

پاسخ سیستم ایمنی غیرسلولی لاروهای بید آرد، *Ephestia kuehniella* به باکتری *Bacillus thuringiensis* و قارچ *Beauveria bassiana*

شیوا حراجی^۱، رضا طلایی حسنلویی^{۲*}، آیدا خرم‌نژاد^۳ و وحید حسینی نوه^۲

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲- استاد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳- دانش‌آموخته دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۰۱)

چکیده

مکانیسم‌های دفاع ذاتی حشرات، به دو بخش مکانیسم‌های سلولی و غیر سلولی (هیومرال) تقسیم می‌شوند که فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز و بیان پپتیدها یا پروتئین‌های ضد میکروبی (AMPs) به‌عنوان اجزای مهم سیستم ایمنی به شمار می‌روند. در پژوهش حاضر، پاسخ سیستم ایمنی هیومرال بید آرد، *Ephestia kuehniella* به چالش با دو بیمارگر مختلف حشرات، باکتری *Bacillus thuringiensis* و قارچ *Beauveria bassiana* مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا سوسپانسیون بیمارگرها به لاروهای سن پنجم بید آرد تزریق شده و سپس فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز و القای احتمالی پپتیدهای ضد میکروبی فنل‌اکسیداز در همولف لاروهای بیمار شده با بیمارگرها در مقایسه با شاهد مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، فعالیت ضد میکروبی همولف لاروهای بیمار شده در برابر باکتری Bt بررسی شد. نتایج نمایانگر کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولف لاروهای بیمار نسبت به شاهد بود. هیچ باند متفاوتی در پروفایل پروتئینی همولف لاروهای بیمار شده نسبت به شاهد، مشاهده نشد. همولف استحصالی از لاروهای بیمار، فعالیت ضد میکروبی در برابر سویه Bt مورد استفاده نداشتند. طبق یافته‌های این پژوهش، سیستم ایمنی غیرسلولی بید آرد در مقابل دیواره‌های سلولی بیمارگرهای مورد استفاده، پاسخ معنی‌داری ارائه نمی‌کند و استفاده از این حشره به‌عنوان مدل مطالعات سیستم ایمنی در برابر این دو جدایه بیمارگر، نیازمند مطالعات بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: پپتید ضد میکروبی حشرات؛ سرکوب سیستم ایمنی؛ آنزیم فنل‌اکسیداز؛ سیستم ایمنی هیومرال.

Non-Cellular Response of Flour Moth, *Ephestia kuehniella* Challenged with *Bacillus thuringiensis* and *Beauveria bassiana*

Shiva Haraji¹, Reza Talei-Hassanlou^{2*}, Ayda Khorramnejad³ and Vahid Hosseini naveh²

1. M.Sc. graduated, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Ph.D. graduated, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: May 31, 2020 - Accepted: October 22, 2020)

ABSTRACT

The innate immune system of insects comprises both cellular and humoral mechanisms. The phenoloxidase activity and the production of antimicrobial peptides/proteins (AMPs) are the most important parts of insect immune system. In this study, we investigated the humoral response of flour moth, *Ephestia kuehniella* challenged with two different entomopathogens, *Bacillus thuringiensis* (Bt) and *Beauveria bassiana*. The suspension of Bt and/or *B. bassiana* was injected to the fifth instar larvae of *E. kuehniella*. Afterwards, the phenoloxidase activity and the possible induction of AMPs in the haemolymph of treated larvae was assessed. Moreover, the antimicrobial activity of the collected haemolymph was examined against a Bt strain. As a result, the phenoloxidase activity of treated larvae was significantly reduced in comparison to non-treated larvae. Also, no band has been detected corresponding to insect AMPs in the haemolymph of immune-challenged larvae with both bacterial and fungal pathogens. Furthermore, the haemolymph did not show any antimicrobial activity *in vitro* against the tested Bt strain. Based on our findings, it can be concluded that the non-cellular immune system of flour moth did not respond to the cell walls of applied entomopathogens, thus further investigations are needed to determine the possible application of *E. kuehniella* as a model in the insect immune system studies against these two entomopathogens.

Key words: insect antimicrobial AMPs; immune system suppression; phenoloxidase enzyme; humoral immune system.

* Corresponding author E-mail: .rtalaei@ut.ac.ir

مقدمه

حشرات برخلاف مهره‌داران، فاقد سیستم ایمنی اکتسابی می‌باشند. مکانیسم‌های سیستم ایمنی بدن این موجودات بر اساس پاسخ‌های سیستم ایمنی ذاتی بنا شده و شامل ایمنی سلولی و ایمنی غیرسلولی (هیومرال) است. سلول‌های خونی به‌خصوص هموسیت‌ها با فاگوسیتوز، کپسوله‌کردن و تشکیل گره، نقش مؤثری در ایمنی سلولی ایفا می‌کنند (Lavine et al. 2002). فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز و القای پپتیدهای ضد میکروبی (AMP)، از بخش‌های مهم سیستم ایمنی غیرسلولی بوده و از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند. در راسته‌ی بال‌پولکداران پس از شناسایی الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگر (PAMP)، برای مثال پپتیدوگلیکان، لیپوپلی‌ساکارید و بتا ۱-۳-گلوکان، سیستم ایمنی ذاتی شروع به ایجاد پاسخ می‌نماید. گیرنده‌های شناسایی الگو (PRR)، PAMP‌ها را شناسایی می‌کنند و آنزیم غیرفعال پروفنل‌اکسیداز از انوسیتوئیدها به داخل همولنف آزاد می‌گردد. در ادامه زنجیره‌ی فعال-سازی آنزیم فنل‌اکسیداز به‌عنوان اولین واکنش‌های سیستم ایمنی آغاز می‌گردد (Cerenius et al. 2008, Kopáček et al. 1995, Lu and Jiang 2007, Zhao et al. 2007). سیگنال‌های خاصی از ارتباط بین گیرنده‌های PRR و PAMP‌ها ایجاد شده و با انتقال سیگنال از چند مسیر، در نهایت مولکول‌هایی برای مبارزه با بیمارگرها القا می‌شوند (Tzou et al. 2002). پپتیدهای ضد میکروبی به‌صورت عمومی و یا اختصاصی در برابر تعداد وسیعی از بیمارگرها، باکتری‌های گرم مثبت یا باکتری‌های گرم منفی، قارچ‌ها، انگل‌ها و حتی ویروس‌ها، فعال هستند (Cytryńska et al. 2007). تاکنون بیش از ۳۰۰۰ پپتید و پروتئین با خاصیت ضد میکروبی از همه‌ی گونه‌های زنده، از باکتری تا انسان، معرفی شده است که از این بین حدود ۳۰۵ پپتید از حشرات شناسایی شده است (پایگاه داده <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

در بیش‌تر مطالعات مربوط به شناسایی پپتیدها از راسته‌های متفاوت حشرات، گونه‌هایی چون پروانه‌ی موم‌خوار بزرگ، کرم ابریشم و مگس سرکه به دلیل پراکنش جهانی و اهمیت محیطی آن‌ها، مورد بررسی

قرار گرفته است (Adamski et al. 2019). در پژوهش حاضر به خاطر اهمیت خاص بید آرد، *Ephestia kuehniella* Zeller (Lep.: Pyralidae) پرورش و استفاده از آن به‌عنوان میزبان جانشین در تکثیر پارازیتوئیدها و شکارگرها، پاسخ سیستم ایمنی غیرسلولی لاروهای این حشره به دو بیمارگر مهم حشرات، باکتری *Bacillus thuringiensis* Bt و قارچ *Beauveria bassiana* مطالعه شد. با این هدف که پتانسیل این حشره به‌عنوان مدل برای انجام پژوهش‌های مرتبط با القا و تولید پپتیدهای ضد میکروبی تعیین گردد.

مواد و روش‌ها

بیمارگرهای مورد استفاده

در پژوهش حاضر از سویه‌ی AzLp باکتری *B. thuringiensis* و جدایه TV قارچ *B. bassiana* تهیه شده از کلکسیون بیمارگرهای حشرات موجود در آزمایشگاه کنترل بیولوژیک آفات گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، استفاده گردید. برای کشت باکتری Bt از محیط غذایی آگار (NA^۱) و برای قارچ *B. bassiana* از محیط کشت SDAY^۲ استفاده شد. بیمارگرهای باکتریایی و قارچی مورد استفاده به ترتیب در شرایط دمایی ۲۹±۱ و ۲۵±۱ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

پرورش حشرات

کلنی اولیه برای پرورش لاروهای بید آرد از آزمایشگاه کنترل بیولوژیک آفات گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تأمین شد. پرورش بید آرد روی یک کیلوگرم آرد سبوس‌دار و سه گرم مخمر انجام گرفت. ظرف‌های پرورش در شرایط دمایی ۲۷±۳ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰±۱۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پاسخ سیستم ایمنی در لاروهای سن پنجم بید آرد مورد بررسی قرار گرفت.

1. Nutrient Agar

2. Sabouraud's Dextrose Agar Yeast

میکرولیتتر) از بافر فسفات (شامل ۸ گرم NaCl، ۰/۲ گرم KCl، ۱/۴۴ گرم Na_2HPO_4 و ۰/۲۴ گرم KH_2PO_4 در ۱ لیتر آب، pH~۷/۴) به نمونه‌ها روی یخ اضافه شد. سپس نمونه‌ها با سرعت $12000 \times g$ ، در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و روشن‌شده (پلاسمای همولنف) به میکروتیوب جدیدی که از قبل روی یخ قرار گرفته بود، منتقل شد. برای حذف بقایای سلولی، نمونه‌ها دوباره سانتریفیوژ شدند و روشن‌شده میکروتیوب‌های جدید منتقل شده و برای تعیین فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند. برای سنجش فعالیت آنزیم فنل اکسیداز، ۱۰ میکرولیتتر از همولنف استخراج شده به همراه ۱۰ میکرولیتتر سوبسترای ال-دوپا (۱۰ میلی‌مولار) در ۸۰ میکرولیتتر بافر فسفات به هر چاهک میکروپلیت ۹۶ چاهکی ریخته شد. سپس میزان جذب در هر چاهک در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Thermo Scientific, Finland) (Thermo Multiskan GO) به مدت ۴۵ دقیقه، هر دقیقه یکبار خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم به صورت واحد فعالیت ویژه ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) محاسبه شد. در این آزمون غلظت پروتئین نمونه‌ها با استفاده از جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین شد.

بررسی پپتیدهای ضد میکروبی القایی

برای بررسی القای پپتیدهای ضد میکروبی در لاروهای تیمار شده پس از گذشت ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تزریق سوسپانسیون‌های مشخص باکتری و قارچ به میزان دو میکرولیتتر به هر لارو سن پنجم بید آرد، همولنف لاروهای تیمار و شاهد به روش هانگ و بوش جمع‌آوری شدند (Hung and Boucias 1992). عصاره‌ی همولنف لاروها بر اساس روش سیتیرینسکا و همکاران (Cytryńska et al. 2007) تهیه شد. ابتدا محلول استخراج متانولی/اسیدی (۹۰ میلی‌لیتر متانول، ۹ میلی‌لیتر آب و ۱ میلی‌لیتر اسید استیک) با همولنف لاروهای تیمار شده و شاهد به نسبت ۱:۹ مخلوط شد. سپس نمونه‌ها با سرعت $20000 \times g$ ، در ۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. روشن‌شده حاصل جمع‌آوری و پس از انتقال به میکروتیوب جدید در دستگاه Christ alpha 1-4LO در دمای ۶۰- درجه

تهیه سوسپانسیون و تزریق بیمارگر

سوسپانسیون باکتری از کشت ۱۸ ساعته باکتری Bt با اضافه کردن یک لوپ از باکتری رشد یافته روی محیط NA به داخل میکروتیوب حاوی یک میلی‌لیتر آب، تهیه شد. سوسپانسیون تهیه‌شده با استفاده از لام گلبول‌شمار تعیین غلظت شد. سوسپانسیون قارچ نیز با جمع‌آوری کنیدی‌های قارچی از محیط کشت‌های مایه‌زنی شده پس از گذشت ۱۴ روز از تلقیح، تهیه شد. کنیدی‌ها به لوله فالکون منتقل شده و حجم ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به همراه تعدادی مهره‌ی شیشه‌ای با قطر تقریبی ۳ میلی‌متر و ۱ میلی‌لیتر تویین 80، ۰/۰۲ درصد به آن‌ها اضافه گردید. پس از ۵ دقیقه ورتکس، سوسپانسیون از کاغذ صافی عبور داده شد و تعیین غلظت انجام گرفت. بر مبنای نتایج آزمون زنده‌مانی لاروها با غلظت‌های مختلف (داده‌های منتشر نشده)، سوسپانسیون با غلظت 10^7 سلول بر میلی‌لیتر از باکتری Bt و سوسپانسیون 10^6 کنیدی بر میلی‌لیتر از قارچ *B. bassiana* تهیه شد. بعد از تهیه سوسپانسیون‌ها، بیمارگرهای مورد مطالعه با اعمال تیمار حرارتی غیرفعال شدند. به این ترتیب که سلول‌های باکتری Bt به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس حرارت داده شد. سوسپانسیون کنیدی‌های قارچ *B. bassiana* به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شدند. پس از ثابت نگه‌داشتن لاروهای بید آرد روی یخ و انجام ضدعفونی سطحی با الکل ۷۰ درجه، دو میکرولیتتر از سوسپانسیون حرارت دیده از قسمت پهلویی به لاروهای سن پنجم بید آرد با استفاده از سرنگ انسولین تزریق شد.

بررسی فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

پس از گذشت ۲۴ ساعت، همولنف لاروهای تیمار و شاهد جمع‌آوری شد. به این منظور لاروها به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفته و با الکل ۷۰ درجه به صورت سطحی ضدعفونی شدند. استخراج همولنف به روش هانگ و بوش انجام شد (Hung and Boucias 1992). به‌طور خلاصه، با ایجاد خراش در پای آخر لاروهای بید آرد، همولنف خارج‌شده جمع‌آوری و به میکروتیوب‌هایی که از قبل روی یخ قرار داده شده بودند، منتقل گردید. حجمی برابر با حجم همولنف استحصالی (حدود ۲۰

bassiana به ترتیب با میانگین فعالیت ویژه ۱/۰۵۶ و ۰/۹۷۴ بعد از ۲۴ ساعت در مقابل ۱/۵۸۰ شاهد، نشان داد که کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در تیمارها نسبت به شاهد وجود دارد ($t=-5.3$, $df=3.6$) و $P=0.008$ برای *Bt* و $P=0.011$ و $t=-7.13$, $df=2.44$ برای قارچ).

شاید در حالت کلی، عدم شناسایی ساختارهای دو بیمارگر تزریق شده به‌عنوان غیرخودی توسط سیستم ایمنی حشره، یا عدم توانایی کافی سیستم ایمنی حشره در پاسخ به عامل بیماری از دلایل احتمالی عدم افزایش فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز باشد اما در آزمون حاضر، نه‌تنها میزان این فعالیت افزایش نیافته بلکه کاهش معنی‌داری نیز ثبت شده است. با توجه به توان ایستوری پپتیدوگلیکان (در مورد *Bt*) و بتا ۱، ۳- گلوکان (در مورد *Bb*)، احتمال دارد که تمرکز انرژی لاروها بر سیستم ایمنی سلولی باعث کاهش فعالیت فنل‌اکسیداز شده باشد. رحیمی و همکاران کاهش فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز لاروهای این حشره در مقابل پاپروپیروکسی فن و هگرافلومورن را ناشی از کاهش تعداد هموسیت‌ها گزارش نموده‌اند (Rahimi et al., 2013). هم‌چنین در پژوهش دیگری (Zibae et al. 2011) کاهش فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز پس از تزریق قارچ *B. bassiana* به حشره کامل سن گندم *E. integriceps* گزارش شده است.

القای پپتیدهای ضد میکروبی

پس از مقایسه‌ی پروفایل پروتئینی عصاره‌ی همولنف لاروهای تیمار شده با قارچ و یا باکتری با عصاره‌ی همولنف لاروهای شاهد در ژل SDS-PAGE و هم‌چنین NATIVE-PAGE، باند پروتئینی متفاوتی مشاهده نگردید (شکل ۱).

با توجه به این موضوع که عدم مشاهده‌ی باند متفاوت در پروفایل پروتئینی لاروهای تیمار شده با بیمارگرها، می‌تواند ناشی از غلظت کم پپتیدهای القایی باشد، فعالیت ضد میکروبی همولنف کل لاروهای تیمار علیه بیمارگرهای مورد استفاده نیز بررسی شد.

فعالیت ضد باکتریایی همولنف کل

استخراج شده از لاروهای بید آرد تیمار شده با قارچ و

سلسیوس و فشار ۰/۱ میلی بار در طی شب لیوفیلیزه شد. سپس، به هر میکروتیوب حجمی معادل رانشین، تری فلونورو استیک اسید (TFA) ۰/۱ درصد اضافه شد. محتوی لیپید نمونه‌ها با اضافه کردن حجم برابر با حجم اولیه‌ی همولنف از N-هگزان، ورتکس و سپس با شرایط قبلی بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله برخلاف مراحل قبل، رانشین حذف شده و پس از افزودن حجم برابر با حجم اولیه از اتیل استات به ته‌نشین، نمونه‌ها ورتکس و مطابق شرایط پیشین به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز آبی رانشین به‌دست‌آمده که حاوی پپتیدهای ضد میکروبی احتمالی می‌باشد، جمع‌آوری و لیوفیلیز گردید. پس از تعیین غلظت نمونه‌ها، با استفاده از روش شاگر (Schägger 2006) الگوی پروتئینی عصاره‌ی همولنف نمونه‌ها با SDS-PAGE ۱۶٪ مورد بررسی قرار گرفت. از ژل الکتروفورز ناواشرشت‌گر Native-PAGE ۱۵٪ برای استخراج پپتیدهای مورد نظر استفاده گردید.

تعیین فعالیت ضد میکروبی همولنف

فعالیت ضد میکروبی همولنف استخراج شده از لاروهای بید آرد تیمار شده، با روش آزمون هاله بازدارنده در برابر باکتری *Bt* انجام شد (Brown et al. 2008). برای این منظور، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 5×10^6 سلول در میلی‌لیتر در وسط محیط کشت ریخته و با میله‌ی شیشه‌ای به‌صورت یکنواخت روی محیط کشت پخش شد. سپس کاغذ صافی استریل شده حاوی ۱۲۰۰ میکروگرم از همولنف کل در محیط ظروف پتری قرار داده شد. پس از ۱۸ ساعت وجود یا عدم وجود هاله‌ی بازدارنده اطراف کاغذ صافی بررسی گردید. مقایسه‌های دوتایی بین تیمار و شاهد با استفاده از آزمون t-student و در محیط نرم‌افزار SYSTAT13 انجام شد.

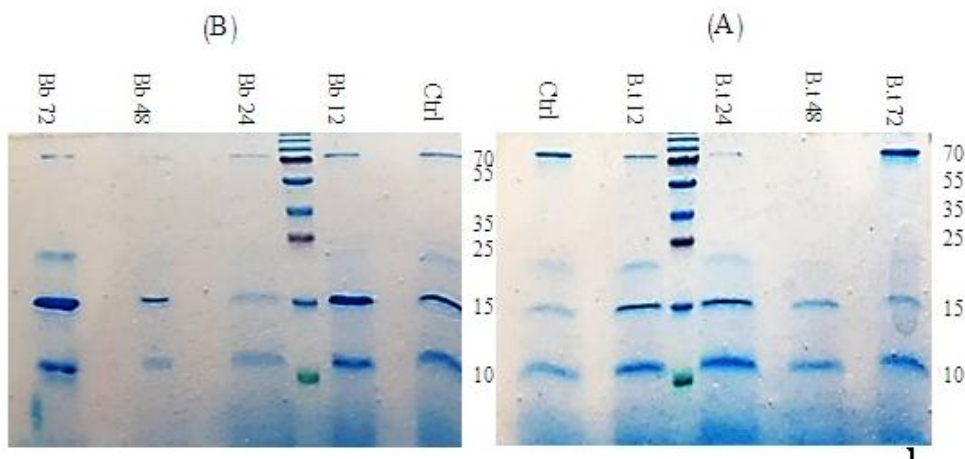
نتایج و بحث

فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز

میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در عصاره‌ی همولنف لارو بید آرد تیمار شده با باکتری *Bt* و یا قارچ *B.* میزان فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی همولنف کل

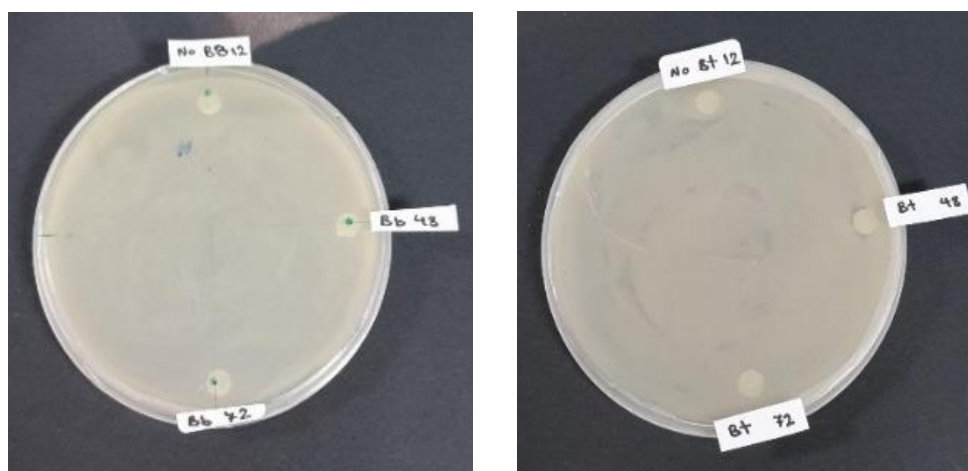
فعالیت ضد باکتریایی مشاهده نگردید (شکل ۲).

باکتری بر باکتری Bt به صورت *in vitro* با استفاده از آزمون هالی بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفت، اما



شکل ۱- پروفایل پروتئینی عصاره‌ی همولنف جمع‌آوری‌شده از لاروهای بید آرد تیمار شده با باکتری Bt (A) و قارچ *Beauveria bassiana* (B) در مقایسه با شاهد در بازه‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق با تجزیه ژل SDS-PAGE

Figure 1. Protein profile of haemolymph extract from challenged larvae with Bt (A) and *Beauveria bassiana* (B) in comparison to control 12, 24, 48, 72 hours after injection following SDS-PAGE analyse.



شکل ۲- نتایج آزمون بررسی فعالیت ضد باکتریایی همولنف کل لارو بید آرد تزریق‌شده با باکتری Bt (راست) و قارچ *Beauveria bassiana* (چپ) بر رشد *Bacillus thuringiensis*

Figure 2. Anti-bacterial assay of total haemolymph from Bt-challenged (right) and *Beauveria bassiana*-treated (left) larvae of flour moth on *Bacillus thuringiensis* growth.

که می‌تواند نتیجه تغییر ویژگی‌های بیمارگر و یا خود میزبان باشد. میزبان با کاهش بیان ژن‌های دخیل در شناسایی میکروبه‌ها، سیگنال‌دهی مسیرهای ایمنی و ترشح پپتیدهای ضد میکروبی موجب کاهش دیگر فاکتورهای مؤثر در سیستم ایمنی و در نتیجه کاهش

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، همولنف کل لاروهای تیمار شده فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری Bt مشاهده نشد. به نظر می‌رسد که ساختارهای بیمارگرهای مورد استفاده در این پژوهش، سیستم ایمنی غیرسلولی را القا نکرده و یا سرکوب کرده است

به همین دلیل در برخی از مطالعات برای تزریق به لارو از مخلوطی از سلول‌های زنده و مرده استفاده شده است (Taszlow et al., 2017).

به طور کلی پس از چالش لاروهای *E. kuehniella* با دیواره‌های سلولی بیمارگرهای مذکور، با کاهش میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولف لاروهای تیمار نسبت به شاهد، مشاهده نشدن باند متفاوت از شاهد در پروفایل پروتئینی همولف لاروهای تیمار شده و عدم مشاهده فعالیت ضد باکتریایی از همولف استخراج‌شده از لاروهای تیمار می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً ساختارهای سلولی مربوط به بیمارگرهای مورد استفاده توسط حشره شناسایی نشده‌اند یا سیستم ایمنی سلولی حشره با کارایی بالا احتمالاً فقط با به‌کارگیری سیستم ایمنی سلولی به ساختارهای عوامل بیماری پاسخ داده است. گرچه برای روشن شدن دقیق این موضوع، به پژوهش‌های بیشتری در زمینه مطالعات سیستم ایمنی و القای پپتیدهای ضد میکروبی علیه این دو بیمارگر مهم حشرات نیاز هست، به نظر می‌رسد بید آرد، مدل مناسبی برای اجرای پژوهش‌های مرتبط با القا و تولید پپتیدهای ضد میکروبی نباشد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از طرح پایان‌نامه نویسنده اول بوده و با حمایت مالی دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به شماره 73132800/6/27 انجام یافته است. بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی را اعلام می‌دارد.

توانایی سیستم ایمنی حشره در پاسخ به عوامل مهاجم می‌شود. پیش‌تر نشان داده شده که باکتری *Bt* توانایی سرکوب سیستم ایمنی حشرات از طریق غیرفعال کردن آنزیم فنل‌اکسیداز را دارد. باکتری *Bt* از طریق تغییر بیان ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی، سیستم ایمنی هیومرال شب‌پره‌ی پشت الماسی، *Plutella xylostella* را سرکوب می‌کند. باکتری *Bt* در لاروهای *P. xylostella* با کاهش بیان ژن مربوط به آنزیم سرین پروتئاز به‌عنوان آنزیم فعال‌کننده فنل‌اکسیداز و افزایش سرپین‌ها به‌عنوان مولکول مهارکننده آنزیم فنل‌اکسیداز، فعالیت این آنزیم را کاهش داده است (Lin et al., 2020, et al. 2018). زو و همکاران نشان داده‌اند که پس از ورود قارچ *Isaria fumosorosea* به شب‌پره پشت الماسی، میزان بیان PRRها و همچنین تمام AMPها کاهش یافته است که نشانگر سرکوب سیستم ایمنی توسط این بیمارگر و پتانسیل مناسب آن برای استفاده در کنترل آفت مذکور به شمار رفته است. این در حالی است که نتایج اغلب مطالعاتی که اثر قارچ‌های بیمارگر حشرات بر سیستم ایمنی را مورد بررسی قرار داده است، حاکی از افزایش AMPها بوده و این موضوع نشانگر عدم توانایی قارچ‌های بیمارگر حشرات در سرکوب سیستم ایمنی ذاتی به حساب می‌آید (Xu et al., 2017). در پژوهش حاضر با توجه به کاهش فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز و عدم مشاهده پپتیدهای ضد میکروبی از دیگر احتمالات موجود، عدم توانایی حشره در شناسایی ساختارهای بیمارگر است. این عدم شناسایی می‌تواند پیرو تغییر ساختار و کاهش تعداد PAMPها پس از گرمادهی به جدایه بیمارگر مورد استفاده باشد.

REFERENCES

- Adamski Z, Bufo SA, Chowański S, Falabella P, Lubawy J, Marciniak P, Pacholska-Bogalska J, Salvia R, Scrano L, Słocinska M, Spochacz M, Szymczak M, Urbanski A, Walkowiak-Nowicka K, Rosinski G (2019) Beetles as model organisms in physiological, biomedical and environmental studies - A review. *Frontiers in Physiology* 10: 319.
- Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon KH, East PD (2008) The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(2): 201-212.
- Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K (2008) The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology* 29(6): 263-71.
- Cytryńska M, Mak P, Zdybicka-Barabas A, Suder P, Jakubowicz T (2007) Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides* 28(3): 533-546.
- Hung SY, Boucias DG (1992) Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense Response of the Beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Invertebrate Pathology* 60(2): 152-8.

- Kopáček P, Weise C, Götz P** (1995) The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25(10):1081–91.
- Lavine MD, Strand MR** (2002) Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32(10): 1295-309.
- Li S, Xu X, Shakeel M, Xu J, Zheng Z, Zheng J, Yu X, Zhao Q, Jin F** (2018) *Bacillus thuringiensis* suppresses the humoral immune system to overcome defense mechanism of *Plutella xylostella*. *Frontiers in Physiology* 15(9): 1478.
- Lin J, Yu XQ, Wang Q, Tao X, Li J, Zhang S, Xia X, You M** (2020). Immune responses to *Bacillus thuringiensis* in the midgut of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Developmental & Comparative Immunology* 103661.
- Lu Z, Jiang H** (2007) Regulation of phenoloxidase activity by high- and lowmolecular-weight inhibitors from the larval hemolymph of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 478–485.
- Rahimi VA, Zibae AR, Mojahed SA, Maddahi KH, Zare DA** (2013) Effects of pyriproxyfen and hexaflumuron on cellular immunity of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Romanian Journal of Biology-Zoology* 58(2): 151-62.
- Schägger H** (2006) Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocol* 1(1):16-22.
- Taszlow P, Vertyporokh L, Wojda I** (2017) Humoral immune response of *Galleria mellonella* after repeated infection with *Bacillus thuringiensis*. *Journal of invertebrate pathology* 1(149): 87-96.
- Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B** (2002) How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host–pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 5(1): 102-10.
- Xu J, Xu X, Shakeel M, Li S, Wang S, Zhou X, Yu J, Xu Xi, Yu X, Jin F** (2017). The Entomopathogenic Fungi *Isaria fumosorosea* plays a vital role in suppressing the immune system of *Plutella xylostella*: RNA-Seq and DGE analysis of immunity-related genes. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Zhao P, Li J, Wang Y, Jiang H** (2007) Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated in vitro by *Manduca sexta* phenoloxidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 952–959.
- Zibae A, Bandani AR, Malagoli D** (2011) Purification and characterization of phenoloxidase from the hemocytes of *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 158(1): 117-123.