

تاثیر گرانولوویروس کرم سیب (CpGV) بر برخی از پارامترهای بیوشیمیایی کرم سیب،

Cydia pomonella (L.)مهديه کمالی دهقان^{۱*}، مرتضی موحدی‌فاضل^۲ و محمدرضا رضایپناه^۳

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ۳- بخش کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: M_kamali4550@yahoo.com

Effect of *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) on some biochemical parameters of codling moth, *Cydia pomonella* (L.)M. Kamali Dehghan^{1&*}, M. Movahedi Fazel² and M. Rezapana³

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan. Email: M_kamali4550@yahoo.com 2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan. Email: movahedi@znu.ac.ir 3. Insect Virology Lab, Biological Control Dept, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO).

*Corresponding author, E-mail: M_kamali4550@yahoo.com

چکیده

ویروس گرانولوز کرم سیب، CpGV (*Cydia pomonella* granulovirus) یکی از عوامل موثر در کاهش جمعیت این آفت در سرتاسر جهان می‌باشد. اخیراً گزارشات غیر رسمی مبنی بر کاهش اثرات کشندگی حاد این ویروس منتشر شده است. بر این اساس، این تحقیق با هدف بررسی اثرات مزمن این ویروس بر روی تغییرات برخی از منابع انرژی بعنوان عامل موثر در زمستان‌گذرانی کرم سیب پرداخته است. این ویروس قادر است قبل از ورود لاروهای این آفت به داخل میوه از طریق تغذیه آن را بیمار و باعث تضعیف و تخریب سلول‌های بافت چربی میزبان شود. در این تحقیق اثرات جانبی غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ OB/μl ویروس CpGV پس از گذشت هفت روز بر مقادیر پروتئین و گلیکوژن لاروهای سن پنجم کرم سیب بترتیب طبق روش Yee & Chapman و Van Handel مورد بررسی قرار گرفت. لاروها بر روی غذای مصنوعی و در انکوباتور با شرایط نوری (۱۶:۸) (L:D)، رطوبت نسبی ۶۰±۱۰ درصد و شرایط دمایی ۲۴±۲ °C پرورش یافتند. آلوده سازی لاروها به ویروس از طریق آغشته سازی سطح غذای مصنوعی با غلظت‌های مشخص شده ویروس انجام شد. نتایج حاصله بیانگر اثرات معنی دار در کاهش میزان پروتئین و گلیکوژن (P<0.001) می‌باشد. بطوریکه میانگین میزان پروتئین در غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ OB/μl آلوده به ویروس و شاهد بترتیب ۰/۷۴±۰/۷۴، ۰/۷۷±۰/۷۷ و ۰/۸۸±۰/۸۸، ۸/۵۷±۰/۸۸ و ۱/۱۶±۰/۸۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و میانگین میزان گلیکوژن به ترتیب ۰/۴۸±۰/۵، ۰/۱۱±۰/۶۷، ۰/۹۵±۰/۸۷ و ۱±۰/۲۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برآورد گردید. نتایج بدست آمده تاثیر جانبی ویروس در کاهش برخی از منابع انرژی و بالطبع تضعیف لاروهای کرم سیب را نشان می‌دهد. با توجه به تاثیر قابل توجه منابع انرژی در بقاء زمستانه، بنظر می‌رسد اثرات مزمن ویروس CpGV بتواند زمستان‌گذرانی این آفت را با مشکل مواجه نماید.

واژگان کلیدی: کنترل بیولوژیک- پروتئین- گلیکوژن- گرانولو ویوس کرم سیب

Abstract

The CpGV is one of the mortality factors that can be reduced population of *Cydia pomonella* (L.) throughout the world. Recently, some informal reports refer the reduction of acute effects of CpGV. So, in this research aimed the evaluation of the chronic effects of CpGV on some bioenergetic resources, as the key factors in overwintering of *C. pomonella*. This virus can infect the larvae immediately before entering into the fruit. So, the larvae may be weakened and the fat bodies may be destroyed by a virus. In this research were examined the side effects of concentration levels 1, 2 and 4 OB/μl of CpGV after 7th day on the amount of protein and glycogen on 5th instar *C. pomonella* according to Yee & Chapman and Van Handel method respectively. Larvae been reared on artificial diet and in incubated with light (L:D) (16:8), relative humidity of 60 ± 10 percent and temperature conditions 24 ± 2 °C. Larvae were infected via impregnated artificial food with specified concentrations virus. Results showed that CpGV decreased total protein and glycogen (p<0.001), significantly. The average of the amount of protein in concentrations 1, 2 and 4 OB/μl and control was 9.74±0.74, 8.57±0.88, 0.81±0.008 and 11.80±1.16 mg/g fresh weight, respectively. Also, the amount of glycogen was 7.5±0.48, 0.67±0.11, 2.87±0.95 and 3.28±1 mg/g fresh weight, respectively. The results indicated that CpGV can decrease some of bioenergetic resources of the larvae and they may be weakened. According to the influence of energy resources on the survival rate of overwintering insect, this virus may be disrupted overwintering of colding moth.

Key words: biological control - protein - glycogen- *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV)

مقدمه

سیب به عنوان یکی از محصولات باغی دانه‌دار در ایران به دلیل داشتن شرایط آب و هوایی مناسب برای کشت این محصول از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. به طوری که طبق آمار سازمان خوار و بار جهانی (FAO) ایران با تولید ۱۶۵۱۸۳۹ تن سیب در سال ۲۰۱۱ مقام هشتم را در دنیا به خود اختصاص داده است. کرم سیب، *Cydia pomonella* (Linnaeus)، به عنوان یکی از آفات کلیدی روی این محصول از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد که علاوه بر سیب روی گلابی و گردو نیز فعالیت شدیدی دارد (Rozsypal *et al.*, 2013). این آفت در تمامی نقاط کشور پراکنده می‌باشد. از مهمترین راه‌های کنترل این آفت، حشره‌کش‌های شیمیایی می‌باشد که مصرف بی‌رویه‌ی آن‌ها، اثرات نامطلوب روی محصولات مصرفی، محیط‌زیست، پارازیتوئیدها و شکارگرهای این حشره و همچنین بروز طغیان آفات دیگر در باغ‌های سیب و نیز افزایش مقاومت این آفت نسبت به حشره‌کش‌های شیمیایی به ویژه سموم فسفره را به دنبال داشته است (Malik *et al.*, 2002). بنابراین، لزوم استفاده از روش‌های جایگزین مطلوب از جمله عوامل کنترل بیولوژیک، حتی بیش از پیش احساس می‌شود. امروزه در بحث مدیریتی سعی بر آن است که از ترکیبات اختصاصی در جهت کنترل آفت استفاده شود تا از اثرات جانبی بر موجودات غیر هدف جلوگیری گردد. تکنیک‌هایی از جمله عقیم کردن حشرات، جلب کردن و کشتن انبوه حشرات با استفاده از فرمون‌ها، اختلال در جفت‌گیری و همچنین عوامل کنترل بیولوژیک مواردی از این قبیل هستند (Dyck, 2010)، که در این روش بیشتر از عوامل کنترل بیولوژیکی همراه با عوامل دیگر برای مدیریت تلفیقی آفات استفاده می‌شود (Lacey & Unruh, 2005). یکی از عوامل کنترل بیولوژیک این آفت ویروس CpGV از خانواده Baculovirida، جنس Granulovirus می‌باشد که به صورت کاملاً اختصاصی کنترل کرم سیب را سبب می‌شود (Ludewig, 2003). تحقیقاتی در خصوص بررسی سمیت حاد گرانولوویروس کرم سیب حاکی از آن است که سوش‌های متفاوت این ویروس، رنج متفاوتی از تلفات را نشان داده است (Eberle *et al.*, 2009). از طرفی برخی از اثرات جانبی عوامل بیماری‌زا می‌تواند زمینه‌ساز اثر بخشی سایر عوامل محیطی را بر روی میزبان‌ها خود را افزایش دهند و بعضاً مسمومیت‌های مزمن را به همراه داشته باشد (Babu & Ramakrishna, 2009). از آنجایی که ویروس پس از ورود به بدن میزبان در درون محیط قلیایی روده میانی لارو پوشش ویروس تجزیه شده و ویروس جذب سلول‌های گوارشی می‌گردد، در این مرحله ویروس آزاد می‌شود و عفونت در سلول‌های اپیتلیالی شروع می‌شود (Gallegos *et al.*, 2009). با توجه به مکانیزم تاثیر گرانولوویروس‌ها که باعث تضعیف و تخریب سلول‌های بافت چربی میزبان می‌شود (Flexner & Belnavis, 2000) لذا به نظر می‌رسد که این ویروس بتواند روی منابع انرژی و نیز مقاومت به سرمای این آفت اثرگذار باشد (Warburg & Yuval, 1997). چراکه مقدار ذخایر انرژی روی میزبان متابولیسم، بقاء حشره و مقاومت به سرمای آن موثر است (Bao & Robinson, 2008) و با توجه به آنکه کرم سیب زمستان را بصورت آخرین سن لاروی در درون پیله‌های تشکیل شده در زیر پوست درختان می‌گذراند (اسماعیلی، ۱۳۶۶) لذا ذخیره منابع انرژی برای سپری نمودن حداقل ۶ ماه از سال برای این آفت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و هرگونه اختلال در ذخیره منابع انرژی می‌تواند بر میزان بقاء حشرات در طول زمستان اثرگذار باشد.

مواد روش‌ها

حشرات

نمونه‌برداری در مهر ماه سال ۱۳۹۱ از زیر پوستک درختان باغ‌های سیب آلوده استان زنجان انجام شد. لاروهای سن پنجم جمع آوری شده به ظروف مسقف با توری منتقل شده و در انکوباتور با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای 24 ± 2 °C درجه و رطوبت نسبی 60 ± 10 درصد نگهداری شدند. حشرات کامل پس از خروج به ظروف مخصوص تخم‌ریزی منتقل گردید. لاروهای حاصل از تخم‌های این حشرات بر روی غذای مصنوعی تهیه شده بر طبق روش باتن (۱۹۸۱) پرورش داده شدند. ظروف حاوی لارو در همان شرایط پرورش نگهداری شدند. جهت پرهیز از همخواری، لاروها به صورت انفرادی پرورش یافتند. لاروهای سن پنجم به محض خروج از غذا به ظروف حاوی مقواهای مجوف منتقل شده تا به حشرات کامل تبدیل شوند.

ویروس

ایزوله مورد استفاده ویروس CpGV-M با غلظت 8×10^8 OB/ μ l از بخش کنترل بیولوژیک موسسه تحقیقات و آفات و بیماری‌های گیاهی تهیه شد. جهت تعیین غلظت، شمارش گرانول‌ها با استفاده از لام و لامل هلبر و طبق روش (Hube, r. 1981)، با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست انجام گرفت. برای محاسبه غلظت سوسپانسیون ویروسی میانگین تعداد گرانول‌های شمارش شده در ۵ خانه (در حالتی که عمق سوسپانسیون موجود در زیر لامل کاملاً پر باشد) در عدد 250000 ضرب گردید. عدد حاصل غلظت سوسپانسیون ویروسی را نشان می‌دهد (رضایانه ۱۳۸۰).

آلوده سازی

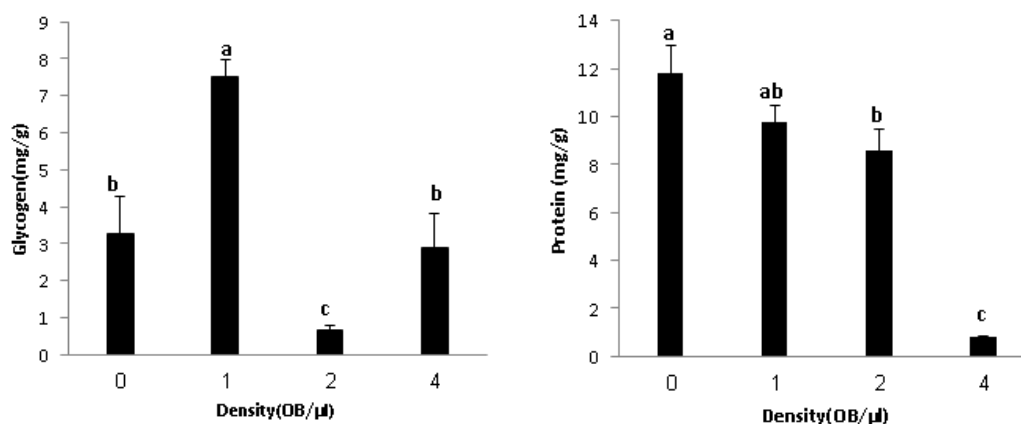
تعدادی ظرف با حجم غذای مساوی انتخاب و به مدت ۲۰ دقیقه تحت اشعه UV استریل گردید. سپس سطح غذا با 10μ l از غلظت های ۲، ۱ و ۴ OB/ μ l ویروس توسط سمپلر پوشش داده و در زیر هود خشک شدند. در تیمار شاهد سطح غذا توسط 10μ l آب مقطر استریل پوشش داده شد. لاروهای سن پنجم یک روزه پس از دو روز گرسنگی، بصورت انفرادی بر روی غذاهای آلوده به ویروس و شاهد منتقل گردید. پس از گذشت مدت هفت روز لاروهایی که تنها از یک نقطه وارد گذاشته بودند جهت اندازه گیری منابع انرژی انتخاب و توزین شدند. برای هر غلظت ۵ تکرار در نظر گرفته شد. میزان ذخیره گلیکوژن طبق روش (Van Handel, 1985; Van Handel & Day 1988; Kaufmann & Brown 2008) و پروتئین بر طبق روش (Yee & Chapman (2008) برآورد شد. میزان پروتئین و کربوهیدرات بر حسب mg/g وزن تر حشره محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزارهای آماری مینی تب ۱۶ در غالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج بیانگر کاهش معنی دار پروتئین همراه با افزایش غلظت ویروس می‌باشد به طوریکه میانگین پروتئین در غلظت‌های ۲، ۱ و ۴ OB/ μ l آلوده به ویروس و شاهد بترتیب 0.73 ± 0.97 ، 0.88 ± 0.87 ، 0.08 ± 0.81 و 1.16 ± 1.80 میلی گرم بر گرم وزن تر حشره است. نتایج بدست آمده مشابه نتایج بکارگیری نماتد باکتریال روی لاروهای سرخرطومی حنایی خرما می‌باشد که در این تحقیق هم نماتد باکتریال باعث کاهش اسیدهای آمینه حشره آلوده در مقایسه با شاهد شده است (Abdel-Razek et al., 2004)، که این کاهش می‌تواند به دلیل کاهش در فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده (Kobayashi et al.,

(1990)، استفاده از پروتئین‌های همولف برای ساخت ویروس و یا اجسام چند وجهی (Kawase & Hayashi, 1965) و تبدیل برخی پروتئینها به چربی (Abdel-Razek *et al.*, 2004) و همچنین به علت گرسنگی ناشی از اختلالات ایجاد شده در معده لارو (Kawase & Hayashi, 1965) باشد. با توجه به آنکه ویروس‌ها پس از ورود، سلول‌های میزبان را جهت تکثیر خود بسیج نموده و ژنوم خود را در درون پوشش نوکلئوکسپید تکثیر می‌نمایند. قطعا جهت تکثیر این بخش‌ها از منابع انرژی میزبان استفاده می‌نمایند. اما نتایج سالاما و همکاران ۱۹۸۳ نشان داده که در لاروهای الوده به Bt محتوای برخی از اسیدهای آمینه افزایش یافته است که می‌تواند ناشی از تجزیه کریستال‌های پروتئین باشد که مطالعات نشان داده است که آنزیم‌های پروتولیتیک معده تا حدی در این واکنش درگیر هستند. از طرفی مطالعات آسیب‌شناسی بافتی افزایش قابل توجهی در سنتز پروتئین‌های هسته‌ای در اجسام چربی، سلول‌های زیر جلدی، ماتریس تراشه و سلول‌های غده ابریشم پس از عفونت به ویروس را نشان داده است (Sarama *et al.*, 1994).

داده‌های حاصله همچنین تاثیر کاهشی معنی‌داری روی میزان ذخایر گلیکوژن ($P < 0.001$) نیز نشان داده است، بطوریکه میانگین گلیکوژن به ترتیب $7/50 \pm 0/49$ ، $0/11 \pm 0/67$ ، $0/95 \pm 2/87$ و $3/28 \pm 1/09$ میلی گرم بر گرم وزن تر بدست‌آمد. میزان کربوهیدرات موجود در همولف شاخص مهمی از میزان متابولیسم، تعادل پویا از جذب، سوخت و ساز و مصرف توسط بافت‌های مختلف است (Zhu *et al.*, 2012). در غلظت ۱ OB/ μ l گلیکوژن افزایش یافته است که می‌تواند به دلیل ایجاد اختلال در نسبت بین ترکیبات ذخیره‌ای و روند ذخیره سازی منابع انرژی (Nation, 2002; Klowden, 2007)، تامین منابع مورد نیاز برای تکثیر ویروس و کاهش میزان گلیکوژن و مصرف بیشتر مواد غذایی برای جبران کاهش ذخایر (Nation, 2002) باشد. در غلظت ۲ OB/ μ l میزان گلیکوژن حتی از شاهد نیز کمتر است نتیجه به دست آمده مشابه در لاروهای کرم ابریشم آلوده به BmNPV (Kobayashi *et al.*, 1981) و CPV (Saito, 1963; Horie & Watanabe, 1983) می‌باشد، این کاهش ممکن است طی تنش ایجاد شده در اثر استفاده از ویروس باشد که محتوای گلیکوژن برای تکثیر ویروس و به عنوان سوخت ذخیره‌ای برای برطرف کردن نیاز انرژی در زمان مبارزه با عفونت ویروسی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sarma *et al.*, 1994). اما در غلظت ۴ OB/ μ l میزان گلیکوژن لارو با شاهد در یک گروه قرار گرفته اند. طبق اطلاعات موجود پس از جذب مواد غذایی، مراحل تبدیل گلوکز به تری‌هالوز یا گلیکوژن (بر حسب نیاز بدن و سطح تری‌هالوز موجود در همولف) و نیز تبدیل اسیدهای چرب به دی و تری-اسیل گلیسرول در سلول‌های چربی در حضور آنزیم‌ها انجام می‌شود (Nation, 2002; Klowden, 2007). فعالیت این ویروس در سلول‌های چربی احتمالا می‌تواند نسبت بین ترکیبات ذخیره‌ای و نیز در روند ذخیره‌سازی منابع انرژی اختلال ایجاد کند. همانطور که پیش‌تر نیز اشاره شد ویروس‌ها برای تکثیر و تامین ترکیبات لازم برای سنتز نوکلئوکسپید خود، میزبان را وادار به تامین منابع می‌کنند که در مجموع منجر به افزایش منابع انرژی در بعضی از غلظت‌ها می‌شود. از طرف دیگر کاهش میزان گلیکوژن در سلول‌های چربی، حشره را وادار به جبران کاهش ذخایر موجود از طریق مصرف بیشتر مواد غذایی می‌کند می‌نماید.



References

- Abdel-Razek, A., Kamel, K., & Salama, H. (2004) Biochemical effects of the nematode-bacteria complex on the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 37, 205–214.
- Babu, K. & Ramakrishna, S. (2009) Metabolic alterations and molecular mechanism in silkworm larvae during viral infection: A review. *African Journal of Biotechnology* 8, 899–907.
- Bao, N. & Robinson, W. H. (2008) Metabolic reserves in *Periplaneta americana* (Dictyoptera: Blattidae). *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests*. p. 145-152.
- Bathon, H. (1981) Zur Zucht des Apfelwicklers, *Laspeyresia pomonella* (L.) (Lep., Tortricidae), auf einem künstlichen Nährmedium. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* 2, 136-140.
- Eberle, K. E., Sayed, S., Rezapanah, M., Shojai-Estabragh, S. & Jehle, J. (2009) Diversity and evolution of the *Cydia pomonella* granulovirus. *J. Gen. Virol.* 90, 662–71.
- Flexner, J. L. & Belnavis, D. L. (2000) Microbial Insecticides. pp 35-63. In: Rechcigl, J. E. & Rechcigl, N. A. (eds). *Biological and Biotechnological Control of Insect Pests*. Lewis Publishers, Inc. New York. 374 pp
- Gallegos, G., Rios, C., Sánchez, V. M., Guerrero, E., Sánchez, S. R. & Sánchez, F. (2009). Protección de Frutos de Manzano con el Virus de la Granulosis de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera:Tortricidae). *Southwestern entomologist scientific note* 34, 331-335.
- Horie, Y. & Watanabe, K. (1983). Effect of various kinds of dietary protein and supplementation with limiting amino acids on growth, haemolymph components and uric acid excretion in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 29, 187–199.
- Huber, J. (1981) Apfelwickler – Granulosevirus: Produktion und Biotests. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* 2, 141-145.
- Kaufmann, C. & Brown, M. R. (2008) Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Insect Physiology* 54, 367-377.
- Kawase, S. & Hayashi, Y. (1965) Nucleic-acid and protein changes in blood and midgut of the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus), during the course of cytoplasmic polyhedrosis. *Journal of Invertebr. Pathol.* 7, 49–54.
- Klowden, M. J. (2007) *Physiological Systems in Insects*. Boston, MA: Academic press. 571 pp.
- Kobayashi, M., Kotake, M., Sugimori, H., Nagamine, T. & Kajiura, Z. (1990) Identification of virus-specific polypeptides and translatable mRNAs in the isolated pupal abdomens of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 55, 52–60.

- Ludewig, M. H.** (2003) The Establishment of a Virus Free Laboratory Colony of *Cryptophlebia leucotreta* (False Codling Moth) and Characterisation of *Cryptophlebia leucotreta* Granulovirus (CrleGV) Genes. M.S. Student Rhodes University.
- Nation, J. L.** (2002) *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press, Boca Raton.
- Saito, S.** (1963) Trehalose in the body fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect Physiol.* 9, 509-519.
- Salama, H.S., Sharaby, A. & Ragaei, M.** (1983) Chemical changes in the haemolymph of *Spodoptera littoralis* [Lep.: Noctuidae] as affected by *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga* 28, 331-337.
- Sarma, B. J., Samson, M. V., Sivaprasad, V., Balankatasubbaiah, M. & Datta, R. K.** (1994) Biochemical changes in the haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* L., during the progressive infection of nuclear polyhedrosis virus (BmNPV). *Séricologia* 34, 539-544.
- Van Handel, E.** (1985) Rapid determination of glycogen and sugar in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1, 299-304.
- Van Handel, E. & Day, J. F.** (1988) Assay of lipids, glycogen and sugars in individual mosquitoes: correlations with wing length in field-collected *Aedes vexans*. *American Mosquito Control Association* 4, 549-550.
- Warburg, M.S. & Yuval, B.** (1997) Effects of energetic reserves on behavioral patterns of mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Oecologia* 112, 314-319.
- Yee, W. L. & Chapman, P. S.** (2008) Seasonal Amounts of Nutrients in Western Cherry Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) and Their Relation to Nutrient Availability on Cherry Plant Surfaces. *Environmental Entomology* 37(5), 1086-1098.
- Zhu, Q., He, Y., Yao, J., Liu, Y., Tao, L. & Huang, Q.** (2012) Effects of sublethal concentrations of the chitin synthesis inhibitor, hexaflumuron, on the development and hemolymph physiology of the cutworm, *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Science* 12(27), 1-13.