تولید ویروس چندوجهی هسته‌ای در لارو برگخوار چغندر *Spodoptera exigua* (Hbn.) (Lep. Noctuidae)

علی اصغر پورمیرزا[۱] و سید ابراهیم کمالی[۲]

چکیده

اگرچه ویروس چندوجهی هسته‌ای (NPV) برای کنترل لارو برگخوار چغندرقند از سالها پیش به صورت تجارتی در دسترس بوده است لیکن تولید آن محدود به روش تکثیر در داخل سلول زنده می‌باشد. به دلیل این محدودیت، بهینه کردن متغیرهای مؤثر در تولید بیشترین مقدار ویروس ضرورت دارد. سه نوع از این متغیرها وزن لارو، اینوکولوم اولیه و نوع غذا می‌باشند. در این تحقیق لاروهای بر اساس اندازه‌گیری عرض کپسول سر به گروههای مختلف سنی تقسیم شدند. نتایج زیست‌سنجی با لاروهای متفاوت از نظر وزن و با به کار بردن دزهای 10^4، 10^5، 10^6 و 10^7 عدد چند وجهی در هر میلی لیتر اینوکولوم اولیه نشان دادند که برای تولید ویروس مناسبترین لارو و دز، لارو سن چهارم تغذیه کرده از برگ چغندرقند و دز 10^6 عدد چند وجهی در هر میلی‌لیتر می‌باشد. برای تعیین اثر نوع غذا در میزان تولید ویروس، برگ چغندرقند و غذای نیمه مصنوعی بر کار رفتند. در اینوکولوم به کار رفته برای لاروهای سنین اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم به ترتیب (۵، ۱۰ و ۱۵)، (۲۰، ۲۵ و ۳۰)، (۴۰، ۵۰ و ۶۰)، (۷۰، ۸۰ و ۹۰) و (۱۰۰، ۱۱۰ و ۱۲۰) عدد چند وجهی در هر میلی‌مترمربع سطح ماده غذایی وجود داشت. بیشترین تلفات لاروها در حداکثر زمان دوره کمون مشاهده گردید و این وضعیت برای تولید ویروس مناسب بود. لاروسن ششم در برابر ویروس مقاومت بلوغ نشان داد. از لاروهای تغذیه کرده از برگ چغندرقند تقریباً ۱۰ برابر بیشتر از لاروهای تغذیه نموده از غذای نیمه مصنوعی ویروس به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: ویروس چندوجهی هسته‌ای، برگخوار چغندرقند، تولید ویروس، وزن لارو

مقدمه

استفاده از سموم شیمیایی ضمن کنترل آفات از لحاظ زیست محیطی زیانهای جبران ناپذیری را برجای گذاشته است. بنابراین برای مبارزه با آفات بایستی از روشهای دیگر کنترل بخصوص روش بیولوژیکی استفاده گردد. از عوامل بیولوژیک کنترل کننده کرم برگخوار چغندرقند ویروس چند وجهی هسته‌ای *Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV)* از اهمیت خاصی برخوردار بوده است (۲۴). این ویروس در طبیعت فعال بوده و در مواردی بیماری همه گیر در لاروها ایجاد می کند ولی مهمترین عامل موثر در کاهش کارآیی آن پرتوهای فرابنفش با طول موج ۲۸۰ تا ۳۲۰ نانومتر می باشد(۶). مطابق گزارشات موجود مصرف $1/1\times10^{12}$ عدد چند وجهی ویروس در هر هکتار مزرعه چغندرقند در کنترل لارو برگخوار چغندر از مصرف متومیل و دیفلوبنزورون از نظر اقتصادی مقرون به صرفه بوده است (۱۰ و ۱۸).

در مزرعه چغندر قند برای مبارزه با لارو برگخوار چغندر از عصاره له شده لاروهای آلوده به ویروس چند وجهی هسته‌ای جمع آوری شده در برزیل متداول بوده و در هر ماه به طور متوسط ۱۵۰۰ کیلوگرم ویروس تهیه شده و در سطح ۷۵۰۰۰ هکتار مزرعه چغندرقند مصرف می گردد (۱۲). تکثیر ویروس منحصراً در داخل

۱- دانشیار گروه گیاهپزشکی – دانشکده کشاورزی ارومیه

۲- عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی آستارا

تاریخ دریافت: ۸۰/۹/۲۴

تاریخ پذیرش: ۸۲/۲/۲۲

سلول زنده صورت می‌گیرد (۱۷ و ۲۴) و تولید آن در مقیاس بزرگ پرهزینه می باشد (۱۴) بنابراین جهت تولید بهینه ویروس لازم است که تعداد آن در هنگام تکثیر در داخل هر سلول میزبان به حداکثر برسد. هر عاملی که پس از آلوده شدن میزبان در رشد آن تاثیر گذارد در تعداد نهایی ویروس مؤثر خواهد بود (۱۱). مقدار ویروس تولید شده در سلول بسیار متغیر می باشد (۳) به طوری که در لارو بعضی از پروانه ها ۱۰ درصد وزن خشک لارو را چند وجهی ویروس تشکیل می دهد (۲۱). تکثیر ویروس در داخل سلول زنده به صورت لگاریتمی است و در *S.exigua* دوره کمون بیماری ۴ روز بوده و پس از آن در مدت ۱ تا ۳ روز به تعداد ویروس به صورت لگاریتمی افزوده می شود و لارو پس از ۳ روز می میرد (۲۰). از عوامل موثر در تکثیر ویروس وزن اولیه لارو، زمان استحصال ویروس از لارو آلوده، اینوکولوم اولیه، نوع غذا و دمای محیط را می توان نام برد. وزن لارو در هنگام آلودگی به ویروس و زمان مرگ مهمترین عامل در تولید ویروس می باشد (۶و ۸). گزارش شده است که اگر لارو برگخوار چغندرقند با وزن ۵ ± ۳۵ میلی گرم و با دز ۸×۱۰^{۴} PIB[1] آلوده شود در زمان برداشت که متوسط وزن لارو ۸۶ میلی گرم می گردد تعدا OB[2] استحصال شده برابر ۱×۱۰^{۹} عدد خواهد بود (۱۱).

تجربیات نشان داده اند که در اثر افزایش ۲۸ درصد وزن بدن لارو میزان تولید ویروس ۱۵/۸ درصد افزایش می یابد (۱۷) و مشاهده شده است که لارو سن آخر در برابر ویروس از خود مقاومت نشان می دهد (۷). در تحقیقی معلوم گردید که اگر لارو در سن چهارم به ویروس آلوده شود ۸۳۵۰۰ برابر اینوکولوم اولیه ویروس تولید می شود و در صورتی که لارو در سن پنجم به ویروس آلوده گردد تعداد ویروس استحصال شده به ۱۲۸۰ برابر اینوکولوم اولیه می رسد (۸). جنس لارو نیز در میزان ویروس به دست آمده دخالت دارد به عنوان مثال در لارو ماده پروانه ابریشم باف ناجور ۲/۵۴ برابر لارو نر ویروس تولید می شود(۱۳). زمان جمع آوری لاروهای آلوده به ویروس جهت استحصال ویروس اهمیت زیادی دارد(۸، ۱۷ و ۲۲)و ویروس بدست آمده از لاروهای مرده از ویروس استحصال شده از لاروهای در حال مرگ به مراتب قدرت بیماریزایی بیشتری داشته اند (۱۵و۲۰). اثر اینوکولوم اولیه در تکثیر و تولید ویروس شناخته شده است (۳) و اگر اینوکولوم اولیه کمتر از دز زیرکشنده باشد به دلیل وجود مواد ضد ویروس در دستگاه گوارش لارو امکان تکثیر ویروس فراهم نبوده و در نتیجه آلودگی به وجود نمی آید و در صورتی که مقدار اینوکولوم اولیه بیشتر از دز کشنده باشد لارو قبل از رسیدن به مرحله رشد نهایی می میرد (۹). در بررسی اثر اینوکولوم اولیه با تعداد ۵۴ تا ۲۷۰۸ عدد OB برهر میلی متر مربع ماده غذایی معلوم گردید که بین لگاریتم های تعداد ویروس استحصال شده و تعداد ویروس در اینوکولوم اولیه همبستگی خطی معکوس وجود دارد(۳). نوع غذای لارو بخصوص از نظر مقدار و نوع پروتئین عاملی است که به طور مستقیم در رشد و وزن نهائی لارو و به طور غیر مستقیم در مقدار ویروس حاصله تاثیر زیادیدارد (۱۱). با توجه به عوامل موثر در تولید ویروس به منظور تعیین مناسبترین سن لاروی، اینوکولوم اولیه و نوع غذا جهت تولید ویروسNPV در لارو برگخوار چغندر قند این تحقیق انجام یافت.

[1]- Polyhedron inclusion body
[2] - Occlusion bodies

مواد و روشها

پرورش برگخوار چغندر: در بهار سال ۱۳۷۷ از مزارع چغندرقند اطراف نوشین شهر ارومیه تعداد زیادی لارو برگخوار چغندر جمع آوری گردید. لاروها در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۰ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی روی برگ چغندرقند پرورش یافتند. پس از ظهور شب پرکها و تخمگذاری آنها لاروهای حاصله به دو گروه تقسیم شدند گروهی برای نسلهای متعدد روی برگ چغندر قند و گروه دیگر برای چندین نسل در روی غذای مصنوعی به کار رفته توسط منظری [۲] پرورش داده شدند.

ویروس چند وجهی هسته ای: ویروس به کار رفته در این آزمایشها با نام تجاری SPOD-X LC یک حشره‌کش مایع ویروس چند وجهی هسته‌ای ویژه کرم برگخوار چغندرقند با ۲×۱۰^{۹} OB در هر میلی لیتر بود. این فرمولاسیون از شرکت زیر تهیه گردید.

Crop Genetic International- A Subsidairy of biosys Lot # 30015

شناسایی سنین مختلف لاروی

شناسایی سنین مختلف لاروی با اندازه گیری عرض کپسول سر و تعیین وزن لارو صورت گرفت. برای این منظور ۳۰ عددظرف پرورش محتوی ماده غذایی انتخاب شد و به داخل هر یک از آنها یک عدد لارو سن اول یا نوزاد منتقل گردید در هر تعویض جلد عرض پوسته کپسول سر به کمک عدسی مدرج (گراتیکول) نصب شده بر روی عدسی چشمی میکروسکوپ اندازه گیری گردید و وزن ۲۰ عدد لارو نیز تعیین شد.

میزان تغذیه سنین مختلف لاروی از برگ چغندر: سی عدد لارو سن اول یا نوزاد به طور انفرادی درون قفسها ی لارو سن اول روی برگ چغندر قند قرار گرفتند پس از آنکه لاروها به لارو سن دوم تبدیل شدند داخل قفسهای سن دوم لاروی انتقال یافتند این عمل تا آخر سن ششم لاروی ادامه یافت و چون مساحت قفسها مشخص بود مقدار غذای تغذیه شده توسط یک لارو در طول دوره لاروی تعیین گردید.

تهیه لارو هم سن: دسته های تخم هم سن به صورت مجزا پرورش داده شدند. لاروهای مشابه از نظر وزن درون قفسهایی که حداکثر شرایط مناسب برای پرورش را داشتند محبوس گردیدند.

تهیه محلول ویروسی: برای تهیه محلول ویروسی مورد نظر از محلول مادر که حاوی $۱۰^{۶}$ عددویروس چند وجهی هسته ای در هر میلی لیتربود و نیز رابطه $N_۱V_۱=N_۲V_۲$ استفاده گردید. $N_۱$ تعداد چند وجهی موجود در محلول مادر و $V_۱$ حجمی از محلول مادر که مورد استفاده قرار گرفت$N_۲$ تعداد چند وجهی در محلول مورد نیاز و $V_۲$ حجم آبی که بایستی بر روی محلول مادر اضافه شود. در تیمار شاهد از آب مقطر بدون ویروس استفاده شد.

قفس های لاروی و آلوده سازی ماده غذایی

جهت تهیه قفس لاروی از صفحات پلاستیکی شفاف به ابعاد ۴×۴ سانتیمتر وبه ضخامت ۳ میلی متر استفاده شد بر روی هر یک از این صفحات ۶ حفره دایره ای به عمق ۳ میلی متر به قطر متناسب با سن لاروی ایجاد گردید.

۱- *سن اول لاروی:* برگ چغندرقند بین دو صفحه پلاستیکی شفاف سوراخ دار که قطر هر سوراخ ۳ میلی متر بود قرار گرفت. صفحات طوری روی هم واقع شدند که سوراخهای آنها بر هم منطبق گردیدند. سپس توسط گیره لباس صفحات به هم متصل شدند. درون هر سوراخ

اینوکولوم اولیه توسط سمپلر با دقت ۰/۱ میکرولیتر روی برگ قرار گرفت.مساحت سوراخ ۷ میلی مترمربع بود که ۲/۵ میکرولیتر از مایع ویروسی به صورت قطره ای تمام سطح را می پوشاند. تعداد چند وجهی ها ۵، ۱۰ و ۱۵ عدد در هر میلی مترمربع بود. پس از تبخیر محلول ویروسی لاروها در درون سوراخها به طور انفرادی قرار گرفتند برای جلوگیری از فرار لارو یک صفحه پلاستیکی شفاف با سوراخهای بسیار ریز روی صفحه روئی گذاشته شد. سه صفحه پلاستیکی توسط چند گیره لباس محکم به یکدیگر متصل شدند.در آزمایش با غذای مصنوعی ابتدا لوله توخالی پلاستیکی به قطر ۳ میلی متر به آرامی روی ماده غذایی فشار داده شدو در نتیجه فرورفتگی دایره ای به مساحت ۷ میلی متر مربع ایجاد گردید. سپس ۲/۵ میکرولیتر از محلول ویروسی مورد نظر روی دایره ریخته شد. پس از خشک شدن محلول یک عدد لارو درون لوله مذکور قرار گرفت و لوله درون ماده غذایی فرو برده شد. طرف دیگر لوله توسط پارچه توری مسدود گردید. کلیه لاروها پس از تغذیه مواد غذایی آلوده به ویروس روی ماده غذایی غیر آلوده خاص خود انتقال یافتند. هفت روز پس از آلودگی، لاروهای مرده جمع آوری شده و تا زمان شمارش چند وجهی در قسمت یخدان یخچال نگهداری شدند.

۲- *سن دوم لاروی:* در تمام موارد کار مشابه لارو سن اول بود با این تفاوت که قطر سوراخ ۵ میلی متر بوده و با ۵ میکرولیتر از محلول خیس می‌گردید. دزهای به کار رفته دارای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ عدد ویروس چند وجهی بر هر میلی مترمربع بود.

۳- *سن سوم لاروی:* سطح مورد نظر جهت آلوده سازی ۶۰ میلی متر مربع و تعداد چند وجهی ویروسی بر هر میلی متر مربع ۴۰، ۵۰ و ۶۰ عدد بود. از محلول ویروسی۱۰ میکرولیتر روی این سطح قرار گرفت.

٤- *سن چهارم لاروی:* مشابه لارو سن اول عمل گردید با این تفاوت که قطر سوراخ ۱۵ میلی متر بود. برای لاروهایی که از غذای مصنوعی تغذیه می کردند از لوله ای به طول ۲ و قطر ۱/۵ سانتیمتر استفاده گردید.

۵- ***لارو سن پنجم:*** قفس از دو صفحه دایره ای شکل سوراخ دار که قطر سوراخ آنها ۳۰ میلی‌متر بود تشکیل گردید. به دلیل ضخامت زیاد لارو دریکی از صفحات به جای توری از یک قوطی فیلم عکاسی استفاده شد. لارو درون قوطی فیلم محبوس گردید و دو صفحه در مقابل یکدیگر قرار گرفتند و سپس توسط چند گیره لباس به هم متصل گردیدند.

٦- *لارو سن ششم:* به دلیل اینکه لارو در مقابل ویروس مقاومت بلوغ از خود نشان داده و در کوتاهترین زمان به شفیره تبدیل می شد مورد بررسی قرار نگرفت.

تعیین تعداد ویروس چند وجهی: بدن لارو با بهمزن شیشه ای له شد و به آن ۵ سانتیمتر مکعب آب مقطر اضافه گردید و به مدت یک هفته در دمای اتاق نگهداری شد تا کاملاً متلاشی گردید. محلول بدست آمده از پارچه تنظیف عبور داده شد و سوسپانسیون عاری از لاشه لارو جهت شمارش چند وجهی ها مورد استفاده قرار گرفت. تعداد چند وجهی هر لارو به وسیله لام گلبول شمار و میکروسکوپ فازکنتراست تعیین گردید.

تعیین مناسب ترین سن لاروی و دز برای تولید ویروس: براساس گزارشات موجود مناسب‌ترین زمان آلوده سازی لارو برای تولید ویروس هنگامی است که لارو در حدود ۶۳ درصد وزن نهائی خود را بدست آورده باشد

(۱۳). لاروهای سنین اول و دوم شرایط یاد شده را نداشتند. لاروهای سنین پنجم و ششم نیز جهت تولید ویروس مورد توجه واقع نشدند زیرا در آلودگی با ویروس قبل از تولید حداکثر تعداد ویروس به شفیره تبدیل می شدند. بنابراین از لاروهای سنین سوم و چهارم و محلول های ویروسی دارای 10^4، 10^5، 10^6 و 10^7 عدد چند وجهی در میلی لیتراستفاده شد. در هرسن لاروی و برای هر غلظت از ویروس۳۰ عدد لارو به کار رفت لاروها در شرایط پرورش نگهداری شدند روی سطح برگ ۱۰ میکرولیتر از محلولهای ویروسی فوق ریخته شد و سپس لاروهای سنین سوم و چهارم درون قفس های خود قرار گرفتند و پس از آنکه لاروها اینوکولوم را همراه غذا خوردند آنها به روی برگ چغندر قند عاری از ویروس انتقال یافته و هر روز بررسی شدند. پس از ۷ روز لاروهای مرده جمع آوری شده و تا زمان شمارش ویروس چند وجهی در یخدان یخچال نگهداری گردیدند.

نتایج و بحث

شناسایی سنین مختلف لاروی: اندازه گیری عرض کپسول سر لارو نشان داد که برگخوار چغندر دارای ۶ سن لاروی مشخص می باشد و این نتیجه از عدم تداخل میانگین ± انحراف معیار عرض کپسول سر سنین مختلف لاروی استنباط گردید (جدول ۱). مناسبترین رابطه بین عرض کپسول سر برحسب میلی متر (Y) و سن لاروی (X) به صورت $Y = ex^{(-0.40 x + 0.87)}$ با $R=0.99$ و $R^2=\%99$ مشخص شد. R نشان می دهد که بین دو متغیر یک همبستگی ۹۹ درصدی وجود دارد و مقدار R^2 بیان می کند که ۹۹ درصد تغییرات عرض کپسول سر لارو مربوط به سن لاروی است. رابطه بین عرض کپسول سر و وزن لارو نشان دادکه با اطمینان ۹۹ درصد بین آنها همبستگی مستقیم معنی دار وجود دارد و مناسبترین رابطه بین عرض کپسول سر برحسب میلی‌متر (Y) و وزن لارو (X) برحسب میلی‌گرم و با $R^2=\%98$ به صورت $Y=0/33+6/54X$ می باشد. مقدار R یک همبستگی ۹۹ درصدی بین وزن و عرض کپسول سر را بیان می‌کند و مقدار R^2 نشان می دهد که ۹۸ درصد تغییرات عرض کپسول سر و در نتیجه سن لاروی را عامل وزن توجیه می کند و به این ترتیب با اندازه گیری وزن لارو به سن آن می توان پی برد.

میزان تغذیه سنین مختلف لاروی از برگ چغندرقند: با توجه به جدول (۲) مشخص می‌گردد که یک لارو در طول دوره زندگی خود ۰/۹ ± ۵۰۲۳ میلی متر مربع برگ چغندقند را مورد تغذیه قرار می دهد و وزن تر این سطح از برگ در بررسی ۲۰ نمونه مختلف برابر با ۰/۲ ± ۱/۷ گرم بود. هر لارو پس از تفریخ تخم تا پایان سن چهارم به طور متوسط ۱۶/۳۳ درصد از کل تغذیه خود را انجام می‌دهد و قسمت اعظم تغذیه در سنین پنجم و ششم لاروی صورت می گیرد.

تعیین تعداد ویروس چند وجهی: جدول (۳) نشان می دهد که میزان ویروس چند وجهی تولید شده در لاروهای سن اول تغذیه کرده از غذای مصنوعی ۴/۹ برابر بیشتر از لاروهای سن اول تغذیه کرده از غذای طبیعی می باشد ولی در سنین بالاتر از لاروهایی که از برگ چغندرقند تغذیه کرده بودند ۱۰/۱۲ برابر بیشتر از لاروهایی که از غذای مصنوعی تغذیه نموده بودند ویروس چند وجهی به دست آمد. از لارو سن چهارم آلوده شده با دز ۷۰ PIB در هر میلی مترمربع، بیشترین تعداد ویروس چند وجهی استحصال گردید.

جدول ۱- وزن و عرض کپسول سردر سنین مختلف لارو برگخوار چغندر[1]

سن لاروی	وزن بر حسب میلی گرم میانگین ± انحراف معیار	عرض کپسول سر بر حسب میلی متر میانگین ± انحراف معیار
اول	۰/۲۷ ± ۰/۰۷	۰/۲۵۳ ± ۰/۰۰۳
دوم	۱۱/٦ ± ۱/٤۲	۰/۳۷۵ ± ۰/۰۰۲
سوم	۲۵/۲ ± ۲/۲۱	۰/۵٦۲ ± ۰/۰۰۱
چهارم	٦۷/۱۵ ± ٤/۰۹	۰/۷۹۳ ± ۰/۰۰۱
پنجم	۱۲۳/۰۱ ± ٤/٦٤	۱/۲۲۰ ± ۰/۰۰٤
ششم	۲۵۰/۱۵ ± ٦/۸	۱/۹۲ ± ۰/۰۰۷

۱- وزن در مورد ۲۰ لارو و عرض کپسول سر در مورد ۳۰ لارو اندازه گیری شده است.

جدول ۲- میزان تغذیه سنین مختلف لارو برگخوار چغندر از برگ چغندرقند

سن لاروی	تعداد لارو	طول دوره لاروی به روز	میانگین سطح کل تغذیه شده در هر سن لاروی بر حسب میلی مترمربع	در صد تغذیه
اول	۳۰	۳/۵ ± ۰/۲	۸ ± ۰/۵	۰/۱٦
دوم	۳۰	۲/۵ ± ۰/۱	٤۷ ± ۰/۳	۰/۹٤
سوم	۳۰	۳ ± ۰/۱	۲۲۳ ± ۰/۷	٤/٤٤
چهارم	۳۰	٤ ± ۰/۱	۵٤۲ ± ۰/۳	۱۰/۷۹
پنجم	۳۰	٤ ± ۰/۲	۱۸٤۵ ± ۰/۷	۳٦/۷۳
ششم	۳۰	۳/۵ ± ۰/۱	۲۳۵۸ ± ۰/٤	٤٦/۹٤

سطح کل تغذیه شده برابر با ۰/۹ ± ۵۰۲۳ میلی متر مربع می باشد

جدول ۳- سنین مختلف لاروی، دز اینوکولوم اولیه و میزان بازیافت ویروس چند وجهی در سنین اول تا پنجم لارو برگخوار چغندر قند

سن لاروی	دز برحسب PIB بر هر میلی مترمربع	تعداد لارو	متوسط تعداد چند وجهی ویروسی NPV به ازای هر لارو	
			غذای مصنوعی	غذای طبیعی
	۰	۱۵	---	---
	۵	۱۵	$۱/۲ \times ۱۰^{۶}$	$۱/۵ \times ۱۰^{۵}$
اول	۱۰	۱۵	$۱/٤ \times ۱۰^{۶}$	$۲/۸ \times ۱۰^{۵}$
	۱۵	۱۵	$۵/۸ \times ۱۰^{۵}$	$۲/۲ \times ۱۰^{۵}$
	۰	۱۵	---	---
	۲۰	۱۵	$۱/۹ \times ۱۰^{۶}$	$٤/۲ \times ۱۰^{۷}$
دوم	۲۵	۱۵	$۳/۵ \times ۱۰^{۶}$	$۳/٦ \times ۱۰^{۷}$
	۳۰	۱۵	$۱/٤ \times ۱۰^{۶}$	$۲/۸ \times ۱۰^{۷}$
	۰	۱۵	---	---
	٤۰	۱۵	$۵/۲ \times ۱۰^{۷}$	$۱/۸ \times ۱۰^{۸}$
سوم	۵۰	۱۵	$۱/۲۸ \times ۱۰^{۸}$	$۳/۳ \times ۱۰^{۸}$
	٦۰	۱۵	$۳/٤۱ \times ۱۰^{۷}$	$۱/۵۲ \times ۱۰^{۸}$
	۰	۱۵	---	---
	۷۰	۱۵	$۵/٤ \times ۱۰^{۸}$	$٤/۱٤ \times ۱۰^{۹}$
چهارم	۸۰	۱۵	$۲/۳ \times ۱۰^{۸}$	$۳/۲۵ \times ۱۰^{۹}$
	۹۰	۱۵	$۱/۲ \times ۱۰^{۸}$	$۳/۱۹ \times ۱۰^{۹}$
	۰	۱۵	---	---
	۱۰۰	۱۵	۳×۱۰^{۷}	$۳/۳٤ \times ۱۰^{۸}$
پنجم	۱۱۰	۱۵	$۵/٦ \times ۱۰^{۷}$	$٤/۸ \times ۱۰^{۸}$
	۱۲۰	۱۵	$۳/۱۲ \times ۱۰^{۷}$	$۲/۷ \times ۱۰^{۸}$

تعیین مناسبترین سن لاروی و دز برای تولید ویروس: با توجه به نتایج مندرج در جدول (۴) معلوم می شود که مناسب ترین سن لاروی برای تولید ویروس، سن چهارم لاروی و دز $PIB ۱۰^{۶}$ بر هر میلی لیتر می باشد.

جدول ٤- تعیین مناسبترین سن لاروی و دز ویروس برای تولید ویروس در لاروهای برگخوار چغندر قند تغذیه کرده از برگ چغندرقند

سن لاروی	تعداد لارو	PIB بر میلی لیتر	درصد تلفات لارو	میانگین تعداد PIB در هر لارو
سوم	۳۰	$۱۰^{٤}$	٤٦/٦	$۲/۱۲ \times ۱۰^{۸}$
	۳۰	$۱۰^{٥}$	۷۳/۳	$۲/۷۳ \times ۱۰^{۸}$
	۳۰	$۱۰^{٦}$	۹٦/٦	$۱/۸٥ \times ۱۰^{۸}$
	۳۰	$۱۰^{۷}$	۱۰۰	$۱/۱٥ \times ۱۰^{۷}$
چهارم	۳۰	$۱۰^{٤}$	٤۰	$۳/۱۷ \times ۱۰^{۹}$
	۳۰	$۱۰^{٥}$	٥٦/٦	$۳/٥۱ \times ۱۰^{۹}$
	۳۰	$۱۰^{٦}$	۹۳/۳	$٤/۲۱ \times ۱۰^{۹}$
	۳۰	$۱۰^{۷}$	۱۰۰	$۲/۷۳ \times ۱۰^{۸}$

برای برگخوار چغندر ۵ سن لاروی را ذکر نموده‌اند (۲۰) ولی در آزمایش‌های حاضر بر اساس اندازه گیری عرض کپسول سر لارو ۶ سن لاروی تشخیص داده شد که این نتیجه با کارهای منظری(۲) تطابق دارد. خیری (۱) سطح برگ چغندرقند تغذیه شده توسط هر لارو را در طول دوران لاروی ۳۳۰۰ میلی متر مربع با وزن ۱/۳ گرم گزارش کرده است که با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر تا حدودی متفاوت است. این اختلاف می تواند به تفاوت در شرایط جغرافیایی، بیوتیپ حشره، تکنیک اندازه گیری سطح برگ و ضخامت برگ مربوط باشد.

با توجه به میزان تغذیه سنین مختلف لاروی معلوم می شود که میزان تغذیه لارو تا پایان سن چهارم درمجموع ۱۶/۳۳ درصد از کل تغذیه دوره لاروی را تشکیل می دهد که در مقایسه با میزان تغذیه لارو در سنین پنجم و ششم (۸۳/۶۷) درصد ناچیزی می باشد. این نتیجه با تجربیات محققین دیگر تطابق کامل دارد (۱۸).

بنابراین برای کنترل حشره لازم است که لارو قبل از ورود به سن پنجم از بین برود. از آنجایی که فاصله زمانی تفریخ تخم تا پایان سن چهارم لاروی ۱۳ روز است بنابراین فرصت کافی برای اعمال ابزار مدیریت کنترل انبوهی آفت در یک برنامه IPM فراهم می باشد.

ویروس بکار رفته در این بررسی مخصوص لارو برگخوار چغندر است و از نظر کشندگی نسبت به ویروسهای مشابه برتری دارد. زیرا در تولید ویروس و آزمایش های زیست سنجی، نوع ویروس (۱۱)، اینوکولوم اولیه (۳ و ۱۳)، وزن لارو (۶، ۷ و ۱۷)، زمان جمع آوری لارو و نوع غذا (۷، ۸ و ۲۲) اهمیت دارند به عنوان مثال اگر خواسته شود از MbNPV در تعیین LD_{50} استفاده گردد لازم است که چندین بار عمل پاساژ صورت گیرد تا ژنوم ویروسی سازگار با لارو برگخوار چغندر حاصل شود (۲۳و۲۴) در صورتیکه در مورد ویروس تجارتی بکار رفته در تحقیق حاضر این عمل لازم نیست بنابراین در تولید

ویروس و تعیین مقادیر LD_{50} می توان آنرا به طور مستقیم به کار برد.

لارو برگخوار چغندر دارای میزبان های متعددی است بنابراین مشخص کردن نوع غذای مناسب حائز اهمیت است. در بررسی حاضر معلوم شد که در لارو تغذیه کرده از برگ چغندرقند نسبت به لارو مشابه تغذیه نموده از غذای مصنوعی ۱۰/۱۲ برابر بیشتر ویروس تولید می‌شود. محققین با استفاده از غذای نیمه مصنوعی و بدون ذکر فرمول آن در هر لارو برگخوار چغندر $۶/۵\times۱۰^{۱۰}$ عدد چند وجهی را بازیافت کرده اند (۵) که در حدود ۱۰ برابر بازیافت لارو تغذیه کرده از غذای طبیعی در مطالعه حاضر است. در تحقیقی مشابه با استفاده از غذای مصنوعی مقدار بازیافت چند وجهی را در هر لارو $۱/۲\times۱۰^{۹}$ عدد گزارش نموده اند (۱۹) که اندکی کمتر از بازیافت لارو تغذیه کرده از غذای طبیعی این تحقیق می‌باشد. شاپیرو (۱۳) میزان بازیافت چند وجهی در هر لارو برگخوار چغندرقند تغذیه کرده از غذای مصنوعی را ۶×۱۰^{۸} عدد ذکر کرده است که با نتایج بررسی حاضر مشابه می باشد. در هر حال اختلاف موجود در میزان بازیافت ویروس چند وجهی در لارو برگخوار چغندرقند می تواند به بیوتیپ حشره، نوع غذا و وزن لارو مربوط باشد زیرا بیوتیپ های مختلف از نظر وزن بدن اندکی متفاوتند. در ۳۰ عدد لارو سن ششم جمع آوری شده از مزارع چغندرقند اطراف نوشین شهرارومیه که در آخر مرحله لاروی بوده و حداکثر رشد را داشتند متوسط وزن بدن ۳۱ ± ۲۶۰ میلی گرم بود در حالی که در همین تعداد لارو سن ششم جمع آوری شده از مزارع چغندرقند خوی متوسط وزن بدن هر لارو ۱۵ ± ۳۰۰ میلی گرم تعیین گردید. با استفاده از غذای مصنوعی (۵و۱۹) و با به کار بردن برگ یونجه جهت تغذیه لارو برگخوار چغندر (۴) لارو سن چهارم را مناسب ترین سن لاروی جهت تولید ویروس معرفی نموده اند که این نتایج با نتیجه تحقیق حاضر تشابه کامل دارد.

شرکت سازنده SPOD-X LC مقدار مصرف این فرمولاسیون را ۱۲۵- ۲۵۰ میلی لیتر در هکتار از محلول حاوی ۲×۱۰^{۹} عدد چند وجهی در هر میلی لیتر توصیه کرده است که در ۲۵۰ میلی لیتر از این محلول ۵×۱۰^{۱۱} عدد چند وجهی وجود دارد. در بررسی حاضر (جدول۴) معلوم گردید در هر لارو سن چهارم آلوده به ویروس پرورش یافته روی غذای طبیعی $۴/۲۱\times۱۰^{۹}$ عدد چند وجهی تولید می شود بنابراین جهت سمپاشی هر هکتار حداکثر به ۱۱۹ عدد لارو برگخوار چغندر سن چهارم آلوده به ویروس نیاز می باشد. البته هنگامی که بوته چغندرقند در مرحله ۲۰- ۲۵ برگی باشد می توان ۲۰ عدد لارو برگخوار چغندرقند را روی آن پرورش داد و برای پرورش ۱۱۹ عدد لارو برگخوار چغندر ۶ عدد بوته چغندرقند کافی خواهد بود بنابراین برای هر هکتار مزرعه می توان در قسمتی از مزرعه این تعداد بوته را به پرورش لارو اختصاص داده و در زمان مناسب آنها را ویروس پاشی نمود و سپس عصاره بدست آمده از لاشه لاروهای آلوده را در مزرعه مصرف کرد. در نمونه برداری های بهاره سال ۷۷ که از مزارع چغندرقند نوشین شهر انجام گرفت تعداد کمی از لاروها به ویروس آلوده بودند و در نمونه برداری مجددی که در شهریور ماه همان سال از این مزارع به عمل آمد مجدداً آلودگی در لاروها مشاهده گردید با توجه به اینکه اوج تابش پرتوهای فراء بنفش در ماههای تیر و مرداد ماه بوده و این پرتوها ویروسهای چند وجهی را از بین می برند (۱۶) می توان تصور نمود که این نمونه ها سوشهای بومی مقاوم ویروس در برابر پرتوهای فرا بنفش هستند. بنابراین تحقیق در مورد تکثیر و کاربرد سوشهای بومی ویروس ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه به خاطر تقبل هزینه‌های انجام این تحقیق سپاسگزاری می نمایند.

همچنین از آقایان دکتر عباس صمدی و دکتر مهدی یاسی به خاطر مطالعه این نوشته و پیشنهادات ارزنده تشکر می‌کنند.

منابع

۱- خیری،م. ۱۳۶۴. بررسی شرایط نشو و نمای برگخوار چغندر قند *Spodoptera exigua* و علل تغییرات جمعیت آن. پایان نامه دکترای گیاهپزشکی، حشره شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۲ـ منظری، ش. ۱۳۷۵. بررسی آزمایشگاهی در چگونگی بیماریزایی ویروس MbNPV روی تخم و مراحل مختلف لاروی برگخوار چغندر قند *Spodoptera exigua*. پایان نامه کارشناسی ارشد گیاهپزشکی، حشره شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

3- Bell, M. R. 1991. In vivo production of a nuclear polyhedrosis virus. utilizing tobacco budworm and multicellular larval rearing container. Journal of Economical Science 26:69-75.

4- Buttu, G. S. 1987. Propagation of nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera exigua.* Indian Journal of Ecology 14: 61-63.

5- Choi, J.Y., Kim, H.S., Jin, B.R., Seol, K.Y., and Park, H.Y. 1996. Pathogenecity and production of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. Korean Journal of Applied Entomology 35: 228-231.

6- Entwistle, P. F., and Evans, H. F. 1985. Viral control. pp: 347-412, *In*: 6- G.A. Kerkut and Gilbert, L. I. (eds.). Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford, Pergamon Press, UK.

7- Evans, H. F. 1986. The influence of larval maturation on responses of *Mamestra brassicae* L. (Lep. Noctuidae) to nuclear polyhedrosis virus infection. Archives of Virology 75: 163-170.

8- Evans, H. F., Lomer, C. J., and Kelly, D. C. 1981. Growth of nuclear polyhedrosis virus in larvae of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* L., Archives of Virology 70: 207-214.

9- Funakoshi, M. and Aizawa, K. 1989. Antiviral substances in the silkworm gut juice against a nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori,* Journal of Invertebrate Pathology 53: 135-136.

10- Gelernter, W.D. and Federeci, B. A. 1986. Isolation, identification and determination of virulence of a nuclear polyhedrosis virus from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Environmental Entomology 15:240-245.

11- Hunter-Fufita, F. R., Entwistle, P., Evans, H. F., and Crook, N. E. 1998. Insect Viruses and Pest Management. John Wiley, New York, 620 p.

12- Moscardi, F. 1990. Development and use of soybean caterpillar baculovirus in Brazil. pp: 184-187, *In:* Proceedings of 5th International Colloquium on Invertebrate Pathology, Adelaide, Australia.

13- Shapiro, M. 1982. In vivo mass production of insect viruses for use as pesticides. pp : 463-492, *In*: Krusstaek, H. (ed.). Microbial and Viral Pesticides, Marcel Dekker, New York.

14- Shapiro, M. 1986. In vivo production of baculoviruses. pp: 31-62, *In:* Granados, R.R.and Federici, B. A. (eds.). The Biology of Baculoviruses. CRC Press, Boca Raton, Florida.

15- Shapiro, M., and Bell, R. A. 1981. Biological activity of *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus from living and virus killed larvae. Annals of Entomology Society of America 74: 27-28.

16- Shapiro, M., and Robertson, J. L. 1992. Enhancement of gypsy moth (Lep. Lymantridae) baculovirus activity by optical brighteners. Journal of Economic Entomology 84: 1120-1124.

17- Shieh, T. R. 1989. Industrial production of viral pesticides. Advances in Virus Research 36: 315-343.

18- Smits, P. H., Vande Vrie, M., and Vlak, J.M. 1987. Nuclear polyhedrosis virus for the control of *Spodoptera exigua* larvae on glasshouse crops. Entomologia Experimentalis et Applicata 43: 73-80.

19- Smits, P. H., Vonschomberg, M., and Vlak, J. M. 1984. Production of nuclear polyhedrosis virus in larvae of beet armyworm *Spodoptera exigua*. Mededе Lingen-van-de- Faculteit 49: 867-873.

20- Smits, P. H. and Vlak, J. M. 1988. Quantitative and qualitative aspects in the production of a nuclear polyhedrosis virus in *Spodoptera exigua* larvae. Annals of Applied Biology 112: 249-257.

21- Tanada, Y., and Kaya, H. K. 1993. Insect Pathology. Academic Press, New York, 666p.

22- Teakle, R. E., and Byrne, V. S. 1989. Nuclear polyhedrosis virus production in Helicoverpa armigera infected at different larval age. Journal of Invertebrate Pathology 53: 21-24.

23- Tompkins, G. J., Dougherty, E. M., Adams, J. R., and DIGGS, D. 1988. Changes in the virulence of nuclear polyhedrosis viruses when propagated in alternative noctuid (Lep. Noctuidae) cell lines and host. Journal of Economic Entomology 81: 1028-1032.

24- Winstanley, D., and Rovesti, L. 1993. Insect viruses as biocontrol agents. pp:105-137, In: Gareth Jones, D. (ed.). Exploitation of Microorganism. Chapman & Hall, New York, 488p.

Production of nuclear Pol yhedrosis virus in larvae of beet armyworm , spodoptera exigua (Hb.) (Lep. noctuid ae)

A.A. Pourmirza[1] & S.I. Kamali[2]

Abstract

Although commercial formulations of nuclear polyhedrosis virus (NPV) to control beet armyworm larvae had been available for a long time, however, it's production remains limited to *in vivo* culture. Due to this limitation, optimizations of variables that will maximize virus yield are necessary. Three of these variables are larval weight, initial inoculum and food source. The larvae were separated into different instars based on measurements of head capsule widths. The bioassay with different weight groups and doses of 10^4,10^5,10^6 and 10^7 PIB/ml of virus revealed that the 4th instar larvae reared on sugar beet leaf and treated with 10^6 PIB/ml fulfill the most appropriate conditions of virus production. To determine the effect of food source on virus yield, sugar beet leaf and semiartificial diet were used. The applied inoculum for 1st, 2nd, 3rd, 4th, and 5th instar larvae were (5,10,15), (20,25,30), (40,50,60), (70,80,90) and (100,110,120) PIB/mm^2 of food surface respectively. Maximum mortality rate of infected larvae occurred at the prolonged period of latent time and this condition was suitable enough for maximum virus yield. A degree of maturation resistance was found to exist in the 6th instar larvae. The larvae which reared on sugar beet leaf, produced ca. ten-fold more viruses than the corresponding larvae that fed on the diet.

Keywords: *Nuclear polyhedrosis virus, beet armyworm, virus production, larval weight.*

1-Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

2-Instructor of Azad University, Astara, Iran