فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۴، پیاپی ۷۰، زمستان ۱۴۰۰، ص ۱۶۳-۱۴۸
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.4, Sering.70, winter 2021, p. 148-163
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۸

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
doi 22051/JAB.2021.34309.1398

اثرات باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* در ترکیب با نانوذرات سیلیکا و نیمارین در کنترل لارو سن دوم برگخوار چغندرقند(*Spodoptera exigua* Hb. (Lep.: Noctuidae در شرایط آزمایشگاهی

مجید علیمحمدیان[۱]، شهرام آرمیده[*۲]، شهرام میرفخرایی[۳]، مریم فروزان[۴]

چکیده

استفاده از ترکیبات گیاهی و فیزیکی به همراه باکتری Bacillus thuringiensis var. kurstaki (Btk) در کاهش دوز مصرفی و افزایش اثر آن از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا کارایی باکتری Btk در اختلاط با نانوذرات سیلیکا و نیمارین در کنترل لارو سن دوم برگخوار چغندرقند Spodoptera exigua Hb. در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی گرفت. شاخص LC_{50} حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری، نانوذرات سیلیکا و نیمارین بعد از ۷۲ساعت به ترتیب (۷۲۴/۷۸، ۹۸۲/۲۸ و ۳۹۳/۷۱ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. در بررسی اثر ترکیبی، بیشترین و کمترین مرگ‌ومیر در تیمار ترکیب باکتری با نیمارین (۶۶درصد) و تیمار شاهد (آب مقطر) (۲درصد) مشاهده شد، همچنین در ارزیابی خسارت، بیشترین و کمترین خسارت در تیمار شاهد (۵۵/۳ درصد) و تیمار ترکیب باکتری با نیمارین (۱۵درصد) حاصل شد. در این بررسی با توجه به افزایش کارایی باکتری در تلفیق با نیمارین، کاربرد توام آنها در کنترل لاروهای برگخوار چغندرقند قابل توصیه است.

واژه های کلیدی: ، باکتری Bacillus thuringiensis، برگخوار چغندرقند، نانومواد، کشندگی

---

۱ . دانشجوی دکتری حشره شناسی گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه- پردیس
۲ . دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه * نویسنده مسئول: Sh.aramideh@Urmia.ac.ir
۳ . استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۴ . بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه

مقدمه

یکی از مهم ترین آفات چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) لارو برگخوارکارادرینا (*Spodoptera exigua* Hb.) است که به طیف وسیعی از گیاهان زراعی، سبزیجات و صیفی‌جات خسارت اقتصادی وارد می‌کند. ویژگی‌های زیستی این آفت مانند قدرت زادو ولد بالا، طیف وسیع میزبانی و قدرت سازگاری با شرایط مختلف محیطی، این حشره را به آفتی بسیار مهم تبدیل کرده است (Farahani *et al*., 2011).فشار مبارزه شیمیایی روی این آفت موجب کاهش کارایی سموم به واسطه مقاومت به گروه‌های مختلف آفتکش‌های شیمیایی شده است (Ahmad *et al*., 2018). از روش‌های جایگزین کنترلی مثل کنترل زراعی، کنترل زیستی و میکروبی بخصوص بوسیله نماتودها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌های بیمارگر در برنامه های مدیریت این آفت مورد توجه قرار گرفته است (Schünemann *et al*., 2014; Chattopadhyay *et al*., 2017; Luna-Espino *et al*., 2018). باکتری *Bacillus thuringiensis* با کاربرد نزدیک به ۹۵ درصد، مهمترین میکروارگانیسم مورد استفاده در کنترل زیستی آفات کشاورزی است (Sansinenea *et al*., 2012). این باکتری دارای بیش از یک هزار جدایه است که نزدیک به ۶۰ درصد آنها روی راسته‌های دوبالان، بالپولکداران و سخت بالپوشان مؤثرند (Tabashnik *et al*., 2015) بر اساس منابع موجود، فرآورده‌های *Btk* سالیانه در چندین میلیون هکتار علیه بالپولکداران آفت محصولات کشاورزی، جنگلی و محصولات انباری مورد استفاده قرار می‌گیرند (Dubois *et al*., 1988; Reardon *et al*., 1994; Kish, 2004; Jijkli, 2010). این باکتری، در مرحله اسپورزایی، یک یا چند کریستال پروتئینی درون سلولی تولید می‌کند که خاصیت حشره کشی داشته و برای طیف گسترده‌ای از حشرات و دیگر بی‌مهرگان از قبیل نماتدها و کنه‌ها سمی است ولی برای انسان، مهره داران و گیاهان، غیر سمی است و به راحتی تجزیه می‌شود (Xu *et al*., 2014; Soundararajan, 2012; Palma *et al*., 2014). یکی از جدیدترین استراتژی‌ها در کنترل آفات و حفاظت گیاهان، ترکیب یا تلفیق چند عامل با یکدیگر است (Sharifzadeh *et al*. 2018)، روش تلفیق دو یا چند ماده بویژه هنگامی که ترکیبات اثر متفاوتی داشته باشند موجب کاهش مقاومت افات می‌شود (Ghassemi-Kahrizeh & Aramideh, 2014; Zhu *et al*., 2016; Sudo *et al*., 2017) و در مواردی موجب کاهش هزینه مبارزه می‌شود (Das, 2014). وقتی دو ماده خاصیت تشدید کنندگی اثر داشته باشند، موجب کاهش دز مصرفی می‌گردند (Wraight & Ramos, 2005). تاثیر توام باکتری *B. thuringiensis* و حشره‌کش گیاهی آزادیراختین (*Azadirachta indica* A. Juss.) با فرم تجاری نیمارین در کنترل پروانه سفید آمریکایی (*Hyphantria cunea* Drury) نشان داده که آزادیراختین دارای تشدید کنندگی اثر است (Sheibani, 2010). نتایج مشابه روی اثر بیماری‌زایی باکتری *B. thuringiensis* روی سنین مختلف لارو سوسک کلرادوی سیب زمینی (*Leptinotarsa decemlineata* Say) و اثر تشدیدکننده‌های گیاهی در افزایش کارآیی آن در شرایط آزمایشگاه مشاهده شد (Javi *et al*., 2004). تاثیر باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای سنین اول، دوم و سوم برگخوار چغندرقند و نقش حناء و کاربراندوم در افزایش کارآیی آن در

آزمایشگاه نشان داد که ترکیبات گیاهی نظیر حناء دارای تشدید کنندگی اثر است (Namvar *et al*., 2003). از طرف دیگر مطالعات مختلف حاکی از اثرات حشره کشی ترکیبات فیزیکی نظیر نانوذرات سیلیکا SiO_2 NPs روی آفات مختلف نظیر شپشه-گندم (*Sitophilus granarius* L.) (Goswami *et al*., 2010; Debnath *et al*., 2011; El-Naggar *et al*., 2020)، شپشه چهار-نقطه‌ای (*Callosobrachus maculatus* F.) (Rouhani *et al*., 2012; Arumugam *et al*., 2016)، شپشه آرد (*Tribolium confusum* Jacquelin du Val) و شپشه دندانه‌دار برنج (*Oryzaephilus surinamensis* L.) است (El-Naggar *et al*., 2020). همچنین SiO_2NPs در مزرعه روی آفاتی نظیر برگخوار پرودرینا (*Spodoptera litorallis* Bois) (El-Samahy *et al*., 2015; Ayoub *et al*., 2017)، پروانه پشت الماسی کلم (*Plutella xylostella* L.) (Shoaib *et al*. 2018; Bilal *et al*. 2020)، روی شته ها و شپشک‌ها (Debnath *et al*., 2010; Pavitra *et al*., 2018; Caceres *et al*., 2019) اثرات خوبی نشان داده‌اند.

لذا جهت کاهش مصرف مقدار باکتری و افزایش تاثیر آن در اختلاط با یک ترکیب سازگار با محیط زیست، اثر باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* در اختلاط با نانو ذرات سیلیکا و نیمارین جهت کنترل لارو سن دوم برگخوار چغندرقند *Spodoptera exigua* Hb. در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در تحقیق

باکتری (*Btk*) *B. thuringinsis* var. *kurstaki* با نام تجاری Belthiral® به صورت پودر وتابل، ۳۲۰۰۰ IL/mg، ساخت کارخانه Probelete S.A.CTRA مادرید-اسپانیا و فرمولاسیون تجاری آزادیراختین (*Azadirachta indica* A. Juss.) با نام تجاری نیمارین® امولسیون حاوی ۰/۱۵ درصد ماده مؤثره آزادیراختین، تولید شرکت Biotech international Ltd.(New Delhi, India)مورد استفاده قرار گرفت، همچنین نانو ذره سیلیس SiO2 با قطر ذرات ۴۰-۵۰ نانومتر و با خلوص ۹۹/۹۹ درصد تولید شرکت پیشگامان (Pishgamannano® www.Irannanotech.com) در آزمایشات بکار رفت.

پرورش میزبان

برای انجام زیست سنجی در شرایط آزمایشگاهی، لاروهای پروانه برگخوار چغندرقند روی غذای مصنوعی متشکل از لوبیا چیتی، آگار، مخمر آبجوی خشک، متیل پاراهیدروکسی بنزوات، اسیدسوربیک، اسیدآسکوربیک، فرمالدئید و آب مقطر در دمای ۲۶±۲ درجه سیلسیوس و رطوبت نسبی ۵۷±۳ با ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، پرورش یافتند (Singh & Moore, 2005) سپس لاروهای سن دوم که از دسته تخم‌های یکسان بوجود امدند را با اندازه گیری عرض کپسول سر تفکیک و در آزمایش به کار برده شدند.

تعیین کشندگی (LC_{50})

در شرایط آزمایشگاهی به منظور تعیین میزان کشندگی باکتری (*Bt*)، نانوذرات سیلیکا (NPs) و نیمارین (NE) روی سن دوم لاروی، ابتدا در یک سری آزمایش‌های مقدماتی غلظت‌هایی با بیشترین و کمترین تلفات (۲۰ الی ۸۰ درصد) تعیین و سپس در فاصله این دو غلظت، سه غلظت به روش لگاریتمی مشخص شد (Pourmirza, 2005) (جدول ۱)، بدین ترتیب پنج غلظت به همراه آب مقطر (بعنوان شاهد) و هر غلظت در سه تکرار و تمام غلظت‌ها به همراه یک درصد پخش کننده توییین-۸۰ روی برگ‌های چغندرقند کشت شده در گلدان‌هایی به ابعاد ۴×۸×۱۰سانتیمتر که به خوبی برگ‌ها توسط ظروف بستنی یک کیلویی محصور شده بود، به وسیله اسپری دستی پاشیده شد و تعداد ۱۰ عدد لارو سن دوم در هر تکرار رهاسازی شدند و درب آنها با توری مسدود گردید. نتایج حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف هر ترکیب بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت یادداشت برداری شد و تجزیه و تحلیل گردید.

اختلاط نانوسیلیکا و نیمارین با باکتری

این آزمایش به منظور ارزیابی خاصیت اختلاط نانوسیلیکا و نیمارین با باکتری *Btk* روی مرگ و میر لاروهای سن دوم برگخوار چغندرقند طراحی شد. بدین منظور بعد از تعیین مقادیر LC_{25} و LC_{50} اثرات توأم نانوسیلیکا همراه با باکتری و نیمارین همراه با باکتری بر اساس مقدار LC_{25} و LC_{50} توزین و محلول‌های هر تیمار شامل باکتری (LC_{50}, *Bt*)، نانوسیلیکا (LC_{50}, NPs)، نیمارین (LC_{50}, NE)، ترکیب باکتری با نانوسیلیکا (LC_{25}, NPs+ LC_{25}, *Bt*)، ترکیب باکتری با نیمارین (LC_{25}, NE+ LC_{25}, *Bt*) و تیمار شاهد (آب مقطر) به همراه یک درصد پخش کننده توییین-۸۰ در سه تکرار که توسط ظروف بستنی یک کیلویی به ابعاد ۴×۸×۱۰سانتیمتر محصور شده بودند، به وسیله سمپاش دستی پاشیده شد و بعد از خشک شدن سطح برگ در هر تکرار ۱۰ عدد لارو سن دوم با استفاده از قلم مو به ارامی روی برگ‌های درون ظروف قرار گرفت و درب آنها با توری مسدود گردید. تلفات لاروی پس از یک، سه و پنج روز پس از تیمار، شمارش شد.

ارزیابی خسارت

همزمان با ارزیابی مرگ و میر لاروهای سن دوم، تاثیر اختلاط نانوسیلیکا و نیمارین با باکتری در درصد خسارت وارده توسط ۳۰ عدد لارو در هر تیمار با اندازه‌گیری سطح برگ قبل و بعد از تیمار بوسیله سطح سنج برگ بعد از یک، سه و پنج روز تعیین و با استفاده از معادله زیر محاسبه و مقایسه میانگین شد (Abdollahzadeh Bavani *et al*., 2019).

$$\text{درصدخسارت} = \frac{\text{خسارت تیمار} - \text{خسارت شاهد}}{\text{خسارت شاهد}} \times 100$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده های حاصل از تلفات لاروهای سن دوم بعد از اصلاح با فرمول ابوت با روش تجزیه پروبیت آنالیز و مقادیر LC_{25} و LC_{50} محاسبه گردید (Abbott, 1925). اثر تلفیقی باکتری با نانوذرات سیلیکا و نیمارین همچنین ارزیابی خسارت از تجزیه واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و مقایسه میانگین تیمارها به روش HSD-TUKEY در سطح اطمینان ۹۵درصد در نرم افزار (SPSS v. 22) انجام گرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel-2016 استفاده گردید.

$$\text{درصدتلفات} = \frac{\text{تلفات تیمار} - \text{تلفات شاهد}}{\text{تلفات شاهد}} \times 100$$

نتایج و بحث

تجزیه پروبیت حاصل از تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری *B. thuringiensis*، نیمارین (NPs)، نانوسیلیکا (NE) بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت روی سن دوم لاروی برگخوار چغندرقند مطابق جدول ۱ حاصل شد. نتایج نشان داد نیمارین با LC_{50} کمتر در مقایسه با باکتری، و نانو ذرات سیلیکا اثر مطلوبتری روی سن دوم لاروی پروانه برگخوار چغندرقند دارد.

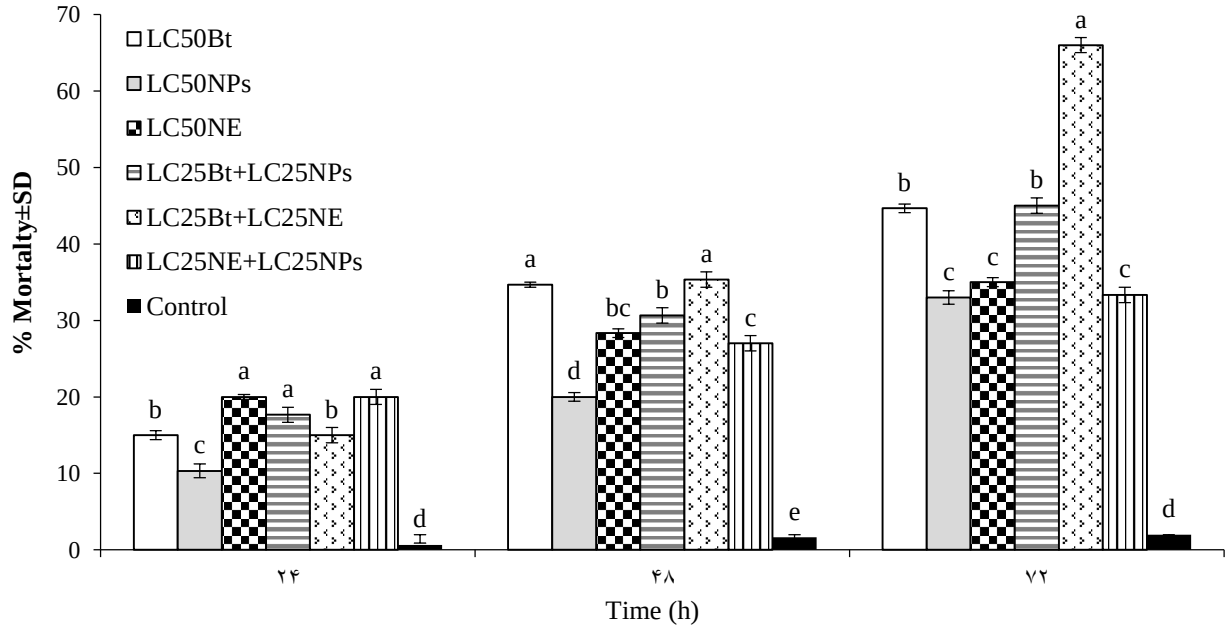
جدول ۱: تجزیه پروبیت، LC_{50} و LC_{25}باکتری *Bacillus thuringiensis* ، نیمارین و نانوسیلیکا بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت روی سن دوم لاروی پروانه برگخوار چغندرقند

Treatment	Concentration (mg. $L.^{-1}$)	Time (h)	X^2 (df)	Slope± SE	Intercept	LC_{50} (ppm)	LC_{25} (ppm)
						Fiducial limits	Fiducial limits
Bt	320.00 765.00	24	0.924(3)	1.075±0.453	-4.110	2252.39 2064.07-2929.42	1569.10 920.77-2028.68
	1210.00 1655.00	48	2.437(3)	1.670±0.396	-5.191	1483.31 956.44-1901.20	706.30 237.46-914.85
	2100.00 Control	72	7.818(3)	2.573±0.420	-7.36	724.78 317.22-1324.57	396.35 3.82-707.95
NPs	284.00 673.00	24	0.212(3)	1.775±0.290	-5.239	3219.22 2555.60-4556.23	1925.11 1613.12-2255.87
	1062.00 1451.00	48	2.040(3)	1.388±0.282	-3.701	1852.94 1033.98-2079.88	880.32 331.41-975.11
	1840.00 Control	72	7.129(3)	1.586±0.284	-3.878	982.64 890.64-1169.55	503.55 420.48-950.20
NE	350.00 800.00	24	0.594(3)	2.176±0.747	-7.885	1608.15 1207.31-3951.89	1087.72 769.66-1306.42
	1250.00 1700.00	48	1.082(3)	3.089±0.642	2.067	793.35 531.19-1192.80	514.68 440.18-945.41
	2150.00 Control	72	3.363(3)	5.273±0.793	-6.024	393.71 241.76-525.04	212.79 96.98-321.07

با توجه به نتایج بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نیمارین با ۱۶۰۸/۱۵، ۷۹۳/۳۵ و ۳۹۳/۷۱ کمترین شاخص LC_{50} و بیشترین تلفات روی لارو سن دوم برگخوارچغندرقند نشان داد.

اختلاط نانوسیلیکا و نیمارین با باکتری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های تلفات تیمارهای باکتری (LC_{50}, *Bt*)، نانوسیلیکا (LC_{50}, NPs)، نیمارین (LC_{50}, NE)، ترکیب باکتری با نانوسیلیکا (LC_{25}, NPs+LC_{25}, *Bt*)، ترکیب باکتری با نیمارین (LC_{25}, NE+LC_{25}, *Bt*)، ترکیب نانوسیلیکا با نیمارین (LC_{25}, NE+LC_{25}, NPs) و تیمار شاهد روی لارو سن دوم برگخوار چغندرقند بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب نشان داد که با اطمینان ۹۵ درصد بین کشندگی تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد [F(6, 14)=195.02, P=0.001، F(6, 14)=244.76, P=0.001 و F(6, 14)=1014.49, P=0.001]، در هر سه زمان F محاسبه شده از F جدول در سطح احتمال آماری ۹۵ درصد، بزرگ‌تر بوده و P (احتمال) کوچکتر از ۰/۰۵ است.

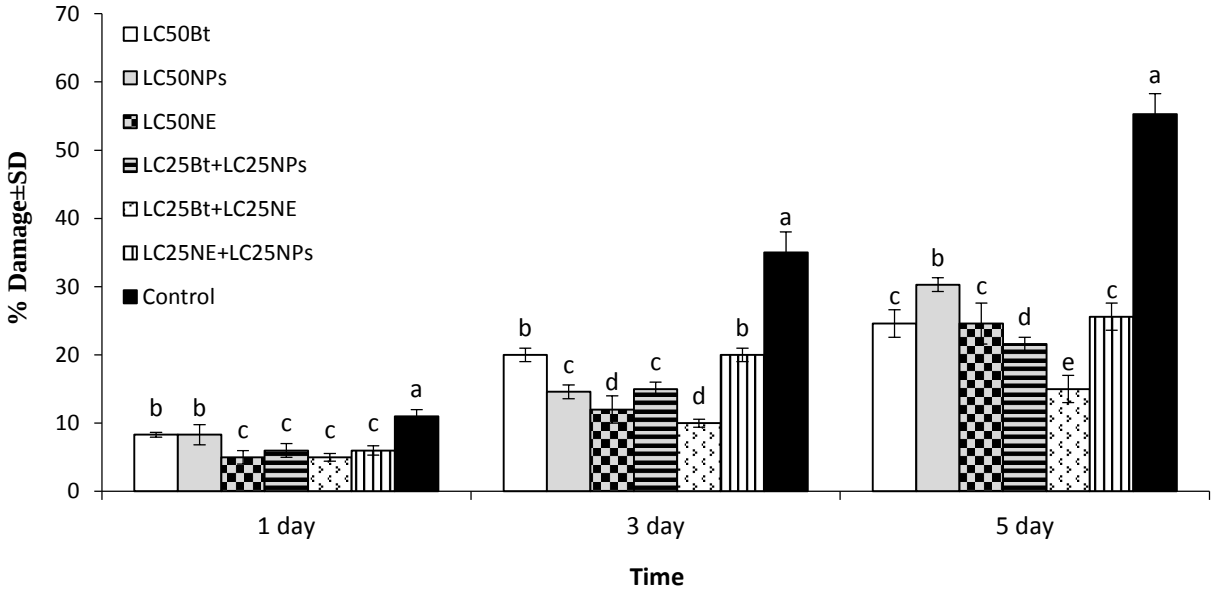


شکل ۱: مقایسه میانگین درصد تلفات ناشی از تیمارها، روی لارو سن دوم برگخوار چغندرقند پس از۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به روش آزمون توکی در سطح احتمال ۹۵ درصد در شرایط آزمایشگاهی (حروف مشابه در بالای هر ستون نشانه عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است).

در بررسی اثر ترکیبی، بیشترین و کمترین مرگ و میر در تیمار ترکیب باکتری با نیمارین (LC_{25}, AZ+LC_{25}, *Bt*) و تیمار شاهد (آب مقطر) مشاهده شد (شکل ۱).

ارزیابی خسارت

تجزیه واریانس درصد خسارت حاصل از تاثیر تیمارهای باکتری (LC_{50}, *Bt*) ، نانوسیلیکا (LC_{50}, NPs)، نیمارین (LC_{50}, NE)، ترکیب باکتری با نانوسیلیکا (LC_{25}, NPs+LC_{25}, *Bt*)، ترکیب باکتری با نیمارین (LC_{25}, NE+LC_{25}, *Bt*)، ترکیب نانوسیلیکا با نیمارین (LC_{25}, NE+LC_{25}, NPs) و تیمار شاهد بعد از ۱، ۳ و ۵ روز در سطح احتمال ۹۵ درصد اختلاف معنی دار نشان داد [F(6, 14)=22.11; P=0.001، F(6, 14)=273.68; P=0.001 و F(6, 14)=1153.92; P=0.001]. در هر سه زمان F محاسبه شده از F جدول در سطح احتمال آماری ۹۵ درصد، بزرگ‌تر بوده و P (احتمال) کوچکتر از ۰/۰۵ مبود.



شکل ۲: مقایسه میانگین تعداد درصد خسارت لارو سن دوم برگخوار چغندرقند به وسیله تیمارهای مختلف بعد از ۱، ۳ و ۵ روز در سطح احتمال ۹۵ درصد با آزمون توکی. ستون‌های با حروف یکسان اختلاف معنی داری با هم ندارند.

با توجه به میانگین تیمارها، بیشترین خسارت در تیمار کنترل و کمترین خسارت در تیمار ترکیب باکتری با نیمارین (LC_{25}, NE+LC_{25}, *Bt*) مشاهده شد (شکل ۲).

گزارش‌های زیادی در مورد تحقیق و کاربرد باکتری *B. thurungiensis* علیه مراحل لاروی پروانه برگخوار چغندرقند یکی از آفات مهم محصولات کشاورزی بویژه چغندرقند وجود دارد (Hernandez–Martınez *et al*., 2008; Da-yong *et al*., 2012; Da-yong & Yong-man, 2013). بررسی‌ها نشان داده در شرایط آزمایشگاهی، مقاومت در برابر باکتری *Btk* در بسیاری از حشرات نظیر پروانه شب‌پره هندی (*Plodia interpunctella*) (McGaughey, 1985)، لارو جوانه‌خوار توتون (*Heliothis virescens*) (Gould *et al*., 1992)، پروانه پشت‌الماسی (*P. xylostella*) (Tabashnik, 1994)، لارو برگخوارچغندرقند (*S. exigua*)

(Moar *et al*., 1995)، پروانه ساقه خوار اروپایی‌ذرت (*Ostrinia nubilalis*) (Siqueira *et al*., 2004)، پروانه سرخ ثانویه‌پنبه (*Pectinophora gossypiella*) (Tabashnik *et al*., 2004) و لارو پروانه قوزه پنبه (*Helicoverpa armigera Hübner*) (Xu *et al*., 2005) گزارش گردیده است. در کاربرد مزرعه‌ای نیز گزارش‌هایی از مقاومت آفات به باکتری *Btk* حکایت دارد (McGaughey, 1985; Janmaat & Myers, 2003). استفاده از ترکیبات فیزیکی و گیاهی می‌تواند در تشدید اثر باکتری موثر باشد. اثر هم افزایی محصولات چریش بر *Btk* در بسیاری از تحقیقات اثبات شده است (Togbe *et al*., 2014; Abedi *et al*., 2014; Singh *et al*., 2007; Konecka *et al*., 2019). درخت چریش حاوی ماده اکدیستروئیدی به نام آزادیراختین بوده که قادر است در فرآیندهای فیزیولوژیک بندپایان اختلال ایجاد نماید. آثار ضد تغذیه ای قوی و توانایی ایجاد اختلال در رشد و نمو و تولید مثل حشره توسط این ترکیب ثابت شده است (Murugan, *et al*., 1998; Ling *et al*., 2000). باکتری *Btk* در اختلاط با روغن دانه چریش (نیمارین) روی پروانه شب‌پره هندی (*Plodia interpunctella*) خاصیت هم افزایی نشان داده است (Nouri-Ganbalani, 2016). بررسی اثر ترکیبی باکتری *B. thuringiensis* و روغن دانه چریش روی بید سیب‌زمینی (*Phthorimaea operculella*) در مزرعه و انبار موثر بوده و ترکیب چریش و باکتری *B. thuringiensis* (دلفین) غده ها را در برابر این آفت به طور قابل توجهی محافظت می‌کند (Salama & Salem, 2000). با توجه به نتایج تحقیق حاضر نیز که شاخص LC_{50} نیمارین بیشترین کشندگی را نسبت به باکتری و نانو سلیکا نشان داد، همچنین نیمارین در اختلاط با باکتری(*Bt*, LC_{25}, NE+LC_{25}) با ۶۶ درصد تلفات و کاهش خسارت تا ۱۵ درصد در مقایسه با تیمار شاهد (آب مقطر) ۵۵/۳ درصد خسارت، بهترین عملکرد را در کنترل لاروهای سن دوم برگخوار چغندر قند نشان داد. لذا استفاده توام باکتری و نیمارین می‌تواند یک روش سازگار با محیط زیست و زیست پایه در کنترل افات هدف مورد استفاده قرار گیرد. بر اساس بررسی Abedi و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تاثیر نیمارین و *Btk* روی لاروهای کرم قوزه پنبه (*H. armigera*) مقدار LC_{50} محاسبه شده نیمارین در مقایسه با *Btk* کمتر بوده و نیمارین حدود ۲ برابر سمی تر از *Btk* نشان داد که نتایج این بررسی نیز مشابه آن است. تأثیر حشره‌کش‌های گیاهی نیمارین، نیمک، نیمک سوپر، نیم‌پلاس، نیم‌آزال روی جمعیت *B. tabaci* بررسی شده و نیمارین بالاترین درصد کاهش جمعیت آفت را ۱۰ روز پس از محلول‌پاشی ایجاد کرده است (Sarailoo & Poorghaz, 2006). اسید تانیک و تاننهای گیاهی دیگر نیز باعث تأخیر در رشد و نمو لاروهای آفت می‌گردند و می‌توانند بعنوان سینرژیست با باکتری *B. thuringinsis* بکار روند، بررسی‌ها نشان داده تلفات حاصله از مخلوط این سینرژیست‌ها و *B. thuringinsis* نسبت به حالت استفاده از *B. thuringinsis* تنها، به مراتب بیشتر است (Khanizad & Safaralizadeh, 2002). همچنین Singh و همکاران در سال ۲۰۰۷ برهم‌کنش مثبت مشابهی را در لاروهای پروانه کرم قوزه پنبه (*H. armigera*) یافتند که در معرض باکتری *Btk* و روغن گیاهی azadirachtin قرار گرفته بودند که این نتایج با داده های این تحقیق همسو است. نانو سیلیکا بصورت فیزیکی روی کوتیکول افت تاثیر گذاشته و خواص آبگریزی

ان را که مانع ورود و نفوذ ترکیبات شیمیایی و آب به داخل بدن می‌گردند تخت تاثیر قرار می‌دهد در نتیجه باعث مرگ می شود (Abd El-Wahab et al., 2016). اثر کشندگی Bt-ZnO NPs در روی سوسک چهار نقطه ای (*C. maculatus*) نشان داد که *Bt*-ZnO NPsباعث کاهش باروری و زاد آوری سوسک چهار نقطه‌ای در آزمایشهای دوز- پاسخ شد. همچنین *Bt*-ZnO NPs موجب اختلال در رشد مراحل لاروی، شفیرگی پس از تیمار با ۲۵ میکروگرم/میلی لیتر گردید، این بررسی نشان داد در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر مرگ‌ومیر ۱۰۰درصد با LC_{50} برابر با ۱۰/۷۱میکروگرم در میلی‌لیتر حاصل می گردد (Malaikozhundan *et al*., 2017). بررسی ها نشان داده که نانو ذرات سلیکا با قابلیت مقاومت به اشعه ماوراءبنفش و گرما بعنوان حامل می‌توانند مولکول‌های پروتینی نظیر دلتا اندوتوکسین باکتری *B. thuringiensis* رو به بافت‌ها و سلول‌های نماتد منتقل نمایند، و موجب مرگ و میر و بازدارنگی از رشد نماتدها گردند (Xu *et al*., 2016). اثر حشره‌کش AgNPsهای سنتز شده با *Btk* در روی لارو پروانه *Trichoplusia ni* Hübner و لارو طوقه خوار اگروتیس *Agrotis ipsilon* مورد آزمایش قرار گرفت، نتایج نشان داد که تیمار AgNPs سنتز شده با *Btk* روی هر دو آفت اثر کشندگی بالایی دارد (Atef *et al*., 2017). نتیجه مشابه با حشره کش AgNPsهای سنتز شده با *Btk* در روی لاروهای پشه کولکس و آنوفل نیز مشاهده گردید (Banu *et al*., 2014; Marimuthu *et al*., 2013). در این بررسی بعد از ۷۲ ساعت مخلوط نانوذره سلیکا با باکتری *Btk* اختلاف معنی‌داری با کاربرد تنهای باکتری *Btk* نشان نداد. با عنایت به اثرات سوء سموم کشاورزی بر سلامت انسان، موجودات غیر هدف و الودگی محیط زیست استفاده از پتانسیل باکتری *Btk* بعنوان عامل زیستی در اختلاط با نیمارین در کنترل این افت و بررسی های میدانی قابل توصیه است.

نتیجه گیری کلی

باکتری *Btk* در ترکیب با نیمارین موجب افزایش اثر کشندگی و کاهش خسارت در محصول را نشان داد که به نظر می رسد مربوط به نحوه اثر ترکیبات است. باکتری *Btk* و نیمارین به طریق گوارشی عمل می کنند، در حالی که ترکیب نانوسیلیکا به طریق فیزیکی و جلدی اثر می کند. در این بررسی با توجه به افزایش کارایی باکتری *Btk* در تلفیق با روغن گیاهی نیمارین و کاهش مصرف فرموله باکتریایی، کاربرد توام این دو عامل در راستای مدیریت مقاومت و کنترل پایدار جمعیت لاروهای برگخوار چغندرقند و آفات حساس قابل توصیه است.

سپاسگزاری

بـــه ایـــن وســـیله از مـــدیریت و آزمایشگاه‌های دانشـــگاه شهید باکری میاندوآب وابسته به دانشگاه ارومیه به خاطر حمایت‌های مختلف در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی میگردد.

منابع

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 265-267.

Abd El-Wahab, A. S. El –Bendary, H. M. and El-Helaly A. A. (2016). Nano silica as a promising nano pesticide to control three different aphid species under semi-field conditions in Egypt. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences F Toxicology & Pest Control, 8 (2): 35- 49.

Abdollahzadeh Bavani, M. Aramideh, Sh. and Hosseinzadeh A. (2019). Effect of *Bacillus thuringiensis*, *Se*NPV, Spinosad and Emamectin on third larval instar of *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae) in laboratory and field conditions. Plant Pest Research, 9 (1): 1-12.

Abedi, Z. Saber, M. Vojoudi, S. Mahdavi, V. and Parsaeyan E. (2014). Acute, sublethal, and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Journal of Insect Science. 14: 30.

Ahmad, M. Farid, A. and Saeed, M. (2018). Resistance to new insecticides and their synergism in *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae) from Pakistan. Crop Protection, 107: 79-86.

Arumugam, G. Velayutham, V. Shanmugavel, S. and Sundaram, J. (2016). Efficacy of nanostructured silica as a stored pulse protector against the infestation of bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus* (Col.: Bruchidae). Applied Nanoscience, 6: 445-450.

Atef, M. Sayeda, M. Sanghoon, Kimb. and Behleb, W. (2017). Characterization of silver nanoparticles synthesised by *Bacillus thuringiensis* as a nanobiopesticide for insect pest control. Biocontrol Science and Technology, 27(24).

Ayoub, H.A. Khairy, M. Rashwan, F.A. and Abdel-Hafez, H.F. (2017). Synthesis and characterization of silica nanostructures for cotton leaf worm control. Journal of Nanostructure Chemistry, 7:91-100.

Banu, A.N. Balasubramanian, C. and VinayagaMoorthi, P. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus thuringiensis* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Dip.: Culicidae). Parasitology Research, 113: 311-316.

Bilal, M. Xu, C. Cao, L. Zhao, P. Cao, C. Li, F. and Huang, Q. (2020). Indoxacarb-loaded fluorescent mesoporous silica nanoparticles for effective control of *Plutella xylostella* L. with decreased detoxification enzymes activities. Pest Management Science, 76:3749-3758.

Caceres, M. Vassena, C.V. Garcera, M.D. and Santo-Orihuela, P.L. (2019). Silica nanoparticles for insect pest control. Current Pharmaceutical Design, 25: 4030-4038.

Chattopadhyay, P. Banerjee, G. and Mukherjee, S. (2017). Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. 3 Biotech, 7:60.

Das, S.K. (2014). Scope and relevance of using pesticide mixtures in crop protection: a critical review. IJESTR, 2(5):119-125.

Da-yong, J. Xueli, Q. Xiangguo, L. and Yongwan, Y. (2012). Effects of Tween 80 on spreading of *Bacillus thuringiensis* on crop leaves and its control efficacy against *Spodoptera exigua* in scallion fields. Plant Protection, 38(5):143-146.

Da-yong, J. and Yong-man, Y. (2013). Effect on growth and development of *Spodoptera exigua* larvae by *Bacillus thuringiensis* CAB109. Northern Horticulture, 20(6):122-124.

Debnath, N. Das, S. Brahmachary, R.L. Chandra, R. Sudan, S. and Goswami, A. (2010). Entomotoxicity assay of silica, zinc oxide, titanium dioxide, aluminium oxide nanoparticles on *Lipaphis pseudobrassicae*. AIP Conference Proceedings, 1276: 307-310.

Debnath, N. Das, S. Seth, D. Chandra, R. Bhattacharya, S.C. and Goswami, A. (2011). Entomotoxic effect of silica nanoparticles against *Sitophilus oryzae* (L.). Journal of Pest Science, 84: 99-105.

Dubois, N. R. Reardon, R. and Kolodny-Hirsch. D. M. (1988). Field efficacy of the NRD-12 strain of *Bacillus thuringiensis* against gypsy moth. Journal of Economic Entomology. 81: 1672-1677.

El-Naggar, M.E. Abdelsalam, N.R. Fouda, M.M.G. Mackled, M.I. Al-Jaddadi, M.A.M. Ali, H.M. Siddiqui, M.H. and Kandil, E.E. (2020). Soil application of nano silica on maize yield and its insecticidal activity against some stored insects after the post-harvest. Nanomaterials, 10:739.

El-Samahy, M.F.M. Khafagy, I.F. and El-Ghobary, A.M.A. (2015). Efficiency of silica nanoparticles, two bioinsecticides, peppermint extract and insecticide in controlling cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* Boisd. and their effects on some associated natural enemies in sugar beet fields. Journal of Plant Protection and Pathology, Mansoura University, 6:1221-1230.

Farahani, S. Talebi, A.A. and Fathipour, Y. (2011). Life cycle and fecundity of *Spodoptera exigua* (Lep.:Noctuidae) on five soybean varieties. Journal of Entomological Society of Iran, 30(2): 1-12.

Ghassemi-Kahrizeh, A. and Aramideh, Sh. (2014). Study on the synergistic effect of Henna in enhancement of pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner on third and fourth instars larvae of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col.: Chrysomelidae). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(12):1497-1507.

Goswami, A. Roy, I. Sengupta, S. and Debnath, N. (2010). Novel applications of solid and liquid formulations of nanoparticles against insect pests and pathogens. Thin Solid Films 519:1252-1257.

Gould, F. Ramirez, A.M. Anderson, M. Ferre, J. Silva, F.J. and Moar, W.J. (1992). Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 80: 7986-7990.

Hernandez-Martınez, P. Ferre, J. and Escriche B (2008) Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology, 97:245-250

Janmaat, A.F. and Myers, J. (2003). Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loppers, *Trichoplusia ni*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270: 2263-2270.

Javi, E. Safaralizadeh, M.H. and Poormirza, A.A. (2004). Survey of pathogenic of *Bacillus thuringiensis* Berliner on different instar larvae of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col., Chrysomelidae) and effect of plant synergistic in increasing its efficiency in laboratory conditions. Sciences and Techniques of Agriculture and Natural Sources, 4: 187-198. (In Persian).

Jijkli, M.H. (2010). European market of biological control agents: actual situation and perspectives. Final Report of an EU Project 416Pp.

Khanizad, A. and Safaralizadeh, M.H. (2002). 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, Kermanshah, Iran. Pp. 274. (In Persian).

Kish, K. J. (2004). Saprophagous caterpillars (Lepidoptera: Noctuidae: Herminiinae): Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* application in forest and laboratory settings. Master of Science Thesis. West Virginia University.

Konecka, E. Kaznowski, A. and Tomkowiak, D. (2019). Insecticidal activity of mixtures of *Bacillus thuringiensis* crystals with plant oils of *Sinapis alba* and *Azadirachta indica*. Annals of Applied Biology,174(3): 364-371.

Ling, M. A. Gordon, G. and Zalucki, M. (2000). Biological effects of azadirachtin on Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae) fed on cotton and artificial diet. Austeralian Journal of Entomology. 39: 301–304. 23.

Luna-Espino, JC. Castrejón-Gómez, VR. Pineda, S. Figueroa, JA. and Martínez, AM. (2018). Effect of four multiple nucleopolyhedrovirus isolates on the larval mortality and development of *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae) determination of virus production and mean time to death. Florida Entomologist, 101(2): 153-159.

Malaikozhundan, B. Vaseeharan, B. Vijayakumara, S. and Thangaraj, M. P. (2017). *Bacillus thuringiensis* coated zinc oxide nanoparticle and its biopesticidal effects on the pulse beetle, *Callosobruchus maculatus*. Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology, 174: 306-314.

Marimuthu, S. Abdul Rahuman, A. Kirthi, A.V. Santhoshkumar, T. Jayaseelan, C. and Rajakumar, G. B. (2013). Eco-friendly microbial route to synthesize cobalt nanoparticles using *Bacillus thuringiensis* against malaria and dengue vectors. Parasitology Research, 112: 4105–4112.

McGaughey, W.H. (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 229: 193-195.

Moar, W.J.M. Pusztai-Carey, H. van Faassen, D. Bosch and Frutos, R. (1995). Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lep.: Noctuidae). Applied and Environmental Microbiology, 61: 2086-2092.

Murugan, K. Jeyabalan, D. Senthil-Kumar, N. Babu, R. Sivaramakrishnan, S. and Senthil-Nathan, S. (1998). Antifeedant and growth-inhibitory properties of neem limonoids against the cotton bollworm Helicoverpa armigera (Hubner). Insect Science and Its Application, 18: 157-162.

Namvar, P. Safaralizadeh, M.H. and Pourmirza, A.A. (2003). Studies on the susceptibility of *Spodoptera exigua* (Hubner) larvae to *Bacillus thuringiensis* under greenhouse conditions. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 7: 215-221. (In Persian).

Nouri-Ganbalani, G. Borzoui, E. Abdolmaleki, A. Abedi, Z. and Kamita, S.G. (2016). Individual and combined effects of *Bacillus thuringiensis* and Azadirachtin on *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidopetra: Pyralidae). Journal of Insect Science, 16(1):95 1–8.

Palma, L. Delia Muñoz, D. Berry, C. Murillo, J. and Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. Toxins, 6(12): 3296-3325.

Pourmirza, A. A. (2005). Local variation in susceptibility of Colorado potato beetle (Col.: Chrysomelidae) to insecticide. Journal of Economic Entomology, 98: 2176-80.

Pavitra, G. Sushila, N. Sreenivas, A.G. and Ashok, J. Sharanagouda, H. (2018). Biosynthesis of green silica nanoparticles and its effect on cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover and mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7: 1450–1460.

Reardon, R, N. Dubois, and McLane. W. (1994). *Bacillus thuringiensis* for managing gypsy moth: A review. U. S. Forest Serv., National Center of Forest Health Management. Morgantown, WV. FHM-NC-01-94. 32 pp.

Rouhani, M. Samih, M.A. and Kalantari, S. (2012). Insecticidal effect of silica and silver nanoparticles on the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus* F. (Col.: Bruchidae). Journal of Entomology Research, 4:297-305.

Salama, H.S. and Salem, S.A. (2000). *Bacillus thuringiensis* and neem seed oil (*Azadirachta indica*) effects on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* zeller in the field and stores. Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz, 33: 73-80.

Sansinenea, E. (2012). *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Dordrecht; Heidelberg; London; New York, NY: Springer.

Sarailoo, M.H. and Poorghaz, A.H. (2006). The effect of some plant origin materials against *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) in cotton field of Gonbad. Journal of Agriculture Science Natural Resources, 13(4): 62-72. (In Persian).

Schünemann, R. Knaak, N. and Fiuza, L.M. (2014). Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. ISRN Microbiology, 1-12.

Sharifzadeh, M.S. Abdollahzadeh, G. Damalas, Ch.A. and Rezaei, R. (2018). Farmers' criteria for pesticide selection and use in the pest control process. Agriculture, 8: 24.

Sheibani, Z.T. (2010). Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on first, second and third ages of white leaf-eating butterfly larvae of Pistachio *Ocneria terebinthina* (Lep.:Lymanteridae). Journal of Research in Agricultural Science, 6 (11): 83- 92.

Shoaib, A. Elabasy, A. Waqas, M. Lin, L. Cheng, X. Zhang, Q. and Shi, Z. (2018). Entomotoxic effect of silicon dioxide nanoparticles on *Plutella xylostella* (L.) (Lep.: Plutellidae) under laboratory conditions. Environmental Toxicology and Chemistry, 100: 80-91.

Singh, G. Rup, P. J. and Koul O. (2007). Acute, sublethal and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* toxins on *Helicoverpa armigera* (Lep.: Noctuidae) larvae. Bulletin of Entomological Research, 97: 351-7.

Singh, P. and Moore, R. F. (2005). Handbook of Insect Rearing. Elsevier Science Publishers 7: 575- 576.

Siqueira, H.A.A. Moellenbeck, D. Spencer, T. and Siegfried. B.D. (2004). Cross-resistance of Cry1Ab-selected *Ostrinia nubilalis* (Lep.: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins. Journal of Economic Entomology, 97: 1049-1057.

Soundararajan, R.P. (2012). Pesticides- Advances in Chemical and Botanical Pesticides. InTech, Rijeka, Croatia.

Sudo, M. Takahash,i D. Andow, D.A. Suzuki, Y. and Yamanaka, T. (2017). Optimal management strategy of insecticide resistance under various insect life histories: heterogeneous timing of selection and interpatch dispersal. Evolutionary Applications, (2): 271-283.

Tabashnik, B.E. Zhang, M. Fabrick, J.A. Wu, Y. and Gao, M. (2015). Dualmode of action of *B.t*. proteins: protoxin efficacy against resistant insects. Nature, 5: 15107.

Tabashnik, B.E. Liu, Y.B. Unnithan, D.C. Carriere,Y. Dennehy, T.J. and Morin, S. (2004). Shared genetic basis of resistance to *B.t.* toxin Cry1Ac in independent strains of pink bollworm. Journal of Economic Entomology, 97: 721-726.

Tabashnik, B. E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual Review of Entomology, 39: 47-79.

Togbe, C.E. Zannou, E. Gbehounou, G. Kossou, and Huis, A.V. (2014). BBC: Biological based combinations- a concept way forward in sustainable pest management. International Journal of Tropical Insect Science, 34: 248-259.

Wraight, SP. and Ramos, ME. (2005). Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* tenebrionis- based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 90(3): 139-150.

Xu, J. Huigens, ME. Orr, D. and Groot, AT. (2014). Differential response of *Trichogramma* wasps to extreme sex pheromone types of the noctuid moth *Heliothis virescens*. Ecological Entomology, 39: 627-636.

Xu, Qin. Xuemei, Xiang. Xiaowen, Sun. Hong, Ni. and Lin, Li. (2016). Preparation of nanoscale *Bacillus thuringiensis* chitinases using silica nanoparticles for nematicide delivery. International Journal of Biological Macromolecules, 82: 13-21.

Xu, X. Yu, L. and Wu, Y. (2005). Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. Applied and Environmental Microbiology, 71: 948-954.

Zhu,. F. Lavine, L. O'Neal, S. Lavine, M. Foss, C. and Walsh, D. (2016). Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems. Insects, 7(1): 2.

Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in combination with neemarin and silica nanoparticles in the control of second instar larvae of sugar beet, *Spodoptera exigua* Hb. (Lep.: Noctuidae) in laboratory condition

M. Alimohamadian[1], Sh. Aramideh[2]*, Sh. Mirfakhraie[3], M. Frozan[4]

Received: 2021.2.17

Accepted: 2021.6.29

Abstract:

Use of plant and physical compounds with Bacillus thuringiensis var. kurstaki (Btk) is very important in reducing the dose and increasing its effect. Therefore, the efficiency of Btk in mixing with silica nanoparticles and neemarin in controlling second larval instar Spodoptera exigua Hb. in vitro was evaluated. The LC_{50} value obtained from the effect of different concentrations of Btk, silica nanoparticles and neemarin after 72 hours was obtained (724.78, 982.28 and 393.39) mg.L -1, respectively. In the study of the mix effect, the highest and lowest mortality were observed in the treatment of Btk combination with neemarin (66%) and the control treatment (distilled water) (2%). Also, in the damage assessment, the highest and lowest damage was observed in the control (55.3%) and Btk combination neemarin (15%) tratments. Due to the increased efficiency of Btk in combination with neemarin, their combined use in the control of larval instar of S. exigua is recommended.

Keywords: Bacillus thuringiensis, lethality, Nanomaterial, Spodoptera exigua

1PhD Student of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia-Pardis, Ir
2Associate professor of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
(*Corresponding Author: Sh.aramideh@Urmia.ac.ir)
3Assistant Professor of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
4Plant Protection Research Department, West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Urmia, Iran