

بررسی تاثیر دمای محیط در قدرت بیماری‌زایی ویروس چند وجهی هسته‌ای کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera multiple nucleopolyhedrovirus* در آزمایشگاه

فرزانه مشتاقی ملکی^۱، جلال جلالی سندی^{۱*} و محمدرضا رضایانه^۲

^۱ رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی

^۲ تهران، موسسه گیاه پزشکی کشور، بخش کنترل بیولوژیک

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۸

چکیده

پایین بودن سرعت تاثیر ویروس در مزرعه یکی از عوامل محدودکننده کاربرد باکولوویروس‌ها می‌باشد. دمای حاکم بر شرایط میکروکلیمایی موجود در منطقه از جمله عواملی است که به عنوان یک عامل جانبی در کنار سایر عوامل موثر در کارایی و سرعت تاثیر ویروس اثرگذار می‌باشد. در این بررسی تاثیر دمای ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد بر فعالیت بیولوژیکی (LD_{50} و LT_{50}) ویروس چند وجهی هسته‌ای کرم غوزه پنبه (*Helicoverpa armigera multiple nucleopolyhedrovirus*) در لاروهای اوایل سن ۳ کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hub. در شرایط نوری AD: ۱۶L و رطوبت نسبی ۶۰-۵۰٪ در قالب طرح اسپلیت پلات فاکتوریل به صورت دز و زمان لازم برای مرگ و میر با اهمیت برابر در داخل عامل دما مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر LD_{50} مربوط به ویروس در دماهای ۲۰، ۲۶ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۳۵۸۰/۸۳، ۲۶۱۴/۸۲ و ۱۷۵۱/۶۲ پلی‌هدر در هر لارو برآورد شد. مقایسه میانگین مقادیر LD_{50} با آزمون دانکن در هر سه دما نشان می‌دهد که با افزایش دما میزان مرگ و میر حاصل از ویروس به طور معنی‌دار افزایش می‌یابد. تاثیر دما در میزان مرگ و میر به ویژه در دزهای پایین معنی‌دار می‌باشد. مقادیر LT_{50} مربوط به دز 5×10^5 پلی‌هدر در هر لارو در دماهای ۲۰، ۲۶ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۷/۱۵، ۶/۷۳ و ۶/۵۸ روز برآورد شد. مقایسه میانگین مقادیر LT_{50} با آزمون دانکن نشان می‌دهد که ویروس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد سریع‌تر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد عمل کرده و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری با دو دمای دیگر ندارد. بررسی مقادیر LD_{50} و LT_{50} مربوط به ویروس و مقایسه آن با دوره نهفته آلودگی نشان می‌دهد که تاثیر دما در سرعت و میزان مرگ و میر بعد از دوره نهفته آلودگی می‌باشد. لذا دماهای بالای ۳۰-۲۶ درجه سانتی‌گراد جهت حصول درصد مرگ و میر بیشتر و افزایش سرعت مرگ و میر ناشی از ویروس توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ویروس چند وجهی هسته‌ای کرم غوزه پنبه، دمای محیط، دوره نهفته آلودگی، کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera*، LD_{50} و LT_{50} .

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۳۱-۶۶۹۰۸۱۷، پست الکترونیکی: jjalali@guilan.ac.ir

مقدمه

دادند، که اغلب به صورت سوسپانسیون‌های مایع تنظیم شده بر اساس معادل لاروی (LE) می‌باشند (۷). گسترش انواع فرمولاسیون‌های ویروسی بستگی به قدرت سازگاری آنها با شرایط محیطی حاکم بر مزرعه و محیط کاربرد دارد (۱۶). اخیراً تعدادی از باکولوویروس‌ها برای حفاظت

در طول سه دهه اخیر باکولوویروس‌ها به عنوان یکی از ابزارهای بالقوه مفید برای کنترل جمعیت حشرات آفت در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات به کار برده می‌شوند (۱۱)، ۲۶ و ۴۰). پیوری و همکاران. در سال ۱۹۹۶، ۴۳ فرآورده فرمولاسیون‌های ویروسی ثبت شده در جهان را گزارش

کرم غوزه پنبه جمع‌آوری شده از نواحی استان گیلان می‌باشد.

مواد و روشها

۱- **میزبان:** لاروهای سنین مختلف کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* Hubner از مزارع مختلف توتون احمد گوراب در استان گیلان جمع‌آوری و به صورت انفرادی در اتاق پرورش استریل تحت شرایط محیطی دمای 1 ± 26 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵۰-۶۰٪ و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی روی غذای مصنوعی بر اساس لوبیا چشم‌بلبلی و جوانه گندم برای ۴ نسل متوالی پرورش یافتند. حشرات بالغ با آب عسل ۱۰٪ تغذیه و کاغذهای حوله‌ای برای بستر تخم‌ریزی پروانه‌ها بکار رفت (۲).

۲- **ویروس:** نمونه اولیه ویروس چند وجهی هسته‌ای کرم غوزه پنبه با نام helicovirid-liquid (فراورده میکروبی تولید شده در سال ۱۳۷۶ و نگهداری شده در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد و تاریکی) از بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک موسسه تحقیقات گیاه پزشکی تهیه شد (۱۷). غلظت کشنده‌ای از ویروس (10^8 PIB/ml LC₉₅~3) تهیه (۳۹) و برای آلوده‌سازی انفرادی لاروهای اوایل سن ۳ به دلیل خاصیت کانی بالیستیک بین لاروها (۷) جهت تولید ماکزیم مقدار ویروس با کارایی بیشتر در لارو آلوده در مراحل نهایی مرگ و میر به کار رفت. لاروهای آلوده به ویروس تازه تلف شده (۱۶) از روز پنجم آلودگی به بعد جمع‌آوری (۴۳) و در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با ۳ بار پاساژدهی ویروس در لاروهای اوایل سن ۳ (۸، ۱۲ و ۴۱)، له کردن لاروها در محلول بافر Tris-HCl (pH 7.03) 50mM با هموژنایزر شیشه‌ای، عبور سوسپانسیون حاوی ذرات ویروس از پارچه دو لایه نظیف و خالص‌سازی آنها از طریق میانگریز سازی (۲۴)، سوسپانسیون ویروسی *Helicoverpa armigera* multiple nucleopolyhedrovirus (HaMNPV) تهیه و پس از کنترل

محصولات زراعی، سبزیجات، گیاهان جنگلی و مراتع به کار برده می‌شوند (۲۳، ۲۸، ۲۹ و ۴۲). باکولوویروس‌ها در طبیعت تحت تاثیر عوامل محیطی و کلیمایی زیادی قرار می‌گیرند، تشعشعات خورشیدی (۱۰، ۱۶، ۲۲، ۳۰، ۳۲، ۳۴)، دما (۱، ۱۰ و ۲۲)، مقدار ازن در اتمسفر بالایی (۴۴)، رطوبت نسبی (۱)، pH محیط و شبنم موجود روی گیاه (۲۲ و ۴۵) و گونه میزبان و گیاه میزبان (۱۸، ۲۰، ۳۱ و ۳۳) از جمله عوامل محیطی مطرح در کارایی باکولوویروس‌ها می‌باشند. دمای حاکم بر شرایط میکروکلیمایی موجود در منطقه از جمله عواملی است که به عنوان یک عامل جانبی در کنار سایر عوامل موثر در کارایی ویروس اثرگذار می‌باشد. تاثیر آن در بیماریزایی و سرعت پخش ویروس وابسته به فصل و محلی بوده و به ویژه در مناطق گرم در کنار سایر عوامل نقش اساسی در ایجاد اپیدمی ویروس در داخل جمعیت میزبان دارد (۲۱، ۲۷). دما در میزان تکثیر ویروس و ماکزیم مقدار ویروس تولید شده در حشره موثر می‌باشد (۵، ۱۹، ۳۶). گزارش‌هایی مبنی بر تاثیر دما در سرعت و میزان مرگ و میر ویروس در آفت وجود دارد (۴، ۵، ۶، ۹، ۱۴ و ۲۵)، که نشان می‌دهند افزایش دما تا یک محدوده مشخص باعث افزایش سرعت و میزان مرگ و میر لاروی در نتیجه آلودگی به ویروس می‌شود. با توجه به اینکه یکی از دلایل عمده محدودیت استفاده از باکولوویروس‌ها در برنامه‌های مدیریتی، طولانی بودن سرعت تاثیر ویروس و در نتیجه دوام لارو آلوده در محیط می‌باشد (۷ و ۳۷) نقش دمای موجود در منطقه و تاثیر آن بر سرعت مرگ و میر حاصل از ویروس حایز اهمیت می‌باشد.

هدف از اجرای این تحقیق بررسی تاثیر دمای انکوباسیون ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد (بهینه محدوده دمایی رشد و نمو حشره) بر فعالیت بیولوژیکی (LD₅₀ و LT₅₀) ویروس چند وجهی هسته‌ای کرم غوزه پنبه (*Helicoverpa armigera* multiple nucleopolyhedrovirus) در لاروهای

بودند به غذای سالم بدون فرمالین و عاری از آلودگی ویروسی انتقال یافتند. لاروهای مرده در نتیجه آسیب هنگام جابجایی و ... از شمارش حذف شد. مرگ و میر لاروی ناشی از آلودگی از روز دوم آلودگی به بعد بطور روزانه و تا روز دهم بررسی و لاروهای مشکوک به سایر عوامل بیماریزا از شمارش حذف شد. مجموع مرگ و میر در روز دهم به عنوان شاخص تلفات برای تعیین مقادیر LD₅₀ و تلفات روزهای ۱۰-۲ در هر روز نیز برای تعیین مقادیر LT₅₀ به کار گرفته شد.

این زیست‌سنجی در سه تکرار انجام و داده‌های حاصل از زیست‌سنجی به روش LD₅₀ و LT₅₀ با نرم‌افزار آماری پروبیت تجزیه و تحلیل شد. تبدیل داده درصدی تلفات حاصل از ویروس در لاروها با Arcsin انجام و میزان تلفات حاصل از ویروس و زمان لازم برای مرگ و میر به صورت دو عامل فرعی در داخل عامل دما (طرح اسپیلت پلات فاکتوریل) با نرم‌افزار آماری MSTATC تجزیه و تحلیل شد. داده‌های مربوط به این تجزیه واریانس تلفات مربوط به دماهای انکوباسیون ۱ ± ۲۰، ۱ ± ۲۶ و ۱ ± ۳۰ درجه سانتی‌گراد، دزهای صفر، ۱۰^۲ × ۵، ۱۰^۳ × ۵، ۱۰^۴ × ۵ و ۱۰^۵ × ۵ پلی‌هدر در هر لارو و روزهای دوم، چهارم، ششم، هشتم و دهم بعد از آلودگی می‌باشند.

نتایج

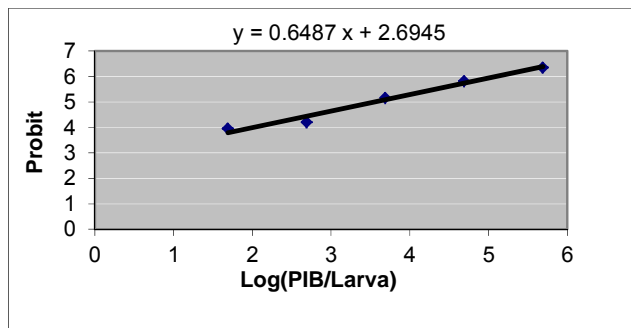
کنترل کمی و شمارش تعداد پلی‌هدر در واحد حجم نمونه نشان داد که در هر میلی‌لیتر از ویروس استخراج شده تعداد ۱۰^{۱۰} × ۲/۵ پلی‌هدر وجود دارد.

نتایج محاسبات نرم‌افزار پروبیت در هر سه دمای انکوباسیون به صورت معادله خط پروبیت، برآورد LD₅₀، محدوده اطمینان ۹۵٪ مقادیر LD₅₀ و معیار آزمون مربع لاتین در جدول ۱ آمده است. شکل خط پروبیت و نقاط مشاهده شده در هر زیست‌سنجی نیز در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ آمده است.

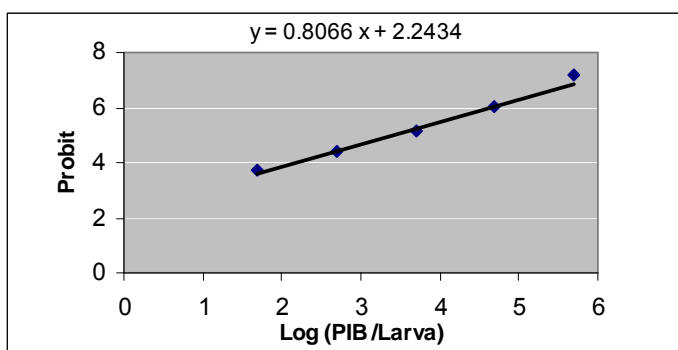
کمی (شمارش تعداد پلی‌هدر در واحد حجم نمونه) با استفاده از لام نوبار و میکروسکوپ اختلاف فاز (۳۲) برای ادامه بررسی به کار رفت.

۳- زیست‌سنجی: لاروهای یکسان و یکنواخت اوایل سن ۳ کرم غوزه پنبه همزمان تفریخ شده از تخم مربوط به یک دوره تخم‌ریزی در تاریکی (۳۸) با میانگین وزن لاروی ۰/۴۹ ± ۵/۷۵ میلی‌گرم انتخاب و جهت خنثی شدن محتویات روده‌ای و ایجاد حالت یکنواختی و در نتیجه پاسخ مناسب به ویروس به مدت ۶ ساعت گرسنه نگهداشته شدند (۳). غذای تازه درست شده و بدون فرمالین (۱۳.۳۹) در اندازه‌ای که برای ۲۴ ساعت غذای لاروها را تامین کند (حدوداً در ابعاد ۲×۲×۱ میلی‌متر مکعب) بریده و روی آب آگار نیمه جامد جهت جلوگیری از خشک شدن غذا منتقل شد. غلظت‌های (شاهد، ۲/۵×۱۰^۴، ۱۰^۵×۲/۵، ۱۰^۶×۲/۵، ۱۰^۷×۲/۵، ۱۰^۸×۲/۵) از سوسپانسیون ویروسی در محلول بافر Tris-HCl 50mM (pH7.03) تهیه و مقدار ۲ میکرولیتر از هر سری غلظت بلافاصله بعد از تهیه روی سطح غذا ریخته شده و برای مدتی (حدود ۳-۵ دقیقه) در فضای آزمایشگاه قرار گرفت (۳۵). تیمار شاهد نیز شامل محلول Tris-HCl 50mM (pH=7.03) فاقد ویروس بود. تعداد ۳۰ لارو برای هر ۶ تیمار انتخاب شد، به این ترتیب تعداد کل لاروهای مورد تیمار واقع شده ۱۸۰ لارو اوایل سن ۳ یکسان و یکنواخت از لحاظ وضعیت فیزیولوژیکی و همزمان تفریخ شده بود. این زیست‌سنجی در سه تکرار انجام شد.

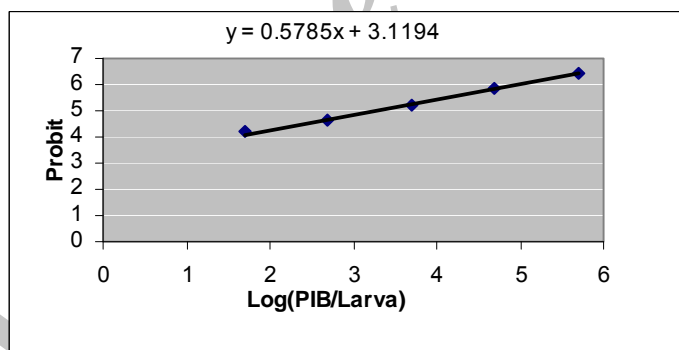
لازم به ذکر است که آلودگی سطحی غذا به صورت شروع از تیمار شاهد و سپس به سمت تیمارهای با دزهای بالاتر ذرات ویروسی جهت کاهش خطای آزمایشی انجام شد. لاروهای گرسنه نگهداشته شده به صورت انفرادی با قلم موی استریل روی غذای آلوده با مقدار مشخص از ذرات ویروس (تیمارها) به داخل قوطی‌های پلاستیکی شفاف فیلم عکاسی به ارتفاع ۴۶ میلی‌متر منتقل و در دماهای ۱ ± ۲۰، ۱ ± ۲۶ و ۱ ± ۳۰ درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۶۰-۵۰٪ و دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی در هر سه دما نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت لاروهایی که کل غذای حاوی ذرات ویروس را تغذیه کرده



نمودار ۱- زیست‌سنجی با لاروهای اوایل سن ۳ کرم غوزه پنبه و HaMNPV در دمای انکوباسیون 1 ± 20 درجه سانتی‌گراد.



نمودار ۲- زیست‌سنجی با لاروهای اوایل سن ۳ کرم غوزه پنبه و HaMNPV در دمای انکوباسیون 1 ± 26 درجه سانتی‌گراد.



نمودار ۳- زیست‌سنجی با لاروهای اوایل سن ۳ کرم غوزه پنبه و HaMNPV در دمای انکوباسیون 1 ± 30 درجه سانتی‌گراد.

جدول ۱- نتیجه آزمایش زیست‌سنجی ۱۰ روزه با لاروهای اوایل سن ۳ کرم غوزه پنبه و HaMNPV در سه دمای انکوباسیون.

دمای انکوباسیون (± 1 C °)	LD ₅₀ (PIB/Larva)	محدوده ۹۵٪ اطمینان LD ₅₀	معادله خط پروبیت	R ²
۲۰	۳۵۸۰/۸۳ C	۱۸۹۵/۹۷ - ۶۷۶۹/۴۳	$Y = 0.6487X + 2.6945$	۲/۶۱
۲۶	۲۶۱۴/۸۲ B	۱۶۰۸/۵۵ - ۴۱۷۶/۳۹	$Y = 0.8066X + 2.2434$	۱/۲۶
۳۰	۱۷۵۱/۶۲ A	۸۳۸/۰۹ - ۳۵۳۵/۹۱	$Y = 0.5785X + 3.1194$	۰/۴۲

میانگین مقادیر LD₅₀ با حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

مقادیر LT₅₀ مربوط به دماهای مذکور در دزهای بالاتر از به صورت برآورد LT₅₀، محدوده اطمینان ۹۵٪ مقادیر ۹۰٪ مرگ و میر با نرم‌افزار آماری پروبیت محاسبه شده و LT₅₀ و شیب خط پروبیت در جدول ۲ آمده است.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل نشان می‌دهد که بین سطوح عوامل دمای انکوباسیون، دز ویروس، زمان لازم برای مرگ و میر، دما × دز ویروس، دما × زمان لازم برای مرگ و میر، زمان × دز ویروس و دمای انکوباسیون × دز ویروس × زمان لازم برای مرگ و میر در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳).

جدول ۲- مقادیر LT_{50} مربوط به زیست‌سنجی لاروهای اوایل سن ۳ کرم غوزه پنبه و HaMNPV در سه دمای انکوباسیون.

شیب خط پروبیت	محدوده ۹۵٪ اطمینان LT_{50}	LT_{50} (day)	٪ مرگ و میر	دمای انکوباسیون ($C \pm 1$)	دز ویروس PIB/Larva
۸/۶۴	۶/۷۴ - ۷/۵۹	۷/۱۵B	۹۱/۱۴	۲۰	5×10^5
۸/۷۲	۶/۴۹ - ۶/۹۷	۶/۷۳AB	۹۸/۵۹	۲۶	
۶/۸۲	۶/۲۶ - ۶/۹۰	۶/۵۸A	۹۲/۷۲	۳۰	

*میانگین مقادیر LT_{50} با حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

جدول ۳- تجزیه واریانس میانگین تلفات حاصل از تاثیر دمای انکوباسیون در روند فعالیت HaMNPV در لاروهای اوایل سن ۳ کرم غوزه پنبه.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
دما	۲	۳۰/۱۴۱	**۱۰/۸۷
خطای داخل دما	۶	۲/۷۷۳	
دز ویروس	۵	۲۴۲۱/۱۰۷	**۹۵/۷۸
دز ویروس × دما	۱۰	۸۶/۵۵	**۸/۶۵
زمان مرگ و میر	۴	۴۸۷۵/۶۴	**۱۹۲/۸۷
زمان مرگ و میر × دما	۸	۱۸۵/۳۵	**۷/۳۳
زمان مرگ و میر × دز ویروس	۲۰	۵۷۹/۱۳	**۲۲/۹۱
دما × دز ویروس × زمان مرگ و میر	۴۰	۵۳/۶۶	**۲/۱۲
خطای داخل فاکتورها	۱۷۴	۲۵/۲۸	
کل	۲۶۹		

C.V.=۵۲/۹۴

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

میانگین تلفات ۸/۹۲٪ در کمترین گروه قرار دارد. بین میانگین تلفات دمای انکوباسیون ۲۶-۳۰ و ۲۰-۲۶ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. به عبارتی با افزایش دمای انکوباسیون در فاصله ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد، مرگ و میر حاصل از ویروس افزایش می‌یابد.

تاثیر دمای انکوباسیون در میزان مرگ و میر: مقایسه میانگین میزان تلفات در دماهای انکوباسیون 1 ± 20 ، 1 ± 26 و 1 ± 30 درجه سانتی‌گراد با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ (حداقل اختلاف معنی‌دار ۰/۶۱) نشان می‌دهد که دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با میانگین تلفات ۱۰/۰۸٪ در بیشترین گروه و دمای انکوباسیون ۲۰ درجه سانتی‌گراد با

غیر معنی‌دار می‌باشد. به عبارتی در لاروهای آلوده به ویروس، تاثیر دمای انکوباسیون ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد در دزهای پایین حائز اهمیت بوده و در دزهای بالا نقش مهمی در میزان مرگ و میر حاصل از ویروس ندارند.

تجزیه واریانس مقادیر LD_{50} در هر سه دمای انکوباسیون نشان می‌دهد که بین میانگین درصد تلفات (با درجه آزادی خطای ۶ و میانگین مربعات $27148/53$) در سطح احتمال $0/01$ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. مقایسه میانگین مقادیر LD_{50} با آزمون دانکن نشان می‌دهد که بین این مقادیر در هر سه دمای انکوباسیون اختلاف معنی‌داری وجود دارد. میانگین مقدار LD_{50} در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد (با بیشترین مقدار) کمترین گروه و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (با کمترین مقدار) بیشترین گروه را به خود اختصاص داده است (جدول ۱).

تاثیر دما × زمان در میزان مرگ و میر: مقایسه میانگین میزان تلفات با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ (حداقل اختلاف معنی‌دار ۳/۳۱) نشان می‌دهد که میزان مرگ و میر در هر سه دمای انکوباسیون تا روز چهارم بعد از آلودگی در یک گروه با کمترین مقدار و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در روز دهم بعد از آلودگی در گروه جداگانه با بیشترین مقدار قرار دارد.

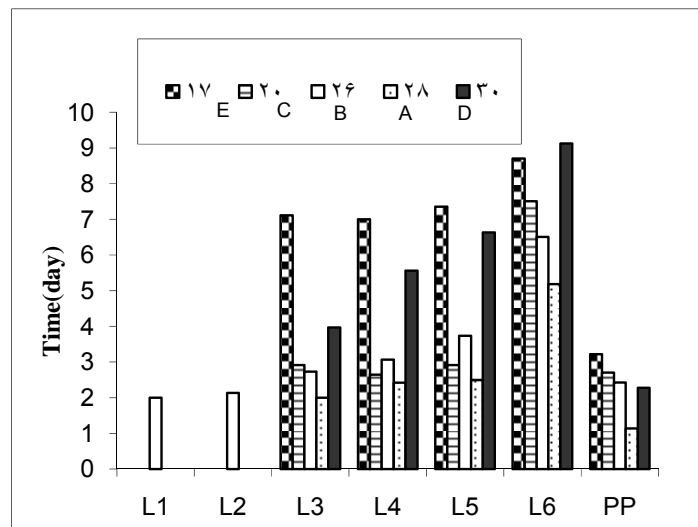
تجزیه واریانس مقادیر LT_{50} مربوط به دز 5×10^5 پلی‌هدر در هر لارو در هر سه دمای انکوباسیون (با درجه آزادی خطای ۶ و میانگین مربعات $0/43$) نشان می‌دهد که بین این مقادیر در سطح احتمال $0/01$ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. مقایسه میانگین مقادیر LT_{50} با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ (حداقل اختلاف معنی‌دار $0/59$) نشان می‌دهد که دمای انکوباسیون ۳۰ درجه سانتی‌گراد در بالاترین گروه و دمای انکوباسیون ۲۰ درجه سانتی‌گراد در پایین‌ترین گروه قرار گرفته و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری با دو دمای دیگر ندارد (جدول ۲). در مجموع می‌توان گفت که با افزایش دما (در طول ۱۰ روز)

تاثیر زمان و دز در میزان مرگ و میر: مقایسه میانگین میزان تلفات با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ (حداقل اختلاف معنی‌دار $1/91$) نشان می‌دهد که میزان مرگ و میر در روز دوم و چهارم بعد از آلودگی در یک گروه با کمترین مقدار و در روز دهم بعد از آلودگی در گروه جداگانه با بیشترین مقدار قرار دارد. بین روز دهم و هشتم بعد از آلودگی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. تمامی مقادیر میانگین میزان تلفات نیز با افزایش دز مصرفی، افزایش می‌یابد.

تاثیر دز × زمان در میزان مرگ و میر: مقایسه میانگین میزان تلفات با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ (حداقل اختلاف معنی‌دار $3/31$) نشان می‌دهد که میزان مرگ و میر در همه روزهای مربوط به شاهد، روزهای دوم و چهارم بعد از آلودگی مربوط به کلیه دزها و روز ششم بعد از آلودگی مربوط به دزهای 5×10^2 و 5×10^3 پلی‌هدر در هر لارو در یک گروه با کمترین مقدار و روز دهم بعد از آلودگی در دزهای 5×10^4 و 5×10^5 پلی‌هدر در هر لارو در گروه جداگانه با بیشترین مقدار قرار دارد. بین میزان مرگ و میر در روزهای هشتم و دهم بعد از آلودگی در دز 5×10^5 پلی‌هدر در هر لارو اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. به عبارتی تا روز چهارم بعد از آلودگی تاثیر ویروس در کلیه دزها نهفته بوده و از آن به بعد با افزایش دز مصرفی سرعت مرگ و میر حاصل از ویروس افزایش می‌یابد.

تاثیر دما × دز در میزان مرگ و میر: مقایسه میانگین تلفات با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ (حداقل اختلاف معنی‌دار $3/62$) نشان می‌دهد که دزهای شاهد در هر سه دمای انکوباسیون در یک گروه با کمترین مقدار و دز 5×10^5 پلی‌هدر در هر لارو در هر سه دما در گروه دیگر با بیشترین مقدار قرار دارد. این بررسی نشان می‌دهد که تاثیر دمای ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد در میزان مرگ و میر در بالاترین دز (5×10^5 پلی‌هدر در هر لارو) ناچیز و

در محدوده ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد سرعت مرگ و میر حاصل از ویروس نیز افزایش می‌یابد.



نمودار ۴- طول دوره رشدی سنین مختلف لاروی و پیش‌شغیرگی کرم غوزه پنبه در ۵ دمای مختلف (L1-L6: سنین لاروی ۱ الی ۶، PP: پیش‌شغیره).

معنی‌داری نسبت به دماهای ۲۰، ۲۶ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد در طول دوره رشد و نمو لاروی دیده می‌شود به طوری که در این دما طول دوره رشد و نمو بعد از ۱۷ درجه سانتی‌گراد در بیشترین مقدار می‌باشد، در نتیجه دما بهینه برای رشد سریع فیزیولوژیکی لاروهای کرم غوزه پنبه دمای ۲۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و در دماهای بالاتر و پایین‌تر از این محدوده کاهش سرعت رشد و نمو لاروی دیده می‌شود.

بحث

این بررسی تاثیر دمای انکوباسیون ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد را در میزان و نیز سرعت مرگ و میر لاروهای کرم غوزه پنبه نشان می‌دهد. افزایش در میزان و سرعت مرگ و میر در دمای انکوباسیون ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌تواند به تاثیر دما در سرعت تکثیر ویروس در داخل بدن لارو نسبت داده شود. ویژگیهای مربوط به DNA ویروس و اجزای پروتئینی ساختمانی و غیر ساختمانی در قدرت بیماری‌زایی ویروس و روند فعالیت آن اثرگذار می‌باشند (۱۱، ۴۴). تعدادی از محققین نشان دادند که

تاثیر دما × دز × زمان در میزان مرگ و میر: مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ (حداقل اختلاف معنی‌دار ۸/۱۰) نشان می‌دهد که میزان مرگ و میر تا روز چهارم بعد از آلودگی در کلیه دزها در هر سه دما (به استثناء روز چهارم بعد از آلودگی در دز ۱۰^۵ × ۵ پلی‌هدر در هر لارو در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) و تا روز ششم بعد از آلودگی در دزهای ۱۰^۲ × ۵ و ۱۰^۳ × ۵ پلی‌هدر در هر لارو در هر سه دما در یک گروه با کمترین مقدار و در روز دهم بعد از آلودگی در دز ۱۰^۵ × ۵ پلی‌هدر در هر لارو در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گروه جداگانه با بیشترین مقدار قرار دارد.

در نمودار ۴ طول دوره رشد و نمو لاروی سنین مختلف کرم غوزه پنبه در دماهای ۱۷-۳۰ درجه سانتی‌گراد آمده است. مقایسه میانگین طول دوره رشد و نمو لاروهای سالم سنین مختلف در دماهای مختلف (داده‌های منتشر نشده) نشان می‌دهد که با افزایش دما از ۱۷ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد، طول دوره رشد و نمو لاروی کاهش می‌یابد ولی با افزایش دما به ۳۰ درجه سانتی‌گراد افزایش

۳۰ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه دمای بهینه برای رشد لاروها ۲۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد کاهش در رشد فیزیولوژیکی لاروها در دماهای بالا خود می‌تواند دلیلی بر مستعد بودن لاروها به آلودگی‌های ویروسی باشد. افزایش میزان آلودگی NPV در لاروهای *Trichoplusia ni* در محیط در دماهای بیشتر از ۲۸ درجه سانتی‌گراد نیز با نتایج این بررسی مطابقت دارد (۱). این در حالی است که در لاروهای کرم سبب آلوده به ویروس CpGV میزان آلودگی ویروس در محدوده دمایی رشد سریع لارو (۳۲-۲۶ درجه سانتی‌گراد) ابتدا در بیشترین مقدار و حدود ۹۵٪ و سپس به ۸۱-۵۰٪ کاهش یافته و سرعت مرگ و میر حاصل از ویروس نیز (LT₅₀) از ۳۲ درجه سانتی‌گراد به بعد کاهش می‌یابد (۹). لذا تاثیر بازدارندگی دما در تکثیر ویروس در داخل بدن لارو در دماهای بالا و دخیل بودن عوامل فیزیولوژیکی مرتبط با لارو در روند آلودگی به ویروس موثر می‌باشد. مطالعات نشان داده است که علیرغم تاثیر سوء اشعه UV در کارایی ویروس SpexNPV در روزهای آفتابی استفاده از فرمولاسیون‌های ویروسی در ساعات سرد شبانه بدلیل تاثیر سرمای محیط در کاهش فعالیت فیزیولوژیکی لاروهای *Spodoptera exempta* از جمله کاهش میزان تغذیه و در نتیجه کاهش میزان کسب ویروس جهت ایجاد مرگ و میر کشنده در زمان معین محدود مناسب نبوده و تعامل تاثیر اشعه ماوراء بنفش و دمای محیط حایز اهمیت می‌باشد، نتیجه این تعامل بعد از استقرار ویروس در داخل بدن میزبان و دوام آن جهت کنترل به صورت مرگ و میر طبیعی و ایجاد اپیدمی در جمعیت میزبان به ویژه در حالات طغیانی آفت جلوه‌گر می‌باشد (۱۰). در مطالعه حاضر سرعت مرگ و میر حاصل از ویروس با افزایش دما در محدوده ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت به طوری که در ۳۰ درجه سانتی‌گراد لاروهای آلوده به ویروس سریع‌تر از سایر لاروهای آلوده موجود در دماهای ۲۰ و ۲۶ درجه سانتی‌گراد تلف شدند. نتایج حاصل از

نژادهای جهش یافته BmNPV حساس به دما در دماهای غیر مجاز ۳۳ درجه سانتی‌گراد (بالای دمای بهینه) هیچ پلی‌هدری در لاروهای آلوده ایجاد نکردند (۳۶). با بررسی تکثیر ویروس در محیط کشت BmN₄ در ۳۳ درجه سانتی‌گراد نشان داده شد که سنتز طبیعی DNA ویروس رخ داده ولی تولید ویروس‌های جوانه زده و پلی‌هدرها با شکست مواجه می‌شود که نشان از عدم بیان ژن در مراحل انتهایی سنتز می‌باشد. با انتقال لاروها به ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه) اغلب لاروها به بالغین سالم تبدیل شدند که حاکی از تاثیر مخرب دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد در مکان‌های بیان ژن در ویروس می‌باشد. در بررسی ده روزه روی بازدارندگی تجمع پلی‌پپتیدهای ویروس Densonucleosis virus در سلول‌های اپی‌تلیوم لوله گوارش لاروهای سن ۴ حشره *Bombyx mori* در دماهای غیر مجاز عدم تکثیر ویروس در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در لارو گزارش شد ولی با انتقال دوباره لارو به ۲۵ درجه سانتی‌گراد تکثیر مجدد ویروس شروع شده و پلی‌پپتیدهای ویروسی در سلول‌های لوله گوارش و فضولات لاروی قابل رویت بودند، در نتیجه مشخص شد که محدوده دمایی غیر مجاز در کوتاه مدت بر سطح نسخه‌برداری و ترجمه ژنی ویروس تاثیر سویی نداشته و تنها ویروس را به حالت نهفته نگه داشته و از تکثیر آن ممانعت می‌کند (۱۹). لذا می‌توان نتیجه گرفت که تاثیرات مخرب دماهای بالای بهینه بر تکثیر ویروس بر اساس نوع ویروس و ویژگی‌های بیولوژیکی آن متفاوت است. در این بررسی آلودگی و از بین رفتن لاروها در نتیجه HaMNPV در ۳۰ درجه سانتی‌گراد حاکی از تکثیر ویروس در این دما می‌باشد.

ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیولوژیکی میزبان نیز از جمله عواملی هستند که در روابط بین دما و ویروس اثرگذار می‌باشند، بررسی رشد فیزیولوژیکی لاروها در ۳۰-۱۷ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد که بر خلاف افزایش سرعت و میزان مرگ و میر ویروسی رشد لاروها در دمای

نهفتگی (دوره انکوباسیون ویروس) ناچیز بوده و بررسی مقادیر LT_{50} مربوط به ویروس در یک دز ثابت نشان می‌دهد که تاثیر دما در میزان و سرعت مرگ و میر بعد از دوره نهفته آلودگی شروع شده به طوری که بعد از دوره نهفته آلودگی افزایش دمای انکوباسیون باعث افزایش سرعت مرگ و میر حاصل از ویروس می‌شود.

در مجموع با توجه به اینکه دما یکی از عوامل مهم محدود کننده کاربرد باکولوویروس‌ها می‌باشد، بر اساس نتایج حاصل از این بررسی کاربرد HaMNPV در دماهای بالای ۲۶-۳۰ درجه سانتی‌گراد جهت حصول درصد مرگ و میر بیشتر و افزایش سرعت مرگ و میر ناشی از ویروس توصیه می‌شود.

بررسی بیماری‌زایی BsNPV در لاروهای *Buzura suppressaria* نشان داده است که سرعت تاثیر ویروس با افزایش دما افزایش یافته و بیشترین مقدار را در ۳۰ درجه سانتی‌گراد دارد بدست آمده است (۶). کاهش در میزان رشد و نمو لاروی در ۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌تواند دلیلی بر تضعیف لارو در این دما باشد که خود باعث مستعد شدن لارو به آلودگی ویروسی و در نتیجه کاهش مقادیر LT_{50} و افزایش سرعت مرگ و میر حاصل از ویروس در لاروها می‌شود.

برابر بودن میزان مرگ و میر در روزهای دوم و چهارم بعد از آلودگی در تمام دماهای مربوط به هر سه دمای انکوباسیون نشان می‌دهد که تاثیر دما در دوره

منابع

1. Ali, M. A., ElKhouly, A. S., Moawad, G. M., and Ragab, G. M., (1995). Seasonal abundance of cabbage looper, *Trichoplusia ni* as related to temperature, relative humidity and the natural incidence of a nuclear polyhedrosis virus. *Acta Agronomica Hungaria*. 43: 331-339.
2. Allahyari, M., (1999). An evaluation of susceptibility some of population of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) to Profenophos, Endosulfan, Fenvalerate and Fenprothrin insecticides. M. Sc. Thesis, University of Tabriz. PP: 45. (Persian with English abstract).
3. Arne, C. N., and Nordin, G. L., 1995. Enhancement of indices 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.
4. Bieber, K. D., and Hostetter, D. L., 1977. Activity of the nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper evaluated at programmed temperature regimens. *Journal of Invertebrate Pathology*. 18: 81-84.
5. Carter, J. B., 1975. The effect of temperature upon *Tipula iridescent* virus infection in *Tipula oleracea*. *Journal of Invertebrate Pathology* 25: 115-124.
6. Chen, M. S., Sun, F. L., and Xu, D. H., 1981. Study of the biological characteristics of nuclear polyhedrosis virus in *Buzura*. *Hubei Nongy Keue* 12: 26-28.
7. Cherry, A. J., Rabindra, R. J., Parnell, M. A., Geetha, N., Kennedy, J. S., and Grzywacz, D., 2000. Field evaluation of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus formulations for control of the chickpea pod-borer, *H. armigera* (Hubn), on chickpea (*Cicer arietinum* var shoba) in southern India. *Crop Protection* 19: 51-60.
8. Ebling, P. M., and Kaupp, W. J., 1995. Differentiation and comparative activity of six isolates of a nuclear polyhedrosis virus from the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria*, Hubner. *Journal of Invertebrate Pathology* 66:198-200.
9. Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Steinke, S. B., Huber, J., and Jehle, J. A., 1999. *Cydia pomonella* granulovirus: Lethal time of neonate codling moth varies with temperature. 32th Annual meeting of the Society for Invertebrate Pathology (22-28. Aug. 1999), Irvine, USA.
10. Grzywacz, D., Mushobozi, W. L., Parnell, M., Joliffe, F., Wilson, K., 2008. Evaluation of *Spodoptera exempta* nucleopolyhedrovirus (SpexNPV) for the field control of African armyworm (*Spodoptera exempta*) in Tanzania. *Crop Protection* 27: 17-24.
11. Guo, Z. J., An, S. H., Wang, D., Liu, Y. H., Kumar, V. S., and Zhang, C. X., 2005. Characterization of Ha29, a specific gene for *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid

- Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38: 354-359.
12. Hamm, J. J., 1982. Relative susceptibility of several Noctuid species to a nuclear polyhedrosis virus from *Heliothis armigera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 39: 255-256.
 13. Hoover, K., Schultz, C. M., Lane, S. S., Bonning, B. C., Hammock, B. D., and Duffy, S. S., 1997. Effects of diet – age and streptomycin on virulence of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus against the tobacco budworm. *Journal of Invertebrate Pathology* 69: 46-50.
 14. Hughes, P. R., and Wood, H. A., 1981. A synchronous peroral technique for the bioassay of Insect virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 154-159.
 15. Ignoffo, C. M., and Garcia, C., 1996. Simulated sunlight-UV sensitivity of experimental dust formulation of the nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa/ Heliothis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 192-194.
 16. Ignoffo, C. M., and Shapiro, M., 1978. Characteristics of Baculovirus preparations processed from living and dead larvae. *Journal of Economic Entomology* 71: 186-188.
 17. Izadyar, S., Rezapanah, M. R., Daniali, M., Chitic, V., and Valashchuk, L., 1998. Laboratory production of NPV (Helicovirid-liquid) and the study of its pathogenicity on the cotton bollworm *in vitro*. Proceedings of 13th Iranian Plant Protection congress, 23-27 Aug., 1998, Karadj. P: 61.
 18. Jadhav, R. G., Khair, V. M., and Mote, U. N., 1992. Evaluation of adjuvants for nuclear polyhedrosis virus of gram pod borer (*Helicoverpa armigera*) on sunflower (*Helianthus annuus*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 62: 494-496.
 19. Kobayashi, M., and Choi, H., 1990. Inhibition of the accumulation of viral polypeptides in the Densonucleosis virus - infected midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, reared at a supraoptimal temperature. *Journal of Invertebrate Pathology* 56: 117-122.
 20. Long, G., Chen, X., Peters, D., Vlak, J. M., and Hu, Z., 2003. Open reading frame 122 of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus encodes a novel structural protein of occlusion-derived virions. *Journal of General Virology* 84: 115-121.
 21. Maramorosch, K., and Sherman, K. E., 1989. Viral insecticides for biological control. Academic Press, Inc. P:809.
 22. McLeod, P. J., Yearian, W. C., and Young, S. Y., 1977. Inactivation of baculovirus *Heliothis* by ultraviolet irradiation, dew, and temperature. *Journal of Invertebrate Pathology* 30: 237-241.
 23. Moscardi, F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 44: 257-289.
 24. 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)
 25. Moussa, A. Y., 1977. A new virus disease in the house fly, *Musca domestica* (Diptera). *Journal of Invertebrate Pathology*. 30: 204-216.
 26. OECD, 2002. Consensus document on information used in assessment of environmental applications involving baculoviruses. *Series on harmonization regulatory oversight in biotechnology* 20. ENV/JM/MONO (2002)1 OECD.
 27. Olofsson- Alvarez, C., and Osuna, E. V., 1988. Environmental persistence of the a nuclear polyhedrosis virus of the European pine sawfly in relation to epizootics in Swedish scots pine forests. *Journal of Invertebrate Pathology* 52: 119-129.
 28. Pawar, B. S., Chundurwar, R. D., Kadam, B. S., Thmbre, U. T., and Seeras, N. R., 1990. Field efficacy of nuclear polyhedrosis virus against *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae) on gram (*Cicer arietinum*) in Maharashtra. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 60: 287-289.
 29. Rabindra, R. J., Sathiah, N., and Jayaraj, S., 1992. Efficacy of nuclear polyhedrosis virus against *Helicoverpa armigera* (Hbn)(Lep., Noctuidae) larvae. *Journal of Applied Entomology* 118: 453-460.
 30. Rezapanah, M., 2001. Effects of solar radiation on efficacy of *Cydia pomonella* granulosis virus. M. Sc. Thesis, University of Tarbiat Modarres, Tehran. 96 pp. (Persian with English abstract).
 31. Rezapanah, M., 2001. Biochemical and Biological variation of Iranian isolates of *Cydia pomonella* granulovirus. Ph. D. Thesis, University of Tarbiat modarres, Tehran. 109 pp. (Persian with English abstract).

32. Rezapannah, M. R., Bayat Assadi, H., Esmaili, M., and Nouri Ghanbalani, G., 1996. Effects of solar radiation on efficacy of *Cydia pomonella* granulosis virus (CpGV). *Journal of Applied Entomology and Phytopathology* 63: 26-31. (Persian with English abstract)
33. Room, R. E., 1975. Field trials with a nuclear polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* against larvae of *Heliothis armigera* (Hb.) (Lepidoptera: Noctuidae) on sorghum and cotton in Botswana. *Bulletin of Entomology Research* 65: 507-514.
34. Shapiro, M., 1992. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economic Entomology* 85: 1682-1686.
35. Sheppard, R. F., and Stairs, G. R., 1977. Dosage-Mortality and Time - Mortality studies of a granulosis virus in a laboratory strain of the codling moth, *Laspeyresia pomonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 29: 216-221.
36. Shikata, M., Sano, Y., Hashimoto, Y., and Matsumoto, T., (1998). Isolation and characterization of a temperature-sensitive mutant of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus for a putative RNAPolymerase gene. *Journal of General Virology*. 79: 2071-2078.
37. Subrahmanyam, B., and Ramakrishnan, N., 1981. Influence of a baculovirus infection on molting and food consumption by *Spodoptera littoralis*. *J. Inverteb. Pathol.* 38: 161-168.
38. Teakle, R. E., 1979. Relative pathogenicity of nuclear polyhedrosis viruses from *Heliothis punctigera* and *Heliothis zea* for larvae of *Heliothis armigera* and *Heliothis punctigera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 34:231-237.
39. Teakle, R. E., and Byrne, V. S., 1989. nuclear polyhedrosis virus production in *Heliothis armigera* infected at different larval ages. *Journal of Invertebrate Pathology* 53:21-24.
40. Teakle, R. E., Jensen, J. M., and Giles, J. E., 1986. Age-related susceptibility of *Heliothis punctigera* to a commercial formulation of nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 47:82-92.
41. Tompkins, G. J., Dougherty, E. M., Adams, J. R., and Diggs, D., 1988. Changes in the virulence of nuclear polyhedrosis virus when propagated in alternate Noctuid (Lepidoptera: Noctuidae) cell lines and hosts. *Journal of Economic Entomology* 81: 1027-1032.
42. Wang, D., and Zhang, C. X., 2007. *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus ORF80 encodes a late, nonstructural protein. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40:65-71.
43. Whitlock, V. H., 1977. Effect of larval maturation on mortality induced by granulosis and a nuclear polyhedrosis virus infections of *Heliothis armigera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 30:80-86.
44. Witt, D. J., and Hink, W. F., 1979. Selection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus for resistance to inactivation by near Ultraviolet, far Ultraviolet, and thermal radiation. *Journal of Invertebrate Pathology* 33: 222-232.
45. Young, S. Y., Yearian, W. C., and Kim, K. S., 1977. Effect of dew from cotton and soybean foliage on activity of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 29: 105-111.

A laboratory investigation on the effect of environmental temperature on virulence of *Helicoverpa armigera* Multiple Nucleopolyhedrovirus

Moshtaghi Maleki F.¹, Jalali Sendi J.¹ and Rezapanah M.R.²

¹ Plant Protection Dept., Faculty of Agriculture, University of Guilan- Rasht, I.R. of Iran

² Biological Control Dept., Institute of Plant Pests and Diseases, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Not only a low speed of the effect of virus is one of factors to limit the use of baculoviruses in the field but also microclimate thermal condition is a lateral factor besides other effective factors that can affect on virulence and speed of the effect of virus. In this evaluation the effect of different temperatures 20-30 °C were investigated in biological activity (LT₅₀, LD₅₀) of a *Helicoverpa armigera* Multiple Nucleopolyhedrovirus isolate in early 3rd instar larva of cotton budworm (*Helicoverpa armigera* Hub.) in laboratory condition (50-60% relative humidity and 16L:8D photoperiod) in a factorial split plot. The viral dosage and the required time for mortality were similarly important in the temperature factor. LD₅₀ values in temperatures 20, 26 and 30 °C were estimated 3580.83, 2614.82 and 1751.62 PIB/Larvae respectively. The comparison of the mean LD₅₀ values with Duncan's multiple range test in three temperatures showed that viral range of mortality increases significantly with increasing temperature. The effect of temperature in mortality is especially significant in low dosages. LT₅₀ values in viral dosage of 5×10^5 PIB/Larvae in temperatures 20, 26 and 30 °C were estimated 7.15, 6.73 and 6.58 day respectively. The comparison of the mean LT₅₀ values with Duncan's multiple range test show that viral dosage in 30 °C is more active than 20 °C and its activity in 26 °C isn't significantly different from two other temperatures. Evaluation of LD₅₀ and LT₅₀ values of viral dosage and its comparison to incubation period show that the effect of temperature in the mortality rate and mortality speed is after the incubation period. Therefore temperatures in range of 26-30 °C could be recommended in reaching the high mortality percent and increasing the viral speed mortality.

Keywords: *Helicoverpa armigera* Multiple Nucleopolyhedrovirus, environmental temperature, incubation period, *Helicoverpa armigera*, LD₅₀ and LT₅₀