

تأثیر اسید سالیسیلیک جداشده از سه گونه بید *Salix sp.* در اختلاط با باکتری *Bacillus thuringiensis B.*
روی لاروهای سن سوم و چهارم پروانه *Tortrix viridana L.*

سمانه اکبری^۱ و شهرام آرمیده^{۲*}

۱- دکتری حشره شناسی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. (sama8akbari@gmail.com)

۲- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. (sh.aramideh@urmia.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۸

چکیده

مقدمه و هدف: پروانه جوانه‌خوار بلوط یکی از مهم‌ترین آفات جنگلی قرنطینه داخلی است و لاروهای آن با تغذیه از جوانه‌های زایای درختان و با تغذیه از برگ خسارت سنگینی به درختان بلوط وارد می‌کنند. با توجه به اثرات تخریبی و زیان‌بار سموم شیمیایی، استفاده از روش‌های جایگزین به‌ویژه مهار زیستی با استفاده از دشمنان طبیعی و ترکیبات گیاهی به‌عنوان راهکار مدیریت تلفیقی آفات مورد استفاده قرار گرفته است. از میان عوامل زیستی بیمارگر حشرات باکتری *Bacillus thuringiensis B.* برای داشتن مزیت‌های فراوان مانند اثر اختصاصی روی لارو بال‌پولکداران، تاثیر ناچیز روی محیط زیست و جانداران غیرهدف و همچنین سهولت تلفیق با سایر روش‌های کنترل، جایگاه ویژه‌ای در مدیریت کنترل آفات کشاورزی و جنگلی دارد. بررسی‌ها نشان داده که این باکتری در اختلاط با تانن‌های گیاهی خاصیت سینرژیستی نشان می‌دهد. اسیدهای عالی نظیر اسیدتانیک در اختلاط با باکتری *B. thuringiensis* می‌تواند به‌عنوان سینرژیست در کنترل لارو آفات مختلف مورد استفاده قرار گیرد. گونه‌های مختلف تیره بید *Salicaceae* به واسطه داشتن سالیسین در پوست تنه، دارای خواص دارویی و صنعتی هستند. سالیسین به‌عنوان یک تانن گیاهی می‌تواند در اختلاط با باکتری *B. thuringiensis* در کنترل جوانه‌خوار بلوط مؤثر باشد. از طرفی سالیسیلیک اسید به‌علت ترکیب فنولی، یکی از عوامل مهم رشد در گیاهان است. این ماده به‌عنوان یک متابولیت ثانویه در گیاهان تولید می‌شود. نقش اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک ترکیب مهم در واکنش گیاه به تنش‌های غیرزیستی به اثبات رسیده است. سالیسیلیک اسید قابل حل در آب بوده و یک ترکیب آنتی‌اکسیدان است و نقش مهمی در پاسخ گیاه به تنش‌های غیرزنده مانند خشکی، سرما، فلزات سنگین، گرما و تنش اسمزی دارد. به‌نظر می‌رسد پاسخ‌های متابولیکی را تقویت کرده، بر شاخص‌های فتوسنتزی و روابط آبی گیاه نیز اثر می‌گذارد. از این‌رو،

این پژوهش برای استحصال و اندازه‌گیری ماده سالیسیلیک اسید در بید مجنون، بید سفید و بید بز و تاثیر آن به همراه باکتری *B. thuringiensis* روی آفت جوانه‌خوار بلوط انجام شد.

مواد و روش: پوست بید مجنون، بید سفید و بید بز در فصل بهار و تابستان جمع‌آوری، خشک و پودر شد؛ عصاره‌گیری نمونه‌ها توسط دستگاه سوکسله و خالص‌سازی عصاره توسط دستگاه روتاری انجام شد. استخراج اسید سالیسیلیک طبق استاندارد TAPPI، با استفاده از حلال اتانول انجام شد. سپس مقادیر کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) باکتری *B. thuringiensis* که در آزمایشات زیست‌سنجی به‌دست آمده را با غلظت‌های یک، سه، پنج، هفت و نه درصد اسید سالیسیلیک گونه‌های بید ترکیب و روی لاروهای سن سه و چهار *T. viridana* جمع‌آوری شده از جنگل‌های پردانان پیرانشهر کار رفت. در این آزمایش بعد از ۴۸ ساعت حشرات تیمار شده با نزدیک کردن سوزن داغ به پاها و شاخک‌هایشان اگر حرکتی مشاهده نمی‌شد، مرده تلقی شدند. در این پژوهش برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کل مواد استخراجی پوست درختان بید مجنون، بید سفید و بید بز به ترتیب ۲۳/۵۵، ۳۶/۲۵ و ۲۰/۷۵ درصد وزن پوست آنها است. مقدار سالیسیلیک اسید در مواد استخراجی پوست بید مجنون، بید سفید و بید بز به ترتیب ۱۵/۲۰، ۲۰/۱۰ و ۱۴/۷۰ به‌دست آمد. مقدار کشندگی (LC_{50}) باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای سن سوم و چهارم جوانه‌خوار بلوط ۴۸ ساعت بعد از تیمار به ترتیب ۶۵۹/۷۷ و ۷۴۲/۴۵ ppm بود. درصد مرگ و میر لاروهای سن سه و چهار جوانه‌خوار بلوط در اختلاط با یک، سه، پنج، هفت و نه درصد اسید سالیسیلیک مستخرج از گونه بید مجنون، بید سفید و بید بز همراه با LC_{50} باکتری دارای اختلاف معنی‌داری بودند. درصدهای بالای اسید سالیسیلیک سبب افزایش مرگ و میر لارو سن سوم جوانه‌خوار در هر سه گونه بید شد. نتایج اختلاط اسید سالیسیلیک استخراجی با غلظت LC_{50} باکتری *B. thuringiensis* در تمام غلظت‌ها روی لاروهای سن سوم نشان داد ترکیب اسید سالیسیلیک مستخرج از بید سفید با باکتری *B. thuringiensis* دارای بیشترین مقدار کشندگی نسبت به دو تیمار دیگر بود و در لاروهای سن چهارم اختلاط اسید سالیسیلیک مستخرج از بید سفید با غلظت LC_{50} باکتری در سه غلظت پنج، هفت و نه درصد از دو تیمار دیگر بیشتر بود.

نتیجه‌گیری کلی: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که باکتری *B. thuringiensis* اثر حشره‌کشی روی لاروهای پروانه *T. viridana* دارد و در اختلاط با اسید سالیسیلیک استخراج شده از سه گونه بید مجنون، بید سفید و بید بز اثرات کنترل‌کننده بهتری در مرگ و میر این آفت دارا است که بهترین اثر بخشی آن در اسید سالیسیلیک مستخرج از بید سفید مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصل از این بررسی می‌توان از پوست گونه‌های مختلف بید به‌ویژه بید سفید در استخراج اسید سالیسیلیک استفاده و آن را در ترکیب با باکتری *B. thuringiensis* در مدیریت این آفت مهم جنگلی به‌کار برد.

واژه‌های کلیدی: اسید سالیسیلیک، درصد کشندگی، بید، کنترل تلفیقی، کنترل زیستی.

سبب شده راهکارهای مدیریت تلفیقی آفات مطرح و مورد تأکید قرار گیرد (Akbari and Aramideh, 2022). استفاده از عوامل بیماری‌زای حشرات به‌ویژه باکتری *Bacillus thuringiensis subsp. kurestaki* که از میکروارگانسیم‌های بیماری‌زای حشرات و مؤثرترین ماده زیستی برای از بین بردن سریع آفات حساس به این باکتری است؛ به‌ویژه در شرایط جنگلی روی بال-پولکلداران مورد توجه قرار گرفته است (Aramideh, 2016; Fuentealba et al., 2019). در بررسی‌های به‌عمل آمده روی این آفت مشخص شد که با محلول-پاشی‌های میدانی توسط سم میکروبی *B. thuringiensis* می‌توان کنترل رضایت‌بخشی را ایجاد کرد (Pinheiro and Valicente, 2021).

در بررسی کنترل پروانه برگ‌خوار *Ennomos quercinaria* (Hafngel) یکی از آفات مهم جنگلی، غلظت‌های مختلف باکتری *B. thuringiensis* بر علیه لاروهای سن یک و دو این آفت استفاده شد و نتایج نشان داد این باکتری پتانسیل بالایی در کنترل این آفت دارد (Vatandoost et al., 2018). مشتقات سویه HD1 از باکتری *B. thuringiensis subsp. kustaki* به‌طور گسترده‌ای برای کنترل آفات جنگلی مانند *Lymantria dispar* L. و *Choristoneura fumiferana Clemens* و *Thaumetopoea pityocampa* Denis & Gui-ming et al. (2001). در پژوهش دیگری مشخص شد تمام محصولات مبتنی بر باکتری *B. thuringiensis kurstaki* کنترل قابل توجهی روی لارو *L. dispar* داشته است (Olivieri et al., 2021). استفاده از باکتری *B. thuringiensis subsp. kurstaki* یکی از مؤثرترین روش‌ها برای کاهش تراکم جمعیت لاروهای تعدادی از بال‌پولکلداران محسوب می‌شود (Ruiu et al., 2013). در سال‌های اخیر، ترکیبات سنتتیک و هورمون‌های

جنگل‌ها و مراتع از مهم‌ترین منابع طبیعی تجدیدشونده هستند که نقش اساسی در تامین نیازمندی‌های انسان دارند. جنگل‌ها با گونه‌های با ارزش جنگلی از نظر تولید انواع چوب‌آلات صنعتی، دارای اهمیت فراوان هستند و سهم بسزایی در اقتصاد ملی و رونق صنعت دارند. بنابراین لزوم حفظ و حمایت از این منابع عظیم ملی و سرمایه‌های خدادادی بسیار ضروری است (Kooch et al., 2010; Draganova et al., 2013; Vatandoost et al., 2018; Aghazadeh et al., 2023). پروانه جوانه‌خوار بلوط *Tortrix viridana* L. یکی از مهم‌ترین آفات درختان بلوط در ایران است (Zargarani et al., 2015). لاروهای این آفت با تغذیه از جوانه‌ها و برگ‌های بلوط خسارت سنگینی را به این درختان وارد می‌کنند. درحال حاضر این آفت به شدت در استان‌های آذربایجان غربی، کهگیلویه و بویراحمد، کردستان، لرستان و کرمانشاه شایع شده است. جوانه‌خوار بلوط (*T. viridana*) از تعداد محدودی گیاه تغذیه می‌کند و دامنه میزبانی آن محدود به جنس بلوط است. لاروهای این آفت با تغذیه از جوانه‌ها و برگ‌های درختان بلوط خسارت سنگینی را بر درختان وارد می‌کند (Alehosseini et al., 2013). این آفت دارای یک نسل در سال بوده و زمستان‌گذرانی آن به‌صورت تخم است. خسارت آن هم‌زمان با خروج لاروهای نئونات از اواخر اسفند ماه شروع شده و سنین اول و دوم لاروی عملاً در داخل جوانه‌ها زندگی می‌کنند. لاروهای سن سوم پس از خروج از جوانه‌ها شروع به تغذیه از برگ‌های جوان کرده و در ضمن تغذیه، برگ‌ها را تا کرده و تار می‌تند (Zargarani et al., 2015). اثرات تخریبی و زیان بار سموم شیمیایی از یک طرف و موفقیت‌ها و تحولات مربوط به مدیریت مبارزه زیستی با آفات از طرف دیگر

Bacillus caprea در اختلاط با باکتری *Tortrix thuringiensis* روی جوانه‌خوار بلوط *viridana* L. مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

در این بررسی از لاروهای سن سه و چهار جوانه‌خوار بلوط (*T. viridana*) جمع‌آوری شده از جنگل‌های پردانان پیرانشهر استفاده شد. تخم‌های این آفت در سال ۱۴۰۱ از جنگل‌های مذکور جمع‌آوری و برای پرورش به آزمایشگاه منتقل شدند. این آفت توسط استاد رده-بندی گروه حشره‌شناسی (جناب آقای دکتر کریم‌پور) شناسایی و تایید شد. برای انجام آزمایش‌های زیست-سنجی در آزمایشگاه لاروهای *T. viridana* در ظروف پلاستیکی درب‌دار به ابعاد ۱۵×۱۵×۱۰ سانتی‌متر (با امکان تهویه مناسب) روی برگ‌های تازه بلوط در شرایط دمایی ۲۵±۲ درجه سلسیوس، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده شدند. سنین لاروی بر اساس تجربه و اندازه‌گیری کپسول سر پوستک لاروی به کمک کولیس تفکیک شدند. برای حفظ کلنی، برگ‌ها به طور روزانه جایگزین شدند.

استخراج اسید سالیسیلیک

پوست تنه بیدهای مجنون (*S. babylonica*)، بید سفید (*S. alba*) و بید بز (*S. caprea*) در فصل بهار جمع-آوری و سپس در محلی تاریک کاملاً خشک و پودر شدند و جداگانه به مقدار ۵۰ گرم در داخل کاغذ صافی ریخته شد و به وسیله نخ محکم بسته شد؛ به طوری که نمونه از کاغذ صافی بیرون ریخته نشود و داخل کارتوش سوکسوله قرار داده شد و مقدار ۳۰۰ میلی لیتر حلال اتانول (مرک) داخل بالن ریخته شد. برای خنک کردن کندانسور، آب خنک در اطراف آن به جریان درآمد. وقتی حلال شروع به جوشیدن کرد بخارها در

زیادی مانند بتا آمینوبوتریک اسید، جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید و متیل سالیسیلیک و غیره برای کنترل آفات و بیماری‌ها به کار برده شده است (Panahandeh and Pahlavan, 2022). پوست، برگ و جوانه‌های درختان خانواده بیدیان Salicaceae حاوی گلیکوزیدهای فنلی مشتقات سالیسیلات‌ها مانند سالیسین و پوپولین (بنزیل سالیسین) هستند. در پژوهشی، بتا آمینو بوتریک اسید و سالیسیلیک اسید اثرات ممانعت‌کنندگی روی رشد و تکثیر شته سبز هلو داشته‌اند و با افزایش طول سیکل زندگی شته‌ها سبب کم‌شدن جمعیت شته شدند (Nayebzadeh et al., 2016). اسید تانیک و تانن‌های گیاهی دیگر نیز سبب تاخیر در رشد و نمو لاروهای آفت می‌شوند و می‌توانند به‌عنوان سینرژیست با باکتری به کار روند (Khanizad and Safaralizadeh, 2002). همچنین بررسی‌ها نشان داده است اسید هیدروکسی سینامیک همراه با باکتری *B. thuringiensis* روی کنترل تغذیه و تخم‌ریزی سرخرطومی سیب‌زمینی تاثیر سینرژیستی داشت (Anyanga et al., 2020).

بررسی‌ها نشان داد که تانیک اسید در افزایش میزان مرگ و میر و کاهش تغذیه در لاروهای *Hyphantria cunea* تاثیر معنی‌داری دارد (Tan et al., 2022). همچنین بررسی‌ها نشان دادند که غلظت‌های ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید سبب القا مقاومت در گندم علیه شته روسی گندم می‌شود (Dinary et al., 2015). بر اساس پژوهشی که روی گیاه گندم انجام شده است؛ بتا آمینوبوتریک اسید می‌تواند مقاومت به شته *Sitobion avenae* F. را در گندم القا کند (Cao et al., 2014).

از این‌رو، در همین راستا در این بررسی تاثیر اسید سالیسیلیک جداشده از پوست بید مجنون (*Salix babylonica*)، بید سفید (*S. alba*) و بید بز (*S.*

کارتوش ایجاد شده و بعد چهار مرحله تقطیر پایان می- یابد. پس از عصاره گیری نمونه ها توسط دستگاه روتاری موجود در آزمایشگاه دانشگاه ارومیه تغلیظ شد و ترکیب نهایی حاصله در آزمایشات به کار رفت.

برآورد بازده کلی استخراج

برای تعیین درصد مقدار مواد استخراجی محلول در اتانول، از روش استاندارد 88-T2004om- آیین نامه Technical Association of the Pulp and) TAPPI (Paper Industry استفاده شد.

روش اندازه گیری مقدار سالیسین

برای ارزیابی مقدار اسید سالیسیلیک موجود در بافت- های نمونه های بید مجنون، بید سفید و بید بز از روش اندازه گیری سالیسین استفاده شد. در این آزمایش مقدار سالیسین موجود در محلول استخراجی با استفاده (Lamberts Beer ۱۱) از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه- گیری شده است. طبق این قانون بین غلظت یک ماده و بیشینه جذب خوانده شده در دستگاه اسپکتروفتومتر رابطه ای وجود دارد. ماده سالیسیلیک اسید با کلروفوریک، کمپلکس های رنگی ایجاد می کند که بیشینه جذب این کمپلکس رنگی در طول موج ۵۴۰ نانومتر به دست آمده است. برای آزمایش محلول یک درصد سالیسیلیک اسید و کلروفوریک در آب مقطر به طور جداگانه تهیه شد. برای این منظور مقدار ۰/۱ گرم از مواد استخراجی هر یک از درختان بید ۰/۱ گرم کلروفوریک به طور جداگانه در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. پس از مخلوط کردن پنج میلی لیتر از محلول استخراجی با پنج میلی لیتر محلول کلروفوریک، حجم نمونه با آب مقطر به ۲۵۰ میلی لیتر رسانده شد و رنگ محلول در اثر تشکیل کمپلکس به آبی ارغوانی تبدیل شده که جذب آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. سپس مقدار جذب خوانده شده را در معادله رگرسیون به دست آمده، قرار داده تا مقدار سالیسین

محلول به دست آید. مقدار ۲۰ میلی لیتر از محلول استخراجی را از داخل یک ستون Al_2O_3 به مدت ۱۵ ساعت عبور داده شد تا ترکیبات کلروفیلی و دیگر مشتقات حذف شود.

پاتوژن مورد بررسی

برای انجام این بررسی از پودر تجاری ساخت شرکت بیوشیمی-اسپانیا (Belthirul 16SC-Probellet) با 3×10^{11} IU/mg و 8×10^4 CFU/Kg که یک حشره کش زیستی مبتنی بر سوش *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* است، استفاده شد.

زیست سنجی

تعیین کشندگی باکتری (LC_{50})

به دلیل ماهیت حشره کشی باکتری که از طریق گوارشی مؤثر است؛ آزمون های زیست سنجی به روش غوطه ور کردن برگ درختان بلوط (*Quercus infectoria G.*) Olivier) انجام شد. برای ارزیابی و محاسبه LC_{50} باکتری آزمایش های مقدماتی شامل تأثیر پنج غلظت از باکتری به همراه تیمار شاهد برای تعیین غلظت های کشنده ۸۰-۲۰ درصد روی لارو سن سوم و چهارم جوانه خوار بلوط (*T. viridana*) جداگانه انجام شد. سپس سه غلظت دیگر به روش لگاریتمی محاسبه شد. غلظت های مختلف تهیه و خوب به هم زده شد و برای پخش یکنواخت محلول ها در سطح برگ ها، مقدار یک درصد از توئین-۲۰ که دارای خاصیت پخش کنندگی و چسبندگی است، استفاده شد. پس از آلوده سازی، برگ ها در دمای آزمایشگاه خشک شد. در تیمار شاهد از آب مقطر به همراه یک درصد توئین -۲۰ استفاده شد. پس از تبخیر آب از سطح برگ ها، در هر تیمار ۶۰ عدد لارو سن سوم و چهارم به طور جداگانه روی برگ ها به آرامی با قلم موی نرم قرار گرفتند. برای تبادل هوای درون ظروف، درب آنها با توری مسدود شد. تلفات لاروها پس از ۴۸ ساعت شمارش شد. لاروهای مرده با زدن

تجزیه تحلیل آماری

برای محاسبه مقادیر LC_{50} باکتری روی لاروهای سن سوم و چهارم این آفت داده‌های حاصل از مرگ و میر لاروها تجزیه پروبیت شد. همچنین تاثیر اختلاط باکتری با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک مستخرج از سه گونه بید به روش تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی و در سطح احتمال ($P < 0.05$) انجام شد. برای تجزیه‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

به‌طورکلی نتایج این بررسی نشان می‌دهد که مقدار سالیسیلیک اسید در گونه‌های مختلف خانواده بید در ایران متفاوت است. علاوه بر سالیسیلیک اسید ترکیب‌های دیگری نیز در پوست آنها وجود دارد. بیشترین درصد مواد استخراجی مربوط به پوست درخت بیدسفید ۳۶/۲۵ درصد است و کمترین مقدار مربوط به بید بز با ۲۰/۷۵ درصد است.

سوزن داغ به سر آنها ثبت شد. به این نحو که در صورت تحرک، لارو زنده و در صورت عدم واکنش به سوزن داغ و تغییر در رنگ بدن، مرده محسوب شدند. در این پژوهش برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

تعیین درصد کشندگی اسید سالیسیلیک همراه با باکتری *T. viridana* در

برای انجام این مرحله از آزمایشات مقادیر یک، سه، پنج، هفت و نه درصد از اسید سالیسیلیک به دست آمده از بید مجنون، بید سفید و بید بز هر کدام جداگانه به همراه LC_{50} باکتری *B. thuringiensis* و ۰/۱ درصد توپین-۲۰ مخلوط شدند و با روش غوطه‌وری برگ‌های بلوط در تیمارهای ذکر شده انجام شد. در تیمار شاهد از LC_{50} باکتری *B. thuringiensis* و ۰/۱ درصد توپین-۲۰ استفاده شد. بعد از خشک شدن برگ‌ها در هر تیمار ۶۰ عدد لارو سن سوم و چهارم *T. viridana* روی برگ‌ها قرار گرفتند و در ظروف پلاستیکی با تهویه مناسب نگهداری شدند. در این آزمایش، بعد از ۴۸ ساعت حشراتی که با نزدیک کردن سوزن داغ به بدنشان حرکتی نمی‌کردند، مرده تلقی شدند. در این پژوهش برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

جدول ۱- میانگین کل ماده و سالیسیک اسید استخراجی از بید مجنون، بید سفید و بید بز

Table 1. The mean of the total substance and salicylic acid extracts from *Salix bubyronica*, *S. alba* and *S. caprea*

درصد سالیسیک اسید Percentage of salicylic acid	درصد مواد استخراجی Percentage of extract materials	اندام درخت Tree parts	گونه‌های بیدیان Salix species
15.20	23.55	پوست Skin	<i>Salix bubyronica</i>
20.10	36.25	پوست Skin	<i>Salix alba</i>
14.70	20.75	پوست Skin	<i>Salix caprea</i>

شاخص LC_{50} باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای سن سوم و چهارم *T. viridana* ۴۸ ساعت بعد از تیمار

تعیین ۵۰ درصد کشندگی (LC_{50}) باکتری *B. thuringiensis*

در جدول ۲ نشان داده شده است. مقدار کشندگی LC_{50} در لارو سن سوم و لارو سن چهارم *T. viridana* به ترتیب ۶۵۹/۷۷ و ۷۴۲/۴۵ ppm بود.

جدول ۲- تجزیه پروبیت حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus thuringiensis* بعد از ۴۸ ساعت روی لاروهای

سن سوم و چهارم *Tortrix viridana*

Table 2. Probit analyzes different concentrations of *Bacillus thuringiensis* after 48 hours on 3st and 4st larva of *Tortrix viridana*

LC ₉₀ (CLs) *	LC ₅₀ (CLs) *	احتمال p	عرض از مبدا Intercept (+5)	کای اسکور (درجه آزادی) χ^2 (df)	شیب خط ± خطای استاندارد Slope±SE	سنین لاروی Larval stage
4000.08 (1556.51- 512124.14)	659.77 (51.41-1846.65)	0.002	0.384	15.10 (3)	1.63±0.19	لارو سن سه 3 st instar larva
3317.42 (1594.57- 30717.22)	742.45 (124.78- 1518.22)	0.003	-0.659	13.80(3)	1.97±0.22	لارو سن چهار 4 st instar larva

*پی پی ام (CLs = محدوده اطمینان)

* Ppm, CLs= Confidence limits

پنج، هفت و نه درصد اسید سالیسیلیک مستخرج از گونه بید مجنون، بید سفید و بید بز همراه با LC_{50} باکتری *B. thuringiensis* به ترتیب با شرایط $(P < 0.0001)$ و $(F_{6,14} = 458/97; P < 0.0001)$ ، $(F_{6,14} = 346/64; P < 0.0001)$ و $(F_{6,14} = 99/68; P < 0.0001)$ دارای اختلاف معنی‌داری بودند. درصدهای بالای اسید سالیسیلیک سبب افزایش مرگ و میر لارو سن سوم جوانه خوار در هر سه گونه بید شد.

اثر ترکیب باکتری با غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک روی *T. viridana* لاروهای سن سوم *T. viridana* تجزیه واریانس مرگ و میر تجمعی لارو سن سوم جوانه‌خوار بلوط (*T. viridana*) با غلظت‌های یک، سه، پنج، هفت و نه درصد توسط اسید سالیسیلیک مستخرج از سه گونه بید مجنون، بید سفید و بید بز در ترکیب با باکتری *B. thuringiensis* بعد از ۴۸ ساعت در جدول ۳ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که درصد مرگ و میر لارو سن سه *T. viridana* در تیمارهای یک، سه،

جدول ۳- مقایسه درصد مرگ و میر توسط اسید سالیسیلیک مستخرج از سه گونه بید مجنون، بید سفید و بید بز در ترکیب با باکتری *B. thuringiensis* روی لارو سن سوم جوانه خوار بلوط

Table 3. Comparison of mortality rates by salicylic acid extracted from *Salix bubyronica*, *S. alba* and *S. caprea* in combination with *Bacillus thuringiensis* on *Tortrix viridana*

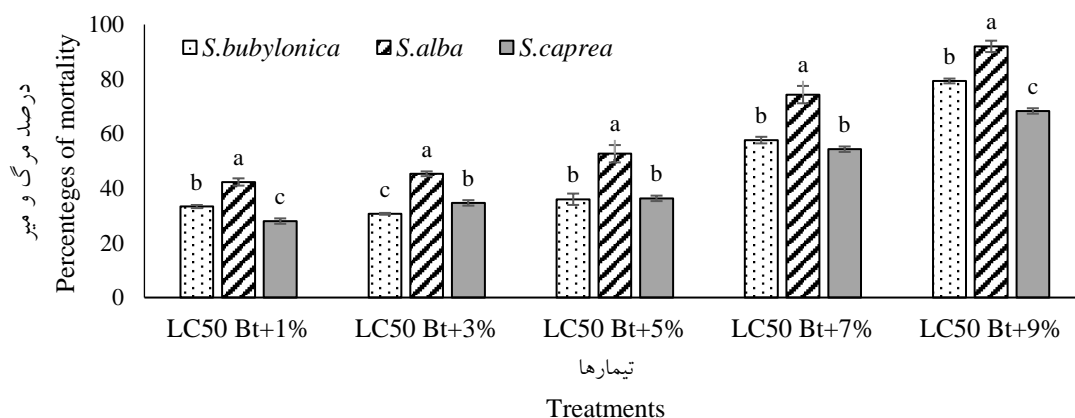
مرگ و میر حشرات (میانگین \pm انحراف معیار)			تیمارها
Mortality of <i>T. viridana</i> (Mean \pm SE)			Treatments
<i>S. bubyronica</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. caprea</i>	
0.33 \pm 0.33 ^d	0.67 \pm 0.33 ^f	1.00 \pm 0.67 ^d	Control
36.01 \pm 2.57 ^c	43.01 \pm 1.52 ^{cd}	33.33 \pm 0.57 ^c	LC ₅₀ Bt
31.00 \pm 0.57 ^c	45.33 \pm 1.33 ^c	36.01 \pm 0.33 ^c	LC ₅₀ Bt +1% SA
33.33 \pm 0.88 ^c	36.33 \pm 0.88 ^d	35.67 \pm 0.33 ^c	LC ₅₀ Bt +3% SA
36.01 \pm 2.08 ^c	54.00 \pm 2.64 ^c	36.67 \pm 4.74 ^c	LC ₅₀ Bt +5% SA
57.67 \pm 1.20 ^b	74.03 \pm 3.18 ^b	54.33 \pm 2.60 ^b	LC ₅₀ Bt +7% SA
79.33 \pm 0.88 ^a	92.33 \pm 2.08 ^a	68.33 \pm 0.88 ^a	LC ₅₀ Bt +9% SA

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است (آزمون توکی).

Different letters within columns show statistically significant variations ($\alpha = 0.05$, Tuckey test).

تجزیه واریانس مرگ و میر تجمعی لاروهای سن سوم پروانه جوانه خوار بلوط (*T. viridana*) با غلظت های یک، سه، پنج، هفت و نه درصد تیمار شده با اسید سالیسیلیک مستخرج از بید مجنون، بید سفید و بید بز همراه با LC₅₀ باکتری *B. thuringiensis* در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که درصد مرگ و میر توسط هر سه گونه بید در غلظت های یک، سه، پنج، هفت و نه درصد به ترتیب با شرایط ($P < 0.0001$)

معنی داری بودند. با توجه به نتایج، تیمار اسید سالیسیلیک مستخرج از بید سفید به همراه LC₅₀ باکتری *B. thuringiensis* در تمام غلظت ها نسبت به دو تیمار مورد آزمایش مرگ و میر بیشتری داشت، و دو تیمار بعدی نیز در غلظت نه درصد اختلاف معنی دار داشتند.



شکل ۱- درصد مرگ و میر لارو سن سوم پروانه *T. viridana* با غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک مستخرج از سه گونه بید به همراه LC₅₀ باکتری *Bacillus thuringiensis*

Figure 1. Mortality percentage of third instar larvae of *Tortrix viridana* with different concentrations of salicylic acid extracted from three species of willow along with LC₅₀ of *Bacillus thuringiensis*

لاروهای سن چهارم *T. viridana*

نتایج نشان داد که درصد مرگ و میر غلظت‌های یک، سه، پنج، هفت و نه درصد در تیمارهای LC₅₀ باکتری *B. thuringiensis*، بید مجنون، بید سفید و بید بز همراه با اسید سالیسیلیک سبب افزایش مرگ و میر لارو سن چهارم جوانه‌خوار در هر سه تیمار شده است. (F_{۶,۱۴}=۹۵۱/۷۴؛ P<۰/۰۰۰۱) و (F_{۶,۱۴}=۱۰۳/۲۱۳؛ P<۰/۰۰۰۱) دارای اختلاف معنی‌داری بودند (جدول ۴). درصدهای LC₅₀ باکتری *B. thuringiensis* به ترتیب با شرایط (F_{۶,۱۴}=۴۳۵/۶۰؛ P<۰/۰۰۰۱)، (F_{۶,۱۴}=۱۷۸/۸۶؛ P<۰/۰۰۰۱) بودند. با توجه به نتایج، تیمار اسید سالیسیلیک مستخرج از بید

جدول ۴. مقایسه میانگین درصد مرگ و میر توسط اسید سالیسیلیک مستخرج از سه گونه بید مجنون، بید سفید و بید بز در ترکیب با باکتری *B. thuringiensis* روی لارو سن چهارم جوانه‌خوار بلوط در غلظت‌های مختلف

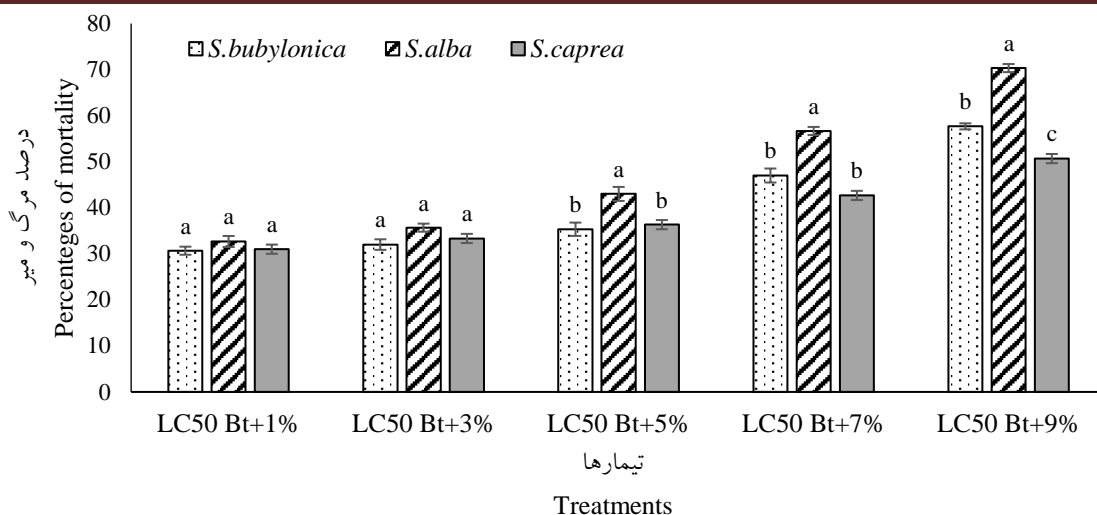
Table 4. Comparison of the average percentage of mortality by salicylic acid extracted from three from *Salix babylonica*, *S. alba* and *S. caprea* on *Tortrix viridana* in different concentrations

مرگ و میر حشرات (میانگین ± انحراف معیار)			تیمارها
Mortality of <i>T. viridana</i> (Mean±SE)			Treatments
<i>S. babylonica</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. babylonica</i>	
0.33±0.33 ^d	0.67±0.33 ^f	0.67±0.33 ^d	Control
33.33±0.57 ^c	33.31±1.20 ^d	33.00±2.08 ^c	LC ₅₀ Bt
30.67±0.88 ^c	32.67±1.20 ^d	31.01±1.52 ^c	LC ₅₀ Bt +1% SA
32.00±1.15 ^c	35.67±0.88 ^d	33.33±1.20 ^c	LC ₅₀ Bt +3% SA
35.33±1.45 ^c	43.00±1.52 ^c	36.33±0.88 ^{bc}	LC ₅₀ Bt +5% SA
47.00±1.52 ^b	56.67±0.88 ^b	42.67±2.66 ^b	LC ₅₀ Bt +7% SA
57.67±0.66 ^a	70.33±0.88 ^a	50.67±0.66 ^a	LC ₅₀ Bt +9% SA

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال 5% است (آزمون توکی).
Different letters within columns show statistically significant variations ($\alpha = 0.05$, Tuckey test).

سفيد به همراه LC₅₀ باکتری *B. thuringiensis* در غلظت‌های یک و سه درصد نسبت به سه تیمار مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری نداشته است ولی در سه غلظت بالا پنج، هفت و نه درصد اسید سالیسیلیک مستخرج از بید سفید به همراه LC₅₀ باکتری *B. thuringiensis* نسبت به دو تیمار مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری درصد مرگ و میر بیشتری داشت و دو تیمار اسید سالیسیلیک مستخرج از بید بز و بید مجنون به همراه LC₅₀ باکتری *B. thuringiensis* غیر از غلظت نه درصد که در آن اختلاف معنی‌دار داشتند؛ در بقیه غلظت‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند.

تجزیه واریانس مرگ و میر تجمعی لارو سن چهارم پروانه *T. viridana* با غلظت‌های یک، سه، پنج، هفت و نه درصد تیمار شده با اسید سالیسیلیک مستخرج از بید مجنون، بید سفید و بید بز همراه با LC₅₀ باکتری *B. thuringiensis* در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که درصد مرگ و میر توسط هر سه گونه بید در غلظت‌های یک، سه، پنج، هفت و نه درصد به-ترتیب با شرایط (F_{۶, ۶}=۰/۷۵؛ P>۰/۵۱۰)، (F_{۶, ۶}=۲/۹۰؛ P<۰/۰۰۰۱)، (F_{۶, ۶}=۹/۹۷؛ P<۰/۰۰۱۱)، (F_{۶, ۶}=۱۵/۰۷؛ P<۰/۰۰۰۱) و (F_{۶, ۶}=۱۷۸/۸۶؛ P<۰/۰۰۰۱) بودند. با توجه به نتایج، تیمار اسید سالیسیلیک مستخرج از بید



شکل ۲. درصد مرگ و میر لارو سن چهارم پروانه *T. viridana* با غلظت های مختلف اسید سالسیلیک مستخرج از سه گونه بید به همراه LC_{50} باکتری *Bacillus thuringiensis*

Figure 2. Mortality percentage of fourth instar larvae of *Tortrix viridana* with different concentrations of salicylic acid extracted from three species of willow along with LC_{50} of *Bacillus thuringiensis*

بحث

باکتری *Bacillus thuringiensis* به خاطر مزیت های فراوان مانند اثر اختصاصی روی لارو حشرات آفت، تاثیر ناچیز روی محیط زیست و جانداران غیرهدف و همچنین سهولت ترکیب و تلفیق با سایر روش های کنترل، جایگاه ویژه ای در مدیریت کنترل آفات کشاورزی و جنگلی دارد. این باکتری امروزه یکی از موفق ترین حشره کش های میکروبی تجاری است که درصد قابل قبولی از بازار آفت کش های بیولوژیک را به خود اختصاص داده است (Aramideh, 2016).

در پژوهشی حساسیت سنین اول، دوم و سوم لاروی پروانه برگ خوار سفید پسته (*Ocnaria terebinthina*) نسبت به باکتری *B. thuringiensis* var. *kurstaki* مورد بررسی قرار گرفت. لاروهای سنین اول بیشترین حساسیت را نسبت به *B. thuringiensis* نشان دادند (Sheibani, 2010). در بررسی حاضر نیز لارو سن سه در مقایسه با لارو سن چهار حساسیت بیشتری نسبت به تیمارها داشت. همچنین در پژوهشی دیگر *B. thuringiensis* برای کنترل پروانه برگ خوار

از غلظت های مختلف باکتری *B. thuringiensis* بر علیه لارو سن یک و دو حشره مورد نظر استفاده شد. نتایج نشان داد حساسیت لارو سن دوم بیشتر است و بیشترین مقدار تلفات با دو ppm مقدار ۶۲ درصد در لارو سن دو این آفت گزارش شد (Vatandoost et al., 2018). بیماری-زایی باکتری *B. thuringiensis* در اختلاط با زغال فعال و نشاسته روی لاروهای سن دوم برگ خوار درختان زبان گنجشک (*Nyssia graecarius* Staudinger) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد باکتری مذکور به همراه زغال فعال اثر سینرژیستی خوبی در کنترل این آفت جنگل دارند (Aramideh, 2016). همچنین باکتری *B. thuringiensis* توانایی زیادی در کنترل آفات بال-پولک داران مانند *Anticarsia Helicoverpa armigera* و *Spodoptera gemmatalis* دارد (Pinheiro and Valicente, 2021).

کاهش می‌یابند و تأثیر مستقیمی روی شکارگر آن در کوتاه‌مدت ندارند (Moreno-Delafuente et al., 2020). همچنین در استفاده از سالیسیلیک اسید به همراه باکتری *Bacillus subtilis* در کنترل قارچ بیماری -زا *Phytophthora infestans* نتایج نشان داد که این ترکیب با عوامل زیستی در کنترل آفات و بیماری‌ها خاصیت سینرژیستی دارد (Wani et al., 2017; Lastochkina et al., 2020). اسیدهای عالی مانند اسید تانیک در اختلاط با باکتری *B. thuringiensis* نشان داده می‌توانند به‌عنوان سینرژیست در کنترل لارو آفات مختلف به‌ویژه در شرایط جنگلی و مزارع مورد استفاده قرار گیرد. در بررسی تأثیر باکتری *B. thuringiensis* به همراه تانن مستخرج از گیاه صنوبر در ارزیابی بقا و رشد لارو پروانه برگ‌خوار صنوبر (*Choristoneura fumiferana*) موجب افزایش تلفات آفت و اثرات سوء روی رشد و بقاء آن داشت (Gibson et al., 1995). که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

نتایج این بررسی نشان داد که باکتری *B. thuringiensis* اثر حشره کشی روی لاروهای *viridana* دارد و در شرایط جنگل که استفاده از آفت -کش‌های شیمیایی غیرمجاز و مقدر نیست، یک گزینه مطلوب است و لیکن این کنترل در اختلاط با اسید سالیسیلیک خاصیت افزایشی نشان داد که این ماده ارگانیک را به راحتی می‌توان از پوست درختان بید استخراج کرد. اسید سالیسیلیک استخراج شده از سه گونه بید میجنون، بید سفید و بید بز در اختلاط با این آفت‌کش زیستی اثرات کنترل‌کننده بهتری در مرگ و میر این آفت را نسبت به کاربرد تنهای باکتری نشان داد که بهترین اثربخشی در اسید سالیسیلیک مستخرج از بید سفید مشاهده شد. از آنجایی که پوست درختان بید حاوی اسید سالیسیلیک بالایی بوده از طرفی جزو

بیشتری نسبت به سایر سنین لاروی برخوردار بوده و با افزایش سن لارو مقدار تأثیر اسپور و کریستال‌های باکتری کاهش می‌یابد (Asareh and Askari, 2004). بررسی‌های زیادی نشان می‌دهد ترکیبات فنولی به عنوان آفت‌کش تأثیرات قابل قبولی دارند (Mollashahi et al., 2017; Auger et al., 2008). تانن‌ها سبب بروز مشکلاتی در سنین لاروی مانند جلوگیری از رشد و عدم تکمیل مراحل رشدی حشرات می‌شوند (Acheuk et al., 2014). خواص حشره‌کشی تانن‌های مستخرج از میوه *Cydonia oblonga* روی *Tribulium confusum* نشان داد که این ماده نقش کنترلی خوبی دارد و به‌عنوان حشره‌کش زیستی عمل می‌کند (Benahmed-Djilalia et al., 2021). در پژوهشی تأثیر سالیسیلیک اسید و پتاسیم سیلیکات سبب کاهش جمعیت تریپس پیاز (*Thrips tabacci* Lind.) نسبت به شاهد شد و همچنین افزایش غلظت سالیسیلیک اسید و پتاسیم سیلیکات نیز معنی‌دار بود (Panahandeh and Pahlavan, 2022). نتایج مشابهی در بررسی ما مبنی بر کاهش جمعیت *T. viridana* در استفاده از اسید سالیسیلیک و غلظت‌های بالا آن به‌دست آمد. پژوهش -های دیگری نیز مبنی بر کاهش جمعیت آفت بر اثر استفاده از اسید سالیسیلیک گزارش شده است (Rogerio et al., 2005; Nayebedeh et al., 2016). کاربرد اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک را بر علیه شب‌پره مینوز گوجه فرنگی *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) نشان داد که این دو اسید در تلفیق با رقم‌های مناسب برای کنترل آفت مناسب می‌باشند (Nemati et al., 2020). تأثیر اسید سالیسیلیک روی *Aphis gossypii* و شکارگر آن *Chrysoperla carnea* نشان داد که شاخص‌های زیستی شته تحت تأثیر اسید سالیسیلیک قرار گرفته و

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری ارزشمند کارشناسان محترم آزمایشگاه حشره‌شناسی گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی ارومیه در اجرای این بررسی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

ضایعات این گیاه می باشد؛ از این رو، به راحتی با هزینه بسیار کم می توان آن را استخراج و در مصارف متعدد به ویژه به عنوان ماده همراه این آفت کش زیستی به کار برد.

References

- Acheuk, F.; Abdellaoui, K.; Bendifallah, L.; Hammichi, A.; Semmar, E., Effects of crude ethanolic extract of *Solenostemma argel* (Asclepiadaceae) on 5th instar larvae of *Locusta migratoria*. AFPP Tenth International Conference on Pests in Agriculture Montpellier-October 22 and 23, **2014**.
- Akbari, S.; Aramideh, Sh., Effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill on survival and population growth parameters of *Myzocallis coryli* Goetze. *Forest Research and Development* **2022**, 9(1), 129-144. (In Persian)
- Alehosseini, S.A.; Saadati, S. H.; Zarghani, H. H., Study of population dynamics of oak tortrix moth (*Tortrix viridana*) and its natural enemies in Fars province. *Journal of Plant Protection* **2013**, 5, 1-12.
- Anyanga, M. O.; Farman, D. I.; Ssemakula, G. N.; Mwanga, R. O. M.; Stevenson, P. C., Effects of hydroxycinnamic acid esters on sweetpotato weevil feeding and oviposition and interactions with *Bacillus thuringiensis* proteins. *Journal of Pest Science* **2020**, 1612-4766.
- Aramideh, Sh., 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* **2016**, 2 (2), 145-154. (In Persian)
- Asareh, M. H., Evaluation of pathogenicity of bacteria strains (*Bacillus Thuringiensis* (Bacteria: Bacillaceae) on *Spodoptera Exigua* (Lep.: Noctuidae). *Journal of Applied Crop Research* **2004**, 16(1), 89-94. (In Persian)
- Benahmed-Djilalia, A.; Mehraza, R.; Bouacem, K. H.; Benseddik, A.; Moualeka, I.; Nabievd, M.; Benzarae A., Bioactive Substances of *Cydonia oblonga* Fruit: Insecticidal Effect of Tannins on *Tribulium confusum*. *International Journal of Fruit Science* **2021**, 21(1), 721-731
- Cao, H. H.; Zhang, M.; Zhao, H.; Zhan Y.; Wang, G. X. X.; GUO, S. S., Deciphering the Mechanism of -Aminobutyric Acid-Induced Resistance in Wheat to the Grain Aphid, *Sitobion avenae*, *Plos One*, **2014**. 9: e91768.
- Dinary, A.; Dolaty L.; Nematolahy M.; Forutan S., Effects of different doses of SA, on wheat resistance induction against Russian aphid of wheat. The First Conferences on New Finding in Environment and Agricultural Ecosystems **2015**, Tehran. Iran. (In Persian)
- Draganova, S.; Takov, D.; Pilarska, D.; Doychev, D.; Mirchev, P.; Georgiev, G., Fungal Pathogens on Some Lepidopteran Forest Pests in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica* **2013**, 65(2), 179-186.
- Fuentealba, A.; Dupont, A.; Hébert, CH.; Berthiaume, R.; Quezada-García, R.; Bauce, E., Comparing the efficacy of various aerial spraying scenarios using *Bacillus thuringiensis* to protect trees from spruce budworm defoliation. *Forest Ecology and Management* **2019**, 432, 1013-1021.
- Gui-ming, L.; Xiang-yue, Z.; Lu-quan, W., The use of *Bacillus thuringiensis* on Forest Integrated Pest Management. *Journal of Forestry Research* **2001**, 12, 51-54.
- Gibson, D. M.; Gallo L. G.; Krasnoff, S. B.; Ketchum R. E., Increased efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in combination with tannic acid. *Journal Economic of Entomology*, **1995**, 88(2): 270-277
- Khanizad, A.; Safaralizadeh, M.H., The evaluating synergist effect of tannic acid in combination with low doses *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on *Galleria mellonella* larvae, Proceedings of the Fifteenth Congress of Plant Protection **2002**, Kermanshah, Iran. pp. 274. (In Persian)
- Kooch, Y.; Hosseini, S. M.; Akbarinia, M.; Tabari, M; Jalali, S. G. H., The role of dead tree in regeneration density of mixed beech

- stands (case study: Sardabrood forests, Chalous, Mazandaran). *Iranian Journal of Forest* **2010**, 2(2), 93-103. (In Persian)
- Lastochkina, O.; Baymiev, A.; Shayahmetova, A.; Garshina, D.; Koryakov, I.; Shpirnaya, I.; Pusenkova, L.; Mardanshin, I.; Kasnak, C.; Palamutoglu, R. Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers. *Plants* **2020**, 9, 76.
- Mollashahi, H.; A. Mirshekari, M.; Ghorbani.; A. Tarrah., Insecticidal effect of the fruit extract bitter melon (*citrullus colocynthis*) on locust *chrotogonus trachypterus* (Orth: Pyrgomorphidae) *Biosciences Biotechnology Research Asia* **2017**, 14 (4), 1285–1289.
- Moreno-Delafuente, A.; Garzo, E. A.; Fereres, A.; Viñuela, E; Medina, P., Effects of a Salicylic Acid Analog on *Aphis gossypii* and Its Predator *Chrysoperla carnea* on Melon Plants. *Agronomy* **2020**, 10, 1830.
- Nemati, A.; Zahiri B.; Mohammad Khanjani M., Systemic changes in tomato induced by foliar-treated hormone and cultivar interactions reduce the fitness of an invasive specialist herbivore, the tomato leaf miner. *Iranian Journal of Plant Protection Science* **2020**, 51(2), 221-233. (In Persian)
- Nayebzadeh, A.; Sharifi-Sirchi, G. R.; Ahmadi K., Resistance induction to green peach aphid (*Myzus persicae*) in broad bean by salicylic acid and aminobutyric acid. *Applied Entomology and Phytopatology* **2016**, 84(1): 13-20. (In Persian)
- Olivieri, M.; Mannu, R.; Ruiu, L.; Ruiu, P. A.; Lentini, A., Comparative Efficacy Trials with Two Different *Bacillus thuringiensis* Serovar *kurstaki* Strains against Gypsy Moth in Mediterranean Cork Oak Forests. *Forests* **2021**, 12(5), 602.
- Panahandeh, S.; Pahlavan, M.Y., Potassium silicate and salicylic acid effects on onion thrips population density and some growth indices of onion cultivars. *Agriculture, Environment and Society* **2022**, 2(1), 25-30.
- Pinheiro, D. H.; Valicente, F. H., Identification of *Bacillus thuringiensis* Strains for the Management of Lepidopteran Pests. *Neotropical Entomology*, **2021**, 50(5), 804-811.
- Ruiu, L.; Mannu, R.; Falchi, G.; Braggio, A.; Luciano, P., Evaluation of different *Bacillus thuringiensis* sv *kurstaki* formulations against *Lymantria dispar* and *Malacosoma neustria* larvae infesting *Quercus suber* trees. *Redia*, **2013**, 96, 27–31
- Sheibani, Z. T., The Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on the First, Second and Third Larval Instars of Pistachio White Leaf Moth *Ocneria terebinthina* (Lep.: Lymanteridae). *Journal of Research in Agricultural Science* **2010**, 6(2):83-92.
- Tan, M.; Wu, H.; Yan, Sh.; Jiang, D., Evaluating the Toxic effects of tannic acid treatment on *Hyphantria cunea* Larvae. *Insects* **2022**, 13(10), 872.
- Vatandoost, A.; Damavandian, M.R.; Barimani _Varandi, H.; Babae, M. R., Study on the effect of *Bacillus thuringiensis* on control of *Ennomus quercinaria* (Hafngel). *Plant Pest Research* **2018**, 8(3), 89-102. (In Persian)
- Wani, A.B.; Chadar, H.; Wani, A.H.; Singh, S.; Upadhyay, N., Salicylic acid to decrease plant stress. *Environmental Chemistry Letters* **2017**, 15, 101–123.
- Zargar, M. R.; Mousavi Mirkala, S. R.; Banj Shafiei, A.; Ramezani kakroudi, E., Survey on biology of *Tortrix viridana* L. in laboratory and field conditions and its distribution in West-Azerbaijan. *Forest Research and Development* **2015**, 1(1), 31-42. (In persion)

Effect of salicylic acid isolated from three native willow species in combination with *Bacillus thuringiensis* B. on the oak leaf roller, *Tortrix viridana* L.

Samaneh Akbari¹ and Shahram Aramideh^{*2}

1- PhD of Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I. R. Iran. (sama8akbari@gmail.com)

2- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I. R. Iran. (sh.aramideh@urmia.ac.ir)

Received: 08 March 2024 Accepted: 17 June 2024

Abstract

Introduction and Objective: The oak leaf roller, *Tortrix viridana* L., is one of the most important pests in oak forests in Iran. This pest tops the list of domestic and quarantine forest pests and its larvae cause heavy damage to oak trees by feeding on the reproductive buds and leaves of trees. Considering the destructive and harmful effects of chemical pesticides, especially biological control using natural enemies and plant compounds as alternative methods, have been used as integrated pest management solutions. Among the biological factors, the insect pathogen, *Bacillus thuringiensis* B. has a special place due to its many advantages such as specific effect on the larvae of lepidoptera order, insignificant effect on the environment and non-target organisms, as well as the ease of integrating with other control methods in the management of agricultural and forest pest control. Studies have shown that this bacterium exhibits synergistic properties when combined with specific plant tannins. The organic acids like tannic acid, when mixed with *B. thuringiensis*, can serve as synergists in controlling various pest larvae. Willow tree species, due to their salicin content in the bark, possess medicinal and industrial properties. Salicin, as a plant tannin, can be effective when combined with *B. thuringiensis* in controlling oak leaf rollers. Additionally, salicylic acid, due to its phenolic composition, is one of the essential growth factors in plants. This substance, as a secondary metabolite, is produced in plants. The role of salicylic acid as a critical compound in plant response to abiotic stresses has been well established. Salicylic acid is water-soluble and acts as an antioxidant, playing a vital role in plant responses to non-living stresses such as drought, cold, heavy metals, heat, and osmotic stress. It seems to enhance metabolic responses, affecting plant photosynthetic parameters and water relations. Therefore, this study was conducted to extract and measure salicylic acid in babylonian willow (*Salix babylonica*), white willow (*S. alba*), and goat willow (*S. caprea*) and assess its impact in combination with *B. thuringiensis* on the oak leaf roller, *T. viridana*.

Materials and Methods: The bark of babylonian willow, white willow, and goat willow was collected, dried, and powdered in spring and summer. Sample extraction was carried out using a soxhlet apparatus, and the extract purification was done using a rotary device. Salicylic acid extraction was performed according to the TAPPI standard using ethanol as a solvent. Subsequently, the lethal concentrations (LC₅₀) of *B. thuringiensis* obtained from bioassays were combined with salicylic acid concentrations of 1, 3, 5, 7, and 9% from the willow species and applied to third and fourth instar oak leaf roller larvae. In this experiment, insects treated were considered dead if no movement was observed upon close approach with a hot needle to their legs and thoracic appendages after 48 hours. Each treatment in this research was replicated three times.

Findings: The results showed that the total extractable material percentages in the bark of babylonian, white and goat willow were 23.55, 36.25, and 20.75%, respectively. The salicylic acid content in the bark extract of babylonian, white, and goat willow was found to be 15.20, 20.10, and 14.70%, respectively. The mortality rate (LC₅₀) of *B. thuringiensis* on third and fourth instar oak leaf roller larvae 48 hours after treatment was 659.77 and 742.45 ppm, respectively. The mortality rates of third and fourth instar oak leaf roller larvae in combination with 1, 3, 5, 7, and 9% salicylic acid extracted from

* Corresponding author

Tel: +989143475914

babylonian, white and goat willow along with *B. thuringiensis* 's LC₅₀ showed significant differences. Higher percentages of salicylic acid led to an increase in mortality of third instar oak leaf roller larvae in all three willow species. The results of combining salicylic acid extract with *B. thuringiensis* at all concentrations showed that the combination of salicylic acid extracted from white willow with *B. thuringiensis* had the highest mortality rate compared to the other two treatments on third instar larvae. In fourth instar larvae, the combination of salicylic acid extracted from white willow with the LC₅₀ concentration of bacteria was higher in three concentrations, 5, 7, and 9%, compared to the other two treatments.

General Conclusion: The results of this study demonstrated that *B. thuringiensis* have insecticidal effects on oak leaf roller larvae and when combined with salicylic acid extracted from three willow species (babylonian willow, white willow, and goat willow), they exhibit better control effects on the mortality of this pest, with the best effectiveness observed with salicylic acid extracted from white willow. Based on the results of this research, it is possible to utilize the bark of various willow species, especially white willow, for extracting salicylic acid and employing it in combination with *B. thuringiensis* in managing this important forest pest.

Keywords: Salicylic Acid, Mortality Percentage, Willow, Integrated Pest Control, Biological Control.