تاثیر دو جدایه قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* بر ایمنی لارو سن چهارم بید سیب زمینی *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae)

زهرا پورعلی[۱] و مریم عجم حسنی[۲*]

۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران

۲ - ***نویسنده مسوول:** استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران (shahroodm@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۱۹

چکیده

شناخت ویژگی‌های سیستم ایمنی حشرات، می‌تواند در اتخاذ روش‌های کنترل بیولوژیک مانند استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات نقش مهمی داشته باشد. حشرات دارای سیستم ایمنی قوی، از پیشرفت آلودگی ممانعت می‌کنند. در این تحقیق، واکنش ایمنی لارو سن چهارم بید سیب زمینی *Phthorimaea operculella* در برابر دو جدایه از قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* شامل Fashand و 47 بررسی شد. غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر هر کدام از جدایه‌ها به لاروها تزریق شد. لاروهای شاهد نیز با آب مقطر تیمار شدند. پس از گذشت ۳، ۶ و ۱۰ ساعت فراوانی سلول‌های خونی در لاروهای تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس مشاهدات، تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در لاروهای تیمار شده بعد از گذشت ۳ ساعت به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. ولی فراوانی سلول‌های فوق با گذشت زمان تا ۱۰ ساعت به تدریج کاهش یافت. پروهموسیت‌ها نیز، کاهش معنی داری ۶ ساعت پس از تزریق اسپورها نشان دادند. فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز نیز اندازه گیری شد. بیش‌ترین فعالیت فنل‌اکسیداز به ترتیب در جدایه Fashand و 47 در ۳ ساعت پس از تزریق رخ داد. شناسایی هموسیت‌ها و مطالعه اثرات متقابل عوامل بیمارگر با سامانه ایمنی بید سیب زمینی برای اولین بار انجام شده است و می‌تواند زمینه تحقیقات بعدی در راستای امکان سنجی کنترل بیولوژیک این آفت خطرناک سیب زمینی با قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* باشد.

کلید واژه‌ها: بید سیب زمینی، قارچ بیمارگر حشرات، ایمنی سلولی

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) به عنوان یکی از مهم ترین محصولات غذایی در دنیا محسوب می‌شود، که از نظر اهمیت بعد از محصولاتی چون گندم، برنج و ذرت در مقام چهارم قرار داشته و در ایران نیز از جایگاه ویژه‌ای در تغذیه مردم برخوردار است و از نظر تامین غذای مردم جهان پس از گندم و برنج در رتبه سوم قرار دارد (FAO, 2014). سیب‌زمینی در زمره محصولات غده ای است که دارای کربوهیدرات (نشاسته) زیادی بوده و نقش مهمی در تغذیه مردم جهان دارد و این موضوع به دلیل عملکرد بسیار بالا در واحد سطح، انرژی و مقدار پروتئین تولیدی در واحد سطح توسط سیب زمینی نسبت به گندم و برنج می‌باشد (Khajepour, 1991). از آفات مهم سیب‌زمینی، بید سیب‌زمینی *Phthorimaea operculella*

است. این حشره الیگوفاژ آفت محصولات خانواده‌ی Solanaceae شامل سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، توتون، بادمجان، فلفل، بامیه و تاجریزی بوده و به طور وسیعی در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده شده است (Fenemore, 1988). به تجربه ثابت شده است که مبارزه شیمیایی با این آفت به دلیل مخفی بودن آن در درون برگ‌ها، ساقه و غده‌ها و همچنین به دلیل بروز مقاومت سریع به حشره کش‌ها به تنهایی کافی نبوده و بایستی با بکارگیری روش‌های مختلف زراعی، مکانیکی، بیولوژیک و میکروبیولوژیک با این آفت مقابله کرد (Bacon et al., 1972). امروزه استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات در کنترل بسیار از آفات، توصیه شده است. اسپورهای بیماریزای این قارچ‌ها قادر به رشد و جوانه زنی در همولنف حشره بوده و منجر به آلودگی می‌شوند (Abood et al., 2010). شناخت ویژگی‌های سیستم ایمنی حشرات می تواند در درک بهتر برهمکنش بین دفاع حشره و فعالیت قارچ‌های بیمارگر بسیار مؤثر باشد. مشخص شده که میزبان‌های مقاوم قادر به جلوگیری از پیشرفت آلودگی هستند (Washburn et al., 2000). به طور معمول سامانه ایمنی حشره با شناسایی عامل بیگانه فعال شده و به شکل ایمنی سلولی و هیومرال واکنش نشان می‌دهد (Lavine and Strand, 2002). این واکنش‌ها گاه بسیار قوی عمل کرده و منجر به غالبیت دفاع فیزیولوژیک حشره بر عامل بیمارگر شده است. در همین راستا Moushumi et al. (2008) گزارش کردند که زمانی که سوسک‌های *Diclodispa armigera* (Olivier) با قارچ *Beauveria bassiana* آلوده شدند، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها با فرایند بیگانه خواری اسپورها را بلعیدند و با گذشت زمان، زائده‌های سیتوپلاسمی سلول‌های مشارکت کننده در ایمنی، اطراف عامل بیگانه را در بر گرفتند، بطوریکه حشره توانست اسپورها را مهار کرده و به همراه سیستم فنل اکسیداز آنها را ملانیزه و دفع کند. در تحقیقی دیگر، مشاهده شد که دفاع سلولی مگس سرکه پارازیت شده با تشکیل کپسول اطراف عامل مهاجم و توسط لاملوسیت‌ها انجام شد. لاملوسیت‌ها به تخم پارازیتویید حمله‌ور شده و یک کپسول اطراف آن تشکیل دادند. مولکول‌های سمی حاصل در طول ملانیزاسیون منجر به کشته شدن عامل بیگانه شدند (Meister et al., 1994). این واکنش‌های دفاعی گاه بسیار قوی بوده و منجر به برتری ایمنی حشره نسبت به عامل بیگانه شده است به طوری‌که با انهدام عامل بیگانه توسط هموسیت‌های حشره، رهاسازی عامل بیمارگر به منظور کنترل حشره ناموفق بوده و در نتیجه هدف اصلی که کاهش خسارت آفت است تحقق نمی‌یابد. حشرات دارای تنوع زیادی در فراوانی سلول‌های خونی و غلظت پپتیدهای ضد میکروبی هستند. این تنوع حتی در مراحل زیستی مختلف یک حشره نیز مشهود است و قطعا در حساسیت و مقاومت حشرات مختلف دخیل می‌باشد. به نظر می‌رسد بررسی اثرات متقابل بین ایمنی حشره و عوامل بیگانه وارد شده به همولنف یا هر نوع تنش می تواند انگیزه جدیدی در بهره گیری بهتر عوامل میکروبی باشد. بر اساس گزارش اخیر محققین، پنج نوع هموسیت در همولنف بید سیب زمینی وجود دارد که شامل پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید و اسفرولوسیت است Pourali and Ajamhassani, (2018). ولی تا کنون گزارشی مستند مبنی بر چگونگی اثرات متقابل هموسیتهای این حشره در مقابل عوامل بیماریزا ثبت نشده است لذا در تحقیق حاضر، اهداف زیر مورد مطالعه قرار گرفت: برهمکنش‌های دفاع سلولی لاروهای سن چهارم بید سیب زمینی در برابر اسپور قارچ بیمارگر *B. Bassiana* شامل دو جدایه Fashand و 47 و تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز پس از ۳، ۶ و ۱۰ ساعت.

مواد و روش‌ها

پرورش و تهیه کلنی بید سیب‌زمینی

در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵، جمعیت اولیه بید سیب‌زمینی جهت تشکیل کلنی از غده‌های آلوده‌ی رقم سانته‌ی موجود در آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشکده‌ی کشاورزی شاهرود تهیه شد. کلنی بید سیب‌زمینی داخل ظروف پلاستیکی به ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر و قطر ۱۴ سانتی‌متر که محتوی غده‌های سیب‌زمینی بود، مستقر شدند. غده‌ها به طور روزانه مورد بازبینی قرار گرفتند و هنگامی که توسط لاروها مصرف و یا فاسد شدند، با غده‌های تازه جایگزین شدند. جهت تغذیه‌ی شب پره‌ها پس از تولد و تکامل تخمدان‌ها برای تخم ریزی بیش‌تر، قطره‌های بسیار کوچک عسل به سطح داخلی سقف ظروف پرورش مالیده شد. کلیه آزمایش ها در داخل اتاقک رشد با دمای ۱±۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۴۵٪ انجام گرفت. از سنین چهارم لاروی (لاروهای سن چهارم با اندازه گیری عرض کپسول سر تشخیص داده شدند. عرض کپسول سر در لارو سن چهارم = ۰/۹۲- ۰/۷۷ میلی‌متر بود) برای بررسی فراوانی انواع سلول‌های خونی و آزمایش‌های ایمنی شناسی استفاده شد.

تهیه و کشت قارچ *B. bassiana* و تزریق به حشرات

دو جدایه بیماریزای قارچ (*B. bassiana*) شامل Fashand (جداسازی شده از خاک منطقه Fashand توسط غزوی و تهیه شده از موسسه گیاهپزشکی کشور) و 47 (جداسازی شده از خاک جنگل ابر شاهرود توسط حیدری) روی محیط PDA کشت شدند. برای نگهداری جدایه‌ها به مدت طولانی از محیط PCA استفاده شد. این محیط از اسپورزایی زیاد جلوگیری می‌کند و میزان زنده مانی جدایه‌ها را در دمای ۱۰ درجه سلسیوس افزایش می‌دهد. پس از گذشت هشت روز از کشت قارچ‌ها، غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد و جهت بررسی‌های ایمنی شناسی مورد استفاده قرار گرفت. غلظت 10^5 اسپور در میلی لیتر (با توجه به زیست سنجی پایه) از هر کدام از جدایه ها تهیه شده و با استفاده از سرنگ هامیلتون میزان ۲ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ به سطح شکمی محدوده بند ۳ و ۴ شکمی لاروهای سن چهار تزریق شد. سپس محل زخم با پارافین پوشانده شد. فراوانی سلول‌های خونی در فواصل زمانی ۳، ۶ و ۱۰ ساعت بررسی و ثبت شد. بدین منظور، همولنف لاروهای سن چهارم هر تیمار در هر زمان ذکر شده با استفاده از میکروپی‌پت جمع‌آوری و با بافر فیزیولوژیک رقیق شدند. ماده ضد انعقاد به کار رفته در آزمایش محلول تایسون بود (Mahmood and Yousuf, 1985). شمارش سلول‌های خونی با استفاده از لام نئوبار و بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری Olympus BH2 انجام شد. شمارش کل با محاسبه تعداد سلول‌های خونی موجود در پنج خانه از لام نئوبار (هر کدام به ابعاد یک میلی متر مربع) انجام شد (Jones, 1967) و با فرمول زیر محاسبه گردید (Jones, 1962).

$$\frac{\text{عمق خانه‌های لام گلبول شمار} \times \text{میزان رقت} \times 1\,mm^2 \times \text{تعداد سلول‌های خونی}}{\text{تعداد خانه‌های شمارش شده از لام}}$$

لاروهای شاهد با ۲ میکرولیتر آب مقطر تیمار شدند. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تیمار (شاهد (لاروهای تزریق شده با آب مقطر) و دو جدایه قارچ (لاروهای تزریق شده با جدایه های فشند و ۴۷)) و ۱۰ تکرار (۱۰ لارو سن چهارم) انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از برنامه نرم افزاری SAS- 9.4 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام گرفت.

تعیین فعالیت فنل اکسیداز

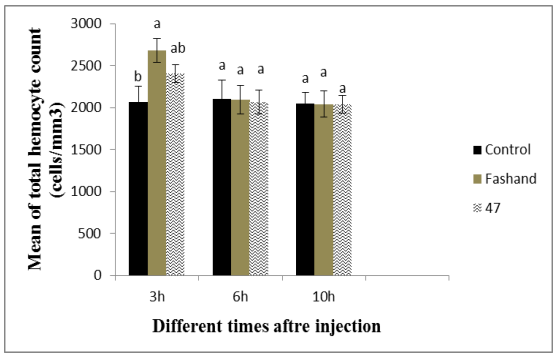
برای تعیین اثر جدایه های قارچ روی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز لاروهای مورد آزمایش از روش هموسیت لایزیت استفاده شد (Leonard et al., 1985). در این روش برای هر تیمار، همولنف ۳۰ لارو سن چهار بید سیب زمینی جمع آوری شد و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رو نشین حذف شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (PH=7) به رسوبات اضافه شد و سپس هموژنیزه شدند. محلول اخیر دوباره در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رو نشین حاصل در برآوردهای آنزیمی استفاده شد. بدین منظور، ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌ها به ۵۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی‌مولار L-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) و ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات اضافه شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و طول موج نمونه‌ها توسط دستگاه Elisa reader مدل EL×800 ساخت شرکت BioTek آمریکا در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد. هر تکرار شامل مجموع همولنف ۳۰ لارو سن چهار بود که با هم مخلوط شدند. تجزیه واریانس داده‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از برنامه نرم افزاری SAS- 9.4 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام گرفت.

نتایج

بررسی وضعیت ایمنی سلولی لاروهای سن چهار بید سیب زمینی در برابر دو جدایه از قارچ *B. bassiana*

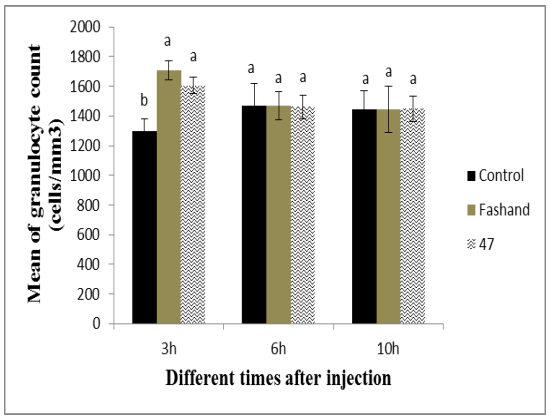
نتایج نشان داد که واکنش ایمنی لاروهای تیمار شده با قارچ بیمارگر، معنی‌دار بوده است. بیش ترین تغییرات معنی‌دار روی سلول‌های خونی در زمان های ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق قارچ رخ داده است. به طوری که پس از ۳ ساعت از تزریق اسپورهای دو جدایه Fashand و 47، افزایش معنی‌داری در تعداد کل سلول‌های خونی ($P \leq ۰/۰۲۳۹$، $df_{t,e} = ۲،۲۷$، $F = ۴/۳$) (شکل ۱)، گرانولوسیت‌ها ($P \leq ۰/۰۰۰۵$، $df_{t,e} = ۲،۲۷$، $F = ۱۰/۲۴$) (شکل ۲) و پلاسموتوسیت‌ها ($P \leq ۰/۰۱۰۱$، $df_{t,e} = ۲،۲۷$، $F = ۵/۴۸$) (شکل ۳) نسبت به شاهد مشاهده شد. با گذشت زمان به تدریج تعداد کل سلول‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها کاسته شد به طوریکه در زمانهای ۶ و ۱۰ ساعت پس از تزریق، تفاوت معنی داری بین فراوانی سلول‌های خونی در لاروهای تیمار شده و شاهد مشاهده نشد.

۳ ساعت پس از تزریق هر دو جدایه، تعداد پروهموسیت‌ها نسبت به شاهد کاهش یافتند، اما اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده نشد. اما ۶ ساعت پس از تزریق هر دو جدایه، پروهموسیت‌ها ($P \leq ۰/۰۰۰۶$ ، $df_{t,e} = ۲،۲۷$، $F = ۹/۹۸$) کاهش معنی داری نسبت به شاهد داشتند. اما ۱۰ ساعت پس از تزریق هر دو جدایه هیچ اختلاف معنی‌داری در تراکم پروهموسیتها نسبت به شاهد مشاهده نشد (شکل ۴).



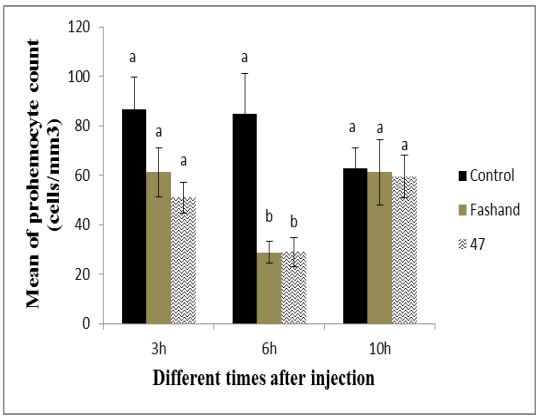
شکل ۱- تاثیر دو جدایه‌ی Fashand و 47 بر تعداد کل سلول‌های خونی لاروهای سن چهارم *P. operculella* (حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار)

Fig.1. The Effect of two isolates of Fashand and 47 on THC in hemolymph of 4th instars larvae of *P. operculella* (Columns show mean ± SE and statistical differences were marked by different letters)



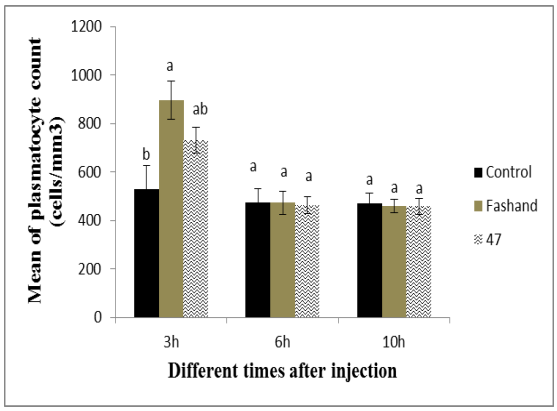
شکل ۲- تاثیر دو جدایه‌ی Fashand و 47 بر تعداد گرانولوسیت‌های لاروهای سن چهارم *P. operculella* (حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار)

Fig.2. The Effect of two isolates of Fashand and 47 on granulocytes in hemolymph of 4th instars larvae of *P. operculella* (Columns show mean ± SE and statistical differences were marked by different letters)



شکل ۴- تاثیر دو جدایه‌ی Fashand و 47 بر تعداد پروهموسیت‌های لاروهای سن چهارم *P. operculella* (حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار)

Fig.4. The Effect of two isolates of Fashand and 47 on prohemocytes in hemolymph of 4th instars larvae of *P. operculella* (Columns show mean ± SE and statistical differences were marked by different letters)

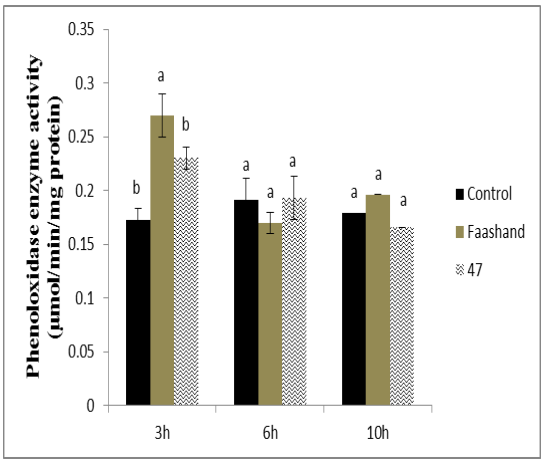


شکل ۳- تاثیر دو جدایه‌ی Fashand و 47 بر تعداد پلاسموتوسیت‌های لاروهای سن چهارم *P. operculella* (حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار)

Fig.3. The Effect of two isolates of Fashand and 47 on plasmatocytes in hemolymph of 4th instars larvae of *P. operculella* (Columns show mean ± SE and statistical differences were marked by different letters)

بررسی فعالیت فنل اکسیداز در لاروهای سن چهار بید سیب زمینی در برابر دو جدایه از قارچ *B. bassiana*

همراه با افزایش تعداد سلول‌های خونی پس از ورود عامل بیگانه (اسپور قارچ)، فعالیت فنل اکسیداز افزایش یافت. جدایه Fashand بیش‌ترین فعالیت فنل اکسیداز را به میزان ۰/۰۲±۰/۲۷ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین در فاصله زمانی ۳ ساعت پس از تزریق قارچ‌ها داشت و این افزایش معنی دار بود ($P \leq ۰/۰۰۵$، $df_{t,e} = ۲،۲۷$، $F = ۱۲/۵۸$). جدایه 47 نیز در همین فاصله زمانی فعالیت فنل اکسیداز را به طور معنی داری افزایش داد و در مرتبه بعدی بعد از جدایه Fashand قرار گرفت. با گذشت زمان تا ۱۰ ساعت از فعالیت سیستم فنل اکسیداز به تدریج کاسته شد (شکل ۵).



شکل ۵- تاثیر دوجدایه Fashand و 47 بر فعالیت فنل اکسیداز لاروهای سن چهارم *P. operculella* (حروف کوچک مشابه در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی دار)

Fig.5. The Effect of two isolates of Fashand and 47 on phenoloxidase enzyme activity in hemolymph of 4th instars larvae of *P. operculella* (Columns show mean ± SE and statistical differences were marked by different letters)

بحث

در تحقیق حاضر، تاثیر اسپورهای قارچ بر فعالیت ایمنی بید سیب زمینی معنی دار بود. این تغییر در همان ساعات اولیه ورود عامل بیگانه به همولنف رخ می‌دهد (Khosravi et al., 2014) که از ویژگی‌های ایمنی سلولی می‌باشد. بطوریکه تعداد کل سلول‌های خونی و سلول‌های مشارکت کننده در ایمنی یعنی گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در سه ساعت اولیه ورود عامل اسپورها به طور معنی داری افزایش یافت. در واقع گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها از دو طریق هم با اشتقاق پروهموسیت‌ها به عنوان سلول‌های پایه و هم تقسیمات میتوزی خود زیاد می‌شوند. از طرفی پروهموسیت‌ها به عنوان سلول‌های پایه در ساعاتی بعد، کاهش قابل ملاحظه ای نشان دادند که نشان دهنده واکنش مثبت آنها به آلودگی بوده است. سیستم فنل اکسیداز به عنوان یک فاکتور مهم در ایمنی حشرات در ملانیزاسیون و بلوکه کردن عامل بیگانه نقش دارد (Söderhäll and Cerenius, 1992). افزایش معنی دار فعالیت این آنزیم همراه با افزایش تعداد سلول‌های خونی در نتایج این تحقیق بیانگر این واقعیت است که فعالیت آنزیم فنل اکسیداز با ورود لیپوپلی ساکاریدهای قارچ‌ها تحریک شده و افزایش یافته است. سلول‌های خونی به ویژه اونوسیتوئیدها منابع بالقوه تولید فنل اکسیداز در بالپولکداران می‌باشند (Jiang et al., 1997) هر چند که در این تحقیق، تغییر معنی داری در تراکم اونوسیتوئیدها مشاهده نشد.

به نظر می‌رسد تاثیر آلودگی ناشی از متابولیت‌های هر دو جدایه بومی (۴۷) و غیر بومی (فشند) بر فراوانی سلول‌های خونی بید سیب زمینی اختلاف معنی داری ایجاد نکرد، هر چند که تاثیر جدایه‌ها بر فعالیت فنل اکسیداز معنی دار بود. در واقع نوع ترکیبات شیمیایی و متابولیت‌ها منجر به رفتارهای ایمنی مختلفی در حشره می‌شود چنانچه ایمنی سلولی لارو پروانه موم خوار بزرگ در برابر قارچ‌های *B. bassiana* و *Metarhizium anisopliae* متفاوت گزارش شده است (Vilcinskas et al., 1997). از طرفی ظرفیت ایمنی هر لارو به دلیل مقدار هماتوپویزیز و تولید سلول‌های خونی و بسته به جنسیت و مقدار تغذیه متفاوت است (Barreda and Belosevic, 2001).

نتایج دیگر محققان نیز مؤید تأثیر معنی‌دار عامل بیگانه بر واکنش‌های دفاعی حشرات است. به طور مثال، Khosravi et al. (2014) اثر اسپورهای *B. bassiana* (Bals.-Criv) را بر عملکرد سیستم ایمنی لاروهای پروانه برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis* Walker بررسی کردند. شمارش کل و تفرقی سلول‌های خونی نشان داد که آلودگی توسط *B. bassiana* موجب تغییرات قابل توجهی در تعداد سلول‌های خونی شده است. در ساعات اولیه آلودگی با قارچ تعداد کل سلول‌های خونی افزایش یافته اما پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت کاهش یافت. کاهش مشابه در تعداد سلول‌های خونی در گردش خون آلوده به قارچ *B. bassiana* لاروهای *Spodoptera exigua* نیز

مشاهده شد (Hung and Boucias, 1992). Zibaee and Malagoli (2014) واکنش‌های ایمنی کرم ساقه خوار نواری برنج *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera:Crambidae) را در برابر تعدادی از قارچ‌های بیماری‌زای حشرات شامل ایزوله‌های BB1، BB2 و BB3 از *B. bassiana*، *M. anisopliae*، *I. fumosoroseus* و *Lecanicilium lecanii* بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که بیش‌ترین تعداد کل سلول‌های خونی، سه ساعت پس از تزریق ایزوله‌های *B. bassiana* و شش ساعت پس از تزریق دیگر تیمارها بدست آمد. در بررسی واکنش‌های ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم *Spodoptera litura* Fabr. علیه دو جدایه از قارچ *B. bassiana* و ذرات سنتزی لاتکس بید، نشان داد که در زمان‌های سه و شش ساعت پس از تزریق، تعداد کل سلول‌ها، تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نسبت به شاهد به طور معنی‌داری بالاتر بود. فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز نیز اندازه گیری شد و نشان داد که بالاترین فعالیت این آنزیم در زمان‌های سه و شش ساعت پس از تزریق تیمارها بود. در نهایت سلول‌های خونی این حشره در مقابله با عامل بیگانه‌ای چون اسپور قارچ و ذرات سنتزی لاتکس بید، فعالیت مثبتی از خود نشان داده و با تشکیل گره اطراف اسپورها، توانستند آن‌ها را از بین ببرند (Ajamhassani, 2014b). همچنین در یک بررسی دیگر روی واکنش ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم پروانه *U. pulchella*، در برابر دو جدایه از قارچ *B. bassiana* (Bals.-Criy) و یک جدایه از قارچ *Isaria farinosae* نشان داده شد که در زمان‌های سه و شش ساعت پس از تزریق، تعداد کل سلول‌ها، تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نسبت به شاهد به طور معنی‌داری بالاتر بود. همچنین فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز اندازه گیری شد و نشان داد که این پارامتر با تعداد سلول‌های خونی در زمان‌های مختلف ارتباط مستقیم داشت. به این معنی که بالاترین فعالیت این آنزیم سه و شش ساعت پس از تزریق بود. در نهایت مشخص شد که این حشره نیز از سیستم ایمنی مناسبی در مقابل عوامل مهاجم برخوردار است (Ajamhassani, 2014a). Ajamhassani et al. (2013) در بررسی پاسخ ایمنی پروانه برگخوار سفید آمریکایی *Hyphantria cunea* (Drury) در برابر چهار ایزوله از قارچ بیماری‌زای حشرات به نام *B. bassiana*، و یک ایزوله از *I. farinosae*، گزارش کردند که ۶ ساعت پس از تزریق اسپورهای قارچ بیمارگر در همه جدایه‌ها، تعداد کل سلول‌های خونی و تعداد ایمنوسیت‌های در گردش به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت. طبق مطالعات متعددی که محققین گزارش داده اند، تعداد سلول‌های خونی درگیر در پاسخ ایمنی نسبت به پاتوژن‌های مختلف دارای نوسانات زیادی است (Hung and Boucias, 1992; Bidochka and Khachatourians, 1987; Sewify and Hashem, 2001; Chouvenc et al., 2009; Anggraeni and Putra, 2011; Zibaee et al, 2011). این نوسانات در تعداد سلول‌های خونی را می‌توان به برخی عوامل مانند مداخله ی احتمالی سلول‌های خونی در فرایند تشکیل گره پس از تزریق، اثر سیتوتوکسی متابولیت ثانویه قارچی بر روی سلول‌های خونی و آسیب غشا به علت ترکیب سطح اسپور (عمدتاً پروتئین‌های آبگریز) نسبت داد.

طبق نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر، افزایش مشاهده شده در تعداد کل سلول‌های خونی به افزایش هر دو نوع ایمنوسیت یعنی گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها بستگی دارد. به علاوه، کاهش تعداد کل سلول‌های خونی پس از ۱۰ ساعت ناشی از کاهش هر دو جمعیت گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها است. این کاهش می‌تواند به علت آلودگی سلول‌ها (Chain and Anderson, 1983; Gunnarsson, 1988; Gillespie et al., 2000) و یا به علت تعلل در فرایند بیگانه‌خواری (Vilcinskas et al., 1997) و تغییر شکل شدید سلول‌ها در نتیجه تاثیر زهرابه‌های قارچی (Vilcinskas et al., 1997) باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شده است که بدین وسیله از آن مقام تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Abood, F., Bajwa, G. A., Ibrahim, Y. B., and Sajap, A. S. 2010. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* against the Tiger moth, *Atteva sciodoxa* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Journal of Entomology, 7(1): 19-32.

Ajamhassani, M., Sendi, J. J., Zibaee, A., Askary, H., and Farsi, M. J. 2013. Immunoliogical responses of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) to entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criy) and *Isaria farinosae* (Holmsk.) Fr. Journal of Plant Protection Research, 53(2): 110-118.

Ajamhassani, M. 2014a. Study on cellular defense of larvae of *Utethesia pulchella* (Lepidoptera: Arctiidae) against *Beauveria bassiana* and *Isaria farinosae*. Biocontrol in Plant Protection. 2(1): 57-67. (In Farsi with English abstract).

Ajamhassani, M. 2014b. Cellular immune reactions of *Spodoptera litura* (Fabricus) (Lepidoptera: Noctuidae) against entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. Plant Pests Research, 4(2): 59-68. (In Farsi with English abstract).

Anggraeni, T., and Putra, R. E. 2011. Cellular and humoral immune defenses of *Oxya japonica* (Orthoptera: Acrididae) to entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. Entomological Research, 41(1): 1-6.

Bacon, O. G., McCalley, N. F., Riley, W. D., and James, R. H. 1972. Insecticides for control of potato tuberworm and green peach aphid on potatoes in California. American Potato Journal, 49(8): 291-296.

Barreda, D. R., and Belosevic, M. 2001. Transcriptional regulator of hemopoiesis. Immunology, 25: 763-789.

Bidochka, M. J., and Khachatourians, G. G. 1987. Hemocytic defense response to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. Entomologia experimentalis et applicata, 45(2): 151-156.

Chain, B. M., and Anderson, R. S. 1983. Inflammation in insects: The release of a plasmatocyte depletion factor following interaction between bacteria and haemocytes. Journal of Insect Physiology, 29(1): 1-4.

Chouvenc, T., Su, N. Y., and Robert, A. 2009. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 101(3): 234-241.

FAO, 2014. FAO statistical yearbooks - world food and agriculture. FAO Chief Statistician, and Director, Statistics Division, United Nations.

Fenemore, P. G. 1988. Host-plant location and selection by adult potato moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae): a review. Journal of Insect Physiology, 34(3): 175-177.

Gillespie, J. P., Burnett, C., and Charnley, A. K. 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var acridum. Journal of Insect Physiology, 46(4): 429-437.

Gunnarsson, S. G. S. 1988. Infection of Schistocerca gregaria by the fungus *Metarhizium anisopliae*: Cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. Journal of Invertebrate Pathology, 52(1): 9-17.

Hung, S. Y., and Boucias, D. G. 1992. Influence of Beauveria bassiana on the cellular defense response of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Journal of Invertebrate Pathology, 60(2): 152-158.

Jiang, H., Wang, Y., Ma, C., and Kanost, M. R. 1997. Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 27(10): 835-850.

Jones, J. C. 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. American Zoologist, 209-246.

Jones, J. C. 1967. Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* (Linnaeus). The Biological Bulletin, 132(2): 211-221.

Khajepour, M. R. 1991. Production of industrial plants. Jihad-e Daneshgahi Press, Isfahan Industrial University.

Khosravi, R., Sendi, J. J., Zibaee, A., and Shokrgozar, M. A. 2014. Immune reactions of the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill and two developmental hormones. Invertebrate Survival Journal, 11: 11-21.

Lavine, M. D., and Strand, M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32(10): 1295-1309.

Leonard, C., Söderhäll, K., and Ratcliffe, N. A. 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. Insect Biochemistry, 15(6): 803-810.

Mahmood, T., and Yousuf, M. 1985. Effect of some insecticides on the hemocytes of *Gryllus bimaculatus* de Geer. Pakistan Journal of Zoology, 17(1): 71-84.

Meister, M., Braun, A., Kapper, C., Reichhart, J. M., and Hoffman, J. A. 1994. Insect immunity. A transgenic analysis in *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. The European Molecular Biology Organization Journal, 13(24): 5958–5966.

Moushumi, P. H. L., Hazarika, K., Barooah, M., Puzari, K. C., and Kalita, S. 2008. Interaction of *Dicladispa armigera* (Coleoptera: Chrysomelidae) haemocytes with *Beauveria bassiana*. International Journal of Tropical Insect Science, 28(2): 88–97.

Pourali, Z. and Ajamhassani, M. 2018. The effect of thermal stresses on the immune system of the potato tuber moth, Phthorimaea operculella (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal of Entomological Society of Iran. 37(4), supplementary, 515-525.

Sewify, G. H., and Hashem, M. Y. 2001. Effect of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on cellular defence response and oxygen uptake of the wax moth *Galleria mellonella* L.(Lep., Pyralidae). Journal of Applied Entomology, 125(9-10): 533-536.

Söderhäll, K., and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. Annual Review of Fish Diseases, 2: 3-23.

Vilcinskas, A., Matha, V., and Götz, P. 1997. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Journal of Insect Physiology, 43(12): 1149-1159.

Washburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan, F. F., Beckage, N. E., and Volkman, L. E. 2000. Co-infection of Manduca sexta larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. Journal of Insect Physiology, 46(2): 179-190.

Zibaee, A., Bandani, A., Talaei-Hassanlouei, R., and Malagoli, D. 2011. Cellular immune reactions of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. Journal of Insect Science, 138: 1-16.

Zibaee, A., and Malagoli, D. 2014. Immune response of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) larvae to different entomopathogenic fungi. Bulletin of Entomological Research, 104(2): 155-163.

Effect of two isolates of *Beauveria bassiana* on immunity of fourth instar larvae of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Z. Pourali[1] and M. Ajam hassani[2]*

1. M.Sc. student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Sharood, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Sharood, Iran (Shahroodm@gmail.com)

Received: 14 February 2017 Accepted: 10 September 2018

Abstract

Background and Objectives

Knowledge on the characteristics of insects immune system can play an important role in the adoption of biological control methods such as the use of entomopathogenic fungi. Insects with a strong immune system exhibit the development of infection.

Materials and Methods

In this study, the immune responses of fourth instars larva of the potato tuber moth were investigated against two isolates of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* including Fashand and 47 (isolated from the soil of the Fashand region and isolated from the Abr jungle of Shahrood, respectively). Concentration of 10^5 spores / ml of each isolate was injected to the larvae. Control larvae were treated with distilled water. After 3, 6 and 10 hours, the abundance of hemocytes was evaluated in treated larvae.

Results

The results showed that after 3 hours the total number of hemocytes, plasmatocytes and granulocytes increased significantly compared to control. However, the abundance of these hemocytes decreased gradually after 10 hours post injection. 6 hours after injection, prohemocytes also showed significant decrease in numbers. The amount of enzyme activity of phenoloxidase was measured. The maximum activity of Phenoloxidase enzyme was in the isolates of Fashand and 47, respectively, in 3 hours after spores injection.

Discussion

Recognition of hemocytes and study of the interaction of pathogenic agents with immune system of Potato tuber moth has been conducted for the first time and could be used as a basis for future investigation in the context of the feasibility of the biological control of this dangerous pest of potato with *Beauveria bassiana*.

Keywords: Potato tuber moth, Entomopathogenic fungi, cellular immune