نامه انجمن حشره‌شناسی ایران
جلد چهاردهم ــ اسفندماه ۱۳۷۳

وجود پلیدناویروسها در غدد کالیکس زنبور پارازیتوئید *Cotesia rubecula* (Marshall) (Hymenoptera: Braconidae)

نگارش :

ساسان عسگری[1] و اتو اشمیت

چکیده :

پلیدناویروسها در دستگاه تناسلی بعضی از بال‌غشائیان پارازیتوئید بصورت همزیست وجود دارند. در بررسی با میکروسکپ الکترونی، وجود پلیدناویروسها در غدد کالیکس زنبور ماده پارازیتوئید ***Cotesia rubecula*** نشان داده شد. با توجه به خصوصیات ساختمانی (ظاهری ـ مولکولی) ویروسهای جداشده از ***C. rubecula***، این ویروسها در زیرگروه bracovirus ها از خانوادهٔ پلیدناویروسها طبقه‌بندی می‌شوند. پیکرهٔ این ویروسها دارای نوکلئوکپسید استوانه‌ای با عرض یکسان و طول متغیر بوده، زائده دم‌مانندی دارند. مطالعات مربوط به نقوش الکتروفورتیکی DNA و پروتئین نشان داد که این ویروس واجد DNA دورشته‌ای و چندحلقه‌ای می‌باشد و از یک ساختمان پیچیده پروتئینی برخوردار است. نقش این ویروسها در محافظت پارازیتوئید از واکنشهای دفاعی میزبان مورد بحث این مقاله است.

مقدمه :

موجودات زندهٔ پارازیت که بخشی از دورهٔ زندگی خود را در داخل بدن میزبان می‌گذرانند باید توانایی غلبه بر سیستم دفاعی ـ ایمنی میزبان خویش را داشته باشند. حشرات پارازیتوئید نیز از این قاعده مستثنی نمی‌باشند. این حشرات جهت غلبه بر واکنشهای سیستم ایمنی از

---

۱ ـ ساسان عسگری، استرالیا ۵۰۶۴

استراتژیهای متنوعی استفاده می‌کنند. گذاشتن تخم در داخل تخم میزبان که فاقد سیستم ایمنی است یا تخمگذاری در مراحل اولیه لاروی که هنوز یک سیستم ایمنی کامل ندارد و نیز گذاشتن تخم در داخل بافت سلولی میزبان که دور از دسترس سلولهای خونی آن می‌باشد، از جمله امکاناتی هستند که حشرات پارازیتوئید بکار می‌گیرند (Salt, 1968). علاوه بر موارد یادشده، برخی از زنبورهای پارازیتوئید متعلق به راستهٔ بال‌غشائیان برای غلبه بر واکنشهای دفاعی میزبان خود از نوعی ارتباط همزیستی با انواع خاصی از ویروسها سود می‌جویند (Stolt & Vinson, 1979). این ویروسها که در کمیتهٔ بین‌المللی رده‌بندی ویروسها بعنوان پلیدناویروسها (Polydnaviruses) نامگذاری گردیده‌اند (Brown, 1986) تاکنون در دو خانواده از زنبورهای پارازیتوئید بنام Braconidae و Icheumonidae یافت شده‌اند که اصطلاحاً به ترتیب bracovirus ها و ichnovirus ها نامیده می‌شوند (Krell, 1991).

پلیدناویروسها در غدد کالیکس تخمدانهای حشرهٔ مادهٔ پارازیتوئید که بین تخمدانها و مجاری جانبی تخم قرار گرفته‌اند تکثیر می‌یابند. این ویروسها به همراه تخم حشره پارازیتوئید در موقع تخمگذاری بداخل بدن میزبان تزریق می‌شوند (Fleming, 1992). مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهد که این ویروسها در موفقیت پارازیتیسم این حشرات پارازیتوئید نقش اساسی دارند. Edson و همکارانش (۱۹۸۱) نشان دادند که تخمهای تزریق‌شدهٔ پارازیتوئید ***Compoletis sonorensis*** (Hym: Ichneumonidae) بدون حضور پلیدناویروسها توسط سیستم ایمنی میزبان ***(Heliothis virescens)*** بعنوان جسم خارجی تشخیص داده شده و کپسولی از طرف میزبان بدور آنها تشکیل می‌شود. با تزریق ویروسهای غیرفعال‌شده توسط اشعهٔ ماوراءِ بنفش ممانعت از این عمل امکان‌پذیر نبوده است. این کپسول همچنین در صورت عدم حضور پلیدناویروسها در لاروهای ***Pseudaletia includens***، در عرض ۲۴ تا ۳۶ ساعت بدور تخمهای ***Microplitis demolitor*** (Hym: Braconidae) تشکیل می‌یابد (Noda & Strand, 1991).

پلیدناویروسها علاوه بر از کار انداختن سیستم ایمنی، اختلالاتی در سایر فرآیندهای فیزیولوژیکی میزبان ایجاد می‌کنند. از جمله این اختلالات می‌توان تغییر در الگوهای پروتئینی همولنف (Beckage & Kanost, 1993)، کاهش غلظت هورمون اکدای استروئید (ecdysteroid) (Dahlman *et al.*, 1990) جلوگیری از ذخیرهٔ پروتئین در بافت چربی (Tanaka, 1986)، تحلیل بافت تولیدکنندهٔ سلولهای خونی (Guzo & Stoltz, 1987) و از بین رفتن هموسیتها (Apoptosis) (Strand & Pech, 1995) را نام برد.

مطالعات نشان داده است که پلیدناویروسها از بدن پارازیتوئید بعنوان محیطی برای تکثیر استفاده می‌کنند و اثرات منفی فیزیولوژیکی آنها فقط مربوط به بدن میزبان پارازیتوئید می‌باشد (Edson *et al.*, 1981). از طرف دیگر این ویروسها در داخل بدنِ میزبان تکثیر نشده

و فقط پروتئینهای حاصل از تظاهر ژنهای ویروس منجر به بروز تغییرات فیزیولوژیکی در میزبان می‌شوند (Krell, 1991). در بررسیهای متعدد، RNA پیام‌آور (mRNA) نسخه‌برداری‌شده از ژنهای ویروس، در بافتهای مختلف بدن میزبان از جمله بافت چربی، عصبی و غدهٔ پیش قفس سینه یافت شده است (Strand *et al.*, 1992; Blissard *et al.*, 1986).

در این مقاله ضمن گزارش حضور پلیدناویروسها در زنبور پارازیتوئید ***C. rubecula*** ساختمان ظاهری و مولکولی این ویروس بررسی شده و نحوهٔ محافظت تخم این پارازیتوئید در بدن لارو سفیدهٔ کوچک کلم ***Pieris rapae*** L. مورد بحث قرار می‌گیرد.

مواد و روش :

پرورش حشرات

در شرایط آزمایشگاهی زنبور پارازیتوئید ***C. rubecula*** بر روی لاروهای میزبان ***P. rapae*** که با برگ کلم تغذیه می‌شدند پرورش داده شدند. دمای محیط ۲۵ درجه سانتیگراد بوده و حشرات مربوطه تحت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی قرار داشتند. زنبورهای بالغ و پروانه‌ها بترتیب با عسل ۱۰۰٪ و ۲۵٪ تغذیه شدند.

دستگاه تناسلی حشرهٔ ماده

با استفاده از بینوکلر و پنسهای شمارهٔ ۴، دستگاه تناسلی حشرهٔ ماده ***C. rubecula*** با بیرون‌کشیدن تخمریز از بدن حشره مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج ویروس

ابتدا حدود ۴۰-۵۰ عدد زنبور ماده بر روی یخ بی‌حس شدند و سپس ضمن جراحی در محلول فیزیولوژیکی PBS[1] (۱۳۸ میلی مولار کلرورسدیم؛ ۲/۷ میلی مولار کلرورپتاسیم؛ ۱/۴۷ میلی‌مولار فسفات منوپتاسیم؛ ۷/۳ میلی‌مولار فسفات دی‌سدیم؛ pH ۷/۶) تخمدانهای آنها بیرون کشیده شد. مجموعهٔ تخمدانها توسط قیچی بسیار ریزی خرد شده تا یک تعلیق یکدست بدست آید. تعلیق مربوطه بمدت ۵ دقیقه با سرعت ۷۲۰ g سانتریفوژ گردید تا بقایای سلولی، بافتها و تخمها ته‌نشین گردد. فاز بالایی بمدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۸۰۰ g سانتریفوژ شده تا ویروسها ته‌نشین شوند. رسوب ویروسی بدست‌آمده در ۱۰۰ میکرولیتر PBS به حالت تعلیق درآمده و مجدداً بمدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۸۰۰ g سانتریفوژ شد. رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر PBS به حالت تعلیق درآمده و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

---

۱. Phosphate Buffer Saline

میکرسکپی الکترونی انتقالی (Transmission Electron Microscopy)

برای بررسی حضور پلیدناویروسها و مطالعهٔ شکل ظاهری آنها از میکروسکپ الکترونی انتقالی استفاده گردید. بدین‌منظور گرید[1] پوشیده شده از کربن بمدت ۵ دقیقه بر روی یک قطره از تعلیق ویروس قرار داده شد و سپس برای رنگ‌آمیزی منفی به روی یک قطره از یورانیل استات ۲٪ در آب منتقل گردید. گرید رنگ‌آمیزی شده در معرض هوا خشک و نمونه توسط میکروسکپ الکترونی (Philips 400) مورد بررسی و از آن عکس تهیه شد.

استخراج DNA از ویروس

برای استخراج DNA ویروس، به تعلیق ویروس N-lauroyl sarcosine اضافه شده و غلظت آن در محلول به ۴٪ رسانیده شد و سپس بمدت یکساعت در ۶۰ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. برای هضم محتویات پروتئینی ویروسها، پروتئیناز K به مقدار ۳۰۰ میکروگرم به ازاء هر میلی‌لیتر حجم مایع به مخلوط اضافه و بمدت ۲ ساعت در ۳۷ درجهٔ سانتیگراد نگهداری شد. سپس سوسپانسیون بدست‌آمده با دو حجم فنل: کلروفرم (۵۰:۵۰) مخلوط و بمدت یک دقیقه با سرعت ۱۵۸۰۰ g سانتریفوژ گردید. فاز بالائی که حاوی اسیدهای نوکلئیک می‌باشد به لولهٔ دیگری انتقال داده شده و با دو حجم اتانول ۱۰۰٪ مخلوط و بمدت ۱۸ ساعت در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت. در مرحلهٔ بعدی مخلوط مربوطه بمدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۵۸۰۰ g سانتریفوژ گردید. رسوب ته لوله که حاوی DNA استخراج شده از ویروس بود پس از خشکانیدن کامل در شرایط خلاء در ۵۰ میکرولیتر آب استریل حل گردید و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. روش استخراج DNA از پلیدناویروسها با کمی تغییرات از Stoltz و همکارانش (۱۹۸۶) اقتباس گردید.

الکتروفورز ژل آگاروز (Agarose Gel Electrophoresis)

به ۱۰ میکرولیتر DNA (حدود ۵ میکروگرم) استخراج شده از ویروس، ۲ میکرولیتر بافر نمونه (۰/۰۵٪ برومونفل آبی، ۳۰٪ گلیسرول در آب) اضافه گردید. نمونه‌ها بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد و در بافر TBE[2] (۰/۰۸۹ مولار Tris؛ ۰/۰۸۹ مولار استات سدیم؛ ۰/۴ میلی مولار EDTA[3]، pH ۸/۰) به همراه نشانگرهای وزن مولکولی DNA (VI و IV)

---

۱. grid : دیسک ریزی که نمونه بر روی آن قرار داده شده و در میکروسکپ مشاهده می‌شود.

۲. TBE : Tris-borate / EDTA

۳. EDTA : Ethylene diamine tetra acetic acid

در حدود ۲ ساعت و با ولتاژ ۷۰ رانده شدند. برای مشاهدهٔ قطعات DNA، ژل بمدت ۱۵-۱۰ دقیقه در محلول ۰/۱ میلیگرم در میلی‌لیتر بروميد اتیدیوم غوطه‌ور شده و تحت روشنایی لامپ ماوراء بنفش از آن عکسبرداری شد.

برای اینکه پروفیلی از DNA ویروس بدست آید، از آنزیمهای قطع‌کنندهٔ DNA (*Eco RI* و *Hind III*, Boehringer Mannheim) برای بریدن کل DNA به قطعات کوچکتر استفاده گردید (Sambrook *et al.*, 1989).

الکتروفورز ژل پلی آکریلامید (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

برای تجزیهٔ پروتئینهای ویروس، نمونهٔ استخراج‌شدهٔ ویروس به همراه نشانگر وزن مولکولی بر روی ژل سدیم دودسیل سولفات (SDS) - پلی آکریلامید ۱۰٪ رانده شد (Laemmli, 1970). برای رنگ‌آمیزی پروتئینها، ژل رانده‌شده حدود ۱۸ ساعت در کوماسی آبی (۰/۲۵ گرم کوماسی درخشندهٔ آبی R250 در ۹۰ میلی‌لیتر ۵۰٪ متانول و ۱۰ میلی‌لیتر اسیداستیک) بر روی صفحهٔ متحرک قرار گرفت. سپس ژل در محلول حاوی ۱۰٪ اسیداستیک و ۳۰٪ متانول غوطه‌ور و بر روی صفحهٔ متحرک نگهداری شد تا رنگهای داخل ژل که به پروتئینها متصل نیستند از ژل خارج گردند (Sambrook *et al.*, 1989). از ژل مربوطه عکسبرداری شده و سپس برای نگهداری در دستگاه خشک‌کن ژل خشک گردید.

نتیجه و بحث :

۱ - غدد کالیکس

بررسی دستگاه تناسلی حشرهٔ مادهٔ *C. rubecula* نشان می‌دهد که این زنبور دارای غدد کالیکس می‌باشد که بین تخمدانها و مجاری تخم قرار گرفته‌اند (شکل ۱). اهمیت این غدد بیشتر در ارتباط با تکثیر پلیدناویروسها می‌باشد. بعضی از محققین تولید این ویروس را محدود به قسمت بالایی غده دانسته و قسمت پایینی را بخشی از مجرای تخم تلقی می‌کنند (Buron & Beckage, 1992). طبق مدارک موجود پلیدناویروسها در هستهٔ سلولهای کالیکس تکثیر می‌یابند و با از هم پاشیده شدن این سلولها و یا ترشح از آنها، بداخل مجرای غده‌ها رها می‌شوند (Vinson, 1990). در هنگام تخمگذاری حشرهٔ ماده مقداری از مایع کالیکس را که حاوی ویروسها و بعضی پروتئینها است بداخل بدن میزبان تزریق می‌کند. در بسیاری از متون این مایع آبی - خاکستری رنگ معرفی گردیده است؛ درصورتی‌که اگر در هنگام مشاهدهٔ تخمدانها در زیر میکروسکپ از نور تحتانی استفاده شود این مایع برنگ نارنجی دیده می‌شود.

آزمایشات گوناگون نشان داده است که اگر یک گونهٔ پارازیتوئید آلوده به این

ویروس باشد نسلهای بعدی آن گونه نیز دارای ویروس مربوطه خواهند بود. باید خاطرنشان نمود که انتقال ویروس از زنبور مادر به دختر از طریق کروموزومهای آن صورت می‌گیرد (Stoltz *et al.*, 1986; Stoltz, 1992) و لذا انتقال صددرصد آن به نسل بعدی را تضمین می‌کند. این مورد توسط آزمایشات ژنتیکی و نشان دادن حضور ژنهای هومولوگ ویروس در کروموزومهای حشرهٔ نر و مادهٔ پارازیتوئید ثابت شده است (Stoltz *et al.*, 1986). در مورد چگونگی اکتساب پلیدناویروسها توسط زنبورهای پارازیتوئید نظریه‌های تکاملی متفاوتی وجود دارد که خارج از بحث این بررسی است.

۲ ـ مرفولوژی ویروس

مطالعاتی که توسط میکروسکپ الکترونی بر روی نمونهٔ خالص‌شدهٔ ویروس از غدد کالیکس *C. rubecula* صورت گرفت حضور پیکره‌های ویروس را در غدد کالیکس ثابت نمود و نشان داد که مرفولوژی این ویروسها خصوصیاتی مشابه با سایر اعضاء bracovirus‌ها دارد (شکل ۲). پلیدناویروسهای مربوطه دارای نوکلئوکپسیدهای استوانه‌ای شکل با عرض یکسان (حدود ۴۴ نانومتر) و طول متغیر (۵۶-۳۷ نانومتر) می‌باشند (شکل ۲ A). نوکلئوکپسیدها ممکن است بصورت منفرد و یا چندتائی در یک غلاف قرار داشته باشند (شکل ۲ A). این غلاف قبل از خروج ویروس از هستهٔ سلول کالیکس بوجود می‌آید (Krell, 1982). همچنین زائدهٔ دم‌مانندی در پیکرهٔ ویروس مشاهده گردید (شکل ۲ B) که احتمالاً در نفوذ ویروسها از طریق غشاء پلاسمائی و نیز نفوذ DNA ویروس از طریق منافذ هسته به سلولهای میزبان نقش دارد (Stoltz & Vinson, 1979).

قابل توجه است که ساختمان ظاهری bracovirus‌ها با ichnovirus‌ها تشابهی ندارد. نوکلئوکپسیدهای ichnovirus‌ها عدسی یا بیضی‌شکل هستند و زائدهٔ دم‌مانند در این ویروسها دیده نمی‌شود (Krell, 1987) معهذا، بعلت مشابهت ichnovirus‌ها با bracovirus‌ها از لحاظ ساختمان مولکولی، محل تکثیر ویروس و نحوهٔ عمل در میزبان، آنها را در خانوادهٔ Polydnaviridae طبقه‌بندی کرده‌اند.

۳ ـ ژنوم ویروس

مشاهدات مربوط به الکتروفورز DNA استخراج‌شده از پلیدناویروسهای *C. rubecula* بر روی ژل‌آگاروز نشان داد که ویروس مربوطه دارای DNA چند حلقه‌ای می‌باشد. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود DNA قطع‌نشدهٔ ویروس دارای چندین بند می‌باشد که نشان‌دهندهٔ تعدد حلقه‌های DNA ویروس است. بررسیهای قبلی نیز ژنوم این ویروسها را بسیار پیچیده و حاوی DNA دورشته‌ای و چندحلقه‌ای تعریف کرده‌اند (Stoltz *et al.*, 1984).

ژنوم ichnovirusهای زنبور پارازیتوئید *Compoletis sonorensis* که بخوبی مطالعه شده دارای حداقل ۳۰ حلقه DNA است که اندازهٔ آنها از ۶۰۰ تا ۲۸۰۰۰ جفت باز متغیر است (Krell *et al.*, 1982).

DNA قطع‌شدهٔ پلیدناویروسهای *C. rubecula* با آنزیمهای قطع‌کنندهٔ اسیدهای نوکلئیک (*Eco*RI و *Hind*II) حدود ۲۵-۲۰ بند را بر روی ژل آگاروز نشان داد که دامنهٔ اندازهٔ آنها بین ۵۱۷ تا ۲۰۰۰۰ جفت باز می‌باشد. این مطلب بیانگر بزرگ بودن ژنوم این ویروس است. تحقیقات نشان می‌دهد که در مورد ichnovirusها هر ویریون حاوی یکی یا تمام حلقه‌های DNA می‌باشد (Krell *et al.*, 1982) در حالیکه در تنها bracovirus بررسی‌شده از نظر ژنتیکی (*Chelonus inanitus*) هر ویریون منفرد فقط دارای یکی از حلقه‌ها بوده، دارای تمام اطلاعات ژنتیکی نیست. نتیجتاً جمعیت ژنتیکی متنوعی از این ویروسها بوجود آمده که هر عضو حاوی بخشی از ژنوم این ویروسها می‌باشد (Albrecht *et al.*, 1994). وجود چنین جمعیتی در مورد *C. rubecula* نشان داده نشده است. احتمالاً بروز تغییرات متنوع فیزیولوژیی در حشرهٔ میزبان می‌تواند بیانگر این واقعیت باشد که هر مجموعه‌ای از ویریون‌ها با اطلاعات ژنتیکی مختص خود موجب یک تغییر ویژه گردیده و اثرات کلی مشاهده شده در واقع تظاهر ژنهای جمعیتهای مختلف پلیدناویروس است.

هیبریداسیون حلقه‌های مختلف ژنوم ویروس *C. sonorensis* با یکدیگر نشان می‌دهد که این حلقه‌ها در توالی DNA خود دارای همولوژی می‌باشند و بنابراین برخی از آنها دارای قطعه‌های تکراری هستند (Stoltz & Xu, 1989).

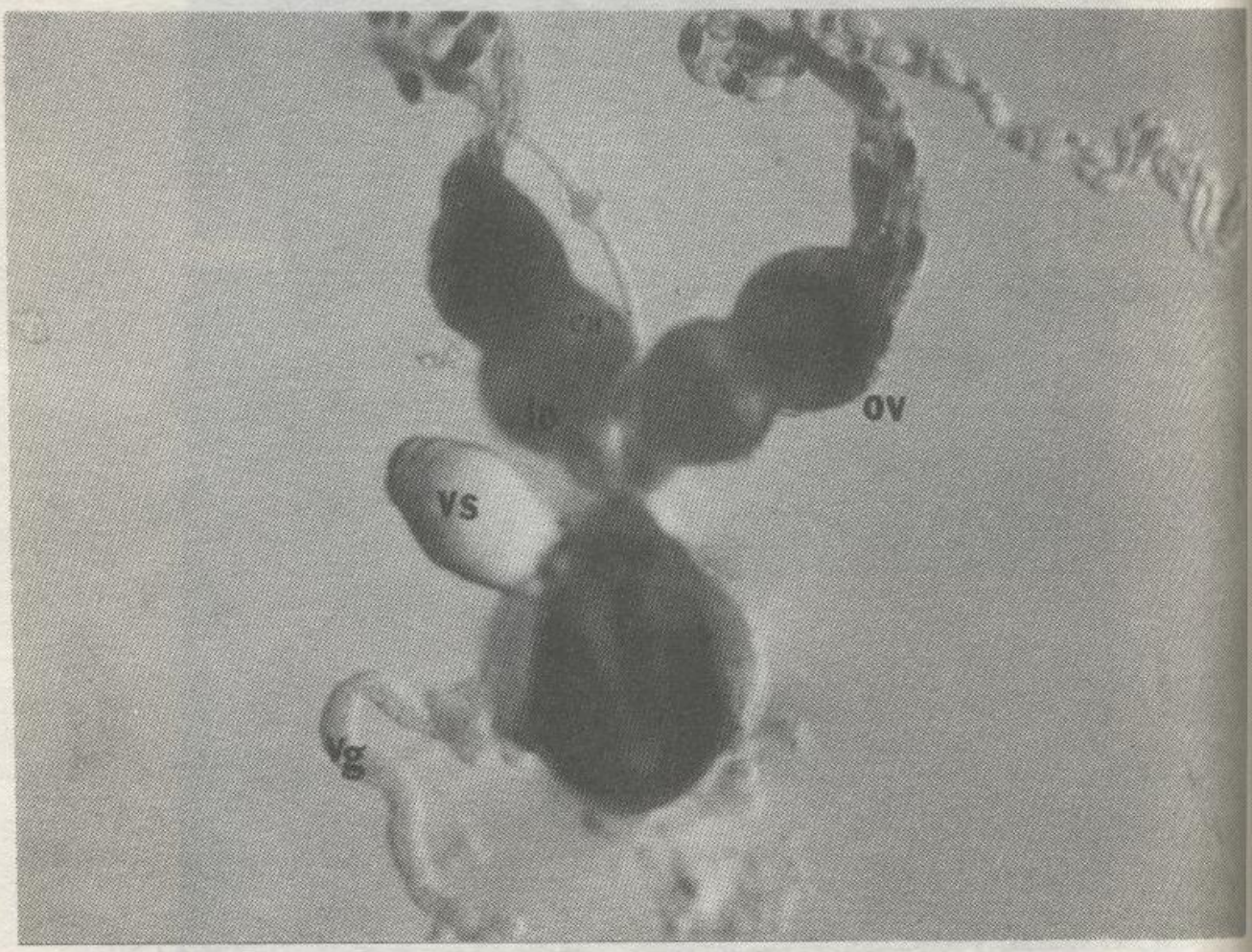
۴-پروتئینهای ویروس

رانده شدن پروتئینهای پلیدناویروسهای استخراج‌شده بر روی ژل پلی‌آکریلامید حدود ۱۵ پلی پپتید را تفکیک نمود (شکل ۴) که اجزاء ساختمانی کپسیدها و غلاف دور نوکلئوکپسید را شامل می‌شوند. محاسبهٔ وزنهای مولکولی بر روی منحنی استاندارد نشان داد که وزن مولکولی این پپتیدها بین ۲۸ تا ۱۲۹ کیلو دالتون می‌باشند. دور از ذهن نیست که ویروسی با داشتن ساختمان پیچیده‌ای از اسیدهای نوکلئیک دارای یک ساختمان پیچیده پروتئینی نیز باشد. آزمایشات انجام‌شده نشان داده است که دو پپتید ۶۵ و ۳۵ کیلو دالتونی در فراهم‌آوردن محافظت غیرفعال تخمهای پارازیتوئید *C. rubecula* در میزبان *P. rapae* نقش اصلی را بازی می‌کنند (Asgari & Schmidt, 1994). این پپتیدها بطور فزاینده‌ای در غدد کالیکس حشرهٔ ماده تولید می‌شوند و در هنگام عبور تخمهای پارازیتوئید از این ناحیه روی تخم‌ها را می‌پوشانند. بررسی‌های بعمل‌آمده نشان داده که پروتئین ۶۵ کیلو دالتونی با پروتئینهای میزبان شباهتهای آنتی‌ژنیک دارند، لذا تخمهای پارازیتوئید که با این پروتئین پوشانده شده‌اند در بدن

میزبان بعنوان جسم خارجی شناخته نشده، تخمهای پارازیتوئید در مقابل واکنشهای ایمنی میزبان مصون باقی می‌مانند (Asgari, 1993). این مکانیسم غیرفعال در حفاظت تخمها در ساعات اولیه بعد از پارازیتیسم ضروری بنظر می‌رسد، زیرا بعد از تزریق ویروسها به حفرهٔ عمومی میزبان مدتی طول می‌کشد تا ژنهای ویروس ترجمه شود و پروتئینهای حاصله در سیستم ایمنی میزبان مداخله نمایند (اطلاعات انتشار نیافته). آزمایشات اولیه نشان می‌دهد که این پروتئین جزء ساختمانی کپسید ویروس نمی‌باشد بلکه در غلاف دربرگیرندهٔ نوکلئوکپسیدهای ویروس یافت می‌شود (اطلاعات انتشار نیافته). اینکه آیا ژن کُدکنندهٔ این پروتئین (۶۵کیلو دالتون) در ژنوم ویروس قرار داشته و یا توسط خود زنبور در غدهٔ کالیکس تولید می‌شود سؤالی است که در حال حاضر تحت بررسی است.

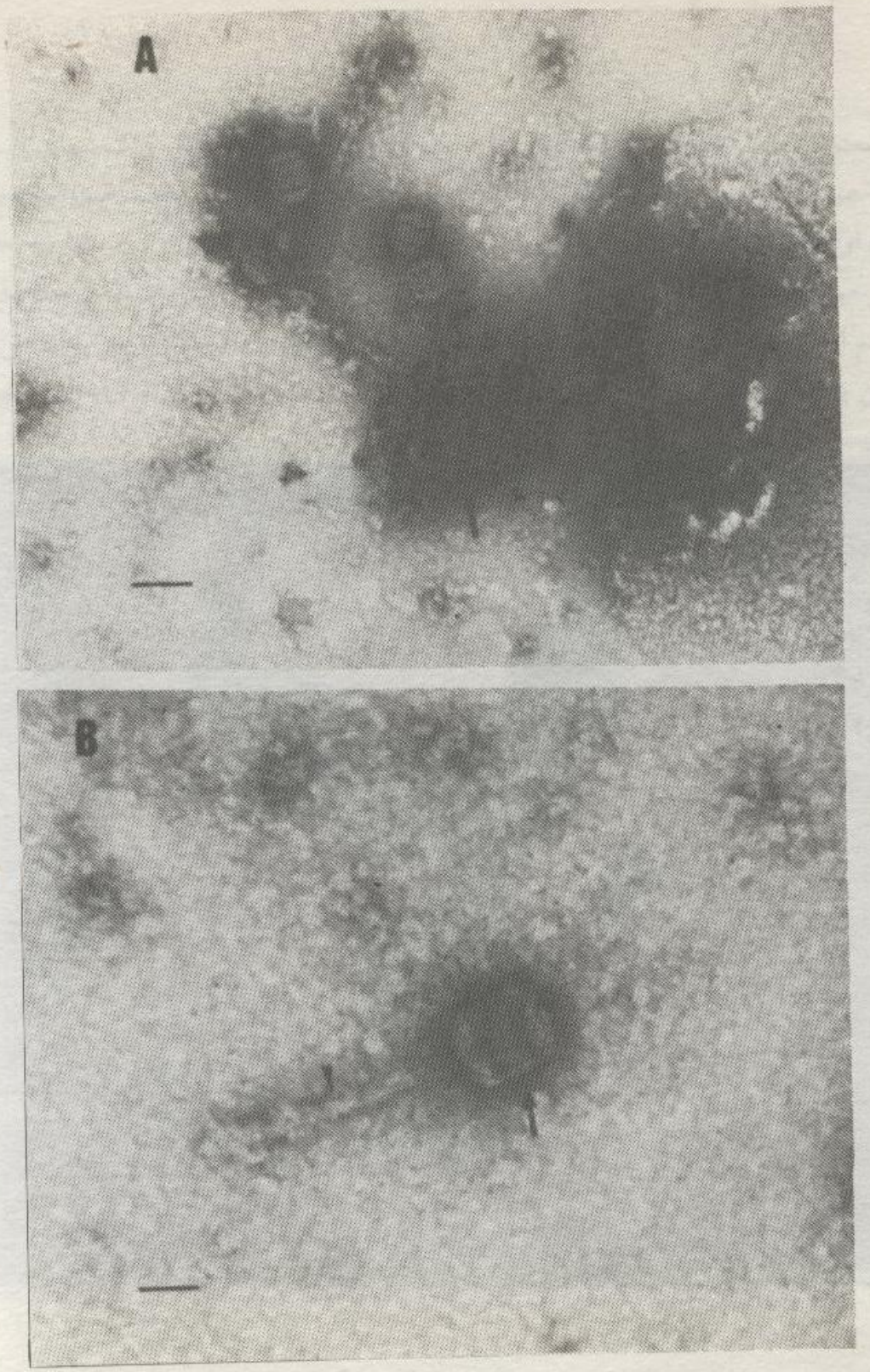
سپاسگزاری :

نگارندگان از آقایان مهندس مسعود بهار و مهندس بیژن حاتمی و خانم کلودیا فاضلی برای ویرایش این مقاله سپاسگزاری می‌کنند.



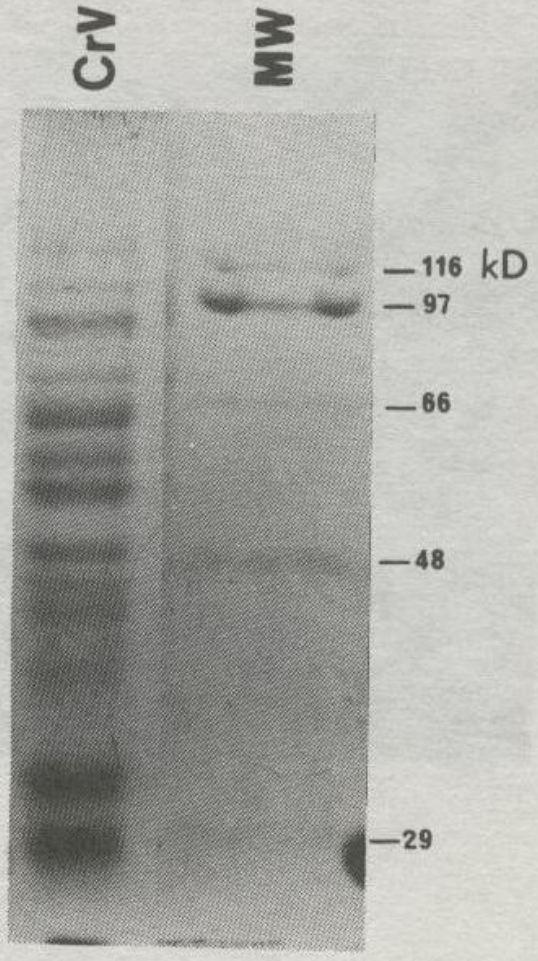
شکل ۱ : اندام تناسلی حشرهٔ مادهٔ *C. rubecula*.

ov، تخمدان؛ ca، کالیکس؛ lo، مجرای تخم جانبی؛ vg، غدهٔ زهر؛ vs، کیسهٔ ذخیرهٔ زهر



شکل ۲ : تصویر میکروسکپ الکترونی انتقالی پلیدناویروسهای استخراج‌شده از تخمدانهای (A. *C. rubecula*) ویروسهای رنگ‌آمیزی منفی شده (۸۰۰۰۰ برابر)؛ دو غلاف ویروس در تصویر دیده می‌شود (فلشفها)؛ مقیاس نشانگر ۶۲/۵ نانومتر است، B) ویروس با بزرگنمائی بیشتر (۷۰۰۰۰ برابر)، نوکلئوکپسید (فلش) و زائدهٔ دم‌مانند (سر فلش) در شکل مشخص است؛ مقیاس نشانگر ۲۹/۵ نانومتر است.

شکل ۳: الکتروفورز DNA پلیدناویروس *C. rubecula* DNA ویروس همچنین با آنزیمهای قطع‌کننده *Eco*RI و *Hind*III به قطعات کوچکتر بریده شده و بر روی ژل آگاروز ۰/۸٪ رانده، رنگ آمیزی گردیده و بر روی روشنایی ماوراءبنفش عکسبرداری شده‌اند. MV IV، نشانگر وزن مولکولی IV (از بالا به پایین ۱۹۳۲۹، ۷۷۴۳، ۵۵۲۶، ۴۲۵۴، ۳۱۴۰، ۲۶۹۰، ۲۳۲۲، ۱۸۸۲، ۱۴۸۹، ۱۱۵۰، ۹۲۵ و ۶۹۷ جفت باز)؛ DNA، *Eco*RI ویروس قطع‌شده با آنزیم مربوطه؛ DNA ، *Hind*III ویروس قطع‌شده با آنزیم مربوطه؛ Undigested، DNA قطع‌نشدهٔ ویروس؛ MV IV، نشانگر وزن مولکولی VI



شکل ۴ : نقش پلی‌پپتیدهای پلیدناویروسهای *C. rubecula* جداشده بر روی ژل آکریلامید ۱۰٪.
ژل با کوماسی درخشندهٔ آبی رنگ‌آمیزی شده است. CrV، ویروس *C. rubecula*؛ MV،
نشانگر وزن مولکولی

Journ. of Ent. Soc. of Iran
Vol. 14, March, 1994

Polydnaviruses produced in the calyx glands of *Cotesia rubecula* (Marshall) (Hymenoptera: Braconidae)

By

S. Asgari * and Otto Schmidt *

SUMMARY

Endoparasitoid insects which lay their eggs int the hemocoel of their insect hosts, have adopted various mechanisms to overcome their host immune reactions (Vinson, 1990). Being a foreign object, a parasitoid egg is exposed to cellular and humoral responses of the immune system of the host. Symbiotic polydnaviruses (PVs) that are produced in the calyx glands of the female reproductive organs of certain parasitoid hymenopterans play an active role in the suppression of the host immune system as well as causing a variety of physiological changes (Fleming, 1992; Krell, 1991). PVs are injected into the host along with the eggs at parasitization (Vinson and Stoltz, 1979). The virus genes are expressed in the host and directly or indirectly divert several physiological processes. PVs have reported from two families of parasitic hymenoptera: Braconidae and Ichneumonidae (Krell, 1991). Accordingly, the viruses that are produced in braconid and ichnomonid wasps are called bracoviruses and ichnoviruses, respectively (Krell, 1991).

Cotesia rubecula which is a habitual parasitoid of ***Pieris rapae*** caterpillars successfully completes its development inside the host. Microscopic

* Eng. Sassan Asgari and Dr. Otto Schmidt, Dept. of Crop Protection, Waite Campus, GlenOsmond SA 5064, Australia

presence of large calyx glands (Fig.1). Extraction of virus particles from the calyx glands and their transmission electron microscopic observations showed that symbiotic PVs are produced in these glands. The viruses have a cylindrical nucleocapside and a tail-like structure which is a typical characteristic of bracoviruses (Fig.2). The nucleocapsides are variable in length (37-56nm) but have a same width of about 44nm.

DNA extracted from ***C. rubecula*** PVs and restriction fragments were separated on an agarose gels. Several bands of undigested virus are present indicating that the virus genome consists of several double-stranded DNA segments which is a molecular characteristic of PVs (Fig.3). Restriction digestion of the DNA with ***Eco***RI and ***Hind***III produced 20-25 fragments ranging in size from 517 bp to 20 kb (Fig.3). The DNA circles are packaged inside nucleocapsides and enveloped as single or multiple nucleocapsides.

Separation of ***C. rubecula*** proteins on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that the virus particle composed of several polypeptides ranging from 28-129kD in size (Fig.4). Studies on the virus proteins have shown that two proteins of 65 and 35kD are involved in passive protection of the parasitoid eggs in ***Pieris caterpillars*** (Asgari and Schmidt, 1994). Whether the protective proteins are encoded by the virus or the wasp genome is under investigation.

REFERENCES

Alberecht, U., Wyler, T., Pfisterwilhelm, R., Gruber, A., Stettler, P., Heiniger, P., Kurt, E., Schumperli, D., and Lanzrein, B. 1994 : Polydnavirus of the parasitic wasp ***Chelonus inanitus*** (Braconidae) - Characterization, genome organization and time point of replication. ***Journal of General Virology***, **75**, 3353-3363.

Asgari, S. 1993 : Passive protection of the parasitoid eggs, ***Cotesia rubecula*** against the immune reactions of the host, ***Pieris rapae***. Master's Thesis, University of Adelaide.

Asgari, S., and Schmidt, O 1994 : Passive protection of eggs from the parasitoid, ***Cotesia rubecula,*** in the host ***Pieris rapae. J. Insect Physiol.*** **40**, 789-795.

Beckage, N.E., and Kanost, M.R. 1993 : Effects of parasitism by the braconid wasp ***Cotesia congregata*** on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, ***Manduca sexta. Insect Biochem. Molec. Biol.*** **23**, 643-563.

Blissard, G.W., Fleming, J.G.W., Vinson, S.B., and Summers, M.D. 1986 : ***Campoletis sonorensis virus:*** Expression in ***Heliothis virescens*** and identification of expressed sequences. ***J. Insect Physiol.*** **32**, 351-359.

Brown, F. 1986 : The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meeting of the international committee on taxonomy of viruses in Sendai, September 1984. ***Intervirology*** **25**, 141-143.

Buron, I., and Beckage, N.E. 1992 : Characterization of a polydnavirus (PDV) and virus-like filamentous (VLFP) in the braconid wasp ***Cotesia congregata*** (Hymenoptera: Braconidae). ***J. Inverteber. Pathol.*** **59**, 315-327.

Dahlman, D.L., Coar, D.L., Koller, C.N., and Neary, T.J. 1990 : Contributing factors to reduced ecdysteroid titers in ***Heliothis virescens*** parasitized by ***Microplitis croceipes. Arch. Insect Biochem. Physiol.*** **13**, 29-39.

Edson, K.M., Vinson, S.B., Stoltz, D.B., and Summers, M.D. 1981 : Virus in a parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in the parasitoid's host. ***Science*** **211**, 582-583.

Fleming, J.G.W. 1992 : Polydnaviruses: Mutualists and pathogens. ***Annu. Rev. Entomol.*** **37**, 401-423.

Guzo, D., and Stoltz, D.B. 1987 : Observation on cellular immunity and parasitism in the tussock moth. ***J. Insect Physiol.*** **33**, 19-31.

Krell, P.J. 1987 : Replication of long virus-like particles in the reproductive tract of the ichneumonid wasp ***Diadegma terebrans. J. gen. Virol.*** **68**, 1477-1783.

Krell, P.J. 1991 : Polydnaviridae. In ***Atlas of Invertebrate Viruses*** (Edited by J.Adams, & J.R.Bonami), pp. 141-177. C.R.C. Press, Boca Raton, FL.

Krell, P.J., Summers, M.D., and Vinson, S.B. 1982 : Virus with a multipartit superhelical DNA genome from the ichneumonid parasitoid, ***Campoletis sonorensis. J. Virol.*** **43**, 859-870.

Laemmli, U.K. 1970 : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. ***Nature*** **227**, 680-685.

Milne, R.G. 1993 : Electron microscopy of in ***vitro*** preparations. In ***Diagnosis of plant virus***

diseases (Edited by R.E.F. Matthews), pp. 215-251. CRC Press Inc., Florida.

Salt, G. 1968 : The resistance of insect parasitoids to the defense reaction of their hosts. ***Biol. Rev.* 43**, 200-232.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989 : ***Molecular cloning. A laboratory manual.*** (second edition ed.). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Stoltz, D.B., and Vinson, S.B. 1979 : Viruses and parasitism in insects. ***Adv. Virus Res.* 24**, 125-171.

Stoltz, D.B., Krell, P., Summers, M.D., and Vinson, S.B. 1984 : Polydnaviridae-a proposed family of insect viruses with segmented, double-stranded, circular DNA genomes. ***Intervirology* 21**, 1-4.

Stoltz, D.B., Guzo, D., and Cook, D. 1986 : Studies on polydnavirus transmission. ***Virology* 155**, 120-131.

Stoltz, D.B., and Ku, D. 1989 : Polymorphism in polydnavirus genomes. ***Can. J. Microbiol.* 36**, 538-543.

Stoltz, D.B. 1990 : Evidence for chromosomal transmission of polydnavirus DNA. ***J. Gen. Virol.* 71**, 1051-1056.

Strand, M.R., and Noda, T. 1991 : Alteratios in the haemocytes of ***Pseudoplusia includens*** after parasitism by ***Microplitis demolitor. J. Insect Physiol.*** 37, 839-850.

Strand, M.R., Mckenzie, V., Grassl, B.A., and Aiken, J.M. 1992 : Persistence and expression of ***Microplitis demolitor*** polydnavirus in ***Pseudoplusia includens. J. Gen. Virol.* 73**, 1627-1635.

Strand, M.R., and Pech, L.L. 1995 : *Microplitis demolitor* polydnavirus induces apoptosis of a specific haemocyte morphotype in *Pseudoletia includens. J. Gen Virol.* **76**, 283-291.

Tanaka, T. 1986 : Effects of the calyx and venom fluids of ***Apanteles kariyai*** Watanabe (Hymenoptera: Braconidae) on the fat body and haemolymph protein contents of its host ***Pseudaletia separata*** (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). ***Appl. Entomol. Zool.* 21**, 220-227.

Vinson, S.B. 1990 : How parasitoids deal with the immune system of their host: an overview. ***Arch. Insect Biochem. Physiol.* 13**, 3-27.