تحقیقات آفات گیاهی
۱۳۹۸ -۹ (۳): ۱-۱۳

تاثیر سرم جنین گاوی بر رشد سلول‌های خونی لاروهای *Helicoverpa armigera*، *Anagasta kuehniella* و *Arge ochropus* در محیط کشت سلولی 400 Ex-cell

بی‌تا والی‌زاده[۱]، جلال جلالی سندی*[۱] و رسول صالحی[۲]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ۲- گروه ژنتیک و زیست‌شناسی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۲)

چکیده

استفاده از رده‌های سلولی حشرات برای تولید آفت‌کش‌های زیستی، پروتئین‌های نوترکیب یا تحویل ژن، در حال گسترش است. لذا تولید رده‌های سلولی جدید به غنی‌تر کردن این فن‌آوری کمک می‌کند، بنابراین هدف از تحقیق حاضر، تهیه چندین کشت اولیه از سلول‌های خونی لاروهای کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* (Hubner)، شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Anagasta kuehniella* (Zeller) و زنبور برگ‌خوار رز *Arge ochropus* (Gmelin) می‌باشد. سلول‌های خونی در محیط کشت EX-cell 400 حاوی غلظت‌های مختلف ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد سرم جنینی گاوی در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه-داری شدند. غلظت‌های سرم جنینی بر اساس پژوهش‌های پیشین کشت سلولی حشرات انتخاب شدند. نتایج نشان داد که زمانی که سرم جنینی گاوی از محیط کشت حذف شد، هیچ رشد سلولی مشاهده نشد. بیشینه رشد سلول‌های خونی لارو کرم غوزه در محیط کشت حاوی ۱۵ درصد سرم جنینی گاوی مشاهده شد. با افزایش سرم جنینی گاوی به ۲۰ درصد، افزایشی در رشد سلولی مشاهده نشد. بیشینه رشد سلول‌های خونی لارو شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در محیط کشت با ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی مشاهده شد. رشد این سلول‌ها در سرم جنینی گاوی ۱۵ و ۲۰ درصد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. با افزایش غلظت سرم جنینی گاوی، رشد سلول‌های خونی *A. ochropus* نیز افزایش یافت. در نتیجه، پژوهش حاضر، حداقل غلظت سرم جنینی گاوی مورد نیاز برای بیشینه رشد سلول‌های حشرات را در محیط کشت سلولی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: زنبور برگ‌خوار رز، شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، کرم غوزه پنبه، سرم جنینی گاوی، کشت سلولی حشرات

*نویسنده مسئول: jjalali@guilan.ac.ir

مقدمه

کشت سلول شامل حفظ و پرورش سلول‌های یک موجود زنده در محیط آزمایشگاهی[1]به‌صورت زنده و فعال است. اگر برخی از مواد مغذی و عوامل رشدی در اختیار سلول‌های جانوری قرار داده شوند، سلول‌ها قادر خواهند بود به‌عنوان یک واحد منفرد بیولوژیک به مدت بسیار زیادی زنده مانده و قابلیت تکثیر، متابولیسم و پاسخ به محرک‌های محیطی را دارا باشند (Matindoost *et al.*, 2008). رده‌های سلولی حشرات از بافت‌های مختلف بسته به هدف محقق مشتق می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها شامل جنین، تخمدان و بافت چربی و بافت‌های مختلف از لاروهای نئونات می‌باشد. در میان رده‌های سلولی توسعه یافته، تعداد رده‌های سلولی حاصل از سلول‌های خونی کم است. هر چند جمع‌آوری این سلول‌ها راحت بوده و کشت‌های حاصل از سلول‌های خونی در مقایسه با بافت‌های تخمدان یا جنین از یکنواختی کمتری برخوردار هستند (Mitsuhashi and Shozawa, 1985). فیزیولوژیست‌ها از کشت بافت چربی و دیگر انواع سلولی، شامل کشت‌های سلول عصبی، برای مطالعه مسیرهای سیگنال سلولی استفاده می‌کنند (Arif and Pavlik, 2012). به‌طور مثال، کشت سلول در بررسی سازوکار گیرنده‌های Toll (یکی از پذیرنده‌های شناسایی عامل بیماری‌زا) در سامانه‌های ایمنی حشره مدل (Lemaitre and Hoffmann, 2007) و در بررسی منشا و تشکیل خوشه سلولی از اندام هماتوپوئتیک (Mangalika *et al.*, 2010) نقش دارد. همچنین، این روش در مطالعه حرکت سلول‌ها و مولکول‌های موثر در آن در مگس سرکه *Drosophila melanogaster* Meigen (Evans and Wood, 2014) و بررسی عملکرد ایکوزانوئیدها (Stanly and Kim, 2014) استفاده شده است. سم‌شناسان برای ارزیابی سمیت برخی از آفت‌کش‌ها و مواد شیمیایی در آزمایش‌های مقدماتی از سلول‌های کشت شده حشرات استفاده می‌کنند که این هم از نظر زمان و هم از نظر هزینه بسیار مقرون به صرفه‌تر از پرورش خود حشره برآورد شده است (Wen *et al.*, 2015). مطالعه ویروس‌های گیاهی که توسط حشرات منتقل می‌شوند، با استفاده از کشت سلول حشرات بسیار حائز اهمیت است. یوآن‌یوآن و همکاران (Yuanyuan *et al.*, 2013) با استفاده از لاین سلولی زنجره‌ی قهوه‌ای برنج توانستند ساختارهای پروتئینی، ژنتیک و نحوه‌ی تکثیر ویروس نواری برنج را بررسی کنند و با استفاده از RNA مداخله‌گر، بیان ژن پروتئین NS3 را در این لاین سلولی خاموش کردند؛ نتایج این مطالعه نشان داد که این پروتئین در تکثیر و آلودگی این ویروس نقش دارد. تولید آفت‌کش‌های زیستی، کاربرد کشت سلول حشرات را دو چندان کرد، زیرا این امکان را به محققین و تولیدکنندگان تجاری داد که بتوانند به تولید میکروارگانیسم‌هایی همچون ویروس‌ها که ازدیاد آن‌ها در خارج از محیط غیر زنده ممکن نیست، بپردازند. از طرف دیگر، ازدیاد و خالص‌سازی آن‌ها در خود لاروهای حشرات کاری دشوار، زمان‌بر و هزینه‌بر بوده، به‌علاوه امکان آلودگی لاروها به سایر میکروارگانیسم‌ها در حین تکثیر نیز وجود دارد، از این رو کشت سلولی، تکثیر خالصی از ویروس را نوید داد (Ranga Rao *et al*., 2015; Chaeychomsri, 2017).

برای تولید موفق باکلوویروس‌ها، می‌بایست یک لاین سلولی انتخاب شود که توان تولید بالا، زمان دو برابر شدن کمتر از ۲۴ ساعت و عملکرد حداقل ۳۰۰ OB/cell[2] را داشته باشد. تعداد کمی از لاین‌های سلولی شناخته‌شده، این قابلیت را دارند و ضروری است لاین‌های سلولی دیگر با این قابلیت شناسایی شوند (Raid *et al*., 2014).

برای رشد سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی، شرایط کشت باید از شرایط درون بدن موجود زنده تقلید کند. بیش‌تر محیط‌های پایه کشت سلولی نمی‌توانند به‌تنهایی رشد سلول‌ها را حمایت کنند و بنابراین محیط‌های پایه با سرم-های حیوانی غنی می‌شوند. در تعیین عملکرد اصلی محیط کشت، اسمولالیته، درصد زنده بودن سلول‌ها، pH محیط برای نگهداری، مواد غذایی و انرژی لازم برای رشد و تکثیر

1. *in vitro*

2. occlusion body cell

سلول‌ها ضروری هستند. سرم اهمیت خاصی در بهبود شرایط رشد سلول‌ها دارد (Davis, 1994). اضافه کردن سرم به محیط کشت سلولی برای نگهداری، تکثیر و تمایز سلول‌های انسانی و حیوانی در شرایط آزمایشگاهی ضروری است. سرم حیوانی سرشار از عوامل رشد، هورمون‌ها، پروتئین‌های حامل، عناصر ضروری و مواد ناشناخته دیگری است که در حضور آن، سلول‌ها قدرت حیات و تکثیر بسیار بیش‌تری پیدا می‌کنند. در شرایطی که سرم حیوانی در محیط نگهداری سلول وجود نداشته باشد، میزان زیستایی به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد. رایج‌ترین سرمی که در محیط کشت سلولی استفاده می‌شود، سرم جنین گاوی[1] است، زیرا غنی‌تر بوده و عوامل رشد بیش‌تری نسبت به سایر سرم‌ها دارد و حاوی گاماگلوبولین کمی است (Ferruzza *et al*., 2013; Van der Valk *et al*., 2010). از جمله مشکلاتی که حذف سرم از محیط کشت به‌وجود می‌آورد می‌توان این موارد را نام برد: سرم حاوی انواع مختلفی از عوامل ضروری و مفید شامل املاح، ویتامین‌ها و هورمون‌ها است که همگی برای رشد سلول ضروری هستند. همچنین سرم حاوی انواعی از خنثی‌کننده‌های پروتئاز است که به‌ویژه در هنگام تریپسینه کردن سلول‌ها مؤثر است، سلول‌ها را در برابر نیروهای برشی اعمال شده توسط همزن در کشت سوسپانسیون به‌طور غیراختصاصی تا حدی محافظت می‌کند، توانایی اتصال به برخی مواد سمی را داشته و موجب حذف آن‌ها از دسترس سلول‌ها می‌شود. در کنار این مزایا، مواردی از معایب سرم نیز باعث شده است که گاه حذف سرم در دستور کار محققین و برخی از تولیدکننده‌های فراورده‌های حاصل از سلول قرار بگیرد، مانند تفاوت خصوصیت‌های انواع سرم تهیه‌شده از منابع مختلف جغرافیایی، شرایط خاص نگهداری و حمل و نقل (Merten *et al*., 1994, 1999). از طرف دیگر، سرم می‌تواند یکی از عوامل آلودگی باشد و امکان وجود عوامل مضر شناخته شده و ناشناخته نظیر ویروس، پریون و مایکوپلاسما در سرم وجود دارد، بنابراین برای تولید محصولات دارویی و به‌منظور اجتناب از آلودگی باید از محیط‌های کشت فاقد سرم استفاده شود. استفاده از سرم نه تنها هزینه‌بر است، بلکه باعث افزایش مخارج مربوط به جداسازی پروتئین‌های سرم از محصول نهایی نیز می‌شود و استخراج و خالص‌سازی محصول اصلی و نهایی کشت را مشکل می‌کند (Aghili and Zarkesh, 2016). امروزه استفاده از محیط کشت‌های تجاری خاصی که نیاز به افزودن سرم ندارند یا از مقدار کمتری استفاده می‌کنند، رایج شده است که می‌تواند به‌طور اختصاصی برای هر رده سلولی استفاده شود.

هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر میزان سرم در محیط کشت سلول‌های خونی *H. armigera*، *E. kuehniella* و *A. ochropus* بر مورفولوژی و زیستایی سلول‌ها به‌منظور تلاش برای کشت سلول‌ها در محیط‌هایی با سرم کمتر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش حشرات

کرم غوزه‌ی پنبه از مزارع توتون موسسه تحقیقات توتون واقع در رشت (37°16'19.6"N 49°31'40.7"E) در اوایل فصل تابستان جمع‌آوری و لاروها به آزمایشگاه منتقل شد. به‌منظور پرورش بهینه، لاروها در اتاقک‌های رشد، در دمای ۵ ± ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و در شرایط نوری ۸ :۱۶ (تاریکی: روشنایی) ساعت، پرورش داده شدند. از رژیم غذایی مصنوعی برای پرورش لاروها استفاده شد که مواد مورد نیاز برای تهیه‌ی این غذا بدین شرح است: ۲۰۴ گرم لوبیا چشم‌بلبلی، ۳۰ گرم پودر جوانه‌ی گندم، ۳۰ گرم مخمر، ۱/۳ گرم اسید سوربیک، ۳/۵ گرم اسیدآسکوربیک، ۴ میلی‌لیتر روغن، ۲/۷ میلی‌لیتر فرمالین، ۱۴ گرم آگار و ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (Shorey and Hale, 1965). پرورش تا ۵ نسل انجام شد و از لاروهای سنین آخر برای خون‌گیری استفاده شد.

کلنی اولیه شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، *E. kuehniella*، از پرورش‌های موجود در اینسکتاریوم موسسه تحقیقات علمی و صنعتی واقع در رشت (37°12'20.2"N

1. Fetal Bovine Serum (FBS)

49°38'48.5"E) تهیه شد. بید آرد روی رژیم غذایی آرد گندم (با نسبت ۷۵ گرم آرد و ۲۵ گرم سبوس گندم) پرورش داده شد (Yazdanian, 2000). بدین ترتیب که آرد و سبوس گندم تهیه شده به ارتفاع سه سانتی‌متر در ظروف پلاستیکی پرورشی ریخته شد و سپس مقدار ۰/۲گرم تخم جمع‌آوری شده‌ی بید آرد در سطح ماده‌ی غذایی موجود در هر ظرف، پخش شد. پرورش بید آرد داخل اتاقک‌های رشد واقع درآزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشگاه گیلان در شرایط دمایی ۱ ±۲۵ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی، ۵±۶۵ درصد و دوره‌ی نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ساعت تاریکی انجام شد.

سرشاخه‌های گیاهان رز حاوی تخم‌های زنبور برگ‌خوار رز *A. ocropus*، از محوطه دانشگاه گیلان (37°12'00.5"N 49°38'58.8"E) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از تفریخ، پرورش لاروها در دمای ثابت ۲±۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰±۷۰ درصد در شرایط نوری ۸ :۱۶ (روشنایی: تاریکی) ساعت، انجام شد. برای پرورش لاروها از ظروف پلاستیکی درپوش‌دار شفاف با ابعاد ۷×۱۵×۱۸ سانتی‌متر استفاده شد، که روی درپوش آن‌ها جهت تهویه، توری ارگانزا تعبیه شده بود. مراحل لاروی، پیش‌شفیرگی و شفیرگی در این ظروف سپری شد. حشرات کامل پس از ظهور به قفس‌های تخم‌ریزی حاوی شاخه‌های بریده گل رز منتقل شدند.

کشت اولیه سلول‌های حشرات

آماده‌سازی کشت اولیه

برای این آزمایش لاروهای سنین آخر (بر اساس عرض کپسول سر) کرم غوزه پنبه، شب‌پره مدیترانه‌ای آرد و زنبور برگ‌خوار رز انتخاب شدند، سطح بدن لاروها با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شد و سپس روی کاغذ صافی استریل قرار داده شد. به منظور خارج کردن همولنف، یکی از پاهای شکمی به کمک قیچی کوچک استریل بریده شد و ۵۰۰ میکرولیتر همولنف (از زنبور برگ‌خوار رز ۳۰ لارو، از شب‌پره مدیترانه‌ای آرد ۵۰ لارو و از کرم غوزه حدود ۱۰ لارو استفاده شد) به ظرفی حاوی ۱/۵ میلی‌لیتر محلول کالسن[1] چکانده شد. همولنف رقیق‌شده به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰×g سانتریفیوژ شد، ته‌نشین سلول‌ها به داخل فلاسک Erlenmeyer flask (200 ml) منتقل و ۵ میلی‌لیتر محلول کالسن به سلول‌های درون فلاسک اضافه شد. بیش‌تر سلول‌های خونی به کف فلاسک در طی ۲۰ دقیقه اول چسبیدند. سلول‌های چسبیده به کف ظرف با تغییر محلول کالسن ۳ مرتبه شسته شدند و در نهایت با محیط کشت (EX-Cell® 420 serum-free medium, Sigma-Ex-Cell 400 Aldrich) جایگزین شدند. محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد و محلول ضد باکتری ۱ درصد، به حجم ۲۰ میلی‌لیتر به‌عنوان استوک آماده شد (به‌طور مثال برای تهیه محیط کشت با ۵ درصد سرم، ۱ میلی‌لیتر سرم به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت که حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر محلول ضد باکتری بود، اضافه می‌شد). تمام کشت‌های اولیه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از استقرار کشت‌های اولیه، محیط هر فلاسک با سلول‌های معلق حذف و در فلاسک دیگر قرار گرفت. ۵ میلی‌لیتر محیط کشت جدید از استوک به فلاسک‌های حاوی تک‌لایه سلول‌های چسبیده اضافه شد (Yasunaga-Aoki *et al.*, 2004).

انتقال کشت اولیه سلول‌های خونی

پس از ایجاد حالت تک لایه سلولی، وقتی که سلول‌ها ۹۰ درصد سطح فلاسک را پوشاندند، سلول‌ها با روش‌های مختلف انتقال داده شدند. برای پاساژ دادن کشت اولیه، در مورد سلول‌هایی که به ظرف کشت نچسبیده و به صورت معلق در محیط بودند، با پیپت کردن محیط، یک سوسپانسیون یکنواخت سلولی به دست آمد که با تقسیم آن به دو فلاسک و سپس اضافه کردن محیط کشت تازه، به فلاسک‌ها انتقال داده شدند. ابتدا، سلول‌های چسبیده به فلاسک با استفاده از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار pH 7 شسته شدند، سپس محلول تریپسین- EDTA ۰/۲۵درصد به محیط اضافه شد. سپس فلاسک به مدت سه دقیقه در انکوباتور دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از

1. Carlson

بررسی ظروف با میکروسکوپ معکوس، به منظور اطمینان از آزادسازی همه سلول‌ها جهت خنثی کردن آنزیم تریپسین، محیط کشت حاوی FBS به سوسپانسیون سلول اضافه و سانتریفیوژ شد. سپس مایع رونشین حذف و با اضافه کردن محیط کشت تازه، رسوب سلولی به حالت سوسپانسیون در آمد. این سوسپانسیون سلولی به ظروف جدید انتقال یافتند (Söderhäll and Cerenius, 1992).

ارزیابی ویژگی‌های رده سلولی

شمارش سلول

برای تعیین تعداد سلول زنده از رنگ‌آمیزی آن‌ها با رنگ تریپان بلو استفاده شد. در این حالت سوسپانسیون سلولی را به نسبت ۱:۱ با رنگ تریپان بلو مخلوط کرده و سپس سلول‌های رنگ‌نگرفته که معرف سلول‌های زنده هستند (سلول‌های زنده که غشای ناتراوا نسبت به رنگ تریپان بلو دارند، بی‌رنگ و سلول‌های مرده که هیچ انتخابی برای ورود به رنگ ندارند و رنگ وارد سیتوپلاسم آن‌ها می‌شود به رنگ آبی مایل به بنفش دیده می‌شوند (Jason Fan, 2016))، در زیر لام نئوبار در مساحت یک میلی متر مربع شمارش شدند. این عمل با ۳ تکرار انجام شد و در نهایت تراکم سلول (تعداد سلول در هر میلی‌لیتر) به دست آمد. نمونه‌ها با میکروسکوپ اختلاف فاز (Phase-Contrast) مدل Olympus BH2 مورد بررسی قرار گرفتند و تصاویر لازم تهیه شد.

تعیین منحنی رشد و زمان مضاعف شدن جمعیت سلولی

تعیین منحنی رشد با استفاده از سلول‌های معلق انجام شد. سوسپانسیون سلولی تهیه و سپس به هر خانه یک ظرف ۲۴ خانه‌ای، ۱×۱۰^{۵} سلول/ میلی‌لیتر وارد شد و در انکوباتور با دمای ۲ ±۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سلول‌های سه خانه روزانه شمارش می‌شدند و میانگین آن‌ها به‌عنوان عدد مبنا برای تعداد سلول‌ها بعد از یک روز رشد قرار گرفت و به این ترتیب منحنی رشد سلول تنظیم شد (Mitsuhashi, 2002). برای هر کدام از حشرات از ۵ تیمار و ۳ تکرار استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SAS (SAS Institute, 1997) و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

در هر سه محیط کشت فاقد سرم جنینی گاوی، هیچ‌گونه رشد سلولی مشاهده نشد (جدول ۱) و پس از گذشت یک هفته تعدادی از کشت‌ها از بین رفتند و تعدادی نیز بدون تغییر باقی ماند. سلول‌ها بر اساس ریخت شناسی به صورت زنده، مرده یا در حال مردن در نظر گرفته می‌شدند. سلول-های زنده، حاشیه صاف و phase-bright داشتند، در حالی‌که سیتوپلاسم سلول‌های در حال مرگ، واجد واکوئل‌های گرانوله بود که در زیر میکروسکوپ به‌صورت دانه‌دار و تیره دیده می‌شد. سلول‌های مرده از ته فلاسک کنده می‌شدند. بلافاصله بعد از ریختن کشت اولیه در ظرف، کشت‌ها شامل تجمعات سلولی و سلول‌های منفرد بودند. علاوه‌بر سلول‌هایی که به صورت فعال تکثیر می-شدند، سلول‌های آماس کرده و گرانوله‌شده، توده‌های سلولی کوچک و بقایای سلول‌های مرده نیز در محیط کشت وجود داشتند.

پنج نوع سلول خونی پروهموسیت، پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید و اسفرولوسیت در همولنف لارو *H. armigera* شناسایی شده است (Baghban *et al.*, 2015)، که پس از استقرار کشت اولیه، همه این سلول‌های خونی مشاهده شدند. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۹۵ درصد در جدول ۱ آمده است. با توجه به مقایسه میانگین تیمارها، سلول‌های خونی *H. armigera* در محیط کشت Ex-cell 400 حاوی ۱۵ درصد سرم جنینی گاوی بیش‌ترین میزان رشد سلولی را داشتند و به $۱/۸ \pm ۰/۰۲\times۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌متر مکعب خون رسید ولی نتایج تجزیه واریانس نشان داد، با افزایش غلظت سرم جنینی گاوی به۲۰ درصد به‌طور معنی‌داری تعداد سلول‌های خونی کاهش یافت و به $۱\pm ۰/۴\times۱۰^{۶}$ سلول در

جدول ۱- مقایسه میانگین (± خطای معیار) رشد سلول‌های خونی حشرات در محیط Ex-cell 400 در زمان‌های ۳، ۶ و ۱۲ روز بعد از افزودن سرم جنینی گاوی

Table 1. Mean comparison (± SE) based on growth of insect hemocytes in Ex-cell 400 medium supplemented with FBS after 0, 3, 6, 9, 12 days

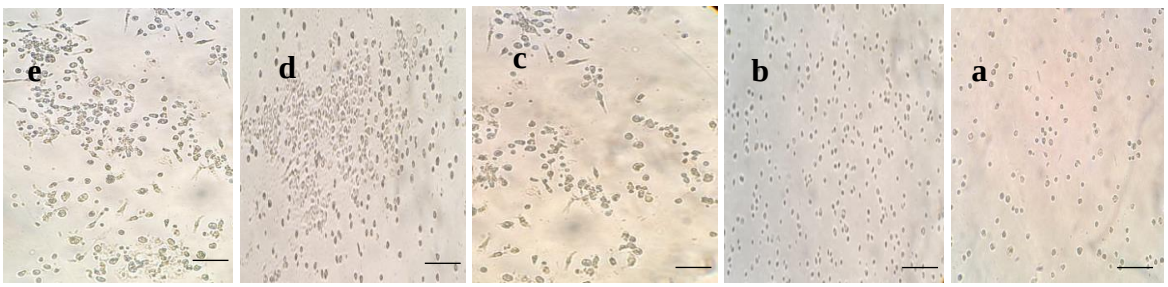
		Days after treatment			
	FBS concentration	3	6	9	12
Helicoverpa armigera	0	0.5±0.001^{c}	0.7±0.004^{c}	0.4±0.001^{c}	0.1±0.001^{c}
	5	3.0±0.021^{bc}	4.5±0.001^{b}	7.5±0.002^{b}	8.5±0.004^{b}
	10	5.0±0.003^{ab}	9.5±0.009^{a}	10.7±0.001^{b}	13.0±0.015^{ab}
	15	7.2±0.007^{a}	12±0.014^{a}	16.0±0.004^{a}	18.0±0.007^{a}
	20	6.0±0.018^{a}	10±0.006^{a}	11.5±0.017^{ab}	10.0±0.007^{b}
Anagasta kuehniella	0	0.4±0.001^{b}	0.6±0.004^{a}	0.8±0.001^{c}	0.9±0.002^{d}
	5	6.0±0.003^{a}	9.0±0.021^{a}	11.0±0.009^{b}	15.0±0.007^{c}
	10	9.0±0.004^{a}	13.5±0.005^{a}	17.0±0.009^{a}	22.0±0.014^{a}
	15	8.5±0.001^{a}	13±0.006^{a}	15.5±0.013^{ab}	19±0.007^{ab}
	20	7.0±0.003^{a}	11±0.004^{a}	14.0±0.009^{ab}	16±0.012^{bc}
Arge ochropus	0	0.3±0.001^{b}	0.7±0.004^{e}	0.5±0.004^{e}	0.3±0.018^{c}
	5	2.0±0.006^{ab}	2.5±0.001^{d}	3.7±0.008^{d}	5.0±0.008^{b}
	10	2.8±0.001^{ab}	3.6±0.007^{c}	4.5±0.003^{c}	6.0±0.001^{b}
	15	4.0±0.007^{a}	4.5±0.011^{b}	5.5±0.009^{b}	7.5±.007^{ab}
	20	5.0±0.009^{a}	6.6±0.007^{a}	7.6±0.018^{a}	9.2±0.007^{a}

*The means followed by the same letter(s) in each column were not significantly different at $P < 0.05$ (Tukey test).

میلی‌متر مکعب خون رسید ($F=35.85$, $df_{t,e}=4, 5$, $p<0.0007$) (شکل‌های ۱ و ۲). تعداد سلول‌های زنده و مدت زمان رسیدن به سطح پوششی کامل در محیط کشت با ۱۵ درصد سرم در این تحقیق مطلوب و با گزارش‌های سایر محققین مطابقت دارد (Lua *et al*., 2002; Pedrini *et al*., 2011). این در حالی است که در کشت اولیه سلول‌های *Spodoptera frugiperda* IPLB Sf21AE افزایش غلظت سرم جنینی گاوی از صفر تا ۲۰ درصد، باعث افزایش زیستایی سلول‌ها شد (Maranga *et al*., 2002). طبق گزارش‌ها، از کشت سلول‌های بافت تخمدان شفیره‌ی *H. armigera* در محیط کشت گریس[1] با سرم ۱۰ درصد برای اهداف مختلف از جمله تکثیر *H. armigera* nuclearpolyhedrosis virus (HearNPV) استفاده می‌شود (Chaeychomsri, 2017).

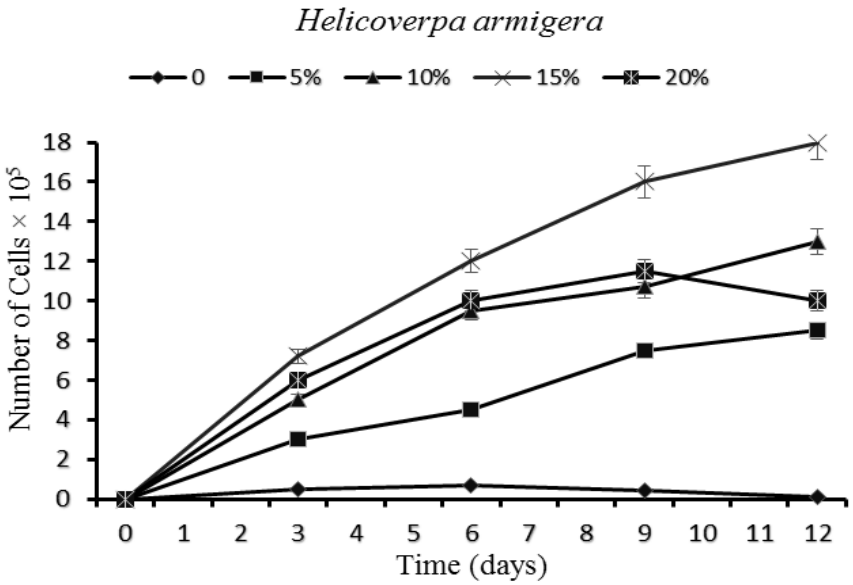
با توجه به مقایسه میانگین تیمارها، تعداد سلول‌های زنده شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی، مدت زمان رسیدن به سطح پوششی کامل و تعداد کل پاساژهای به‌عمل آمده در محیط کشت با سرم جنینی ۱۰ درصد به بیش‌ترین میزان خود رسیده و تعداد سلول‌های زنده بعد از ۱۲ روز به $۲/۲ \pm ۰/۰۰۴ \times ۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌متر مکعب خون رسید (جدول ۱). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که با افزایش غلظت سرم جنینی به ۱۵ و ۲۰ درصد، تعداد سلول‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($F=41.94$, $df_{t,e}=4, 5$, $p<0.0005$) (شکل‌های ۳ و ۴).

1. Grace



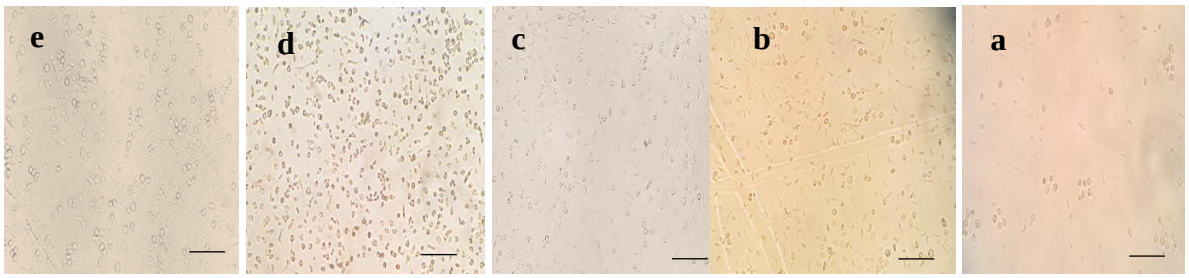
شکل ۱- رشد سلول‌های خونی کرم غوزه پنبه در محیط Ex-cell 400 حاوی غلظت‌های مختلف سرم جنینی گاوی، a) بدون سرم، b) ۵، c) ۱۰، d) ۱۵ و e) ۲۰ درصد بعد از گذشت ده روز. مقیاس ۲۰ میکرومتر است

Figure 1. Growth of hemocytes of *Helicoverpa armigera* in Ex-cell 400 medium supplemented with a) 0, b) 5, c) 10, d) 15 and e) 20% FBS 10 days after treatment. The scale bar is 20 µm



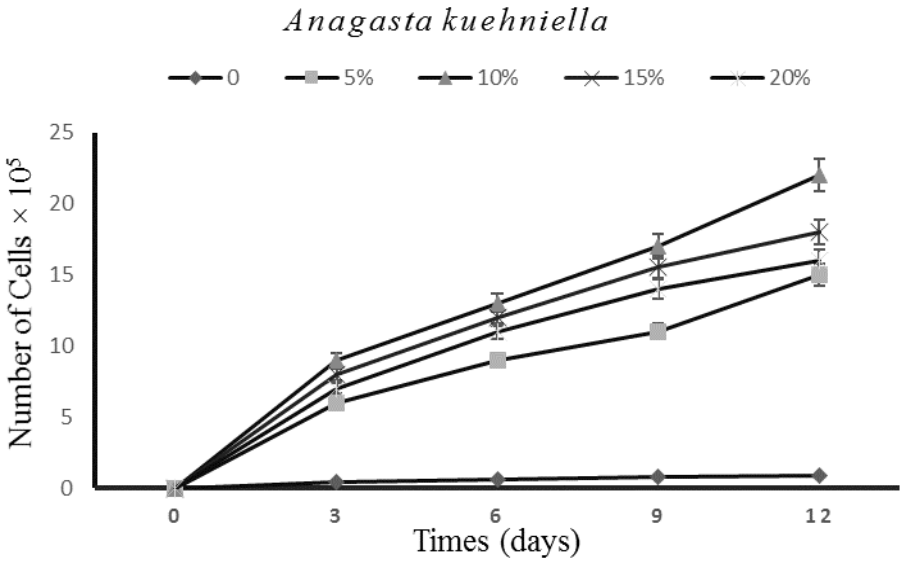
شکل ۲– منحنی رشد سلول‌های خونی لارو کرم غوزه پنبه در محیط کشت Ex-cell ۴۰۰ حاوی غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد سرم جنینی گاوی

Figure 2. Growth curves of hemocytes of *Helicoverpa armigera* in Ex-cell 400 medium supplemented with 0, 5, 10, 15 and 20% FBS



شکل ۳– رشد سلول‌های خونی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در محیط حاوی غلظت‌های مختلف سرم جنینی گاوی a) بدون سرم، b) ۵، c) ۱۰، d) ۱۵ و e) ۲۰ درصد بعد از گذشت ده روز . مقیاس ۲۰ میکرومتر است.

Figure 3. Growth of hemocytes of *Anagasta kuehniella* in Ex-cell medium supplemented with a) 0, b) 5, c) 10, d) 15 and e) 20% FBS after 10 days. The scale bar is 20 µm



شکل ۴– منحنی رشد سلول‌های خونی لارو شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در محیط کشت Ex-cell 400 حاوی غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد سرم جنینی گاوی

Figure 4. Growth curves of hemocytes of *Anagasta kuehniella* in Ex-cell 400 medium supplemented with 0, 5, 10, 15 and 20% FBS

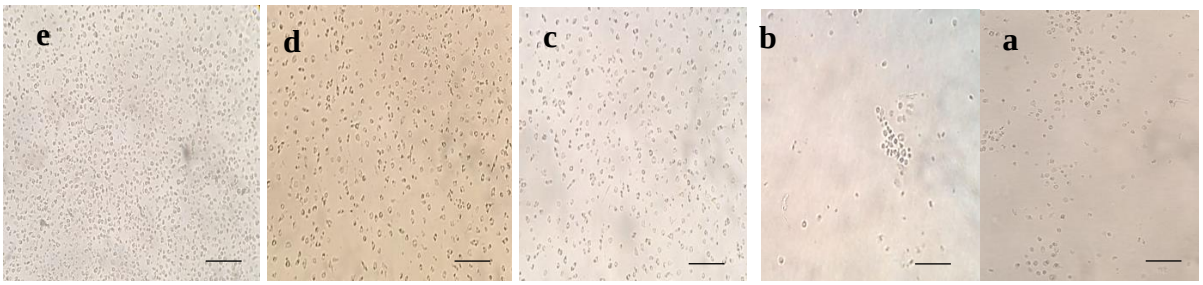
پس از استقرار کشت اولیه، پنج نوع سلول خونی پروهموسیت، پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید و اسفرولوسیت‌ها و دو سلول شبه‌پلاسماتوسیت شامل ورمیسیت و پودوسیت شناسایی شدند (Ghasemi *et al*., 2015). پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها بیش‌ترین تراکم سلولی را در محیط کشت داشتند. پژوهش حاضر با نتایج لین و همکاران مطابقت دارد (Lynn *et al*., 2004). آن‌ها گزارش کردند که رشد و زیستایی سلول‌های جنینی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد با ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی در محیط‌های کشت اولیه و ۵ درصد سرم در محیط‌های بعد از کشت اولیه، مطلوب است و قادر به تکثیر انواعی از باکلوویروس‌ها از جمله *Autographa californica* MNPV، *Anagrapha falcifera* MNPV، *Anticarsa gemmatalis* MNPV، *Galleria mellonella* MNPV، *H. armigera* SNPV، *H. zea* SNPV، *Lymantria dispar* MNPV، *Plutella xylostella* MNPV و *Rachoplusia ou* MNPV هستند.

پس از استقرار کشت اولیه سلول‌های خونی لارو سن آخر زنبور برگ‌خوار رز *A. ochropus*، چهار نوع سلول خونی قابل تشخیص بودند. این سلول‌ها عبارت بودند از پلاسماتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و انوسیتوئیدها (Khosravi *et al*., 2015)

سلول‌های خونی کرم برگ‌خوار رز بیش‌ترین رشد را بعد از ۱۲ روز در محیط کشت EX-cell 400 با ۲۰ درصد سرم جنینی داشته و به ۱۰^۵ ×۰/۰۰۷ ± ۹/۲ سلول در میلی‌متر مکعب خون رسیدند و با افزایش غلظت سرم جنینی گاوی از صفر تا ۲۰ درصد، رشد سلول خونی‌های *A. ochropus* به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($F=55.92, df_{t, e}= 4, 5, p<0.0002$) (شکل‌های ۵ و ۶) (جدول ۱). در پژوهشی دیگر مشابه با تحقیق حاضر، با افزایش غلظت سرم جنینی گاوی از ۱ تا ۱۰ درصد در محیط کشت گریس، تعداد و زیستایی سلول‌های *Anticarsia gemmatalis* Hübner به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. سرم حیوانی سرشار از فاکتورهای رشد، هورمون‌ها، پروتئین‌های حامل، عناصر ضروری و مواد ناشناخته دیگری است که در حضور آن سلول‌ها قدرت حیات و تکثیر بسیار بیش‌تری پیدا می‌کنند (Gómez *et al*., 2018). همچنین متین دوست و همکاران در سال ۱۳۸۵ گزارش کرده‌اند، بیش‌ترین رشد

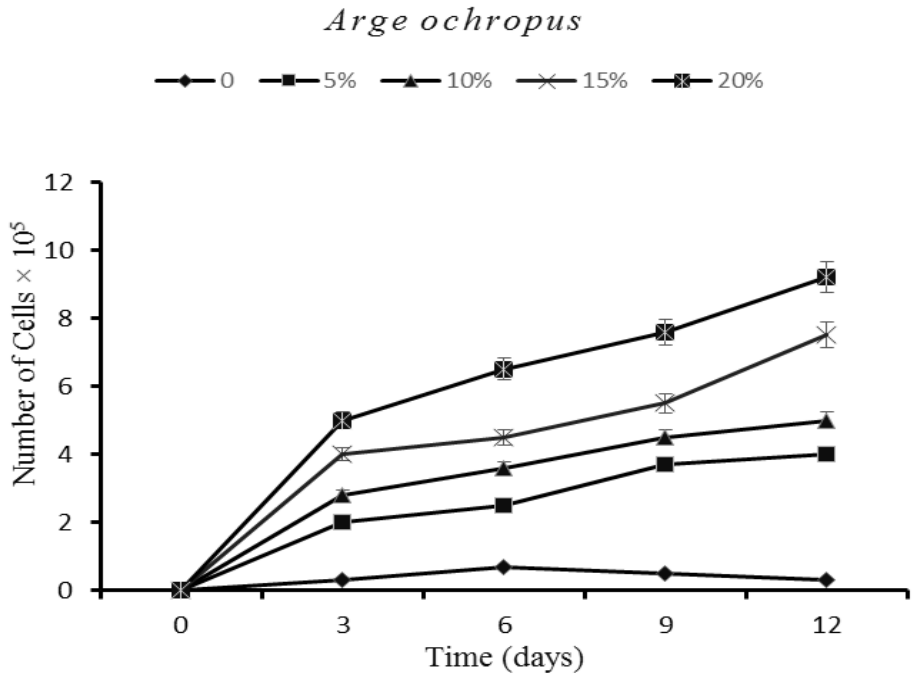
سلول‌های جنینی کرم ابریشم *Bombyx mori* L. در محیط TC-100 در غلظت ۲۰ درصد سرم مشاهده شد (Matindoost *et al.*, 2008).

ویژگی‌هایی از جمله توانایی کشت این سلول‌ها به حالت سوسپانسیون در تراکم بالا به جای حالت چسبیده، قابلیت اصلاحات ژنتیکی به گونه‌ای که اجازه ورود و بیان DNA خارجی را داده و به میزان زیادی پروتئین خارجی را بیان می‌کند، از مزایای کشت سلولی حشرات است. از مزایای دیگر، قابلیت تولید پروتئین به صورت گلیکوزیله و انجام اصلاحات پس از ترجمه برای فعالیت زیستی پروتئین، ایمن بودن سلول‌ها به گونه‌ای که هیچ ماده سمی اضافه‌ای به پروتئین تولید شده اضافه نمی‌شود، سلول‌های حشرات را به یک رده سلولی مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب انسانی تبدیل کرده است (Drugmand *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2014).



شکل ۵– رشد سلول‌های خونی زنبور برگ‌خوار رز در محیط کشت Ex-cell 400 حاوی غلظت‌های مختلف سرم جنینی گاوی a) بدون سرم، b) ۵، c) ۱۰، d) ۱۵ و e) ۲۰ درصد بعد از گذشت ده روز تیمار. مقیاس ۲۰ میکرومتر است.

Figure 5. Growth of hemocytes of *Arge ochropus* in Ex-cell 400 medium supplemented with a) 0, b) 5, c) 10, d) 15 and e) 20% FBS 10 days after treatment. The scale bar is 20 µm



شکل ۶– منحنی رشد سلول‌های خونی لاروی زنبور برگ‌خوار رز در محیط کشت Ex-cell 400 حاوی غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد سرم جنینی گاوی

Figure 6. Growth curves of hemocytes of *Arge ochropus* in Ex-cell 400 medium supplemented with 0, 5, 10, 15 and 20% FBS

افزایش محصول پروتئینی و کاهش هزینه‌های تولید، هدف اصلی فن‌آوری تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد (Yoon and Hong, 2006). علاوه بر این، کشت سلولی در علم حشره‌شناسی می‌تواند به شناخت و بررسی هر چه بهتر حشرات بیانجامد (Evans and Wood, 2014). کشت سلول حشرات کاربردهای زیادی در زمینه‌های فیزیولوژی، بیوشیمی، ژنتیک، زیست‌شناسی تکاملی و آسیب‌شناسی حشرات دارد (Harrison *et al*., 2018).

سرم جنینی گاوی (FBS) برای نگهداری، تکثیر و تمایز سلول‌های حشرات در محیط کشت لازم است. FBS مخلوط پیچیده‌ای از عوامل مختلف است و حاوی ترکیبات زیادی نظیر عوامل رشد، پروتئین، ویتامین، عناصر ضروری، هورمون، عوامل چسبندگی و غیره می‌باشد که برای رشد و نگهداری سلول‌ها ضروری هستند (Rezaei *et al*., 2013)، ولی با این وجود، استفاده از سرم به چندین دلیل چالش‌برانگیز است که می‌توان به هزینه بالا، مداخله در خالص‌سازی محصولات نوترکیب و امکان آلودگی‌های ویروسی و غیره اشاره کرد (Liu and Chang, 2006).

پیشنهاد می‌شود که برای تهیه‌ی کشت‌های اولیه سلول-های خونی این حشرات از غلظت‌های به‌دست آمده در این پژوهش استفاده شود. زیرا این سلول‌ها در کشت اولیه هنوز به شرایط آزمایشگاهی ایجاد شده، عادت نکرده و بسیار حساس هستند. بدیهی است که در این حالت تهیه‌ی محیط کشت هر چه غنی‌تر به رشد و زیستایی سلول‌ها خونی کمک خواهد کرد. البته بعد از رسیدن به بستر سلولی تک لایه‌ای مناسب، بهتر است سلول‌ها را به مقدار کم سرم عادت داد تا کاربرد آن در آزمایشگاه به‌صرفه باشد و مهم‌تر این‌که کشت ویروس در محیط دارای سرم کم، بیش‌تر عملی می‌شود و عیار ویروس تولید شده بیش‌تر خواهد بود.

در میان رده‌های سلولی توسعه‌یافته، تعداد رده‌های حاصل از سلول‌های خونی حشرات کم است، هر چند که جمع‌آوری این سلول‌ها راحت است. با توجه به اهمیت کشت سلول حشرات در مطالعات پایه و کاربردی و از آن‌جا که تاکنون این دانش فنی در ایران چندان به کار گرفته نشده است، ضرورت آن احساس می‌شود تا به فناوری تهیه و تولید کشت سلول حشرات توجه شود. به‌دلیل معایب و هزینه بالای استفاده از سرم، در این پژوهش سعی شده است، میزان حداقل سرم برای بیش‌ترین رشد سلول-های خونی در محیط کشت حشرات تعیین شود.

References

Aghili, Z. and Zarkesh, H. 2016. Investigating the effects of fetal bovine serum on morphology, cell viability and production of recombinant human growth hormone in comparison to serum-free medium in CHO cells. **New Cellular and Molecular Biotechnology Journal** 6(24): 65-71. (In Farsi)

Arif, B. and Pavlik, L. 2012. Insect cell culture: Virus replication and applications in biotechnology. **Journal of Invertebrate Pathology** 112: 136-141.

Baghban, A., Jalali Sendi, J. and Zibaee, A. 2015. The effect of zinc (Zn^{2+}) on cellular immune system of American cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lep.: Noctuidae). **Plant Pest Research** 5(3): 71-84. (In Farsi)

Chaeychomsri, S. Chaeychomsri W. Ikeda M. and Kobayashi M. 2017. Susceptibility of a Cloned Cell Line from *Helicoverpa armigera* to Homologous Nucleopolyhedrovirus. **Journal of Advanced Agricultural Technologies** 4: 3.

Davis, J. M. 1994. Basic cell culture A Practical Approach. Oxford University Press.

Drugmand, J. C., Schneider Y. J. and Agathos, S. N. 2012. Insect cells as factories for biomanufacturing. **Biotechnology Advances** 30: 1140–1157.

Evans, C. J., Liu, T. and Banerjee, U. 2014. *Drosophila hematopoiesis*: Markers and methods for molecular genetic analysis. **Methods** 68: 242-251.

Fan, J. 2016. Hemocytometer cell count and trypan blue cell viability (4th ed). Bowdish Lab, McMaster University Hamilton, ON, Canada.

Ferruzza, S., Rossi, C., Sambuy, Y. and Scarino, M. L. 2013. Serum reduced and serum free media for differentiation of Caco2 cells. **Altext** 30:159-168.

Ghasemi, V., Moharramipour, S. and Sendi, J. J. 2013. Circulating hemocytes of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep.: Pyralidae) and their response to thermal stress. **Invertebrate Survival Journal** 10: 128-140.

Gómez, D. L. M., Belaich, M. N., Rodríguez, V. A. and Ghiringhelli, P. D. 2018. Effects of fetal bovine serum deprivation cultures on the production of *Anticarsia gemmatalis* multinucleopolyhedrovirus. **Contributions on Biotechnology** 10: 68.

Harrison, R. L., Herniou, E. A., Jehle, J. A., Theilmann, D. A., Burand, J. P., Becnel, J. J., Krell, P. J., van Oers, M. M., Mowery, J. D., Bauchan, G. R. and Lefkowitz, E. J. 2018. ICTV virus taxonomy profile: Baculoviridae. **Journal of General Virology** 99(9): 1185-1186.

He, F., Yang, Y., Xiao, Y., Peng, R., Yao, H., Li, X., Peng, J., Hong, H., Liu, K. and Li, J. 2015. Establishment and characterization of a novel cell line from midgut tissue of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal** 51(6): 562-571.

Khosravi, R., Sendi, J. J., Brayner, F. A., Alves, L. C. and Feitosa, A. P. S. 2015. Hemocytes of the Rose Sawfly *Arge ochropus* (Gmelin) (Hymenoptera: Argidae). **Neotropical Entomology** 45(1): 58-65**.**

Lemaitre, B. and Hoffmann, J. A. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology** 25: 697-743.

Liu, C. H. and Chang, T. Y. 2006. Rational development of serum free medium for Chinese hamster ovary cells. **Process Biochemistry** 41: 2314–2319.

Lua, L. H. L., Pedrini, M. R. S., Reid, S., Robertson, A. and Tribe, D. E. 2002. Phenotypic and genotypic analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus serially passaged in cell culture. **Journal of General Virology** 83: 945–955.

Lynn, D., Stephen, E. and Ferkovich, M. 2004. New cell lines from *Ephestia kuehniella*: characterization and susceptibility to baculoviruses. **Journal of Insect Science** 4(9): 1-5.

Mangalika, P. R., Kawamoto, T., Takahashi-Nakaquchi, A. and Iwabuchi, K. 2010. Characterization of cell clusters in larval hemolymph of the cabbage armyworm *Mamestra brassicae* and their role in maintenance of hemocyte populations. **Journal of Insect Physiology** 56(3): 314-323.

Matindoost, L., Jalali Sendi, J., Soleiman-Jahi, H., Etebari K. and Rahbarizade, F. 2008. In vitro establishment of embryonic primary cultures of silkworm, *Bombyx mori* (Lep.: Bombycidae). **Journal of Entomological Society of Iran** 38(2): 173-186. (In Farsi)

Maranga, L., Coroadinha, A. S. and Carrondo, M. J. T. 2002. Insect cell culture medium supplementation with fetal bovine serum and bovine serum albumin: Effects on Baculovirus adsorption and infection kinetics. **Biotechnology Progress** 18: 855−861.

Merten, O. W., Kierulff, J. V., Castignolles, N. and Perrin, P. 1994. Evaluation of the new serum free medium (MDSS2) for the production of different biological: use of various cell lines. **Cytotechnology** 14: 47-59.

Merten, O. W., Kallel, H. and Manuguerra, J. C. 1999. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. **Cytotechnology** 30: 191-201.

Mitsuhashi, J. 2002. Invertebrate tissue culture methods. Springer-Verlag, Tokyo, p. 446.

Mitsuhashi, J. and Shozawa, A. 1985. Continuous cell lines from larval hemocytes of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. **Development, Growth and Differentiation** 27(5): 599-606.

Pedrini, M. R. S., Reid, S., Nielsen, L. and Chan, L. C. L. 2011. Kinetic characterization of the group II *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus propagated in suspension cell cultures: implications for development of a biopesticides production process. **Biotechnological Progress** 27: 614–624.

Ranga Rao, C., Kumar, S., Sireesha, K. and Lava, P. 2015. Role of nucleopolyhedroviruses (NPVs) in the management of lepidopteran pests. In Asia G. V. (Eds). International Publishing Switzerland, Switzerland, Europe. pp. 43.

Reid, S., Chan, L. C. L. and Van Oers, M. M. 2014. Production of entomopathoginic viruses. In: Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G. and Shapiro-Ilan D. I. (Eds.). Mass production of beneficial

organisms invertebrates and entomopathogens. Elsevier, Amsterdam, Netherland, Europe. ISBN 978-0-12-391453-8.

Rezaei, M., Zarkesh Esfahani, S. H. and Gharagozloo, M. 2013. The effect of different media composition and temperatures on the production of recombinant human growth hormone by CHO cells. **Research in Pharmaceutical Sciences** 8: 211-217.

Shorey, H. and Hale, R. 1965. Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 58: 522–524.

Sohi, S. S. and Smith, C. 1970. Effect of fetal bovine serum on the growth and survival of insect cell cultures. **Canadian Journal of Zoology** 48: 427-432.

Stanley, D. and Kim, Y. 2014. Eicosanoid signaling in insects: from discovery to plant protection. **Critical Reviews in Plant Sciences** 33: 1. 342-349.

Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L. and Gstraunthaler, G. 2010. Optimization of chemically defined cell culture media replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in Vitro** 24:1053-1063.

Wagner, G. R. and Hirschey, M. D. 2014. Nonenzymatic protein acylation as a carbon stress regulated by sirtuin deacylases. **Molecola Cell** 54(1): 5-16.

Wen, F., Caputo, G. and Hooey, S. h. 2015. Establishment of a cell line from the ash and privet borer beetle *Tylonotus bimaculatus* Haldeman and assessment of its sensitivity to diacylhydrazine insecticides. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal** 42: 683–707.

Yasunaga-Aoki, G., Imanishi, S., Iiyama K. and Kawarabata, T. 2004. Establishment of phagocytic cell lines from larval hemocytes of the beet armyworm, *Spodoptera exigua.* **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Animal** 40: 183-186.

Yazdanian, M. 2000. Evaluating the amount of growth and fecundity of mill moth, *Ephestia kuehniella* Zeller on different media prepared from flour. M. Sc. Thesis, University of Tabriz, 125 pp. (In Farsi)

Yoon, S. K. and Hong, J. K. 2006. Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production. **Journal of Biotechnology** 122: 463-472.

Yuanyuan, M., Wu, W., Chen, H., Liu, Q., Jia, D., Mao, Q., Chen, Q., Wu, Z. and Taiyun, W. 2013. An insect cell line derived from the small brown plant hopper supports replication of rice stripe virus, a tenuivirus. **Journal of General Virology** 94: 1421–1425.

Plant Pest Research
2019- 9 (3): 1-13

Effect of fetal bovine serum on the hemocytes growth of *Helicoverpa armigera, Anagasta kuehniella* and *Arge ochropus* in Ex-cell 400 culture

B. Valizadeh[1], J. Jalali Sendi[1*] and R. Salehi[2]
1. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran,
2. Department of Genetics and Molecular Biology, Medical University of Isfahan, Isfahan, Iran

(Received: May 27, 2019- Accepted: September 3, 2019)

Abstract

The use of insect cell lines for producing bio-pesticides, recombinant protein expression or gene delivery is increasing. Hence, the establishment of new cell lines will help to enrich this technology. Therefore, the purpose of this research is preparation of several primary cultures initiated from hemocytes of *Helicoverpa armigera* (Hubner), *Anagasta kuehniella* (Zeller) and *Arge ochropus* (Gmelin). The cultures were incubated in EX-cell 400 medium supplemented with 0, 5, 10, 15 and 20% concentrations of fetal bovine serum (FBS) at 28ºC. The concentrations of FBS were chosen on the basis of previous research. Results showed no growth in any of the cell lines when FBS was omitted from the medium. Maximal growth of *H. armigera* hemocytes was obtained with 15% FBS. There was no further increase in growth as FBS concentration was increased to 20%, Maximal growth of *A. kuehniella* hemocytes was obtained at 10% FBS. The growth of these cells was significantly lower at 15 and 20% FBS. As the fetal bovine serum concentration increased, *A. ochropus* hemocytes growth increased. In conclusion, the current investigation demonstrated the lowest concentration of FBS required for maximal growth of insect cells *in vitro*.

Key words: *Arge ochropus*, *Anagasta kuehniella*, *Helicoverpa armigera*, Fetal bovine serum, Insect cell culture

*Corresponding author: jjalali@guilan.ac.ir