اثرات زیرکشندگی *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Berliner روی کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* Hübner

ناهید واعظ[۱*]، شهزاد ایرانی‌پور[۲] و میرجلیل حجازی[۲]

۱- استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان.
۲- استاد گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.
* مسئول مکاتبه: naheedvaez@gmail.com
تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۲

چکیده

کرم غوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidopter: Noctuidae) یکی از آفات مهم محصولات کشاورزی در غالب نقاط دنیا از جمله ایران می‌باشد. در این آزمایش اثرات زیرکشنده‌ی غلظت LC_{20} باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Berliner روی لاروهای سن سوم کرم غوزه‌ی پنبه در شرایط دمایی ۱ ± ۲۶ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰ ± ۶۵ درصد و دوره نوری ۸ : ۱۶ ساعت (تاریکی : روشنایی) در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس آزمایش‌های زیست‌سنجی صورت گرفته، غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis*، روی لاروهای سن سوم کرم غوزه‌ی پنبه، $۹/۸ \times ۱۰^{۵}$ واحد موثر در لیتر (IU/L) به‌دست آمد. میانگین طول عمر و میانگین تعداد تخم گذاشته شده در طول عمر افراد ماده *H. armigera* در شاهد و تیمار باکتری به‌ترتیب، ۱/۰۵ ± ۱۶/۶۳، ۱/۰۵ ± ۱۳/۸۸ روز، ۱۴۷/۶۸ ± ۱۳۳۶/۸۳ و ۱۴۷/۶۸ ± ۱۰۲۹ تخم به‌دست آمد که در مورد هر دو فراسنجه، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود داشت. نرخ تولیدمثل خالص (R_0) در شاهد و تیمار باکتری به‌ترتیب، ۵۱/۸۹ ± ۵۸۲/۲۲ و ۲۷/۷۸ ± ۱۲۶/۳۸ ماده/ ماده/ نسل، نرخ ذاتی افزایش جمعیت (r_m)، ۰/۰۰۲ ± ۰/۱۴۴۲ و ۰/۰۰۴ ± ۰/۱۰۸۲ ماده/ ماده/ روز، نرخ متناهی رشد (λ)، ۰/۰۰۳ ± ۱/۱۵۵ و ۰/۰۰۴ ± ۱/۱۱۴ ماده/ ماده/ روز، طول مدت یک نسل (T)، ۰/۶۲ ± ۴۴/۱۶ و ۰/۶۲ ± ۴۴/۷۳ روز و زمان دوبرابر شدن جمعیت (DT)، ۰/۰۸ ± ۴/۸۰ و ۰/۲۱ ± ۶/۴۱ روز به‌دست آمد که به غیر از میانگین طول مدت یک نسل بقیه‌ی فراسنجه‌های رشد جمعیت پایدار *H. armigera* اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بین شاهد و تیمار باکتری نشان دادند. نتایج نشان داد که باکتری مذکور توانایی کاهش جمعیت کرم غوزه‌ی پنبه را دارد و جهت کاهش مصرف سموم در مناطقی که آفت مذکور حضور دارد، این ماده میکروبی قابل پیشنهاد است.

واژه‌های کلیدی: زیست‌سنجی، فراسنجه‌های جمعیت پایدار، کرم غوزه پنبه، *Bacillus thuringiensis*

مقدمه

کرم غوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* (Hübner) یکی از آفات مهم پنبه محسوب می‌شود که به گیاهان دیگر از قبیل توتون، گوجه‌فرنگی، یونجه، خشخاش، کنف، شبدر، ذرت، نخود، کنجد، گل ابریشم، پسته، بادنجان، سویا، لوبیا، ذرت خوشه‌ای، کدو و شاهدانه نیز حمله می‌کند (بهداد ۱۳۸۱). کنترل کرم غوزه‌ی پنبه در اکثر نقاط دنیا با استفاده از حشره‌کش‌ها صورت می‌گیرد. خسارت‌زایی بسیار زیاد کرم غوزه‌ی پنبه و مقاوم شدن آن در برابر حشره‌کش‌های شیمیایی، میزان استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی را افزایش داده است. این وضعیت منجر به افزایش هزینه‌های مربوط به کنترل آفت و افزایش آثار سوء جانبی کاربرد آفت‌کش-های شیمیایی گردیده‌است. بنابراین برای کاهش اثرات سوء جانبی آفت‌کش‌ها و کنترل بهینه‌ی آفت، کوشش‌های بسیاری در به‌کارگیری روش‌های گوناگون کنترل و کنترل تلفیقی انجام گرفته‌است (لامرز و مکلود ۲۰۰۷). در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات با هدف دسترسی به

یک کنترل موثر و انتخابی با حداقل ایجاد اختلال در محیط زیست و تامین حداکثر سلامتی انسان است، استفاده از حشره‌کش‌های میکروبی از روش‌های ایده‌آل کنترل آفات به شمار می‌روند (طالبی چایچی و خرمشاهی ۱۳۷۳) و در میان این حشره‌کش‌ها، باکتری‌ها بیش‌از همه مورد استفاده تجاری قرار گرفته‌اند (هاجک و همکاران ۲۰۰۹؛ بیلی و همکاران ۲۰۱۰) و در این بین، باکتری‌های جنس *Bacillus* از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند.

در حال حاضر چهار گونه باسیلوس برای کنترل آفات به‌کار می‌روند که بیشترین توجه روی *Bacillus thuringiensis* Berliner متمرکز می‌باشد (چارلز و همکاران ۲۰۰۰؛ لیسی و سیجل ۲۰۰۰؛ هاجک و همکاران ۲۰۰۹؛ بیلی و همکاران ۲۰۱۰). این باکتری به‌عنوان متداول‌ترین عامل کنترل میکروبی حشرات مورد استفاده قرار می‌گیرد و امروزه در تولید بیش از ۹۰٪ آفت‌کش-های میکروبی و تعداد زیادی از گیاهان تراژن (Bt-crops) مقاوم به حشرات کاربرد دارد (لیسی و همکاران ۲۰۰۱؛ گیلبرت و گیل ۲۰۱۰؛ سانسینتا ۲۰۱۲). از متداول‌ترین واریته‌های این باکتری، *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* و *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* می‌باشند که عمدتاً علیه لاروهای بال‌پولکداران مؤثر هستند (کاظمی ۱۳۷۴؛ موسوی ۱۳۷۹؛ رخشانی ۱۳۸۱؛ خانجانی و خلقانی ۱۳۸۷ ؛ کرافت ۱۹۹۰؛ نون و آشر ۲۰۰۰؛ وگا و کایا ۲۰۱۲). کریستال پروتئین یا توکسین اصلی این باکتری (دلتا اندوتوکسین[1]) به‌صورت حشره‌کش اختصاصی عمل می‌کند و روی موجودات غیر هدف اثر سوء کمی دارد (آویلا و همکاران ۲۰۰۵). میزان سمیت این باکتری روی سنین مختلف لاروی گونه‌های مختلف بالپولکداران بسیار متغیر می‌باشد (مشتولی و همکاران ۲۰۱۱). باکتری *B. thuringiensis*، علیه لاروهای بال-پولکداران به‌کار می‌رود و معمولاً حشرات بالغ را آلوده نمی‌کند. با این‌که این میکروارگانیسم روی افراد بالغ تأثیری ندارد، اما ممکن است در مراحل نابالغ در بدن میزبان پایدار مانده و سبب آلودگی‌های بعدی در زمان بلوغ گردد. این امر ممکن است روی فراسنجه‌های زیستی افراد بالغ از قبیل میزان باروری، طول عمر و سایر فراسنجه‌های زیستی میزبان تأثیر بگذارد. علاوه بر این، چنین آلودگی‌هایی می‌توانند به‌طور غیر مستقیم دشمنان طبیعی را نیز تحت تأثیر قرار دهند (رخشانی ۱۳۸۱؛ هاجک و همکاران ۲۰۰۹؛ ساندارا‌راجان ۲۰۱۲). دامو (۱۹۹۰) دریافت که در اثر تیمار لاروهای کرم غوزه‌ی پنبه با باکتری *B. thuringiensis*، افراد بالغ بدشکلی ظاهر شدند. راماچادران و همکاران (۱۹۹۳) مشاهده کردند که پروتئین Cry1Aa هیچ تأثیر مخربی روی وزن شفیره‌های *Choristoneura fumiferana* (Clemens) و *Hyphantria cunea* (Drury) ندارد و ایشان پیشنهاد کردند که اثرات منفی باکتری *B. thuringiensis* بسته به نوع توکسین ایجاد شده توسط باکتری تغییر پیدا می‌کند. عبدالستار و واتسون (۱۹۸۲) نیز گزارش نمودند که باکتری *B. thuringiensis* می‌تواند رفتار جفت-گیری و تخم‌ریزی *Heliothis virescens* Fabricius را به حدی تحت تأثیر قرار دهد که تفریخ تخم نزدیک صفر درصد گردد. کریر و همکاران (۲۰۰۱) اعلام نمودند که افراد بالغ *Pectinophora gosyypiella* (Saunders) که در مرحله لاروی، توکسین Cry1Ac باکتری *B. thuringiensis* را دریافت نموده بودند دارای تخم‌هایی با درصد تفریخ پایین‌تر نسبت به افراد سالم بودند. مشابه همین گزارش در مورد *Agrotis ypsilon* Hufnagel هم صورت گرفته است (حافظ و همکاران ۱۹۹۳). هم‌چنین در برخی موارد دیده شده که لاروهای میزبانی که تحت تأثیر باکتری قرار گرفته‌اند رشد آهسته‌تری داشته، یا از نظر اندازه کوچک‌تر از لاروهای سالم بوده‌اند و در نتیجه مستعد حمله پارازیتوئیدها گردیده‌اند و میزان پارازیتیسم در چنین مواردی افزایش یافته است (ماسکارنهاس و لوترل ۱۹۹۷). نتایج مطالعات وو و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که استفاده از باکتری *B.thuringiensis* در سن اول لاروی، جمعیت *Pieris brassicae* L. را به طور محسوسی کاهش می‌دهد و هم‌چنین لاروهای سن دوم حساسیت بالاتری نسبت به لاروهای سن سوم نشان دادند.

با این‌که امروزه در برخی نقاط پنبه‌کاری کشور از حشره‌کش میکروبی *B. thuringiensis* همراه با سایر

[1] δ-endotoxin

روش‌های کنترلی از جمله کنترل زیستی استفاده می‌شود، اما هنوز اطلاع دقیق و درستی از میزان اثر این ماده میکروبی روی آفت مذکور در دست نیست. با توجه به این‌که در کشور ما استفاده از ترکیبات میکروبی سابقه زیادی ندارد، لازم است در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات و ایمنی محیط زیست توجه بیشتری به این عوامل شده و استفاده از این عوامل توسعه یابد. یکی از اطلاعات مهم و اساسی در مدیریت تلفیقی آفات، آگاهی از نیازهای زیستی و بوم‌شناختی آفت بوده و تعیین مقادیر کمی فراسنجه‌های زیستی بقا و تولید مثل که تحت عنوان دموگرافی[1] شناخته می‌شود در این راه مفید و موثر می‌باشد. لذا در این تحقیق اثرات زیرکشندگی باکتری *B. thuringiensis* روی کرم غوزه‌ی پنبه مورد بررسی قرار گرفت تا معلوم شود حشره‌کش میکروبی *B. thuringiensis*، تا چه حد توانایی کاهش بقا و تولید مثلی آفت را دارد.

مواد و روش‌ها

پرورش کرم غوزه‌ی پنبه

حشرات مورد استفاده در این بررسی به صورت لاروهای سنین مختلف از کلنی پرورشی موجود در گلخانه گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز تهیه گردید. جهت پرورش لاروها از غذای مصنوعی با استفاده از روش ذکرشده توسط سینگ (۱۹۸۲) استفاده شد. لاروهای سنین یک تا چهار داخل ظروف استوانه‌ای پلاستیکی به‌قطر ۲۰ و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر که حاوی مقدار کافی غذای مصنوعی بودند، نگهداری گردیدند. روی درب ظروف مزبور دو سوراخ به قطر ۲/۵ و فاصله ۵/۵ سانتی متر از یکدیگر، برای تهویه ایجاد و با پارچه‌ی توری ۷۰ مش پوشانده شدند. تراکم مناسب برای لاروها در این ظروف، ۱۲۰ – ۱۰۰ لارو به‌ازای هر ظرف بود (محمدی ۱۳۸۴). پس از اینکه لاروها به سن چهارم رسیدند، به‌منظور جلوگیری از همنوع‌خواری، هر لارو به‌صورت انفرادی به داخل قوطی‌های فیلم معمولی به‌قطر دهانه‌ی سه و ارتفاع پنج سانتی‌متر منتقل شد که روی درب آن‌ها سوراخی به قطر ۷/۵ میلی‌متر ایجاد و با توری سیمی ۱۶ مش پوشانده شده بود. بازدیدهای روزانه به‌منظور تمیزکردن ظروف و اضافه نمودن غذا صورت گرفت. پس از ظهور حشرات کامل، تعداد ۱۰ جفت حشره‌ی نر و ماده (به نسبت ۱:۱) داخل ظروف تخم‌گیری منتقل گردیدند (حشرات ماده به رنگ قهوه‌ای و حشرات نر به رنگ سبز می‌باشند). ظروف تخم‌گیری عبارت بودند از استوانه‌های پلاستیکی شفاف به ارتفاع ۱۸ و قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر که دهانه‌ی آن‌ها با توری پارچه‌ای ۵۰ مش پوشانده شده بود و به‌منظور تغذیه‌ی حشرات کامل، داخل هر ظرف، یک قوطی فیلم حاوی حدود ۳۵ میلی‌لیتر آب‌عسل ۲۰ درصد قرار داده شده بود. توری‌های حاوی تخم روزانه تعویض و تا تفریخ تخم‌ها نگهداری گردید. لاروهای ۲۴ ساعته سن یک ظاهرشده برای ادامه پرورش کلنی مورد استفاده قرار گرفتند. این کار به مدت شش نسل انجام گرفت و از لاروهای سن سوم نسل ششم برای انجام آزمایش‌های اصلی استفاده شد.

باکتری ***B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* PB54 Strain**

باکتری مورداستفاده در این آزمایش، به‌صورت پودر قابل تعلیق در آب (WP) با نام تجارتی بلتی‌رول[2] ساخت شرکت Probelte[3] کشور اسپانیا، از بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی مرکز حفظ نباتات تبریز تهیه شد. پودر مذکور حاوی ۳۲۰۰۰ واحد مؤثر بر میلی‌گرم (I.U./mg) اسپور و کریستال باکتری بود.

نحوه انجام آزمایش‌ها

زیست‌سنجی لاروهای کرم غوزه‌ی پنبه با باکتری ***B. thuringiensis* subsp. *kurstaki***

به‌دلیل ماهیت باکتری *B. thuringiensis* که از طریق گوارشی مؤثر است و باید مورد تغذیه واقع شود تا اثرات خود را نشان دهد، زیست‌سنجی‌ها با مخلوط - کردن غلظت‌های مختلف باکتری با غذای مصنوعی که برای پرورش لاروهای کرم غوزه‌ی پنبه مورد استفاده

[1] Demography

[2] Belthirul

[3] http://www.probelte.es/es/index.jsp

قرار می‌گرفت، انجام شد (عابدی و همکاران ۲۰۱۴). برای این کار، ابتدا آزمایش‌های مقدماتی (تعیین محدوده‌ی غلظت‌ها) انجام گرفت و غلظت‌هایی که موجب مرگ‌ومیر حدود ۱۰ تا ۸۰ درصد جمعیت مورد آزمایش شدند انتخاب گردیدند. آزمایش‌های اصلی با شش غلظت به اضافه شاهد در سه تکرار انجام شدند. غلظت‌های مورد بررسی در آزمایش‌های اصلی عبارت بودند از : $۱۰^{۵} \times ۴۴/۸$، $۱۰^{۵} \times ۲۷/۵۲$، $۱۰^{۵} \times ۱۶/۶۴$، $۱۰^{۵} \times ۱۰/۲۴$ و $۱۰^{۵} \times ۶/۴$ واحد مؤثر در لیتر (IU/L)[1]. جهت انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی، ۲۵ عدد لارو سن سوم کرم غوزه‌ی پنبه که ۲۴ ساعت از پوست‌اندازی آن‌ها می‌گذشت به‌طور تصادفی انتخاب شدند و به‌مدت سه ساعت بدون تغذیه نگهداری شدند. سپس هر یک به‌طور انفرادی داخل قوطی فیلم قرار داده شدند. پس از تهیه‌ی غلظت‌های مورد نظر باکتری، به نسبت ۱ به ۹ با ماده‌ی غذایی مصنوعی مخلوط شدند و برای اطمینان از این‌که سوسپانسیون سمی و غذا خوب با هم آمیخته شده‌اند، سه قطره رنگ سبز خوراکی به آن‌ها اضافه گردید و توسط کاردک به خوبی با هم مخلوط شدند. سپس دو گرم از ماده غذایی حاوی غلظت‌های مورد نظر باکتری داخل قوطی‌های فیلم قرار داده شدند تا مورد تغذیه لاروها قرار گیرند. لاروها به مدت سه روز از این غذا تغذیه شده و سپس از غذای مصنوعی بدون باکتری تغذیه کردند. در شاهد به جای باکتری از آب مقطر استفاده شد. نتایج آزمایش، به‌مدت یک هفته پس از انجام آزمایش، هر روز ثبت گردید. افراد مرده سیاه شده و فاقد هر گونه تحرکی بودند. آزمایش مذکور سه بار تکرار گردید.

جدول زندگی- زادآوری کرم غوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera*

به‌منظور بررسی اثرات زیرکشنده‌ی باکتری *B. thuringiensis* روی کرم غوزه‌ی پنبه از غلظت LC_{20} باکتری و برای تعیین فراسنجه‌ها از جدول‌های زندگی زادآوری ویژه سنی استفاده شد. برای انجام این آزمایش‌ها، ابتدا ۳۰۰ عدد تخم ۲۴ ساعته کرم غوزه‌ی پنبه در ظرف پلاستیکی دایره‌ای شکل به قطر ۱۵ سانتی‌متر قرار داده شد. بعد از تقریباً سه روز، تخم‌ها تفریخ شده، لاروهای خارج شده به ظرف دیگری (مشابه ظروفی که تخم‌ها نگه داشته شده بودند) حاوی ماده‌ی غذایی مصنوعی انتقال داده شدند. این لاروها روزانه با غذای مصنوعی فاقد باکتری تغذیه شدند. پس از این‌که لاروها به سن سوم رسیدند، به‌طور تصادفی به دو گروه مجزا تفکیک و در دو ظرف جداگانه قرار داده شدند. برای انجام این آزمایش، دو تیمار، یکی شاهد و دیگری تیمار باکتری، در نظر گرفته شد. در شاهد لاروهای سن سوم تا مرحله‌ی پیش‌شفیرگی روزانه با دو گرم غذای مصنوعی فاقد باکتری تغذیه شدند، اما در تیمار حاوی باکتری، پس از جدا کردن لاروها و انتقال آن‌ها به ظرف دیگر، تا زمان تبدیل آن‌ها به پیش‌شفیره روزانه با دو گرم غذای حاوی غلظت LC_{20} باکتری تغذیه شدند. پس از طی شدن مرحله شفیرگی و تعیین جنسیت حشرات کامل ظاهر شده، یک جفت نر و ماده داخل ظروف پلاستیکی استوانه‌ای شکل سفید به‌قطر دهانه ۱۰ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر منتقل شدند که دهانه‌ی آن‌ها با توری پارچه‌ای ۵۰ مش پوشانده شده بود. به‌منظور تغذیه حشرات کامل، از آب-عسل ٪۲۰ استفاده شد. ظروف مذکور روزانه تعویض و توری، قوطی فیلم حاوی آب‌عسل و دیواره داخلی ظرف استوانه‌ای بازدید و تعداد تخم گذاشته شده شمارش و تا خروج حشرات کامل و تعیین نسبت جنسی درون اطاقک رشد نگهداری شدند. این کار تا مرگ آخرین فرد ماده تکرار شد. هر فرد ماده به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شده (مجموعا دارای ۵۰ تکرار برای هر تیمار) و مرگ هر ماده به‌منزله پایان ثبت نتایج برای تکرار مربوطه بود. تمامی مراحل ذکر شده برای شاهد و تیمار باکتری مشابه بود. آزمایش‌ها در داخل اطاقک رشد با شرایط دمایی ۱± ۲۶ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰ ± ۶۵ درصد و دوره نوری ۸ : ۱۶ ساعت (تاریکی : روشنایی) انجام گرفت.

[1] International Unite per liter

تعیین منحنی بقا و محاسبه‌ی فراسنجه‌های رشد جمعیت پایدار کرم غوزه‌ی پنبه در شاهد و تیمار باکتری

برای تشکیل جدول زندگی و محاسبه‌ی فراسنجه‌های مربوط به آن، از روش کری (۱۹۹۳) استفاده شد. در این جدول داده‌های حاصل از ثبت نتایج آزمایش شامل سن فرد ماده (x) و تعداد افراد زنده مانده در سن x (N_x)، در دو ستون در نرم‌افزار Excel درج شدند و نرخ بقا (l_x) و امید زندگی (e_x) با استفاده از اعداد این دو ستون و فرمول‌های مربوطه محاسبه شدند. برای تعیین نوع منحنی بقا از کمیتی موسوم به انتروپی[1] استفاده شد.

برای محاسبه‌ی فراسنجه‌های رشد جمعیت پایدار، داده‌های حاصل از انجام آزمایش شامل سن (x)، نسبت بقای حشرات ماده در سن x (l_x) و میانگین تعداد تخم ماده حاصل در سن x (m_x) در یک جدول وارد و سایر فراسنجه‌ها در نرم‌افزار Excel محاسبه شدند.

مقدار دقیق نرخ ذاتی افزایش جمعیت (r_m) با حل معادله‌ی اویلر- لوتکا[2] محاسبه شد:

$$\sum_{x=0}^{\omega} l_x m_x e^{-r_m \cdot x} = 1$$

از دیگر فراسنجه‌های برآورد شده، نسبت تولیدمثل ناخالص (GRR)، نسبت تولیدمثل خالص (R_0)، نرخ متناهی رشد (λ)، میانگین طول مدت یک نسل (T)، نرخ ذاتی تولد (b) و نرخ ذاتی مرگ (d) بودند. برای تعیین خطای استاندارد فراسنجه‌های جمعیت پایدار، از روش جک‌نایف[3] استفاده گردید (مایا و همکاران ۲۰۰۰).

طرح آزمایشی و نحوه‌ی تجزیه‌ی داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی پیاده شدند. برای مقایسه‌ی دو تیمار آزمایش (شاهد و تیمار آلوده به باکتری) از آزمون t در سطح احتمال یک و پنج درصد استفاده گردید. پیش از آزمون t، آزمون F مبنی بر تجانس واریانس دو تیمار انجام شد و در مواردی که آزمون F معنی‌دار بود، از آزمون t نامتعادل (با واریانس‌های نامساوی) استفاده شد. تجزیه‌ی داده‌های مربوط به آزمایش زیست‌سنجی و تعیین غلظت‌های LC_{50} و LC_{20} با استفاده از رویه Probit نرم‌افزار SAS (2006) انجام شد و نمودارهای مربوط به تمامی آزمایش‌های انجام شده در محیط Excel رسم شدند.

نتایج

زیست‌سنجی لاروها:

بر اساس زیست‌سنجی‌های انجام شده، غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* روی لاروهای سن سوم کرم غوزه‌ی پنبه، در پژوهش حاضر، $۹/۸ \times ۱۰^{۵}$ واحد مؤثر در لیتر به‌دست آمد (جدول ۱). نتایج نشان داد که میزان مرگ‌ومیر افراد در طول زمان افزایش پیدا کرد. به عنوان مثال، غلظت $۳۳/۴ \times ۱۰^{۵}$ IU/L بعد از سه روز، موجب مرگ‌ومیر ۲۰٪ جمعیت همزادگان آزمایشی شد در حالی‌که بعد از پنج روز، مرگ‌ومیر افراد در همین غلظت به ۵۰٪ درصد رسید. از طرف دیگر به‌منظور ایجاد مرگ‌ومیر ۹۰٪، غلظتی پنج برابر بیشتر مورد نیاز است (به جدول ۱ مراجعه شود). به‌علت این‌که مقدار کای‌اسکوار در تمام تجزیه‌های پروبیت غیرمعنی‌دار بود، هیچ عامل عدم تجانسی در محاسبه‌ی ضریب اطمینان مقادیر LC_{50} مورد استفاده قرار نگرفت ($P>0.05$).

توقف تغذیه، بی‌حرکتی، بی‌حالی، نقص در تغییر جلد، قهوه‌ای شدن قسمت‌های مختلف بدن و نهایتاً سیاه شدن بدن و لهیده شدن آن عمده‌ترین علایم مسمویت لاروها توسط باکتری *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* بودند.

فراسنجه‌های زیستی:

میانگین طول عمر افراد ماده *H. armigera* در شاهد و تیمار باکتری به‌ترتیب، $۱/۰۵ \pm ۱۶/۶۳$ و $۱/۰۵ \pm ۱۳/۸۸$ روز به‌دست آمد. نتیجه آزمون t نشان داد که از نظر میانگین طول عمر زنبورهای ماده بین شاهد و تیمار باکتری تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد (جدول ۲).

[1] Entropy
[2] Euler-Lotka equation
[3] Jackknife

جدول ۱- غلظت‌های کشنده‌ی باکتری ***B. thuringiensis*** **subsp.** ***kurstaki*** روی لاروهای سن سوم ***Helicoverpa armigera*** سه تا شش روز بعد از تیمار.

زمان بعد از تیمار	تعداد لارو مورد آزمایش	شیب خط ± SE	LC_{20} (IU/l diet) (محدوده‌ی اطمینان)	LC_{50} (IU/l diet) (محدوده‌ی اطمینان)	LC_{90} (IU/l diet) (محدوده‌ی اطمینان)	χ^2 (df =۳)
روز سوم	۳۷۵	۱/۵۲ ± ۰/۳۱	۳۳/۴ × $۱۰^۵$ (۲۵/۵ ×$۱۰^۵$ – ۵۱/۲ ×$۱۰^۵$)	۱۱۹/۱ × $۱۰^۵$ (۶۹/۷ ×$۱۰^۵$ – ۴۰۱/۳ ×$۱۰^۵$)	۸۲۷/۲ × $۱۰^۵$ (۲۸۲/۶ ×$۱۰^۵$ – ۱۰۵۰/۸ ×$۱۰^۵$)	۵/۰۷ ^{ns*}
روز چهارم	۳۷۵	۱/۷۴ ± ۰/۲۶	۱۶/۲ × $۱۰^۵$ (۱۲/۷ ×$۱۰^۵$ – ۱۹/۶ ×$۱۰^۵$)	۴۹ × $۱۰^۵$ (۳۷/۶ ×$۱۰^۵$ – ۷۵/۹ ×$۱۰^۵$)	۲۶۵/۵ × $۱۰^۵$ (۱۴۳/۷ ×$۱۰^۵$ – ۸۱۲/۴ ×$۱۰^۵$)	۵/۰۰ ^{ns}
روز پنجم	۳۷۵	۱/۸۲ ± ۰/۲۵	۱۱/۶ × $۱۰^۵$ (۸/۸ ×$۱۰^۵$ – ۱۴/۱ ×$۱۰^۵$)	۳۳/۵ × $۱۰^۵$ (۲۷/۴ ×$۱۰^۵$ – ۴۴/۶ ×$۱۰^۵$)	۱۶۸/۵ × $۱۰^۵$ (۱۰۳/۶ ×$۱۰^۵$ – ۳۸۴/۶ ×$۱۰^۵$)	۶/۷۷ ^{ns}
روز ششم	۳۷۵	۱/۸۰ ± ۰/۲۴	۹/۸ × $۱۰^۵$ (۷/۲ ×$۱۰^۵$ – ۱۲/۱ ×$۱۰^۵$)	۲۸/۸ × $۱۰^۵$ (۲۳/۸ ×$۱۰^۵$ – ۳۶/۹ ×$۱۰^۵$)	۱۴۷/۷ × $۱۰^۵$ (۹۳/۱ ×$۱۰^۵$ – ۳۲۰/۹ ×$۱۰^۵$)	۵/۹۵ ^{ns}

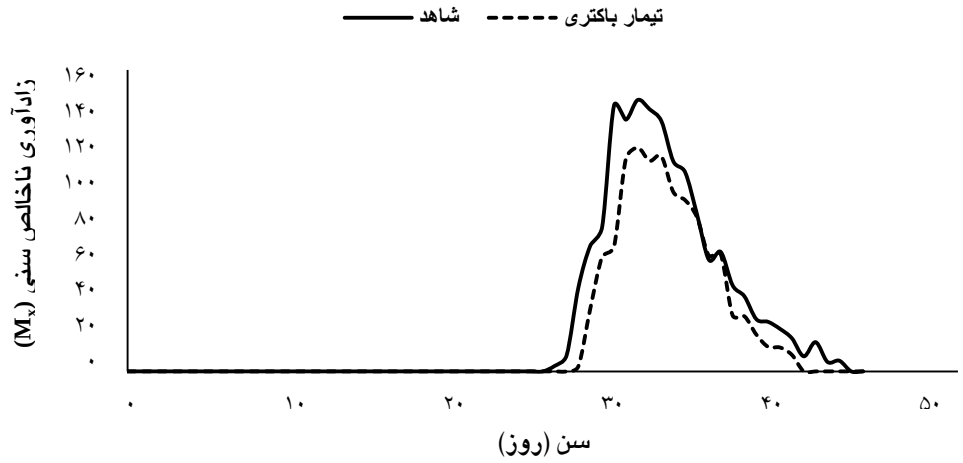
* **ns** : غیرمعنی‌دار.

جدول ۲- نتایج آزمون‌های F، t و میانگین (±SE) فراسنجه‌های زیستی ***H. armigera*** در شاهد و تیمار ***B. thuringiensis*** .

فراسنجه	آزمون F		df		آزمون t		df	میانگین ± اشتباه استاندارد	
	آماره‌ی F	مقدار بحرانی	صورت	مخرج	آماره‌ی t	مقدار بحرانی آزمون یک طرفه		مقدار بحرانی آزمون دو طرفه	شاهد	تیمار باکتری
طول دوره‌ی نابالغ	۱/۴۶ ^{ns}	۱/۵۹	۵۱	۵۱	۸/۴۸ **	۱/۶۶	۱۰۲	۱/۹۸	۳۵/۶۵ ± ۰/۴۵	۳۹/۵۲ ± ۰/۴۵
طول عمر حشرات کامل	۱/۱۵ ^{ns}	۱/۹۰	۴۰	۱۶	۲/۲۶ *	۱/۶۷	۵۶	۲/۰۰	۱۶/۶۳ ± ۱/۰۵	۱۳/۸۸ ± ۱/۰۵
دوره‌ی تخم‌ریزی	۱/۲۳ ^{ns}	۱/۹۰	۴۰	۱۶	۲/۲۴ *	۱/۶۷	۵۶	۲/۰۰	۱۲/۹۵ ± ۰/۸۹	۱۰/۹۴ ± ۰/۸۹
زادآوری	۱/۴۳ ^{ns}	۲/۱۵	۴۰	۱۶	۲/۰۸ *	۱/۶۷	۵۶	۲/۰۰	۱۳۳۶/۸۳ ± ۱۴۷/۶۸	۱۰۲۹ ± ۱۴۷/۶۸

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪، * معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ و **ns** عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

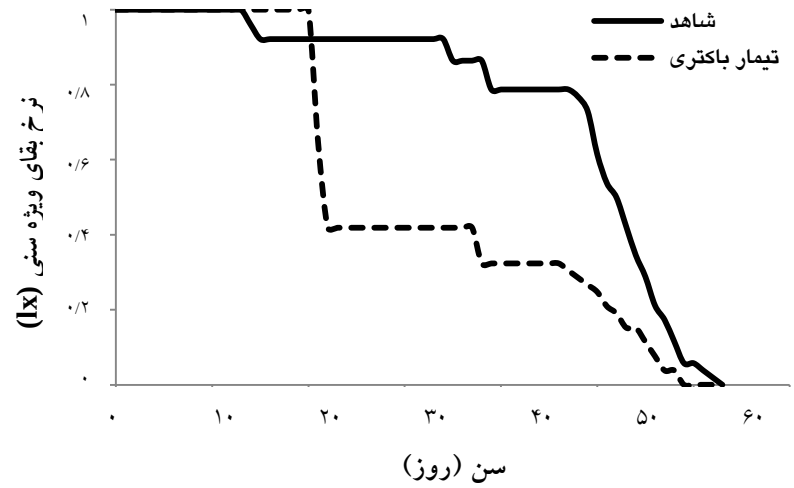
میانگین تعداد تخم گذاشته شده در طول عمر افراد ماده *H. armigera* در شاهد و تیمار باکتری به‌ترتیب، ۱۴۷/۶۸ ± ۱۳۳۶/۸۳ و ۱۴۷/۶۸ ± ۱۰۲۹ تخم به‌دست آمد. آزمون t نشان داد که بین دو تیمار یاد شده، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد (جدول ۲). کمینه و بیشینه تخم گذاشته شده توسط افراد ماده کرم غوزه‌ی پنبه در شاهد به‌ترتیب، ۵۷ و ۲۵۲۶ تخم و در تیمار باکتری به‌ترتیب، ۶۰ و ۱۶۶۶ تخم به‌دست آمد. روند تخم‌گذاری روزانه افراد ماده *H. armigera* در هر دو تیمار در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین تعداد تخم روزانه در شاهد، ۱۲/۰۷ ± ۱۰۴/۱۵ و در تیمار باکتری، ۱۲/۰۷ ± ۹۲/۵۷ تخم به‌دست آمد که تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار مشاهده نشد. بر اساس نتایج، میانگین تخم‌گذاری در تیمار باکتری نسبت به شاهد حدود ۷۷٪ و تخم‌گذاری روزانه حدود ۸۹٪ بود.



شکل ۱- روند تخم‌گذاری روزانه *H. armigera* در شاهد و غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis*

منحنی بقای کرم غوزه‌ی پنبه در شاهد و تیمار باکتری از نوع یک به‌دست آمد که در شکل ۲ نشان داده شده است. در شاهد، مرگ‌ومیر در بین افراد مسن بیشتر بوده و با افزایش سن حشره میزان مرگ‌ومیر افزایش یافت، بنابراین شیب منحنی در انتها ناگهان کاهش نشان داد. مقدار انتروپی منحنی بقای کرم غوزه‌ی پنبه در شاهد و تیمار باکتری به‌ترتیب، ۰/۱۶ و ۰/۴۲ به‌دست آمد. در تیمار باکتری میزان مرگ‌ومیر در مراحل لاروی زیاد بود، که پس از ظهور اولین شب‌پره‌ی ماده تاحدی ثابت شد و در نهایت دوباره روند کاهشی به خود گرفت. نرخ بقای افراد در زمان ورود به مرحله حشره کامل در شاهد و تیمار باکتری به‌ترتیب، ۰/۹۲ و ۰/۳۷ بود که شاهد در مقایسه با تیمار باکتری رقم بالاتری را به‌خود اختصاص می‌دهد. با نگاهی به منحنی بقای کرم غوزه‌ی پنبه متوجه می‌شویم که غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis* تأثیر زیادی در میزان مرگ‌ومیر افراد نسبت به شاهد داشته است (شکل ۲).

نمودارهای نرخ تولیدمثل خالص و ناخالص کرم غوزه‌ی پنبه در شاهد و تیمار باکتری در شکل ۳ نشان داده شده است. چنانچه از نمودار مشخص است مرگ و میر افراد در تیمار باکتری زیاد بوده و در نتیجه نرخ تولیدمثل خالص آن افت چشم‌گیری نسبت به نرخ تولیدمثل ناخالص آن داشته است.



شکل ۲- منحنی بقای *H. armigera* در شاهد و غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis*

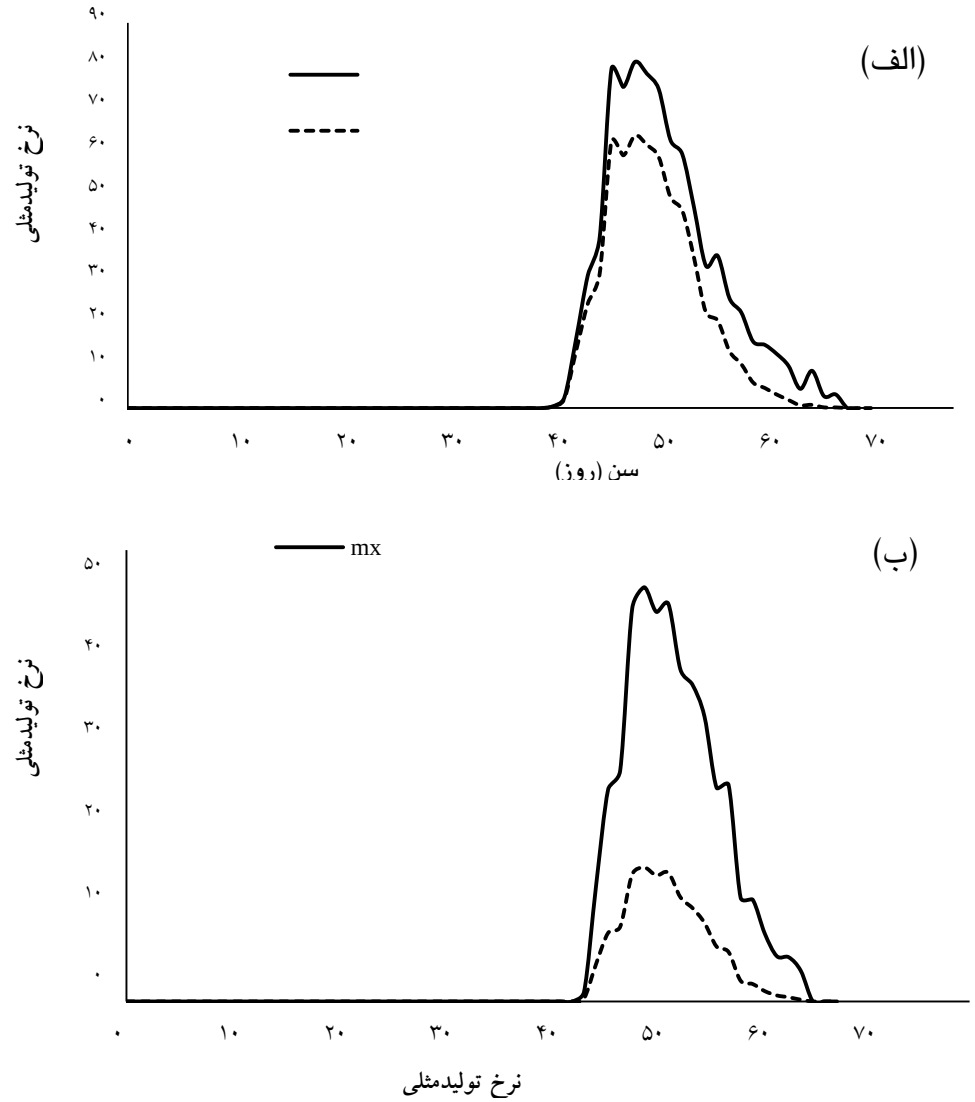
امید زندگی (e_x) کرم غوزه‌ی پنبه در شاهد، ۴۸/۳۱ و در تیمار باکتری، ۳۲/۸۳ روز در آغاز آزمایش تعیین شد. روند تغییرات امید زندگی *H. armigera* در شاهد و تیمار باکتری در شکل ۴ نشان داده شده است.

مقادیر مربوط به هشت فراسنجه‌ی رشد جمعیت پایدار کرم غوزه‌ی پنبه، *H. armigera* شامل نرخ تولید-مثل ناخالص (GRR)، نرخ تولیدمثل خالص (R_0)، نرخ ذاتی افزایش جمعیت (r_m)، نرخ متناهی رشد (λ)، طول مدت یک نسل (T)، زمان دوبرابر شدن جمعیت (DT)، نرخ ذاتی تولد (b) و نرخ ذاتی مرگ (d) در شاهد و تیمار آغشته به غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis* و نتایج آزمون‌های F و t مبنی بر برابری واریانس و میانگین فراسنجه‌های رشد جمعیت پایدار در شاهد و تیمار آغشته به غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis* در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. نتایج آزمون t مشخص کرد که تمامی فراسنجه‌های کرم غوزه‌ی پنبه به جز طول مدت یک نسل بین شاهد و تیمار باکتری اختلاف معنی-داری در سطح احتمال یک درصد دارند (جدول ۳).

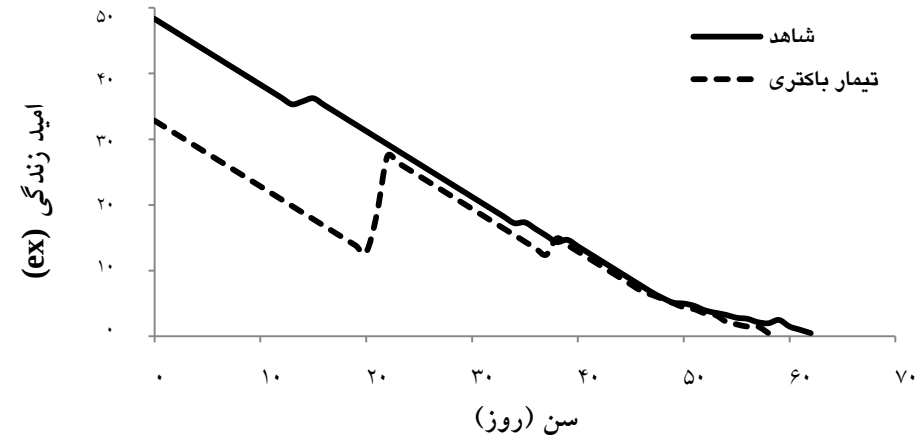
جدول ۳- نتایج آزمون‌های F، t و میانگین (±SE) فراسنجه‌های رشد جمعیت پایدار *H. armigera* در شاهد و غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis*

فراسنجه	آزمون F		df			آزمون t		df	میانگین ± اشتباه استاندارد	
	آماره‌ی F	مقدار بحرانی	صورت	مخرج	آماره‌ی t	مقدار بحرانی آزمون یک طرفه	مقدار بحرانی آزمون دو طرفه		شاهد	تیمار باکتری
نرخ تولیدمثل ناخالص (GRR)	۲/۷۶ **	۱/۷۳	۴۹	۳۳	۵/۲۲ **	۱/۶۶	۱/۹۸	۸۱	۸۲۳/۸۷ ± ۶۰/۳۲	۴۳۴/۲۶ ± ۴۳/۹۹
نرخ تولیدمثل خالص (R_0)	۵/۱۳ **	۱/۷۳	۴۹	۳۳	۷/۴۸ **	۱/۶۶	۱/۹۸	۷۲	۵۸۲/۲۲ ± ۵۱/۸۹	۱۲۶/۳۸ ± ۲۷/۷۸
نرخ ذاتی افزایش جمعیت (r_m)	۱/۸۳ *	۱/۶۷	۳۳	۴۹	۶/۸۷ **	۱/۶۷	۲/۰۰	۵۷	۰/۱۴۴۲ ± ۰/۰۰۲	۰/۱۰۸۲ ± ۰/۰۰۴
نرخ متناهی رشد (λ)	۱/۷۳ *	۱/۷۳	۴۹	۳۳	۶/۹۳ **	۱/۶۷	۲/۰۰	۵۸	۱/۱۵۵ ± ۰/۰۰۳	۱/۱۱۴ ± ۰/۰۰۴
میانگین طول مدت یک نسل (T)	۱/۳۴ ns	۱/۶۷	۳۳	۴۹	۱/۵۲ ns	۱/۶۷	۲/۰۰	۶۴	۴۴/۱۶ ± ۰/۶۲	۴۴/۷۳ ± ۰/۶۲
زمان دو برابر شدن جمعیت (DT)	۴/۸۶ **	۱/۶۷	۳۳	۴۹	۵/۸۵ **	۱/۶۸	۲/۰۲	۴۲	۴/۸۰ ± ۰/۰۸	۶/۴۱ ± ۰/۲۱
نرخ ذاتی تولد (b)	۱/۳۸ ns	۱/۶۷	۳۳	۴۹	۶/۳۹ **	۱/۶۷	۲/۰۰	۶۳	۰/۱۴۶۰ ± ۰/۰۰۴	۰/۱۱۵۶ ± ۰/۰۰۴
نرخ ذاتی مرگ (d)	۱/۹۹ *	۱/۶۷	۳۳	۴۹	۵/۷۵ **	۱/۶۷	۲/۰۰	۵۵	۰/۰۰۱۸ ± ۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۷۴ ± ۰/۰۰۰۷

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪، * معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ و ns عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.



شکل ۳- نرخ تولیدمثل خالص و ناخالص ویژه سنی کرم غوزه‌ی پنبه در شاهد (الف) و تیمار غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis* (ب).



شکل ۴- تغییرات سنی امید به‌زندگی *H. armigera* در شاهد و غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis*.

بحث

اثرات زیرکشندهی باکتری *B. thuringiensis* روی آفات مختلف هنوز به درستی شناخته نشده است، زیرا اکثر تحقیقات و پژوهشهای صورت گرفته در ارتباط با اثرات کشندهی این ماده میکروبی بر علیه لاروهای آفات و آن هم مرگومیر آنها بوده است. دزهای پایین این باکتری میتواند سبب تغییرات رشدی و فیزیولوژیک در میزبان گردد (ارب و همکاران ۲۰۰۱). اثرات زیرکشندهی باکتری *B. thuringiensis* شامل کاهش تغذیه، کاهش مدت نشوونمای لارو و افراد بالغ، کاهش باروری افراد ماده، کاهش وزن لارو و حشرات بالغ میباشد (اندرسن ۱۹۹۸؛ تولدو و همکاران ۱۹۹۹) به طوری که در تحقیق حاضر هم مشاهده شد که در نتیجهی تغذیهی لاروهای سن سوم کرم غوزهی پنبه از غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringienss* نشوونمای مراحل نابالغ، میانگین طول عمر، طول دورهی تخمریزی، زادآوری، نسبت جنسی، بقا و سایر فراسنجههای زیستی آفت تحت تاثیر قرار گرفت (جدول ۲ و ۳).

طولانی شدن دورهی لاروی در اثر غلظتهای زیرکشندهی *B. thuringiensis* در آفات مختلفی از جمله *Choristoneura* sp. (پدرسون و همکاران ۱۹۹۷)، *Cochylis hospes* Walsingham (بارکر ۱۹۹۸)، *Heliothis virescens* (Fabricius) (عبدالستار و واتسون ۱۹۸۲)، *Lymantria dispar* L. (والنر و همکاران ۱۹۸۳) و چندین آفت دیگر گزارش شده است. پدرسون و همکاران (۱۹۹۷) افزایش ۲۹ تا ۴۵ درصدی در طول نشو و نمای مراحل نابالغ *Choristoneura fumiferana* Clemens در اثر غلظت LD_{50} باکتری *B. thuringiensis* را گزارش کردند. بارکر (۱۹۹۸) نشو و نمای مراحل نابالغ *C. hospes*، در شاهد و تیمار غلظت LD_{50} باکتری *B. thuringiensis* را بهترتیب، ۲۱/۴ و ۳۳/۸ روز بهدست آورد. در تایید نتایج محققان ذکر شده، در پژوهش حاضر نیز در تیمار باکتری، حدودا چهار روز (۱۰ درصد) طول دورهی نشو و نمای مراحل نابالغ کرم غوزهی پنبه نسبت به شاهد افزایش نشان داد. به نظر میرسد لاروهای تیمار شده با باکتری، کاهش کیفیت غذایی خود را با افزایش طول دورهی لاروی‌شان پاسخ داده باشند. تفاوتهای موجود بین نتایج حاصل از تحقیق حاضر و سایر محققین میتواند به غلظتهای مورد بررسی، حشرات و شرایط آزمایش مربوط باشد.

آزمایشهای مختلف نشان دادهاند که چندین عامل میتوانند کارایی باکتری *B. thuringiensis* را در مزرعه در برنامههای مدیریت تلفیقی تحت تأثیر قرار دهند. نخست اینکه لاروهای میزبان پس از دریافت غلظتهای زیرکشنده این باکتری، پس از چند روز رشد عادی خود را از سر بگیرند. دوم اینکه اگر دورهی لاروی میزبان در مزرعه طولانیتر گردد، نسبت به حملهی پارازیتوئیدها آسیبپذیرتر میگردد (ارب و همکاران ۲۰۰۱).

بوس و همکاران (۲۰۰۲) عنوان نمودند که اگر لاروهای *C. fumiferana* در سن ششم لاروی از باکتری تغذیه نمایند وزن شفیره آنها کاهش مییابد، اما اگر در سن چهارم لاروی آلوده به غلظتهای زیرکشندهی باکتری گردند به علت اینکه لاروها زمان کافی برای بهبودی دارند، تأثیر منفی زیادی روی وزن شفیرهها ایجاد نخواهد شد ولی در سن ششم، لاروها زمان کمتری برای ترمیم و بازیابی داشته و احتمالا بخش زیادی از مواد غذایی جذب شده را به جای افزایش وزن به ترمیم سلولهای پوششی روده اختصاص میدهند. بوس و همکاران (۲۰۰۶) همچنین برای اولین بار گزارش کردند که اثر غلظتهای زیرکشندهی باکتری *B. thuringiensis* روی لاروهای *C. fumiferana* میتواند به نسل بعدی نیز منتقل گردد. آنها همچنین اعلام نمودند که شایستگی افراد در نسل جدید به دیگر تنشهای ایجاد شده در نسل قبلی از قبیل تغییرات زیاد درجهی حرارت ربطی ندارد اما تنشهای غذایی که والدین از آن رنج میبرند، مانند غذای حاوی باکتری *B. thuringienss* میتواند در نسل بعدی هم ادامه پیدا کند. آنها همچنین گزارش دادند که لاروهایی که در دوران زندگی خود از غلظتهای پایین این باکتری تغذیه کردهاند سرعت رشد پایینتری نسبت به افرادی داشتند که از غذای بدون باکتری تغذیه شدند که این خود موجب اثرات منفی روی

بقای لاروها و درصد تفریخ تخم نسل بعدی شده بود. چنانچه در تحقیق حاضر هم مشاهده شد که میانگین بقای لاروها در اثر غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringienss* تا ۳۲ درصد نسبت به شاهد کاهش یافته است. مشابه با نتیجه به‌دست آمده، وو و همکاران (۲۰۰۳) نیز عنوان نمودند که لاروهای کرم غوزه‌ی پنبه‌ای که از پنبه تراریخته و دارای ژن توکسین باکتری *B. thuringiensis* تغذیه کرده بودند نسبت به لاروهای تغذیه کننده از پنبه-های غیر تراریخته از بقای کم‌تری برخوردار بودند.

طولانی شدن دوره لاروی می‌تواند در اثر ترکیب سه پدیده باشد. نخست اینکه لاروهایی که از غلظت‌های پایین *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* تغذیه نموده‌اند در مدت کوتاهی از تغذیه کردن دست می‌کشند که این مدت بستگی به درجه‌ی حرارت، زمان در معرض قرارگیری، دز تغذیه شده و کیفیت غذا دارد (بوس و همکاران ۲۰۰۲). این مدت زمان به لارو امکان می‌دهد که سم باکتریایی وارد شده به بدن را تجزیه و سلول‌های پوشش داخلی روده را ترمیم بخشد (اسپایس و اسپنس ۱۹۸۵). دوم لاروهایی که تغذیه خود را از سر گرفته‌اند، به افزایش نشوونمای خود تمایل نشان می‌دهند تا بتوانند انرژی از دست رفته در دورانی که تغذیه نمی-کردند را به‌دست آورند (بوس و همکاران ۲۰۰۲). سوم اینکه در مزرعه، بی‌اشتهایی لارو سبب می‌شود که آفت مرحله مناسب گیاه را جهت تغذیه از دست داده و مجبور به تغذیه از مواد غذایی با کیفیت پایین‌تر گردد که این خود موجب افزایش طول دوره‌ی لاروی، افزایش مرگ‌ومیر، کاهش بقا و کاهش وزن شفیره‌های آفت می-گردد (لارنس و همکاران ۱۹۹۷).

در بررسی حاضر طول عمر و میانگین تخم گذاشته شده افراد ماده کرم غوزه‌ی پنبه در تیمار باکتری به-ترتیب، ۱۳/۶۵ و ۲۳ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد. می‌توان عنوان نمود که باکری تاثیری منفی روی طول عمر و باروری افراد ماده بالغ کرم غوزه‌ی پنبه داشته است. اثرات منفی باکتری *B. thuringiensis* روی آفات مختلفی از قبیل *H. virescens* (گلد و اندرسون ۱۹۹۱) و *Leptinotarsa decemlineata* Say (کوستا و همکاران ۲۰۰۰؛ قاسمی کهریزه و همکاران ۱۳۸۲) نیز گزارش شده است که این اثرات ممکن است در نتیجه کاهش وزن شفیره‌های افراد ماده باشد که منجر به تولید ماده‌های کوچکتر و در نتیجه‌ی کاهش باروری شده است. کوستا و و همکاران (۲۰۰۰) هم‌چنین اعلام نمودند که کاهش طول عمر افراد بالغ سوسک کلرادو بعد از در معرض قرارگیری با *B. tenebrionis* Berliner ممکن است موجب اثرات منفی روی نرخ باروری افراد ماده گردد. چنین افرادی توان کمتری داشته زیرا میزان آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها و کلسیم کاهش یافته و چنین تغییراتی در فیزیولوژی حشره می‌تواند تولید اسپرم، مواد مغذی اسپرماتوفور و رفتار جفت‌گیری حشره را تحت تأثیر قرار دهد که این خود موجب کاهش باروری افراد باقیمانده در نتیجه غلظت‌های زیرکشنده باکتری گردد. عابدی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که در اثر استفاده از غلظت LC_{30} باکتری *B. thuringiensis* در غذای لاروهای سن سوم کرم غوزه‌ی پنبه به مدت هفت روز، وزن لاروها و شفیره‌ها کاهش چشمگیری در مقایسه با شاهد داشتند. هم‌چنین طول دوره‌ی لاروی و شفیرگی افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با شاهد نشان داد. طول عمر افراد ماده و باروری آنها نیز در تیمار باکتری به ترتیب ۲۹/۴ و ۱۸/۴ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد. درصد خروج حشرات کامل اختلاف معنی‌داری بین تیمار باکتری و شاهد نشان نداد. هم‌چنین آنها عنوان نمودند که بالاترین نرخ باروری در روزهای سوم و چهارم بعد از ظهور حشرات کامل اتفاق افتاد. در تحقیق حاضر نیز طول عمر و باروری آفت پس از قرارگیری در معرض غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis* به‌ترتیب، ۱۳/۶۵ و ۲۳/۰۳ درصد کاهش نشان داد که در مقایسه با نتایج عابدی و همکاران (۲۰۱۴) باروری افراد ماده آفت، کاهش بیشتری داشته است. تفاوت‌ها ممکن است مربوط به غلظت مورد استفاده، میزان ماده موثره باکتری مورد استفاده، سوش کرم غوزه‌ی پنبه و شرایط آزمایش باشد. در مورد خیلی از آفات مهم بال‌پولکدار کاهش باروری افراد بالغ در نتیجه‌ی استفاده از باکتری *B. thuringiensis* گزارش شده است. پلانزیکم و آلویس (۲۰۰۵) اعلام نمودند که بین وزن شفیره‌های

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) که از باکتری *B. thuringiensis* تغذیه کرده‌اند و میزان باروری افراد ماده ارتباط مستقیمی وجود دارد به‌طوری‌که افراد سالم تخم بیشتری نسبت به افراد آلوده می‌گذارند، زیرا که باکتری فیزیولوژی افراد بالغ را تحت تأثیر قرار داده و بازتاب آن در میزان و کیفیت تخم‌های گذاشته شده منعکس می‌گردد.

با نگاهی به نتایج به‌دست آمده از فراسنجه‌های جمعیت پایدار کرم غوزه‌ی پنبه در پژوهش حاضر متوجه می‌شویم که غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis* به غیر از میانگین طول مدت یک نسل توانسته بقیه‌ی فراسنجه‌های رشد جمعیت پایدار *H. armigera* را تغییر دهد و این بدان معناست که باکتری مذکور توانایی کاهش جمعیت کرم غوزه‌ی پنبه را دارد. با توجه به نتایج معلوم شد که غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis* موجب کاهش ۴۹ درصدی نرخ ناخالص تولیدمثل و کاهش ۷۹ درصدی نرخ خالص تولیدمثل شده است. هم‌چنین نرخ ذاتی افزایش جمعیت کرم غوزه‌ی پنبه در تیمار باکتری حدود ۲۵ درصد نسبت به شاهد کاهش داشته است. هم‌چنین با نگاهی به نمودار تولیدمثل خالص و ناخالص کرم غوزه پنبه در شاهد و تیمار باکتری به‌نظر می‌رسد اثر غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis* بر زنده‌مانی افراد بیش از تولیدمثل آنها بوده است به طوری‌که در تیمار باکتری، نرخ خالص تولیدمثل کرم غوزه‌ی پنبه نسبت به نرخ ناخالص تولیدمثل آن در حدود ۷۱ درصد کاهش داشته است در حالی که در شاهد کاهش نرخ تولیدمثل خالص نسبت به نرخ ناخالص تولیدمثل ۲۹ درصد بود. با مقایسه نرخ بقای افراد در شاهد و تیمار باکتری متوجه می شویم که بقای افراد در تیمار باکتری ۳۲ درصد کاهش یافته و در نتیجه تولیدمثل خالص کرم غوزه‌ی پنبه پس از مصرف غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis* تفاوت چشم‌گیری با تولیدمثل ناخالص آن نسبت به شاهد نشان داده است (شکل ۳). از سوی دیگر نسبت جنسی بر پایه افراد ماده برای جمعیت مورد آزمایش *H. armigera* در شاهد، ۰/۵۶ و در تیمار آغشته به غلظت LC_{20} باکتری *B. thuringiensis*، ۰/۳۹ به‌دست آمد. با نگاهی به نسبت جنسی افراد برای هر دو تیمار می‌توان گفت که باکتری توانسته موجب کاهش نسبت جنسی و افزایش نرزایی شود که این خود به نوعی باعث کاهش باروری هم شده است. تولیدمثل ناخالص در تیمار باکتری تقریبا نصف شاهد است ولی تخم‌گذاری خیلی بیشتر از نصف است. می‌توان عنوان نمود که احتمالا بخاطر تلفات نامساوی نر و ماده است که در تیمار باکتری، ماده‌ها بیشتر تلف شده‌اند. سوناوان و همکاران (۲۰۰۷) نرخ تولیدمثل خالص *H. armigera* را روی پنبه، ۴۱۶/۸۴ و روی پنبه تراژن، ۴۷/۰۵ ماده/ ماده/ نسل ذکر کردند. این گزارش نشان می‌دهد که تغذیه‌ی لاروها از گیاه حاوی ژن‌های cry باکتری *B. thuringiensis* یا غذای حاوی اسپور و سم این باکتری می‌تواند اثر بسیار زیادی روی نرخ تولیدمثل خالص کرم غوزه‌ی پنبه داشته باشد چنانچه در آزمایش حاضر هم، چنین نتیجه‌ای مشاهده شد.

باتوجه به داده‌های به‌دست آمده در پژوهش حاضر معلوم گردید که نرخ ذاتی رشد و نرخ تولیدمثل خالص که دو فراسنجه‌ی کلیدی جهت تعیین قابلیت تولیدمثلی یک موجود زنده می‌باشند، در تیمار باکتری کاهش چشمگیری نسبت به شاهد نشان دادند و مؤید این مطلب است که کرم غوزه‌ی پنبه به باکتری مذکور حساسیت زیادی دارد و می‌توان جهت کاهش مصرف سموم در نواحی پنبه‌کاری کشور از این ماده میکروبی استفاده نمود.

در نهایت می‌توان اظهار کرد که تحقیق و پژوهش روی اثرات زیرکشنده‌ی عوامل بیماری‌زای حشرات ممکن است مفهوم کارایی این عوامل را تغییر دهد زیرا که حشرات آلوده شده ممکن است به رشد خود ادامه دهند اما قادر به ایجاد خسارت در گیاهان نباشند. اگرچه ارزیابی چنین تأثیراتی در مزرعه مشکل است اما بدون شک چنین اثراتی وجود داشته (گلیر و اکالاگان ۲۰۰۰) و تأثیر زیادی در پویایی جمعیت آفات بال‌پولکدار دارند که به نوبه‌ی خود می‌تواند در مدیریت آنها مفید واقع شود (پیندا و همکاران ۲۰۰۹).

منابع مورد استفاده

بهداد ا، ۱۳۸۱. حشره شناسی مقدماتی و آفات مهم گیاهی ایران. انتشارات مرکز نشر یادبود، ۸۴۰ صفحه.

خانجانی م و خلقانی ج، ۱۳۸۷. اصول کنترل آفات (حشرات و کنه‌ها). انتشارات سازمان ترویج، آموزش و تحقیقات کشاورزی وزارت کشاورزی، ۳۶۰ صفحه.

رخشانی ا، ۱۳۸۱. اصول سم شناسی کشاورزی. انتشارات فرهنگ جامع، ۳۷۴ صفحه.

طالبی چایچی پ و خرمشاهی ا، ۱۳۷۳. شناختی بر مدیریت تلفیقی آفات، انتشارات عمیدی، تبریز، ۳۰۰ صفحه.

کاظمی م ح، ۱۳۷۴. کنترل میکروبی آفات و بیماری‌های گیاهی (ترجمه و تدوین). انتشارات دانشگاه تربیت معلم تبریز، ۱۶۷ صفحه.

قاسمی کهریزه ا، صفرعلیزاده م ح و پورمیرزا ع ا، ۱۳۸۲. تاثیر باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* روی سنین مختلف لاروی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col.: Chrysomelidae) و نقش سینرژیست حنا در افزایش کارایی آن. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۳۴، شماره . صفحه‌های ۵۳۹ تا ۵۴۷.

محمدی د، ۱۳۸۴. بررسی اثر برخی سموم بر روی *Helicoverpa armigera* Hüb.، پایان‌نامه کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

موسوی س م، ۱۳۷۹. مبارزه بیولوژیکی (ترجمه و تدوین). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۴۸۷ صفحه.

Abdul-Sattar AA, Watson TF, 1982. Survival of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae after short-term feeding periods on cotton treated with *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology 75: 630-632.

Abedi Z, Saber M, Vojoudi S, Mahdavi V, 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. Available online: http://www.insectscience.org/14.30

Andersen JL, 1998. Reregistration Eligibility Decision (RED), Microbial pesticides: *Bacillus thuringiensis*. United States Environmental Protection Agency. Washington D. C. http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0247.pdf

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

Bailey A, Chandler D, Grant WP, Greaves J, Prince G, Tatchell M, 2010. Biopesticides, Pest Management and Regulation. CAB International Publishing. 232 pp.

Barker JF, 1998. Effect of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* toxin on the mortality and development of the larval stages of the banded sunflower moth (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Economic Entomology 91: 1084-1088.

Bauce E, Bidon Y, Berthiaume R, 2002. Effects of food nutritive quality and *Bacillus thuringiensis* on feeding behavior, food utilization and larval growth of spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) when exposed as fourth and sixth-instar larvae. Agriculture and Forest Entomology 4: 1–14.

Bauce E, Carisey N, Dupont A, 2006. Carry over effects of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) progeny under various stressful environmental conditions. Agricultural and Forest Entomology 8: 63–76.

Carrie`re Y, Ellers-Kirk C, Liu YB, Sims MA, Patin AL, Dennehy TJ, Tabashnik BE, 2001. Fitness costs and maternal effects associated with resistance to transgenic cotton in the pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal of Economic Entomology 94: 1571–1576.

Carey JR, 1993. Applied Demography for Biologists with Special Emphasis on Insects. Oxford University Press, UK.

Charles JF, Delécluse A, Nielsen-le Roux C, 2000. Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field Application. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 548 pp.

Costa SD, Barbercheck ME, Kennedy GG, 2000. Sublethal acute and chronic exposure of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to the d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology 93(3): 680–689.

Croft BA, 1990. Arthropod Biological Control Agents and Pesticides. John Wiley and Sons, New York.

Damo MC, 1990. Isolation and screening of *Bacillus thuringiensis* Berliner against the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). MS thesis, University of the Philippines at Los Baños, College Laguna Philippines.

Erb SL, Bourchier RS, Van Frankenhuyzen K, Smith, SM, 2001. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* on *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and the Tachinid parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). Environmental Entomology 30(6): 1174-1181.

Gilbert LI, Gill SS, 2010. Insect Control: Biological and Synthetic Agents. Academic Press, London. 470 pp.

Glare TR, O'callaghan M, 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley, 350 pp.

Gould F, Anderson A, 1991. Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 delta-endotoxin on growth, behavior, and fitness of susceptible and toxin-adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental Entomology 20: 30–38.

Hafez M, Salama HS, Aboul-Ela R, Ragaei M, 1993. Developmental stages of *Agrotis ypsilon* Hufn. (Lep., Noctuidae) as affected by *Bacillus thuringiensis* Berl. Journal of Applied Entomology 115: 466–475.

Hajek AE, Glare T, O'Callaghan M, 2009. Use of microbes for control and eradication of invasive arthropods, Springer Science and Business. 366 pp.

Lacey LA, Siegel JP, 2000. Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. Dordrecht; Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.

Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P, 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? Biological Control 21: 230–248.

Lammers JW, Macleod A, 2007. Report of a Pest Risk Analysis, *Helicoverpa armigera* (Hubner). Plant Protection Service (NL) and Central Science Laboratory (UK) Joint Pest Risk Analysis for *Helicoverpa armigera*. http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/helicoverpa.pd. 2010.5.17.

Lawrence RK, Mattson WJ, Haack RA, 1997. White spruce and the spruce budworm: defining the phenological window of susceptibility. Canadian Entomologist 129: 291–318.

Maia AHN, Luiz AJB, Campanhola C, 2000. Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique computational aspects. Journal of Economic Entomology 93: 511-518.

Mascarenhas VJ, Luttrell RG, 1997. Combined effect of sublethal exposure to cotton expressing the endotoxin protein of *Bacillus thuringiensis* and natural enemies on survival of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Environmental Entomology 26(4): 939-945.

Mashtoly TA, Abolmaaty A, El-Zemaity ME, Hussien MI, Alm SR, 2011. Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *aizawai* to black cutworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae) with *Bacillus* sp. NFD2 and *Pseudomonas* sp. FNFD1. Journal of Economic Entomology 104(1): 41-46.

Meng FX, Shen JL, Zhu ZP, 2003. Temporal-spatial variation in efficacy of *B. thuringiensis* cotton leaves against *Helicoverpa armigera* (Hubner) and effect of weather conditions. Acta Entomologica Sinica 46: 299-304.

Navon A, Ascher KRS, 2000. Bioassays of Entomopathogenic microbes and nematodes. CAB International Publishing. 84 pp.

Pedersen A, Dedes J, Gauthier D, van Frankenhuyzen K, 1997. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. Entomologia Experimentalis et Applicata 83: 253-262.

Pineda S, Martinez AM, Figueroa JI, Schneider MI, Estal DP, Estal Vinuela E, Gomez B, Smagghe G, Budia F, 2009. Influence of azadirachtin and methoxyfenozide on life parameters of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology 102(4): 1490-1496.

Polanczykm RA, Alves SB, 2005. Biological parameters of *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae) assayed *Bacillus thuringiensis* Berliner. Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.) 62 (5):464-468.

Ramachadran R, Raffak KF, Miller MJ, Ellis DD, Mccown BH, 1993. Behavioral responses and sublethal effects of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) and fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin in diet. Environmental Entomology 22: 197-211.

Sansinenea E, 2012. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Published by Springer. 392 pp.

SAS Institute, 2006. The SAS system for Windows. SAS Institute.

Singh P, 1982. Artificial Diets for Insects, Mites and Spiders. (2nd printing) IFI/ Plenum Data Company.

Sonawane JR, Khande DM, Bisane KD, Tayade PP, 2007. Life table studies of *Helicoverpa armigera* (Hübner) on Bt and non Bt cotton. Journal of Entomological Research 31(1): 1-4.

Spies AG, Spence KD, 1985. Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth *Manduca* scanning electron microscopic study. Tissue and Cell 17: 379–394.

Soundararajan RP, 2012. Pesticides- Advances in Chemical and Botanical Pesticides. Published by InTech. 382 pp.

Toledo J, Liedo P, Williams T, Ibarra J, 1999. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* b-exotoxin to three species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). Journal of Economic Entomology 92(5): 1052-1056.

Vega FE, Kaya HK, 2012. Insect Pathology. Academic Press. 508 pp.

Wallner WE, Dubois NR, Grinberg PS, 1983. Alteration of parasitism by *Rogas lymantriae* (Hymenoptera: Braconidae) in *Bacillus thuringiensis*-stressed gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) hosts. Journal of Economic Entomology 76: 275-277.

Wu K, Guo Y, Lv N, Greenplate JT, Deaton R, 2003. Efficacy of transgenic cotton containing a cry1Ac gene from *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. Journal of Economic Entomoloy 96(4): 1322-1328.

Sublethal Effects of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Berliner on Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner

N Vaez[1*], Sh Iranipour[2] and MJ Hejazi[2]

[1]Asistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University.
[2]Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.
[*]Corresponding author: naheedvaez@gmail.com

Received: 17 October 2017 Accepted: 2 January 2018

Abstract

Cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) is one of the important pests of agricultural products in the world, including Iran. In this study, the sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* (Bacillales: Bacillaceae) were evaluated on third instar larva of *H. armigera* under laboratory conditions 26±1 °C, 65±10% RH and 16:8 (L:D) photoperiod. The LC_{20} value of *B. thuringiensis* on 3rd instar larva of *H. armigera* was 9.8×10^5 IU/L. The mean female longevity and fecundity in control and Bt-treatment were 16.63 ± 1.05 and 13.88 ± 1.05 days and 1336.83 ± 147.68 and 1029 ± 147.68 eggs respectively that in both cases, there was a significant difference. In control and Bt-treatment, the net reproductive rate (R_0) were 582.22 ± 51.89 and 126.38 ± 27.78 f/f/g, the intrinsic rate of natural increase (r_m) were 0.1442 ± 0.002 and 0.1082 ± 0.004 f/f/d, the finite rate of increase (λ) were 1.155 ± 0.003 and 1.114 ± 0.004 f/f/d, the mean generation time (T) were 44.16 ± 0.62 and 44.73 ± 0.62 d and the doubling time (DT) were 4.80 ± 0.08 and 6.41 ± 021 d respectively. Except the mean generation time (T), other population parameters of *H. armigera* showed a significant difference between control and Bt-treatment. The results indicated that the *B. thuringiensis* have high potential to reduce the cotton bollworm population and can be recommended for reducing the use of pesticides in the areas where the pest is present.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Bioassay, Cotton bollworm, Population parameters.