تحقیقات آفات گیاهی
۶۸-۵۹ : ۴(۲) - ۱۳۹۳

واکنش های ایمنی سلولی لارو *Spodoptera* (Lepidoptera.: Noctuidae) علیه قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* (Fabricus) *litura*

مریم عجم حسنی[1*]
۱. استادیار گروه باغبانی و گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی بسطام، دانشگاه شاهرود

(تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۹)

چکیده

با توجه به جایگاه ارزشمند عوامل میکروبی در کنترل آفات، بررسی برهم‌کنش سیستم دفاعی حشره با قارچ‌های بیمارگر می‌تواند راهکاری نوین در اتخاذ برنامه‌های مدیریت آفت محسوب شود. لذا در این تحقیق، ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم *Spodoptera litura* (Fabricus) در برابر دو جدایه از قارچ *Beauveria bassiana* شامل Fashand و 566 و ذرات (Latex Bead) با بررسی فعالیت سلول‌های خونی پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتویید و آنزیم فنل‌اکسیداز انجام شد. غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر از جدایه‌های قارچی و 10^6 ذره در میلی‌لیتر لاتکس بید به لاروها تزریق شدند و در فواصل زمانی ۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت واکنش آن‌ها با هموسیت‌ها گزارش شد. تیمار شاهد شامل لاروهایی بودند که با آب مقطر تزریق شدند. تعداد کل سلول‌ها، تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در زمان های ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق حداکثر بود که تفاوت معنی‌داری را با شاهد نشان داد. اما به تدریج پس از ۶ ساعت تعداد کل سلول‌ها و تعداد افتراقی سلول‌های خونی کاسته شد. تعداد پروهموسیت‌ها در ۳ ساعت ابتدایی پس از تزریق کاهش معنی‌داری نشان داد. پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در فرایند گره‌زایی شرکت کرده و منجر به نابودی عامل بیگانه شدند. گره‌زایی در فواصل زمانی ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق عوامل بیگانه در همولنف حشره مشاهده شد. فعالیت فنل اکسیداز در حضور سوبسترای L-DOPA اندازه‌گیری شد. این پارامتر با تعداد سلول‌های خونی در زمان‌های مختلف ارتباط مستقیم نشان داد. بالاترین فعالیت این آنزیم ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق تیمارها بود. نتایج این آزمایش ایمنی شناسی حاکی از آن است که سلول‌های خونی لارو *S. litura* در مقابله با عامل بیگانه‌ای چون اسپور قارچ و ذرات سنتزی لاتکس بید فعالیت خوبی از خود نشان داده اند چنان‌که همراه با افزایش تعداد سلول‌های موثر در ایمنی، با تشکیل گره اطراف اسپور، توانستند آن‌ها را از بین ببرند.

واژه‌های کلیدی: دفاع سلولی، هموسیت، *Spodoptera litura*، *Beauveria bassiana*

*نویسنده مسئول: shahroodm@gmail.com

مقدمه

پروانه برگ‌خوار *Spodoptera litura* (Fabricus) آفتی چندین‌خوار است که طیف وسیعی از سبزی‌ها (کاهو، کلم، بروکلی، ذرت، سیب‌زمینی، بادمجان، توتون، لوبیای چشم بلبلی، هویج)، درختان میوه (سیب، انگور، توت) و درختان زینتی و غیر مثمر (توت زینتی) را مورد حمله قرار می‌دهد (Vennet, *et al*., 2003). خسارت بالای این آفت در شمال امریکا، اروپای مرکزی و کشورهای آسیایی مانند چین، هند و ایران، روش‌های کنترل متنوعی را پایه‌ریزی کرده است که از آن میان استفاده از عصاره‌های گیاهی و عوامل میکروبی جایگاه ارزشمندی داشته است (Ashokaraj *et al*., 2013). استفاده توام *Bacillus thuringiensis* و قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* مرگ و میر بالای لاروهای این آفت را سبب شد (Jayanthi *et al*., 2001; Alotaibi, 2013). فن والریت و ویروس NPV نیز به همراه قارچ *B. bassiana* در کاهش جمعیت لاروهای *S. litura* موثر ارزیابی شدند. کنیدی‌های بیماریزای قارچ‌های بیمارگر مانند *B. bassiana* توان تندش و نفوذ به هموسل حشرات را دارند و گاه می توانند بر سیستم دفاعی سلولی حشره غلبه کنند (Abood *et al*., 2010). بررسی برهمکنش عامل بیمارگر و سیستم دفاعی حشره می‌تواند غالبیت یکی را بر دیگری مشخص سازد.

در واقع، واکنش‌های ایمنی، شاخص مهم حساسیت میزبان به آلودگی است که به شکل غیر اختصاصی و اختصاصی ظهور می‌کند. در ایمنی غیر اختصاصی، جلد، لایه‌های کوتیکولی لوله گوارش، منافذ تنفس و سیستم تناسلی به‌عنوان منابع فیزیکی در دفع عامل خارجی فعالیت می‌کنند (Strand and Lavin, 2002; Kanost *et al*., 2007) از طرفی، مطالعات اجزاء تشکیل‌دهنده همولنف از مراحل مهم ایمنی‌شناسی حشرات است (Nahla *et al*., 2010). نقش سلول‌های خونی در ایمنی اختصاصی و مشارکت آن‌ها در فرایندهای بیگانه‌خواری (Borges *et al*., 2008) و تشکیل گره و کپسول (Nardi *et al*., 2003) ثابت شده است. گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها به‌عنوان ایمنوسیت‌های حشرات در فعالیت‌های ایمنی طیف وسیعی از بال‌پولک‌داران نقش کلیدی دارند. به علاوه، پپتیدهای ضد میکروبی، لکتین‌ها، سیستم پروفنل‌اکسیداز و ملانیزاسیون در واکنش‌های هیومرال فعالیت می‌کنند (Bulet *et al*., 1999). به عبارتی، برآیندی از فعالیت‌های دفاعی، رفتاری، مرفولوژیکی، ژنتیکی و فیزیولوژیکی، حشره را در برابر عوامل زنده و غیر زنده بیگانه محافظت می‌کند. بنابراین، بررسی برهمکنش بین ایمنی حشرات با عوامل بیگانه می‌تواند رویکردی جدید در بهره‌گیری بهتر و مناسب‌تر عوامل میکروبی باشد. ساندیپ و همکاران در سال ۲۰۱۱ اظهار داشتند که غشای پلاسمایی پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت-های لارو سن ۳ این حشره ۲ ساعت پس از تیمار با اسپورهای قارچ *B. bassiana*، مضمحل می‌شود و ایمنی ضعیفی ۴۸ ساعت پس از تیماردهی به شکل کپسول اطراف اسپورها رخ می دهد ولی گزارشی از چگونگی فعالیت سلول‌های خونی در ساعت‌های اول ورود اسپورها به همولنف و یا نقش آنزیم فنل اکسیداز ارائه ندادند (Sanehdeep *et al.,* 2011). لذا به منظور درک بیشتر قدرت ایمنی پروانه برگ‌خوار *S. litura* در برابر عوامل بیگانه در این تحقیق، پاسخ‌های دفاع سلولی لاروهای سن چهارم این حشره در مقابل قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و ماده سنتزی غیر زنده لاتکس بید در مدت زمان ۲۴ ساعت ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

در اواسط فصل بهار و همزمان با تخمریزی پروانه *S. litura*، یک دسته تخم از پشت برگ‌های درختان توت دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان جمع‌آوری شد و در آزمایشگاه در شرایط مناسب دمایی (۱±۲۶ درجه سلسیوس) و دوره نوری (۱۴:۱۰) و رطوبت نسبی ۵±۷۵ پرورش داده شدند. پس از پرورش یک نسل و جفتگیری پروانه‌های نر وماده، دسته‌جات تخم حاصل به منظور انجام آزمایش‌ها در نظر گرفته شد لاروهای تازه تفریخ شده در ظرف‌های پرورش به ابعاد ۸×۱۰×۱۸ سانتیمتر مکعب محتوی برگ‌های توت قرار داده شدند. لاروهای سن ۴ جهت آزمایش‌های ایمنی‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند

کشت و نگهداری جدایه‌های قارچ بیماریزای *Beauveria bassiana*

دو جدایه بیماریزای قارچ *B. bassiana* (تهیه شده از موسسه گیاه‌پزشکی کشور) شامل Fashand (جداسازی شده از خاک منطقه‌ی فشند، توسط غزوی) و 566 (جدا سازی شده از سن گندم در اصفهان توسط پارکر) روی محیط Potato Dextrose Agar کشت شدند. برای تولید اسپور به مقدار زیاد از محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar استفاده شد. این محیط کشت با دارا بودن محیط اسیدی از رشد باکتری‌های ساپروفیت جلوگیری نموده و سبب تولید اسپور به مقدار زیاد می‌شود (Poinar and Thomas, 1978). برای نگهداری جدایه‌ها به مدت طولانی از محیط Potato Carrot Agar استفاده شد. این محیط از اسپورزایی زیاد جلوگیری کرده و میزان زنده مانی جدایه‌ها را در دمای ۱۰ درجه سلسیوس افزایش می‌دهد. پس از گذشت ۸ روز از کشت قارچ‌ها، غلظت مناسب تهیه شده و جهت بررسی‌های ایمنی‌شناسی مورد استفاده قرار داده شدند. برای آزمایش‌های ایمنی شناسی، غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر برای تزریق انتخاب شد.

تزریق اسپورهای دو جدایه قارچ *B. bassiana* و لاتکس بید به لاروها

برای انجام این آزمایش از لاروهای سن چهار استفاده شد. به‌منظور جلوگیری از تحرک لاروها، آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه روی قطعاتی از یخ قرار داده شدند. سطح شکمی بدن لاروها با الکل ۷۰٪ ضد عفونی شده و سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون ۲ میکرولیتر از غلظت مناسب سوسپانسیون اسپور و یا لاتکس بید به سطح شکمی لاروها محدوده پاهای دروغین دوم و سوم تزریق شد. سپس محل زخم با پارافین پوشانده شد. قطر قطعات پلی استیرن کربوکسیلات موجود در لاتکس بید ۰/۳ میکرومتر بود که به نسبت ۱:۱۰ با بافر فسفات (pH= ۷/۲) رقیق شد (Borges *et al*., 2008) . غلظت تیمارهای به کار رفته در آزمایش‌های ایمنی شناسی 10^6 کنیدی در میلی‌لیتر (برای جدایه های قارچی) و 10^6 (ذره در بافر برای لاتکس بید) در نظر گرفته شد. این غلظت با آزمایش‌های مقدماتی به دست آمد. تزریق غلظت های بالاتر مرگ و میر لاروها را قبل از ۲۴ ساعت به همراه داشت. حشرات شاهد با آب مقطر تزریق شدند. پس از تزریق، لاروها به ظروف پرورش حاوی برگ توت منتقل شدند.

بررسی تاثیر اسپورهای قارچ *B. bassiana* و لاتکس بید روی تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها

بعد از تزریق اسپور و لاتکس بید به لاروهای سن ۴، تعداد کل سلول‌های خونی در فواصل زمانی ۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت توسط لام نئوبار شمارش شده و با شاهد (آب مقطر) مقایسه شدند. به این ترتیب که از هر لارو مقدار ۵ میکرولیتر همولنف جمع‌آوری شد و به نسبت ۱:۲۰ با بافر فیزیولوژیک رقیق شد. شمارش سلول‌های خونی با استفاده از لام نئوبار و بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری Olympus (BH2) انجام گرفت. شمارش کل با محاسبه میانگین تعداد سلول‌های خونی موجود در ۵ خانه از لام نئوبار× ضریب رقت × 10^4 میلی‌لیتر به دست آمد. ماده ضد انعقاد به کار رفته در آزمایش محلول تورک (کلرید سدیم ۶۲ میلی‌مولار، گلوکز ۱۰۰ میلی‌مولار، تری سدیم سیترات^{30} میلی‌مولار و اسید سیتریک ۲۶ میلی‌مولار) بود (Sewify and Hashem, 2001). شمارش پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نیز مانند شمارش کل سلول‌های خونی انجام شد. برای هر یک از زمان‌های مورد آزمایش ۵ تکرار در نظر گرفته شد.

بررسی تاثیر اسپورهای قارچ *B. bassiana* و لاتکس بید در تشکیل گره

بعد از تزریق، در فواصل زمانی ۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت همولنف حشرات جمع‌آوری شده و روی لام نئوبار قرار گرفت. میزان همولنف جمع‌آوری شده برای تعیین تعداد گره، ۵ میکرولیتر بود که با ماده ضد انعقاد رقیق می‌شد. در شمارش گره ها، ملاک محاسبه لایه های گرانولوسیت و پلاسموتوسیت بود که در اطراف اسپور یا لاتکس بید جمع شده و آن را منهدم می‌کردند. گاه یک لایه و گاه چند لایه از سلول‌های خونی برای گره زایی مشارکت داشتند. در اینجا نیز حاصل‌ضرب تعداد گره‌های موجود در ۵ خانه از هماسیتومتر با ضریب رقت و 10^4 برای هر تیمار (دو جدایه

قارچ، لاتکس بید و شاهد) و در زمان‌های یاد شده محاسبه شد.

تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

برای تعیین اثر اسپور قارچی روی سیستم فنل اکسیداز لاروهای مورد آزمایش از روش هموسیت لایزیت استفاده شد (Leonard *et al*., 1985). در این روش برای هر تیمار و در هر زمان (۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴) ساعت، همولنف لارو جمع‌آوری شده و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رونشین حذف شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) به رسوبات اضافه شد و سپس هموژنیزه شد. محلول اخیر دوباره در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رو نشین حاصل در برآورد های آنزیمی استفاده شد. بدین منظور، ۲۵ میکرولیتر از نمونه ها 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 سلسیوس انکوبه شده و سپس توسط دستگاه Elysa reader در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. آزمایش در ۵ تکرار انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تیمار (شاهد، دو جدایه قارچ و لاتکس بید) و ۵ تکرار و برای هر زمان (۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) به طور جداگانه انجام شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از برنامه نرم افزاری SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

بررسی تاثیر اسپورهای قارچ *bassiana Beauveria* و لاتکس بید روی تعداد کل سلول-های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها

تغییر تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها وگرانولوسیت‌ها در مقایسه با شاهد و در فواصل زمانی مختلف پس از تزریق اسپورهای تمام جدایه‌ها و لاتکس بید معنی‌دار بود. تمام تیمارها ۶ ساعت پس از تزریق سبب افزایش تعداد کل سلول‌ها شدند ($F=152, df= 3,$ $p\leq0.0001$) جدایه Fashand پس از ۶ ساعت از زمان تزریق، بالاترین تعداد کل سلول‌های خونی را با میانگین ۲۲۱±۳/۴×۱۰^{۴} عدد در میلی‌لیتر همولنف، پلاسموتوسیت‌ها ۱۱۲/۷±۱/۱) ×۱۰^{۴}) عدد در میلی‌لیتر همولنف و گرانولوسیت‌ها ۳/۵) ×۱۰^{۴} ±۷۴) عدد در میلی‌لیتر همولنف را به دنبال داشت (جدول ۱، ۲ و ۳). به تدریج با گذشت زمان پس از ۶ ساعت، تاثیر تیمارها کاسته شد چنانکه پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت، تعداد کل سلول‌ها کاهش یافت. هرچند که در لاروهای تیمار شده با جدایه Fashand همچنان تعداد سلول‌ها بالا بود. تعداد پلاسموتوسیت‌ها ($F= 54, df= 3,$ $p\leq0.0001$) و گرانولوسیت‌ها ($F=28.4, df= 3,$ $p\leq0.0001$) نیز در همه تیمارها پس از ۶ ساعت افزایش معنی‌داری نشان داد. جدایه Fashand پس از ۶ ساعت از زمان تزریق، سبب افزایش تعداد پلاسموتوسیت‌ها به میزان۱/۱ ±۹۷) ×۱۰^{۴}) عدد در میلی‌لیتر و گرانولوسیت‌ها به میزان ۳/۵) ×۱۰^{۴} ±۷۴) عدد در میلی‌لیتر همولنف شد. در آزمایش‌های فوق، جدایه 566 و لاتکس بید نسبت به جدایه Fashand تاثیر کمتری داشته و در یک گروه آماری قرار می‌گرفتند. تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نیز در لاروهای تیمار شده با اسپورهای جدایه 566 و لاتکس بید در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت به تدریج کاسته شد. البته جدایه Fashand همچنان پس از ۱۲ ساعت توانست تعداد گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌های لاروهای تیمار شده را افزایش دهد (جدول ۲ و ۳). تعداد پروهموسیت‌ها در ۳ ساعت ابتدای تیماردهی، در همه لاروها کاسته شد. پروهموسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های پایه خون در زمان ورود عامل بیگانه (اسپور قارچ یا باکتری و ...) انشقاق یافته و به سلول‌های موثر در ایمنی (پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها) تبدیل می‌شوند. افزایش تعداد گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق و متعاقبا افزایش فعالیت ایمنی را می‌توان به تقسیم پروهموسیت‌ها و مشارکت آن‌ها در فرایند دفاع نسبت داد. تعداد اونوسیتوییدها در حضور اسپورهای قارچی افزایش داشت اما تفاوت معنی داری با شاهد نشان نداد.

بررسی تاثیر اسپورهای قارچ *B. bassiana* و لاتکس بید در تشکیل گرهبررسی تاثیر اسپورهای قارچ *B. bassiana* و لاتکس بید در تشکیل گره

اسپورهای قارچ و قطعات لاتکس بید سبب واکنش سلول‌های خونی لاروهای *S. litura* به شکل گره‌زایی شدند (شکل ۱). در همه‌ی تیمارها بیشترین تعداد گره ۳ ساعت ($F=35, df=3, p\leq0.0001$) و ۶ ساعت ($F=107, df=3, p\leq0.0001$) پس از تزریق، مشاهده شد. بیشترین تعداد گره به ترتیب ۳ ساعت پس از تزریق جدایه‌های Fashand به میزان $۱۰^{۴}\times$ (۶± ۴۸/۷) عدد در میلی‌لیتر همولنف و لاتکس بید به میزان $۱۰^{۴}\times$ (۲/۵±۲۸/۵) عدد در میلی‌لیتر همولنف حشره تشکیل شد. میزان تشکیل گره ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق تیمارها به طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۴).

تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

ورود اسپورهای قارچی و قطعات لاتکس بید به همولنف لاروهای *S. litura* منجر به فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در فواصل مختلف زمانی بعد از تزریق تیمارها شد (جدول ۵). نتایج نشان داد که یک ارتباط مستقیم بین تعداد کل سلول‌های خونی و فعالیت فنل‌اکسیداز در واکنش‌های ایمنی این حشره در مقابل جدایه‌های *B. bassiana* و لاتکس بید وجود دارد. چنانکه جدایه Fashand بالاترین میزان فعالیت فنل‌اکسیداز را در همولنف حشره ۶ ساعت پس از تزریق اسپور به میزان (۰/۰۳۱ ± ۰/۱۵) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین به دنبال داشت. جدایه 566 و لاتکس بید در رده بعدی قرار گرفتند. با گذشت زمان پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت به تدریج از فعالیت این آنزیم کاسته شد.

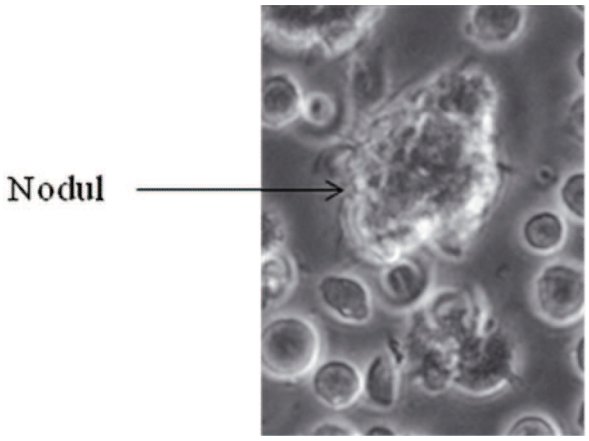
بحث

آزمایش‌های ایمنی‌شناسی در این تحقیق حاکی از واکنش‌های ایمنی سلولی لاروهای سن چهار *S. litura* در مقابل اسپورهای قارچی و قطعات لاتکس بید بود. این واکنش‌ها با تغییر در تعداد کل سلول‌ها و نیز فعالیت‌های گره‌زایی و فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در فواصل زمانی مختلف پس از ورود اسپورها و لاتکس بید به همولنف اتفاق افتاد. جدایه Fashand در مقایسه با سایر تیمارها و شاهد بالاترین تغییر در تعداد کل سلول‌ها، گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها را ۶ ساعت پس از ورود به همولنف حشره ایجاد کرد. به‌نظر می‌رسد که خواص فیزیولوژیکی هر جدایه و نیز وضعیت ایمنی هر لارو به لحاظ تعداد سلول‌ها و فعالیت آنها در برابر جدایه‌های مختلف متفاوت بوده و منجر به واکنش‌های ایمنی در زمان‌های مختلف می‌شود. یافته‌های مشابهی دال بر پاسخ ایمنی حشرات مختلف در برابر عوامل بیگانه وجود دارد: دفاع سلولی سوسک *D. armigra*، ۶ ساعت پس از تلقیح قارچ *B. bassiana* به همولنف حشره با اضمحلال غشای پلاسمایی گرانولوسیت‌ها مشاهده شد (Moushumi *et al*., 2008). واکنش ایمنی سن گندم در برابر *B. bassiana* با افزایش (THC) و (DHC) سلول‌های خونی حشره پس از ۳ ساعت بروز کرد (Zibaee *et al*., 2011). افزایش تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها ۶ ساعت پس از ورود اسپورهای *B. bassiana* به همولنف *Hyphantria cunea* مشاهده شد (Ajamhassani *et al*., 2013). در تشکیل گره، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها با نسبت مشابه مشارکت داشتند. گره‌ها به شکل یک لایه، دو لایه و چند لایه مشاهده شد. فراوانی گره‌ها در فواصل ۳ و ۶ ساعت پس از ورود عوامل بیگانه به همولنف معنی‌دار بود. گره‌زایی در همه‌ی تیمارها پس از ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت از زمان تلقیح عوامل بیگانه به‌طور چشمگیری کاهش یافت. بنابراین بیشترین واکنش‌های دفاعی سلولی *S. litura* در مقابل جدایه‌های *B. bassiana* و لاتکس بید، در ساعات اولیه ورود این عوامل به همولنف اتفاق افتاد. این نتایج با یافته‌های عجم حسنی و همکاران که گره زایی *H. cunea* را در برابر *B. bassiana* ۳ و ۶ ساعت پس از تلقیح، معنی‌دار ارزیابی کرده بودند منطبق بود. تزریق اسپورهای قارچی و قطعات لاتکس بید به لاروهای سن چهار *S. litura* سبب افزایش فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در فواصل مختلف پس از تزریق شد. فنل‌اکسیداز به عنوان یک عامل کلیدی در ایمنی حشرات در زمان ورود لیپوپلی ساکاریدها و پپتیدوگلیکان‌ها به بدن فعال می‌شود. در پروانه‌ی ابریشم‌باف‌ناجور فعالیت فنل‌اکسیداز پس از تلقیح حشره با *B. bassiana* به طور معنی‌داری افزایش یافت. در حشرات، فرایند فعالیت فنل

اکسیداز منجر به تشکیل ملانین می‌شود که اطراف عامل بیگانه رسوب می‌کند و به دفع عامل بیگانه کمک می‌کند. از طرفی این واکنش تولید سم را در پی دارد که خود برای از بین بردن عامل بیگانه موثر می‌باشد (Ashida, 1997). سلول‌های خونی یکی از منابع تولید پروفنل‌اکسیداز می‌باشند و در بال‌پولک‌داران، اونوسیتوییدها به‌عنوان سلول‌های تولیدکننده پروفنل‌اکسیداز شناسایی شده‌اند (Jiang *et al*., 1997). چنان‌که نقش اونوسیتوییدها در فعال‌سازی فنل‌اکسیداز در *Galleria mellonella* (Brookman *et al*., 1989) و *Bombyx mori* (Akai, 1973) ثابت شده است. به گزارش هرناندز[1] و همکاران در سال ۱۹۹۹ فعالیت فنل‌اکسیداز در حضور سوبسترای L-DOPA در گرانولوسیت‌ها رخ می‌دهد. به این معنی که ممکن است گرانولوسیت‌ها همراه با تغییرات مرفولوژیکی خود در زمان دفاع سلولی، فنل‌اکسیداز را آزاد کنند. در تحقیق حاضر افزایش فعالیت فنل‌اکسیداز با افزایش تعداد گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها ارتباط مستقیم نشان داد. به‌نظر می‌رسد که این سلول‌ها در فعال سازی فنل‌اکسیداز به طور مشترک سهیم هستند. از طرفی، متلاشی شدن اوونوسیتوییدها در آزمایش-های ایمنی‌شناسی این تحقیق، خود می‌تواند استدلالی مبنی بر آزاد شدن فنل اکسیداز از این سلول‌ها باشد. قابل ذکر است که فرایند تجزیه و تلاشی اوونوسیتوئیدها به لحاظ آماری در نتایج این تحقیق مورد بحث قرار نگرفت ولی در طول بررسی پاسخ‌های دفاعی به همراه سایر واکنش‌ها قابل مشاهده بود.

از این بررسی نتیجه‌گیری می‌شود که فعالیت ایمنی سلولی لاروهای سن چهار پروانه *S. litura* در برابر عوامل زنده و غیر زنده بیگانه با مشارکت پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و اونوسیتوییدها همراه است. سلول‌های خونی در ساعات اولیه ورود اسپورها اطراف آن‌ها مجتمع شده و آن‌ها را منهدم می‌کنند. به علاوه آنزیم فنل اکسیداز در ملانیزه کردن عوامل بیگانه و در نهایت خروج آن‌ها از همولنف نقش دارد. لاروهای سن چهار حشره مذکور در زمان ۲۴ ساعت پس از تزریق غلظت 10^6 اسپورها زنده ماندند و به فعالیت‌های حیاتی خود ادامه دادند ولی آیا واکنش ایمنی این حشره هنگام تزریق غلظت‌های بالاتر قارچ هم چنین خواهد بود؟ و آیا سنین پایین لاروی توان مقابله با عامل بیگانه‌ای مانند اسپور قارچ را خواهند داشت؟ قطعا تحقیقات تکمیلی به منظور دستیابی به این پرسش‌ها مورد نیاز است تا بتوان در بحث‌های مدیریت کنترل این آفت مهم از نتایج برهمکنش ایمنی-قارچ استفاده کرد.

[1] Hernandez



شکل ۱- گره حاصل از مشارکت پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در انهدام اسپور قارچ (میکروسکوپ فازکنتراست بزرگنمایی ۴۰)

Figure 1. Nodulation of compact of Plasmotocyte and Granulocyte for removing the spore (Phase contrast microscopy, ×40)

جدول ۱- تاثیر جدایه های قارچ *Beauvaria bassiana* و لاتکس بید روی تعداد کل سلول‌های خونی *Spodoptera litura*

Table 1. The effect of isolates *of Beauvaria bassiana* and Latex-bead on the total hemocyte (x 10^4/mL) of *Spodoptera litura*. a, b, c and d means significant at $p \leq 0.05$ (Tukey test)

Treatment	Post injection (hours)				
	1	3	6	12	24
Control	148±2.8a	145.5±1.6c	147.25±2.2c	152.2±4.8b	151±2.2a
Fashand	153±4.7a	192.7±2.6a	221±3.4a	185.2±5a	152.7±5.4a
566	139±2.2a	167±2.6b	181.2±6.7b	148.5±5.6b	138.5±4ab
Latex-bead	136.7±3.6ab	169.5±0.6b	180.7±2b	139.5±5.5b	127±4.6b

جدول ۲- تاثیر جدایه های قارچ *Beauvaria bassiana* و لاتکس بید روی پلاسموتوسیت‌های *Spodoptera litura*

Table 2. The effect of isolates *of Beauvaria bassiana* and Latex-bead on the plasmotocyte (x 10^4/mL) of *Spodoptera litura*. a, b, c and d means significant at $p \leq 0.05$ (Tukey test)

Treatment	(Post injection (hours)				
	1	3	6	12	24
Control	56.7±2.6a	55.2±3c	54.7±4.7c	57.2±3.8b	58.2±1.7a
Fashand	54.7±3.1a	91±1.3a	112.7±1.1a	80±3a	51.2±2.2ab
566	60.2±1.9a	78.5±0.6b	92±1.7b	74.5±4.7a	47.7±4.7ab
Latex-bead	53.2±1.8ab	62.5±1.8c	88.7±4b	73.2±2.9a	43.2±1.9b

جدول ۳- تاثیر جدایه های قارچ *Beauvaria bassiana* و لاتکس بید روی گرانولوسیت‌های *Spodoptera litura*

Table 3. The effect of isolates *of Beauvaria bassiana* and Latex-bead on the granulocyte (x 10^4/mL) of *Spodoptera litura*. a, b, c and d means significant at $p \leq 0.05$ (Tukey test).

Treatment	Post injection (hours)				
	1	3	6	12	24
Control	38.2±1.3a	41.5±3b	39±2.2c	46.7±1.2b	48.7±5.2a
Fashand	39.5±1.7a	58.7±1.1a	74±3.5a	55.7±2.4a	36±1.5a
566	35±2.1ab	44±3b	57.2±1.1b	46.5±1.3b	43±2.6a
Latex-bead	37.2±1.2a	50.2±2.3ab	75±4.6a	54.5±2.3ab	38.2±3.7a

جدول ۴- تاثیر جدایه های قارچ *Beauvaria bassiana* و لاتکس بید روی تعداد گره ها در *Spodoptera litura*

Table 4. The effect of isolates *of Beauvaria bassiana* and Latex-bead on Nodul count (x 10^4/mL) of *Spodoptera litura*. a, b, c and d means significant at $p \leq 0.05$ (Tukey test)

Treatment	Post injection (hours)				
	1	3	6	12	24
Control	0.5±0.2a	1d	2±0.4c	0.2d	0.2a
Fashand	1.25±0.4a	48.7±6a	26.7±1.5a	14.5±0.6a	2.5±0.6a
566	1a	19.2±1.3c	9.5±1b	6.2±0.6c	1±0.4a
Latex-bead	1.25a	28.5±2.5b	4.25±0.6c	9.25±0.8b	0.5a

جدول ۵- تاثیر جدایه های قارچ *Beauvaria bassiana* و لاتکس بید روی فعالیت فنل اکسیداز (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در *Spodoptera litura*

Table 5. The effect of isolates *of Beauvaria bassiana* and Latex-bead on phenoloxidase activity (µmol/min/mg) of *Spodoptera litura*. a, b, c and d means significant at $p \leq 0.05$ (Tukey test)

Treatment	Post injection (hours)				
	1	3	6	12	24
Control	0.069±0.004a	0.067±0.006c	0.068±0.004d	0.064±0.004b	0.068±0.005a
Fashand	0.068±0.003a	0.014±0.004a	0.016±0.007a	0.072±0.007a	0.067±0.003a
566	0.056±0.002ab	0.012±0.005b	0.013±0.004b	0.068±0.003b	0.068±0.006a
Latex-bead	0.058±0.002ab	0.012±0.003b	0.012±0.005c	0.06±0.002c	0.064±0.001a

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., Zibaee, A., Askary, H. and Farsi, M. 2013. Immunological 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.

Akai, H. and Sato, S. 1973. Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). **Journal of Insect Morphology** 2: 207-31.

Alotaibi, A. 2013. Mortality Responses of *Spodoptera litura* Following Feeding on *BT*- Sprayed Plants. **Journal of Basic & Applied Science** 9: 195-215.

Ashida, M., and Brey, P. 1997. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In Brey, P and Hultmark, D. (Eds.). Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects, Chapman & Hall, London. pp: 135-171.

Borges, A. R., Santos, P. N. Furtado, A. F. and Figueiredo, R. C. 2008**.** Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduvidae). **Micron** 39: 486-494.

Brookman, J. L., Ratcliffe, N. A. and Rowley, A. F. 1989. Optimization of a monolayer phagocytosis assay and its application for studying the role of the prophenoloxidase system in the wax moth, *Galleria mellonella***. Journal of Insect Physiology** 34: 337-45.

Bulet, P., Hetru, C. Dimarcq, J. Hoffmann, L. D. 1999. Antimicrobial peptides in insects, structure and function. **Developmental and Comparative Immunology** 23: 329-344.

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: 835–850.

Jones, J.C. and Liu, D. P. 1969**.** The effects of ligaturing *Galleria mellonella* larvae on total haemocyte counts and on mitotic indices among haemocytes**. Journal of Insect Physiology** 15:1703-1708.

Gupta, A. P. 1985. Cellular elements in the haemolymph. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), Comperhensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology Cambridge University Press, pp. 85-127.

Hernandez, S., Lanz, H., Rodriguez, M. H., Torres, J. A., Martinez, P. A. and Tsutsumi, V. 1999**.** Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. **Journal of Medical Entomology** 36: 426-434.

Kamala, P. D., Jayanthi and Padmavathamma, K. 2001**.** Joint action of microbial and chemical insecticides on *Spodoptera littura* (FAB) (Lep.: Noctuidae). **Journal of Tropical Agriculture** 39: 142-144.

Kanost, M. R. 2007. Serpins in a Lepidopteran insect, *Manduca sexta*. In Silverman, G. A. and Lomas, D. A. (Eds.). Molecular and Cellular Aspects of the Serpinopathies and Disorder in Serpin Activity. World Scientific Publishing Co., Hackensack, New Jersey. pp. 229-242.

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

Leonard, C., Soderhall, K. N. and Ratcliffe, A. 1985**.** Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Balbifer cranifer* haemocytes. **Insect Biochemistry**. 15: 803-810.

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

Nahla, M., El-Aziz , A. B. D. and Awad, H. H. 2010. Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. **Micron** 41: 203-209.

Nardi, J. B., Pilas, B. Ujhelyi, E. Garsha, K. and Kanost, M. R. 2003. Hematopoetic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. **Development Genes and Evolution** 213: 477-491.

Park, S. H., Yu, Y. S., Park, J. S., Choo, H. Y., Bae, S. D. and Nam, M. H. 2001**.** Biological Control of Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius with entomopathogenic nematodes. Biotechnology. **Bioprocess Eng** 6: 139-143.

Sanehdeep, K. Harminder, P., Kirandeep[a] K. and Amarjit, K. 2011**.** Cellular Immune Response of *Spodoptera Litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) During Mycosis of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria Bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Journal of Biological Control** 25(2): 152-155**.**

Sintim, H. O., Tashiro, T. and Motoyama, N. 2009**.** Response of the cutworm *Spodoptera litura* to sesame leaves or crude extracts in diet. **Journal of Insect Science** 9(52): 1-13.

Venette, R. C., Davis, E. E., Zaspel, J., Heisler, H. and Larson, M. 2003. Mini risk assessment: rice cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius [Lep.: Noctuidae].

Zibaee, A., Bandani, A. Talaei, 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** 11: 138: 1-16.

Plant Pests Research
2014- 4(2): 59-68

Cellular immune reactions of *Spodoptera litura* (Fabricus) (Lepidoptera: Noctuidae) against entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*

M. Ajamhassani
Assistant Professor, Department of Horticulture and Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bastam, University of Shahrood

(Received: October 23, 2013- Accepted: January 29, 2014)

Abstract

Since microbial factors have important role in control of pests, determination of interactions between immune system and entomopathogenic fungi can be useful in IPM programs. Cellular immunity of 4th instars of *Spodoptera litura* (Fabricus) was investigated against two isolates of *Beauveria bassiana* (Fashand and 566) and latex-bead. Number of prohemocytes, granulocytes, oenocytoids and phenoloxidase activity was measured too. A concentration of 10^6 spore/mL of spores and 10^6 particle/mL latex-bead were injected to larvae and their interactions with hemocytes were recoreded at 1, 3, 6, 12 and 24 h time-intervals. For control, distilled water was injected to larvae. The number of hemocytes were maximum after 3 and 6 h of injection. Nodulation was occurred 3 and 6 h after injection. Phenoloxidase activity was determined in the presence of L-DOPA as a substrate after injection of fungal spores and latex beads. Phenoloxidase activity was highest in 3 and 6 h post injection. Result showed that hemocytes and phenoloxidase in *S. litura* had an important role in immune reaction. So, with increasing of hemocyte number, hemocytes aggregated around spores and lead to spore death.

Key Words: Cellular defense, Hemocyte, *Spodoptera litura*, *Beauveria bassiana*

*Corresponding author: shahroodm@gmail.com