Archive of SID.ir

مقالهٔ تحقیقی

تغییرات سلول‌های خونی بید کلم *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae) در پاسخ به *Bacillus thuringiensis* و تنش‌های دمایی

مجتبی زارعی[۱]، مریم عجم‌حسنی[۲] و شیده موجرلو[۳]

۱، ۲ و ۳- دانش‌آموخته، استادیار، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران.

مسئول مکاتبات: مریم عجم‌حسنی، ایمیل: shahroodm@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۰۵ ۹(۱) ۵۹-۷۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۰

چکیده

سیستم گردش خون در انتقال و ذخیرهٔ غذا و دفاع در مقابل میکروارگانیسم‌ها فعالیت می‌کند. میزان موفقیت این سیستم وابسته به تعداد و نوع سلول‌های خونی و عملکرد مناسب آن‌ها در برابر عوامل آلودگی در بدن است. در پژوهش حاضر، تاثیر *Bacillus thuringiensis* و تنش‌های دما بر فراوانی هموسیت‌ها و فعالیت فنل اکسیداز لارو سن پنجم بید کلم بررسی شد. در آزمایش اول، برگ‌های کلزا با غلظت زیرکشنده باکتری تیمار شده و لاروهای سن پنج پس از تغذیه از برگ‌ها در فواصل ۱۲ و ۲۴ ساعت خون‌گیری شدند. در آزمایش دوم نیز لاروها به مدت ۱۲ ساعت در دو دمای ۴ و ۳۰ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند و تنش دما روی هموسیت‌های آن‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که تغذیه از برگ‌های کلزای آلوده به باکتری پس از گذشت ۱۲ و ۲۴ ساعت سبب افزایش معنی‌دار کل سلول‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها و فعالیت فنل‌اکسیداز نسبت به شاهد شد. تنش‌های دمایی نیز افزایش فراوانی هموسیت‌ها و فعالیت فنل‌اکسیداز را نسبت به شاهد سبب شدند که این افزایش در لاروهایی که تنش دمای بالا را تحمل کرده بودند، معنی‌دارتر بود. قطعا تحقیقات تکمیلی نیاز است تا بتوان با شناخت ویژگی‌های ایمنی جمعیت‌های حساس و مقاوم بید کلم، امکان استفاده از روش‌های کنترل میکروبی را علیه آن ارزیابی نمود.

واژه‌های کلیدی: بید کلم، سلول‌های خونی، باسیلوس تورنژینسیس، دما

مقدمه

بید کلم با نام علمی *Plutella xylostella* (Linnaeus) یا پروانه پشت‌الماسی Diamondback moth یکی از مهمترین آفات گیاهان خانوادهٔ چلیپاییان و چندین محصول گلخانه‌ای در ایران و جهان می‌باشد. این آفت در ایران در سال‌های اخیر حالت طغیانی داشته و خسارت شدیدی روی محصولات خانوادهٔ چلیپاییان به ویژه کلم پیچ، شلغم و کلزا ایجاد کرده است (Fahimi *et al.*, 2008). لاروهای این آفت به شدت برگ‌های میزبان را مورد حمله قرار داده و از کیفیت و مرغوبیت محصول می‌کاهند. بید کلم دارای تنوع میزبانی زیادی بوده و از قدرت پراکنش و تولید مثل بالا و خصوصیات ژنتیکی منحصر به فردی برخوردار است، به همین خاطر به سرعت به انواع آفت کش‌ها مقاوم می‌شود (Zhao *et al.*, 2006). از طرفی سطح وسیع کاربرد سموم، سبب طغیان مجدد آفت و از بین رفتن دشمنان طبیعی و موجودات غیر هدف شده است. برای مدیریت بید کلم از انواع روش‌های زراعی، بیولوژیک و شیمیایی استفاده می‌شود. کاربرد عوامل موثر در کنترل میکروبی مانند قارچ‌ها و باکتری‌های بیماریزا در کنترل بسیاری از آفات برگخوار توصیه شده است. چنان‌که استرین‌هایی از باکتری *Bacillus thuringiensis* به تنهایی و یا به شکل مخلوط با آفت‌کش‌های شیمیایی علیه لاروهای سنین مختلف بید کلم

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

به کار گرفته شده و بر اساس گزارشات، گاه جمعیت‌هایی از بید کلم به آن مقاوم شده‌اند (Whalon *et al.*, 2008). ساز و کارهای مختلفی در مقاومت آفات به باکتری باسیلوس تورینژینسیس توسط محققین شناخته شده است (Ferre & Vanrie, 2002) که رایجترین آن‌ها، تغییراتی است که در گیرنده‌های توکسین در سلول‌های ستونی معده اتفاق می‌افتد (Sayyed *et al.*, 2004). هر چند که فعالیت‌های پروتئولیتیک یا درصد فعالیت پروتئازها در فرایند هضم نیز در این امر مشارکت دارد. به علاوه گزارش شده که مقاومت نسبتا بالای شب پرهٔ بید آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) به این باکتری بیماریزا در نتیجه ایمنی بالای آن رخ می‌دهد (Rahman *et al.*, 2004) و یا قدرت ملانیزاسیون و لخته‌شدن خون در برابر استرین‌های این باکتری در همولنف کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* (Lep.: Noctuidae) بسیار قوی بوده به‌طوری‌که منجر به انحلال توکسین‌های باکتری می‌شود (Ma *et al.*, 2005).

همولنف آخرین مانع دفاعی حشرات در مقابل انواع تنش‌ها و عوامل بیگانه است (Lavin & Strand, 2002). عوامل بیگانه پس از عبور از لایه‌های کوتیکولی جلد، وارد گردش خون شده و با اجزای ایمنی فیزیولوژیک مواجه می‌شوند. هموسیت‌ها در سیستم گردش خون با تغییر در تعداد، تیپ و مرفولوژی به تنش‌ها و عوامل ورودی مهاجم واکنش نشان می‌دهند (Li *et al.*, 2019). حشرات دارای سیستم ایمنی از نوع ایمنی ذاتی بوده که به شکل ایمنی سلولی و ایمنی هیومرال در برابر ورود عوامل بیگانه، آلودگی‌ها و عفونت‌ها فعال می‌شود (Riberio & Brehelin, 2006). ایمنی سلولی به شکل بیگانه‌خواری و گره‌زایی و تشکیل کپسول با مشارکت سلول‌های مهم در ایمنی یعنی پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها صورت می‌گیرد (Lavin & Strand, 2002). در واقع، ایمنی سلولی دارای مولفه‌هایی است که سلول‌های خونی ارکان اصلی آن را تشکیل می‌دهند و شناسایی انواع سلول‌های خونی و فراوانی آن‌ها در همولنف هر حشره اولین مرحله مطالعات ایمنی‌شناسی است (Ajamhassani, 2015). سلول‌های خونی حشرات برعکس مهره‌داران، نقشی در انتقال اکسیژن ندارند، اما نقش اساسی در سیستم ایمنی آن‌ها دارند. سلول‌های خونی که در خون غالب بالپولکداران مشاهده می‌شود شامل پروهموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها هستند. گرانولوسیت‌ها با داشتن پروتئین‌های لکتین قادر به شناسایی عوامل بیگانه هستند. این سلول‌ها به همراه پلاسموتوسیت‌ها با پروفایل چندشکلی، با بیگانه‌خواری و گره‌زایی اطراف عامل بیگانه در مقابل عامل مهاجم واکنش نشان می‌دهند و این پروسه، ایمنی سلولی حشرات را شامل می‌شود. دفاع هیومرال مربوط به پپتیدهای ضد میکربی وآنزیم‌هایی است که تشکیل ملانین و دفع عمل مهاجم را تنظیم می‌کنند (Strand, 2008). ورود اسپور قارچ یا باکتری پیش فنل اکسیداز غیرفعال موجود در اپیدرم، اندام چربی و لوله‌های مالپیگی را فعال کرده و سپس سامانه فنل اکسیداز با سیگنال‌دهی سرین پروتئازها شامل تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز فعال شده و منجر به تولید کوئینون و فنل و نهایتا ملانیزاسیون عامل بیگانه می‌شود. این لکهٔ دفعی توسط جریان خون به انتهای لوله گوارش هدایت می‌شود تا دفع شود. فعالیت همزمان ایمنی هیومرال و سلولی، حشره‌ای با دفاع قدرتمند علیه مهاجمان مضر از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها، تک‌یاخته‌ها و غیره می‌سازد. گزارشات متعددی نشان‌دهنده پاسخ‌های ایمنی حشرات در ساعات اولیهٔ ورود عامل مهاجم به هموسل است. روشن شده که معمولا ایمنی سلولی مقدم بر ایمنی هیومرال رخ می دهد. عجم حسنی و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌های لارو سن پنجم پروانه برگخوار سفید اشجار *Hyphantria cunea* (Drury)، شش ساعت پس از ورود اسپورهای جدایه‌های مختلف بوروریا باسیانا، واکنش دفاعی مناسبی با تغییر در تعداد و تشکیل گره نشان می‌دهند (Ajamhassani *et al.*, 2013). مطالعات انجام‌شده مرتبط با واکنش دفاعی سن خونخوار *Rhodnius prolixus* در مقابل حمله باکتری *Escherichia coli* نشان داد هموسیت‌ها درگیر، فعالیت بیگانه‌خواری بالایی علیه باکتری نشان داده و آن‌ها را در بازه زمانی کوتاهی منهدم می‌کنند (Borges *et*

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

(*al.*, 2008). همچنین، واکنش دفاعی کرم برگخوار *Spodoptera litura* در مقابل *B. thuringiensis* با تغذیه از گیاهان مختلف با تغییرات معنی‌دار تعداد کل سلول‌های خونی، فعالیت فنل‌اکسیداز، گلوتاتیون اس ترانسفراز و ملانیزاسیون همراه بود (Vengateswari *et al.*, 2020). به علاوه، سیستم ایمنی قوی، قادر به تحمل تنش‌های حاصل از جراحت و زخم در سطح جلد، گرسنگی و نیز تنش‌های حاصل از تغییرات محیطی مانند دما می‌باشد (Duarte *et al.*, 2020) این واقعیت در گروه‌های مختلف بی‌مهرگان که فاقد ایمنوگلوبولین هستند به اثبات رسیده است (Bao *et al.*, 2007). چنان‌که ثابت شده شکل و تعداد هموسیت‌ها لاروهای بید چغندرقند *Scrobipapla ocellatella* Boyd تحت تاثیر تنش‌های گرما و سرما دستخوش تغییرات بارزی می‌شود. دیوارهٔ سلولی اونوسیتوئیدها و گرانولوسیت‌ها در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس پاره شده و محتویات سلولی اونوسیتوئیدها بیرون ریخته می‌شود و در نتیجه سلول دچار مرگ می‌شود (Ajamhassani, 2021). در گزارشی دیگر، محققین نشان دادند که تیمار توام تنش گرما و قارچ بووریا باسیانا به‌طور معنی‌داری سبب افزایش تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و فعالیت فنل‌اکسیداز در کرم ساقه‌خوار برنج *Chilo suppresslais* (Walker) می‌شود (Shamakhi *et al.*, 2019). تنش سرمایی ۴۰ درجهٔ سلسیوس سبب کاهش ۴۴ درصدی سلول‌های خونی در گردش خون سوسری، *Gromphadorhina coquereliana* شد. به‌علاوه شمار سلول‌های بیگانه‌خوار تحت تاثیر سرما ۱۶ درصد کاهش یافت و شکل سلول‌ها نیز دچار تغییرات بارزی گردید به طوری‌که سطح سلول‌های سرمادیده نسبت به سلول‌های شاهد افزایش یافت و به عبارتی، اندازهٔ سلول‌ها تحت سرما افزایش نشان داد (Lubawy & Stocinska, 2020).

محققین وجود پنج هموسیت شامل پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید، پروهموسیت و اسفرولوسیت را در همولنف بید کلم گزارش کرده‌اند (Negreiro *et al.*, 2004; Correia *et al.*, 2008). به‌علاوه گزارش‌هایی نیز از تغییرات تراکم گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌های این آفت در مقابل حشره‌کش‌های Dipel و Xentari، (Ribeiro *et al.*, 2012) و پارازیتیسم توسط *Diadegma semiclausum* وجود دارد (Huang *et al.*, 2009). از آنجا که جمعیت‌های مختلف بید کلم می‌تواند واکنش‌های متنوعی در برابر هر نوع آلودگی نشان دهد، در تحقیق حاضر، فعالیت ایمنی این آفت در مقابل دوز زیر کشنده باکتری بیماریزای *B. thuringiensis* و تنش‌های دمایی مورد ارزیابی قرار گرفت. قطعا تحقیقات تکمیلی در شناخت بیشتر ویژگی‌های ایمنی شناسی بید کلم و واکنش آن به انواع حشره‌کش‌های میکروبی و شیمیایی ضروری می‌نماید.

مواد و روش‌ها

پرورش لاروهای بید کلم

کلنی اولیهٔ بید کلم از مزارع کلزای کشت و صنعت جوین تهیه و به آزمایشگاه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود (درون اتاقک رشد با دمای ۱±۲۰ سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰٪ و دورهٔ نوری ۱۴:۱۰ ساعت) منتقل شد. برای پرورش لاروها از ظروف پرورش به ابعاد ۳۰×۱۵×۲۰ سانتی‌متر استفاده شد که در سطح بالایی پوشیده از توری ارگانزا بود. تغذیهٔ لاروها با استفاده از برگ‌های کلزا صورت گرفت. روزانه ظروف مورد بازبینی قرار گرفته و از فضولات لاروی پاکسازی شده و برگ‌های جدید برای تغذیه در ظرف قرار داده می‌شد. از لاروهای سن پنجم برای آزمایش‌های ایمنی‌شناسی استفاده شد (Ajamhassani *et al.*, 2013).

تعیین درصد فراوانی سلول‌های خونی در همولنف لارو سن پنجم بید کلم

برای تعیین درصد سلول‌های خونی، همولنف ۲۰ لارو سن پنجم به طور جداگانه توسط میکروپیپت از محدودهٔ شکم استخراج شده و روی لام قرار داده شد. به این شکل که از هر لارو حدود یک میکرولیتر خون روی لام قرار گرفت. برای رنگ‌آمیزی سلول‌های خون از مادهٔ گیمسا استفاده شد که به حجم حدود ۲۰ میکرولیتر روی خون قرار داده شد. پس از گذشت زمان ۱۵ دقیقه، محلول رنگ‌آمیزی

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

شسته شد و برای تثبیت سلول‌ها و رنگ از کربنات لیتیم استفاده شد. سلول‌های خونی با استفاده از میکروسکوپ نوری BH2 و بزرگنمایی ۴۰ شناسایی و شمارش شدند. نحوهٔ شمارش اینگونه بود که تعداد صد عدد سلول به‌طور تصادفی انتخاب شده و انواع سلول‌ها شمارش شدند (Gupta, 1985).

کشندگی *B. thuringiensis* روی لارو سن پنجم بید کلم

ترکیب بیولوژیک استفاده شده در تحقیق حاضر، *B. thuringiensis* زیرگونه Kurstaki به شکل پودری و ساخت شرکت سی بی سی (CBC) از کشور ایتالیا می‌باشد که از مرکز تحقیقات کشاورزی شاهرود تهیه شد. برای انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی، غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ پی پی ام از ترکیب فوق در آب مقطر تهیه شد و به برگ‌های کلزا تیمار شدند. برای هر غلظت، ۶۰ عدد دیسک برگ کلزا به شعاع ۲ سانتی‌متر و ۶۰ عدد لارو سن پنج بید کلم در نظر گرفته شد. تعداد تکرارها برای هر تیمار ۴ عدد و هر تکرار شامل ۱۵ عدد لارو بود. با کمک میکروپیپت، ترکیب *B. thuringiensis* به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در مرکز هر برگ قرار داده شد. پس از خشک شدن، روی هر برگ یک عدد لارو سن پنج قرار گرفت. هر لارو به همراه برگ مورد تغذیه آن به یک پتری به‌طور جداگانه منتقل شدند. تیمار شاهد شامل لاروهایی بود که روی برگ‌های کلزای تیمارشده با ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر قرار گرفتند. پتری‌ها به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۰ درجهٔ سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰٪ و نسبت روشنایی به تاریکی ۱۴:۱۰ ساعت انتقال یافته و به لاروها اجازه داده شد که مدت زمان ۲۴ ساعت از برگ‌های آلوده تغذیه کنند. پس از ۲۴ ساعت، غلظتی از ترکیب که ۲۵٪ تلفات لاروها را به‌همراه داشت، به‌عنوان غلظت LC_{25} (پی پی ام) در نظر گرفته شد و از آن در آزمایش‌های ایمنی‌شناسی استفاده شد (Jones, 1967).

بررسی ایمنی لارو بید کلم در برابر باکتری *B. thuringiensis*

در این آزمایش دیسک‌های برگی به شعاع دو سانتی‌متر تهیه شد و در ظروف پتری‌دیش به‌طور جداگانه یک عدد دیسک برگی آلوده شده به غلظت ۴۰ پی پی ام *B. thuringiensis* (غلظت زیرکشنده که در آزمایش قبل به‌دست آمد) به‌همراه یک عدد لارو سن پنج قرار داده شد و مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت به لاروها اجازه داده شد تا از برگ‌ها تغذیه کنند. سپس آزمایش‌های ایمنی‌شناسی روی لاروها انجام گرفت. این آزمایش شامل سه تیمار بود: شاهد (لاروهایی که از برگ‌های کلزای تیمارشده با آب مقطر تغذیه کردند)، لاروهایی که ۱۲ ساعت از برگ‌های آلوده به باکتری تغذیه کردند و لاروهایی که ۲۴ ساعت از برگ‌های آلوده تغذیه کردند. برای هر تیمار ۴۰ عدد لارو در نظر گرفته شد که شامل ۴ تکرار ۱۰ تایی بود. به این شکل که هر تکرار شامل همولنف ده لارو بود که با هم مخلوط شده و به نسبت ۲:۱۰ میکرولیتر با بافر تایسون رقیق می‌شدند. شمارش سلول‌ها با فرمول جونز محاسبه شد.

بررسی ایمنی بید کلم در مقابل تنش‌های دما

لاروهای سن پنج بید کلم به مدت ۲۴ ساعت تحت تنش دمای ۴ و ۳۰ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند. تیمار شاهد شامل لاروهایی بود که در دمای آزمایشگاه قرار داشتند. لاروها بعد از ۲۴ ساعت خون‌گیری شدند و شمارش سلول‌های خونی آن‌ها با فرمول جونز انجام شد. آزمایش شامل ۳ تیمار و هر تیمار شامل ۴ تکرار ۱۰ تایی (لارو) بود. طرح آزمایش کامل تصادفی و تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد.

تعیین فعالیت فنل اکسیداز

برای تعیین اثر باکتری *B. thuringiensis* و تنش‌های دما روی فعالیت فنل اکسیداز لاروهای مورد آزمایش از روش هموسیت لایزیت استفاده شد (Leonard *et al.*, 1985). در این روش همولنف لاروهای هر تیمار جداگانه جمع‌آوری شده و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رو نشین حذف شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) به رسوبات اضافه شده و سپس هموژنیزه شد. محلول اخیر دوباره در ۱۲۰۰۰ دور در

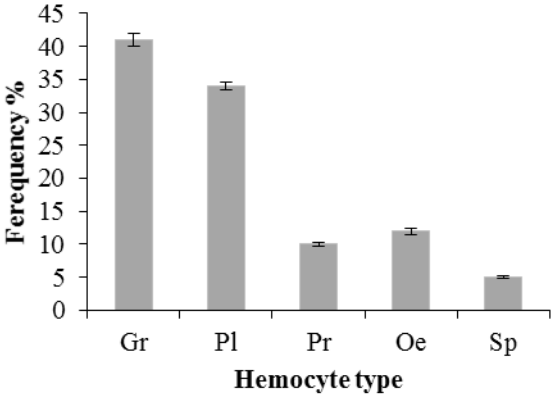
Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

دقیقه برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رونشین 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 درجهٔ سلسیوس نگهداری شده و سپس توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. آزمایش در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SAS و مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۱٪ انجام شد.

نتایج

شکل ۱ نشان‌دهندهٔ فراوانی انواع هموسیت‌ها در همولنف لارو سن پنج بید کلم است. گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در مجموع حدود ۷۰٪ تراکم سلول‌های خونی را شامل می‌شوند هرچند که فراوانی گرانولوسیت‌ها بالاتر از سایر سلول‌هاست. پروهموسیت‌ها و اونوسیتوئیدها هر یک حدود ۱۰٪ فراوانی را در خون بید کلم دارند و کمترین فراوانی سلول‌ها متعلق به اسفرولوسیت‌هاست.



شکل ۱- میانگین درصد فراوانی سلول‌های خونی لارو سن پنج بید کلم

Figure 1– mean of percentage of hemocytes of fifth instar larvae of *Plutella xylostella*

جدول ۱- نشان دهندهٔ سمیت باکتری *B. thringiensis* بر لاروهای بید کلم است. دوز زیرکشنده باکتری حدود ۴۰ پی پی ام به دست آمد که در بررسی‌های ایمنی‌شناسی به کار گرفته شد.

بررسی تاثیر *B. thuringiensis* روی تعداد کل و انواع سلول‌های خونی لارو سن پنج بید کلم

نتایج نشان داد که واکنش ایمنی لاروهایی که از برگ‌های آلوده به باکتری *B. thuringiensis* تغذیه کردند، معنی‌دار بوده است. بیشترین تغییرات معنی‌دار روی سلول‌های خونی بعد از ۱۲ ساعت تغذیهٔ لاروها از برگ‌های آلوده به باکتری رخ داده است به طوری‌که پس از ۱۲ ساعت افزایش معنی‌داری در تعداد کل سلول‌های خونی ($F=22.5$, $df_{t,e}=2$, 37; $p\leq0.002$)، گرانولوسیت‌ها ($F=45.6$, $df_{t,e}=2$, 37; $p\leq0.0001$)، پلاسموتوسیت‌ها ($F=36.7$, $df_{t,e}=2$, 37; $p\leq0.001$) و پروهموسیت‌ها ($F=12.5$, $df_{t,e}=2$, 37; $p\leq0.0006$) نسبت به شاهد اتفاق افتاده است (جدول ۲). به تدریج با گذشت زمان تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی لاروها کاسته شد، ولی در همولنف لاروهایی که ۲۴ ساعت از برگ‌های آلوده تغذیه کرده بودند، همچنان تعداد سلول‌های خونی بالاتر از لاروهای شاهد بود.

بررسی تاثیر *B. thuringiensis* بر فعالیت آنزیم فنل-اکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم

نتایج این آزمایش نشان داد که تغذیه از برگ‌های آلوده به باکتری *B. thuringiensis* سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز شد ($F=19.72$, $df_{t,e}=2$, 37; $p\leq0.0001$). میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در لاروهایی که به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت از برگ‌های آلوده به باکتری تغذیه کرده بودند به‌ترتیب با میانگین (۰/۰۰۱±۰/۲۸) و (۰/۰۰۲±۰/۳۱) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت (جدول ۳).

بررسی تاثیر دماهای مختلف روی تعداد سلول‌های خونی لاروهای سن پنج بید کلم

واکنش‌های دفاع سلولی لارو سن پنج بید کلم در برابر تنش‌های دمایی (۴ و ۳۰ درجهٔ سلسیوس) معنی‌دار بود.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

نتایج حاصل از تاثیر دمایی مختلف روی هموسیت‌های لارو سن پنج بید کلم نشان می‌دهد که در لاروهایی که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند؛ تعداد کل هموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها نسبت به شاهد (دمای ۱±۲۰ درجهٔ سلسیوس) افزایش یافت. به طوریکه تغییرات معنی‌داری در تعداد کل هموسیت‌ها ($F=21.3$, $df_{t,e}=2, 37$; $p\leq 0.005$)، گرانولوسیت‌ها ($F= 17.7$, $df_{t,e}=2, 37$; $p\leq 0.05$)، پلاسموتوسیت‌ها ($F=32.4$, $df_{t,e}=2, 37$; $p\leq 0.0001$) و اونوسیتوئیدها ($F= 10.6$, $df_{t,e}=2, 37$; $p\leq 0.003$) نسبت به شاهد ایجاد شد (جدول ۴). همچنین در اثر تنش سرما (دمای ۴ درجهٔ سلسیوس)، تعداد کل هموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها نسبت به شاهد افزایش یافت. در این دما تغییرات معنی‌داری در تعداد کل هموسیت‌ها ($F=22.5$, $df_{t,e}=2, 37$; $p\leq 0.0001$)، گرانولوسیت‌ها ($F= 15.6$, $df_{t,e}=2, 37$; $p\leq 0.003$)، پلاسموتوسیت‌ها ($F=34.3$, $df_{t,e}=2, 37$; $p\leq 0.003$) و اونوسیتوئیدها ($F= 25.8$, $df_{t,e}=2, 37$; $p\leq 0.006$) نسبت به شاهد مشاهده شد (جدول ۴).

بررسی تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم

نتایج این آزمایش نشان داد که افزایش و کاهش دما به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز را افزایش می‌دهد ($F=18.6$, $df_{t,e}=2, 37$; $p\leq 0.003$). فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در شاهد ۰/۲±۰/۰۰۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود که به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از فعالیت آن در لاروهای تحت تنش دمای ۴ درجهٔ سلسیوس (۰/۳۴±۰/۰۱) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین و دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس (۰/۳۶±۰/۰۰۴) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود (جدول ۵).

جدول ۱– سمیت حشره‌کش بیولوژیک *Bacillus thuringiensis* بر لارو سن پنج بید کلم *Plutella xylostella*

Table 1. Pathogenicity of biological insecticide *Bacillus thuringiensis* on fifth instar larvae of *Plutella xylostella*

Pest	Numbers	Chi–squre	Slope±se	LC_{50}(90%FL)	LC_{90}(90%FL)
Plutella xylostella	360	1.5	2.2±0.53	65.5–110 ppm	140.3–177.8ppm

جدول ۲– تاثیر باکتری *Bacillus thuringiensis* بر تعداد کل هموسیت‌ها و انواع سلول‌های خونی لاروهای سن پنج بید کلم

Table 2. Effect of *Bacillus thuringiensis* on total hemocyte count and differential hemocyte count in fifth instar larvae of *Plutella xylostella*

B. t(40 ppm)	THC (in mm^3 hemolymph)	GR (in mm^3 hemolymph)	PL (in mm^3 hemolymph)	PR (in mm^3 hemolymph)
Control	48.5±2.45b	25±1.86b	17.6±1b	1.4±0.11b
12 h	72±3.44a	37.2±1.2a	22.4±0.12a	4±0.5a
24 h	58.7.6±3.44b	30.7±0.33b	17.5b	3.5±0.1a

حروف مختلف در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۵ ٪

Different letters in each column show significantly difference among treatment using Tukey's range test ($P\leq 0.05$).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جدول ۳– تاثیر باکتری *Bacillus thuringiensis* بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم

Table 3. Effect of *Bacillus thuringiensis* on phenoloxidase activity in hemolymph of fifth instar larvae of *Plutella xylostella*

	B. thuringiensis (40 ppm)		
	Control	12 h	24 h
Phenoloxidase activity (µm/min/mg protein)	0.16±0.003 b	0.28±0.001a	0.31±0.002 a

حروف مختلف نشانگر اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه بندی توکی در سطح احتمال ۵ ٪

Different letters show significantly difference among treatment using Tukey's range test ($P \leq 0.05$).

جدول ۴– تاثیر تنش دما بر تعداد کل هموسیت‌ها و انواع سلول‌های خونی لاروهای سن پنج بید کلم

Table 4. Effect of thermal stress on total hemocyte count and differential hemocyte count in fifth instar larvae of *Plutella xylostella*

Temperature	THC (in mm^3 hemolymph)	GR (in mm^3 hemolymph)	PL (in mm^3 hemolymph)	PR (in mm^3 hemolymph)	OE (in mm^3 hemolymph)
20±1°C	45.8±4.4c	23±1.66b	20.4±1.45ab	1.8±0.224b	2b
4°C	58.8±1.3b	28.2±1.23b	21.56±0.33b	3.7±0.14a	3±0.1b
30°C	94.5±5.72a	45±4.14a	38.87.4±3.4a	4±0.2a	4.4±0.15a

حروف مختلف در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۵٪

Different letters in each column show significantly difference among treatment using Tukey's range test ($P \leq 0.05$).

جدول ۵– تاثیر تنش دما بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم

Table 5. Effect of thermal stress on phenoloxidase activity in hemolymph of fifth instar larvae of *Plutella xylostella*

	Temperature (°C)		
	20±1°C	4°C	30°C
Phenoloxidase activity (µm/min/mg protein)	0.2±0.001 a	0.34±0.01 b	0.36±0.004 b

حروف مختلف نشانگر اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۵٪

Different letters show significantly difference among treatment using Tukey's range test ($P \leq 0.05$).

بحث

بر اساس گزارشات محققین ایمنی‌شناسی حشرات ثابت شده که جمعیت هموسیت‌ها درگردش خون می‌تواند به سرعت در پاسخ به جراحت جلد، گرسنگی، نوع تغذیه، تغییرات دمایی و آلودگی ناشی از میکروارگانیسم‌ها، ذرات سموم و آلاینده‌های محیطی تغییر کند (Mowlds *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2020). این تغییر اصولا به شکل تغییر در مرفولوژی و فراوانی پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها مشاهده می‌شود. پروهموسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های پایه و بنیادی در طول هماتوپویزیز ساخته شده و به‌همراه پلاسموتوسیت‌ها از اندام‌های هماتوپویتیک آزاد می‌شوند. این سلول‌ها در شرایط تنش یا ورود عامل بیگانه به همولنف به سایر سلول‌ها مشتق شده و به این ترتیب آمادگی دفاع سلولی را افزایش می‌دهند. پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های اصلی مشارکت‌کننده در

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

ایمنی سلولی مداخله می‌کنند (Lavin & Starnd, 2002). مجموع فراوانی این سلول‌ها در لارو کامل اکثر بالپولکداران حدود ۸۰ تا ۹۰٪ کل سلول‌های خونی را شامل می‌شود. در بخشی از تحقیق حاضر دفاع لاروهای سن پنجم بید کلم پس از تغذیه از برگ‌های کلزای آلوده به باکتری *B. thuringiensis* با افزایش معنی‌دار همهٔ سلول‌های خونی و فعالیت آنزیم فنل اکسیداز همراه بود. این تغییر تقریبا در همان ساعات اولیه ورود آلودگی به هموسل رخ داد که از ویژگی‌های دفاع سلولی جانوران است (Standly & Miller, 2006). در واقع، در فاصله زمانی حدود ۱۲ ساعت پس از ورود عامل بیگانه به بدن لارو، سامانه دفاع یاخته‌ای تحریک می‌شود. چنین به نظر می‌آید که در این فرایند، تعداد زیادی هموسیت جدید تولید می‌شود و جایگزین هموسیت‌های می‌شود که در واکنش به عامل بیگانه نابود می‌شوند (Li *et al.*, 2019). ضمن اینکه قسمت عمده این افزایش مربوط به گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها است. این سلول‌ها نقش عمده در فعالیت‌های بیگانه‌خواری، تشکیل گره و کپسول اطراف عامل بیگانه دارند و ثابت شده به همراه توکسین‌های ترشح شده و فعالیت اجزای فنل‌اکسیداز سبب ملانیزاسیون و بلوکه شدن عامل آلوده می‌شوند (Beckage, 2008). نتایج نشان داد با گذشت زمان تا ۲۴ ساعت سامانه ایمنی حشره کمی ضعیف‌تر شد ولی همچنان فراوانی سلول‌های خونی در پاسخ به ذرات *B. thuringiensis* بالاتر از شاهد بود. بنابراین تغییر معنی‌دار تعداد سلول‌های خونی و برگشت آن‌ها به حالت اولیه، یک فعالیت فیزیولوژیکی سیستم گردش خون در مقابل *B. thuringiensis* است. چرا که حفظ هموستازیس موجود زنده در تمام مراحل رشدی ضروری است (Nakahara *et al.*, 2003). محققین دیگر نیز مشخص کرده‌اند که حضور عامل مهاجم در همولنف حشره منجر به تغییر در تراکم هموسیت‌ها به ویژه ایمنوسیت‌ها می‌شود. چنانکه عجم حسنی و محمودزاده اعلان کردند که لاروهای لیسه سیب *Yponomeuta malinellus* Zeller پس از تغذیه از برگ‌های سیب آلوده به باکتری بیماریزای *B. thuringiensis* تا زمان ۲۴ ساعت فعالیت ایمنی بالایی نشان داده و جمعیت ایمنوسیت‌ها و تعداد کل هموسیت‌ها و فعالیت فنل‌اکسیداز دستخوش تغییرات معنی‌داری شد (Ajamhassani & Mahmoodzadeh, 2020). هنان در سال ۲۰۱۲، دفاع هیومرال لاروهای *Agrotis ipsilon* را در برابر *B. thuringiensis* مطالعه کرده و نتیجه گرفتند که ۶ و ۱۲ ساعت پس از تیمار لاروها با باکتری، فعالیت لیزوزیمی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Hanan, 2012). در بررسی‌های انجام شده توسط بلانکو و همکاران (۲۰۱۷)، پاسخ ایمنی لارو *Galleria mellonella* در برابر سه سویه باکتری گرم منفی *Actinobacillus pleuropneumoniae* مثبت بود بطوری‌که غلظت پپتیدهای آنتی باکتریال را در همولنف حشره به‌طور معنی‌داری افزایش داد (Blanco *et al.*, 2017). سلولهای خونی لاروهای کرم ابریشم *Bombyx mori* در ساعات اولیه هجوم باکتری *E. coli* دچار تغییر در مرفولوژی و تعداد شدند. گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها با گره‌زایی اطراف عامل بیگانه در شرکت در ملانیزاسیون فعالیت کردند (Li *et al.*, 2019). پاسخ ایمنی *Spodoptera litura* تغذیه کرده از رژیم غذایی غنی از هیدرات کربن در مقابل نماتد بیمارگر *Mesorhabditis belari*، باکتری همزیست و متابولیت‌های آن کاملا معنی‌دار بود (Manjula *et al.*, 2020). در همین راستا ورود اسپورهای قارچ بیمارگر *B. bassiana* به همولنف لارو پروانه برگخوار سفید اشجار *Hyphantria cunea* Drury (Ajamhassani *et al.*, 2013)، لارو پروانه برگخوار شبدر علوفه‌ای *Utethesia pulchella* L. (Ajamhassani, 2014) و لارو بید سیب‌زمینی *Phthorimaea operculella* Zeller (Pourali & Ajamhassani, 2018) در فاصله ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق قارچ، به شدت سبب افزایش معنی دار هموسیت‌ها و افزایش حجم خون گردید.

دما نقش مهم در رشد حشرات و ساز و کار هموستازیس دارد (Ghasemi *et al.*, 2013). نقش دما در فرایندهای سامانه ایمنی حشرات نیز ثابت شده است. دما تراکم سلولهای خونی شب پره بید آرد *Ephestia kuehniella* zeller را به‌طور معنی‌داری تغییر داده و گاه مرفولوژی سلولها را دستخوش تغییر می کند. غشای سلول‌های خونی

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

پاره شده و محتویات سلولی به بیرون ریخته می‌شود (Ghasemi *et al*.., 2013). در تحقیقات پورعلی و همکاران در سال ۲۰۱۸، دمای پایین (۴ درجهٔ سلسیوس) سبب کوچک شدن سلولهای خونی لارو بید سیب‌زمینی و چروکیدگی دیواره سلولی آن‌ها شد. به‌علاوه تقسیمات میتوتیک در پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و به‌ویژه گرانولوسیت‌ها گاه در اثر تنش‌های دمایی به شدت تحریک می شود (Pourali & Ajamhassani, 2018). تاثیر تنش‌های دمایی بر فراوانی هموسیت‌ها در لارو لیسهٔ سیب (Ajamhassani & Mahmoodzadeh, 2020) و کرم جگری *Cossus cossus*L.، (Ajamhassani & Pourali, 2020) نیز مشهود بود. در این بررسی‌ها دمای ۴۰–۳۵ درجهٔ سلسیوس در بازه زمانی ۲۴ ساعت سبب افزایش معنی‌دار تعداد کل هموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها وگرانولوسیت‌ها شد و سرما با دمای ۴ درجهٔ سلسیوس کاهش معنی‌دار هموسیت‌ها را به همراه داشت. در تحقیق حاضر تنش‌های دمایی گرما و سرما هر دو به افزایش معنی‌دار جمعیت هموسیت‌ها و فعالیت فنل‌اکسیداز منتهی شد. به علاوه دیوارهٔ سلولی گرانولوسیت‌ها در تنش با دمای بالا پاره شده و اندامک‌های سلولی به بیرون از سلول ریخته شد. از طرفی سرما سبب کوچک و فشرده شدن سلول‌های خونی به‌ویژه گرانولوسیت‌ها شده و دیوارهٔ سلولی اغلب سلول‌ها چروکیده شده بود (نتایج مشاهده‌ای).

در آزمایش‌های این تحقیق، تاثیر تنش دما و ورود باکتری به همولنف سامانه فنل‌اکسیداز را تحریک و سبب افزایش معنی دار فعالیت این آنزیم شد. مشاهده شده که تنش‌های دیگر مانند گرسنگی و تغییر رژیم غذایی فعالیت فنل اکسیداز را در لارو شب پره هندی *Plodia interpunctella* به‌طور معنی‌داری تغییر دادند (Ebrahimi & Ajamhassani, 2020). ثابت شده که یکی از محصولات فنل‌اکسیداز در طول دفاع حشره، ملانین است. ملانین و کوینون آزاد شده در سطح زخم و جراحت و گره‌های تشکیل شده توسط سلولهای خونی رسوب کرده و به بلوکه کردن عامل بیگانه کمک می کند. به گزارش هرناندز و همکاران در سال ۱۹۹۹ گرانولوسیت‌ها سلول‌هایی هستند که هنگام ورود آلودگی و عفونت به همولنف با تغییر غشای سلولی می‌توانند فنل اکسیداز را در حضور سوبسترای اختصاصی خود یعنی L– DOPA آزاد نمایند. در تحقیق حاضر مشاهده شده همراه با افزایش معنی دار تعداد گرانولوسیت‌ها در مقابله با تنش، فعالیت سامانه فنل اکسیداز نیز افزایش قابل توجهی یافت که با نتایج هرناندز منطبق است. البته باید در نظر داشت که یکی از منابع بالقوه تولید فنل اکسیداز در بالپولکداران اونوسیتوئیدها هستند (Jiang *et al*., 1997) و فراوانی این سلول‌ها نیز هنگام تنش‌های دمایی تغییر محسوسی پیدا کرد.

تغییر در تعداد سلول‌های خونی، به عنوان ارکان اصلی و پایه ای دفاع فیزیولوژیک، سامانه ایمنی حشره را تحت تاثیر قرار می‌دهد. چنانچه ایمنی حشره از توانمندی بالا برخوردار باشد می‌تواند بر عامل بیگانه فایق آید و بر عکس گاه مشاهده شده که سیستم ایمنی ضعیف سبب پیشرفت آلودگی شده است که در این‌صورت، نتیجه برهم‌کنش به نفع قارچ یا باکتری بیماریزا خواهد بود. در واقع، نوع واکنش حشره به عامل میکروبی مهاجم، کارایی روش‌های کنترل مانند کنترل میکروبیولوژیک و شیمیایی را تا حدود زیادی مشخص می‌کند. لذا مطالعه و بررسی اثرات متقابل آلودگی حاصل از باکتری‌ها و قارچ‌های بیمارگر در همولنف با اجزای دفاع سلولی و هیومرال حشره ضروری است تا بتوان در اتخاذ روش‌های کنترل میکروبی با تدبیر بیشتری اقدام نمود.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی شاهرود بخاطر حمایت مالی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

References

Ajamhassani, M., Sendi, J.J., Zibaee, A., Askary, H. & 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: 110–118.

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

Ajamhassani, M. 2015. Study of cytology of hemocytes in the Spurge hawk–moth, *Hyles euphorbiae* L. (Lepidoptera: Sphingidae). Plant Protection (Agricultural Science Journal), 38(3): 49–62. (In Persian with English summary)

Ajamhassani, M. 2019. Study on morphology and frequency of hemocytes in *Osphranteria coerulescense* (Redt) (Coleoptera: Cerambycidae) and *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae) larvae, two wood boring insects of Iran. Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 17(2): 96–106. (In Persian with English summary).

Ajamhassani, M. & Pourali, Z. 2020. Hemogram study and effect of thermal Stresses on abundance of immunocytes in larvae of Goat Moth, Cossus cossus (Lepidoptera: Cossidae). Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 17(2): 239–250. (In Persian with English summary).

Ajamhassani, M. & Mahmoodzadeh, M. 2020. Cellular defense responses of 5th instar larvae of the Apple Ermine Moth, *Yponomeuta malinellus* (Lepidoptera: Yponomeutidae) against starvation, thermal stresses and entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*. Journal of Animal Researches, 4(2): 59–68. (In Persian with English summary).

Ajamhassani, M. 2021. Hemocyte changes of larvae of the beet moth, *Scrobipalpa ocellatella* (Lepidoptera: Gelechiidae) affected by thermal stress. Journal of Entomological Society of Iran, 41(1):101–103. (In Persian with English summary).

Bao, Y., Yamano, Y. & Morishima, I. 2007. Induction of hemolin gene expression by bacterial cell wall components in eri–silkworm, *Samia cynthia*ricini. Molecular Biology, 146: 147−151.

Beckage, N. E. 2008 Insect Immunology, Academic Press. California.

Blanco, L.A.A., Crispim, J.S., Fernandes, K.M., de Oliveira, L.L., Pereira, M.F., Bazzolli, D.M.S. & Martins, G.F. 2017. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Cell and Tissue Research, 370(1): 153–168.

Borges, A.R., Santos, P.N. Furtado, A.F. & Figueiredo, R.C. 2008. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduvidae). Micron, 39: 486–49.

Correia, A. A., Wanderley–Teixeira, V., Oliveira, J.V. & Torres, J.B. 2008. Dinámica hemocitaria en larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas con nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, 34: 357–365.

Duarte, J.P., Silva, C.E., Ribeiro, P.B. & Carcamo, M.C. 2020. Do dietary stresses affect the immune system of *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae)? Brazillian Journal of Biology, 80(1): 73–80.

Ebrahimi, M. & Ajamhassani, M. 2020. The Effects of Starvation Challenges and Nutritional Diets on Immunity System of Indian Meal Moth *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera Pyralidae). Invertebrate Survival Journal, 17: 175–185.

Fahimi, A., Kharrizi–pakdel, A. & Talaee–Hassanloui, R. 2008. Evaluation of effect of PxGV–Taiwanii on cabbage moth Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae) in laboratory conditions. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(13): 1768– 1770.

Ferré, J. & Van Rie, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual Review of Entomology, 47: 501–533.

Ghasemi, V., Moharramipour, S. & Jalali Sendi, 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.

Gillespie, J.P., Burnett, C. & 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: 429–437.

Gupta, A.P. 1985. Cellular elements in the hemolymph. Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology, 3: 401–451.

Hannon, E.R., Rodstrom, R.A., Chong, J.M. & Brown, J.J. 2017. Carpenterworm Moth. Washington State University Extension.

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

Huang, F., Shi, M. & Yang, Y. 2009. Changes in hemocytes *of Plutella xylostella* after parasitism by *Diadegma semiclausum*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 70(3): 177–187.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Jiang, H., Wang, Y., Ma, C. & 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. 1967. Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* L. Biological Bulletin, 132: 211–221.

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

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

Li, T., Yan, D., Wang, X., Zhang, L. & Chen, P. 2019. Hemocyte Changes During Immune Melanization in *Bombyx Mori* Infected with *Escherichia coli*. Insects, 10(301): 1–15.

Lubawy, J. & Slocinska, Malgorzata. 2020. Characterization of Gromphadorhina coquereliana hemolymph under cold stress. Scientific Reports.

Ma, G., Roberts, H., Sarjan, M., Feath erstone, N., Lahnstein, J., Akhurst, R. & Schmidt, O. 2005. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35 (7): 729–739.

Manjula, P., Lalitha, K. & Shivakumar, M.S. 2020. Diet composition has a differential effect on immune tolerance in insect larvae exposed to Mesorhabditis belari, Enterobacter hormaechei and its metabolites. Journal of Experimental Parasitology, 208: 1–7.

Mowlds, P. & Kavanagh, K. 2008. Effect of pre–incubation temperature on susceptibility of *Galleriamellonella* larvae to infection by Candida albicans. Mycopathologia, 165: 5–12.

Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M. & Kamimura, M. 2003. In vitro studies of hematopoiesis in the silkworm: Cell proliferation in and hemocyte discharge from the hematopoietic organ. Journal of Insect Physiology, 49: 907–916.

Negreiro, M.C.C., Andrade, F.G.D. & Falleiros, Â.M.F. 2004. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. Semina: Ciências Agrárias, 25(4): 293–308.

Söderhäll, K. & Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase–activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology, 10(1): 23–28.

Pourali, Z. & 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.Supplementary, 37(4): 515–525.

Rahman, M.M., Roberts, H.L.S., Sarjan, M., Asgari, S. & Schmidt, O. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(9): 2696–2699.

Ribeiro, L., Teixeira, V., Cunha, F., Teixeira, A. & Siqueira, H. 2012. Immunological response of resistant and susceptible *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis.* Revista Colombiana de Entomología, 38(2): 208–214.

Sayyed, A.H., Raym ond, B., Ibiza–Palacios, M.S., Escriche, B. & Wright, D.J. 2004. Genetic and biochemical characterization of field–evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Applied and Environmental Microbiology, 70(12): 7010–7017.

Shamakhi, L., Zibaee, A., Karimi, A. & Hoda, H. 2019. Effect of thermal stress on the immune responses of *Chilo suppressalis* walker (Lepidoptera: Crambidae) to *Beauveria bassiana*. Journal of Thermal Biology, 84: 136–145.

Stanley, D. & Miller, J.S. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. Entomologia Experimentalis ET Applicata, 119: 1–13.

Strand, M.R. 2008. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect immunology, 25–47.

Vengateswari, G., Arunthirumeni, M. & Shivakumar, M.S. 2020. Effect of food plants on *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae immune and antioxidant properties in response to Bacillus thuringiensis infection. Toxicology Reports, 1428– 1437.

Whalon, M.E., Mota –Sanchez, D. & Hollingworth, R.M. 2008. Analysis of global pesticide resistance in arthropods. p. 5–31. In: Whalon, M. E. (Ed.). Global Pesticide Resistance in Arthropods. CABI Publishing. Wallingford. United States of America. 192 p.

Zhao, J.Z., Collins, H.L., Li, Y.X., Mau, R.F.L., Thompson, G.D., Hertlein, M. Andaralo, J.T., Boykin, R. & Shelton, A.M. 2006. Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance of spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate. Journal of Economic Entomology, 99(1): 176–181.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Changes in hemocytes of *Plutella xylostella* (Lepidoptera:Plutellidae) in response to *Bacillus thuringiensis* and thermal stresses

Mojtaba Zareei[1], Maryam Ajamhassani[2], Shideh mojerlou[3]

1, 2, 3. Graduate student, Assistant Professor, Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Iran.

Corresponding author: Maryam Ajamhassani, email: shahroodm@gmail.com

Received: Mar., 25, 2021 9(1) 59–70 Accepted: May., 31, 2022

Abstract

The circulatory system is involved in the transport and storage of food and defense against microorganisms. The success rate of this system depends on the number and type of blood cells and their proper function against contaminants in the body. In the present study, the effect of *Bacillus thuringiensis* and temperature stress was investigated on homocyte abundance and phenol oxidase activity in fifth larvae of *Plutella xylostella*. In the first experiment, rapeseed leaves were treated with sub–lethal concentrations of bacteria and fifth instar larvae were bled at 12 and 24 hours after feeding on the leaves. In the second experiment, the larvae were exposed to 4 and 30 degrees Celsius for 12 hours and temperature stress was examined on their homocytes. The results showed that feeding on canola leaves infected with bacteria after 12 and 24 hours caused a significant increase in total cells, plasmotocytes and granulocytes and phenol oxidase activity compared to the control. Temperature stresses also increased the number of homocytes and phenol oxidase activity compared to the control, which was more significant in larvae that tolerated high temperature stress. Certainly, additional research is needed to be able to evaluate the possible use of microbial control methods against cabbage willow by recognizing the safety characteristics.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Diamondback moth, hemocytes, temprature

Archive of SID.ir