Iranian Journal of Plant ProtectionScience
Vol 51, No 2, Autumn and winter 2020 (195-207)
DOI: 10.22059/ijpps.2020.302425.1006943

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۹ (۲۰۷-۱۹۵)

جمع‌آوری و تعیین ویژگی جدایه‌های ایرانی ویروس چندوجهی هسته‌ای کرم غوزهٔ پنبه *Helicoverpa armigera* Single Nucleopolyhedro virus (HearSNPV) بر مبنای ژن پلی‌هدرین (*Polh*)

راحله شهبازی[۱و۲]، رضا طلایی حسنلویی*[۱]، مسعود نادرپور[۲]، علی مهرور[۳]، اکبر دیزجی[۱] و فاطمه فتوحی[٤]

۱-گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج.

۲- موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج.

۳- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز.

٤- بخش تحقیقات آنفلونزا و سایر بیماریهای تنفسی انستیتو پاستور ایران، تهران

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۵/۱۳)

چکیده

استفاده از روش‌های مبتنی بر اسیدنوکلئیک در شناسایی ویروس‌ها به دلیل ساختار کوچک ژنومی آن‌ها و تفاوت‌های جزیی در سطح نوکلئوتید بین جدایه‌ها یا استرین‌ها، از اهمیت زیادی برخوردار است. در پژوهش حاضر، لاروهای مرده و/یا بیمار از مزارع گوجه‌فرنگی مناطق مختلف جغرافیایی ایران جمع‌آوری و برای آلودگی باکولوویروسی *Helicoverpa armigera* Single nucleopolyhedrovirus (HearSNPV) با روش بهینه‌سازی شده بر اساس سدیم دودسیل سولفات برای استخراج OBs، بررسی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی (*Polh*-a, *Polh*-b) طراحی‌شده بر اساس ناحیهٔ حفاظت‌شدهٔ ژن پلی‌هدرین (*Polh*) برای ۲۶ جدایهٔ ثبت‌شده از ویروس Hear/*H. zea*-SNPV انجام شد. آلودگی به HearSNPV با تکثیر باندهای مونومورفیک ۳۷۰ و ۷۹۰ نوکلئوتیدی در ۲۸ لارو تأیید شد. همسانه‌سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی باندهای تکثیرشده، تعلق آن‌ها به ژن *Polh* ویروس چندوجهی هسته‌ای گونه‌های *H. armigera* و *H. zea* با شباهت بیش از ۹۹/۶ درصد را نشان داد. تجزیه‌وتحلیل تبارزایی جدایه‌های ایرانی HearSNPV همراه با سایر جدایه‌های ثبت‌شده از این ویروس در دنیا، جدایه‌های ایرانی را در گروه II آلفاباکولوویروس‌ها طبقه‌بندی و کارایی بیش‌تر روش توسعه داده‌شده را اثبات کرد. پژوهش حاضر اولین گزارش از معرفی و شناسایی مولکولی جدایه‌های ایرانی HearSNPV با به‌کارگیری روش PCR و DNA ویروس از لاروهای با هویت نامشخص بیمارگر است. با توجه به حصول اطمینان از مؤثر و مفید بودن این روش در غربال‌گری سریع لاروهای حشرات ازنظر آلودگی به این ویروس و بررسی تبارزایش، بهره‌مندی از آن در پژوهش‌های آینده توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ویروس چندوجهی هسته‌ای، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، *Helicoverpa* sp.، پلی‌هدرین.

Collecting and partial characterization of Iranian *Helicoverpa armigera* Single NucleopolyhedroVirus isolates based on *Polh* gene

Raheleh Shahbazi[1,2], Reza Talaei-Hassanloui[1], Masoud Naderpour[2], Ali Mehrvar[3], Akbar Dizaji[1] and Fatemeh fotouhi [4]

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. 2. Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. 3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. 4. Pasteur Institute, Tehran, Iran.

(Received: une 2, 2020 - Accepted: August 3, 2020)

ABSTRACT

Nucleic acid-based diagnostic approaches are significant methods in the detection and identification of viruses due to their small genome structures and minimal nucleotide differences among virus isolates or strains. In this study, dead or diseased larvae of *Helicoverpa* sp. were collected from tomato fields in distinct geographic areas in Iran, and baculovirus infection was assayed by occlusion body extraction using an optimized Sodium Dodecyl Sulphate method. Two sets of specific polymerase chain reaction (PCR) primer pairs (*Pol-a* and *Pol-b*) were designed based on the conserved polyhedrin gene region of 26 fully sequenced HearSNPV/HzNPV isolates. Accordingly, infection by HearSNPV was confirmed in 28 out of 34 tested larvae by PCR amplification of monomorphic fragments of about 370 and 790 nucleotides, respectively. Cloning and sequencing of those fragments showed that they belong to the corresponding polyhedron gene from nucleopolyhedriviruses of *H. arimegra* and *H. zea* species with 99.6% sequence identity. The phylogeny trees developed for Iranian isolates based on their polyhedron gene sequences showed that they all belong to the Group II *Alphabaculovirus* and formed one clade with other HearSNPV isolates. This further confirmed the efficiency of the developed method for baculovirus detection and characterization. To our knowledge, this is the first report of introduction and molecular characterization of some HearSNPV isolates, circulating in these pests in Iran, using a robust DNA-based approach. The excellent efficacy of this method in virus detection makes it a valuable tool for rapid screening of insect cadavers for HearNPV infection, phylogenic studies, and virus monitoring in bioinsecticides application.

Keywords: nucleopolyhedrovirus, polymerase chain reaction, *Helicoverpa* sp., *polh* gene.

* Corresponding author E-mail: rtalaei@ut.ac.ir

مقدمه

در بین عوامل کنترل میکروبی، باکولوویروس‌ها از ابزارهای مهم برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات به‌ویژه علیه لارو بال‌پولک‌داران مطرح هستند. خانوادهٔ Baculoviridae یک گروه از ویروس‌های اختصاصی بندپایان با ژنوم DNA دو رشته‌ای حلقوی و اندازهٔ متغیر از ۸۰ تا ۱۸۰ هزار جفت‌باز است. نوکلئوکپسیدهای میله‌ای شکل درون ویریون‌ها در کریستال پروتیینی چندوجهی[1] به نام جسم محاط (OB)[2] قرار می‌گیرند. از بین چهار جنس خانواده باکولوویریده، فقط دو جنس آلفا- و بتا-باکولوویروس به‌طور گسترده تجاری و به بازار عرضه شده‌اند (Christian *et al*., 2001; Baillie and Bouwer, 2011; Hasse *et al*., 2015; Ikeda *et al*. 2015). پژوهش‌های جدید بیش‌تر درزمینهٔ زیست‌شناسی مولکولی این ویروس‌ها و به‌ویژه در راستای تغییر ظرفیت حشره‌کشی ویروس با افزایش میزان زهرآگینی آن‌ها متمرکز شده است. باکولوویروس‌ها هم‌چنین به‌عنوان حامل‌های ژن‌درمانی در علوم پزشکی موردتوجه هستند (Woo *et al*., 2006; Kost *et al*., 2005). پیشرفت و توسعه در این زمینه نیاز به شناخت جزییات از ویژگی‌های متمایزکننده باکولوویروس‌ها، ذخایر وسیع ژنتیکی و محتوی تنوع در بین جمعیت‌ها دارد. با هدف درک بیش‌تر و بهتر پدیده‌های فرگشتی باکولوویروس‌ها و هم‌چنین سازوکارهای مولکولی عفونت‌زایی و همتاسازی آن‌ها، توالی‌یابی ژنوم باکولوویروس‌های مختلف توسط پژوهشگران متعددی انجام یافته است (Zhang *et al*., 2005; Chen *et al*., 2002; Ogembo *et al*., 2007; Arrizubieta *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2014; Costa *et al*., 2019). با وجود تعداد زیاد باکولوویروس‌ها در طبیعت، تنها بخش کوچکی از آن‌ها با جزییات مطالعه شده‌اند. تعداد زیادی ویروس چندوجهی هسته‌ای (NPV[3]) در سراسر دنیا از گونه‌های جنس *Helicoverpa* جداسازی شده‌اند. این باکولوویروس آفت کرم غوزهٔ پنبه یا کرم میوهٔ گوجه‌فرنگی *H. armigera* را مورد حمله قرار می‌دهد (Ogembo *et al*., 2005; Mehrvar 2011). با توجه به تغذیه لاروها درون میوه‌ها و بذرهای گیاه میزبان، گسترش مقاومت به حشره‌کش‌ها رو به افزایش است، درنتیجه کنترل آفت را با چالش‌هایی مواجه کرده است. ازاین‌رو، استفاده از عوامل کنترل زیستی به‌ویژه بیمارگرها، نویدبخش کنترل چنین آفاتی محسوب می‌شود. توصیف ژنتیکی جدایه‌های *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus حاکی از تنوع درون‌گونه‌ای بسیار بالا و حضور ژنوتیپ‌های مجزا با فعالیت حشره‌کشی متفاوت است (Ogembo *et al*., 2007; Wang *et al*., 2003; Mehrvar *et al*., 2006)؛ بنابراین تعیین ویژگی و انتخاب ژنوتیپ یا مخلوطی از چندین ژنوتیپ با ویژگی‌های حشره‌کشی مطلوب، عامل مهم در تکوین حشره‌کش‌های بر پایهٔ باکولوویروس است. با ملاحظهٔ مسایل ایمنی زیستی، توسعهٔ تجاری جدایه‌های بومی HearSNPV برای کنترل آفت *H. armigera* بسیار مورد توجه است (Zhang *et al*., 2005; 2014). چندین روش برای شناسایی تیپ‌های وحشی و نوترکیب NPV ازجمله تشخیص میکروسکوپی، روش‌های سرم‌شناسی، روش‌های ایمنی‌سنجی با امواج، هیبریدیزاسیون DNA و استفاده از آنزیم‌های آندونوکلئاز برشی به کار گرفته شده است (Smith and Summers, 1981; Brown *et al*. 1982; Knell *et al*., 1983; Webb and Shelton, 1990; Traverner and Connor, 1992; Baillie & Bouwer, 2011; Christian *et al*. 2001).

کاربرد این روش‌ها یا به دلیل غیرقابل‌اعتماد بودن و مضرات مواد رادیواکتیو محدود شده و یا از توان کافی برای ردیابی تمام چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی برخوردار نیستند. عدم توانایی آنزیم‌های برشی در تشخیص نوع چندشکلی، تعیین مکان مشخص چندشکلی در ژنوم ویروس و هضم ضعیف باند (های) موردنظر در جدایه‌هایی است که از غالبیت کمی برخوردار هستند (Motta *et al*., 2002). باکولوویروس‌ها، پروتیین پلی‌هدرین با ۲۴۵ تا ۲۵۰ آمینواسید را در سطوح بالایی در فاز نهایی عفونت‌زایی

1. Polyhedron (*pl.*: Polyhedra)
2. Occlusion body
3. Nucleopolyhedrovirus

تولید می‌کنند که ژن بیان‌کنندهٔ آن بسیار حفاظت‌شده است. این ویژگی اساس استفاده از این ژن در شناسایی انواع NPV و پژوهش‌های تبارزایی آن‌ها است (Zanotto *et al.*, 1993; Woo *et al.*, 2006). با توجه به عدم اطمینان از آلودگی لاروهای جمع‌آوری‌شده به گونهٔ موردنظر، نیاز به ردیابی قطعه‌ای از ژنوم ویروس است که بتواند لارو آلوده به HearSNPV را از سایرNPVها متمایز کند (Rowley *et al*. 2010, 2011; Baillie and Bouwer, 2011). تاکنون هیچ‌گونه اطلاعات مولکولی از جدایه‌های ایرانی HearSNPV در سطح مولکولی در دسترس نبوده، ازاین‌رو در پژوهش حاضر، جدایه‌های HearSNPV با یک روش قابل‌اعتماد، حساس و سریع بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و توالی‌یابی نوکلئوتیدی ژن پلی‌هدرین شناسایی و روابط تبارزایی آن‌ها در بین NPVهای ثبت‌شده در بانک ژن تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری جدایه‌های ویروس

به‌منظور دستیابی به منبعی از واریانت های بومی ویروس، طی سال‌های ۹۶-۱۳۹۵ از مزارع سنتی بدون سم‌پاشی گوجه‌فرنگی و با علایم خسارت لارو *Helicoverpa* sp. بازدید و لاروهای دارای علایم ظاهری بیماری جمع‌آوری شدند. درمجموع ۳۵ لارو با علایم خاص رنگ‌پریدگی و آب‌دار بادکنکی و یا مرگ از شمال غرب (شامل آذربایجان شرقی ۱۱ نمونه و اردبیل یک نمونه)، شمال شرق (خراسان رضوی ۱۴ نمونه و خراسان شمالی یک نمونه) و شمال کشور (گلستان با نه نمونه) جمع‌آوری شدند.

خالص‌سازی ماتریکس پروتیینی ویروس، با تغییراتی در روش توصیه‌شدهٔ Rowely *et al.*, (2010) و Arrizubieta *et al.*, (2015) انجام شد. لاروها به‌طور جداگانه با۱ تا ۱/۵ میلی‌لیتر، SDS ۰/۱ درصد (W/V) سرد در هاون چینی همگن‌سازی و به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱ تا ۲ دقیقه ورتکس گردید. به‌منظور حذف بقایای درشت مثل کوتیکول از عصاره، میکروتیوب‌ها با نیروی g ۱۰۰ به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ شدند. رونشین به میکروتیوب جدید منتقل شده و ته‌نشین دوباره در SDS ۰/۱ درصد حل و مرحلهٔ قبل تکرار و رونشین حاصله با مرحلهٔ قبل مخلوط و با نیروی g ۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ته‌نشین نهایی پلی‌هدرین در ۱ تا ۱/۵ میلی‌لیتر آب یون‌زدوده حل و پس از ورتکس دوبار با نیروی g۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله با آب مقطر شستشو و سپس در ۳۰۰ میکرولیتر از آب مقطر حل شد. همگی مراحل روی یخ انجام شدند. سوسپانسیون حاصله پس از کنترل کمی (شمارش پلی‌هدر در واحد حجم نمونه با هموسیتومتر نئوبار، عمق ۰/۲ میلی‌متر، مساحت هر مربع کوچک ۰/۰۶۲۵)، در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری گردید.

برای مشاهده و شمارش تعداد OB در نمونه‌ها، ابتدا از سوسپانسیون تهیه‌شده سری‌های رقت کاملاً یکنواخت و همگن تهیه شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر رقت با میکروپیپت در هر طرف شیار لام گلبول شمار (MARIENFELD, Germany) ریخته شد تا زیر لامل پخش گردد. پس از تثبیت ذرات OB در کف شبکهٔ شطرنجی لام به مدت ۱۰ دقیقه، OBs مشاهده و تعداد آن‌ها شمارش شد.

استخراج DNA ویروس و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

استخراج DNA ویروس از OBهای خالص‌شده از هر تک لارو با استفاده از کیت استخراج هم‌زمان DNA/RNA ویروس از سرم، پلاسما و مایعات بدن (Sinapure Viral Kit®) از شرکت سیناکلون طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. یک جفت آغازگر (pol-aF/R جدول ۱) به‌عنوان مارکر شناسایی و غربالگری اولیهٔ ویروس در بین نمونه‌های جمع‌آوری‌شده بر اساس توالی‌های ژن پلی‌هدرین جدایه‌های ثبت‌شده HearSNPV/HzNPV از نواحی مختلف جهان در بانک ژن (جدول ۲) طراحی گردید که انتظار می‌رفت قطعه‌ای به طول تقریبی ۳۷۳ جفت

باز را در واکنش PCR تکثیر دهد. برای دستیابی به توالی کامل ژن پلی‌هدرین در نمونه‌های مثبت یک جفت آغازگر (pol-bF/R جدول ۱) که قطعه‌ای به طول ۷۹۰ جفت‌باز را تکثیر می‌دهد طراحی شد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۵۰ میکرولیتر و با آنزیم *Pfu* DNA polymerase (Thermo scientific, Lithuania) در دستگاه ترموسایکلر BioRad انجام شد.

جدول ۱. توالی و مشخصات آغازگرهای طراحی‌شده برای ردیابی ویروس HearSNPV و تکثیرکامل ژن پلی‌هدرین

Table 1. Charectristics of primer pairs designed to detectoin of HearNPV and amplify *polh* genes.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Reaction conditions	Amplified genomic regions
Polh- aF *Polh*-aR	CGTTACAGTTACAGCCCTAC TTGGTCGCATATTAACAGAC	95°C /3 min, 25 x (94°C /30 sec, 54°C /30 sec, 72°C /30 sec), 72°C /5 min	Partial *Polh* genomic DNA (373 bp)
Polh-bF *Polh*-bR	CGTTACAGTTACAGCCCTAC GATCGAATTTAGATAAAATTATGAG	95°C /3 min, 25 x (94°C /30 sec, 54°C /30 sec, 72°C /1 min), 72°C /7 min	Complete *Polh* genomic DNA (790 bp)

F: forward primer; R: reverse primers; *Polh*: Polyhedrin gene

همسانه‌سازی، توالی‌یابی و آنالیز داده‌ها

محصول PCR تکثیرشده در دو جدایهٔ ویروس از استان آذربایجان شرقی پس از خالص‌سازی با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (GFX Gel Extraction Kit, South Korea)، در ناقل PTG-19T تهیه‌شده از شرکت سیناکلون و بر اساس دستورالعمل شرکت در باکتری *Escherichia coli* استرین XL1-Blue همسانه‌سازی و استخراج پلاسمیدهای نوترکیب (PTG-19T-Hear/Hz-SNPV) به روش لیزآلکالینی (Ehrt & Schnappinger, 2003) انجام شد. بررسی ابتدایی کلون‌های باکتریایی ازنظر حضور پلاسمید نوترکیب با استفاده از کلون باکتری یا پلاسمید استخراج‌شده در واکنش PCR بررسی شد.

توالی‌یابی پلاسمیدهای نوترکیب توسط شرکت Bioron (South Korea) انجام شد. پس از اطمینان از تکثیر ژن پلی‌هدرین در این دو جدایه، در سایر نمونه‌های انتخابی از مناطق جغرافیایی مختلف، محصول PCR تکثیرشده از جدایه‌ها با جفت آغازگرهای Polh-bF/R به‌طور مستقیم و بدون همسانه‌سازی، توالی‌یابی شد.

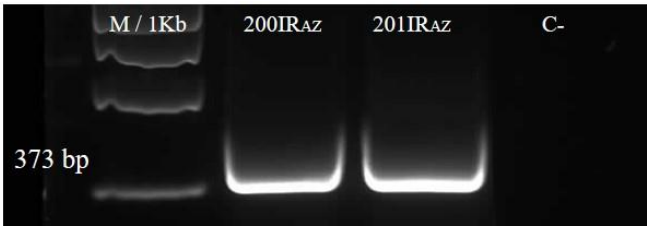
توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده، پس از جستجو و مشابهت‌سنجی در پایگاه داده‌های اطلاعات ژنومی (NCBI) ثبت شد.

نتایج

غربال‌گری اولیه نمونه‌های جمع‌آوری‌شده

در ابتدا تکثیر بخشی از ژن پلی‌هدرین دو جدایهٔ ویروس از استان آذربایجان شرقی (- $200IR_{AZ}$ $201IR_{AZ}$) با موفقیت انجام شد (شکل ۱). قطعات تکثیرشده در حامل PTG-19T همسانه‌سازی و سپس پلاسمید نوترکیب استخراج و توالی‌یابی گردید. توالی نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده با توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن مقایسه و از تکثیر ژن پلی‌هدرین اطمینان حاصل شد. به‌طوری‌که توالی بخشی از ژن پلی‌هدرین در جدایهٔ $200IR_{AZ}$ و $201IR_{AZ}$ از آذربایجان شرقی به ترتیب شباهت ۱۰۰ و ۹۹/۷۳ درصدی با جدایهٔ HaNPV-Rajankute با رأس شمار MH029111 و HaNPV-AC53T5 با رأس شمار KU738904 نشان داد. پس از تأیید ژن پلی‌هدرین در این دو جدایه، از آن به‌عنوان کنترل‌های مثبت در سایر واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز به کار گرفته شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با جفت آغازگرهای ذکرشده در سایر جدایه‌های جمع‌آوری‌شده از نقاط مختلف جغرافیایی به‌منظور تأیید بیماری در لاروهای موردنظر انجام شد (شکل ۲). تکثیر ژن پلی‌هدرین در لاروهای جمع‌آوری‌شده از استان‌های آذربایجان شرقی، خراسان رضوی و گلستان به ترتیب ۹۰/۹، ۷۵ و ۷۵ درصد

موفق بود. هم‌چنین از یک نمونه جمع‌آوری‌شده از استان اردبیل و خراسان شمالی، هر دو آلوده به ویروس موردنظر بوده است.

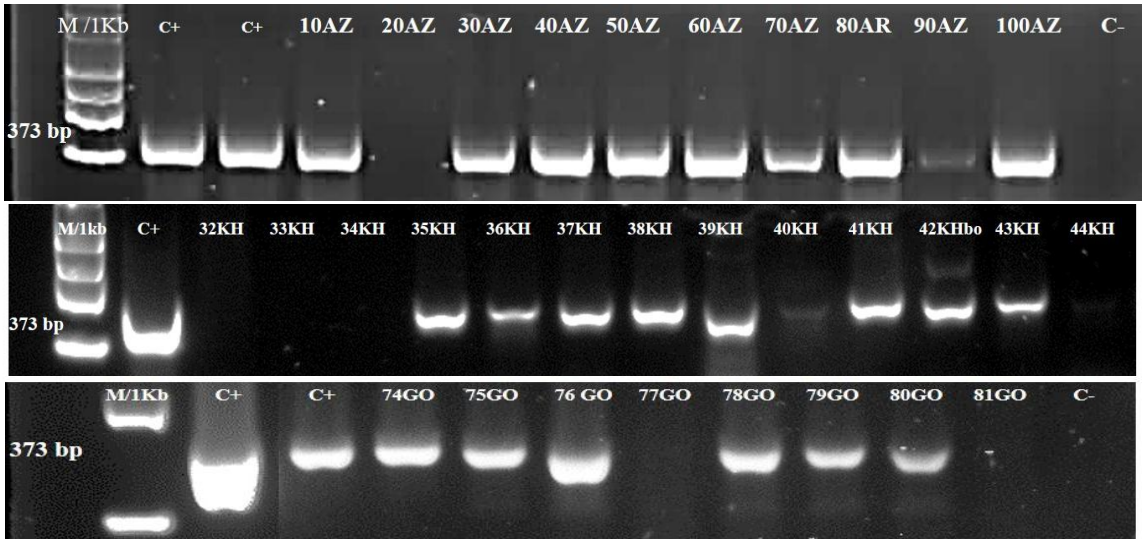


شکل ۱. تکثیر بخشی از ژن پلی‌هدرین (قطعهٔ ۳۷۳ جفت بازی) HearSNPV با جفت آغازگرهای Polh-aF/R در دو جدایهٔ جمع‌آوری‌شده از آذربایجان شرقی، -C: شاهد منفی (لارو عاری از ویروس) M: مارکر kb ۱.

Figure 1. PCR amplification of a 373 bp fragment of partial *pol* gene in two isolates of HearSNPV from East Azarbaijan. C- and M indicate negative control and DNA ladder (1Kb), respectively

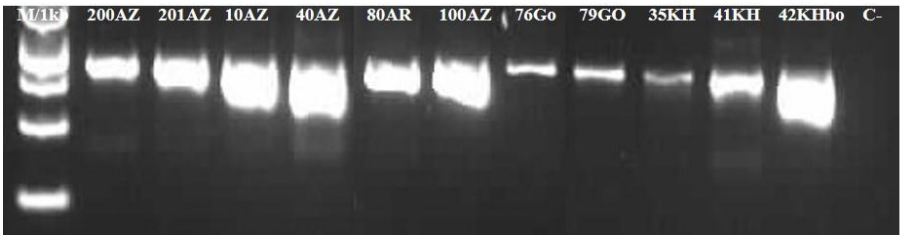
توالی‌یابی ژن پلی‌هدرین و تعیین موقعیت جدایه‌های ایرانی ویروس HearSNPV

از بین نمونه‌های آلوده به HearSNPV جمع‌آوری‌شده مشکوک به آلودگی با HearSNPV، پنج نمونه از استان آذربایجان شرقی، دو نمونه از هر یک از استان‌های خراسان رضوی و گلستان و یک نمونه از استان‌های اردبیل و خراسان شمالی انتخاب گردید. قطعه ۷۹۰ جفت بازی (ژن کامل پلی‌هدرین) جدایه‌های ویروسی در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با جفت آغازگرهای polh-bF/R تکثیر گردید (شکل ۳). پس از توالی‌یابی جهت تأیید گونه ویروس، توالی‌ها در پایگاه داده‌های اطلاعات ژنومی شباهت‌سنجی شد و گونهٔ ویروسی HearNPV در تمامی جدایه‌ها تأیید شد. توالی کامل ژن پلی‌هدرین جدایه‌های ایرانی به‌دست‌آمده در این پژوهش در بانک ژن ثبت گردید (جدول ۲).



شکل ۲. الکتروفورز محصول PCR بخشی از ژن پلی‌هدرین (قطعه ۳۷۳ جفت بازی) HearSNPV روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در لاروهای جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف جغرافیایی. A) کد AZ: نمونه‌های آذربایجان شرقی (کد 80AR از اردبیل)، B) کد KH: نمونه‌های خراسان رضوی (42KHbo از خراسان شمالی)، C) کد GO: نمونه‌های گلستان، C^+ و -C: به ترتیب شاهد مثبت (جدایهٔ $200IR_{AZ}$) و منفی: (لارو عاری از ویروس)، M: نشانگر وزن مولکولی 1kb.

Figure 2. PCR amplification belonging to the partial *pol* gene (fragment of 373 bp) HearSNPV on 1.5% agaros gel in HearNPV-infected cadavers collected from different geographic regions of Iran. A) AZ: East Azarbaijan (80AR from Ardabil) B), KH: Khorasan Razavi (42KHbo from North Khorasan), C) GO: Golestan provinces. C- and M indicate negative control and DNA ladder (1Kb), respectively (Fermentas).



شکل ۳. الکتروفورز محصول PCR ژن کامل پلی‌هدرین (تکثیر قطعه ۷۹۰ جفت بازی) جدایه‌های ایرانی انتخابی HearSNPV (AZ: نمونه‌های آذربایجان شرقی (کد 80AR از استان اردبیل)،GO: نمونه‌های استان گلستان KH: نمونه‌های خراسان رضوی (42KHbo از استان خراسان شمالی)، -C: شاهد منفی (لارو عاری از ویروس)، M: نشانگر وزن مولکولی 1kb.

Figure 3. PCR amplification belonging to the complete *pol* gene (fragment of 790 bp) of selected HearSNPV isolates. AZ: East Azarbaijan (80AR from Ardabil), GO: Golestan, KH: Khorasan Razavi (42KHbo from North Khorasan) provinces. C- and M indicate negative control and DNA ladder (1Kb), respectively (Fermentas)/

جدول ۲. مشخصات و رس‌شمار ژن پلی‌هدرین جدایه‌های ایرانی HearSNPV ثبت‌شده از این پژوهش در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن.

Table 2. Accession numbers of the *polh* amplified from the studied HearSNPV Iranian isolates.

Iranian Isolate	Collected date / Geographic region	Accession number
$200IR_{AZ}$	East Azarbaijan/2013-2014	MN840078
$201IR_{AZ}$	"	MN840079
$10\ IR_{AZ}$	"	MN840074
$40IR_{AZ}$	"	MN840075
$80IR_{AZ}$	Ardabil/ 2013-2014	MN840076
$100IR_{AZ}$	East Azarbaijan/2013-2014	MN840077
$35IR_{KH}$	Khorasan razavi /2016	MN840082
$41IR_{KH}$	"	MN840083
$76IR_{GO}$	Golestan /2017	MN840080
$79IR_{GO}$	"	MN840081
$42\ IR_{NK}$	North Khorasan/2017	MN840084

توالی‌های ژن پلی‌هدرین به‌دست‌آمده با سایر جدایه‌های NPV از جنس‌های مختلف باکولوویروس ثبت‌شده در بانک ژن جدول ضمیمه با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 زیرهم‌چینی و تبارنامه جدایه‌های ویروس بر اساس این بخش از ژنوم بازسازی گردید (شکل ۴). توالی‌های ژن پلی‌هدرین، ۱۱ مکان چندشکلی تک نوکلئوتید[4] (SNP) به‌طور مشترک در بین جدایه‌های ایرانی نشان داد. هم‌چنین در جدایه‌های $76IR_{GO}$ و $79IR_{GO}$ از استان گلستان و جدایه‌های $35IR_{KH}$ و $41IR_{KH}$ از استان خراسان رضوی در موقعیت ۴۸ از کدون آغازین (G—›T) و موقعیت ۶۹ از کدون آغازین (G—›A) SNP اختصاصی این جدایه‌ها مشاهده می‌شود. تبارنامهٔ رسم‌شده بر اساس توالی ترجمه‌شدهٔ آمینواسیدی پروتیین پلی‌هدرین جدایه‌های ایرانی، تمامی نمونه‌های ردیابی‌شده را با اعتبار شاخهٔ ۹۹ درصد در کلاد HearSVPV/HzNPV و در گروه II جنس *Alphabaculovirus* قرار داد. گونه‌های جنس *Betabaculovirus*، *Deltabaculovirus* و *Gammabaculovirus* با اعتبار شاخهٔ بالا از این جنس جدا شدند. فیلوگرام با CuniNPV از جنس *Deltabaculovirus* ریشه‌دار شده است.

بحث

رشد جمعیت جهانی بشر و نیاز به افزایش کمی و کیفی (سالم) محصولات غذایی ازیک‌طرف، تغییرات اقلیمی جهانی و مساعد شدن شرایط رشدونمو و پراکنش جغرافیایی حشرات، توسعه مقاومت به حشره‌کش‌های مرسوم و گیاهان تراریخته از طرف دیگر، نیاز به پژوهش‌های کاربردی در برنامه‌های کنترل زیستی را شدت بخشیده است (Rowely *et al*., 2011). باکولوویروس‌ها توانایی توسعه به‌عنوان آفت‌کش‌های زیستی بالقوه را دارا هستند. ازآنجایی‌که

4. Single Nucleotide Polymorphic

جدایه‌های بومی روی جمعیت‌های بومی آفت در حالت کلی زهرآگینی بالاتری دارند، شناسایی سویه‌های بومی یک منطقه با بیشینهٔ ظرفیت کنترل آفت پیش از تولید و توسعهٔ یک آفت‌کش زیستی ضروری به نظر می‌رسد (Figueiredo *et al*. 1999; Chen *et al*., 2002; Arrizubieta *et al*., 2013)؛ چراکه زهرآگینی ویروس با توجه به بیوتیپ میزبان و منطقهٔ جغرافیایی جمع‌آوری ویروس هم متفاوت است (Barrera *et al*., 2011) و چه‌بسا/شاید جدایه‌های غیربومی، فعالیت سویه‌های بومی یک منطقه را کاهش می‌دهند (Munoz & Caballero, 2000). مطالعه و شناسایی جدایه‌های اختصاصی یک منطقه با روش‌های تشخیصی قابل‌اعتماد و قدرتمند در ردیابی صحیح و دقیق ضرورت دارد. برای غلبه بر محدودیت‌های آنالیز آنزیم‌های برشی (Baillie & Bouwer, 2011; Christian *et al*. 2001) در شناسایی ویروس، تکثیر قطعات ژنومی حفاظت‌شده با PCR و به دنبال آن توالی‌یابی و آنالیزهای تبارزایشی قطعات تکثیرشده بسیار کارآمد و مؤثر است. ژنوم باکولوویروس‌های بال‌پولک‌داران توالی‌یابی شده تا به امروز ۶۲ ژن مشترک را دارا هستند (Arizubieta *et al*., 2015). تعدادی از این ژن‌های اصلی دارای توالی موتیف‌های به‌شدت حفاظت‌شده هستند که امکان طراحی الیگونوکلئوتیدهای دژنره اختصاصی برای تشخیص دو جنس گسترده باکولوویروس‌ها (آلفا و بتاباکولوویروس‌ها) را فراهم می‌آورند.

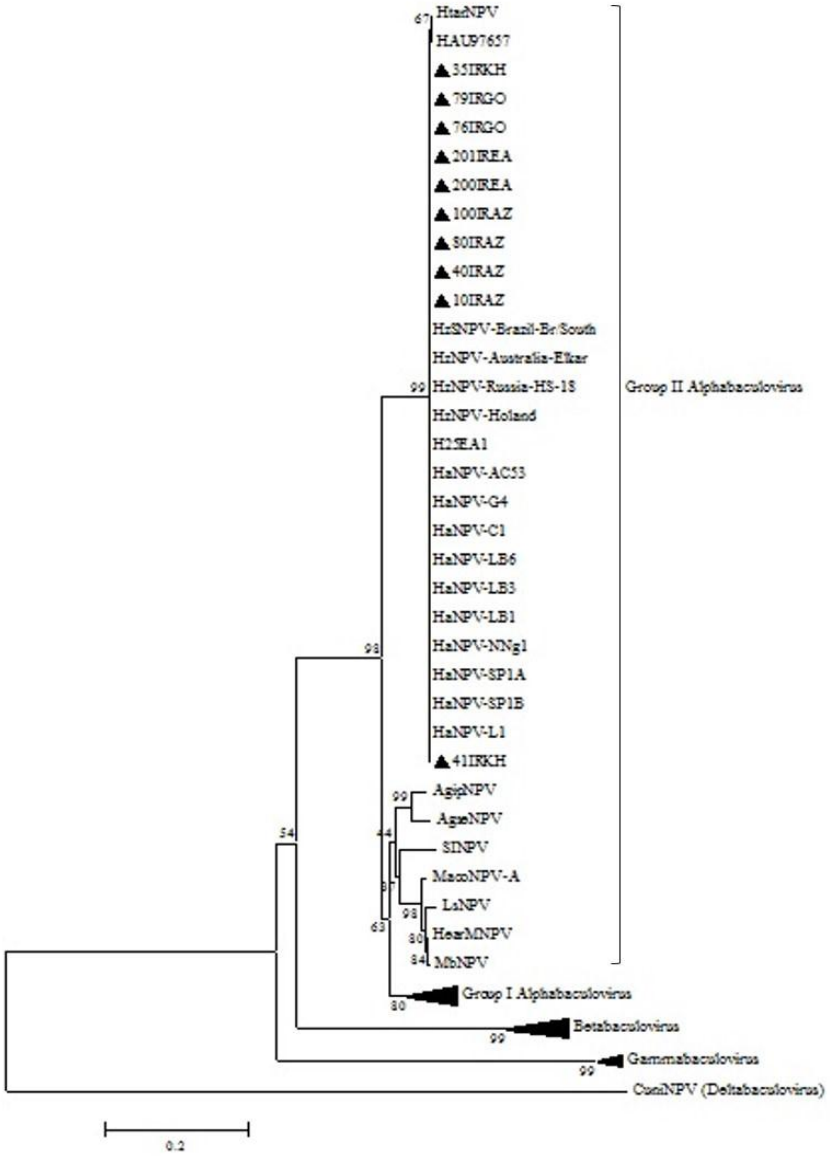
در طراحی این آغازگرها قطعات سه ژن بسیار حفاظت‌شده ازجمله پلی‌هدرین/گرانولین (*Pol/gran*)، *late expression factor* 8 (*lef* 8)، *late expression factor* 9 (*lef* 9) هدف هستند. سپس آنالیز توالی‌های به‌هم‌پیوسته این قطعات، وضعیت درخت تبارزایش را برای کامل کردن مجموعه ژن‌های اصلی مشخص می‌کند؛ بنابراین امکان پیش‌بینی ارتباط یک ویروس نامشخص با ویروس‌های شناخته‌شده را فراهم می‌آورد (Lange *et al*., 2004; Jehle *et al*., 2006). تکثیر با واکنش PCR و توالی‌یابی ژن‌های حفاظت‌شدهٔ باکولوویروس‌های اختصاصی بال‌پولک‌داران، ازجمله ژن پلی‌هدرین، برای تعیین گونه و آنالیزهای تبارزایی باکولوویروس‌ها متداول است (Rowley *et al*. 2010, Rowley *et al*. 2011; Baillie and Bouwer, 2011; Lang *et al*. 2004; Christian *et al*. 2001). پروتیین پلی‌هدرین در NPVهای بال‌پولک‌داران بسیار شبیه و بین ۹۰-۸۵ درصد شباهت آمینواسیدی دارند، اگرچه بسته به گونهٔ ویروس، طول و وزن مولکولی متفاوت دارد (Woo *et al*. 2006). ژن پلی‌هدرین بال‌پولک‌داران حدود ۵۰ درصد هم‌ساختی (Homology) در اسیدهای آمینه با پروتیین گرانولین گرانولوویروس‌ها و ۴۰ درصد شباهت با پلی‌هدرین ویروس‌های چندوجهی هسته‌ای بال‌غشاییان نشان دادند (Rohrmann, 1992). این میزان بالای شباهت، راه‌برد طراحی آغازگر یونیورسال به‌منظور تشخیص سریع و زودهنگام آلودگی به NPV را بهبود می‌بخشد. مزیت این روش این است که می‌توان از همه توالی‌های ژن پلی‌هدرین ویروس‌های چندوجهی هسته‌ای موجود در پایگاه داده‌های ژنومی و یک برنامه نرم‌افزاری ساده به‌منظور انتخاب دومین نامزد مناسب برای تکثیر بهره جست. این آغازگرها امکان تکثیر DNA از بسیاری از گونه‌های NPV و پژوهش‌های بعدی برای گونه‌های ناشناخته را به‌طور کارا و مؤثر فراهم می‌آورد (Galal, 2009). در این پژوهش، ابتدا بر اساس توالی‌های حفاظت‌شدهٔ ژن پلی‌هدرین در جدایه‌های HzNPVs/HearSNPVs، یک جفت آغازگر برای غربال‌گری اولیهٔ نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از محیط و آلوده به ویروس موردنظر طراحی شد. آنالیز ژن پلی‌هدرین در بین جدایه‌های ایرانی و مقایسه آن‌ها با توالی ژن پلی‌هدرین از جدایه‌های HearSNPVs/HzNPVs نواحی مختلف دنیا، هم‌ساختی بسیار بالایی (بیش از ۹۹/۶ درصد) هم در توالی نوکلئوتیدی DNA و هم در توالی آمینواسیدی آشکار کرد. هم‌چنین آنالیز Neighbor-joining تبارنامهٔ ژن پلی‌هدرین، تمام جدایه‌های ایرانی را با اعتبار ۱۰۰ درصد در گروه II جنس *Alphabaculoviruses* خوشه‌بندی کرد. پروتیین پلی‌هدرین NPVهای گروه II، ۲۴۶ اسیدآمینه در مقایسه با NPV های گروه I با ۲۴۵ آمینواسید دارند

(Woo *et al*., 2006). آنالیزهای مشابهت‌سنجی و هم‌ردیفی توالی ژن‌های پلی‌هدرین جدایه‌های ایرانی با توالی‌های HzNPV /HearSNPV هم‌ساخت نشان داد که همگی جدایه‌های ایرانی متعلق به گونهٔ HearSNPV بوده و آنالیزهای تبارزایشی هم نتوانست جدایه‌های HzNPV و HearSNPV را متمایز کنند. خوشه‌بندی جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های HzNPV حاکی از طبقه‌بندی این ویروس‌ها به‌عنوان یک گونهٔ یکسان است؛ چراکه بر اساس میزبان قابل‌تمایز نیستند. این مسئله قابل‌ذکر است که ساختار ژنومی HearSNPV و HzNPV، شباهت بسیار بالایی در توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی دارند. ویروس‌های چندوجهی شناسایی‌شده از دو گونهٔ فوق پیش‌تر بر اساس گونه‌ای که از آن جداسازی می‌شدند، HearSNPV و یا HzNPV نام می‌گرفتند، اخیراً در گونهٔ *H. armigera* Single nucleopolyhedrovirus (HearSNPV) قرار گرفته‌اند. بر این اساس تمامی جدایه‌هایی که پیش‌تر HzNPV گزارش شده‌اند، به‌عنوان واریانت‌هایی از یک گونه (HearSNPV) بر مبنای توالی بخشی از ژن بسیار حفاظت‌شدهٔ *polh* هستند (Adams *et al*., 2015, Noune & Hauxwell, 2016). در این راستا پژوهشگرانی نظیر Cristian *et al*., (2001) یک روش تشخیصی غربال‌گری سریع بر مبنای PCR و اندونوکلئازهای برشی در شناسایی و تفکیک NPVهای جداشده از گونه‌های جنس *Helicoverpa* sp. با استفاده از ژن پلی‌هدرین به‌منظور درک پراکنش و ژنتیک جمعیت HearSNPV در استرالیا طراحی و ارایه کردند. روش پیشنهادی اساساً در سامانه‌های پایشی پیش و پس از رهاسازی برای حشره‌کش‌های زیستی بهبودیافتهٔ نوترکیب کاربرد دارد. در سال ۲۰۰۹ بر اساس ۱۵۲ توالی نوکلئوتیدی ثبت‌شده از ژن پلی‌هدرین از گونه‌های مختلف NPV، یک جفت آغازگر دژنره یونیورسال در ردیابی NPVهای مختلف طراحی شد. این روش همراه با توالی‌یابی قطعهٔ تکثیری قادر به ردیابی گونه‌های مختلف NPV بود که می‌توان از آن جهت پایش بقایای NPV در محیط، پراکنش تیپ وحشی و ردیابی حشره‌کش‌های باکولوویروسی رهاشده در محیط استفاده کرد (Galal, 2009). هم‌چنین Woo (2001) با مقایسهٔ توالی‌های ژن پلی‌هدرین از ۲۶ گونهٔ نوکلئوپلی‌هدروویروس، آغازگر دژنره از نواحی با حفاظت‌شدگی بالا طراحی که قادر به شناسایی *Autographa californica* NPV، *Hyphantria cunea* NPV، *Bombyx mori* NPV، *Spodoptera exigua* NPV، *S. litura* NPV و *Lymantria dispar* NPV از محیط بود. انتخاب این نواحی امکان تکثیر باکولوویروس‌های بیش‌تر را فراهم می‌آورد. این روش در کنار سادرن هیبریداسیون[5] با استفاده از قطعه تکثیرشدهٔ ژن به‌عنوان پروب، امکان شناسایی ساختار ژن پلی‌هدرین را فراهم می‌آورد. وی کارایی این روش را در ردیابی پراکنش ویروس‌های چندوجهی هسته‌ای و رهاسازی تیپ‌های وحشی و نوترکیب NPV مفید دانست. با توجه به‌دقت پایین تشخیص ویروس‌های یک خانواده با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ایمیونولوژیکی، روش‌های تحلیل بر اساس ویژگی‌های ژنتیکی، روش‌هایی قدرتمند، قابل‌اعتماد، سریع، کم‌هزینه و تکرارپذیر در شناسایی ویروس‌ها در سطح گونه و نژاد است.

علاوه بر این، جستجو و ردیابی جدایه‌های بومی امکان دستیابی به تعداد بیش‌تری از جدایه‌های موجود و درنتیجه سویه‌های کاراتر در هر منطقه را فراهم می‌آورد. تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های باکولوویروسی جمع‌آوری‌شده از یک مزرعه می‌تواند درنهایت عملکرد کنترل زیستی را افزایش دهد (Cory *et al*. 2005; Baillie & Bouwer, 2012). مشابهت ژنتیکی بین جدایه‌های بومی و غیربومی ویروس‌های چندوجهی هسته‌ای که به‌عنوان آفت‌کش به کار گرفته می‌شوند، نشان می‌دهد که این میکروارگانیسم‌ها و حشرات میزبانشان قادر به غلبه بر مرزهای جغرافیایی و کلونیزه کردن زیستگاه‌های جدید هستند (Mazzi & Dorn, 2012). بسیاری از واریانت‌های باکولوویروس‌ها در یک میزبان چرخش کرده و از گونهٔ یکسان از نواحی مختلف جغرافیایی قادر به جداسازی هستند. توالی‌های ژنوتیپ‌های مختلف یک گونهٔ ویروس با

5. Southern hybridization

چندشکلی تک نوکلئوتید، جایگزینی و حذف/الحاق قطعه‌ای از ژن که ممکن است منجر به تغییر چارچوب بازخوانش بشود یا خیر قابل شناسایی هستند (Rabalska *et al*., 2019). Krejmer-



شکل ۴. تبارنامهٔ رسم‌شده بر اساس توالی ترجمه‌شدهٔ آمینواسیدی ژن کامل پلی‌هدرین جنس‌های مختلف باکولوویروس. بازسازی با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و با روش Neibour-joining با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ انجام شد. موقعیت جدایه‌های ایرانی در بین جنس‌های باکولوویروس مشخص شده است. مقادیر ارزش بوت استرپ در شاخه‌های متناظر درج شده است.

Figure 4. Phylogenic tree constructed based on full polyhedrin amino acid sequences of *baculovirus* isolates by Neibour-joining analysis method in MEGA6. The division of *baculovirus* genus is indicated and the position of Iranian isolates marked. Bootstrap resampling was done 1000 times and resulting bootstrap values are shown on the corresponding branches (Alphabaculovirus group I [HycuNPV (NC-007767), BmNPV(JQ-291706), AcMNPV (M-25054), AgMNPV (NC-008520), AceNPV (U40834)],Alphabaculovirus group II [HearMNPV (NC-011615), SINPV (X-94437), HtarNPV (U-97657), MacoNPV-A (NC-003529), LsNPV (LSU30302), MbNPV (M-20927), AgipNPV (NC-011345), AgseNPV (NC-007921)], Betabaculovirus [TnGV (NC_038375), CpGV(NC-002816), PlxyGV (NC-002593), SpliGV (NC-009503), XnGV (NC-002331), Gmmabaculovirus [NeabNPV (NC-008252), NeleNPV (NC-005906), NeseNPV (NC-005905), deltabaculovirus [CuniNPV (NC-003084)].

روش توسعه‌یافته در پژوهش حاضر از تمام معیارهای روش‌های مناسب در ردیابی میکروارگانیسم‌ها

از قبیل دقت و حساسیت، کم‌هزینه بودن، نیاز به زمان کم، توانایی در ردیابی هم‌زمان ویروس در تعداد زیاد نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از محیط و تکرارپذیری برخوردار است؛ بنابراین، در پژوهش‌های میدانی به‌عنوان روشی مطمین در غربال‌گری سریع لاروهای حشرات ازنظر آلودگی به این ویروس و جداسازی از محیط کاربرد دارد. بعلاوه، تکثیر باند مونومورفیک و اختصاصی در واکنش PCR حاکی از توانایی چشمگیر آن در ردیابیHearSNPV در نمونه بوده و نشان‌دهندهٔ قابلیت روش در مطالعهٔ ساختار ژنتیکی جمعیت، تشریح ساختار ژن پلی‌هدرین، بررسی تبارزایی و ردیابی بقایای آن‌ها در محیط است. این پژوهش اولین گزارش از آنالیزهای مولکولی جدایه‌های ایرانی HearSNPV است.

جدول ضمیمه. مشخصات جدایه‌های HzNPV/HearSNPV ثبت شده در بانک ژن مورداستفاده در طراحی دو جفت آغازگر اختصاصی ژن پلی‌هدرین.

Supplementary Table. Information of published HzNPV/HearSNPV isolates in NCBI and used for designing *pol* gene specific primers.

Isolate	Country	Accession number	Refrence
HearNPV-SP1B	Spain	KJ701033	Arrizubieta et al. 2015
HearNPV-SP1A	Spain	KJ701032	Arrizubieta et al. 2015
HearNPV-NNg1	Africa	AP010907	Ogembo et al. 2009
HearNPV-LB1	Spain	KJ701029	Arrizubieta et al. 2015
HearNPV-LB3	Spain	KJ701030	Arrizubieta et al. 2015
HearNPV-LB6	Spain	KJ701031	Arrizubieta et al. 2015
HearNPV-C1	China	NC-003094	Zhang et al. 2005
HearNPV-G4	China	NC-002654	Wang et al. 2001
HearNPV-Australia	Australia	JN584482	Zhang et al. 2014
HearSNPV-AC 53	Australia	KJ909666	Noune and Hauxwell ,2016
HearNPV-AC53T5	Australia	KU738904	Noune and Hauxwell, 2016
HearNPV-AC53T2	Australia	KU738901	Noune and Hauxwell, 2016
HearSNPV-AC 53	Australia	KU738900	Noune and Hauxwell, 2016
HearNPV-AC53T5	Australia	KU738899	Noune and Hauxwell, 2016
HearNPV-AC53T2	Australia	KU738898	Noune and Hauxwell, 2016
HearNPV-AC53C9	Australia	KU738897	Noune and Hauxwell, 2016
HearNPV-AC53C6	Australia	KU738896	Noune and Hauxwell, 2016
HearNPV-AC53C5	Australia	KU738903	Noune and Hauxwell, 2016
HearNPV-AC53C3	Australia	KU738902	Noune and Hauxwell, 2016
HearNPV-L1-India	India	KT013224	Rakshit et al., 2015
HearsNPV-H25EA1	Australia	KJ922128	Noune and Hauxwell, 2016
HzSNPV-F16	America	AF334030	Chen et al., 2002
HzSNPV-HS-18	Russia	KJ004000	Ternovoi et al., 2013
HzSNPV	Australia	HZU67264	Cowan et al., 1994
HzSNPV-Br/south	Brazil	KM596835	Ardisson-araujo et al., 2015
HgSNPV-ar	Aegentina	KP340517	Ferrelli et al., 2015

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از طرح رسالهٔ نویسنده اول بوده و با حمایت مالی دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به شماره 73132800/6/26 و موسسهٔ تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال انجام‌شده، بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی را اعلام می‌دارد.

REFERENCES

1. Adams, M. J., LeftKowitz, E. J., King, A. M. Q., Bamford, D. H., Breitbart, M., Davison, A. J., Ghabrial, S. A., Gobalenya, A. E., Knowles, N. J., Krell, P., Lavigne, R., Prangishvili, D., Sanfacon, H., Siddell, S. G., Simmonds, P., and Carstens, E. B. (2015). Ratification vote on taxonomic proposals to the International committee on toxonomy of viruses. *Archives Virology*, 160, 1837-1850.
2. Arrizubieta, M., Williams, T., Caballeroa, P., and Simon, O. (2013). Selection of a nucleopolyhedrovirus isolate from *Helicoverpa armigera* as the basis for a biological insecticide. *Pest Management Science*, 70, 967–976.
3. Arrizubieta, M., Simon, O., Williams, T., and Caballero, P. (2015). A novel binary mixture of *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus genotypic variants has improved insecticidal characteristics for control of cotton bollworms. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 3984 – 3993.
4. Baillie, V. L., and Bouwer, G. (2011). Development of highly sensitive assays for detection of genetic variation in key *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus genes. *Journal of Virological Methods*, 178, 179– 185.
5. Barrera, G., Simon, O., Villamizar, L., Williams, T., and Caballero, P. (2011). *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biological Control*, 58, 113-120.
6. Baillie, V. L., and Bouwer, G. (2012). High levels of genetic variation within *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus populations in individual host insects. *Archives of Virology*, 157, 2281–2289.
7. Brown, D.A.; Allen, C.J. and Bignell, G.N. (1982). The use of a protein A conjugate in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of four closely related baculoviruses from *Spodoptera* species. *Journal of General Virology*, 62:375-378.
8. Chen, X. Zhang, W. J., Wong, J., Chun, G., Lu, A., McCutchen, B. F., Presnail, J. K., Herrmann, R., Dolan, M., Tingey, S., Hu, Z. H., and Vlak, J. M. (2002). Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. Journal of *General Virology*, 83, 673-684.
9. Christian, P. D., Gibb, N., Kasprzak, A. B., and Richards, A. (2001). A rapid method for the identification and differentiation of *Helicoverpa* nucleopolyhedroviruses (NPV Baculoviridae) isolated from the environment. Journal of *Virological Methods*, 96, 51–65.
10. Cory, J. S., Green, B. M., Paul, R. K., and Hunter-Fujita, F. (2005). Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89, 101–111.
11. Costa, V.H.D., Soares, M.A. Dimate, F.A.R., de Sá, V.G.M., and Zanuncio, J.C. (2019). Genetic Identification and Biological Characterization of Baculovirus Isolated from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Florida Entomological Society* 102(1), 59-64.
12. Ehrt, S., and Schnappinger, D. (2003). *Methodes in Molecular Biology*. *E. Coli Plasmid Vectors* Edited by: N. Casali and A. Preston © Humana Pree Inc., Totowa, Nj. Vol, 235
13. Figueiredo, E., Munoz, D., Escribano, A., Mexia, A., Vlak, J. M., and Cabllero, P. (1999). Biochemical identification and comparative insecticidal activity of nucleopolyhedrovirus pathogenic for *Heliothis armigera* (Lep.: Noctuidae) larvae. Journal of *Applied Entomolgy*, 123, 165-169.
14. Galal, F. (2009). Universal Primer for Early and Rapid Detection of Nucleopolyhedroviruses of Multiple Species Using Polymerase Chain Reaction. *Egyption Academic Journal of Biological Sciences*, 1(1), 57-64
15. Haase, S., Sciocco-Cap, A., and Romanowski, V. (2015). Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives. *Viruses*, 7, 2230-2267.
16. Ikeda, M., Hamajima, R., and Kobayashi, M. (2015). Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insects . *Journal of Entomological Science*, 18,1-20.
17. Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., and Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology*, 151(7), 1257–66.
18. Knell, J.D.; Summers, M.D. and Smith, G.E. (1983). Serological analysis of 17 baculoviruses from subgroup A and B using protein blot immunoassay. *Virology*, 125, 381-392.
19. Kost, T. A., Condreay, J. P., and Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 23, 567-575.
20. Kreimer-Rabalska, M., Rabalska, L., Jukes, M., D., Souza, M., L., Moore, S., D., and Szewczyk, B. (2019). New Method for Differentiation of Granuloviruses (Betabaculoviruses) Based on Real Time Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR). *Viruses*, 11, 115.

21. Lange M., Wang H., Zhihong H., and Jehle J. A. (2004). Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran specific baculoviruses. *Virology*, 325, 36-47.
22. Mazzi, D., and Dorn, S. (2012). Movement of insect pests in agricultural landscapes. *Annals of Applied Biology* 160: 97–113.
23. Mehrvar, A., Rabindra, R. J., Veenakumari, K. and Narabenchi, G. B. 2006. Comparative evaluation of yield productivity parameters in seven geographic isolates of nucleopolyhedrovirus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Environment*. 12(1): 14-15.
24. Mehrvar, A. 2011. Entomopathogenic viruses, mass production technology. pp. 281-305. In: Borgio, J.F., Sahayaraj, K. and Susurluk, A. (Eds.). Microbial insecticides, principles and applications. NOVA Science Publishers, USA. (ISBN: 978-1-61209-223-2).
25. Miller, L. K. (1988). Baculoviruses as gene expression vectors. *Annual Review of Microbiology*, 42, 177−199.
26. Motta, F. C., Rosado, A. S., & Couceiro, J. N. 2002. Standardization of denaturing gradient gel electrophoresis for mutant screening of influenza A (H3N2) virus samples. *Journal of Virological Methods* 101, 105–115.
27. Munoz, D., and Caballero, P. (2000). Persistence and effects of parasitic genotypes in a mixed population of the *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. *Biological Control* 19, 259-264.
28. Naser, W.L. and Miltenburger, H.G. (1983). Rapid baculovirus detection, identification, and serological classification by western blotting-ELISA using a monoclonal antibody. *Journal of General Virology*, 64,639-647.
29. Noune, C., and Hauxwell, C. (2016). Complete genome sequences of seven *Helicoverpa armigera* SNPV-AC53-derived strains. *Genome*, Announc. 4(3), e00260-16
30. Ogembo, J. G., Kunjeku, E. C., and Sithanantham, S. (2005). A preliminary study on the pathogenicity of two isolates of nucleopolyhedroviruses infecting the African bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 25, 218-222.
31. Ogembo, J. G. Chaeychomsri, S. Kamiya, K., Ishikawa, H., Katou, Y., Ikeda, M., and Kobayashi, M. (2007). Cloning and Comparative Characterization of Nucleopolyhedroviruses Isolated from African Bollworm, *Helicoverpa armigera*, (Lepidoptera: Noctudiae) in Different Geographic Regions. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 76, 39-49.
32. Rowley, D., L., Farrar, J., R., Blackburn, M., B., and Harrison, R., L. (2010). Genetic and biological variation among nucleopolyhedrovirus isolates from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Virus Genes*, 40(3), 458-68.
33. Rowley, D., Popham, H.J.R., and Harrison, R.L. (2011). Genetic variation and virulence of nucleopolyhedroviruses isolated worldwide from the heliothine pests *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Heliothis virescens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107,112–126.
34. Rohrmann, G.F. (1992). Baculovirus structure proteins. *Journal of General Virology*, 73,749-761.
35. Rozen, S., and Skaletsky, H.J. (2000). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In: Krawetz, S. and Misener, S., Eds., Bioinformatics Methods and Protocols: *Methods in Molecular Biology*, 365-386.
36. Smith, G.E. and Summers, M.D. (1981). Application of a novel radioimmunoassay to identify baculovirus structural proteins that share interspecies antigenic determinants. *Journal of Virology*, 39,125-137.
37. Smith, G. E., Summers, M. D., and Fraser, M. J. (1983). Produc-tion of human β-interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*, 3, 2156−2165.
38. Sun, X. L., and Peng, H. (2007). Recent advances in biological pest insects by using viruses in China. *Virologica Sinica*, 22, 158-162.
39. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6, Molecuar evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
40. Traverner, M.P. and Connor, E.F. (1992). Optical enumeration technique for detection of baculoviruses in the environment. *Environmental Entomology*, 21, 307-313.
41. Wang, H., Deng, F., Pijlman, G. P., Chen, X., Sun, X., Vlak, J. M., and Hu, Z. (2003). Cloning of biologically active genomes from a *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolate by using a bacterial artificial chromosome. *Virus Research*, 97, 57-63.
42. Webb, S.E. and Shelton, A.M. (1990). Effect of age structure on the outcome of viral epizootics in field populations of imported cabbageworm (Lepidoptera: Pieridae). *Environmental Entomology*, 19, 111-116.
43. Woo, S.D., Choi, J.Y., Je, Y.H., and Jin, B.R. (2006). Characterization of the *Helicoverpa assulta* nucleopolyhedrovirus genome and sequence analysis of the polyhedrin gene region. *Journal of*

BioSciences, 31(3), 329-338.
44. Woo, S., D. (2001). Rapid Detection of Multiple Nucleopolyhedroviruses Using Polymerase Chain Reaction. *Molecules and Cells*, 11(3), 334-340.
45. 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.
46. Zhang, C. X., Ma, X. C., and Guo, Z. J. (2005). Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsidnucleopoly- hedrovirus. *Virology*, 333 (1),190-199.
47. Zhang, H., Yang, Q., Qin, Q., Zhu, W., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, N., and Zhang, J. (2014). Genomic sequence analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus isolated from Australia. *Archives of Virology*, 159, 595– 601.