

پاسخ‌های ایمنی سن شکارگر *Andrallus spinidens* Fabricius (Hem.: *Beauveria bassiana* Boisdual به قارچ بیماریار *Pentatomidae*)

حسین فیروزیخت^۱، آرش زیبایی^{۱*}، محمد مهدی سوهانی^۲ و حسن هدی^۳

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت-ایران. ۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت-ایران. ۳- بخش کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی، آمل-ایران

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۳)

چکیده

در این پژوهش، تاثیر دو جدایه از قارچ بیماریار *Beauveria bassiana* Boisdual بر سامانه ایمنی افراد بالغ سن شکارگر *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae) چهار نوع سلول خونی در همولنف حشره بالغ شناسایی شد که شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و اوونوسیت‌ها بودند. همچنین تاثیر دو جدایه قارچ *B. bassiana* و لاتکس‌بید روی ایمنی سلولی و فعالیت فنل اکسیداز مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین تعداد سلول‌خونی شمارش شده به ترتیب ۴۸، ۴۸، ۱۲ و ۱۲ ساعت پس از آلودگی، در توئین (شاهد)، لاتکس‌بید، جدایه BB2 و جدایه AM-118 به دست آمد. بیشترین تعداد پلاسماتوسیت‌ها نیز در ۴۸، ۴۸، ۲۴ و ۳ ساعت پس از آلودگی در توئین (شاهد)، لاتکس‌بید، جدایه BB2 و جدایه AM-118 و بیشترین تعداد گرانولوسیت‌ها نیز به ترتیب در ۴۸، ۴۸، ۱۲ و ۱۲ ساعت پس از آلودگی مشاهده شد. بیشترین میزان گره نیز به ترتیب در ۴۸، ۴۸، ۱۲ و ۶ ساعت پس از آلودگی و در مورد فعالیت فنل اکسیداز هم بیشترین فعالیت ۶ ساعت پس از آلودگی در توئین، جدایه BB2 و جدایه AM-118 و ۳ ساعت پس از آلودگی برای لاتکس‌بید مشاهده شد. جهت تعیین ژن تولید کننده پیش فنل اکسیداز، RNA سلول‌های خونی استخراج شده و پس از سنتز cDNA، ژن مذکور با استفاده از یک جفت آغازگر رفت و برگشت دژنر تکثیر شد. نتیجه نشان‌دهنده محصولی با ۶۷۵ جفت باز بر مبنای خوانش برگشت بود که با پیش‌فنل اکسیداز سن *Anasa tristis* De Geer ۶۶ درصدی داشت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهند که پاسخ‌های ایمنی سن شکارگر به جدایه‌های مختلف قارچ *B. bassiana* متفاوت است، بنابراین در برنامه‌های مدیریت تلفیقی باید از جدایه‌هایی استفاده کرد که برای شکارگر بیماریارگری کمتری داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: *Beauveria bassiana*، *Andrallus spinidens*، ایمنی سلولی، فنل اکسیداز

مقدمه

واکنش ایمنی در حشرات می‌تواند به‌عنوان شاخص مهم حساسیت میزبان به آلودگی محسوب شود. سیستم ایمنی حشرات بعد از اینکه عوامل مهاجم را شناسایی کرد، با پاسخ‌های سلولی و هیومرال، به عوامل بیگانه واکنش نشان می‌دهد (Gillespie et al., 2000; Lavine and Strand, 2002; Stanly and Miller, 2006). سلول‌های خونی، ایمنی سلولی را از طریق بیگانه‌خواری، کپسوله کردن و ایجاد گره ایجاد می‌کنند اما در ایمنی هیومرال، پپتیدهای ضد میکروبی، آنزیم فنل اکسیداز و متابولیت‌های حدواسط اکسیژن و نیتروژن اهمیت دارند که منجر به مرگ عامل مهاجم در همولنف می‌شوند (Borges et al., 2008). فرآیند بیگانه‌خواری با واکنش گیرنده‌های سطح سلول‌های خونی با عامل مهاجم آغاز شده و تشکیل فاگوزوم می‌دهد. این فاگوزوم طی یک سری واکنش‌های تجزیه و ترکیب ابتدا به فاگولیزوزوم و سپس به اندوزوم و لیزوزوم تبدیل خواهد شد. در حشرات، پلاسموتوسیت‌ها به همراه گرانولوسیت‌ها مهم‌ترین نوع سلول‌های شرکت‌کننده در بیگانه‌خواری می‌باشند اما دیده شده که اوونوسیت‌ها هم ممکن است سلول‌های باکتری را نابود کنند (Borges et al., 2008). در کپسوله کردن، ذرات درشت مهاجم مانند تخم پارازیتوئیدها، توسط تعداد زیادی از سلول خونی مورد حمله قرار گرفته و احاطه می‌شود. این جریان شبیه آن است که باکتری‌ها و یا اسپورهای قارچ را در برمی‌گیرند و گره‌زایی نامیده می‌شود (Lavine and Strand, 2002). فنل اکسیداز از دیگر اجزای ایمنی حشرات است که نقش مهمی در روند انعقاد خون، ملانیزه شدن گره (یا کپسول) و بهبود زخم داشته و به طور عمده توسط انوسیتوئیدها سنتز می‌شود. در بندپایان آنزیم فنل-اکسیداز به عنوان زایموژن یا آنزیم غیرفعال سنتز شده و سپس پروفنل اکسیداز در حضور پروتئیناز سرین فعال می‌شود (Cerenius and Soderhall, 2008).

سن شکارگر (*Andrallus spinidens* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) عامل کنترل بیولوژیک است که از لاروهای پروانه‌های *Noctuidae* و *Pyalidae* تغذیه می‌کند (Najafi-Navaee et al., 1998)، اما پوره-های سن اول مانند سایر اعضای خانواده *Pentatomidae* رفتار شکارگری نداشته و از شیره جوانه‌های برنج و علف‌های هرز مزرعه تغذیه می‌کنند (Najafi-Navaee et al., 1998). سن *A. spinidens* انتشار وسیعی داشته و تاکنون از چین، تایوان، ژاپن، فیلیپین، اندونزی، هند، آذربایجان، ایران و بسیاری از نواحی گرم و مرطوب جهان گزارش شده است (Mohaghegh and Najafi, 2003). این حشره در مناطق شمال ایران از کرم ساقه‌خوار نواری برنج *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) و کرم سبز برگ‌خوار برنج *Naranga aenescens* Moore (Lepidoptera: Noctuidae) تغذیه کرده و زمستان را به صورت حشره کامل در لابه‌لای علف‌های هرز و سایر گیاهان میزبان سپری می‌کند (Najafi-Navaee et al., 1998).

قارچ‌های بیمارگر حشرات از موارد موثر کنترل بیولوژیک آفات گیاهی هستند که می‌توانند با ایجاد آلودگی-های اپیدمیک سبب کاهش جمعیت آفات شوند. در مورد کرم ساقه‌خوار نواری برنج مشخص شده است که غلظت‌های ۹۰، ۳۲ و ۴۵۰۰۰ اسپور بر لارو جدایه‌های BB1، BB2 و BB3 از *Beauveria bassiana* سبب ایجاد مرگ و میر در لاروها می‌شود (Ramzi and Zibae, 2014). در پژوهشی دیگر، مشخص شد که غلظت‌های ۱۰^۳ و ۱۰^۴ اسپور در میلی-لیتر جدایه‌های BB2 و AM-118 سبب ایجاد مرگ و میر در افراد بالغ *A. spinidens* سن می‌شود (Firouzbakht et al., 2015). در واقع جدایه AM-118 بیمارگری بیشتری نسبت به جدایه BB2 روی سن آندرالوس نشان داده است. بنابراین جدایه دوم گزینه بهتری برای مدیریت تلفیقی کرم ساقه‌خوار نواری برنج است. جهت درک بهتر این سازوکار و اثبات این کارایی چگونگی برهمکنش سامانه ایمنی سلولی با دو جدایه

سپس همولنف پخش شده و به مدت ۲۵ تا ۴۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سلول‌های خونی با محلول گیمسا به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند (رقیق شده با آب مقطر به-نسبت ۱ به ۹) و سپس بلافاصله توسط آب مقطر شسته شدند (Borges *et al.*, 2008). نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $\times 40$ مشاهده شدند.

اثر اسپور جدایه‌های قارچی بر تعداد کل و تفکیک شده سلول‌های خونی

جهت تعیین اثر اسپور جدایه‌های قارچی بر تعداد سلول‌های خونی، یک میکرولیتر از محلول توئین ۸۰ (۰/۰۱ درصد) حاوی غلظت 10^5 از اسپورهای قارچی جدایه‌های BB2 و AM-118، به حدفاصل اولین و دومین جفت پای حشره بالغ تزریق شد. در ضمن از محلول‌های توئین ۸۰ و لاتکس بید به-عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد (Franssens *et al.*, 2006). پس از گذشت ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تزریق موارد ذکر شده، همولنف از ۵ حشره بالغ در هر بازه زمانی برای هر تیمار با بریدن پای جلویی آن‌ها جمع‌آوری شد و در میکروتیوب‌های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بافر ضد انعقاد ریخته شد. محلول ضد انعقاد (اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید ۱۰ میلی‌مولار، گلوکز ۱۰۰ میلی‌مولار، سدیم کلرید ۶۲ میلی‌مولار و اسید سیتریک ۲۶ میلی‌مولار با اسیدیته ۴/۶) به‌نسبت ۸ به ۱ (ماده ضد انعقاد-همولنف) طبق روش آزامبوجا و همکاران (Azambuja *et al.*, 1991) با همولنف مخلوط شد. تعداد کل و تعداد پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها توسط لام نتوبار (Zahlkammer Company) شمارش شدند. برای هر تیمار در هر بازه زمانی، تعداد ۵ سن بالغ در ۵ تکرار مورد استفاده قرار گرفتند.

اثر اسپورهای قارچ بر تعداد گره

جهت انجام این مرحله از روش فرانسنس و همکاران (Franssens *et al.*, 2006) استفاده شد. همولنف ۵ حشره بالغ در هر بازه زمانی برای هر تیمار با بریدن پای آن‌ها جمع‌آوری شده و در میکروتیوب‌های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بافر

مذکور اهمیت زیادی دارد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش، تعیین انواع سلول‌های خونی به عنوان گام نخست ارزیابی سامانه ایمنی سلولی، تغییر تعداد سلول‌های خونی، تشکیل گره و فعالیت فنل اکسیداز پس از تزریق جدایه‌ها و تعیین ژن تولید کننده پیش‌فنل اکسیداز سن *A. spinidens* بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرورش حشرات

افراد بالغ سن *A. spinidens* در بازه زمانی اوایل شهریور تا اواسط مهرماه سال ۱۳۹۲ از زمین‌های برنج شهرستان آمل جمع‌آوری و روی سن پنجم لاروی کرم ساقه‌خوار نواری برنج در ظروف پلاستیکی به ابعاد 40×25 سانتی‌متر، در شرایط آزمایشگاهی با دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۸۰٪ و دوره‌ی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده شدند. دسته‌های تخم به دست آمده تا زمان تفریح در شرایط آزمایشگاهی مذکور نگهداری شدند. پوره‌های سن ۱ و ۲ روی نشاهای برنج تغذیه شده و از سن ۳ به بعد روی لاروهای کرم ساقه‌خوار نواری برنج پرورش داده شدند (Sorkhabi-abdolmaleki *et al.*, 2013).

کشت و پرورش قارچ‌های بیمارگر

جدایه‌های *B. bassiana* شامل BB2 و AM-118 (نگهداری شده در هرباریوم قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان) در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس روی محیط حاوی PDA کشت داده شدند. پس از ۱۴ روز کندی‌ها توسط اسکالپل استریل از محیط کشت جدا شده و به درون آب مقطر حاوی ۸۰ Tween (۰/۰۱٪) انتقال داده شدند. غلظت 10^8 به عنوان منبع اصلی تهیه اسپور در نظر گرفته شد.

تعیین انواع سلول‌های خونی توسط میکروسکوپ نوری

جهت تعیین نوع سلول‌های خونی، پای جلویی سن‌ها بریده شده و همولنف به‌طور مستقیم روی اسلاید گذاشته شد.

میانی، DNA است که به صورت یک حلقه سفید بوده و در نهایت فاز پایینی صورتی رنگ شامل سایر اجزای سلولی هم- چون پروتئین و چربی می‌باشد. حجم مساوی از الکل ایزوپروپانول به نمونه‌ها اضافه شده و پس از چند بار پیست کردن، به مدت ۱۵ دقیقه در $g\ 24000$ سانتریفیوژ انجام شد. در مرحله بعد، فاز رویی حذف و یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه شد. پس از ۱۰ ثانیه ورتکس آرام، نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت $g\ 8800$ سانتریفیوژ شدند. در نهایت، نمونه‌ها خشک و ۵۰ میکرولیتر آب DEPC (Diethylpyrocarbonate) به آن‌ها اضافه شد. کمیت RNA استخراج شده با اسپکتروفوتومتر تعیین شد.

ساخت رشته cDNA

جهت ساخت cDNA مواد لازم به طور جداگانه از شرکت فرمتاز خریداری و بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط این شرکت عمل شد. بنابراین یک میکرولیتر از پرایمر oligo dT به هر تیوب اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل ۴ میکرولیتر 5x reaction buffer، ۰/۵ میکرولیتر Ribolock Ribo RNase Inhibitor ($40\mu\text{M}$)، ۱ میکرولیتر dNTP Mix و ۰/۹ میکرولیتر RevertM-MuLV Reverse Transcriptase ($200\mu\text{M}$) بود. مقادیر ذکر شده به ازای هر ۲/۵ میکروگرم از RNA بوده و حجم هر تیوب با استفاده از آب عاری از نوکلئاز به ۲۱ میکرولیتر رسانده شد. تیوب‌ها در دستگاه PCR به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سلسیوس و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و در نهایت cDNA های ساخته شده به فریزر ۸۰- درجه منتقل شدند.

رقیق‌سازی cDNA های ساخته شده به نسبت ۴ میکرولیتر و ۱۶ میکرولیتر در آب مقطر استریل انجام گرفت. جهت اطمینان از صحت ساخت cDNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مرجع

ضدانعقاد ریخته شد. برای هر تیمار آزمایشی، تعداد ۵ سن بالغ در ۵ تکرار مورد استفاده قرار گرفتند.

اثر اسپورهای قارچ بر فعالیت فنل اکسیداز

اندازه‌گیری فعالیت فنل اکسیداز بر اساس روش لئونارد و همکاران (Leonard *et al.*, 1985) انجام شد. پس از تزریق جدایه‌ها، همولنف پس از گذشت ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت جمع‌آوری شده و در ۲۰۰ میکرولیتر ماده ضد انعقاد ریخته شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در $g\ 26000$ سانتریفیوژ شدند. مقدار ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی به عنوان نمونه مورد نظر به ۲۰ میکرولیتر محلول ۱۰ میلی‌مولار L-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) به عنوان سوستر و ۵۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (اسیدیته ۷) اضافه شد. نمونه به دست آمده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انکوبه شده و در طول موج ۴۹۲ نانومتر، در سه تکرار خوانده شد. یک واحد فعالیت فنل اکسیداز نشان‌دهنده مقدار آنزیم لازم برای افزایش جذب در ۴۹۲ نانومتر در هر دقیقه است.

تعیین ژن پیش‌فنل اکسیداز در سن بالغ *A. spinidens* استخراج RNA

جهت بررسی توالی ژن مورد نظر، تعداد ۱۰ عدد سن بالغ آندرالوس انتخاب شدند. سپس برای استخراج RNA، از بافر RNX plus طبق دستور کار کیت (Cat#RN7713C) ارائه شده توسط شرکت سیناکلون استفاده شد. بر اساس این روش همولنف ۱۰ عدد سن بالغ آندرالوس در ۱ میلی‌لیتر بافر RNXTM(plus) هموژنایز شده و قبل از انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، ۱۰ ثانیه ورتکس شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه شده و پس از ۵ ثانیه تکان دادن، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس روی یخ نگهداری شدند. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در $g\ 24000$ سه فاز قابل رویت است که فاز بالایی RNA می‌باشد و به آرامی از بقیه فازها جدا شده و به یک تیوب جدید منتقل می‌شود. فاز

آغازگرهای ژن پیش‌فنل اکسیداز بر اساس اطلاعات سایت NCBI و Biology Work Bench طراحی شدند. جهت طراحی ژن‌های پیش‌فنل اکسیداز سن‌های *Anasa tristis* و De Geer (Hemiptera: Coreidae) (JQ266747.1) و *Riptortus pedestris* F. (Hemiptera: Coreidae) (AK417606.1) توسط نرم‌افزار آنلاین ClastalW با هم جفت شده و آغازگر دژنره طراحی شد.

[Forward: CACGGGAAATCTCACCAGG/
Reverse: CAGACAAATCGCTCCACCAACTA]
18srRNA (Lu et al., 2013)، و پرایمرهای طراحی شده
ژن پیش‌فنل اکسیداز
[Forward: CAYCAYTGGCAYTGGCAYYT /Reverse:
CGRAANCKNGGNGGCCA و بر اساس برنامه تکثیر
جدول ۱ انجام شد. پس از انجام واکنش PCR، محصولات
با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند.

جدول ۱- برنامه تکثیر ژن پیش‌فنل اکسیداز در سن *Andrallus spinidens*

Table 1. Amplification program of proPhenoloxidase gene in *Andrallus spinidens*

Step	Temp	Time	Cycles
Initial denaturation	94	5 min	39 Times
Denaturation	94	30 s	
Annealing	42	30 s	
Extension	72	45 s	
Final extension	65	5 s	

بودند (شکل ۱e). در بررسی انجام شده دیگر روی سن *Rhodnius prolixus* L. (Hemiptera: Reduviidae) با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی، وجود پنج نوع سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، پلاسماتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، آدیپوهوموسیت‌ها و اونوسیتوئیدها گزارش شد (Borges et al., 2008). در سن معمولی گندم *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) وجود ۴ نوع سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، پلاسماتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها در همولنف این سن گزارش شد. طی این بررسی، پروهموسیت‌ها سلول‌هایی کوچک و کروی شکل، همراه با هسته بزرگ مرکزی و سیتوپلاسم ناحیه باریکی از اطراف هسته، پلاسماتوسیت‌ها سلول‌هایی دوکی شکل و تعداد کمی گرانول در سیتوپلاسم، گرانولوسیت‌ها سلول‌هایی بیضی شکل، همراه با هسته بزرگ و تعداد زیادی گرانول در سیتوپلاسم، و اونوسیتوئیدها سلول‌هایی کروی شکل، دارای

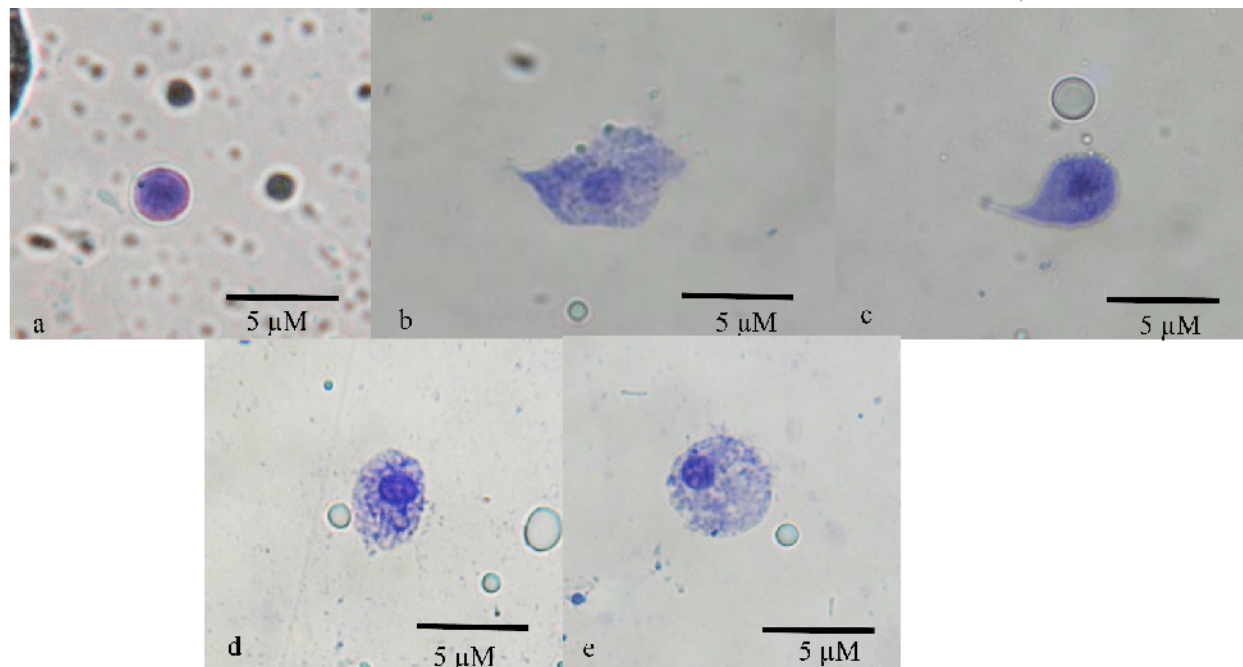
نتایج و بحث

شناسایی نوع سلول‌های خونی توسط میکروسکوپ نوری

چهار نوع سلول‌های خونی، در همولنف حشره بالغ سن *A. spinidens* توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ شناسایی شدند که شامل پروهموسیت‌ها، پلاسماتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها بودند. نکته قابل توجه این که دو شکل مرفولوژیک از پلاسماتوسیت‌ها مشاهده شد (شکل ۱ a-e). پروهموسیت‌ها سلول‌هایی گرد با هسته بزرگ و سیتوپلاسم باریک بودند (شکل ۱a). پلاسماتوسیت نوع اول (شکل ۱b) با شکل نامنظم، هسته مشخص و تعدادی گرانول در سیتوپلاسم اما پلاسماتوسیت نوع دوم (شکل ۱c) چشمی شکل با هسته مشخص و تراکم بیشتری از گرانول بودند. گرانولوسیت‌ها بیضوی با هسته مشخص و تعداد زیادی گرانول قابل مشاهده بودند (شکل ۱d). در نهایت، اونوسیتوئیدها، گرد با هسته مشخص و پیرامونی و تعدادی گرانول اطراف هسته

(2011).

یک هسته کوچک و غیر عادی همراه با تعداد بسیار کمی
گرانول داخل سیتوپلاسم توصیف شدند (Zibae et al.,)



شکل ۱- تعیین سلول‌های خونی *Andrallus spinidens* توسط میکروسکوپ نوری. (a) پروهموسیت، (b,c) پلاسماتوسیت، (d) گرانولوسیت، (e) انوسیتوئید

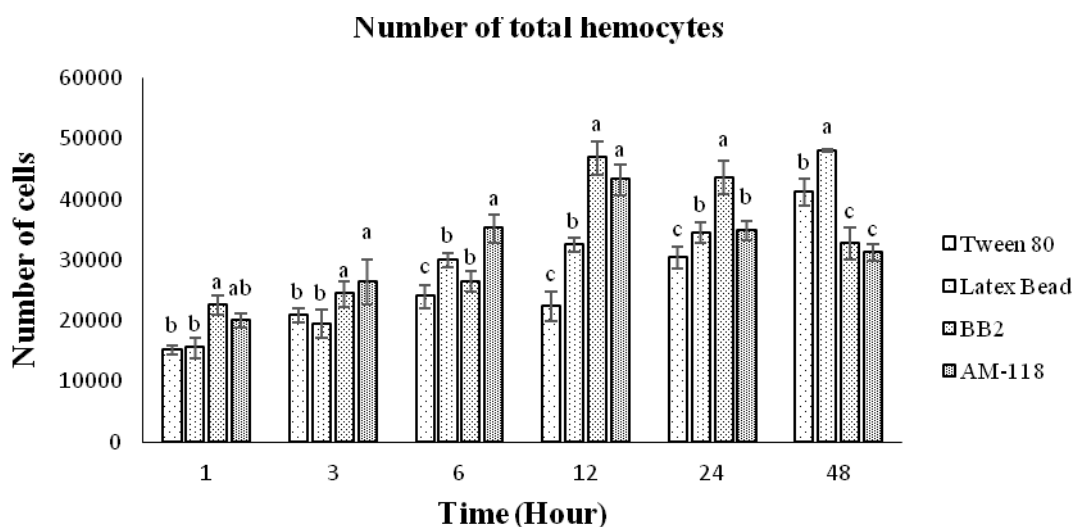
Figure 1. Determination of *Andrallus spinidens* hemocytes by light microscopy. a) Prohemocyte, b,c) Plasmatocytes, d) Granulocyte, e) Encyctoids

تعداد پلاسماتوسیت‌ها به ترتیب در ۴۸، ۴۸، ۲۴ و ۳ و در گرانولوسیت‌ها نیز به ترتیب در ۴۸، ۴۸، ۱۲ و ۱۲ ساعت پس از آلودگی در توئین (شاهد)، لاتکس بید، BB2 و AM-118 مشاهده شد (شکل ۳). افزایش تعداد کل سلول‌های خونی و ایمونوسیت‌ها (پلاسماتوسیت و گرانولوسیت) نیز در سن *R. E. integriceps* (Borges et al., 2008) *prolixus* *Gryllus assimilis* (Zibae et al., 2011)، سیرسیرک *Fabricius* (Orthoptera: Gryllidae)، سوسری آلمانی *Blatella germanica* L. (Blattodea: Blatellidae) (Hazarika and Gupta, 1987) سوسری آمریکایی، ملخ شاخک کوتاه *Melanoplus sanguinipes* Stal (Orthoptera: Acrididae) (Gillespie and) (Khachatourians, 1992)، پروانه‌های *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) و

تعداد کل سلول‌های خونی سن *A. spinidens* و دو گروه مهم از سلول‌های درگیر در ایمنی شامل گرانولوسیت‌ها و پلاسماتوسیت‌ها در بازه‌های زمانی متفاوت پس از تزریق تعیین شدند. نتایج، حاکی از اختلاف معنی‌داری بین فراوانی کل سلول‌ها و همچنین گرانولوسیت‌ها و پلاسماتوسیت‌ها در ساعت‌های بعد از تزریق بود. چنان‌که با افزایش گذشت زمان از ساعت‌های اولیه تزریق، تعداد کل سلول‌ها و فراوانی پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در هر میلی‌لیتر همولف افزایش یافت (شکل‌های ۲ و ۳). بیشترین تعداد سلول‌خونی شمارش شده به ترتیب ۴۸، ۴۸، ۱۲ و ۱۲ ساعت پس از آلودگی، در توئین (شاهد)، لاتکس بید، BB2 و AM-118 به دست آمدند (شکل ۲). در مورد اثر قارچ بر تعداد تفکیک شده بر تعداد پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها، افزایش

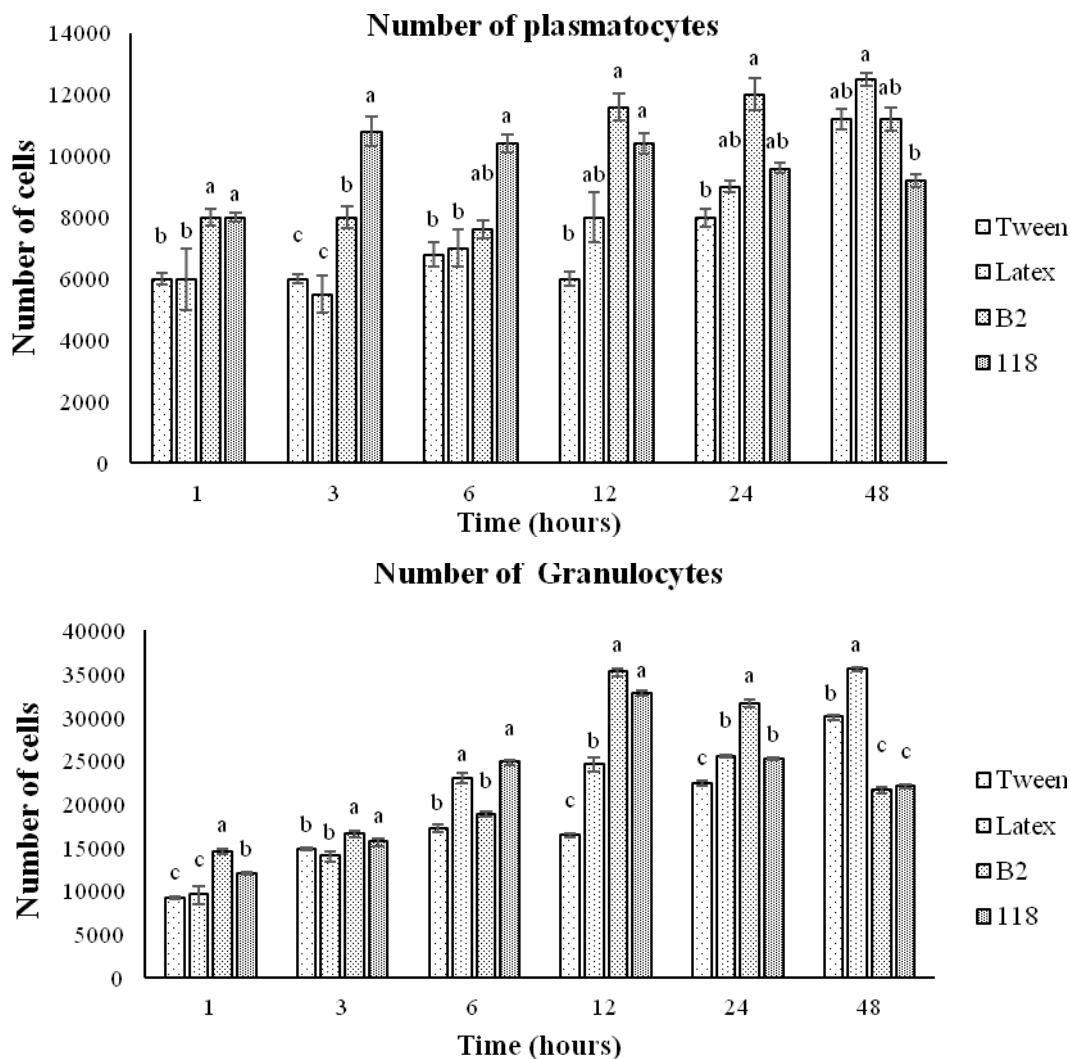
(*et al.*, 2011). علاوه بر این، افزایش تعداد ایمونوسیت‌ها به دلیل اهمیت آن‌ها در تولید مواد ضد قارچی، باکتریایی، ضد ویروسی و جذب تیروزین از همولنف و سنتز پیش‌فیل اکسیداز برای شرکت در ملانیزاسیون پس از تشکیل گره و کپسول اطراف عامل مهاجم است (Gupta, 1985).

Pseudoplusia includes Walker (Lepidoptera: Noctuidae) نیز گزارش شده است. این روند افزایشی در تعداد سلول‌های خونی به دلیل تمایز پروهموسیت‌ها به پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها است تا این سلول‌ها بتوانند در فرآیند بیگانه‌خواری عامل مهاجم نقش داشته باشند (Borges et al., 2008; Zibae).



شکل ۲- تاثیر قارچ‌های بیمارگر بر تعداد کل سلول‌های خونی *Andrallus spinidens* (تعداد سلول‌ها $\times 10^4$ بر میلی‌لیتر \pm خطای استاندارد). تفاوت آماری توسط حروف مختلف در هر تیمار نشان داده شده‌اند (آزمون توکی، احتمال کمتر از ۵ درصد)

Figure 2. Effects of entomopathogenic fungi on total hemocyte counts of *Andrallus spinidens* (Mean Numbers $\times 10^4$ /ml \pm SE). Statistical differences have been marked by different letters in each treatment (Tukey test, $p \leq 0.05$)



شکل ۳- تاثیر قارچ‌های بیمارگر بر تعداد پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌های *Andrellus spinidens* (تعداد سلول‌ها $\times 10^4$ بر میلی-لیتر \pm خطای استاندارد). تفاوت آماری توسط حروف مختلف در هر تیمار نشان داده شده‌اند (آزمون توکی، احتمال کمتر از ۵ درصد)

Figure 3. Effects of entomopathogenic fungi on plasmatocytes and granulocytes counts of *Andrellus spinidens* (Mean Numbers $\times 10^4$ /ml \pm SE). Statistical differences have been marked by different letters in each treatment (Tukey test, $p \leq 0.05$)

تشکیل ایجاد گره یا کپسوله کردن، ناشی از چسبیدن و احاطه کردن سلول‌های بیگانه توسط سلول‌های خودی است (Ling and Yu, 2006). بیشتر بودن تعداد گره‌های تشکیل شده در *A. spinidens* نسبت به شاهد نشان‌دهنده اهمیت این پاسخ در حذف اسپوره‌های قارچ از همولنف است به طوری که این تفاوت آماری تا ۴۸ ساعت پس از تزریق نیز پا برجا مانده است.

بیشترین میزان گره تشکیل شده در *A. spinidens* به- ترتیب در ۴۸، ۴۸، ۱۲ و ۶ ساعت پس از آلودگی، در توئین (شاهد)، لاتکس بید، BB2 و AM-118 به دست آمد (جدول ۲). از لحاظ آماری، در جدایه BB2 در تمامی ساعت‌های پس از تزریق تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده شد، اما در جدایه AM-118 نیز در تمامی ساعت‌ها به جز ۱ ساعت پس از تزریق تفاوت معنی‌داری نبود (جدول ۲). فرآیند

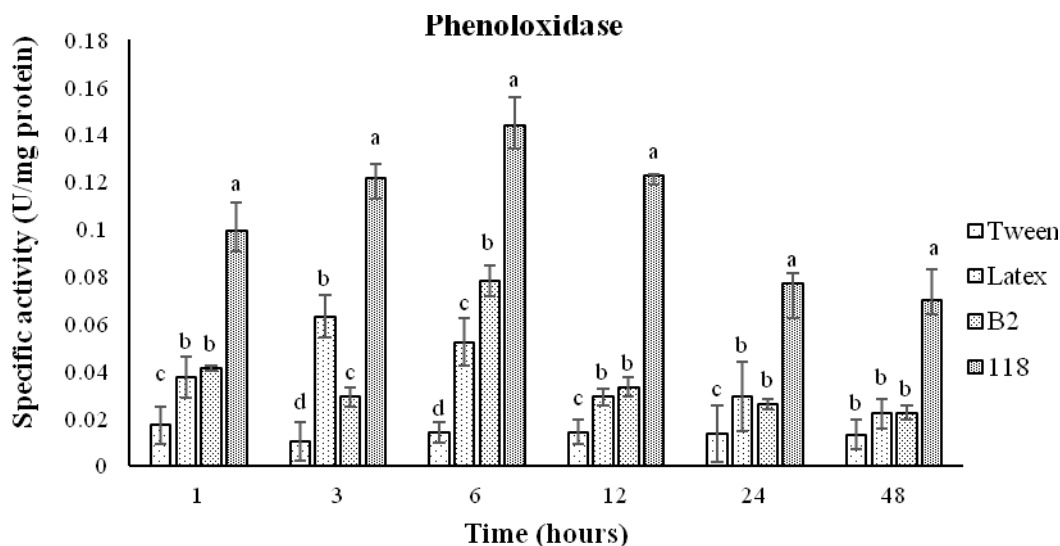
جدول ۲- تاثیر قارچ‌های بیمارگر بر تعداد گره‌های سن *Andrallus spinidens*.

Treatment	1	3	6	12	24	48
Tween 80	0	0c	4±0.35d	8±0.47d	12±1.2c	24±5.4d
Latex	0	80±8.36b	100±12.3c	100±2.6c	150±7.8bc	250±49.3c
Bead						
BB2	0	800±101.2 a	1200±26.8a	2800±85.2a	2000±101.2a	2000±125.6a
AM-118	0	0c	800±45.3b	800±32.6b	400±58.7b	400±92.2b

*. Statistical differences have been marked by different letters in each treatment (Tukey test, $p \leq 0.05$).

حشرات آلوده به قارچ‌ها یا سایر بیمارگران به طور سریع افزایش می‌یابد (Cerenius *et al.*, 2008). چنین وضعیتی در *M. sanguinipes* (Gillespie and) و *Spodoptera exigua* (Khachatourians, 1992) و *Hubner* (Lepidoptera: Noctuidae) (Hung and) و *Lymantria dispar* L. (Boucias, 1992) و *Ashida et al.*, 1997) (Lepidoptera: Lymantridae) و *E. integriceps* (Zibae *et al.*, 2011) نیز مشاهده شده است.

بیشترین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز ۶ ساعت پس از آلودگی در توئین، BB2 و AM-118 و ۳ ساعت پس از آلودگی برای لاتکس بید مشاهده شد (شکل ۴). در حشرات، فرآیند فعالیت فنل اکسیداز منجر به تشکیل ملانین می‌شود که در اطراف کپسول رسوب کرده و به دفع عامل بیگانه کمک می‌کند. فنل اکسیدازهای حشرات به صورت پیش آنزیم غیرفعال توسط سلول‌های خونی (به طور عمده انوسیتوئیدها) سنتز شده و پس از جراحت یا ورود عامل بیگانه با شکافت پروتئینی فعال می‌شوند (Cerenius *et al.*, 2008). میزان این آنزیم در همولف حشرات سالم بسیار پایین است، اما در

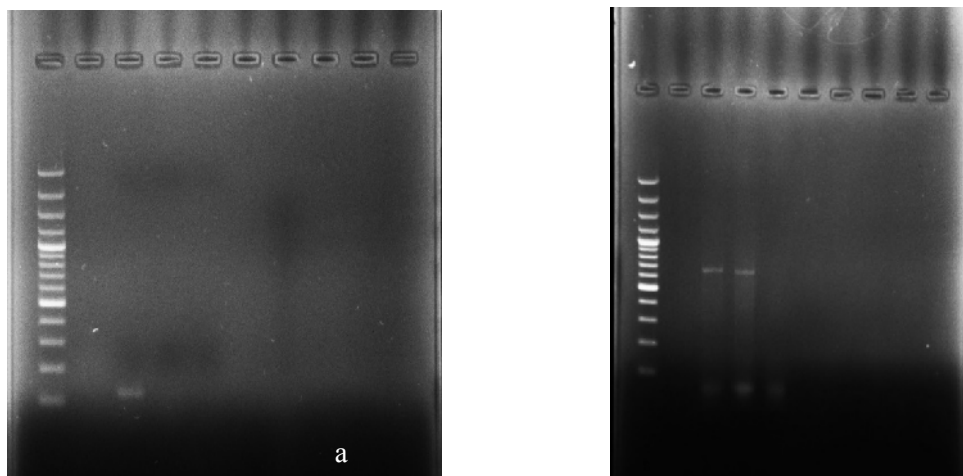


شکل ۴- تاثیر قارچ‌های بیمارگر بر فعالیت فنل اکسیداز *Andrallus spinidens*. تفاوت آماری توسط حروف مختلف در هر تیمار نشان داده شده‌اند (میانگین ± خطای استاندارد؛ آزمون توکی، احتمال کمتر از ۵ درصد)

Figure 4. Effects of entomopathogenic fungi on phenoloxidase activity in *Andrallus spinidens*. Statistical differences have been marked by different letters in each treatment (Mean±SETukey test, $p \leq 0.05$)

اساس توالی این ناحیه‌ی ژنی، ژن فنل اکسیداز توالی‌یابی شده شباهت بسیاری به ژن فنل اکسیداز سن *A. tristris* دارد (شکل ۶). اطلاعات کمی در مورد ژن پیش‌فنل اکسیداز افراد Hemiptera وجود دارد و فقط در سن‌های *A. tristris*، *Riptortus pedestris* Fabricius (Hemiptera: Coreidae) و دو زیر واحد در زنجبرک *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae) شناسایی شده است. تعیین این ژن در سن شکارگر *A. spinidens* ضمن افزایش اطلاعات در این زمینه می‌تواند در درک بهتر سازوکار ایمنی‌شناختی این حشره مفید باشد.

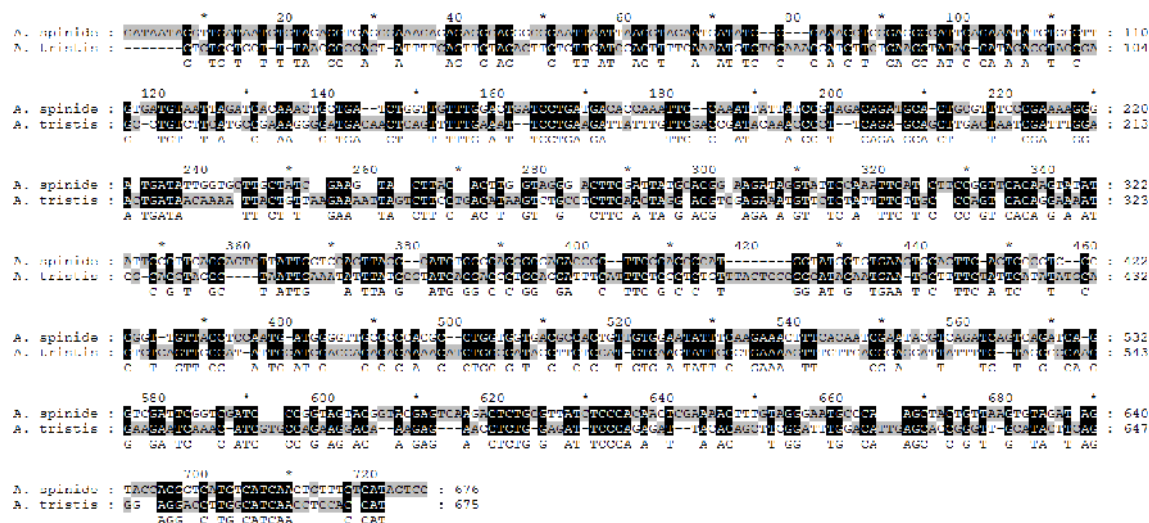
پس از استخراج RNA و ساخت cDNA از نمونه همولنف سن بالغ *A. spinidens*، ژن فنل اکسیداز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. جهت اطمینان از صحت طراحی آغازگرهای سفارش داده شده، cDNA های ساخته شده برای همولنف در تکثیر ژن فنل اکسیداز و ژن مرجع 18srRNA طی یک واکنش استفاده شد که میزان کیفیت تکثیر آن‌ها در شکل ۵ انجام بلاست در وب‌سایت NCBI هم نشانگر پارامتر آدنت ۶۶ درصدی با پیش فنل اکسیداز سن *Anasa tristris* De Geer (Coriade: Hemiptera) بود (شکل ۶). نتایج به دست آمده حاکی از صحت تکثیر ژن فنل اکسیداز و تعیین توالی نشانگر ژنی با ۶۷۶ جفت باز بود. بر



شکل ۵- محصول PCR تولید شده از mRNA سن بالغ *A. spinidens*. تعیین صحت ساخت cDNA از همولنف *Andrallus*

spinidens با استفاده از ژن رفرنس 18srRNA (a). و پیش فنل اکسیداز (b). نشانگر مولکولی از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز

Figure 5. Determination cDNA goodness from hemolymph of *Andrallus spinidens* by 18srRNA (a) and proPhenoloxidase (b). Ladder from 100 to 3000 bp



شکل ۶- توالی ژن پیش فنل اکسیداز در سن *Andrallus spinidens* و تطابق آن با پیش فنل اکسیداز *Anastis tristris* با استفاده از

نرم افزار Genedoc

Figure 6. Sequencing of pro Phenoloxidase gene in *Andrallus spinidens* and its alignment with proPhenoloxidase of *Anastis tristris* using Genedoc software

روشی امیدوار کننده در کاهش جمعیت آفات هستند اما تاثیر جنبی آن‌ها بر عوامل بیوکنترل نیز باید مورد توجه قرار گیرد. از آنجاکه تغییر در ایمنی سلولی را می‌توان به‌عنوان یک عامل قابل استناد جهت فهم بهتر تاثیر دو عامل زنده بر یکدیگر و همچنین به‌عنوان مهم‌ترین شاخص آلودگی حشرات به عوامل بیگانه به‌شمار آورد، بنابراین اطلاعات به‌دست آمده در این پژوهش می‌تواند توانایی مقابله این سن با قارچ بیمارگر *B. bassiana* را نشان دهند. این توانایی در افزایش تعداد سلول‌های خونی، تداوم ایمنی به قارچ از طریق گره و فعالیت فنل-اکسیداز مشهود بود.

سپاس‌گزاری

از مساعدت مرحوم مهندس مهدی سلیمی در کشت و پرورش قارچ‌های بیمارگر و همچنین معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به سبب حمایت مالی این پژوهش قدردانی می‌شود.

در عصر حاضر استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک به‌عنوان یک روش جدید، کم هزینه، کارآمد و کم‌خطر بیش از گذشته مورد توجه کارشناسان، محققین و مسئولین امر قرار گرفته است. امروزه در صنعت کشاورزی مدرن دنیا از روش‌هایی مطمئن از نظر صرفه اقتصادی و اثر سوء کمتر بر محیط زیست در سطوح مختلف زیر کشت محصولات زراعی، باغی و صیفی استفاده شود. برنج هم به‌عنوان یک محصول استراتژیک و یکی از مهم‌ترین منابع غذایی مورد نیاز بشر از این قاعده مستثنی نخواهد بود. با توجه به استفاده روزافزون از آفت‌کش‌های مختلف جهت دور ماندن این محصول از آفات و بیماری‌ها توسط کشاورزان، توجه به این موضوع ضروری است که استفاده بی‌رویه از این ترکیب‌ها و بی‌توجهی به تاثیر آن می‌تواند بر موجودات مفید و محیط زیست صدمات جبران‌ناپذیری وارد آورد. بنابراین، نیاز به یک روش ایمن که بتواند اثر سوء بر محیط زیست و عوامل غیرهدف را به حداقل برساند و ما را به هدف پیش‌رو برساند بیش از گذشته احساس خواهد شد. در این میان اگرچه بیمارگران حشرات نشانگر

References

- Ashida, M. and Brey, P. 1997. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In Brey, P. and Hultmark, D. (Eds.). *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman and Hall, London. UK, pp, 135-171.
- Azambuja, P., Garcia, E. S. and Ratcliffe, N. A. 1991. Aspects of classification of hemiptera hemocytes from six triatomine species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cru* 86: 1-10.
- Borges, A., Santos, P., Furtado, A. and Figueiredo, R. 2008. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Micron* 39: 486-494.
- Cerenius, L., Lee, B. L. and Söderhäll, K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Journal of Trends in Immunology* 29: 263-271.
- Firouzbakht, H., Zibae, A., Hoda, H. and Sohani, M. M. 2015. Virulence Determination of *Beauveria bassiana* Isolates on a Predatory Hemipteran, *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 50: 115-126.
- Franssens, V., Smagghe, G., Simonet, G., Claeys, I., Breugelmans, B., DeLoof, A. and Vanden Broeck, J. 2006. 20-Hydroxy ecdysone and juvenile hormone regulate the laminarin-induced nodulation reaction in larvae of the fleshfly, *Neobellieria bullata*. *Developmental and Comparative Immunology* 30: 735-740.
- Gardiner, E. M. M. and Strand M. R. 2000. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Archive of Insect Biochemistry and Physiology* 43: 147-164.
- Gillespie, J. P. and Khachatourians, G. G. 1992. Characterization of the *Melanoplus sanguinipes* haemolymph after infection with *Beauveria bassiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B* 103: 455-463.
- Gillespie, J. P., Burnett, C. and Charnley, A. K. 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Insect Physiology* 46: 429-437.
- Gupta, A. 1985. Cellular elements in the hemolymph. In Gilbert, L. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Academic press, NY, USA. pp 401-451.
- Hazarika, L. K. and Gupta A. P. 1987. Variation in hemocyte populations during various developmental Stages of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *Zoological Science* 4: 307-313.
- Hung, S. Y. and Boucias, D. G. 1992. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Invertebrate Pathology* 60: 152-158.
- Lavine, M. and Strand, M. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295-1309.
- Leonard, C., Kenneth, S. and Ratcliffe, N. A. 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberua craniifer* haemocytes. *Insect Biochemistry* 15: 803-810.
- Ling, E. and Yu, X. Q. 2005. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1356-1366.
- Lu, M., Du, X., Cao, S. S., Liu, P. and Li, J. 2013. Molecular cloning and characterization of the first caspase in the striped stem borer, *Chilo suppressalis*. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 10229-10241.
- Mohagheh, J. and Najafi, I. 2003. Predation capacity of *Andrallus spinidens* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) on *Naranga aenescens* Moore (Lep.: Noctuidae) under semi-field and field conditions. *Applied Entomology and Phytopathology* 71: 57-68.

- Najafi-Navaee, A., Saeb, H. and Osco, T.** 1998. Biology and ecology of *Andrallus spinidens* F. as the predator of rice, cotton and maize pests. Proceedings of 13th Iranian Plant Protection Congress. 22-26 August, Iran. pp. 49.
- Ramzi, S. and Zibae, A.** 2014. Biochemical properties of different entomopathogenic fungi and their virulence against *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology** 24: 597–610.
- Sorkhabi-Abdolmaleki, S., Zibae, A., Hoda, H., Hosseini, R. and Fazeli-Dinan, M.** 2013. Proteolytic compartmentalization and activity in the midgut of *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Entomological and Acarological Research** 45: 33-41.
- Stanley, D. W. and Miller, J. S.** 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. **Journal of Entomologia Experimentalis et Applicata** 119: 1-13.
- Zibae, A., Bandani, A. R., Talaei-Hassanlouei, R. and Malagoli, D.** 2011. Cellular immune reactions of *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. **Journal of Insect Science** 11: 138.

Plant Pest Research
2016- 6(3): 25-38

Immune responses of *Andrallus spinidens* Fabricius (Hem.: Pentatomidae) to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Boisduval

H. Firouzbakht¹, A. Zibae^{1*}, M. M. Sohani² and H. Hoda³

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht-Iran, 2. Assistant Professor, Department Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht-Iran, 3. Biological Control Department, National Institute of Plant Protection, Amol, Iran

(Received: February 23, 2016- Accepted: August 24, 2016)

Abstract

In this study, the effects of two isolates from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Boisduval were determined in immune system of the predatory hemipteran, *Andrallus spinidens* Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae). Four types of hemocytes were identified in the hemolymph of the adult bug including prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes and oenocytoids. Also, the effects of two entomopathogenic fungus isolates and latex bead were studied on the activity of phenoloxidase. The highest number of total hemocytes were found at time intervals of 12, 12, 48 and 48 hours post-injection by Tween80 (Control), latex bead, BB2 and AM-118, respectively. The highest number of plasmatocytes were determined 48, 48, 24 and 3 hours post-injection by Tween80 (Control), latex bead, BB2 and AM-118 but the number of granulocytes were observed after 48, 48, 12 and 12 hours, respectively. The highest number of nodules were observed 48, 48, 12 and 6 hours post-injection Tween80 (Control), latex bead, BB2 and AM-118, respectively. The highest activity of phenoloxidase were determined 6 hours post-injection by Tween80 (Control), BB2 and AM-118 and 3 hours post-injection by Tween80, respectively. To determine the gene of proPhenoloxidase, RNAs of the hemocytes were extracted and it was amplified by a pair of degenerate forward and reverse primers followed by cDNA synthesis. The results revealed a product with 675 bp based on reverse sequencing which had a 66% similarity with prophenoloxidase of *Anasa tristis* De Geer. Results of this study demonstrate that immune responses of the predacious hemipteran are different regarding various isolates of *B. bassiana* so the isolates should be used which have the lower virulence against the predator in integrated pest management programs.

Key words: *Andrallus spinidens*, *Beauveria bassiana*, Cellular immunity, Phenoloxidase

*Corresponding author: arash.zibae@guilan.ac.ir and arash.zibae@gmx.com