آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۵، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۶

بررسی اثرات بیمارگری سه نوع نوکلئوپلی هیدرو ویروس، *Spodoptera littoralis* NPV، *Helicoverpa armigera* NPV و *Spodoptera litura* NPV روی مراحل زیستی پروانه برگخوار مصری پنبه *Spodoptera littoralis*

زهرا معقولی فرد[۱،۲]، شهرام حسامی[۲]✉، رسول مرزبان[۳] و غلامرضا صالحی جوزانی[۴]

۱- دانشجوی PhD، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران؛ ۲- دانشجوی PhD و استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران؛ ۳- دانشیار مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، تهران، ایران؛ ٤- استاد، بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۶)

چکیده

در این تحقیق قدرت بیمارگری سه ویروس *Spodoptera littoralis* NPV، *Helicoverpa armigera* NPV و *Spodoptera litura* NPV در سه غلظت مختلف ۶×۱۰^{۲}، ۶×۱۰^{۴} و ۶×۱۰^{۶} OB در میلی‌لیتر روی لاروهای ۵ روزه کرم برگخوار مصری پنبه (*Spodoptera littoralis*) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس روی غذای مصنوعی بررسی شد. بیشترین طول دوره لاروی با ۱۹/۷ روز مربوط به ویروس *H. armigera* در غلظت ۶×۱۰^{۴} OB در میلی‌لیتر بود که با بقیه تیمارها اختلاف معنی دار داشت. در ویروس *S. littoralis* NPV در غلظت ۶×۱۰^{۴} OB در میلی‌لیتر، کمترین درصد شفیره شدن (۱۰ درصد) مشاهده شد. ویروس *S. littoralis* NPV در غلظت‌های ۶×۱۰^{۲} و ۶×۱۰^{۴} OB در میلی‌لیتر کمترین وزن شفیرگی با ۱۸/۳ و ۱۳/۸ میلی‌گرم را داشت. در جدایه *S. littoralis* NPV، در غلظت ۶×۱۰^{۴} OB در میلی‌لیتر کمترین درصد خروج حشره کامل با ۶/۷ درصد مشاهده شد. مؤثرترین ویروس برای کنترل مراحل مختلف زیستی این آفت،*S. littoralis* NPV بود. LC50 جدایه *S. littoralis* NPV روی لاروهای ۵ روزه پروانه برگخوار مصری پنبه، ۷×۱۰^{۲} OB در میلی‌لیتر محاسبه شد.

واژه‌های کلیدی: باکولوویروس‌ها، قدرت بیمارگری، کرم برگخوار مصری پنبه، ویروس‌های بیمارگر حشرات.

Pathogenic effects of three Nucleopolyhedrovirus, *Spodoptera littoralis* NPV, *Helicoverpa armigera* NPV, *Spodoptera litura* NPV on life stages of Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis*

Z. MAGHOLIFARD[1, 2], SH. HESAMI[2]✉, R. MARZBAN[3] and GH. SALEHI JOUZANI[4]

1- PhD Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, Fars Science and Research branch, Islamic Azad University, Fars, Iran; 2. PhD Student, Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran; 3- Associate Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research, Education and Extension Organization(AREEO), Tehran, Iran; 4- Professor, Department of Microbial Biotechnology and Biosaftey, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization(AREEO), Karaj, Iran

Abstract

In this study, pathogenicity of three virus isolates, *Spodoptera littoralis* NPV, *Helicoverpa armigera* NPV, *Spodoptera litura* NPV was evaluated in three different concentrations of 6×10^{2}, 6×10^{4}, 6×10^{6} $OBml^{-1}$ on 5-day-old larvae of Egyptian cotton leafworm, *S. littoralis* at 25 ˚C on artificial diet. The highest larval duration was observed in concentration of 6×10^{4} $OBml^{-1}$ *H. armigera* NPV with 19.7 days which had a significant difference with other treatments. *S. littoralis* NPV in concentrarion of 6×10^{4} had the lowest percentage of pupal rate (10%) and lowest pupal weight in concentrarions of 6×10^{2} and 6×10^{4} $OBml^{-1}$ (18.3 and 13.8 mg, respectively). The lowest adult emergence (6.7%) was observed in *S. littoralis* NPV isolate with 6×10^{4} $OBml^{-1}$ concentration. *S. littoralis* NPV was most effective virus for controlling various biological stages of this pest. The LC_{50} of *S. littoralis* NPV isolate on 5-day-old larvae of Egyptian cotton leafworm was determined to be 7×10^{2} $OBmL^{-1}$.

Key words: Baculoviruses, Egyptian cotton leafworm, pathogenicity, Insect pathogenic viruses.

✉ **Corresponding author: shahram.hesami@gmail.com**

مقدمه

پروانه برگخوار مصری پنبه *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lep.:Noctuidae) یک آفت پلی‌فاژ با دامنه میزبانی وسیع (Alfazairy *et al*., 2013) و از آفات مهم اقتصادی پنبه، یونجه، شبدر، چغندرقند، ذرت، گوجه‌فرنگی، فلفل سبز، بادام زمینی، توتون، آفتابگردان، درختان میوه از قبیل سیب و مرکبات می‌باشد (Carter, 1984; Masetti *et al*., 2008; Ahmad, 1988; Sannino *et al*., 1996; Hatem *et al*., 2009a, Abd El Mageed and Shalaby, 2011). این آفت به بیش از ۱۱۲ گونه گیاهی متعلق به ۴۴ خانواده حمله می‌کند (Moussa *et al*., 1960; Brown and Dewhurst, 1975; Hatem *et al*., 2009b and 2011). این آفت بطور گسترده در آفریقا، کشورهای حاشیه مدیترانه و آسیای میانه و قسمت‌های جنوبی ایتالیا پراکنده شده است (Sannino, 2003; Pineda *et al*., 2007) . در ایران نیز این آفت در استان‌های جنوبی و مناطق گرمسیر باعث خسارت می‌شود (Khodaverdi *et al*., 2010). اصلی ترین روش برای کنترل این آفت، جمع‌آوری برگ‌های حاوی توده‌های تخم در اواخر ماه می تا آگوست و سوزاندن آنها است (Topper *et al*., 1984; McKinley *et al*., 1989). با افزایش خسارت در مزارع استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی مطرح شد. کاربرد بیش از اندازه آفت‌کش‌ها باعث ایجاد مقاومت این حشره به برخی از آفت‌کش‌ها از قبیل ارگانوفسفات‌ها، کاربامات‌ها و پایروتیروئیدها شده است (El-Guindy *et al*., 1982; Miles and Lysandrou, 2002; El-zemaity *et al*., 2003; Hatem *et al*., 2011). از طرفی کاربرد آفتکش‌های شیمیایی باعث ایجاد مشکلات زیست‌محیطی در طبیعت و ایجاد مخاطرات برای سلامتی انسان می‌شود. از این مشکلات می‌توان به از بین رفتن حشرات مفید مانند دشمنان طبیعی آفات و حشرات گرده افشان اشاره کرد. همچنین خطرات زیان بار آفتکش‌ها و وارد شدن آنها در چرخه غذایی موجودات زنده و انسان از دیگر مواردی است که می توان به آن اشاره کرد. بنابراین استفاده از ویروس‌های حشرات برای کنترل این آفت توسعه یافت (Jones *et al*., 1994). محصولات باکولوویروس به دلیل ایمن بودن، بیمارگری بالا و فرمولاسیون راحت عامل کنترل کاربردی در بسیاری از کشورها است (Lacey *et al*., 2015). این پاتوژن‌ها اهمیت زیادی در کنترل آفات مهم راسته بال‌پولکداران مانند *Spodoptera* spp. و *Helicoverpa* spp. و بعضی از راسته بال‌غشائیان و دوبالان دارند (Szewcyk *et al*., 2006; Rowley *et al*., 2011; Harrison and Hoover, 2012). این گونه‌های آفات به سرعت نسبت به حشره‌کش‌های شیمیایی متداول مقاومت نشان می‌دهند و به علاوه به دامنه وسیعی از محصولات کشاورزی آسیب می‌رسانند (Grzywac *et al*., 2005; Arrizubieta *et al*., 2014). در زمان حمله حشرات بالغ به گیاهان تیمار شده با ویروس، ویروس به سطح تخم و متعاقباً به لاروها منتقل می‌شود (Cross *et al*., 2005). از آنجا که باکولوویروس‌ها اختصاصی و سازگار با محیط زیست هستند، همواره به عنوان یکی از جایگزین‌های ممکن یا مکمل حشره‌کش‌های شیمیایی مطرح بوده‌اند (Moscardi, 1999). اگرچه کاربرد این ویروس‌ها به عنوان حشره‌کش دارای محدودیت‌هایی است اما باعث چرخه‌های ثانویه آلودگی در جمعیت آفت شده و یک ابزار کنترل جمعیت در طولانی مدت بوده و منجر به افزایش فواصل اسپری پاشی و کاهش هزینه‌ها می‌شوند (Bonsall, 2004). تحقیقات نشان داده است که جدایه‌های مختلف *S. littoralis* NPV می‌توانند باعث مرگ و میر بالا در جمعیت لاروهای این آفت شود (Maeda *et al*., 1990; Jones *et al*., 1994; Toprak *et al*., 2006; 2007; Masetti *et al*., 2008). *S. litura* NPV به عنوان عامل کنترل مؤثر و کاربردی علیه آفت *S. litura* در هند معرفی شده است (Jayaraj and Rabindra, 1990; Muthuswami *et al*., 1993). همچنین *H. armigera* NPV نیز به عنوان یک بخش مهم در کنترل تلفیقی آفات معرفی شده است (Hunter-Fujita *et al*. 1998; Erayya *et al*., 2013; Chaeychomsri, 2015). پژوهش‌های انجام شده در فرمولاسیون میکروکپسول HaNPV آینده امید

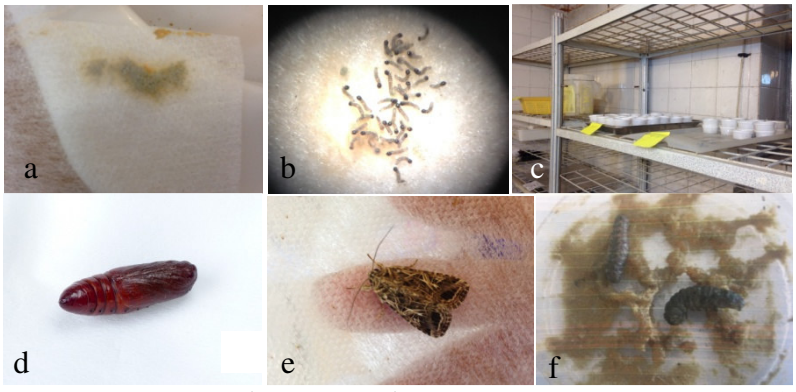
بخشی را نوید می‌دهد (Gifani *et al.*, 2015). کاربرد ویروس‌های بیماریزای حشرات در سال‌های اخیر در ایران مورد توجه قرار گرفته است. برای اولین بار ویروس گرانولوسیس کرم سیب توسط Rezapanah *et al.* (2002) از ایران گزارش شد. همچنین Fahimi *et al.* (2008) قدرت بیمارگری ویروس MbNPV را روی لاروهای سنین مختلف بید کلم *Plutella xylostella* بررسی کردند و بیشترین مرگ و میر را روی لاروهای سنین ۲ و ۳ مشاهده نمودند. امکان مدیریت *Spodoptera exigua* با استفاده از ویروس MbNPV و سم ایندوکساکارب توسط Rabie *et al.* (2011) بررسی شد و امکان کنترل لاروهای سنین پائین این آفت با ویروس را مورد توجه قرار دادند. با توجه به اهمیت یافتن آفت کش‌های زیستی مؤثر جهت کنترل آفات برگخوار مختلف، هدف از اجرای تحقیق حاضر بررسی اثرات بیمارگری سه نوع باکولوویروس NPV *Spodoptera littoralis*، *Helicoverpa armigera* NPV و *Spodoptera litura* NPV روی مراحل زیستی پروانه برگخوار مصری پنبه، *S. littoralis* بود.

روش بررسی

۱- پرورش حشره: لاورهای سنین مختلف *S. littoralis* از مزارع پنبه دزفول جمع آوری و در اتاق پرورش سترون تحت شرایط محیطی دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره روشنایی به تاریکی ۸:۱۶ ساعت روی غذای مصنوعی ابداعی توسط Navon (1985) با تغییراتی به شرح زیر پرورش یافتند. حشرات بالغ در دسته‌های ۳۰ تایی (۱۵♂ + ۱۵♀) در ظروف استوانه‌ای پلاستیکی به قطر، ۱۷ و ارتفاع، ۲۵ سانتی‌متر قرار گرفتند. سطح درونی دیواره ظروف به وسیله کاغذهای حوله‌ای پوشانده شد و در کف استوانه، پتری حاوی آب عسل ۱۰ درصد قرار داده شد.

برای تهیه غذای مصنوعی لاروها، ۲۶۶/۵ گرم لوبیا چیتی که به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شد به همراه ۴۰ گرم مخمر آبجو، ۲/۵ گرم نپاژین (متیل پاراهیدروکسی بنزووآت)، ۱/۲۵ گرم اسید سوربیک، ۴ گرم اسید آسکوربیک و ۴۰۰ سی سی آب مقطر، توسط دستگاه مخلوط کن برقی به خوبی مخلوط شد. حدود ۱۶ گرم آگار را داخل ۴۰۰ سی سی آب مقطر ریخته و پس از اتوکلاو با بقیه مواد مخلوط شد. غذای آماده شده را به ظروف نگهداری غذای مصنوعی منتقل و در یخچال در دمای ۴-۳ درجه سلیسیوس نگهداری شد (با تغییراتی در جیره ارایه شده توسط Navon, 1985).

۲- مراحل آماده سازی ویروس‌ها: ویروس *H. armigera* NPV (HaNPV) از شرکت Henan Jiyuan Baiyun از کشور چین تهیه شد. به میزان یک گرم ویروس با غلظت 6×10^{10} OB در میلی‌لیتر در ۱۰ سی سی محلول بافر Tris-Hcl 50mM (PH 7.03) رقیق شد و از روی محلول استوک غلظت‌های مورد نیاز ساخته شد.



شکل ۱- مراحل پرورش *S.littoralis*: (a) تخم، (b) لاروهای نئونات (لاروهای تازه خارج شده از تخم)، (c) طی کردن ۶ مرحله لاروی، (d) شفیره، (e) حشره بالغ، (f) پیش شفیره

Fig. 1. Rearing stages of *S.littoralis*: (a) egg, (b) neonate (newly-hatched larvae), (c) passing of six-stages of larvae, (d) pupae, (e) adult, (f) prepupae.

ویروس *S. littoralis* NPV (SpliNPV) به صورت جدایه اصلی به میزان ۱ میلی‌لیتر با غلظت $۶/۶۷\times۱۰^{۹}$ OB در میلی‌لیتر از طریق دکتر David Grzywacz از انستیتو منابع طبیعی دانشگاه گرینویچ انگلیس دریافت شد. غلظت‌های مورد نیاز با محلول بافر ساخته شد. ویروس *S. litura* NPV (SpltNPV) به صورت جدایه اصلی به میزان ۵ میلی‌لیتر از طریق دکتر احمد دزیانیان، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شاهرود در اختیار قرار گرفت. به منظور تازه کردن و تکثیر ویروس SpltNPV، ۱۰۰ عدد لاور سن ۳ روی غذای مصنوعی آلوده به ویروس قرار گرفتند (Catena *et al*., 2014). لاورهای آلوده از روز پنجم آلودگی به بعد جمع آوری شدند (Whitlock, 1977) و سپس در محلول بافر Tris-Hcl 50mM (PH 7.03) با هموژنایزر له شده و سوسپانسیون حاوی ذرات ویروس از پارچه دو لایه تنظیف عبور داده و صاف شد. خالص سازی آنها از طریق سانتریفیوژ (Moshtaghi-Maleki, 2003) و کنترل کمی (شمارش تعداد پلی هدر در واحد حجم نمونه) با استفاده از لام هموسیتومتر (عمق ۰/۱۰۰ mm، مساحت ۰/۰۰۲۵ mm2) و میکروسکوپ فاز کنتراست صورت گرفت و در تیوب‌های کوچک دو میلی لیتری در فریزر با دمای ۵۰- درجه سیلسیوس نگهداری شد (Tamez-Guerra *et al*., 2000).

۳- بررسی تفاوت‌های زیستی ویروس‌ها: برای بررسی تفاوت‌های زیستی ویروس‌ها روی مراحل زیستی پروانه برگخوار مصری پنبه، میزان مرگ ومیر، طول دوره لاروی، درصد شفیره شدن، وزن شفیره‌ها و درصد خروج حشرات کامل به روش زیر تعیین و محاسبه شدند. لاروهای ۵ روزه پروانه برگخوار مصری پنبه مربوط به یک دوره تخمریزی انتخاب و برای خنثی شدن محتویات روده‌ای لاروها و اطمینان از خوردن غذای آلوده، به مدت چهار ساعت گرسنه نگه داشته شدند (Arne and Nordin, 1995; Alfazairy *et al*., 2013). غلظت‌های ۶×۱۰^{۲}، ۶×۱۰^{۴} و ۶×۱۰^{۶} OB در میلی‌لیتر با استفاده از محلول بافر Tris-Hcl 50mM از هر سه جدایه ساخته شد. غذای تازه به ابعاد ۱ سانتی متر مکعب برای مصرف هر لارو بریده شد و با ۰/۵ ml از هر غلظت، بطور کامل آلوده شد و برای تیمار شاهد از محلول بافر Tris-Hcl 50mM استفاده شد. غذاهای آلوده به مدت ۵-۳ دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار گرفتند (Sheppard and Stairs, 1977; Jeyarani *et al*., 2007; Masetti *et al*., 2008). تعداد ۳۰ لارو برای هر تیمار در سه تکرار انتخاب شد. لازم به ذکر است که آلوده کردن سطوح غذا از تیمار شاهد شروع و سپس به سمت تیمارهای با غلظت بالاتر ذرات ویروس برای کاهش خطای آزمایش انجام شد (Kalantari *et al*., 2014). لاروهای گرسنه با قلم موی سترون به صورت انفرادی به ظرف های پلاستیکی با قطر دهانه ۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۳ سانتی‌متر روی غذای آلوده منتقل شدند. برای تهویه مناسب درب ظروف سوراخ و با پارچه توری پوشانده شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره روشنایی به تاریکی ۸:۱۶ ساعت نگه داری شدند. بعد از ۴۸ ساعت و اطمینان از تغذیه کامل لاروها از غذای آلوده به ویروس، به ظرف‌های مشابه با غذای سالم و عاری از ویروس منتقل شدند و تا زمان شفیره شدن لاروها، غذای سالم در اختیارشان قرار گرفت. لاروهایی که از غذای آلوده تغذیه نکرده بودند یا به وسیله عواملی غیر از آلودگی ویروسی مرده بودند از شمارش حذف شدند. شمارش تلفات از روز سوم آلودگی تا خروج حشرات کامل بصورت روزانه ادامه یافت. طول دوره لاروی در لاروهایی که از آلودگی ویروسی جان سالم به در برده و شفیره شدند محاسبه شد. درصد شفیره شدن، از شفیره‌های سالم محاسبه و بدست آمد. برای تعیین وزن شفیره‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال Sartorius با حساسیت ۰/۰۰۰۰۱ گرم، شفیره‌ها توزین شدند و اعداد تا دو رقم اعشار بر حسب میلی‌گرم ثبت شدند. درصد خروج حشرات کامل که شکل طبیعی و سالمی داشتند و بطور کامل از پوسته شفیرگی خارج شدند، محاسبه شد. در محاسبه مرگ و میر، علاوه بر لاروهای آلوده، شفیره‌های آلوده و پوک با رنگ‌های تیره و حشرات کامل بی بال و بدشکل جز

تلفات محسوب شدند. مؤثرترین جدایه از ویروس که بیشترین اثر مخرب را روی مراحل مختلف زیستی پروانه برگخوار مصری پنبه داشت، مشخص شد.

۴- تعیین LC_{50} مؤثرترین جدایه ویروس: برای تعیین LC_{50} مؤثرترین جدایه ویروس روی *S. littoralis*، غلظت‌های حداقل و حداکثر با زیست سنجی اولیه محاسبه و با استفاده از فواصل لگاریتمی، غلظت‌های $۱۰^{۲}$، $۲/۸\times۱۰^{۲}$، $۸/۱\times۱۰^{۲}$، $۲/۳\times۱۰^{۳}$، $۶/۶\times۱۰^{۳}$، $۱/۸\times۱۰^{۴}$ و ۶×۱۰^{۴} OB در میلی‌لیتر برای انجام آزمایشات زیست سنجی روی لاروهای ۵ روزه آفت ساخته شد. تعداد ۳۰ لارو برای هر غلظت در سه تکرار انتخاب شد. آزمایش مانند شرایط آزمایش قبلی انجام شد شمارش تلفات از روز سوم آلودگی بصورت روزانه تا زمان شفیره شدن ادامه یافت و مقدار LC_{50} مؤثرترین جدایه محاسبه شد.

۵- تجزیه و تحلیل آماری: آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و درصد تلفات با فرمول: M [%]= [(t-c)/(100-c)]×100، M= درصد مرگ و میر اصلاح شده، t= درصد مرگ و میر مشاهده شده در تیمار، C= درصد مرگ و میر شاهد (Abbott, 1925) اصلاح شد. داده‌های حاصل از آزمایش توسط نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد (SPSS, 1998). درصد مرگ و میر اصلاح شده، طول دوره لاروی، درصد شفیره شدن، وزن شفیره‌ها و درصد خروج حشرات کامل بوسیله آزمون دانکن با P<۰/۰۵ مقایسه شدند.

با استفاده از نرم افزار SAS غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC50) مؤثرترین جدایه ویروس محاسبه شد (Sas Institute, 1999).

نتیجه و بحث

بر اساس نتایج بدست آمده، درصد مرگ و میر در غلظت‌های ۶×۱۰^{۲}، ۶×۱۰^{۴} و ۶×۱۰^{۶} OB در میلی‌لیتر ویروس SpliNPV با هم اختلاف معنی دار نداشتند. درصد مرگ و میر هر سه غلظت ویروس HaNPV اختلاف معنی‌دار داشتند و با افزایش غلظت، میزان مرگ و میر افزایش یافت. در جدایه SpltNPV درصد مرگ و میر بین غلظت ۶×۱۰^{۲} با ۶×۱۰^{۴} OB در میلی‌لیتر و غلظت ۶×۱۰^{۴} با ۶×۱۰^{۶} OB در میلی‌لیتر ویروس اختلاف معنی دار وجود نداشتند ($F(8,18)=11.00$, $P<0.001^*$) (جدول ۱). بنابراین در جدایه SpliNPV می‌توان غلظت‌های پایین‌تر را بکار برد که هم از لحاظ اقتصادی به صرفه‌تر است و هم خطر بروز مقاومت را کاهش می‌دهد. در مقایسه درصد مرگ و میر غلظت‌های ۶×۱۰^{۲}، ۶×۱۰^{۴} و ۶×۱۰^{۶} OB در میلی لیتر ویروس SpliNPV با غلظت‌های مشابه ویروس‌های HaNPV و SpltNPV اختلاف معنی دار وجود داشت (شکل ۲). بر این اساس می‌توان بیشترین درصد مرگ و میر در *S. littoralis* توسط SpliNPV اعلام کرد که مطابق با نتایج به دست آمده توسط برخی از محققین دیگر بود (Maeda *et al*., 1990; Jones *et al*., 1994; Toprak *et al*., 2006, 2007; Masetti *et al*., 2008). میزان مرگ و میر لاروهای نئونات *S. littoralis* توسط SpliNPV، ۲۰/۱۱ درصد محاسبه شد (El-Helaly and El-bendary, 2013). اثر ویروس HaNPV روی درصد مرگ و میر *P. xylostella* بررسی و مشاهده شد که با افزایش دز مصرفی، درصد مرگ و میر افزایش یافت (Magholli *et al*., 2013). به علاوه Kalantari *et al*. (2013) اثر HaNPV روی *H. armigera* بررسی کردند و به نتایج مشابهی رسیدند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. بیشترین طول دوره لاروی با ۱۹/۷ روز مربوط به غلظت ۶×۱۰^{۴} OB در میلی لیتر ویروس HaNPV بود که با بقیه تیمارها اختلاف معنی دار داشت ($F_{(7,16)}=14.00$, $P<0.001^*$) (جدول ۱). طول دوره لاروی در همه تیمارها به جز غلظت‌های ۶×۱۰^{۲} OB در میلی‌لیتر هر سه جدایه ویروس با شاهد اختلاف معنی دار داشتند (شکل ۳). به علاوه Magholli *et al*. (2014) در بررسی اثر HaNPV روی بیدکلم *P. xylostella*، بیان کردند طول دوره لاروی در تیمارهای ویروس بیشتر از شاهد بود اما تفاوت معنی داری نداشت و در واقع اثرات دزهای زیرکشندگی سبب طولانی شدن دوره لاروی شد. اثر HaNPV روی طول

دوره لاروی کرم قوزه پنبه توسط Kalantari *et al*. (2013) بررسی شد و نشان دادند که دوری لاروی در لاروهای آلوده طولانی‌تر است. مطالعات Marzban *et al*. (2009) روی اثر HaCPV نشان داد که طول دوره لاروی و شفیرگی *H. armigera* در تیمارهای ویروس از شاهد بیشتر بود و با افزایش دز ویروس، طول دوره لاروی بیشتر و در کل سیکل زندگی حشره طولانی‌تر بود. نتایج حاصل از مطالعات Shaurub *et al*. (2014) روی طول دوره لاروی *S. littoralis* در تیمار ویروس SpliMNPV، ۲ روز طولانی‌تر از شاهد بود. در یک بررسی، Hatem *et al*. (2011) بیان کردند که طول دوره رشد لارو و شفیره *S. littoralis* تحت تأثیر ویروس Granulovirus *S. littoralis* قرار نمی‌گیرد، احتمالاً باکولوویروس‌های متفاوت اثر متفاوتی روی طول دوره لاروی و شفیرگی آفت مورد نظر دارند. ویروس HaNPV روی *H. armigera* باعث طولانی شدن طول دوره لاروی نسبت به شاهد شد که با افزایش دز ویروس دوره لاروی طولانی‌تر شد (Kumar *et al*., 2008). نتایج حاصل از آزمایشات ما با نتایج این مطالعات مطابقت دارد. کمترین درصد شفیره شدن (۱۰ درصد) در غلظت ۶×۱۰^{۴} OB در میلی لیتر ویروس SpliNPV و بیشترین درصد شفیره شدن بعد از تیمار شاهد (۱۰۰ درصد)، مربوط به غلظت ۶×۱۰^{۲} OB در میلی لیتر ویروس HaNPV (۷۰ درصد) بود ($F_{(7,16)}$=34.00, P<0.001*) (جدول ۱). تفاوت بقیه تیمارها روی درصد شفیره شدن معنی دار نبود (شکل ۴). ویروس SpliNPV در غلظت ۶×۱۰^{۴} OB در میلی لیتر کمترین وزن شفیرگی با ۱۳/۸ میلی‌گرم را داشت که با بقیه تیمارها به جز غلظت ۶×۱۰^{۲} OB در میلی‌لیتر ویروس SpliNPV اختلاف معنی دار داشت ($F_{(7,16)}$=2.05, P<0.001*) (جدول ۱). به طور کلی ویروس SpliNPV باعث کاهش وزن شفیرگی می‌شود که در نتیجه تغذیه کمتر در مرحله لاروی است (شکل ۵). درصد شفیره شدن و وزن شفیره های *P. xylostella* در تیمارهای ویروس HaNPV از شاهد کمتر بود و با افزایش دز مصرفی، این میزان کمتر شد (Magholli *et al*., 2013). در معرض قرار گرفتن برگخوار مصری در برابر باکولوویروس‌ها اثر منفی روی رشد و نمو آن می‌گذارد، و سبب کاهش درصد شفیرگی و وزن شفیره‌ها و افزایش دوره رشد خصوصاً روی لاروهای سنین پایین می‌شود. Shaurub *et al*. (2014) و Nathan *et al*. (2005) روی *S. littoralis* و Marzban *et al*. (2009) و Kalantari *et al*. (2013) روی *H. armigera* به نتایج مشابهی رسیده‌اند. کمترین درصد خروج حشرات کامل (۶/۷ درصد) مربوط به جدایه SpliNPV در غلظت ۶×۱۰^{۴} OB در میلی‌لیتر بود که با بقیه تیمارها به جز غلظت ۶×۱۰^{۲} OB در میلی‌لیتر ویروس SpliNPV و غلظت ۶×۱۰^{۶} OB در میلی‌لیتر ویروس SpltNPV اختلاف معنی دار نداشت ($F_{(7,16)}$= 23.00, P<0.001*) (جدول ۱). بین درصد خروج حشرات کامل در غلظت‌های ۶×۱۰^{۲} OB در میلی‌لیتر ویروس SpliNPV و ۶×۱۰^{۴} OB در میلی‌لیتر ویروس HaNPV و ۶×۱۰^{۶} OB در میلی‌لیتر ویروس SpltNPV اختلاف معنی‌دار وجود نداشت و با توجه به دز مصرفی می‌توان ترتیب جدایه‌ها را از نظر تأثیر روی کاهش درصد خروج حشرات کامل، SpliNPV> HaNPV> SpltNPV بیان کرد (شکل ۶). درصد شفیره شدن، وزن شفیره‌ها و درصد خروج حشره کامل در ویروس SpliNPV نسبت به دو ویروس دیگر کمتر و درصد مرگ و میر لاروی بیشتر است، بنابراین مؤثرترین ویروس روی این آفت، SpliNPV می‌باشد.

غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) جدایه SpliNPV به عنوان مؤثرترین جدایه روی لاروهای ۵ روزه *S. littoralis*، ۷×۱۰^{۲} OB در میلی‌لیتر بدست آمد (جدول ۲). همچنین Hatem *et al*. (2012) میزان LC_{50} ویروس SpliNPV روی لاروهای *S. littoralis* را $۵/۲\times۱۰^{۴}$ PIB در میلی‌لیتر گزارش کردند و Trang and Chaudhari (2002) غلظت کشنده ۵۰ درصد ویروس NPV برای لاورهای پنج روزه *S.littoralis* را $۳/۹\times۱۰^{۶}$ PIB در میلی لیتر بیان کردند. مقدار غلظت کشنده ۵۰ درصد ویروس SpltNPV علیه *S. litura* روی پنبه ۰/۶۱ OB در میلی متر مربع گزارش شد (Ravishankar and Venkatesha,

2010). میزان LC_{50} ویروس SpliMNPV روی لاروهای سن چهارم *S. littoralis*، $۸/۴۳\times۱۰^{۹}$ PIB در میلی‌لیتر محاسبه شد (Shaurub *et al*., 2014). LC_{50} ویروس SpliNPV روی لاروهای سن دوم *S. littoralis*، $۱/۲\times۱۰^{۳}$ PIB در میلی‌لیتر گزارش شد. Sutanto *et al*. (2014) بیان کردند که با افزایش سن لاروی حساسیت لارو به ویروس کاهش می‌یابد و بالاترین غلظت ویروس باعث بالاترین مرگ و میر می‌شود و میزان LC_{95} در لاروهای سن دوم *S. littoralis*، $۲/۳۲\times۱۰^{۶}$ PIB در میلی‌لیتر محاسبه کردند. Hatem *et al*. (2011) میزان LD_{50} برای ویروس SpliGV روی لاروهای سن سوم *S. littoralis*، $۶/۸۶\times۱۰^{۵}$ OB در لارو گزارش کردند. اثر جدایه مصری GV روی لارو سن دوم *S. littoralis* بررسی و مقدار غلظت کشنده ۵۰ درصد برابر با $۳/۴۸\times۱۰^{۷}$ OB در میلی‌لیتر محاسبه شد (Khamiss *et al*., 1998) که با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق، ویروس NPV نسبت به GV در کنترل *S. littoralis* مؤثرتر است و تفاوت در میزان LC_{50} به دلیل اختلاف در سن لاروی و نوع ویروس است.

جدول ۱- تلفات و رشد و نمو برگ خوار مصری *S. littoralis* در معرض نوکلئوپلی هیدرو ویروس SpliNPV، HaNPV و SpltNPV*

Table 1. Mortality, growth and development of *Spodoptera littoralis* larvae when exposed SpliNPV, HaNPV, SpltNPV nucleopolyhedroviruses

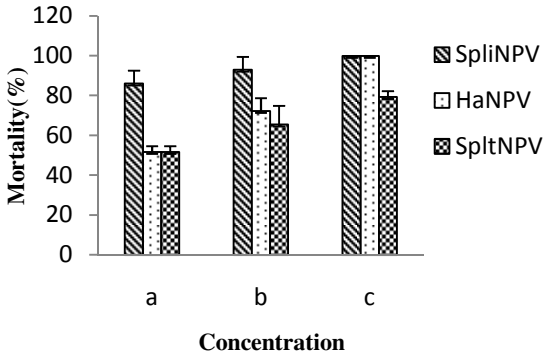
Virus	Concentration ($OBmL^{-1}$)	Mortality (%)**	Larval period (day)	Pupation rate (%)	Pupal weight (mg)	Adult emergence (%)
SpliNPV	6×10^{2}	86.2 ± 6.36 abc	16.33 ±4.13 bc	43.33± 6.36 c	18.27± 1.16 ab	13.33±6.36 de
	6×10^{4}	93.1± 6.36 ab	16.67± 4.18 b	10±5.78 d	13.83± 6.94 b	6.67± 6.36 e
	6×10^{6}	100 a	-	-	-	-
HaNPV	6×10^{2}	51.73± 2.89 e	16.33± 4.22 bc	70 b	22.17 a	46.67± 2.89 b
	6×10^{4}	72.4 ±6.36 cd	19.67±4.29 a	40± 5.78 c	24± 0.62 a	26.67± 6.36cd
	6×10^{6}	100 a	-	-	-	-
SpltNPV	6×10^{2}	51.73± 2.89 e	16.33 ±10.4 bc	50 c	22.17 a	46.67± 2.89 b
	6×10^{4}	65.53± 2.89 de	16.67± 4.20 b	36.66± 6.36 c	24 a	33.33± 2.89 bc
	6×10^{6}	79.33± 9.83 bcd	16.67± 4.35 b	36.66± 2.89 c	22.78± 0.58 a	20± 9.83 cde
Control	0	-	15.33±5.04 c	100 a	32.56± 1.16 a	96.67±2.89 a
DF		8	7	7	7	7
F		11.00	14.00	34.00	2.05	23.00
P		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

* داده‌های جدول به‌صورت میانگین (±SE) می‌باشند و میانگین‌هایی که دارای حروف یکسان درون هر ستون هستند با هم اختلاف معنی‌داری ندارند (آزمون دانکن، P<۰/۰۵).

**شفیره‌هایی که در مرحله شفیرگی از بین رفتند نیز در میزان مرگ و میر منظور شد و درصد تلفات توسط فرمول Abbot اصلاح شد.

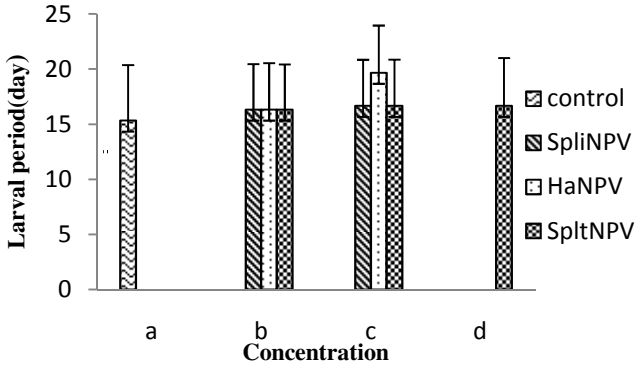
*The data in the table are means (±SE). Means within the same column followed by a different letter are significant at p <0.05, Duncan test.

**Died out pupae were included in the mortality rate and precentage of mortality was corrected by Abbot's formula.



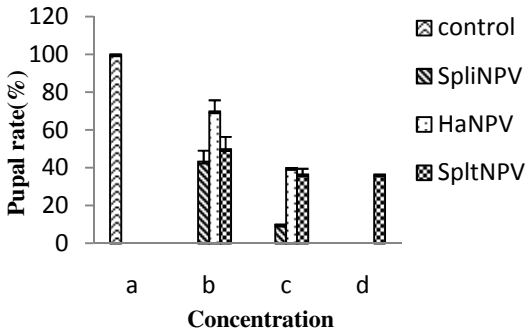
شکل ۲- درصد مرگ و میر لاروهای ۵ روزه *S. littoralis* در سه غلظت (۶×۱۰^{۲}، b:۶×۱۰^{۴}، c: ۶×۱۰^{۶} OB a: در میلی‌لیتر)
از ویروس‌های SpliNPV، HaNPV و SpltNPV

Fig. 2. Mortality (%) of the 5-day-old larvae of *S. littoralis* caused by three concentrations
(a: 6× 10 2, b: 6 ×10 4, c: 6× 10 6 OBmL-1) of SpliNPV, HaNPV and SpltNPV



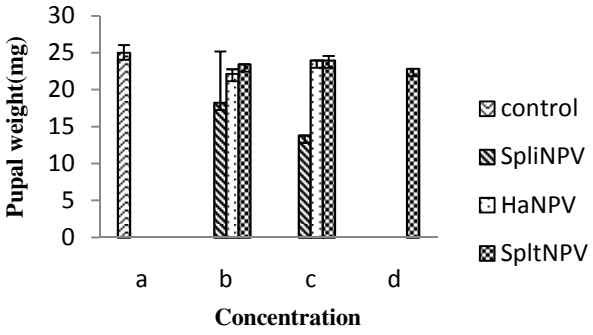
شکل ۳- اثر سه غلظت (۶×۱۰۶ :d، ۶×۱۰۴ :c، ۶×۱۰۲ :b و شاهد :a OB در میلی‌لیتر) ویروس‌های
SpliNPV، HaNPV، SpltNPV بر طول دوره لاروی *S. littoralis*

Fig. 3. Effect of three concentrations (a: control, b: 6×10 2, c: 6×10 4, d: 6×10 6 OBmL-1)
of SpliNPV, HaNPV, SpltNPV on larval period (day) of *S. littoralis*



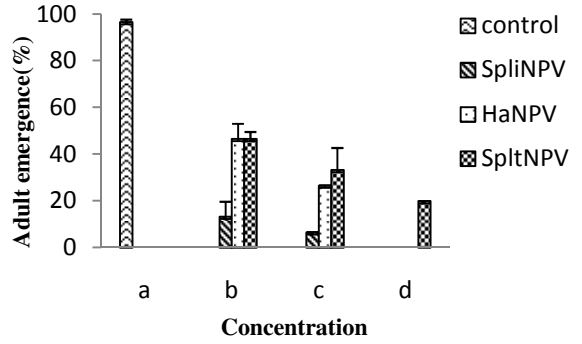
شکل ۴- اثر سه غلظت (۶×۱۰۶ :d، ۶×۱۰۴ :c، ۶×۱۰۲ :b، شاهد :a OB در میلی‌لیتر)
ویروس‌های SpliNPV، HaNPV و SpltNPV روی درصد شفیره شدن *S. littoralis*

Fig. 4. Effect of three concentrations (a: control, b: 6×10 2, c: 6×10 4, d: 6×10 6 OBmL-1)
of SpliNPV, HaNPV and SpltNPV on pupal rate (%) of *S. littoralis*



شکل ۵- اثر سه غلظت (۶×۱۰۶ d: ،۶×۱۰۴ c: ،۶×۱۰۲ b: ،شاهد a: OB در میلی‌لیتر)
از ویروس های SpliNPV، HaNPV، SpltNPV روی وزن شفیرگی *S. littoralis*

Fig. 5. Effect of three concentrations (a: control, b: 6×102 , c: 6×104 , d: 6×106 OBmL-1)
of SpliNPV, HaNPV, SpltNPV on pupal weight (mg) of *S. littoralis*



شکل ۶- اثر سه غلظت (۶×۱۰۶ d: ،۶×۱۰۴ c: ،۶×۱۰۲ b: ،شاهد a: OB در میلی‌لیتر
) از ویروس‌های SpliNPV، HaNPV و SpltNPV روی درصد خروج حشرات کامل *S. littoralis*

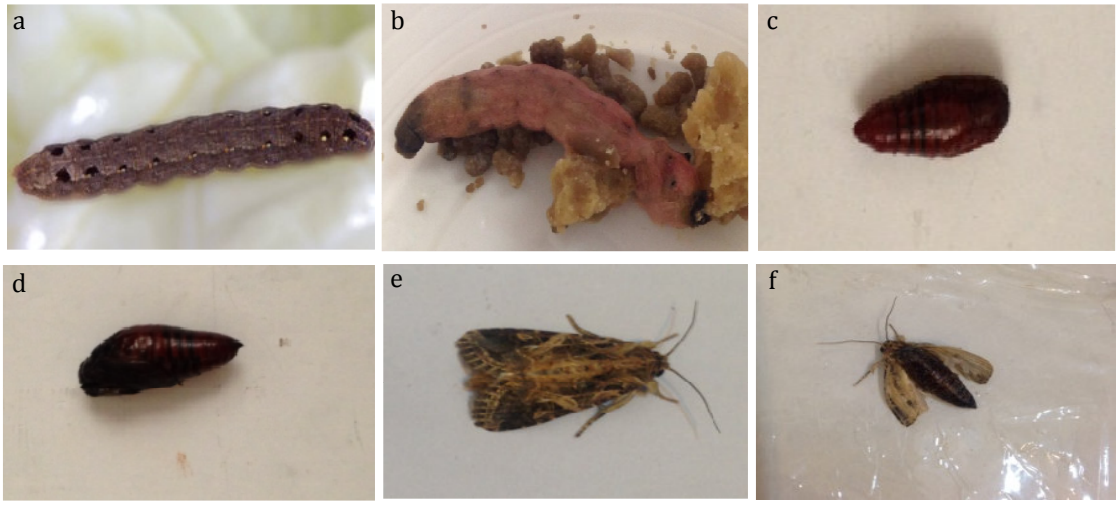
Fig. 6. Effect of three concentrations (a: control , b: 6×102 , c: 6×104 , d: 6×106 OBmL-1)
of SpliNPV, HaNPV, SpltNPV on adult emergence (%) of *S. littoralis*

جدول ۲- زیست سنجی جدایه SpliNPV روی لاروهای ۵ روزه پروانه برگخوار مصری پنبه

Table 2. Bioassay results of SpliNPV isolate on the 5-day-old larvae of Egyptian cotton leaf worm

Isolate	$LC_{50}(OBmL^{-1})$	Confidence Interval (%95)		Slope	Intercept	□2	Df	Pr> chisq
		Low limit	Up limit					
SpliNPV	7×10^{2}	3.6×10^{2}	1.2×10^{3}	0.59	-1.71	1.55	5	0.9069

علایم اثرات ویروس‌های SpltNPV و SpliNPV روی لارو، شفیره و حشره کامل *S. littoralis*: لارو آلوده (b) نسبت به لارو سالم (a)، متورم و آبکی و از بدن لارو مایعی خارج شد. بد شکلی و پوک شدن شفیره در غلظت ۶×۱۰^{۶} OB در میلی‌لیتر ویروس SpltNPV دیده شد (d). بیشتر شفیره‌ها در غلظت‌های ۶×۱۰^{۲} و ۶×۱۰^{۴} ویروس SpliNPV نسبت به شفیره‌های سالم (c) دارای رنگ تیرتر بود که در نهایت حشره بالغ سالم (h) از آنها خارج نشد (e) و همچنین در ویروس SpliNPV در غلظت ۶×۱۰^{۲} OB در میلی‌لیتر و ویروس SpltNPV در غلظت ۶×۱۰^{۶} OB در میلی‌لیتر تعدادی بدشکلی شفیره (f) و پیش شفیره (g) دیده شد. در ویروس SpliNPV در مواردی حشره بالغ داخل پوسته شفیرگی باقی ماند (i) و در مواردی بدشکلی حشره بالغ (j) دیده شد (شکل ۷).



شکل ۷- اثرات ویروس‌ها روی پروانه برگخوار مصری پنبه: (a) لارو، (b) لارو آلوده، (c) شفیره، (d) شفیره بدشکل، (e) حشره بالغ سالم، (f) حشره بالغ بدشکل، حاصل از لاروهای آلوده به ویروس SpltNPV و SpliNPV

Fig. 7. Effects of Viruses on *S.littoralis*: (a) healthy larvae, (b) infected larvae, (c) pupae, (d) deformed pupae, (e) healthy moth, (f) deformed moth, resulting from SpltNPV and SpliNPV-infected larvae

علایم بیماری در لاروهای آلوده: بدن لاروها متورم رنگ پریده و مایعی از آن خارج می‌شود، آلودگی باعث می‌شود میزبان به حالت ذوب شدن به نظر برسد (Aizawa,1963; Tanada and Kaya, 1993; Federici, 1997). لاروهای آلوده معمولاً تا قبل از شفیره شدن می‌میرند ولی گاهی آلودگی از مراحل آخر لاروی به بعضی از شفیره‌ها منتقل می‌شود، اما درصد مرگ و میر کمتر است. حشرات بالغی که جان سالم به در برده‌اند، ممکن ویروس را به درصد کمی از لاروهای نسل بعد منتقل کنند (Young, 1990). لاروهای آلوده به ویروس به رنگ سفید شیری و شکننده درآمده و روده میانی بیش از حد رشد کرده و متورم شده و لاروها تنبل شده و حرکت کمی دارند (Marzban *et al*., 2013). از بدن لاروهای آلوده به ویروس SpliNPV مایعی صورتی رنگ خارج شد، پیش شفیره‌های آلوده سیاه رنگ و به حالت خشکیده بودند. شفیره‌های آلوده دارای رنگ تیره‌تر از شفیره‌های سالم و بعضی از شفیره‌های آلوده آبکی بودند. حشرات بالغ بدشکل هم دیده شد ولی در ویروس‌های HaNPV و SpltNPV آلودگی بیشتر در مراحل اولیه لاروی و لاروهای آلوده به حالت آبکی بودند و درصد کمی از آلودگی به مراحل بعدی منتقل شد.

در این مطالعه اثرات تضعیف کننده دزهـای زیرکشـندگی باکولوویروس‌ها روی مراحل زیستی برگخوار مصری بخـوبی بررسی شده است. اثرات زیر کشندگی ممکن است بـه علـت هدر رفتن انرژی میزبان برای مهار ویـروس یـا بهبـودی از آن اتفاق افتـاده باشـد (Wiygul and Sikorowski, 1978; Marzban, 2012). اگر چه لاروهـا در زمـان آزمـون از غـذای مصـنوعی تغذیه اجباری شدند، اما مشاهده شد که لاروهای شـاهد همـه غذای خود را خورده بودند ولی در تیمارهای ویروس لاروهـا با توجه به غلظت ویروس کمتـر از دو سـوم غـذا را مصـرف کرده بودند.

زمان رشد و نمو موضوع مهمی در بیولوژی یـک حشـره است. طولانی شدن رشد و نمـو در هـر مرحلـه‌ای از زنـدگی یک حشره آفت به معنی بیشتر در معـرض دشـمنان طبیعـی و سایر عوامـل طبیعـی قـرار گـرفتن اسـت، کـه سـبب کـاهش جمعیت حشره آفت می‌شود، علاوه بر این طولانی شدن زمان یک نسل سبب کاهش نسل‌های آفت در یـک فصـل یـا سـال می‌شود. علائم ویروسی در لاروهای آلوده به HaNPV در زمان کوتاه‌تـری ظـاهر شـد و مـرگ و میـر لاروی در طـی مـدت کوتـاه‌تـری صـورت گرفـت ولـی علائـم SpliNPV در زمـان طولانی‌تری ظاهر شـد و چـون لاروهـای سـنین بـالاتر آفـت هم‌خواری دیده می‌شود، احتمال انتقـال ویـروس از لاروهـای زنده آلوده که در دوره نهفتگی به سر می‌برند به لاروهای سالم وجود دارد

طبق این تحقیق، درصد مرگ و میـری لاروی *S. littoralis* توسط ویروس SpliNPV نسبت به دو ویروس دیگر بالاتر بود و اکثر لاروهایی که از مرحله لاروی جان سالم به در بردند در مرحله شفیرگی به شفیره هایی با وزن کم‌تر و در مـواردی بـه شفیره‌هایی با رنگ تیره‌تر تبدیل شدند کـه در نهایـت حشـره بالغ از آنها خارج نشد و در مواردی حشره بالغ داخـل پوسـته شفیرگی باقی ماند یا دچار بدشکلی شـدند و در نهایـت تنهـا درصد کمی حشره بالغ سالم از شفیره‌ها خارج شدند. احتمـالاً به دلیل اینکه این ویروس اختصاصی این حشره می‌باشد.

References

ABBOTT, W. S. 1925. A method for computing the effective- ness of an insecticide, Journal of Economic Entomology, 18: 265-267.

ABD EL MAGEED, A. E. M. and S. M. SHALABY, 2011. Toxicity and biochemical impacts of some new insecticide mixtures on cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.), Plant Protection Science, 47: 166-175.

AHMAD, T. R. 1988. Field studies on sex pheromone trapping of cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae), Journal of Applied Entomology, 105: 212-215.

AIZAWA, K. 1963. The nature of infections caused by nuclear polyhedrosis viruses. In "Insect Pathology: An Advanced Treatise" (E. A. Steinhaus, ed.), Vol. 1, pp. 381-412. Academic Press, New York.

ALFAZAIRY, A. A., A. M. D. EL-AHWANY, E. A. MOHAMED, H. A. H. ZAGHLOUL and E. R. EL-HELOW, 2013. Microbial control of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) by Egyption *Bacillus thuringiensis* isolates, Folia Microbialogica, 58: 155-162.

ARNE, C. N. and G. L. NORDIN, 1995. Enhancement of indinces of viral infection by simultaneously administering *Helicoverpa zea* and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis viruses to larval *Helicoverpa zea* (Boddie), Journal of Invertebrate Pathology, 66: 18-24.

ARRIZUBIETA, M., T. WILLIAM, P. CABALLERO and O. SIMON, 2014. Selection of a nucleopolygedrovirus isolate from *Helicoverpa armigera* as the basis for a biological insecticide, Pest Management Science, 70(6): 967-976.

BONSALL, M. B. 2004. Impact of diseases and pathogens on insect population dynamics, Physiological Entomology, 29: 223-236.

BROWN, E. S. and C. F. DEWHURST, 1975. The genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) in África and the Near East, Bulletin Research, 65: 221-262.

CARTER, D. 1984. Pest Lepidoptera of Europe with special reference to the British Isles. Junk Pulisher, Dordrehct, The Nertherlands.

CATENA, A. B., A. S. MIRÓN, F. G. CAMACHO, A. C. GÓMEZ and E. M. GRIMA, 2014. Baculovirus biopesticides: An overview, The Journal of Animal and Plant Sciences, 24: 362-373.

CHAEYCHOMSRI, S. 2015. Characterization of the *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus during serial passage in cell culture, Journal of Advanced Agricultural Technologies, 2(1): 63-70.

CROSS, J. V., D. WINSTANELY, N. S. NAISH, HEITON, G. KEANE, R. VAN WEZEL and D. GAKEK, 2005. Semiochemical driven auto-dissemination of *Cydia pomonella* and *Adoxophyes orana* baculoviruses, IOBC Bull, 28: 319-324.

DUNCAN, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests, Biometrics, 11: l-42.

EL-GUIDNY, M. A., S. M. MADI, M. E. KEDDIS, Y. H. ISSA and M. M. ABDEL-SATTAR, 1982. Development of resistance to pyrethroids in field populations of the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisd.), International Pest Control, 124: 6–16.

EL-HELALY, A. A. and H. M. EL-BENDARY, 2013. Impact of Spinosad and Nucleopolyhedro virus Alone and in Combination against the Cotton Leafworm Spodoptera littoralis under labratory, Applied Science Reports, 2(1): 17-21.

EL-ZEMAITY, M. S., W. M. EL-DEEB, Y. A. OSMAN and A. I. HUSSIEN, 2003. Develoment of resistance of *Spodoptera littoralis* to certain bioinsecticides, Journal of inveronmental Sciences, 6: 793-810.

ERAYYA, J. JAGDISH, P. K. SAJEESH and V. UPADHYAY, 2013. Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV), A Potential Biopesticide: A Review. Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences, 1(8): 30-33.

FAHIMI, A., A. KHARAZI PAKDEL, R. TALAEI HASSANLOUI, M. R. REZAPANAH and F. MALEKI, 2008. Evaluation of the effect of MbNPV on cabbage moth, *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae), in laboratory conditions, Journal of the Entomological Society of Iran, 28 (1): 63-74.

FEDERICI, B. A. 1997. Baculovirus Pathogenesis. University of California at Riverside, Department of Entomology and Interdepartmental Graduate Program in Genetics, Riverside California.

GIFANI, A., R. MARZBAN, A. SEIFKORDI, M. ARDJMAND and A. DEZIANIAN, 2015. Ultraviolet protection of nucleopolyhedrovirus through microencapsulation with different polymers, Biocontrol Science and Techology, 25(7): 814-827.

GRZYWACZ, D., A. RICHARDS, R. J. RABINDRA, H. SAXENA and O. P. RUPELA, 2005. Efficacy of biopesticides and natural plant products for Heliothis/Helicoverpa control. In:Sharma, H.C. (Ed.), *Heliothis*/*Helicoverpa* Management - Emerging Trends and Strategies for Future Research. Oxford and IBH Pub. Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India, pp.371-389.

HARRISON, R. and K. HOOVER, 2012. Baculoviruses and other occluded insect viruses. In: Vega, F., Kaya, H. (Eds.), Insect Pathology Elsevier, Amsterdam, pp. 73-131.

HATEM, A. E., S. S. M. ABDEL-SAMAD, H. A. SALEH, M. H. A. SOLIMAN and A. I. HUSSIEN, 2009a. Toxicologycal and physiological activity of plant extracts againts *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae, Boletín de Sanidad Vegetal Plangas, 35: 517-531.

HATEM, A. E., H. B. HOMAM, R. A. M. AMER, S. S. M. ABDEL-SAMAD, H. A. SALEH and A. I. HUSSIEN, 2009b. Synergistic activity of several acids in binary mixtures with synergistic insecticides on *Spodoptra littoralis* (Boisduval), Boletín de Sanidad Vegetal Plangas, 35: 533-542.

HATEM, A. E., H. K. ALDEBIS and E. V. OSUNA, 2011. Effects of *Spodoptera littoralis granulovirus* on the development and reproduction of cotton leafworm, *S.littoralis*, Biological Control, 59: 192-199.

HATEM, A. E., A. M. AMER. REDA and E. VARGAS-OSUNA, 2012. Combination effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin and nucleopolyhedrovirus or granulovirus of *Spodoptera littoralis* on cotton

leafworm, Eyptian Journal of Biological Pest Control, 22(2): 115-120.

HUNTER-FUJITA, F., P. F. ENTWISTLE, H. F. EVANS, and N. E. CROOK, 1998. Insect Viruses and Pest Management, Chichester: John Wiley & Sons Ltd. West Sussex. UK. 620 pp.

JAYARAJ, S. and R. J. RABINDRA, 1990. Microbial control and integrated pest management. Proceedings of Indo USSR Joint Workshop on Problems and Potentials of Biocontrol of Pests and Diseases, Bangalore, pp. 263-387.

JEYARANI, S., R. J. RABINDRA, N. SATHIAH, P. KARUPPACHAMY and S. SUBRAMANIAN, 2007. Efficacy of spiracular infection of *Helicoverpa armigera* with its nucleopolyhedrovirus and its role in virus production, Journal of Virological Methods, 142: 213-217.

JONES, K. A., N. S. IRVING, G. MOAWAD, D. GRZYWACZ, A. HAMID and A. FARGHALY, 1994. Field trials with NPV to control *Spodoptera littoralis* on cotton in Egypt, Crop Protection. 13: 337-340.

KALANTARI, M., R. MARZBAN, S. IMANI and H. ASKARI, 2013. Effect of *Bacillus thuringiensis* isolate and single nuclear polyhedrosis virus in combination and alone on *Helicoverpa armigera*, Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(1): 42-50.

KALANTARI, M., R. MARZBAN, Z. MAGOLLIFARD, and H. ABBASIPOUR, 2014. Study of virulence and molecular characteristics of some *Bacillus thuringiensis* isolates on cotton bollworm and diamondback moth, Biocontrol in Plant Protection, 1(2): 17-26.

KHAMISS, O., J. GIANNOTTI, G. FEDIERE, X. LERY, and A. NOUR-EL-DIN, 1998. Characterization of two Egyptian isolates of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) Granulovirus from natural infestation in Egypt. In: Proceeding of the First Regional Symposium for Applied Biological control in Mediterranean Countries", Cairo, Egypt, October 25-29, 1998 (M.Canard, and V.Beyssat-Arnaouty, Eds.), pp.17-21.Toulouse, France.

KHODAVERDI, H., A. SAHRAGARD, M. AMIR MOAFI, and J. MOHAGHEGH NEYSHABOURI, 2010. A Study on the demographic parameters of Egyptian Cotton Leafworm *Spodoptera littoralis* (B.) (Lep.: Noctuidae) fed on artificial diet and under laboratory conditions, Iranian Journal of Plant Protection Science,1(49): 61-69.

KUMAR, S. N., K. MURUGAN and W. ZHANG, 2008. Additive interaction of *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus and Azadirachtin, Biological Control, 53:869-880.

LACEY, L. A., D. GRZYWACZ, D. I. SHAPIRO-ILAN, R. FRUTOS, M. BROWNBRIDGE and M. S. GOETTEL, 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future, Journal of Invertebrate pathology, 132: 1-41.

MAEDA, S., Y. MUKOHARA and A. KONDO, 1990. Characteristically distinct isolates of the nuclear polyhedrosis virus from *Spodoptera litura*, Journal of General Virology, 71: 2631-2639.

MAGHOLLI, Z., R. MARZBAN, H. ABBASIPOUR, A. SHIKHI, and J. KARIMI, 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.

MAGHOLLI, Z., H. ABBASIPOUR and R. MARZBAN, 2014. Effect of Helicoverpa armigera Nucleopolyhedrosis Virus (HaNPV) on the larvae of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), Plant Protection Science, 4: 184-189.

MARZBAN, R., Q. HE, X. LIU and Q. ZHANG, 2009. Effect of Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac and cytoplasmic polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (HaCPV) on cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae), Journal of Invertebrate Pathology, 101: 71-76.

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 Entomological Research Society, 14: 45-53.

MARZBAN, R., Q. HE, Q. W. ZHANG and X. X. LIU, 2013. Histopathology of Cotton bollworm midgut infected with *Helicoverpa armigera* Cytoplasmic polyhedrosis virus, Brazilian Journal of Microbiology, 44(4): 1231-1236.

MASETTI, A., V. DELUIGI and G. BURGIO, 2008. Effect of nucleopolyhedrovirus based product on *Spodoptera littoralis*, Bulletin of Insectology, 61(2): 299-302.

MCKINLEY, D. J., G. MOAWAD, K. A. JONES, D. GRZYWACZ and C. R. TURNER, 1989. The development of nuclear polyhedrosis virus for the control of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) in cotton. In: Green, M. B., Lyon, D.J. de B. (Eds.), Pest Management in Cotton. Ellis Horwood, Chichester, UK, pp. 93–100.

MILLES, M. and M. LYSANDROU, 2002. Evidence for negative cross resistance to insecticides in field collected *Spodoptera littoralis* (Boisd.) from Lebanon in laboratory bioassays. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent, 67: 665-669.

MOSCARDI, F. 1999. Assessment of the application of baculovirus of Lepidoptera, Annual Review of Entomology, 44: 257-289.

MOSHTAGHI- MALEKI, F. 2003. The effect of temperature on virulence of *Helicoverpa armigera* multiple nucleopolyhedrovirus in laboratory. M. Sc. Thesis, University of Guilan. P:104. (Persian with English abstract).

MOUSSA, M. A., M. A. ZAHER and F. KOTBY, 1960. Abundance of cotton leafworm,*Prodenia litura* (F) , in relation to host plantes. I. Host plants and their effect on biology (Lepidoptera: Agrotidae. Zenobiinae), Bulletin of the Entomological Society of Egypt, 44: 241-245.

MUTHUSWAMI, M., R. J. RABINDRA and S. JAYARAJ, 1993. Use of baculovirus mixture for the control of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* on Groundnut, Journal of Biological Control, 7: 105-108.

NATHAN, S. S., K. KALAIVANI and P. G. CHUNG, 2005. The effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus on midgut enzymatic profile of *Spodoptera littoralis* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae), Pesticide Biochemistry and Physiology, 83: 46-57.

NAVON, A. 1985. *Spodoptera littoralis*. PP. 469-475. In Singh, P. and Moore, R. F. (eds.) Handbook of Insect Rearing. Elsivire. Amesterdam.

PINEDA, S., M. I. SCHENEIDER, G. SMAGGHE, A. M. MARTINEZ, P. DELESTAL, E. VINUELA, J. VALLE and F. BUDIA, 2007. Lethal and sublethal effects of Methoxyfenozide and Spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), Journal of Economic Entomology, 100: 773-7800.

RABIE, M. M., A. A. SERAJ, R. TALAEI HASSANLOUI, and H. RAHIMI, 2011. A laboratory investigation on the Effect of MbNPV and Indoxacarb Against the Beet Armyworm, Spodoptera Exigua (Lep., Noctuidae) larvae, Plant Protection (Scientific Journal Of Agriculture), 34(1): 81-89.

RAVISHANKAR, B. S. and M. G. VENKATESHA, 2010. Effectiveness of SlNPV of *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants, Journal of Biopesticides, 3(1): 168-171.

REZAPANAH, M. R., A. KHARAZI PAKDEL, K. KAMALI and J. HUBER, 2002. Survey on Natural Occurrence of Cydia pomonella Granulovirus in Apple Orchards of Iran, Applied Entomology and Phytopathology, 69(2): 49-55.

ROWELY, D. L., H. J. R. POPHAM and R. L. HARRISON, 2011. Genetic variation and virulence of nucleopolyhedroviruses isolated worldwide from the heliothine pests *Helicoverpa armigera*. *Helicoverpa zea*, and *Heliothis virescens*, Journal of Invertebrate Pathology, 107:112-126.

SANNINO, L., A. BALBANI, P. LOMBARDI and M. AVIGLIANO, 1996. *Spodoptera littoralis*: un insidioso parassuta delle colture erbacee. L'Informatore Agrario, 52: 76-79.

SANNINO, L. 2003. *Spodoptera littoralis* in Italia: possibili ragioni della crescente diffusione e mezzi di lotta, Informatore Fitopatologico, 53(6): 28-31.

SAS INSTITUTE. 1999. SAS Online Doc®. Version 8. Cary, NC.

SHAURUB, E. H., A. A. EL-MEGUID and N. M. EL-AZIZ,

2014. Effect of individual and combined treatment with Azadirachtin and *Spodoptera littoralis* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus (SpliMNPV, Baculoviridae) on the Egyptian Cotton Leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), Ecologia Balkanica, 6(2): 93-100.

SHEPPARD, R. F. and G. R. STAIRS, 1977. Dosage–Mortality and Time – Mortality studies of a granulosis virus in a laboratory strain of the codling moth, *Laspeyresia pomonella*, Journal of Inverteberate Pathology, 29: 216-221.

SPSS. 1998. SPSS User's Guide. SPSS, Inc., Chicago.

SUTANTO, K. D., S. EL-SALAMOUNY and A. S. AL-DAWOOD, 2014. Affectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus (SpliNPV) against first and second instar larvae of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae), African Journal of Microbiology Research, 8(4): 337-340.

SZEWCYK, B., L. HOYOS-CARVAJAL, M. PALUSZEK, I. SKRZECZ and M. LOBO DE SOUZA, 2006. Baculoviruses re-emerging biopesticides, Bitechnology Advances, 24: 143-160

TAMEZ-GUERRA, P., M. R. MCGUIRE, R. W. BEHLE, J. J. HAMM, H. R. SUMNER and B. S. SHASHA, 2000. Sunlight persistance and rainfastaness of spray-dried formulations of baculovirus, isolated from Anagrapha falcifera (Lepidoptera: Noctuidae), Journal of Economic Entomology, 93: 210-218.

TANADA, Y. and H. KAYA, 1993. Insect pathology, Academic Press, Inc., San Diego, California.

TOPPER, C. P., G. MOAWAD, D. J. MCKINLEY, M. HOSNY, K. A. JONES, S. EL-NAGAR and M. EL-SHEIK, 1984. Field trials with a nuclear polyhedrosis virus against *Spodoptera littoralis* on cotton in Egypt, Tropical Pest Management, 30: 372–378.

TOPRAK, U., S. BAYRAM and O. M. GURKAN, 2006. Comparative biological activities of a plaque-purified variant and turkish native isolate of SpliNPV-B against *Spodoptera lituralis* (Lep: Noctuidae), Pest Management Science, 62: 57-63.

TOPRAK, U., M. O. GURKAN and S. BAYRAM, 2007. Impact of a turkish isolate and a plaque-purified variant of SpliNPV-B on Larval stage development of *Spodoptera lituralis* (Lep: Noctuidae) Boisd, Pest Management Science, 63: 564-568.

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

WIYGUL, G. and P. P. SIKOROWSKI, 1978. Oxygen uptake in tobacco budworm larvae (Heliothis virescens) infected with cytoplasmic polyhedrosis virus, Journal of Invertebrate Pathology, 32: 191–195.

WHITLOCK, V. H. 1977. Effect of larval maturation on mortality induced by nuclear polyhedrosis and granulosis virus infection of *H.armigera*, Journal of Invertebrate Pathology, 30: 80-86.

YOUNG, S. Y. 1990. Effect of Nuclear Polyhedrosis Virus infection in *Spodoptera ornithogalli* larvae on post larval stages and dissemination by Adults, Journal of Invertebrate Pathology, 55: 69-75.