واکنش‌های دفاع سلولی لارو لیسه سیب در برابر تنش‌های گرسنگی، دمایی و باکتری بیماری‌زای *Bacillus thuringiensis*

مریم عجم حسنی* و مریم محمودزاده

ایران، شاهرود، دانشگاه صنعتی شاهرود

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

نقش سلول‌های خونی و سامانه فنل اکسیداز در دفاع سلولی حشرات ثابت شده است. تعداد سلول‌های خونی تحت تأثیر هر نوع تنش یا ورود عامل بیگانه به همولنف تغییر می‌کند. حشرات با سامانه ایمنی قوی می‌توانند گاه روند بیماری‌زایی یک عامل بیماری‌زا را تغییر داده و یا متوقف کنند. دراین تحقیق، اثر تنش‌های گرسنگی، تنش‌های دمایی و باکتری *Bacillus thuringiensis* بر دفاع سلولی لاروهای سن پنجم لیسه سیب بررسی شد. نتایج آزمایش دوره‌های گرسنگی نشان داد که در همولنف لاروهای گرسنه باگذشت زمان به مدت ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری در تعداد کل سلول‌های خونی، پروهموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها ایجاد شد. همچنین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز تحت تأثیر تنش گرسنگی ۲۴ ساعت بطور معنی‌داری کاهش یافت و بعد از ۴۸ ساعت گرسنگی روند افزایشی نشان داد. اثر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد سلول‌ها کاملاً معنی‌دار بود. بطوریکه تعداد کل و تفرقی سلول‌ها (به‌جز پروهموسیت‌ها) در دمای ۳۵ افزایش و در دمای ۴ درجه سلسیوس کاهش قابل‌توجهی نشان داد. فعالیت سامانه فنل اکسیداز بطور بارزی تحت تنش‌های گرما و سرما کاهش یافت. تغذیه از برگ‌های آلوده به باکتری *B. thuringiensis* سبب افزایش معنی‌دار تعداد همه سلول‌های خونی و فعالیت آنزیم فنل اکسیداز شد. این عوامل باگذشت زمان تا ۲۴ ساعت بطور معنی‌داری کاهش یافتند که نشانگر واکنش مثبت سلول‌های خونی در برابر عامل بیگانه بود. این نتایج می‌تواند به‌عنوان مقدمه‌ای برای شناخت ویژگی‌های دفاع فیزیولوژیک لیسه سیب استفاده شود و در برنامه‌های کنترل میکروبی مدنظر قرارگیرد.

واژه‌های کلیدی: لیسه سیب، واکنش سلول‌های خونی، تغذیه و دما، باکتری *Bacillus thuringiensis*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۵۰۲۲۲۷، پست الکترونیکی: shahroodm@gmail.com

مقدمه

لیسه سیب Zeller (Lepidoptera: Yponomeutidae) *Yponomeuta malinellus*، آفتی مونوفاژ، تک نسلی و برگ‌خوار درختان سیب می‌باشد که در سراسر مناطق معتدله پالئارکتیک پراکنده است (۳۴). لیسه سیب مخصوص مناطق سردسیر کوهستانی بوده (۹) و رایج‌ترین میزبان‌های آن گونه‌های سیب و گلابی گزارش شده است (۳۴و ۴۰). لاروهای آفت بسیار پرخوار بوده و بطور دسته‌جمعی از بافت‌های بین رگبرگ‌های، برگ‌های میزبان تغذیه می‌کنند. لاروها ضمن تغذیه اقدام به تنیدن تارهای ابریشمی کرده و بدین وسیله برگ‌ها و سرشاخه‌ها را به هم می‌چسبانند (۹). در تحقیقی پارازیتیسم لیسه سیب توسط چند زنبور از خانواده Braconidae و Ichneumonidae در ترکیه مورد مطالعه قرارگرفت. براساس نتایج، زنبور (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae) *Diadegma armillatum* بیشترین تأثیر را در انگلی کردن لاروهای لیسه سیب نشان داد (۳۶). در مطالعه‌ای که توسط اسلامی در سال ۱۳۷۹ جهت ارزیابی کاربرد سموم میکروبی بر پایه*Bacillus thuringiensis* به‌منظور مبارزه با

آفت لیسه درختان سیب انجام گرفت، نتایج آزمایش نشان داد که مرگ‌ومیر ناشی از سم‌پاشی در مورد تمام دوزهای مصرفی *B.t* صد در صد بوده است (۱). جواد زاده و همکاران نیز تأثیر فرآورده داخلی *B.t* در کنترل لیسه سیب را در سال ۱۳۹۱ موردبررسی قراردادند (۳). در مناطق باسابقه آلودگی بالا می‌توان با استفاده از ترکیبات فسفره متداول آفت را کنترل کرد. همچنین استفاده از ترکیبات ساخته شده براساس هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد حشرات (IGR) نیز از دیگر موارد کنترل آفت است (۹).

براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، عملکرد و شیمی بافت، پنج نوع سلول خونی در بالپولک‌داران شناسایی شده است که شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت-ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها می‌باشند (۴۸). جلالی و صالحی در سال ۲۰۰۸، بامطالعه‌ی سلول‌های خونی پروانه‌ی برگ‌خوار مرکبات *Papillio demoleus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) بوسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی، پنج نوع سلول خونی شناسایی کردند (۲۸). نتایج مشابهی برای دیگر لاروهای بالپولک‌داران مانند بید کلم *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) (۲۷)، شب‌پره خرنوب *Ectomoyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) (۴)، پروانه کرم ابریشم *Bombyx mori* (Linnaeus) (Lepidoptera: Bombycidae) (۴۹)، پروانه برگخوار سفید اشجار *Hyphantria cunea* (Drury) (۱۲) و لارو بید سیب‌زمینی *Phthorimaea operculella* (۴۲) گزارش شده است. دفاع سلولی با مشارکت انواع سلول‌های خونی و فعالیت آنزیم فنل اکسیداز همراه است که تابع عوامل مختلفی مانند تغییرات دما، نوع تغذیه، ورود انواع آلودگی-ها و ... می‌باشد (۴۷). درواقع پاسخ ایمنی حشرات شاخص مهم حساسیت آن‌ها به انواع آلودگی‌های ناشی از هجوم عوامل بیگانه مانند اسپور قارچ‌ها و باکتری‌ها، سموم، دیاپوز، پوست‌اندازی، تنش‌های گرسنگی، محیطی، تغییر رژیم غذایی و حتی جنسیت است (۵۲). این موضوع علاوه بر حشرات در مورد اکثر گروه‌های جانوران مانند ماهی‌ها نیز گزارش شده است (۵و ۱۰). نقش دما در زندگی حشرات به خوبی شناخته شده است (۱۹، ۴۴و ۴۶). دما ممکن است تأثیرات زیادی بر همولنف داشته باشد که شامل تأثیر بر مورفولوژی و فراوانی سلول‌های خونی و عملکرد آن‌ها می‌باشد (۴۳). همانطور که حرارت-های پایین و بالا یکی از منابع استرس برای حشرات هستند، ممکن است که تعداد هموسیت‌ها بطور مستقیم توسط تغییر در درجه حرارت تغییر کند. بعلاوه تغذیه به‌عنوان یک عامل حیاتی در دفاع سلولی و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا شناخته شده است (۳۱، ۴۱و ۵۰). مطالعات نشان داده است که محرومیت مواد غذایی بر پاسخ سلول‌های خونی حشره تأثیر می‌گذارد (۱۴، ۳۰، ۴۵و ۵۳). در مطالعه اثر محرومیت مواد غذایی روی حساسیت لارو *Galleria mellonella* (L.) به عفونت توسط بانویل و همکاران در سال ۲۰۱۲ نتایج نشان داد که محرومیت از مواد غذایی منجر به کاهش پاسخ سلولی و ایمنی و افزایش حساسیت به عفونت می‌شود و در تراکم هموسیت‌ها کاهش معنی‌داری رخ می‌دهد (۱۵). ووگل ویث و همکاران در سال ۲۰۱۶ فراوانی نسبی انواع سلول‌های خونی وابسته به رژیم غذایی را در شب‌پره حبه انگور *Eupoecilia ambiguella* (Lepidoptera:Tortricidae) (Hubner) بررسی کردند. مشاهدات آن‌ها نشان داد که غلظت کل سلول‌های خونی و غلظت هر نوع سلول در رژیم‌های غذایی مختلف متفاوت است (۵۱). گزارش‌های متعددی نیز مبنی بر واکنش‌های ایمنی حشرات مختلف در برابر ورود عوامل بیگانه مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها و یا ترکیبات سنتزی به همولنف وجود دارد. بعنوان مثال عجم حسنی (۱۳۹۳b)، واکنش‌های ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم *Spodoptera litura* را علیه دو جدایه از قارچ *Beauveria bassiana* و ذرات سنتزی لاتکس بید بررسی کرد (۷). عجم حسنی (۱۳۹۳a)، همچنین واکنش ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم پروانه *Utethesia pulchella*

L. (Lepidoptera: Arctiidae)، را در برابر دو جدایه از قارچ *B. bassiana* (Bals.-Criy) و یک جدایه از قارچ *Isaria farinosae* را بررسی کرد (۶). عجم حسنی و همکاران (۲۰۱۳)، پاسخ ایمنی پروانه برگخوار سفید آمریکایی *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) را در برابر چهار ایزوله از قارچ بیماری‌زای حشرات به نام *B. bassiana*، و یک ایزوله از *I. farinosae* (Holmsk.)، بررسی کردند (۱۲). پورعلی و عجم حسنی در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که قارچ بیمارگر *B. bassiana* در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از ورود به همولنف لارو سن چهار بید سیب‌زمینی سبب تغییر معنی‌دار سلول‌های مشارکت کننده در ایمنی می‌شوند (۲). در بررسی که توسط دانفی و همکاران در سال ۱۹۹۲ انجام گرفت، سلول‌های خونی پروانه ابریشم باف ناجور *Lymantria dispar* (L.) در برابر باکتری‌های *Xenorhabdus luminescens* و *X. nematophilus* بترتیب ۱/۵ و ۵ ساعت پس از تزریق حفره‌دار می‌شوند و باگذشت زمان، لیپو پلی ساکاریدهای دیواره‌ی سلولی باکتری بر ساختار سلول‌های خونی و اجسام چربی تأثیر گذاشته و موجب متلاشی شدن آن‌ها می‌شود (۲۰). بورگز و همکاران (۲۰۰۸)، به این نتیجه رسیدند که واکنش دفاع سلولی سن خون‌خوار *Rhodnius prolixus* در مقابل باکتری *Escherichia coli* با افزایش تعداد سلول‌های خونی و تغییرات مرفولوژیکی شدید این سلول‌ها همراه بود که درنهایت منجر به غالب شدن سیستم ایمنی حشره بر این باکتری شد (۱۸). اریکسون و همکاران (۲۰۰۹)، کاهش در تعداد سلول‌های خونی را پس از تیمار پروانه کلم *Trichoplusia ni* با غلظت‌های کم *B. thuringiensis* (Btk) و *E. coli* مورد مطالعه قراردادند. (۲۱).

لیسه سیب از آفات برگخوار مهم درختان سیب می‌باشد که بویژه در ارتفاعات، گاه خسارت بالای آفت منجر به از بین رفتن تمام سطح پارانشیم برگ شده و متعاقباً میوه‌ها دچار ریزش می‌شوند. تاکنون گزارش مستندی مبنی بر شناسایی جنبه‌های ایمنی‌شناسی لیسه سیب ارائه نشده است و حتی سایر ویژگی‌های فیزیولوژیک این آفت ناشناخته است، بنظر می‌رسد تحقیق حاضر با معرفی انواع سلول‌های خونی لارو سن پنج آفت و برهمکنش هموسیت‌ها با تنش‌های دمایی، گرسنگی و باکتری *B. t* بتواند گام مؤثری در راستای شناخت ویژگی‌های دفاع سلولی آن بردارد. قطعاً مطالعات فیزیولوژی این آفت کلیدی می‌تواند در اتخاذ روش‌های کنترل میکروبی آن بر پایه *B. t* مثمر ثمر باشد.

مواد و روشها

جمع‌آوری حشرات: دستجات لاروهای نئونات لیسه سیب از باغ‌های سیب شهرستان اسفراین در تاریخ ۱۳۹۷/۲/۲۰ جمع‌آوری شدند و تا زمان انجام آزمایشات مربوطه درون ظروف پرورش به ابعاد ۱۵×۱۵×۱۵ سانتیمتر درون اتاقک رشد با دمای ۱±۲۰ و رطوبت نسبی ۵۰٪ و دوره نوری ۱۴:۱۰ ساعت قرار داده شدند. برگ‌های سیب درون ظروف روزانه مورد بازبینی قرار گرفتند و زمانیکه برگ‌ها بطور کامل توسط لاروها خورده شده بودند، برگ‌های تازه جایگزین آن‌ها شد. لاروهای سن پنج لیسه سیب جهت آزمایشات ایمنی‌شناسی مورد استفاده قرار گرفتند. طول بدن لارو سن پنج آفت ۲۰ میلیمتر و عرض کپسول سر ۱/۲ میلیمتر است.

شناسایی سلول‌های خونی لیسه سیب: جهت شناسایی سلول‌های خونی، از ماده رنگ‌آمیزی گیمسا استفاده شد. سلول‌ها با کلیدهای موجود در منابع معتبر (۲۴) شناسایی شدند و جهت مشاهده و عکس‌برداری از سلول‌ها از بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری Olympus BH2 استفاده شد. ده عدد لارو سنین مختلف لیسه سیب بعنوان ده تکرار انتخاب شدند. لاروها در بشر محتوی آب مقطر در دمای ۵۵–۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند و پس از پنج ثانیه برداشته و روی کاغذ صافی قرار گرفتند . سپس بوسیله اسکالپل یک پای کاذب لارو برش داده شد و مقداری از همولنف لارو را روی یک لام گذاشته و با لام

دیگر یک اسمیر تهیه شد. پس از خشک شدن همولنف، مقداری ماده رنگ‌آمیزی گیمسا (محلول ۹:۱ گیمسا و آب مقطر) روی اسمیر قرار گرفت، پس از گذشت ۱۵ دقیقه، جهت شستن محلول رنگی لام در آب مقطر قرار گرفت و به آرامی خارج شد. سپس لام بمدت پنج ثانیه در کربنات لیتیم اشباع شده قرار داده شد (این امر بمنظور تثبیت رنگ سلول‌ها انجام گرفت). لام دوباره در آب مقطر شستشو داده شد و سلول‌ها با توجه به منابع معتبر شناسایی شدند.

بررسی تأثیر دماهای مختلف بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی لاروهای سن پنج لیسه سیب: برای این منظور ده عدد از لاروهای سن پنجم لیسه سیب مورد استفاده قرار گرفتند. تیمارها بمدت ۲۴ ساعت در دو دمای ۴ و ۳۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. (شرایط آزمایش برای دمای ۴ درجه سلسیوس، یخچال و رطوبت نسبی ۴۵ درصد و برای دمای ۳۵ درجه سلسیوس اتاقک رشد با رطوبت نسبی ۴۵ درصد در نظر گرفته شد) تیمار شاهد نیز شامل لاروهایی بود که در دمای ۱±۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۵ درصد در اتاقک رشد قرار داده شدند. تعداد کل هموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و اونوسیتوئیدهای لاروهای تیمار شده شمارش شدند. شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار و بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری انجام شد. به این منظور، همولنف لاروهای هر تیمار با استفاده از میکروپیپت جمع‌آوری و با بافر فیزیولوژیک رقیق شدند. ماده ضد انعقاد به کار رفته در آزمایش محلول تایسون بود (۳۳). نسبت همولنف به تایسون ۴:۱۰ میکرولیتر و شمارش سلول‌های خونی با محاسبه تعداد سلول‌های خونی موجود در پنج‌خانه از لام نئوبار (هرکدام به ابعاد یک میلیمتر مربع) انجام شد و با فرمول زیر محاسبه گردید (۲۹).

عمق خانه های لام نئوبار× میزان رقت× ۱ میلیمتر مربع ×تعداد سلولهای خونی

تعداد خانه های شمارش شده از لام

تجزیه داده‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت.

بررسی تأثیر دوره‌های گرسنگی بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی در لاروهای سن پنج لیسه سیب: بمنظور انجام این آزمایش لاروهای سن پنجم لیسه سیب به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض گرسنگی قرار گرفتند. (آزمایش در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۵ درصد انجام شد). تعداد کل هموسیت‌ها و تعداد پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و اونوسیتوئیدهای تکرارها شمارش شدند. تجزیه داده‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد. این آزمایش شامل سه تیمار شاهد، لاروهای گرسنه تحت تنش گرسنگی ظرف مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت و هر تیمار شامل ده تکرار بود.

سمیت حشره‌کش بیولوژیک *Bacillus thuringiensis* روی لارو سن پنجم لیسه سیب: ترکیب بیولوژیک استفاده شده در تحقیق حاضر، *Bacillus thuringiensis* زیرگونه Kurstaki به شکل پودر و ساخت شرکت سی بی سی (اینتراکوم بیو) کشور ایتالیا می‌باشد که از مرکز تحقیقات کشاورزی شاهرود تهیه شد. جهت انجام آزمایشات زیست‌سنجی، غلظتهای ۰/۵، ۱ و ۲ پی پی‌ام از ترکیب فوق که در آب مقطر تهیه می‌شد و به برگ‌های سیب تیمار شدند. برای هر غلظت، ۶۰ عدد دیسک برگ سیب به شعاع ۲ سانتیمتر و ۶۰ عدد لارو سن پنج در نظر گرفته شد. (تعداد تکرارها برای هر تیمار ۴ عدد و هر تکرار شامل ۱۵ عدد لارو بود). و با کمک میکروپیپت، ترکیب *B.t* به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در مرکز هر برگ قرار داده شد. روی هر برگ یک عدد لارو سن پنج لیسه سیب 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 سیب تیمار شده با ۲۰۰ میکرولیتر

آب مقطر قرار گرفتند. پتری‌ها به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۵ درصد و نسبت روشنایی به تاریکی ۱۴:۱۰ ساعت انتقال‌یافته و به لاروها اجازه داده شد که مدت‌زمان ۲۴ ساعت از برگ‌های آلوده تغذیه کنند. پس از ۲۴ ساعت، غلظتی از ترکیب که ۲۵ درصد تلفات لاروها را به دنبال داشت بعنوان غلظت LC_{25} (پی پی‌ام) در نظر گرفته شد و از آن در آزمایشات ایمنی‌شناسی استفاده شد.

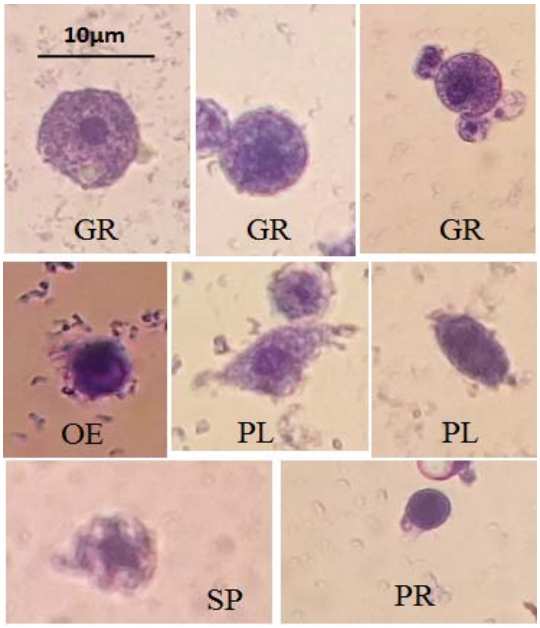
بررسی تأثیر باکتری *B. t* بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی لارو سن پنج لیسه سیب: به این منظور ابتدا غلظتی از باکتری که حدود ۲۵ درصد تلفات در لاروها ایجاد می‌کرد یعنی LC_{25} با آزمون زیست‌سنجی تعیین شد. این غلظت ۱ پی پی‌ام به دست آمد. سپس دیسک‌های برگی به شعاع ۲ سانتی‌متر تهیه شد و در ظروف پتری‌دیش بطور جداگانه یک عدد دیسک برگی آلوده شده به غلظت ۱ پی پی‌ام باکتری به همراه یک عدد لارو سن پنج قرار داده شد و مدت۱۲ 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 شاهد (لاروهایی که از برگ‌های سیب تیمار شده 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 و سپس خون‌گیری شدند و برای هر تیمار ۱۵ عدد لارو در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنل اکسیداز: برای تعیین اثر دوره‌های گرسنگی و دمایی روی فعالیت فنل اکسیداز لاروهای مورد آزمایش از روش هموسیت لایزیت استفاده شد (۳۲). در این روش همولنف لاروهای هر تیمار جداگانه جمع‌آوری شده و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رو نشین حذف‌شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) به رسوبات اضافه‌شده و سپس هموژنیزه شد. محلول اخیر دوباره در ۱۲۰۰۰ دور در 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 بمدت ۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شده و سپس توسط دستگاه الایزا ریدر در طول‌موج 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 درصد انجام شد.

نتایج

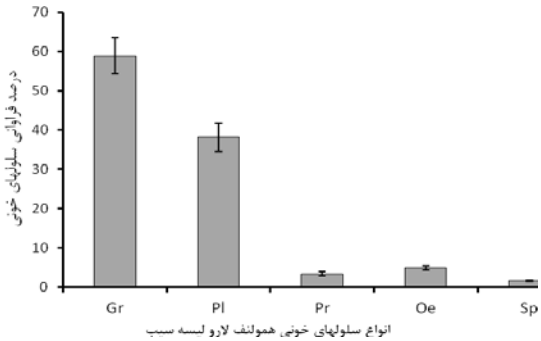
شناسایی سلول‌های خونی لارو سن پنج لیسه سیب: با استفاده از میکروسکوپ نوری، سلول‌های خونی لاروهای سن پنج لیسه سیب *Y. malinellus* شناسایی شدند. این سلول‌ها شامل گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها، پروهموسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها بودند. گرانولوسیت‌ها سلول‌هایی مدور یا بیضی شکل با هسته‌ی مشخص مرکزی یا کناری بوده و در سطح سیتوپلاسم آن‌ها گرانول‌های فراوانی دیده شد. اندازه گرانولوسیت‌ها متنوع و از کوچک تا سلول‌هایی بزرگ در خون حشره مشاهده شد. این سلول‌ها بیشترین فراوانی را در بین سلول‌های خونی به خود اختصاص دادند (شکل ۱ و ۲). پلاسموتوسیت‌ها، دوکی شکل با دو زائده سیتوپلاسمی کوچک در طرفین دیده شدند. این سلول‌ها بعد از گرانولوسیت‌ها بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (شکل ۱ و ۲). پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در مجموع بیشترین فراوانی هموسیت‌ها را تشکیل دادند. اونوسیتوئیدها سلول‌هایی کوچک، گرد یا تخم‌مرغی شکل با هسته جانبی مشخص مشاهده شدند که هسته مدور آن‌ها بطور کامل به کناره‌ی غشای سلول کشیده شده است. این سلول‌ها بزرگتر از پروهموسیت‌ها ولی کوچکتر از سایر سلول‌های خونی می‌باشند. فراوانی این سلول‌ها نسبت به

گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها کمتر بود (شکل ۱ و ۲). پروهموسیت‌ها کوچکترین سلول‌ها با هسته‌ی مرکزی و مدور مشاهده شدند. هسته پروهموسیت‌ها تقریباً تمام حجم سیتوپلاسم سلول را اشغال کرده است بطوریکه سیتوپلاسم به شکل لایه‌ای نازک به کناره‌ی غشای سلول کشیده شده است (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ از سلول‌های خونی رنگ‌آمیزی شده با گیمسا در لارو سن پنج *Yponomeuta malinellus*

GR= گرانولوسیت، PL= پلاسموتوسیت، OE= اونوسیتوئید، PR= پروهموسیت، SP= اسفرولوسیت



شکل ۲- میانگین درصد فراوانی سلول‌های خونی لارو سن پنج لیسه سیب *Yponomeuta malinellus*

فراوانی این سلول‌ها نسبتاً پایینتر از سلول‌های قبلی بود. اسفرولوسیت‌ها سلول‌هایی نسبتاً بزرگ با یک هسته‌ی فشرده مشاهده شدند که سطح سیتوپلاسم این سلول‌ها دارای اسفرول‌های متعددی بود و کم‌ترین میزان فراوانی سلول‌های خونی را به خود اختصاص دادند (شکل ۱ و ۲).

بررسی تأثیر دماهای مختلف روی تعداد سلول‌های خونی لاروهای سن پنج لیسه سیب: واکنش‌های دفاع سلولی لارو سن پنج لیسه سیب در برابر تنش‌های دمایی (۴ و ۳۵ درجه سلسیوس) معنی‌دار بود. نتایج حاصل از تأثیر دمایی مختلف روی هموسیت‌های لارو سن پنج لیسه سیب نشان می‌دهد که در لاروهایی که بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند؛ تعداد کل هموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها نسبت به شاهد (دمای ۱±۲۰ درجه سلسیوس) افزایش یافت اما تعداد پروهموسیت‌ها نسبت به شاهد کاهش یافت بطوریکه تغییرات معنی‌داری در تعداد کل هموسیت‌ها ($F=4.23$, $df_{t,e}=2, 12$; $P\leq 0.04$)، گرانولوسیت‌ها ($F= 3.77$, $df_{t,e}=2, 12$; $P\leq 0.05$)، پلاسموتوسیت‌ها ($F=7.65$, $df_{t,e}=2, 12$; $P\leq 0.007$) و اونوسیتوئیدها ($F= 3.49$, $df_{t,e}=2, 12$; $P\leq 0.05$) نسبت به شاهد ایجاد شد (جدول ۱). همچنین در اثر تنش سرما (دمای ۴ درجه سلسیوس)، تعداد کل هموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها نسبت به شاهد کاهش یافت. در این دما تغییرات معنی‌داری در تعداد کل هموسیت‌ها ($F=4.23$, $df_{t,e}=2, 12$; $P\leq 0.0408$)، گرانولوسیت‌ها ($F= 3.77$, $df_{t,e}=2, 12$; $P\leq 0.0538$)، پلاسموتوسیت‌ها ($F=7.65$, $df_{t,e}=2, 12$; $P\leq 0.0072$) و اونوسیتوئیدها ($F= 3.49$, $df_{t,e}=2, 12$; $P\leq 0.0539$) نسبت به شاهد مشاهده شد (جدول ۱).

بررسی تأثیر تنش‌های دمایی مختلف بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف لارو سن پنج لیسه سیب: نتایج این آزمایش نشان داد که افزایش و کاهش دما بطور معنی-

داری فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز را کاهش می‌دهد ($F=30.15, df_{t,e}=2, 6; P\leq0.0007$). فعالیت آنزیم فنل-اکسیداز در شاهد ۰/۲۳±۰/۰۰۳ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود که بطور قابل‌توجهی بالاتر از فعالیت آن در لاروهای تحت تنش دمای ۴ درجه سلسیوس (۰/۱۴±۰/۰۱۵) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین و دمای ۳۵ درجه سلسیوس (۰/۱۴±۰/۰۰۵) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود (جدول ۲).

جدول۱- بررسی تأثیر دماهای مختلف بر تعداد کل هموسیت‌ها و انواع سلول‌های خونی ۲۰ عدد از لاروهای سن پنج *Yponomeuta malinellus*

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)
25±1°C	41.8±1.37c	22±0.86c	16.6±0.85ab	1.8±0.24c	2±0.29b
4°C	27.6±1.42b	11.2±0.64b	11±0.47b	3.2±0.38b	2±0.29b
35°C	55.4±6.72a	23.6±3.85a	24.4±2.62a	2.2±0.38a	3.4±0.33a

حروف کوچک مشابه در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۱ ٪

جدول ۲- بررسی تأثیر تنش‌های دمایی مختلف بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در همولنف لارو سن پنج *Yponomeuta malinellus*

	Temperature (°C)		
	20±1°C	4°C	35°C
Phenoloxidase activity (µm/min/mg protein)	0.23±0.003 a	0.14±0.015 b	0.14±0.005 b

حروف کوچک مشابه نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۱ درصد

بررسی تأثیر دوره‌های گرسنگی روی تعداد کل و انواع سلول‌های خونی لارو سن پنج لیسه سیب: تأثیر دوره‌های گرسنگی بر تعداد گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها معنی‌دار بود. تعداد کل سلول‌های خونی ($F=34.56, df_{t,e}=2, 12; P\leq0.0001$) در لاروهای تحت تیمار ۲۴ ساعت گرسنگی تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت ولی بعد از ۴۸ ساعت گرسنگی تعداد کل سلول-های خونی با میانگین ۴۵/۲±۰/۵۷ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف بطور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت و به ۶۳/۶±۱/۷۵ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف رسید. تعداد پروهموسیت‌ها ($F=14.59, df_{t,e}=2, 12; P\leq0.0006$) نیز در لاروهایی که ۲۴ ساعت گرسنگی را تحمل کرده بودند اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان نداد و میزان آن با میانگین ۱/۴±۰/۱۶ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف کاهش یافت ولی بعد از ۴۸ ساعت گرسنگی بطور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت و به ۳/۸±۰/۲۴ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف رسید. بر اساس مشاهدات افزایش معنی‌داری در تعداد گرانولوسیت‌های لاروهایی که ۲۴ ساعت گرسنگی را تحمل کرده بودند، نسبت به شاهد وجود داشت ($F = 11.32, df_{t,e}=2, 12; P\leq 0.0001$). همچنین بعد از ۴۸ ساعت تعداد کل گرانولوسیت‌ها افزایش یافته و به میانگین ۳۰/۲±۰/۹۲ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف رسید. تعداد پلاسموتوسیت‌ها ($F=7.95, df_{t,e}=2, 12; P\leq0.0063$) تحت تنش گرسنگی ۲۴ ساعت با میانگین ۱۸/۴±۰/۱۶ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف افزایش یافت و بعد از ۴۸ ساعت گرسنگی روند افزایشی آن ادامه یافت تا به ۲۲/۸±۰/۹۲ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف رسید. تعداد اونوسیتوئید-ها ($F=56.16, df_{t,e}=2, 12; P\leq0.0001$) تحت تنش گرسنگی ۲۴ ساعت با میانگین ۱/۲±۰/۱۳ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف بطور معنی‌داری کاهش یافت سپس بعد از ۴۸ ساعت گرسنگی بشدت افزایش پیدا کرد و به ۶/۶±۰/۲۶ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف رسید

بطوریکه نسبت به شاهد تغییرات معنی‌داری را نشان داد (جدول ۳).

جدول ۳- بررسی تأثیر تنش‌های گرسنگی بر تعداد کل هموسیت‌ها و انواع سلول‌های خونی ۲۰ عدد از لاروهای سن پنج *Yponomeuta malinellus*

Starvation(h)	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)
Control	41.8±1.37b	22±0.86c	16.6±0.85b	1.8±0.24b	2±0.29c
24 h	45.2±0.57b	23.8±0.38b	18.4±0.16ab	1.4±0.16b	1.2±0.13b
48 h	63.6±1.75a	30.2±0.92a	22.8±0.92a	3.8±0.24a	6.6±0.26a

حروف کوچک مشابه در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۱ درصد

بررسی تأثیر تنش‌های گرسنگی بر فعالیت آنزیم فنل-اکسیداز در همولنف لارو سن پنج لیسه سیب: نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که افزایش مدت‌زمان گرسنگی پس از ۲۴ ساعت با میانگین (۰/۰۱۲±۰/۱۶) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز ($F=44.72, df_{t,e}=2, 6;$ $P\leq0.0002$) و بعد از ۴۸ ساعت با میانگین (۰/۰۰۸±۰/۱۶) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین موجب افزایش فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز می‌شود. میانگین فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در شاهد (۰/۰۰۳±۰/۲۳) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین تعیین شد (جدول ۴).

جدول ۴- بررسی تأثیر تنش‌های گرسنگی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در همولنف لارو سن پنج *Yponomeuta malinellus*

	Starvation (h)		
	Control	24 h	48 h
Phenoloxidase activity (µm/min/mg protein)	0.23±0.003 a	0.16±0.012 b	0.28±0.008 a

حروف کوچک مشابه نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۵- سمیت حشره‌کش بیولوژیک ***Bacillus thuringiensis*** بر لارو سن پنج لیسه سیب***Yponomeuta malinellus***

Pest	Numbers	Chi-squre	Slope±se	LC_{50} (90%FL)	LC_{90} (90%FL)
Yponomeuta malinellus	240	1.4	5.2±0.53	1.7-2.8 ppm	3.2-5.5ppm

بررسی تأثیر *B. t* روی تعداد کل و انواع سلول‌های خونی لارو سن پنج لیسه سیب: نتایج نشان داد که واکنش ایمنی لاروهایی که از برگ‌های آلوده به باکتری *B. t* تغذیه کردند معنی‌دار بوده است. بیشترین تغییرات معنی‌دار روی سلول‌های خونی بعد از ۱۲ ساعت تغذیه لاروها از برگ-های آلوده به باکتری رخ داده است بطوریکه پس از ۱۲ ساعت افزایش معنی‌داری در تعداد کل سلول‌های خونی ($F=18.72, dft,e=2, 12; P\leq0.0001$)، گرانولوسیت‌ها ($F=23.13, df_{t,e}=2, 12; P\leq0.0002$)، پلاسموتوسیت‌ها ($F=31.52, df_{t,e}=2, 12; P\leq0.03$) و پروهموسیت‌ها ($F=14.5, df_{t,e}=2, 12; P\leq0.0001$) نسبت به شاهد اتفاق افتاده است (جدول ۶).

بررسی تأثیر *B. t* بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف لارو سن پنج لیسه سیب: نتایج این آزمایش نشان داد که تغذیه از برگ‌های آلوده به باکتری *B. t* سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم فنل اکسیداز شد ($F=40.72,$ $df_{t,e}=2, 12; P\leq0.0001$). میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در لاروهایی که بمدت ۱۲ ساعت از برگ‌های آلوده به باکتری تغذیه کرده بودند با میانگین (۰/۰۰۶±۰/۲۷) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بطور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. (جدول ۷).

جدول ۶- بررسی تأثیر باکتری *Bacillus thuringiensis* بر تعداد کل هموسیت‌ها و انواع سلول‌های خونی ۲۰ عدد از لاروهای سن پنج *Yponomeuta malinellus*

B. t (1 ppm)	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)
Control	41.8±1.37b	23±0.86b	16.6±0.7c	1.7±0.21b	2.2±0.19c
12 h	48.2±0.67a	30.2±1.5a	24.7±0.5a	3.7±0.5a	4.2±0.23a
24 h	40.6±2.52b	24.7±0.45b	21.5±0.45b	3.1±0.1a	3.6±0.26b

حروف کوچک مشابه در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۷- بررسی تأثیر باکتری *B.t* بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در همولنف لارو سن پنج *Yponomeuta malinellus*

	B. t (1 ppm)		
	Control	12 h	24 h
Phenoloxidase activity (µm/min/mg protein)	0.24±0.002 b	0.27±0.006 a	0.26±0.003 a

حروف کوچک مشابه نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۱ درصد

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر وجود پنج نوع سلول خونی شامل گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها، پروهموسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها را در همولنف لاروهای لیسه سیب اثبات کرد که با مطالعاتی که توسط دیگر محققین در زمینه شناسایی سلول‌های خونی انجام شده شباهت نزدیکی دارد. برای مثال، در بررسی هموسیت‌های شب پره‌ی مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller پنج نوع سلول خونی شامل پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید و اسفرولوسیت و دو مورفوتایپ دیگر ورمیسیت و پودوسیت گزارش شد (۲۲). عجم‌حسنی در سال ۱۳۹۴ پنج نوع هموسیت در مراحل مختلف لاروی، شفیرگی و بالغ کرم شاخ‌دار فرفیون *Hyles euphorbiae* L. (Lepidoptera: Sphingidae) را شناسایی کرد (۸). با توجه به نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌های سلولی نشان داده شده است که هر یک از مورفوتیپ‌های سلول دارای اندازه‌های متنوعی هستند. در این تحقیق نیز اشکال متنوعی از برخی هموسیت‌ها بویژه گرانولوسیت‌ها مشاهده شد که اندازه آن‌ها متنوع و از کوچک تا سلول‌هایی درشت در خون حشره پراکنده بودند. تعداد هموسیت‌های در گردش خون همچنین می‌تواند به‌سرعت در پاسخ به تنش از قبیل زخم، عفونت، گرسنگی، تغذیه و یا تغییرات دمایی تغییر کند (۲۳و ۳۵). تغییر در تعداد سلول‌های خونی، سامانه ایمنی حشره را تحت تأثیر قرار می‌دهد و واکنش حشرات را در برابر انواع روش‌های کنترل، مانند کنترل میکروبیولوژیک یا شیمیایی تغییر می‌دهد (۱۲). مطالعاتی که در رابطه با اثر درجه حرارت بر تعداد هموسیت‌های حشرات مختلف، توسط محققین صورت گرفته، نشان‌دهنده نتایج متفاوتی است. در بررسی‌های انجام‌گرفته روی *Antheraea mylitta* (Drury) تغییراتی در تعداد تفرقی سلول‌های خونی تحت تنش‌های دمایی مشاهده شد. کاهش در تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در طی تنش‌های دمایی در مقایسه با دمای معمولی مشاهده شد، اما دمای بالا و پایین روند مشابهی را نشان نداد. همچنین کاهش قابل‌توجهی در تعداد کل سلول‌های خونی در دمای پایین مشاهده شد، اما در دمای بالا افزایش قابل‌توجهی دیده نشد (۳۹). در یک مطالعه‌ی دیگر روی لارو *Danaus chrysippus* L.، نشان داده شد که تنش سرما سبب کاهش تعداد سلول‌های خونی می‌شود بااین‌وجود، تنش گرمایی افزایش سلول‌های خونی را بدنبال داشت (۳۸). طبق مشاهدات قاسمی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در رابطه با واکنش‌های ایمنی *E. kuehniella* در برابر تنش‌های دمایی،

شکل سلول‌های خونی و تعداد آن‌ها دچار تغییرات شدیدی شد. نتایج آن‌ها نشان داد که درجه حرارت بالا (۴۰ درجه سلسیوس) سبب افزایش قابل‌توجهی در تعداد کل سلول‌های خونی بویژه اونوسیتوئیدها و پلاسموتوسیت‌ها و درجه حرارت پایین (۴ درجه سلسیوس) منجر به کاهش قابل‌توجهی در تعداد کل سلول‌های خونی شد. دیواره سلولی پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها بعنوان مهم‌ترین سلول‌های خونی شرکت‌کننده در ایمنی سلولی، در برابر دمای حدود ۴۰ درجه سلسیوس پاره شدند و محتویات سلولی آن‌ها به داخل همولنف پخش شد. (۲۲). پندی و همکاران در سال ۲۰۰۸ شمارش کل و تفرقی سلول‌های خونی را در لارو-های سن پنجم *D. chrysippus* تحت تنش دمایی مورد بررسی قراردادند و به این نتیجه رسیدند که سرما موجب کاهش تعداد سلول‌های خونی و گرما افزایش تعداد سلول-های خونی را بدنبال دارد. میانگین تعداد پروهموسیت‌ها پس از گرم شدن و سرد شدن بترتیب افزایش و سپس کاهش می‌یابد، درصد پلاسموتوسیت‌ها در تمام مراحل آزمایش کاهش یافت. علاوه بر این تنش‌های دمایی سرما و گرما بر ساختار هموسیت‌ها تأثیر گذاشته و موجب شکسته شدن غشای پلاسما و تکه‌تکه شدن هسته و اندام‌های سلولی می‌شود (۳۷). در بررسی تأثیر تنش‌های دمایی بر سامانه ایمنی بید سیب‌زمینی (Lepidoptera: Gelechiidae) *P. operculella* مشاهده شد که تعداد کل هموسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌هایی که بمدت ۲۴ ساعت تحت تنش دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، نسبت به شاهد (دمای ۲۰±۱ درجه سانتی‌گراد) بطور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین در اثر تنش سرما (دمای ۴ درجه سلسیوس) تعداد کل هموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (۲). در تحقیق حاضر نیز نتایج آزمایش‌های مربوط به بررسی دفاع سلولی لیسه سیب در برابر تنش‌های دمایی و گرسنگی نشان داد که این تنش‌ها بر سامانه ایمنی این حشره بطور معنی‌داری تأثیرگذار هستند. نتایج حاصل از آزمایشات مربوطه نشان داد که تنش گرما سبب افزایش قابل‌توجهی در تعداد کل هموسیت‌ها (THC) و در مقابل تنش سرما کاهش قابل‌توجهی در THC را نشان داد. بنابراین بنظر می‌رسد که در معرض قرار دادن حشره در دمای بالا، می‌تواند سازگاری محیطی لارو را از طریق یک مکانیسم مشابه و رفتار تنظیم حرارت یعنی افزایش تعداد کل هموسیت‌ها و بخصوص افزایش پلاسموتوسیت‌ها بالا ببرد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تغذیه یا عدم تغذیه بر واکنش‌های دفاع سلولی لیسه سیب مؤثر است چراکه انرژی تولید شده با تغذیه برای حفظ پایداری بدن و فعالیت‌های ایمنی ضروری است (۱۵). مطالعات ایمنی‌شناسی لاروهای گرسنه زنبورعسل *Apis mellifera* نشان داد که در لاروهای گرسنه مانده بمدت هفت روز غلظت پپتیدهای ضدمیکروبی مانند آریل فورین کاهش یافت (۱۳). در تحقیقی دیگر لاروهای شب‌پره موم‌خوار گرسنه از میزان کمتری پپتیدهای ضدمیکروبی مانند لیپوکالین و پروتئین-های ایمنی مانند آپولیپوفورین و آریل فورین نسبت به لاروهای شاهد بهره‌مند بودند (۱۵). اثر محرومیت‌های غذایی بر عملکرد ایمنی *Tenebrio molitor* L. مورد مطالعه قرارگرفته است و مشخص شده است غلظت آنزیم فنل‌اکسیداز در حشراتی که گرسنه مانده‌اند بطور معنی‌داری کمتر از حشرات تغذیه کرده است (۴۵). آدامو و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی اثر محرومیت‌های غذایی بر سیستم ایمنی کرم شاخدار تنباکو نشان دادند که محرومیت غذایی اثرات پیچیده و متناقضی بر سامانه‌ی ایمنی این حشره دارد بطوریکه موجب تغییرات ذخایر انرژی کوتاه مدت مانند چربی‌ها و بلند مدت مانند پروتئین‌ها، کاهش آستانه‌ی فعال‌سازی برای برخی پاسخ‌های ایمنی مانند سامانه‌ی فنل-اکسیداز می‌شود (۱۱). در بخش دیگری از تحقیق حاضر دفاع لاروهای سن پنجم لیسه سیب در برابر باکتری *B. t* با افزایش معنی‌دار همه‌ی سلول‌های خونی و فعالیت آنزیم فنل اکسیداز همراه بود. با توجه به نتایج به دست آمده

می‌توان چنین استنباط نمود که در فاصله زمانی حدود ۱۲ ساعت پس از ورود عامل بیگانه به بدن لارو، سامانه دفاع یاخته‌های تحریک شده و شمار کل سلول‌ها بی‌درنگ افزایش قابل‌توجهی یافته است. 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 ترشح‌شده و فعالیت اجزای فنل اکسیداز سبب ملانیزاسیون و حذف عامل آلوده می‌شوند (۱۶). با گذشت زمان تا ۲۴ ساعت، آلودگی ناشی از باکتری سبب کاهش تراکم سلول‌های خونی و درنتیجه ضعیف شدن سامانه ایمنی حشره شد. واکنش‌های دفاع سلولی حشرات در برابر عوامل بیگانه توسط دیگر محققین نیز به اثبات رسیده است. بعنوان مثال هروهوو و دان (۱۹۸۲)، جمعیت سلول‌های خونی لارو کرم شاخدار توتون *Manduca sexta* را در اثر ورود باکتری *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli* به همولنف حشره بررسی کردند. بر اساس مشاهدات، تعداد کل سلول‌های خونی، بطور معنی‌داری افزایش یافت و تعداد پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها نیز یک ساعت پس از ورود عامل بیگانه به همولنف به میزان ۸۰٪ افزایش یافت (۲۶). هنان در سال ۲۰۱۲، دفاع هیومرال لاروهای *Agrotis ipsilon* را در برابر باکتری *B. thuringiensis* مطالعه کرده و نتیجه گرفتند که ۶ و ۱۲ ساعت پس از تیمار لاروها با باکتری، فعالیت لیزوزیمی بطور معنی‌داری افزایش یافت (۲۵). فعالیت عجم حسنی (۱۳۹۳b)، در بررسی واکنش‌های ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم *S. litura* علیه دو جدایه از قارچ *B. bassiana* و ذرات سنتزی لاتکس بید، نشان داد که در زمان‌های سه و شش ساعت پس از تزریق اسپورها، تعداد کل سلول‌ها، تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نسبت به شاهد بطور معنی‌داری بالاتر بود. فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز نیز اندازه‌گیری شد و نشان داد که بالاترین فعالیت این آنزیم در زمان‌های سه و شش ساعت پس از تزریق تیمارها بود. در انتها سلول‌های خونی این حشره در مقابله با عامل بیگانه‌ای چون اسپور قارچ و ذرات سنتزی لاتکس بید، فعالیت مثبتی از خود نشان داده و با تشکیل گره اطراف اسپورها، توانستند آن‌ها را از بین ببرند (۷). در تحقیقی دیگر پاسخ ایمنی پروانه برگخوار سفید آمریکایی *H. cunea* در برابر چهار ایزوله از قارچ بیماری‌زای حشرات به نام *B. bassiana*، و یک ایزوله از *I. farinosae*، بررسی شد. نتایج نشان داد که ۶ ساعت پس از تزریق اسپورهای قارچ بیمارگر در همه جدایه‌ها، تعداد کل سلول‌های خونی و تعداد ایمنوسیت‌های در گردش خون بطور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت (۱۲). در بررسی‌های انجام شده توسط بلانکو و همکاران (۲۰۱۷)، پاسخ ایمنی لارو *G. mellonella* در برابر سه سویه باکتری گرم منفی *Actinobacillus pleuropneumoniae* مثبت بود بطوریکه غلظت پپتیدهای آنتی باکتریال را در همولنف حشره بطور معنی‌داری افزایش داد (۱۷). پورعلی و عجم حسنی (۲۰۱۷)، ایمنی سلولی لارو سن چهار بید سیب‌زمینی *P. operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) را در برابر دو جدایه از قارچ بیمارگر *B. bassiana* شامل Fashand و 47 بررسی کردند. پس از گذشت ۳، ۶ و ۱۰ ساعت فراوانی سلول‌های خونی در لاروهای تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد که تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در لاروهای تیمار شده بعد از گذشت ۳ ساعت بطور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت ولی فراوانی آن‌ها با گذشت زمان تا ۱۰ ساعت به‌تدریج کاهش یافت. پروهموسیت‌ها نیز کاهش معنی‌داری ۶ ساعت پس از تزریق اسپورها نشان دادند (۴۲).

نتایج این تحقیق نشان دهنده‌ی دفاع سلولی مناسب لیسه سیب می‌باشد. چرا که سلول‌های خونی حشره در دماهای بالا مانند ۳۵ درجه سلسیوس افزایش معنی‌داری نشان

دادند که احتمالاً نشان از توان دفاعی خوب حشره در شرایط آب و هوایی مختلف است. از طرف دیگر بر اساس مشاهدات، لاروهای گرسنه با افزایش معنی‌دار تراکم سلول‌های خونی و فعالیت آنزیم فنل اکسیداز سازگاری مناسبی در برابر تنش گرسنگی نشان دادند. این موضوع می‌تواند به‌نوعی در مطالعات بیولوژی آفت و گذر لارو-های نئونات از شرایط بدون غذا در زمستان مؤثر باشد. باکتری *Bacillus thuringiensis* به‌عنوان عامل میکروبی مناسبی برای لیسه سیب و بسیاری از بالپولک‌داران گزارش شده است. فعالیت دفاعی لیسه سیب در برابر باکتری بیماری‌زای *B. t* با مشارکت سلول‌های خونی و سیستم فنل اکسیداز همراه بود. بنظر می‌رسد مطالعات وسیع‌تر در زمینه اثر متقابل ایمنی حشره- عامل میکروبی می‌تواند جنبه‌های جدیدتری از استفاده از روش‌های کنترل میکروبی علیه این آفت برگ‌خوار سیب ارائه دهد.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی شاهرود بخاطر حمایت‌های مالی و از خانم مهندس معصومه حیدرنیا بدلیل همکاری در نمونه برداری‌های صحرایی صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

۱- اسلامی، ع.، ۱۳۷۹. ارزیابی کاربرد سموم میکروبی بر پایه *Bacillus thuringiensis* به‌منظور مبارزه با آفت لیسه درختان سیب (*Hyponomeuta* spp.)، اولین کنگره بیولوژی کاربردی ایران.

۲- پورعلی، ز.، و عجم حسنی، م.، ۱۳۹۷. تأثیر دو جدایه قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* بر ایمنی لارو سن چهارم بید سیب‌زمینی *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae)، گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۴۱، شماره ۳، صفحه ۴۰-۳۱.

۳- جوادزاده، م.، مرزبان، ر.، و کلیایی، ر.، ۱۳۹۱. بررسی تأثیر فرآورده داخلی *Bacillus thuringiensis* در کنترل لیسه سیب، بیستمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران.

۴- خسروی، ر.، جلالی سندی، ج.، و قاسمی، و.، ۱۳۹۱. شناسایی سلول‌های خونی لارو شب پره خرنوب *Ectomoyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)، تحقیقات آفات گیاهی، شماره۲ (۳)، صفحات ۳۹-۳۰.

۵- ربیعی، م.، ۱۳۹۵. اثر درمانی تجویز عصاره برگ و سرشاخه‌های گیاه مو بر سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مسمومیت تجربی با سم دیازینون، مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۰، شماره ۳، صفحه ۳۱۷-۳۰۸ .

۶- عجم حسنی، م.، ۱۳۹۳a. بررسی دفاع سلولی لاروهای *Utethesia pulchella* (Lepidoptera: Arctiidae) در مقابل قارچ‌های *Isaria farinosae* و *Beauveria bassiana*، مهار زیستی در گیاه‌پزشکی، جلد ۲، شماره ۱، صفحات ۶۷-۵۷.

۷- عجم حسنی، م.، ۱۳۹۳b. واکنش‌های ایمنی سلولی لارو *Spodoptera littura* (Fabricus) (Lepidoptera.: Noctuidae) علیه قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana*، تحقیقات آفات گیاهی، جلد ۴، شماره ۲، صفحات ۶۸-۵۹.

۸- عجم حسنی، م.، ۱۳۹۴. بررسی یاخته‌شناسی سلول‌های خونی کرم شاخدار فرفیون *Hyles euphorbiae* L. (Lepidoptera: Sphingidae)، مجله علمی کشاورزی، جلد ۳۸، شماره ۳، صفحات: ۶۲-۵۰.

۹- کلیایی، ر.، خباز جلفائی، ح.، و میرکمالی، ح.، ۱۳۹۴. راهنمای آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز سیب، نشر آموزش کشاورزی، صفحه ۲۷۲-۱.

۱۰- مشکینی، س.، دلیرژ، ن.، و طافی، ع. ا.، ۱۳۹۴. بررسی تاثیر لوامیزول بر سیستم ایمنی و مقاومت در برابر تنش تراکم در قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مجله پژوهش-های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۹، شماره ۱، صفحه ۱۰۵-۹۹.

11- Adamo, S. A., Davies, G., Easy, R., Kovalko, I., and Turnbull, K. F., 2016. Reconfiguration of the immune system network during food limitation in the caterpillar *Manduca*

sexta. Journal of Experimental Biology, PP: jeb-132936.

12- Ajamhassani, M., Sendi, J. J., Zibaee, A., Askary, H., and 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(2), PP: 110-118.

13- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., and Le Conte, Y., 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. Biology letters. rsbl20090986 p.

14- Ayres, J. S., and Schneider, D. S., 2009. The role of anorexia in resistance and tolerance to infections in Drosophila, PLoS Biol, 7 p.

15- Banville, N., Browne, N., and Kavanagh, K., 2012. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. Virulence. 3(6), PP: 497-503.

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

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

18- Borges, A. R., Santos, P. N., Furtado, A. F., and Figueiredo, R. C. B. Q., 2008. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduvidae). Micron. 39(4), PP: 486-494.

19- Chapman, R. F., and Chapman, R. F., 1998. The insects: structure and function. Cambridge university press.

20- Dunphy, G., and Bourchier, R., 1992. Responses of Nonimmune Larvae of the Gypsy Moth, *Lymantria dispar*, to Bacteria and the Influence of Tannic Acid. Journal of Invertebrate Pathololgy. 60, PP: 26-32.

21- Ericsson, J. D., Janmaat, A. F., Lowenberger, C., and Myers, J. H., 2009. Is decreased generalized immunity a cost of B.t resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*. Journal of invertebrate pathology. 100(2), PP: 61-67.

22- Ghasemi, V., Moharramipour, S., and 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, PP: 128-140.

23- 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(4), PP: 429-437.

24- Gupta, 1985. Cellular elements in the haemolymph. In kerkut, G. A, Gilbert, L. I, (Eds.), Comperhensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Cambridge University Press, PP: 87-127.

25- Hanan, A., 2012. Effect of *Bacillus thuringiensis* and Farnesol on Haemocytes Response and Lysozymal Activity of the Black Cut Worm *Agrotis ipsilon* Larvae. Asian Journal of Biological Sciences, 5(3), PP: 157-170.

26- Horohov, D. W., and Dunn, P. E., 1982. Changes in the circulating hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. Journal of Invertebrate Pathology. 40(3), PP: 327-339.

27- Huang, F., Yang, Y. Y., Shi, M., Li, J. Y., Chen, Z. Q., Chen, F. S., and Chen, X. X., 2010. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Plutella xylostella* larva: cell types and their role in phagocytosis. Tissue and Cell. 42(6), PP: 360-364.

28- Jalali, J., and Salehi, R., 2008. The hemocyte types, differential and total count in *Papilio demoleus* L, (Lepidoptera: Papilionidae) during post-embryonic development. Mun. Ent, Zool. 1, PP: 199-216.

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

30- Kapari, L., Haukioja, E., Rantala, M. J., and Ruuhola, T., 2006. Defoliating insect immune defense interacts with induced plant defense during a population outbreak, Ecology 87, PP: 291–296.

31- Lazzaro, B. P., and Little, T. J., 2009. Immunity in a variable world. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci, 364, PP: 15–26.

32- Leonard, C., Söderhäll, K., and Ratcliffe, N. A., 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. Insect Biochemistry, 15(6), PP: 803-810.

33- Mahmood, A., and Yousaf, M., 1985. Effect of some insecticides on the hemocytes of *Gryllus bimaculatus* de Geer. Pakistan Journal of Zoology, 17, PP: 71-84.

34- Menken, S. B., Herrebout, W. M., and Wiebes, J. T., 1992. Small ermine moths (Yponomeuta): their host relations and evolution. Annual Review of Entomology. 37(1), PP: 41-66.

35- Mowlds, P., and Kavanagh, K., 2008. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*, Mycopathologia, 165(1), PP: 5-12.

36- Narmanlioglu, H. K., 2017. Parasitoids of the apple ermine moth, *Yponomeuta malinellus* Zeller, 1838 (Lepidoptera: Yponomeutidae), in the Çoruh Valley, Erzurum Province, Turkey. Turkiye Entomology Dergisi-Turkish Journal of Entomology, 41(4), PP: 357-365.

37- Pandey, J. P., Tiwari, R. K., and Kumar, D., 2008 a. Temperature and ganglionectomy stresses affect haemocyte counts in plain tiger butterfly, *Danais chrysippus* L.(Lepidoptera: Nymphalidae), Journal of Entomology, 5(2), PP: 113-121.

38- Pandey, J. P., Tiwari, R. K., and Kumar, D., 2008 b. Reduction in haemocyte mediated immune response in *Danaus chrysippus* following treatment with neem based insecticides. J. Entomol, 5, PP: 200-206.

39- Pandey, J. P., Mishra, P. K., Kumar, D., Singh, B. M. K., and Prasad, B. C., 2010. Effect of temperature on hemocytic immune responses of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. Research Journal of Immunology, 3(2), PP: 169-177.

40- Philip, H. G., and Edwards, L., 1991. Field Guide to Harmful and Beneficial Insects and Mites of Tree Fruits. Ministry of Agriculture and Fisheries, Victoria, British Columbia, Canada, 62 p.

41- Ponton, F., Wilson, K., Cotter, S. C., Raubenheimer, D., Simpson, S. J., 2011. Nutritional immunology: a multi-dimensional approach, PLoS Pathog, 7 p.

42- Pourali, Z., and Ajamhasani, M., 2018. The effect of thermal stresses on the immune system of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), 2nd Iranian International Congress of Entomology, PP: 515-525 .

43- Ribeiro, C., and Brehélin, M., 2006. Insect haemocytes: what type of cell is that, Journal of insect physiology, 52(5), PP: 417- 429.

44- Sehnal, F., Nedved, O., and Kostal, V., 2003. Temperature, Effects on Development and Growth. In: Encyclopedia of Insects, Resh, V. H., and R. T., Carde (Eds.), Academic Press, New York, PP: 1116-1119.

45- Siva-Jothy, M. T., and Thompson, J. J., 2002. Short-term nutrient deprivation affects immune function. Physiological Entomology. 27(3), PP: 206-212.

46- Solensky, M. J., and Larkin, E., 2003. Temperature induced variation in larval coloration in *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae). Ann. Entomol. Soc. Am, 96, PP: 211-216.

47- Stanley, D. W., and Miller, J. S., 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. Entomologia Experimentalis et Applicata. 119(1), PP: 1-13.

48- Strand, M. R., 2008. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect immunology, PP: 25-47.

49- Tan, J., Xu, M., Zhang, K., Wang, X., Chen, S., Li, T., Xiang, Z., and Cui, H., 2013. Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. Journal of insect physiology, 59(6), PP: 595-603.

50- Vogelweith, F., Dourneau, M., Thiery, D., Moret, Y., and Moreau, J., 2013. Geographical variation in parasitism shapes larval immune function in a phytophagous insect. Naturwissenschaften, 100, PP: 1149–1161.

51- Vogelweith, F., Moret, Y., Monceau, K., Thiéry, D., and Moreau, J., 2016. The relative abundance of hemocyte types in a polyphagous moth larva depends on diet. Journal of insect physiology, *88*, PP: 33-39.

52- Washburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan, F. F., Beckage, N. E., and Volkman, L. E., 2000. Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. Journal of Insect Physiology. 46(2), PP: 179-190.

53- Yang, S. Y., Ruuhola, T., Haviola, S., and Rantala, M. J., 2008. Effects of host-plant shift on immune and other key life-history traits of an eruptive Geometrid, *Epirrita autumnata* (Borkhausen), Ecol, Entomol, 33, PP: 510–516.

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*

Ajam Hasani M. and Mahmoudzadeh M.

Shahrood University of Technology, Shahroud, I.R. of Iran

Abstract

The role of hemocytes and the phenoloxidase system is well established in insect cell defense. The number of hemocytes could be affected by some sort of tension against insects or entry of any foreign agent to hemolymph. Insects with a strong immune system can sometimes alter the pathogenicity of a pathogenic agent or could even make them ineffective. In the current research, effect of tensions like starvation and thermal as well as the efficacy of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* were considered on cell defense of fifth instar larvae of the apple ermine moth, *Yponomeuta malinellus* Zeller. Starvation experiments incited a significant difference in total hemocyte counts, prohemocytes, granulocytes, plasmatocytes, and oenocytoids of 48 hours starved. Larve. The phenoloxidase activity was also significantly reduced 24 and 48 hours post starvation. Starvation showed an increasing trend. The effect of different thermal stresses on total number of cells was quite significant. The total number of hemocytes, granulocytes, plasmatocytes and oenocytoids in larvae which were exposed to 35 ° C for 24 hours, significantly increased compared to the control and 4 °C, significantly reduced total number of hemocytes, granulocytes and plasmatocytes. In addition, thermal stresses reduced the phenoloxidase enzyme activity. Feeding on *B. thuringiensis* infested leaves significantly increased total number of hemocytes and phenoloxidase enzyme activity. These factors decreased significantly over time for up to 24 hours indicating a positive reaction of the blood cells against the foreign agent during the initial hours of entering the hemolymph. These results can be considered as a starting point for recognition of physiological defense characteristics in apple ermine moth and to be considered in microbial control programs.

Key words: *Yponomeuta malinellus*, Response of hemocytes, Feeding and temprature, *Bacillus thuringiensis*