# بررسی اثرات متقابل کاربرد توأم برخی جدایه‌های بومی باکتری *Bacillus thuringiensis* و ویروس Nucleopolyhedrovirus روی کنترل کرم غنچه توتون (*Helicoverpa armigera*)

# Study the interaction effects of combined application of some native strains of *Bacillus thuringiensis* and Nucleopolyhedrovirus on control of *Helicoverpa armigera*

**مرضیه شازده احمدی[1*]، سید افشین سجادی[1] و زین العابدین شهادتی مقدم[1]**

دریافت: ۹۷/۶/۲۵ پذیرش ۹۷/۱۱/۲۵

**چکیده**

کرم غنچه توتون (*Helicoverpa armigera*) یکی از آفات مهم توتون در سراسر جهان می‌باشد. امروزه به دلیل مشکلات استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی از قبیل آلودگی زیست‌محیطی و ایجاد مخاطرات برای سلامت انسان و سایر جانداران، هزینه‌های بالا و نیز بروز مشکل مقاومت آفات، باعث توجه بیش‌تر به استفاده از مدیریت تلفیقی آفات (IPM) و استفاده از عوامل مهم کنترل بیولوژیک مانند باکتری Bt و ویروس NPV شده است. در این تحقیق، اثرات متقابل کاربرد توأم ۵ جدایه برتر بومی باکتری Bt (جدایه‌های ۱۲، ۷۳، ۷۲، ۵۰ و ۵۸) و یک جدایه برتر بومی ویروس NPV که از مناطق مختلف استان‌های شمال ایران جداسازی شده بودند، در ۲ غلظت ($10^3$ - $10^4$ POB/ml)، در ترکیب با ۲ غلظت از باکتری Bt ($1 \times 10^7$ - $2 \times 10^7$ spore/ml) روی درصد کشندگی لاروهای سن دوم کرم غنچه توتون بررسی شد. آزمون در قالب طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی با ۲۰ تیمار و ۳ تکرار در سال ۱۳۹۵ در شرایط آزمایشگاه بخش گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش انجام شد. نتایج نشان داد که جدایه‌های ۱۲، ۷۳، ۷۲ و ۵۰ از باکتری Bt با غلظت $2 \times 10^7$ spore/ml در ترکیب با ویروس NPV با غلظت $10^4$ POB/ml دارای بیش‌ترین اثر کشندگی بودند، به‌طوری‌که در روزهای هفتم و چهاردهم بعد از اعمال تیمار، ۱۰۰ درصد اثر کشندگی مشاهده شد. کم‌ترین اثر کشندگی مربوط به جدایه ۵۸ باکتری Bt با غلظت $1 \times 10^7$ spore/ml در ترکیب با ویروس NPV با غلظت $10^3$ POB/ml بود که در روز چهاردهم بعد از اعمال تیمار، ۴۲/۲ درصد کشندگی ایجاد کرد. LC50 جدایه برتر (Bt-72) برابر با $7 \times 10^6$ spore/ml و برای جدایه برتر NPV (NPV-10) برابر با $8/1 \times 10^4$ POB/ml بوده است. نتایج نشان داد که Bt با غلظت $1 \times 10^7$ spore/ml در ترکیب با هر دو غلظت از NPV و نیز Bt با غلظت $2 \times 10^7$ spore/ml در ترکیب با $10^4$ (POB/ml) اثرات افزایشی نشان دادند. اثرات متقابل سینرژیستی در ترکیب بیش‌ترین غلظت از Bt ($2 \times 10^7$ spore/ml) و کم‌ترین غلظت از NPV ($10^3$POB/ml) مشاهده شد. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیب Bt + NPV منجر به تشدید قدرت بیماری‌زایی و کشندگی آن‌ها می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** Bt، اثر متقابل، کرم غنچه توتون، NPV، جدایه‌های بومی.

۱- محقق، گروه گیاه¬پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش، بهشهر، ایران

**نویسنده مسئول مکاتبات:** Noshinshazdeahmadi@Yahoo.com

**مقدمه**

کرم غنچه توتون (Lepidoptera: Noctuidae) *Helicoverpa armigera*، آفتی چند نسلی است که در حال حاضر، مهم‌ترین آفت مزارع توتون در ایران و سراسر جهان محسوب می‌شود؛ این آفت هر ساله خسارت جبران ناپذیری به محصول توتون وارد کرده و موجب کاهش چشم‌گیری در کمیت و کیفیت آن می‌گردد. این آفت در حدود ۴۰ درصد محصول توتون را از بین می‌برد و علاوه بر توتون، به اکثر محصولات زراعی مهم مانند پنبه، گوجه‌فرنگی، ذرت، سویا، نخودفرنگی، سورگوم و ... خسارت می‌زند. این آفت، با دارا بودن تنوع میزبانی بالا، قدرت پراکنش و تولید مثل زیاد، اخیراً نسبت به بسیاری از آفت‌کش‌های شیمیایی مقاوم شده است (Abdual Qayyum *et al*., 2015).

امروزه با استفاده بی‌رویه از سموم شیمیایی، معضلات متعددی در زمینه بقایای غیرقابل تجزیه مواد شیمیایی در محیط، به‌هم خوردن تعادل جمعیت حشرات، نابودی عوامل کنترل کننده طبیعی، بروز آفات ثانوی و مقاومت اکثر حشرات در برابر حشره‌کش‌های شیمیایی به وجود آمده است (Abbot, 1925). استفاده از حشره کش‌های شیمیایی، نه تنها هزینه تولید محصول را افزایش می‌دهد، بلکه باعث مخاطرات و آسیب‌های بهداشتی به کشاورزان و محیط زیست و سایر جانداران و دشمنان طبیعی آفات نیز می‌شود. با توجه به چنین مشکلاتی، همواره راهکارهای گوناگونی برای مدیریت آفات مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت، روش کنترل تلفیقی برای محافظت محصول، با در نظر گرفتن حداقل اثرات زیان بخش و کنترل پایدار آفات برگزیده شده است. در مدیریت تلفیقی آفات از میان تمام روش‌های مفید در کنترل آفات، مطلوب‌ترین روش‌ها بر اساس اصول صحیح اکولوژیکی و با حفظ کمی و کیفی محیط زیست به صورت توأم استفاده می‌گردد (Bravo *et al*., 2007).

نیاز حیاتی به ترکیبات امن و موثر به عنوان جایگزین اثرات سوء حشره کش‌های شیمیایی، تمایل به کاربرد عوامل کنترل بیولوژیک را افزایش داده است، در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات (IPM)، حشره کش‌های بیولوژیک به دلیل داشتن مزایایی نظیر نداشتن باقیمانده سم، سازگاری با محیط زیست، حفظ سایر دشمنان طبیعی آفات، هزینه و مصرف دز کمتر از مهم‌ترین موارد ایده آل برای کنترل آفات به شمار می‌روند (Reddy and Manjunatha., 2000).

در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات، بیمارگرها از جایگاه و اهمیت خاصی برخوردارند، که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به باکتری (Bt) *Bacillus thuringiensis* و ویروس Nucleopolyhedrovirus (NPV) اشاره کرد. این دو از موفق‌ترین عوامل بیماری‌زای حشرات در مبارزه با آفات محسوب می‌شوند که در مبارزه با تعداد زیادی از آفات راسته‌های مختلف، مانند (بال‌پولکداران، دوبالان و سخت‌بال‌پوشان) کاربرد زیادی پیدا کرده اند (Hatem *et al*., 2012).

باکتری Bt گرم مثبت، خاکزی، هوازی، میله‌ای شکل و اسپورزا است که در زمان تشکیل اسپور، کریستال‌های پروتئینی سمی به نام دلتااندوتوکسین تولید می‌کند که روی حشرات راسته‌های مختلف به ویژه روی لاروهای راسته بال‌پولکداران مؤثر می‌باشد. Bt یک باکتری خاکزی است که بیش از ۵۰ سال است که به عنوان مهم‌ترین حشره‌کش بیولوژیکی در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. امروزه این باکتری به دلیل تخصص میزبانی و سمیت کم برای موجودات زنده غیر هدف به ویژه دشمنان طبیعی (شکارگرها و پارازیتوئیدها)، یکی از موفق‌ترین حشره‌کش‌های بیولوژیک در سراسر جهان می‌باشد (Marzban *et al*., 2009).

ویروس چند وجهی هسته‌ای Nucleopolyhedrovirus (NPV) از خانواده Baculoviridae بوده و یکی از عوامل مهم کنترل بیولوژیک علیه حشرات راسته بال‌پولکداران و به‌خصوص گونه‌های *Heliothis* و تعدادی از گونه‌های دیگر می‌باشد (Fuxa, 2004).

نحوه اثر باکتری Bt و ویروس NPV در معده میانی حشره می‌باشد. بدین صورت که کریستال‌های پروتئینی Bt پس از هضم توسط پروتئازهای موجود در قسمت میانی مجرای هاضمه حشره به جایگاه‌های ویژه‌ای در رأس ریزپرزهای سلول‌های مخاطی مجرای هاضمه لاروها می‌چسبند و پس از چسبیدن، وارد فضای پلاسمایی سلول و ایجاد جراحت و زخم شده و موجب پاره شدن دیواره روده و عفونت خون و نهایتاً مرگ حشره می‌شوند. آلودگی ویروس NPV در

حشرات نیز بدین صورت است که تکثیر ویروسی از هسته سلول‌های اپیتیال معده میانی حشره در pH قلیایی با تعدادی آنزیم مرتبط با فعالیت تخریبی ویروس آغاز شده و موجب آغاز انحلال اجسام چندوجهی هسته‌ای و انتشار ذرات ویروس (ویریون‌ها) می‌شود و در نهایت آلودگی به بافت‌های مختلف تا زمان مرگ کامل حشره گسترش می‌یابد (Salama *et al*., 1993; Chang *et al*., 2003).

این دو پاتوژن (NPV و Bt) در حالت ترکیبی با هم‌دیگر، اثرات متقابل دارند. اولین قدم به عنوان پایه و اساس تحقیق روی این دو پاتوژن، جداسازی جدایه‌های بومی و بررسی درصد کنترل کنندگی آن‌ها روی آفات هدف می‌باشد. دامنه میزبانی جدایه‌های این دو بیمارگر بسیار متنوع بوده و حتی روی یک گونه حشره، شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها با هم تفاوت زیادی دارند. این تنوع ژنتیکی ناشی از تنوع شرایط جغرافیایی و میزبان‌های مختلف بوده که موجب تفاوت در توکسین‌های آن‌ها شده و به همین دلیل آن‌ها را می‌توان از اغلب نقاط دنیا جمع‌آوری نمود (Knaak *et al*., 2005). با توجه به این‌که در مناطق مختلف ایران، جدایه‌های این دو بیمارگر به صورت پراکنده یافت می‌شوند، به همین دلیل شناسایی جدایه‌های بومی و سازگار با شرایط اقلیمی هر منطقه و آگاهی از شدت بیماری‌زایی و دامنه میزبانی آن‌ها اهمیت زیادی دارد (Marzban *et al*., 2009).

استفاده از ویروس NPV به تنهایی به عنوان یک عامل بیوکنترل دارای محدودیت‌هایی است، از جمله: اولاً، نیاز به مدت زمان نسبتاً طولانی بین آلودگی با ویروس و مرگ حشره می‌باشد (به آهستگی اثر می‌کند). ثانیاً، اگر ویروس NPV به مدت چندسال در معرض شرایط آب و هوایی در مزرعه قرار گیرد، نور خورشید و شرایط آب و هوایی و همچنین امکان بروز جهش ژنتیکی در آن، موجب کاهش کارایی و پایداری ویروس می‌گردند (Pingel and Lewis., 1999). همچنین، نقطه ضعف اصلی استفاده از باکتری Bt به تنهایی در کنترل آفات، در این است که کریستال‌های لاروکشی آن، نمی‌توانند به مدت زمان طولانی در محیط باقی مانده و پایداری خود را حفظ نمایند، زیرا آن‌ها سریع توسط نور خورشید یا سایر عوامل تجزیه کننده در محیط، غیر فعال می‌شوند (Schnepf *et al*., 1998).

در نتیجه باکتری Bt و ویروس NPV به دلیل داشتن محدودیت در کاربرد انفرادی، می‌توانند با هم‌دیگر ترکیب و ادغام گردند که اثرات کنترل ترکیبی این دو عامل به‌خوبی در تحقیقات محققان مشخص و بیان شده است (Padua *et al*., 1997; Chandrasekaran *et al*., 2015). بنابراین، با توجه به هزینه بالا، گران قیمت بودن و وجود محدودیت‌هایی در کاربرد انفرادی هریک از این عوامل، همچنین به منظور کاهش دز مصرفی و افزایش کارایی آن‌ها، مؤثرترین روش استفاده ترکیبی از این دو پاتوژن می‌باشد. امروزه، استفاده ترکیبی و توأم از فرمولاسیون‌های میکروبی، به‌عنوان یک ابزار مهم و موفق در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات (IPM) می‌باشد (Hatem *et al*., 2012; Mcyay *et al*., 1997). باکتری Bt و ویروس NPV می‌توانند با یکدیگر دارای اثرات متقابل به صورت‌های مختلفی مانند اثر (سینرژیستی، آنتاگونیستی، افزایشی) باشند که این امر به عواملی همچون نحوه اثر و عملکرد، زیرگونه جدایه پاتوژن به‌کار رفته، غلظت‌های مختلف مورد استفاده و مدل آزمون زیست‌سنجی بستگی دارد. کاربرد ترکیبی این دو پاتوژن می‌تواند راه‌گشایی برای مشکلات مقاومت، کاهش غلظت و دوز مصرفی، کاهش هزینه‌ها و نیز افزایش کارایی این عوامل بیوکنترل شود (Mahmoud *et al*., 2012; Salama *et al*., 1987).

معقولی و همکاران (۲۰۱۳)، اثرات تعاملی بین *Bacillus thuringiensis Subsp.Kurstaki* و HaSNPV (*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus) روی کنترل آفت شب پره گل کلم (*Plutella xylostella*) را در شرایط آزمایشگاهی بررسی و آزمایشات زیت سنجی را با ۳ غلظت از Bt + ۳ غلظت از ویروس HaSNPV انجام دادند. نتایج نشان داد که اثرات سینرژیستی (Synergistic) با ترکیب کم‌ترین غلظت Bt (۲/۴ × ۱۰$^{۳}$ spore/ml) با کم‌ترین غلظت از ویروس HaSNPV (۲/۳ × ۱۰$^{۳}$ POB/ml) حاصل گردید (Magholi *et al*., 2013).

هدف از این تحقیق، بررسی اثرات متقابل کاربرد توأم باکتری Bt و ویروس NPV روی مرگ و میر لاروی کرم غنچه توتون در شرایط آزمایشگاهی بود تا مؤثرترین جدایه‌ها و با غلظت مناسب آن‌ها مشخص گردد.

## مواد و روش‌ها

### پرورش حشره میزبان

برای پرورش لارو کرم غنچه توتون در آزمایشگاه، از غذای مصنوعی به روش (Ahmed *et al.*, 1998) استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا محیط غذای مصنوعی، (شامل لوبیا چشم بلبلی (۲۰۵ گرم)، مخمر (۳۵ گرم)، پودر جوانه گندم (۳۰ گرم)، اسید آسکوربیک (۱/۱ گرم)، فرمالدئید۳۷ ٪ (۰/۵ میلی‌لیتر)، نیپاژین (۲/۲ گرم)، روغن آفتابگردان، آگار (۱۴ گرم)، ویتامین c (۳/۵ گرم)، کلرامفنیکل (۲ میلی‌لیتر)، بنومیل (۳ گرم)، پنی‌سیلین (۳ گرم) و آب مقطر (۷۰۰ میلی‌لیتر) بعد از مخلوط شدن مواد با یکدیگر، داخل پتری‌های شیشه‌ای برای مصارف بعدی در یخچال نگهداری گردید. پرورش لاروها روی غذای مصنوعی و به‌صورت دسته جمعی در ظرف‌های پلاستیکی شفاف درب‌دار و لاروهای سنین بالاتر به‌صورت انفرادی در قوطی‌های خالی فیلم عکاسی انجام شد. در هر قوطی یک قطعه غذای مصنوعی کوچک (۲ گرم) قرار داده و یک روز در میان تعویض شد. شفیره‌ها به طور روزانه جمع‌آوری و به داخل ظرف‌هایی پلاستیکی به ابعاد ۵/۵ × ۱۸ × ۱۱ سانتی‌متر حاوی خاک اره منتقل شدند. حشرات بالغ نیز هر روز جمع‌آوری و برای تخم‌گذاری، به ظرف‌های استوانه‌ای از جنس پلاستیک شفاف (به ابعاد ۱۷ × ۳۵ سانتی‌متر) حاوی توری‌های سلولزی جاذب رطوبت منتقل شدند. برای تغذیه پروانه‌ها، گلوله‌های پنبه‌ای آغشته به آب و قند ۱۰٪ روی توری قرار داده شد. حشرات بالغ نر و ماده پس از جفت‌گیری روی تورهای تنزیب تخم‌ریزی کرده، این تورها به‌طور روزانه تعویض شده و سپس هر کدام به تنهایی در پلاستیکی قرار داده شدند. یک پنبه خیس جهت حفظ رطوبت در هر پلاستیک قرار داده شد. تخم‌ها پس از ۳ تا ۴ روز دوره کمون، در اتاقک رشد در شرایط کنترل شده دما ۲ ± ۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۵٪، دوره روشنایی ۱۶ ساعت و تاریکی ۸ ساعت، تفریخ شدند. تعداد لاروها روزانه شمارش و ثبت شدند (شکل ۱).

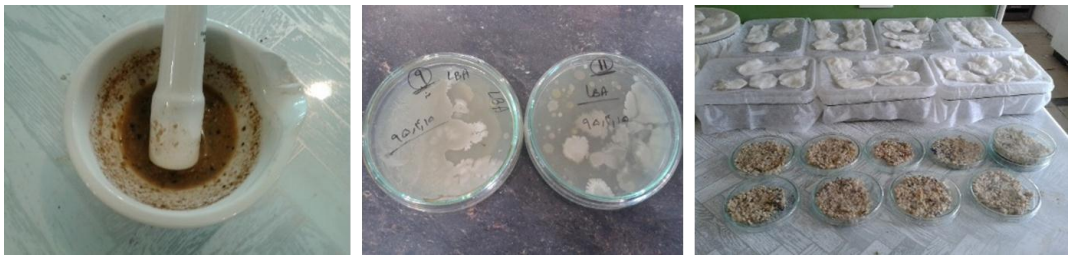
### تهیه و آماده‌سازی باکتری Bt

در این تحقیق، از ۵ جدایه برتر بومی باکتری Bt (جدایه‌های ۱۲، ۷۳، ۷۲، ۵۰ و ۵۸) که در تحقیق قبلی انجام شده توسط نویسندگان، از خاک‌های مناطق مختلف استان‌های شمال ایران جمع‌آوری و با روش انتخابی استات سدیم ۰/۲۵ مولار جداسازی شده بودند و نیز قدرت کشندگی آن‌ها در آزمون زیست‌سنجی Bt (به‌طور انفرادی) روی لاروهای سن دوم کرم غنچه توتون بررسی و تأیید شده بود (شازده احمدی و همکاران، ۱۳۹۵) و به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب شده بودند، استفاده گردید. این جدایه‌ها به‌صورت اسپور-کریستال در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری همراه با ۰/۲میلی‌لیتر آب مقطراستریل و در فریزر با دمای۱۳- درجه نگهداری شده بودند. این جدایه‌ها درون محیط LB مایع (Tryptone 1%, Yeast extract 0/5 %, Nacl 1%, PH= 7-7/5) به مدت ۴ روز در دمای $^{\circ C}$۲۸ درون شیکر انکوباتور با دور ۲۰۰rpm رشد کردند. وجود اسپور- کریستال آزاد در نمونه‌ها با مشاهده میکروسکوپی تأیید شد. تأیید کامل شناسایی اسپور و کریستال‌ها توسط مشاهده زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ بر اساس شاخص‌های میکروسکوپی باکتری Bt (اسپور، کلاهک و کریستال) صورت گرفت. سپس داخل یخچال با دمای $^{\circ C}$ ۴ نگهداری شدند. اسپور و کریستال‌ها را درون آب مقطر و محلول 0/04% Tween 80 به‌صورت سوسپانسیون یکنواختی درآورده و غلظت‌های مورد نیاز جهت زیست‌سنجی با روش سری رقت تهیه شدند (شکل ۱).

### تهیه و آماده‌سازی ویروس چندوجهی هسته‌ای (NPV)

از یک جدایه برتر بومی ویروس NPV به نام Tirtash1 معرفی شده در تحقیق قبلی نویسندگان استفاده شد (شازده احمدی و همکاران، ۱۳۹۵). بدین منظور، لاروهای سن دوم *H.armigera* با سوسپانسیون ویروسی $۱ \times ۱۰^{۷}$ $OBml^{-1}$ روی غذای مصنوعی قرار داده شده و بدین ترتیب، آلوده‌سازی لاروها به ویروس NPV انجام شد.

پس از چهار روز، لاروهای آلوده جمع‌آوری شدند و سپس، خالص‌سازی ویروس NPV از پیکره لاروهای آلوده انجام شد. بدین صورت که لارو آلوده در هاون چینی با استفاده از مقدار کمی آب مقطر، کاملاً له شده و پس از عبور از چند لایه پارچه تنزیب (صافی)، در چند مرحله سانتریفیوژ گردیدند و در نهایت، اجسام چندوجهی هسته‌ای (POBs) ویروس خالص‌سازی شده که در قسمت محلول رویی بوده به ویال‌های تمیز دیگری انتقال داده شد. بدین ترتیب عصاره ویروس NPV از پیکره لاروهای آلوده، استخراج و خالص‌سازی گردید (شکل ۱).



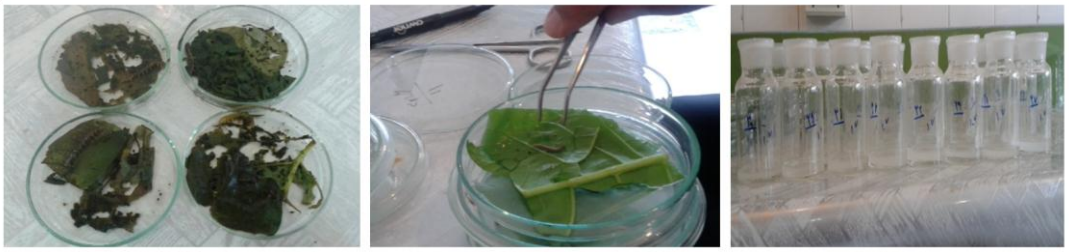
شکل ۱- راست) مراحل پرورش حشره میزبان در آزمایشگاه؛ وسط) کلنی‌های باکتری Bt رشد یافته روی محیط کشت LBA؛ چپ) ویروس NPV خالص‌سازی شده

Fig. 1. Right) Host insect breeding in Laboratory; Middle) Bt colonies grown on LBA medium; Left) NPV virus purified in Laboratory.

### انجام آزمایشات زیست‌سنجی (Bioassay)

برای تهیه غلظت‌ها، ابتدا ۵ لوله آزمایش استریل برای هر جدایه شماره‌گذاری (۱ تا ۵) شد. در لوله اول ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و ۱ میلی‌لیتر از استوک اسپور-کریستال به آن اضافه و سوسپانسیون یکنواختی تهیه شد. در لوله دوم ۹/۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون لوله اول به آن اضافه گردید. در لوله‌های بعدی نیز به همین منوال ۹/۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و در هر لوله ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون لوله قبل اضافه شد. پس از تهیه غلظت‌های مورد نیاز از باکتری Bt و ویروس NPV برای آزمایشات زیست‌سنجی، با میکروسکوپ نوری شمارش شدند (شکل ۲). در این تحقیق، آزمون زیست‌سنجی بررسی اثرات متقابل Bt + NPV با استفاده از ترکیب دو غلظت از باکتری Bt ($۱ \times ۱۰^{۷}$ - $۲ \times ۱۰^{۷}$ CFU/ml) و دو غلظت مختلف از ویروس NPV ($۱۰^{۴}$ - $۱۰^{۴}$ POB/ml) که در تحقیق قبلی انجام شده توسط نویسندگان به عنوان غلظت‌های برتر تعیین شده بودند و با استفاده از غذای طبیعی روی لاروهای سن دوم کرم غنچه توتون در قالب طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی با ۲۰ تیمار (تیمارها شامل ۵ جدایه باکتری Bt، دو غلظت Bt، دو غلظت ویروس NPV) و ۳ تکرار در سطح پتری در آزمایشگاه بخش گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش در سال ۱۳۹۵ انجام شد. برای هر غلظت ترکیبی، ۳ تکرار و در هر تکرار ۱۵ عدد پتری دیش در نظر گرفته شد (شازده احمدی و همکاران، ۱۳۹۵). هر پتری دیش محتوی دیسک برگی توتون و یک عدد لارو سن دوم بود. دیسک‌های برگی توتون قبل از آغشته شدن به سوسپانسیون‌های ترکیبی نامبرده شده، به منظور اطمینان از عدم آلودگی آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ قرار داده و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس، روی هر سمت دیسک برگی توتون، مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های ترکیبی نامبرده ریخته و با لوپ استریل پخش شده تا تمام سطح برگ توتون آغشته گردد. در این تحقیق از یک تیمار شاهد (آب مقطر استریل) استفاده شد. درون هر پتری‌دیش، توسط قلم موی استریل، تعداد یک عدد لارو سن دوم قرار داده شد و سپس روی درب هر ظرف، اطلاعات مربوط به غلظت، شماره تکرار و تاریخ انجام آزمون درج گردید (شکل ۲). پس از ۴۸ ساعت تغذیه لاروها از غذای آلوده و آغشته به غلظت‌های مختلف ترکیب NPV+Bt، به ظروف پتری‌دیش مشابه دارای غذای سالم و عاری از این دو بیمارگر انتقال یافتند. سپس، درون ژرمیناتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶

ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. با توجه به آزمون زیست‌سنجی اثر متقابل که یک بار انجام شد، آماربرداری از میزان مرگ و میر لاروها در زمان‌های ۳، ۵، ۷ و ۱۴ روز بعد از اعمال تیمار شمارش و ثبت شد. معیار مرگ و میر لاروها، سیاه شدن و عدم واکنش لاروها به ضربه سوزن بود (شکل ۲) (شازده احمدی و همکاران، ۱۳۹۵).



شکل ۲- راست) تهیه سری رقت‌های مورد نیاز؛ وسط) انجام آزمون زیست‌سنجی؛ چپ) لاروهای تلف شده بعد از انجام زیست‌سنجی

Fig 2. Right) The series of dilutions required; Middle) Performance of bioassay test; Left) Dead Larvae died after bioassay.

### آزمون ضریب اثر متقابل (CTF)

برای به‌دست آوردن نوع اثرات متقابل بین غلظت‌های مختلف به‌کار رفته در ترکیب NPV+Bt و طبقه‌بندی نتایج نهایی اثرات ترکیبی آن‌ها به سه گروه مختلف شامل اثرات آنتاگونیستی (Ant)، اثرات سینرژیستی (Syn) و اثرات افزایشی (Add)، از فرمول زیر استفاده شد (Mansour *et al*., 1966; Wakil *et al*., 2012):

$$CTF= (O_c – O_e) / O_e \times 100$$

CTF= فاکتور سمیت، Oc= مرگ و میر مشاهده شده توسط کاربرد ترکیب NPV + Bt و Oe= مرگ و میر مورد انتظار توسط هر کدام از بیمارگرهای مورد استفاده

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمون زیست‌سنجی اثرات ترکیب NPV+Bt روی لاروهای سن دوم کرم غنچه توتون، به‌صورت طرح فاکتوریل بر پایه آنالیز واریانس کاملاً تصادفی در شرایط آزمایشگاه انجام و اطلاعات به‌دست آمده به وسیله نرم افزار آماری SAS در سطح اعتماد ۹۹٪ مورد آنالیز و تجزیه واریانس قرار گرفتند و حداقل غلظت کشندگی ۵۰ درصد (LC50) با استفاده از برنامه Polo-Pc محاسبه و مؤثرترین ترکیبات مشخص شدند. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد استفاده گردید.

### نتایج

نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل غلظت‌های مختلف باکتری Bt و ویروس NPV روی کرم غنچه توتون در روزهای مختلف آماربرداری نسبت به شاهد در شرایط آزمایشگاه نشان داد که اثر باکتری Bt با غلظت‌های مختلف و ویروس NPV با غلظت‌های مختلف در روزهای سوم، پنجم، هفتم و چهاردهم آماربرداری در سطح احتمال یک درصد از نظر آماری معنی‌دار بودند. همچنین، نتایج نشان داد که اثر متقابل باکتری Bt × ویروس NPV در روزهای سوم آماربرداری، معنی‌دار نبوده ولی در روزهای پنجم و چهاردهم، در سطح احتمال یک درصد و در روز هفتم، در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بودند (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت‌های مختلف باکتری *B. thuringiensis* و ویروس NPV روی کرم غنچه توتون در شرایط آزمایشگاه

Table 1. Variance analysis of the interaction effects of different concentrations of *B. thuringiensis* and Nucleopolyhedrovirus on *H. armigera* under laboratory conditions.

| Mean of squares | میانگین مربعات | | | درجه آزادی Df. | منبع تغییر (SOV) |
|---|---|---|---|---|---|
| روز چهاردهم $D_{14}$ | روز هفتم $D_7$ | روز پنجم $D_5$ | روز سوم $D_3$ | | |
| 5218.5$^{**}$ | 4137.6$^{**}$ | 467.09$^{**}$ | 648.4$^{**}$ | 4 | باکتری Bt |
| 1245.7$^{**}$ | 1186.3$^{**}$ | 670.6$^{**}$ | 389.6$^{**}$ | 1 | ویروس NPV |
| 2244.8$^{**}$ | 6835.2$^{**}$ | 106.6$^{**}$ | 322.4$^{**}$ | 1 | غلظت Bt |
| 45.2$^{**}$ | 44.7$^{**}$ | 1.8$^{ns}$ | 17.7$^{ns}$ | 4 | باکتری Bt × ویروس NPV |
| 44.8$^{**}$ | 272.8$^{**}$ | 1.11$^{**}$ | 4.4$^{**}$ | 4 | غلظت × Bt |
| 1126.6$^{**}$ | 294.8$^{**}$ | 2.8$^{**}$ | 34.8$^{*}$ | 1 | غلظت × NPV |
| 71.3$^{**}$ | 22.2$^{ns}$ | 1.11$^{**}$ | 2.93$^{**}$ | 4 | غلظت × NPV × Bt |
| 5.94 | 14.69 | 8.8 | 8.14 | 40 | خطا |
| 2.91 | 5.02 | 6.39 | 7.72 | | ضریب تغییرات (درصد) (%) (CV) |

$^{**}$و $^{*}$: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد؛ $^{ns}$: غیر معنی‌دار

$^{**}$ and $^{*}$: significant at 1% and 5% probability level; $^{ns}$: no significant

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus thuringiensis* و ویروس NPV روی کرم غنچه توتون نسبت به شاهد در شرایط آزمایشگاه

Table 2. Mean comparison of the interaction effects of different concentrations of *Bacillus thuringiensis* and Nucleopolyhedrovirus on *Helicoverpa armigera* compared to control under laboratory conditions.

| Percentage of | درصد مرگ و میر لاروی | | | Treatment | تیمار | ردیف No. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| روز چهاردهم $D_{14}$ | روز هفتم $D_7$ | روز پنجم $D_5$ | روز سوم $D_3$ | غلظت NPV (POB/ml) NPV concentration | غلظت Bt (spore/ml) Bt concentration | |
| 100 $^{a}$ | 100 $^{a}$ | 3.53 $^{ab}$ | 46.6 $^{a}$ | $10^4$ | Bt 12 ($2 \times 10^7$) | 1 |
| 100 $^{a}$ | 100 $^{a}$ | 55.5 $^{a}$ | 46.6 $^{a}$ | $10^4$ | Bt 73 ($2 \times 10^7$) | 2 |
| 100 $^{a}$ | 100 $^{a}$ | 53.3 $^{ab}$ | 46.6 $^{a}$ | $10^4$ | Bt 72 ($2 \times 10^7$) | 3 |
| 100 $^{a}$ | 100 $^{a}$ | 53.3 $^{ab}$ | 46.6 $^{a}$ | $10^4$ | Bt 50 ($2 \times 10^7$) | 4 |
| 100 $^{a}$ | 95.5 $^{ab}$ | 48.8 $^{bcd}$ | 42.2 $^{ab}$ | $10^4$ | Bt 12 ($1 \times 10^7$) | 5 |
| 95.5 $^{a}$ | 77.7 $^{c}$ | 51.07 $^{abc}$ | 40 $^{bc}$ | $10^3$ | Bt 50 ($2 \times 10^7$) | 6 |
| 95.5 $^{a}$ | 82.2 $^{c}$ | 51.07 $^{abc}$ | 40 $^{bc}$ | $10^3$ | Bt 12 ($2 \times 10^7$) | 7 |
| 100 $^{a}$ | 82.2 $^{c}$ | 51.07 $^{abc}$ | 40 $^{bc}$ | $10^3$ | Bt 72 ($2 \times 10^7$) | 8 |
| 100 $^{a}$ | 82.2 $^{c}$ | 53.3 $^{abc}$ | 40 $^{bc}$ | $10^3$ | Bt 73 ($2 \times 10^7$) | 9 |
| 100 $^{a}$ | 93.3 $^{b}$ | 46.6 $^{cd}$ | 37.7 $^{bc}$ | $10^4$ | Bt 50 ($1 \times 10^7$) | 10 |
| 100 $^{a}$ | 97.7 $^{ab}$ | 46.6 $^{cd}$ | 37.7 $^{bc}$ | $10^4$ | Bt 72 ($1 \times 10^7$) | 11 |
| 100 $^{a}$ | 93.3 $^{b}$ | 48.8 $^{bcd}$ | 37.7 $^{bc}$ | $10^4$ | Bt 73 ($1 \times 10^7$) | 12 |
| 80 $^{b}$ | 66.6 $^{d}$ | 44.4 $^{de}$ | 35.5 $^{c}$ | $10^3$ | Bt 72 ($1 \times 10^7$) | 13 |
| 73.3 $^{c}$ | 62.2 $^{d}$ | 44.4 $^{de}$ | 35.5 $^{c}$ | $10^3$ | Bt 50 ($1 \times 10^7$) | 14 |
| 75.5 $^{bc}$ | 62.2 $^{d}$ | 44.4 $^{de}$ | 35.5 $^{c}$ | $10^3$ | Bt 73 ($1 \times 10^7$) | 15 |
| 73.3 $^{c}$ | 64.4 $^{d}$ | 44.4 $^{de}$ | 35.5 $^{c}$ | $10^3$ | Bt 12 ($1 \times 10^7$) | 16 |
| 51.07 $^{d}$ | 46.6 $^{e}$ | 40 $^{ef}$ | 26.6 $^{d}$ | $10^4$ | Bt 58 ($2 \times 10^7$) | 17 |
| 48.8 $^{de}$ | 44.4 $^{ef}$ | 33.3 $^{gh}$ | 24.4 $^{d}$ | $10^4$ | Bt 58 ($1 \times 10^7$) | 18 |
| 44.4 $^{ef}$ | 42.2 $^{ef}$ | 37.7 $^{fg}$ | 22.2 $^{d}$ | $10^3$ | Bt 58 ($2 \times 10^7$) | 19 |
| 42.2 $^{f}$ | 40 $^{f}$ | 31.07 $^{h}$ | 22.2 $^{d}$ | $10^3$ | Bt 58 ($1 \times 10^7$) | 20 |

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means followed by same letter in each column are not significantly different at 1% of probability level according to DMRT.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که جدایه‌های Bt-12، Bt-73، Bt-72 و Bt-50 با غلظت spore/ml ۱۰^۷ × ۲ در ترکیب با ویروس NPV با غلظت POB/ml ۱۰^۴ دارای بیشترین اثر کشندگی بودند، به طوریکه در روزهای هفتم و چهاردهم بعد از اعمال تیمار، دارای ۱۰۰ درصد اثر کشندگی بودند. کمترین اثر کشندگی مربوط به جدایه Bt-58 با غلظت spore/ml ۱۰^۷ × ۱ در ترکیب با ویروس NPV با غلظت POB/ml ۱۰^۳ بود که در روز چهاردهم بعد از اعمال تیمار، فقط ۴۲/۲ درصد کشندگی ایجاد کرد (جدول ۲).

نتایج آزمایشات فاکتور سمیت (CTF) نشان داد که Bt با غلظت spore/ml ۱۰^۷ × ۱ در ترکیب با هر دو غلظت از NPV و نیز Bt با غلظت spore/ml ۱۰^۷ × ۲ در ترکیب باNPV با غلظت (POB/ml) $10^4$ اثرات افزایشی نشان دادند. اثرات متقابل سینرژیستی در ترکیب بیش‌ترین غلظت از Bt ( spore/ml ۱۰^۷ × ۲) و کم‌ترین غلظت از NPV ($10^3$ POB/ml) مشاهده شد. در این تحقیق، ایجاد اثرات سینرژیستی و افزایشی در مرگ و میر لاروهای *H. armigera* مشاهده شده در ترکیبات مختلف Bt + NPV به غلظت بیمارگر به‌کار رفته بستگی داشت.

LC50 جدایه برتر (Bt-72) برابر با spore/ml ۱۰^۶ × ۷ و برای جدایه برتر NPV (NPV-10) برابر با POB/ml ۱۰^۴ × ۸/۱ بوده است (جدول ۴).

**بحث**

امروزه، ترکیبی از دو حشره‌کش میکروبی، مانند Bt و NPV، به عنوان وسیله‌ای برای افزایش طیف برنامه‌های مدیریت بیماری‌زای حشرات محسوب می‌شود. بدین ترتیب مدیریت آفات متعدد را به‌طور هم‌زمان (IPM) میسر می‌سازد. همچنین ممکن است که بیمارگرها به منظور افزایش قدرت بیماری‌زایی به صورت ترکیب با یکدیگر به کار رفته و اثرات متقابل با یکدیگر داشته باشند. در تحقیق (Reddy and Manjunatha, 2000) اثر افزایشی (Add) بعد از تیمار لاروهای آفت *Spodoptera littoralis* با ترکیب Bt + NPV به‌دست آمد و گزارش شد که مرگ و میر حاصل از ترکیب فرآورده تجاری Bt (Dipel®) بیشتر از کاربرد انفرادی هر یک از آن‌ها به تنهایی بوده است. در تحقیق کنونی، ایجاد اثرات سینرژیستی و افزایشی در مرگ و میر لاروهای *H. armigera* مشاهده شده در ترکیبات مختلف Bt + NPV به غلظت بیمارگر به‌کار رفته بستگی داشت، در صورتی‌که در سایر ترکیبات گزارش شده بود که اثرات متقابل ایجاد شده توسط ترکیبات مختلف Bt + NPV به عواملی مانند غلظت، زیرگونه باکتری Bt، طراحی مدل زیست‌سنجی و سن لاروی به کار رفته در هر آزمایش بستگی دارد (Liu *et al*., 2006). نتایج نهایی لیو و همکاران (۲۰۰۶)، نشان داد که در صورت ترکیب غلظت کم Bt (۶۲/۵ µg/g) با دوزهای بالاترNPV (POB/ml ۱۰^۷ × ۳ - ۱۰^۶× ۶)، اثرات متقابل از نوع افزایشی ایجاد شد (Liu *et al*., 2006). مرزبان و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که مرگ و میر حاصل از ترکیب Cry 1Ac و ویروس CPV روی *H. armigera* اثرات سینرژیستی و افزایشی داشت. این نتایج با یافته‌های مرزبان، ۲۰۱۲ مطابقت داشت (Marzban *et al*., 2009). متر و زوهدی (۱۹۸۱)، کارایی اثر بیوکنترلی و زیستی دو ترکیب پاتوژن Bt + NPV را بر روی لاروهای آفت کرم غوزه پنبه (*Helicoverpa armigera*) را به‌صورت ترکیبی و همزمان، مورد بررسی قرار دادند. مشاهده شد که حساسیت لاروها به هر یک از دو پاتوژن Bt و NPV، در هنگام کاربرد آن‌ها، با افزایش سن لاروی کاهش یافت. نتایج نهایی آن‌ها نشان داد که با افزایش سن لاروی، اثرات متقابل بین این دو پاتوژن، از نوع سینرژیستی و افزایشی بود (Matter and Zohdy, 1981). نحوه اثر و عملکرد Bt و NPV به صورت آسیب و تخریب سلول‌های اپیتلیال در روده میانی حشره می‌باشد. توکسین Bt در غلظت‌های کمتر ممکن است باعث تأخیر در رشد و نمو لاروها شود، بنابراین به ویروس فرصتی جهت تکثیر و ایجاد اثرات کشندگی بیش‌تر در تعامل با باکتری می‌دهد. این امر بیان کننده این است که چرا Bt و NPV در برخی از آزمون‌ها اثرات سینرژیستی و تشدید کنندگی نشان می‌دهند.

جدول ۳- درصد مرگ و میر لاروی، فاکتور سمیت و نوع اثرات متقابل باکتری Bt و ویروس NPV روی لاروهای سن دوم کرم غنچه توتون (*H. armigera*).

Table 3. The percentage of larvae mortality, CTF and Type of interaction effect of Bt and NPV on 3 rd larvae of *H. armigera*.

| BT-58 | | | BT-50 | | | BT-72 | | | BT-73 | | | BT-12 | | | غلظت ویروس NPV con. POB /ml | غلظت باکتری Bt Con. ml Spore/ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| نوع اثر متقابل Type of Interaction | فاکتور سمیت CTF | درصد مرگ و میر لاروی Mortality% | نوع اثر متقابل Type of interaction | فاکتور سمیت CTF | درصد مرگ و میر لاروی Mortality % | نوع اثر متقابل Type of interaction | فاکتور سمیت CTF | درصد مرگ و میر لاروی Mortality % | نوع اثر متقابل Type of interaction | فاکتور سمیت CTF | درصد مرگ و میر لاروی Mortality % | نوع اثر متقابل Type of Interaction | فاکتور سمیت CTF | درصد مرگ و میر لاروی Mortality% | | |
| Add | 41/6 | %42/2 | Add | 45.7 | %73/3 | Add | 37/5 | % 80 | Add | 45/7 | % 75/5 | Add | 45/45 | ٪73/3 | $10^3$ | $1 \times 10^7$ |
| Syn | 83/3 | %48/8 | Add | 66.6 | ٪100 | Add | 66/6 | %100 | Add | 66/6 | ٪100 | Add | 61/29 | ٪100 | $10^4$ | $1 \times 10^7$ |
| Syn | 87/6 | ٪44/4 | Syn | 87.6 | %95/5 | Syn | 97/17 | %100 | Syn | 87/6 | ٪95/5 | Syn | 81/81 | ٪95/5 | $10^3$ | $2 \times 10^7$ |
| Add | 66/6 | ٪51/07 | Add | 66.6 | %100 | Add | 66/6 | %100 | Add | 66/6 | ٪100 | Add | 61/29 | ٪100 | $10^4$ | $2 \times 10^7$ |

Add = اثر افزایشی، Syn = اثر سینرژیستی

Add: Increasing effect; Syn: Synergistic effect

جدول ۴- حداقل غلظت کشندگی ۵۰ درصد (LC50) جدایه‌های بومی Bt و NPV روی کرم غنچه توتون

Table 4. The minimum lethal concentration of 50% (LC50) of native Bt and NPV isolates on tobacco bud worm.

| ردیف No. | نام جدایه Isolate's name | | غلظت Concentrations | | | | میزان حداقل غلظت کشندگی LC50 con. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | عامل بیمارگر Pathogen | نام جدایه isolate | $10^3$ | $10^4$ | $1\times10^7$ | $2\times10^7$ | |
| 1 | | 72 | _ | _ | 55 | 62 | $7\times10^6$ |
| 2 | | 73 | _ | _ | 53.3 | 60 | $8\times10^6$ |
| 3 | Bt | 12 | _ | _ | 53.3 | 60 | $8\times10^6$ |
| 4 | | 50 | _ | _ | 53.3 | 60 | $8\times10^6$ |
| 5 | | 58 | _ | _ | 51 | 53.3 | $9\times10^6$ |
| 6 | NPV | 10 | 52 | 5 8 | _ | _ | $8.1\times10^4$ |

نتایج تحقیق کنونی نشان داد که همه جدایه‌های Bt به جز جدایه Bt-58 با غلظت spore/ml ۱۰^۷ × ۱ در ترکیب با هر دو غلظت از NPV و نیز Bt با غلظت spore/ml ۱۰^۷ × ۲ در ترکیب با (POB/ml) ۱۰^۴ اثرات افزایـشی نشـان دادند. اثرات متـقابل سینـرژیستی در ترکیب بیش‌ترین غلظت از Bt spore/ml (۱۰^۷ × ۲) و کم‌ترین غلظت از NPV (POB/ml $10^3$) مشاهده شد و نشان داد که ترکیب Bt + NPV منجر به تشدید قدرت بیماری‌زایی و کشندگی آن‌ها گردید. در صورتی‌که در تحقیق کلانتری و همکاران (۲۰۱۳) گزارش شده بود که لاروهای سن سوم *H. armigera* نسبت به کاربرد ترکیب Bt + NPV حساسیت بیش‌تری نشان دادند. آن‌ها همچنین بیان کردند که اثرات سینرژیستی زمانی مشاهده شد که کم‌ترین غلظت از Bt با بیش‌ترین غلظت از NPV ترکیب شده بودند و سایر ترکیبات آن‌ها اثرات آنتاگونیستی و افزایشی نشان دادند که با نتایج این تحقیق کنونی مغایرت داشت (Kalantari *et al*., 2013). همان‌گونه که در جدول دیده می‌شود، فاکتور سمیت (CTF) برای دو سویه Bt-72 و Bt-73 در حالت اثر متقابل ترکیب باکتری Bt با غلظت ۱۰^۷ × ۲ + ویروس NPV با غلظت ۱۰^۳ به‌ترتیب برابر با ۹۷/۱۷٪ و ۸۷/۶ ٪ و از نوع سینرژیستی (Syn) به‌دست آمد که دارای بیش‌ترین مقدار بود. این امر یک ویژگی بسیار مطلوب برای این دو سویه تلقی می‌گردد (جدول ۳).

## References منابع


**شازده احمدی، م.، سجادی، ا.، شهادتی مقدم، ز.، صالحی جوزانی، ق.ر.، عاصمی، ه.و مسعودی، ا. ۱۳۹۵.** جداسازی و شناسایی مولکولی سویه‌های بومی *Bacillus thuringiensis* و اثرات متقابل ترکیب Bt + NPV جهت کنترل بیولوژیکی آفت کرم غنچه توتون(*Helicoverpa armigera*). کارنامه پژوهشی سالیانه مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش، شرکت دخانیات ایران، صفحات: ۱۶۵-۱۸۲ .

**Abbot W. S. 1925.** A method for comparing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18: 265-267.

**Abdual Qayyum M., Wakili W., Jalal Arif M. and Talib Sahi SH. 2015.** *Bacillus thuringiensis* and Nuclear Polyhedrosis Virus for the enhanced Bio-control of *Helicoverpa armigera*. International Journal of Agriculture and Biology 17: 1043- 1048.

**Ahmed, K. Khalique, F. and Malik, B.A. 1998.** Modified artificial diet for mass rearing of Chickpea Pod borer, *Helicoverpa armigera* (H.). Pakistan Journal of Biological Sciences 1:183-187.

**Bravo, A., Gill, S.S. and Soberon, M. 2007.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* cry and cyt toxins and their potential for insect control. Toxin 49: 423-435.

**Chang, J.H., Choi, J.Y., Jin, B.R., Roh, J.Y., Olszewski, J.A., Seo, S.J., O´Reilly, D.R. and Je, T.H. 2003.** An improved baculovirus insecticide producing occlusing bodies that contains *Bacillus thuringiensis* insect toxin. Journal of Invertebrates Pathology 84: 30-37.

**Chandrasekaran R., Revanthi K. and Jayanthi S. 2015.** Combined effect of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtitis* against *Helicoverpa armigera*. International Journal of current Microbiology and Applied sciences 4 (7): 127-141.

**Duraimurugan, P., Regupathy, A. and Shanmugam, P. 2009.** Effect of Nucleopolyhedrovirus and *Bacillus thuringiensis* infection on the activiry of insecticide detoxification enzyme in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hbn. Acta Phytopathology and Entomology of Ungarica 44: 345-352.

**Fuxa, J.R. 2004.** Review: Ecology of insect Nucleopolyhedroviruses. Agriculture, Ecosystems and Environment 103: 27-43.

**Hatem, A. E., Reda, A. M. Amer. and Vargas- Osuna, E. 2012.** Combination effect of *Bacillus thuringiensis* Cry 1AC toxin and Nucleopolyhedrovirus or Granolovirus of *Spodoptera Littoralis* on the cotton leafworm. Egyptian Journal of Biological Pest Control 22 (2): 115-120.

**Kalantari, M., Marzban, R., Imani, S. and Askari, H. 2013.** Effects of *Bacillus thuringiensis* isolates and single nuclear polyhedrosis virus in combination and alone on *Helicoverpa armigera*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 12: 107-121.

**Knaak, N., Fiuza, L. M. 2005.** Histopathology of *Anticarsa gemmatalis* Hubner (Lep.; Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus and *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki*. Brazilian Journal of Microbiology 36 196-200.

**Liu, X., Zhang, Q., Xu, B.L. and Li, J.C. 2006.** Effects of Cry 1AC toxin of *Bacillus thuringiensis* and Nuclear Polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hubner) on larvae mortality and population. Pest Management science 62: 729-737.

**Mahmoud, D., Abdl El- Bar, M. and Abdual Aziz Radi, M. 2012.** Combined effect of local isolate *Spodoptera littoralis* Nucleopolyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* on *Culex pipiens* larvae (Culicidae: Diptera). The Journal of Basic & Applied Zoology 65: 74-78.

**Magholi, Z., Marzban, R., Abbasipour, H., Shikhi, A. and Karimi, J. 2013.** Interaction effects of *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki* and Single Nuclear Polyhedrosis Virus on *Plutella Xylostella*. Journal of Plant diseases and protection 120: 173-178.

**Mansour, N.A., Eldefrawi, M.E., Toppozada, A. and Zeid, M. 1966.** Toxicological studies on the Egyptian cotton leafworm, *Prodenia litura* Vl potentiation and antagonism of carbamate insecticide. Journal of Economic Entomology 59: 307–311

**Marzban, R., He, Q., Liu, X. X. and Zhang, Q. W. 2009.** Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry 1AC and cytoplasmic polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hubner)(HaCPV) on cotton bollworm (Lepidoptera: Nuctuidae). Journal of Invertebrate pathology 101: 71-76.

**Matter, M.M. and Zohdy, N.M.Z. 1981.** Biotic efficiency of *Bacillus thuringiensis* Berl. and Nuclear polyhedrosis virus on larvae of American bollworm, *Heliothis armigera* Hbn. (Lepidoptera: Noctuidae). Zeitschrift fur Angewandte Entomologie 92: 336-343.

**Mcyay, J., Gudauskas, R. and Harper, J. 1997.** Effects of *Bacillus thuringiensis* and Nuclear Polyhedrosis Virus mixtures on *Trichoplusia ni* Larvae. Journal of Invertebrate Pathology 29: 367- 372.

**Padua, L. E., Uplb, V. P., Philprice, V. P., Gapud, Philiprice, R.C.S., Philiprice, E.C.M., Talekan, N. S. and Pennstate, E.R. 1997.** Potential of Nuclearpolyhedrosis Virus (NPV) and *Bacillus thuringiensis* CBO for *Spodoptera* control in yello Granen onions. Asia Region CRSP 4th Annual Report 346-347.

**Pingel, R.L. and Lewis, L.C. 1999.** Effect of *Bacillus thuringiensis*, *Anagrapha falcifera* multiple Nucleopolyhedrosis, and their mixture on three Lepidoptera corn ear pests. Journal of Economic Entomology 92: 91-96.

**Reddy, G.V.P. and Manjunatha, M.M. 2000.** Laboratory and field studies on the integrated pest management of *Helicoverpa armigera*(Hubner) in cotton, based on pheromone trap catchthreshold level. Journal of Applied Entomology 124: 213-221.

**Salama, H.S., Moaved, S. M. and Zaki, F.N. 1987.** Effects of Nuclearpolyhedrosis Virus & *Bacillus thuringiensis* combinations on *Spodoptera littoralis*(Biosd.). Journal of Applied Entomology 104: 23-27.

**Salama, H.S., Sharaby, A., and Eldin, M.M. 1993.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Berl. and Nuclear Polyhedrosis Virus in the Larvae of *Spodoptera littoralis*(Boisd). Insect Science and its Application 14: 483-488.

**Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 775-806.

**Wakil, W., Ghazanfar, M.U., Nasir, F., Qayyum, M.A. and Tahir, M. 2012.** Insecticidal efficacy of *Azadirachta indica*, nucleopolyhedrovirus and chlorantraniliprole singly or combined against field populations of *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Chilean Journal of Agricultural Research 72: 53–61

# Study the interaction effects of combined application of some native strains of *Bacillus thuringiensis* and Nucleopolyhedrovirus on control of *Helicoverpa armigera*

.

**M. Shazdehahmadi[1*], A. sajjadi[1] and Z. Shahadati Moghadam[1]**

Received: 16 Sep., 2018 Accepted: 14 Feb., 2019

**ABSTRACT**

*Helicoverpa armigera* is one of the most important tobacco pests in all over the world. Today, due to the problems of using chemical pesticides such as environmental pollution and endangering the health of humans and other organisms, high costs and the problems of pest resistance, has led to more attention to use of IPM method and important biological control agents such as *Bacillus thuringiensis* (Bt) and Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV). In this research, the interaction effects of combined use of 5 superior Bt isolates and one superior NPV isolate that in previous research of authors, were isolated from different parts of the northern of Iran, the investigation was conducted by combining two concentrations of Bt ($2 \times 10^7 - 1 \times 10^7$ spore/ml) and two concentrations of NPV ($10^3 - 10^4$ POB/ml). The mortality of 2$^{th}$ larvae of H. *armigera* was compared among the pathogen treatments on a completely randomized factorial design with 20 treatments and 3 replications under laboratory conditions in plant protection department of Tirtash Research and Education Center through 2016. The results showed that Bt isolates (12, 73, 72, 50) with ($2 \times 10^7$ spore/ml) concentration in combination with NPV ($10^4$ POB/ml) had the most lethal effect, so that on 7 and 14 days after treatment, they had 100% lethal effects. The lowest mortality related to Bt-58 with ($1 \times 10^7$ spore/ml) in combination with NPV ($10^3$ POB/ml), which on the 4$^{Th}$. day after applying the treatment, it caused only 42/2% mortality. $LC_{50}$ of superior isolate (Bt-72) was equal to $7 \times 10^6$ spore/ml and superior isolate (NPV-10) was equal to $8/1 \times 10^4$ POB/ml. The results revealed that $1 \times 10^7$ spore/ml concentration of Bt in combination with both two NPV concentrations and also Bt ($2 \times 10^7$ spore/ml) in combination with $10^4$ POB/ml showed Additive effects. Synergistic interaction effects were observed in combination of the highest concentration of Bt ($2 \times 10^7$ spore/ml) and the lowest concentration of NPV ($10^3$ POB/ml). Generally, the results of this research showed that the combination of (Bt + NPV) leads to increase their pathogenicity and mortality.

**Key words:** Bt, Interaction effect, *Helicoverpa armigera*, NPV, Native isolates.

1. Researchers, Tirtash Tobacco Research & Education Center, Behshahr, Mazandaran.
**Corresponding author**: Noshinshazdeahmadi@yahoo.com