نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸، ص. ۲۸۸-۲۸۱

Journal of Plant Protection
Vol. 33, No. 3, Fall 2019, P. 281-288

مقاله کوتاه پژوهشی

مشخصات الکترون میکروسکوپی معده در بیوتیپ B سفیدبالک *Bemisia tabaci* ناقل بگوموویروس‌ها

مریم رستگار[1*]- مرتضی الهیاری[2]- سارا قارونی کاردانی[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۴

چکیده

سفیدبالک *Bemisia tabaci* از آفات مهم محصولات زراعی و باغی، به‌صورت مستقیم با تغذیه و به‌طور غیرمستقیم با انتقال ویروس به گیاه خسارت می‌زند. ویروس‌های جنس *Begomovirus* از تیره *Geminiviridae* توسط *B. tabaci* به حالت گردشی و پایا انتقال می‌یابند. مطالعه آناتومی داخلی ناقلین، سلول‌ها و ارگان‌های درگیر در انتقال، یک پیش‌نیاز برای بررسی برهم‌کنش تعیین کننده‌های ویروسی و سلولی در تداوم گیرش و انتقال ویروس است. در بعضی ناقل‌ها مانند شته‌ها، مطالعاتی در این زمینه صورت گرفته است، ولی در *B. tabaci* اطلاعات موجود اندک می‌باشد. به منظور تعیین جزئیات دستگاه گوارش این حشره و تعیین بخش‌های درگیر در انتقال ویروس، از قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش بیوتیپ B این حشره، مقاطع نازک تهیه و با میکروسکوپ الکترونی تصویربرداری گردید. مشخص شد که در سلول‌های دیوارهٔ معده میانی، جلویی و عقبی میکروویلی‌هایی (MV) وجود دارد، که کاملاً به هم چسبیده‌اند. به‌علاوه غشاهای تغییریافته پریمیکروویلار (MDMV) به‌صورت وزیکل‌های کوچک از لابه‌لای میکروویلی‌ها به درون فضای معده فرستاده می‌شوند. در این مطالعه MPMV برای اولین بار در مورد *B. tabaci* توصیف می‌شود. غشاهای MV و MDMV ممکن است محل اتصال ویروس‌ها و در واقع جایگاه گیرنده بگوموویروس‌ها باشد. در راستای جداسازی این غشاها و مطالعات بیشتر روی آن‌ها، لازم است از آنزیم‌های متصل به غشاها، به‌عنوان مارکر استفاده شود. برای این منظور میزان فعالیت ویژه دو آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز مورد بررسی قرار گرفت، که قابل توجه نبود؛ لذا احتمالا این آنزیم‌ها متصل به غشاهای مذکور در *B. tabaci* نمی‌باشند. به دلیل اهمیت موضوع، آنزیم‌های دیگری مانند آمینوپپتیداز نیز باید مورد بررسی و مطالعه قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: بافت‌شناسی حشرات، ساختار معده، سفیدبالک، ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی

مقدمه

سفیدبالک‌ها (*Homoptera: Aleyrodidae*) برای تغذیه از آوندهای آبکشی گیاهان، تخصص یافته‌اند. اغلب بیماری‌های ویروسی که در دو دهه گذشته شناخته شده‌اند، توسط این حشرات انتقال می‌یابند. از سوی دیگر پراکنش جهانی ویروس‌هایی که توسط آن‌ها منتقل می‌شوند، در حال افزایش است. *B. tabaci* مهم‌ترین گونه سفیدبالک به عنوان ناقل ویروس‌های گیاهی است. این حشره پلی‌فاژ و با گسترش جهانی است. بیش از ۱۱۴ ویروس به‌وسیله سفید بالک‌ها انتقال می‌یابند، که *B.tabaci* اغلب آن‌ها را انتقال می‌دهد. درک کاملی از آناتومی داخلی سفید بالک و سلول‌ها و ارگان‌های درگیر در انتقال، یک پیش‌نیاز برای بررسی برهم‌کنش تعیین کننده‌های ویروسی و سلولی ناقل در تداوم کسب و انتقال ویروس توسط سفیدبالک می‌باشد (۲، ۴ و ۹). دستگاه گوارش این حشرات دارای سه بخش متوالی است. بخش جلویی شامل دهان، گلو، مری و پیش معده و بخش میانی یا معده محل گوارش و جذب غذا می‌باشد.

۱- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: m.rastegar@areeo.ac.ir)
۲- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
۳- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

DOI: 10.22067/jpp.v33i3.81507

پیوست‌هایی مانند لوله های کور (سیکوم)[1] نیز وجود دارند. یک لایه سلول‌های پوششی سطح درونی لوله غذا را می‌پوشاند. در قسمت میانی لوله گوارش لایه کوتیکولی وجود ندارد و عمل جذب غذا در این محل انجام می‌شود. در برخی از حشرات از جمله سفیدبالک‌ها، قسمت آخر بخش جلویی لوله گوارش به قسمت انتهایی معده پیوسته است و سبب پدید آمدن ساختمان ویژه‌ای به نام اتاق پالایش[2] شده است. قسمت جلویی معده میانی وارد اتاق پالایش شده و شامل سلول‌های بسیار ضخیم اپی‌تلیال همراه با میکروویلی‌های بزرگ در اطراف یک مجرای کوچک‌تر می‌باشد. بخش عقبی لوله غذا دارای سه قسمت روده باریک، راست روده و روده بزرگ می‌باشد. قسمتی از روده باریک دور زده و وارد اتاق پالایش می‌شود تا غذا سریعاً تغلیظ گردد. سلول‌های اپی‌تلیال سیستم گوارشی سفیدبالک، کانال معده و هموسل را که کل بدن را اشغال کرده از هم جدامی‌کند. سفیدبالک‌ها دارای یک جفت غده بزاقی حقیقی و یک جفت غده بزاقی ضمیمه – که کوچک‌تر و کمی جلوتر از غدد بزاقی حقیقی قرار گرفته می‌باشند. غدد بزاقی اصلی و ضمیمه دارای لومن و لایه‌ای میکروویلی می باشند. غدد بزاقی، انشعابی از لوله گوارش می‌باشند (۶، ۸ و ۹). ویروس‌های جنس *Begomovirus* توسط سفیدبالک به‌طریق پایا منتقل می‌شوند و در استایلت، سر، معده میانی، همولنف و غدد بزاقی ردیابی شده‌اند (شکل ۱). بگوموویروس‌ها در اتاق پالایش تجمع یافته و از آن‌جا بیشترین مقدار ویروس وارد همولنف می‌شود. موانع اصلی از معده به همولنف و همولنف به غدد بزاقی وجود دارد. عبور از این موانع یک فرایند فعال است و پس از تشخیص پروتئین پوششی (CP) توسط گیرنده‌های درون میکروویلی[3] و حمل‌ونقل ویریون‌ها درون وزیکل‌های پوشش‌دار رخ می‌دهد. پیکره‌های ویروسی از دیواره معده میانی ازطریق لایه غشایی میکروویلی یا اپیکال پلاسمالما عبور کرده و سپس از طریق همولنف به سیستم بزاقی وارد می‌شود. پس از عبور از این مانع در طول تغذیه از گیاه، ویروس انتقال داده می‌شود. جزئیات این رابطه و موقعیت گیرنده ویروس هنوز به خوبی روشن نشده است. لذا مطالعه این جزئیات در طراحی استراتژی‌های جدید و موثر، به منظور کنترل بیماری‌های ناشی از بگوموویروس‌ها موثر خواهد بود. به منظور شناسایی موقعیت گیرنده‌ها در انتقال گردشی بگوموویروس‌ها در سفید بالک ناقل لازم است که جزئیات سلول‌ها و بافت‌های حشره‌ای درگیر در این فرآیند توصیف گردد، لایه غشایی میکروویلی که اطراف لومن (قسمت درونی معده)، قسمتهای مختلف معده را احاطه کرده‌اند، در حقیقت کنترل‌کننده‌های اصلی نقل و انتقال مولکول‌های معدنی و آلی از فضای درون معده به همولنف و برعکس می‌باشند. بسیاری از عوامل زنده از جمله باکتری‌ها و ویروس‌ها نیز در اثر تعاملاتی که با این غشاها دارند، قادرند وارد بدن حشره شوند.

1- Caecum
2- Filter Chamber
3- Micovilli, MV

غشاهای میکروویلی محل احتمالی گیرنده بگوموویروس‌ها عنوان شده است. به دلایل فوق از قسمت‌های مختلف دستگاه گوارشی بیوتیپ B، *B.tabaci* که بیشترین کارایی در انتقال بگوموویروس‌ها را دارا است، توسط الکترون میکروسکوپی تصویر برداری شد (۶، ۸ و ۹).

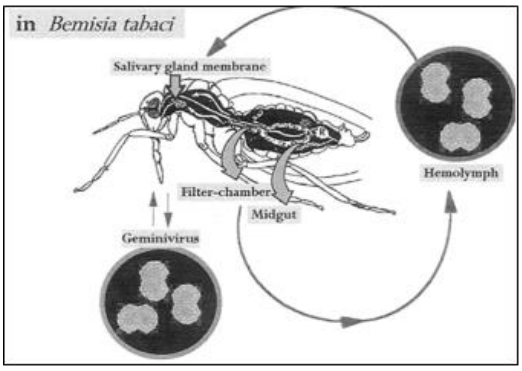
آنزیم‌های گوارشی

در جانوران ترشح آنزیم‌های گوارشی از سلول‌های معده بلافاصله پس از ساخته شدن به درون معده صورت می‌گیرد. بیشتر هضم نهایی توسط آنزیم‌های متصل به غشاهای میکروویلی انجام می‌گردد. به منظور جداسازی غشاهای میکروویلی سلول‌های معده میانی، می‌توان از آنزیم‌های متصل به غشاها به عنوان مارکر استفاده کرد (۹، ۱۰ و ۱۱). آلفا آمیلاز یک اندو–آنزیم است و باعث تبدیل نشاسته و گلیکوژن به دکسترین‌های کوچک‌تر می‌شود. لفاگلوکوزیداز و ایزومالتاز باعث هضم بیشتر این دکسترین‌ها و تولید گلوکز می‌شوند و این دو آنزیم اگزو آنزیم هستند. بسیاری از حشرات یک یا چندین آلفا و بتا گلوکوزیداز دارند که طیف وسیعی از کربوهیدرات‌های کوچک‌تر را تجزیه می‌کنند (۸). به منظور جداسازی لایه غشایی میکروویلی در معده سفید بالک که محل احتمالی پروتئین گیرنده ویروس‌ها، به‌ویژه ویروس خسارت‌زای پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی می‌باشد، از آنزیم های متصل به این غشا می‌توان به عنوان مارکر استفاده کرد. برای این منظور دو آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز که در حشرات مشابه، به عنوان آنزیم‌های متصل به غشاء میکروویلی، گزارش شده‌اند، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تصویر الکترون میکروسکوپی از معده *Bemisia tabaci*

برای تهیه تصویر الکترون میکروسکوپی، بخش اول معده میانی جدا و پس از برش طولی در محلول تثبیت کننده کارنووسکی قرار داده شد. بعد از نگهداری در این محلول به مدت ۸ ساعت، تثبیت بافت در محلول یک درصد اسمیوم تتراکسید (مرک) به مدت ۱/۵ ساعت ادامه یافت و پس از آن در بافر کاکودیلات (سیگما) شستشو داده شد. آب‌گیری در محلول‌های الکل اتیلیک انجام و نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در محلول پروپیلن اکسید (مرک) نگهداری و پس آن در میکروتیوب‌های کوچک در رزین قرار داده شد. پس از خشک شدن رزین، برش‌هایی به ضخامت ۵۰ نانومتر با استفاده از یک دستگاه اولترا میکروتوم U3 تهیه و برش‌ها در محلول یورانیل استات و سیترات سرب رنگ آمیزی و با الکترون میکروسکوپ فیلیپس مدل CM10 مشاهده و عکس‌برداری گردید.



شکل ۱- مسیر عبور بگوموویروس‌ها با رفتار گردشی در سفیدبالک *B. tabaci* (۸)

Figure 1– Circulative pathway of begomoviruses in *B. tabaci*

مواد و محلول‌های مورد نیاز

به‌منظور مطالعه و تشخیص گیرنده‌های احتمالی بگوموویروس‌ها، لازم است غشاهای درون معده جدا و خالص گردند. به‌منظور جداسازی لایه غشایی میکروویلی در معده سفیدبالک که محل احتمالی پروتئین گیرنده بگوموویروس‌ها، به ویژه ویروس خسارت‌زای پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی می‌باشد، می‌توان از آنزیم‌های متصل به این غشا به‌عنوان مارکر استفاده کرد. به‌منظور شناسایی آنزیم‌های موجود در غشاهای معده سفید بالک فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز که در معده شته‌ها فعال است، مورد بررسی قرار گرفت.

ماده زمینه آلفا گلوکوزیداز- برای فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز نیاز به ماده زمینه آلفا- پارا نیتروفنیل گلوکوپایرانوزاید می‌باشد، که طبق روش اللهیاری و همکاران (۱) با استفاده از غلظت ۵ میلی مولار ماده زمینه در بافر سیترات-فسفات (PH=۵) اندازه‌گیری شد.

محلول متوقف کننده فعالیت آنزیم- یک گرم سدیم لوریل سولفات، ۲/۱ گرم بی کربنات سدیم و ۲/۶ گرم کربنات سدیم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. از این محلول برای متوقف کردن فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز و اسید فسفاتاز استفاده گردید (۱).

معرف برادفورد- برای تهیه این معرف، کوماسی بلو[1] به نسبت ۱۰۰ میلی‌گرم در ۵۰ میلی لیتر الکل اتیلیک ۹۵٪ حل شد و سپس ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک غلیظ به آن افزوده و حجم محلول با آب دیونیزه به ۲۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم‌های گوارشی

فعالیت دو آنزیم گوارشی آلفا و بتا گلوکوزیداز با استفاده از روش اللهیاری و همکاران (۱) مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش در ۲۵۰ میکرولیتر محلول واکنش اندازه‌گیری شد. میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط یک دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده شد و ثبت گردید. مقدار پارانیتروفنول تولید شده، با استفاده از پارامترهای یک منحنی استاندارد که رابطه میزان جذب نور و غلظت پارانیترو فنول را نشان می‌داد و در همین شرایط محاسبه شده بود، تخمین زده شد. شیب خط پارانیتروفنول تولید شده در چهار زمان مذکور مقدار تولید این ماده را در واحد زمان (دقیقه) نشان می‌دهد (۱).

اندازه گیری میزان پروتئین

میزان پروتئین در محلول به روش برادفورد، با استفاده از یک منحنی استاندارد به‌دست آمده از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی تخمین زده شد. میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت گردید.

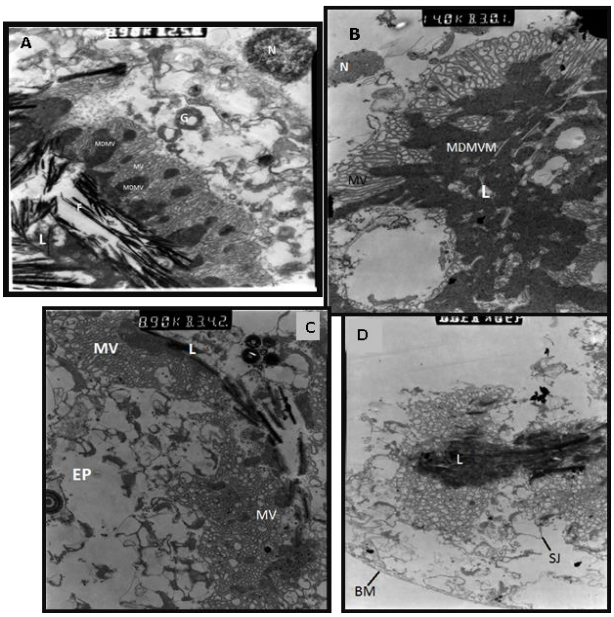
نتایج و بحث

به منظور شناسایی موقعیت گیرنده‌ها در انتقال گردشی بگوموویروس‌ها در مگس سفید ناقل لازم بود که جزئیات سلول‌ها و بافت‌های حشره در این فرآیند توصیف گردد. تصویر میکروسکوپی از مقطع اتاقک پالایش در شکل ۲ نشان داده شده است. میکروویلی‌ها در این قسمت مشابه معده میانی بالارونده[2] توسعه یافته هستند. فضای درون لومن وزیکول‌های مختلف از ماده‌ای پر شده که تیره‌تر به نظر می‌رسد. همان‌طور که مشخص است، این مواد در سیتوپلاسم سلول‌ها تولید شده و از لابه‌لای میکروویلی‌ها به فضای درون لومن ترشح می‌شوند. مقاطع مربوط به معده میانی بالارونده (شکل ۲، A و B) و معده میانی پائین رونده (شکل ۲، C) نشان داده شده است. در

1- Coomassie Brilliant Blue R250

2- Ascending midgut

این مقاطع کریستال‌هایی در فضای درونی لوله دیده می‌شود، درحالی که در مقطع مربوط به معده میانی پائین رونده این کریستال‌ها تشکیل نشده‌اند. محل اتصال غشاء پائینی سلولهای مختلف، که به طرز خاصی به هم متصل شده‌اند، در شکل ۲ مشخص شده است. همان طورکه در شکل ۲ قسمت B مشاهده می‌شود، میکروویلی‌ها در همه قسمت‌ها به‌طور فشرده کنار هم قرار گرفته‌اند. به‌طوری‌که بیشتر نوک میکروویلی‌ها با فضای داخلی معده در تماس است. به‌نظر می‌رسد دیواره‌های جانبی میکروویلی‌ها با اتصالاتی که تیره‌تر دیده می‌شوند به هم‌دیگر چسبیده‌اند.



شکل ۲- قسمت‌های مختلف معده: A و B – مقطع عرضی معده بالارونده (Ascending midgut)، C- مقطع عرضی معده پائین رونده (Descending midgut) و D- مقطع عرضی اتاقک پالایش (filter chamber). F- باقی‌مانده‌های کریستالی غذا (شکل A – مقطع عرضی Ascending midgut)، L- قسمت درونی معده (lumen)، G- اجسام گلژی، N- هسته، MV- میکروویلی، MDMVM (modified perimicrovillar membrane). A و B معده میانی- جلویی، در این ناحیه میکروویلی‌ها بلندتر هستند. میکروویلی‌ها به یکدیگر کاملا چسبیده‌اند که در این حالت Lamellae نامیده می‌شوند. در واقع میکروویلی‌ها توسط زوائدی به نام Trabecullae به هم متصل شده‌اند. C و D معده میانی عقبی: در این ناحیه میکروویلی‌ها کوتاه‌تر هستند. SJ- محل اتصال سلول های اپی‌تلیال، EP- سلول اپی‌تلیال. BM- غشاء پایه سلول اپی‌تلیال (برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود).

Figure 2- Different parts of midgot: A and B- Cross section of Ascending midgut, C- Cross section of Descending midgut, D- Cross section of filter chamber. F- Food Crystal (Fig A. Cross section of ascending midgut), L. lumen. G- Golgi bodies, N- Nucleus, MN- Microvilli, MDMVM- modified perimicrovillar membrane. A and B Ascending midgut, microvilli are longer in this area. Microvilli are completely sticked together whitch called Lamellae, C and D- Descending midgut, EP- Epithelial cells. BM-Basal membrane.

این ساختمان در شته‌ها نیز دیده شده است و ساختاری به نام ترابکول[1] موجب اتصال بین دیواره‌های جانبی میکروویلی است (۱۰ و ۱۱). وزیکل‌هایی در اطراف هسته (N) دیده شد که حاوی غشاهای در هم پیچیده و متراکمی هستند (شکل ۲ قسمت A). در شته *Acyrthosiphon pisum* نشان داده شده است که این غشاها همان غشاهای پریمیکروویلار تغییر یافته[2] هستند. غشاهای پریمیکروویلار غشاهایی هستند که در راسته نیم‌سخت‌بال‌پوشان (Hemiptera) دیده شده‌اند و وظیفه مهمی در فرایندهای هضم و جذب دارند، ولی در شته‌ها به صورت غشاهای پریمیکروویلار تغییریافته مشاهده می‌شوند. شته‌ها و سفید بالک‌ها هر دو، در گروه Sternorrhyncha قرار داده شده‌اند. این حشرات از آوند آبکش تغذیه کرده و به همین دلیل

1- Trabeculae

2- Modified perimicrovillar membrane, MDMVM

غلظت سوکروز در درون معده آنها تا یک مولار می‌رسد (۶، ۷، ۸ و ۹). این غلظت از سوکروز فشار اسمزی تا حدود سه برابر فشار اسمزی همولنف ایجاد می‌کند و بنابراین می‌تواند موجب انتقال آب از همولنف و سلول‌های اپی‌تلیال به درون معده گردد. در شته‌ها و سفیدبالک‌ها برای اینکه با این فشار اسمزی مقابله گردد، میکروویلی‌ها با اتصالات محکمی به هم‌دیگر چسبیده‌اند (شکل ۲). به‌دلیل وجود این ساختار، غشاهای پری‌میکروویلار که در حشرات راسته جوربالان تکامل یافته اند، به شکل تیپیک خود وجود ندارند. در عوض غشاهایی که در سیتوپلاسم سلول‌های (اجسام گلژی) ساخته می‌شوند، از لابه‌لای میکروویلی‌ها به درون فضای معده راه می‌یابند (شکل ۲، A).

در شکل (۲، A و B) تصویر بخشی از معده میانی بالارونده نمایش داده شده است. در این بخش از معده میانی میکروویلی‌ها بلندتر و منظم‌تر کنار هم قرار گرفته‌اند و فضای درونی معده وسیع‌تر و از کریستال‌های غذایی پر شده است. در اینجا نیز غشاهای تغییر یافته پری‌میکروویلار (MDMVM) در وزیکل‌هایی در درون سیتوپلاسم ظاهر شده و سپس از لابه‌لای میکروویلی‌ها وارد فضای داخلی معده شده‌اند.

دستگاه گوارش در این حشرات این گونه تکامل یافته که بخشی از روده عقبی که قابلیت دفع آب و مواد ناخواسته را دارد، به ابتدای معده میانی در ساختمان پیچیده‌ای به نام اتاق پالایش متصل شده است. تحقیقات قبلی نشان داده که وجود ویریون‌ها در اتاق پالایش بیشترین جمعیت را دارد و پس از آن بیشترین تعداد ویریون‌ها در معده میانی دیده شد. اگر ویریون‌ها در انتهای معده میانی بالارونده وارد سلول نشوند، مقصد بعدی آن‌ها روده عقبی خواهد بود و سپس دفع می‌شوند. بنابراین به احتمال زیاد گیرنده‌های اصلی ویریون‌ها باید در ابتدای معده میانی یعنی معده میانی پایین‌رونده باشد. این گیرنده‌ها می‌توانند پروتئین‌های مختلف متصل به غشاء میکروویلی‌ها باشند. به دلیل اینکه در شته‌ها و سفید بالک‌ها برخلاف سایر حشرات نیم‌سخت‌بال‌پوش غشاهای پریمیکروویلار از نوک میکروویلی‌ها رها شده و ارتباط فیزیکی خود را با میکروویلی حفظ نمی‌کنند، احتمال اینکه گیرنده‌های ویریون روی این غشاها باشد کاهش پیدا می‌کند (۶، ۷، ۸ و ۹). برای پی‌بردن به ماهیت این گیرنده‌ها لازم است غشاهای مختلف معده میانی پایین‌رونده، از جمله غشاهای پایینی که در تماس با همولنف هستند، خالص شده و پروتئین‌های متصل به آنها استخراج شوند. مطالعه آنزیم‌های متصل به غشاء در سلول‌های معده میانی می‌تواند به مشخص شدن جایگاه دقیق این گیرنده‌ها کمک کند. در شته *Acyrthosiphon pisum* مشخص شد که آنزیم‌های آلفا گلوکوزیداز و یک سیستئین پروتئیناز شبیه کاتپسین‌ها به غشاهای پری‌میکروویلار تغییر یافته متصل هستند. یک عمل اصلی نسبت داده شده به این آلفا گلوکوزیداز تجزیه ساکارز است که پس از جذب فروکتوز از فشار اسمزی غذای بلعیده شده کاسته می‌شود (۳). همچنین نشان داده شده است که *B. tabaci* می‌تواند پروتئین‌های موجود در غذای مصنوعی را جذب کند، ولی هیچ‌گونه فعالیت آنزیمی مربوط به آنزیم تجزیه‌کننده پروتئین در معده آن مشاهده نشده است (۶). در این مطالعه هیچ فعالیتی از آنزیم آلفا گلوکوزیداز در معده *B. tabaci* مشاهده نشد. فعالیت دو آنزیم آلفا و بتا گلوکوزیداز که در غشاهای معده میانی شته‌ها فعال است، مورد بررسی قرار گرفت که فعالیت ویژه آنزیم آلفا گلوکوزیداز ۳۴/. و بتا گلوکوزیداز ۰۵۳/. به‌دست آمد، که این میزان فعالیت ویژه قابل توجه نیست و به نظر می‌رسد این آنزیم‌ها متصل به غشاهای مذکور در دستگاه گوارشی *B. tabaci* بیوتیپ B نمی‌باشند و آنزیم‌های دیگری مانند آمینوپپتیداز نیز باید آزمایش گردد.

غشاهای تغییریافته پریمیکروویلار به‌صورت وزیکل‌های کوچک از لابه‌لای میکروویلی‌ها به درون فضای معده فرستاده می‌شوند. غشاهای پریمیکلوویلار تغییر یافته MDMVM، تاکنون در مگس های سفید توصیف نشده‌اند که در شکل ۲ مشاهده می‌شوند. غشاهای میکروویلیMV و پریمیکلوویلار تغییر یافته MDMV احتمالا محل اتصال ویروس و در واقع جایگاه گیرنده بگومو‌ویروس‌های گردشی است (۶).

از اهداف آینده‌نگر برای کنترل بگوموویروس‌ها اخلال در انتقال توسط ناقل می‌باشد. این اهداف با جداسازی غشاهای درگیر در مسیر گردشی بگومو‌ویروس‌ها و شناخت و جداسازی گیرنده‌های این ویروس‌ها در بدن سفیدبالک ناقل امکان پذیر می‌گردد. پاتوژن‌های قابل انتقال با ناقلین حشره‌ای مانند بگومو‌ویروس‌های گیاهی جزء مخرب‌ترین بیمارگرها هستند، چرا که این بیمارگرها توسط ناقلین خود قادرند در زمان کوتاه در نواحی وسیعی منتشر شوند. از همین رو تعداد ناقلین حشره‌ای که می‌توانند چنین بیمارگرهایی را منتقل کنند از عوامل تعیین‌کننده نقش پاتوژن در ایجاد خسارت می‌باشند. مطالعات انجام شده در مورد پاتوژن‌های قابل انتقال با ناقلین نشان داده که گیرنده‌های اختصاصی در بدن حشره ناقل و لیگاندهای هم کنش‌کننده با این گیرنده‌ها در پاتوژن مسئول برقراری ارتباط اختصاصی هستند که شرط لازم انتقال است. گیرنده‌ها به عنوان درجه بالای اختصاصیت ناقلی شمرده می‌شوند و شناسایی آن‌ها اهمیت زیادی دارند زیرا باعث فرصت‌هایی برای کنترل بیماری‌های ویروسی گیاهان می‌شوند.

منابع

1- Allahyari M., Bandani A.R., and Habibi-Rezaei M. 2010. Subcellular fractionation of midgut cells of the sunn pest *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae): enzyme markers of microvillar and perimicrovillar membranes, Journal of Insect Physiology 56(7): 710-717.
2- Blanc S., Uzest M., and Drucker M. 2011. New research horizons in vector-transmission of plant viruses. Current Opinion in Microbiology 14: 483–491.
3- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248–254.
4- Castillo J.N., Olive E.F., and Campos F.F. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. Annual Review of Phytopathology 49: 219–48.
5- Cristofoletti P.T., Ribeiro A.F., Derasion C., Rahbe Y., and Terra W.R. 2003. Midgut adaptation and digestive enzyme distributionin a phloem feeding insect, the pea aphid *Acythosiphon pisum*. Journal of Insect Physiology 49: 11-24.
6- Czosnek H., Ghanim M., and Ghanim M. 2002. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci* insights from studies with Tomato yellow leaf curl virus. Association of Applied Biologists 140: 215-231.
7- De Barro P.J., Liu S.S., Boykin L.M., and Dinsdale A.B. 2011. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. Annual Review of Entomology 56: 1–19.
8- Ghanim M., Rosell R.C., Campbell L.R., Czosnek H., Brown j.K., and Ullman D.E. 2001. Digestive, salivary, and reproductive organs of *Bemisia tabaci* (*Gennadius*) (Hemiptera: Aleyrodidae) B type. Journal of Morphology 248: 22–40.
9- Kanakala S., and Ghanim M. 2018. "Whitefly-transmitted begomoviruses and advances in the control of their vectors," In B.L Patil. Genes, Genetics and Transgenics for virus resistance in plants. Ciaster Academic Press., U.K. 201–220.
10- Salvucci M.E. 2000. Effect of the β-glucosidase inhibitor, bromoconduritol, on carbohydrate metabolism in the silverleaf whitefly, Bemisia argentifolii. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 45: 117–128.
11- Silva C.P., Ribeiro A.F., and Terrra W.R. 1996. Enzyme markers and isolation of the microvillar and perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells. Insect Biochemistry and Molecular Biology 26: 1011–1018.

Journal of Plant Protection
Vol. 33, No. 3, Fall 2019, P. 281-288

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸، ص. ۲۸۸-۲۸۱

Details of Digestive Organ of *Bemisia tabaci* Biotype B, the Vector of Begomoviruses by Electron Microscopy

M. Rastegar[1]*- M. Allahyari[2]- S. Gharouni Kardani[3]

Received: 26-06-2019
Accepted: 05-11-2019

Introduction: Whitefly, Bemesia tabaci Bemisia (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) is the key pest of many crops worldwide, directly damages the plant by feeding and indirectly by transmitting the virus. The *Begomoviruses* in the family *Geminiviridae* are transmitted by *B. tabaci* through a circulative and persistent manner. For some insect vectors of plant viruses like aphids, information has been collected regarding their digestive tract anatomy and cell structure in relation to the formation of virus receptor for successful transmission. In *B. tabaci*, such structural details are poorly understood. This study was performed to determine the details of the digestive organs of *B. tabaci*.

Materials and Methods: Ultrathin sections from important regions of the digestive tract of the insect were prepared and studied by electron microscopy according to a conventional procedure (Cristofoletti *et al*., 2003). After dissection of the alimentary tract, the tissue was fixed in Karnovsky solution and Osmium tetraoxide, 8 and 1.5 hours, respectively. After rinsing in sodium cacodylate buffer, the tissue was dehydrated in successive alcohols grades. Then the tissue was embedded in resin and ultrathin sections (50 nm) were prepared using a U3 ultra-microtome. These sections were stained in Uranyl acetate and Lead Citrate then were examined by a Philips CM10 electron microscope.

Alimentary canal of *B. tabaci* was dissected in a few drops of 260 mM NaCl buffer located on a microscope slide on top of an ice block. Dissected tissues were homogenized in a motorized potter-elvehjem homogenizer (Teflon pestle, 0.1 mm clearance) for 3 minutes at 500 rpm. Enzyme assay methods were according to (Allahyari *et al*., 2010). Briefly, α and β-glucosidase activity were measured using 5 mM α and β-D, 4-nitrophenyl glucopyranoside in 50 mM citrate– phosphate buffer pH 5.0, respectively, based on the appearance of p-nitrophenol in the solution. Protein concentration was measured according to the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin (Bio-Rad, Munchen, Germany) as a standard.

Results and Discussion: Observations showed that ascending and descending midgut are composed of thick epithelial cells with microvilli (MV) extending into the large lumen. These microvilli appeared to join each other and tighten by trabeculae. Furthermore, the Modified Premicrovillar Membranes (MDPMV) are sent into the lumen through the inter-lamellar space in the form of small vesicles between microvilli (fig. 2, A). These membranes are synthesized in Golgi cisternae and then fused whit with the microvillar membrane at the base of microvilli. Based on our knowledge this is the first report describing MPMV in *B. tabaci*. The receptor position for begomoviruses is probably on microvillar membrane as reported by other vectors however, MDPMV may have some roles in virus transmission processes. In order to study the possibility of isolating these membranes, we measured the activity of membrane-bound enzymes, α and β- glycosidase reported in other Hemipetran insects (Silva *et al*., 1996). Assessing specific activities of these enzymes showed that they were not present or active in *B. tabaci* gut. The specific activity of α and β- glycosidase in the gut homogenate of *B. tabaci* were 0.34 and 0.053 mU/mg protein whereas in *Eurygaster integriceps* first part of midgut homogenate mean specific activity of these enzymes were 316.97 and 27.93, respectively (Allahyari *et al*., 2010). Previous research also found that other enzymes may be involved in trehalose formation and decreasing osmotic pressure due to high sucrose concentration in phloem sap (Salvucci, 2000).

Conclusion: Binding sites of the virus particles on an inner surface of the alimentary canal, which most probably has a role in the absorbing region of this organ, the midgut and the inner surface of the midgut are covered by microvilli. Thus the virus particles firstly must be bind to the microvillar membrane. Glycoproteins and other transmembrane proteins are possible binding sites. Modified perimicrovillar membranes also may have

1- Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, (AREEO), Isfahan, Iran,
(*- Corresponding Author Email: m.rastegar@areeo.ac.ir)
2- Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, (AREEO), Shiraz, Iran
3- Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, (AREEO), Mashhad, Iran

an important role in virus transmission and digestion. In the process of digestion free amino acids that are abundant in phloem sap are trapped in the MDPMV and in this way making amino acid absorption easier by increasing the concentration of amino acids (Cristofoletti *et al*., 2003). In order to study the physiology of virus interaction with midgut, it is necessary to isolating microvillar and perimicrovillar membrane. Investigations using other candidate enzymes like aminopeptidase and also lectin binding properties are powerful markers to isolate these membranes for future studies.

Keywords: *Bemisia tabaci*, Histology, Midgut structure, TYLCV