P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2016,10 (2) :51-55

دراسة إمراضية نسيجية لتأثيرات العزلة المحلية لفيروس *Spodoptera littoralis* Nucleopolyhedrovirus على يرقات دودة ورق القطن *Spodoptera littoralis* (Boisd.) في العراق

عز الدين عطية عربي البيار* لمياء كاظم عبيد* حسام الدين عبد الله محمد صالح**

*جامعة الأنبار كلية العلوم
**جامعة بغداد كلية الزراعة

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: 2016/09/07
تاريخ القبول: 2017/02/12
تاريخ النشر: 29/ 10/ 2017
DOI: 10.37652/juaps.2016.132598

الكلمات المفتاحية:
SpoNPV،
Baculoviruses،
Spodoptera littoralis،
Nucleopolyhedrovirus,
Peritrophic membrane.

الخلاصة:

هدف الدراسة الحالية هو إلقاء الضوء على التأثيرات الحاصلة في المعي الوسطي midgut وخاصةً غشاء Peritrophic membrane الذي يعتبر كخط صد أول ليرقات دودة ورق القطن *Spodoptera littoralis* (Boisd) ضد الأجسام الضمينة occlusion bodies OBs (وهي بروتينات متبلورة تشكل وتضم النيوكليوكابسيد) لفيروس Nucleopolyhedrovirus *Spodoptera littoralis* المعزول محلياً والذي إستُعمل كعامل سيطرة بيولوجية في السيطرة على هذهِ الآفة الزراعية. إن للتخصص العالي لفيروسات Baculoviruses كعامل سيطرة بيولوجية لعوائل حشرية محددة دور كبير في برامج السيطرة المتكاملة على الآفات الزراعية وبالتحديد فيروس SpoNPV الذي يكون عالي التخصص في إصابة يرقات دودة ورق القطن *S. littoralis*. وقد أشارت النتائج الى حدوث تفكك وتهشم لغشاء Peritrophic membrane في المعي الوسطي ليرقة دودة ورق القطن بالعمر اليرقي الرابع بعد 24 ساعة من التعرض الى تناول غذاء ملوث بالأجسام الضمينة OBs لفيروس SpoNPV، كما أكد الفحص المجهري للمقطع العرضي للمعي الوسطي لليرقات وبعد مرور 48 الى 72 ساعة من الإصابة الفيروسية إجتياح الجسيمات الفيروسية لبقية الأنسجة الداخلية للجهاز الهضمي و إمتداد الإصابة لتصل الى الأجسام الدهنية fat bodies وأنسجة القصيبات الهوائية و حتى أنسجة الأدمة و خلايا كيوتكل اليرقة الخارجي. وإستناداً لنتائج الفحص النسيجي ليرقات *S. littoralis* المصابة بفيروسات SpoNPV يعد الفيروس عامل سيطرة بيولوجي فعال ومتخصص وآمن بيئياً في السيطرة على هذه الآفة الخطيرة.

المقدمة:

الإفراط في إستعمال المبيدات الحشرية للسيطرة على يرقات حشرة *Spodoptera littoralis* (Boisd) أدى الى مقاومتها لمختلف أصناف المبيدات الحشرية الكيمياوية (17)، إضافة الى المخلفات السمية والتأثيرات الملوثة للبيئة (24، 6) والتأثير السلبي على الكائنات الحية غير المستهدفة (7) وهذا ما تم تأكيده في عدة دراسات. وللتقليل من أضرار السيطرة الكيمياوية على الآفات الزراعية تم التوجه التطبيقي الى السيطرة الإحيائية ومن بين عواملها الفيروسات التي تعمل بصورة متخصصة على مدى واسع من الآفات الحشرية وبالتحديد Baculovirusres وهي مجموعة فيروسية كبيرة لأفرادها DNA مزدوج وتصيب اللافقريات فقط، وتصنف ضمن عائلة Baculoviridae عدة أجناس منها Nucleopolyhedroviruses(NPVs) و Granuloviruses (GVs) (1،21). فيروس SpoNPV من عائلة NPV ويستعمل بصورة متخصصة على يرقات دودة أوراق القطن والتي تعتبر من الآفات التي

* Corresponding author at: University of Anbar College of Science .E-mail address:

تهاجم معظم المحاصيل الزراعية وخاصة محاصيل الزراعة المغطاة (3،22). إن دودة ورقة القطن *S.littoralis* تعتبر من الآفات الرئيسية في محاصيل القطن والعائلة الباذنجانية و تكمن خطورتها في مهاجمة اليرقات حديثة الفقس للبشرة السفلى لورقة النبات المصاب (موضع وضع البيض) وتلتهم اليرقات غالبية اوراق النبات والبراعم الزهرية والورقية ولها سعة تكاثرية تصل بالمعدل الى 1000 بيضة/أنثى (25،23)، وهي من الحشرات المتعددة المضائف polyphagous و التي تسبب أضراراً لأكثر من 44 عائلة نباتية في ظروف المناخ المعتدل والإستوائي (9،10).

درست عائلة فيروسات Baculoviruses بصورة واسعة و هي من أكبر العوائل الفيروسية المدروسة عالميا في هذا المجال، و بالرغم من أنها تصيب أكثر من 600 نوع من الحشرات (12) فقد عزلت أفراد مصابة بصورة طبيعية و قد أظهرت مدى محدود من المضائف والتي تصيب أنواع قريبة لها وراثيا فقط. وقد أصبح من المسلم به أن Baculoviruses كفؤة جدا بشكل فعال كعامل أحيائي للسيطرة على الحشرات وبمختلف عوائلها (11، 4)، ومنها رتب Diptera و Hymenopterans و Trichoptera. وقد توجه الإهتمام مؤخرا بالإعتماد على عوامل السيطرة البيولوجية في السيطرة على الآفات الزراعية كالمركبات التي تعتمد على البكتريا والفطريات و الفيروسات (14)، وقد وجد أن هذه المجاميع ذات طابع منفرد في إختيار المضيف وفي طريقة الإصابة (2) وقد تختلف خصائص النتائج بالإعتماد على العوامل الخارجية أو الداخلية للكائن الحي وبيئته.

ونظرا للحاجة الى إيجاد بديل بيولوجي محلي عن المبيدات الكيمياوية، هدفت الدراسة الى التشخيص النسيجي ليرقات عثة دودة ورق القطن *S. littoralis* بالعمر اليرقي الثالث متعرضة للإصابة بالعزلة المحلية لفيروس SpoNPV لإستعماله مستقبلا كمبيد بيولوجي معتمد للسيطرة على هذه الآفة.

طريقة العمل:

مصدر حشرة الإختبار: جمعت عزلة من حشرة عثة ورق القطن *S.littoralis* من كلية الزراعة /جامعة بغداد / قسم وقاية النبات، تمت تربية الحشرات البالغة (الذكور و الإناث) في أقفاص خشبية خاصة لتربية الحشرات وغذيت بمحلول سكري (10%) غمست قطعة قطن فيه لتحفيز الإناث على وضع البيض، تم وضع أصص حاوية على نبات الباذنجان كأماكن لوضع البيض على أوراقه، بعدها جمعت لطع البيض من الأوراق و حضنت في حاويات بلاستيكية لحين الفقس و الوصول للعمر اليرقي المطلوب للدراسة و إجراء التجارب المطلوبة على اليرقات.

مصدر العزلة الفيروسية: شُخص فيروس Spo NPV من قبل أ.م.د. حسام الدين عبد الله / أستاذ علم إمراضية الحشرات في قسم وقاية النبات/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد وذلك من خلال جمع حقلي ليرقات دودة ورق القطن *S. littoralis* المصابة بفيروس Spo NPV و التي ظهرت عليها العلامات الأولى للإصابة و التي تتميز بالتغير التدريجي في لون اليرقة مصحوباً بزيادة في لمعان وعتامة الجلد وإمتناع اليرقات عن التغذية و تصبح اليرقات المصابة كسولة و تفقد قابليتها على الحركة و تتحول المحتويات الداخلية وخاصةَ المنطقة الوسطى من جسم اليرقة المصابة الى مادة سائلة حليبية اللون (18). كما تُظهر اليرقات المصابة إنتفاخات في مناطق الإصابة و يبدأ الكيوتكل بالتصدع والتشقق وعند وصول الإصابة الفيروسية الى مراحلها الأخيرة في جسم اليرقة فتبدأ الأحشاء الداخلية لليرقة بالذوبان و تسيل من التشققات الجلدية لليرقة الميتة بسبب إصابة الخلايا الجلدية بالأجسام الفيروسية مؤديةَ الى ذوبان و تشقق جلد اليرقة (5، 20).

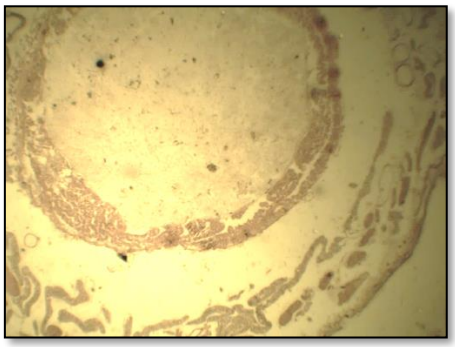
مستعمرة يرقات عثة ورق القطن: مختبريا ربيت عزلة من حشرة عثة ورق القطن *S.littoralis* تمت تنقيتها لثلاثة أجيال، للتخلص من أي مؤثرات للمبيدات الكيمياوية التي قد تكون تعرضت لها أسلافها في الحقل، في مختبرات كلية العلوم / جامعة الأنبار، بظروف مختبرية محكمة بدرجة حرارة $25\pm2\ ^0C$ و رطوبة RH 65-70% و بدورة إضاءة طبيعية لحين وصولها الى العمر اليرقي الثاني و الرابع لإجراء التجارب المطلوبة عليها (11). إذ غذيت اليرقات حديثة الفقس على تغذية شبه مصنعة و التي تتكون من مزج 250 غرام فاصوليا بيضاء، 15 غرام ascorbic acid، 1.2 غرام sorbic acid، 20 غرام أكار، 80 غرام خميرة خبز، 5 غرام natrium benzoate و 1200 مللتر ماء معقم فائق التقطير (15). طبخت جميع المكونات على نار هادئة بإستثناء ascorbic acid الذي تمت إضافته بعد رفع المكونات من النار لحين وصولها لدرجة 50^0 C ثم صب المزيج في أطباق بلاستيك بقطر 7 سنتمتر و بسمك 3 ملمتر، حفظت بدرجة $5\ ^0C$ لحين الإستعمال. عزلت اليرقات قيد الدراسة ذات العمر اليرقي الثاني و الرابع بصورة مفردة (كل يرقة في وعاء خاص مع قطعة من الغذاء سابق التحضير) لإجراء التجارب المطلوبة عليها.

التشخيص النسيجي لفيروسSpo NPV في مقاطع عرضية ليرقات *S.littoralis* مصابة بالفيروس: أُخذت يرقات بالعمر اليرقي الرابع مصابة بفيروس Spo NPV من عزلة الفيروسات المحلية،

بعد مرور 24 و **72** من التعريض و ظهور أعراض الإصابة عليها من قلة حركة و إمتناع عن التغذية، للدراسة النسيجية histopathological study و التشخيصية لفيروس Spo NPV من خلال تأثيره على الأنسجة الداخلية لجسم يرقة دودة ورق القطن عند إصابتها بالفيروس. حُفظت اليرقات المصابة بتركيز 85% Saline solution، تم تثبيت العينات بمحلول alcoholic Bouins solution لمدة 24 ساعة، غُسلت بعدها بكحول ايثانول Ethanol 70%، لغرض تجفيف العينات بعد الكحول و تهيئتها للتصبيغ تم غسلها مرتين في كل مرة 15 دقيقة بكحول اثيلي مطلق absolute ethyl alcohol 100%. تم ترويق العينات لمدة 24 ساعة بمادة بنزوات المثيل methyl benzoate ثم غُسلت بالتولوين toluene لمدة 5 دقائق لإتمام الترويق، بعدها نقلت اليرقات المصابة المعاملة الى البرافين المنصهر بدرجة حرارة C 58^0، ثم تُركت العينات المطمورة بالبرافين لمدة ثلاث ساعات لحين تَجمّد البرافين. تم تقطيع قالب العينات المطمورة بالبرافين بسمك 5 µm ثم صُبغت العينات بصبغات Ehrlisch`s heamatoxylin and eosin كما وُصفت من قبل (16). عينات السيطرة حُضرت وعوملت للدراسة النسيجية بنفس الطريقة السابقة.

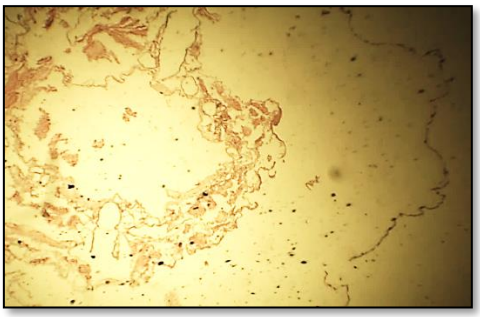
النتائج والمناقشة:

من خلال التشخيص النسيجي للمقطع العرضي ليرقات دودة ورق القطن *S. littoralis* و بإستعمال مجهر ضوئي نوع Leica DM4 B & DM6 B مجهز بكاميرا نوع Nikon موديل DS-Ri2 Microscope Camera مرتبطة بالكومبيوتر، أظهرت معاملة السيطرة أن غشاء Peritrophic للمعي الوسطي ما زال موجوداً و محتفظاً بخصائصهِ الوقائية و النسيجية بظروفهِ الإعتيادية شكل 1. مقارنةً بالتشخيص المجهري للمقطع العرضي ليرقات دودة ورق القطن *S. littoralis* المصابة بفيروس Spo NPV و بعد مرور 24 ساعة من الإصابة وجود تهتكات في غشاء Peritrophic membrane التي سببتها الإصابة الفيروسية و التي تعتبر أولى الأعراض التشخيصية لإبتلاع اليرقة للفيروس مع الغذاء شكل 2. و بالإعتماد على الفحوصات النسيجية المجهرية نلاحظ تفكك هذا النسيج بإتجاه طبقة lumen المعي الوسطي في اليرقة في المراحل المتقدمة من الإصابة أي بعد مرور 72 ساعة شكل 3، كذلك نلاحظ إنتشار الفيروس في بقية أنسجة الجسم و في المناطق العميقة وصولاً الى الخلايا المولدة للمعي الوسطي و غشاءها القاعدي.

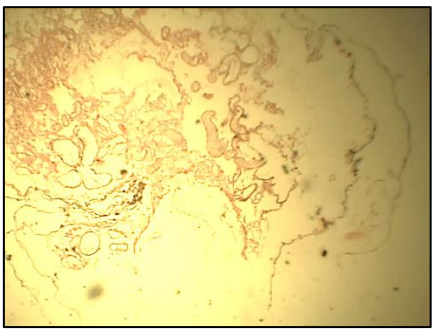


شكل 1 مقطع عرضي بالقوة 40X ليرقة *S. littoralis* بالعمر اليرقي الرابع من معاملة السيطرة مع ملاحظة بقاء غشاء Peritrophic لمنطقة المعي الوسطي و بقية الأنسجة الجسمية

و مع التقدم في الإصابة الفيروسية لوحظ زيادة في عدم وضوح الأنسجة و عدم ترابطها و إستمرار طبقاتها مقارنةً مع معاملة السيطرة، إذ أن المعي الوسطي يعتبر منطقة الإختراق الأولى للفيروس و الذي ينتقل بعدها الى السوائل الجسمية لليرقة و من ثم مهاجمة مختلف مناطق جسم اليرقة.



شكل 2 مقطع عرضي بالقوة 40X ليرقة *S. littoralis* بالعمر اليرقي الرابع بعد مرور 24 ساعة من الإصابة بفيروس SpoNPV و ملاحظة تهتك غشاء Peritrophic و بقية الأنسجة



شكل 3 مقطع عرضي بالقوة 40X ليرقة *S. littoralis* بالعمر اليرقي الرابع بعد مرور 72 ساعة من الإصابة بفيروس SpoNPV و ملاحظة تهتك غشاء Peritrophic و بقية الأنسجة و تمزق الجدار الخارجي لجسم اليرقة المصابة

إن الضرر المصاحب للإصابة بفيروس Spo NPV يزداد بزيادة فترة الإصابة، إذ أن هجوم الفيروس في الإصابة المبكرة يحفز الجهاز

المناعي للحشرة و بوجود الحاجز في المعي الوسطي Peritrophic membrane يكون هناك وقاية ضد هجوم المسبب المرضي الذي يتقيض و ينهار أمام تركيز المسبب المرضي الفيروسي و طول فترة التعرض له (19). كما أكد (8) إن إستمرارية الإصابة و ثباتيتها تؤدي الى عدم الإعتماد على Peritrophic membrane كخط صد أول ضد المسببات المرضية. إن طول مدة التعرض تؤدي الى زيادة نسب القتل بسبب إنطلاق جسيمات الفيروس SpoNPV OBs في المعي الوسطي midgut في اليرقات المصابة و إختراقها لغشاء Peritrophic membrane و من ثم الأنسجة الداخلية للجهاز الهضمي و بالتالي الإنتشار في جسم الحشرة محدثة الضرر التام و من ثم الموت للحشرة المصابة (13). بناءاً على ما أظهرته نتائج الفحص النسيجي للمقطع العرضي ليرقات دودة ورق القطن المعرضة للتغذية بغذاء ملوث بفيروس SpoNPV فالحاجة ضرورية و مُلحة الى التوجه لإستعمال الفيروسات الممرضة للحشرات كعامل بيولوجي فعال و مؤثر في السيطرة على الآفات الحشرية في العراق.

المصادر:

1 (ICTV). 2016. Copyright © International Committee on Taxonomy of Viruses. All rights reserved.

2. Ascher, K. R. S. (1993). Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the Neem tree, *Azadirachta indica*. Arch. Insect Biochem. Physiol.22: 433-449.

3. Bulach, D. M., Kumar, C. A., Liang, B. & Tribe, D. E. (1999). Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedron and DNA polymerase gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology* 73, 59-73.

4. El-Salamouny, S. A. (2007). Observation on the Peritrophic membrane of tortricid and noctuid insect and its role in susceptibility and enhancement. J. Agric. Urban. Entomol. 24(4): 195-204.

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

6. Frank, R., Braun, H. E., Ripley, B. D. and Clegy, B. S. (1990). Contamination of rural ponds with pesticides, 1971-1985. Ontario, Canada. Bull. Environ. Contamin. Toxicol.13: 771-817.

7. Franz, J. M. (1974). Testing of side effects of pesticides on beneficial arthropods in laboratory: a review. Z. Pfl. Krankh. Fl. Schutz, 18: 141-174.

8. Funakoshi, M., Aizawa K. (1989). Viral inhibitory factor produced in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with a Nuclear Polyhedrosis Virus. J invert Pathol 54: 151-155.

9. Hatem, A.E. (2006). Comparacion de los efectos de insecticidas selectivos sobre el desarralloy repoduccion de *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). Thesis Dextoral Universided de Cardoba.240

10. Honsy, M. M.; Moawad, G. G.; and El-Saadany, G. B. (1986). Economic damge thresholds of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) in Egypt. Crop Prot.; 5: 100-104.

11. Huber, J.: Use of Baculoviruses in pest management programs. In "The biology of Baculoviruses" Volume 2. Edited by: Granados RR, Federici B. CRC Press, Boca Raton, F.L.; 1986:181-202.

12. Martignoni ME, Iwai PJ: A catalog of viral diseases of Insects, Mites and Ticks. 4th edition Portland, Oregon: USDA Forest Service PNW-195; 1986.

13. Petrik, D. T.; Iseli, A.; Montelone, B. A.; Van Etten, J. L.; Clem, R. J. (2003). Improving baculovirus resistance to UV in activation increased virulence resulting expression of DNA repair enzyme. 82: 50-56.

14. Rao, N. V.; Reddy, P. S. (1990). Relative efficacy of some new insecticides on insect pests of cotton. Indian J. Plant Port.18: 53-58.

15. Shorey, H.; Hale, R. (1965). Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. J. Econ. Entomol. 58:522-524.

16. Sumner, A. T. and B. H. Sumner, 1969. A laboratory manual of micro technique and histochemistry. Blackwel Scientific publication. Oxford and Edinburgh, pp:236.

17. Tabashink, B. E., Cushing, N. L. and Johnson, M. W. (1987). Diamond back moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to insecticides in Hawaii: Intra-island variation and cross-resistance. J. Econ. Entomol. 80:1091-1099.

18. Tanada, Y. and H. Kaya, (1993). *Insect Pathology*, Academic press, Inc., San Diego, California.

19. Terra, W. R. (2001). The origin and functions of the insect Peritrophic membrane and Peritrophic gel. Arch Insect Biochem Physiol 47: 47-61.

20. Toprak, U. and M. O. Gürkan, 2004. First record of a NPV isolate from *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera:Noctuidae) for Turkey and its molecular identification according to the partial *lef-8* gene. *Turkish J. Biol*., 28 (2-4): 71-77.

21. Volkman, L. E., Blissard, G. W., Freisen, P. D., Possee, R. D. & Theilmann, D. A. (1995). The

Baculoviridae. In Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 104-113. Edited by F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, and M. A. Mayo & M. D. Summers. Vienna & New York: Springer-Verlag.

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

23. **ربيع**، سهى كاظم. حياتية دودة ورق القطن *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). رسالة ماجستير. وقاية النبات/ كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق. 2002.

24. **شعبان**، عواد و نزار مصطفى الملاح. 1993. المبيدات. دار الكتاب للطباعة ز النشر، جامعة الموصل.صفحة 520.

25. **العزاوي**، عبد الله فليح؛ قدو، إبراهيم قدوري والحيدري، حيدر صالح. الحشرات الاقتصادية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد. 652 صفحة. العراق. 1990.

Histopathological study for the effect of local isolate of *Spodoptera littoralis* Nucleopolyhedrovirus on the larvae of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) In Iraq

EZDDIN A. ALBYYAR LAMYA KH. OBAID HUSAM ALDIN A. MOHAMMED SALIH

E.mail:

ABSTRACT

The aim of this current study is to focus on the histopathological changes that happens to the midgut of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisd) larvae especially in the Peritrophic membrane as a main defense line against the occulosion bodies OBs (A crystalline protein matrix which occludes the nucleocapsids) of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus from a local Iraqi isolation that was used as a biological control factor to control this pest. The high specialty of the baculovirus when used as a biological control factor for certain insect families has an important role in full control programs to control pests, especially the SpoNPV virus which is highly specialized in infecting the cotton leaf worm *S. littoralis* larvae. And it was pointed out by results that there was dissociation and disintegration in the midgut Peritrophic membrane of the larva of the cotton leaf worm at the forth larva stage after 24 hours of exposing them to semi-synthesized nutrition with OBs of the SpoNPV. The microscopic test of the cross section of the larva's midgut showed that after 72 hours of viral infection virus particles have speeded through the rest of the inner tissue of the digestive system and invaded it to reach the fat bodies and tracheal system up to the dermis tissues and the outer cuticle cells of the larva. According to the results of the histopathological study of the infected *S. littoralis* with the SpoNPV, the virus is considered to be an effective, specialized and ecological safe biological control factor to control this serious pest.