، به‌وسیله فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش حشره از دلایل افزایش اثر تلفیق دو عامل ذکر کرده‌اند. همچنین، در بررسی مشابهی در شرایط آزمایشگاهی مشخص شد که تلفیق *Btk* با آزادپراختین علیه کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hübner مرگ‌ومیر تجمعی لاروها را در طی هفت روز نسبت به استفاده آنها به‌تنهایی افزایش داده است. همچنین، هر دو عامل میزان ظهور حشرات کامل و شفیره کرم غوزه پنبه را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داده است (Abedi et al., 2014). در مطالعه تأثیر توأم باکتری *Btk* و پودر گیاهی حنا روی لاروهای سن سوم سوسک کلرادوی سیب‌زمینی، نتایج نشان‌دهنده اثر تشدیدکنندگی پودر حنا بود. پودر حنا به‌دلیل داشتن مقدار زیادی از تانن‌ها موجب بروز حالت افزایشی در اختلاط با باکتری *Btk* می‌شود. زیرا تانن‌های موجود در پودر حنا می‌توانند موجب بروز زخم‌های ریزی در سلول‌های بافت پوششی روده میانی حشرات شوند. این وضعیت سبب می‌شود، اسپورهای رشدکرده درون معده به مقدار بیشتری وارد حفره عمومی بدن شوند و تلفات لاروها را در اثر پدیده عفونت عمومی افزایش دهند (Ghassemi-Kahrizeh & Aramideh, 2014). در این پژوهش نیز باکتری *Btk* در اختلاط با هر دو ترکیب گیاهی نیمارین و ماترین اثر بیشتری نسبت به کاربرد تک‌تک آنها نشان داد که

۵۰ درصد کاهش می‌دهند (Ojha et al., 2017). در این پژوهش نیز، حشره‌کش گیاهی ماترین و باکتری *Btk* به‌صورت کاربرد آنها به‌تنهایی، همچنین در اختلاط با یکدیگر، اثر کنترلی بسیار خوبی روی پروانه ابریشم‌باف ناجور داشت که با پژوهش یادشده در بالا مطابقت دارد.

Mannu و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند، استفاده از *Btk* روی درختان بلوط موجب کاهش خسارت پروانه ابریشم‌باف ناجور می‌شود. در پژوهش Hwang و همکاران (۲۰۲۳) اثر کشندگی *Btk* روی پروانه ابریشم‌باف ناجور مطالعه شد و نتایج نشان داد، این باکتری موجب تلفات بالا در همه سنین این آفت می‌شود. از سوی دیگر، قرار گرفتن در معرض غلظت‌های زیرکشنده *Btk* اثر ضدتغذیه‌ای روی لارو بال‌پولک‌داران داشته است (Hesketh & Hails, 2015). در تحقیق مشابهی Erb و همکاران (۲۰۰۱) اثرهای زیرکشنده *Btk* روی پروانه ابریشم‌باف ناجور *L. dispar* و پارازیتوئید آن را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که باکتری روی فراسنجه‌های زیستی آفت مؤثر، اما روی پارازیتوئید آن بی‌اثر است که بی‌خطر بودن این ماده زیستی روی دشمنان طبیعی را نشان می‌دهد. در این پژوهش نیز باکتری *Btk* نسبت به تیمار شاهد روی دگردیسی مرحله لاروی به شفیرگی و مرحله شفیرگی به حشره کامل تأثیرگذار بود و میزان دگردیسی هر دو مرحله را کاهش داد، اما نسبت به تیمار نیمارین اثر کمتری داشت.

با وجود کشندگی قابل‌توجه این باکتری روی لارو بال‌پولک‌داران، گزارش‌هایی از مقاومت به این عامل کنترل زیستی توسط بعضی پژوهشگران ارائه شده است (Xu et al., 2005; Tabashnik et al., 2004; Siqueira et al., 2004). بنابراین استفاده از ترکیبات گیاهی می‌تواند در تشدید اثر باکتری و کاهش مقاومت مؤثر باشد. البته اثر هم‌افزایی محصولات چریش بر *Btk* در بسیاری از تحقیقات به اثبات رسیده است (Alimohamadian et al., 2022; Konecka et al., 2019; Togbe et al., 2014; Singh et al., 2007). Nouri-Ganbalani و همکاران (۲۰۱۶) خاصیت هم‌افزایی باکتری *Btk* را در اختلاط با روغن دانه

دارند. استفاده از ترکیب عوامل کنترلی مورد استفاده در این پژوهش، که به صورت هم افزایی عمل می کنند، از استفاده آنها به صورت جداگانه کارآمدتر است. چنین روشی نه تنها موجب کاهش برگ زدایی درختان توسط آفت می شود، بلکه می تواند موجب کاهش غلظت مورد استفاده پاتوزن شود و متعاقب آن موجب کاهش احتمال مقاومت حشرات شود. این پژوهش در حمایت از توسعه استفاده از آفت کش های میکروبی و گیاهی علیه آفات جنگلی و باغی قابل توصیه است.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر عباس حسین زاده (عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد مهاباد)، به دلیل همکاری در انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می شود.

با نتایج ذکر شده مطابقت دارد. دلایلی مانند تورم سلول های پوششی معده و اختلال عملکرد این سلول ها تحت تأثیر محصولات بر پایه چریش، همچنین اثرهای دفعی و ضد تغذیه ای این محصولات می تواند موجب اثرهای سینرژیستی در کنترل های تلفیقی همانند استفاده توأم آن با عامل کنترل بیولوژیک مانند باکتری *Btk* شود (Ochieng *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2024). همچنین، اختلاط باکتری *Btk* با ترکیبات گیاهی موجب کاهش احتمال مقاومت آن به آفات می شود، در نتیجه تأثیر ترکیبات گیاهی بر آنزیم ها و میکروبیوتای معده و روده میزبان می تواند موجب بروز خاصیت سینرژیستی این ترکیبات با یکدیگر شود (Nouri-Ganbalani *et al.*, 2016).

با در نظر گرفتن اثرهای زیست محیطی آفت کش های شیمیایی و خطر مقاومت آفت ابریشم باف ناجور به این آفت کش ها، گزینه های کنترلی جایگزین اهمیت فراوانی

References

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Abedi, Z., Saber, M., Vojoudi, S., Mahdavi, V. and Parsaeyan, E., 2014. Acute, sublethal, and combination effects of Azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Science*, 14(1): 30-39.
- Adiroubane, D. and Raghuraman, K., 2008. Plant products and microbial formulation in the management of brinjal shoot and fruit borer, *Leucinodes orbonalis* (Guenee.). *Journal of Biopesticides*, 1: 124-129.
- Akhanaev, Y.B., Tomilova, O.G., Yaroslavtseva, O.N., Duisembekov, B.A., Kryukov, V.Y. and Glupov, V.V., 2017. Combined action of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* and avermectins on the larvae of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera, Chrysomelidae). *Entomological Review*, 97(2): 158-165.
- Ali, S., Zhang, C., Wang, Z., Wang, X., Wu, J., Cuthbertson, A.G.S., Shao, Z. and Qiu, B., 2017. Toxicological and biochemical basis of synergism between the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and the insecticide Matrine against *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Scientific Reports*, 7: 46558.
- Alimohamadian, M., Aramideh, Sh., Mirfakhraie, Sh. and Frozan, M., 2022. Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in combination with Neemarin and silica nanoparticles in the control of second instar larvae of sugar beet, *Spodoptera exigua* Hb. (Lep.: Noctuidae) in laboratory condition. *The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology*, 34(4): 148-163.
- Almeida, G.D., Zanoncio, J.C., Senthil-Nathan, S., Pratisoli, R., Polanczyk, R.A., Azevedo, D.O. and Serrão, J. E., 2014. Cytotoxicity in the midgut and fat body of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Geometridae) larvae exerted by neem seeds extract. *Invertebrate Survival Journal*, 11: 79-86.
- Amirfanak, V., Safavi, S.A. and Forouzan, M., 2023. Study on the life table parameters of the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (L.) (Homoptera: Aphididae) influenced by sublethal concentrations of the Matrine. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 45(4): 19-35.
- 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.
- Azimi, M., Aramideh, Sh., Mirfakhraie, Sh., Hosseinzadeh, A. and Michaud, J.P., 2024. Efficacy of the parasitoid wasp, *Habrobracon hebetor* in integrating with Matrine and *Bacillus thuringiensis* in the control of *Anagasta kuehniella*. Plant Pest Research, 13(4): 1-15.
- Benelli, G., Canale, A., Toniolo, C., Higuchi, A., Murugan, K., Pavela, R. and Nicoletti, M., 2017. Neem (*Azadirachta indica*): Towards the Ideal Insecticide?. Natural Product Research, 31: 369-386.
- Bezerra, D.G., de Andrade, I.R., Santos, H.L.V., Xavier, M.D.d.S., Fernandes, P.Í., Devilla, I.A., Nascimento, T.L., Borges, L.L., da Conceição, E.C. and Paula, J.A.M.d., 2021. *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) Microencapsulated Bioinsecticide: Spray Drying Technique Optimization, Characterization, in Vitro Release, and Degradation Kinetics. Powder Technology, 382: 144-161.
- Cheng, X., Ye, J., He, H., Liu, Z., Xu, C., Wu, B., Xiong, X., Shu, X., Jiang, X. and Qin, X., 2018. Synthesis, characterization and in vitro biological evaluation of two Matrine derivatives. Scientific Reports, 8(1): 15686.
- Cocco, A., Cossu, A.Q., Erre, P., Nieddu, G. and Luciano, P., 2010. Spatial analysis of gypsy moth populations in Sardinia using geostatistical and climate models. Agricultural and Forest Entomology, 12: 417-426.
- Crickmore, N., 2006. Beyond the spore—past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. Journal of Applied Microbiology, 101: 616-619.
- Dader, B., Aguirre, E., Caballero, P. and Medina, P., 2020. Synergy of lepidopteran nucleopolyhedroviruses AcMNPV and SpliNPV with insecticides. Insects, 11(5): 316.
- El-mageed, A.E.M.A. and Shalaby, S.E.M., 2011. Toxicity and biochemical impacts of some new insecticide mixtures on cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Plant Protection Science, 47: 166-175.
- Erb, S.L., Bouchier, R.S., Van Frankenhuyzen, K. and Smith, S.M., 2001. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* on *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and the tachinid parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). Environmental Entomology, 30(6): 1174-1181.
- Furlong, M.J. and Groden, E., 2001. Evaluation of synergistic interactions between the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine. Journal of Economic Entomology, 94(2): 344-356.
- Ghassemi-Kahrizeh, A. and Aramideh, Sh., 2014. Study on the synergistic effect of Henna in enhancement of pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner on third and fourth instars larvae of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col.: Chrysomelidae). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(12): 1497-1507.
- Gödel, B., Lemic, D. and Bažok, R., 2020. Alternatives to synthetic insecticides in the control of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) and their environmental benefits. Agriculture, 10-611.
- Helson, B.V., Barry Lyons, D., Wanner, K.W. and Taylor, A.S., 2001. Control of conifer defoliators with neem-based systemic bioinsecticides using a novel injection device. The Canadian Entomologist, 133: 729-744.
- Hesketh, H. and Hails, R.S., 2015. *Bacillus thuringiensis* impacts on primary and secondary baculovirus transmission dynamics in Lepidoptera. Journal of Invertebrate Pathology, 132: 171-181.
- Hlasny, T., Trombik, J., Holuša, J., Lukášová, K., Grendár, M., Turčáni, M., Zúbrik, M., Tabaković-Tošić, M., Hirka, A., Buksha, I. and Modlinger, R., 2016. Multi-decade patterns of gypsy moth fluctuations in the Carpathian Mountains and options for outbreak forecasting. Journal of Pest Science, 89: 413-425.
- Hosseinzadeh, A. and Aramideh, S., 2016. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and Spinosad on three larval stages of beet armyworms *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lep: Noctuidae). Journal of Entomology and Zoology Studies, 4(5): 375-379.
- Hwang, H.S., Acharya, R., Lucas, M.D.C., Sharma, S.R., Lee, Y.S. and Lee, K.Y., 2023. Effects of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus and *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on different larval instars of *Lymantria dispar asiatica*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 113(1): e22002.
- Karimzadeh Esfahani, J., 2014. Investigating the efficiency of the new insecticide Rui Agro (Matrine) in the control of cabbage moth. Agricultural Research, Education and Extension Organization, 20 (In Persian).
- Konecka, E., Kaznowski, A. and Tomkowiak, D., 2019. Insecticidal activity of mixtures of *Bacillus thuringiensis* crystals with plant oils of *Sinapis alba* and *Azadirachta indica*. Annals of Applied Biology, 174(3): 364-371.
- Konecka, E., Kaznowski, A., Grzesiek, W., Nowicki, P., Czarniewska, E. and Baranek, J., 2020. Synergistic interaction between carvacrol and *Bacillus thuringiensis* crystalline proteins against *Cydia pomonella* and *Spodoptera exigua*.

- BioControl, 65: 447-460.
- Kouhjeni Gorji, M., 2023. Investigation of the efficacy of three botanical insecticides, Neem Azal®, Ruy Agro®, and Bio1®, on the boxwood moth *Cydalima perspectalis* Walker (Lep.: Crambidae). Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 21(1): 187-199.
- Kryukov, V.Y., Khodyrev, V.P., Yaroslavtseva, O.N., Kamenova, A.S., Duisembekov, B.A. and Glupov, V.V., 2009. Synergistic action of entomopathogenic hyphomycetes and the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. morrisoni in the infection of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. Applied Biochemistry and Microbiology, 45: 511-516.
- Kryukov, V.Y., Tomilova, O.G., Luzina, O.A., Yaroslavtseva, O.N., Akhanev, Y.B., Tyurin, M.V., Duisembekov, B.A., Salakhutdinov, N.F. and Glupov, V.V., 2018. Effects of fluorine-containing usnic acid and fungus *Beauveria bassiana* on the survival and immune-physiological reactions of Colorado potato beetle larvae. Pest Management Science, 74: 598-606.
- Kumar, P., Poehling, H.M. and Borgemeister, C., 2005. Effects of different application methods of Azadirachtin against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) on tomato plants. Journal of Applied Entomology, 129: 489-497.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M. and Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. Journal of Invertebrate Pathology, 132: 1-41.
- Lengai, G.M.W., Muthomi, J.W. and Mbega, E.R., 2020. Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. Scientific African, 7: 1-13.
- Lentini, A., Mannu, R., Cocco, A., Ruio, P.A., Carboneschi, A. and Luciano, P., 2019. Long-term monitoring and microbiological control programs against lepidopteran defoliators in Sardinian cork oak forests (Italy). Annals of Silvicultural Research, 45(1): 21-30.
- Liebhold, A. M., Elkinton, J. S., Zhou, C., Hohn, M. E., Rossi, R. E., Boettner, G. H., ... and McManus, M. L., 1995. Regional correlation of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) defoliation with counts of egg masses, pupae, and male moths. Environmental Entomology, 24(2): 193-203.
- Mannu, R., Cocco, A., Luciano, P. and Lentini, A., 2020. Influence of *Bacillus thuringiensis* application timing on population dynamics of gypsy moth in Mediterranean cork oak forests. Pest Management Science, 76(3): 1103-1111.
- Martemyanov, V.V., Bykov, R.A., Demenkova, M., Gninenko, Y., Romancev, S., Bolonin, I., Mazunin, I., Belousova, I.A., Akhanev, Y.B., Pavlushin, S.V., Krasnoperova, P. and Ilinsky, Y., 2019. Genetic evidence of broad spreading of *Lymantria dispar* in the West Siberian Plain. Plos One, 14(8): e0220954.
- Massaguni, R. and Latip, S.N.H.M., 2012. Neem crude extract as potential biopesticide for controlling golden apple snail, *Pomacea canaliculata*. In: Soundararajan, R. P., (Ed.). Advances in Chemical and Botanical Pesticides. In Tech, Rijeka, Croatia, 233-254.
- Medo, I. and Marcic, D., 2013. The effects of Kingbo biopesticide on *Tetranychus urticae* Koch female adults. Pesticides and Phytomedicine (Belgrade), 28: 195-202.
- Mhalla, D., Farhat-Touzri, D.B., Tounsi, S. and Trigui, M., 2018. Combinational effect of *Rumex tingitanus* (Polygonaceae) hexane extract and *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). BioMed Research International, 1: 3895834.
- Mohamadi, D., Evazian Kari, N. and Sharifi Azar, Z., 2020. Enhancing Efficiency of *Bacillus thuringiensis* by Leaf Extract of *Cupressus arizonica* against *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae). Journal of Applied Research in Plant Protection, 9(1): 89-105.
- Moradi Afrapoli, F., Mohammadi Sharif, M., Barimani Varandi, H. and Shayanmehr, M., 2022. Susceptibility of *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae to some reduced-risk insecticides in laboratory bioassays. Journal of Forest Science, 68(7): 253-262.
- Nikakhtar, S., Aramideh, S., Mirfakhraie, S. and Frouzan, M., 2022. Effect of three commercial formulations includes Nimbecidine, Neemazal T/S and Kofa from plant compound of neem on the biological stages of *Trialeurodes vaporariorum* (Hem.: Aleyrodidae) and its parasitoid, *Encarsia formosa*. Plant Pest Research, 12(1): 59-72.
- Nouri-Ganbalani, G., Borzoui, E., Abdolmaleki, A., Abedi, Z. and Kamita, S. G., 2016. Individual and combined effects of *Bacillus thuringiensis* and Azadirachtin on *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Insect Science, 16(1): 95.
- Ochieng, T.A., Akutse, K.S., Ajene, I.J., Kilalo, D.C., Muiru, M., and Khamis, F.M., 2024. Interactions between *Bacillus thuringiensis* and selected plant extracts for sustainable management of *Phthorimaema absoluta*. Scientific Reports, 14(1): 9299.
- Ojha, P.K., Kumari, R. and Chaudhary, R.S., 2017. Impact of certain bio-pesticides on larval mortality

- of *Helicoverpa armigera* Hübner (Noctuidae: Lepidoptera) in chickpea. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(2): 1083-1091.
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Mcfield, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., van der Sluijs, J.P., van Dyck, H. and Wiemers, M., 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 68-102.
- Pisa, L., Goulson, D., Yang, E.C., Gibbons, D., Sanchez-Bayo, F., Mitchell, E., Aebi, A., van der Sluijs, J., MacQuarrie, C.J.K., Giorio, C., Long, E.Y., McField, M., van Lexmond, M.B. and Bonmatin, J.M., 2017. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*, 28: 1749-11797.
- Rahman, S., Biswas, S.K., Barman, N.C. and Ferdus, T., 2016. Plant extract as selective Pesticide for integrated pest management. *Biotechnological Research*, 2(1): 6-10.
- Robertson, J.L., Russell, R.M., Preisler, H.K. and Savin, N.E., 2007. *Bioassays with arthropods*. Boca Raton, CRC Press, 199p.
- Ruiu, L., Mannu, R., Falchi, G., Braggio, A. and Luciano, P., 2013. Evaluation of different *Bacillus thuringiensis* sv *kurstaki* formulations against *Lymantria dispar* and *Malacosoma neustria* larvae infesting *Quercus suber* trees. *Redia*, 96: 27-31.
- Ruiu, L., Ruiu, P.A. and Lentini, A., 2021. Comparative efficacy trials with two different *Bacillus thuringiensis* Serovar *kurstaki* strains against gypsy moth in mediterranean cork oak forests. *Forests*, 12(5): 602.
- Singh, G., Rup, P.J. and Koul, O., 2007. Acute, sublethal and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* toxins on *Helicoverpa armigera* (Lep.: Noctuidae) larvae. *Bulletin of Entomological Research*, 97(4): 351-357.
- Siqueira, H.A.A., Moellenbeck, D., Spencer, T. and Siegfried, B.D., 2004. Cross-resistance of Cry1Ab-selected *Ostrinia nubilalis* (Lep.: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Journal of Economic Entomology*, 97: 1049-1057.
- Souto, A.L., Sylvestre, M., Tölke, E.D., Tavares, J.F., Barbosa-Filho, J.M. and Cebrián-Torrejón, G., 2021. Plant-derived pesticides as an alternative to pest management and sustainable agricultural production: Prospects, applications and challenges. *Molecules*, 26(16): 4835.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Unnithan, D.C., Carriere, Y., Dennehy, T.J. and Morin, S., 2004. Shared genetic basis of resistance to B.T. toxin Cry1Ac in independent strains of pink bollworm. *Journal of Economic Entomology*, 97: 721-726.
- Taheri Sarhozaki, M., Aramideh, S., Akbarian, J. and Pirsai, S., 2020. The effect of zinc oxide nanoparticles, kaolin powder and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in combination with Neemarin® against *Bemisia tabaci* and pupae of *Eretmocerus mundus* under field conditions. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 43(3): 1-19.
- Tavakoli, M., Hosseini-Chegeni, A. and Khaghaninia, S., 2018. The first report of Gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) outbreak from Northern Zagros forests and its identification using COI gene in Iran. *Iranian Journal of Forest and Range Protection Research*, 16(2): 207-218.
- Tiberi, R., Branco, M., Bracalini, M., Croci, F. and Panzavolta, T., 2016. Cork oak pests: a review of insect damage and management. *Annals of Forest Science*, 73: 219-232.
- Togbe, C.E., Zannou, E., Gbehounou, G. and Kossou, H.A., 2014. BBC: Biological based combinations- a concept way forward in sustainable pest management. *International Journal of Tropical Insect Science*, 34: 248-259.
- Woodward, S.L. and Quinn, J.A., 2011. *Encyclopedia of invasive species: from Africanized honey bees to zebra mussels*. Greenwood, California USA, 764p.
- Wu, J., Yu, X., Wang, X., Tang, L. and Ali, S., 2019. Matrine enhances the pathogenicity of *Beauveria brongniartii* against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Frontiers in Microbiology*, 10: 1812-1825.
- Xu, X., Yu, L. and Wu, Y., 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 948-954.
- Yaroslavtseva, O.N., Dubovskiy, I.M., Khodyrev, V.P., Duisembekov, B.A., Kryukov, V.Y. and Glupov, V.V., 2017. Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* on Colorado potato beetle larvae. *Journal of Insect Physiology*, 96: 14-20.
- Zanardi, O.Z., Ribeiro, L.P., Ansante, T.F., Santos, M.S., Bordini, G.P., Yamamoto, P.T. and Vendramim, J.D., 2015. Bioactivity of a Matrine-based biopesticide against four pest species of agricultural importance. *Crop Protection*, 67: 160-167.