بررسی اثر بیمارگری سویه‌های *Bacillus thuringiensis* بومی خاک‌های زراعی ایران روی پروانه برگ‌خوار مصری پنبه *Spodoptera littoralis* Z.

زهرا معقولی فرد[۱،۲]، رسول مرزبان[۳]، شهرام حسامی[۲]، غلامرضا صالحی‌جوزانی[۴] و رضا شرفی[۴]

۱- بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲- بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۳- بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۴- بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
مسئول مکاتبات: رسول مرزبان، پست الکترونیکی: r.marzban@areeo.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۲۹ ۷(۱) ۱۴۳–۱۵۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۴/۰۳

چکیده

پروانه برگ‌خوار مصری پنبه (Boisduval) *Spodoptera littoralis*، آفتی همه چیزخوار با دامنه میزبانی وسیع است که همه ساله خسارت قابل توجهی به محصولات کشاورزی وارد می‌کند. مشخص شده است که همه سویه‌های *Bacillus thuringiensis* (Bt) روی این آفت مؤثر نیستند و سویه‌های کمی با توجه به توکسین‌های پروتئینی خود روی آن مؤثرند. هدف از اجرای تحقیق حاضر، دستیابی به سویه‌های Bt بومی با قابلیت کنترل پروانه برگ‌خوار مصری و بررسی تاثیر محیط کشت تکثیر باکتری بر قابلیت حشره‌کشی سویه‌های منتخب بود. بدین منظور، قدرت بیمارگری ۱۱۸ سویه بومی Bt (رشد داده شده در محیط R2NB) روی لاروهای پنج روزه پروانه برگ‌خوار مصری پنبه در دمای ۲۷ درجه سلسیوس روی غذای مصنوعی بررسی و غربال شدند. درصد مرگ و میر ۱۱۸ سویه باکتری با غلظت 10^3 اسپور در میلی‌لیتر نشان داد که چهار سویه GON–9، QM–2، GN–13 و QM–1 به ترتیب با ۹۳/۳۳، ۷۰، ۴۶/۶۷ و ۴۳/۳۳ درصد، بالاترین میزان مرگ و میر و سویه های GN–12، EN–2، GON–12، GON–7، CHI–2، AGI–7، AGI–3 و AGI–2 روی لاروهای *S. littoralis* بی‌تأثیر بودند. سپس سویه‌های مؤثر در دو محیط کشتNutrient Broth و R2NB تکثیر شده، روی آفت مذکور ارزیابی شدند. نتایج نشان داد چهار سویه منتخب در محیط کشت R2NB نسبت به NB روی لاروهای پروانه برگ‌خوار مصری اثر کشندگی بیشتری داشتند و تفاوت آنها معنی‌دار بود. همچنین محتویات ژن‌های *cry* خصوصا ژن *cry*2Ab در سویه‌های مؤثر مورد بررسی و ردیابی قرار گرفت. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که سویه‌های QM–1، QM–2 و GON–9 حاوی ژن *cry*2Ab هستند.

واژه‌های کلیدی: قدرت بیمارگری، پروانه برگ‌خوار مصری پنبه، محیط کشت، *Spodoptera littoralis* , *Bacillus thuringiensis*, *cry* genes

مقدمه

پروانه برگ‌خوار مصری پنبه *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lep.:Noctuidae) یک آفت همه چیزخوار با دامنه میزبانی وسیع است که خسارت قابل توجهی به بیش از ۱۱۲ گونه گیاهی متعلق به ۴۴ خانواده وارد می‌کند (Alfazairy *et al*., 2013; Robinson *et al*., 2010; Hatem *et al*., 2011). در کشورهای مدیترانه‌ایی و آسیایی از آفات مهم پنبه، تنباکو و ذرت بشمار می‌آید (Çakici *et al*., 2014) و در مناطق گرمسیری ایران باعث خسارت روی یونجه، چغندرقند و سبزیجات می‌شود (خداوردی و همکاران،۱۳۸۹). خسارت این آفت در خوزستان، ۱۰ تا ۱۵ درصد و در سال‌های طغیان تا ۹۰ درصد گزارش شده است (مدنی، ۱۳۹۵). استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی،

استراتژی کنترل رایج برای *S. littoralis* است که در طی سال‌های متمادی باعث بروز مقاومت شده است (Sorour *et al*., 2011; Arrizubieta *et al*., 2014; Ullah *et al*., 2014). از طرفی کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی، آثار سوء روی انسان، محیط زیست و دیگر موجودات زنده بخصوص دشمنان طبیعی آفات می‌گذارد (Xu *et al*., 2001; Arthur & Philips, 2003; Wei *et al*., 2003). لذا بکارگیری روش‌های غیرشیمیایی به ویژه کنترل زیستی ضروری است (Lacey *et al*., 2001 و معقولی فرد و همکاران،۱۳۹۶a). باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) یکی از میکروارگانسیم‌های مؤثر در کنترل آفات کشاورزی و جنگل‌ها است (Lacey *et al*., 2015; Salehi Jouzani *et al*., 2017). باکتری Bt، باکتری هوازی و گرم مثبت است که توانایی تولید بلورهای پروتئینی سمی یا دلتا اندوتوکسین برای حشرات (که توسط ژن‌های *cry* کد می‌شوند) در طول دوره اسپور زایی دارند. این بلورهای پروتئینی خاصیت کشندگی بالایی روی طیف وسیعی از آفات بخصوص بال‌پولک‌داران، سخت بال پوشان و دوبالان دارند (Mansour *et al*., 2012; Marzban *et al*., 2016; Salehi Jouzani *et al*., 2017). تاکنون بیش از ۱۰۰ زیرگونه از باکتری Bt با خصوصیات مختلف فیلوژنتیکی و سروتایپی شناسایی شده است. بر اساس آخرین آمار، در طی ۳ دهه گذشته حدود ۸۲۰ ژن مختلف *cry* (*cry1–cry78*)، ۱۴۷ ژن *vip* (*vip1–3*) و ۴۰ ژن *cyt* (*cyt1–3*) در سویه‌های مختلف Bt در دنیا شناسایی شده است. این تنوع عظیم ژن‌های با دامنه حشره‌کشی وسیع، باکتری Bt را تبدیل به یک آفت‌کش زیستی منحصر به فرد با کاربرد گسترده در دنیا نموده است (Azizoglu *et al*., 2020).

کریستال‌های پروتئینی Cry1، Cry2 و Cry9 روی لاروهای بال‌پولک‌داران بیشترین تأثیر را دارند (Bravo *et al*.,1998). در حالی‌که لاروهای سن اول و دوم *S. littoralis* از راسته بال‌پولک‌داران حساسیت بالایی نسبت به دلتا اندوتوکسین اختصاصی خود دارند اما لاروهای سن سوم تا ششم در بعضی موارد به این سموم مقاومت نشان می‌دهند (Dutton *et al*., 2003). از آنجا که کنترل بعضی آفات با کریستال‌های پروتئینی موجود باکتری Bt ممکن نیست، مطالعه بیشتر روی سموم زیستی با قدرت کشندگی بالا ضروری است. بدلیل این‌که، گسترش مقاومت حشرات نسبت به سموم Bt، به مکانسیم‌های متعددی نیاز دارد، مقاومت آفات به فرمولاسیون‌های Bt نسبت به آفت‌کش‌های شمیایی با سرعت کمتر و با احتمال کمتری صورت می‌گیرد (Ullah *et al*., 2014; Qayyum *et al*., 2015). با این حال، یافتن سویه‌های بومی جدید و مؤثر با احتمال بروز مقاومت کمتر این آفات به آنها ضروری است (Magholifard *et al*.,2020). لذا، هدف از اجرای تحقیق حاضر، غربال سویه‌های بومی Bt روی پروانه برگ‌خوار مصری پنبه و انتخاب سویه و محیط کشت مناسب برای کنترل آفت مذکور بود.

مواد و روش ها

۱- پرورش حشره

لاورهای سنین مختلف *S. littoralis* از مزارع پنبه دزفول جمع‌آوری و در اتاق پرورش سترون تحت شرایط محیطی دمای ۲۷درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره روشنایی 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٪ قرار داده شد. برای تهیه غذای مصنوعی لاروها، ۲۶۶/۵ گرم لوبیا چیتی که به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شده بود به همراه ۴۰ گرم مخمر آبجو، دو و نیم گرم نپاژین (متیل پاراهیدروکسی بنزووآت)، یک و بیست و پنج گرم اسید سوربیک، چهار 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 چهار درجه سلیسیوس نگهداری شد (با تغییراتی در جیره ارایه شده توسط Navon, 1985).

۲- مراحل آماده سازی باکتری

تعداد ۱۱۸ سویه بومی باکتری Bt که قبلا از خاک‌های زراعی مناطق مختلف کشور جداسازی شده بودند از کلکسیون بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور دریافت شد (Marzban, 2002; Marzban & Salehi, 2006). چهار روز بعد از کشت اولیه سویه‌ها روی محیط کشت Nutrient agar در دمای ۲۷ درجه سلسیوس، سه لوپ از باکتری کشت داده شده در یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد و به ۹۹ میلی‌لیتر محیط کشت R2NB (سه گرم عصاره گوشت، پنج گرم پپتون، ۵۰ گرم عصاره برنج در یک لیتر آب مقطر استریل) در ارلن های ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد که به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه داخل شیکرانکوباتور و سپس به مدت یک ساعت در دمای ۴- درجه سلسیوس برای اسپورزایی بیشتر قرار گرفتند. بعد از کشت نهایی و انجام زیست سنجی‌های اولیه برای بدست آوردن غلظت مطلوب، سوسپانسیون سویه‌های باکتری با غلظت 10^3 اسپور در میلی‌لیتر بوسیله رقیق کردن با Tween 80 (0.4%) تهیه شد.

۳- غربال‌گری سویه‌های باکتری

برای غربال‌گری سویه‌ها، لاروهای پنج روزه بصورت انفرادی داخل ظروف پلاستیکی (ارتفاع سه سانتی‌متر و قطر شش سانتی‌متر) حاوی غذای مصنوعی به ابعاد یک سانتی‌متر مکعب قرار گرفتند. برای هر سویه سه تکرار و در هر تکرار ۱۵ عدد لارو استفاده شد. هر غذای مصنوعی با نیم میلی‌لیتر از غلظت ساخته شده بوسیله نمونه‌گیر آلوده شد و تیمار شاهد غذای مصنوعی بدون آلودگی در نظر گرفته شد. برای اطمینان از تغذیه لاروها از غذای آلوده، لاروها به مدت دو تا چهار ساعت قبل از شروع آزمایش تغذیه نشدند (Burges & Thompson, 1971). ظروف داخل ژرمیناتور در دمای ۲۷ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و دوره روشنایی ۸:۱۶ ساعت قرار گرفتند. بعد از ۴۸ ساعت و اطمینان از تغذیه لاروها از غذای آلوده، لاروهای زنده مانده به داخل ظروف مشابه همراه با غذای مصنوعی عاری از آلودگی منتقل شدند. میزان مرگ و میر لاروها تا هفت روز از شروع آزمایش ثبت شد. پس از مشخص شدن سویه‌های مؤثر باکتری در کنترل این آفت، سویه‌ها در دو محیط کشت Nutrient Broth و R2NB بطور جداگانه کشت شدند و آزمایشاتی مشابه با مراحل و شرایط آزمایشات قبلی برای بررسی اثر محیط کشت روی عملکرد سویه‌های مؤثر صورت گرفت.

٤- تعیین LC_{50} مؤثرترین سویه باکتری

برای تعیین LC_{50} مؤثرترین سویه باکتری روی *S. littoralis* غلظت‌های حداقل و حداکثر با زیست‌سنجی اولیه محاسبه و با استفاده از فواصل لگاریتمی غلظت‌های $1/9\times10^6$، $6/3\times10^6$، $1/9\times10^7$، $6/3\times10^7$، $1/9\times10^8$، $6/3\times10^8$ و $1/9\times10^9$ اسپور در میلی‌لیتر برای انجام آزمایشات زیست‌سنجی روی لاروهای پنج روزه آفت ساخته شد. تعداد ۳۰ لارو برای هر غلظت در سه تکرار انتخاب شد. آزمایش مانند شرایط آزمایش‌های قبلی انجام شد و شمارش تلفات از روز دوم آلودگی بصورت روزانه ثبت شد.

۵- ردیابی ژن‌های *cry* در سویه‌های مؤثر باکتری

۵-۱- استخراج DNA

برای استخراج DNA از سویه‌های بومی، ابتدا سویه‌ها به مدت یک شب در محیط Luria–Bertani کشت داده شدند. سپس به تیوپ یک و نیم میلی‌لیتری منتقل و سانتریفیوژ (پنج دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه) انجام شد. مایه رویی دور ریخته شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل روی پلت ریخته شد. به مدت یک ساعت در دمای ۷۰- درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از گذشت یک ساعت ویال‌ها مستقیماً به مدت پنج دقیقه به آب جوش منتقل شدند. برای جداسازی مواد اضافه، به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ

شد. مایع رویی به عنوان نمونه DNA برای PCR بکار گرفته شد. غلظت نمونه DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (NanoDrop^{TM}) اندازه‌گیری شد.

۵-۲- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

بعد از استخراج DNA، برای بررسی حضور یا عدم حضور ژن‌های *cry1*، *cry1Ab*، *cry1Ac*، *cry1C*، *cry2* و *cry2Ab* از آغازگرهای اشاره شده در جدول ۱ استفاده شد (Jua´rez–Pe´rez *et al*., 1997; Seifinejad *et al*., 2008; Salehi Jouzani *et al*., 2008). PCR براساس روش (Jua´rez–Pe´rez *et al*., 1997) برای ۲۵۰ نانوگرم کل DNA باکتری با ۲/۵ واحد آنزیم تک DNA پلی‌مراز (Taq–DNA polymerase)، ۲۰۰ میلی مولار از هر دزوکسی نوکلئوتیدهای سه فسفاته (dNTP)، یک میلی مولار از هر آغازگر و سه میلی مولار دی کلرید منیزیم ($MgCl_2$) در حجم نهایی ۵۰ میکرو لیتر صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت بیوراد (Bio–Red thermal cycler) صورت گرفت. مراحل واکنش شامل مرحله واسرشته سازی اولیه (Pre–denaturation) در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشته سازی (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه (۲۵ چرخه)، مرحله اتصال آغازگر (Annealing) در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله گسترش (Extension) در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و نهایتا مرحله گسترش نهایی (Final extension) در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه (۲۵ چرخه) بود.

۵-۳- الکتروفورز محصول PCR و آنالیز داده‌ها

محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد در بافر Tris–acetate–EDTA در دستگاه الکتروفورز آنالیز و وزن مولکولی محصولات PCR حاصله به همراه مارکر 1kb ladder اندازه‌گیری شد. ژل مربوطه (حاوی اتیدیوم بروماید) تحت نور لامپ ماوراء بنفش بررسی و سپس با دستگاه ژل داک عکس‌برداری شد. در نهایت اندازه باندهای بدست آمده با اندازه مورد انتظار مقایسه شد. لازم به ذکر است که آزمایشات برای هر ژن حداقل دو بار تکرار شد.

جدول۱– آغازگرهای عمومی و اختصاصی ژن‌های *cry* موثر بر راسته بالپولکداران مورد استفاده در تحقیق حاضر

Table 1. The universal and specific primers for lepidopteran active *cry*–type genes used in the present study

cry gene	Primer Name	Sequence	Product Size (bp)	Accession No.
cry1	UNcry1(+)	Degenerate 5 '– TRACRHTDDBDGTATTAGAT–3 '	1500–1600	
	UNcry1(–)	Degenerate 5 '– MDATYTCTAKRTCTTGACTA–3 '		
		Note:		
		B= C, G, or T; D= A, G, or T; H= A, C, or T;		
		K= G or T ; M= A or C; R= A or G; Y= T or C.		
cry1Ab	SPcry1Ab(+)	5 '– CGGATGCTCATAGAGGAGAA–3 '	1371	M13898
	UNcry1(–)	5 '–TRACRHTDDBDGTATTAGAT–3 '		
cry1Ac	SPcry1Ac(+)	5 '– GGAAACTTTCTTTTTAATGG–3 '	844	M11068
	UNcry1(–)	5 '–TRACRHTDDBDGTATTAGAT–3 '		
cry1C	SPcry1C(+)	5 '– ATTTAATTTACGTGGTGTTG–3 '	1,176	X07518
	UNcry1(–)	5 '–TRACRHTDDBDGTATTAGAT–3 '		
cry2	UNcry2(+)	5 '–GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG–3 '	680–700	M31738
	UNcry2(–)	5 '–CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT–3 '		X55416 X57252
cry2Ab	UNcry2(+)	5 '–GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG–3 '	546	X55416
	SPcry2Ab(–)	5 '–TGGCGTTAACAATGGGGGGAGAAAT–3 '		

٦- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی انجام و درصد تلفات با فرمول ابوت M [%]= [(t–c)/(100–c)]×100 =[%] M، اصلاح شد (M = درصد مرگ و میر اصلاح شده، t = درصد مرگ و میر مشاهده شده در تیمار، C = درصد مرگ و میر شاهد) (Abbott, 1925). داده‌های حاصل از آزمایش توسط نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد (SPSS, 1998) و مقایسه میانگین‌ها بوسیله آزمون دانکن در سطح پنج درصد و آزمون T نمونه‌های جفتی در سطح پنج درصد بررسی شد. با استفاده از نرم افزار SAS غلظت کشنده ۵۰ درصد LC_{50} مؤثرین سویه باکتری محاسبه شد (SAS Institute, 1999).

نتایج

بر اساس نتایج بدست آمده از بین ۱۱۸ سویه باکتری با غلظت 10^3 اسپور در میلی‌لیتر روی لاروهای پنج روزه *S. littoralis*، چهار سویه GON–9، QM–2، GN–13 و QM–1 به ترتیب با ۹۳/۳۳، ۷۰، ۴۶/۶۷ و ۴۳/۳۳ درصد، بالاترین میزان تلفات را داشته و سویه‌های GN–12، EN–2، GON–12، GON–7، CHI–2، AGI–7، AGI–3 و AGI–2 بی‌تأثیر بودند (جدول ۲).

مقایسه عملکرد چهار سویه مؤثر با بالاترین درصد تلفات در دو محیط کشت R2NB و NB نشان داد که کشت باکتری در محیط R2NB روی مرگ و میر لاروی *S. littoralis* نسبت به NB تفاوت معنی‌دار دارد و از عملکرد خیلی خوبی برخوردار است (شکل ۱).

با توجه به عملکرد بهتر سویه‌ها در محیط کشت R2NB، زیست‌سنجی چهار سویه مؤثر در این محیط کشت نشان داد سویه GON–9 بطور معنی‌داری نسبت به سه سویه دیگر دارای اثرات کشندگی بالاتری است ($F(3,8)=10.08$, $P<0.004$) (جدول ۳)

جدول ۲- زیست‌سنجی سویه‌های *Bacillus thuringiensis* بومی روی لارو پنج روزه *Spodoptera littoralis*

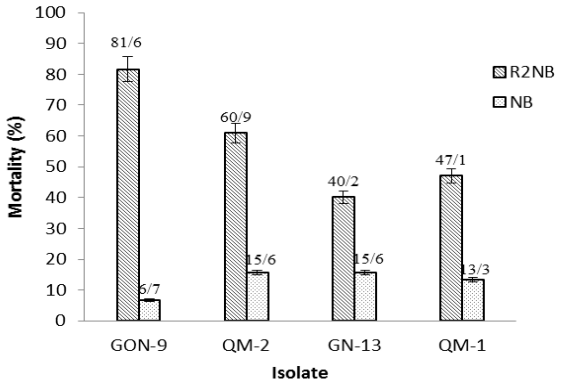
Table 2. Bioassay of the Bt native isolates on the 5–old–day larvae of *Spodoptera littoralis*

Isolate	Mortality (%)±SE	Isolate	Mortality (%)±SE
AGI–1	20 ± 5.78^{def}	GN–17	16.67 ± 3.33^{efg}
AGI–2	0 ± 00^{h}	GN–18	6.67 ± 3.33^{gh}
AGI–3	0 ± 00^{h}	GN–19	10 ± 5.78^{fgh}
AGI–4	13.33 ± 6.67^{efg}	GON–3	30 ± 5.78^{de}
AGI–5	36.67 ± 10^{cd}	GON–4	16.67 ± 6.67^{efg}
AGI–6	26.66 ± 14.5^{de}	GON–5	6.67 ± 3.33^{gh}
AGI–7	0 ± 00^{h}	GON–6	6.67 ± 3.33^{gh}
AGI–8	3.33 ± 3.33^{gh}	GON–7	0 ± 00^{h}
AL–1	20 ± 5.78^{def}	GON–8	6.67 ± 3.33^{gh}
AL–2	26.67 ± 6.67^{de}	GON–9	93.33 ± 3.33^{a}
AL–3	6.67 ± 3.33^{gh}	GON–10	13.33 ± 3.33^{efg}
AL–4	20 ± 5.78^{def}	GON–11	13.33 ± 6.67^{efg}
AL–5	20 ± 5.78^{def}	GON–12	0 ± 00^{h}
AL–6	6.67 ± 6.67^{gh}	HN–1	16.67 ± 3.33^{efg}
AL–7	20 ± 00^{def}	HON–1	30 ± 5.78^{de}
AL–8	16.67 ± 8.81^{efg}	HON–2	6.67 ± 6.67^{gh}
AL–9	20 ± 5.78^{def}	HON–3	3.33 ± 3.33^{gh}
AL–10	3.33 ± 3.33^{gh}	IM–1	33.3 ± 6.67^{cd}
AL–11	3.33 ± 3.33^{gh}	KH–1	26.67 ± 6.67^{de}
AL–12	10 ± 5.78^{fgh}	KH–2	3.33 ± 3.33^{gh}
AL–13	16.67 ± 6.67^{efg}	KH–3	23.33 ± 3.33^{def}
ASHI–1	30 ± 5.78^{de}	KH–4	3.33 ± 3.33^{gh}
ASHI–2	16.67 ± 8.82^{efg}	KH–5	10 ± 00^{fgh}
ASHI–3	6.67 ± 3.33^{gh}	KH–6	16.67 ± 12.01^{efg}
BR–1	13.33 ± 3.33^{efg}	KH–9	30 ± 5.78^{de}
BR–2	10 ± 00^{fgh}	KH–10	33.33 ± 16.67^{cd}
BR–3	6.67 ± 6.67^{gh}	KD–1	30 ± 10^{de}

BR–5	13.33±13.33^{efg}	KD–2	3.33±3.33^{gh}
BR–6	20±11.55^{def}	KD–3	36.67±8.82^{cd}
BR–7	13.33±6.67^{efg}	KD–4	16.67±3.33^{efg}
CHI–1	10±5.78^{fgh}	KD–5	20±5.75^{def}
CHI–2	0±00^{h}	KD–6	6.67±3.33^{gh}
CHI–3	10±5.78^{fgh}	KD–7	6.67±3.33^{gh}
CHI–4	6.67±3.33^{gh}	KN–1	6.67±3.33^{gh}
CHI–5	6.67±6.67^{gh}	KN–2	3.33±3.33^{gh}
CHI–6	30±25.2^{de}	KN–3	3.33±3.33^{gh}
CHI–7	3.33±3.33^{gh}	KN–4	10±00^{fgh}
CHI–8	6.67±3.33^{gh}	KON–1	30±10de
CHI–9	3.33±3.33^{gh}	KON–3	16.67±6.67^{efg}
CHI–10	0±00^{h}	KON–4	6.67±3.33^{gh}
CHI–11	13.33±8.82^{efg}	KON–5	6.67±3.33^{gh}
EN–1	6.67±6.67^{gh}	KON–6	3.33±3.33^{gh}
EN–2	0±00^{h}	KON–7	20±00^{def}
EN–3	10±00^{fgh}	MI–1	10±00^{fgh}
EN–4	10±5.77^{fgh}	MI–2	13.33±8.82^{efg}
EN–5	16.67±3.33^{efg}	MN–1	6.67±3.33^{gh}
FS–1	6.67±3.33^{gh}	MN–2	20±5.75^{def}
GN–2	10±5.75^{fgh}	QN–1	16.67±12.01^{efg}
GN–3	10±5.75^{fgh}	QM–1	46.67±23.33^{bc}
GN–4	16.67±3.33^{efg}	QM–2	70±10^{b}
GN–5	3.33±3.33^{gh}	TN–1	20±5.78^{def}
GN–6	6.67±3.33^{gh}	YD–1	13.33±6.67^{efg}
GN–7	6.67±3.33^{gh}	YD–2	20±11.54^{def}
GN–8	3.33±3.33^{gh}	YD–3	10±00^{fgh}
GN–9	13.33±13.33^{efg}	YD–4	10±00^{fgh}
GN–10	23.33±8.82^{def}	YD–5	3.33±3.33^{gh}
GN–11	16.67±6.67^{efg}		
GN–12	0±00^{h}		
GN–13	43.33±3.33^{c}		
GN–14	20±15.27^{def}		
GN–15	13.33±13.33^{efg}		
GN–16	13.33±13.33^{efg}		
DF	117		
F	3.418		
P	0.001		

داده‌های جدول بصورت میانگین(±SE) می‌باشند. آزمون دانکن (P <0.05) انجام شد و میانگین‌هایی که دارای حروف یکسان درون هر ستون هستند با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

The data in the table are means (±SE). Means within the same column followed by a different letter are significantat (P <0.05), according to Duncan test.



شکل ۱– نتایج زیست‌سنجی سویه‌های منتخب Bt روی لارو پنج روزه *Spodoptera littoralis* در محیط‌های کشت R2NB و NB

Fig.1. The bioassay results of the selected Bt strains on the 5–day–old larvae of *Spodoptera littoralis* in R2NB and NB media

جدول ۳– نتایج زیست‌سنجی سویه‌های منتخب Bt (کشت شده در محیط کشت R2NB) روی لارو پنج روزه *Spodoptera littoralis*

Table 4. The results of bioassay of the selected strains cultured in R2NB on the 5–day–old larvae of *Spodoptera littoralis*

Isolate	Mortality (%)[1,2]
GON–9	81.6±2.23[a]
QM–2	60.9±4.47[b]
GN–13	40.2±9.67[c]
QM–1	47.1±2.2[bc]
DF	3
F	10.08
P	0.004

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

۲– درصد تلفات توسط فرمول Abbot اصلاح شد.

1. The data in the table are means ±SE. Means within the same column followed by a different letter are significant (P <0.05), according to Duncan test.
2. The percentage of mortality was corrected using Abbot's formula.

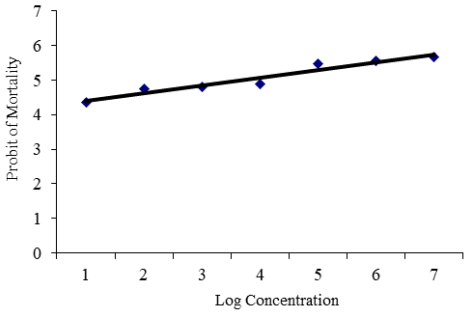
جدول ۴– تعیین مقادیر کشنده ۲۵ درصد (LC_{25})، ۵۰ درصد (LC_{50}) و ۷۵ درصد (LC_{75}) سویه GON–9 باکتری روی لارو پنج روزه *Spodoptera littoralis*

Table 5. The bioassay results of the strain GON–9 on the 5–day–old larvae of *Spodoptera littoralis*

Isolate	LC_{25}	LC_{50}	LC_{75}	Slope	Intercept	χ^2	*df*	Pr> Chisq
GON–9	8.31×10^5 (8.1×10^4–2.9×10^6)	2.78×10^7 (1.1×10^7–6×10^7)	9.69×10^8 (3.6×10^8–5.2×10^9)	0.44	3.28–	1.42	5	0.9222

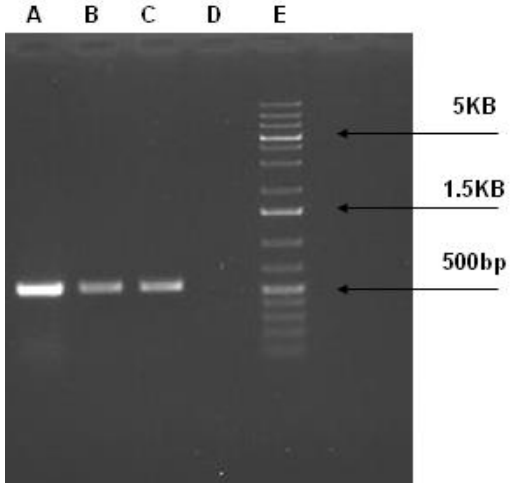
مقادیر کشنده ۲۵ درصد (LC_{25})، ۵۰ درصد (LC_{50}) و ۷۵ درصد (LC_{75}) سویه GON–9 باکتری روی لاروهای پنج روزه *S. littoralis* به ترتیب برابر با ۸/۳×۱۰^{۵}، ۲/۸×۱۰^{۷} و ۹/۷ ×۱۰^{۸} اسپور در میلی لیتر محاسبه شد (شکل ۲ و جدول ۴).

نتایج ردیابی ژن‌های *cry* در سویه‌های منتخب نشان داد که زیر مجموعه‌های ژن *cry1* شامل *cry1Ab*، *cry1Ac*، *cry1C* در چهار سویه GN–13، QM–1، QM–2 و GON–9 وجود ندارند. با این حال ژن *cry2Ab* در سویه‌های QM–1، QM–2 و GON–9 مشاهده شد (شکل ۳).



شکل۲– نتایج زیست سنجی سویه GON–9 روی لاروهای پنج روزه *Spodoptera littoralis*

Fig. 2. The bioassay results of the strain GON–9 on the 5–day–old larvae of *Spodoptera littoralis*



شکل ۳– محصول PCR روی ژل الکتروفورز ۱٪ سویه های Bt، A: QM–1، B: QM–2، C: GON–9، D: کنترل منفی، E، مارکر لدر (Ladder).

Fig. 3. Agarose gel (1%) electrophoresis of PCR products amplified from Bt strains. A: QM–1, B: QM–2, C: GON–9, D: negative control, E: molecular weight marker (1kb).

بحث

در این تحقیق قدرت بیمارگری ۱۱۸ سویه بومی باکتری Bt، روی پروانه برگ‌خوار مصری پنبه بررسی شد. بر اساس نتایج حاصله، چهار سویه GON–9، QM–2، GN–13 و QM–1 به ترتیب با ۹۳/۳۳، ۷۰، ۴۶/۶۷ و ۴۳/۳۳ درصد تلفات لاروی بعنوان سویه های مؤثر انتخاب شدند. نتایج تحقیقات قبلی نشان داده بود که سویه‌های KON–4، YD–5، AGI–2، MI–1، KH–4 و QM–1 باکتری Bt روی لاورهای سوسک برگ‌خوار نارون (*Xanthogaleruca luteola*) به ترتیب ۷۵، ۶۸، ۵۶، ۵۳، ۸۵ و ۶۵٪ کشندگی دارند (Nazarian *et al*., 2009). در تحقیق حاضر، این شش سویه باکتری به جز QM–1 روی لاروهای پروانه برگ‌خوار مصری پنبه (*S. littoralis*) تأثیر کمی داشتند که نشان می‌دهد این سویه‌ها بیشتر بر سخت‌بال‌پوشان موثر هستند. دلیل تأثیر متفاوت سویه‌های Bt، وجود ژن‌های متفاوت کد کننده پروتئین‌های سمی (Cry) و همین‌طور میزان بیان این ژن‌هاست (Federici,1999). سویه‌های مختلف باکتری Bt حتی در یک گونه در میزان بیماریزایی برای یک حشره خاص به دلیل توکسین‌های مختلف تولید شده توسط استرین‌ها ممکن است متفاوت باشند (Dulmage, 1970). طبق نتایج حاصله از این تحقیق، از بین چهار سویه GON–9 ، QM–2 ، GN–13 و QM–1، سویه GON–9 مرگ و میری بیشتری روی لاروهای *S. littoralis* نشان داد. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نوع محیط کشت بر میزان کشندگی سویه‌های Bt موثر است. سویه‌های تولید شده در محیط کشت R2NB نسبت به NB عملکرد بهتری از نظر کشندگی نشان دادند. عملکردهای متفاوت باکتری‌ها در محیط کشت‌های مختلف احتمالا مربوط به میزان تحریک بیان ژن‌های مؤثر باکتری (*cry*) است. بیان ژن‌های کریستال‌های سمی روی ژنوم باکتری Bt، بسته به محیط کشت باکتری متفاوت است (Dutton *et al*., 2005). ژن‌های *cry*2Ab (Dahi, 2012)، *cry*1Ac (Greenplate, 1999) در گیاه پنبه تراریخته (*Gossypium barbadense*) و ژن *cry*1Ab (Dutton *et al*., 2005) و ژن *cry*2Ab (Svobodová *et al*., 2016) در ذرت تراریخته (*Zea*

(*Beta vulgaris*) و ژن *cry*1Ab در چغندرقند تراریخته (*mays*) (Jafari *et al*., 2009) بیان شده و باعث مقاومت این گیاهان در برابر آفت *S. littoralis* شد. *S. littoralis* و بقیه بال‌پولکداران در لاروهای سن اول و دوم دارای حساسیت بالایی نسبت به توکسین‌های خاص خود دارند در حالی که از سن سوم لاروی به بعد، به دلیل فعالیت بالای پروتئولیتیک که منجر به تخریب کامل توکسین می‌شود، مقاومند (Bai *et al*., 1993; Keller *et al*., 1996). در مواردی با وجود بیان ژن و ساخته شدن کریستال‌های پروتئینی، به دلیل کاهش اتصال توکسین به گیرنده‌های موجود در روده میانی، کاهش حل شدن پروتوکسین، انجام فرآیندهای پروتئولیتیک پروتوکسین و تخریب و رسوب توکسین توسط پروتئازها، مقاومت به Bt نشان داده شد (Bruce *et al*., 2007). بنابراین یافتن سویه‌های قوی‌تر علیه *S. littoralis* و انتخاب محیط کشت با عملکرد بهتر و مبارزه با لاروهای آفت در سنین پایین‌تر برای کاهش مقاومت به باکتری و کاهش صدمات حاصل از تغذیه لاروها اهمیت دارد.

در این تحقیق، غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) سویه GON–9 $۲/۸\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد. در تحقیقات صورت گرفته توسط دیگر محققین، غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) سویه‌های M27 و K66 باکتری Bt برای کنترل لاروهای تازه تفریخ شده پروانه برگ‌خوار مصری پنبه، به ترتیب $۰/۳۱\times۱۰^{۸}$ و $۰/۸۹\times۱۰^{۸}$ اسپور در میلی‌لیتر محاسبه شد (Alfazairy *et al*., 2013). LC_{50} سویه M27 با مقدار LC_{50} سویه GON–9 در مطالعات ما مشابه بود. علت تفاوت مقدار LC_{50} سویه K66 با LC_{50} سویه GON–9 در این تحقیق را می‌توان تفاوت در سن لاروی و نوع سویه بیان کرد. Salama *et al*.(1989) مقدار غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) سویه‌های HD–129 و HD–635 باکتری Bt روی لارو سن دوم پروانه برگخوار مصری پنبه به ترتیب $۲/۲\times۱۰^{۳}$ و $۱/۶\times۱۰^{۳}$ میکروگرم در میلی‌لیتر بیان کردند. Hatem *et al*.(2012) مقدار LC_{50}، Cry1Ac باکتری Bt روی لارو سن اول *S. littoralis*، $۵/۸\times۱۰^{۱۰}$ میکروگرم در میلی‌لیترمحاسبه کردند. علت اختلاف در نتایج را می‌توان تفاوت در روش آزمایشها و تفاوت در نوع سویه و تفاوت در بیان ژن‌های *cry* دانست.

در این مطالعه، وجود ژن‌های *cry*1، *cry*2، *cry*1Ac، *cry*1C و *cry*2Ab که روی حشرات راسته بالپولکداران مؤثرند، بررسی شد و ژن *cry*2Ab در سویه‌های GON–9، QM–1 و QM–2 ردیابی شد. سیفی‌نژاد و همکاران وجود ژن *cry*2Ab در سویه QM–1 بر علیه لاروهای *H. armigera* گزارش کردند (Seifinejad *et al*. 2008). لیو و همکاران گزارش کردند که توکسین‌های کریستالی Cry1Ab، Cry1Ac، Cry2Aa و Cry2Ab بیشترین اثر کشندگی را روی لاروهای *H. armigera* دارند (Liao *et al*., 2009). سویه‌های Bt حاوی ژن‌های *cry*1 و *cry*2 روی لاروهای *S. littoralis* مؤثرند (Alfazairy *et al*., 2013). سویه‌های بومی باکتری Bt حاوی ژن‌های *cry*1Aa، *cry*1Ac، *cry*2 و *cry*3 بیشترین اثر کشندگی روی لاروهای *S. littoralis* نشان دادند (Aly *et al*., 2008). سویه‌های حاوی ژن‌های *cry*2Ab و *cry*1Ac باعث مرگ و میر لاروهای *S. littoralis* شدند (Dahi, 2012).در پایان با توجه نتایج تحقیق حاضر می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که سویه‌های حاوی ژن فعال *cry2Ab* روی لاروهای پروانه برگ‌خوار مصری پنبه کشندگی خوبی دارند و در این تحقیق نیز سه سویه GON–9، QM–1 و QM–2 که حاوی این ژن بودند روی این لاروهای این آفت اثر کشندگی بالایی نشان دادند. در ضمن تحقیق حاضر نشان داد که نوع محیط کشت استفاده شده برای تولید سویه‌های Bt اثر معنی داری بر میزان کارایی و سمیت سویه‌های Bt دارد.

References

Abbott, W.S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology. 18: 265–267.

Alfazairy, A.A., El–Ahwany, A.M.D., Mohamed, E.A., Zaghloul, H.A.H. & El–Helow., E.R. 2013. Microbial control of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) by Egyptian *Bacillus thuringiensis* isolates. Folia Microbial, 58: 155–162.

Aly, N.A.H., Soliman. E.A.M., El–Kawokgy, T. 2008. RAPD identification of local *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to *Spodoptera littoralis* and *Culex pipiens* using universal primers for *cry* genes. Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science Biotechnology, 2(2): 60–66.

Arrizubieta, M., William, T., Caballero, P., Simon, O. 2014. Selection of a nucleopolygedrovirus isolate from *Helicoverpa armigera* as the basis for a biological insecticide. Pest Management Science, 70(6): 967–976.

Arthur, F.H. & Philips, T.W. 2003. Stored–product insect pest management and control, pp. 341–358. In Y.H. Hui, B.L., Bruinsma, J.R., Gorham, W.K., Nip, P.S., Tong, P Ventresca., (eds.), Food plant sanitation. Marcel Dekker, New York.

Azizoglu, U., Salehi Jouzani, G., Yilmaz, N., Baz, E. & Ozkok, D. 2020. Genetically modified entomopathogenic bacteria, recent developments, benefits and impacts: A review. Science of the Total Environment. PP.139–169.

Bai, C., Degheele. D., Janses., S., Lambert., B. 1993. Activity of insecticidal proteins and strans of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker). Journal of Invertebrate Pathology. 62: 211–215.

Bravo, A., Gill., S.S., Soberón M. Mode of action of *Bacillus thuringiensi*s Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon. 49(4): 423–435.

Bruce, M.J., Gatsi, R., Crickmore, N., Sayyed, A.H. 2007. Mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the Diamond back Moth. Biopesticides International. 3(1): 1–12.

Burges, H.D. & Thompson, E.M. 1971. Standardization and assay of microbial insecticides. In: Burges, H.D., Hussey, N.W. (eds.), Microbial control of insects and mites. Academic., New York, p 709.

Çakici, F.Ö., Sevim. A., Demirbağ, Z., Demir., İ. 2014. Investigation interal bacteria of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae and some Bacillus strains as biocontrol agents. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 38: 99–110.

Dahi, H.F. 2012. Efficacy of Bt transgenic egyption cotton varieties expressing *cry*1Ac and *cry*2Ab genes against *Spodoptera littoralis* (Boisd). Journal of American Sciences. 8(3): 457–463.

Dulmage, H.T. 1970. Insecticidial activity of HD–1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. Journal of Invertebrate Pathology. 15: 232–239.

Dutton, A., Romeis, J. Bigler, F. 2003. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt–maize expressing Cry1Ab as a case study. Biocontrol. 48: 611–636.

Dutton, A., Romeis, J., Bigler, F. 2005. Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis*. Entomologica Experimentalis Et Applicata. 114: 161–169.

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

Greenplate, J.T. 1999. Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein Cry1Ac over time in Bollgard cotton fruit and terminals. Journal of Economic Entomology. 92: 1377–1383.

Hatem, A.E., Aldebis, H.K., Osuna, E.V. 2011. Effects of *Spodoptera littoralis granulovirus* on the development and reproduction of cotton leafworm, *S.littoralis*. Biological Control. 59: 192–199.

Hatem, A.E., Reda, A.M. Amer., Osuna. E.V. 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.

Jafari, M., Noruzi, P., Malbobi, M.A., Valizadeh, M., Mohammadi, SA. 2009. Transformation of cry1Ab gene to sugar beet (Beta vulgaris L.) by Agrobacterium and development of resistance plant against *Spodoptera littoralis*. Sugar Beet Journal. 2 (24): 37–55.

Jua´rez–Pe´rez, V.M., Ferrandis, M.D., Frutos, R. 1997. PCR–based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. Applied and Environmental Microbiology. 63: 2997–3002.

Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovski, E., Regev, M., Koncz, C., Schell, J. Zilberstein. 1996. Digestion δ–endotoxin by midgut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instars of *Sodoptera littoralis* to Cry1C. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 26: 365–373.

Khodaverdi, H., Sahragard, A., Amirmoafi, M., Mohaghegh, J. 2010. Study of demographic parameters of Egyptian cotton leafworm on artificial diet in laboratory conditions. Iranian Journal of Plant Protection Science. 41(1): 61–69.

Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P. 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? Biological Control. 21: 230–248.

Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro–Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M. and Goettel, M.S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future, Journal of Invertebrate pathology. 132: 1–41.

Liao, C., Heckel, D.G., Akhurst, R. 2009. Toxicity of Bacillus thuringiensis insecticidial proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. Journal of Invertebrate Pathology. 80: 55–66.

Madani, S. 2016. Get to know the Egyptian cotton leafworm better. http://fspmarket.com/tutoralis/Spodoptera–littoralis–bois/ [Accessed 5 July 2016].

Magholifard, Z., Heami, Sh., Marzban, R., Salehi Jouzani, G. 2018. Pathogenic effects of three isolates of Nucleopolyhedrovirus, *Spodoptera littoralis* NPV, *Helicoverpa armigera* NPV, *Spodoptera litura* NPV on life stages of Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. Entomology and Phytopathology. 85(2):203–218.

Magholifard, Z., Heami, Sh., Marzban, R., Salehi Jouzani, G. 2020. Individual and combined biological effects of *Bacillus thuringiensis* and Multicapsid Nucleopolyhedrovirus on the biological stages of Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (B.) (Lep.:Noctuidae). Journal of Agricultural Science and Technology. 22(2):465–476.

Mansour, S.A., Foda, M.S., Aly, A.R. 2012. Mosquitocidal activity of two Bacillus bacterial endotoxins combined with plant oila and conventional insecticides. Industrial Crops and Products. 35: 44–52.

Marzban, R. 2002. Comparison bioassay of several native strains of Bt and *kurstaki* serotype on *Plodia interpunctella*. Journal of Plant Diseases and protection. 70: 29–36.

Marzban, R., Salehi Jouzani, G. 2006. Isolation of native *Bacillus thuringiensis* Berliner isolates from the agricultural soils of Iran. Journal of Agricultural Science. 1(2): 47–54.

Marzban R., Saberi F., Shirazi M.M., 2016. Microfiltration and Ultrafiltration of *Bacillus thuringiensis* Fermentation broth: Membrane performance and spore–crystal recovery approaches. Brazilian Journal Chemical Engineering. 33 (4): 783–791.

Nazerian, A., Jahangiri, R., Salehi Jouzani, G., Seifinejad, A., Soheilivand, S. Bagheri, O., Keshavarzi, M., Alamisaeid, K. 2009. Coleoptera–specific and putative novel *cry* genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. Journal of Invertebrate Pathology. 102: 101–109.

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

Qayyum, M.A., Wakil, W., Arif, M.J., Sahi, Sh.T. 2015. *Bacillus thuringiensis* and Nuclear Polyhedrosis Virus for the Enhanced Bio–cotrol of *Helicoverpa armigera*. International Journal Agricultural and Biology. 17(5): 1043–1048.

Robinson, G.S., Ackery., P.R. Kitching, I.J., Beccaloni, G.W., Hernández, L.M. 2010. Hosts a database of the world Lepidopteran hostplants. Natural History Museum, London. Available from http://www. nhm.ac.uk/hosts [Accessed 14 January 2012].

Salama, H.S., Foda, M.S., Sharaby, A. 1989. A proposed new biological standard for bioassay of bacterial insecticides versus *Spodoptera* spp. Tropical Pest Management. 35: 326–330.

Salehi Jouzani, G., Abad, A.P., Seifinejad, A., Marzban, R., Kariman, K., Maleki, B. 2008. Distribution and diversity of Dipteran–specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains oBtained from different ecosystems of Iran. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 35(2): 83–94.

Salehi Jouzani, G., Valijanian, E. and Sharafi, R. 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. Applied Microbiology Biotechnology. 101(7): 2691–2711.

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

Seifinejad, A., Salehi Jouzani, G., Hosseinzadeh, A., Abdmishani, C. 2008. Characterization of Lepidoptera–active cry and vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. Biological Control. 44(2): 216–226.

Sorour, M.A., Khamiss, O., Abd El–Wahab, A.S., El–Sheikh., M.A.K., Abul–Ela, S. 2011. An Economically modified semi–synthetic diet for mass rearing the Egyptian Cotton LeafWorm *Spodoptera littoralis*. Academic Journal of Entomology. 4(3): 118–123.

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

Svobodová, Z., Romeis, J., Habuštová, O.S., Meissle, M. 2016. Susceptibility of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) to lepidopteran active Cry proteins in stacked Bt maize. Available from https: //www.researchgate.net/publication/304019535 [accessed 12 January 2018].

Ullah, L., Asif, M., Arslan, M., Ashfaq, M. 2014. Temporal expression of Cry1Ab/c protein in Bt–cotton varieties, their efficacy against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and population dynamics of suckingarthropods on them. International Journal of Agricultural and Biology. 16: 879–885.

Wei, J.Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S., Aroian, R.V. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. Proceeding of the National Academy of Sciences. 100(5): 2760–2765.

Xu, J., Shelton, A.M., Cheng, X. 2001. Variation in susceptibility of Diadegma insulare to permenthrin. Journal of Economic Entomology. 99: 541–546.

Pathogenic effects of *Bacillus thuringiensis* native Iranian soil strains on Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* Z.

Zahra Magholi Fard[1, 2], Rasoul Marzban[3], Shahram Hesami[2], Gholam Reza Salehi Jouzani[4] and Reza Sharafi[4]

1. Plant Protection Department, Faculty of Agricultural Sciences, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
2. Plant Protection Department, Faculty of Agricultural Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
3. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
4. Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
Corresponding author**:** Rasoul Marzban, e-mail: r.marzban@areeo.ac.ir

Received: Mar., 19, 2020 7(1) 143–155 Accepted: June, 23, 2020

Abstract

The Egyptian cotton leafworm is a polyphagous pest with a broad range of hosts causing annually significant damage to agricultural crops. It has been found that no all strain of *Bacillus thuringiesis* are effective on this pest and small numbers of the isolates are effective due to the contents of their crystalline proteins. The aim of the present study was to obtain native isolates of Bt that were capable of controlling and investigate the effect of growth medium of Bt on the insecticidal ability of selected isolates. Hence, the pathogenicity of 118 native isolates of *B. thuringiesis* cultivated in R2NB medium were determined on five–day–old larvae of *Spodptera.littoralis* at 27 °C on artificial diet. The mortality rate of 118 native isolates of Bt with a concentration of 10^3 spore ml^{-1} illustrated that the highest mortality rates belong to four isolates GON–9, QM–2, GN–13 and QM–1 with 93.33, 70, 46.67 and 43.43, respectively. In addition, GN–12, EN–2, GON–7, CHI–2, AGI–7, AGI–3 and AGI–2 isolates were ineffective on *S. littoralis* larvae. Then, the effective isolates grown in nutrient broth and R2NB medium were evaluated on mentioned pest. The results showed that the four selected isolates were more lethal on R2NB medium than NB on larvae of Egyptian cotton leafworm and their differences were significant. Also, the content of *cry* genes particularly *cry* 2Ab in effective isolates were examined and traced. The outcomes of polymerase chain reaction demonstrated QM–1, QM–2 and GON–9 have *cry* 2Ab.

Keywords: pathogenicity, Egyptian cotton leafworm, *Bacillus thuringiesis*, medium, *cry* gene