



Investigating the impact of temperature and three subspecies of *Bacillus thuringiensis* on the nodulation of the immune system and some biological parameters of the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)

Alireza Mirzaei Parsa¹ | Maryam Rashki² | Elham Rezvannejad³

1. Department of Biodiversity, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail: alirezamirzaeiparsa@gmail.com.

2. Corresponding Author, Department of Biodiversity, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail: ma_rashkigh@yahoo.com.

3. Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail: rezvannejad2002@yahoo.com.

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	The entomopathogenic bacterium, <i>Bacillus thuringiensis</i> , is a gram-positive and spore-forming bacterium, and a large number of its subspecies have been identified and introduced. The insect immune responses activate after ingesting <i>Bt</i> or its toxin proteins. This research aimed to investigate the effect of temperature and three subspecies including <i>B. thuringiensis</i> subspecies <i>thuringiensis</i> (<i>Btt</i>), <i>B. thuringiensis</i> subspecies <i>aizawai</i> (<i>Bta</i>), and <i>B. thuringiensis</i> subspecies <i>galleriae</i> (<i>Btg</i>) on nodule formation and some biological parameters of the moth <i>Ephestia kuehniella</i> Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). A concentration of 10 ⁹ spore/ml was used to contaminate the larval diet. This experiment was performed at three different temperatures (20, 25, and 30 °C), relative humidity of 55±5%, and a photoperiod of 16:8 (L: D). The highest number of nodules was significantly observed in <i>Bta</i> and <i>Btg</i> treatments at 30 °C and the lowest number of nodules was observed in the control. There was no significant difference in the time until pupation among the three subspecies. However, a significant difference was observed between different temperatures in each subspecies. Therefore, this duration in the control was significantly affected by temperature. The highest amount of pupa production was related to the temperatures of 20 and 25 °C in subspecies <i>Bta</i> and the control that had no significant difference. The number of adults obtained in the <i>Bta</i> treatment was not affected by the temperature, similar to the control. Since the temperature did not affect the number of nodules in the control, it is concluded that increasing the temperature by affecting the <i>Bt</i> increased the number of the nodules formed in the surviving larvae and also, the subspecies kind of the bacterium had a significant effect on it.
Article history: Received: 7 February 2024 Revised: 25 February 2024 Accepted: 9 March 2024 Published online: 22 December 2022	
Keywords: <i>Spore</i> , <i>entomopathogenic bacterium</i> , <i>nodulation</i> , <i>temperature</i> , <i>biological control</i> .	

Cite this article: Mirzaei Parsa, A. R., Rashaki, M. & Rezvannejad, E. (2023). Investigating the impact of temperature and three subspecies of *Bacillus thuringiensis* on the nodulation of the immune system and some biological parameters of the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 11 (2), 135-152. DOI: <https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.372232.332>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.372232.332>

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive and spore-forming bacterium that has special toxicity for different orders of insects and can point out three subspecies *B. thuringiensis* subspecies *thuringiensis* (*Btt*), *B. thuringiensis* subspecies *aizawai* (*Bta*) and *B. thuringiensis* subspecies *galleriae* (*Btg*). Insects can activate their immune responses after consuming *Bt* or toxin proteins for defence. The purpose of this research is to investigate the effect of temperature and three subspecies of insect pathogenic bacteria including *Btt*, *Bta* and *Btg* were found to affect the production of nodules concerning the immune system of *E. kuehniella* larvae and some biological parameters of this moth such as the number of produced pupae, the period till pupation and the number of adults. This experiment was performed at three different temperatures (20, 25 and 30°C), the

relative humidity $55\pm 5\%$ and a photoperiod of 16:8 (L: D). The results showed that the interaction of bacterium and temperature on the number of nodules formed in larval hemolymph, the duration of 24-day-old larvae turning into pupae, and the number of pupae and adults produced were significant. In the case of all three subspecies of bacterium, the highest number of nodules was significantly formed at 30 °C. However, the difference was not significant between the other two temperatures (20 and 25°C). The lowest amount of nodules was significantly observed in the control and showed that temperature does not affect the number of nodules formed in larval hemolymph. There was no significant difference between the three subspecies in the time until the pupation of the larvae at any temperature. However, a significant difference was observed among different temperatures in each subspecies. Likewise, this duration in the control was significantly affected by temperature; therefore, this process took more time at 20 than 30°C. The number of pupae produced in each of *Btt* and *Btg* treatments was the same at all three temperatures and no significant difference was observed between different temperatures. However, in *Bta* treatment at 30°C, pupal production decreased significantly that was similar to the control. The highest amount of pupa production was related to the temperatures of 20 and 25 °C in *Bta* and the control treatment did not have significant differences. At the temperature of 30°C, there was no significant difference in the number of pupae produced between the three studied subspecies. The number of adults obtained in the *Bta* treatment was not affected by the temperature, similar to the control. While, in *Btt* and *Btg* subspecies, the lowest number was significantly obtained at 30 and 25°C, respectively. In other words, a significant difference was revealed in the number of adults obtained among the three subspecies of the bacterium at two temperatures of 25 and 30°C that were less than the control. In general, the average duration of transformation of bacteria-infected larvae to pupation was less than that of the control. The effects of environmental changes on insect immune responses are not strong. Since the temperature did not affect the number of nodules in the control, it is concluded that increasing the temperature by affecting the *Bt* bacterium increased the number of the nodule formation in the surviving larvae and also, the subspecies of the bacterium had a significant effect on it. It seems that for this reason, the treatment of 5th instar larvae with *Bta* and *Btg* subspecies at 30°C caused the highest number of nodules in the hemolymph of larvae without significant difference between these two subspecies. Perhaps this has caused these two treatments to have no difference in the number of pupae and adults created compared to the control. Another result recorded in the present study showed that the increase in temperature caused the 24-day-old larvae to enter the pupal stage faster. This trend was observed in the bacterial treatment (in each of the subspecies) and the control. Of course, infected larvae entered the pupal stage even earlier than healthy larvae. This strategy is to escape from the adverse effects of bacterium and increase in temperature. Because it has been proven that the sensitivity of Lepidopteran larvae to *Bt* bacterial toxins is higher than that of adults (Lu *et al.* 2012). The results showed that no more pupae were formed in bacterial treatments from the 9th day after infection at high temperature and the 13th day after infection at low temperature. It seems that this issue happened due to the death of some larvae due to bacterial infection and it is more evident in the case of *Btt* subspecies in all three temperatures.



بررسی اثر دما و سه زیرگونه از باکتری *Bacillus thuringiensis* بر تشکیل گره در سیستم ایمنی و برخی پارامترهای زیستی شبپره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)

علیرضا میرزایی پارسا^۱ | مریم راشکی^۲ | الهام رضوان نژاد^۳

۱. گروه تنوع زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: alirezamirzaeiparsa@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، گروه تنوع زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: ma_rashkigh@yahoo.com
۳. گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: rezvannejad2002@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	باکتری بیمارگر حشرات، <i>Bacillus thuringiensis</i> ، گرم مثبت و اسپورزا است که تعداد زیادی از زیرگونه‌های آن شناسایی و معرفی شده است. پاسخ‌های ایمنی حشرات، پس از بلعیدن <i>Bt</i> یا پروتئین‌های سمی آن فعال می‌شود. هدف از این تحقیق، بررسی اثر دما و سه زیرگونه <i>B. thuringiensis</i> subspecies <i>B. thuringiensis</i> subspecies <i>aizawai</i> (<i>Bta</i>)، <i>thuringiensis</i> (<i>Bt</i>) و <i>galleriae</i> (<i>Btg</i>) بر تشکیل گره طی پاسخ ایمنی و برخی پارامترهای زیستی شبپره <i>Ephestia kuehniella</i> Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) بود. برای آلوده‌سازی بستر غذایی لارو، از غلظت 10^9 اسپور در میلی‌لیتر استفاده شد. این آزمایش در سه دمای مختلف (۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سلسیوس)، رطوبت نسبی 55 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۶:۸ (روشنایی: تاریکی) انجام شد. به‌طور معنی‌دار بیشترین تعداد گره تحت تأثیر زیرگونه‌های <i>Bta</i> و <i>Btg</i> در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و کمترین میزان گره در شاهد در هر سه دما مشاهده شد. مدت زمان تا شفیره شدن، در هر دما بین سه زیرگونه اختلاف معنی‌دار نداشت. اما، بین دماهای مختلف در هر زیرگونه اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. همچنین، این مدت زمان در شاهد به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر دما قرار گرفت. بیشترین میزان تولید شفیره مربوط به دماهای ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس در زیرگونه <i>Bta</i> و شاهد بود که با هم اختلاف معنی‌دار نداشتند. تعداد حشرات کامل بدست‌آمده در تیمار <i>Bta</i> مشابه شاهد تحت تأثیر دما قرار نگرفت. از آنجا که دما بر تعداد گره‌ها در شاهد تأثیری نداشت، چنین استنباط می‌شود که افزایش دما با تأثیر بر باکتری <i>Bt</i> ، تعداد گره‌های تشکیل شده را در لاروهای زنده‌مانده افزایش داده و همچنین، نوع زیرگونه باکتری به‌طور معنی‌دار بر آن تأثیر داشته است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۸	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۲/۰۶	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۰/۰۱	
کلیدواژه‌ها:	اسپور، باکتری بیمارگر حشرات، تشکیل گره، دما، کنترل بیولوژیک.

استناد: میرزایی پارسا، علیرضا؛ راشکی، مریم و رضوان‌نژاد، الهام (۱۴۰۱). بررسی اثر دما و سه زیرگونه از باکتری *Bacillus thuringiensis* بر تشکیل گره در سیستم ایمنی و برخی پارامترهای زیستی شبپره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی، ۱۱ (۲)، ۱۳۵-۱۵۲. DOI: <https://doi.org/10.22059/jbioc.2024.372232.332>



مقدمه

باکتری *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) یک باکتری گرم مثبت و اسپورزا است که در همه جا یافت می‌شود و پروتئین‌های بلوری (*Cry*)، سیتولیتیک (*Cyt*) و حشره‌کش رویشی (*Vip*) را تولید می‌کند که دارای سمیت ویژه برای راسته‌های مختلف حشرات است (Panwar et al., 2018). این باکتری به‌طور گسترده برای کنترل آفات کشاورزی و بهداشتی استفاده می‌شود (Zhao et al., 2017). شب‌پره مدیترانه‌ای آرد یکی از آفات انباری مهم با پراکنش جهانی است که در تمام نقاط دنیا در انبارهای گندم، پسته و بادام شیوع دارد. لارو این حشره با تغذیه و تنیدن تارهای ابریشمی در داخل و سطح محصول به شدت باعث کاهش کمیت و کیفیت مواد انباری می‌شود. همچنین فضولات و پوسته‌های لاروی تولیدشده توسط حشره باعث ایجاد بوی نامطبوع در فراورده‌های انباری می‌شود (Hagstrum et al., 2013).

برای ظهور اثرات *Bt*، باکتری باید توسط لارو حشره بلعیده شود. با حل شدن پروتئین بلوری، تعادل نفوذپذیری سلول‌های پوششی معده میانی از بین می‌رود و منجر به تخریب این سلول‌ها می‌شود. افزایش جذب گلوکز در روده میانی و اختلال در پدیده فسفوریلاسیون میتوکندری‌ها و محل سیناپس عصبی، ازدیاد تراکم یون‌های پتاسیم در خون در سطح خارجی سلول‌ها و برهم خوردن تعادل یونی، باعث فلج شدن سیستم گوارش می‌شود. مرگ حشره دو تا سه روز بعد از این مراحل اتفاق می‌افتد که طی این مدت زمان حشره دچار عفونت خونی و کمبود مواد غذایی می‌شود. با وجود این که حشره به محض دریافت دوز کشنده نمی‌میرد ولی تغذیه حشره کمی پس از آلودگی اولیه متوقف می‌شود؛ بنابراین گیاه صدمه نمی‌بیند (Bajwa and Kogan, 2000).

طی دهه‌های گذشته تعداد زیادی از زیرگونه‌های *Bt* شناسایی و معرفی شده‌است که می‌توان به سه زیرگونه *B. thuringiensis* subspecies *thuringiensis* (Itoua-Apoyolo et al., 1995)، *B. thuringiensis* subspecies *galleriae* (*Btg*) (Zhu et al., 2015) و *B. thuringiensis* subspecies *aizawai* (*Bta*) (Silva et al., 2015) اشاره کرد. سه زیرگونه فوق حاوی ژن‌های خانواده *cry1* هستند (Kalman et al., 1993; Seifinejad et al., 2008) که به‌طور گسترده برای کنترل حشرات آفت متعلق به راسته بالپولکداران استفاده شده است. به‌طورمثال، تحقیقی نشان داد که پروتئین‌های *LipCry1A* باکتری *Bt* متعلق به سویه *Lip*، فعالیت حشره‌کشی بالایی علیه لاروهای شب‌پره آرد داشته‌است (El Khoury et al., 2014).

محققین دریافته‌اند که پروتئین‌های *Cry* متعلق به زیرگونه *Bta* برای کنترل آفت *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) بسیار موثر و کارآمد است (Silva et al., 2012). همچنین، در یک مطالعه دیگر اثر زیرگونه *Bta* روی لاروهای *S. frugiperda* ارزیابی شد (Dequesh et al., 2005). این زیرگونه باعث مرگ بیش از ۹۵ درصد از لاروهای آفت و علاوه بر این، کاهش مصرف برگ توسط این حشره شد. نکته بسیار مهم، عدم تغییر ویژگی‌های زیستی پارازیتوئید آن *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) در نتیجه تغذیه لاروهای آفت از باکتری *Bta* بود که نشان‌دهنده بی‌ضرر بودن کاربرد این زیرگونه برای زنبور پارازیتوئید بعنوان عامل کنترل بیولوژیک است.

پاسخ‌های ایمنی حشرات (هومورال و سلولی)، پس از مصرف *Bt* یا پروتئین‌های سم فعال می‌شوند (Contreras et al., 2015; Wu and Yi, 2018). بسیاری از مطالعات نشان‌دادند که پاسخ‌های ایمنی حشرات با مقاومت به *Bt* مرتبط و در حشرات مقاوم افزایش می‌یابند (Dubovskiy et al., 2016; Wei et al., 2018). حتی دوز کم *Bt*، در شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepdoptera: Pyralidae)، سوسک قرمز آرد و کرم ابریشم، مقاومت حشرات را نسبت به عفونت مجدد افزایش داده‌است (Pinos et al., 2021).

پلاسماتوسیت‌ها، نوعی از سلول‌های خونی حشرات، شامل سلول‌هایی کوچک تا بزرگ، چند شکلی به اندازه ۴۰ تا ۵۰ میکرومتر هستند. این سلول‌ها بیگانه‌خوار هستند و هجوم باکتری‌ها را با تشکیل گره مورد حمله قرار می‌دهند که در این صورت، باکتری‌ها در داخل گره‌های حاوی سلول‌های خونی و لخته خون تجمع می‌یابند (Nation, 2016). سرانجام، این فرآیند با ملانیزه شدن و تبدیل شدن به گره‌های سیاه رنگ که به دیواره‌های داخلی بدن یا اندام‌های مختلف داخلی متصل می‌شوند، پایان می‌یابد. در فرآیند تشکیل گره، پروفنول اکسیدازها نقش مهمی دارند (Franssens *et al.*, 2006). هدف از این تحقیق، بررسی اثر دما و سه زیرگونه از باکتری بیمارگر حشرات شامل *B. thuringiensis* subspecies *B. thuringiensis* subspecies *galleriae* و *B. thuringiensis* subspecies *aizawai* (*Bta*) *thuringiensis* (*Btt*) بر میزان تولید گره‌ها در ارتباط با سیستم ایمنی لارو ۲۴ روزه شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella* و برخی پارامترهای زیستی این شب‌پره مانند تعداد شفیره‌های تولیدشده، طول دوره شفیرگی و تعداد افراد کامل ظاهر شده بود.

روش‌شناسی پژوهش

پرورش شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella*

برای پرورش شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد از ظروف پلاستیکی به ابعاد شش سانتیمتر ارتفاع و ۲۰ سانتیمتر طول استفاده شد. برای انجام تهویه مناسب، روی در ظروف منفذی تعبیه و با توری چسبانده شد. غذای مورد استفاده در این آزمایش مخلوطی از آرد و سیوس گندم (۲:۱) بود. بعد از ضدعفونی ظرف‌ها، در هر ظرف به اندازه‌ی دو سوم حجم آن بستر غذایی فوق ریخته شد. به ازای هر یک کیلوگرم بستر ۰/۲ گرم تخم حشره به ظرف‌ها اضافه شد. سپس، ظروف حاوی تخم حشره و آرد در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد و طول دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند (Kurtulus *et al.*, 2020). تخم‌های شب‌پره پس از هشت روز تفریح و لاروهای کوچک یک روزه شروع به تغذیه از آرد کردند. از لاروهای ۱۲ روزه در آزمایش بیمارگری و از لاروهای ۲۴ روزه در تمام آزمایش‌ها استفاده شد. در آزمایشگاه برای تداوم پرورش و حفظ جمعیت شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، بعد از ظاهر شدن حشرات کامل از آن‌ها تخم‌گیری شد. شب‌پره‌های بالغ توسط جاروبرقی داخل محفظه‌ای جمع‌آوری و سپس به درون قیف پلاستیکی ریخته شدند. دهانه‌ی قیف به وسیله توری بسته شد و بصورت وارونه دهانه بزرگ آن روی یک کاغذ سفید قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت تخم‌های ریخته شده روی کاغذ سفید جمع‌آوری شدند و برای ادامه پرورش مورد استفاده قرار گرفتند. این روند تا پایان انجام آزمایش‌ها ادامه داشت.

کشت سه زیرگونه از باکتری *B. thuringiensis*

برای کشت باکتری از محیط کشت نوترینت آگار استفاده شد. برای تهیه‌ی ۱۰۰ سی سی محیط کشت، ۲/۸ گرم پودر نوترینت آگار استفاده و سوسپانسیون بدست‌آمده اتوکلاو شد. سه زیرگونه باکتری شامل *B. thuringiensis* subspecies *thuringiensis* (*Btt*) (PTCC No. 1385)، *B. thuringiensis* subspecies *aizawai* (*Bta*) (PTCC No. 1368) و *B. thuringiensis* subspecies *galleriae* (*Btg*) (PTCC No. 1375) (تهیه‌شده از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران) درون ظروف پتری کشت شدند. در این مرحله محیط کشت حاوی باکتری به مدت دو هفته در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت تا اسپور و کریستال تولید شود (Yilmaz *et al.*, 2012).

بررسی بیمارگری سه زیرگونه‌ی مختلف باکتری *B. thuringiensis* علیه *E. kuehniella*

برای این منظور، سه زیرگونه مختلف باکتری (*Btg* و *Bta*، *Btt*) استفاده شد. برای هر زیرگونه سه تکرار در نظر گرفته شد. برای آلوده‌سازی بستر غذایی لارو با باکتری، از غلظت 10^9 اسپور در میلی‌لیتر استفاده شد. درون هر ظرف پتری (به قطر ۵/۸ سانتی‌متر) یک گرم بستر غذایی و یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد. برای انجام آزمایش‌ها از واحد آزمایشگاهی شامل ظرف پتری (به قطر ۵/۸ سانتی‌متر) با در منفذدار با توری حاوی بستر غذایی آلوده به باکتری استفاده شد. در هر واحد آزمایشگاهی شرح داده شده در بالا یعنی ظروف پتری حاوی بسترهای غذایی آلوده به باکتری *Bt*، ۱۵ لارو ۱۲ روزه قرارگرفت و مرگ بطور روزانه تا ۱۰ روز ثبت شد (دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت 55 ± 5 درصد و دوره‌ی نوری ۱۶:۸ روشنایی: تاریکی). شاهد شامل ظرف پتری حاوی بستر غذایی تنها آغشته به توئین ۰/۰۲ درصد بود.

بررسی اثر دما و زیرگونه‌های مختلف باکتری *B. thuringiensis* بر تعداد گره‌های خون و برخی پارامترهای زیستی *E. kuehniella*

برای انجام این آزمایش، درون هر ظرف پتری حاوی بسترهای غذایی آلوده به باکتری شرح داده شده در آزمایش قبل، ۱۰ عدد لارو ۲۴ روزه اضافه شد و سپس، در ظرف پتری با پارافیلیم محکم شد. این آزمایش در سه دمای مختلف (۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سلسیوس)، رطوبت نسبی 55 ± 5 درصد و دوره‌ی نوری ۱۶:۸ (روشنایی: تاریکی) انجام شد. در هر دما از سه زیرگونه مختلف باکتریایی (*Btg* و *Bta*، *Btt*) استفاده شد. برای هر دما ۱۵ عدد ظرف پتری استفاده شد. یعنی برای هر زیرگونه باکتری، پنج تکرار در هر دما تهیه شد.

از هر پنج تکرار سه عدد ظرف پتری برای بررسی همولنف استفاده شد و دو ظرف برای ثبت برخی پارامترهای زیستی، نگهداشته شد. ده عدد لارو ۲۴ روزه در هر ظرف پتری قرار داده شد. لاروها هر روز به مدت یک ماه از شروع آزمایش بررسی شدند و مدت زمان از لارو سن پنج تا شفیره، تعداد لاروهای شفیره شده و تعداد حشرات کامل ظاهر شده ثبت شد (Mostafa *et al.*, 2005). پانزده ظرف پتری نیز حاوی بستر غذایی غیرآلوده (تنها آغشته به توئین ۰/۰۲ درصد)، بعنوان شاهد برای هر دما تهیه شد.

شمارش گره‌ها در خون لاروهای *E. kuehniella*

پس از گذشت ۴۸ ساعت از شروع آزمایش و تغذیه‌ی لاروها از بستر غذایی آلوده به باکتری، سه عدد از ظروف پتری حاوی ۱۰ عدد لارو برای گرفتن خون و شمارش گره‌ها انتخاب شد. ۱۰ عدد لارو بصورت تصادفی انتخاب و درون یک ظرف شیشه‌ای قرار گرفتند. با یک سوزن نازک و استریل شده با الکل، رگ پشتی لاروها سوراخ و سپس، قطره خون خارج شده توسط لوله‌ی موئین جمع‌آوری و روی لام گلبول‌شمار منتقل شد. سپس، تعداد گره‌ها زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی $\times 400$ شمارش شد (Mostafa *et al.*, 2005).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایشات فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی طراحی شد و برای تجزیه واریانس تمام پارامترها از برنامه‌ی GLM در نرم‌افزار SAS استفاده شد. پس از تجزیه واریانس (برنامه ANOVA)، در صورت معنی‌دار شدن آزمون، مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از روش توکی در سطح پنج و یک درصد انجام شد.

یافته‌های پژوهش

تعیین و مقایسه بیماری‌گری سه زیرگونه مختلف باکتری *B. thuringiensis*

نتایج نشان داد که بیشترین میزان مرگ و میر متعلق به زیرگونه‌ی *Btt* بود که با دو زیرگونه‌ی دیگر یعنی *Btg* و *Bta* تفاوت معنی‌دار داشت ($F=119/39$, $df=3$ و 11 , $P<0/05$) (جدول ۱). در حالی که، دو زیرگونه‌ی *Btg* و *Bta* از نظر میانگین مرگ و میر ایجادشده در بیدارد با هم تفاوت معنی‌دار نداشتند ($F=119/39$, $df=3$ و 11 , $P>0/05$).

جدول ۱. مرگ و میر ایجاد شده (میانگین \pm انحراف معیار) توسط زیرگونه‌های مختلف باکتری *Bt* (*Btt=B.thuringiensis subsp thuringiensis*, *Btg=B.thuringiensis subsp galleriae* و *Bta=B.thuringiensis subsp aizawai*) و شاهد (توئین ۰/۰۲ درصد).

Table 1. Mortality (Mean \pm Standard Error) caused by different subspecies of *Bt* (*Btt= B. thuringiensis subsp thuringiensis*, *Bta= B. thuringiensis subsp aizawai*, *Btg=B. thuringiensis subsp galleriae*) and control (0.02%)

Bacterium	<i>Btg</i>	<i>Bta</i>	<i>Btt</i>	Control
Mortality	10.67 \pm 1.20 b	11.00 \pm 0.58 b	13.67 \pm 0.67 a	00.00 c

میانگین‌ها با حروف متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند (آزمون توکی، $P<0/05$).

Means followed by different letters are significantly different (Tukey's test, $P<0.05$).

اثر دما و زیرگونه‌های مختلف باکتری *B. thuringiensis* بر تعداد گره‌های خون و برخی پارامترهای زیستی *E. kuehniella*

نتایج مربوط به مقایسه‌ی میانگین تعداد گره، مدت زمان تا شفیره‌شدن لاروها، تعداد شفیره‌ها و حشرات کامل تولیدشده در سه دمای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه‌ی سلسیوس بدون در نظر گرفتن اثر سویه‌های مختلف باکتری *Bt*، در جدول ۲ نشان داده شده‌است. میانگین تعداد گره تشکیل‌شده در خون لاروها در هر سه دمای آزمایش‌شده اختلاف معنی‌دار داشت ($P\leq 0/01$ ، $F=25/83$ ، $df=11$ و 39). بالاترین مقدار گره در دمای ۳۰ درجه‌سلسیوس و کم‌ترین مقدار مربوط به دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس بود. در بررسی مدت زمان تا شفیره‌شدن لاروها در هر سه دمای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه‌ی سلسیوس اختلاف معنی‌دار مشاهده‌شد ($P\leq 0/01$ ، $F=59/44$ ، $df=11$ و 26 ، $P\leq 0/01$)، کمترین زمان تا شفیره‌شدن لاروها مربوط به دمای ۳۰ و بیشترین مربوط به دمای ۲۰ درجه‌سلسیوس بود.

در تعداد شفیره‌های تولیدشده بین دمای ۲۵ درجه‌ سلسیوس با دو دمای دیگر اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($P>0/01$ ، $F=6/24$ ، $df=11$ و 26). اما، بین دمای ۲۰ و ۳۰ درجه‌سلسیوس اختلاف معنی‌دار مشاهده‌شد ($P\leq 0/01$ ، $F=6/24$ ، $df=11$ و 26). به‌طوری‌که، تعداد شفیره‌های تولیدشده در دمای ۲۰ بیشتر از ۳۰ درجه‌سلسیوس بود (جدول ۲). این روند در مورد تعداد حشرات کامل تولیدشده نیز صادق بود و میانگین آن در دمای ۲۰ بیشتر از دمای ۳۰ درجه‌سلسیوس بود و بین این دو دما اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P\leq 0/01$ ، $F=4/30$ ، $df=11$ و 26). بین تعداد حشرات تولیدشده در دمای ۲۵ درجه‌ سلسیوس با دو دمای دیگر اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($F=4/30$ ، $df=11$ و 26 ، $P>0/01$).

جدول ۲. میانگین (\pm انحراف معیار) گره، مدت زمان تا شفیره شدن لاروها، تعداد شفیره‌ها و حشرات کامل تولیدشده *E. kuehniella* تحت تأثیر سه دمای مختلف

Table 2. Mean (\pm Standard Error) number of nodules, time until larvae pupation, number of produced pupae, and adults of *E. kuehniella* affected by three different temperatures

Temperature Parameters	20 °C	25 °C	30 °C
No. of nodule (No./ml)	6.53 \pm 0.97 ^b	5.15 \pm 0.94 ^c	9.15 \pm 1.65 ^a
Time to pupation (Day)	6.33 \pm 0.16 ^a	5.33 \pm 0.16 ^b	4.44 \pm 0.17 ^c
No. of pupa	6.88 \pm 0.58 ^a	6.33 \pm 0.83 ^{ab}	5.22 \pm 0.60 ^b
No. of adult	5.66 \pm 0.44 ^a	4.88 \pm 0.69 ^{ab}	3.77 \pm 0.60 ^b

میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ردیف از نظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند (آزمون توکی، $P<0/01$).

Means followed by different letters in each row are significantly different (Tukey's test, $P<0.01$).

نتایج مربوط به میانگین تعداد گره تشکیل شده، مدت زمان تا شفیره شدن لاروها، تعداد شفیره و تعداد حشرات کامل تولید شده تحت تأثیر سه زیرگونه باکتری و شاهد، بدون در نظر گرفتن اثر دماهای مختلف، در جدول ۳ آورده شده است. میانگین گره تشکیل شده بین دو زیرگونه *Btt* و *Btg* تفاوت معنی داری را نشان نداد ($F=۲۵/۸۳$, $df=۱۱$ و ۳۹ , $P>۰/۰۱$). بین زیرگونه *Bta* و دو زیرگونه دیگر از نظر تعداد گره تشکیل شده در خون لارو تفاوت معنی دار وجود داشت ($F=۲۵/۸۳$, $df=۱۱$ و ۳۹ , $P\leq ۰/۰۱$) و مقدار گره در زیرگونه *Bta* بیشتر از سایر زیرگونه‌ها بود. بین سه زیرگونه باکتری و شاهد تفاوت معنی دار مشاهده شد ($P\leq ۰/۰۱$ ، $F=۲۵/۸۳$, $df=۱۱$ و ۳۹)، به طوری که، کمترین میزان تشکیل گره مربوط به تیمار شاهد بود.

جدول ۳. میانگین (\pm انحراف معیار) گره، مدت زمان تا شفیره شدن لاروها، تعداد شفیره و حشرات کامل تولید شده بید آرد تحت تأثیر زیرگونه‌های مختلف باکتری (*Bt*=*B.thuringiensis subsp thuringiensis*, *Btt*=*B.thuringiensis subsp aizawai*, *Bta*=*B.thuringiensis subsp galleriae* و *Btg*=*B.thuringiensis subsp thuringiensis*) و شاهد (توئین ۰/۰۲ درصد)

Table 3. Mean (\pm Standard Error) number of nodules, time until larvae pupation, number of produced pupae and adults of *E. thuringiensis subsp B. thuringiensis subsp thuringiensis*, *Bta*= *B. kuehniella* affected by different subspecies of *Bt* bacterium (*Btt*= Tween 80) *thuringiensis subsp galleriae*) and control (0.02% *B. aizawai*, *Btg*=

Bacterium	<i>Btt</i>	<i>Bta</i>	<i>Btg</i>	Control
No. of nodule (No./ml)	8.78 \pm 0.75 ^b	11.33 \pm 0.91 ^a	8.44 \pm 1.35 ^b	1.46 \pm 0.15 ^c
Time to pupation (Day)	5.00 \pm 0.36 ^b	5.16 \pm 0.30 ^b	5.00 \pm 0.36 ^b	6.00 \pm 0.28 ^a
No. of pupa	4.00 \pm 0.45 ^b	7.66 \pm 0.61 ^a	4.66 \pm 0.66 ^b	7.55 \pm 0.15 ^a
No. of adult	3.16 \pm 0.70 ^b	5.66 \pm 0.76 ^a	3.66 \pm 0.55 ^b	6.00 \pm 0.33 ^a

میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ردیف از نظر آماری اختلاف معنی دار دارند (آزمون توکی، $P<۰/۰۱$).
Means followed by different letters in each row are significantly different (Tukey's test, $P<0.01$).

در مدت زمان تبدیل شدن لارو ۲۴ روزه به شفیره بین سه باکتری اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۱$ ، $df=۱۱$ و ۲۶ ، $F=۵۹/۴۴$). اما، بین تیمارهای حاوی باکتری و شاهد اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P\leq ۰/۰۱$ ، $df=۱۱$ و ۲۶ ، $F=۵۹/۴۴$). طولانی ترین مدت مربوط به تیمار شاهد بود. تعداد شفیره‌های تولید شده هنگامی که لارو بید آرد از باکتری *Btt* و *Btg* تغذیه کرده است به طور معنی دار کمتر از زمانی بود که از باکتری *Bta* تغذیه داشته است ($P\leq ۰/۰۱$ ، $df=۱۱$ و ۲۶ ، $F=۶/۲۴$). در حالی که، تیمار اخیر با شاهد تفاوت معنی دار نداشت. بین دو تیمار با زیرگونه‌های *Btt* و *Btg* نیز اختلاف معنی دار مشاهده نشد ($P>۰/۰۱$ ، $df=۱۱$ و ۲۶ ، $F=۶/۲۴$).

روند فوق در مورد تعداد حشرات کامل تولید شده نیز صادق بود. به طوری که، بین زیرگونه‌های *Btt* و *Btg* از نظر تعداد حشرات کامل تولید شده اختلاف معنی دار وجود نداشت ($P>۰/۰۱$ ، $df=۱۱$ و ۲۶ ، $F=۴/۳۰$) و بیشترین تولید حشرات کامل به طور معنی دار مربوط به تیمار با زیرگونه *Bta* و لاروهای موجود در شاهد بود ($P\leq ۰/۰۱$ ، $df=۱۱$ و ۲۶ ، $F=۴/۳۰$). تأثیر سه زیرگونه باکتری *Bt* روی تعداد گره تشکیل شده در خون لارو، مدت زمان تبدیل شدن لارو ۲۴ روزه به شفیره، تعداد شفیره‌ها و حشرات کامل تولید شده *E. kuehniella* در سه دمای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سلسیوس بررسی و نتایج در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۴. تأثیر سه زیرگونه مختلف باکتری (*Bta=B.thuringiensis subsp aizawai*, *Btt=B.thuringiensis subsp thuringiensis*) *Bt* و شاهد (توئین ۰/۰۲ درصد) بر تعداد گره تشکیل شده در خون لارو، مدت زمان تبدیل شدن به شفیره، تعداد شفیره‌ها و حشرات کامل تولیدشده بید آرد در سه دمای مختلف

thuringiensis B. thuringiensis subsp thuringiensis), *Bta= B. Table 4.* The effect of three different subspecies of *Btt* bacterium (*Btt= Tween 80*) on the number of nodules formed in larval *thuringiensis subsp galleriae*) and control (0.02% *B. subsp aizawai*, *Btg= hemolymph*, the duration of larvae turning into pupae, and adults of produced pupae, and adults of Mediterranean flour moth at three different temperatures

Bacterium	Parameter	Temperature		
		20 °C	25 °C	30 °C
<i>Btt</i>	No. of nodule (No./ml)	8.33 ± 0.88 ^c	7.33 ± 0.45 ^c	10.67 ± 0.88 ^b
	Time to pupation (Day)	6.00 ± 0.00 ^b	5.00 ± 0.00 ^c	4.00 ± 0.00 ^d
	No. of pupa	4.50 ± 0.50 ^b	4.05 ± 0.50 ^b	3.00 ± 0.00 ^b
	No. of adult	4.50 ± 0.50 ^a	4.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^b
<i>Bta</i>	No. of nodule (No./ml)	10.33 ± 0.88 ^b	9.33 ± 0.88 ^c	14.33 ± 1.20 ^a
	Time to pupation (Day)	6.00 ± 0.500 ^b	5.00 ± 0.00 ^c	4.50 ± 0.50 ^{cd}
	No. of pupa	8.50 ± 0.50 ^a	8.00 ± 1.00 ^a	6.50 ± 0.50 ^b
	No. of adult	6.50 ± 0.50 ^a	6.00 ± 0.20 ^a	4.50 ± 0.50 ^a
<i>Btg</i>	No. of nodule (No./ml)	7.00 ± 0.57 ^{cd}	5.33 ± 0.33 ^d	13.00 ± 1.30 ^a
	Time to pupation (Day)	6.00 ± 0.00 ^b	5.00 ± 0.00 ^c	4.00 ± 0.00 ^d
	No. of pupa	6.00 ± 0.10 ^b	3.50 ± 0.50 ^b	4.50 ± 0.50 ^b
	No. of adult	4.50 ± 0.50 ^a	2.50 ± 0.50 ^b	4.00 ± 0.00 ^a
Control	No. of nodule (No./ml)	1.00 ± 0.00 ^c	1.00 ± 0.00 ^c	1.00 ± 0.00 ^c
	Time to pupation (Day)	6.00 ± 0.00 ^b	6.00 ± 0.00 ^b	5.00 ± 0.00 ^c
	No. of pupa	9.00 ± 0.00 ^a	9.00 ± 0.00 ^a	6.00 ± 0.00 ^b
	No. of adult	6.50 ± 0.50 ^a	6.50 ± 0.50 ^a	5.00 ± 0.00 ^a

میانگین‌ها با حروف متفاوت در ردیف‌ها و ستون‌ها برای هر پارامتر از نظر آماری اختلاف معنی دار دارند (آزمون توکی، $P < 0.01$).

Means followed by different letters rows and columns for each parameter are significantly different (Tukey's test, $P < 0.01$).

نتایج نشان داد، تأثیر متقابل باکتری و دما بر تعداد گره تشکیل شده در خون لارو، مدت زمان تبدیل شدن لارو ۲۴ روزه به شفیره، تعداد شفیره‌ها و حشرات کامل تولیدشده بید آرد معنی دار بود (جدول ۴). در مورد هر سه زیرگونه باکتری، بیشترین تعداد گره به طور معنی دار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تشکیل شد ($P < 0.01$ ، $df=11$ و 39 ، $F=59/50$). کمترین میزان گره به طور معنی دار در شاهد مشاهده شد که نشان داد دما تأثیری بر تعداد گره تشکیل شده در خون لارو ندارد ($P > 0.01$ ، $df=11$ و 39 ، $F=59/50$).

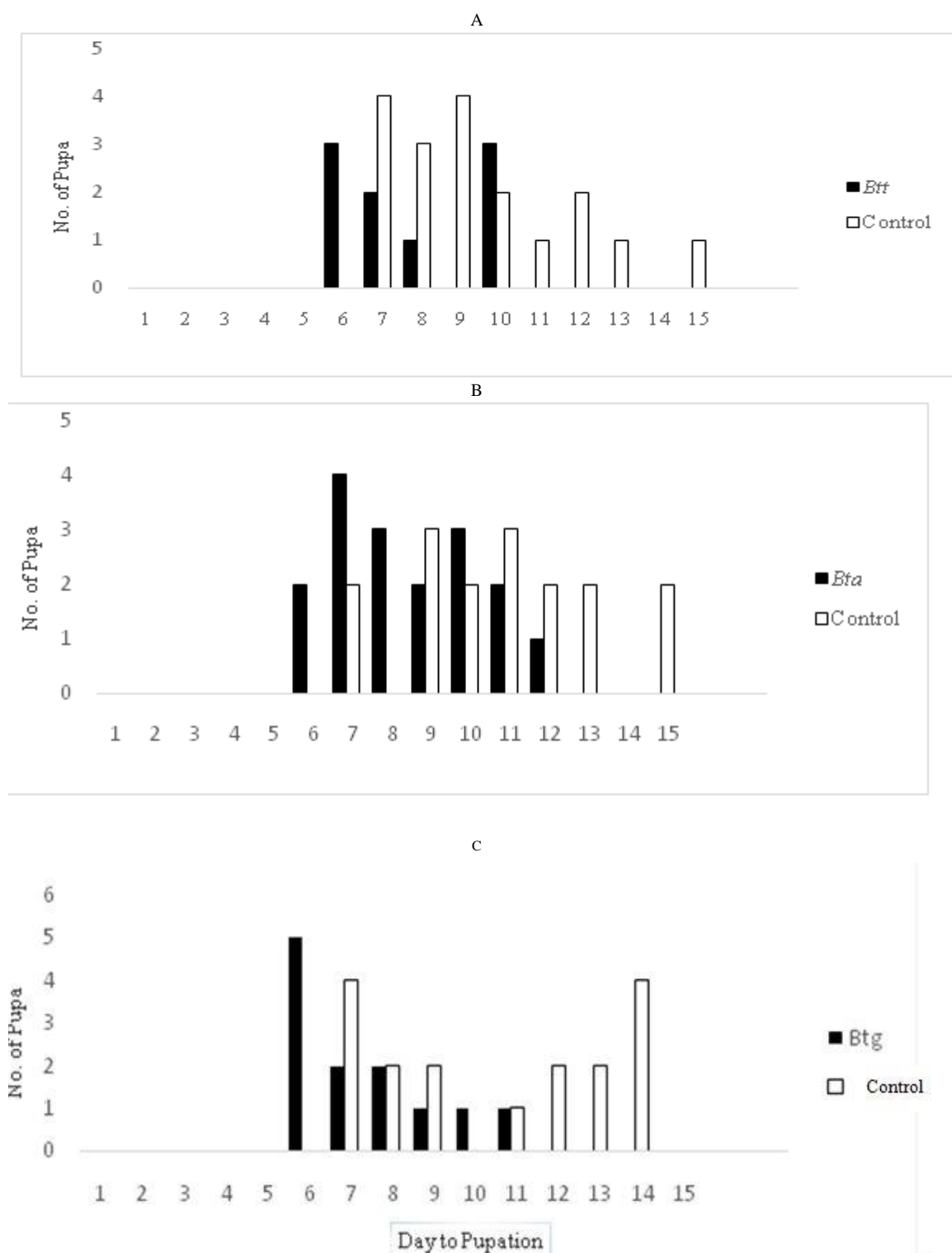
بر اساس جدول ۴، به طور معنی دار بیشترین تعداد گره تحت تأثیر زیرگونه‌های *Btg* و *Bta* در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تشکیل شد ($P < 0.01$ ، $df=11$ و 39 ، $F=59/50$). کمترین میزان گره به طور معنی دار در شاهد مشاهده شد. تعداد گره در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تحت تأثیر زیرگونه *Btg* به طور معنی دار کاهش یافت ($P < 0.01$ ، $df=11$ و 39 ، $F=59/50$). در دمای ۲۰ درجه سلسیوس بین هر سه زیرگونه باکتری (*Btg* و *Bta*، *Btt*) و شاهد اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P < 0.01$ ، $df=11$ و 39 ، $F=59/50$). بدین صورت که، بیشترین و کمترین تعداد گره به طور معنی دار به ترتیب تحت تیمار با زیرگونه‌های *Btg* و *Bta* تشکیل شد ($P < 0.01$ ، $df=11$ و 39 ، $F=59/50$).

مدت زمان تا شفیره شدن لاروهای ۲۴ روزه، در هر دما بین سه زیرگونه اختلاف معنی‌دار نداشت ($P > 0.01$ ، $df = 11$ و 39 ، $F = 63/0.8$). اما، در بین دماهای مختلف در هر زیرگونه اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P < 0.01$ ، $df = 11$ و 39 ، $F = 63/0.8$). همچنین، این مدت زمان در شاهد به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر دما قرار گرفت ($P < 0.01$ ، $df = 11$ و 39 ، $F = 63/0.8$)؛ به طوری که، این فرایند در دمای ۲۰ بیشتر از ۳۰ درجه سلسیوس طول کشید.

تعداد شفیره تولیدشده در هر یک از زیرگونه‌های *Btg* و *Btt* در هر سه دما یکسان بود و اختلاف معنی‌داری بین دماهای مختلف مشاهده نشد ($P > 0.01$ ، $df = 11$ و 39 ، $F = 12/28$). اما، در زیرگونه *Bta* در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تولید شفیره به‌طور معنی‌دار کاهش یافت ($P < 0.01$ ، $df = 11$ و 39 ، $F = 12/28$) که این نتیجه مشابه شاهد بود. بیشترین میزان تولید شفیره مربوط به دماهای ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس در زیرگونه *Bta* و تیمار شاهد بود که با هم اختلاف معنی‌دار نداشتند ($P > 0.01$ ، $df = 11$ و 39 ، $F = 12/28$). در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، تفاوت معنی‌دار در تعداد شفیره تولیدشده بین سه زیرگونه مورد مطالعه مشاهده نشد.

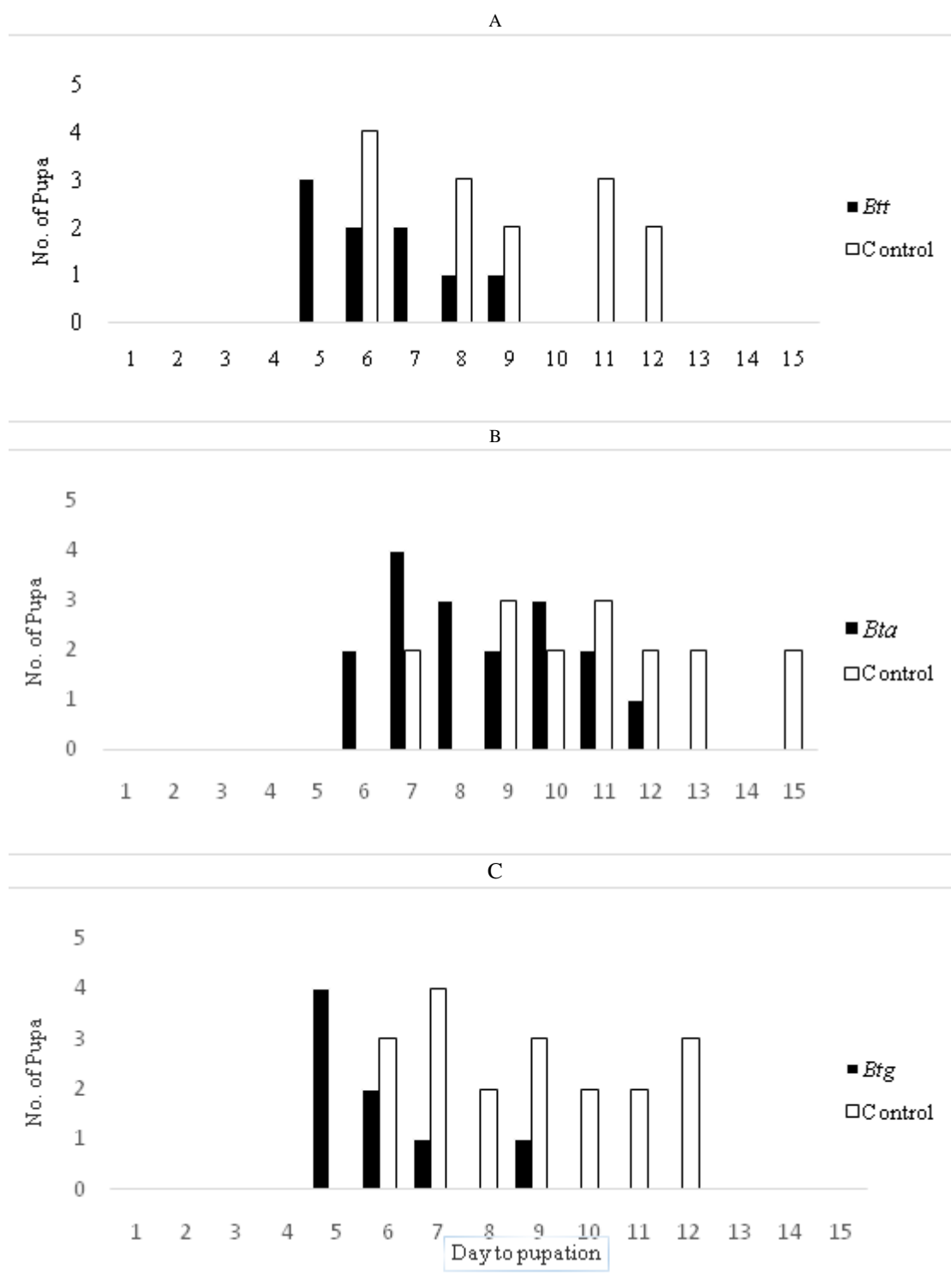
تعداد حشرات کامل بدست‌آمده در تیمار *Bta* مشابه شاهد تحت تأثیر دما قرار نگرفت ($P > 0.01$ ، $df = 11$ و 39 ، $F = 11/98$). در حالی که، در زیرگونه‌های *Btg* و *Btt* کمترین تعداد به‌طور معنی‌دار به ترتیب در دمای ۳۰ و ۲۵ درجه سلسیوس بدست‌آمد ($P < 0.01$ ، $df = 11$ و 39 ، $F = 11/98$). به عبارت دیگر، تفاوت معنی‌دار در تعداد حشرات کامل بدست‌آمده میان سه زیرگونه باکتری در دو دمای ۲۵ و ۳۰ درجه آشکار شد که کمتر از شاهد بودند.

اثر تغذیه لارو ۲۴ روزه از زیرگونه‌های مختلف باکتری *Bt* بر پراکنش فراوانی مدت زمان تا شفیرگی بید آرد در دماهای مختلف بررسی شد (شکل‌های ۱ تا ۳). به طور کلی، در تیمار باکتریایی میانگین مدت زمان تبدیل شدن لاروها به شفیره نسبت به شاهد کمتر بود.



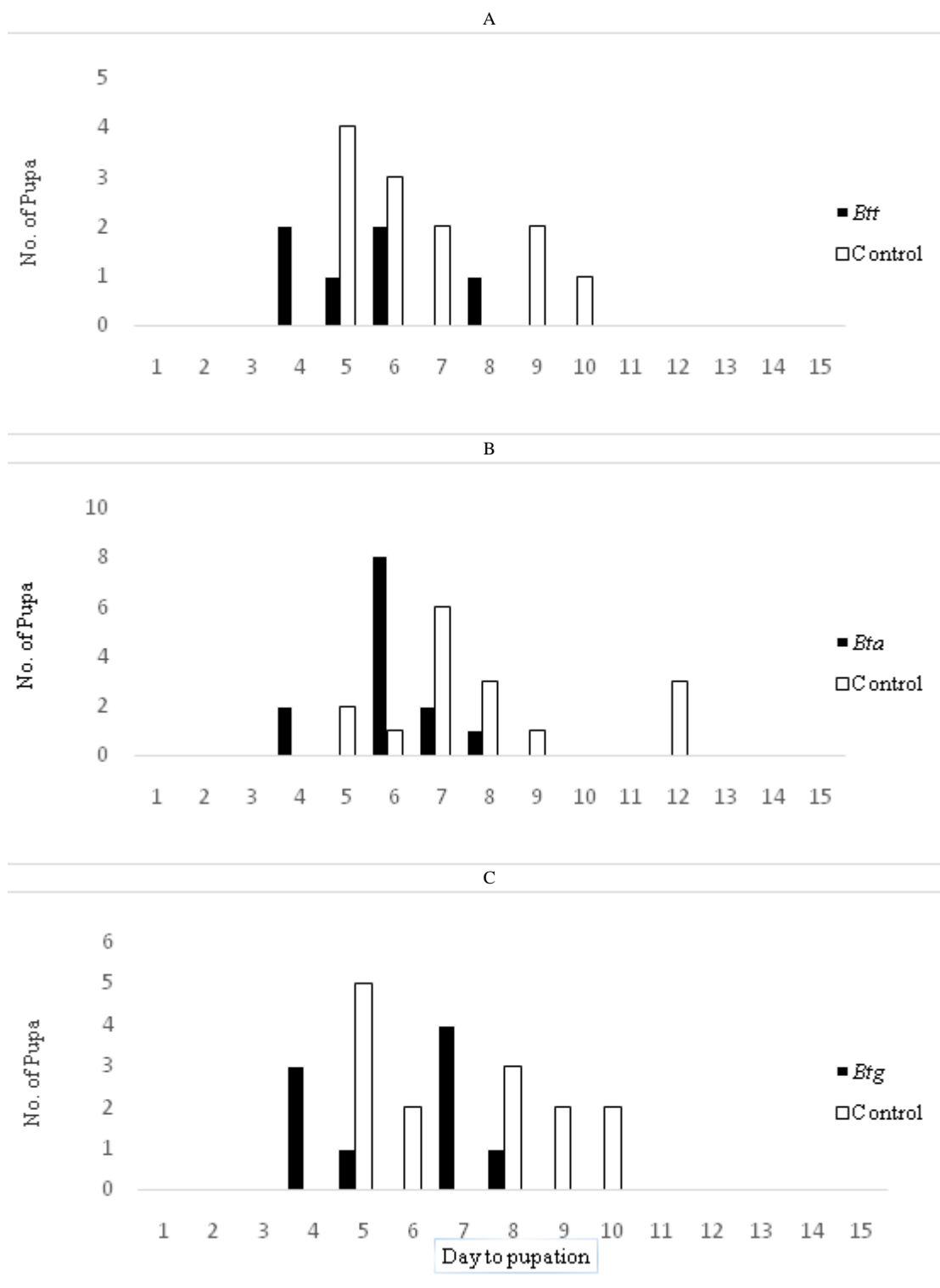
شکل ۱. اثر زیرگونه‌های مختلف باکتری *Bt* (الف: *Btt*=*B.thuringiensis* subsp *thuringiensis*، ب: *Bta*=*B.thuringiensis* subsp *aizawai*، ج: *Btg*=*B.thuringiensis* subsp *galleriae*) بر پراکنش فراوانی روزها تا شفیره‌گی بید آرد در دمای ۲۰ درجه سلسیوس

Figure 1. The effect of *Bt* subspecies (A: *Btt*= *B. thuringiensis* subsp *thuringiensis*, B: *Bta*= *B. thuringiensis* subsp *aizawai*, C: *Btg*= *B.thuringiensis* subsp *galleriae*) on the frequency distribution of days to pupation of Mediterranean flour moth at 20 °C



شکل ۲. اثر زیرگونه‌های مختلف باکتری *Bt* (الف: *Btt=B.thuringiensis subsp thuringiensis*، ب: *Bta=B. thuringiensis subsp aizawai*، ج: *Btg=B. thuringiensis subsp galleriae*) بر پراکنش فراوانی روزها تا شفیره‌گی بید آرد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس

Figure 2. The effect of *Bt* subspecies (A: *Btt= B. thuringiensis subsp thuringiensis*, B: *Bta= B. thuringiensis subsp aizawai*, C: *Btg= B.thuringiensis subsp galleriae*) on the frequency distribution of days to pupation of Mediterranean flour moth at 25 °C



شکل ۳. اثر زیرگونه‌های مختلف باکتری *Bt* (الف: *Btt=B. thuringiensis subsp thuringiensis*، ب: *Bta=B. thuringiensis subsp aizawai*، ج: *Btg=B. thuringiensis subsp galleriae*) بر پراکنش فراوانی روزها تا شفیره‌گی بید در دمای ۳۰ درجه سلسیوس

Figure 3. The effect of *Bt* subspecies (A: *Btt= B. thuringiensis subsp thuringiensis*, B: *Bta= B. thuringiensis subsp aizawai*, C: *Btg= B.thuringiensis subsp galleriae*) on the frequency distribution of days to pupation of Mediterranean flour moth at 30 °C

بحث

معیارهای شدت بیمارگری، با سنجش پاسخ میزبان به دوز کشندگی مرتبط است (Shapiro-Ilan et al., 2005). غربالگری سویه‌های دارای زهرآگینی بالا، مهمترین مرحله در تولید سموم بیولوژیک است (Alves, 1998). بیمارگری و شدت آن اغلب پارامترهای قابل ارزیابی هستند؛ اما، اثرات سموم روی میزبان‌هایی که زنده مانده‌اند نیز باید در نظر گرفته شود. زیرا ممکن است روند فیزیولوژیکی حشرات زنده مانده تحت تأثیر سم قرار گیرد و منجر به ایجاد لاروهای بی‌ضرر شوند (Rabinovitch et al., 2017).

در تحقیق حاضر، قبل از بررسی اثر دما و باکتری *Bt* روی تشکیل گره در سیستم ایمنی و برخی پارامترهای زیستی بیدهای آرد زنده مانده، ابتدا بیمارگری سه زیرگونه باکتری *Bta*، *Btg* و *Btt* روی لاروهای جوان بید آرد *E. kuehniella* تعیین شد. بیشترین مرگ به‌طور معنی‌دار در لاروهای بید آرد توسط زیرگونه *Btt* ایجاد شد. در تحقیقی دیگر، سمی‌ترین جدایه شناسایی شده از ترکیه، SY49.1، علیه بیدآرد حاوی ژن‌های خانواده *cry1* بود (Yilmaz et al., 2012). علاوه بر این، بیدآرد نسبت به جدایه جدید BLB250، حاوی ژن *cryIA*، بسیار حساس بود (BenFarhat-Touzri et al., 2016). کمترین میزان مرگ و میر ثبت‌شده مربوط به دو زیرگونه *Bta* و *Btg* و فاقد تفاوت معنی‌دار بود. اگرچه، هر سه زیرگونه فوق حاوی ژن‌های خانواده *cry1* هستند (Kalman et al., 1993; Seifinejad et al., 2008) که به طور گسترده برای کنترل حشرات آفت متعلق به راسته بالپولکداران استفاده شده‌اند؛ ولی بیمارگری متفاوتی نشان دادند.

با توجه به بیمارگری پایین برخی سویه‌های باکتری *Bt*، می‌توان گفت افزایش مقاومت حشرات به آفت‌کش‌ها بزرگ‌ترین تهدید برای موفقیت‌های به‌دست‌آمده در کنترل آفات از طریق استفاده از باکتری *Bt* است. در ابتدا باور بر این بود که حشرات به عوامل بیولوژیک مقاومت نشان نمی‌دهند. اما، اولین گزارش از مقاومت حشرات به *Bt* در سال ۱۹۸۵ مربوط به شب‌پره هندی *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) بود. برخی آفات دیگر نظیر شب‌پره پشت الماسی *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) در سطح مزرعه و برخی مانند *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) در سطح آزمایشگاهی توانایی تکامل مقاومت به *Bt* را نشان داده‌اند (Tabashnik et al., 2009).

در رابطه با مکانیسم مقاومت حشرات به باکتری *Bt* عوامل مختلفی دخیل هستند. همانگونه که پیش‌تر هم گفته شد بسیاری از مطالعات نشان دادند که پاسخ‌های ایمنی حشرات به مقاومت به *Bt* مرتبط است (Dubovskiy et al., 2016; Wei et al., 2018). یکی از پاسخ‌های ایمنی، تشکیل گره در خون حشرات میزبان است و به‌طور کمی، مهم‌ترین پاسخ به آلودگی‌های باکتریایی است (Nation, 2016).

اثرات تغییرات محیطی بر پاسخ ایمنی حشرات به طور کلی ضعیف است (Bauerfeind and Fischer, 2014). از آنجایی که دما بر تعداد گره‌ها در شاهد تأثیری نداشت، چنین استنباط می‌شود که افزایش دما با تأثیر بر باکتری *Bt*، تعداد گره‌های تشکیل‌شده را در لاروهای زنده‌مانده افزایش داده و همچنین، نوع زیرگونه باکتری به‌طور معنی‌دار بر آن تأثیر داشته است. مطلوب‌ترین دامنه دمایی که در آن باکتری *Bt* سم تولید می‌کند ۲۸ تا ۳۲ درجه سلسیوس گزارش شده است و در کل، تخمیر در ۳۰ درجه سلسیوس انجام می‌شود (Li et al., 2017). به‌نظر می‌رسد به این دلیل، تیمار لاروها با زیرگونه *Bta* و *Btg* در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بالاترین تعداد گره‌های تشکیل‌شده در خون لارو بید آرد را بدون تفاوت معنی‌دار بین این دو زیرگونه ایجاد کرده است. شاید این امر باعث شده است تا این دو تیمار تفاوتی در تعداد سفیره و حشرات کامل ایجادشده با شاهد نداشته باشند. اما، این مسأله تا حدودی با کاهش دما به ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس بین سه زیرگونه تغییر کرد. چنین استنتاج می‌شود که ویژگی‌های فیزیولوژیکی هر زیرگونه از عوامل میکروبی به‌خاطر نوع مواد شیمیایی و متابولیت‌ها متفاوت است و پاسخ‌های ایمنی مختلفی توسط حشره بروز می‌کند (Vilcinskas and Matha, 1997).

بیشترین تعداد شفیره در تیمار لاروها با زیرگونه *Bta* در دو دمای پایین بدون تفاوت معنی دار با شاهد بدست آمد. اما، کمترین تعداد حشرات کامل بدست آمده تحت تأثیر زیرگونه‌های *Btg* و *Btt* به ترتیب در دماهای ۳۰ و ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده شد. در مجموع، به نظر می‌رسد لاروهای بید آرد زنده مانده تا حدودی نسبت به دو زیرگونه *Btg* و *Btt* حساس تر بودند. به طور کلی، نتایج تحقیق حاضر نشان داد در هر دما هر زمان که گره بیشتری تشکیل شده، تعداد شفیره و/یا حشرات کامل تقریباً مشابه شاهد بدست آمده است.

در تحقیقی دیگر نشان داده شده است که حساسیت لاروهای پشه *Aedes stimulans* (Walker) (Diptera: Culicidae) نسبت به باکتری *Bt* با افزایش سن لاروی و دما، کاهش یافته است (Wraight et al., 1981). قابل ذکر است آزمون بیماری‌گری روی لاروهای ۱۲ روزه و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و آزمایش‌های مربوط به تأثیر دما بر تولید گره و سایر موارد، روی لارو ۲۴ روزه انجام شد و برای برقراری ارتباط بین نتایج این دو مقوله باید به این مسأله توجه شود. بنابراین، سن لاروی و دمای محیطی باید برای کنترل موثر حشره آفت میزبان با استفاده از باکتری *Bt* در نظر گرفته شود (Yilmaz et al., 2013). به نظر می‌رسد شب‌پره آرد در دمای بالا مقاومت بیشتری در برابر باکتری از خود نشان داده است.

به طور قطع، عوامل دیگری نیز وجود دارند که می‌توانند میزان اثرات باکتری *Bt* روی بیدآرد را تغییر دهند و باید در مورد سه زیرگونه باکتری فوق بررسی شوند. به عنوان مثال، در روده‌ی لاروهای *Bt* که باکتری *Bt* به آن‌ها وارد شده یک ماده انعقاد خون افزایش یافته و با اتصال به سم *Bt*، به صورت بالقوه باعث غیرفعال شدن آن در روده شده است (Rahman et al., 2007).

تحلیل نتایج دیگر پژوهش حاضر نشان داد که افزایش دما باعث شد تا لاروهای ۲۴ روزه سریع‌تر وارد مرحله شفیرگی شوند. این روند در تیمار باکتریایی (در هر یک از زیرگونه‌ها) و شاهد مشاهده شد. البته، لاروهای آلوده به باکتری حتی زودتر از لاروهای سالم وارد مرحله شفیرگی شدند. به نظر می‌رسد این استراتژی، برای فرار از اثرات سوء باکتری و افزایش دما باشد. زیرا ثابت شده است که حساسیت لاروهای بالپولکداران نسبت به سموم باکتری *Bt* از حشرات کاملی که لاروهای آن‌ها قبلاً در معرض باکتری بوده‌اند، بیشتر است (Carriere et al. 2009; Lu et al. 2012). همچنین، دوزهای بالا از سموم باکتری *Bt* (Cry1Ca و Cry1Ac)، باعث کاهش معنی‌دار طول دوره زندگی *S. exigua* و *H. armigera* شده است (Zhang et al., 2013).

در مطالعه حاضر، رطوبت نسبی ثابت و 55 ± 5 درصد در نظر گرفته شد و مشابه بررسی مصطفی و همکاران در رطوبت ۴۳ درصد که نزدیک به رطوبت تحقیق حاضر بود، با افزایش دما تعداد گره افزایش و مدت زمان تا ایجاد شفیره کاهش یافت (Mostafa et al., 2005). مشابه تحقیق حاضر، نشان داده شد که واکنش دفاع سلولی سن خون‌خوار *Rhodnius prolixus* (Stål) (Hemiptera: Reduviidae) در مقابل باکتری *Escherichia coli* با افزایش تعداد سلول‌های خونی و تغییرات مرفولوژیکی شدید این سلول‌ها همراه بود که در نهایت باعث غلبه سیستم ایمنی حشره بر این باکتری شد (Borges et al., 2008).

نتایج نشان داد که در تیمارهای باکتریایی از روز نهم پس از آلودگی در دمای بالا و روز سیزدهم پس از آلودگی در دمای پایین، دیگر شفیره‌ای ایجاد نشده است. به نظر می‌رسد این مسأله بخاطر مرگ تعدادی از لاروها در اثر باکتری اتفاق افتاده است و در هر سه دما در مورد زیرگونه *Btt* مشهودتر است. در مجموع با توجه به نتایج، اثر دما و زیرگونه‌های مختلف باکتری *Bt* بر بخشی از سیستم دفاعی و پارامترهای زیستی بید آرد محرز بود.

بیشترین فعالیت ایمنی سلولی در حشرات در ساعات اولیه ورود عوامل بیگانه به بدن اتفاق می‌افتد و به تدریج با گذشت زمان پاسخ سلولی کاهش پیدا می‌کند (Stanley and Miller, 2006). در مطالعه حاضر، برای شمارش گره‌ها پس از گذشت ۴۸ ساعت از شروع آزمایش و تغذیه لاروهای ۲۴ روزه از بستر غذایی آلوده به باکتری، از لاروها خون‌گیری انجام شد. به نظر می‌رسد اگر خون‌گیری زودتر انجام شود تعداد گره بیشتری در خون شمارش شود. در واقع پاسخ‌های سیستم ایمنی در حشرات،

معرف ورود عامل آلودگی به خون و میزبان‌های مقاوم قادر به متوقف کردن پیشرفت آن‌ها هستند (Washburn *et al.*, 2000). با توجه به این مسأله، باید تحقیق در مورد جداسازی و شناسایی سویه‌های جدید و بومی باکتری *Bt* در خصوص کنترل آفات در کشور به صورت پویا و مستمر انجام شود تا سویه‌هایی با زهرآگینی بالاتر جایگزین عوامل قبلی شوند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

آنچه که مشخص است عوامل بسیاری در ارتباط با تغییر اثرات بیماری‌گری سویه‌های مختلف باکتری دخیل هستند که برخی روی باکتری و برخی روی پاسخ‌های ایمنی حشره میزبان تأثیر خواهند گذاشت. در این تحقیق نشان داده شد که تفاوت در دما و زیرگونه باکتری بیمارگر *Bt* می‌تواند باعث تغییراتی در تشکیل گره و برخی پارامترهای زیستی بیدارد شود. ملانیزاسیون بیمارگر یکی از پدیده‌های مهم است که در ایمنی بدن حشرات از طریق تشکیل گره مشارکت دارد و اختلال در سنتز ملانین می‌تواند حساسیت آفت را به عوامل بیمارگر افزایش دهد. حتی محققین ثابت کردند که فعالیت‌های فنل‌اکسیداز (دخیل در پدیده ملانیزاسیون) لارو بیدارد بر اساس عدم تعادل تغذیه‌ای جیره غذایی و نوع کربوهیدرات جیره متفاوت خواهد بود (Korkmaz *et al.*, 2022). به طور قطع، انجام تحقیقات آتی با توجه به موارد فوق باعث افزایش غلبه بیمارگرهای حشرات بر پاسخ‌های ایمنی میزبان و ارتقاء توانایی حشره‌کشی آن‌ها در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات خواهد شد.

سپاس‌گزاری

این تحقیق مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجو است و با حمایت مالی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته انجام شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

- Alves, S.B. (1998). Controle microbiano de insetos, Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Bajwa, W. I., & Kogan, M. (2000) An interactive knowledge-based system for integrated codling moth management. In M. Shenk & M. Kogan (Eds.), *IPM in Oregon: Achievements and future directions* (pp. 211-226). Corvallis, Oregon: Oregon State University.
- Bauerfeind, S. S., & Fischer, K. (2014). Integrating temperature and nutrition-environmental impacts on an insect immune system. *Journal of Insect Physiology*, 64, 14–20.
- BenFarhat-Touzri, D., Driss, F., & Tounsi, S. (2016). A promising HD133-like strain of *Bacillus thuringiensis* with dual efficiency to the two Lepidopteran pests: *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) and *Ephestia kuehniella* (Pyralidae). *Toxicon*, 118, 112-120.
- Borges, A., Santos, P.N., Furtado, A.F., & Figueiredo, R.C.B.Q. (2008). Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Micron*, 39(4), 486-494.
- Carriere, Y., Showalter, A. M., Fabrick, J. A., Sollome, J., Ellers-Kirk, C., & Tabashnik B. E. (2009). Cadherin gene expression and effects of *Bt* resistance on sperm transfer in pink bollworm. *Journal of Insect Physiology*, 55, 1058-1064.
- Contreras, E., Benito-Jardon, M., Lopez-Galiano, M. J., Real, M. D., & Rausell, C., 2015. *Tribolium castaneum* immune defense genes are differentially expressed in response to *Bacillus thuringiensis* toxins sharing common receptor molecules and exhibiting disparate toxicity. *Developmental and Comparative Immunology*, 50, 139–145.
- Curwen, B., Palmer, S., & Ruddell, P. (2000). *Brief cognitive behaviour therapy (Brief Therapies Series)*. London: Sage.
- Dequech, S. T. B., Silva, R. F. P., & Fiuza, L. M. (2005). Interação entre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Bacillus thuringiensis aizawai*, em laboratório. *Neotropical Entomology*, 34(6), 937–944.

- Dubovskiy, I. M., Grizanova, E. V., Whitten, M. M. A., Mukherjee, K., Greig, C., Alikina, T., Kabilov, M., Vilcinskas, A., Glupov, V. V., & Butt, T. M. (2016). Immuno-physiological adaptations confer wax moth *Galleria mellonella* resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Virulence* 7, 860–870.
- El Khoury, M., Azzouz, H., Chavanieu, A., Abdelmalak, N., Chopineau, J., & Awad, M. K. (2014). Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain Lip harboring a new cry1Aa gene highly toxic to *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Archives of Microbiology*, 196(6), 435-444.
- Franssens, V., Smagghe, G., Simonet, G., Claeys, I., Breugelmans, B., De Loof, A., & Broeck, J. V. (2006). 20-Hydroxyecdysone and juvenile hormone regulate the laminarin-induced nodulation reaction in larvae of the flesh fly, *Neobellieria bullata*. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(9), 735-740.
- Hagstrum, D., Klejdysz, T., Subramanyam, B., & Nawrot, J. (2013). Atlas of stored-product insects and mites, advancing grain science worldwide, Minnesota, USA: AACC International Press.
- Itoua-Apoyolo, C., Drif, L., Vassal, J. M., Debarjac, H., Bossy, J. P., Leclant, F., & Frutos, R. (1995) Isolation of Multiple Subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a Population of the European Sunflower Moth, *Homoeosoma nebulella*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12): 4343-4347.
- Kalman, S. K., Kiehne, L., Libs, J. L., & Yamamoto, T. (1993). Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (4), 1131-1137.
- Korkmaz, E., Altun, N., & Faiz, Ö. (2022). Effects of diet on phenoloxidase activity and development of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. *Biological Bulletin of Russian Academy of Science*, 49 (Supplementary 1), S189–S197.
- Kurtulus, A., Pehlivan, S., Achiri, T. D., & Atakan, E. (2020). Influence of different diets on some biological parameters of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Stored Products Research* 85, 101554.
- Li, L., Chen, Z., & Yu, Z. (2017). Mass production, application and market development of *Bacillus thuringiensis* biopesticides in China. In L. M. Fiuza, R. A. Polanczyk & N. Crickmore (Eds.), *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus characterization and use in the field of biocontrol* (pp. 185-212). Switzerland: Springer.
- Lu, Y., Wu, K., Jiang, Y., Guo, Y., & Desneux, N. (2012). Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, 487, 362-365.
- Mostafa, A., Fields, P., & Holliday, N. (2005). Effect of temperature and relative humidity on the cellular defense response of *Ephestia kuehniella* larvae fed *Bacillus thuringiensis*. *Journal of invertebrate pathology*, 90 (2), p. 79-84.
- Nation J. L. (2016). *Insect physiology and biochemistry*. Third Edition. Florida: CRC Press, Boca Raton.
- Panwar, B.S., Kaur, J., Kumar, P., & Kaur, S. (2018). A novel cry52Ca1 gene from an Indian *Bacillus thuringiensis* isolate is toxic to *Helicoverpa armigera* (cotton boll worm). *Journal of Invertebrate Pathology*, 159, 137–140.
- Pinos, D., Andrés-Garrido, A., Ferré, J., & Hernández-Martínez, P. (2021). Response mechanisms of invertebrates to *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1), e00007-20.
- Rabinovitch, L., Vivoni, A. M., Machado, V., Knaak, N., Berlitz, D. L., Polanczyk, R. A., & Fiuza, L. M. (2017). *Bacillus thuringiensis* characterization: morphology, physiology, biochemistry, pathotype, cellular, and molecular aspects. In L. M. Fiuza, R. A. Polanczyk & N. Crickmore (Eds.), *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus characterization and use in the field of biocontrol* (pp. 1-18). Switzerland: Springer.
- Rahman, M. M., Roberts, H.L.S., & Schmidt, O. (2007). Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth *Ephestia kuehniella*. *Journal of Invertebrate*

- Pathology, 96(2), 125-132.
- Seifinejad, A., Salehi Jouzani, G. R., Hosseinzadeh, A., & Abdmishani, C. (2008). Characterization of Lepidoptera-active Cry and Vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Biological Control*, 44, 216–226.
- Shapiro-Ilan, D. I., Fuxa, J. R., Lacey, L. A., Onstad, D. W., & Kayae, H. K. (2005). Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *The Journal of Invertebrate Pathology*, 88:1–7.
- Silva, M. C., Siqueira, H. A. A., Marques, E. J., Silva, L. M., Barros, R., Lima Filho, J. V. M., & Silva, S. M. F.A. (2012). *Bacillus thuringiensis* isolates from northeastern Brazil and their activities against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, 22(5), 583-599.
- Silva, M.C., Siqueira, H. A. A., Silva, L. M., Marques, E. J., & Barros, R. (2015). Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* active against diamondback moth and fall armyworm. *Neotropical Entomology*, 44(4), 392-401.
- Stanley, D. W., & Miller, J. S. (2006). Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119, 1–13.
- Tabashnik, B., Van Rensburg, J. B. J., & Carriere, Y. (2009). Field-evolved insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crops: definition, theory and data. *Journal of Economic Entomology*, 92, 2011-2025.
- Vilcinskas, A., & Matha, V. (1997). Effects of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 43, 1149-1159.
- Washburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan, F. F., Beckage, N. E., & Volkman, L. E. (2000). Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Insect Physiology*, 46, 179–190.
- Wei, J., Yang, S., Chen, L., Liu, X., Du, M., An, S., & Liang, G. (2018). Transcriptomic responses to different Cry1Ac selection stresses in *Helicoverpa armigera*. *Frontiers in Physiology*, 9, 1653.
- Wraight, S. P., Molloy, D., Jamnback, H., & McCoy, P. (1981). Effects of temperature and instar on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 against *Aedes stimulans* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38(1), 78-87.
- Wu, G., & Yi, Y. (2018). Transcriptome analysis of differentially expressed genes involved in innate immunity following *Bacillus thuringiensis* challenge in *Bombyx mori* larvae. *Molecular Immunology*, 103, 220–228.
- Yilmaz, S., Ayvaz, A., Akbulut, M., Azizoglu, U., & Karabörklü, S. (2012). A novel *Bacillus thuringiensis* strain and its pathogenicity against three important pest insects. *Journal of Stored Products Research*, 51, 33-40.
- Yilmaz, S., Karabörklü, S., Azizoğlu, U., Ayvaz, A., Akbulut, M., & 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.
- Zhang, Y., Ma, Y., Wan, P.-J., Mu, L.-L., & Li, G.-Q. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins affect lifespan and reproductive performance of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* adults. *Journal of Economic Entomology*, 106(2), 614-621.
- Zhao, M., Yuan, X., Wei, J., Zhang, W., Wang, B., Khaing, M. M., & Liang, G. (2017). Functional roles of cadherin, aminopeptidase-N and alkaline phosphatase from *Helicoverpa armigera* (Hübner) in the action mechanism of *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa. *Science Report*, 7, 46555.
- Zhu, L., Tian, L. J., Zheng, J., Gao, Q. L., Wang, Y. Y., Peng, D. H., & Sun, M. (2015). Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* strain HD-29, a typical strain of commercial biopesticide. *Journal of Biotechnology*, 19, 108-109.