تعیین قدرت بیمارگری Nucleopolyhedro virus روی کرم قوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* و شب پره‌ی پشت الماسی، *Plutella xylostella*

مریم کلانتری[۱]، زهرا معقولی فرد[۲] و رسول مرزبان[۱*]

۱- مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران.

۲- گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد تهران.

*مسئول مکاتبات: r.marzban@areeo.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲

چکیده

ویروس Nucleopolyhedrosis virus به‌خاطر مزیت‌های فراوان مانند اثر اختصاصی روی لارو حشرات آفت، عدم تاثیر نامطلوب روی محیط زیست و جانداران غیرهدف و همچنین سهولت ترکیب و تلفیق با سایر روش‌های کنترلی، جایگاه ویژه‌ای در مدیریت کنترل آفات دارد. اولین قدم به‌عنوان پایه و اساس تحقیق روی این ویروس، بررسی قدرت بیمارگری آن درکنترل آفات مورد هدف است. در این تحقیق قدرت بیمارگری ویروس روی لارو سن دوم کرم قوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* Hübner و شب پره‌ی پشت الماسی، *Plutella xylostella* L. در دمای ۲± ۲۷ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۵٪ و دوره‌ی نوری ۱۶:۸ (تاریکی:روشنایی) بررسی شد. غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد (LC_{50}) Nucleopolyhedrosis virus روی لارو سن دوم کرم قوزه‌ی پنبه *Helicoverpa armigera* $۹/۲\times۱۰^{۳}$ OB ml^{-1} و شب پره‌ی پشت الماسی *Plutella xylastella* $۳/۸\times۱۰^{۴}$ OB ml^{-1} محاسبه شد، که بیمارگری ویروس با کمترین غلظت کشنده‌ی ۵۰ درصد روی کرم قوزه‌ی پنبه بهتربود. زمان لازم برای مرگ و میر ۵۰ درصد (LT_{50}) در غلظت $۱۰^{۶}$ OB ml^{-1} روی لارو سن دوم، *H. armigera* پنج روز و در جمعیت شب پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* ۴/۸ روز تعیین گردید که تقریباً با هم مطابقت دارند. نتایج این تحقیق نشان داد که Nucleopolyhedro virus دارای قدرت بیمارگری بیشتری روی کرم قوزه‌ی پنبه نسبت به شب پره‌ی پشت الماسی است. به نظر می رسد اگرچه این ویروس روی میزبان اصلی قدرت بیمارگری بیشتری دارد ولی نتایج این مطالعه نشان داد که می‌تواند بعنوان عامل کنترل شب پره‌ی پشت الماسی نیز بکار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: کنترل میکروبی، کرم قوزه‌ی پنبه، شب پره‌ی پشت الماسی، ویروس.

مقدمه

کرم قوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* Hübner (Lep.: Noctuidae) آفت مهم پنبه، گوجه‌فرنگی، ذرت، نخود، توتون، لوبیا، سویا و کنجد است (فیت ۱۹۸۹). حشره‌ی مزبور پلی‌فاژ بوده و در دنیا بیش از ۷۰ گونه میزبان برای آن گزارش شده است. لاروهای این آفت از برگ‌های جوان، قوزه‌ها، بلال، میوه و غلاف بذور گیاهان میزبان خود تغذیه می‌کنند (میتر و همکاران ۱۹۹۳). شب پره‌ی پشت الماسی یا بید کلم، *Plutella xylostella* L. (Lep.: Plutellidae) در تمام کشت بوم‌های گیاهان تیره‌ی چلیپائیان یافت می‌شود و از بیشترین پراکنش جهانی در بین بال‌پولکداران برخوردار است (تالکار و شلتون ۱۹۹۳). در دنیا برای کنترل آن سالانه بیش از یک میلیارد دلار هزینه می‌شود (ورکرک و رایت ۱۹۹۶، دزیانیان و همکاران ۲۰۱۰). این شب پره در سال ۱۳۱۷ توسط افشار به‌عنوان یکی از آفات مهم کلم از ایران گزارش شد (بهداد ۱۳۷۶) و در سال ۱۳۷۸ در مزارع کلم استان تهران طغیان کرد (مرزبان و بنی عامری ۱۳۸۳). این آفت با دارا بودن تنوع میزبانی بالا، قدرت پراکنش و تولیدمثل زیاد و ویژگی‌های ژنتیکی، به خیلی از آفت‌کش-های شیمیایی مقاوم شده است (شلتون ۲۰۰۴، رایت ۲۰۰۴، گرزیواسک ۲۰۰۹). استفاده از آفت‌کش‌های

شیمیایی برای کنترل آفات گیاهی از گذشته‌های دور روشی معمول بوده است. اما هزینه‌های اقتصادی بالا، ظهور نژادهای مقاوم به آفت‌کش‌های شیمیایی، نگرانی‌های زیست‌محیطی و آلودگی در چرخه‌ی غذایی سبب کاهش کاربرد روش‌های شیمیایی در کنترل آفات گیاهی شده است (مرزبان و عسکری ۱۳۸۸). این دلایل دستیابی به روش‌های سالم و ارزانتر را به‌عنوان یک چالش جدی فراروی محققان قرار داده است. استفاده از حشره‌کش‌های میکروبی در یکی دو دهه‌ی اخیر مورد توجه جدی قرار گرفته است. ویروس‌های بیمارگر حشرات از سالیان دور شناسایی شده‌اند و استفاده از آنها در کنترل حشرات به طور معنی‌داری در طی بیش از نیم قرن گذشته افزایش یافته است. باکولوویروس‌ها در هشت خانواده از حشرات با حدود ۵۰۰ گونه ثبت شده اند، که این ویروس‌ها در بال‌پولکداران در اغلب بافت‌های بدن و در بال‌غشائیان تنها در بافت‌های لوله‌ی گوارش تکثیر می‌یابند. حدود ۶۰۰ باکولوویروس باعث آلودگی در حشرات می شوند که بیشتر آنها متعلق به راسته‌های دوبالان، بال‌پولکداران و بال غشائیان هستند (لانگ ۲۰۰۴). ویروس Nucleopolyhedro virus در راسته های بال‌پولکداران، دوبالان و بال غشائیان و GVs فقط روی بال‌پولکداران پیدا شده است (جهل و همکاران ۲۰۰۶). در ایران پژوهش‌هایی در ارتباط با تأثیر ویروس NPV روی شب پره‌ی پشت الماسی انجام شده است (معقولی و همکاران ۱۳۹۴). این ویروس در برخی کشورها از جمله در کشور چین تجاری شده است (جانگ ۱۹۹۴) . علاوه بر NPV از GV نیز برای کنترل شب پره ی پشت الماسی استفاده شده است و ثابت شده که ویروس های PxGV و PxMNPV هردو روی شب پره‌ی پشت الماسی بیمارگر هستند اما تغذیه‌ی لاروهای شب‌پره‌ی پشت‌الماسی از ترکیب این دو ویروس باعث مرگ و میر بیشتری در لاروها نسبت به کاربرد تنهایی آنها شد (فارار ۲۰۰۷).

در میزان ماندگاری باکولوویروس‌ها در طبیعت عوامل زیادی از جمله تشعشعات خورشیدی، دما، pH محیط، نوع گیاه میزبان و نژاد ویروس نقش دارند. در میان تشعشعات خورشیدی، تشعشعات ماوراء بنفش با طول موج ۳۸۰۰-۲۸۵۰ انگستروم که حدود ۱٪ کل تشعشعات خورشیدی وارده به سطح زمین است به ماندگاری ویروس آسیب شدیدتری وارد می‌کنند و طول موج‌های کمتر از ۳۱۰۰ انگستروم در این مورد سهم بیشتری دارند (انتویستل ۱۹۸۳). خاک به عنوان مأمنی با درجات مختلف برای ذرات ویروسی می‌باشد و می‌تواند ذرات ویروسی را از سالی به سال دیگر در خود حفظ کند. تفاوت و تنوع در غیرفعال شدن ذرات ویروسی در خاک می‌تواند به دلیل ویژگی های شیمیایی، فیزیکی و پوشش گیاهی روی خاک باشد.

ویروس NPVs از طریق تغذیه وارد دستگاه گوارش حشرات میزبان می‌شود. پروتئین اندام های پوششی (OBs) در محیط قلیایی حل شده و نوکلئوکپسیدهای پوشش‌دار (ENCs) که گاه به آنها Occlusion Derived Virus (ODV) گفته می شود، آزاد شده و از غشأ اطراف غذا عبور کرده و با غشاء بخش میانی دستگاه گوارش مجاور می‌شوند (لهان ۱۹۹۷، تریسی و کوکل ۱۹۹۷ و مرزبان ۲۰۱۲). ذرات ENCs که حاوی یک و یا چند NC باشند، به پرزهای (Microvillous) سلول‌های پوششی (استوانه‌ای) متصل شده (در بال‌پولکداران pH بالای ۱۰ برای آلودگی الزامی است) و به احتمال زیاد از آن طریق، ذرات نوکلئوکپسید وارد سلول شده و سپس از طریق غشاء وارد هسته می-شوند. ذرات ویروس در هسته، پوشش نوکلئوکپسیدی خود را از دست داده و DNA را رها می نمایند تا طی تکثیر، واحدهای نوکلئوکپسید جدید تولید شوند. نوکلئوکپسیدهای جدید را یک غشاء دولایه در برگرفته، به سیتوپلاسم برده و همراه با نوکلئوکپسیدهای اولیه به غشاء پلاسمایی سلول‌های سطح خارجی لوله‌ی گوارش (basal membrane) چسبیده و غشایی از این جنس، نوکلئوکپسیدها را در برمی گیرد. این نوکلئوکپسیدها به شکل ویروس‌های خارج سلولی یا بدون پوشش (non-occluded) داخل هموسل می‌ریزند و منجر به آلودگی بیشتر می‌شوند.

لاروهای آلوده بی حال، نرم و شل شده و گاهی رنگ پریدگی و سفیدشدن رنگ بدن در لاروها دیده می‌شود (مرزبان و همکاران ۲۰۱۳). اغلب مقداری مایع سفید که حاوی پلی‌هدرا می‌باشد از بدن لارو به بیرون تراوش می‌شود. در مایع بالا آورده شده حشره، پلی‌هدرا وجود دارد (انتویستل ۱۹۸۳). هدف از این پژوهش مقایسه‌ی بیمارگری HaNPV روی لارو سن دوم شب پره‌ی پشت الماسی و کرم قوزه‌ی پنبه است.

مواد و روش‌ها

۱- پرورش حشرات

در این بررسی پروانه‌ی کرم قوزه‌ی پنبه از مزارع گوجه‌فرنگی گرگان جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. لاروهای این حشره به علت هم‌خواری، به‌صورت انفرادی درون لوله‌های آزمایش (۶×۱ cm) روی غذای مصنوعی تکثیر شد (تیکل و بیرن ۱۹۸۹) . پس از دوران لاروی و شفیرگی، پروانه‌ها ظاهر و در دسته‌های ۳۰ عددی (۱۵♂ + ۱۵♀) در استوانه‌های پلاستیکی ۲۵×۱۷ سانتی‌متر که سطح درونی دیواره بوسیله‌ی کاغذ جاذب رطوبت پوشانده شده و در کف استوانه، پتری حاوی آب -عسل ۱۰٪ قرار داده شده بود، قرار گرفت. کلیه‌ی مراحل رشدی آفت در اتاق پرورش با دمای ۲±۲۷ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵± ۶۵٪ و دوره‌ی نوری ۱۶:۸ (تاریکی:روشنایی) انجام گرفت. شب پره‌ی پشت الماسی از مزارع کلم اسلام‌شهر و کهریزک (جنوب تهران) جمع-آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. برای تشکیل کلنی در قفس پرورش به شکل مکعب مستطیل از جنس پلکسی گلاس به ابعاد ۴۰×۴۰×۶۰ سانتی‌متر در دمای ۲±۲۷ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵± ۶۵٪ و دوره‌ی نوری ۱۶:۸ پرورش داده شدند. لاروها از برگهای کلم و پروانه‌ها از محلول آب عسل ۱۰٪ تغذیه شدند.

۲-آماده‌سازی ویروس HaNPV

ویروس HaNPV از شرکت تجاری Henan Jiyuan Bai Yun از کشور چین تامین شد.

۲-۱- تعیین غلظت ویروس HaNPV

جهت برآورد تعداد پلی‌هدرها (Occlusion bodies) در حجم مشخص هر نمونه، از لام گلبول‌شمار (Haemacytometer) و میکروسکوپ فازکنتراست استفاده شد. به منظور کاهش خطا و اطمینان از صحت مقدار برآورد شده، دوبار شمارش انجام شد.

۳-روش‌های زیست‌سنجی

در این تحقیق آزمایشات زیست‌سنجی با هدف ارزیابی توان و شدت بیمارگری جدایه‌ی ویروس HaNPV روی لارو سن دوم کرم قوزه‌ی پنبه و شب پره‌ی پشت الماسی انجام شد و برای این منظور از آزمون‌های تعیین LC50 و LT50 استفاده گردید. ابتدا یک آزمون زیست‌سنجی مقدماتی برای تعیین حداقل و حداکثر غلظت انجام شد. سپس غلظت‌های مورد نیاز جهت آزمون زیست‌سنجی بر اساس روش ارائه شده توسط خواجه‌نوری (۱۳۴۷) مشخص شدند.

۳-۱-زیست‌سنجی ویروس NPV با استفاده از غذای طبیعی روی شب پره‌ی پشت الماسی

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تعداد هفت غلظت از ویروس بر حسب $OB\ ml^{-1}$ ($۷×۱۰^{۲}$، $۲/۱×۱۰^{۳}$، $۶/۹×۱۰^{۳}$، $۲/۱×۱۰^{۴}$، $۶/۹×۱۰^{۴}$، $۲/۱×۱۰^{۵}$ و $۷×۱۰^{۵}$) تهیه و برای هر غلظت سه ظرف پلاستیکی با قطر دهانه‌ی ۱۰ سانتی‌متر که درب ظروف سوراخ دار بوده و با پارچه‌ی توری پوشانده شده بود، در نظر گرفته شد. برای هر غلظت سه تکرار و در هر تکرار، از دو دیسک برگی تازه گل کلم (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) به قطر سه سانتی‌متر استفاده شد. دیسک-های برگی ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد قرار گرفته و بعد از آن سه مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند تا از عدم آلودگی روی برگ اطمینان حاصل شود. روی هر سمت دیسک برگی ۱۰ میکرولیتر از غلظت ساخته شده ویروس ریخته و با لوپ استریل پخش شد، به طوریکه تمام سطح برگ به ویروس آغشته شود. برای شاهد از بافر Tris-50mM HCl (pH=7.03) استفاده شد. سپس برگ‌ها را در محیطی استریل قرار داده تا کاملاً خشک شوند و در هر ظرف به

وسیله‌ی پنس استریل دو دیسک برگی قرار داده و در قسمت قاعده‌ی برگ برای حفظ رطوبت برگ، پنبه‌ی مرطوب قرار داده شد. سپس با قلم موی استریل درون هر ظرف تعداد ۱۰ عدد لارو سن دوم گذاشته شد و روی درب هر ظرف اطلاعات مربوط به غلظت، شماره‌ی تکرار وتاریخ درج شد. ظروف داخل انکوباتور با دمای ۲±۲۷ درجه‌ی سیلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۵۵ درصد و در شرایط نوری ۱۶:۸ (روشنایی: تاریکی) گذاشته شد. بعد از اطمینان از تغذیه‌ی لاروها از برگ‌ها، پس از ۲۴ ساعت برگ‌های تیمار نشده در اختیار لاروها گذاشته شد و تعداد تلفات به مدت یک هفته ثبت شد. معیار مرگ و میر در اثر ویروس، لاروهای بی حال، نرم و شل شده (حالت لهیدگی وخروج مایعات از بدن) و رنگ پریدگی بود.

۳-۲- زیست‌سنجی ویروس HaNPV با استفاده از غذای مصنوعی روی کرم قوزه‌ی پنبه

با توجه به نتایج زیست‌سنجی مقدماتی، مقادیر غلظت های مناسب با توجه به روش خواجه نوری (۱۳۴۷) در هفت سری رقت از ویروس HaNPV تهیه شد. برای تهیه غلظت‌ها از بافر Tris-HCl 50mM (pH=7.03) استفاده گردید. غذای مصنوعی بدون فرمالین (تیکل و بیرن ۱۹۸۹) در ابعاد ۲/۰×۰/۲×۱ سانتی‌مترمکعب بریده شد و روی سطح هر تکه غذا با استفاده از سمپلر، مقدار ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده ریخته و برای حدود پنج دقیقه در زیر هود آزمایشگاه قرار گرفتند تا سطح غذای مصنوعی خشک شود، سپس داخل لوله‌های آزمایش قرار داده شدند. برای هر غلظت ۴۵ لوله در سه تکرار ۱۵ عددی تدارک دیده شد. در هر لوله‌ی آزمایش یک لارو سن دوم که از نظر رنگ و اندازه یکسان بودند (اوانس ۱۹۸۱). توسط قلم‌مو روی غذای تیمار شده قرار داده شدند (هوقس و همکاران۱۹۸۳). پس از ۲۴ ساعت تغذیه، لاروها به لوله‌های آزمایش مشابه حاوی غذای سالم و عاری از ویروس انتقال یافتند (کومار و همکاران ۲۰۰۸). مرگ و میر لاروی از روز چهارم تا روز هفتم در هر تیمار شمارش و یادداشت شد (برد و آخورست ۲۰۰۷). معیار مرگ و میر در اثر ویروس، عدم واکنش به تحریک سوزن یا لهیدگی بافت میزبان بود (کلانتری و همکاران ۲۰۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌های زیست‌سنجی در قالب طرح کاملا" تصادفی انجام و اطلاعات به دست آمده به‌وسیله‌ی نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) و (LT_{50}) ویروس روی لارو سن دوم کرم قوزه‌ی پنبه و شب پره‌ی پشت الماسی محاسبه و مقایسه شد.

نتایج

مقایسه بیمارگری ویروس روی کرم قوزه‌ی پنبه و شب پره‌ی پشت الماسی

نتایج جدول تجریه واریانس داده‌های تلفات لاروهای کرم قوزه‌ی پنبه و شب پره‌ی پشت الماسی که به مدت ۲۴ ساعت تغذیه شده و سپس از غذای تیمار نشده استفاده و تا هفت روز آماربرداری شدند، نشان می‌دهد که بین غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. میانگین درصد تلفات با آزمون دانکن در SAS در سطح ۵٪ مقایسه و گروه‌بندی شدند، همچنین نتایج تجزیه واریانس در جداول ۱ و ۲ آمده است.

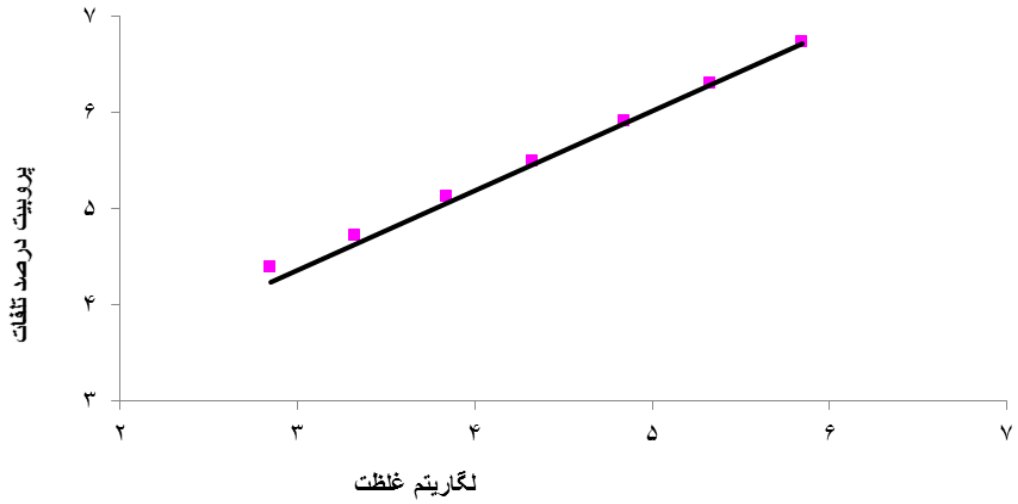
میزان غلظتی که در آن ۵۰ درصد جمعیت لاروی از بین رفتند (LC_{50}) برای ویروس HaNPV روی کرم قوزه‌ی پنبه $۹/۲×۱۰^{۳}$ OB ml^{-1} و در مورد شب پره‌ی پشت الماسی $۳/۸×۱۰^{۴}$ OB ml^{-1} تعیین گردید. نتایج نشان داد که این ویروس برای کنترل لارو سن دوم کرم قوزه‌ی پنبه و شب پره‌ی پشت الماسی، مناسب می‌باشد. ویروس روی کرم قوزه‌ی پنبه در مقایسه با شب پره‌ی پشت الماسی، LC_{50} پایین‌تری دارد (جدول ۳). آمار مربوط به خط رگرسیون در ویروس HaNPV نشان می‌دهد که در آن بین پروبیت تلفات و لگاریتم غلظت های مختلف آزمایش ارتباط مستقیم و معنی‌داری وجود دارد و ضریب همبستگی یک می‌باشد که در نمودارهای ۱ و ۲ مشاهده می‌شود.

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد تلفات ویروس **HaNPV** روی لاروسن دوم کرم قوزه‌ی پنبه.

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
تیمار	۶	۱۹۸۰/۶۶	۳۳۰/۱۱	۱۲/۸۱**	۰۰۰
خطا	۱۴	۳۶۰/۵۶	۲۵/۷۵		
کل	۲۰	۲۳۴۱/۲۲			

ضریب تغییرات: ۱۹/۱۴٪

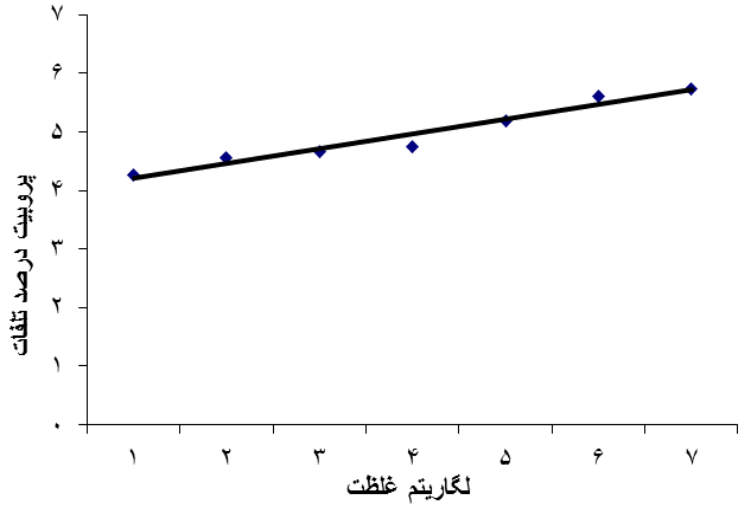
**: نشانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱٪ می باشد.



شکل ۱- رگرسیون غلظت-مرگ و میر ایجاد شده توسط ویروس **HaNPV** روی لاروسن دوم کرم قوزه‌ی پنبه.

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس غلظتهای مختلف ویروس **NPV** روی تلفات لارو سن دوم شب پره‌ی پشت الماسی.

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	Sig
تیمار	۶	۷۸۱۱/۸۱	۱۳۰۱/۹۶۸	۲۱۳/۶۰۴	۰/۰۰۰
خطا	۱۴	۸۵/۳۳	۶/۰۹۵		
کل	۲۰	۷۸۹۷/۱۴۳			



شکل ۲- رگرسیون غلظت-مرگ و میر ایجاد شده توسط ویروس **HaNPV** روی لاروسن دوم شب پره‌ی پشت الماسی.

جدول ۳-زیست سنجی ویروس **NPV** روی لارو سن دوم شب پره‌ی پشت الماسی و کرم قوزه‌ی پنبه.

حشره آفت	LC_{50} OB/ml	حدود اطمینان ٪۹۵ حدبالا– حدپائین	شیب خط	عرض از مبدا	χ^2	درجه آزادی	Pr>chisq
شب پره‌ی پشت الماسی	$۳/۸\times۱۰^{۴}$	$۱/۶\times۱۰^{۴}$ – $۹/۸\times۱۰^{۴}$	۰/۳۰۶۳	-۰/۵۴۴	۱/۴۸	۵	۰/۹۹۹۲
کرم قوزه‌ی پنبه	$۹/۲\times۱۰^{۳}$	$۲/۴\times۱۰^{۳}$-$۲/۳\times۱۰^{۴}$	۱/۲۲	-۲/۲۹	۱/۲۸	۵	۰/۹۷۶۳

زمان کشنده‌ی ۵۰ درصد (LT_{50})

مقدار زمان کشنده ۵۰ درصد (LT_{50}) برای غلظت-هایی که بیش از ۵۰ درصد مرگ و میر ایجاد می کنند محاسبه شد (جدول۴). نتایج نشان داد که در غلظت حدود $۱۰^{۴}$ OB ml^{-1} زمان لازم برای مرگ و میر ۵۰ درصد (LT_{50}) جمعیت شب پره‌ی پشت الماسی، ۴/۸ روز و در مورد کرم قوزه‌ی پنبه پنج روز می‌باشد که تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود نداشت.

جدول ۴- مقادیر زمان کشنده‌ی ۵۰ درصد (LT_{50}) ویروس **NPV** در غلظت $۱۰^{۴}$ از **OB ml^{-1}** روی لاروسن دوم شب پره‌ی پشت الماسی و کرم قوزه‌ی پنبه.

حشره آفت	LT_{50} روز	حدود اطمینان ٪۹۵ حدبالا– حدپائین	شیب خط	عرض از مبدا	χ^2	درجه آزادی	Pr>chisq
شب پره‌ی پشت الماسی	۴/۸	۴/۴ – ۵/۵	۹۰/۳۹	-۱۹/۳۲	۵/۸۷	۵	۰/۹۹۹۲
کرم قوزه‌ی پنبه	۵	۵/۲ -۶/۸	۱/۲۲	-۲/۲۹	۱/۲۸	۵	۰/۹۷۶۳

بحث

در این تحقیق اثر قدرت بیمارگری ویروس NPV روی کرم قوزه‌ی پنبه و شب پره‌ی پشت الماسی مقایسه و مشاهده شد که دز ویروس روی کرم قوزه‌ی پنبه نسبت به شب پره‌ی پشت الماسی پایین‌تر است. تحقیقات جاکوز (۱۹۷۲) نشان داد که ویروس *Trichoplusia ni* NPV برای کنترل کرم وجب کن کلم، (Hüb.) *Trichoplusia ni* و سفیده کوچک کلم،(L.) *Pieris rapae* مؤثر است. همچنین پادماواتاما و همکاران (۱۹۹۱) تأثیر ویروس PxMNPV را روی شب پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* بررسی کردند و بالاترین درصد مرگ و میر لاروی (۹۳/۶۷ درصد) مربوط به بالاترین غلظت یعنی $۱/۷×۱۰^{۹}$ PIB/ml و پایین‌ترین درصد مرگ و میر لاروی (۲۰/۶۷ درصد) مربوط به پایین‌ترین غلظت یعنی $۱/۷×۱۰^{۱}$PIB/ml بیان کردند. درصد مرگ و میر لارو سن دوم شب پره‌ی پشت الماسی در غلظت $۱/۷×۱۰^{۵}$PIB/ml را ۷۴/۲ درصد اعلام کردند. در آزمایش ما نیز درصد مرگ و میر لاروی در غلظت $۷×۱۰^{۵}$PIB/ml، معادل ۷۷ درصد بدست آمد که با نتایج پادماواتاما مطابقت دارد. همچنین فارار و همکاران در سال ۲۰۰۷مقدار LD_{50} ویروس NPV روی شب پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* و کرم برگخوار چغندرقند، *Spodoptera exigua* (Hüb.) را به ترتیب برابر با (OBs) ۱۶۷ و ۲۵۷ در هر لارو بیان کردند. همینطور مقدار LC_{50} ویروس AcMNPV روی لارو سن سوم کرم قوزه‌ی پنبه (*H. armigera*) برابر با $۵/۱۳×۱۰^{۵}$ OB ml^{-1} برآورد شده است (هونگ و همکاران ۲۰۰۸). در تحقیق دیگری مقادیر LC_{50} ویروس NPV برای لاروهای دو، سه، چهار، پنج، شش، هفت و هشت روزه کرم برگخوار پنبه، *Spodoptera litura* (F.) را به ترتیب برابر با $۱×۱۰^{۳}$ PIB/ml، $۵/۳×۱۰^{۳}$، $۴/۱×۱۰^{۴}$، $۳/۹×۱۰^{۶}$، $۱/۲×۱۰^{۷}$، $۱/۴×۱۰^{۸}$ و $۱/۵×۱۰^{۹}$ بیان کردند (ترانگ و چودهاری ۲۰۰۲). همچنین بیوران (۱۹۸۴) مقدار LC_{50} ویروسNPV روی لارو سن سوم شب پره‌ی پشت الماسی را به میزان $۱/۵×۱۰^{۴}$ PIB/ml و برای (Guenée) *Spodoptera ornithogalli* و کرم وجب کن کلم، برابر با ۱ PIB/mm^2 تعیین نمود. علاوه بر این مقدار LC_{50} ویروس PxGV India روی لاروسن دوم شب پره‌ی پشت الماسی، معادل با ۵/۸۹ OB/mm^2 برآوردشد (رابیندرا و همکاران ۱۹۹۷). دزیانیان و همکاران (۲۰۱۰) مقدار LC_{50} ویروسPxGV روی لاروسن دوم شب پره‌ی پشت الماسی را برابر با $۱/۳۹×۱۰^{۶}$ OB mL^{-1} اعلام کردند که علت بزرگتر بودن این LC_{50} با مقادیر بدست آمده در آزمایش ما را می‌توان ناشی از تفاوت زیر گروه ویروسی و حتی تنوع در نژاد شب پره‌ی پشت الماسی، بیان کرد. به همین نحو فهیمی و همکاران (۲۰۰۸) مقدار LC_{50} ویروس PxGV –Taiwanii روی لارو سن دوم شب پره‌ی پشت الماسی را برابر با $۱/۵۵ ×۱۰^{۷}$ OB ml^{-1} گزارش کردند. در تحقیق دیگری چهار ایزوله ویروس SeNPV (*Spodoptera exigua* NPV)، SeNPV-US از آمریکا، SeNPV-TH از تایوان، SeNPV-SP1 و SeNPV-SP2 از اسپانیا را روی لارو سن دوم کرم برگخوار چغندر قند، *S. exigua* بررسی و ثابت شد که SeNPV-TH با مقدار LD_{50} برابر ۱/۵ OB/Larva دارای بیشترین تأثیر می‌باشد (کابالرا و همکاران ۱۹۹۲).

میزان زمان کشنده‌ی ۵۰ درصد (LT_{50}) ویروس NPV در غلظت $۷/۹×۱۰^{۵}$ روی لاروهای چهار روزه‌ی کرم برگخوار پنبه، *S. litura* برابر ۶/۲ روز محاسبه شد (ترانگ و چودهاری ۲۰۰۲) . در آزمایش حاضر LT_{50} ویروس NPV در غلظت $۶/۶×۱۰^{۵}$، برابر ۴/۴ روز محاسبه شد که علت تفاوت را می توان در نوع حشره مورد آزمایش و سن لاروی و حتی تفاوت در نژاد ویروس ذکر کرد. مقدار LT_{50} ویروس PxGV در غلظت $۱۰^{۶}$OB/ml روی لاروسن دوم (در دمای ۲۷ درجه‌ی سیلسیوس) و لاروسن سوم (در دمای ۲۳ درجه‌ی سیلسیوس) شب پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* به ترتیب ۴/۹۸ روز و ۵/۵۱ روز گزارش شد (کدیر و همکاران ۱۹۹۹). دزیانیان و همکاران (۲۰۱۰) مقدار LT_{50} ویروس PxGV روی لاروهای سن اول تا سوم شب پره‌ی پشت الماسی، *P. xylostella* را در غلظت های (OB mL^{-1}) $۳/۱۱×۱۰^{۹}$، $۳/۱۱×۱۰^{۷}$ و $۳/۱۱×۱۰^{۵}$، به ترتیب ۵/۱۴۵–۳/۸۱۳ روز، ۷/۷۷۱–۴/۴۱۹ روز و ۹/۴۰۷–۶/۹۴۷ روز بیان کردند. دزیانیان مقدار LT_{50} ویروس PxGV را

در غلظت mL^{-1} OB ۱۰^۵ ×۳/۱۱ روی لارو سن دوم،۷/۷۷۱ روز اعلام کرد در حالی که درآزمایش حاضر مقدار LT_{50} ویروس NPV در غلظت $OB\ ml^{-1}$ ۱۰^۴ ×۱۱، ۴/۸ روز بدست آمد که می‌توان نتیجه گرفت که ویروس NPV سریعتر از GV لاروهای شب پره‌ی پشت الماسی را می کشد که با نتایج Farrar (2007) مطابقت دارد. سابرامانیان و همکاران (۲۰۱۵) اعلام کردند که مقدار LT_{50} ویروس *Spodoptera litura* (SpltNPV) *nucleopolyhedrovirous* علیه کرم برگخوار پنبه، *S. litura* با افزایش دما، کاهش می‌یابد و مقدار LT_{50} از ۲۰۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سیلسیوس به ۱۳۶ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سیلسیوس کاهش می‌یابد.

اگرچه استفاده از پاتوژن‌ها برای کنترل آفات، بخش کوچکی از صنعت کنترل آفات را تشکیل می‌دهد ولی استفاده از آنها در حال گسترش است و شانس زیادی برای استفاده‌ی بهتر از پاتوژن‌ها وجود دارد. در سال‌های اخیر ژن‌های زیادی از باکولوویروس‌ها شناسایی شده‌اند از قبیل: *Ha*122، (لنگ و همکاران ۲۰۰۳) ، chitinase gene ، *orf*33 (وانگ و همکاران ۲۰۰۵) ، *Ha*29 (گو و همکاران ۲۰۰۵) ، *Ha*128 (آن و همکاران ۲۰۰۵) و *orf*83 (وانگ و زانگ ۲۰۰۵). این ژن‌ها به منظور افزایش سرعت عمل باکولوویروس‌های نوترکیب ایجاد شده‌اند (ناون و همکاران ۲۰۰۰). ویروس HaNPV برای کنترل کرم قوزه‌ی پنبه و شب پره‌ی پشت الماسی مناسب می باشد و می تواند در آینده در مدیریت آفات بعنوان ابزار مناسبی مورد کاربرد قرار گیرد.

منابع

بهداد ا، (۱۳۷۶). آفات گیاهان زراعی ایران. انتشارات یادبود، اصفهان، ۶۱۸ صفحه.

خواجه نوری ع، (۱۳۴۷). آمار پیشرفته و بیومتری، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران،۵۶۷ صفحه.

مرزبان ر و بنی عامری و. (۱۳۸۳). بررسی تأثیر حشره کشهای بیولوژیکی و شیمیایی در کنترل شب پره پشت الماسی کلم، *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae). خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، صفحه ۱۸۸.

مرزبان ر و عسکری ح .(۱۳۸۸). دستاوردها، چالش ها و چشم انداز کنترل میکروبی آفات. همایش ملی نیم قرن مصرف آفتکش ها. موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور.

An SH, Wang D, Yang Z.N, Guo ZJ, Xu HJ, Sun JX and Zhang CX, 2005. Characterization of a late expression gene, open reading frame 128 of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid NucleoPolyhedroVirus. Journal Archives of Virology 150: 2453-2466.

Biever KD and Andrew PL, 1984. Susceptibility of Lepidopterous larvae to *Plutella xylostella* nuclear polyhedrosis virus. Journal of Invertebrate Pathology 44: 117-119.

Bird LJ and Akhurst RJ, 2007. Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *Helicoverpa Punctigera* (Wallengren) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins. Journal of Invertebrate Pathology 94: 84-94.

Caballera P, Zuidema O, Santiago-Alvarez Cand Vlak, MJ, 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. Journal Biocontrol Science and Technology 2(2): 145-157.

Dezianian A, Sajap AS, Lau WH, Omar D, Kadir HA, Mohzmed R and Yusoh MRM, 2010. Morphological Characteristics of *P. xylostella* Granulovirus and Effects on Its Larval Host Diamondback Moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). American journal of Agricultural and Biological Sciences 5(1): 43-49.

Entwistle PF, 1983. Control of insects by virus diseases. Biocontrol News and Information, 4(3): 203-229

Evans HF and Shapiro M, 1981. Viruses. In: Lacey, L. (Ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press London. pp. 17–54.A

Fahimi A, Kharrazi-Pakdel A and Talaei-Hassanloui R, 2008. Evalution of Effect of PxGV-Taiwanii on Cabbage moth, *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae) in Laboratory Conditions. Pakistan Journal of Biological Sciences 11(13): 1768-1770.

Farrar RR, Shapiro M and Shepard M, 2007. Relative activity of baculoviruses of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). BioControl, 52: 657-667.

Fitt G P, 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. Annual. Review of Entomology, 34: 17-52.

Grzywacz D, Rossbach A, Rauf A, Russell DA, Srinivasan R and Shelton AM, 2009. Current control methods for diamondback moth and other brassica insect pests and the prospects for improved management with lepidopteran-resistant Bt vegetable brassica in Asia and Africa. Crop Protection 29(1): 68-79.

Guo ZJ, An SH, Wang D, Liu YH, Kumar VS and Zhang CX, 2005. Characterization of Ha29, a specific gene for *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid NucleoPolyhedroVirus. Journal Biochemistry Molecular Biology 38: 354-359

Hong-Lian Sh, Du-JuanD, Jin-Dong H, Jin-xin W and Xiao-Fan Z,2008. Construction of the recombinant baculovirus AcMNPV with cathepsin B-Like proteinase and its insecticidal activity against *Helicoverpa armigera.* Pesticide Biochemistry and physiology 91:141-146.

Hughes PR, Gettig RR, McCarthy WJ, 1983. Comparison of the time- Mortality response of *Heliothis zea* to 14 isolates of Heliothis nuclear polyhedrosis virus. Journal Invertebrate Pathology 41: 256-261.

Jaques RP, 1972.Control of the cabbage looper and the imported cabbage worm by virus and bacterial. Journal of Economic Entomology 65: 757-760

Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, HerniousEA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM and Vlak JM,2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. Archives of Virology 151: 1257-1266.

Kadir HBA, Payne CC, Crook NE, Fenlon JS and Winstanely D, 1999. The comparative susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* and some other major Lepidoptera pests of brassica crops to a range of baculovirus. Biocontrol Science and Technology 9: 421-433.

Kalantari M, Marzban R and Imani S, 2013. Effect of *Bacillus thuringiensis* isolates and single nuclear polyhedrosis virus in combination and alone on *Helicoverpa armigera.* Archives of Phytopathology and Plant Protection

Kumar NS, Murugan K and Zhang W, 2008. Additive interaction of *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus and Azadirachtin. BioControl 53: 869-880.

Lehane MJ, 1997. Peritrophic matrix structure and function. Annual Review of Entomology, 42: 525-550.

Long G, Chen X, PetersD, Vlak JM and Hu Z, 2003. Open reading frame 122 of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus encodes a novel structural protein of occlusion-derived virions. Journal of General Virology 84: 115-121.

Lange M, Wang H, Zhihong H and Jehle JA, 2004. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. Virology, 325: 36-47.

Magholi Z, Abbasipour H and Marzban R, 2014. Effects of *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrosis virus (HaNPV) on the larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Journal Plant Protectection Science 50(4): 184–189.

Marzban R, He Q, Zhang QW and Liu XX, 2013. Histopathology of Cotton bollworm midgut infected with *Helicoverpa armigera* Cytoplasmic polyhedrosis virus. Brazili. Journal Microbiology 44(4): 1231-1236.

Marzban R. 2012. Midgut pH profile and energy differences in lipid, protein and glycogen metabolism of Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin and Cypovirus-infected *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: *Noctuidae).* Journal of the Entomological Research Society 14: 45-53.

Mitter C and Mattews M, 1993. Biosystematic of the Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae). Annual Review of Entomology 38: 207-225.

Navon A, 2000. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. PP.125-146. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (Eds), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and practice. Wiley New York USA.

Padmavathamma K and Veeresh GK, 1991. Effect of Larval age and dosage of nuclear polyhedrosis virus on the susceptibility of diamondback moth, *Plutella xylostella*. Entomologia Experimentalis et Applicata 60: 39-42.

Rabindra RJ, Geethea N, RenukaS, Varadhaarajan S and Regupatholy A, 1997. Occurence of a granulosis virus from two populations of *Plutella xylostella* in India. Proceedings of the 3rd International Work Shop on Management of Diamondback Moth and other Crucifer pests. Kuala Lumpur, Malaysia, 29 Oct.-1Nov. 1996 pp.113-115.

Shelton AM, 2004. Management of diamondback moth. Pp.47-53. In: Sivapragasam, A, Loke, W.H., A.K. Hussan and G.S. Lim (Eds.) The Management of Diamondback Moth and other Crucifer pests: Proceedings of the Third International Workshop of Diamondback Moth. Kualalumpur Malaysia.

Talekar NS and Shelton AM, 1993. Biology, ecology and management of the diamondback moth, Annual Review of Entomology 38: 275-301.

Teakle, RE, and Byrne VS, 1989. Nuclearpolyhedrosis virus production in *Heliothis armigera* infected at different larval ages. Journal of Invertebrate Pathology 53: 21-24.

Trang T and Chaudhari S, 2002. Bioassay of nuclear polyhedrosis virus (NPV) and in combination with insecticide on *Spodoptera litura* (Fab). Omonrice 10: 45-53.

Treacy MF, All JN and Kukel CR, 1997. Invertebrate selectivity of a recombinant baculovirus: Case study on AaHIT gene-inserted Autographa Califera nuclear polyhedrosis virus. Pp.57-68 In: (Bondari, K. (ed.). New Developments in Entomology Research Signpost London.

Verkerk RHJ and Wright DJ, 1996. Multitropic interactions and management of the diamondback moth, a review. Bulletin of Entomological Research 86: 205-216.

Wang XP, Fang YL and Zhang ZN, 2005. Effect of male and female multiple mating on the fecundity, fertility and longevity of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). Blackwell Verlag, Berlin, Germany 129(1): 39-42.

Wright D, 2004. Biological control of DBM: a global perspective. Pp.9-14. In: Bordat D and Kirk A A (eds.), Improving Biocontrol of *Plutella xylostella*. CIRAD, Montpelier, France (2004), Proceedings of the International symposium in Montpelier France 21-24 Oct 2002.

Zhang GY, 1994. Research, development and application of Heliothis viral pesticide in China. Resources and Environment in the Yangtze Basin 3:36–41. (In Chinese)

Virulence Determination Nuclear Polyhedrosis Virus on Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera* and Diamond Back Moth, *Plutella xylostella*

M Kalantari[1], Z Magollifard[2] and R Marzban[1]*

[1] Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
[2]Deprartmetn of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran.
*Corresponding author: r.marzban@areeo.ac.ir

Received: 19 October 2015 Accepted: 23 December 2018

Abstract

Nucleopolyhedro virus (NPV) has an important role in pest management programs. Because of many advantages such as selective effect on larvae of insect pest, no undesirable effects on environment and non-target organisms and also compatibility with other pest management tactics. In this research, the virulence of a native isolate was evaluated on the larvae of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner and diamond back moth, *Plutella xylostella* at 27±2 ^{o}C, 65±5% RH and 16L: 8D photoperiod. Based on the results, 50% lethal concentration (LC_{50}) of virus on the 2nd larval instars of *H. armigera* and *P. xylostella* were determined as 9.2×10^{3} OB/ ml $^{-1}$and 3.8×10^{4} OB/ml $^{-1}$, respectively. Also results (LC_{50} – values), showed that NPV was more virulent on *H. armigera* than on the *P. xylostella*. Values obtained for 50% lethal time (LT_{50}) of NPV were almost similar 5 and 4.8 days post treatment for *H. armigera* and *P. xylostella*, respectively.

Keywords: Microbial control, *Helicoverpa armigera*, *Plutella xylostella*, Virus.