Isolation and identification of the Nuclear Polyhydrosis Virus (NPV) from the cotton leaf worm larvae *Spodoptera littoralis* (Boisd)

عزل وتشخيص الفايروس متعدد الاسطح الموجود بالنواة N.P.V من يرقات دودة ورق القطن *Sopdoptera littoralis* (Boisd)

حسام الدين عبدالله محمد صالح
قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد

المستخلص

ظهرت اعراض مرضية على يرقات دودة ورق القطن *Spodoptera littoralis* المرباة بالمختبر ، على اوراق نبات الطماطة تمثلت ببطء الحركة وتوقفها عن التغذية وانتفاخ وتغير لون الجسم الى لون ابيض شاحب ، عزل فايرس Spodoptera.Nuclear Poly Hydrosis Viruses من اليرقات المريضة وشخص باستعمال المجهر الالكتروني النافذ باستعمال طريقة التصبيغ السالب واثبتت مسؤوليته عن موت اليرقات ، استعمل الفايروس بثلاثة مستويات25 و 50 و 75% بالاختبار الحيوي ليرقات دودة ورق القطن وظهرت الاجسام الضمينة IBs متعددة الاوجه، رسمت خطوط السمية للمستويات بعد 24 ساعة و 72 ساعة باستعمالlog dose-propit، وجد ان Lc50 للفايروس بعد استعمال 24 ساعة هي 0.20 %والميل 1.86 وبعد 27 ساعة كانت o.07 % Lc50 والميل 1.62.

Abstract

Cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisd) larvae reared in lab on tomato leafs, showed illness symptoms which were: slow mobility, stop feeding, swelling and discoloration into pale white. Spodoptera Nuclear Poly Hydrosis Virus was isolated and identified using the electron transmission microscope by the negative staining method and proved to be responsible for the larvae's mortality. Three concentrates of viral suspension were used (25,50,75 %) for the bioassay and the polyhydric inclusion bodies appeared. Toxicity lines were drawn after 24 and 72 hours using the (Log. Dose-propit). The LC50s for the virus were 0.20 % and 0.07 % and the slopes were 1.86 , 1.62 consequently.

المقدمة

تعد دودة ورق القطن ***Sopdoptera littoralis* (Boisd)** آفه تسبب اضرار اقتصادية على نباتات العائلة الباذنجانية وتعد من الآفات الحشرية المهمة في العراق على افراد هذه العائلة (1). تنتشر هذه الافة على مدار السنة في الحقول المكشوفة والزراعة المحمية بسبب ملائمة الظروف البيئية ووفرة العائل الغذائي بالعراق (2). وتعد من اهم الافات الرئيسة على محصول الطماطة في الزراعة المحمية في العراق خصوصاً في محافظة البصرة (3).

ان اهمية هذه الحشرة تأتي من الضرر الحاصل نتيجة تغذي اليرقات الصغيرة على البشرة السفلى للورقة حيث موضع البيض. عند التقدم بالعمر تتغذى على اجزاء كبيرة من الورقة وقد تقرض معظمها ولا تبقي الا العروق اضافة الى مهاجمتها البراعم الخضرية والزهرية والازهار والثمار في حالات الاصابة الشديدة على الطماطة (4). يتميز سكان حشرة دودة ورق القطن *Sopdoptera littoralis* (Boisd) بمقاومة عالية للمبيدات الكيمياوية حيث طورت مقاومة ضدها فيكون من الصعب مكافحة هذه الحشرة كيمياوياً لذا وجدت بدائل باستعمال المكافحة الشاملة والمنظمة ومنها الطرق الفيزياوية والميكانيكية والحيوية (5).

ان طرق المكافحة الاحيائية المتوفرة بالعالم هي استعمال الفايروسات الحشرية كعناصر ضبط للافة شخص اكثر من 20 مجموعة فايروسية تصيب الحشرات وضعت في 14 عائلة فايروسية تصيب اكثر من 100 عائل حشري وحلم. تعد عائلة الفايروسات العصوية Baculoviridae التي تضم فايروسات متعددة الاسطح الموجودة بالنواة Nucelar viruses polyhydrosis الذى يصيب اكثر من 400 عائل حشري منها 34 عائلة تعود الى رتبة حرشفية الاجنحة ومنها دودة ورق القطن (6). من اهم اعراض الاصابة بهذا الفايروس هو تغير لون الدم من رائق الى سائل ابيض لبني يتبعه نقص في التغذية وكسل عام وقبل الموت تصبح الحشرة مترهلةً وتتوقف عن الحركة والتغذية ويحدث الموت بعد 24 ساعة من ابتلاع جسيمة الفايروس (7). الفايروسات التى تصيب الحشرات من عائلة Baculoviridae تمتاز بتكوينها اجسام بروتينية محتواة متعددة الاسطح ينغمر بها الفايرس وهو من نوع DNA .

طريقة العمل والمواد:

عند تربية حشرة دودة ورق القطن(Boisd) *S. littoralis* ، بالمختبر ظهرت عليها اعراض مرضية مطابقة لما ذكر في المصادر العلمية. عزل المسبب المرضي وطبقت فرضية كوخ واتضح انه فايروس Spo-N. P.V . اجريت عملية عزل وتشخيص الفايروس باستعمال المجهر الالكتروني النافذ وبطريقة التصبيغ السالب، رسمت خطوط السمية لمستويات الفايروس وحددت قيم LC50 لها.

ربيت يرقات دودة ورق القطن بالعمر الرابع على اوراق الطماطة بالمختبر ، جمعت 20 يرقة مريضة تحول لونها الى الابيض الطباشيرى وبطء في الحركة والامتناع عن التغذية وتحول محتويات جسمها الى سائل كريه الرائحة ، هرست في هاون خزفي مبرد في محلول دارئ Buffer Phosphate Saline (BPS) ذو أس هيدروجيني متعادل pH = 7.2 رشحت بقطع من الشاش المعقم لغرض التخلص من القطع الكبيرة ، ولعزل الفايروس اتبعت خطوات (8) وكما يلي :

1- جنست 20 يرقة مهروسة مع 50 مللتر ماء مقطر معقم بارد بخلاط كهربائي ذو ثلاث سرعات لمدة خمسة دقائق لكل سرعة بعد اضافة خمسة مللتر من المحلول الدارىء BPS بغرض تحرير محتويات الخلية بعد تكسيرها والمحافظة على الفايرس.
2- رشح المحلول بورق ترشيح Wattman No. 4 للتخلص من القطع الكبيرة.
ترك المحلول بالثلاجة لليوم التالي ، رشح المحلول باستعمال قمع بوخنر بواسطة جهاز تفريغ هوائي باستعمال ورق ترشيح Wattman No. 1 .
3- عرض الراشح الى عملية انتباذ باستعمال جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 دورة / دقيقة ولمدة نصف ساعة.
4- اهمل الراسب واخذ الراشح ، اضيف اليه خمسة مللتر من المحلول الدارىء BPS وعرض لعملية انتباذ مرة اخرى بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة / دقيقة ولمدة نصف ساعة.
5- اهمل الراشح واخذت الحبة Pellet المترسبة وهي عبارة عن جسيمات الفايروس اضيف اليها خمسة مللتر ماء مقطر معقم واجريت عمليات ترشيح بواسطة مرشحات دقيقة Millipore اسبانية الصنع من انتاج شركة Gema medical وبقطر 0.2 مللي مايكرون التي تسمح بمرور جسيمات الفايروس فقط ، قسم المحلول الى قسمين: قسم للاختبار الحيوي والقسم الاخر استعمل للتصوير في وحدة المجهر الالكتروني / كلية الطب / جامعة النهرين.

تحضير مستويات الفايروس للاختبار الحيوي

بعد تنقية الفايروس حضرت ثلاثة مستويات من الفايروس هي 25 و 50 و 75% من المحلول المنقى ، استعملت ثلاثة مكررات لكل مستوى في كل مكرر عشرة يرقات غذيت على اوراق طماطة رشت بمرشة يدوية سعة 100 مل استعمل خمسة مللتر من المحلول لكل مستوى اما معاملة المقارنه رشت الاوراق بالماء فقط، اخذت القراءات و النسبة المئوية للقتل بعد 24 ، 72 ساعة . اجريت التجربة في حاضنة تحت درجة حرارة 25° ±2 سلزية ورطوبة نسبية 75%.
صححت نسب القتل اعتماداً على معادلة Schneider–Orellis المشتقة من Abbott وهي :

$$\text{نسبة القتل (\%)} = \frac{\text{\%القتل المئوية في الالواح المعاملة} - \text{\% للقتل في المقارنة}}{100 - \text{النسبة المئوية للقتل في المقارنة}} \times 100$$

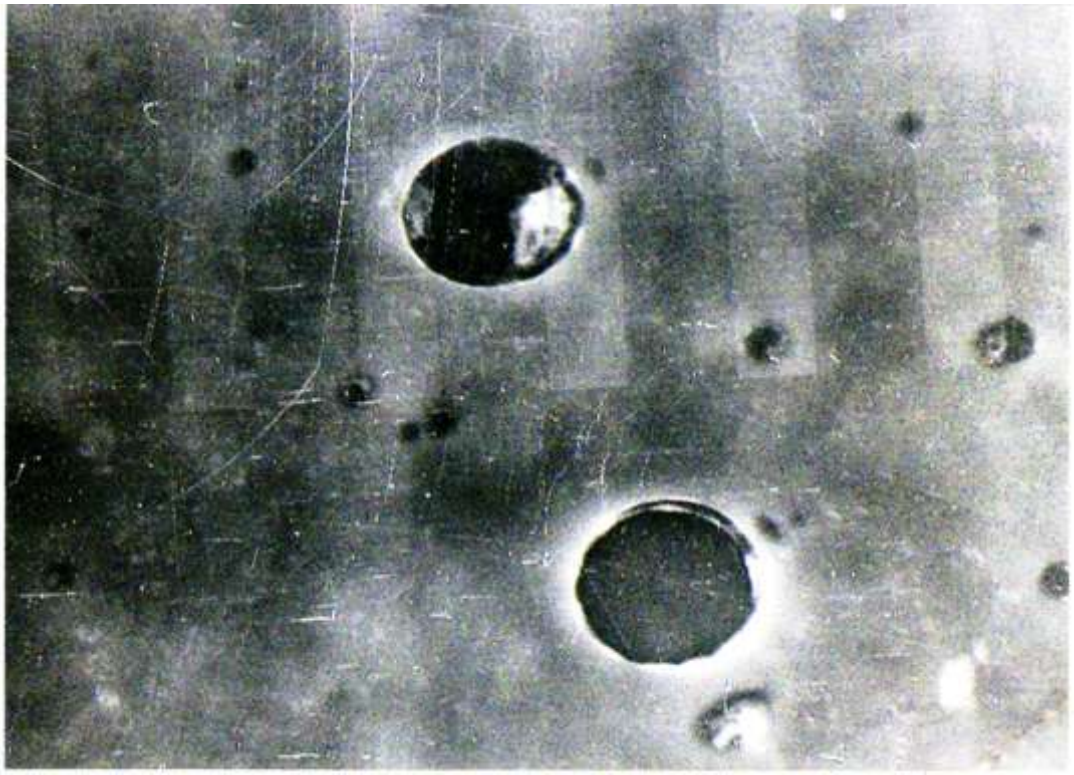
رسمت خطوط السمية باعتماد Logprobit paper حيث يقسم المحور الصادي منها الى وحدات Probit والمحور السيني الى لوغارتم المستوى باستعمال البرنامج الإحصائي الجاهز EPA probit analysis program version 1.5 .

تصوير الفايرس بالمجهر الإلكتروني النافذ:

اخذ 5 مللتر من محلول الفايروس المنقى و مرر على مرشحات خاصة لهذا الغرض Millipore قطر 0.2 ملي مايكرون ، استعملت طريقة (9) في تصبيغ النماذج باستعمال حامض فوسفوتنكستك اسد 2% . فحصت النماذج بالمجهر الالكتروني النافذ نوع Philips –CMID عند قدرة 80 كيلوفولت وصور الفايروس بعدة تكبيرات (10).

النتائج والمناقشة

اظهرت نتيجة الفحص الالكتروني وبالتصبيغ السالب Negative staining وجود الاجسام الضمنية للفايرس Spo-N.P.V.(IBs) متعددة الاسطح وهي عبارة عن جسيمات الفايرس مغمورة بمادة بروتينية متعددة الاوجه وبقوة تكبير 25000 مرة (شكل 1).



شكل (1) الاجسام المحتواة للفايروس Spo-N.P.V وبقوة تكبير 25.000 مرة وبالتصبيغ السالب

اتفقت النتيجة مع ما وجده(6) من ان الفايروس ينغمر في اجسام محتواه بروتينية (اجسام ضمنية IBs) متعدد ة الاسطح وهذا الفايروس يعود لعائلة الفايروسات العصوية وباسم Spo-N.P.V ، وكذلك مع نتائج(11) اذ ذكر ان الفايروس الذي يصيب Spo-N.P.V متعددة الاسطح (الاوجه) يصيب نواة خلايا الحشرة وينغمر في اجسام محتواه (ضمنية) IBs واليرقات المصابة تكون خاملة يتحول لونها الى ابيض فتحدث عملية الملننة، وهى ظهور بقع داكنة على كيوتكل الحشرة ويتحول جدار الجسم الى تركيب رخو وهش وتتحول محتويات جسم اليرقة الى سائل كريه الرائحة بعد الموت.

رسمت خطوط السمية لمستويات الفايروس Spo-N.P.V بعد المعاملة بـ 24 ساعة . والجدول (1) يبين النسبة المئوية للقتل والمصححة وقيمة مربع كاي عند معاملة يرقات دودة ورق القطن *S. littoralis* بالفايروس وبعد 24 ساعة من المعاملة .

جدول (1) .النسبة المئوية لقتل يرقات دودة ورق القطن *S. littoralis* (Boisd) وقيمة مربع كاى بعد 42 ساعة من المعاملة بمستويات الفايرس.Spo-N.P.V

المستوى	عدد الحشرات المعاملة	عدد الحشرات الميتة	% للقتل الملاحظة	% للقتل المصححة	قيمة مربع كاي المحسوبة	قيمة مربع كاي الجدولية
0.25	20	12	0.600	0.571	0.929	3.841
0.50	20	14	0.700	0.771		
0.75	20	18	0.900	0.858		
حدود الثقة 5.95 – 7.05 حد الثقه 95% قيمة LC50 المحسوبة 0.200%						

يتبين من جدول(1)ان نسب القتل تزداد بزيادة المستوى اذ كانت60% عند المستوى25% وازدادت لتصبح90% عند المستوى 75% حدود الثقة من 5.95 و 7.05 ولا يوجد فرق كبير بينها اذاً هي ذات معنى ، اذا كان الفرق كبير فلا معنى لها (12).

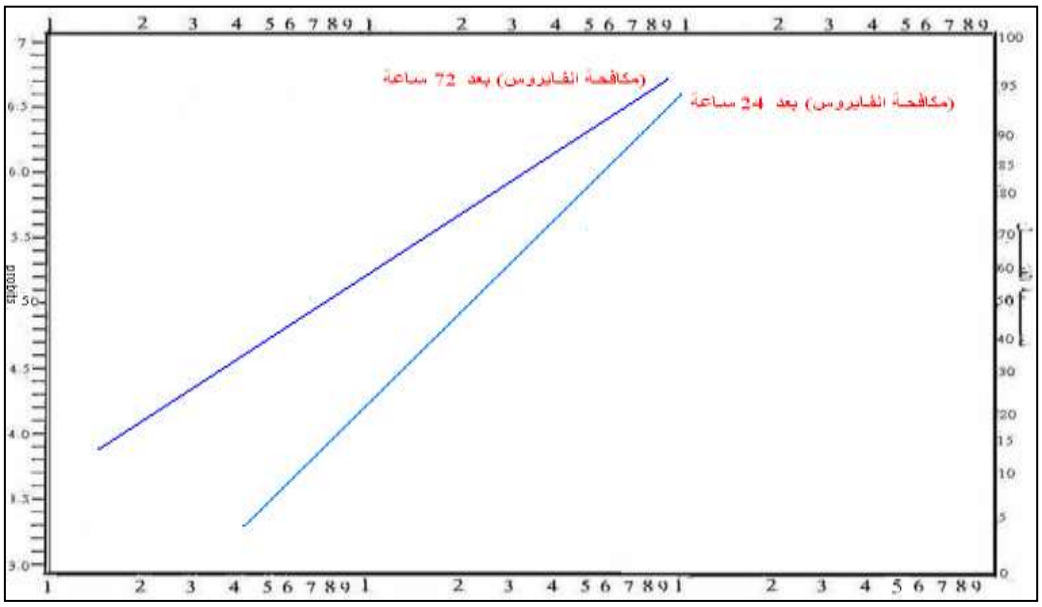
قيمة مربع كاي المحسوبة بلغ 0.929 وهي اقل من قيمة مربع كاي الجدولية 3.841 ولا يوجد اختلاف معنوي في طول خطا السمية والنقاط المار بها أي ان خطوط السمية تمر بجميع النقاط او معظم النقاط المرسومة. وكانت قيمة Lc50 المحسوبة هي 0.200 %.

جدول 2 .النسبة المئوية لقتل يرقات دودة ورق القطن (Boisd) *S. littoralis* وقيمة مربع كاي لمعاملة مستويات الفايروس بعد 27 ساعة

المستوى	عدد الحشرات المعاملة	عدد الحشرات الميتة	% للقتل الملاحظة	% للقتل المصححة	قيمة مربع كاي المحسوبة	قيمة مربع كاي الجدولية
0.25	20	16	0.800	0.797	0.018	3.841
0.50	20	18	0.900	0.9066		
0.75	20	19	0.9500	0.9461		
حدود الثقة 5.84 – 7.77 حدا الثقه 95% قيمة LC50 المحسوبة 0.077						

يوضح جدول (2) ان مستويات الفايروس بعد المعاملة بـ 72 ساعة تراوحت نسبة القتل من 80% للمستوى 25% لتصل الى 95% عند المستوى 75% ، بلغت قيمة حدود الثقة بين 5.84 و 7.72 أي لا يوجد فرق كبير بين حدود الثقة .وقيمة مربع كاي المحسوبة 0.018 واقل من القيمة الجدولية الذي بلغ 3.841 . لا يوجد اختلاف معنوي في خط السمية والنقاط المارة بها. وبلغت قيمة LC50 المحسوبة 0.077 ، اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره (13) حول حدود الثقة وقيمة مربع كاي ، وبلغت قيمة LC50 المحسوبة 0.077 %.

يوضح شكل(2) خطوط السمية لمستويات الفايروس بعد 24 ، 72 ساعة من المعاملة . يلاحظ ان خطوط السمية لمستويات الفايروس مستقيمة هذا يدل على ان ميكانيكية التأثير السام هي واحدة ، كذلك تلاحظ ان خط السمية لمستويات الفايروس بعد 72 ساعة من المعاملة اقترب نحو المحور الصادي مما يدل على ان الحشرة حساسة جداً لمستويات الفايروس المعاملة بـعد 72 ساعة . اتفقت النتيجة مع ما ذكره (12). ان مستويات الفايروس المختلفة تكون فعالة بعد 72 ساعة من الاستعمال على الغذاء لان طريق دخول الفايروس إلى جسم الحشرة يكون عن طريق الفم.



شكل 2 خطوط السمية لمستويات الفايروس .Spo-N.P.V بعد المعاملة بـ24 و72 ساعة

المصادر

1- العزاوي ، عبدالله فليح وابراهيم قدوري قدو ، وجيه ، صالح الحيدري . 1990. الحشرات الاقتصادية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد. 652 صفحة.

2- الزبيدي ، عايد نعمة عويد. 1987. تأثير المبيد البكتيري Bactoispeine على ثلاثة حشرات ، حرشفية الاجنحة وتوافقه مع بعض المبيدات الكيمياوية في البيوت المحمية ، رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة بغداد.

3- قاسم ، انعام عباس. 1999. دراسة تشخيصية وبيئية لأنواع الديدان القارضة من رتبة حرشفية الاجنحة على محصول الطماطة مع الاشارة الى مكافحتها في مزارع الزبير وصفوان. رسالة ماجستير. جامعة البصرة.

4- ربيع، سهى كاظم جعفر 2002. حياتية وبيئية دودة ورق القطن***Sopdoptera littoralis* (Boisd)** ومكافحتها كيمياوياً. رسالة ماجستير، كلية الزراعة–جامعة بغداد.

5- العبيدي ، شيماء حميد مجيد 2006. كفاءة الفطر *Beauveria bassiana* والمبيد Avaunt في مكافحة دودة ورق القطن ***Sopdoptera littoralis* (Boisd)** رسالة ماجستير ، كلية الزراعة – جامعة بغداد.

6- Tanada, Yoshinori ; Harry , K. Kaya. 1993. Insect pathology , Academic Press. INC. Page 666.

7- الباروني، محمد ابو مرداس وعصمت محمد حجازي.1994. المكافحة الحيوية للآفات، الجزء الثاني. ممرضات الحشرات، منشورات جامعة المختار، ليبيا635 صفحة.

8- Burgess , H.D. 1981. Microbial control of pest and plant diseases. Entomo. Res. 65 : 221-262.

9- Geeffery , A. Meek . 1977. Practical electron microscopy for biologists. A Wily Interscience Publication. John Wily and sons , 2nd edition , New York. Pp. 529.

10- صالح ، حسام الدين عبدالله محمد. 1999. عزل وتنقية الفايروس الحبيبي PTM-GV من البيئة العراقية واختباره في مكافحة عثة درنات البطاطا *Pthorimaea operculella* (Zell.) . اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

11- David , B. Sattelle . 1994. Biological techniques of manual of techniques in insect pathology , Academic press , pp. 320.

12- شعبان ، عواد ونزار مصطفى الملاح. 1993. المبيدات . دار الكتاب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل . 520 صفحة.

13- Navon , A. ; Ascher , K.R.S. 2000. Bioassay of Entomopathogen microbes and Nematodes . CABI Publishing , pp. 324.