جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

دراسة للكشف والتعرف على الفيروسات التابعة لعائلة Baculoviridae المتواجدة طبيعياً على بعض حشرات رتبة الـ Lepidoptera في سورية

رسالة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في وقاية النبات

إعداد المهندسة
غنوه محمد

المشرف

الاستاذ الدكتور عبد النبي بشير

1436هـ-2015م

جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

دراسة للكشف والتعرف على الفيروسات التابعة لعائلة Baculoviridae المتواجدة طبيعياً على بعض حشرات رتبة الـ Lepidoptera في سورية

رسالة أعدت لنيل درجة الدكتوراة في وقاية النبات

إعداد المهندسة
غنوه محمد

المشرف

الاستاذ الدكتور عبد النبي بشير

1436هـ-2015م

تصريح:

أصرح بأن البحث الموصوف في هذه الأطروحة تحت عنوان:

دراسة للكشف والتعرف على الفيروسات التابعة لعائلة Baculoviridae
المتواجدة طبيعياً على بعض حشرات رتبة الـ Lepidoptera في سورية

لم يسبق له أن قُدم للحصول على أي درجة جامعية أخرى وأن كافة الأعمال والنتائج المذكورة هي محصلة جهودي الشخصية وبتوجيه من المشرفيين العلميين.
وأن أية معلومات أو طرائق أو نتائج أخرى ذكرت في الأطروحة قد نسبت إلى مصادرها ومؤلفيها بوضوح في النص وفي قائمة المراجع.

المرشحة للدرجة
غنوة أحمد محمد

أصادق على تصريح المرشحة للدرجة

المشرف:
الأستاذ الدكتور عبد النبي بشير

عنوان الأطروحة:

دراسة للكشف والتعرف على الفيروسات التابعة لعائلة Baculoviridae المتواجدة طبيعياً على بعض حشرات رتبة الـ Lepidoptera في سورية

أعدت الأطروحة من قبل المهندسة غنوة أحمد محمد

الدرجة العلمية : دكتوراة في وقاية النبات

مكان وتاريخ المناقشة : كلية الزراعة- جامعة دمشق في 30 / 4 / 2015 - مدرج الإطروحات وقبلت من لجنة الحكم علما ان الطالبة قامت بالتعديلات اللازمة

لجنة الحكم:

- أ. د. جودة فضول	عضواً رئيساً
- أ. د. عبد النبي بشير	عضواً مشرفاً
- أ.د. لؤي أصلان	عضواً
- أ. د. هدى قواص	عضواً
-أ. د. محمود أبو غرة	عضواً

شكر وتقدير

أتقدم بخالص الشكر والتقدير إلى الدكتورة أمل خدام والأستاذ الدكتور عبد النبي بشير اللذان قاما بالإشراف على هذه الرسالة وقدما توجيهاتهما وإرشاداتهما القيمة، كما اخص بالشكر الدكتورة عايدة جلول للمساعدة القيمة التي قدمتها للبحث وأتوجه بالشكر والتقدير إلى الأستاذ الدكتور لؤي أصلان لتوفيره التسهيلات اللازمة لإنجاز البحث، وكل الشكر والتقدير إلى إدارة كلية الزراعة وعلى رأسهما عميد كلية الزراعة الأستاذ الدكتور محمد أيمن السعدي وكل من الأستاذ الدكتور موسى عبود نائب العميد للشؤون العلمية والأستاذ الدكتور محمود صبوح نائب العميد للشؤون الإدارية والأستاذ الدكتور هشام الرز رئيس قسم وقاية النبات، كما اشكر القائمين على مخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة الدكتورة سلام لاوند والسيد عماد كيلاني والسيد طلال عكاش ، وكذلك القائمين على مخبر بحوث ودراسات الطفيليات، المهندسين فائق عبد الرازق واحمد أبو السل وعلاء صالح وباسل شديدي والقائمين على مخبر بحوث ودراسات المكافحة الحيوية للأعشاب الضارة الدكتور غسان إبراهيم والمهندسة سهى الحاج كسار والآنسة هزار الوادي، والقائمين على مخبر بحوث ودراسات الأعداء الحيوية غير الحشرية الأستاذ الدكتور خالد العسس والمهندسات اسما حيدر واسما حسن وأماني جاويش والآنسة علا البدوي.

واخص بالشكر المهندسة عبير لحام والى روح المهندس عدنان الرفاعي للمساعدة الكبيرة التي قدماها للعمل.

قائمة الاختصارات

LIST OF ABBREVIATIONS

AcMNPV: *Autographa californica* multiple Nucleopolyhedrovirus

Agip NPV: *Agrorotis ipsilon* Nucleopolyhedrovirus

AgMNPV: *Anticarsia gemmatalis* multiple Nucleopolyhedrovirus

BmNPV: Bombyx mori NPV Nucleopolyhedrovirus

Bp: base pairs

BV: budded virions

CPV: cytoplasmic polyhedrosis virus

DNA: deoxyribonucleic acid

dNTP: 2′-Deoxyribonucleoside-5′-Triphosphate

DNV: *Densonucleovirus*

EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid

g : gravity traditionally named "relative centrifugal force" (RCF)

GV: Granuloviruses

H. armigera: Helicoverpa armigera

HaMNPV: Heliothis armigera multiple nucleopolyhedrovirus

HaSNPV: Heliothis armigera single nucleopolyhedrovirus

hrs: Homologous regions

H. zea: Helicoverpa zea

H. virescens : *Helicoverpa virescens*

HzSNPV : *Helicoverpa zea* nucleopolyhedrovirus

Hrs Regulatory content: homologous regions*:*

IPM: Integrated Pest Management

Kb: Kilo base pairs

kDa: Kilo dalton

LdMNPV: *Lymantria dispar* NPV

LSD :Least Significant Difference

MNPV: multiple nucleocapsids nucleopolyhedrovirus

µg: Microgram

µl: Microliter

NPV: Nucleopolyhedrovirus

OB: occlusion bodies

ODV: occlusion derived virus

OpMNPV : *Orgyia pseudotsugata* MNPV

Orfs: open reading frame

PCR: polymerase chain reaction

PIF: Per os infectivity factors

PlxyGV: Plutella xylostella Granuloviruses

RNA: Ribonucleic acid

SDS: Sodium dodecyl sulfate

Sf9: Spodoptera frugiperda

SfMNPV: Spodoptera frugiperda MNPV

Spodoptera exigua SeMNPV:

SNPV: single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus

Taq:*Thermus aquaticus*

قائمة المصطلحات

Abiotic factories عوامل بيئية غير حيوية

Antagonism التضاد

Ascoviruses الفيروسات الزقية

Baculoviruses الفيروسات العصوية

Bioinsecticides المبيدات الحشرية الحيوية

Biological control المكافحة الحيوية

Biotic factories العوامل البيئية الحيوية

Bioreactors مفاعلات حيوية

Braconidae متطفلات حشرية من فصيلة البراكونيدات

Budded virions (BV) الفيروس المتبرعم

Butterflies فراشات

Cannibalism ظاهرة الافتراس الذاتي

Chemical complexity البنية الكيميائية المعقدة

Conserved genes المورثات المحافظ عليها

DNA Deoxyvira الفيروسات التي تحوي على الحمض النووي

Double-stranded فيروسات ثنائية السلسلة

Entomopathogenic الكائنات الدقيقة الممرضة للحشرات

Entomopathogenic viruses الفيروسات الممرضة للحشرات

Gene expression vectors تعبير المورثات

Genotypes طرز وراثية

Granulovirus (GV) فيروسات حبيبية

Haemocytometer شريحة عد

Hemolymph خضاب دم الحشرات

Horizontally transmitted infection الانتقال الأفقي للعدوى

Host range المدى العائلي

Ichneumonidae متطفلات حشرية من فصيلة الايكنومونيدات

Integrated Pest Management الإدارة المتكاملة للآفات

International committee on Taxonomy of Viruses اللجنة العالمية لتصنيف الفيروسات

Jaundice disease مرض اليرقان

Latent virus infections الإصابة الفيروسية اللاحقة او الكامنة

LD50 الجرعة نصف القاتلة

Liquefaction تحلل

Mammals الثدييات

Moths عث

Multiple nucleocapsids (MNPV فيروسات متعددة الفريون

Nucleocapsid المعطف البروتيني

Nucleopolyhedroviruses (NPV) فيروسات نووية متعددة السطوح

Obligate pathogens ممرضات إجبارية التطفل

Occlusion bodies الأجسام الضمينة

Occluded derived virions (ODV) الفريون المحاط بجسم ضمين

Parasitoids المتطفلات الحشرية

Polydnaviruses الفيروسات البوليدينية

Polyhedral occlusion bodies الجسم الضمين المتعدد الوجوه

predators المفترسات

Reoviridae RNA الفيروسات التي تحوي الحمض النووي

Single nucleocapsid (SNPV) فيروسات وحيدة الفريون

Single-stranded فيروسات مفردة السلسلة

Synergism التأزر

Vertically transmitted infection الانتقال العمودي للعدوى

Virogenic stroma (مطرحة فيروسية) نسيج ضام

فهرس المحتويات

TABLE OF CONTENTS

الموضوع	رقم الصفحة
المقدمة Introduction	1
أهمية الدراسة	3
أهداف البحث	4
الفصل الأول	5
1- الدراسة المرجعية Review Literature	5
1-1- لمحة تاريخية عن الفيروسات الممرضة للحشرات	5
1-2- العلاقات التصنيفية للفيروسات الممرضة للحشرات	6
1-3- الخواص المورفولوجية والفيزيوكيميائية للفيروسات الممرضة للحشرات	6
1-4- عائلة الفيروسات العصوية	9
1-5- الوضع التصنيفي للفيروسات العصوية	13
1-5-1- الجنس *Alphabaculovirus*	15
1-5-2- الجنس *Betabaculovirus*	18
1-5-3- الجنس *Gammabaculovirus*	20
1-5-4- الجنس *Deltabaculovirus*	21
1-6- العدوى وانتشار المرض	22
1-6- 1- الانتقال الأفقي للعدوى	22
1-6- 2- الانتقال العمودي للعدوى	23
1-7- آلية تضاعف الفيروس الممرض للحشرات من فصيلة الفيروسات العصوية *Baculoviridae* داخل العائل الحشري	24
1-7-1- الطور التمهيدي	24
1-7-2- الطور اللوغاريتمي	24
1-7-3- مرحلة الاستقرار	25
1-8- الإصابة الفيروسية اللاحقة او الكامنة	26
1-9- العوامل البيئية المؤثرة على القدرة البقائية للفيروسات الممرض للحشرات	27
1-10- إستراتيجية استخدام الفيروسات الممرضة للحشرات في المكافحة الميكروبية للآفات الحشرية	28
1-11- بعض التطبيقات لاستخدام الفيروسات الممرضة للحشرات في المكافحة الميكروبية للآفات الحشرية	31
1-12- تقنيات نشر الفيروسات	33
1-12-1- نشر حشرات مصابة/ حاملة للعدوى	33
1-12-2- الرش	34
1-12-3- الطعوم	34
1-12-4- غمر الشتلات	34
1-13- إنتاج الفيروسات الممرضة للحشرات	34
1-13-1- إنتاج الفيروسات *In vivo*	34

1-13-2- إنتاج الفيروسات *in vitro*	35
1-14- المبيدات الحيوية الفيروسية التجارية	36
1-15- الكشف عن الـ *Baculoviruses*	38
1-15-1 السلاسل النيكلوتيدية لجينوم *Baculoviridae*	39
1-15-2 مكونات الجينوم وتنظيمه	40
1-15-3- تنظيم الجينوم والمناطق الوراثية المتشابهة	42
1-15-4- المورثات المحافظ عليها conserved genesعند عائلة *Baculoviridae*	42
الفصل الثاني	
2- المواد والطرائق Materials and Methods	45
2-1- تقصي الفيروسات الممرضة للحشرات Entomopathogenic viruses من فصيلة *Baculoviridae* على حشرات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera في بعض حقول المحاصيل في المنطقة الجنوبية من سورية	45
2-2- تقصي الفيروسات الممرضة للحشرات على حشرة دودة لوز القطن الأمريكية (*Helicoverpa Heliothis*) *armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) في بعض حقول القطن ودورهافي تنظيم أعداد حشرة دودة اللوز الأمريكية في بعض حقول القطن في محافظة الحسكة	46
2- 3- العزل الجزئي لـ polyhedral (تحضير المعلق الفيروسي لإجراء العدوى)	47
2-4- طريقة تغذية اليرقات (نقل العدوى)	47
2-5- دراسة الأجسام الضمينة (OB)s بالفحص بالمجهر الضوئي	47
2- 6- طريقة العد: وذلك وفق الخطوات التالية	48
2-7- تحليل بروتينات البوليهيدرا Protein analysis	49
2-8- استخلاص DNA الـ baculovirus	49
2- 9- تحديد نوعية DNA الـ baculovirus	50
2-10- الكشف عن مورثة البوليهيدرين باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR : polymerase chain reaction	50
2-11- شجرة القرابة والبصمة الوراثية	51
2-12- تقييم فاعلية بعض عزلات الفيروسات المستخلصة على يرقات فراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* وعلى يرقات فراشة حفار ساق التفاح *Zeuzera pyrina*.	52
2-12-1- العزلات المستخدمة في الاختبارات	52
2-12-2- اليرقات المختبرة	52
12-3-2 الاختبارات الحيوية	53
2-13- التصميم الإحصائي	54
الفصل الثالث	
3- النتائج والمناقشة Results and Discussion	55
3-1- تقصي الفيروسات الممرضة للحشرات Entomopathogenic viruses من فصيلة *Baculoviridae* على حشرات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera في بعض حقول المحاصيل في المنطقة الجنوبية من سورية	55
3-1-1- نتائج العدوى المخبرية	58
3-2- تقصي الفيروسات الممرضة للحشرات على حشرة دودة لوز القطن الأمريكية (*Helicoverpa Heliothis*) *armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) في بعض حقول القطن ودورهافي تنظيم أعداد حشرة دودة اللوز الأمريكية في بعض حقول	60

القطن في محافظة الحسكة	
3-2-1- نتائج المسح الحقلي وجمع العينات	60
3-3- الكشف والعزل الجزئي للأجسام الضمينة (OB) للعزلات الفيروسية المستخلصة من الحشرات المصابة.	63
3-3-1- الفحص بالمجهر الضوئي والعد بواسطة شريحة Haemocytometer	63
3-3-2- تحديد الوزن الجزيئي للبوليهيدرا	65
3-3-3- التشخيص الجزيئي للـ baculovirus	66
3-3-4 – نتائج شجرة القرابة والبصمة الوراثية restriction enzymes profiling	69
3-4- تقييم فاعلية بعض عزلات الفيروسات المستخلصة على يرقات فراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* وعلى يرقات فراشة حفار ساق التفاح *Zeuzera pyrina*.	71
الاستنتاجات والمقترحات	75
التوصيات	76
المراجع	77

فهرس الجداول

LIST OF TABLES

الجدول	العنـــــــــــــــــــــــــــوان	الصفحة
1	جدول.1.بعض خواص الفيروسات الممرضة للحشرات.	8
2	الجـدول. 2. الوضـع التصـنيفي لعائلـة *Baculoviridae* حسـب اللجنـة الدوليـة لتصـنيف الفيروسات	14
3	الجدول. 3. فيروسات من جنس *Alphabaculovirus* والحشرات التي تتطفل عليها	16
4	الجدول. 4. فيروسات من الجنس *Betabaculovirus* والحشرات التي تتطفل عليها.	19
5	الجدول .5. أمثلة من المبيدات الحيوية الرئيسة الفيروسة التجارية	36
6	الجدول .6. المورثات المتعرف عليها في المجموعة الأولى من NPV	40
7	الجدول. 7 .الوزن الجزيئي*لمورثات* *Baculoviridae*	41
8	الجدول. 8. مورثات محافظ عليها عند *Baculoviridae* .	43
9	الجدول.9. النسبة المئوية لموت بعض يرقات رتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera نتيجة الإصابة بفيروس ممرض للحشرات.	57
10	الجدول.10. أعراض الإصابة بالفيروسات الممرضة المعزولة من بعض يرقات حشرات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة.	58
11	الجدول.11. النسبة المئوية لموت يرقات دودة اللوز الأمريكية نتيجة الإصابة بفيروس ممرض للحشرات في بعض حقول القطن في منطقتي المالكية والقامشلي.	62
12	الجدول. 12. النسبة المئوية لموت يرقات دودة اللوز الأمريكية نتيجة الإصابة بفيروس ممرض للحشرات في بعض حقول القطن في منطقتي المالكية والقامشلي	63
13	جدول.13. النسبة المئوية لموت ليرقات فراشة الشمع الكبرى المعاملة بثلاث عزلات فيروسية مختلفة.	72
14	الجدول.14.النسبة المئوية لموت الاعمار اليرقية لحشرة حفار ساق التفاح نتيجة الإصابة بالعزلة 166 في ظروف المخبر .	73

فهرس الأشكال

LIST OF FIGURES

الشكل	العنـــــــــــــــــــــــــــوان	الصفحة
1	تحلل أنسجة اليرقة المصابة بالـ *Baculoviridae* تحللاً كاملاً وانطلاق الأجسام الضمينة في سائل الدم، ويصبح جلد اليرقة المحتضرة هشاً للغاية	11
2	الصفات المورفولوجية لـ *Nucleopolyhedroviruses* و *Granulovirus* .	13
3	مكونات الجسم الضمين عند *Nucleopolyhedroviruses*	13
4	الأجسام الضمينة للفيروسات الحبيبية GV بالمجهر الالكتروني.	18
5	يرقات *Neodiprion Sertifer*	20
6	آلية تضاعف الفيروس الممرض للحشرات داخل العائل الحشري المصاب	26
7	حشرة *Estigmene acrea* (Arctidae: Lepidoptera)	29
8	اختلاف تسلسل الأحماض الأمينية في سم الحشرات AaH	30
9	يرقات حفار ساق التفاحZeuzera pyrina L. التي تم الحصول عليها من مركز إكثار الأعداء الحيوية في اللاذقية	53
10	الاعراض على اليرقات المصابة	56
11	أعراض الإصابة بالعدوى الاصطناعية على اليرقات المدروسة	59
12	أعراض الإصابة المختلفة بالفيروسات الممرضة للحشرات على يرقات دودة اللوز الأمريكية في حقول القطن في محافظة الحسكة	61
13	كريستالات البوليهيدرا اللامعة باستخدام تكبير x400 بالمجهر الضوئي بدون تلوين	64
14	. البوليهيدرا عند التكبير x400 بالمجهر الضوئي على شريحة العد بعد تلوينها بأزرق البرومو فينول	64
15	هلامة البولي اكريلاميد للبوليهيدرين	66
16	هلامة الاغاروز الذي يظهر نوعية DNA المعزول من الـ *Baculovirus*	67

17	الكشف عن المورثة *polh* باختبار الـ PCR	68
18	البصمة الوراثية للفيروسات على الحشرات باستخدام انزيم HindIII	69
19	شجرة القرابة الوراثية بدون جذر لعزلات مختلفة من الـ *Baculovirus*	70
20	أعراض الإصابة بالفيروس	71

الملخص

تعد فصيلة الفيروسات العصوية *Baculoviruses* عوامل ممرضة نوعية للحشرات، وتضم هذه العائلة 4 أجناس و منها جنسي الفيروسات العصوية متعددة الوجوه *Nucleopolyhedroviruses* (NPV)، والفيروسات الحبيبية *Granulovirus* (GV). والتي تكون محاطة بأجسام محتواة ضمنية occlusion bodies (OB) .

هدفت الدراسة إلى عزل الأجسام المتضمنة من يرقات خمسة أنواع حشرية من رتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera وهي: فراشة الواي الفضية *Autographa gamma*، وأبو دقيق الملفوف الصغير *Pieris rapae* ، ودودة ورق العنب *Hyles lineata* ، ودودة اللوز الأمريكية *Helicoverpa armigera*، وأبو دقيق الخبازي *Vanesa cardui*. تم جمع هذه الحشرات من مناطق مختلفة سورية خلال مواسم 2009-2011 . جمعت يرقات فراشة الواي الفضية *A. gamma* من نباتي الخبيزة *Malva sylvestris*، والنجيل L. *Agropyron repens* من بعض حقول دوما (ريف دمشق)، وجمعت يرقات أبو دقيق الملفوف *P. rapae* من نباتات الملفوف *Brassica oleracea* والقرنبيط *Brassica oleracea* var. *botrytis*، من بعض حقول الملفوف والقرنيط من ريف محافظة درعا، أما يرقات دود ورق العنب *H. lineata* فجمعت من بعض بساتين الكرمة في سعسع وجديدة عرطوز (ريف دمشق ودوما)، وتم جمع يرقات دودة اللوز الأمريكية *H. armigera* من بعض حقول البندورة والفليفلة من ريف محافظة درعا، وبالنسبة ليرقات أبو دقيق الخبازي *V. cardui* فقد جمعت من نباتي الخبيزة والنجيل من جديدة عرطوز وسعسع ودوما من محافظة ريف دمشق، وجمعت يرقات دودة لوز القطن الأمريكية *Helicoverpa* (*Heliothis*) *armigera* من حقول القطن في منطقتي المالكية والقامشلي في محافظة الحسكة خلال موسم 2011خلال مواسم 2009-2011.

لم يتم إجراء أي مكافحة ميكروبية في جميع حقول وبساتين الدراسة التي تم اختيارها على الإطلاق.

بينت الدراسة احتمال إصابة جميع اليرقات بالفيروسات العصوية *Nucleopolyhedroviruses*، وفقا للأعراض الظاهرية . كما بينت النتائج أن النسبة المئوية لموت يرقات دودة اللوز الأمريكية المتسبب عن مرض فيروسي 9.9% في منطقة المالكية و11.6%في منطقة القامشلي. واختلفت النسبة المئوية لموت اليرقات الناتج عن إصابة فيروسية خلال أشهر الدراسة في منطقتي الدراسة، إذ تراوحت النسبة بين 1.5% و14.3%، و 2.9%

و14.7% في منطقتي المالكية والقامشلي على التوالي، وكانت أعلى نسبة مئوية للموت في شهر أب في المنطقتين، 14.3% في منطقة المالكية و14.7% في منطقة القامشلي.

عزلت الأجسام المحتواة الضمينة من هذه اليرقات في مخبر التقانة الحيوية في كلية الزراعة جامعة دمشق ، بينت دراسة المعلق الفيروسي المعزول من يرقات الحشرات المصابة حقلياً وجود الأجسام الضمينة (OB) في كلٍ من حشرات فراشة الواي الفضية *A. gamma*، وأبو دقيق الملفوف *P.rapae*، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H. armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui* التي تم جمعها حقلياً وكذلك في الحشرات المعداة، و عند استخدام شرائح العد لعينات مأخوذة من أبو دقيق الخبازي كان عدد البوليهيدرا / 2.7 × 10^6 يرقة بينما كان العدد 3.1× 10^4 عند أبو دقيق الملفوف و 2.2 × 10^5 عند دودة ورق العنب و 1.6 × 10^5 عند دودة اللوز الأمريكية و3.6 × 10^4 عند فراشة الواي الفضية. أكدت الدراسة للأجسام الضمينة (OB) التي عُزلت من اليرقات الميتة أو المصابة على أن هذه الفيروسات تابعة لجنسNucleopolyhedroviruses وذلك بدراستها باستخدام المجهر الضوئي ولعدم تلونها أثناء الصبغ بأزرق البروموفينول. أظهرت الـ OBs المنقى التي أجري لها رحلان كهربائي باستخدام هلامة البولي اكريلاميد 10 % بعد الصبغ بـ brilliant blue R Coomassie أن وزنها الجزيئي 30 kDa في كل من يرقات فراشة الواي الفضية *gamma* A ، وأبو دقيق الملفوف *P. rapae* ، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H.armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui*. بينت نتائج التشخيص الجزيئي الدقيق للفيروسات باستخدام اختبار الـ PCR وبادئات متخصصة بالكشف عن مورثة البوليهيدرين، للحمض النووي المعزول من يرقات فراشة الواي الفضية *A. gamma* ، وأبو دقيق الملفوف *P. rapae* ، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H.armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui* والتي تم اختيارها بعد رؤية OB في الحشرات المدروسة نتائج ايجابية في البادئ المدروس. أظهرت نتائج تقطيع الـDNA للفيروسات المعزولة من يرقات فراشة الواي الفضية *A. gamma* ، وأبو دقيق الملفوف *P. rapae* ، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H.armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui* وجود حزما مختلفة ضمن هلامة الأغاروز، وعند استخدام البيانات لرسم شجرة القرابة الوراثية باستخدام برنامج المعلوماتية TREECON (1.3b) وجد أن العينات المدروسة انقسمت إلى مجموعتين المجموعة الأولى: الفيروسات المعزولة من يرقات فراشة الواي الفضية (ريف دمشق) ودودة اللوز الأمريكية (الحسكة)، أما المجموعة الثانية: تشمل الفيروسات المعزولة من أبو دقيق الخبازي (ريف دمشق)، ودودة ورق العنب (ريف دمشق) وأبو دقيق الملفوف (درعا).

تم تقييم فاعلية ثلاث عزلات فيروسية وهذه العزلات هي: 223 من يرقات *V. cardui* المصابة بالفيروس وجمعت من جديدة عرطوز في عام 2011 ، والعزلة 166 من يرقات *A. gamma cardui* المصابة بالفيروس وجمعت من بعض الحقول في دوما في عام 2010، والعزلة 7 من يرقات *V. cardui* المصابة بالفيروس، وهذه اليرقات جمعت من بعض حقول سعسع في عام 2010. بينت النتائج التفوق للعزلة الفيروسية 166 على العزلة 7 ظاهريا والعزلة 223 معنوياً عند مستوى احتمال 1%. كما تم اختبار فاعلية العزلة 166 على يرقات العمر الرابع لدودة الشمع الكبيرة وعلى الأعمار اليرقية الخمسة الأولى لحشرة حفار ساق التفاح، وبينت النتائج أن حساسية اليرقات للفيروسات تقل كلما كبرت اليرقات في العمر، وكانت أعلى متوسط للنسبة المئوية لموت العمر اليرقي الأول 93.33%، وأقلها 6.66% في العمر اليرقي الخامس. مما يؤسس لاستخدام هذه اليرقات في إنتاج الفيروس وبالتالي العمل على استبدال المبيدات التقليدية بهذا الفيروس في مكافحة الحشرات.

المقدمة

تعد الفيروسات عوامل ممرضة غير حية وذلك لأنها تفتقد لأهم خصائص الحياة، ومع هذا فان الفيروسات تشارك الكائنات الحية في الكثير من الخصائص مثل البنية الكيميائية المعقدة chemical complexity، والحاجة إلى التكاثر وقابلية التطور. لكن الفيروسات مرتبطة وبشكل كلي بالكائنات الحية، وذلك لأنها ممرضات إجبارية التطفل. Obligate pathogens على الكائنات الحية الدقيقة إلى النباتات والحيوانات بما فيها الإنسان (Hull وزملاؤه، 1990)، ومع هذا هناك بعض الفيروسات التي تستخدم لمصلحة الإنسان في بعض الحالات، وعلى سبيل المثال الفيروسات الممرضة للحشرات Entomopathogenic viruses، فهناك الكثير من الحشرات التي تسبب أضررا كبيرة للإنسان ومزروعاته وغذائه، تكون عائلا لأنواع من الفيروسات الممرضة للحشرات، ويمكن أن تستخدم هذه الفيروسات في برامج المكافحة الحيوية للحشرات الضارة التي تسبب أضراراً اقتصادية كبيرة لمختلف المزروعات (Cristina وIbarra، 2011). تشكل الحشرات المجتمع الأكبر من الكائنات الحية. وتتواجد في كل مكان، وهناك الكثير من الآفات الحشرية تنافس الإنسان على غذائه وبخاصة تلك التي تنتمي إلى رتبة حرشفيات الأجنحة *Lepidoptera* من فراشات (Butterflies) وعث (moths) والتي تضم أهم الحشرات التي تسبب أضراراً اقتصادية لمختلف المحاصيل الزراعية.

وقد تم استخدام الكثير من طرائق المكافحة لمحاولة الحد من أعداد الآفات الحشرية في البساتين والحقول الزراعية، فقد استخدمت المكافحة الكيميائية في منتصف القرن الواحد والعشرين كوسيلة وحيدة في برامج المكافحة للآفات الزراعية، وأدى الاستخدام العشوائي للمبيدات الكيميائية في مكافحة الآفات الحشرية إلى تلوث البيئة وموت الكثير من الأعداء الحيوية الطبيعية، كما سبب الأثر المتبقي سمية للإنسان والحيوانات المفيدة وتلوث المياه اضافة الى ظهور صفة المقاومة لدى الكثير من الآفات ضد مجموعات مختلفة من المبيدات الكيميائية لسبب الانتخاب للأنماط الوراثية المتحملة والقضاء على الأنماط الوراثية الحساسة. الأمر الذي أدى إلى ضرورة إيجاد استراتيجية جديدة لمكافحة الحشرات الضارة وخاصة تلك التي تنتمي منها إلى رتبة حرشفيات الأجنحة *Lepidoptera* بحيث تكون أمنة على البيئة وليس لها أضرار جانبية على الإنسان ومنتجاته الزراعية والحيوانية، وتقلل من استخدام المبيدات الكيمائية للتقليل ما أمكن من أضرارها وأثرها المتبقي السام في المحاصيل والبيئة، ومن الاستراتيجيات التي تم اللجوء إليها هي استراتيجية المكافحة الحيوية Biological control التي تتضمن استخدام المتطفلات الحشرية parasitoids والمفترسات predators وممرضات الحشرات

Entomopathogenic والتي تضم الجراثيم والفطريات ووحيدات الخلية والديدان الخيطية والفيروسات الممرضة للحشرات، وتستخدم منتجات هذه الممرضات للحشرات على شكل مركبات تجارية تسمى بالمبيدات الحشرية الحيوية Bioinsecticides في بقاع مختلفة من العالم لمكافحة الآفات الحشرية وخاصة تلك التي تنتمي لرتبة حرشفيات الأجنحة *Lepidoptera*، وتعد المنتجات الحيوية للفيروسات الممرضة للحشرات واحدة من أهم هذه المركبات التي تستخدم في مكافحة الكثير من الآفات الزراعية في البساتين والحقول والغابات (Ibarra و Cristina Del Rincon-Castro، 2008).

بينت الأبحاث وجود أكثر من نوع من الفيروسات الممرضة للحشرات تتواجد في 15 عائلة من الفيروسات (Van Regenmortel وزملاؤه، 2000)، وكان التوجه في برامج المكافحة الحيوية نحو الفيروسات التي ليس لها أي تأثير ضار على الثدييات mammals وتتواجد هذه الفيروسات ضمن ثلاث عائلات هي: *Baculoviridae*، *Polydnaviridae* و*Ascovirdae*، حيث بينت الأبحاث أن الفيروسات العصوية *Baculoviruses* والفيروسات البوليدينية *Polydnaviruses* والفيروسات الزقية *Ascoviruses* لم يسجل ضمن عوائلها أي عائل من الثدييات، كما أشارت الدراسات الى اعتماد المكافحة الحيوية للحشرات على استخدام الفيروسات الممرضة للحشرات بشكل رئيس على الفيروسات العصوية *Baculoviruses* وذلك لأن الفيروسات الزقية *Ascoviruses* ذات فاعلية ضعيفة في برامج المكافحة الحيوية (Cristina Del Rincon-Castro وIbarra، 2011)، وتتضاعف الفيروسات البوليدينية *polydnaviruses* فقط في مبايض المتطفلات الحشرية من عائلة Ichneumonidae وعائلة Braconidae (Theilmann و Summers، 1986؛ Strand وزملاؤه، 1992)، بينما سجل فاعلية كبيرة للفيروسات العصوية *baculoviruses* في برامج المكافحة الحيوية وخاصة ضد الحشرات من رتبة حرشفيات الأجنحة *Lepidoptera* وغيرها من الحشرات الضارة، حيث أشار Murphy وآخرون (1995) أن عدد العوائل التي تتطفل عليها الفيروسات العصوية *baculoviruses* هو نحو 600 نوع تنتمي إلى رتب حرشفيات الأجنحة Lepidoptera وثنائيات الأجنحة Diptera وغشائيات الأجنحة Hymenoptera وغمديات الأجنحة Coleoptera وشبكيات الأجنحة Neuroptera وشعريات الأجنحة Trichoptera وهدبيات الأجنحة Thysanoptera، وكذلك عشاريات الأرجل *Decapoda* الجمبري (shrimps). ولكن أشير أخيراً إلى أن أنواع الفيروسات التي تتطفل على حشرات من رتب حرشفيات الأجنحة Lepidoptera وثنائيات الأجنحة Diptera وغشائيات الأجنحة Hymenoptera هي فقط من

عائلة الفيروسات العصوية *Baculoviridae* (ICTV، 2014)، وقد اجرى في العالم دراسات مكثفة للفيروسات العصوية *Baculoviruses* وذلك لاستخدامها كمبيدات حيوية bioinsecticides لمكافحة الحشرات الضارة وخاصة من رتبة حرشفيات الأجنحة في بقاع مختلفة من العالم،(Summers وSmith ،1987؛ Choi وزملاؤه، 1999؛ Wood و Robert، 1991)

إضافة إلى كل ما تقدم فلقد كشفت الأبحاث الحديثة عن استخدامات أخرى مستقبلية لـ *Baculoviridae*، اذ بدأ استخدامها كنواقل لدراسة تعبير المورثات gene expression vectors التي تستخدم في إنتاج اللقاحات وكذلك التشخيص المرضي (Condreay وKost، 2007؛ van Oers، 2006)، ويرجع ذلك إلى قدرة المورثة polh و p10 على التعبير المكثف، وإذا أضفنا إلى كل ذلك التطور في زراعة الخلايا الحشرية، تصبح عائلة *Baculoviridae* مرشحةً للعب دورٍ في المعالجة الوراثية (Räty وزملاؤه، 2008).

يستخدم في العالم الكثير من المستحضرات التجارية للفيروسات العصوية لمكافحة العديد من الآفات الحشرية من رتبة حرشفيات الأجنحة، ففي الولايات المتحدة يستخدم ثلاثة من الفيروسات العصوية النووية المتعددة السطوح NPV_s لـ *Heliothis* spp. (Elcar)، فراشة الغجر *Lymantria dispar* (Gyp-check)، و *Orgyia pseudosugata* (Biocontrol-1)، هناك دراسات لاستخدام الـ NPV_s لـ *Heliothis spp.* في حقول القطن والفصة والحمص في الهند واستراليا ، ولمكافحة حشرة الناي الفضية *Trichoplusia ni* في حقول القطن في جنوب أمريكا، ولمكافحة *Spodoptra spp.* في حقول القطن والخضار في الهند والصين والولايات المتحدة الأمريكية (Ibarra وCristina Del Rincon-Castro، 2008).

أهمية الدراسة

تعد الفيروسات الممرضة للحشرات من عوامل المكافحة الحيوية للعديد من الحشرات الضارة وخاصة تلك التي تنتمي لرتبة حرشفيات الأجنحة، وتعتبرالفيروسات من أكثر مجموعات ممرضات الحشرات 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، كما أن كل منها مغلف بجسم ضمين يمنحه قدرة بقائية عالية بالبيئة، وأنه شديد الضراوة المرضية ضد الآفات الحشرية، 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 (Summers وSmith ،1987؛ Choi وزملاؤه، 1999؛ Wood وRobert ، 1991).

تأتي أهمية هذا البحث في التعرف على الفيروسات العصوية الممرضة لحشرات رتبة حرشفيات الأجنحة إذ أنه من الضروري معرفة الأنواع الموجودة في البيئة المحلية ودراسته بقصد دراسة إمكانية استخدامها في برامج المكافحة الحيوية لحشرات رتبة حرشفيات الأجنحة، كما تأتي أهمية الدراسة من خلال عزل البوليهيدرا (polyhedra) او ما يعرف بالاجسام الضمنية لتحديد نوع الجنس الفيروسي المنتشر في البيئة المحلية، وتأتي الأهمية أيضاً من خلال دراسة شراسة العزلات الفيروسية لتحديد العزلات المحلية التي من المحتمل تملك شراسة تفوق العزلات العالمية ونظرا لندرة الدراسات عن الفيروسات الممرضة للحشرات في سورية، فقد كان من المفيد إلقاء مزيداً من الضوء عليها لمعرفة ما هو منتشر منها في البيئة المحلية المتطفل على حشرات رتبة حرشفيات الأجنحة وتحديد أجناسها أو أنواعها وشراستها لاستخدامها كأحد الوسائل الرئيسة في المكافحة الحيوية للآفات الحشرية من رتبة حرشفيات الأجنحة ضمن برامج الإدارة المتكاملة للآفات Integrated Pest Management (IPM).

أهداف البحث

1. تقصي الفيروسات الممرضة للحشرات Entomopathogenic viruses من عائلة *Baculoviridae* على حشرات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera في بعض حقول المحاصيل في المنطقة الجنوبية من سورية ومحافظة الحسكة.
2. الكشف والعزل الجزئي للأجسام الضمينة (OB) للعزلات الفيروسية المستخلصة من الحشرات المصابة.
3. اختبار شراسة بعض العزلات على يرقات فراشة حفار ساق التفاح *Zeuzera pyrina* وعلى يرقات فراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella*.

الفصل الأول

1- الدراسة المرجعية

1-1- لمحة تاريخية عن الفيروسات الممرضة للحشرات

تشير االمستحاثات Fossils لمفصليات الأرجل عن وجود بقايا لها مليئة بالأجسام الضمينة (OB_s) للفيروسات يعود تاريخها إلى 100 مليون سنة (Poinar وPoinar، 2005)، وقد تم توثيق الإصابة الوبائية بالفيروسات الممرضة للحشرات من الفيروسات العصوية *Baculovirus* منذ مئات السنين، وذلك خلال تربية دودة الحرير (Miller،1997). بينت الدراسات أن أول مرض فيروسي سجل على الحشرات في القرن السادس عشر هو مرض الغراسيريا على دودة الحرير (*Bombyx mori* L. Lepidoptera: Bombycidae) وهو *Jaundice grasseria* وتم وصف هذا المرض لأول مرة في عام 1529 م من قبل Vida (Benz، 1986)، وقد أدى انتشار هذا المرض إلى انهيار صناعة الحرير في أوربا، وبعد ذلك تم وصف مرض فيروسي على نحل العسل (*Apis mellifera*. Hymenoptera: Apidae). في عام 1856 قام عالمان ايطاليان بوصف الأجسام الضمينة (OB_s) للفيروس المتعدد السطوح (nucleopolyhedrosis) لدودة الحرير. كانت المحاولة الأولى لاستخدام الفيروسات العصوية الـ *Baculoviruses* في عام 1892 بعد حدوث الإصابة وبائية بحشرة *Lymantria monocha* L. في غابات الصنوبر في أوربا، وقد كانت النتائج كبيرة حيث تم القضاء على يرقات الحشرة بعد فترة قصيرة من عملية التطبيق (Huber، 1986).

قام Paillot في عام 1926 بوصف الفيروسات الحبيبية (GV_s) لأول مرة، كما وصف Ishimori في عام 1934 شكل جديد لتعدد السطوح polyhedrosis للجسيمات الضمينة التي في ستوبلاسما خلايا دودة الحرير المصابة (Aruga، 1971). حدث تقدم هائل في دراسات الفيروسات الممرضة للحشرات مع اكتشاف المجهر الالكتروني ، حيث تمكن Bergold في عام 1947 من وصف جزيء الفيروس الممرض للحشرات، وخلال الفترة 1950-1970 قام Steinhaus باختبار الفيروسات العصوية *baculoviruses* في المكافحة الحيوية لفراشة البرسيم (*Colias eurythem* Boisduvel. Lepidoptera: Pieridae) باستخدام الفيروس النووي المتعدد السطوح (NPV) المعزول من يرقات الحشرة المريضة (Steinhaus ،1963).

أنتجت أولى المستحضرات الحيوية الفيروسية عام 1975 من شركة Sandoz تحت اسم Elcar لمكافحة ديدان اللوز على القطن *Heliothis| Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) (Ignoffo، 1975) . وقد أشارت ابحاث عديدة الى التطوير العلمي والمنهجي لاستخدام الفيروسات الممرضة للحشرات في برامج المكافحة الحيوية. واستخدم حوالي 50 من الفيروسات العصوية (*Baculoviruses*) في برامج المكافحة الحيوية في بقاع مختلفة من العالم (Benz، 1986؛ Huber، 1986؛ Yearian وYoung، 1982).

1-2- العلاقات التصنيفية للفيروسات الممرضة للحشرات

تصنف الفيروسات الممرضة للحشرات حسب التصنيف المتبع من اللجنة العالمية لتصنيف الفيروسات (International committee on Taxonomy of Viruses) (ICTV,2014) وعليه تصنف الفيروسات الممرضة للحشرات حسب الحمض النووي إلى Deoxyvira وهي الفيروسات التي تحوي على الحمض النووي DNA تتبع العائلات العصوية (*Baculoviridae*) والزقية (*Ascoviridae*)، والقزحية *(Iridoviridae)* ، و *Parvoviridae*، و *Polydnaviridae* و الجدري (*Poxviridae*)، أو Ribovira وهي التي تحوي الحمض النووي RNA، وهي *Reoviridae*، *Nodaviridae*، *Picornaviridae*، *Tetraviridae*. كما تصنف الفيروسات حسب عدد الخيوط المكونة للحمض النووي إلى فيروسات ثنائية السلسلة (double-stranded)، أو مفردة السلسلة (single-stranded) الجدول (1) (Grzywacz وزملاؤه، 2004).

1-3- الخواص المورفولوجية والفيزيوكيميائية للفيروسات الممرضة للحشرات

تشكل الحشرات أكبر مجموعة من الكائنات الحية ويحتمل ان تكون من أهم مخازن الفيروسات. أما الفيروسات المعروفة والتي تصيب مفصليات الأرجل فهي تملك تنوعاً كبيراً وصنفت في العديد من العائلات. وعلى الرغم من هذا التنوع الكبير فإن عددا محدودا نسبيا من الأبحاث تمت على فيروسات الحشرات، وربما يعود السبب إلى أن هذه الفيروسات لا تؤثر (بشكل مباشر) على الفقاريات ولذا فهي لا تملك تأثيرا اقتصاديا مباشرا، ومن بين هذه الفيروسات هنالك الفيروسات التي تصيب بعض عائلات الحشرات والتي درست بشكل كبير كما تم تحليل فعاليتها لاستخدامها في الزراعة والتقانات الحيوية. ركزت غالبية هذه الدراسات على أنواع عائلة الـ *Baculoviridae* وخاصة المتطفلة على أنواع من رتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera

حيث يستخدم عدد كبير منها في المكافحة الحيوية كبديل للمبيدات الكيماوية (Szewczyk وزملاؤه، 2008).

تتواجد الفيروسات في15عائلة فيروسية ويبين الجدول (1) العائلات الفيروسية الممرضة للحشرات وخصائصها، كما يبين أهم الخواص المورفولوجية والفيزيوكيميائية لبعض عائلات الفيروسات الممرضة للحشرات.

يبين الجدول (1) أن عائلة *Parvoviridae* فيروسات لا تحوي جسم ضمين غير مغلفة ، الحمض النووي DNA مفرد السلسلة (single-stranded)، تتشكل فيريونات الفيروس من جزيئات صغيرة قطرها 18-26 نانومتر، الفريون متعدد السطوح (مكعب) (الشكل. 1)، الوزن الجزيئي للجينوم 4-6 kilobases (Tijssen وBergoin،1995)

جدول.1بعض خواص الفيروسات الممرضة للحشرات

العائلة	الحمض النووي	الصفات الشكلية		وجود الغلاف	تشكيل الأجسام الضمينة
		الحجم (nm)	الشكل		
Parvoviridae	**ss** DNA	18-26	Isometric مكعبي	-	-
Iridoviridae	**ds** DNA	125-300	Icosahedral عشروني السطوح	-	-
Baculoviridae	**ds** DNA	200-400×40-60	Bacilliform عصوي	+	+
Poxviridae	**ds** DNA	156-300x150-470	Ovoid بيضوي	+	+
Polydnaviridae	**ds** DNA	150-350	Ovoid بيضوي	+	-
Ascoviridae	**ds** DNA	130×400	Allantoid Bacilliform عصوي	+	-
Nodaviridae	**ss** RNA	Φ 29	Icosahedral عشروني السطوح	-	-
Picornaviridae	**ss** RNA	Φ 22-30	Spherical كروي	-	-
Tetraviridae	**ss** RNA	Φ 35-39	Icosahedral عشروني السطوح	-	-
Reoviridae	**ds** RNA	Φ 55-69	Icosahedral عشروني الوجه	-	+
Birnaviridae	**ds** RNA	Φ 60	Icosahedral عشروني السطوح	-	-
Rhabdoviridae	**ss** RNA	130-380×50-95	Bullet shaped رصاصية الشكل Bacilliform	+	-
Togaviridae	**ss** RNA	Φ 60-65	Spherical كروي	+	-
Flaviviridae	**ss** RNA	Φ 35-45	Spherical كروي	+	-
Bunyaviridae	**ss** RNA	Φ 90-100	Spherical كروي	+	-

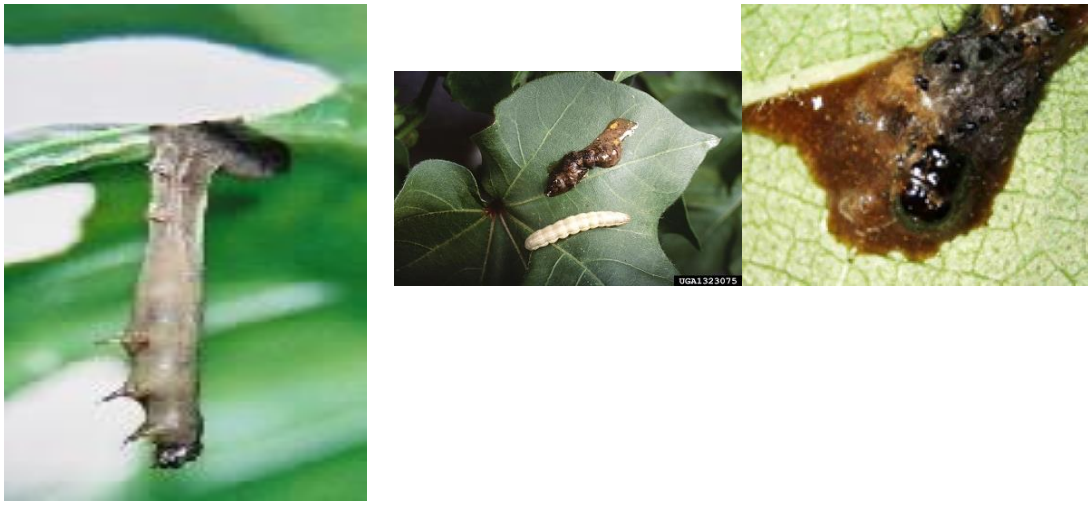
Grzywacz وزملاؤه، 2004

4-1- عائلة الفيروسات العصوية *Baculoviridae*

تُعد الـ *Baculoviridae* من أهم العائلات الفيروسية الممرضة لمفصليات الأرجل وبشكل أساسي الحشرات (Martignoni وزملاؤه، 1968). إن أهم ما يميز هذه العائلة الفيروسية أنها لا تتضاعف ضمن الفقاريات وبالتالي فإن تأثيرها البيئي يُعدَّ سليماً لذا فهي موضوع دراسات مكثفة جداً لاستخدامها في مجال المكافحة الحيوية كبديل للمبيدات الحشرية الكيميائية (Moscardi، 1999). تضم الفيروسات العصوية *Baculoviridae* مجموعة كبيرة من الفيروسات الممرضة لمفصليات الأرجل وخاصة الحشرات من رتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera وأيضاً الحشرات من رتبتي غشائيات الأجنحة Hymenoptera ورتبة ثنائيات الأجنحة Diptera (Moscardi، 1999 ؛ Herniou وJehle، 2007). اكتشف أول مرض فيروسي من عائلة *Baculoviridae* على الحشرات للمرة الأولى في الصين القديمة، والذي تسبب في انهيار مجتمعات دودة الحرير (Miller، 1997) أما الوصف الأول في تاريخ الثقافة الغربية فيعود إلى القرن السادس عشر (Benz، 1986). إذ قام الأسقف الايطالي Marco Vida de Cremona بوصف مرض ديدان الحرير في قصيدة De Bombyce، وبدأ الاهتمام بالفيروسات العصوية كعوامل مكافحة حيوية مبكراً وذلك في عام 1527 عند اكتشاف الفيروسات العصوية خلال دراسة مرض اليرقان 'jaundice disease' على دودة الحرير. تستخدم الفيروسات العصوية *Baculoviridae* في المكافحة الميكروبية للعديد من الآفات الحشرية في الحقول والبساتين والغابات في بقاع مختلفة من العالم (Moscardi، 1999؛ Szewczyk وزملاؤه، 2006، 2009؛ Erlandson،2008) وتشير الأبحاث في السنوات الأخيرة بأن هناك الكثير من الأعمال التي تهدف إلى إيجاد وتطوير سلالات من *baculoviruses* تتميز بفاعلية كبيرة في المكافحة الميكروبية للآفات الحشرية (Black وزملاؤه، 1997؛ Bonning وHammock، 1996).

تصيب هذه الفيروسات يرقات حرشفيات الأجنحة بصورة رئيسية، وتنمو داخل أنوية خلايا اليرقة المصابة، حيث ترتبط بعديد من أنسجة العائل، حيث تتضاعف داخل أنوية خلايا الجسم الدهني والبشرة والخلايا الطلائية للقصيبات الهوائية وأنوية خلايا الدم، وتستمر فترة حضانة المرض من العدوى وحتى الموت 5-12 يوما بالمتوسط، وتتعلق هذه الفترة بعمر اليرقة المصابة وجرعة العدوى والوضع الفيزيولوجي لليرقة ودرجة حرارة الوسط المحيط وغيرها، تتشابه أعرض الإصابة بهذه المجموعة من الفيروسات، إذ تتجه يرقات الحشرات الحرشفية الأجنحة المصابة بالفيروس تجاه قمم النباتات للتعلق بأرجلها البطنية الخلفية حيث تتوقف عن التغذية، ويصبح قوامها هشاً، وتنتفخ ويتغير لونها، ويتقطع جسمها بسهولة ويتبع ذلك موتها. ومن أعراض الإصابة هي توسع انوية الخلايا. التي تمتلئ ببطء بالأجسام الضمينة (Obs). وهذا

يعطي خضاب دم الحشرات hemolymphلونا اصفرا اومائل للون الابيض وفيما بعد يصبح هذا لون كل جسم اليرقة شكل (1). لذا كان الاسم القديم للمرض هو "jaundice" (Federici، 1997؛ Goulson، 1997) اليرقان (Wood وRobert، 1991). تؤثر عدوى الـ *Baculovirus* أيضا على معدل تطور العمر اليرقي (O'Reilly، 1995)، حيث تطول مدة التطور اليرقي بسبب تثبيط هرمون النمو الحشري، والنقص في الكميات المناسبة للـ ecdysteroidsيؤدي لتأخير التعذر ولذلك تزداد مدة تطور اليرقة (Clarke وزملاؤه، 1996).ويؤدي هذا لإنتاج أعظمي للفيروس خلال هذه المرحلة (O'Reilly وMiller، 1991).في المرحلة المتأخرة من العدوى .later stage infection تتوقف اليرقة عن التغذية. وتتميز هذه المرحلة بإنتاج كمية مضاعفة من الـ OBs التي تملأ أخيرا كل جسم اليرقة (تشكل حتى 10^{10}x1.5 OBs/larva أو 25% من كامل الكتلة الحية (Evans وزملاؤه، 1981)، ويقود الفيروس لتشكيل إنزيمين هما الـ cathepsin والـ chitinase اللذين يحفزان تحلل أنسجة اليرقة المصابة تحللاً كاملاً وتنطلق الأجسام الضمينة في سائل الدم، ويصبح جلد اليرقة المحتضرة هشاً للغاية (الشكل . 1). يصبح لون اليرقات المصابة أبيضا لبنيا 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 الاخير إلى تحول اليرقة إلى عذراء ثم حشرة مشوهة تموت غالباً قبل وضع البيض (Granados وLawler، 1981).



الشكل1. تحلل أنسجة اليرقة المصابة بالـ *Baculoviridae* تحللاً كاملاً وانطلاق الأجسام الضمينة في سائل الدم، ويصبح جلد اليرقة المحتضرة هشاً للغاية
المصدر:
http://www.trevorwilliams.info/Ecology_baculoviruses.htm!
http://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5368220

تتميز عائلة الفيروسات العصوية *Baculoviridae* بفيروسات متنوعة وهي مغلفة موجودة داخل جسم ضمين، و الحمض النووي DNA ثنائي السلسلة (double-stranded)، يتراوح وزنه الجزيئي من 80 إلى 180 kbp وتتراوح عدد من المورثات بين 140و160 مورثة (Kool وVlak، 1993؛ Possee وRohrmann، 1997)، ويوجد بين هذه المورثات حوالي 31 مورثة متماثلة تم تميزها ويعتقد بوجود مورثات أخرى متماثلة أيضا لم يتم الكشف عنها بسبب التغيرات الناتجة عن اختلاف أنواع الإدخال والدمج عبر الزمن لمورثات مختلفة، يتوضع هذا الجينوم ضمن فريون عصوي الشكل طوله بين 30 و55 nm وقطره بين 250 و300 nm، إن أكثر ما يميز *Baculoviridae* وجود نموذجين من الفريون المحوط occluded derived virions (ODV) والفيروس المتبرعم budded virions (BV)، هذان النموذجان للفريون متماثلين في بنية المعطف البروتيني nucleocapsid ويختلفان فقط في مصدر وتركيب الغلاف إضافة إلى اختلاف دورهما في دورة حياة الفيروس (الشكل. 3) (Murphy وزملاؤه، 1995).

يكون الفريون الضمين (الحبيس) occlusion derived virus (ODV) مدمصا ضمن قالب matrix من البروتين المتبلور وهذا ما يطلق عليه اسم الـ occlusion bodies وقد يكون شكل occlusion bodies متعدد السطوح وتحوي العديد من الفيريونات ويطلق عليه اسم polyhedral occlusion bodies (الشكل.3) كما في جنس *Nucleopolyhedrovirus*

وقد تحوي bodies occlusion فريون واحد ونادرا اثنين و يكون شكلها ovicylindrical كما في جنس *Granulovirus* (الشكل.3) من الصفات الهامة أيضا والتي يختلف بها جنس *Nucleopolyhedrovirus* عن *Granulovirus* هو الاختلاف في عدد nucleocapsid ضمن الغلاف ففي جنس *Nucleopolyhedrovirus* قد يوجد nucleocapsid وحيدة ضمن الغلاف أو نجد أكثر من جزيء فيروسي nucleocapsid ضمن كل غلاف ويطلق على الحالة الأولى(SNPV) single nucleocapsid وعلى الحالة الثانية (multiple nucleocapsids MNPV)

توجد الحالة الأولى (SNPV) single nucleocapsid عند *Granulovirus*

وتوجد الحالتين (SNPV) single nucleocapsid و multiple nucleocapsids (MNPV) عند *Nucleopolyhedrovirus* (الشكل.4) (Murphy وزملاؤه، 1995).

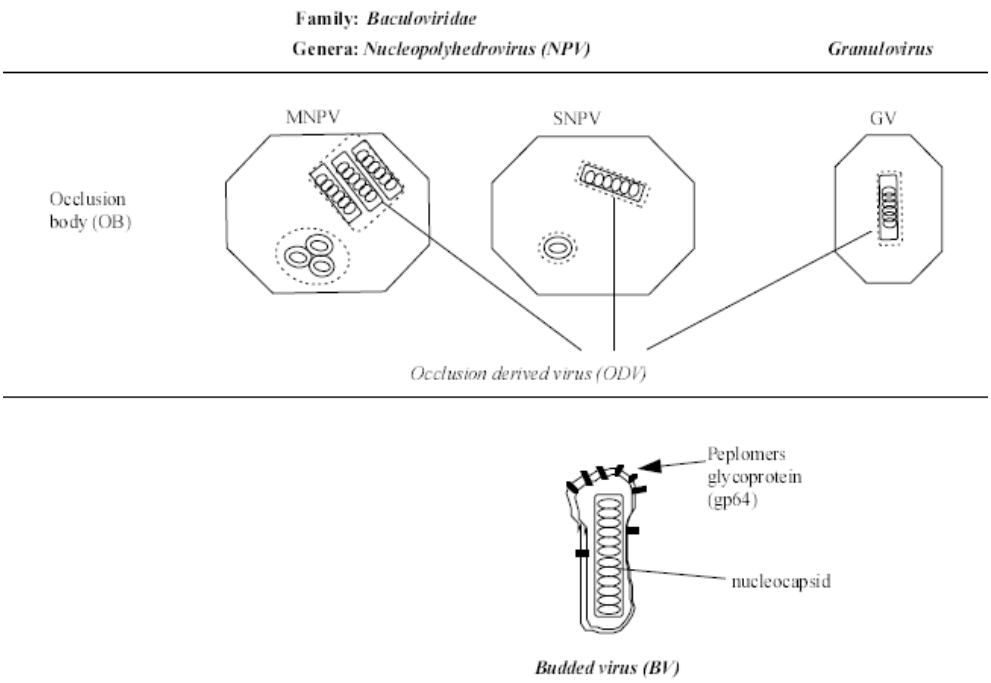
أما الفيروس المتبرعم (BV) budded virus (الشكل.2) والذي ينتجه الفيروس أولا في مرحلة مبكرة جدا من العدوى، وهو يتألف من nucleocapsid واحدة تتبرعم عبر الغشاء السيتوبلازمي للخلايا المعداة إلى داخل السائل خارج الخلية وتأخذ غلافها من الغشاء السيتوبلاسمي، ويحتوي هذا الغلاف على glycoprotein يسمى peplomer glycoprotein، ويقود الجينوم الفيروسي لتشكيل هذا البروتين (Murphy وزملاؤه، 1995).

أما شكل الـ nucleocapsid فهو عصوي قطره 30-55 nmوالطول 250-300 nm، وتحوي جزء وحيد من DNA ملتف جدا على بعضه، دائري مغلق ذو سلسلتين، يتراوح وزنه الجزيئي بين 90 و kbp160 (Murphy وزملاؤه، 1995)

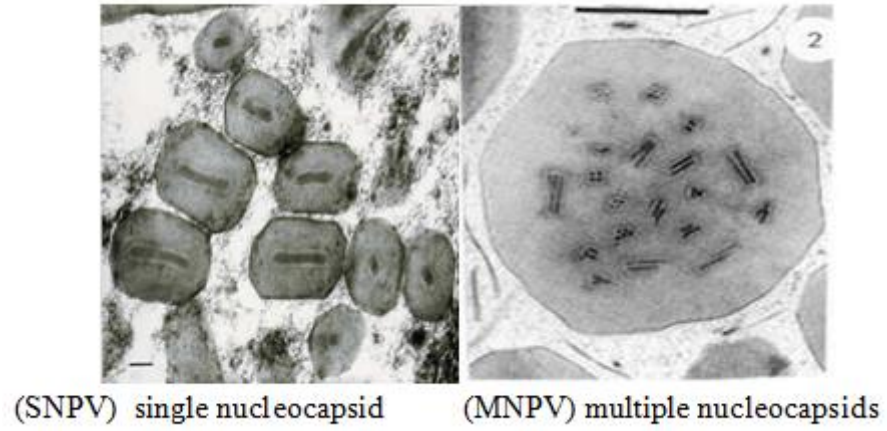
إن تميز هذه الفيروسات بهذه الصفات الشكلية والفيزيائية والكيميائية أي تشكيل bodies occlusion يسمح لنا بالكشف عنها بسهولة بواسطة المجهر الضوئي إذ تمثل bodies occlusion جزيئات عاكسة للضوء بشكل عال جدا (Bergold، 1947)

ويبلغ قياس الـ OB عند *Nucleopolyhedroviruses* 0.15 µm إلى 15 µm (Hooft van Iddekinge وزملاؤه، 1983)، ويتراوح عرض الـ OB عند GV بين 120-300 nm وطولها بين 300 و500 نانو متر (Crook، 1991).

ومن أهم مكونات الـ OB بروتين متعدد الوجوخ polyhedron عند *Nucleopolyhedroviruses*وبروتين حبيبي granulin عند *Granulovirus* Hooft van Iddekinge وزملاؤه، 1983)



الشكل .2 الصفات المورفولوجية لـ *Nucleopolyhedroviruses* و*Granulovirus*
(Murphy وزملاؤه، 1995)



الشكل .3 مكونات الجسم الضمين عند *Nucleopolyhedroviruses*
(Murphy وزملاؤه، 1995)

1-5- الوضع التصنيفي للفيروسات العصوية *Baculoviridae*

أخذت هذه العائلة اسمها من شكل الفريونات العصوية والتي قوامها الحمض النووي DNA مضاعف السلسلة double-stranded، يتراوح وزنه الجزيئي من 80 إلى 180 kbp ويحوي عدد من المورثات تتراوح بين 90 و 180 مورثة، ويوجد بين هذه المورثات حوالي 31 مورثة متماثلة تم تميزها ويعتقد بوجود مورثات أخرى متماثلة أيضا لم يتم الكشف عنها بسبب التغيرات الناتجة عن اختلاف أنواع الإدخال والاندماج عبر الزمن لمورثات مختلفة. يتوضع هذا الجينوم

ضمن فريون عصوي الشكل قطره 30-55 nm والطول 250-300 nm (Murphy وزملاؤه،1995). تم تقسيم فيروسات *Baculoviridae* حسب اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) كما ذكر كل من Carstens وBall (2014) إلى أربعة أجناس، *Alphabaculovirus*، ويضم هذا الجنس أنواع الفيروسات العصوية النووية المتعددة السطوح *nucleopolyhedroviruses* (NPV) والتي تتطفل على حشرات من رتبة حرشفيات الأجنحة (lepidopteran-specific *nucleopolyhedroviruses*, NPV)، و*Betabaculovirus* ويضم هذا الجنس الفيروسات العصوية الحبيبية *Granulovirus* (GV) والتي تتطفل على حشرات من رتبة حرشفيات الأجنحة (lepidopteran specific *Granulovirus*, GV)، و *Gammabaculovirus* ويضم هذا الجنس أنواع الفيروسات العصوية النووية المتعددة السطوح (NPV) التي تتطفل على حشرات من رتبة غشائيات الأجنحة (hymenopteran-specific NPV)، و*Deltabaculovirus* ويضم هذا الجنس أنواع الفيروسات المتطفلة على حشرات من رتبة ثنائيات الأجنحة (dipteran-specific NPV)، (Jehle وزملاؤه، 2006). وفي السابق كانت مجموعتي *alpha* و *betabaculoviruses* مصنفتين كفيروسات نووية متعددة السطوح (NPV- *nucleopolyhedroviruses*) وفيروسات حبيبية *granulovirus* (–GV).(Murphy وزملاؤه،1995). يبين الجدول (2) الوضع التصنيفي لعائلة *Baculoviridae* حسب اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Carstens وBall، 2014).

الجدول. 2. الوضع التصنيفي لعائلة *Baculoviridae* حسب اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Carstens وBall، 2009)

Baculoviridae	
جنس	الرتبة الحشرية التي يتطفل عليها
Alphabaculovirus	Lepidoptera
Betabaculovirus	Lepidoptera
Gammabaculovirus	Hymenoptera
Deltabaculovirus	Diptera

1-5-1- الجنس *Alphabaculovirus*:

الخصائص الشكلية

تعد هذه الفيروسات من أهم الفيروسات الممرضة للحشرات وأكثرها شيوعاً، والمسجل منها حتى الآن عدة مئات من الأنواع، وهناك حوالي 99 نوعا حشريا من رتبة حرشفيات الأجنحة مسجلة في دول الاتحاد الأوربي تصاب بهذه الانواع، أبعاد جزيء الفيروس (الفريون) القطر 30-60 نانو متر وبطول 250- 300 نانو متر (نانومتر = 0.001 ميكرون)، أبعاد الجسم الضمين المتعدد السطوح 1-10 ميكرون وعلى الأغلب 2-3 ميكرون. ويوجد داخل الجسم الضمين 1، أو من 2-6 جزئي فيروسي وقد يصل العدد إلى 40 جزئي فيروسي. يمكن مشاهدة هذه الأجسام الضمينة المتعددة السطوح بواسطة المجاهر الضوئية، وهي لا تتلون بالملونات العادية (Jehle وزملاؤه، 2006).

أعراض الإصابة

تصيب هذه المجموعة من الفيروسات يرقات حرشفيات الأجنحة بصورة رئيسة، و لا تتكاثر هذه الفيروسات إلا بداخل أنويه خلايا اليرقة المريضة، حيث ترتبط بعديد من أنسجة العائل، حيث تتضاعف في أنويه خلايا الجسم الدهني، والبشرة والخلايا الطلائية للقصيبات الهوائية وأنوية خلايا الدم. تستغرق فترة حضانة المرض من العدوى وحتى الموت من 5 أيام وحتى 12 يوماً أو أكثر، وهذه الفترة تتعلق بجرعة العدوى وعمر اليرقة المصابة ووضعها الفيزيولوجي، وتتعلق بدرجة حرارة الوسط المحيط وغيرها. أعراض الإصابة الخارجية بهذه المجموعة من الفيروسات متشابهة، إذ تتجه يرقات الحشرات الحرشفية الأجنحة المصابة بهذا الفيروس تجاه قمم النباتات للتعلق بأرجلها البطنية الخلفية حيث تتوقف عن التغذية، ويصبح قوامها هشاً، وتنتفخ، ويتغير لون اليرقة المريضة، ويمكن أن ينقطع جسم اليرقة المصابة ويتبع ذلك موتها. وتتحلل أنسجتها تحللاً كاملاً وتنطلق الأجسام الضمينة في سائل الدم، ويصبح جلد اليرقة المحتضرة هشاً للغاية. تشاهد هذه الأعراض بسهولة على يرقات الحشرات الخالية من الأشعار مثل يرقات ديدان الثمار، ويرقات الديدان القارضة، حيث يصبح لون هذه اليرقات المصابة أبيضا لبنيا، وذلك لأن خلايا بشرة الجسم الدهني وغيره يمتلئ بالأجسام الكريستالية المتعددة السطوح. تعتبر اليرقات الفتية الأكثر حساسية للإصابة بهذه الفيروسات، فالجرعة نصف القاتلة LD50 ليرقات العمر الأول للفراشة الأمريكية البيضاء هي 5×10^2 فيروس نووي متعدد السطوح للفرد الواحد، والعمر اليرقي الخامس 2×10^4 . وتكون الحشرات في مرحلة ما قبل العذراء والعذراء والحشرة الكاملة مقاومة لهذه الفيروسات. والجرعة غير المميتة لليرقات البالغة تؤدي إلى تحول اليرقة إلى عذراء والتي تعطي حشرة مشوهة تموت غالباً قبل وضع البيض (Jehle وزملاؤه، 2006).

المدى العائلي:

يبين الجدول (3) بعض الفيروسات من جنس ***Alphabaculovirus*** والحشرات التي تتطفل عليها

الجدول. 3. فيروسات من جنس ***Alphabaculovirus*** والحشرات التي تتطفل عليها

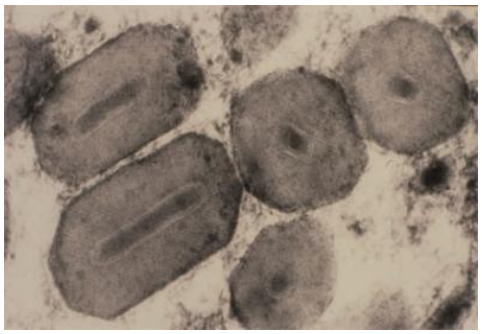
نوع الفيروس	العائل الحشري (عائلة)	المرجع
Agrotis ipsilon multiple nucleopolyhedrovirus	*Agrotis ipsilon* Noctuidae	Harrison، 2009
Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus	*Agrotis segetum* Noctuidae	Jehle وزملاؤه، 2006
Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus	*Antheraea pernyi* Saturniidae	Zhang وزملاؤه، 2007
Anticarsia gemmatalis multicapsid nucleopolyhedrovirus	*Anticarsia gemmatalis* Noctuidae	Soares وRiberio، 2005
Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus	*Autographa californica* Noctuidae	Dong وزملاؤه 2010
Bombyx mori nucleopolyhedrovirus	*Bombyx mori* Bombycidae	Jehle وزملاؤه، 2006
Buzura suppressaria nucleopolyhedrovirus	*Buzura suppressaria* Geometridae	Liu وزملاؤه، 1993
Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus	*Choristoneura fumiferana* Tortricidae	Fauquet وزملاؤه، 2005
Choristoneura rosaceana nucleopolyhedrovirus	*Choristoneura rosaceana* Tortricidae	Fauquet وزملاؤه، 2005
Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus	*Chrysodeixis chalcites* Noctuidae	Fauquet وزملاؤه، 2005
Ectropis obliqua nucleopolyhedrovirus	*Ectropis obliqua* Geometridae	Antony وزملاؤه، 2011
Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus	*Epiphyas postvittana* Tortricidae	Maguire وزملاؤه، 2000
Euproctis pseudoconspersa nucleopolyhedrovirus	*Euproctis pseudoconspersa* Lymantriidae	Tang وزملاؤه، 2009
Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus	*Helicoverpa armigera* Noctuidae	Luo وزملاؤه، 2011
Helicoverpa zea single nucleopolyhedrovirus	*Helicoverpa zea* Noctuidae	Adams وزملاؤه

2013		
Alves وزملاؤه، 2002	*Hyphantria cunea* Arctidae	*Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus*
Liu وزملاؤه، 1993.	*Leucania separata* Noctuidae	*Leucania separata nucleopolyhedrovirus*
McNeil وزملاؤه، 2010	*Lymantria dispar* Lymantriidae	*Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus*
Hughes وزملاؤه، 1997	*Mamestra brassicae* Noctuidae	*Mamestra brassicae multiple nucleopolyhedrovirus*
Donly وزملاؤه، 2014	*Mamestra configurata* Noctuidae	*Mamestra configurata nucleopolyhedrovirus A*
Jehle وزملاؤه، 2006.	*Mamestra configurata* Noctuidae	*Mamestra configurata nucleopolyhedrovirus B*
Song-Tay وزملاؤه، 2007	*Maruca vitrata* Crambidae	*Maruca vitrata nucleopolyhedrovirus*
Liu وزملاؤه، 1993	*Orgyia pseudotsugata* Lymantriidae	*Orgyia pseudotsugata multiple nucleopolyhedrovirus*
Fauquet وزملاؤه، 2005	*Spodoptera exigua multiple* Noctuidae	*Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus*
Fauquet وزملاؤه، 2005	*Spodoptera frugiperda* Noctuidae	*Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*
Fauquet وزملاؤه، 2005	*Spodoptera littoralis* Noctuidae	*Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus*
Fauquet وزملاؤه، 2005	*Spodoptera litura* Noctuidae	*Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus*
Fauquet وزملاؤه، 2005	*Thysanoplusia orichalcea* Noctuidae	*Thysanoplusia orichalcea nucleopolyhedrovirus*
Fauquet وزملاؤه، 2005	*Trichoplusia ni* Noctuidae	*Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus*
Fauquet وزملاؤه، 2005	*Wiseana signata* Hepialidae	*Wiseana signata nucleopolyhedrovirus*

1-5-2- الجنس *Betabaculovirus*:

الخصائص الشكلية

تتميز مجموعة الفيروسات الحبيبية GV بجسمها الضمين الأصغر من الجسم الضمين المتعدد السطوح وهو كبسولي أو حبيبي بيضاوي الشكل، ويتواجد ضمن الجسم الضمين فريون واحد أو اثنان على الأكثر وأبعاد الجزيء الفيروسي 300-250 x 60-30 نانومتر (Federici، 1997) (الشكل .4).



الشكل.4. الأجسام الضمينة للفيروسات الحبيبية GV بالمجهر الالكتروني.
http://www.eurekalert.org/multimedia/pub/5356.php?from=102129

أعراض الإصابة

لأنواع جنس *Betabaculovirus* القدرة على التكاثر في أنوية وسيتوبلاسما العائل، ويعتبر الجسم الدهني النسيج الرئيسي بالعائل الذي يصاب بالفيروسات الحبيبية وكذلك لها القدرة على التضاعف بالخلايا الطلائية للقصبات الهوائية وخلايا أنابيب مالبيجي وخلايا الجهاز العضلي والجهاز العصبي. مدة الحضانة للمرض 5-7 وحتى 45-50 يوماً وهذا يرتبط بجرعة العدوى والعائل ودرجة حرارة الوسط. تتفاوت الأعراض المرتبطة بمرض الفيروس الحبيبي بدرجة كبيرة من حشرة إلى أخرى، وتبدأ أعراض الإصابة بشحوب لون العائل، تباطؤ في الحركة والتوقف عن التغذية، ويتبرقش لون السطح الظهري للعائل ويبقى لون السطح السفلي شاحباً بلون مبيض أو مصفر نتيجة انعكاس لون الجسم الدهني المصاب بالفيروس ويصبح لون السائل الليمفاوي أبيضا لبنيا (Federici، 1997).

المدى العائلي

تتطفل هذه الفيروسات على اليرقات من رتبة حرشفية الأجنحة. وسجل أول مرض من الفيروسات عام 1926 على يرقات أبي دقيق الملفوف (Federici، 1997)، والمسجل حالياً حوالي 200 مرض من الفيروسات الحبيبية على يرقات حرشفية الأجنحة التي تصيب أشجار

الفاكهة والغابات والخضار ويبين الجدول (4) بعض الفيروسات من الجنس *Betabaculovirus* والحشرات التي تتطفل عليها.

الجدول. 4. فيروسات من الجنس *Betabaculovirus* والحشرات التي تتطفل عليها

نوع الفيروس	العائل الحشرية (العائلة)	المرجع
Adoxophyes orana ranulovirus	*Adoxophyes orana* Tortricidae	Wormleaton وزملاؤه، 2003؛ Winstanley و O'Reilly، 1999
Artogeia rapae granulovirus	*Artogeia rapae* Pieridae	Winstanley & O'Reilly, 1999
Choristoneura fumiferana granulovirus	*Choristoneura fumiferana* Tortricidae	Bah وزملاؤه، 1997
Cryptophlebia leucotreta granulovirus	*Cryptophlebia leucotreta* Tortricidae	Lange وJehle ؛ 2003
Cydia pomonella granulovirus	*Cydia pomonella* Tortricidae	Luque وزملاؤه، 2001
Harrisina brillians granulovirus	*Harrisina brillians* Zygaenidae	Federici، 1997
Helicoverpa armigera granulovirus	*Helicoverpa armigera* Noctuidae	Harrison وزملاؤه، 2008
Lacanobia oleracea granulovirus	*Lacanobia oleracea* Noctuidae	Winstanley وO'Reilly ، 1999
Phthorimaea operculella granulovirus	*Phthorimaea operculella* Gelechiidae	Winstanley وO'Reilly ، 1999
Plodia interpunctella granulovirus	*Plodia interpunctella* Pyralidae	Funk وConsigli، 1993
Plutella xylostella granulovirus	*Plutella xylostella* Plutellidae	Hashimoto وزملاؤه، 2000
Pseudalatia unipuncta granulovirus	*Pseudalatia unipuncta* Noctuidae	Winstanley وO'Reilly ، 1999
Trichoplusia ni granulovirus	*Trichoplusia ni* Noctuidae	Winstanley وO'Reilly ، 1999
Xestia c-nigrum granulovirus	*Xestia c-nigrum* Noctuidae	Hayakawa، 1999

1-5-3- الجنس *Gammabaculovirus*

العائل

تتطفل أنواع هذا الجنس على حشرات من رتبة غشاءية الاجنحة Hymenoptera (الشكل 5.) ، ولوحظت على بعض أنواع البعوض، وأنواع هذا الجنس قليلة وأقل انتشاراً من أنواع الجنسين الأول والثاني. من أهم الأنواع فيروس دبور الصنوبر المنشاري *Neodiprion lecontei nucleopolyhedrovirus* الذي يصيب حشرة دبور الصنوبر المنشاري (The redheaded (pine sawfly (Fitch) *Neodiprion lecontei* (Diprionidae) والفيروس Lauzon) *Neodiprion Sertifer* nucleopolyhedrovirus وزملاؤه، 2006)

الشكل 5. يرقات *Neodiprion Sertifer*

المصدر

http://de.wikipedia.org/wiki/Buschhornblattwespen#mediaviewer/File:Neodiprion_sertifer_chenilles.JPG

الخصائص الشكلية

تتميز أنواع هذا الجنس بأنها تحوي الحمض النووي DNA مضاعف السلسلة (double-stranded)، والذي يتراوح وزنه الجزيئي بين 80-86 kbp. الفريون المتضمن (ODV) محاط بغلاف بروتيني متعدد السطوح قياسه من 25 إلى 33 كيلو دالتون، قياس الجسم الضمين يتراوح بين 0.4 إلى 1.1 نانومتر. ويوجد داخل كل جسم ضمين العديد من الفريونات الضمينة، وكل فريون يحتوي حمض نووي واحد (nucleocapsid) داخل الغلاف (Ackermann وSmirnoff، 1983)، كما أشارت الدراسة إلى أنه لم يثبت إلى الآن وجود الفيروس المتبرعم budded virus (BV) (Lauzon وزملاؤه، 2004؛ Maruniak-Garcia وزملاؤه، 2004)

أعراض الإصابة:

فترة حضانة المرض 3-15 يوماً، وتتعلق هذه الفترة بجرعة الفيروس وبعمر اليرقة ودرجة حرارة الوسط. من أهم أعراض الإصابة بهذه المجموعة من الفيروسات، التغيير في سلوك اليرقات المصابة، حيث تفقد الحشرات التي تعيش على شكل مجموعات هذه السلوك في أسلوب الحياة، وتصبح تعيش بشكل إفرادي، وتتحول الحشرات ذات النمط الانفرادي في الحياة إلى النمط الجماعي، وتصبح كسولة، لا تتغذى ولا تتحرك، ويصبح لون حلقات البطن أبيض لبني، ويصبح لون الجسم – بشكل عام – أفتح، ويسيل من فتحة الفم سائل لبني، ويخرج من فتحة الشرج نقاط بنية صمغية، تجف سريعاً، وتلتصق اليرقة المصابة بالسطح الموجود عليه بواسطة النقاط الصمغية، وتكون في البداية ملتصقة في نهايتها الخلفية فقط، وفيما بعد تلتصق بكاملها بالسطح الموجودة عليه (ورقة – غصن- ساق، فرع) ويلي ذلك موت اليرقة المصابة.

يتكاثر الطفيل وينمو في أنوية الخلايا الطلائية للمعدة الوسطي، ونتيجة لذلك تتخرب هذه المعدة ولا تستطيع إفراز الأنزيمات لتمثيل الغذاء وطرح نواتج الهضم.(Lauzon وزملاؤه، 2006).

4-5-1- الجنس *Deltabaculovirus*:

العائل:

أنواع هذا الجنس تتطفل على حشرات من رتبة Diptera. من أهم الأنواع *Culex nucleopolyhedrovirus nigripalpus* (CuniNPV) (Moser وزملاؤه، 2001).

الخصائص الشكلية

بينت الدراسة وجود نموذجين من الفريون المتضمن (الحبيس) occluded virions ODV والفيروس المتبرعم budded virions BV، يتواجد الفريون المتضمن ضمن قالب matrix من البروتين المتعدد السطوح المتبلور، الجسم الضمين (OBs) كروي الشكل، يتروح متوسط طول الجسم الضمين 400 نانومتر، الجسم الضمين لا يتشابه مع الجسم الضمين للفيروسات التي تصيب يرقات حرشفيات وغشائيات الأجنحة (Perera وزملاؤه، 2006).

يتواجد في الجسم الضمين عدد من الفيريونات المحاطة بغشاء، التي يتألف من حمض نووي واحد داخل الغلاف والوزن الجزيئي للحمض النووي 80 kbp (Jehle وزملاؤه، 2006).

الإمراضية:

تقتصر العدوى الفيروسية للخلايا الظهارية في المعي المتوسط. ولم يلاحظ أي انتشار العدوى في الخلايا الأخرى (Moser وزملاؤه، 2001).

1-6- العدوى وانتشار المرض

تختلف طرائق عدوى الحشرات بالفيروسات الممرضة للحشرات بحسب العائلة التي ينتمي إليها الفيروس، وقد بينت الدراسة أن العدوى بالفيروسات الممرضة للحشرات تتم بطريقتين:

1-6- 1- الانتقال الأفقي للعدوى

يتم نقل في هذه الطريقة العدوى مابين أفراد الجيل الواحد، وهي الطريقة الأكثر انتشاراً وحدوثاً، ويتم الانتقال الأفقي للعدوى من خلال الوسائل التالية:

- الغذاء الملوث: حيث تدخل الفيروسات إلى معدة العائل عن طريق فم الحشرات عند التغذية على الغذاء الملوث بالعامل الممرض (Sikorowski وTyson، 1984)، وقد بين Yule وLee (1973) في الدراسة التي أجريت في الصين على دودة الحرير أن العدوى ليرقات الحشرة تنتقل من جيل إلى آخر عن طريق الفم، أشار Sikorowski وزملاؤه (1973) وBong وSikorowski (1991) أن الأجسام المتعددة الوجوه او ما يعرف بالأجسام الضمينة تتحرر من الخلايا المتضررة إلى المعدة لتفرز مع البراز وتصبح وسيلة العدوى عند تناول اليرقة للغذاء الملوث بها. بينت الدراسة أن العدوى بفيروسات *Baculoviride* يتم عن طريق الغذاء الملوث بالأجسام الضمينة (OBs)، حيث تتحرر الأجسام الضمينة من اليرقات المصابة لتلوث التربة وأوراق النبات ولحاء الأشجار وغيرها، ويتم انتقال العدوى من خلال فم الحشرة ومنه إلى قناتها الهضمية (Wang وGranados، 2000؛ Shapiro وArgauer،1997؛ Hegedus وزملاؤه، 2009؛ Haas-Stapleton وزملاؤه، 2003).

الأعداء الحيوية: تتغذى الكثير من الحشرات الكاملة للمتطفلات الحشرية بلدغ عائلها ثم امتصاص السائل الناتج عن هذه اللدغة، وعندما يكون العائل الحشري مصاباً بأحد الفيروسات الممرضة، فإن السائل الذي امتصته الحشرة الكاملة للمتطفل يكون مليئاً بالعوامل الممرضة للحشرات، وبالتالي فإن حشرة المتطفل الحشري الكاملة وعندما تقوم بلدغ عائل آخر تنقل له العدوى، أو تنتقل العدوى من جراء ثقب جسم حشرة العائل لدخول يرقة المتطفل الحشري أو خروج يرقة المتطفل الحشري المكتملة النمو، والسائل الناتج عن هذا الدخول أو الخروج قد يكون أحد العوامل الرئيسة لنقل العدوى من حشرة مريضة إلى حشرة سليمة (Federici،1983) ، أشارت بعض الدراسات إلى دور للمفترسات الحشرية في نقل العدوى بالفيروسات الممرضة للحشرات من حشرات مصابة إلى حشرات سليمة وقد بين Beekman (1980) أهمية المفترسات الحشرية في نقل العدوى بالفيروسات الممرضة بين يرقات *Heliothis*

punctiger، كما أشار Evans وAllaway (1983) إلى دور المفترسات الحشرية بنقل العدوى بالفيروسات الممرضة للحشرات ليرقات فراشة الملفوف *Mamestra brassicae*، وبين Lautenschlager وPodgwaite (1979) أهمية الثدييات والطيور المفترسة في نقل العدوى بالفيروسات الممرضة لحشرة فراشة الغجر *L. dispar*.

- تلوث غلاف البيضة بالفيروسات: وبالتالي فإن هذه الفيروسات تنتقل إلى اليرقات الفتية عند خروجها من غلاف البيضة (Sikorowski وزملاؤه،1973، Houston، 1991).
- ظاهرة الافتراس الذاتي Cannibalism: فبين Carter (1973)، Grosholz (1992)، Undeen وFukuda (1994)، Marina وزملاؤه (2005) و, Williams وHernández (2006) أن افتراس يرقات سليمة ليرقات مصابة من نفس النوع هي من أهم طرق العدوى بالفيروسات الممرضة للحشرات.

1-6- 2- الانتقال العمودي للعدوى

يتم نقل العدوى في هذه الطريقة من جيل إلى آخر، حيث يقوم الآباء بنقل العدوى للأجيال اللاحقة ويتم ذلك بعدة طرائق:

1- عن طريق وضع البيض في مكان ملوث وبالتالي تلوث البيض ثم تلوث اليرقات الناتجة عن هذا البيض، وبين Houston (1991) أن العدوى بالفيروسات الممرضة للحشرات من جيل لآخر تتم عن طريق بيض العائل الملوث. كما بين Sikorowski وزملاؤه (1973) أن العدوى من جيل إلى آخر يتم بصورة رئيسية عن طريق البيض الملوث.

2- مبيضي: حيث تضع الأنثى بيضاً تحمل الخلايا المولدة (الجنين) الأجسام الضمينة الفيروسية مما يؤدي إلى إعطاء يرقات مصابة (Mullens وزملاؤه، 1999؛ López وزملاؤه، 2002). وأشار Linley وNielsen (1968)، Hall وAnthony (1971) أن الانتقال العمودي للفيروسات من الآباء إلى الذرية هو من أهم وسائل العدوى بالفيروسات الممرضة لدى البعوض *Ochlerotatus taeniorhynchus*.

1-7- آلية تضاعف الفيروس الممرض للحشرات من عائلة الفيروسات العصوية *Baculoviridae* داخل العائل الحشري :

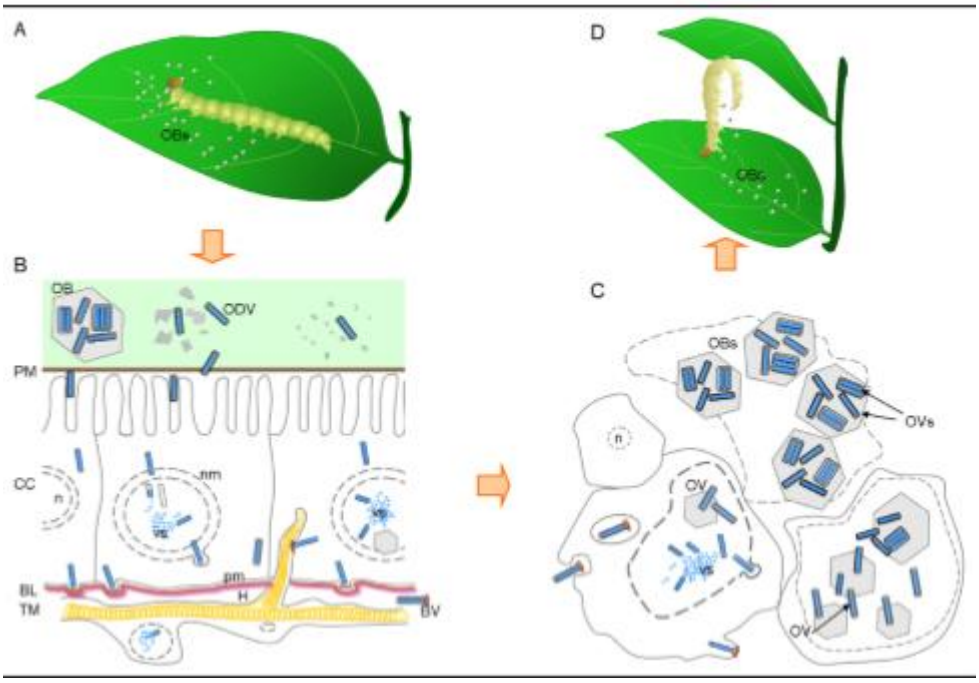
يتم تضاعف الفيروس داخل العائل المصاب بثلاث مراحل:

1-7-1- الطور التمهيدي: تستغرق هذه المرحلة 12 ساعة من بدء العدوى (الشكل. 32- A) ودخول الأجسام الضمينة إلى معدة العائل التي تشكل المسرح الرئيس لنشاط الفيروس، إذ لا يستطيع الفيروس أن يعبر من تجويف القناتين الأمامية والخلفية إلى تجويف الجسم، حيث تشكل طبقة الكيوتيكل المبطنة لهاتين القناتين حاجزاً يحول دون هذا العبور والذي يصبح ممكناً بالمعدة لافتقارها لهذه الطبقة (Wang وGranados، 2000؛ Shapiro وArgauer، 1997؛ Hegedus وزملاؤه، 2009؛ Haas-Stapleton وزملاؤه، 2003). يتحلل بروتين الأجسام الضمينة (OBs) تحت تأثير الوسط القلوي لجوف المعدة (pH ≈ 11) وذلك بواسطة أنزيم البروتييناز المرتبط بفيروس *polyhedroviruses* أو*Granulovirus*، ونتيجة لذلك يتحرر عدداً من الفريونات المغلفة (occlusion derived virion ODV) والتي تلتصق بالامتدادات الأنبوبية للخلايا العمودية التي تشكل جانباً من الطبقة المبطنة لجدار المعدة. بينت الدراسة أن هناك أربع بروتينات تدخل في بنية الـ ODV وهي (P74، PIF1، PIF2 وPIF3) تشارك في هذه العملية وثلاثة من هذه البروتينات وهي (P74، PIF1 وPIF2) تسمح بارتباط الـ ODV بالخلايا العمودية (Ohkawa وزملاؤه،2005؛ Haas-Stapleton وزمـلاؤه، 2004؛ Slack وArif، 2007). وأشار Song وزملاؤه (2008) أنه لم يعرف حتى الآن ما هي العوامل الخلوية التابعة للعائل التي ترتبط بها الـ ODV أو ما إذا كانت هذه البروتينات الثلاث تشكل معقدا أو أنها تعمل بشكل متتابع أو متوازي لتحقيق الارتباط، ولكن الدراسات تتوجه نحو وجود بروتين ارتباط متخصص PIFs لكل *baculovirus* (Song.وزملاؤه، 2008). وتستطيع الـ OBs بما تحمله من عوامل تعزيز الفيروسية (VEF) viral enhancing factors بزيادة نفاذية هذا الجدار ومن ثم تلاشي الجدار الفاصل بين الامتداد الأنبوبي للخلية الطلائية والفريون فتدفع الفيروس في فراغ هذا الامتداد متجهة إلى الخلية (الشكل. 32- B) (Bischoff وSlavicek،1997؛ Derksen وGranados، 1988؛ Wang وزملاؤه، 1994).

1-7-2- الطور اللوغاريتمي: تستغرق هذه المرحلة 48 ساعة، حيث يتم تشكيل النيكلوكابسيد الفيروسية دون تكوين أجسام ضمينة (الشكل. 32- C)، ينطلق الحمض النووي من النيكلوكابسيد إلى داخل انوية الخلايا الطلائية عن طريق مسام في جدار النواة أو تندفع النيكلوكابسيد بكاملها إلى داخل النواة ينطلق منها الحمض النووي ، ويندمج الحمض النووي للنيكلوكابسيد الغازي

والحمض النووي للخلية الطلائية المحتلة وينتج عن ذلك تكوين نسيج ضام (مطرحة فيروسية) **virogenic stroma** يطلق عليه Viroplasm. إن آلية هذا الانتقال غير معروفة،على كل، من الممكن أن الـ nucleocapsids (NCs) تستخدم بروتين (myosin VI) والـبروتين Actin-binding من اجل النقل خلال الـمسام الدقيقة (Volkman، 2007)، تتضخم النواة المصابة حتى تكاد تشغل معظم مساحة الخلية الطلائية، ويشاهد Viroplasm داخل النواة المتضخمة مكوناً لنيكلوكاسيدات فيروسية تنطلق خارجياً حين انفجار جدار هذه النواة لتصيب خلايا العائل ذات الحساسية للعدوى. وقد تتجه النيكلوكابسيد الفيروسية مباشرة إلى غشاء الخلية (دون أن تغزو نواتها)، وهذا ما يسمى النمط الثاني من الفيروس *baculovirus* Second phenotype والذي يسمى budded virus (BV) (Engelhard وزملاؤه، 1994) تنشر الفيروسات المتبرعمة (BVs) الإصابة إلى أنسجة الحشرة الأخرى مثل (خلايا الدم Hemocytes، الجسم الدهني، العضلات، القصبات)، مسببة الإصابة الجهازية systemic infection (تسمى أيضا الإصابة الثانوية secondary infection). أي أن الـ BVs فعالة جدا في تأسيس الإصابة الداخلية وبعض جزيئات الفيروس المتبرعمintrahemocoelic BV وأحيانا جزيء واحدة فقط قادر على عدوى قاتلة (Volkman، 2007) تشجع حموضة الغشاء على اندماج الفيروس وغشاء الخلية (Pearson وزملاؤه، 2000؛ Long وزملاؤه، 2006) ومن ثم تتحررالـنيكلوكابسيد في السيتوبلاسم لتتجه نحو النواة وتنتقل إلى داخلها عن طريق الثقوب النووية، ويقدر عدد الفيروسات المتبرعمة بأربع في كل خلية في جسم الحشرة (Bull، 2003).

1-7-3- مرحلة الاستقرار: تستغرق هذه المرحلة 14-24 ساعة، ويتكون في هذه المرحلة الفيروس المتعدد السطوح، حيث يحاط جزئ الفيروس بالغلاف الداخلي والخارجي ثم تحاط بالجسم الضمين، وتصبح بشكل متعدد السطوح أو حبيبي أو الكبسولي أو غير ذلك، وتصاب كل خلايا اليرقة المريضة بالفيروس، وتتحلل أنسجتها فيمتلئ تجويف جسم العائل بسائل فاتح قوامه الملايين من الأجسام المتعددة السطوح، ويرق جدار الجسم خلال هذه المرحلة إلى درجة تسمح بانفجاره بمجرد اللمس أو الاهتزاز، مما يدفع بانطلاق الفيروس نحو الخارج ملوثة الوسط المتاخم لليرقة المتحللة، (Federici، 1997) (الشكل. 6- D).



الشكل. 6. آلية تضاعف الفيروس الممرض للحشرات داخل العائل الحشري المصاب. (Federici،1997)
A: يرقة تتناول غذاء ملوث بالأجسام الضمينة OBs.
B: انحلال الأجسام الضمينة في الوسط القلوي للمعدة وتحرير الفيريونات المغلفة التي تخترق الخلايا الظهارية للأمعاء لتصيب الخلايا القابلة للإصابة
C: تكاثر الفيروس داخل النواة وتكوين الفيروس OV_s
D: انطلاق الفيروس نحو الخارج وتلوث الأوراق بالأجسام الضمينة.
OB: أجسام ضمينة، ODV: الفريونات المغلفة، PM: الغشاء الظهاري للأمعاء، CC خلية عمودية، n: النواة، nm الغشاء النووي، virogenic stroma: vs ، BL صفيحة قاعدية،TM جهاز القصبات ،H: الهيموليمفا، OV:فريون مغلف.

8-1- الإصابة الفيروسية اللاحقة او الكامنة Latent virus infections

في هذه الحالة تكون الفيروسات موجودة داخل المضيف الحشري ولكن دون ظهور أية أعراض مرضية على المضيف، وفي هذه الحالة تكون الفيروسات قادرة على الانتقال من جيل إلى آخر بطريقة الانتقال العمودي المبيضي، وتحت ظروف خاصة وتأثير عوامل الإجهاد stress factors ينشط الفيروس الكامن محدثاً إصابة الأنسجة دون عدوى خارجية على الإطلاق. ترتبط عوامل الإجهاد غالباً، بظاهرة الكثافة العددية اليرقات أو تعرضها لدرجات حرارة عالية أو منخفضة، الأشعة فوق البنفسجية UV والمعاملة بالمواد الكيماوية، وظروف التربية أو بعدواها بفيروس غريب (Longworth وCunningham، 1968؛ Biever وWilkinson، 1978؛ David وGardiner، 1965؛ Krieg، 1956؛ Podgwaite وMazzone، 1986).

وتدفع عوامل الإجهاد بتثبيط مقاومة اليرقة حاملة الفيروس لهذا المرض، أو بدفعه إلى حالة تسمح بتضاعف الفيروس وإحداث الإصابة بالأنسجة، ويعتقد أن الفيروس يكون مندمجاً بحمضه

النووي مع الحمض النووي الخلوي للعائل، وتحت ظروف الضغط ينفصل الحمضان فيصبح الفيروس الكامن مؤثراً ومحدثاً الإصابة. بين Jurkovicova (1979) وPonsen وde Jong (1964) أنه تم تنشيط الفيروس SNPV *Adoxophyes orana* بعدوى يرقات *A. orana* بـ MNPV *Barathra brassicae*، كما تم تنشيط الفيروس MNPV *B. brassicae* بعدوى يرقات *Barathra brassicae* بالفيروس SNPV *A. orana*

1-9- العوامل البيئية المؤثرة على القدرة البقائية للفيروسات الممرض للحشرات

ترتبط استمرارية العدوى للفيروسات الممرضة للحشرات للآفات الزراعية ارتباطا وثيقاً بقدرة هذه الفيروسات على البقاء، وهناك مجموعة من العوامل البيئية الحيوية Biotic factories وعوامل بيئية غير حيوية Abiotic factories تؤثر على بقاء الفيروس ومدى تأثيره على العائل (Evans، 1986) بينت الدراسة أن الفيروسات تتميز ببعض المميزات التي تعطيها القدرة على البقاء لفترة طويلة وتتمثل هذه المميزات بالأجسام الضمينة وبقدرة الفيروسات على الاستمرار والانتشار من خلال الانتقال العمودي أو من خلال العدوى الكامنة او اللاحقة، وبينت الدراسة أن الفيروس النووي المتعدد السطوح nuclear *Colias eurytheme* polyhedrosis virus CeNPV) الذي يصيب دودة البرسيم *Colias eurytheme* يتواجد بالتربة وتنتشر جزيئاته بماء الري على النبات حيث تشكل مصدراً لعدوى يرقات هذه الآفة، وضحت الدراسات الخاصة تمكن الفيروسات من البقاء مرتبطة من خلال النقل المبيضي أو بأجيال عائله لفترة تراوحت بين تسعة شهور وعشرة شهور بالبيئة. بيت الدراسة أن الأشعة فوق البنفسجية تؤثر على القدرة البقائية للفيروسات الممرضة للحشرات، وأشار Kroschel (1996) أن المدة البقائية للفيروس *phthorimaea operculella granulovirus* انخفضت 15 يوماً تحت تأثير الأشعة فوق البنفسجية، وبين Fuxa وRichter (1996) أن العمليات الزراعية قد تؤثر على بقائية الفيروسات الممرضة للحشرات وخاصة عملية الحراثة التي قد تؤثر على هذه الفيروسات. بينت الدراسة أن للرطوبة تأثيراً بسيطاً على فاعلية الفيروس المتعدد السطوح الذي يصيب دودة البلوط الكاليفورنية *phryganidia californica* ، والدودة نصف القياسية *Plusia gamma*. تزداد بقائية الفيروسات الممرضة للحشرات بازدياد ظاهرة التزاحم، ويعمل الافتراس الذاتي على سرعة انتشار الأمراض الفيروسية. تعمل بعض المواد الغذائية، مخبرياً للدفع أو تنشيط الأمراض الفيروسية بين الحشرات، وتسبب هذه المواد في تغييرات فسيولوجية بالعائل ومنها الخلل في تمثيل الكربوهيدرات، وتنشط بعض المواد الكيميائية كسكر الغلوكوز وحمض الليمون (citric acid) الإصابات الفيروسية للحشرات (توفيق، 1997).

1-10- إستراتيجية استخدام الفيروسات الممرضة للحشرات في المكافحة الميكروبية للآفات الحشرية

حظيت الفيروسات الممرضة للحشرات وخاصة منها *Baculoviruses* باهتمام بالغ في برامج المكافحة الميكروبية للآفات، وذلك لما تتمتع به من آمان ويرجع ذلك لاحتواء هذه الفيروسات على أجناس عديدة متخصصة في هذا المجال، وأن كل منها مغلف بجسم ضمين يمنحه قدرة بقائية عالية بالبيئة، وأنه شديد الشراسة فقط ضد اللافقاريات، وهذه المميزات لم تتضح إلا من خلال اختبارات عديدة لهذه الفيروسات، فقد أجريت دراسات عديدة لاختبار فاعلية الفيروسات الممرضة للحشرات وتحديد المدى العائلي لها، بحيث يتم عزل الفيروس من حشرة مصابة ويتم اختبار العزلات المستحصل عليها لأكثر من مرة وعند التأكد من تخصص هذه السلالات بالآفات الحشرية المعزولة منها تستخدم كعزلات واعدة للمكافحة الميكروبية (Smits وVlak،1988a؛ Shapiroو Robertson، 1991) واستخدمت هذه الطريقة في مكافحة دودة ثمار التفاح في مناطق مختلفة في أوربا، حيث استخدمت عزلات (CpGV) *Cydia pomonella granulosis virus* من يرقات لحشرة المريضة من المكسيك (Tanada، 1964) هذا الاتجاه في استخدام الفيروسات في المكافحة الميكروبية للآفات يسمى الإدخال Introduction of virus، وهناك اتجاه ثان يستند على الدفع بتزايد كثيف للفيروس الممرض في وسط انتشاره دون الاعتماد على ذريته عند المكافحة، على عكس الاتجاه الثالث الذي يشير إلى إجراء تزايد محدود للمرض بإطلاق محدود له خلال الموسم حيث تستند المكافحة على ذريته من خلال معاودته دورة الحياة. وبالاتجاه الرابع يكون التعامل مع وسط الانتشار لتعزيز المكافحة الطبيعية للآفة بمرض يتواجد طبيعيا في وسط انتشار الآفة وهذه الآلية في استخدام الفيروسات الممرضة للحشرات تم استخدامها في أمريكا وكندا لمكافحة حشرة دبور الصنوبر الأوربي (Dirionidae: Hymenoptera) *Gilpiniahercyniae* (Ehler، 1991؛ Huber، 1986).

إن الاستخدام الأمثل للفيروسات في المكافحة الميكروبية للحشرات يتطلب إجراء اختبارات عديدة عليها كاختبارات الشراسة، حيث يتم تحفيز الشراسة من خلال تضاعف الفيروس في عائل بديل، وهذا يساعد أيضاً في إنتاج الفيروس في التربية على عوائل بديلة مما يخفض من تكاليف الإنتاج (Stairs، 1990؛ Martignoni وIwai، 1986؛ Shapiro وزملاؤه، 1982). أشار Shapiro وزملاؤه (1982) أن عثة (Lepidoptera :Arctidae) *Estigmene acrea* (شكل .7)، تستخدم كعائل بديل لإكثار فيروسي SNPV *Orygia pseudotsugata* وMNPV *Choristoneura fumiferana*.

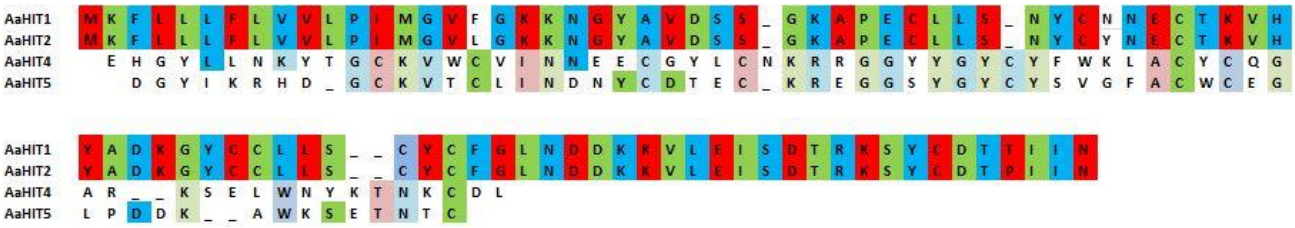
الشكل.7. حشرة *Estigmene acrea* (Lepidoptera :Arctidae)

المصدر: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/leaf/saltmarsh_caterpillar.htm

تتركز الجهود في مجال استخدام الفيروسات الممرضة للحشرات، في إنتاج سلالات فيروسية أسرع قتلاً للحشرات المستهدفة، وأشد مقاومة لتأثير الأشعة فوق البنفسجية التي تعد أقوى عوامل البيئة تدميراً للفيروس تحت ظروف الحقل، وذلك من خلال إدراج الجينات المسؤولة عن تشفير السموم الحشرية الشديدة الفاعلية، كما أنه هناك محاولات لإضافة UV-brighteners، للوقاية من الأشعة فوق البنفسجية مثل المولاس والصمغ والصابون، وبينت النتائج أن إضافة هذه المواد يؤدي إلى زيادة شراسة الفيروس الممرض للحشرات أيضاً (Shapiro وRobertson، 1991؛ Shapiro، 1992) كما انخفضت الجرعة نصف المميتة Median lethal dose أكثر من أربع مرات (Shapiro وDougherty، 1994؛Zou وYoung ، 1996).

إن من استراتيجيات استخدام الفيروسات الممرضة للحشرات في المكافحة الميكروبية استخدام الفيروسات المحسنة وراثياً، والهدف من التحسين الوراثي هو زيادة فاعلية تلك الفيروسات من خلال إدخال مورثات السموم من مفصليات الأرجل، وأشارت الدراسة إلى أنه يتم إدخال بعض السموم العصبية من مفصليات الأرجل والتي تعرف بإحباط عمل الوصلات العصبية أو تثبيط نشاط قنوات الايونات (مضخات الصوديوم) .بسبب تخصصها أصبحت هذه السموم الطبيعية مفيدة جداً في تركيب المبيدات الحيوية الجديدة، ضمينة *Baculovirus*. حيث عدلت المورثات المشفرة لسم عقرب *Androctonus australis* Hector (AaIT) وأدخلت في *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus لزيادة فاعلية هذه الفيروسات. حيث اظهرت سموم المورث AaIT تخصص عال على الحشرات دون وجود تأثير ظاهري على الثديات، ترتبط السموم البروتينية مع بروتينات قناة الصوديوم وتخرب الغشاء العصبي. تأثير السم هو مثير لأنه يقلل من عمل قناة الصوديوم وتصبح إمكاناتها أقل (Lee وAdams، 2000) هذا النمط من العمل هو مشابه للـــسـم ß-exotoxin، يؤدي تحريض السم الى حدوث تقلصات العضلات في الحشرات بالتالي إلى شلل الجسم (Borchani وMansuelle، 1996). إن التخصص العالي للسموم العصبية للعقارب

جعل منها الخيار الأمثل لتطوير فاعلية *Baculoviruses*، إن سم العقرب هو عديد الببتيد مكون من 60 إلى 70 حمض أميني مرتبطة مع بعضها بأربعة روابط كبريتية. يوجد 4 أشكال من سم الحشرات AaH وهي AaHIT1، AaHIT2، AaHIT4، AaHIT5، يختلف تسلسل الأحماض الأمينية لدى AaHIT1 وAaHIT2 في الموقعين 17 و 41 (Loret وMansuelle،1990)، بينما هناك اختلاف كبير في تسلسل الأحماض الأمينية بين AaHIT4 و AaHIT5 (الشكل. 8) (Loret وMartin-Eauclaire، 1991).



الشكل .8. اختلاف تسلسل الأحماض الأمينية في سم الحشرات AaH

تشير الدراسة إلى أنه يتم إدخال مورثات مسؤولة عن إنتاج سم العقارب إلى فيروسات *Baculovirus* لتحسين أدائها وزيادة سرعة التأثير القاتل، حيث تم إدخال المورث المسؤول عن سم العقرب *A. australis* إلى (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus) *WT AcNPV* لإنتاج الفيروس المعدل *AcAaIT*، وبينت الدراسة أن يرقة قاطوع التبغ *H. virescens* المعاملة بفيروس *AcAaIT* ، واليرقات المصابة بالفيروس *AcAaIT* استهلكت كمية اقل من المجموع الورقي مقارنة مع اليرقات المصابة بفيروس *WT AcNPV* واليرقات غير المصابة في الشاهد سقطت بعيدا عن النبات قبل 5-11 ساعة قبل الموت ولم تعد قادرة على إعادة تسلق النبات لتعود للتغذية (Hoover وزملاؤه، 1995). استخدمت الخلايا الحشرية Sf9 لإنتاج الفيروسات المأشوبة، حيث تم إكثار الفيروس AcNPV المعزول من *Trichoplusia ni* والمؤشب بالمورثة *enhancin* ويرمز لها اختصاراً (*AcEnh26*) في خلايا Sf9 تضمنت الخلايا المعدية بروتين يشفر له الفيروس المتحصل عليه من مصدرين مختلفين للفيروسات إما المعزولة من الـ *A. californica* nuclear polyhedrosis virus (*AcNVP*) أو من الفيروس *SeNPV* المعزول من *Spodoptera exigua* (Hubner)، ثم غذيت عليها يرقات الطور الثالث للدودة الخضراء *Spodoptera exigua*، بينت النتائج أن تغذية اليرقات على الخلايا المعدية بفيروس يحوي المورثة *AcEnh26* قد عزز الإصابة بالفيروس *AcNVP* والفيروس *SeNPV* بمقدار 20 ضعفاً أو 10 أضعاف على التوالي مقارنة مع الشاهد الذي أعدي بفيروس غير مؤشب (Du وThiem، 1997).

كما يتم إدخال المورثات من بكتريا *Bacillus thuringiensis* المسؤولة عن إنتاج سموم cry 1ac إلى فيروسات *Baculovirus* لتحسين أداءها في مكافحة الحشرات (Adang وزملاؤه، 1985؛ Schnepf، 1998).

وتبين بعض الأبحاث أنه يتم تحسين أداء *Baculovirus* بإدخال المورثات المسؤولة عن إنتاج منظمات النمو الحشرية (هرمون الانسلاخ وهرمون الحداثة) إليها (Swevers وآخرون، 2008)، تقوم هذه الهرمونات بدور كبير في نمو الحشرات وتنظيم طور السكون، والتكاثر والانسلاخ ما يجعلها من أهم وسائل مكافحة الحشرات (Berghiche وآخرون، 2008؛ Bonning وآخرون، 1997)، وتمتاز بفعاليتها وتخصصها في مكافحة الحشرات وعدم سميتها للثدييات والبيئة، واستخدامها مع الفيروسات كمبيدات حيوية يفتح مجالاً جديداً لإنتاج مبيدات حشرية متخصصة وصديقة للبيئة وغير سامة للإنسان. نقلت المورثات المشفرة لهرمون Juvenile esterase (JHE) وهرمون المدر للبول لفيروسات *Baculoviruses*، كما نقل المورث المشفر لأنزيم البروتياز الذي يسبب ثقب الغشاء الخلوي للحشرات ويسرع من عملية العدوى الجهازية إلى NPVs. وقد طورت الفيروسات المعبرة عن الهرمون الحشري ديورتيك (مدر للبول) والذي يؤثر في مورفولوجيا الحشرة. وقد طور (Hammock وزملاؤه، 1990) فيروس NPV مؤشب يعبر عن هرمون Juvenile esterase. إن مستويات مرتفعة من هرمون JHE يقلل من التغذية ويمنع تطور يرقة الحشرة. فيروسات *Baculoviruses* المعبرة عن JHE المصممة لتزيد من الهرمون بشكل مستقر ليصبح أكثر فاعلية من الهرمون الطبيعي. وتم الحصول على فاعلية متزايدة من خلال اختيار المورث الفيروسي egt المشفر لإنزيم UDP glycosyl transferase المطلوب لإنتاج العديد من الهرمونات الحشرية (Hammock وزملاؤه، 1990).

1-11- بعض التطبيقات لاستخدام الفيروسات الممرضة للحشرات في المكافحة الميكروبية للآفات الحشرية

أجريت الكثير من الاختبارات لاستخدام المبيدات الميكروبية الفيروسية في مكافحة الآفات الحشرية وجمعت في (A detailed continent-by-continent survey on the developmental) وذلك حسب (Hunter- Fujita وزملاؤه، 1998). وأهم الاختبارات:

- *Adoxophyes orana* GV اجري على هذا الفيرس اختبارات حقلية مكثفة وأنتجت مستحضرات تجارية واعتمد هذا الفيروس في سويسرا وألمانيا لمكافحة بعض ديدان الثمار (Andermatt،1986).

- *Agrotis segetum* GV and *Agrotis segetum* NPV أجريت اختبارات على هذه الفيروسات في بلدان عديدة من العالم لمكافحة الديدان القارضة *A. segetum* و*A. ipsilon* وكانت هناك نتائج ممتازة وأفضل من المكافحة الكيميائية، وسجل *Agrotis segetum* GV كمبيد حيوي لمكافحة الدودة القارضة في الدنمارك والاتحاد السوفيتي السابق (Huber، 1998؛ Lipa،1998).
- *Anticarsia gemmatalis* MNPV استخدم هذا الفيروس عل نطاق واسع في البرازيل لمكافحة دودة الفاصولياء المخملية *Anticarsia gemmatalis* في حقول فول الصويا (Moscardi، 1990a؛ Da Silva، 1992) ازدادت المساحة المعاملة بالفيروس من 2000 هكتـار خلال موسم 1982-1983 إلى 1 مليون هكتار خلال موسم 1989-1990 وكانت المعاملة بالفيروس مشابهة بفعاليتها لعدة معاملات بالمبيدات الكيميائية، وتم اختبار الفيروس مع جرعة منخفضة من المبيدات الكيميائية وكانت النتائج ممتازة، وتم التوصية بإتباع هذه الطريقة عندما تكون الإصابة شديدة ولا يمكن التغلب عليها باستخدام الفيروسات فقط (Moscardi وCorso، 1988؛ Da Silva، 1995).
- *Cydia pomonella* GV (CpGV) أجريت اختبارات مكثفة للفيروس لمدة 25 سنة في بلدان عديدة من العالم لمكافحة دودة ثمار التفاح *Cydia pomonella* على التفاح والأجاص والجوز، وقد سجل الفيروس CpGV كمبيد حيوي للحشرة في بلدان عديدة من أوربا (النمسا، فرنسا، ألمانيا، اسبانيا، هولندا، وغيرها). وسجل كمبيد حيوي في أمريكا عام 1995، وأجري على المبيد الحيوي اختبارات حقلية في أستراليا وكندا وتشيلي وغيرها، وقد أعطى المبيد فاعلية كبيرة في مكافحة الحشرة في المناطق الباردة حيث للحشرة جيل واحد في العام (Audemard وزملاؤه، 1992؛ Huber، 1998).
- *Autographa californica* MNPV كثير العوائل، تم اختباره ضد العديد من الآفات الحشرية مثل *H. virescens* و*T. n*. الفيروس AcMNP سجل كمبيد حيوي في الولايات المتحدة الأمريكية في 1994. أجري على الفيروس العديد من الاختبارات الحقلية في وسط أمريكا على مئات ألاف الهكتارات للملفوف البروكلي (Hunter-Fujita وزملاؤه، 1998)، في السنوات الأخيرة تم استخدام السلالات المعدلة وراثياً من AcMNP في المكافحة الميكروبية للآفات السابقة وقد شمل التعديل الوراثي تحسن سرعة القتل أو إضافة المورث المسؤول عن إفراز سموم الحشرات (Cory وزملاؤه، 1994؛ Black، 1997).
- *Heliothis* (*Helicoverpa*) sp. NPV تعد *Helicoverp azea* و *Heliothis virescens* تعد من أهم آفات القطن في جنوب شرق المناطق الجنوبية من الولايات المتحدة

الأمريكية، وآفات على الكثير من المحاصيل الزراعية في مناطق كثيرة من العالم وقد اعتمد *Heliothis* SNP كمبيد حيوي لمكافحة الآفات المشار إليها في عام 1975، وقدرت المساحة المعاملة بـ *Heliothis* SNPV بأكثر من مليون هكتار، وقد اتبع استراتيجية جديدة في مكافحة *Helicoverpa spp*. باستخدام *Heliothis* SNPV على الجيل الأول الذي يتواجد على العوائل العشبية مثل الجيرانيوم *Geranium dissectum* (Bell وHayes، 1994؛ Hayes وBell، 1994)، في مناطق كثيرة من العالم مثل الهند والصين وبعض الدول الأفريقية أجريت اختبارات كثيرة علىNPV *Helicoverpa armigera* لمكافحة *H. armigera* وتم استخدام وسائل أخرى مع الفيروس مثل Bacillus thuringiensis (Bt) وأعطت نتائج ممتازة في المكافحة الميكروبية للآفة (Zhang وزملاؤه، 1996؛ Kunjeku وزملاؤه، 1998).

- *Lymantria dispar NPV* استخدم على نطاق واسع في العالم لمكافحة فراشة الغجر *L. dispar*، وتم تسجيل هذا الفيروس كمبيد حيوي ميكروبي في الولايات المتحدة الأمريكية في 1978، وتم معاملة أكثر 11000 هكتار بهذا المبيد الحيوي الميكروبي (Lewis، 1981؛ Cunningham، 1998)، كما تم تسجيل هذا الفيروس كمبيد حيوي ميكروبي في الاتحاد السوفيتي السابق وأصبح من أهم المبيدات الحيوية الميكروبية لفراشة الغجر (Lipa ،1998).

- *Mamestra brassicae* NPV فيروس ذو مدى عوائلي واسع وتم اختبار هذا المبيد في مكافحة العديد من الآفات مثل فراشة الملفوف *Mamestra brassicae* والفراشة ذات المظهر الماسي *P. xylostella* وspp *Heliothis* و spp *Spodoptera* و*Trichoplusia ni* وغيرها (Doyle وزملاؤه، 1990) تم إنتاج مستحضرات تجارية من هذا الفيروس واعتمد كمبيد حيوي ميكروبي في فرنسا والاتحاد السوفيتي السابق (Hunter-Fujita وزملاؤه، 1998)

- *Neodiprion sertifer* NPV استخدم بنجاح في مكافحة دبور الصنوبر الأوربي *Neodiprion sertife*r (Cunningham وEntwistle،1981). أجريت اختبارات حقلية لهذا الفيروس NeseNPV كمبيد حيوي ميكروبي في كندا واسكندينافيا وبولندا والولايات المتحدة الأمريكية وبريطانيا والاتحاد السوفيتي السابق. وتم تسجيل المسحتضرات التجارية لهذا الفيروس في فنلندا في 1983، وفي بريطانيا (1985) وفي أمريكا (1983) وتوقف استخدامه في عام 1991.

1-12- تقنيات نشر الفيروسات

1-12-1- نشر حشرات مصابة/ حاملة للعدوى

هذه التقنية تستخدم لنشر الفيروسات التي من الصعب المحافظة عليها خارج العائل، تشير الدراسة أنه تم إدخال أعداد من الحشرات الكاملة لخنفساء وحيد القرن الآسيوي *Oryctes rhinoceros* مصابة بالفيروس O. rhinoceros non-occluded BV إلى عدد من جزر جنوب المحيط الهادي لتكون مصدرا للعدوى بهذا الفيروس حيث يمكن أن تبقى هذه الخنافس الحاملة للعدوى حية لعدة أسابيع تنقل العدوى خلال عملية التزواج أو لليرقات (Bedford، 1980)، مع الإشارة إلى أن الأفراد الحاملة للعدوى تتوقف عن الحفر في أشجار النخيل الموجودة عليها وتتوقف عن وضع البيض (Monsarrat وVyrunes، 1976).

1-12-2- الرش

قام Morris (1980) وSmith وBouse (1981) بوضع برامج لتصميم آلات خاصة لرش المبيدات الميكروبية حيث يستخدم لرش الفيروسات آلات رش المبيدات الكيميائية، وأشار Smith وBouse (1981) أنه يفضل استخدام آلات رش تتصف بقطرات قطرها يتراوح بين 100 إلي150ميكرون والني تحقق نسبة موت كبيرة لليرقات المعاملة.

1-12-3- الطعوم

تستخدم الطعوم الفيروسية في مكافحة الحشرات الحافرة والقارضة والتي تقضي وقت كبير على سطح النبات، واستخدمت هذه الطريقة بوضع الفيروس SNPV *Helicoverpa zea* كطعم في حبوب القطن وفول الصويا في مكافحة *H.zea* (Johnson وLewis،1982).

1-12-4- غمر الشتلات

أشار Ignoffo وزملاؤه (1983) انه يمكن إجراء المكافحة الميكروبية للآفات التي تهاجم الملفوف بغمر البادرات بالفيروس قبل الزراعة.

1-13- إنتاج الفيروسات الممرضة للحشرات

لإنتاج كميات كبيرة من فيروسات الحشرات يتم ذلك بعدوى الحشرات السليمة ومن ثم حصاد الفيروسات harvesting of virus، أما مخبريا فان زراعة الأنسجة ***in vitro*** لبعض خلايا عوائل فيروسات الـ *baculoviruses* لم تصبح تجارية بعد حيث أنها أكثر تكلفة من التقنيات ***in vivo***. (Shieh، 1989).

1-13-1- إنتاج الفيروسات *In vivo*:

هناك العديد من العوامل التي تؤثر على كمية الفيروسات المنتجة (Shapiro وزملاؤه، 1981؛ Shapiro، 1982؛ 1986). لإنتاج فيروسات الـ *Baculoviruses*، يتم تربية الحشرات

وبعدها تعدى بالفيروس وبعدها يتم حصاد الفيروسات قبل أو بعد الموت. ترتبط كمية الفيروسات المنتجة عادة بوزن اليرقة، وهكذا يجب أن تكون الشروط مثالية لتصل اليرقة للوزن الأكبر قبل موتها الناجم عن الإصابة الفيروسية (Shapiro ،1982). لاختيار الفيروس، يمكن الحصول عليه من الجمع الحقلي للحشرات الميتة بسبب الفيروس.(Smits وVlak ،1988b؛ Cherry وزملاؤه، 1997؛ Grzywacz وزملاؤه، 1997) أو بإنتاجه حقليا من قبل المزارع (Jones وزملاؤه، 1996). تحوي اليرقات المجموعة خليط من الفيروسات، بقايا حشرية، وأحياء دقيقة (بكتريا، فطر، بروتوزوا، الخ). يمكن أن تؤثر البقايا الحشرية والملوثات الأخرى مباشرة بمنع الإصابة جزئيا أو كليا بوساطة (التضاد antagonism أو التأزر synergism) أو من خلال التأثير على الحشرة المختبرة نفسها مسببة لها الموت، أو التعارض مع إصابة فيروسية أخرى أو من خلال التقليل أو الزيادة في تغذية اليرقة مما يؤدي للتأثير على امتصاص الفيروس هذه التأثيرات لا يمكن التنبؤ بها كما أنها متغيرة حسب نوع وكمية الملوثات (McKinleyوزملاؤه، 1989).

صممت العديد من تقنيات إنتاج الفيروس للتقليل من التلوث بالأحياء الدقيقة، مثلا جمع الحشرات المصابة وهي لا تزال حية يقلل من عدد الجراثيم التي تشكلها البكتريا مقارنة بجمع اليرقات بعد موتها. بشكل عام من المهم التقليل من مصادر التلوث من خلال التحضير المناسب لغذاء الحشرة، إنشاء مستوى عالي من الإجراءات الصحية والانتخاب والعناية بصحة الحشرات هذه الأشياء ضرورية لنمو الحشرات وإعطاء الإنتاج الأفضل من الفيروسات (McKinley وزملاؤه، 1989).

1-13-2- إنتاج الفيروسات *in vitro*

إن إنتاج الفيروسات *in vitro* مكلف جدا ، بالرغم من التطور السريع في هذا المجال في السنوات الأخيرة، هذا الإنتاج يتطلب عدوى سلالة خلوية حشرية قابلة للاصابة (susceptible insect cell line) حيث المتطلبات لنجاح هذا الإنتاج لخصها (Ignoffo وHink، 1971) بما يلي :1- تطوير خلايا حشرية خصبة ونشيطة مما يؤدي لتركيز كبير من الممرض. 2- توفر أوساط زرع بسيطة وغير مكلفة. 3- تطوير إجراءات الزرع وكفاءة، إجراءات الإنتاج الروتينية. هناك العديد من الخلايا الحشرية متوفرة اليوم مع أوساط زرع ومفاعلات حيوية bioreactors محسنة. في العديد من الأنظمة لا تزال المشكلة في انه تنتج فقط الفيروسات المتبرعمة (budded virus). أفضل مزارع الـ NPV هي التي تحقق اكبر عدد من الخلايا قادرة على السماح بتضاعف *Spodoptera* وNPVs *Heliothis* (Winstanley و Crook،1993). من الضروري في أنظمة زراعة الأنسجة توافر التعقيم لان مشاكل التلوث

تعيق إنتاج الفيروس *in viva* وهذا يتطلب بالطبع إجراءات تعقيم للتجهيزات المستعملة، بشكل مثالي معلق الفيروس المستخدم في الزرع يجب أن يكون منقى حتى لا تؤثر المواد أو باقي الأحياء الدقيقة الموجودة على حدوث العدوى. ومع ذلك، في عدد من الحالات الهدف هو لاختبار تأثير هذه المواد على الفاعلية الفيروسية مع وجود أيضا عينة فيروس المنقى في الاختبارات للمقارنة (King و Possee ، 1992؛ O'Reilly وزملاؤه، 1994).

وهناك عدد من تقنيات التنقية المتاحة وتختلف كفائتها وتأثيرها على فاعلية الفيروس:

- الترسيب بالأستون

طورت هذه الطريقة أولا على *Bacillus thuringiensis* (Dulmage وRhodes ، 1971)، ولكن تم تكييفها للاستخدام في وقت لاحق مع الفيروسات (Ignoffo وShapiro ، 1978).

حيث يضاف ببطء محلول من اللاكتوز المائي والأستون إلى معلق الفيروس مما يسبب انفصال الفيروس من المعلق يفلتر بعدها المعلق ويغسل بالماء المعقم تزيل هذه التقنية دهون وبروتينات الحشرة وتقتل بعض البكتريا الرمية.

- التثقيل متفاوت السرعات

هذه الطريقة وصفت من قبل Harrap وزملاؤه (1977) وHunter وزملاؤه (1984) عند الـ *Baculoviruses* وغالبا ما تستخدم هذه الطريقة لإنتاج معلق بنقاوة عالية، ولكنها أيضا تتسبب بضياع كمية من الفيروسات.

- التنقية الجزئية Semi-purification

هذه الطريقة يتم من خلالها التخلص من البقايا الحشرية وبعض الأحياء الدقيقة وهي مناسبة لإنتاج كميات كبيرة من الفيروس (Grzywacz وزملاؤه، 1997؛ Grzywacz، 1998).

1-14- المبيدات الحيوية الفيروسية التجارية

استخدمت الـ *Baculoviruses* كمبيدات حيوية متخصصة في مكافحة آفات الغابات وأشجار الفاكهة والمحاصيل الحقلية منذ مطلع القرن المنصرم في جميع انحاء وهي آمنة للفقاريات والأحياء المفيدة، وقادرة على البقاء في البيئة، كما يمكن إنتاج كميات كبيرة منها وتحضيرها وتعبئتها وتخزينها و تسويقها بطريقة مشابهة للمبيدات الحشرية الكيميائية (Possee وزملاؤه، 1997؛ Inceoglu وزملاؤه، 2006). الـ *Baculoviruses* أدوات مثالية في برامج الإدارة المتكاملة وحققت نتائج حقلية مهمة. واعتمد نحو 60 مبيد في مكافحة الآفات الحشرية في كل أنحاء العالم ويبين الجدول (5) أمثلة من المبيدات التجارية التي اعتمد في تركيبها على الـ *Baculoviruses*.

الجدول 5: أمثلة من المبيدات الحيوية الرئيسة الفيروسة التجارية

الحشرة العائلة	Baculovirus	المحاصيل المكافحة	الاسم التجاري	المرجع
Adoxophyes orana	GV	تفاح، اجاص	Capex 2	Dickler (1991)
Agrotis segetum	GV	خضار	Agrovir	Caballero وزملاؤه (1991)
Autographa californica	NPV	فصة، خضار	Gusano Biological, VPN-80TM	Thakore وزملاؤه (2006)
Mamestra brassicae	NPV	خضار	Mamestrin, Virin EKS	Thakore وزملاؤه (2006)
Cydia pomonella	GV	تفاح، اجاص، جوز	Cyd-X, Virosoft CP4, Madex, Granupom, Granusal, Carpovirusine, Virin-CyAp, Carposin, Carpovirus SC	Vincent وزملاؤه (2007)
Hyphantria cunea	NPV	غابات	Virin-ABB	Moscardi (1999b)
Anticarsia gemmatalis	NPV	صويا	Baculo-soja, Multigen, Baculovirus Nitral, Coopervirus SC, Prote	Moscardi (1999b)
Mamestra configurata	NPV	حبوب زيتية	Virosoft	Erlandson (2008)
Neodiprion lecontei	NPV	غابات	Leconti-virus	Erlandson (2008)
Neodiprion sertifer	NPV	غابات	Monisärmiövirus	Erlandson (2008)
Orgyia pseudotsugata	NPV	غابات	Biocontrol I, Virtuss	Erlandson (2008)
S. exigua	NPV	محاصيل حقلية	Spod-X, Vir-ex, Spod-X LC, Otienem-STM, Ness-A, Ness-E, DOA BIO V1,	Erlandson (2008)
Lymantria dispar	NPV	غابات	Disparvirus, Gypchek, Virin-ENSH,	Erlandson (2008)
Helicoverpa armigera	NPV	قطن، فليفلة، صويا، بندورة	Virin-HS, DOA BIO V2	Erlandson (2008)
H. zea	NPV	قطن، خضار	GemStar, Biotrol, Elcar	Erlandson (2008)
Spodoptera albula	NPV	محاصيل حقلية	VPN-82, VPN-Ultra	Jackson وزملاؤه (2008)
S. frugiperda	NPV	ذرة، رز، ذرة بيضاء	-	Escribano وزملاؤه (1999)
S.littoralis	NPV	قطن، ذرة	Spodopterin	Thakore وزملاؤه (2006)
Spodoptera litura	NPV	تبغ، خضار	DOA BIO V3	Kamiya وزملاؤه (2004)

15-1- الكشف عن الـ *Baculoviruses*

أدى التنوع الفيروسي إلى صعوبة تحديد وتصنيف النوع الفيروسي، ومن الصعوبة تحديد ما إذا كان الفيروس هو نوع أو سلالة، تكمن إحدى صعوبات تحديد الأنواع في التسميات المستخدمة وبطرائق متعددة ومختلفة. ولازالت الصفات الدقيقة لوضع الحدود التصنيفية غير واضحة تماما. تمتلك الفيروسات صفات كيمائية حيوية وبنيوية تشمل تركيب سلسلة sequence الجينوم الفيروسي، هذا الجينوم لا يتمثل بواسطة جزيء محدد من الـ DNA أو الـ RNA ، ولكنه يتمثل كمجتمع ديناميكي مختلف، متنوع موجود دائما في أية عزلة فيروسية viral isolate. هذا التعريف صحيح خاصة للفيروسات التي تملك جينوما من الـ RNA، ومن هنا كانت التسمية – الوصف تشبه نوع، حيث تتألف الأنواع من خليط من الجينومات (Domingo وزملاؤه، 1996). أما الفيروسات التي تملك جينوم DNA فهي أيضا قد تملك تنوعا كبيرا بالجينوم يضاف إلى ذلك الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيروس وما يملك هذا الفيروس من الملامح التي تصبح مرئية عندما تعدي عائل وتبدأ بالتضاعف، كالمدى العائلي host range، الأنسجة المصابة tissue tropism، الامراضية pathology، القدرة على إيقاف الموت الخلوي المبرمج ability to block apoptosis الخ...كل هذه الصفات معا مع بيئة ecology الفيروس سوف تدعم تمييز الأنواع. هذا يقود إلى نظرية الـ polytheist للأنواع الفيروسية (van Regenmortel، 1992)، حيث تحدد الأنواع كمجموعة صفات (بيوكيماوية وحيوية) (biochemical, biological) التي قد لا تكون مشتركة لدى كل الأنواع. تضاف صعوبة تسمية الفيروسات إلى صعوبة ربطها مع أنواع تم تمييزها وتصنيفها. تسمى الـ *Baculoviruses* تقليديا تبعا للعائل التي عزلت منه للمرة الأولى. هذا في بعض الأحيان معقد جدا بسبب أن فيروس معين قد يعدي أكثر من نوع حشري، ونوع حشري واحد قد يكون عائل لعدة فيروسات مختلفة. تقليديا يعتمد تصنيف الـ *baculoviruses* على القدرة الامراضية pathology. أحيانا ولكن لم تبرهن أية واحدة من هذه الصفات الخصائص المصلية serological، المدى العائلي، وشكل الفريون و شكل morphology الـ OBs، كفاءتها لوصف أنواع الـ *baculoviruses* وعلاقات القرابة التطورية (Herniou وJehle، 2007). ونظراً لأهمية شكل الأجسام الضمينة (OB) في تصنيف فيروسات *baculovirus* فقد هدف هذا البحث إلى: الكشف والعزل الجزئي للأجسام الضمينة (OB) للعزلات الفيروسية المستخلصة من الحشرات المصابة.

إن أول ما يميز الـ *Baculoviridae* هو التعرف على الجسم الضمين OB الذي يمكن بواسطته التفريق بين الفيروسات الحبيبية GV و الفيروسات النووية المتعددة السطوح NPV ويبلغ قياس

الاجسام الضمينة OB *Nucleopolyhedroviruses* 0.15 إلى 15µm (Hooft van Iddekinge وزملاؤه، 1983).ويمكن بالفحص البسيط بالمجهر الضوئي الكشف عن الجسم الضمين (Taverner وConnor، 1992؛ Carruthers وزملاؤه، 1988)، إذ يسمح هذا الفحص بالتعرف على الحشرات المصابة ثم استخدام العديد من التقانات التي تدل على نشاط الجزيئات الفيروسية وقدرتها على إحداث العدوى، ومن هذه الطرائق تغذية اليرقات على نباتات حاوية على الاجسام الضمينة الـ OB ثم عزل OB لاستخدامها في الدراسات البيولوجية الجزيئية، من ناحية أخرى يمكن أيضا التعرف على الوزن الجزيئي لكل من بروتين granulin وبروتين polyhedrin بوساطة اختبار الرحلان الكهربائي على هلامة البولي اكريلاميد (Hooft van Iddekinge وزملاؤه، 1983).

كما يعد التعرف على الوزن الجزيئي لـ DNA الفيروسي من الصفات المميزة للفيروسات العصوية *Baculoviridae* حيث يتم تحديد وتمييز أنواع و سلالات الـ *baculoviruses* بإنزيمات التقييد restriction endonuclease، وأشار Laitinen وزملاؤه (1996) أنه تم التعرف على مجموعة من العزلات من مناطق جغرافية مختلفة باستخدام أنزيمات restriction endonuclease، إن عدد أنزيمات restriction enzymes وتردد القطع يحدد درجة تمايز الطرز وراثية المختلفة genotypes. كل هذا مع الأخذ بعين الاعتبار إن استخدام بادئات نوعية لـ *baculoviruses* لتضخيم منطقة محافظ عليها من مورثة polyhedron تستخدم للكشف عن العديد من الأنواع المختلفة لـ NPVs يضاف إلى ذلك المورثات النوعية لفيروسات الحشرات التي عرفت سلاسل حموضها النووية Anagrapha falcifera NPV(، AcMNPV، AgMNPV، BmNPV، HzSNPV، OpMNPV، SfMNPV وSeMNPV) (De Moraes وMaruniak، 1997). سمح التقدم الذي حصل عالميا في البيولوجية الجزيئية بالكشف وتمييز الـ *baculoviruses* عن طريق الـ PCR وذلك بتضخيم منطقة على مورثة البوليهيدرين (De Moraes وMaruniak، 1997؛ Burden وزملاؤه، 2006)، كما يمكن التمييز بين الأنواع اوالسلالات باستخدام الـ restriction endonuclease analysis (Longworth وCunningham، 1968؛ Hughes وزملاؤه، 1993؛ Hughes وزملاؤه، 1997).

1-15-1 السلاسل النيكلوتيدية لجينوم *Baculoviridae*

ساعد التعرف على السلاسل النيكلوتيدية لجينوم *Baculoviridae* على فهم التنوع والتطور الكبير لفيروسات الـ *Baculoviridae*، وأدى ذلك إلى تصنيف هذه الفيروسات إلى أربعة أجناس *Alphabaculovirus* (Lepidopteran NPVs)، و

و (Lepidopteran GVs)*Betabaculovirus*
Dipteran) *Deltabaculovirus* و(Hymenopteran NPVs)*Gammabaculovirus*
(NPVs) (Jehle وزملاؤه، 2006).

تم الكشف عن هذا التنوع الذي يتعلق بارتباط الفيروس مع العائل عنه لأول مرة عند فيروسات تملك جينوم صغير (DNA صغيرة) مثل فيروسات الـ papilloma وفيروسات الـ polyoma(Soeda وزملاؤه، 1980).

تمت ملاحظة الاختلاف الكبير في المورثات عند NPVs التي تصيب Lepidoptera مما أدى إلى تقسيمها إلى مجموعتين ضخمتين تختلفان بشكل كبير في محتوياتهما من المورثات، فالمجموعة الأولى في NPV تستخدم المورثة GP64 من اجل حل وتخريب الغلاف اللبيدي البروتيني، أما المجموعة الثانية في NPV لاتملك GP64 وتستخدم بروتين اسمه F (Pearson وRohrmann ، 2002؛ Zanotto وزملاؤه، 1993).

هناك أيضا حوالي 11 مورثة محافظ عليها في المجموعة الأولى من NPV حسب (الجدول 6)

الجدول 6 المورثات المتعرف عليها في المجموعة الأولى من NPV

Ac1 (ptp), Ac16 (BV-ODV26), Ac27 (iap-1), Ac30, Ac42 (gta), Ac72, Ac73, Ac114, Ac124, Ac128 (gp64), Ac 132, Ac151 (ie2)

(Herniou وزملاؤه،2001)

يبين هذا الجدول أن الاختلاف أكثر تعقيدا من أن يتعلق فقط بالبروتين أو المورثة GP64 أكدت إن تحليل السلاسل النيكلوتيدية للمورثات الشائعة ضمن الـ *Baculoviridae* الاختلافات الكبيرة الموجودة بينها ومنذ هذا الوقت أصبحت صورة الفيروسات التي تصيب Lepidoptera أكثر وضوحا، لابد وفي كل الحالات من معلومات اكبر حول الفيروسات التي تصيب رتب حشرية أخرى كي يستوضح تطور فيروسات Lepidoptera (Herniou وزملاؤه، 2001).

2-15-1 مكونات الجينوم وتنظيمه

يوجد اختلاف كبير في جينوم *Baculoviridae* كما يبين (الجدول 7) (Lauzon وزملاؤه،2006) وفقا للوزن الجزيئي للمورثات.

الجدول. 7 الوزن الجزيئي*لمورثات* *Baculoviridae*

Virus type	**Name of Virus**	**Size (kb)**	**Orfs (>50 aa)**
Group I (12 members)	EppoMNPV	119	136
	AnpeNPV	126	145
	AcMNPV)	134	~150
Group II (16 members)	AdhoNPV	113	125
	SeMNPV	136	139
	AgseNPV	148	153
	LdMNPV	161	163
	LeseNPV	168	169
GV (10 members)	AdorGV	100	119
	CrleGV	111	124
	CpGV	124	143
	XecnGV	179	181
Hymenopt. NPV (3 members)	NeleNPV	82	89
	NeabNPV	84	93
	NeseNPV	86	90
Dipteran NPV (1 member)	CuniNPV	108	109

(Lauzon وزملاؤه، 2006)

تملك فيروسات Hymenoptera اصغر جينوم حوالي 80 kbp وبعكس ذلك فان جينوم GV هو101 kbp عند PlxyGV و 179 kbp عند XecnGV أما عند NPV فهي حوالي 130

kbp بينما المجموعة الثانية تملك تنوعا اكبر من 130 إلى 170 kbp وقد يعزى الحجم الصغير لجينوم فيروسات NPV عند Hymenoptera إلى أن دورة حياتها تتم فقط في خلايا المعي (Lauzon وزملاؤه، 2006)، بينما باقي *Baculoviridae* والتي تسبب عدوى جهازية فإنها تحتاج إلى هذه المورثات كي تنتشر ضمن الحشرات حيث يتضاعف الفيروس في أنسجة مختلفة. ويعزى حجم الجينوم الكبير عند المجموعة الثانية في NPV للـ Lepidoptera التي يتبع لها LdMNPV الذي يبلغ حجمه 161 kbp أي حوالي 30 kbp إضافي عن باقي جينوم NPV إلى تجمع مورثات متكررة تقود لتشكيل تحت وحدات إنزيم ribonucleotide reductase بالإضافة إلى مورثتين محرضتين للتضاعف (Kuzio وزملاؤه، 1999).

1-15-3- تنظيم الجينوم والمناطق الوراثية المتشابهة homologous sequences

بالإضافة إلى المورثات التي تقود لتشكيل البروتينات التي تدخل في حياة الفيروس وإنتاج أجيال جديدة من الفيروسات، يوجد مورثات أخرى ضمن جينوم *Baculoviridae* تحوي مناطق متماثلة فعند AcMNPV فان المناطق المتماثلة (*hrs*) Homologous regions المكونة من 70-bp أي أن *hrs* تتكرر ضمن 8 مواقع على الجينوم فهي متنوعة جدا ومرتبطة بقوة مع الجينوم وبذلك يمكن القول أن هناك تماثل بسيط بين هذه المواقع في الفيروسات المختلفة، ومناطق *hrs* لها دور في تنظيم كل من نسخ وتضاعف DNA عند *Baculoviridae* (Guarino وزملاؤه، 1986؛ Pearson وRohrmann، 1995).

1-15-4- المورثات المحافظ عليها conserved genes عند عائلة *Baculoviridae*

إن دراسة الجينوم لفيروسات مختلفة من *Baculoviridae* أكد وجود 11 مورثة في كل جينوم للفيروسات التابعة لعائلة *Baculoviridae* والتي تم دراسة سلاسل الحموض النووية لها كما في (الجدول 8) (Chen وThiem، 1997).

إن نصف هذه المورثات يرمز لبروتينات مرتبطة مع الفريون ولها دور في بنية الكابسيد وفي بنية غلاف occlusion-derived virus وعدوى اليرقات، أما المورثات الأخرى لها دور في تضاعف DNA وفي عملية النسخ المتأخرة جداً لـ DNA (Leisy وزملاؤه، 1984).

الجدول 8 مورثات محافظ عليها عند *Baculoviridae* .

Conserved genes in baculovirus
AcMNPV ORF
Ac6 Lef2
Ac14 Lef1
Ac22 PIF2
Ac40 p47
Ac50 LEF-8
Ac54 vp1054
Ac62 LEF9
Ac65 DNA pol
Ac66
Ac68
Ac77 VLF-1
Ac80 gp41
Ac81
Ac83 VP91
Ac89 VP39
Ac90 LEF-4
Ac92 p33
Ac95 DNA helicase
Ac96
Ac98
Ac99 LEF-5

Ac100 p6.9
Ac109
Ac115 PIF-3
Ac119 PIF-1
Ac133 Alkaline nuclease
Ac138 p74
Ac142
Ac143 odv-E18
Ac144
Ac148 odv-e56

Chen وThiem، 1997

إضافة إلى الشكل المميز للاجسام الضمينة occlusion body في الفيروسات الحبيبية GV مقارنة مع NPV *Nucleopolyhedroviruses* واختلاف الطراز الممرض لـ GV مقارنة بـ NPV فان تضاعفها لا يتم في النواة وان وجود مورثات نوعية خاصة بها يعكس هذه الاختلافات إذ يوجد عدد من المورثات الموجودة عند كل الـ GV، 14 مورثة من هذه المورثة خاصة بـ GVs بينما الأخرى موجودة عند كل لـGV وعند بعض الـ *baculoviruses*. الأخرى مثال عن هذه المورثة DNA ligase و helicase-2 homologs موجودة عند كلا الـ GV وNPV (Ko وزملاؤه، 2000).

الفصل الثاني

2- مواد البحث وطرائقه :

2-1- تقصي الفيروسات الممرضة للحشرات Entomopathogenic viruses من عائلة *Baculoviridae* على حشرات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera في بعض حقول المحاصيل في المنطقة الجنوبية من سورية

أُجري مسح حقلي متكرر خلال الأعوام 2009-2010 شمل المسح الحقلي بعض الحقول في محافظتي ريف دمشق ودرعا. وتمت هذه الزيارات في أشهر آذار، أيار، تشرين أول، تشرين ثاني، وكانون الأول، وتمت الزيارة مرتين لكل موقع في كل موسم، بحيث تمت زيارات مواقع الدراسة في الثلث الأول والثالث من كل شهر في الموسم الأول، وفي الثلث الثاني والأخير من كل شهر في الموسم الثاني. تم جمع يرقات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera من حقول أختيرت عشوائياً في كل جولة، وشملت فراشة واي الفضية *Autographa(Plusia) gamma* (Noctuidae)، وأبو دقيق الملفوف *Pieris rapae* (Pieridae)، ودودة ورق العنب *Hyles lineata* (Sphingidae)، ودودة اللوز الأمريكية *Helicoverpa(Heliothis) armigera* (Noctuidae)، وأبو دقيق الخبازي *Vanessa cardui* (Nymphalidae).

جمعت يرقات فراشة واي الفضية *A. gamma* من نباتي الخبيزة *Malva sylvestris*، والنجيل *Agropyron repens* L. من بعض حقول دوما (ريف دمشق)، وجمعت يرقات أبو دقيق الملفوف *P. rapae* من نباتات الملفوف *Brassica oleracea* والقرنبيط *Brassica oleracea* var. *botrytis*، من بعض حقول الملفوف والقرنيط من ريف محافظة درعا، أما يرقات دود ورق العنب فجمعت من بعض بساتين الكرمة في سعسع وجديدة عرطوز (ريف دمشق ودوما)، وتم جمع يرقات دودة اللوز الأمريكية *H. armigera* من بعض حقول البندورة والفليفلة من ريف محافظة درعا، وبالنسبة ليرقات أبو دقيق الخبازي فقد جمعت من باتي الخبيزة والنجيل من منطقتي جديدة عرطوز وسعسع ودوما من محافظة ريف دمشق. لم يتم إجراء أي مكافحة ميكروبية في جميع حقول وبساتين الدراسة التي تم اختيارها على الإطلاق.

جمعت عينات اليرقات من 100 نبات اختيرت بشكل عشوائي من كل موقع، وضعت كل يرقة داخل علبة بلاستيكية أبعادها (15 × 7 سم)، وكتب على العلبة كل المعلومات اللازمة (النبات، مكان الجمع، تاريخ الجمع، مكان وجود اليرقة على النبات، الحالة العامة لليرقة، الاستجابة للمؤثرات الخارجية وغيرها)، نقلت هذه العينات إلى دائرة المتطفلات الحشرية في

مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية في كلية الزراعة، في جامعة دمشق، حيث تم فرز اليرقات إلى يرقات سليمة، ويرقات تبدو عليها أعراض إصابة بمرض فيروسي، ويرقات متطفل عليها أو مفترسة، ويرقات ميتةٍ لأسباب أخرى لم تُحدد. تم عزل اليرقات التي تبدو عليها أعراض الإصابة بمرض فيروسي وفُحصت هذه اليرقات باستخدام المجهر الضوئي وسُجلت الأعراض الظاهرية للمرض وحُسبت نسبة الموت الناتجة عن الإصابة الفيروسية وفق المعادلة التالية :

$$\text{النسبة المئوية للموت الناتج عن إصابة فيروسية} = \frac{\text{عدد اليرقات التي تبدي أعراض إصابة بممرض فيروسي}}{\text{عدد اليرقات الكلي المجموعة}} \times 100$$

2-2- تقصي الفيروسات الممرضة للحشرات على حشرة دودة لوز القطن الأمريكيـــــــة (*Helicoverpa Heliothis*) *armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) في بعض حقول القطن ودورهافي تنظيم أعداد حشرة دودة اللوز الأمريكية في بعض حقول القطن في محافظة الحسكة

نفذ البحث في موسم 2011 تم جمع العينات من حقول قطن في منطقتي المالكية والقامشلي من محافظة الحسكة، مساحة كل حقل نحو 10 دونم تقع المالكية في أقصى شمال شرقي سوريا، تبعد عن مركز المحافظة حوالي 160 كيلومترا يبلغ الارتفاع عن سطح البحر (525 م)، المناخ السائد حار صيفا بحيث تصل درجة الحرارة في شهري تموز وآب إلى حوالي 50 مْ، بارد شتاءً حيث تنخفض درجة الحرارة إلى ما دون الصفر بعدة درجات، معدل الهطول السنوي 400 – 600 ملم، تتميز المنطقة بعوامل مناخية متماثلة باستثناء التغير في الهطول المطري، وتقع منطقة القامشلي في وسط المسافة بين مدينتي المالكية والحسكة، تبعد عن مركز المحافظة حوالي 85 كيلومتراً، تطل عليها من الشمال جبال طوروس، يبلغ الارتفاع عن سطح البحر (452 م)، المناخ السائد حار صيفاً بحيث تصل درجة الحرارة في شهري تموز وآب إلى حوالي 54 مْ، بارد شتاءً حيث تنخفض درجة الحرارة إلى ما دون الصفر بعدة درجات، معدل الهطول السنوي 300 – 400. أخذت العينات من موقعي الدراسة ابتداء من بداية شهر حزيران وحتى نهاية شهر أيلول، أجريت في الحقول المختارة المكافحة الحيوية فقط لديدان جوز القطن باستخدام متطفل البيض *Trichogramma principum* ومتطفل اليرقات *Bracon brevicornis* ، ولم تطبق أي مكافحة كيميائية أو ميكروبية على الإطلاق، جمعت يرقات دودة لوز القطن من 100 نبات اختيرت بشكل عشوائي من كل حقل، بحيث تم جمع العينات من كل مواقع الحقل،وتم جمع العينات من حقول أختيرت عشوائياً في كل جولة. وضعت كل يرقة داخل علبة بلاستيكية أبعادها

(15 × 7 سم)، وكتب على العلبة كل المعلومات اللازمة (النبات، مكان الجمع، تاريخ الجمع، مكان وجود اليرقة على النبات، الحالة العامة لليرقة، الاستجابة للمؤثرات الخارجية وغيرها)، وأخذت هذه اليرقات إلى المختبر حيث تم فرز اليرقات إلى يرقات سليمة، ويرقات تبدو عليها أعراض إصابة بمرض فيروسي، ويرقات متطفل عليها أو مفترسة، ويرقات ميتةٍ لأسباب أخرى لم تُحدد. تم عزل اليرقات التي تبدو عليها أعراض الإصابة بمرض فيروسي وفُحصت هذه اليرقات باستخدام المجهر الضوئي وسُجلت الأعراض الظاهرية للمرض وحُسبت نسبة الموت الناتجة عن الإصابة الفيروسية وفق المعادلة التي ذكرت سابقا

2-3- العزل الجزئي لـ polyhedral (تحضير المعلق الفيروسي لإجراء العدوى):

من أجل عزل الفيروسات من اليرقات التي تبدي أعراض الإصابة تم استخدام طريقة El -Salamouny (1998) حيث تم تحضين اليرقات التي تبدو عليها أعراض إصابة بمرض فيروسي درجة حرارة 4 مْ لمدة أسبوعين، ثم هُرست اليرقات المريضة ونُقعت في محلول TEC buffer بمعدل 500 ميكرولتر/ يرقة، ثم صفي المزيج ثلاث مرات بوساطة قطن طبي، واستُخدم المعلق في تغذية اليرقات دون تثفيل .

2-4- طريقة تغذية اليرقات (نقل العدوى)

أُستخُدمت طريقة (Ankersmit وزملاؤه، 1977) بتغذية اليرقات حيث استخدمت أوراق نباتية صغيرة من الخس، والملفوف، والكرمة بعد أن تم تلويثها بالمعلق الحاوي على الأجسام الضمينة (OB) وذلك بتغطيسها في المعلق الذي تم تحضيره سابقاً ، بالاشارة إلى وجود شاهد عومل نفس المعاملة عدا التغذية على غذاء ملوث للتأكد أن سبب الموت هو الغذاء الملوث وليس عوامل أخرى، نُقلت اليرقات السليمة ذات الأعمار المتفاوتة (يرقات فتية) وذلك بعد تصويمها حوالي 24 ساعةً إلى الأوراق الملوثة بالفيروس لتتغذى عليها لمدة يوم كامل ضمن شروط التربية الخاصة من حرارة (21- 25 مْ)، وإضاءة (16: 8)، ورطوبة نسبية (70%)، في مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق، وتم مراقبتها بشكل يومي وتسجيل التغيرات الظاهرية . مع العلم أنه تم وضع كل يرقة بشكل مستقل (تجنباً لظاهرة الافتراس الذاتي) أثناء فترة التجويع، بلغ عدد اليرقات المعداة 5 يرقات لكل نوع حشري، بالإضافة إلى الشاهد5 يرقات لكل نوع حشري أيضاً. تم استخلاص الأجسام الضمينة منها بعد ظهور أعراض الإصابة عليها، وإعادة هذه التجربة وذلك حسب فرضية كوخ (العزل، التعريف، العدوى، إعادة العزل، وإعادة التعريف) للتأكد من القدرة الإمراضية والتأكيد أن سبب الإصابة فيروسي.

2-5- دراسة الأجسام الضمينة (OB)s بالفحص بالمجهر الضوئي

استخدمت طريقة (Martignoni وزملاؤه، 1968) لعزل البوليهيدرا من اليرقات التي تبدي أعراض الإصابة حيث نقعت اليرقات ضمن محلول TEC buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 mM cysteine) وطحنت بواسطة الهاون، بعدها نقلت العينات إلى أنبوب معقم 1.5 مل واجري لها تثفيل بسرعة 145g لـ 4 دقائق عند درجة حرارة 4 م°، ثم اخذ المحلول الطافي إلى أنبوب جديد وثفل مرة أخرى بسرعة 14000g لـ 15 دقائق عند درجة حرارة 4 م°، يؤخذ الراسب ويحل في ا مل ماء مقطر ومعقم حيث يحتوي هذا المحلول على الأجسام الضمينة.

فُحصت العينات التي تم عزلها من اليرقات المصابة حقلياً واليرقات المُعداة التي أبدت أعراضاً ظاهرية (500 عينة)، للكشف عن الأجسام الضمينة (OB) ودراسة تركيزها عن طريق شرائح العد Haemocytometer (Wigley، 1980) وتمّ هذا الفحص باستخدام المعلق الفيروسي في الماء المقطر والمعقم أو بعد إجراء 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 وتتركها لمدة 15 دقيقة، ثم فحصها عند التكبير 400x مرة باستخدام المجهر الضوئي حيث تبدو الـ OB عديمة اللون .

2-6- طريقة العد: وذلك وفق الخطوات التالية:

- مُزجت العينات بوساطة الـرجاج ثم وُضع 10 ميكروليتر من المعلق في نصفي شريحة العد.
- غُطيت الشريحة بالساترة ثم ضُغطت بلطف حتى التثبيت، وقد تم التأكد من التثبيت الصحيح برؤية حلقات نيوتن تحت الغطاء مباشرة.
- تم الانتظار مدة 10-15 دقيقة للسماح للجزيئات بالترسب في قعر الحفرة الميكرونية.
- تم عد عشرة مربعات كبيرة من كل حفرة ميكرونية يحوي كل مربع كبير 16 مربعاً صغيراً على جانبي شريحة الـ Haemocytometer. حيث تم استخدام التكبير x400 للعد.

تم التأكد من عدم تكرار عد نفس البوليهيدرا، كما تم عد البوليهيدرا المتواجدة على الجوانب اليمينية وفي أسفل المربع ومن ثم إحصاء عدد البوليهيدرا في 1 مل حسب المعادلة التالية:

عدد البوليهيدرا في 1 مل = k * x/n * d

حيث d= عامل التمديد، x = عدد البوليهيدرا، n = عدد المربعات المعدودة، k = ثابت = 2.5^3 × 10^{-7} سم$^{-3}$.

2-7- تحليل بروتينات البوليهيدرا Protein analysis

تم تحليل البروتينات بواسطة الرحلان على هلامة البولي اكريلاميد 10 % حسب (Laemmli، 1970)، حيث تم تحضير العينات (البوليهيدرا المعزولة) بغليها 3 دقائق في محلول منظم مكون من:pH 6.8، (0.0625M) – Tris – HCl و 5% β-mercaptoethanol و Sodium dodecyl sulfate SDS 2% و10% Glycerol و0.02% bromophenol blue. تم ترحيل العينات المحضرة سابقا والشاهد ومؤشر الوزن الجزيئي الـ proten broad range molecular markers على الهلام بوجود محلول الرحلان هو (0.05M) – Base – Tris وM 0.38 Glycine و pH 8.7, 0.1% SDS. عرضت الهلامة لتيار كهربائي 25 فولت لمدة خمس ساعات. بعد انتهاء الرحلان الكهربائي تم صبغ الهلامة طول الليل باستخدام Coomassie brilliant blue R 0.1% و 50% Isopropanol و7.5% Acetic acid تم إزالة الصبغ بغسل الهلامة عدد من المرات المتتالية باستخدام 10% isopropanol، 5% acetic acid وتم تصويره.

2-8- استخلاص DNA الـ *Baculovirus*

تم عزل الحموض النووية الفيروسية من البوليهيدرا (200 عينة) المعزولة كما ذكر سابقا باستخدام:

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

حسب تعليمات الشركة المصنعة وفق المراحل التالية:

1-طحنت اليرقات المصابة في ماء مقطر ومعقم .

2- أضيف µl600 من المحلول المفكك للخلايا Solution Lysis Nuclei وحضنت عند درجة حرارة 65 م° لمدة 15 دقيقة.

3- أضيف µl3 من إنزيم الـ RNase Solution RNase A وحضنت عند درجة 37 م° 15 دقيقة.

- بردت الأنابيب عند درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.

5- أضيف µl200 من محلول ترسيب البروتينات Protein Precipitation Solution ترسيب البروتين بمحلول ترسيب البروتين.

6-أجريت عملية تثفيل لمدة 3 دقائق على سرعة g16000 للحصول على راسب.

7-اخذ الطافي الحاوي على الـDNA وتم التخلص من الراسب.

8-تم إضافة 600µl من الـ isopropanol الخلط بلطف عند درجة حرارة الغرفة.

9-تم التثفيل لمدة دقيقة على سرعة 16000g.

10-أزيل الطافي واضيف للراسب 600µl من 70% ethanol.

11-تم التثفيل لمدة دقيقة للتخلص من الايتانول.

12-أضيف 100µl من محلول حل الـ DNA (DNA Rehydration Solution) ثم وضع عند درجة حرارة 65 م° وحرك بشكل منتظم لمدة ساعة.

13-حفظ الـ DNA عند درجة حرارة 2–8 م°

2-9- تحديد نوعية DNA الـ *Baculovirus*

أخذ 10 ميكروليتر من مستخلص الـ DNA وأضيف له صبغة (Blue/Orange 6X Loading Dye) وأجري الرحلان الكهربائي ضمن هلامة اغاروز بتركيز 1% مضاف لها الـ الايتيديوم بروميد باستخدام المحلول المنظم (TBE) بتركيز 1x (10x EDTA 7.4g، Tris-Base 108g، Boric acid 55g) لمدة نصف ساعة على 80 v ثم تم فحص الهلامة تحت الأشعة فوق البنفسجية (Ultra violet) باستخدام جهاز Gel Documentation System والتي تسمح برؤية حزم الحموض النووية الـ DNA المعزول من حشرات فراشة واي الفضية *Autographa gamma* ، أبو دقيق الملفوف *Pieris rapae* (Pieridae)، دودة ورق العنب *lineata Hyles* ، دودة اللوز الأمريكية *Helicoverpa armigera* ، أبو دقيق الخبازي *Vanessa cardui*. كذلك تم تحديد تركيز الـ DNA باستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer على طول موجة 260 نانومتر، حيث كل وحدة من الكثافة الضوئية الـ optical density (OD) عند طول موجة 260 نانومتر تعادل تركيز DNA قدره 50 µg/ ml كما تم تحديد تلوث الحموض النووية بالبروتينات على طول موجة 280 نانومتر حيث أن العينة التي تحقق نسبة 280/260 اعلى من 1.8 تعتبر نقية، بعد ذلك اجري تخفيف الـ DNA إلى التركيز 10 نانوغرام/ ميكروليتر.

2-10- الكشف عن مورثة البوليهيدرين باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR : polymerase chain reaction

تم الكشف عن مورثة البوليهيدرين *polyhedrin* (*polh*) باستخدام البادئات

TCG ATT TAA TAC GCC GGG CCG-3-_5 ,polhF

TGC CAG ATTACT CGT ACC GGC CG-3-_5 ,polhR

حيث يسمح هذا الشفع من البادئات بتضخيم قطعة بوزن جزيئي 750-bp (Christine وزملاؤه، 2007).

ويتضمن تفاعل الـ PCR بحجم 50 ميكروليتر المكونات التالية:

- 25 ميكروليتر go taq green master mix 2x
- 5 ميكروليتر polhF
- 5 ميكروليتر polhR
- 50 نانوغرام DNA (5 ميكروليتر) عينة أو ماء خالي من النيوكلياز بالنسبة للشاهد
- 10 ميكروليتر ماء خالي من النيوكلياز لإكمال حجم التفاعل إلى 50 ميكروليتر

اجري التفاعل بتطبيق البرنامج التالي:

1- فصل سلسلتي الـ DNA (Denaturation) عند درجة حرارة 94 م° لمدة 5 دقائق.

2- فصل سلسلتي الـ DNA (Denaturation) عند درجة حرارة 94 م° لمدة 30 ثانية.

3- ارتباط البادئات بالـ DNA (Annealing) عند درجة حرارة 60 م° لمدة ا دقيقة.

4- البلمرة أو الاستطالة (Extension) عند درجة حرارة 68 م° حيث يتم مضاعفة سلسلة الـ DNA بواسطة إنزيم بلمرة الدنا DNA polymerase تكرر المراحل (2-4) 35 دورة.

5- Final extension عند درجة حرارة 68 م° لمدة 7 دقائق.

تحفظ نواتج الـ PCR عند درجة حرارة 4 م° لحين إجراء الرحلان الكهربائي.

2-11- شجرة القرابة والبصمة الوراثية restriction enzymes profiling

يعتمد تصنيف الفيروسات وتمييزها إلى سلالات على عدد من التقانات منها تحديد تتابع النيكلوتيدات أو البصمة الوراثية باستخدام تقانة amplified fragment length (AFLP) polymorphism ، RFLP وغيرها. إن طريقة الـ Restriction fragment (RFLP) length polymorphism التي تعتمد على استخلاص الـ DNA الفيروسي بشكل نقي ومن ثم تقطيعه بأنزيمات restriction enzymes وترحيله على هلامة الاغاروز لتحديد الحزم أو إجراء الـ Southern blot . يقطع الـ DNA الفيروسي في عدة مناطق ، حيث أن الـ DNA الفيروسي من كل نوع فيروسي أو من كل سلالة يملك تتابع مختلف من النيكلوتيدات وبالتالي

نحصل على قطع متعددة الأوزان الجزيئية خاصة بكل سلالة او نوع، تسجل النتائج بالترقيم الثنائي (1) للحزمة الموجودة و(0) للحزمة المفقودة ومن ثم نستخدم البيانات لرسم شجرة القرابة الوراثية باستخدام برنامج المعلوماتية TREECON (1.3b) (Nei و Li , 1979) تم استخدام الأنزيمات *Hin*dIII و *Eco*RI و*Pst*I حيث تم استخدام (ا وحدة انزيمية لكل 1 ميكروغرام DNA) وتم استخدام 5 ميكروغرام من الـ DNA وفق تعليمات الشركة الصانعة (Promega) وحضنت العينات عند درجة حرارة 37 م°لمدة 24 ساعة في الحاضنة. وبعد انتهاء التحضين تم ترحيل نواتج التفاعل بعد إضافة محلول التحميل الملون على هلامة اغاروز 1%وتيار 50 فولت لمدة ساعتين.

2-12- تقييم فاعلية بعض عزلات الفيروسات المعزولة من يرقات فراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* وعلى يرقات فراشة حفار ساق التفاح *Zeuzera pyrina*.

2-12-1- العزلات المستخدمة في الاختبارات

تم تقييم فاعلية ثلاث عزلات فيروسية وهذه العزلات هي: 223 من يرقات *V. cardui* المصابة بالفيروس وجمعت من جديدة عرطوز في عام 2011 ، و 166 من يرقات *A. gamma* بالفيروس وجمعت من بعض الحقول في دوما في عام 2010، و7 من يرقات *V. cardui* في عام 2010 المصابة بالفيروس، وهذه اليرقات جمعت من بعض حقول سعسع. بينت النتائج التفوق للعزلة الفيروسية 166 على العزلة 7 ظاهريا والعزلة 223 معنوياً عند مستوى احتمال 1%. كما تم اختبار فاعلية العزلة 166 وذلك على يرقات العمر الرابع لدودة الشمع الكبيرة على كافة الأعمار اليرقية الخمسة الأولى لحشرة حفار ساق التفاح، وبينت النتائج أن حساسية اليرقات للفيروسات تقل كلما كبرت اليرقات في العمر، وكانت اعلى نسبة مئوية للموت في العمر اليرقي الأول 93.33%، وأقلها 6.66% في العمر اليرقي الخامس. اعتبرت كل عزلة معاملة وتضمنت كل معاملة 30يرقة بالعمر الرابع.

حيث حفظت العزلات ضمن شروط حرارة 25 ± 2 م° ورطوبة نسبية 65 - 70%

2-12-2- اليرقات المختبرة:

تم الحصول على يرقات حفار ساق التفاح .*Zeuzera pyrina* L من مركز إكثار الأعداء الحيوية في اللاذقية، (الشكل.9)

الشكل .9 يرقات حفار ساق التفاح .*Zeuzera pyrina* L التي تم الحصول عليها من مركز إكثار الأعداء الحيوية في اللاذقية

وعلى يرقات فراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* التي تم الحصول عليها من مخبر الأعداء الحيوية غير الحشرية في مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية في كلية الزراعة، جامعة دمشق.

2-12-3- الاختبارات الحيوية

تم تقييم فاعلية بعض العزلات المختبرة على يرقات حشرة فراشة الشمع الكبرى في العمر اليرقي الرابع، حيث تم اختبار كل عزلة على 30 يرقة، بحيث اعتبرت كل عزلة معاملة، وكل يرقة مكرر في المعاملة، وضعت كل يرقة في وعاء بلاستيكي خاص معد لعملية التربية تحتوي على قطعة من البيئة المغذية (25 غ) والمعاملة بـ 250 ميكرولتر من المعلق الفيروسي من كل عزلة، وبعد التغذية على قطعة الغذاء الملوث قدم لليرقات دوريا غذاءً طازجاً وغير ملوث وتم اخذ القراءات بشكل دوري.

كما تم اختبار يرقات من العمر اليرقي الاول لغاية العمر اليرقي الخامس لحشرة حفار ساق التفاح ، وتم تلويث غذاء هذه اليرقات بـ 250 ميكرولتر من معلق هذه العزلة، وتم اعتبار كل عمر يرقي معاملة، وتضمنت كل معاملة 30 يرقة .

أجريت الاختبارات في ظروف المختبر (عند درجة حرارة 20 م° وفترة اضاءة (14:10) في مخبر الاعداء الحيوية غير الحشرية في مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية في كلية الزراعة في جامعة دمشق.

2-13- التصميم الإحصائي

صممت التجربة بطريقة التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD) في تصميم التجارب، حللت النتائج بطريقة تحليل التباين ONE WAY ANOVA وتمت المقارنة بين المتوسطات باستخدام اقل فرق معنوي (LSD) واختبار T-test عند مستوى دلالة 5% و1% ، واعتمد التحليل الإحصائي ببرنامج SPSS 15.

الفصل الثالث

3- النتائج والمناقشة

3-1- تقصي الفيروسات الممرضة للحشرات Entomopathogenic viruses من عائلة *Baculoviridae* على حشرات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera في بعض حقول المحاصيل في المنطقة الجنوبية من سورية

اختلفت أعراض الإصابة التي تم ملاحظتها على اليرقات المريضة وذلك حسب نوع اليرقة ومرحلة العدوى، وأهم الأعراض التي تم مشاهدتها على اليرقات المريضة هي تغير في اللون حيث لوحظ على اليرقات المريضة لأبو دقيق الملفوف *P. rapae* المظهر الزيتي اللماع (الشكل.10- A)، وتغير لون يرقات دودة ورق العنب إلى البني، والتغير في اللون يعود لامتلاء خلايا البشرة والجسم الدهني بالأجسام الضمينة (OB)، تميزت بعض اليرقات المصابة بالقوام الهش والمنتفخ، وكان من السهولة تقطيع جسمها، نتيجةً لتحلل الأنسجة الداخلية تحت تأثير النشاط الفيروسي وتحطيم الخلايا، لوحظت بعض اليرقات متحللةً قليلا أوكثيراً ويسيل من جسمها سائل قاتم اللون ذي رائحة مميزة حتى أن بعضها كان ينفجر بمجرد لمسها مع خروج سائل مائي بلون أخضر، كما في يرقة دودة ورق العنب *H.lineata* (الشكل.10 - B) لوحظت أنه بعض اليرقات كانت متحللةً تحللاً كاملاً وبقاياها موجودة على أوراق النبات العائل كما في يرقة دودة لوز القطن الأمريكية *H. armigera*، كما لوحظت أن بعض اليرقات في أعلى قمة النبات كانت متعلقةً بأرجلها ورأسها نحو الأسفل كما في يرقات أبو دقيق الخبازي *V. cardui* (الشكل.10 - C) ، كما كانت حركة كل اليرقات المصابة بطيئةً. تتوافق هذه النتائج مع ما وجده (Song وزملاؤه ، 2008 وCherry وزملاؤه، 1997).

C B A

الشكل. 10. يوضح الاعراض على اليرقات المصابة

A: المظهر اللماع الزيتي لليرقات أبو دقيق الملفوف *P.rapae* B: انتباج وانتفاخ يرقات دودة ورق العنب *H. lineate* C : تعلق اليرقات في أعلى النبات عند أبو دقيق الخبازي *V. cardui*

اختلفت النسبة المئوية لموت اليرقات المدروسة باختلاف نوع اليرقة وأحياناً باختلاف العائل النباتي لليرقة نفسها، ويبين الجدول (9) النسبة المئوية لموت اليرقات المدروسة نتيجة الإصابة بفيروس ممرض للحشرات في مناطق الدراسة.

الجدول.9. النسبة المئوية لموت بعض يرقات رتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera نتيجة الإصابة بفيروس ممرض للحشرات

دودة لوز القطن الأمريكية *Helicoverpa armigera*			
العائل النباتي	العدد الكلي لليرقات	عدد اليرقات الميتة نتيجة الإصابة الفيروسية	% للموت
البندورة	41	4	9.75 [a]
الفليفلة	28	2	7.1 [a]
T test	p>0.005		
دودة ورق العنب *Hyles lineata*			
الكرمة	87	11	1.3
أبو دقيق الملفوف *Pieris rapae*			
الملفوف	103	16	15.5[a]
القرنيط	36	4	11.1[b]
T test	p<0.005		
فراشة واي الفضية *Autographa gamma*			
الخبيزة	145	99	69.3[a]
النجيل	58	35	60.3[b]
T test	p<0.005		
أبو دقيق الخبازي *Vanessa cardui*			
النجيل	156	49	31.4[a]
الخبيزة	133	33	31.7[a]
T test	p>0.005		

القيم المتبوعة بأحرف متشابهة عمودياً لا يوجد بينها فروق معنوية على مستوى احتمال 0.05

3-1-1- نتائج العدوى المخبرية:

تم نقل الإصابة إلى اليرقات عن طريق تغذية كل منها على المعلق الفيروسي المعزول من الحشرة المصابة التابعة لنفس النوع ، وقد أصيبت كل اليرقات التي تغذت على عذاء ملوث وماتت ولم يلاحظ اية يرقة ميتة من الشاهد. ويبين الجدول (10) أهم نتائج هذه العدوى.

الجدول.10. أعراض الإصابة بالفيروسات الممرضة المعزولة من بعض يرقات حشرات تابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة

اسم الحشرة	نتائج العدوى
فراشة واي الفضية *Autographa gamma*	تعذرت اليرقات بعد يوم واحد وفشلت في الخروج من طور العذراء (الشكل. 11- C)
أبو دقيق الملفوف *Pieris rapae*	بدأ ظهور القيء والإسهال بعد 3 أيام ومن ثم توقفت عن التغذية بدءاً من اليوم الرابع وماتت في اليوم العاشر (الشكل. 11- B)
دودة ورق العنب *Hyles lineata*	توقفت اليرقات عن التغذية بعد يوم واحد من العدوى، بعد 4 أيام ظهر على اليرقات تغير لوني وأصبحت مائلة للبني مع انتفاخ اليرقات ومن ثم ظهرت الإفرازات مع نقص الاستجابة للمؤثرات وماتت اليرقات بعد 8 أيام (الشكل. 11- A)
دودة اللوز الأمريكية *Helicoverpa armigera*	تعذرت اليرقات بعد 5 أيام وفشلت في الخروج من طور العذراء
أبو دقيق الخبازي *Vanessa cardui*	توقفت اليرقات عن التغذية وظهر تباطؤ في استجابتها للمؤثرات الخارجية وذلك بعد يوم واحد من التغذية على النبات الملوث وفي اليوم الثاني ظهرت الإفرازات ثم حصل موت مفاجئ لليرقات بعد 5 أيام (الشكل.11- D).

D C B A

الشكل .11 .أعراض الإصابة بالعدوى الاصطناعية على اليرقات المدروسة
A: العدوى المخبرية على دودة ورق العنب *H. lineata* B: العدوى المخبرية على ابودقيق الملفوف *P. rapae* C: عذراء فاشلة بالخروج عند الديدان القياسية *A. gamma* D : العدوى المخبرية على ابو دقيق الخبازي *V. cardui*

بينت هذه الدراسة احتمال انتشار الإصابة بفيروسات الجنس (NPV) *Nucleopolyhedroviruses* في كل من يرقات فراشة واي الفضية *A. gamma*، وأبو دقيق الملفوف *P. rapae*، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H.armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui* التي تم جمعها حقلياً، كما كشفت الدراسة الأولية للأعراض الظاهرية على أنها معيار هام يمكن استخدامه في التوجه الأولي لدراسة نوع الإصابة الفيروسية على هذه الحشرات التي تم ذكرها سابقاً. وهذا يتطابق مع (Liu وCarstens،1993).

أشار المسح الحقلي أيضاً إلى انتشار هذه اليرقات المصابة على محاصيل ومزروعات مختلفة وذلك يتعلق بنوع الحشرة والمحصول، و كانت الإصابة أكثر شدةً على فراشة واي الفضية المنتشرة على الخبيزة (68.3%) والنجيل (60.3%) في ريف دمشق الجدول (5) ، كما لوحظ ارتفاع النسبة المئوية لموت اليرقات نتيجة الإصابة بمرض فيروسي في ريف دمشق ودرعا ربما يعزى لوجود اليرقات في الأعمار بين الثالث والخامس، وتتيح هذه النتائج إمكانية الاستخدام المباشر للحشرات المصابة كمبيدات حيوية حشرية. تتطابق النتائج مع (Fauquet وزملاؤه، 2005؛ Liu وCarstens، 1993).وبالاعتماد على التصنيف الحديث للـ *Baculoviruses* (Carstens وBall، 2009) وحسب أعراض الإصابة والامراضية يمكن اعتبار هذه الفيروسات التي تم الكشف عنها تابعة للجنس *Alphabaculovirus* وهذا يتطابق مع الكثير من الأبحاث التي أشارت إلى أن يرقات الأنواع المدروسة تتطفل عليها فيروسات عصوية من الجنس *Alphabaculovirus* (Liu، وCarstens،1993؛ Fauquet وزملاؤه، 2005؛ Yang وزملاؤه، 2001).

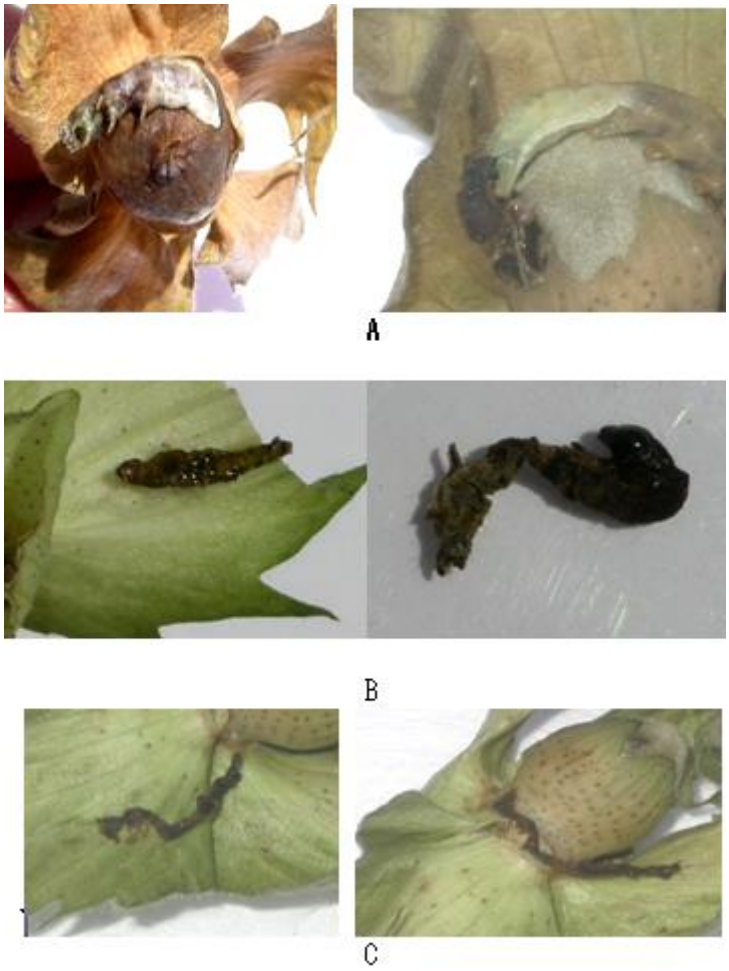
2-3- تقصي الفيروسات الممرضة للحشرات على حشرة دودة لوز القطن الأمريكيـــــــة (*Helicoverpa Heliothis*) *armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae)

في بعض حقول القطن ودورهافي تنظيم أعداد حشرة دودة اللوز الأمريكية في بعض حقول القطن في محافظة الحسكة

3-2-1- نتائج المسح الحقلي وجمع العينات

اختلفت أعراض الإصابة التي تم ملاحظتها على اليرقات المريضة وذلك حسب عمر اليرقة، وأهم الأعراض التي تم مشاهدتها على اليرقات المريضة هي تغير في اللون حيث لوحظ على اليرقات المريضة تحول لونها إلى اللون البني، والتغير في اللون يعود إلى امتلاء خلايا البشرة والجسم الدهني بالأجسام الضمينة (OBs) وهذا يتوافق مع (Goulson, 1997 ؛Federici، 1997)، تميزت بعض اليرقات المصابة بالقوام الهش والمنتفخ وذلك بسبب امتلاء كامل جسمها بالأجسام الضمينة ، وكان من السهولة تقطيع جسمها،نتيجة لتحلل الأنسجة الداخلية تحت تأثير النشاط الفيروسي وتحطيم الخلايا، لوحظت بعض اليرقات متحللة قليلا أوكثيراً يسيل من جسمها سائل داكن ذي رائحة مميزة، لوحظت بعض اليرقات متحللة تحللا كاملا وبقاياها موجودة على أوراق النبات الموجودة عليه، إذ يقود الفيروس لتشكيل انزيمين هما الـ cathepsin والـ chitinase تحفزان تحلل جسم اليرقة، ويقودان تحللها liquefaction (Hawtin وزملاؤه، 1995؛ Slack، 1995).إذ تموت الحشرات المصابة بعد 4 أيام إلى 3 أسابيع بعد الإصابة، اعتمادا على نوع الفيروس وعوامل البيئة، مثل الحرارة. كما لوحظت بعض اليرقات في أعلى قمة النبات متعلقة بأرجلها ورأسها نحو الأسفل، كما كانت حركة اليرقات المصابة والحية بطيئة .(الشكل 12.)

تتوافق هذه النتائج مع (Cherry وزملاؤه، 2000؛ Song وزملاؤه، 2002)، كما تتوافق مع (Evans وزملاؤه، 1981) الذي أشار إلى توقف اليرقة عن التغذية في المرحلة المتأخرة من العدوى وتتميز هذه المرحلة بإنتاج كمية مضاعفة من الاجسام الضمينة الـ OBs التي تملأ أخيرا كل جسم اليرقة (تشكل حتى 10^{10} 1.5 x OBs/larva أو 25% من كامل الكتلة الحية)



الشكل. 12

أعراض الإصابة المختلفة بالفيروسات الممرضة للحشرات على يرقات دودة اللوز الأمريكية في حقول القطن في محافظة الحسكة

A:. اليرقات المصابة هشة ومنتفخة وكان من السهل تقطيع أجسادهم. B: يرقات متحللة مع رائحة مميزة نتيجة لتدهور الأنسجة الداخلية تحت تأثير النشاط الفيروسي. C: يرقات متعلقة بأقدامها على أوراق النبات والرأس إلى الأسفل

وصلت النسبة المئوية لموت يرقات دودة اللوز الأمريكية الناتج عن مرض فيروسي في منطقة المالكية 9.9% وفي منطقة القامشلي 11.6%، وكان الفرق بين نسبة الموت الناتجة عن إصابة فيروسية في منطقة القامشلي ومنطقة المالكية معنويا عند مستوى احتمال 5% ($p<0.005$). الجدول (11).

الجدول.11. النسبة المئوية لموت يرقات دودة اللوز الأمريكية نتيجة الإصابة بفيروس ممرض للحشرات في بعض حقول القطن في منطقتي المالكية والقامشلي موسم 2011

المنطقة / البيان	المالكية	القامشلي
العدد الكلي لليرقات	454	447
عدد اليرقات الميتة نتيجة الإصابة الفيروسية	45	52
% للموت	%9.9	%11.6

اختلفت النسبة المئوية لموت اليرقات الناتج عن إصابة فيروسية خلال أشهر الدراسة في منطقتي الدراسة، وتراوحت النسبة في منطقة المالكية بين 1.5% و14.3%، وبين 2.9% و14.7% في منطقة القامشلي، وكانت أعلى نسبة للموت في شهر أب في المنطقتين، 14.5 في منطقة المالكية و14.7% في منطقة القامشلي كما يظهر بالجدول (8) إن ارتفاع النسبة المئوية لموت اليرقات نتيجة الإصابة بمرض فيروسي في شهر أب وفي المنطقتين ربما يعود إلى وجود مصادر العدوى (الاجسام الضمينة) الناتجة عن تحلل اليرقات المصابة خلال فترة الدراسة السابقة) ولوجود اليرقات في الأعمار بين الثالث والسادس، وهذا يتوافق مع (Wang وGranados، 2000؛ Shapiro وArgauer،1997؛ Hegedus وزملاؤه، 2009؛ Haas-Stapletonوزملاؤه، 2003).

وكان الفرق في نسبة الموت بين شهري أب وتموز ظاهريا على مستوى 5% وبين أب وبقية الاشهر معنويا على مستوى 0.05، ويبين الجدول (12) الفروقات الإحصائية بين النسب المئوية للموت المختلفة خلال أشهر الدراسة في المنطقة الواحدة وبين المنطقتين. لم يختلف الأمر في منطقة القامشلي حيث تميز شهر أب بأعلى نسبة مئوية للموت لليرقات ناتجة عن الإصابة بالفيروس 14.7% وأتى بعده شهر تموز 13.5% وكان الفرق بينهما ظاهريا على مستوى ثقة 0.05 . وعند مقارنة أشهر الدراسة بين المنطقتين بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فرق معنوي في جميع الأشهر لمنطقة القامشلي على منطقة المالكية على مستوى إحصائي 0.05.

الجدول. 12. النسبة المئوية لموت يرقات دودة اللوز الأمريكية نتيجة الإصابة بفيروس ممرض للحشرات في بعض حقول القطن في منطقتي المالكية والقامشلي خلال أشهر الدراسة موسم 2011

المنطقة / الشهر	المالكية			القامشلي		
	عدد اليرقات	عدد اليرقات الميتة(فيروس)	% للموت	عدد اليرقات	عدد اليرقات الميتة(فيروس)	% للموت
حزيران	66	1	1.5±4.77 $^{b\,B}$	34	1	2.9±5.24^{bA}
تموز	268	29	10.8±4.77^{aB}	208	28	13.5±5.24^{aA}
أب	98	14	14.3±4.77^{aB}	136	20	14.7±5.24^{aA}
أيلول	22	1	4.5±4.77^{bB}	69	3	4.34±5.24^{bA}
المجموع	454	45	9.9	447	52	11.6
(LSD			5.82			6.1

تشير اختلاف الأحرف الصغيرة إلى وجود فروق معنوية بين الأشهر في الموسم نفسه للمنطقة نفسها ، وتشير اختلاف الأحرف الكبيرة إلى وجود فرق معنوي بين عامل الموت نفسه في الشهر نفسه بين المناطق المختلفة في الموسم نفسه عند مستوى احتمال (5%)، $p<0.005$.

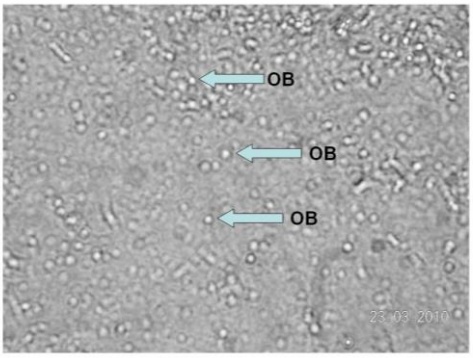
تتشابه هذه النتائج إلى حد ما مع بعض الأبحاث التي أشارت إلى أهمية العوامل الممرضة للحشرات وخاصة الفيروسية منها في تنظيم أعداد الآفة من خلال النسب المئوية للموت المرتفعة لليرقات الفتية (Kunjeku وزملاؤه، 1998)، ومن النتائج السابقة ومن أعراض الإصابة يمكن الاعتقاد أن الفيروس الذي يصيب ديدان لوز القطن الأمريكية هو فيروس تابع لعائلة الـ *Baculovirus* والجنس *Alphabaculovirus*

وقد أشار Karim وزملاؤه (2000) أن الفيروس الذي يصيب دودة لوز القطن الأمريكية في حقول القطن في الصين هو الفيروس (HaSNPV) وأشار إلى أهمية هذا الفيروس في المكافحة الميكروبية لدودة لوز القطن الأمريكية *H. armigera* في حقول القطن والبندورة في الصين، وبين Pokharkar وChaudhary في عام 2001 أن الفيروس (HaSNPV) يستخدم لمكافحة حشرة دودة لوز القطن الأمريكية في حقول القطن في الهند. أشار Zhang في عام 1989 أن يرقات حشرة دودة لوز القطن الأمريكية *H. armigera* الفتية كانت مصابة بنسبة كبيرة في حقول القطن في مقاطعة Hubei في الصين.

3-3- الكشف والعزل الجزئي للأجسام الضمينة (OB) للعزلات الفيروسية المستخلصة من الحشرات المصابة.

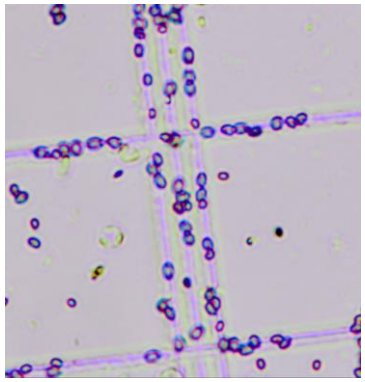
3-3-1- الفحص بالمجهر الضوئي والعد بواسطة شريحة Haemocytometer:

بينت دراسة المعلق الفيروسي المعزول من يرقات الحشرات المصابة حقلياً وجود الأجسام الضمينة (OB) في كلٍ من حشرات فراشة واي الفضية *A. gamma*، وأبو دقيق الملفوف P.rapae، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H. armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui* التي تم جمعها حقلياً وكذلك في الحشرات المعداة، ولم تظُهر الأجسام الضمينة OB في اليرقات السليمة المُرباة مخبرياً أو في اليرقات التي تم جمعها والتي لا تُبدي أعراضاً ظاهرةً وبدت البوليهيدرا كبللورات واضحة عند التكبير 400x (الشكل.13).



الشكل 13. كريستالات البوليهيدرا اللامعة باستخدام تكبير 400x بالمجهر الضوئي بدون تلوين

و عند استخدام شرائح العد (الشكل.14) لعينات مأخوذة من أبو دقيق الخبازي كان عدد البوليهيدرا / 2.7×10^6 يرقة بينما كان العدد 3.1×10^4 عند أبو دقيق الملفوف و 2.2×10^5 عند دودة ورق العنب و 1.6×10^5 عند دودة اللوز الأمريكية و3.6×10^4 عند فراشة واي الفضية. ولم تعط العينات (الاجسام الضمينة) التي تم صبغها بأزرق البروموفينول أي لون وهذا ما يؤكد على أن هذه الفيروسات تابعة لجنس *Nucleopolyhedroviruses* (Fuxa وزملاؤه، 2002).



الشكل 14. البوليهيدرا عند التكبير 400x بالمجهر الضوئي على شريحة العد بعد تلوينها بـأزرق البرومو فينول

بينت هذه الدراسة انتشار الإصابة الفيروسية بجنس *Nucleopolyhedroviruses* في كل من يرقات فراشة واي الفضية *A. gamma* ، وأبو دقيق الملفوف *P. rapae* ، ودودة ورق العنب

H. lineata، ودودة اللوز الأمريكية *H.armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui* التي تم جمعها حقلياً، أكدت الدراسة للأجسام الضمينة (OB) التي عُزلت من اليرقات الميتة أو المصابة على أن هذه الفيروسات تابعة لجنس *Nucleopolyhedroviruses* وذلك بدراستها باستخدام المجهر الضوئي (Hooft van Iddekinge وزملاؤه،1983) ولعدم تلونها أثناء الصبغ بـأزرق البروموفينول (Fuxa وزملاؤه، 2002).

إن دراسة أعداد الأجسام الضمينة التي تم عزلها من يرقات الحشرات السابقة المتواجدة حقلياً بوساطة شرائح العد بينت التركيز الكبير لهذه الأجسام الضمينة للفيروسات في اليرقات المصابة حقلياً، ويُعدُّ هذا دليلاً أكيداً أخراً على الانتشار الواسع جداً لـ *Nucleopolyhedroviruses* على حشرات رتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera في سورية، كما تم من خلال استخدام شرائح العد التعرف على أن أكبر تركيز للأجسام الضمينة (OB) كان في يرقات أبو دقيق الخبازي *V.cardui* (2.7×10^6).

وعلى الرغم من أن الانتشار الوبائي الحقلي كان أكثر وضوحاً على حشرة واي الفضية والتي كان عدد الأجسام الضمينة (OB) في المعلق المستخلص منها (3.6×10^4 polyhedra) أقل منه عند أبو دقيق الخبازي، و يُعدُّ هذا عاملاً هاماً في هذه الدراسة لاختيار الفيروسات الأكثر شراسة لاستخدامها في المكافحة الحيوية. حيث ذكر كل من (Shapiro وزملاؤه، 1982؛ MartignoniوIwai، 1986؛ Stairs، 1990) بإمكانية تعديل المدى العائلي أو أقلمة الـ *Baculoviruses* مع عوائل بديلة مما يحسن من إنتاج الفيروس والتخفيف من التكاليف وتحسن غلة الفيروس وزيادة شراسته.

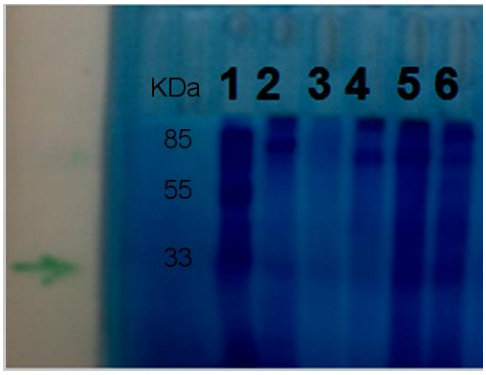
وبالاعتماد على التصنيف الحديث للـ *Baculoviruses* يمكن اعتبار هذه الفيروسات التي تم الكشف عنها تابعة لمجموعة *Alphabaculovirus* وهي الفيروسات التي تشكل الأجسام الضمينة التي تم عزلها جزئياً وفحصها بالمجهر الضوئي وتصيب فقط الحشرات التابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera (Carstens وBall، 2009).

3-3-2- تحديد الوزن الجزيئي للبوليهيدرا

أظهرت الـ OBs المنقى التي اجري لها رحلان كهربائي باستخدام هلامة البولي اكريلاميد 10 % بعد الصبغ بـ Coomassie brilliant blue R أن وزنها الجزيئي 30 kDa في كل من يرقات فراشة واي الفضية *A. gamma* ، وأبو دقيق الملفوف *P. rapae* ، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H.armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui* الشكل 3 وهذا يتوافق مع الدراسات المرجعية حيث ذكر (Stiles وزملاؤه، 1983) أن الوزن الجزيئي عند LdMNPV وBmNPV تبلغ 30 kDa أما عند AcMNPV تبغ 31 kDa كما ذكر

Kumar وزملاؤه، 2007 ا أن الوزن الجزيئي للبوليهيدرا في فيروس *Ha*NPV بلغ 29 kDa وانه لا داعي لتركيز عالي منها لكي تظهر ضمن الهلامة، وهذا بالتالي يؤكد إصابة الحشرات المذكورة بالـ *Baculoviruses* ويعزز ما تم الكشف عنه بالكشف بالمجهر الضوئي من حيث اعتبار هذه الفيروسات التي تم الكشف عنها تابعة لمجموعة *Alphabaculovirus* وهي الفيروسات التي تشكل الأجسام الضمينة التي تم عزلها جزئياً وفحصها بالمجهر الضوئي وتصيب فقط الحشرات التابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera (Carstens وBall ،2009). وكما ذكر أيضا أن الوزن الجزيئي للـ polyhedron هو 25-33 kDa Hooft van Iddekinge) وزملاؤه، 1983).

كما ويؤمن هذا الاختبار طريقة للتشخيص بالإصابة بالفيروس دون الحاجة لتركيز عالي من الجسيمات الضمنية Kumar وزملاؤه، 2007 وهنا نذكر مالهذا البروتين من أهمية في جعل الفيروس مقاوما للظروف البيئية غير المناسبة خارج العائل ولعدة سنوات (Shieh ، 1989) مما يعزز استخدامه في المكافحة الحيوية.

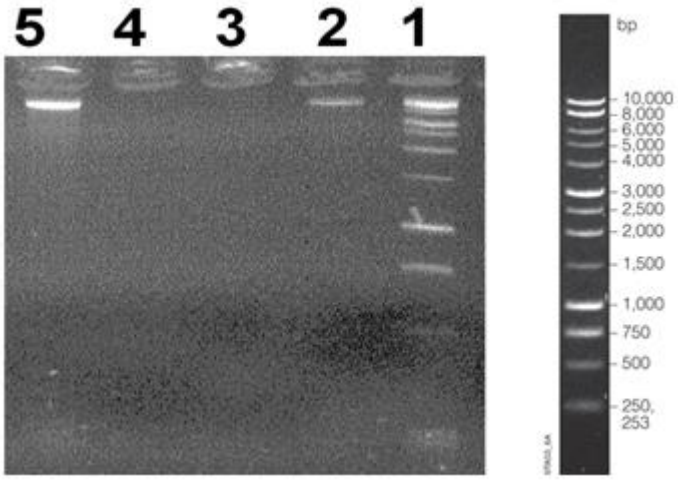


الشكل. 15 هلامة البولي اكريلاميد للبوليهيدرين. العمود الأول protein molecular weight marker،العمود الثاني البوليهيدرين المعزولة من الديدان القياسية ، العمود الثالث البوليهيدرين المعزولة من دودة اللوز الأمريكية ، العمود الرابع البوليهيدرين المعزولة من أبو دقيق الخبازي ، العمود الخامس البوليهيدرين المعزولة من دودة ورق العنب ، العمود السادس البوليهيدرين المعزولة من أبو دقيق الملفوف

3-3-3- التشخيص الجزيئي للـ *Baculovirus*

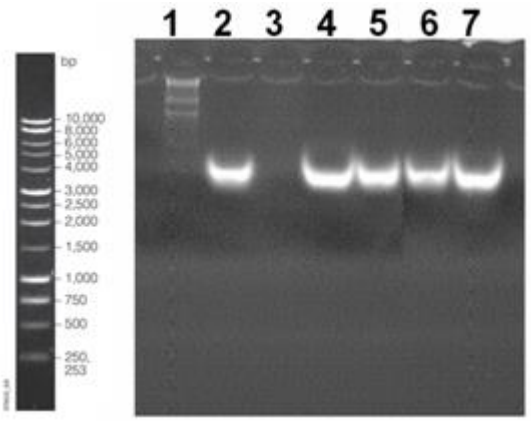
أظهرت نتائج عزل الحمض النووي من العينات المدروسة والمعزولة من يرقات فراشة واي الفضية *A. gamma* ، وأبو دقيق الملفوف *P. rapae* ، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H.armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui* انه حمضا نوويا ذو وزن جزيئي كبير وذلك في كل العينات المدروسة (الشكل 16) وهذا يتوافق مع الدراسات التي ذكرت أن للفيروس جينوما كبير يتراوح وزنه الجزيئي من 90-160 kbp (Murphy و زملاؤه، 1995)، كما ذكر أن الوزن الجزيئي للحمض النووي في LdMNPV أكثر من 160

kbpبينما يبلغ عند *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) و *Bombyx mori* SNPV(BmSNPV) و*Orgyia pseudotsugata* MNPV (OpMNPV) اقل من ذلك بـ kbp 29. يفيد الـ DNA في الاختبارات الوراثية حيث أن تصنيف هذه الفيروسات ويحتاج تحديد أنواعها وسلالاتها إلى دراسة بيولوجية جزيئية لحموضها النووية مثل اختبار الـ PCR وrestriction analysis و أو Trzebitzky probe hybridizations (Barber وزملاؤه، 1993؛ Doyle وزملاؤه، 1990؛ Doyle وHirst، 1991؛ Bensimon وزملاؤه، 1987؛ Hughes وزملاؤه، 1997؛ Entwistle وزملاؤه، 1993)



الشكل. 16 هلامة الاغاروز الذي يظهر نوعية DNA المعزول من الـ *Baculovirus* حيث العمود الأول استخدم فيه 1kp DNA ladder أما الأعمدة 2 و5 تظهر الـ DNA المعزول من الحشرات المصابة فراشة واي الفضية *A. gamma* ، وأبو دقيق الملفوف *P. rapae* على التوالي

أما فيما يتعلق بالتشخيص الجزيئي الدقيق للفيروسات باستخدام اختبار الـ PCR وبادئات متخصصة بالكشف عن مورثة البوليهيدرين، أظهرت النتائج للحمض النووي المعزول من يرقات فراشة واي الفضية *A. gamma* ، وأبو دقيق الملفوف *P. rapae* ، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H.armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui* والتي تم اختيارها بعد رؤية OB في الحشرات المدروسة نتائج ايجابية في البادئ المدروس وهذا يثبت إصابة اليرقات بفيروس الـ *Baculoviruses* ويتفق مع أبحاث (Christin، وآخرون، 2007) حيث يضخم البرايمر القطعة ذات الوزن الجزيئي bp-750 الشكل. 17، والتي تشكله الفيروسات التي تنتمي إلى جنس *Alphabaculovirus* .وهي الفيروسات التي تشكل الأجسام الضمينة متعددة السطوح (Quant-Russell وزملاؤه، 1987؛ van der Wilk وزملاؤه، 1987).



الشكل. 17 الكشف عن المورثة *polh* باختبار الـ PCR: العمود الأول 1kp DNA Ladder العمود 3 الشاهد (ماء معقمة) الأعمدة 2، 4، 5، 6، 7 نتائج الـ pcr للـ DNA المعزول يرقات فراشة واي الفضية *A. gamma* ، وأبو دقيق الملفوف *P. rapae* ، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H.armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui* على التوالي.

وكما هو معلوم فان هذه المورثة تقود لتشكيل بروتين البوليهيدرين (Vlak وRohrmann، 1985)

كما أن هذه المورثة ليست ضرورية لتضاعف الـ DNA أثناء عدوى الخلايا (Smith وزملاؤه، 1983؛ Vlak وزملاؤه، 1990)، هذا وقد تم دراسة هذه المورثة من قبل (Rohrmann وBeaudreau ، 1977؛ Leisy وزملاؤه، 1986a؛ Leisy وزملاؤه، 1986b)

وهذه النتائج تعزز ما تم الكشف عنه بالكشف بالمجهر الضوئي من حيث اعتبار هذه الفيروسات التي تم الكشف عنها تابعة لمجموعة *Alphabaculovirus* وهي الفيروسات التي تشكل الأجسام الضمينة التي تم عزلها جزئياً وفحصها بالمجهر الضوئي وتصيب فقط الحشرات التابعة لرتبة حرشفيات الأجنحة Lepidoptera. ويعزز أيضا ما تم الكشف عنه بدراسة الوزن الجزيئي للـ polyhedron ذو الوزن الجزيئي 30 كيلودالتون، هذا بالإضافة إلى التأكيد على ما تم ذكره بالفصل الثاني، من حيث إمكانية كون هذه الفيروسات تتبع للـ *Baculovirus* وذلك من خلال الأعراض التي أبدتها اليرقات المصابة والتي تم ذكرها في الفصل الثاني.

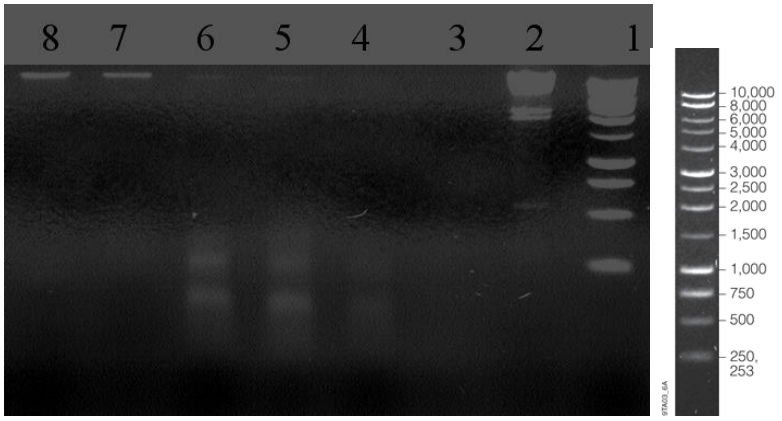
إن عزل البوليهيدرا ودراسة العزلات الفيروسية المحلية الأكثر شراسةً يدخل ضمن البحث المستمر عن عزلات أو أنواع فيروسية متواجدة محلياً تملك شراسةً عاليةً تفوق ما هو متواجد عالمياً، مما له أهمية فائقة لاستخدامه كمبيد حيوي (Smits وزملاؤه، 1987؛ Falcon وBlack، 1978، وزملاؤه, 1997 ؛ Tanada، 1964).

4-3-3 – نتائج شجرة القرابة والبصمة الوراثية restriction enzymes profiling

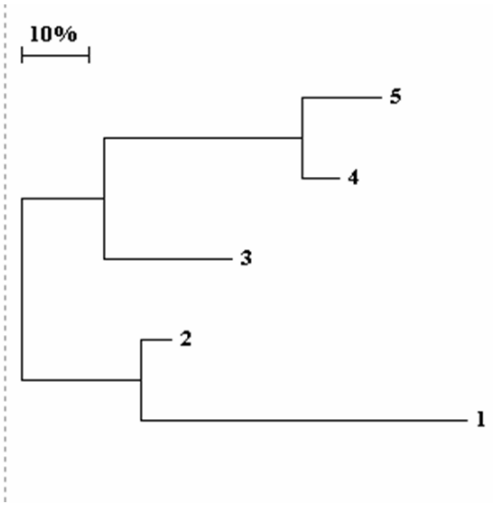
أظهرت نتائج تقطيع الـDNA للفيروسات المعزولة من يرقات فراشة واي الفضية *A. gamma* ، وأبو دقيق الملفوف *P. rapae* ، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H.armigera*، وأبو دقيق الخبازي *V.cardui* وجود حزما مختلفة ضمن هلامة الاغاروز(الشكل 17)، وعند استخدام البيانات لرسم شجرة القرابة الوراثية باستخدام برنامج المعلوماتية TREECON (1.3b) الشكل.19. وجد أن العينات المدروسة انقسمت إلى مجموعتين المجموعة الأولى: الفيروسات المعزولة من يرقات فراشة واي الفضية (ريف دمشق) ودودة اللوز الأمريكية (الحسكة)، أما المجموعة الثانية: تشمل الفيروسات المعزولة من أبو دقيق الخبازي (ريف دمشق)، ودودة ورق العنب (ريف دمشق) وأبو دقيق الملفوف (درعا).

وقد يعزى الاختلاف الى اختلاف العائل (الحشرة) (Murillo وزملاؤه، 2001). ولتأكيد ذلك يتطلب اجراء دراسات على عدد اكبر من العينات تنتمي لنفس العائل ومن نفس المنطقة الجغرافية

كما ذكر (Herniou وJehle، 2007) صعوبة تمييز هذه الفيروسات وتصنيفها حيث قد يعدي الفيروس أكثر من حشرة أو تصاب الحشرة الواحدة بأكثر من فيروس، وبالتالي لا يمكن البت هل هذا الفيروس هو نوع ام سلالة عائدة لنفس النوع الفيروسي.



الشكل .18. البصمة الوراثية للفيروسات على الحشرات باستخدام انزيم HindIII حيث العمود الأول: Leader 1kp، العمود الثاني:Lambda DNA / Hind 111 marker ، العمود الثالث شاهد، العمود الرابع عينة المعزولة من فراشة الواي الفضية ، العمود الخامس العينة المعزولة من دودة اللوز الأمريكية ، العمود السادس العينة المعزولة من أبو دقيق الخبازي ، العمود السابع العينة المعزولة من دودة ورق العنب، العمود الثامن العينة المعزولة من أبو دقيق الملفوف.



الشكل.19.يوضح شـجرة القرابـة الوراثيـة بـدون جـذر لعـزلات مختلفـة مـن الـ *Baculovirus* انشـئت الشـجرة باستخدام برنامج TREECON (1.3b) حسب Nei and li (1979) وبطريقة Neighbor-joining حيث الـ Bootstrap للشجرة عبارة عن 100 مكرر حيث 1: عينـة المعزولـة مـن يرقـات فراشـة واي الفضـية، 2: العينة المعزولة من دودة اللوز الأمريكية، 3: العينة المعزولة من أبو دقيق الخبازي، 4: العينة المعزولـة مـن دودة ورق العنب، 5: المعزولة من أبو دقيق الملفوف.

يحتاج تصنيف هذه الفيروسات إلى دراسة حموضها النووية (De Moraes وMaruniak ، 1997)، إذ تبين الدراسات وجود تنوع كبير في جينوم نفس النوع الفيروسي (van Regenmortel، 1992) مما يجعل من الصعب أن نحدد نوع الفيروس أو هل يوجد عزلة أو نمط أو عدة عزلات لنوع واحد. الدراسة المعمقة لسلسة الحموض النووية لهذه الفيروسات ودراسة علاقة القرابة phylogenetic بإمكانهما فقط أن تسمحا بتصنيف هذه الفيروسات (Jehle وزملاؤه، 2006).

إضافةً لما تقدم تكتسب هذه الدراسة أهميةً كون هذه الفيروسات تكتسب أهميةً في فتح أبواب واسعة في دراسات التقانات الحيوية واستخداماتها المختلفة بما فيها بعض المعالجات للأمراض البشرية (Räty وزملاؤه،2008). من جهة أخرى أن هذه الفيروسات استُخدمت ولا تزال تُستخدم كمبيد حيوي دون أية آثار جانبية على الصحة الإنسانية (Szewczyk وزملاؤه، 2008) لذا فإن كشف وعزل أنواع فيروسية متواجدة محلياً وتملك شراسةً عاليةً لها أهمية فائقة لاستخدامها كمبيد حيوي .

4-3- تقييم فاعلية بعض عزلات الفيروسات المعزولة على يرقات فراشة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* وعلى يرقات فراشة حفار ساق التفاح *Zeuzera pyrina*.

أظهرت اليرقات المعداة بالعزلات الفيروسية اعراض الاصابة النوذجية المختلفة التي تسببها فيروسات تتبع لعائلة الـ *Baculoviridae* حيث لوحظ على يرقات الشمع انتفاخ جسم اليرقات المصابة وتغير اللون وظهور الإفرازات من الجسم (الشكل.20-A)، كما لوحظت أعراض مماثلة على يرقات فراشة حفار ساق التفاح (الشكل.20- B) ويتفق ذلك مع ماذكره Jehle وزملاؤه في عام 2006

الشكل. 20 أعراض الإصابة بالفيروس

A يرقات فراشة الشمع الكبرى المصابة بالفيروس B يرقات حفار ساق التفاح المصابة بالفيروس

ويبين الجدول (13) فرق ظاهري للعزلة الفيروسية 166 مع العزلة 7 ومعنويا مع العزلة 223 من حيث النسبة المئوية للموت. اما بين العزلتين 166 و7 مع العزلة 223 الفرق معنويا عند مستوى احتمال 1%.

جدول.13. النسبة المئوية لموت ليرقات فراشة الشمع الكبرى المعاملة بثلاث عزلات فيروسية مختلفة

العزلة الفيروسية	عدد اليرقات الميتة	نسبة الموت
223	7 ± 5.8^{b}	23.33
166	24 ± 5.8^{a}	80
7	16 ± 5.8^{a}	53.33
8.5		LSD

تشير اختلاف الأحرف إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات على مستوى 1%

وبالتالي فان العزلات الثلاث اختلفت في النسبة المئوية لموت ليرقات على نفس الحشرة (يرقات فراشة الشمع الكبرى)، الحشرات تظهر مستويات مختلفة من قابلية الاصابة باختلاف العزلات المختبرة وهذا قد يعود لأسباب مختلفة منها عدد الفيروسات التي يحويها الـ Occlusion bodies أو طريقة العدوى الفيروسية وطريق التحضير الفيروس كما إن النسبة المئوية للموت تعتمد على تركيز الفيروس (Seufi، 2002؛ Payne، 1982 ؛ Ignoffo، 1966) أن عادات التغذية عند الحشرة أو سرعة تضاعف الفيروس كلها تتأثر باختلاف العزلة الفيروسية يالضافة الى نوع الحشرة والعمر اليرقي وهذا يتوافق (Klein وpodoler ، 1978؛ Komolpith وRamakrishnan ، 1975؛ Pawar وRamakrishnan ،1975؛ Seufi و Osman،2005؛ Seufi، 2008)،

بينما اختلفت نسبة الموت عند يرقات حفار ساق التفاح عند العدوى بالعزلة 166 وذلك حسب العمر اليرقي ، وكانت أعلى نسب مئوية 93.33 للموت% للعمر اليرقي الأول، ثم90% للعمر اليرقي الثاني، ثم 66.66% للعمر اليرقي الثالث، وكانت الفروق ظاهرية بين هذه الأعمار على

مستوى 0.01، وانخفضت نسبة الموت إلى 36.33% للعمر الرابع، وإلى 6.66% للعمر اليرقي الخامس، وكان الفرق ظاهرياً بين هذين العمرين عند مستوى 0.01، الجدول (14)

الجدول.14.النسبة المئوية لموت الاعمار اليرقية لحشرة حفار ساق التفاح نتيجة الإصابة بالعزلة 166 في ظروف المخبر .

العمر اليرقي	عدد اليرقات الميتة	نسبة الموت ,%
1st	28±8.88a	93.33
2nd	27±8.88a	90
3th	20±8.88ab	66.66
4th	11±.88bc	36.33
5th	2±8.88c	6.66
LSD 0.01	11.06	

تشير اختلاف الأحرف إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات على مستوى 1%.

واتفقت النتائج مع الذي ذكره Stairs عام 1965 أن حساسية اليرقات للفيروسات تقل كلما كبرت اليرقات في العمر في حشرة *Malacosoma disstria* كما ذكر Duan وOtvos (2001) بان النسبة المئوية للموت تكون مرتفعة في الأعمار الصغيرة في يرقات *Choristonura fumiferana*، كما ذكر Cherry وزملاؤه في عام 2000، أن حساسية يرقات *Helicoverpha armigera* عند العدوى بـ HearNPV *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus- يعتمد على عمر اليرقات، كما لوحظ أيضا بان الأعمار اليرقة الأصغر لـ *Agrotis segetum* تموت أسرع عند الإصابة بفيرس AsNPV *Agrotis segetum* nucleopolyhedrovirus- (Bourner وزملاؤه، 1992)

وفيرس *Choristoneura* multicapsid nucleopolyhedrovirus -CfMNPV على يرقات *fumiferana* spruce budworm larvae (Duan و Otvos، 2001)

كما وجد Lacey وزملاؤه، 2002 أن حساسية يرقات *Spodoptera littoralis* لـ *Spodoptera littoralis* multicapsid nucleopolyhedrovirus -SpliMNPV تكون أكثر في الأعمار اليرقية الأصغر وكذلك الأمر بالنسبة للفيروسات AfMNPV - *Anagrapha Falcifera* multicapsid nucleopolyhedrovirus وAcMNPV *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus على فراشة التفاح *Cydia pomonella* .

الاستنتاجات والمقترحات:

- بينت هذه الدراسة انتشار الإصابة الفيروسية بجنس *Nucleopolyhedroviruses* في كل من يرقات فراشة واي الفضية *A. gamma* ، وأبي دقيق الملفوف *P. rapae* ، ودودة ورق العنب *H. lineata*، ودودة اللوز الأمريكية *H.armigera*، وأبي دقيق الخبازي *V.cardui* التي تم جمعها حقلياً في حقول من دمشق وريفها ودرعا واللاذقية والحسكة بالاعتماد على الاعراض الظاهرية كمرحلة اولى في التشخيص.

- كان أكبر تركيز للأجسام الضمينة (OB) في يرقات أبو دقيق الخبازي *V.cardui* (2.7×10^6)، على الرغم من أن الانتشار الاعلى الحقلي كان أكثر وضوحاً على حشرة واي الفضية والتي كان عدد الأجسام الضمينة (OB) في المعلق المستخلص منها (3.6×10^4) و يُعدُّ هذا عاملاً هاماً في هذه الدراسة لاختيار الفيروسات الأكثر شراسة لاستخدامها في المكافحة الحيوية.

- انتشار اعراض الاصابة الظاهرة الفيروسات على حشرات مختلفة على محاصيل مختلفة .

- كما تم الكشف عن بروتين البوليهيدرين ذو الوزن الجزيئي 30 kDa باستخدام هلامة البولي اكريلاميد 10 % عند فراشة واي الفضية *Autographa gamma* (Noctuidae) و دودة اللوز الأمريكية *Helicoverpa armigera* (Noctuidae). وأبي دقيق الخبازي *Vanessa cardui* (Nymphalidae) ودودة ورق العنب *Hyles lineata* (Sphingidae) وعند أبي دقيق الملفوف *Pieris rapae* (Pieridae)

- تم الكشف عن مورثة البوليهيدرين *polyhedrin* (*polh*) ذات الوزن الجزيئي 750-bp والتي تشكله الفيروسات التي تنتمي إلى جنس *Alphabaculovirus* .وهي الفيروسات التي تشكل الأجسام الضمينة متعددة السطوح في اليرقات المدروسة.

- انقسمت العينات المدروسة إلى مجموعتين عند استخدام البيانات لرسم شجرة القرابة الوراثية باستخدام برنامج المعلوماتية TREECON (1.3b) المجموعة الأولى الفيروسات المعزولة من يرقات فراشة واي الفضية (ريف دمشق) ودودة اللوز الأمريكية (الحسكة)، أما المجموعة الثانية: تشمل الفيروسات المعزولة من أبو دقيق الخبازي (ريف دمشق)، ودودة ورق العنب (ريف دمشق) وأبو دقيق الملفوف (درعا).

- اختلاف فاعلية العزلات المستخدمة من هذه الفيروسات على نفس العائل واختلافها حسب العمر اليرقي للعائل. حيث اختلفت العزلات الثلاث المختبرة في النسبة المئوية لموت اليرقات على نفس الحشرة (يرقات فراشة الشمع الكبرى)، كما اختلفت نسبة المئوية للموت عند يرقات حفار ساق التفاح عند العدوى بالعزلة 166 وذلك حسب العمر اليرقي ، حيث أن حساسية اليرقات للفيروسات تقل كلما كبرت في العمر.

- متابعة الأبحاث عن انتشار الفيروسات الممرضة للحشرات في سورية .

التوصيات

- تربية واكثار هذه الفيروسات المتواجدة على العوائل الطبيعية مخبرياً.

- إجراء اختبارات حقلية لدراسة التأثير الفعلي لهذه الفيروسات الحشرية كمبيد حيوي

- التعرف على مقاومة هذه الأجسام الحاوية على الفيروسات (OB) للظروف المناخية أي دراسة تأثيرها في شروط مناخية مختلفة.

- ادراج استخدام الفيروسات الممرضة للحشرات ضمن برامج المكافحة المتكاملة للافات للحد من استخدام المبيدات الكيميائية كبدائل اساسية لها من خلال العمل على افتتاح مخبر مستقل للعوامل الممرضة للحشرات خاصة الفيروسي واستخدام مفاعلات حيوية ومزارع خلوية في اكثار وختبار الفيروسات.

المراجع

- توفيق، محمد،(1997) المكافحة البيولوجية في الافات الزراعية. المكتبة الاكاديمية- 757 صفحة.

Ackermann, H. W. and Smirnoff, W. A. (1983). A morphological investigation of 23 baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 41, 269-280.

Adams, M.J., King, A.M.Q. and Carstens, E.B. (2013). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology* 158: 2023–2030.

Adams, J. R., Stadelbacher, E. A. and Thompkins, G. J.(1979). A new viurs-like particle from the cotton bollworm, *Heliothis zea*. 37th Annu. Proc. Elect. Micros. Soc. Am., 52.

Adang, M.J., Staver, M.J., Rocheleau, T.A., Leighton, J., Barker, R.F. and Thompson, D.V. (1985). Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of Bacillus thuringiensissubsp. kurstaki HD-73 and their toxicity to Manduca sexta. *Gene*. 36:289–300.

Alves, C.A., Ikeda, M. and Kobayashi, M. (2002). dentification and characterization of Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus homologous repeated regions. *Virus Genes*.25(3):281-90.

Andermatt, M. (1986). Field efficacy and environmental persistence of the granulosis viruses of the summer fruit tortrix, *Adoxophyes orana*. *International Organisation for Biological and Integrated Control*. 14, 73-74.

Ankersmit G.W., Rabbinge R., Dijkman H. (1977): Studies on the sterile-male technique as a means of control of *Adoxophyes orana* (Lepidoptera, Tortricidae).4. Technical and economic aspects of mass-rearing.Netherland Journal of Pathology, 83: 27–39.

Ankersmit G.W., Rabbinge R., Dijkman H. (1977): Studies on the sterile-male technique as a means of control of *Adoxophyes orana* (Lepidoptera, Tortricidae).4. Technical and economic aspects of mass-rearing.Netherland Journal of Pathology, 83: 27–39.

Antony, B., Sinu, S.P. and Sudripta, D. (2011). New record of nucleorpolyhedrosis viruses in Tea looper caterpillar in India. *Journal of Invertebrate Pathology* .108 (1): 63-67.

Aruga, H. (1971). Cytoplasmic polyhedrosis of the silkworm-historical, economical and epizootiological aspects, pp. 3-21. In H. Aruga and Y. Tanada (eds.) The cytoplasmic-polyhedrosis virus of the silkworm. University of Tokyo Press, Tokyo, Japan.

Audemard, H., Burgerjon, A., Baudry, O., Bergere, D., Breniaux, D., Delay, J.C., Desvaux, R., Formantin, C., Gendrier, J.P. and Tarbouriech, M.F. (1992). Evaluation of 100 trials of carpovirusine, a granulosis virus preparation to control codling moth *Cydia pomonella* L. in apple orchards. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica.* 27, 45-49.

Bah, A., Bergeron, J., Arella, M., Lucarotti, C. J. and Guertin, C. (1997) Identification and sequence analyses of the granulin gene of *Choristoneura fumiferana* granulovirus. *Archives of Virology*. 142, 1577-1584.

Barber, K.N., Kaupp, W.J. and Holmes, S.B. (1993). Specificity testing of the nuclear polyhedrosis virus of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *Canadian Entomologist*. 125, 1055-1066.

Bedford, G.O. (1980). Biology, ecology, and control of palm rhinoceros beetles. *Annual Review of Entomology*. 25: 309-339.

Beekman, A.G.B. (1980). The infectivity of polyhedra of nuclear polyhedrosis virus (N.P.V.) after passage through gut of an insect predator. *Experimentia.* 36: 858-859.

Bell, M.R. and Hayes, J.L. (1994). Areawide management of cotton bollworm and tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) through application of a nuclear polyhedrosis virus on early-season alternate hosts. *Journal of Economic Entomology*. 87, 53-57.

Bensimon, A., Zinger, S., Gerassi, E., Hauschner, A., Harpaz, I. and, Sela, I. (1987). "Dark cheeks," a lethal disease of locust provoked by a lepidopterous baculovirus. Journal *of Invertebrate Pathology*. 50(3) 254-260.

Benz, G.A. (1986). Introduction: Historical Perspectives. pp. 1-36. In: The Biology of Baculoviruses. Vol I:Biological Properties and Molecular Biology, (RR Granados, BA Federici, Eds). CRC Press, Boca Raton, USA.

Berghiche, H., Houamria,. M., Van de Velde S., Soltani, N. And.Smagghe, G. (2008). Effects of two insect growth regulators on the ecdysteroid contents in eggs of the mealworm. *Belgian Journal of Zoology*. 138(2): 140-145.

Bergold, G. H. (1947). Die Isolierung des Polyeder-Virus und die Natur . del' Polyeder. *Zeitschrift für Naturforschung* . 2b :122-,43.

Biever, K.D. and Wilkinson, J.D. (1978). A stress-induced granulosis virus of *Pieris rapae*. *Environmental Entomology.* 7, 572-573.

Bischoff, D. S. and Slavicek, J. M. (1997). Molecular analysis of an enhancin gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology.* 71, 8133-8140.

Black, B.C., Brennan, L.A., Dierks, P.M. and Gard, I.E.(1997). Commercialization of Baculoviral Insecticides. pp. 341-387. In: The Baculoviruses, (LK Miller, Ed.). Plenum Press, New York and London.

Bong, C. F. J., and Sikorowski, P. P. (1991). Presence of polyhedra in the midgut cell nuclei of *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 57: 294-295.

Bonning, B.C and Ward, V. K., Vanmeer, M.M.M., Booth, T.F. and Hammock, B.D. (1997). Disruption of lysosomal targeting is associated with insecticidal potency of juvenile hormone esterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 6007-6012.

Borchani, L. and Mansuelle, P. (1996). A new scorpion venom toxin paralytic to insects that affects Na+ channel activation. Purification, structure, antigenicity and mode of action. *European Journal of Biochemistry*, 241 (2): 525–32.

Bourner, T.C., Vargas-Osuna, E., Williams, T., Santiago-Alvarez, C. and Cory, J.S. (1992). A comparation of the efficacy of nuclear polyhedrosis and granulosis viruses in spray and bait formulations for the control of *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize. *Biol. Sci. Technol*. 2:315-326.

Bull, J. C., Godfray, H. C. and O'Reilly, D. R. (2003). A few-polyhedra mutant and wild-type nucleopolyhedrovirus remain as a stable polymorphism during serial coinfection in *Trichoplusia ni*. *Applied and Environmental Microbiology.* 69, 2052-2057.

Burden, J.P., Possee, R.D. Sait, S.M., King, L.A., and Hails, R.S.(2006). Phenotypic and genotypic characterisation of persistent baculovirus infections in populations of the cabbage moth (*Mamestra brassicae*) within the British Isles. *Archives of Virology*. 151(4): p. 635-49.

Caballero, P., Vargas-Osuna, E., and Santiago-Alvarez,C. (1991). Parasitization of granulosis-virus infected and noninfected *Agrotis segetum* larvae and the virus transmission by three hymenopteran parasitoids. *Entomologia experimentalis et applicata*. 8(1): 55-60.

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

Carruthers W.R., Cory J.S. and Entwistle P.F. (1988). Recovery of pine beauty moth (*Panolis flammea*) nuclear polyhedrosis virus from pine foliage. *Journal of Invertebrate Pathology*. 52(1), 27-32.

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

Carter, J.B. (1973). The mode of transmission of *Tipula* iridescent virus. II Route of infection. *Journal of Invertebrate Pathology*. 21: 136- 143.

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.

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 lnvertebrate Pathology.* 70; 50-58.

Chen, C.J. and Thiem, S.M. (1997). Differential infectivity of two *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus mutants on three permissive cell lines is the result of lef-7 deletion. *Virology*. 227: p. 88-95.

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.

Condreay, J. P. and Kost, T. A. (2007). Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. *Current Drug Targets.* 8, 1126-1131

Cristina Del Rincon-Castro, M and Ibarra ,J. E. (2011). Entomopathogenic Viruses. pp. 29-64. In: Ninfa Rosas (Ed.). *Biological Control of Insect Pests*. Studium Press LLC, USA. 305 p.ISBN**:** 1-933-699-27-2.

Cory, J.S., Hirst, M.L., Williams, T., Hails, R.S., Goulson, D., Green, B.M., Carty, T.M., Possee, R.D., Cayley, P.J., and Bishop, D.H.L. (1994). Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature* .370, 138-140.

Crook, N.E. (1991). Baculoviridae: subgroup B. Comparative aspects of granulosis viruses. pp. 73-110. In: Viruses of Invertebrates, (E Kurstak, Ed.). Marcel Dekker Inc., New York.

Cunningham, J.C. 1998. North America, pp. 313-331, Insect viruses and pest management. (FR Hunter- Fujita, PF Entwistle; HF Evans; NE Crook, Eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York.

Cunningham, J.C. and Entwistle, P.F. (1981). Control of sawflies by baculovirus, pp. 379-407. In: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980, (H.D. Burges ,Ed.). Academic Press, Inc., London.

Da Silva, M.T.B. (1992). Control of soyabean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 - Lepidoptera: Noctuidae) II. Baculovirus anticarsia. *Ciencia Rural*. 22, 261-265.

Da Silva, M.T.B. (1995). Baculovirus anticarsia associated with dosage reduction of insecticides for the control of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, 1818). *Ciencia Rural* .25, 353-358.

David, W.A.L. and Gardiner, B.O.C. (1965). The incidence of granulosis deaths in susceptible and resistant *Pieris brassicae* (Linnaeus) larvae following changes of population density, food and temperature. *Journal of Invertebrate Pathology.* 7, 347-355.

Derksen, A. C. G., and Granados, R. R. (1988). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology*. 167:242–250.

de Moraes, R.R. and Maruniak, J.E. (1997). Detection and identification of multiple baculoviruses using the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. *Journal of Virological Methods*. 63, 209-217.

Dickler, E. (1991). Tortricid pests of pome and stone fruits, Eurasian species. In: van der Geest, L. P. S. and H. H. Evenhuis (eds.). Tortricid Pests: Their biology, natural enemies and control. Elsevier Science Publishers B. V., New York, USA, pp: 435-452.

Domingo, E., Escarmis, C., Sevilla, N., Moya, A., Elena, S. F., Quer, J., Novella, I. S. and Holland, J. J. (1996). Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB Journal.* 10, 859-864

Dong, S., Wang, M., Qiu, Z., Deng, F., Vlak,J. M., Hu, Z. and Wang, H. (2010). *Autographa californica*multicapsid nucleopolyhedrovirus efficiently infects Sf9 cells and transduces mammalian cells via direct fusion with the plasma membrane at low pH. *Journal of Virology*. 84, 5351–5359 .

Donly, B.C., Theilmann, D.A., Hegedus, D.D., Baldwin ,D. and Erlandson, M.A.(2014). Mamestra configurata nucleopolyhedrovirus-A transcriptome from infected host midgut. *Virus Genes*.;48(1):174-83.

Doyle, C.J. and Hirst, M.L. (1991). Cross infection of nymphalid butterfly larvae with cabbage moth (*Mamestra brassicae*) nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 57, 131-133.

Doyle, C.J., Hirst, M.L., Cory, J.S. and Entwistle, P.F. (1990). Risk assessment studies: detailed host range testing of wild-type cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. *Applied and Environmental Microbiology* .56, 2704-2710.

Duan, L. and Otvos, L.S. (2001). Influence of larval age and virus concentration on mortality and sublethal effects of a nucleopohedrovirus on the Western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*.30(1):136-146

Du, X. and Thiem. S. M. (1997) Responses of insect cells to baculovirus infection: Protein synthesis shutdown and apoptosis. *Journal of Virology*. 71:7866-7872.

Dulmage, H.T and Rhodes, R.A. (197l). Production of pathogens in artificial media; *Microbial Control of Insect Pests and Mites, Academic press Lunhn;* 507-540.

Ehler, L.E. (1991). Planned Introductions in Biological Control. pp. 21-40 In: Assessing Ecological Risks of Biotechnology, (LR Ginzburg, Ed.). Butterworth-Heinemann, Boston.

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

Engelhard, E. K., Kam-Morgan, L. N. W., Washburn, J. O. and Volkman, L. E. (1994). The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 91(8):3224–3227.

Entwistle, P.F., Forkner, A.C., Green, B.M. and, Cory, J.S. (1993). Avian dispersal of nuclear polyhedrosis viruses after induced epizootics in the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control.* 3(1), 61-69

Erlandson, M. E. (2008). Insect pest control by viruses.In: Mahy, B. W. J. and M. H. V. van Regenmortel (eds.) Encyclopedia of virology, 3rd ed. Elsevier, Oxford. pp. 125–133.

Escribano, A., Williams, T., Goulson, D., Cave, R. D., Chapman, J. W., and Caballero, P. (1999). Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *Journal of Economic Entomology*. 92(5): 1079-1085.

Evans, H.F. (1986). Ecology and epizootiology of baculoviruses. pp. 89-132. In: The Biology of Baculoviruses. Vol. II: Practical Applications for Insect Control, (RR Granados, BA Federici, Eds.). CRC Press, Boca Raton, USA.

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.

Evans, H. F., and Allaway, G. P.(1983) Dynamics of Baculovirus Growth and Dispersal in *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera *Noctuidae*) Larval Populations Introduced into Small Cabbage Plots. *Applied and Environmental Microbiology* .45(2): 493–501.

Fauquet, C., Mayo, M.A., Desselberger, U. and Ball, L. (2005). Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier-Academic Press, Amsterdam. pp 751–756.

Federici, B. A. (1983). Enveloped double-stranded DNA insect virus with novel structure and cytopathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *USA* 80, 7664-7668.

Federici, B.A. (1997). Baculovirus Pathogenesis. pp. 33-59. In: The Baculoviruses, (LK Miller, Ed.). Plenum Press, New York.

Falcon, L.A. (1978). Viruses as alternatives to chemical pesticides in the Western Hemisphere. pp. 11 ff. In: Proc. Symp. Viral Pesticides: Present

Knowledge and Potential Effects on Public and Environmental Health, Myrtle Beach, 1977 (MD Summers, CY Kawanishi, Eds.), US Environmental Protection Agency, Washington D.C.

Funk, C. J. and Consigli, R. A. (1993). Temporal expression and immunogold localization of *Plodia interpunctella* granulosis virus structural proteins. *Virus Research.* 28, 57-66.

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.

Fuxa, J.R., and Richter, A.R.(1996). Effect of Agricultural Operations and Precipitation On Vertical Distribution of a Nuclear Polyhedrosis Virus in Soil. *Biological Control*.6:324-329.

Garcia-Maruniak, A., Maruniak, J. E., Zanotto, P. M. A., Doumbouya, A. E., Liu, J.C., Merritt, T. M. and Lanoie, J. S. (2004). Sequence analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* 78, 7036-7051.

Goulson, D. (1997). Wipfelkrankheit: modification of host behavior during baculoviral infection. *Oecologia* (Berlin) 109(2), 219-228.

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

Grosholz, E.D. (1992). Interactions of intraspecifi c, interspecifi c and apparent competition with host-pathogen population dynamics, *Ecology*. 73: 507-514.

Grzywacz, D, McKinley, D.J, Jones, K.A . and Moawad, G. (1997). Microbial contamination in *Spodoptwa littoralis* nuclear polyhedrosis virus produced in insects in Egypt; *journal of invertebrate Pntholopj.* 69; 151-156.

Grzywacz, D. (1998). Microbiological examination of virus production *in-vivo; In: Hunter-Fujita F.R, Entzuistle P.F, Evans H.F and Crook N.E (eds) Insect viruses and Pest Management: Theory and Practice. john Wiley* and *Sons, Cllidzester, UK;* 523-541.

Grzywacz, D., Rabindra, R.J., Brown, M., Jones, K.A. and Parnell, M. (2004). The Helicoverpa Armigera NPV Production Manual. Part 1. pp. 27

Guarino, L. A., Gonzales, M. A. and Summers, M. D. (1986). Complete sequence and enhancer function of the homologous DNA regions of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology.* 60, 224-229.

Haas-Stapleton, E. J., Washburn, J. O. and Volkman, L. E. (2004). P74 mediates specific binding of Autographa californica M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of Heliothis virescens Larvae. *Journal of Virology*. 78:6786–6791.

Haas-Stapleton, E. J., Washburn, J. O. and Volkman, L. E. (2003). Pathogenesis of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus in fifth instar *Spodoptera frugiperda*. *Journal of General Virology* .84, 2033-2040.

Hall, D.W. and Anthony, D.W. (1971). Pathology of a mosquito iridescent virus (MIV) infecting *Aedes taeniorhynchus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 18: 61- 69.

Hammock, B.D., Bonning, B.C., Possee, R.D., Hanzlik, T.N .and Maeda, S. (1990). Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. *Nature* .344, 458–461.

Harrap, K., Payne, C.C. and Robetson, J .(1977). The properties of three baculoviruses from closely related hosts; *Virology* .79; 14-31.

Harrison, R.L. (2009). Genomic sequence analysis of the Illinois strain of the *Agrotis ipsilon* multiple nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* 38:155-170.

Harrison, R. L., Puttler, B. and Popham, H. J. R. (2008). Genomic sequence analysis of a fast-killing isolate of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 89, 775-790.

Hashimoto, Y., Hayakawa, T., Ueno, Y., Fujita, T., Sano, Y. and Matsumoto, T. (2000). Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. *Virology* 275, 358-372.

Hawtin, R.E., Arnold, K., Ayres, M.D., Zanotto, P.M., Howard, S.C., Gooday, G.W., Chappell, L.H., Kitts, P.A., King, L.A. and, Possee, R.D. (1995). Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology*. 212,673-85.

Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S.I., Goto, C. and Maeda, S. (1999) Sequence analysis of the Xestia c-nigrum granulovirus genome. *Virology*. 262(2):277–297.

Hayes, J.L. and Bell, M. (1994). Evaluation of early-season baculovirus treatment for suppression of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) over a wide area. *Journal of Economic Entomology*. 87(1), 58-66.

Hegedus, D. D., Erlandson, M. A., Gillott, C. and Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology.* 54, 285-302.

Herniou, E. A. and Jehle, J. A. (2007). Baculovirus phylogeny and evolution. *Current Drug Targets* 8, 1043-1050.

Herniou, E. A., Luque, T., Chen, X., Vlak, J. M., Winstanley, D., Cory, J. S. and O'Reilly, D. R. (2001). Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *Journal of Virology* 75, 8117-8126.

Hooft van Iddekinge, B.J.L., Smith, G.E. and Summers, M.D. (1983). Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 131, 561-565.

Hoover, K., Schultz, C.M., Lane, S. S., Bonning, B.C., Duffey, S. S., McCutchen, B. F. and Hammock B. D. (1995). Reduction in damage to cotton plant by recombinant baculovirus that knock moribund larvae of *Heliothis virescens* off the plant. *Biological Control*. 5: 419-426.

Houston, A. S. (1991). Detection of symptomatic and asymptomatic iridescent virus infection in *Helicoverpa zea*. Thesis for the degree of Master of Science in the Department of Entomology, Mississippi State University.p.60.

Huber, J. (1986). Use of Baculoviruses in Pest Management Programs. pp. 181-202. In: The Biology of Baculoviruses. Vol. II: Practical Applications for Insect Control, (RR Granados, BA Federici, Eds.).CRC Press, Boca Raton, USA.

Huber, J. (1998). Western Europe, pp. 201-215, Insect viruses and pest management. (FR Hunter-Fujita, PF Entwistle; HF Evans; NE Crook, Eds.). John Wiley and Sons, Inc., New York.

Hughes, D. S., Possee, R. D. and King ,L. A. (1997). Evidence for the presence of a low-level, persistent baculovirus infection of *Mamestra brassicae* insects. *Journal of General Virology.* 78:1801–1805.

Hughes, D.S., Possee, R.D. and King, L.A. (1993). Activation and detection of a latent baculovirus resembling *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus in *M. brassicae* insects. *Virology*. 194, 608-615.

Hull, R., Brown, F., and Payne, C. (1990). Virology: directory and dictionary of animal, bacterial, and plant viruses. McMillan Press, LTD, London. pp. 326.

Hunter, F.R., Crook, N.E and Entwistre P.F. (1984). Viruses as pathogens for the control of insects; *In: Grainger j.M and Lynch 1.M (eds)*

Microbiological Methods and Environmental Biotechnology; societyfbr Applied Bacteriology, London; 323-347.

Hunter-Fujita, F.R., Entwistle, P.F., Evans, H.F. and Crook, N.E. (1998). Insect viruses and pest management. John Wiley and Sons, Inc., New York. pp. 201–215.

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].

ICTV Virus Taxonomy (2014) (available at http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=25).

Ignoffo, C.M., McIntosh, A.H. and Garcia, C. (1983). Susceptibility of larvae of *Heliothis zea*, *H. virescens* and *H. armigera* (Lep: Noctuidae) to three baculoviruses. *Entomophaga.* 2, 1–8.

Ignoffo C.M. and Shapiro, M. (1978). Characteristics of baculovirus preparations processed from living and dead larvae; *Journal of Economic Entomology.* 7; 186- 188.

Ignoffo, C.M. (1975). Evaluation of *in vivo* specificity of insect viruses. pp. 52-57. In: Baculovirus for Insect Pest Control: Safety Considerations, (MD Summers, R Engler, LA Falcon, PV Vail, Eds.) ASM, Washington.

Ignoffo, C.M. and Hink, W.F. (1971) Propagation of arthropod pathogens in living systems. In: Burges, H.D. and Hussey, N.W. (eds) *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press, London, pp. 541–580.

Ignoffo, C.M (1966). Effects of age on mortality of Heliothis zea and Heliothis virescens exposed to a nuclear polyhedrosis virus. *The Journal of Invertebrate Pathology*. 8:279-283.

Inceoglu, A.B., Kamita, S. G. and Hammock, B. D. (2006). Genetically Modified Baculoviruses: A Historical Overview and Future Outlook *Advances in Virus Research*. 68: 323-360.

Jackson, D. M., Lynn, D. E., Fuxa, J. R., Shepard, B. M. and Shapiro, M. (2008). Efficacy of entomopathogenic viruses on pickleworm larvae and cell lines. *Journal of agricultural and urban entomology*. 25(2): 81-97.

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.

Johnson, T.B and Lewis, L. C. (1982). Evalution of *Rachiplusia ou* and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in suppressing black cutworm damage to seeding corn in greenhouse and field. *Journal of Economic Emtomology*. 75, 401-404.

Jones, K.A., Grzywacz, D. and Cherry, A. (1996). Appropriate methods of insect virus production in resource-poor regions. Abstracts: Technology Transfer in Biological Control: From Research to Practice, Montpellier, France, September 9–11, 1996. *International Organisation for Biological and Integrated Control* 19 (8), 137.

Jurkovicova, M. 1979. Activation of latent virus infections in larvae of *Adoxophyes orana* (Lepidoptera: Tortricidae) and *Barathra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) by foreign polyhedra. *Journal of Invertebrate Pathology*. 34, 213-223.

Kamiya, K., Zhu, J., Murata, M., Laviña-Caoili, B. A., Ikeda, M., Kobayashi, M. and Kawamura, S. (2004). Cloning and comparative characterization of three distinct nucleopolyhedroviruses isolated from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Japan. *Biological Control*. 31(1): 38-48.

Karim , S . , Zafar , A . U . , Nasir , I . A . and Riazuddin , S .(2000) . Field efficacy of CAMB *Bacillus thurigiensis* biopesticide to control Helicoverpa armigera [Hb] and Earias vitella [Farbricius] in Okra corp

Pakistan *Journal of Biological Sciences* (Pakistan) . v . 3 [8] p . 1296 – 1298 .

King, L.A. and Possee, R.D. (1992). *The Baculovirus Expression System*. Chapman and Hall, London. pp. 389-431.

Klein, M. and Podoler, H. (1978). Studies on an application of a Nuclearpolyhedrosis virus to control population of the Egyptian cotton worm *S. littoralis*. *The Journal of Invertebrate Pathology*, 32: 244-248.
Ko, R., Okano, K., and Maeda, S. (2000). Structural and functional analysis of the Xestia c-nigrum granulovirus matrix metalloproteinase. *Journal of Virology*. 74(23): p. 11240-6.

Komolpith, U. and Ramakrishnan, N. (1975). Bioassay of the nuclear polyhedrosis virus against larval stages of *Spodoptera littoralis* and the effect of the protectants aganist ultraviolet. *Proceedings of the Indian Academy Of* Science*.,* 83:195-203.

Kool, M. and Vlak, J.M. (1993). The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Archives of Virology*. 130, 1-16.

Krieg, A. (1956). "Endogene Virusentstehung" und Latenz-problem bei Insektenviren. Untersuchungen der Polyedrose von *Neodiprion setifer* (Geoffr.). Mitteilung. *Archiv für die Gesamte Virusforschung* . 6, 472-481.

Kroschel, J., Fritsch, E. and Huber, J. (1996). Biological control of the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zeller) in the Republic of Yemen using granulosis virus: biochemical characterization, pathogenicity and stability of the virus. *Biocontrol Science and Technology*. 6, 207-216.

Kumar, C. S ., Sireesha, K ., Ranga Rao, G. V ., Reddy, A. S ., Waliyar, F., Rambabu, C., Kumar, P. L. (2007). Production of polyclonal antibodies for detection of Nucleopolyhedrovirus infecting *Helicoverpa armigera. Indian Journal of Plant Protection*, 35 (2). pp. 210-212.

Kunjeku, E., Jones, K.A. and Moawad, G.M. (1998). Africa, the Near and Middle East, pp. 280-302, Insect viruses and pest management. (FR Hunter-Fujita, PF Entwistle; HF Evans; NE Crook, Eds.). John Wiley and Sons, Inc., New York.

Kuzio, J., Pearson, M. N., Harwood, S. H., Funk, C. J., Evans, J. T., Slavicek, J. M. and Rohrmann, G. F. (1999). Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology.* 253, 17-34.

Lacey, L.A.,Vail, P.V. and Hoffman, D.F. (2002). Comparative activity of baculoviruses against the codling moth *Cydia pomonella* and three other tortricid pests of tree fruit. *The Journal of Invertebrate Pathology*. 80:64-68.

Laitinen, A.M., Otvos, I.S. and Levin, D.B. (1996). Genotypic variation among wild isolates of Douglas Fir Tussock Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economic Entomology*. 89(3), 640-647.

Lange, M. and Jehle, J.A (2003).The genome of the Cryptophlebia leucotreta granulovirus. *Virology*. 317(2):220–236.

Lautenschlager, R.A. and Podgwaite, J.D. (1979). Passage of nucleopolyhedrosis virus by avian and mammalian predators of the gypsy moth, Lynantria dispar. *Environmental Entomology*. 8: 210-214

Lauzon, H.A.M., Garcia-Maruniak, A., Zonatto, P.M.de.A., Clemente, J.C., Herniou, E., Lucarotti, C.J., Arif, B.M. and Maruniak, J.M.(2006) Genomic comparison of the Neodiprion sertifer and Neodiprion lecontei nucleopolyhedroviruses and identification of potential hymenopteran baculovirus-specific open reading frames. *Journal of General Virology.*87, 1477–1489..

Lauzon, H. A. M., Lucarotti, C. J., Krell, P. J., Feng, Q., Retnakaran, A. and Arif, B. M. (2004). Sequence and organization of the *Neodiprion*

lecontei nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of Virology* 78, 7023-7035.

Lee, D. and Adams, M.E. (2000). Sodium channels in central neurons of the tobacco budworm, Heliothis virescens: basic properties and modification by scorpion toxins. *Journal of Insect Physiology*. 46:499–508.

Leisy, D., Nesson, M., Pearson, M., Rohrmann, G. F. and Beaudreau, G. (1986a). Location and nucleotide sequence of the *Orgyia pseudotsugata* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene. *Journal of General Virology.* 67, 1073-1079.
Leisy, D., Rohrmann, G. and Beaudreau, G. (1986b). The nucleotide sequence of the polyhedrin gene region from the multicapsid baculovirus of *Orgyia pseudotsugata*. *Virology.* 153, 280-288.

Leisy, D.J., Rohrmann, G.F. and Beaudreau, G.S. (1984). Conservation of genome organization in two multicapsid nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of Virology*. 52, 699-702.

Lewis, F.B. (1981). Control of gypsy moth by a baculovirus, pp. 363-377. In: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980, (HD Burges, Ed). Academic Press, Inc., London.

Lipa, J.J. (1998). Eastern europe and the former Soviet Union, pp. 216-231, Insect viruses and pest management. (FR Hunter-Fujita, PF Entwistle; HF Evans; NE Crook, Eds.). John Wiley and Sons, Inc., New York.

Liu, J.J. and Carstens, E.B. (1993). Infection of Spodoptera frugiperda and Choristoneura fumiferana cell lines with the baculovirus Choristoneura fumiferana nuclear polyhedrosis virus. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 932-940

Liu, M., Hu, Z., Liang, B., Jin, F., Li, M. and Xie, T. (1993). Physical mapping of Buzura suppressaria nuclear polyhedrosis virus genome. *Archives of Virology*. 128, 357-362

Long, G., Pan, X., Kormelink, R. and Vlak, J. M. (2006). Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology.* 80, 8830-8833.

Longworth, J.F. and Cunningham, J.C. (1968). The activation of occult nuclear polyhedrosis viruses by foreign nuclear polyhedra. *Journal of Invertebrate Pathology.* 10, 361-367.

López, M., Rojas, J. C., Vandame, R. and Williams, T. (2002). Parasitoidmediated transmission of an iridescent virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 80: 160-170.

Loret, EP. and Mansuelle, P. (1990). "Neurotoxins Active on Insects: Amino Acid Sequences, Chemical Modifications, and Secondary Structure Estimation by Circular Dichroism of Toxins from the Scorpion Androctonus australis Hector". *Biochemistry* 29 (6):1492-501.

Loret, E.P. and Martin-Eauclaire, MF. (1991). "An anti-insect toxin purified from the scorpion Androctonus australis Hector also acts on the alpha- and beta-sites of the mammalian sodium channel: sequence and circular dichroism study". *Biochemistry*. 30 (3): 633–40.

Lu, M. and Lin, C. (2003). Involvement of the terminus of grouper betanodavirus capsid protein in virus-like particle assembly. *Archives of Virology.* 148 (2) : 345-355.

Luo, S., Zhang, Y., Xu, X., Westenberg, M., Vlak, J.M., Wang, H., Hu, Z. and Deng, F.(2011). Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus ODV associated protein, HA100, affects oral infectivity in vivo but not virus replication in vitro. *Journal of General Virology*. 92: 1324-1331. 2011.

Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D. R. and Winstanley, D. (2001). The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *Journal of General Virology.* 82, 2531-2547.

Maguire ,T., Harrison, P., Hyink ,O., Kalmakoff, J. and Ward, V.K.(2000) The inhibitors of apoptosis of *Epiphyas*

postvittana nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology.* 81 (2000), pp. 2803–2811

Marina, C.F., Fernández-Salas, I., Ibarra, J.E., Arredondo- Jiménez, J.I., Valle, J. and Williams, T. (2005). Transmission dynamics of an iridescent virus in an experimental mosquito population: the role of host density. *Ecological Entomology*. 30: 376-382.

Martignoni, M.E. and Iwai, P.J. (1986). Propagation of multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orygia pseudotsugata* in larvae of *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 47, 32-41.
Martignoni, M. E., Breillatt, J. P., and Anderson, N. G.. (1968). Mass purification of polyhedral inclusion bodies by isopycnic banding in zonal rotors. *Journal of Invertebrate Pathology*. 11:507–510. NY: Academic Press.

McKinley, D.J., Moawad, G., Jones, K.A., Grzywacz, D. and Turner, C. (1989). The development of nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) in cotton. In: Green, M.B. and de Lyon, D.J. (eds) *Pest Management in Cotton*. Ellis Horwood, Chichester, UK, pp. 93–100.

McNeil, J., Cox-Foster, D., Gardner, M., Slavicek, J., Thiem, S. and Hoover, K. (2010). Pathogenesis of Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus in L. dispar and mechanisms of developmental resistance. *Journal of General Virology.* 91(Pt 6):1590-600.

Miller, L. K. (1997). Baculovirus interaction with host apoptotic pathways. *Journal of Cellular Physiology.* 173, 178-182.

Moscardi, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 44, 257-289.

Monsarrat, P. and Veyrunnes, J.C.(1976). Evidence of *Oryctes* virus in adult feces and new data for virus characterization. *Journal of Invertebrate Pathology*. 27: 387-389.

Morris, O.N. (1980) Entompathogeic viruses strategies for use in forest insect pest managenment. *Canadian. Entomologist* 112, 573-584.

Moscardi, F. (1990a). Development and use of soybean caterpillar baculovirus in Brazil. pp. 184-187 In: Proceedings and Abstracts, Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Adelaide, Australia.

Moscardi, F. (1999b). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*. 44: 257-289.

Moscardi, F. and Corso, I.C. (1988). Control of the soyabean caterpillar using mixtures of Baculovirus anticarsia with reduced dosages of insecticides. Documentos, *Centro Nacional de Pesquisa de Soja, EMBRAPA* No. 36, 35-37.

Moser, B.A., Becnel, J.J., White, S.E., Afonso, C., Kutish, G., Shanker, S. and Almira, E. (2001) Morphological and molecular evidence que *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family Baculoviridae. *Journal of General Virology*. 82: 283-297.

Mullens, B.A., Velten, R.K. and Federici, B.A. (1999). Iridescent virus infection in *Culicoides variipennis sonorensis* and interactions with the mermithid parasite *Heleidomermis magnapapula*. *Journal of Invertebrate Pathology* . 73: 231-233.

Murillo, R., Muñoz, D., Lipa, J.J. and Caballero, P.(2001) Biochemical characterization of three nucleopolyhedrovirus isolates of *Spodoptera exigua* and *Mamestra brassicae*. *Journal of Applied Entomology.* 125, 267-270.

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.

Nei, M., Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76:5269-5273.

Ohkawa, T., Washburn, J. O., Sitapara, R., Sid, E. and Volkman, L. E. (2005). Specific binding of Autographa californica M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of Heliothis virescens larvae is mediated by products of pif genes Ac119 and Ac022 but not Ac115. *Journal of Virology*. 79(24):15258–15264.

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 a baculovirus pesticide by deletion of the egt gene. *Bio Technology*. 9, 1086-1089.

O'Reilly, D.R., Miller, L.K. and Luckow, V.A. (1994) *Baculovirus Expression Vectors,a Laboratory Manual*. Oxford University Press, Oxford.

Paillot, A. (1926). Contribution a l'etiologie et l'epidemiologie de la "grasserie" du Ver a Soie. *C.R. Academy Science, Paris* D179: 229-231

Pawar, V. M. and Ramakrishnan, N. (1975). Investigation of the nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera litura*. III- Bioassay of virus activity. *Indian Journal* of *Entomology*., 37: 374-376.

Payne, C. C. (1982). Insect viruses as control agents. *Parasitol*. 84: 35-77.

Pearson, M.N. and Rohrmann, G.F.(2002). Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the *Baculoviridae, Orthomyxoviridae,* and *Metaviridae (insect retrovirus)* families**.** *Journal of Virology*. 76: p. 5301-5304.

Pearson, M. N., Groten, C., and Rohrmann, G. F. (2000). Identification of the Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein

provides evidence for a phylogenetic division of the Baculoviridae. *Journal of Virology*. 74(13):6126–6131.

Pearson, M.N. and Rohrmann, G.F.(1995). *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus homologous regions: characterization of their ability to function as replication origins. *Journal of Virology*. 69: p. 213- 221.

Perera, O. P., Valles, S. M., Green, T. B., White, S., Strong, C. A. and Becnel, J. J. (2006). Molecular analysis of an occlusion body protein from *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus (CuniNPV). *Journal of Invertebrate Pathology.* 91, 35-42.

Podgwaite, J.D. and Mazzone, H.M. (1986). Latency of insect viruses. *Advances in Virus Research*. 31, 293- 320.

Poinar, G., Jr. and Poinar, R. (2005). Fossil evidence of insect pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* .89, 243-250.

Pokharkar, D. S. and Chaudhary, S. D. (2001). Combined efficacy of nuclear polyhedrosis virus and synthetic insecticides against *Helicoverpa armigera* [Hb] on tomato , Journal of Maharashtra Agricultural Universities [India]. v. 26 [1] p. 25 – 28.

Ponsen, M.B. and De Jong, D.J. (1964). A nuclear polyhedrosis of *Orthosia incerta* (Hufnagel) (Lepidoptera, Noctuidae). *Journal of Insect Pathology*. 6, 376-378.

Possee, R.D. and Rohrmann, G.F.(1997). Baculovirus genome organization and Evolution. pp. 109-140. In: The Baculoviruses. (LK Miller, Ed.) Plenum Press, New York.

Possee, R.D., Barnett, A. L. ,Hawtin, R. E and King, L. A. (1997). Engineered baculoviruses for pest control. Pestic. Sci. 51: 462-470.

Quant-Russell, R.L., Pearson, M.N., Rohrmann, G.F. and Beaudreau, G.S. (1987). Characterization of baculovirus *p10* synthesis using monoclonal antibodies. *Virology* 160, 9-19.

Räty, J. K., Lesch, H.P., Wirth, T. and Ylä-Herttuala, S.(2008). Improving safety of gene therapy. Current Drug Safety, 3: 46-53.

Rohrmann, G. F. and Beaudreau, G. S. (1977). Characterization of DNA from polyhedral inclusion bodies of the nucleopolyhedrosis single-rod virus pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. *Virology.* 83, 474-478.

Shapiro, M., Martignoni, M.E., Cunningham, J.C. and Goodwin, R.H. (1982). Potential use of the saltmarsh caterpillar as a production host for nucleopolyhedrosis viruses. *Journal of Economic Entomology*. 75, 69-71.

Schnepf, E. Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. (1998). Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:775–806.

Seufi, A. M. (2008). Characterization of an Egyptian *S. littoralis* nucleopolhedrovirus and a possible use of a highly conserved region from polyhedrin gene for nucleopolyhedrovirus detection.*Virology Journal*, 5: 13.

Seufi, A. M. and Osman, G.E. (2005). Comparative susceptibility of the Egyptian cotton leafworm, *S. littoralis* to some Egyptian baculovirus isolates. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 15: 21-26.

Seufi, A. M. (2002). Molecular characterizatin of field isolates of entomopathogenic viruses from Egypt. Ph.D. Thesis, Dept. Entomol. Fac. Science, Cairo. Univ., 100 pp.

Shapiro, M. and Argauer, R. (1997). Components of the stilbene optical brightener tinopal LPW as enhancers for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. *Journal of Economic Entomology.* 90, 899-904.

Shapiro, M. and Dougherty, E.M. (1994). Enhancement in activity of homologous and heterologous viruses against the gypsy moth

(Lepidoptera: Lymantriidae) by an optical brightener. *Journal of Economic Entomology*. 87, 361-365.

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

Shapiro, M. and Robertson, J.L. (1991). Natural variability of three geographic isolates of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economic Entomology* .84(1), 71-75.
Shapiro, M. (1986). *In vivo* production of baculoviruses, pp. 31-61. In: *The biology of baculoviruses*. Vol 2 (GRANADOS R. R., FEDERICI B. A., Eds).- CRC Press, Boca Raton, USA.

Shapiro, M., Martignoni, M.E., Cunningham, J.C. and Goodwin, R.H. (1982). Potential use of the saltmarsh caterpillar as a production host for nucleopolyhedrosis viruses. *Journal of Economic Entomology*. 75, 69-71.

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

Sikorowski, P. P., Andrews, G. L. and Broome, J. R. (1973). Transovum transmission of a cytoplasmic polyhedrosis virus of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 21: 41-45.

Slack, J. and Arif, B. M. (2007). The baculoviruses occlusion-derived virus: Virion structure and function. *Advances in Virus Research.* 69, 99-165.

Slack, J.M., Kuzio, J. and Faulkner, P. (1995). Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology*. 76, 1091-1098.

Smith, G.E., Summers, M.D. and Fraser, M.J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology* .3, 2156-2165.

Smith, D. B. and Bouse, L. F. (1981). Machinery and factors that affect the application of oathogens. In *Microbil Contol of Pests and Plant Disease* 1970-1980 (H. D. Burges, Ed), pp.635-653. Academic Press, London.

Smits, P.H. and Vlak, J.M. (1988a). Selection of nuclear polyhedrosis viruses as biological control agents of *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae). *Entomophaga.* 33, 299-308.

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

Smits, P.H., M.C. van Velden, M. van den Vrie, and Vlak, J.M.(1987). Feeding and dispersion of *Spodoptera exigua* larvae and its relevance for control with a nuclear polyhedrosis virus. Entomologia Experimentalis et Applicata 43(1), 67-72.

Soares, J. S. and Ribeiro, B. M. (2005). Pathology of *Anticarsia gemmatalis*larvae infected by two recombinant *A. gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses. *Research in Microbiology*. 156, 263–269

Soeda, E., Maruyama, T., Arrand, J. and Griffin, B. (1980). *Host-dependent evolution of three papova viruses. Nature*. 285: p. 165-7.

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.

Song-Tay, L., Srinivasan, R., Yan-Jheng ,W. and Talekar, N. S. (2007). Occurrence and characterization of a nucleopolyhedrovirus from *Maruca vitrata* (Lepidoptera, Pyralidae) isolated in Taiwan. BioControl 52. pp 801-819 .

Stairs, G.R. (1990). Effects of *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus passaged once in *Manduca sexta* on growth and survival of young *M. sexta* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 56, 139- 141.

Stairs, G. R. (1965). Quantitative differences in susceptibility of nuclear polyhedrosis virus among larval instars of the forest tent caterpillar, *Malacosoma dissteria* (Hubner). *The Journal of Invertebrate Pathology*. 7 (4): 427-429.

Steinhaus, E. A. (1963). Background for the diagnosis of insect diseases. In insect pathology, an advanced treatise, Vol. 2 Ed. E. A. Steinhaus pp. 549-589. Academic Press, New York.

Stiles, B., Burand, J.P., Meda, M., and Wood, H.A.(1983). Characterization of gypsy moth (*Lymantria dispar*) nuclear polyhedrosis virus. *Applied* and *Environmental Microbiology*. 46, 297-303.

Strand, M.R., McKenzie, D.I., Grassl, V., Dover, B.A. and Aiken, J.M (1992). Persistence and expression of *Microplitis demolitor* polydnavirus in *Pseudoplusia includens*. *Journal of General Virology*. 73, 1627–1635.

Summers, M.D. and Smith, G.E. (1987): A method for baculovirus vector and insect cell culture procedures, Texas Agricultural Experiment Station, Bulletin No. 1555.

Swevers, L., Soin, T., Mosallanejad, H., Iatrou, K. and Smagghe, G (2008). Ecdysteroid signaling in ecdysteroid-resistant cell lines from the polyphagous noctuid pest Spodoptera exigua. Insect Biochem. *Journal of Molecular Biology* . 38, 825–833.

Szewczyk, B., Rabalski, L., Krol, E., Sihler, W. and Souza, M. L. (2009). *Baculovirus biopesticides–a safe alternative to chemical protection of plants. Journal of Biopesticides* . 2: 209-216.

Szewczyk, B., Barski, P., Sihler, W., Rabalski, L., Skrzecz, I., Hoyos-Carvajal, L. and De Souza, M. L. (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.

Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I. and. Lobo de Souza, M (2006*). Baculoviruses-re-emerging biopesticides. Biotechnology Advances.* 24: 143-160.

Tanada, Y. (1964). A granulosis virus of the codling moth, *Carpacapsa pomonella*, (Linnaeus) (Olethreutidae, Lepidoptera). *Journal of Insect Pathology*. 6, 378.

Tang, X. D., Xiao, Q., Ma, X. C., Zhu, Z. R. and Zhang, C. X. (2009). Morphology and genome of *Euproctis pseudoconspersa* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes.* 38, 495-506.

Taverner, M.P. and Connor, E.F. (1992). Optical enumeration technique for detection of baculoviruses in the environment. *Environmental Entomology*. 21, 307-313.

Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2: 194-208.

Theilmann, D.A and Summers, M.D. (1986). Molecular analysis of *Campoletis sonorensis* virus DNA in the lepidopteran host *Heliothis virescens*. *Journal of General Virology.* 67, 1961–1969.

Tijssen, P. and Bergoin, M. (1995). Densonucleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses. *Seminars in Virology* . 6, 347-355.

Undeen, A.H. and Fukuda, T. (1994). Effects of host resistance and injury on the susceptibility of *Aedes taeniorhynchus* to mosquito iridescent virus. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 10: 64-66.

van der Wilk, F., van Lent, J.W.M. and Vlak, J.M. (1987). Immunogold detection of polyhedrin, *p10* and virion antigens in *Autographa*

californica nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of General Virology* .68, 2615-2623.

van Oers, M. M. (2006). Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Advanced Virus Research.* 68, 193-253.

van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, E.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.B. (2000). Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, London. 110

van Regenmortel, M. H. V. (1992). Concept of virus species. *Biodiversity and Conservation* 1, 263- 266.

Vlak, J.M., Schouten, A., Usmany, M., Belsham, G.J., Klinge-Roode, E.C., Maule, A.J., Van Lent, J.W. and Zuidema, D. (1990). Expression of cauliflower mosaic virus gene I using a baculovirus vector based upon the *p10* gene and a novel selection method. *Virology*. 179, 312-320.

Vlak, J. M. and Rohrmann, G. F. (1985). The nature of polyhedrin. In *Viral insecticides for biological control*, pp. 489-544. Edited by K. Maramorosh and K. E. Sherman. Orlando: Academic Press

Vincent, C., Andermatt, M. and Valéro, J. (2007). Madex® and VirosoftCP4®, viral biopesticides for codling moth control. In: Vincent, C., M. S. Goethel, and G. Lazarovits (eds) Biological control: A global perspective. CAB International, Cambridge, Massachusetts, USA, pp: 336-343.

Volkman L. E. (2007). Baculovirus infectivity and the actin cytoskeleton. *Curr Drug Targets* 8, 1075-1083.

Wang, X., Zhang, J., Lu, J., Yi, F., Liu, C. and Hu, Y. (2004). Sequence analysis and genomic organization of a new insect picorna-like virus, Ectropis obliqua picorna-like virus, isolated from Ectropis obliqua. *Journal of General Virology* .85, 1145–1151.

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

Wang, P., Hammer, D. A. and Granados, R. R. (1994). Interaction of Trichoplusia ni granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *Journal of General Virology*. 75(8):1961–1967.

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

Williams, T. and Hernández, O. (2006). Costs of cannibalism in the presence of an iridovirus pathogen of *Spodoptera frugiperda*. *Ecological Entomology*. 31: 106-113.

Winstanley, D. and Crook, N. (1993). Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. *Journal of General Virology,* 74, 1599–1609.

Wood, H.A. and Robert, R.G. (1991).Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annual Review of Microbiology*. 45:69-87.

Wormleaton, S., Kuzio, J. and Winstanley, D. (2003) The complete sequence of the Adoxophyes orana granulovirus genome. *Virology*. 311(2):350–365.

Yang, H.W., Cheng, J.F. and Ye, Z.C.(2001). Research and application of biological control for agricultural pest insects in China. The Development Strategy of Plant Protection in 21 Century. Beijing: China Science and Technology, Press. pp. 91-99.

Yearian, W.C. and Young, S.Y. (1982). Control of insect pests of agricultural importance by viral insecticides. pp. 387. In: Microbial and viral pesticides, (E Kurstak, Ed). Marcel Dekker, Inc., New York.

Yule, G. B., and Lee, P. E. (1973). A cytological and immunological study of *Tipula* iridescent virus-infected *Galleria mellonella* larval hemocytes. *Virology*. 51: 409-423.

Zanotto, P. M., Kessing, B. D. and Maruniak, J. E. (1993). Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology.* 62, 147-164.

Zhang, Y. A., Qu, L.J. and Wang, Y.Z. (2007). Using Virus to Restore and Construct Stable Forest Ecosystem for Pest Insects Control. *Chinese forestry science and technology.* (in Chinese)，4(6):53-61

Zhang, G.Y., Zhang, Z.X. and, Sun, X.L. (1996). Evaluation of the application effectiveness of a new formulation of *Helicoverpa* NPV insecticide - an emulsifiable suspension. *Chinese Journal of Biological Control.* 12(1), 24-28.

Zhang, G. Y. 1989. Commercial viral insecticide-*Heliothis armigera* viral insecticide in China. The IPM Practitioner. pp.13.

Zou, Y. and Young, S.Y. (1996). Use of a fluorescent brightener to improve *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus activity in the laboratory and field. *Journal of Economic Entomology* (USA). 89(1), 92-96.

http://www.trevorwilliams.info/Ecology_baculoviruses.htm
http://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5368220

http://www.eurekalert.org/multimedia/pub/5356.php?from=102129
http://de.wikipedia.org/wiki/Buschhornblattwespen#mediaviewer/File:Neodiprion_sertifer_chenilles.JPG
http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/leaf/saltmarsh_caterpillar.htm

Abstract

Baculoviruses are insect pathogen specific factors, this family includes four genuses,, like Nucleopolyhedroviruses (NPV) Granulovirus (GV). Which are surrounded by occlusion bodies (OB).

The present study aimed to isolate occlusion bodies (OB) from infected larvae of 5 Lepidopteran species, *Autographa gamma* , *Pieris rapae* , *Hyles lineate*, *Helicoverpa armigera*, *Vanessa cardui*, insects were collected from different regions from Syria in 2011-2009. *A. gamma* were collected from *Malva sylvestris* and *Agropyron repens* L. from some fields in Douma (Damascus countryside), *P. rapae* from *Brassica oleracea* and *Brassica oleracea* var. *botrytis* from Countryside Daraa, *H. lineate* from Saasaa and Jdaidet Artoz (Damascus countryside), *H. armigera* from Countryside Daraa, *V. cardui* from Jdaidet Artoz and Saasaa (Damascus countryside), *Helicoverpa* (*Heliothis*) *armigera* from cotton fields in AL-Malkia and AL-Kameshli in Al Hasaka in 2009-2011. There were no anti-microbial in all fields and orchards study, which have been selected at all.

The study showed the possibility of infection by Nucleopolyhedroviruses of all larvae, according virtual symptoms. The results also show that the percentage of the death of *Helicoverpa* (*Heliothis*) *armigera* caused by viral disease 9.9% in AL-Malkia and 11.6% in AL-Kameshli region area. Differed percentage of larval mortality caused by viral infection during the months of study in the areas of study, with the ratio ranged between 1.5% and 14.3%, and 2.9% and 14.7% in the regions of AL-Malkia and AL-Kameshli in a row, with the highest percentage of death in August in the two regions, 14.3% in AL-Malkia area and 14.7% in AL-Kameshli region.

Occlusion bodies (OB) were Isolated from these larvae in the biotechnology laboratory in the College of Agriculture, University of Damascus,

the study of viral commentator isolated from infected insect larvae showed the presence of by proved (OB) in each of *A. gamma*, *P.rapae* , *H. lineata, H. armigera, V.cardui* collected from fields as well as in insects infected, and when you use a chip count of the samples taken from *V.cardui* number of OB was 2.7×10^6 / larva while the number was 3.1×10^4 at *P.rapae* and 2.2×10^5 in *H. lineata* leaves and 1.6×10^5 in *H. armigera* and 3.6×10^4 in *A. gamma*. The study proved that proved (OB) were isolated from dead or infected larvae with these viruses were belonged to the genus Nucleopolyhedroviruses and so studied using light microscopy and the lack of colored dye during blue bromophenol. purified OBs which had electrophoresis gel using acrylamide 10% after the dye b brilliant blue R Coomassie showed that the molecular weight of kDa 30 in each of *A. gamma*, *P.rapae* , *H. lineata, H. armigera, V.cardui* .The results of acute molecular diagnostics for viruses using the test the PCR specialized primers detects gene Albolahedrin from DNA were isolated from the larvae of *A. gamma*, *P.rapae* , *H. lineata, H. armigera, V.cardui* .which have been selected after seeing the OB in insects studied positive results in the initiator studied.

Cutting the DNA isolated viruses from larvae *A. gamma*, *P.rapae* , *H. lineata, H. armigera, V.cardui* showed presence of different bands within the agarose gel, and when the use of data to draw restriction enzymes profiling using informatics program TREECON (1.3b) found that the samples studied were divided into two groups, the first group: viruses isolated from larvae of *A. gamma*, (Damascus countryside) and *H. armigera* (Hasaka), while the second group includes the isolated viruses from *V.cardui* (Damascus countryside), and *H. lineata*

(Damascus countryside) and *P.rapae* (Daraa). On the other hand three Three viral isolates effectiveness were evaluatied on the fourth instar larvae of *G. mellonella*, these isolates were: isolate 223 from infected *V. cardui* larvae, were collected from Jdaidet Artoz in 2011, and isolate 166 which collected from *A gamma* larvae were collected from some of fields in Douma in 2010, and isolate 7 from infected *V. cardui* larvae which collected from Saasaa fields in 2010. Results showed observed superiority of the isolation of viral isolate 166 by comparing isolate 7 and significantly by comparing isolate 223 at level 1%. Also the effectiveness of isolate166 has been testing on the first five larval instar of *Zeuzera pyrina,* the results showed that the larvae sensitivity of viruses decrease when larva becom older, where the largest percentage of the death in first instar larvae 93.33%, and least 6.66% of the fifth instar larvae. Which establishes the use of these larvae in the production of the virus and thus work on the replacement of conventional pesticides with the virus in insect control.

Faculty of Agriculure
Department of Plant Protection

Study for detection and Identification of Baculoviridae on natural hosts of some Lepidopteran insects in Syria

Thesis submitted for PhD degree in Agriculture science
(Plant Protection)
By

Ghonwa Ahmad Mouhammad

Supervised by

Dr. Abdulnabi Bashee

2015