دراسة أولية للكشف عن فيروسات تابعة لعائلة Baculoviridae ضمن عوائلها على نباتات مختلفة في منطقة قطنا

Preliminary Study to Detect Baculoviridae on its Hosts on Different Plants in Qatana Area

د. غنوة محمد [1] د. غانية معلا [1]

Dr. G. Mohammad [1] Dr. G. Moulla [1]

gnwadea@gmail.com

Received 30 April 2024; Accepted 07 August 2024

(1) قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

(1) Department of Biology, Faculty of Science, Damascus University, Syria.

الملخص

أُجري المسح الحقلي خلال الأعوام 2022-2023 ونفّذت الجولات الحقلية خلال أشهر آذار، أيار، تشرين الأول وتشرين الثاني. شمل المسح الحقلي منطقة قطنا، وتمت زيارة حقول من منطقة قطنا دوريًا، جُمعت اليرقات التابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera وشملت فراشة الواي الفضية *Autograph gamma*، وأبي دقيق الخبازي *Vanessa cardui* أسبوعياً بصورة عشوائية في كل جولة، سجل وجود لليرقات المصابة بفيروس Baculoviridae وبنسب متفاوتة، كانت الإصابة بالفيروسات العصوية أكثر شدةً على فراشة الواي الفضية المنتشرة على الخبيزة (66.4%) والنجيل (71.4%)، بينما كانت أعلى شدة إصابة على أبي دقيق الخبازي على الخردل بنسبة (61.4%).

الكلمات المفتاحية: حرشفيات الأجنحة، فيروسات عصوية، مكافحة حيوية.

Abstract

A field survey was carried out during 2022-2023 in Qatana area, field visits took place in March, May, October and November. The Lepidoptera larvas were collected from plants sample weekly and randomly. They included Silver Y moth and Thistle Butterfly. We noted various infected with Baculoviridae virus on larvas which were found on plants, the infection was most severe on the silvery moth spread on hibiscus (66.4%) and grass (71.4%), while the highest infection severity by Thistle Butterfly was on mustard (61.4%).

Keywords: Lepidoptera, Baculoviridae, Biological Control.

©2025 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands. **ISSN: 2305-5243/ EISSN: 3005-6438. (p: 155-162)**

المقدمة

تعد الفيروسات الممرضة للحشرات Entomopathogenic viruses من عوامل المكافحة الحيوية للعديد من الحشرات الضارة وخاصة تلك التي تنتمي لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera، وهي من أكثر مجموعات الكائنات الدقيقة الممرضة ثقة لدى القائمين بالمكافحة بالأحياء الدقيقة للآفات الحشرية، ويرجع ذلك الى احتواء عالم الفيروسات على أجناس عديدة متخصصة مما يجعلها آمنة ليس لها آية أثار جانبية ضارة للإنسان ومنتجاته (Cristina and Ibarra, 2008)، كما أن كل منها مغلف بجسم ضمين يمنحه قدرة بقائية عالية بالبيئة، وأنه شديد الضراوة المرضية ضد الآفات الحشرية (Murphy *et al.,* 1995)، لذلك تستخدم الكثير من الفيروسات كمبيدات ميكروبية حشرية وتنتج على نطاق تجاري من قبل عدد من الشركات في العالم، وتتزايد الكميات المستوردة منها إلى عالمنا العربي في الآونة الأخيرة باعتبارها إحدى عناصر صناعات التقانات الحيوية المتقدمة وتعتبر فيروسات الـ Baculoviridae التي تشكل البروتين المتبلور والذي يطلق عليه اسم الـ occlusion bodies "الأجسام الضمينة" (OB) او البوليهيدرا (polyhedra) من أهم هذه الفيروسات المستخدمة في المكافحة الحيوية للحشرات كمبيدات حيوية bioinsecticides لمكافحة الحشرات الضارة وخاصة من رتبة حرشفيات الأجنحة في بقاع مختلفة من العالم (Summers and Smith, 1987; Choi *et al.,* 1999).

تؤثر العدوى بالفيروسات العصوية الـ Baculoviridae أيضًا على معدل تطور العمر اليرقي (O'Reilly, 1995)، حيث تطول مدة التطور اليرقي بسبب تثبيط هرمون النمو الحشري، والنقص في الكميات المناسبة لهرمون الانسلاخ الـecdysteroids مما يؤدي لتأخير التعذر ولذلك تزداد مدة تطور اليرقة (Clarke *et al.*, 1996). ويؤدي هذا لإنتاج أعظمي للفيروس خلال الطور اليرقي (O'Reilly and Miller, 1991). في المرحلة المتأخرة من العدوى later stage infection تتوقف اليرقة عن التغذية. وتتميز هذه المرحلة بإنتاج كمية مضاعفة من الـ OBs التي تملئ أخيراً كل جسم اليرقة 25% من كامل الكتلة الحية (Evans *et al.,* 1981)، ويقود الفيروس لتشكيل إنزيمين هما الـ cathepsin والـ chitinase من خلال إعطاء الأوامر للأحماض النووية في اليرقات المصابة لتشكيل هذين الأنزيمين اللذين يحفزان تحلل أنسجة اليرقة المصابة تحللاً كاملاً وتنطلق الأجسام الضمينة في سائل الدم، ويصبح جلد اليرقة المحتضرة هشاً للغاية. يصبح لون اليرقات المصابة أبيضا لبنيًا بسبب امتلاء خلايا بشرة الجسم الدهني وغيرها بالاجسام الكريستالية متعددة السطوح. تعتبر اليرقات الفتية هي الأكثر حساسية للإصابة بهذه الفيروسات، فالجرعة نصف المميتة LD50 ليرقات العمر الأول للفراشة الأمريكية البيضاء 5×10^2 OBs للفرد الواحد، ولليرقة من العمر الخامس 2×10^4 OBs. وتكون الحشرات في طور ما قبل العذراء والعذراء والحشرة الكاملة مقاومة لهذه الفيروسات، وتؤدي الجرعة غير المميتة ليرقات العمر الأخير إلى تحول اليرقة إلى عذراء ثم حشرة مشوهة تموت غالبًا قبل وضع البيض (Granados and Lawler, 1981). تقصي الفيروسات الممرضة للحشرات Entomopathogenic viruses من عائلة Baculoviridae على حشرات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera.

تأتي أهمية هذا البحث في تقصي الفيروسات الممرضة للحشرات Entomopathogenic viruses من عائلة Baculoviridae على حشرات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera فيما يؤدي لاحقًا الى تحديد العزلات الفيروسية

الأكثر شراسة لاستخدامها مستقبلًا كأحد الوسائل الرئيسة في المكافحة الحيوية للآفات الحشرية من رتبة حرشفيات الأجنحة ضمن برامج الإدارة المتكاملة للآفات Integrated Pest Management (IPM).

مواد وطرائق البحث

المسح الحقلي وجمع العينات

أُجري مسح حقلي خلال العامين 2022-2023 وتمت هذه الزيارات في أشهر آذار، أيار، تشرين أول، تشرين ثاني، جُمع فيها 2500 عينة. شمل المسح الحقلي حقول من منطقة قطنا، حيث تمت زيارة مواقع الدراسة أسبوعياً، وتم جمع يرقات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera من حقول اختيرت عشوائياً في كل جولة، وشملت العينات المجموعة يرقات فراشة الواي الفضية *Autographa gamma* (Noctuidae)، وأبي دقيق الخبازي *Vanessa cardui* (Nymphalidae). وتجدر الإشارة إلى أن هذه اليرقات وجدت على نباتات مختلفة مثل الخبيزة *Malva sylvestris*، والنجيل .*Agropyron repens* L، والخردل *Brassica tournefortii*.

وضعت كل يرقة داخل علبة بلاستيكية أبعادها (15 × 7 سم)، وكتب على العلبة كل المعلومات اللازمة (اسم النبات، مكان الجمع، تاريخ الجمع، الجزء النباتي الذي اخذت منه اليرقة، الحالة العامة لليرقة)، وأخذت هذه اليرقات إلى مخبر الفيروسات في كلية العلوم لدراستها وتصوير أعراض الإصابة بالأجهزة المتاحة في المخبر.

عزل الاجسام الضمينة (OB)

طبقت طريقة (El Salamouny, 1998) من أجل عزل الفيروسات من اليرقات التي تبدي أعراض مرضية حيث تم نقع اليرقات وهرسها في محلول وقائي (واقي TEC buffer بمعدل 500 ميكرولتر/ يرقة)، بعدها نقلت العينات إلى أنبوب معقم 1.5 مل وأجري لها تثفيل بسرعة 145 دورة/دقيقة لمدة 4 دقائق عند درجة حرارة 4 م°، ثم اخذ المحلول الطافي إلى أنبوب جديد وثفل مرة أخرى بسرعة 14000دورة/دقيقة لـ 15 دقيقة عند درجة حرارة 4 م°، يؤخذ الراسب ويحل في 1 مل ماء مقطر ومعقم حيث يحتوي هذا المحلول على الأجسام الضمينة.

الفحص بالمجهر الضوئي

فُحصت العينات التي تم عزلها من اليرقات المصابة حقلياً للكشف عن الأجسام الضمينة (OB) حسب طريقة (Wigley, 1980) بإجراء عملية الصبغُ بوساطة أزرق البروموفينول (0.1% brom- phenol blue) وذلك بوضع 10 ميكروليتر من المعلق على شريحة زجاجية، ومن ثم إضافة نفس الكمية من الملون وتركها لمدة 15 دقيقة، ثم فحصها عند التكبير 400 x باستخدام المجهر الضوئي حيث تبدو الأجسام الضمينة (OB) عديمة اللون.

العدوى الاصطناعية على يرقات فراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella*

تم الحصول على يرقات فراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (Pyralidae: Lepidoptera) من مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية، كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق، ثم أجريت العدوى الصناعية بالفيروسات التي تم عزلها من اليرقات التي جمعت خلال الجولات الحقلية واثبتت لاحقًا إصابتها الفيروسية عن طريق الفحص بالمجهر الضوئي

Bright field microscope. تم إجراء العدوى ليرقات حشرة فراشة الشمع الكبرى في العمر اليرقي الرابع، وضعت كل يرقة في وعاء بلاستيكي خاص معد لعملية التربية يحتوي على قطعة من البيئة المغذية (25 غ) والمعاملة بـ 250 ميكرولتر من المعلق الفيروسي من كل عزلة المتحصل عليه من طحن اليرقات المصابة، وبعد التغذية على قطعة الغذاء الملوث قدم لليرقات دوريًا غذاءً طازجاً وغير ملوث، وتم أخذ القراءات بشكل أسبوعي. أجريت الاختبارات في ظروف المختبر الطبيعية (Wang and Granados, 2000).

التحليل الإحصائي

تم اتباع أسلوب التصميم العشوائي التام في التحليل الاحصائي وحللت النتائج بواسطة برنامج Xlstat 2014.

النتائج والمناقشة

نتائج المسح الحقلي وجمع العينات

اختلفت أعراض الإصابة التي تم ملاحظتها على اليرقات المصابة وذلك حسب نوع اليرقة ومرحلة العدوى، وأهم الأعراض التي تم رصدها على اليرقات المريضة هي تغير اللون الطبيعي المعروف لليرقة إلى اللون الاسود وانتفاخها في يرقات أبي دقيق الخبازي *V. cardui* (الشكل 1- A)، كما لوحظت بعض اليرقات المتحللةً تحللاً كاملاً على أوراق النبات العائل كما في يرقة فراشة الواي الفضية *A. gamma* (الشكل 1- B)، كما تميزت بعض يرقات أبي دقيق الخبازي المصابة بإفراز سائل بلون أخضر قاتم مائي ذي رائحة مميزة (الشكل 1- C)، كما لوحظت بعض اليرقات متعلقةً بأرجلها ورأسها نحو الأسفل في قمة النبات كما في يرقات أبي دقيق الخبازي *V. cardui* (الشكل 1-D) وهذا يتوافق مع ما وجده (Song, *et al.,* 2008; Cherry *et al.,* 1997).

D **C** **B** **A**

الشكل 1. اعراض الاصابة على اليرقات

A: اسوداد وانتفاخ يرقات أبي دقيق الخبازي *V. cardui*، B: تحلل اليرقة بشكل كامل على أوراق النبات العائل كما في يرقة فراشة الواي الفضية *A.gamma*، C: خروج سائل ذو رائحة من يرقات أبي دقيق الخبازي *V. cardui*

D: تعلق اليرقات في أعلى النبات بشكل مقلوب والفم الى الاسفل عند أبي دقيق الخبازي *V. cardui*

يبين الجدول (1) اختلاف النسبة المئوية لإصابة اليرقات المدروسة حسب الحشرة والنبات، فقد كانت الإصابة أكثر شدةً على فراشة الواي الفضية *Autographa gamma* (Noctuidae)، المنتشرة على الخبيزة *Malva sylvestris* (66.4%) والنجيل *Agropyron repens* L. (71.4%)، بينما كانت أعلى شدة إصابة على أبي دقيق الخبازي *Vanessa cardui* (Nymphalidae) على الخردل *Brassica tournefortii* بنسبة (61.4%).

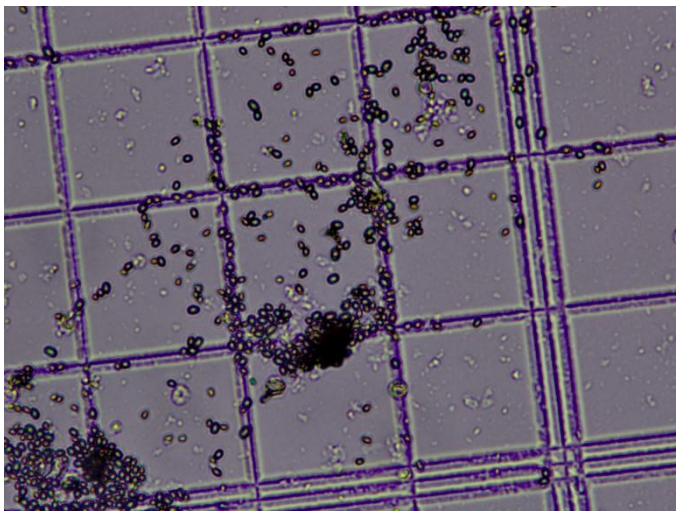
الجدول 1. النسبة المئوية لإصابة بعض يرقات رتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera نتيجة الإصابة بفيروس ممرض للحشرات

الحشرة	العائل النباتي			المتوسط
	خبيرة	خردل	النجيل	
فراشة الواي الفضية *A. gamma*	66.4^{b}	42.2^{d}	71.4^{a}	60^{A}
أبي دقيق الخبازي *Vanessa cardui*	24.8^{f}	61.4^{c}	33.2^{e}	39.8^{B}
المتوسط	45.6^{B}	51.8^{A}	52.3^{A}	49.9
العائل النباتي	p-value< 0.05			LSD 0.05 = 1.192
الحشرة	p-value< 0.05			LSD 0.05 = 0.973
العائل النباتي*الحشرة	p-value< 0.05			LSD 0.05 = 1.685

* تشير الحروف المختلفة في العمود الواحد إلى وجود فروقات معنوية بين متوسطات المعاملات عند مستوى ثقة 95%.

الفحص بالمجهر الضوئي

بينت الدراسة إصابة يرقات حشرتي فراشة الواي الفضية *A. gamma* وأبي دقيق الخبازي *V. cardui* بفيروس الـ Baculoviridae، وقد بدت البولي هيدرا كبللورات واضحة عند التكبير 400 x بسبب تلونها أثناء الصبغ بأزرق البروموفينول (Fuxa *et al.,* 2002).



الشكل 2. البولي هيدرا عند التكبير 400 x بالمجهر الضوئي بعد تلوينها بأزرق البرومو فينول

العدوى الاصطناعية على يرقات فراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella*

أظهرت اليرقات المعداة بالعزلات الفيروسية أعراض الإصابة النموذجية المختلفة التي تسببها فيروسات تتبع لعائلة الـ Baculoviridae، وهذه الاعراض كانت انتفاخ تلك اليرقات المصابة وتغير اللون وظهور الإفرازات من الجسم (الشكل. 3) ويتفق ذلك مع ما ذكره (Jehle *et al.,* 2006).

الشكل. 3 أعراض الإصابة بالفيروسات على يرقات فراشة الشمع الكبرى التي تظهر تغير لونها عن الطبيعي وانتفاخها بسبب تكون الاجسام الضمينة الفيروسية داخلها

تُعد هذه الدراسة أولية للكشف عن فيروسات Baculoviridae التي تصيب حشرات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera على عوائل نباتية مختلفة، يمكن اعتبار هذه الفيروسات التي تم الكشف عنها تابعة لمجموعة*Alphabaculovirus* لأنها تشكل الأجسام الضمينة (OB) التي تم عزلها وفحصها بالمجهر الضوئي وتصيب فقط الحشرات التابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera (Carstens and Ball, 2009). كما تعد هذه الدراسة أولية لاستخدامها كمبيدات آمنة دون أية آثار جانبية على الصحة الإنسانية (Szewczyk *et al.*, 2008).

الاستنتاجات والتوصيات

- تسجيل الإصابة الفيروسية بعائلة Baculoviridae على يرقات حشرات حرشفيات الأجنحة Lepidoptera في فراشة الواي الفضية *Autographa gamma* (Noctuidae)، وأبي دقيق الخبازي *Vanessa cardui* (Nymphalidae) على العوائل النباتية الخردل، النجيل والخبيزة في منطقة قطنا.
- -اختلفت نسب الإصابات الفيروسية على اليرقات حسب النبات العائل لليرقة، حيث كانت أعلى نسبة إصابة على نبات الخبيزة بالنسبة ليرقات فراشة الواي الفضية 66.40%، أما على نبات الخردل فقد بلغت أعلى نسبة إصابة 61.40% بالنسبة ليرقة أبي دقيق الخبازي، وعلى نبات النجيل بلغت أعلى نسبة الإصابة على يرقة فراشة الواي الفضية 71.40%.
- -نوصي بإجراء دراسة بيولوجية جزيئية لهذه الفيروسات من أجل تصنيفها الدقيق.

المراجع

- Carstens, E. B., L. A., Ball. 2009. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2008. Archives of Virology 154: 1181-1188.

- Cherry, A.J., Pamell, M.A., Grzywacz, D. and Jones, K.A. 1997. The optimization of in vivo nuclear polyhedrosis virus production in Spodoptera exempta (Walker) and Spodoptera exigua (Hubner); *Journal of Invertebrate Pathology.* 70; 50-58.

- Choi, J.Y., Woo, S.D., Je, Y.H. and Kang, S.K. 1999. Development of a novel expression vector system using *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. *Molecules and Cells*. 9:504- 509.

Clarke, E.E., Tristem, M., Cory, J.S. and O'Reilly, D.R. 1996. Characterization of the ecdysteroid UDP glucosyltransferase gene from the *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology*. 77: 2865-2871.

- El- Salamouny, S. 1998. Increasing efficacy of nucleopolyhedrovirus and a comparative study of an Egyptian isolate. Ph. D. Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University. 238 pp.

- 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.

- Fuxa, J.R., Richter, A.R., Ameen, A.O. and Hammock. B.D., 2002. Vertical transmission of TnSNPV, TnCPV, AcMNPV, and possibly recombinant NPV in Trichoplusia ni. *Journal of Invertebrate Pathology*, 79: 44-50.

-Granados, R.R. and Lawler, K.A. (1981). *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology*. 108, 297-308.

-Ibarra, J.E. and Cristina Del Rincon-Castro, M. 2008. Insect viruses: diversity, biology, and use as bioinsecticides. In: *International Commision on Tropical Biology and Natural Resources*, in *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS),* Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, [http://www.eolss.net].

-Jehle, J. A., Lange, M., Wang, H., Hu, Z., Wang, Y. and Hauschild, R. 2006. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology* 346, 180-193.

- O'Reilly, D.R. 1995. Baculovirus-encoded UDP-glucosyltransferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 25: 541-550.

- O'Reilly, D.R. and Miller, L.K. 1991. Improvement of baculovirus pesticide by deletion of the egt gene. *Biotechnology*. 9, 1086-1089.

- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. and Summers, M.D. (Eds.). 1995. Virus Taxonomy - The Classification and Nomenclature of viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, New York. Pp 391-392.

- Song, J., Wang, R., Deng, F., Wang, H. and Hu, Z. 2008. Functional studies of per os infectivity factors of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology.* 89, 2331-2338.

-Summers M.D., Smith G.E. *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin no. 1555.* College Station, TX: Texas A and M Univ. Publ.; 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures; pp. 10-39.

- Szewczyk, B., P. Barski, W. Sihler, L. Rabalski, I. Skrzecz, L.Hoyos-Carvajal, L., and M.L. De Souza. 2008. Detection and identification of baculovirus pesticides by multitemperature single-strand conformational polymorphism. Journal of Environmental Science and Health -Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 43: 539-545.

- Wang, P. and Granados, R. R. 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 30, 135-143.

- Wigley, P. J. 1980. Counting insect viruses. In Kalamakov, J., Longworth, J. F., (Eds.) Microbial control of insect pests. New Zealand DSIR Bulletin No 228. Wellington. P54.

N° Ref: 1177