دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی

# تاثیر رژیم‌های غذایی و تنش‌های گرسنگی بر واکنش های ایمنی سلولی شب پره هندی *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae)

نگارنده: میترا ابراهیمی

استاد راهنما:
دکتر مریم عجم‌حسنی

آبان ۱۳۹۶

شماره: ۲۲۷۶
تاریخ: ۱۳۹۶/۱۹/۲۹

**باسمه‌تعالی**

دانشگاه صنعتی شاهرود

مدیریت تحصیلات تکمیلی

## فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم میترا ابراهیمی با شماره دانشجویی ۹۴۰۱۴۴۴ رشته مهندسی کشاورزی گرایش حشره شناسی

تحت عنوان تاثیر رژیم‌های غذایی و تنش‌های گرسنگی بر واکنش های ایمنی سلولی شب پره هندی *Plodia interpunctella* (Hu¨ bner) (Lepidoptera: Pyralidae) که در تاریخ ۱۳۹۶/۸/۲۴ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: خیلی خوب) ☐ مردود ☐

نوع تحقیق: نظری ☐ عملی ☐

| عضو هیأت داوران | نام ونام خانوادگی | مرتبهٔ علمی | امضاء |
|---|---|---|---|
| ۱ـ استادراهنمای اول | مریم عجم حسنی | استادیار | |
| ۲- استادراهنمای دوم | | | |
| ۳- استاد مشاور | | | |
| ۴- نماینده تحصیلات تکمیلی | حمیدرضا صمدلویی | استادیار | |
| ۵- استاد ممتحن اول | مسعود حکیمی تبار | استادیار | |
| ۶ـ استاد ممتحن دوم | علی درخشان شادمهری | استادیار | |

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: محمد رضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

**خدای من! مولای من! ای روشنایی هراسناکان در تاریکی! ای عالم تعلیم ندیده**

**چه زشتی‌های فراوانم را که تو پوشاندی،**

**چه بلاهای سخت را که از من گرداندی،**

**و مرا از چه لغزشگاه‌های متنوع که رهاندی،**

**و چه بدی‌های بسیار را که از من رماندی،**

**و چه بسیار صفات خوب و تعاریف زیبا که در من نبود به مردم باوراندی...**

**به کسی که جز دعا هیچ ندارد ببخشای، که تو قادری بر انجام هر کار که اراده کنی ((دعای کمیل))**

**تقدیم با عشق به:**

**پدرم، مادرم و خواهرانم ملیحه، زهرا و زینب**

استاد راهنمای گرانقدرم سرکارخانم دکتر مریم عجم حسنی، شما نه فقط به عنوان راهنمای بنده در روند تحقیق، که همواره در جایگاه بهترین استاد، دوست، خواهر و قوت قلب من در تمام دوران تحصیلم در دانشگاه درخشیده‌اید. از صمیم قلب از شما متشکرم.

اساتید محترم و ارجمندم در گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، جناب آقای دکتر علی درخشان شادمهری و جناب آقای دکتر مسعود حکیمی تبار، از زحمات بی‌دریغتان در راستای تدریس دروس هر دو مقطع کارشناسی و کارشناسی ارشد و راهنمایی‌هایتانصمیمانه سپاسگزارم.

سرکار خانم مهندس محبوبه عبدالهی کارشناسی محترم آزمایشگاه گیاه‌پزشکی، شش سال مهرابانانه و خواهرانه همیشه در کنار من بودید، سپاس برای همه چیز...

هم‌اتاقی‌ها و دوستان عزیزم: الهه شجاعی منش، سعادت افزود، فاطمه طاهری، اکرم ولی-زاده، نیلوفر علیزاده، زهرا پورعلی، مژگان حشمتی، رقیه جعفرپور و زهرا اعلایی، شما در تمامی این سال‌ها نزدیک‌ترین افراد به من بودید...با من خندیدید...با من اشک ریختید...به من انگیزه و قوت قلب دادید... در این ایام درست مثل روزهای قدیم که مادرم و خواهرانم غمخوارم بودند و بار اضطراب تکالیف نانوشته‌ام بر دوش ایشان بود، شما نیز نگرانم بودید، فراموش نخواهم کرد. برایتان دلی آرام آرزو می‌کنم.

# تعهد نامه

اینجانب میترا ابراهیمی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته حشره شناسی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان‌نامه تاثیر رژیم‌های غذایی و تنش‌های گرسنگی بر واکنش های ایمنی سلولی شب پره هندی (Lepidoptera: Pyralidae) *Plodia interpunctella* (Hùbner) تحت راهنمایی دکتر مریم عجم حسنی متعهد می شوم :

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به د ست آمدن نتایج ا صلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات م ستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) ا ستفاده شده ا ست ضوابط و ا صول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

**تاریخ**

**امضای دانشجو**

**مالکیت نتایج و حق نشر**

- **کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .**
- **استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.**

## چکیده

سلول‌های خونی شاخص مهم ایمنی حشرات در برابر پاتوژن‌ها، پارازیتوئیدها و تنش‌های گرسنگی، نوع رژیم غذایی، جنسیت، دیاپوز و عوامل محیطی مانند دما می‌باشند. حشرات برای مقابله با هر نوع تنش یا عامل بیگانه‌ی مهاجم از واکنش‌های دفاعی سلولی و هیومرال استفاده می کنند. سلول‌های خونی نقش اساسی در سامانه‌ی ایمنی سلولی حشرات داشته و دارای اشکال و فعالیت‌های متنوعی هستند. هم‌چنین پپتیدهای ضد میکروبی مانند آنزیم فنل‌اکسیداز از اجزای اصلی دفاع هیومرال حشرات محسوب می‌شوند. با شناخت دقیق وضعیت سلول‌های خونی و بررسی میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز، بهتر می‌توان جنبه‌های دفاع فیزیولوژیک حشرات را بررسی کرد و این امر به اتخاذ راهکارهای کنترل فیزیولوژیک آن‌ها کمک می‌کند. در این تحقیق ابتدا سلول‌های خونی شب‌پره‌ی هندی *Plodia interpunctella* با رنگ آمیزی گیمسا توسط میکروسکوپ نوری شناسایی شدند. میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز به روش هموسیت لایزیت در حضور سوبسترای L-DOPA و بافر فسفات یک مولار اندازه گیری شد. پنج نوع سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرلوسیت‌ها در همولنف لارو شب‌پره‌ی هندی شناسایی شد. فراوانی سلول‌های خونی در سنین سه، چهار و پنجم لاروی نشان داد که تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در سنین بالای لاروی دارای بیش‌ترین فراوانی بودند به علاوه تعداد کل سلول‌های خونی با افزایش سن لاروی به طور معنی داری افزایش یافت. تاثیر دوره‌های گرسنگی بر تعداد کل سلول‌های خونی معنی دار بود و با افزایش طول دوره‌ی گرسنگی به طور معنی داری کاهش یافت. تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها بعد از ۷۲ ساعت گرسنگی کاهش معنی داری نشان دادند. افزایش مدت زمان گرسنگی موجب کاهش معنی دار فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز شد. نتایج حاصل از آزمایش تاثیر رژیم‌های غذایی شامل نخود وکشمش، گردو، پسته و غذای مصنوعی نشان داد، بیش‌ترین تعداد کل سلول‌های خونی و تعداد پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها مربوط به لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی نخود وکشمش بود. میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لاروهای تغذیه کرده از غذای مصنوعی نسبت به سه رژیم دیگر به طور معنی داری

بیش‌تر بود. تعداد کل سلول‌های خونی در جنس ماده به طور معنی‌داری بیش‌تر از جنس نر مشاهده شد و فراوانی هر یک از سلول‌های خونی به جز پروهموسیت‌ها در جنس ماده به طور معنی داری بیشتر از جنس نر بود. فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در جنس نر بیش‌تر از جنس ماده بود ولی اختلاف معنی داری نداشتند. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی و میزان فعالیت آنزیم‌فنل‌اکسیداز در لارو سن پنجم شب‌پره‌ی هندی تا حدود زیادی تحت تاثیر دوره‌های گرسنگی، رژیم‌های غذایی و جنسیت قرار می‌گیرد.

**واژگان کلیدی:** شب‌پره‌ی هندی، دوره‌های گرسنگی، رژیم غذایی، جنسیت، آنزیم فنل‌اکسیداز، ایمنی

**مقاله‌ی مستخرج از پایان نامه**

The effects of starvation stresses and nutritional diets on the immune system of Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae)**, 2nd Iranian International Congress of Entomology.**

فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**


فصل اول- مقدمه و کلیات ..... ۱

فصل دوم- بررسی منابع ..... ۷

۲-۱- همولنف حشرات ..... ۸

۲-۱-۱- پلاسما ..... ۸

۲-۱-۲- سلول های خونی ..... ۹

۲-۲- طبقه بندی سلول‌های خونی ..... ۹

۲-۳- انواع سلول‌های خونی ..... ۱۲

۲-۴- منشاء سلول‌های خونی ..... ۱۳

۲-۵- هموگرام ..... ۱۴

۲-۶- سامانه‌ی ایمنی حشرات ..... ۱۴

۲-۶-۱- ایمنی اکتسابی ..... ۱۵

۲-۶-۲- ایمنی ذاتی ..... ۱۵

۲-۶-۳- آنزیم فنل‌اکسیداز ..... ۱۸

۲-۷- مطالعات انجام شده در زمینه بررسی تنش‌های گرسنگی، تغذیه و جنسیت بر سامانه‌ی ایمنی حشرات ..... ۱۹

فصل سوم- مواد و روش ..... ۲۳

۳-۱- پرورش حشرات ..... ۲۳

۳-۲- شناسایی سلول‌های خونی ..... ۲۴

۳-۳- شمارش سلول‌های خونی لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره‌ی هندی ..... ۲۵

۳-۴- شمارش تفرقی سلول‌های خونی ..... ۲۵

۳-۵- بررسی تاثیر دوره‌های گرسنگی بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی در لاروهای سن پنجم شب‌پره‌ی هندی ..... ۲۶

۳-۶- بررسی تاثیر رژیم های غذایی بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی در لاروهای سن پنجم شبپره‌ی هندی ..... ۲۶

۳-۷- بررسی تاثیر جنسیت بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی در لاروه‌ای سن پنجم شب‌پره‌ی هندی ..... ۲۶

۳-۸- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز ..... ۲۷

فصل چهارم- نتایج و بحث ..... ۲۹

۴-۱- شناسایی سلول‌های خونی ..... ۳۰

۴-۱-۱- پروهموسیت‌ها ..... ۳۰

۴-۱-۲- پلاسموتوسیت‌ها ..... ۳۰
۴-۱-۳- گرانولوسیت‌ها ..... ۳۰
۴-۱-۴- اونوسیتوئیدها ..... ۳۱
۴-۱-۵- اسفرولوسیت‌ها ..... ۳۱
۴-۲- بررسی فراوانی سلول‌های خونی لاروهای سن سوم،چهارم و پنجم شب‌پره‌ی هندی ..... ۳۳
۴-۳- تاثیر دوره‌های گرسنگی بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی شبپرهی هندی..... ۳۶
۴-۴- تاثیر دوره‌های گرسنگی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف شب‌پره‌ی هندی..... ۴۰
۴-۵- تاثیر رژیمهای غذایی بر تعداد کل و تفرقی سلولهای خونی شب‌پره‌ی هندی ..... ۴۱
۴-۶- تاثیر رژیمهای غذایی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف شب‌پره‌ی هندی ..... ۴۴
۴-۷- تاثیر جنسیت بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی شب‌پره‌ی هندی..... ۴۴
۴-۸- تاثیر جنسیت بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف شب‌پره‌ی هندی ..... ۴۷
۴-۹- بحث ..... ۴۸
۴-۱۰- پیشنهادات ..... ۶۱
منابع ..... ۶۳

# فهرست شکل‌ها

**عنوان** **صفحه**


شکل ۴-۱- سلول‌های خونی شب‌پره هندی ..... ۳۲

شکل ۴-۲-۱- فراوانی کل سلول‌های خونی لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره هندی ..... ۳۳

شکل ۴-۲-۲- فراوانی پلاسموتوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره هندی ..... ۳۴

شکل ۴-۲-۳- فراوانی گرانولوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره هندی ..... ۳۴

شکل ۴-۲-۴- فراوانی پروهموسیت‌ها در همولنف لاروهای سن سوم،چهارم و پنجم شب‌پره هندی ..... ۳۵

شکل ۴-۲-۵- فراوانی اونوسیتوئیدها در همولنف لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره هندی ..... ۳۵

شکل ۴-۲-۶- فراوانی اسفرولوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره هندی ..... ۳۶

شکل ۴-۳-۱- تاثیر تنش‌های گرسنگی بر تعداد کل سلول‌های خونی شب‌پره هندی (تعداد سلول/میلیمتر مکعب) .. ۳۷

شکل ۴-۳-۲- تاثیر تنش‌های گرسنگی بر تعداد پلاسموتوسیتهای شب پره هندی (تعداد سلول در میلیمتر مکعب). ۳۷

شکل ۴-۳-۳- تاثیر تنش‌های گرسنگی بر تعداد گرانولوسیتهای شب پره هندی (تعداد سلول در میلیمتر مکعب) ..... ۳۸

شکل ۴-۳-۴- تاثیر تنش‌های گرسنگی بر تعداد پروهموسیتهای شب پره هندی (تعداد سلول/میلیمتر مکعب) ..... ۳۸

شکل ۴-۳-۵- تاثیر تنش‌های گرسنگی بر تعداد اونوسیتوئیدهای شب پره هندی(تعداد سلول/میلیمتر مکعب)..... ۳۹

شکل ۴-۴- تاثیر دوره‌های گرسنگی بر فعالیت آنزیم فنلاکسیداز در همولنف شب پره هندی ..... ۴۰

شکل ۴-۵-۱تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر تعداد کل سلول‌های خونی شب‌پره هندی(تعداد سلول/میلیمتر مکعب) ..... ۴۱

شک۴-۵-۲- تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر تعداد پلاسموتوسیت‌های شب‌پره هندی(تعداد سلول در میلیمتر مکعب) ..... ۴۲

شکل ۴-۵-۳- تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر تعداد گرانولوسیت‌های شب‌پره هندی (تعداد سلول در میلیمتر مکعب) ..... ۴۲

شکل ۴-۵-۴- تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر تعداد پروهموسیت‌های شب‌پره هندی (تعداد سلول/میلیمتر مکعب) ۴۳

شکل ۴-۵-۵- تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر تعداد اونوسیتوئیدهای شب‌پره هندی(تعداد سلول/میلیمتر مکعب)... ۴۳

شکل ۴-۶- تاثیر رژیم‌های غذایی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف شب‌پره هندی ..... ۴۴

شکل ۴-۷-۱- تاثیر جنسیت بر تعداد کل سلول‌های خونی شب‌پره هندی..... ۴۵

شکل ۴-۷-۲- تاثیر جنسیت بر تعداد پلاسموتوسیت‌های شب‌پره هندی..... ۴۵

شکل ۴-۷-۳- تاثیر جنسیت بر تعداد اونوسیتوئیدهای شب‌پره هندی..... ۴۶

شکل ۴-۷-۴- تاثیر جنسیت بر تعداد گرانولوسیت‌های شب پره هندی..... ۴۶

شکل۴-۷-۵- تاثیر جنسیت بر تعداد پروهموسیت‌های شب‌پره هندی..... ۴۷

شکل ۴-۸- تاثیر جنسیت بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف شب‌پره هندی ..... ۴۷

# فصل اول

# مقدمه و کلیات

*Plodia interpunctella* با نام عمومی شب‌پره‌ی هندی در زیرخانواده‌ی Phycitinae از خانواده‌ی Pyralidae و در راسته‌ی Lepidoptera قرار دارد. حشره‌ای همه جازی و جزء آفات برخی محصولات غذایی و فرآورده‌های انباری است و می‌تواند محصولات متنوعی را آلوده کند. لارو این حشره یک شبکه ابریشمی در داخل و روی سطح غذا می تند و در داخل این شبکه توری تغذیه می کند. شبکه شامل پوسته لاروی و فضولات لاروی است و به محصول آلوده شده بوی نامطبوعی می دهد. گاهی اوقات محصول آلوده با شبکه ابریشمی پر می شود. آلودگی های ایجاد شده می تواند سبب خسارت مستقیم و هزینه های اقتصادی غیر مستقیم مثل هزینه های کنترل آفت، کاهش کیفیت و شکایت مصرف کننده باشد (موهانداس[۱] و همکاران، ۲۰۰۷). شرح کلی تمام مراحل زندگی اولین بار توسط هاملین و فیلیپس[۲] در سال ۱۹۳۱ انجام شد و آن را به عنوان آفت غلات و بیش از بیست نوع مختلف آجیل، میوه و شکلات در سیستم کشاورزی کالیفرنیا در ایالات متحده آمریکا دسته بندی کردند. اخیرا چندین مورد شرح و خلاصه در مورد مراحل زندگی ارائه شده است (ریس[۳]، ۲۰۰۴) جزئیات مورفولوژی لارو و شفیره و بالغ توسط ریچارد و تامسون[۴] (۱۹۳۲) و شرح رگبندی بال ها و ژنیتالیا توسط هنریش[۵] (۱۹۵۶) و هینتون[۶] (۱۹۴۳) انجام شد. شب پره هندی دارای پنج سن لاروی می باشد (آلوتی و گوس‌وامی[۷]، ۱۹۹۰). رفتار تخم‌گذاری در شب‌پره‌ی هندی تحت تاثیر بوی غذاست (فیلیپس و استرند[۸]، ۱۹۹۴). تخم گذاری روی سطح و یا کنار توده مواد غذایی به صورت انفرادی انجام می شود و گاهی به صورت دسته‌ای دیده می‌شود (مولن و آربوگاست[۹]، ۱۹۷۷). باروری شب‌پره‌ی هندی به عوامل متعددی مانند نوع غذا، اندازه جنس ماده، آب آشامیدنی در دسترس و وضعیت فیزیولوژیکی جنس ماده

---

۱ Mohandass
۲ Hamlin, Phillips
۳ Rees
۴ Richards, Thomson
۵ Heinrich
۶ Hinton
۷ Allotey, Goswami
۸ Phillips, Strand
۹ Mullen, Arbogast

بستگی دارد. بیش‌ترین میزان باروری در دمای ۳۱ درجه سانتی گراد انجام می‌شود (ام باتا[۱]، ۱۹۸۵). بیشترین میزان تخم ریزی در دمای ۳۱ درجه سانتی گراد انجام می‌شود که البته به بستگی زیادی به نوع رژیم غذایی دارد. بدیهی است که منابع غذایی نقش مهمی در تعیین خصوصیات باروری و پارامترهای باروری دارند. لارو های تازه متولد شده قادرند از منافذ کوچک با قطر ۰/۳۹-۰/۴۵ میلی متر عبور کنند (تسوجی[۲] ، ۱۹۹۸).

هم‌چنین پیامدهای اقتصادی ناشی از آلودگی از طریق بازگشت دادن محصولات آلوده گزارش شده است. خشکبار، غلات و میوه‌های خشک از نظر اقتصادی دارای اهمیت زیادی برای تولیدکنندگان هستند. آلودگی و آفت‌زدگی محصولات این چنینی ارزش بازارپسندی آن‌ها را کاهش داده و مشکلات عرضه در کشور و صادرات به کشورهای دیگر را ایجاد می‌کند. وجود این آفت انباری و سایر عوامل خسارت‌زا نشان دهنده‌ی ضعف در انبارداری و جزء موانع صادرات به حساب می‌آید. جانسون[۳] و همکاران در سال ۱۹۹۲ محصولاتی را که در اثر آلودگی به شب‌پره‌ی هندی برگشت خورده بودند را لیست کردند. در ایران  مهم‌ترین میزبان‌های شب‌پره‌ی هندی غلات و میوه‌های خشک هستند (ویلیامز[۴]، ۱۹۶۴).

تا کنون روش های متعددی برای کنترل این آفت مهم انباری به کار گرفته شده از جمله کنترل شیمیایی شامل استفاده از حشره کش‌های اورگانوفسفات، کاربامات و حشره کش‌های میکروبی و فومیگانت‌ها، رعایت بهداشت، استفاده از گردهای بی اثر، استفاده از سمیوکمیکال ها مانند فرومون های جنسی و کنترل بیولوژیک.

با توجه به اهمیت اقتصادی مواد انباری و خسارت‌زا بودن این آفت، می توان با شناخت دقیق‌تر فیزیولوژی این حشره، روش‌های مختلف و راهکارهای کنترل فیزیولوژیک این آفت مهم را مورد بررسی و تحقیق قرار داد.

---

[۱] Mbata
[۲] Tsuji
[۳] Johnson
[۴] Wiliamse

ایمنی ذاتی یکی از سامانه های مهم فیزیولوژیک حشرات است که نقش مهمی در دفاع از بدن در برابر عوامل بیگانه بر عهده داد. این سامانه از دو جزء ایمنی ایمنی سلولی (Cellular immunity) و ایمنی غیر سلولی یا هیومرال (Humeral immunity) تشکیل شده است. ایمنی سلولی شامل تولید و مشارکت مستقیم سلول‌های خونی (Hemocytes) است که در آن عوامل مهاجم توسط این سلول‌ها شناسایی و احاطه شده و در نهایت از بین می‌روند (لاوین[۱] و استرند ، ۲۰۰۲؛ گیلسپای[۲] و همکاران، ۱۹۹۷). ایمنی هیومرال نیز شامل سنتز و آزاد شدن ترکیبات بیوشیمیایی مختلف به ویزه پپتیدهای ضد میکروبی و آنزیم ها می‌باشند که هنوز به عنوان مکانیزم دفاعی و اولیه در مهره‌داران، حشرات و گیاهان شناخته می‌شود (لاهر[۳] و همکاران، ۱۹۹۳؛ لاهر و گنز[۴]، ۱۹۹۹). عوامل بیمارگر پس از عبور از جلد بدن و ورود به هموسل باعث تحریک سامانه ایمنی حشرات میزبان و آغاز واکنش های ایمنی می‌شوند. این واکنش ها توسط عوامل زنده و غیر زنده تحت تاثیر قرار می‌گیرند.

موفقیت بیولوژیکی حشرات به دلیل سیستم ایمنی قوی آنهاست. واکنش‌های ایمنی به شکل غیر اختصاصی و اختصاصی ظهور می‌کند. در ایمنی غیر اختصاصی جلد، لایه های کوتیکولی و لوله گوارش، منافذ تنفس و سیستم تناسلی به عنوان منابع فیزیکی در دفع عامل خارجی فعالیت می‌کنند (لاوین و استرند، ۲۰۰۲). اولین سد دفاعی در برابر عوامل بیگانه مربوط به جلد حشرات، پرده دور غذا و اپیتلیوم معده‌ی میانی است (استنلی و میلر[۵]، ۲۰۰۶). واکنش 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 (واشبورن[۶] و همکاران ۲۰۰۰).

---

۱ Lavine
۲ Gillespie
۳ Lehrer
٤ Ganz
٥ Stanley, Miller
٦ Washburn

شناخت ویژگی های دفاع فیزیولوژیک حشرات گام موثری در راستای نحوه کنترل آن ها می تواند تلقی شود.

هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر ۱-دوره‌های گرسنگی، ۲-نوع تغذیه و ۳-جسنیت بر واکنش‌های دفاع سلولی شب‌پره‌ی هندی می‌باشد.

# فصل دوم

# بررسی منابع

### ۲-۱- همولنف حشرات

کلیه اندام‌ها و بافت‌های داخلی حشرات به دلیل سامانه گردش خون باز، در همولنف معلق هستند. همولنف دارای ویژگی هایی از قبیل انتقال مواد غذایی به سلول‌های بدن، ذخیره‌ی دی‌اکسید-کربن، ایجاد فشار هیدرواستاتیکی، حفظ آب بدن، باز شدن بال‌ها در حشرات تازه ظاهر شده، تنظیم دمای بدن در حین پرواز و ایمنی در برابر عوامل مهاجم خارجی می‌باشد (نیشن[۱]، ۲۰۰۸). هم چنین خاصیت انعقاد خون باعث ترمیم شدن زخم‌ها و بهبودی سریع آسیب دیدگی‌ها و جلوگیری از ورود میکرواورگانیزم‌ها به داخل هموسل حشرات می‌شود (بن[۲] و همکاران، ۱۹۸۶).

#### ۲-۱-۱- پلاسما

بیش‌تر حجم پلاسما را آب تشکیل می‌دهد. پلاسما در حفظ آب بدن نقش مهمی دارد. رنگ، ترکیبات و اسیدیته‌ی پلاسما بسته به مرحله‌ی رشدی حشره، رژیم غذایی و در صورت آلودگی به عوامل میکروبی، بسته به گونه‌ی عامل بیماری‌زا دستخوش تغییرات شدیدی می‌شود (کلودن[۳]، ۲۰۰۷). پلاسما دارای ترکیبات آلی از قبیل سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیوم و هم‌چنین اسیدهای آمینه آزاد، اسیدهای آلی، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و لیپوپروتئین‌ها در پلاسما وجود دارد (رایان و واندرهورست[۴]، ۲۰۰۰). ترکیبات موجود در پلاسما فشار اسمزی مورد نیاز بدن حشره را تامین می کنند (ویتینگ[۵]، ۱۹۶۲)۰ از منظر ایمنی شناسی، فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات موجود در پلاسما مانند آنزیم فنل اکسیداز (تونگ[۶] و همکاران، ۲۰۰۵) و آنزیم لیزوزیم (ویلسون و رتکلیف[۷]، ۲۰۰۰) در واکنش‌های هیومرال نقش مهمی را بر عهده دارند.

---

۱ Nation
۲ Bohn
۳ Klowden
۴ Ryan, Van der Horst
۵ Wittig
۶ Tong
۷ Wilson, Ratcliffe

### ۲-۱-۲- سلول های خونی

حشرات فاقد اریتروسیت (گلبول قرمز) هستند و سلول‌های خونی آن‌ها را نمی‌توان معادل لولوکسیت‌های (گلبول سفید) مهره‌داران در نظر گرفت (پندی و تیواری[۱]، ۲۰۱۲). سلول‌های خونی که در سامانه ایمنی حشرات نقش دارند به صورت معلق در پلاسما و یا چسبیده به دیواره‌های داخلی بدن هستند. سامانه‌ی گردش خون در حشرات، انواع مختلف سلول‌های خونی و سلول‌های مزودرمی که دارای وظایف فیزیولوژیکی متعددی هستند را در بر می‌گیرد. ایمنی سلولی با مشارکت انواع سلول‌های خونی همراه است (استنلی و میلر، ۲۰۰۶).

### ۲-۲- طبقه بندی سلول‌های خونی

همولنف حشرات حاوی انواع مختلفی از سلول‌های خونی است. طبقه بندی های متفاوتی برای شناسایی و نامگذاری هموسیت‌ها وجود دارد اما اولین گزارش در مورد سلول‌های خونی به مطالعات سوآمردام[۲] در سال ۱۷۳۷ بر می‌گردد که سلول های خونی شپش انسان *Pediculus humanus* L. را مطالعه کرده است. ییگر[۳] در سال ۱۹۴۵ با مطالعه شکل شناسی سلول های خونی (stoll) *Prodenia eridina* را به نه دسته تقسیم کرد. جونز[۴] در سال ۱۹۶۲، تعداد سلول‌های خونی حشرات را ۳۲ نوع معرفی کرد. هلند[۵] ۱۹۱۱ در ادامه‌ی مطالعات کوئنوت[۶] ۱۸۹۷، سلول‌های خونی را به شش نوع پرولوکوسیت، فاگوسیت، لوکوسیت حاوی گرانول، آمینولوکوسیت، اونوسیتوئید و سلول‌های اسفرول تقسیم کرد. ویگلس ورث[۷] (۱۹۶۵) در ادامه‌ی مطالعات پایلوت و نوئل[۸] (۱۹۲۸) و استفاده از طبقه بندی هلند ۱۹۱۱، فاگوسیت ها را براساس اندازه به دو دسته تقسیم‌بندی کرد. جونز (۱۹۶۲، ۱۹۵۹)

---

۱ Pandey, Tiwari
۲ Swammerdam
۳ Yeager
۴ Jones
۵ Hollande
۶ Cuénot
۷ Wigglesworth
۸ Paillot, Noel

سلول‌های خونی را با میکروسکوپ فاز کنتراست مطالعه کرد و نتایج حاصل را با مشاهدات بدست آمده از رنگ آمیزی و تثبیت سلول‌ها مقایسه کرد و این کار منجر به حذف اصطلاح لوکوسیت به معنای سلول‌های سفید، شد. گوپتا[۱] (a ۱۹۸۵ ،۲۰۰۹) رولی[۲] و رتکلیف (۱۹۸۱) تلاش کردند که سلول های خونی حشرات راسته های مختلف حشرات با یکدیگر هم نام کنند و انواع آن را به شش نوع کاهش دهند (رتکلیف و همکاران، ۱۹۸۵، برهلین و زاخاری[۳]، ۱۹۸۶). شناسایی و طبقه بندی سلول‌های خونی حشرات براساس ویژگی‌های فراساختاری و ایمنوکمیکال نیز انجام گرفته است (سراول[۴] و همکاران، ۲۰۰۳، ویلوت[۵] و همکاران، ۱۹۹۴، لینگ[۶] و همکاران، ۲۰۰۵، مرچانت[۷] و همکاران، ۲۰۰۸). جونز در سال ۱۹۶۲ یکی از مورد قبول ترین طبقه بندی‌ها را انجام داد. بر اساس مورفولوژی، واکنش به رنگ‌ها و پاسخ به تنش‌ها، شش نوع سلول خونی در حشرات مختلف شناسایی شده اند که شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و آدیپوهموسیت‌ها می باشند. همچنین در برخی مراحل زندگی حشرات ورمیسیت‌ها و پودوسیت‌ها مشاهده می شوند (تیواری و همکاران ۲۰۰۶، تیواری و همکاران ۲۰۰۲، پندی و همکارن ۲۰۰۳ a و b، پندی ۲۰۰۴، خسروی و همکاران، ۱۳۹۱). سایر محققین طبقه بندی‌هایی بر اساس ویژگی های مورفولوژیک و عملکردی سلول‌های خونی ارائه داده اند (لاکی[۸] ۱۹۸۸، لاوین و استرند ۲۰۰۲، گاردینر[۹] و استرند ۱۹۹۹،۲۰۰۰). جامع‌ترین طبقه بندی سلول‌های خونی در بین فیزیولوژیست ها توسط گوپتا (۱۹۸۵) انجام شده است و هفت نوع شامل : پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها، کواگلوسیت‌ها و آدیپوهموسیت‌ها می‌باشد ولی در سال ۱۹۹۱ اظهار کرد که کواگلوسیت‌ها در واقع همان گرانولوسیت‌ها هستند، بنابراین

---

۱ Gupta
۲ Rowley
۳ Brehelin, Zachary
۴ Ceraul
۵ Willott
۶ Ling
۷ Merchant
۸ Lackie
۹ Gardiner

در طبقه‌بندی جدید خود شش نوع سلول معرفی کرد. اما طبقه بندی اخیری که تا به امروز مورد استفاده قرار گرفته است، طبقه بندی استرند (۲۰۰۸) است که انواع سلول‌های خونی حشرات را پنج مورد اول دسته بندی گوپتا(۱۹۸۵) معرفی کرده است. او اظهار دارد که آدیپوهموسیت‌ها قطرات چربی پراکنده در همولنف هستند.

مطالعه سلولهای خونی مربوط به ۱۵۰ سال قبل است و بیشتر در مورد بالپولکداران، بالغشائیان، سخت بالپوشان و دوبالان انجام شده است (گوپتا، ۱۹۸۵). هم چنین مطالعات مشابهی در مورد نرم تنان صورت گرفته است، برای مثال سه نوع سلول‌خونی در همولنف حلزون‌ها مشاهده شده است (هین[۱]، ۱۹۹۱). مطالعات نشان داده اند که سلول‌های خونی از نظر اندازه، مورفولوژی و فراوانی در حشرات مختلف متفاوت اند و حتی در برخی گونه‌ها ممکن است همه‌ی پنج نوع سلول‌خونی وجود نداشته باشد. در این راستا می توان به تحقیقاتی زیادی اشاره کرد از جمله: کهن و همکاران (۲۰۱۲)، پنج نوع سلول خونی در سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* Mull. شناسایی کردند. شش نوع سلول-خونی در ملخ *Oxya japonica* Thunberg شناسایی شده‌است (آنگرانی و پوترا[۲]، ۲۰۱۱). در همولنف لارو سن پنجم کرم ابریشم *Bombyx mori* L. ، ۵ نوع سلول خونی شناسایی شده است (آکای و ساتو[۳]، ۱۹۷۳). در پروانه‌ی برگ‌خوار *Spodoptera litura* Fabricius، ۹ نوع هموسیت معرفی شده است (ساکسنا[۴] و همکاران، ۱۹۸۸). با مطالعه‌ی سلول‌های خونی پروانه‌ی برگ‌خوار مرکبات *Papillio demoleus* L. به وسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی، ۵ نوع سلول خونی شناسایی شد (جلالی و صالحی، ۲۰۰۸). خسروی و همکاران در سال ۱۳۹۱ انواع سلولهای خونی کرم گلوگاه انار *Ectomoyelois ceratoniae* Zeller را شناسایی کردند. انواع سلول‌های خونی پروانه برگخوار سفید آمریکایی *Hyphantria cunea* (Drury). شناسایی شده است (عجم‌حسنی و همکاران، ۲۰۱۳). عجم‌حسنی در

[۱] Hine
[۲] Anggraeni, Putra
[۳] Akai, Sato
[۴] Saxena

سال ۱۳۹۳ سلول‌های خونی *Utethesia pulchella* L. را پنج نوع گزارش کرد. عجم‌حسنی در سال ۱۳۹۴ پنج نوع هموسیت در مراحل مختلف لاروی، شفیرگی و بالغ کرم شاخ‌دار فرفیون *Hyles euphorbiae* L. را شناسایی کرد. تا سال ۱۹۸۳ اطلاعات کمی در مورد هماتولوژی شب‌پره هندی وجود داشت. اولین بار بیمن و همکاران در سال ۱۹۸۳ شش نوع هموسیت را در لارو سن پنجم شب‌پره هندی شناسایی کردند. این هموسیت‌ها شامل: پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اسفرولوسیت، اونوسیتوئید و گرانولوسیتوفاگوس بودند، او گرانولوسیتوفاگوس ها را سلول‌هایی معرفی کرد که به علت کمیاب بودن به ندرت در میان هموسیت‌های در گردش مشاهده می‌شوند و به پلاسموتوسیت‌های غول‌پیکر شباهت دارند (بیمن[۱] و همکاران، ۱۹۸۳). در همولنف بید سیب‌زمینی *Phthorimaea operculella* Zeller پنج نوع سلول خونی شناسایی شد (پورعلی و عجم‌حسنی، ۲۰۱۶).

### ۲-۳- انواع سلول‌های خونی

بر اساس کلید شناسایی گوپتا (۱۹۹۱)، پروهموسیت ها سلول‌هایی دارای هسته‌ی درشت و مرکزی هستند و اغلب تمام حجم سلول را پر کرده است. سیتوپلاسم بصورت یک لایه نازک پیرامون هسته را فرا گرفته است. سلول ها اغلب گرد و به ندرت تخم‌مرغی یا بیضوی هستند. پروهموسیت‌ها کوچک‌ترین سلول خونی هستند. پلاسموتوسیت‌ها معمولا دارای سیتوپلاسمی فاقد گرانول و یا گاهی دارای گرانول‌های بسیار ریز هستند. هسته مدور یا کشیده و مرکزی است و ممکن است دانه دانه به نظر برسد یا نرسد. دارای چندشکلی هستند و ممکن است دوکی‌شکل، سیلندری یا تخم مرغی باشند. اندازه‌ی آن‌ها در حشرات مختلف متفاوت است. در گرانولوسیت‌ها سیتوپلاسم به طور برجسته و مشخصی دارای گرانول است. گرانول‌ها ممکن است قابل شمارش باشند یا نباشند. هسته در مقایسه با هسته‌ی پلاسموتوسیت که نسبتا کوچک است و فشرده، گرد یا کشیده می‌باشد. در اسفرولوسیت‌ها عموما هسته نامشخص، کوچک و مرکزی است. سلول‌ها تخم‌مرغی یا گرد با اندازه های متغیر هستند و معمولا از

[۱] Beeman

گرانولوسیت ها کوچک تر هستند ولی گاهی اندازه‌ی آن‌ها درشت‌تر از سایر سلول‌ها نیز مشاهده می‌شود. سیتوپلاسم به شکل گویچه‌های توخالی اطراف هسته قرار گرفته است. انوسیتوئیدها دارای سیتوپلاسم عموما ضخیم، فاقد گرانول و همگن است و اغلب شامل تعدادی صفحات بشقاب مانند است. واکوئل ممکن است وجود داشته باشند. هسته به طور کلی کوچک، گرد یا کشیده است و به طور کلی جانبی است. شکل و اندازه آن متنوع است.

### ۲-۴- منشاء سلول‌های خونی

سلول‌های خونی دارای منشاء مزودرمی هستند و در دو مرحله‌ی رشدی تولید می‌شوند (هلز[۱] و همکاران، ۲۰۰۳). اولین جمعیت سلول‌های خونی در دوران جنینی از مزودرم سر و یا مزودرم پشتی تولید می‌شوند. دومین جمعیت از سلول‌های خونی در مراحل لاروی و پورگی، از اندام‌های هماتوپوئتیک که دارای منشاء مزودرمی هستند مشتق می‌شوند. دانش فعلی در مورد چگونگی تولید سلول‌های خونی در درجه اول از مطالعات انجام شده روی *Drosophila* برگرفته شده است ( تپاس[۲] و همکاران، ۱۹۹۴). اندام‌های هماتوپوئتیک در بال‌پولک‌داران چهار عدد هستند که یک جفت آن در میان و پس قفس سینه و یک جفت دیگر در نزدیکی دیسک‌های کمال قرار گرفته اند (لاوین و استرند، ۲۰۰۲). به طور کلی اندام‌های هماتوپوئتیک در بال‌پولک‌داران به ویژه در لاروهای جوان، منبع مهم تولید کننده‌ی پلاسموتوسیت‌ها هستند در حالی که گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها از سایر سلول‌های خونی مشتق می‌شوند (استرند، ۲۰۰۸). اندام‌های هماتوپوئتیک در قسمت جلویی قلب قرار داشته و به داخل آن باز می‌شوند و در برخی حشرات گزارش شده‌اند. در لارو بال‌پولک‌داران توده‌هایی از سلول‌های بهم چسبیده که شبیه به کپسول هستند، در نزدیکی روزنه‌های تنفسی قفس سینه قرار دارند و سلول خونی تولید می‌کنند. در حشرات، تقسیم میتوزی برای تکثیر سلول‌های خونی در مراحل پس‌جنینی گزارش شده است. اما تقسیمات میتوزی در سلول‌های خونی پایین است، لذا تنها تقسیم میتوزی قادر

[۱] Holz
[۲] Tepass

به تامین و نگهداری سطح سلول های خونی نیست. طول عمر سلول های خونی در حشرات مطالعه شده است. با نشان دار کردن پروهموسیت‌ها مشاهده شده که بعد از ۴۸ ساعت تمامی سلول‌های نشان‌دار شده تبدیل به پلاسموتوسیت و گرانولوسیت شده اند، اما بعد از شش روز هیچ سلول خونی نشان‌داری در بدن حشره مشاهده نشده است. بنابراین نتیجه گرفتند که طول عمر سلول‌های خونی از یک هفته تجاوز نمی کند (بندانی، ۱۳۸۹)

**۲-۵- هموگرام**

مطالعه وضعیت سلولهای خونی در یک مرحله از زندگی حشره و در یک زمان خاص هموگرام نامیده می شود. چهار مولفه اصلی هموگرام شامل شمارش کل سلولهای خونی یا Total Hemocyte Count، شمارش تفرقی سلولهای خونی یا Differential Hemocyte Count، حجم خون یا Blood Volum و شمارش مطلق سلولهای خونی یا Absolut Hemocyte Count است (گوپتا، ۱۹۹۱). هموگرام در هر مرحله رشدی وضعیت سامانه ایمنی حشره و میزان توانایی آن در ایجاد سازش با شرایط محیطی را نشان می‌دهد (شارما ۲۰۰۸) زیرا پارامترهای هماتولوژیک حشرات تحت تاثیر عوامل زنده مانند پاتوژن ها، نماتدها و پارازیتوئیدها و عوامل غیر زنده مانند سن، جنسیت، آفت‌کش، گرسنگی و آلاینده‌های محیطی قرار می‌گیرند. (شارما[۱] ۲۰۰۸، سانجایان[۲] و همکاران ۱۹۹۶).

**۲-۶- سامانه‌ی ایمنی حشرات**

در یک تعریف جامع ایمنی به معنای جلوگیری از ورود عوامل بیگانه به داخل بدن است که در صورت ورود، آن‌ها را از بافت خودی شناسایی کرده و در نهایت آن‌ها را می‌کشد واز سامانه‌ی گردش خون حذف می‌کند (سیواجوتی[۳]، ۲۰۰۵). عوامل بیگانه شامل پاتوژن‌ها (قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها، پروتوزوآها، نماتدها)، آفت‌کش‌ها و پارازیتوئیدها می باشند. همان طور که در بخش کلیات اشاره شد،

[۱] Sharma
[۲] Sanjayan
[۳] Siva-Jothy

علاوه بر این عوامل زنده، برخی عوامل غیر زنده نظیر تنش‌های گرسنگی، جنسیت، رژیم غذایی و دمای محیط، می‌توانند سامانه‌ی ایمنی را تحت تاثیر قرار بدهند. موفقیت بیولوژیکی حشرات به دلیل سیستم ایمنی قوی آن‌هاست. واکنش‌های ایمنی در یک طبقه بندی دیگر شامل ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی است. در ایمنی غیر اختصاصی جلد، لایه های کوتیکولی و لوله گوارش، منافذ تنفس و سیستم تناسلی به عنوان منابع فیزیکی در دفع عامل خارجی فعالیت می‌کنند (لاوین و استرند، ۲۰۰۲). اولین سد دفاعی در برابر عوامل بیگانه مربوط به جلد حشرات، پرده دور غذا و اپیتلیوم معده‌ی میانی است (استنلی و میلر، ۲۰۰۶). زمانی که عوامل بیگانه بتوانند ازین موانع عبور کنند، وظیفه‌ی دفاع به مجموعه-ای از سلول‌های خونی و ملکول‌های دفاعی محول می‌شود (لاوین و استرند، ۲۰۰۲). حال باید از منظر دیگری واکنش‌های سامانه‌ی ایمنی را دسته بندی کرد. سامانه‌ی ایمنی در جانوران چندسلولی به دو روش ایمنی اکتسابی و ایمنی ذاتی در مقابل عوامل خارجی مهاجم واکنش نشان می‌دهند:

### ۲-۶-۱- ایمنی اکتسابی

حشرات فاقد ایمنی اکتسابی هستند. این نوع ایمنی در جانوران مهره‌دار دیده می‌شود. در سرم خون این موجودات پروتئینی به نام گاما-گلوبولین (ایمنوگلوبولین) وجود دارد که به عنوان پادتن یا آنتی بادی عمل می‌کند و در شناسایی و حذف عوامل خارجی نقش دارد. توانایی مهم این سامانه به خاطر سپردن آنتی‌ژنی است که موجود زنده قبلا در برابر آن قرار گرفته است، بنابراین اگر دوباره در معرض همان آنتی‌ژن قرار بگیرد، سامانه ایمنی به سرعت در برابر آن واکنش نشان می‌دهد. این خاصیت ایمنی اکتسابی نامیده می‌شود (فیرون[۱] ۱۹۹۷)

### ۲-۶-۲- ایمنی ذاتی

برخلاف ایمنی اکتسابی، ایمنی ذاتی بر فاکتورهای کدگذاری شده برای شناسایی و کشتن عوامل بیگانه تکیه دارد (فیرون ۱۹۹۷). همان طور که گفته شده حشرات فاقد ایمنی اکتسابی هستند

[۱] Fearon

ولی ایمنی ذاتی در آن‌ها به خوبی توسعه یافته است. ایمنی ذاتی کلیه عوامل فیزیکی، شیمیایی و سلولی را شامل می‌شود که به طور مشترک با هم در لحظات اولیه ورود عامل بیگانه به داخل همولنف، به عنوان اولین خط دفاعی در داخل بدن ایفای نقش می‌کند، به همین خاطر به ایمنی طبیعی نیز مشهور است (قاسمی ۱۳۹۲). سامانه‌ی ایمنی ذاتی حشرات خود به دو دسته شامل ایمنی سلولی و ایمنی هیومرال تقسیم می شود:

**۲-۶-۲-۱- ایمنی سلولی**

ایمنی سلولی معمولا واکنشی سریع است و در ساعات اولیه ورود عوامل مهاجم و یا تنش رخ می دهد. در این نوع ایمنی، سلول‌های خونی به طور مستقیم در واکنش‌های دفاعی بدن نقش دارند (لاوین و استرند، ۲۰۰۲، استرند و پچ[۱] ۱۹۹۵) و شامل سه فرآیند زیر می باشد:

**۲-۶-۲-۱-۱- فاگوسیتوز**

فاگوسیتوز یا بیگانه‌خواری به رفتار ذره خواری در بسیاری از پروتوزوآها و همه‌ی متازوآها دیده می‌شود. در همولنف حشرات پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها سلول‌های شرکت کننده در این فرآیند هستند. این فرآیند زمانی آغاز می‌شود که یک هدف از عامل بیگانه به گیرنده‌های سلول‌های فاگوسیت کننده متصل شود. سپس اگر عامل خارجی کوچک باشد به طوری که سلول بتواند ان را ببلعد یا در دز پایین وارد بدن شود فاگوسیتوز اتفاق می‌افتد. ذرات کوچک مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و پروتوزوآها هستند. فاگوسیتوز در سه مرحله شامل شناسایی عامل خارجی توسط سلول‌های خونی، بلعیدن عامل خارجی توسط آن‌ها و هضم عوامل خارجی انجام می‌شود (استرند ۲۰۰۸ ؛ لاوین و استرند، ۲۰۰۸؛ بورگس[۲] و همکاران، ۲۰۰۸).

[۱] Pech
[۲] Borges

### ۲-۶-۲-۱-۲- تشکیل گره

تشکیل گره یا گره‌زایی به معنای ایزوله و جدا شدن عوامل خارجی زنده و غیر زنده‌ی کوچک مثل باکتری‌ها، قارچ‌ها که در دز بالا وارد بدن حشره می‌شوند، می‌گردد به این صورت که سلول‌های خونی اطراف توده ای از عوامل خارجی قرار می‌گیرند و آن‌ها را مانند کپسول شدن ایزوله می‌کنند. گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها سلول های اصلی مشارکت کننده در فرآیند تشکیل گره هستند (لاوین و استرند، ۲۰۰۲؛ ماناچینی[۱]، ۲۰۱۱).

### ۲-۶-۲-۱-۳- تشکیل کپسول

تشکیل کپسول شبیه به تشکیل گره می‌باشد البته با این تفاوت که اندازه‌ی عامل خارجی بزرگ‌تر می‌باشد، مانند پارازیتوئیدها و نماتدها. در این فرآیند دیواره‌ی عامل خارجی توسط گرانولوسیت-ها شناسایی می‌شود و با اتصال به دیواره‌ی عامل مهاجم محتویات خود را آزاد می‌کند و باعث جلب سایر گرانولوسیت‌ها می‌شود. تعداد زیادی گرانولوسیت اطراف عامل خارجی جمع شده و به دیواره آن متصل می‌شوند سپس یک لایه از سلول‌های پلاسموتوسیت اطراف گرانولوسیت‌ها را در برگرفته و عامل خارجی را از محیط جدا کرده و همراه ملانیزاسیون دفع می‌کنند (ناپی[۲] و همکاران، ۲۰۰۹).

### ۲-۶-۲-۲- ایمنی هیومرال

در این ایمنی برخلاف ایمنی سلولی، سلول‌های خونی دخالت مستقیم ندارند بلکه مواد پروتئینی سنتز شده توسط این سلول‌ها و اندام‌های چربی که خاصیت ضد میکروبی دارند ایفای نقش می‌کنند و به عبارت دیگر این نوع ایمنی با تولید و آزاد شدن ترکیبات بیوشیمیایی، آنزیم‌ها، پپتیدها و ترکیبات اکسیژن و نیتروژن در خون همراه است که موجب شناسایی و از بین بردن موجودات مهاجم می‌شود. اجزای سامانه ایمنی هیومرال شامل پروتئین‌های شناسایی کننده‌ی الگوها، سامانه پروفنل-اکسیداز، ترکیبات اکسیژنی و نیتروژنی واکنش‌زا و پروتئین های دارای خاصیت ضد میکروبی، انعقاد

[۱] Manachini
[۲] Nappi

خون و آنزیم‌های تنظیم کننده‌ی ملانیزاسیون می باشند. پپتیدهای ضد میکروبی در حشرات در شش دسته شامل سکروپین، دیفنسین‌ها، پپتیدهای غنی از اسیدآمینه پرولین، پپتیدهای غنی از اسیدآمینه گلایسین، لیزوزیم و پپتیدهای ضد قارچی می‌شوند. (مایستر[۱] و همکاران، ۲۰۰۰؛ لونبرگر[۲]، ۲۰۰۱؛ بوگدان[۳] و همکاران، ۲۰۰۰؛ واس[۴] و ناپی، ۲۰۰۱؛ موتا و ایواناگا[۵]، ۱۹۹۶، گیلسپای[۶] و همکاران، ۱۹۹۷). پپتیدهای ضد میکروبی، مولکول‌های چسبنده‌ی سلولی، لیزوزیم، لکتین‌ها و سامانه‌ی پروفنل‌اکسیداز همگی نقش مهمی را در ایمنی هیومرال بازی می‌کنند. فنل‌اکسیداز یک فاکتور کلیدی است و نقش اصلی را در ملانیزاسیون و بهبود زخم و حتی ورود عامل بیگانه به عهده دارد (سودرهال و سرنیوس[۷]، ۱۹۹۲).

### ۲-۶-۳- آنزیم فنل‌اکسیداز

آنزیم پروفنل‌اکسیداز که در ساختار خود حاوی یون ($Cu^{2+}$) می باشد، در طیف وسیعی از موجودات وجود دارد و فرم غیرفعال آنزیم فنل‌اکسیداز می‌باشد. آنزیم فنل‌اکسیداز به وسیله‌ی سلول‌های خونی در همولنف در گردش است و یا به صورت غیر فعال یعنی پروفنل‌اکسیداز در بافت‌هایی مانند اجسام چربی یافت می‌شود. دو یا چند فرم از این آنزیم در حشرات شناسایی شده است و احتمال می‌رود که یکی از آن‌ها در کوتیکول وجود داشته و به صورت اختصاصی در سخت شدن کوتیکول نقش دارد و فرم دیگر آن در همولنف وجود دارد و در بهبود زخم ها اهمیت دارد (آشیدا و بری[۸]، ۱۹۹۵).

---

۱ Meister
۲ Lowenberger
۳ Bogdan
4 Vass
۵ Muta, Iwanaga
۶ Gillespie
۷ Söderhäll, Cerenius
8 Ashida, Brey

## ۲-۷- مطالعات انجام شده در زمینه بررسی تنش‌های گرسنگی، تغذیه و جنسیت بر سامانه‌ی ایمنی حشرات

حشرات از منابع تغذیه‌ای متنوع استفاده می‌کنند. رژیم‌های غذایی در بین لاروها و حشرات بالغ حتی یک گونه نیز متفاوت است. قطعا نوع غذا و بهره‌مندی از غذای مطلوب‌تر و یا عدم استفاده از غذای خوب و کافی و حتی گرسنگی بر قدرت ایمنی حشرات تاثیر می‌گذارد. با بررسی اثر گرسنگی بر خصوصیات ایمنی لارو سن پنجم *Manduca sexta* (L.) مشخص شد بعد از هفتاد و دو ساعت سطوح گلوکز و ترهالوز به شدت یافت، اما تغییرات کمی در تعداد کل سلول های خونی به وجود آمد (داهلمن[1]، ۱۹۷۳). اثر محرومیت های غذایی و جنسیت بر عملکردهای ایمنی *Tenebrio molitor* L. مورد مطالعه قرار گرفته است و مشخص شده است غلظت آنزیم فنل اکسیداز در جنس نر به میزان چشمگیری بیشتر از جنس ماده و در حشراتی که گرسنه مانده اند به طور معنی داری کمتر از حشرات تغذیه کرده است (سیواجوتی و تامپسون[2]، ۲۰۰۲). بررسی اثر محرومیت غذایی بر میزان آلودگی *Galleria mellonella* Linnaeus به *Candida albicans* نشان داد که در تراکم هموسیت ها کاهش معنی داری رخ می دهد (بانویل[3] و همکاران، ۲۰۱۲). به علاوه در سایر موجودات نیز فعالیت های ایمنی تحت تاثیر تغذیه گزارش شده است. ال-راواده[4] در سال ۲۰۱۰ اثر تنش گرسنگی بر ایمنی حلزون باغی *Helix aspersa* را بررسی نمود و نتیجه گرفت تنش گرسنگی پاسخ ایمنی را تحت تاثیر قرار می‌دهد، به طوری که تغذیه نقش اصلی را در حفظ پارامترهای ایمنی حلزون باغی بازی می‌کند. او مشخص نمود که گرسنگی به مدت سه هفته سبب کاهش چشمگیر تعداد کل هموسیت‌ها و تعداد سلول‌های فاگوسیت‌کننده و کاهش فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز شد. بات[5] و همکاران در سال ۲۰۰۷ دریافتند که فراوانی هموسیت‌ها و میزان فنل‌اکسیداز در اثر اعمال تنش گرسنگی بر صدف صخره‌های سیدنی Gould *Saccostrea glomerata*،

[1] Dahlman
[2] Thompson
[3] Banville
[4] Al-Rawadeh
[5] Butt

با نیمی از جیره‌ی غذایی همیشگی و سه هفته گرسنگی به ترتیب به میزان ۲۵٪ و ۱۴٪ کاهش یافت. در *Bombus terrestris* Linnaeus ، تفاوت معنی داری میان واکنش‌های ایمنی افراد تغذیه کرده و گرسنه مشاهده شده است (اشمیدت-همپل و اشمیدت همپل[۱] ۱۹۹۸). گرسنگی تاثیر منفی بر مقدار متابولیسم مگس سرکه *Drosophila melanogaster* Meigen دارد (واس و ناپی ۱۹۹۸). در زنبور عسل *Apis mallifera* Linnaeus اثر گرسنگی بر غلظت پپتیدهای ضدمیکروبی مانند ترنس فرین و آریل فورین بررسی شده است (آلوکس و همکاران[۲]، ۲۰۱۰). سامانه‌ی ایمنی یکی از پرهزینه‌ترین سامانه‌های فیزیولوژیکی در موجودات است، بنابراین حفاظت از این سامانه بسیار اهمیت دارد (اشمیدت-همپل ۲۰۰۵) و کمبود مواد غذایی میتواند این سامانه را مختل کند و حساسیت افراد به بیماری‌ها را افزایش دهد (لی[۳] و همکاران ۲۰۰۷). مطالعات انجام شده در زمینه‌ی اثر تغذیه بر ویژگی‌های ایمنی بال‌پولک‌داران نشان داد که نوع غذا بر فعالیت‌های سلول‌های خونی، فراوانی آن‌ها و میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز موثر بوده است. چنان‌چه در راستای مطالعه‌ی ارتباط بین تغذیه از پروتئین و ایمنی زنبورعسل، پارامترهایی مانند غلظت سلول‌های خونی و اجسام چربی و فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز و گلوکزاکسیداز، تحت تاثیر دو متغیر غذایی شامل گرده مونوفلورال (استفاده از گرده یک گیاه در رژیم غذایی) و گرده پلی‌فلورال (استفاده از گرده‌ی چند گیاهان در رژیم غذایی)، مشخص شد که با افزایش تنوع غذایی، سطح ایمنی افزایش یافت و در مقایسه با رژیم گرده مونوفلورال، تغذیه از رژیم گرده پلی فلورال موجب افزایش فعالیت گلوکزاکسیداز شد (آلوکس و همکاران ۲۰۱۰). آدامو[۴] و همکاران (۲۰۱۶) تاثیر سه رژیم غذایی با مقادیر زیاد، کم و فاقد کربوهیدرات را بر عملکردهای سامانه‌ی ایمنی *M. sexta* بررسی کردند و افزایش معنی داری در تعداد کل سلول‌های خونی لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی غنی از کربوهیدرات نسبت به رژیم‌های کم ارزش مشاهده کردند. ووگل‌ویت[۵] و همکاران (۲۰۱۶)،

---

۱ Schmid-Hempel
۲ Alaux
۳ Li
۴ Adamo
۵ Vogelweith

درصدهای مختلفی از عصاره‌ی انگور را در رژیم غذایی مصنوعی شب‌پره‌ی حبه انگور *Eupoecilia ambiguella* Hbn. استفاده کردند و عملکردهای ایمنی این آفت به باکتری‌های *Bacillus cereus*، *Beauveria bassiana* و *Serratia marcescens* را بعد از تغذیه از این رژیم‌ها سنجیدند. کرامس[۱] و همکاران (۲۰۱۵) ایمنی *G. mellonella* را پس از تغذیه از سه رژیم غذایی با کیفیت بالا (غذای مصنوعی شامل عسل، موم زنبور عسل، گلیسرول، شیرخشک، آرد گندم، مخمر خشک، ذرت و آب مقطر به علاوه‌ی ۳۰ روز مصرف *ad libitum*)، کیفیت متوسط( غذای مصنوعی با کیفیت بالا به علاوه دو روز مصرف *ad libitum*) و کیفیت پایین (موم طبیعی زنبور عسل) مورد بررسی قرار دادند و تغییرات معنی داری در پاسخ کپسوله شدن میان لاروهای تغذیه کرده از این رژیم‌ها مشاهده کردند. تاثیر جنسیت بر عملکردهای ایمنی لاروهای *T. molitor* مورد مطالعه قرار گرفته است (رادهیکا[۲] و همکاران، ۱۹۹۸).

[۱] Krams
[۲] Radhika

# فصل سوم

# مواد و روش

### ۳-۱- پرورش حشرات

حشرات کامل شب‌پره‌ی هندی از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه شد و کلنی اولیه در اتاقک رشد آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود مستقر گشت. بعد از یک نسل، پرورش نسل دوم روی چهار رژیم غذایی شامل نخود و کشمش، پسته، مغز گردو و یک رژیم غذایی مصنوعی ( پودر مالت ۱۶۰ گرم،پودر جوانه گندم ۸۰۰ گرم، گلیسرول ۲۰۰ میلی‌لیتر و عسل ۲۰۰ میلی‌لیتر) (رفیعی کرهرودی و همکاران، ۱۳۸۹) انجام شد. ظروف پرورش جعبه هایی به ابعاد۱۰×۱۵×۲۰ سانتی‌متر و دارای دریچه‌ای با توری حریر ریز دو لایه بودند و در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۴۵ درصد و نسبت روشنایی به تاریکی (۱۶:۱۰) نگهداری شدند.

### ۳-۲- شناسایی سلول‌های خونی

به منظور شنا سایی سلول‌های خونی، ده عدد لارو سن پنجم شب‌پره‌ی هندی به عنوان ده تکرار انتخاب شدند. لاروها در ب شرهای ۱۵۰ میلی‌لیتری محتوی آب مقطر در دمای ۵۵-۵۰ درجه‌ی سانتی گراد قرار داده شدند و پس از مدت پنج ثانیه بردا شته شده و روی کاغذ صافی قرار گرفتند. سپس به و سیله‌ی ا سکالپل، یک پای کاذب لارو برش داده شد و مقداری از همولنف لارو را روی یک لام قرار داده و با لام دیگر یک ا سمیر تهیه شد. پس از خشک شدن، مقداری ماده رنگ‌آمیزی گیمسا (محلول ۹:۱ گیم سا و آب مقطر) روی ا سمیر قرار گرفت و پس از گذ شت ۱۲ دقیقه، جهت ش ستن محلول رنگی لام به ظرف حاوی آب مقطر وارد شده و به آرامی خارج شد. سپس لام به مدت ۵ ثانیه در کربنات لیتیم ا شباع شده قرار داده شد (این امر به منظور تثبیت رنگ سلول‌ها انجام گرفت). لام مجددا در آب مقطر شستشو داده شد (ییگر[۱]، ۱۹۴۵) و برای خشک شدن آب اضافی سطح زیرین لام به و سیله کاغذ صافی آب‌گیری شد. در نهایت انواع سلول‌ها با توجه به منابع موجود شنا سایی شدند.

[۱] Yeager

جهت م شاهده و شنا سایی سلول‌های خونی از میکرو سکوپ نوری Olympus BH2 با بزرگنمایی ۴۰ استفاده شد.

### ۳-۳- شمارش سلول‌های خونی لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره‌هندی

ابتدا برای تشـخیص سـنین مختلف لاروی کپسـول سـر لاروها به وسـیله کاغذ میلی‌متری اندازه‌گیری شد. برای شمارش سلول‌های خونی، همولنف لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم جمع‌آوری شـد. به منظور جمع آوری همولنف ابتدا یک پای کاذب به وسـیله‌ی اسـکالپل بریده شـد. بر اسـاس ضرایب رقت محاسبه شده برای هر سن لاروی، همولنف لاروهای هر سن به وسیله‌ی میکروپیپت جمع آوری شـد و با میزان معینی از بافر فیزیولوژیک رقیق شـد. ماده ضـد انعقاد به کار رفته در آزمایش محلول تایسون، ( Nacl2 72 Mm, Na2so4 9 Mm, Glycerol 43Mm, Methyl violet 0.06 Mm, Distilled water) بود (محمود و یوسـف، ۱۹۸۵). نسـبت میزان همولنف به میزان محلول تایسـون (میکرولیتر) برای سن سوم و چهارم لاروی (۹ : ۱) و برای سن پنجم لاروی ( ۳۰ : ۳) بود. شمارش سلول‌های خونی با ا ستفاده از لام نئوبار و بزرگنمایی ۴۰ میکرو سکوپ Olympus BH2 انجام شد. شمارش کل با محا سبه میانگین تعداد سلول‌های خونی موجود در ۵ خانه از لام نئوبار (هر کدام به ابعاد ۱ میلی متر مربع و عمق ۱۰) انجام شد (جونز ۱۹۶۲) :

$$\frac{\text{عمق خانه های لام گلبول شمار} \times \text{ضریب رقت} \times 1mm^2 \times \text{تعداد هموسیت ها}}{\text{تعداد خانه های شمارش شده از لام}}$$

### ۳-۴- شمارش تفرقی سلول‌های خونی

شمارش پلاسموتوسیت ها، گرانولوسیت ها، پروهموسیت ها و اونوسیتوئیدها، مانند روش شمارش کل هموسیت ها در بند ۳-۳ انجام گرفت.

### ۳-۵- بررسی تاثیر دوره‌های گرسنگی بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی در لاروهای سن پنجم شب‌پره‌ی هندی

به منظور انجام این آزمایش لاروهای سن پنجم پرورش یافته روی رژیم غذایی مصنوعی به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرسنگی دیدند این آزمایش شامل چهار تیمار شاهد، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرسنه مانده و هر تیمار شامل ۳۰ تکرار بود. تعداد کل هموسیت‌ها و تعداد پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و اونوسیتوئیدهای تکرارها شمارش شد. تجزیه داده ها در قالب طرح کاملا تصادفی با نرم افزار SAS 9.4 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

### ۳-۶- بررسی تاثیر رژیم های غذایی بر تعداد کل و تفرقی سلولهای خونی در لاروهای سن پنجم شب‌پره‌ی هندی

به این منظور از لاروهای سن پنجم که از مرحله تخم روی چهار رژیم غذایی شامل نخود و کشمش، پسته، مغز گردو و رژیم غذایی مصنوعی پرورش یافته بودند، استفاده شد. این آزمایش شامل چهار تیمار نخود و کشمش، پسته، گردو و غذای مصنوعی و هر تیمار شامل ۲۰ تکرار بود. تعداد کل هموسیت‌ها، و تعداد پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و اونوسیتوئیدهای تکرارها شمارش شد. تجزیه داده ها در قالب طرح کاملا تصادفی با نرم افزار SAS 9.4 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

### ۳-۷- بررسی تاثیر جنسیت بر تعداد کل و تفرقی سلولهای خونی در لاروهای سن پنجم شب‌پره‌ی هندی

به این منظور از لاروهای سن پنجم استفاده شد. برای هر تیمار ۲۰ تکرار در نظر گرفته شد. تعداد کل هموسیت‌ها، و تعداد پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و اونوسیتوئیدهای تکرارها شمارش شد. تجزیه داده ها در قالب طرح کاملا تصادفی با نرم افزار SAS 9.4 و مقایسه

میانگین‌ها با آزمون t-test انجام شد. به این ترتیب این آزمایش شامل دو تیمار و هر تیمار شامل ۲۰ تکرار بود.

### ۳-۸- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز

برای تعیین اثر دوره‌های گرسنگی، رژیم‌های غذایی و جنسیت روی فعالیت فنل اکسیداز لاروهای مورد آزمایش از روش هموسیت لایزیت استفاده شد (لئونارد[۱] و همکارن، ۱۹۸۵). در این روش برای هر تیمار، همولنف ۳۰ لارو سن پنجم شب‌پره‌ی هندی جمع آوری شد و در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای پنج دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ شدند. مایع رو نشین حذف شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات یک مولار (PH=۷) به رسوبات اضافه شد و سپس هموژنیزه شدند. محلول اخیر دوباره در در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رو نشین حاصل در برآوردهای آنزیمی استفاده شد. بدین منظور، ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌ها به ۵۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی‌مولار L-dihydroxyphenylalanin -L) (DOPA که سوبسترای اختصاصی آنزیم فنل‌اکسیداز است و ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات اضافه شد. و طول موج نمونه‌ها توسط دستگاه Elisa reader (ELx800) در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. آزمایش در چهار تکرار انجام شد. هر تکرار شامل مجموع همولنف ۳۰ لارو سن چهار بود که با هم مخلوط شدند. تجزیه داده های مربوط به آزمایشات اثر دوره های گرسنگی و رژیم‌های غذایی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در قالب طرح کاملا تصادفی با نرم افزار SAS 9.4 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد انجام شد. مقایسه میانگین برای آزمایش اثر جنسیت بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز با آزمون t-test انجام شد.

[۱] Leonard

# فصل چهارم

# نتایج و بحث

### ۴-۱- شناسایی سلول‌های خونی

در این تحقیق با استفاده از میکروسکوپ نوری $BH_2$، پنج نوع سلول خونی پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا شناسایی شد. این سلول‌ها شامل پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها بودند (شکل ۴-۱).

#### ۴-۱-۱- پروهموسیت‌ها

در همولنف شب‌پره‌ی هندی، پروهموسیت‌ها کوچک‌ترین سلول ها هستند. دارای هسته‌ی درشت و مرکزی به طوری که این هسته تمام فضای داخلی سلول را احاطه کرده بود و سیتوپلاسم به صورت یک لایه‌ی نازک و به حاشیه غشا کشیده شده است (شکل ۴-۱)

#### ۴-۱-۲- پلاسموتوسیت‌ها

پلاسموتوسیت‌ها از نظر طولی بزرگ‌ترین سلول‌ها هستند. این سلول‌ها بیش‌ترین فراوانی را در همولنف لاروهای سنین سه، چهار و پنجم شب‌پره‌ی هندی به خود اختصاص دادند. دارای پروفایل چندشکلی بوده و به اشکال بیضی، دوکی‌شکل با یک یا دو زائده‌ی سیتوپلاسمی کوتاه یا کشیده، دایره‌ای با سه زائده‌ی سیتوپلاسمی یا بیشتر مشاهده شدند (شکل ۴-۱).

#### ۴-۱-۳- گرانولوسیت‌ها

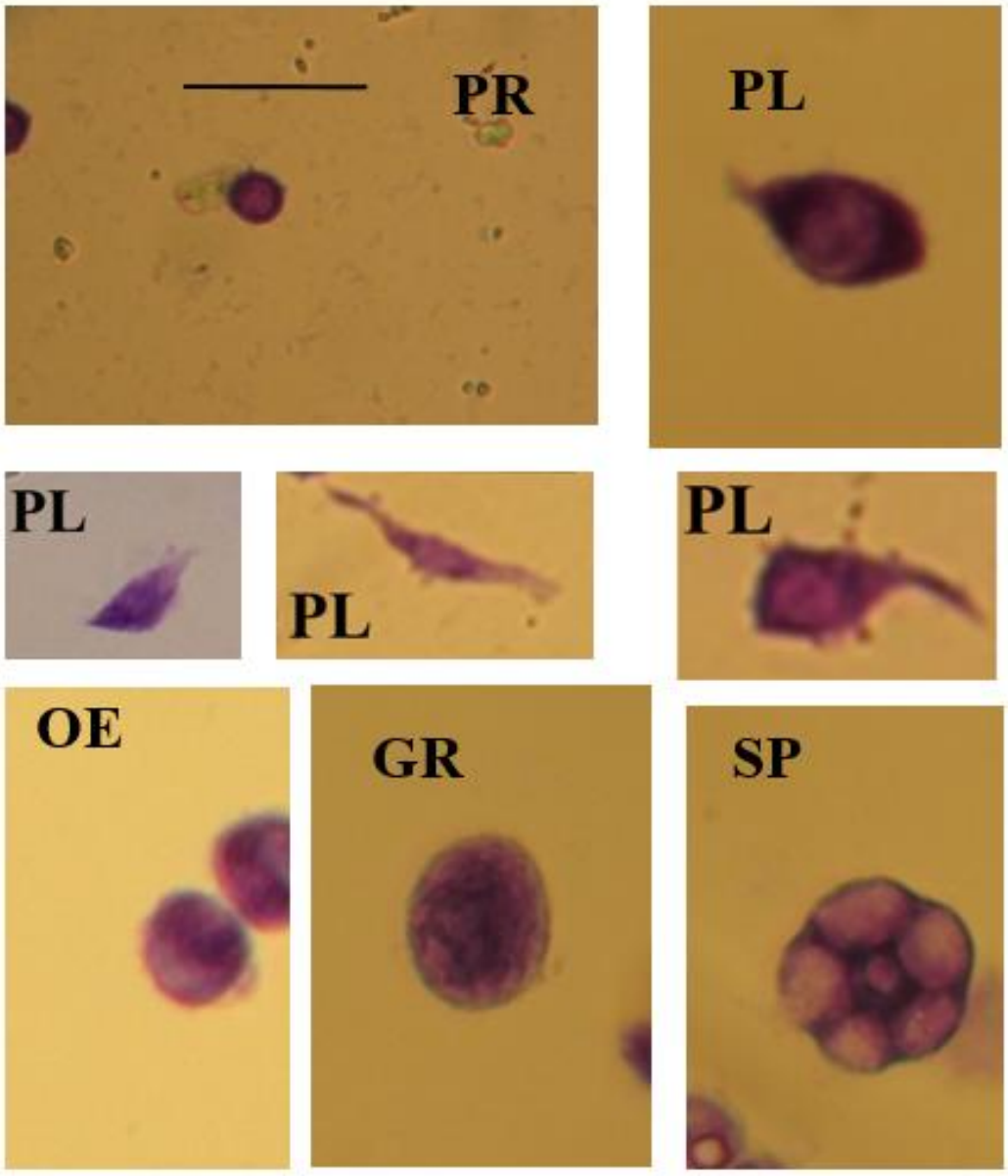
گرانولوسیت‌ها دارای بیش‌ترین فراوانی بعد از پلاسموتوسیت‌ها بودند، دارای اشکال گرد، بیضی یا تخم مرغی با هسته‌ی مرکزی و کوچک بودند. در سطح سیتوپلاسم آن‌ها گرانول‌های فراوانی مشاهده شد. گرانولوسیت‌ها در این حشره، به ابعاد کوچک و بزرگ مشاهده شدند. طبق مشاهدات اندازه‌ی آن‌ها همیشه از پلاسموتوسیت‌ها بزرگ‌تر است و در ابعاد کوچک‌تر یا بزرگ‌تر نسبت به اونوسیتوئیدها دیده شوند (شکل ۴-۱)

### ۴-۱-۴- اونوسیتوئیدها

اونوسیتوئیدها به صورت سلول‌هایی گرد، بیضی و یا تخم مرغی مشاهده شدند و از پروهموسیت ها بزرگ‌تر هستند. دارای هسته‌ی جانبی مشخصی بوده که در اثر رنگ آمیزی با گیمسا به رنگ بنفش تیره در آمده و نسبت به سیتوپلاسم خود پررنگ‌تر به نظر می‌رسند. گاه در سطح سیتوپلاسم اونوسیتوئیدها، دانه‌های کوچکی مشاهده می‌شود ولی در بیش‌تر مواقع سیتوپلاسم صاف و شفاف دارند (شکل ۴-۱).

### ۴-۱-۵- اسفرولوسیت‌ها

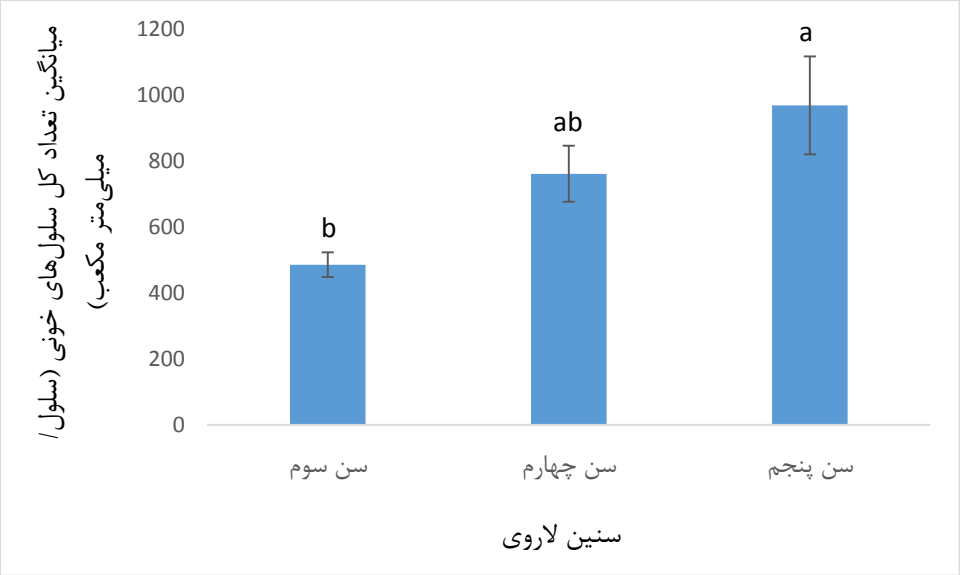
سلول‌هایی نسبتا بزرگ هستند و دارای اشکال نا منظم بوده و در سطح سیتوپلاسم خود دارای اسفرول‌های زیادی با اندازه‌های مختلف هستند. هسته کوچک بوده و به خاطر تجمع اسفرول‌ها به سختی قابل رویت بود. اسفرولوسیت‌های شب‌پره‌ی هندی دارای ظاهری کاملا مشخص به دلیل وجود اسفرول‌ها هستند و صرفا دارای همین شکل بوده و مانند اسفرولوسیت‌های سایر حشرات دارای اشکال متفاوت نیستند (الوندی و همکاران، ۲۰۱۴) (شکل۴-۱).




**شکل ۴-۱-** سلول‌های خونی شب‌پره‌ی هندی، PR=پروهموسیت، PL=پلاسموتوسیت، GR=گرانولوسیت، SP=اسفرولوسیت، OE= اونوسیتوئید

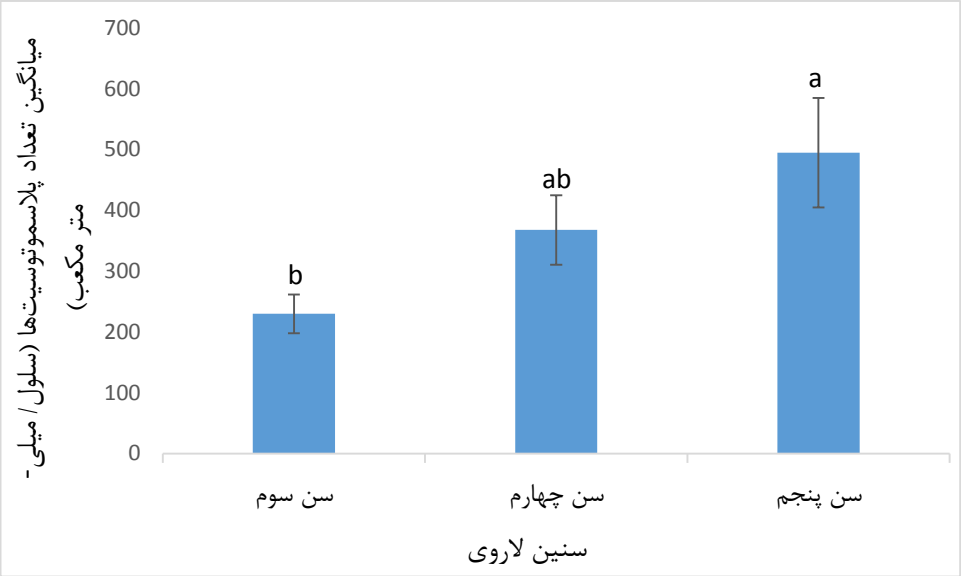
## ۴-۲- بررسی فراوانی سلول‌های خونی لاروهای سن سوم،چهارم و پنجم شب‌پره‌ی هندی

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تعداد کل سلول‌های خونی در سنین سوم، چهارم و پنجم لاروی با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند. بیش‌ترین تعداد کل مربوط به سن پنجم (۱۴۸/۳۲۲±۹۶۹/۶) و کم‌ترین میزان مربوط به سن سوم (۳۷/۶۳۷±۴۸۶) بود (P < ۰/۰۰۴۸، df = ۲ ، F = ۲/۸۶)، (شکل ۴-۲-۱).



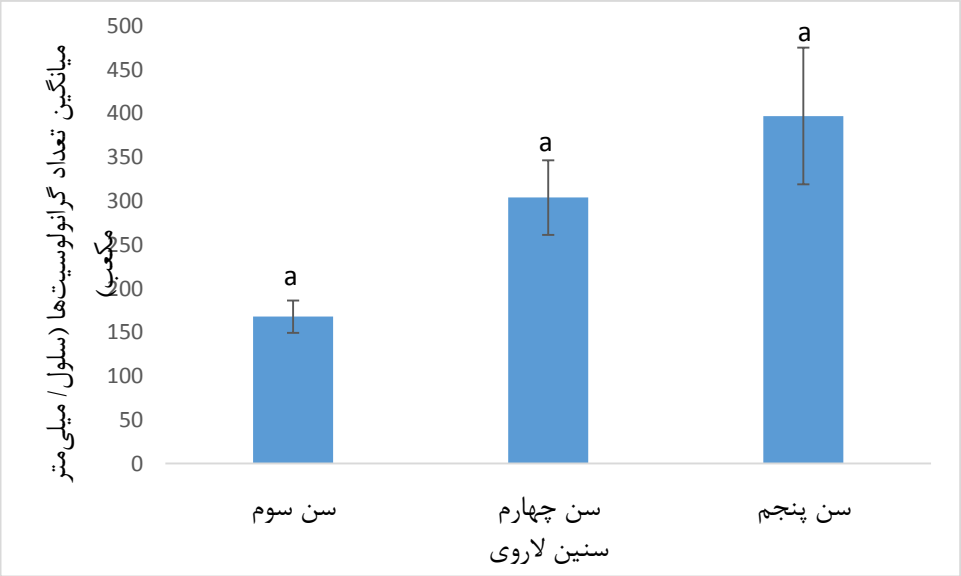

شکل ۴-۲-۱- فراوانی کل سلول‌های خونی لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره‌ی هندی

کم‌ترین تعداد پلاسموتوسیت‌ها در همولنف لارو سن سوم (۳۱/۸۹۶±۲۳۰) و بیش‌ترین تعداد در لارو سن پنجم (۸۹/۹۲۵±۴۹۵/۱) شمارش شد که دارای تفاوت معنی داری با یکدیگر بودند (P< ۰/۰۱۷۷، df = ۲ ، F = ۴/۳۳)، (شکل ۴-۲-۲).



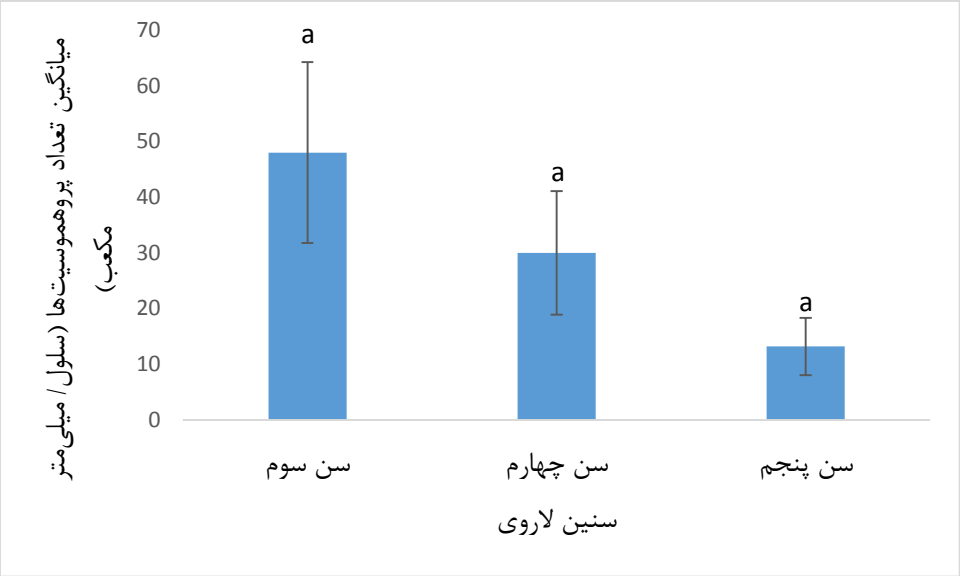

شکل ۴-۲-۲- فراوانی پلاسموتوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره‌ی هندی

اختلاف معنی داری بین تعداد گرانولوسیت‌ها در لاروهای سن سوم و چهارم و پنجم مشاهده نشد و به ترتیب برابر با ۱۸/۴۹۰±۱۶۸، ۴۲/۶۳۹±۳۰۴ و ۷۸/۱۷۰±۳۹۷/۱ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف بود ($P < ۰/۱۱۷$ ،۲ = df ، ۴/۸۱ = F) (شکل ۴-۲-۳).



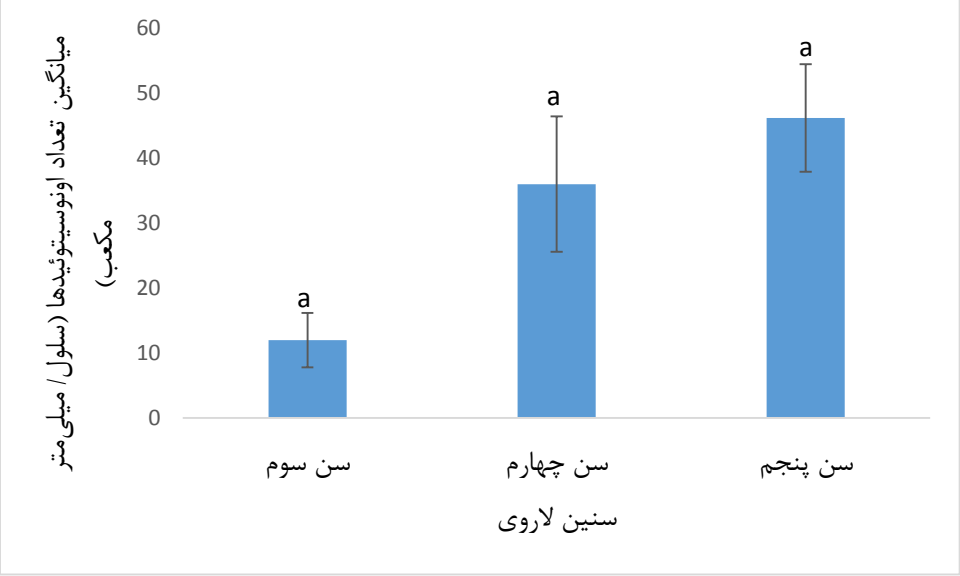

شکل ۴-۲-۳- فراوانی گرانولوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره‌ی هندی

میانگین تعداد پروهموسیت‌ها در همولنف لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم به ترتیب برابر با ۱۶/۲۴۸±۴۸، ۱۱/۰۹۸±۳۰ و۵/۱۴۷±۱۳/۲ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف بود ($P < ۰/۱۲۰۵$ ،۲ = df ، ۲/۲۰ = F) (شکل ۴-۲-۴).



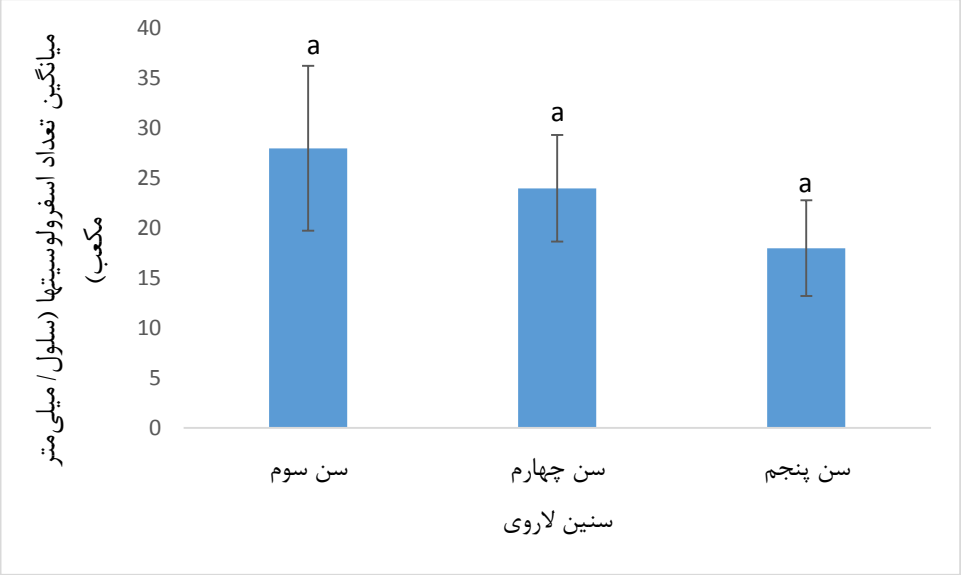

شکل ۴-۲-۴- فراوانی پروهموسیت‌ها در همولنف لاروهای سن سوم،چهارم و پنجم شب‌پره‌ی هندی

میانگین تعداد اونوسیتوئیدها به طور معنی داری با افزایش سن لاروی افزایش یافت. این مقدار در سن سوم،چهارم و پنجم لاروی به ترتیب برابر با ۴/۲۰۵±۱۲، ۱۰/۴۲۳±۳۶ و ۸/۲۷۸±۴۶/۲ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف بود ($P < ۰/۰۱۲۴$ ، $df = ۲$ ، $F = ۴/۷۵$) (شکل ۴-۲-۵).




شکل ۴-۲-۵- فراوانی اونوسیتوئیدها در همولنف لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره‌ی هندی

اختلاف معنی داری میان میانگین تعداد اسفرولوسیت‌های سنین مختلف لاروی مشاهده نشد (۰/۵۳۲ > P، ۲ = df ، ۰/ ۶۴۰ = F) (شکل۴-۲-۶).

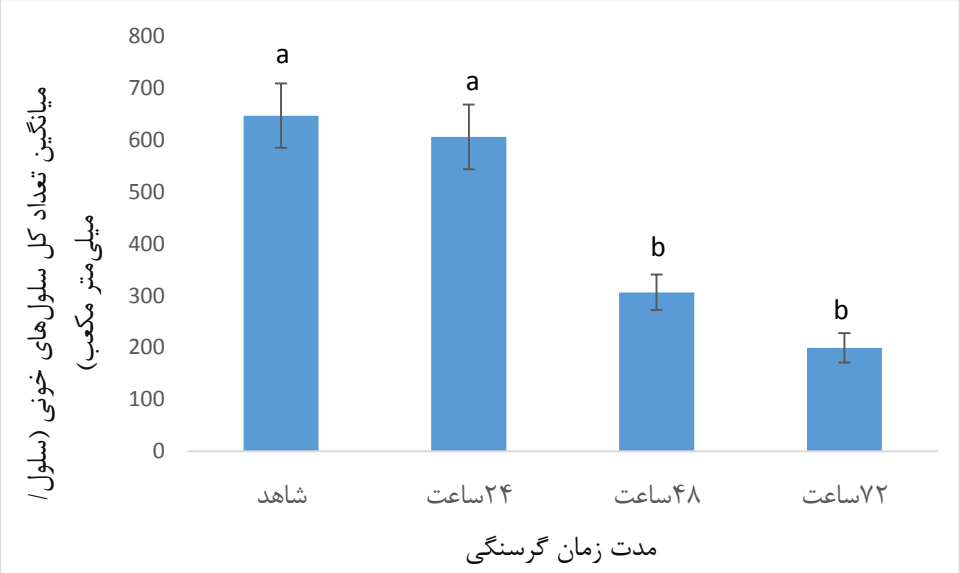



شکل ۴-۲-۶- فراوانی اسفرولوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن سوم، چهارم و پنجم شب‌پره‌ی هندی

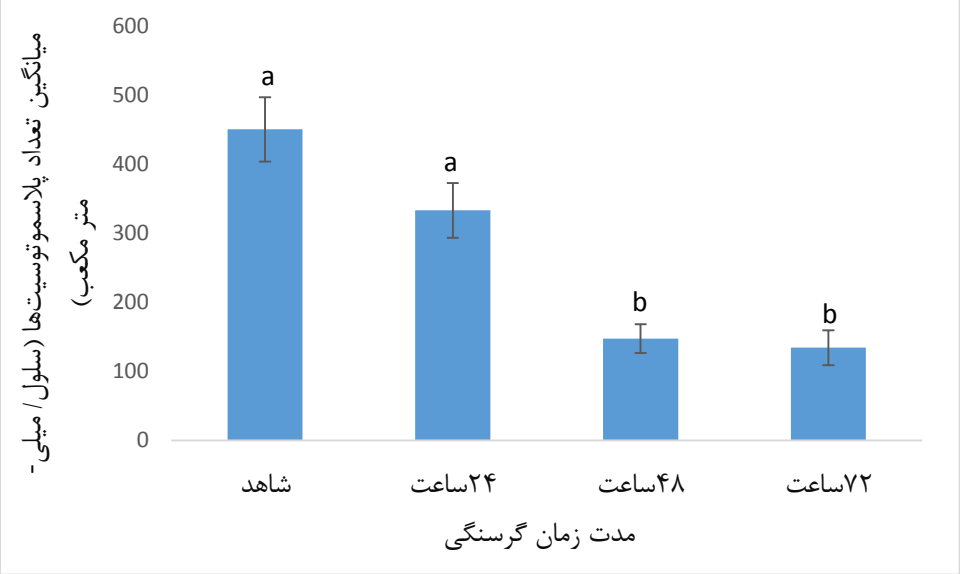
## ۴-۳- تاثیر دوره‌های گرسنگی بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی شب‌پره‌ی هندی

تاثیر دوره های گرسنگی بر تعداد کل سلول های خونی در شب پره هندی معنی‌دار بود. تعداد کل سلول های خونی (۰/۰۰۰۱ > P، ۳ = df ، ۳۴/۲۱ = F)، در لاروهای تحت تیمار ۲۴ ساعت گرسنگی، نسبت به شاهد کاهش معنی داری نداشت، ولی بعد از ۴۸ ساعت گرسنگی تعداد کل سلول-های خونی با میانگین (۶۱/۷۸±۶۴۷/۵۳) عدد در میلی‌متر مکعب همولنف به شدت کاهش یافت و به (۳۴/۲۹±۳۰۶/۵) عدد در میلی متر مکعب همولنف رسید. این تعداد در لاروهایی که ۷۲ ساعت گرسنه مانده بودند نیز به طور معنی داری کاهش پیدا کرد و به (۲۹/۲۸±۱۹۹/۴) عدد در میلی متر مکعب همولنف رسید (شکل۴-۳-۱). تعداد کل پلاسموتوسیت ها (۰/۰۰۰۱ > P، ۳ = df ، ۱۹/۳۴ = F)، بعد از ۲۴ ساعت گرسنگی تفاوت معنی داری با شاهد نداشت ولی به ترتیب بعد از ۴۸ ساعت با میانگین (۲۰/۸۵±۱۷۴/۱۴) عدد در میلی متر مکعب همولنف و بعد از ۷۲ ساعت با میانگین (۲۵/۲۵±۱۳۴/۰۴) عدد در میلی متر مکعب همولنف ، اختلاف معنی داری با شاهد (۴۶/۶۵±۴۴۹/۹۳) نشان داد. به عبارتی

پلاسموتوسیت ها در لاروهایی که مدت زمان بیشتری گرسنگی کشیده بودند نسبت به شاهد کاهش چشمگیری نشان دادند (شکل۴-۳-۲).



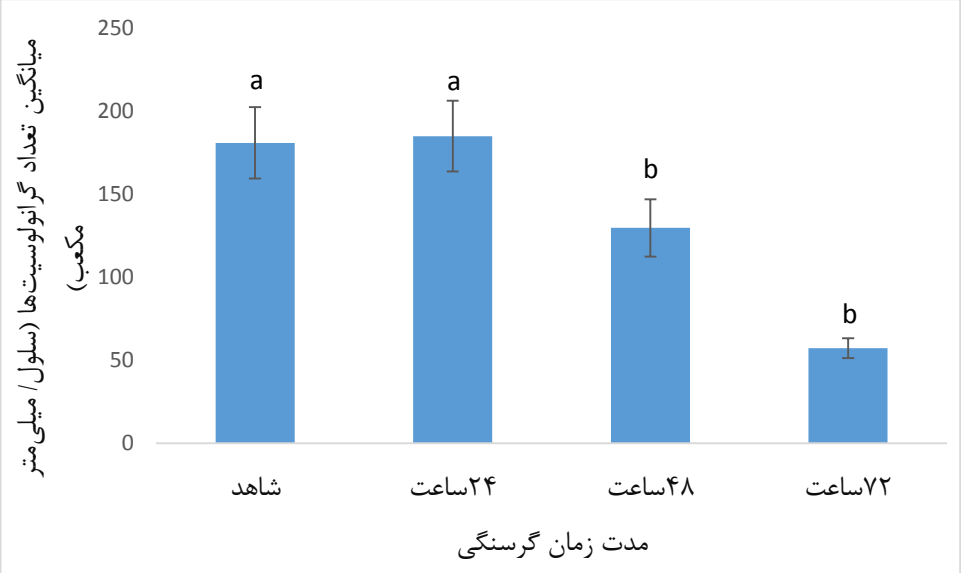

شکل ۴-۳-۱- تاثیر تنش‌های گرسنگی بر تعداد کل سلول های خونی شب‌پره هندی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)




شکل ۴-۳-۲- تاثیر تنش‌های گرسنگی بر تعداد پلاسموتوسیت‌های شب‌پره هندی (تعداد سلول در میلی‌متر مکعب)

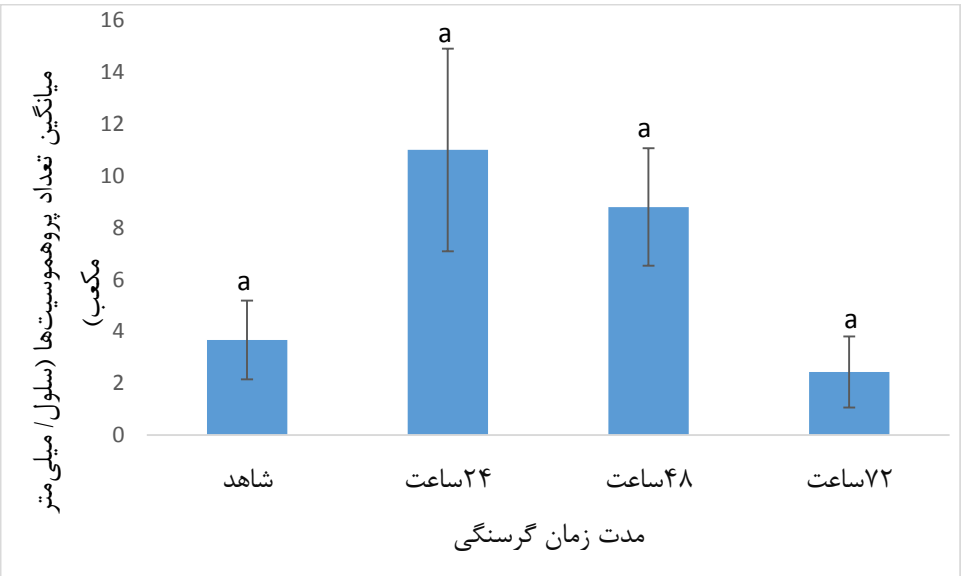
بر اساس مشاهدات تفاوت معنی‌داری در تعداد گرانولوسیت‌های لاروهایی که ۴۸ ساعت گرسنگی را تحمل کرده بودند، وجود داشت ($F = ۱۱/۳۲$ ، $df = ۳$ ،$P < ۰/۰۰۰۱$). هم‌چنین بعد از ۷۲ ساعت

تعداد کل گرانولوسیت‌ها به میانگین (۶/۰۲±۷۵/۳۳) عدد در میلی متر مکعب همولنف رسید (شکل۴-۳-۳).



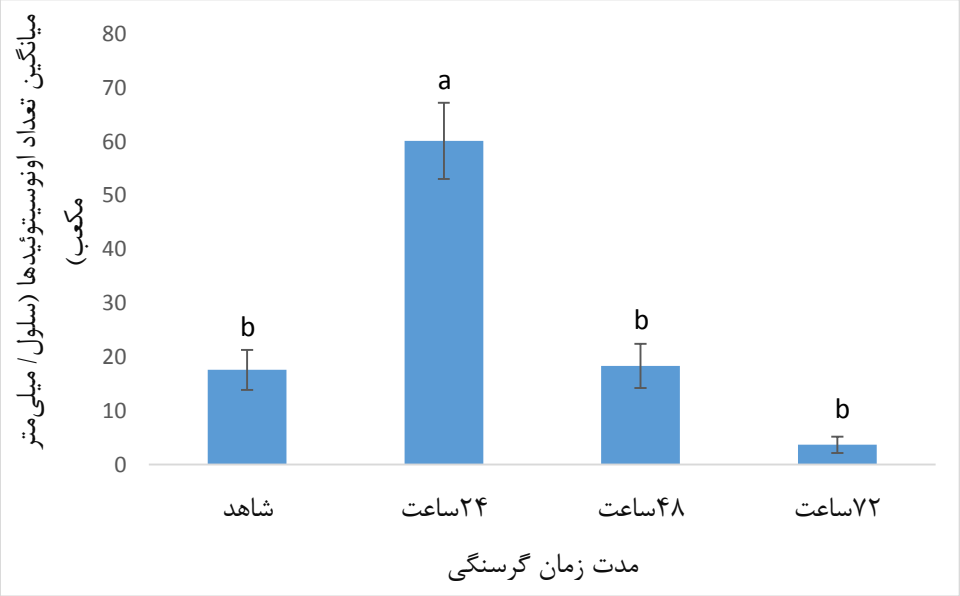

شکل ۴-۳-۳- تاثیر تنش‌های گرسنگی بر تعداد گرانولوسیت‌های شب‌پره هندی (تعداد سلول در میلی‌متر مکعب)

تعداد پروهموسیت‌ها ($F = ۲/۰۹$ ، $df = ۳$ ،$P < ۰/۰۰۰۱$) تحت تنش گرسنگی ابتدا افزایش و بعد از ۷۲ ساعت کاهش یافت. به نظر می‌رسد که پروهموسیت‌ها تحت تنش تقسیم شده و تعدادشان افزایش یافته است (شکل۴-۳-۴).




شکل ۴-۳-۴- تاثیر تنش‌های گرسنگی بر تعداد پروهموسیت‌های شب‌پره هندی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

تعداد اونوسیتوئیدها ($P < ۰/۰۰۰۱$، $df = ۳$ ، $F = ۲۸/۷۷$)، بعد از گذشت ۲۴ ساعت گرسنگی، افزایش چشمگیری نسبت به شاهد داشت، در حالی که بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان آن کاهش پیدا کرد. تعداد کل اونوسیتوئید ها در شاهد و تیمار های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرسنگی به ترتیب (۱۷/۶±۳/۷۱)، (۶۰/۱۳±۷/۰۷)، (۱۸/۳۳±۴) و (۳/۶۶±۵۲,۱) عدد در میلی متر مکعب همولنف بود (شکل۴-۳-۵).




شکل ۴-۳-۵- تاثیر تنش‌های گرسنگی بر تعداد اونوسیتوئیدهای شب‌پره هندی(تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

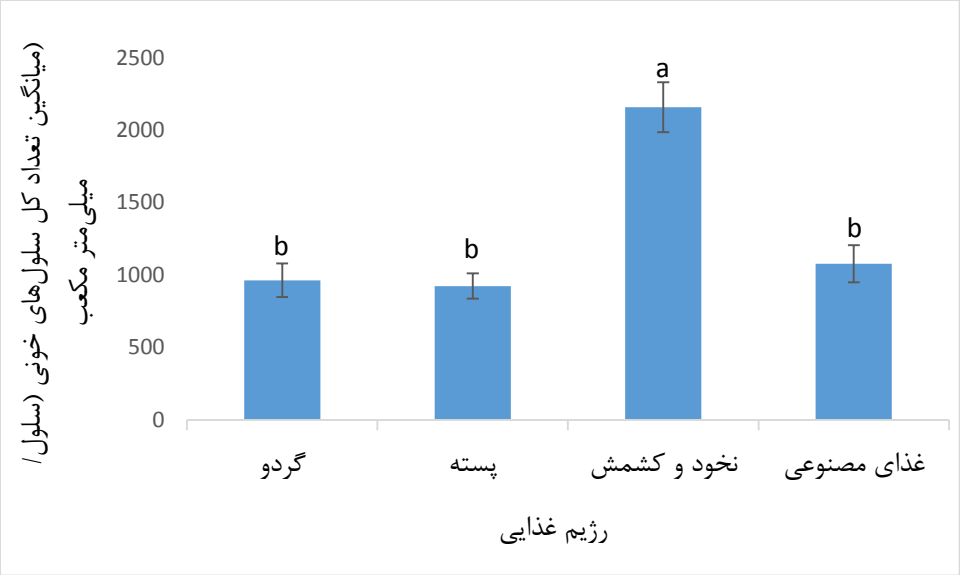
### ۴-۴- تاثیر دوره‌های گرسنگی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف شب‌پره‌ی هندی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که افزایش مدت زمان گرسنگی موجب کاهش فعالیت آنزیم فنل اکسیداز می‌شود ($F=۲۵/۰۴$، $df=۳$ ، $P <۰/۰۰۰۱$). فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در شاهد، ۰/۶۸۲±۰/۰۸۹ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود که به طور معنی داری از میزان فعالیت آن در لاروهای تحت تنش گرسنگی بیش‌تر است. فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لاروهای تحت تنش‌های گرسنگی به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به ترتیب برابر با ۰/۱۶۳±۰/۰۱۶، ۰/۱۸۳ ±۰/۰۱۹ و ۰/۱۷۶±۰/۰۱۱ تعیین شد (شکل ۴-۴).

شکل ۴-۴- تاثیر دوره‌های گرسنگی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف شب‌پره‌ی هندی

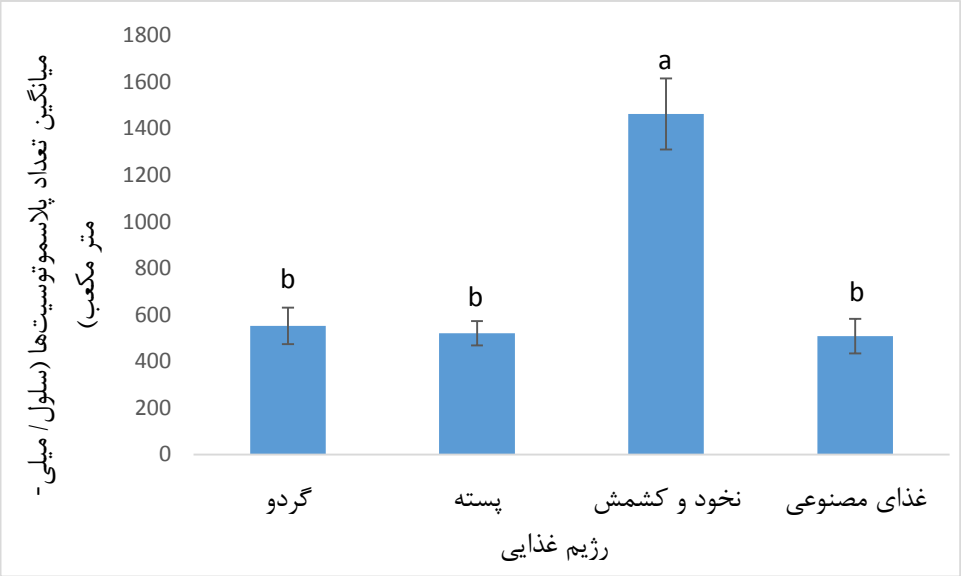
### ۴-۵- تاثیر رژیم‌های غذایی بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی شب‌پره‌ی هندی

نتایج نشان داد که نوع غذا بر تعداد سلول های خونی لاروهای شب‌پره‌ی هندی موثر است. بیش‌ترین تعداد کل سلول های خونی ($P < ۰/۰۰۰۱$ ،$df = ۳$ ،$F = ۲۰/۶۰$)، مربوط به رژیم غذایی نخود و کشمش با میانگین (۱۷۲/۵۸±۲۱۵۸/۱) عدد در میلی متر مکعب همولنف بود. تعداد کل سلول های خونی در لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی مصنوعی، گردو و پسته به ترتیب برابر با (۱۰۷۸±۱۲۸/۱)، (۹۶۳±۱۱۶) و (۹۲۴±۸۷/۳۳)عدد در میلی متر مکعب همولنف، بود (شکل۴-۵-۱).



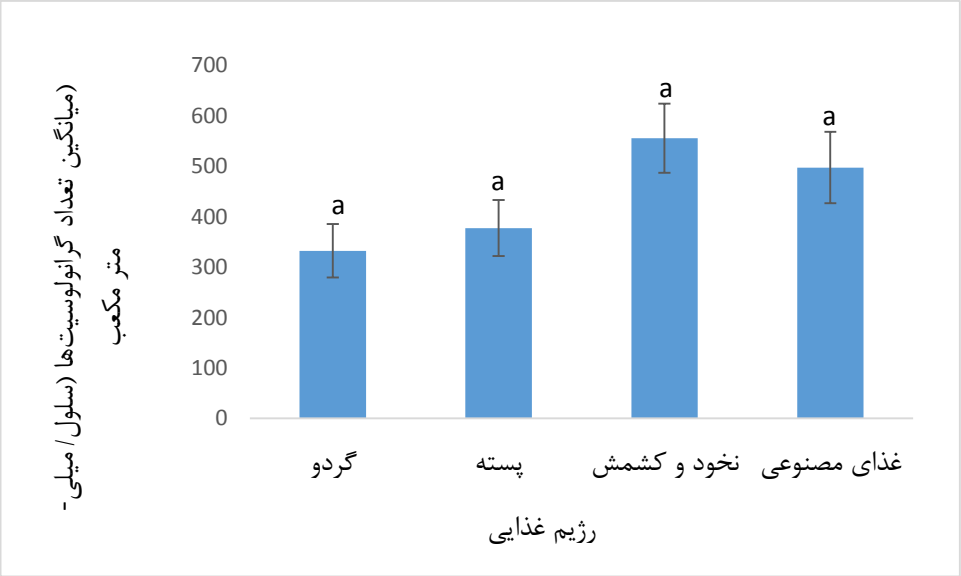

شکل ۴-۵-۱- تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر تعداد کل سلول های خونی شب‌پره هندی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

بیش ترین تعداد کل پلاسموتوسیت ها ($P < ۰/۰۰۰۱$ ،$df = ۳$ ، $F = ۲۳/۱۷$)، مربوط به لاروهایی بود که از رژیم غذایی نخود و کشمش تغذیه کردند. تعداد پلاسموتوسیت‌ها در لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی مصنوعی در جایگاه دوم قرار داشت و تعداد پلاسموتوسیت‌ها در لاروهای تغذیه کرده از گردو و پسته کاسته شد (شکل ۴-۵-۲).

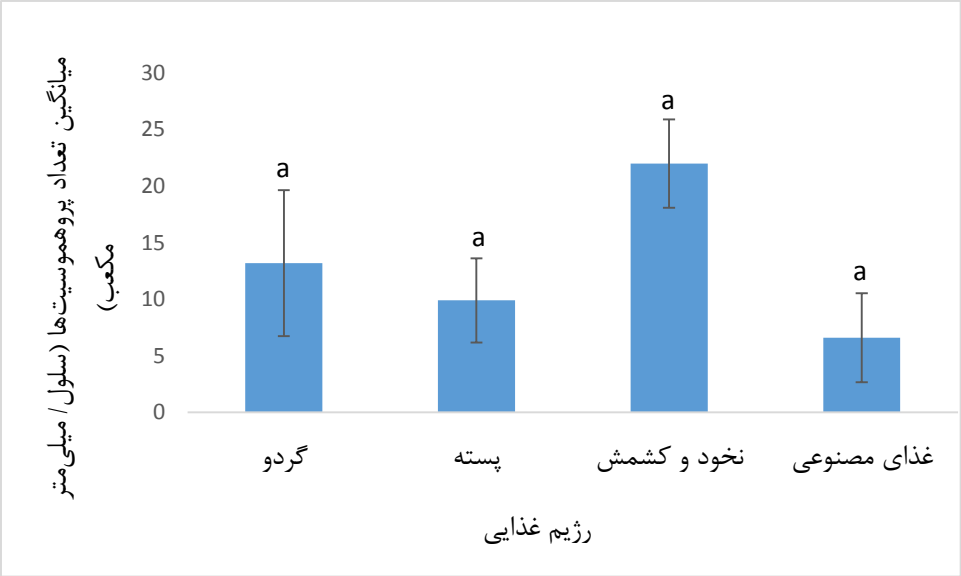



شک۴-۵-۲- تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر تعداد پلاسموتوسیت‌های شب‌پره هندی (تعداد سلول در میلی‌متر مکعب)

تعداد گرانولوسیت‌ها و پروهموسیت‌ها در لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های غذایی مختلف، اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند. مشاهدات نشان می دهد که نوع غذا روی تعداد گرانولوسیت‌ها و پروهموسیت-های این حشره بی‌تاثیر بوده است (شکل ۴-۵-۳ و ۴-۵-۴).

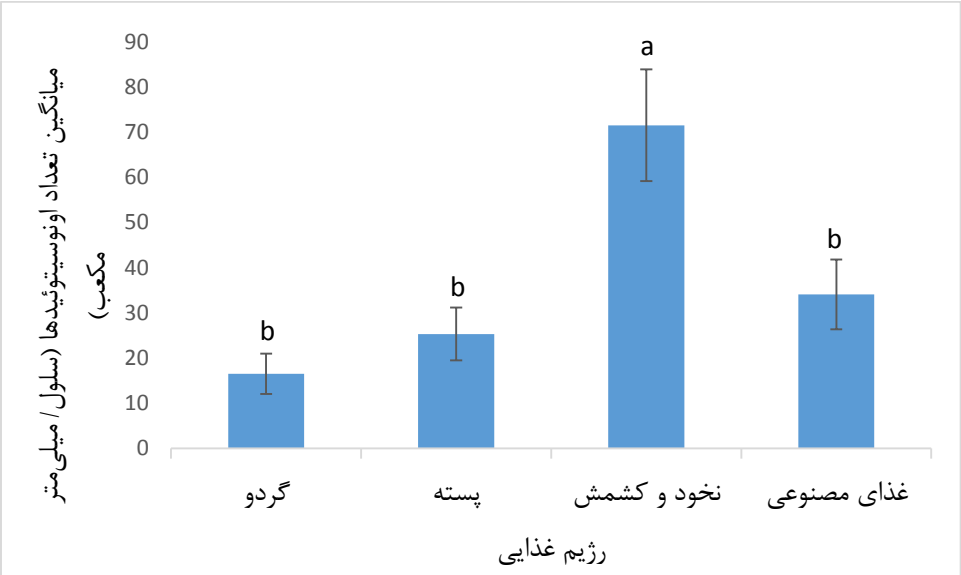



شکل ۴-۵-۳- تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر تعداد گرانولوسیت‌های شب‌پره هندی (تعداد سلول در میلی‌متر مکعب)




شکل ۴-۵-۴- تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر تعداد پروهموسیت‌های شب‌پره هندی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

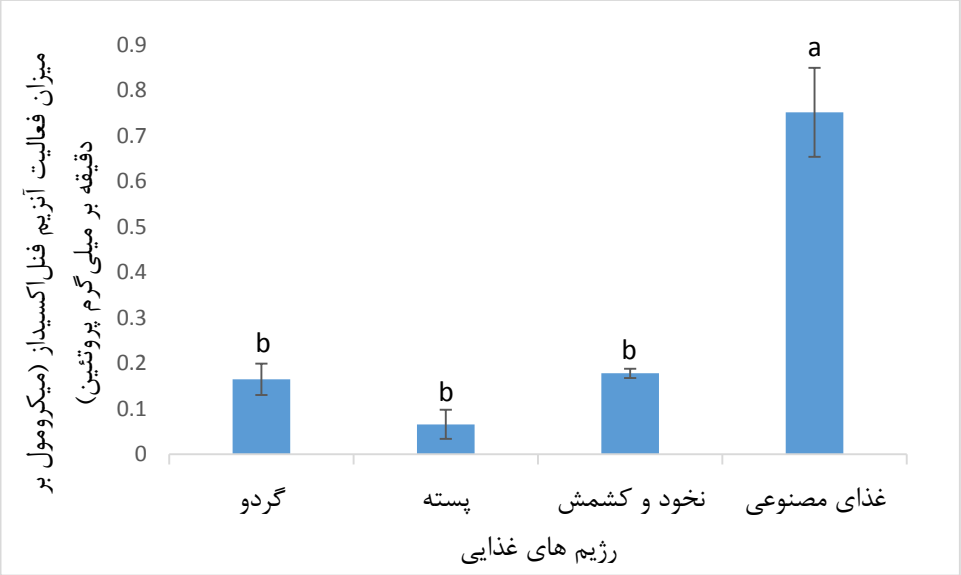
رژیم های غذایی بر تعداد اونوسیتوئیدها به طور معنی داری ($P < ۰/۰۰۰۱$، $df = ۳$ ، $F = ۸/۷۹$) ، تاثیر داشت به طوری که فراوانی این سلول‌ها در لاروهای تیمار نخود و کشمش با میانگین (۱۲/۳۵±۷۱/۵۰) عدد در میلی‌متر مکعب همولنف، بیشتر از همه مشاهده شد که با سایر رژیم‌ها دارای اختلاف معنی داری بود. اونوسیتوئیدها در لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذای مصنوعی، پسته و گردو به ترتیب برابر با (۷/۷۳±۳۴/۱۰)، (۵/۸۴±۲۵/۳۰) و (۴/۴۸±۱۶/۵۰) عدد در میلی‌متر مکعب همولنف بود (شکل ۴-۵-۵).




شکل ۴-۵-۵- تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر تعداد اونوسیتوئیدهای شب‌پره هندی(تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

### ۴-۶- تاثیر رژیم‌های غذایی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف شب‌پره‌ی هندی

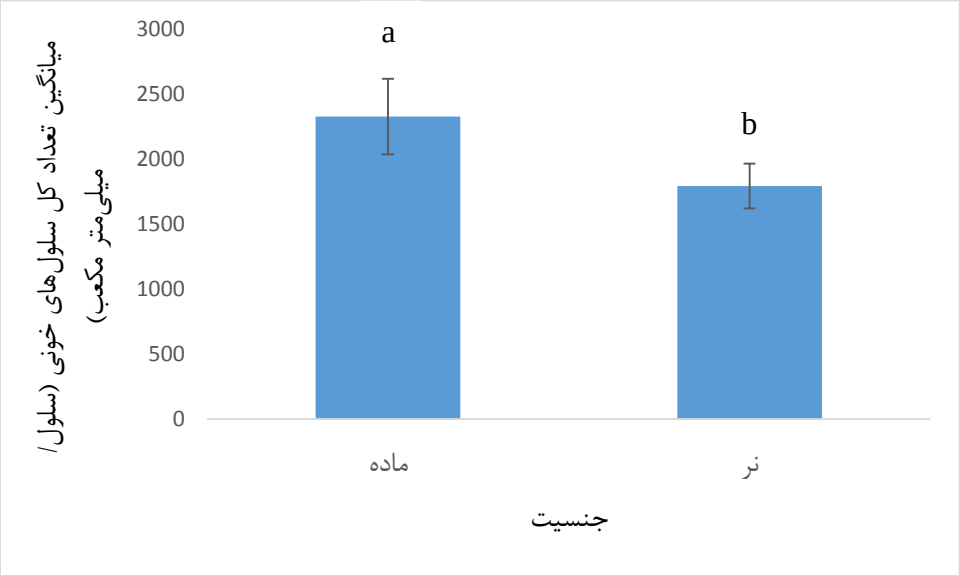
نتایج نشان داد که نوع تغذیه می‌تواند بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز موثر باشد. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لاروهای تغذیه کرده از غذای مصنوعی (P<۰/۰۰۰۱، F=۳ ،df= ۳۲/۶۱) با میانگین ۰/۰۹۸±۰/۷۵۲ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود که به طور معنی داری از سایر رژیم‌های غذایی بیش‌تر بود. میزان فعالیت این آنزیم در لاروهای تغذیه کرده از سه رژیم غذایی نخود و کشمش، گردو و پسته به ترتیب ۰/۰۱۰±۰/۱۷۸، ۰/۰۳۴۶±۰/۱۶۵ و ۰/۰۸۹±۰/۰۶۶ بود (شکل ۴-۶).



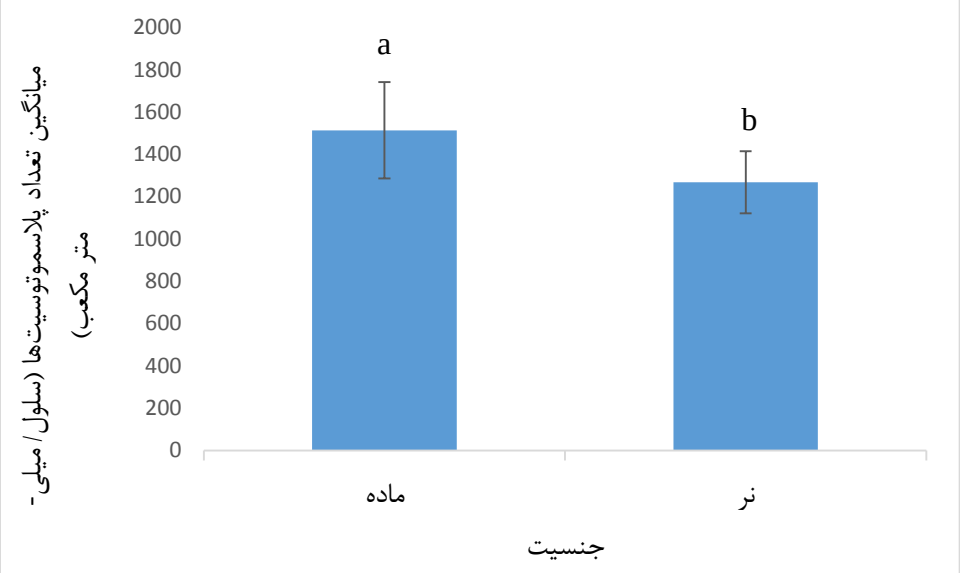

شکل ۴-۶- تاثیر رژیم‌های غذایی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف شب‌پره‌ی هندی

### ۴-۷- تاثیر جنسیت بر تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی شب‌پره هندی

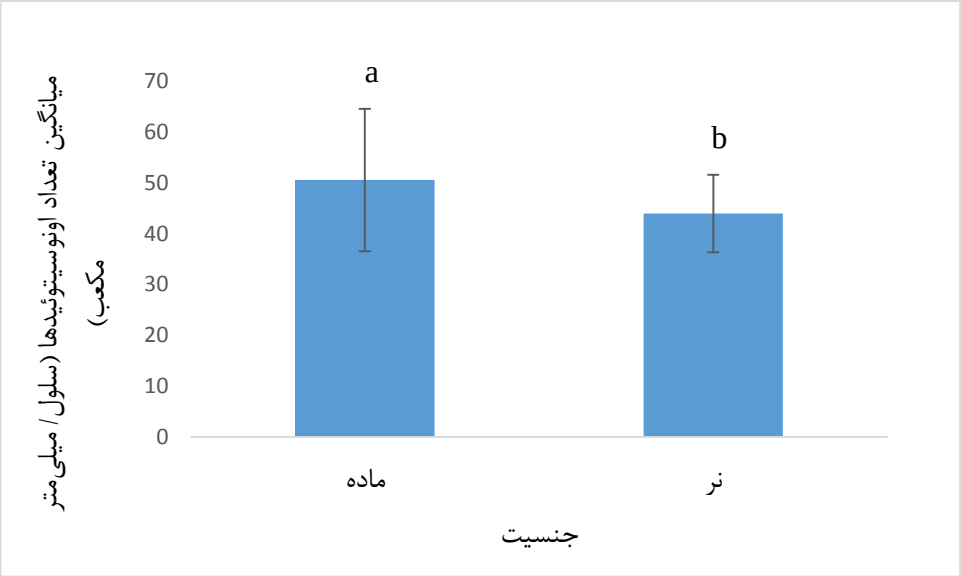
طبق نتایج تعداد کل سلول‌های خونی (P = ۰/۰۲۸، t = ۱/۵۸) در جنس ماده (۲۹۰/۴۳±۲۳۳۰) به طور معنی داری بیش‌تر از جنس نر (۱۷۲/۶۱±۱۷۹۵/۲) بود (شکل ۴-۷-۱) هم‌چنین تعداد پلاسموتوسیت‌ها (P = ۰/۰۲۸، t = ۱/۵۸)، تعداد اونوسیتوئیدها (P = ۰/۰۱۱، t = ۰/۴۱)، و تعداد گرانولوسیت ها (P = ۰/۰۰۲۵، t = ۲/۴۷) در جنس ماده به طور معنی داری بیش‌تر از جنس نر بود (شکل ۴-۷-۲ و ۴-۷-۳ و ۴-۷-۴). ولی در تعداد پروهموسیت‌ها (P = ۰/۱۵۹، t = -۱/۰۵) اختلاف معنی داری میان جنس نر و ماده مشاهده نشد (شکل ۴-۷-۵).



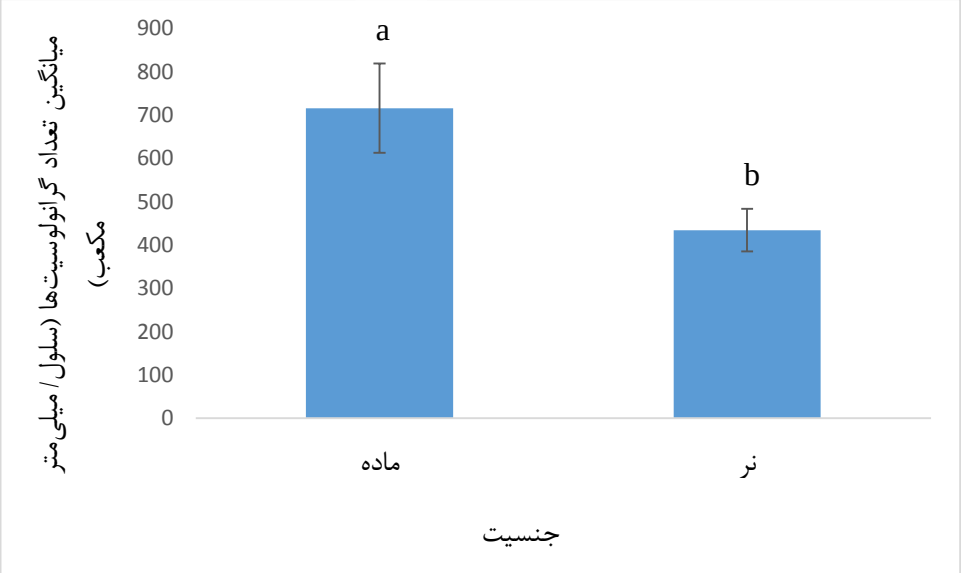

شکل ۴-۷-۱- تاثیر جنسیت بر تعداد کل سلول‌های خونی شب‌پره هندی



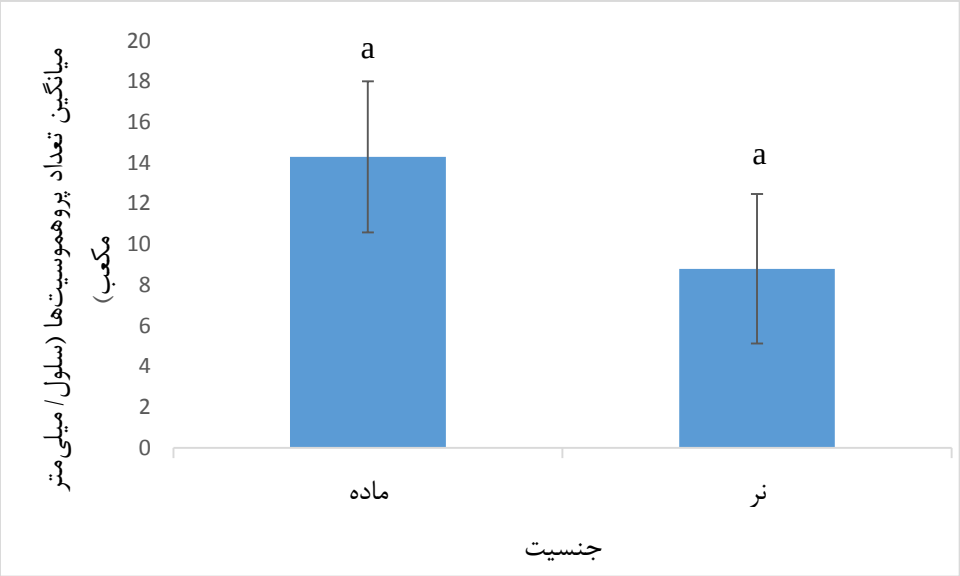

شکل ۴-۷-۲- تاثیر جنسیت بر تعداد پلاسموتوسیت‌های شب‌پره هندی




شکل ۴-۷-۳- تاثیر جنسیت بر تعداد اونوسیتوئیدهای شب‌پره هندی



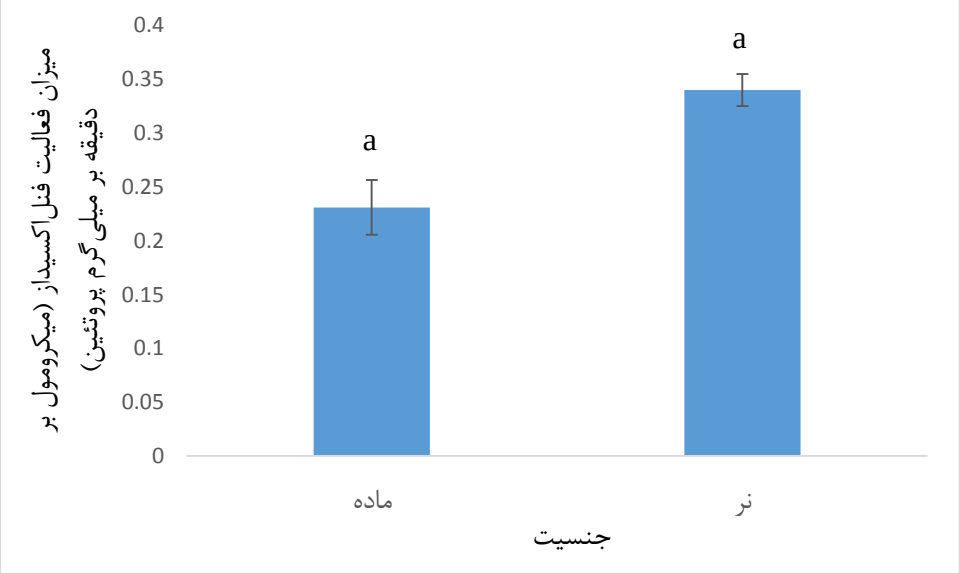

شکل ۴-۷-۴- تاثیر جنسیت بر تعداد گرانولوسیت‌های شب‌پره هندی




شکل۴-۷-۵- تاثیر جنسیت بر تعداد پروهموسیت‌های شب‌پره هندی

## ۴-۸- تاثیر جنسیت بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف شب‌پره‌ی هندی

فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز (P = ۰/۵۰۷، t = -۳/۷۳) در لاروهای نر و ماده شب‌پره‌ی هندی محاسبه شد و اختلاف معنی داری میان جنس و نر ماده نشان نداد. فعالیت این آنزیم در جنس ماده برابر با ۰/۲۳۱±۰/۰۲۵ و در جنس نر ۰/۳۴±۰/۰۱۵ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود (شکل ۴-۸).




شکل ۴-۸- تاثیر جنسیت بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف شب‌پره‌ی هندی

## ۴-۹- بحث

نتایج تحقیق حاضر وجود پنج نوع سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها را در خون لاروهای شب‌پره‌ی هندی اثبات کرد. این نتایج با طبقه بندی سلول‌های خونی توسط استرند و پچ (۱۹۹۵) و کلیدهای معتبر شناسایی سلول‌های خونی مانند کلید گوپتا (۱۹۹۱) مطابقت دارد.

شناسایی سلول‌های خونی در گروه‌های مختلف جانوران مورد مطالعه قرار گرفته است. به عنوان مثال وضعیت سلول‌های خونی در بندپایان، سخت پوستان و نرم تنان بررسی شده است. چنانچه در عنکبوت *Xrolycosa nemoralis* Westring سلول‌های خونی با توجه به ساختار داخلی خود به دو دسته تقسیم شده‌اند. این سلول‌ها دارای گرانول‌های فراوان (احتمالا همان گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها) و سلول‌هایی فاقد گرانول (احتمالا همان پروهموسیت ها) هستند (استالمچ[1] و همکاران، ۲۰۱۵). پاتیل و شاه[2] (۲۰۱۲) با بررسی وضعیت سلول‌های خونی عقرب *Heterometrus xanthopus* Pocock، شکل-شناسی و فراوانی هفت نوع سلول خونی را بررسی کردند. این سلول‌ها شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها، آدیپوهموسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و کواگولوسیت‌ها بودند. بیش‌ترین فراوانی در میان سلول‌های خونی *H.xanthopus* مربوط به پلاسموتوسیت‌ها و و کم‌ترین فراوانی مربوط به اونوسیتوئیدها و آدیپوهموسیت‌ها بوده است. مطالعات صورت گرفته روی ایمنی حلزون‌ها نشان داده‌اند که معمولا سه نوع سلول خونی در همولنف آن‌ها یافت می‌شود. این سلول‌ها شامل سلول‌های گرد، هیالونوسیت‌ها (دارای ساختار هیالینی) و گرانولوسیت‌ها (دارای گرانول‌های سیتوپلاسمی) هستند (هین[3] ۱۹۹۹، دوناگی[4] و همکاران، ۲۰۰۹). در اختاپوس *Octopus* Cuvier

[1] Stalmach
[2] Patil, shah
[3] Hine
[4] Donaghy

*vulgaris* دو دسته سلول‌خونی شامل گرانولوسیت‌ها با هسته U شکل و گرانولوسیت‌های کوچک با هسته گرد و بزرگ، توسط کاستلانوس-مارتینز[۱] (۲۰۱۴) شناسایی شده‌اند.

هم‌چنین مطالعه‌ی هموسیت‌ها در گروه‌های مختلف حشرات گزارش شده است. در مگس سرکه *Drosophila melanogaster* L. ثابت شده است که سه نوع سلول خونی شامل لاملوسیت‌ها، سلول‌های کریستالی و پلاسموتوسیت‌ها در همولنف وجود دارد (میستر و لاگوکس[۲]، ۲۰۰۳). پال و کومار[۳] در سال ۲۰۱۴، با هدف مقایسه وضعیت سلول‌های خونی سه گونه از دوبالان زیر راسته‌ی سیکلورافا، پنج نوع سلول خونی را در این سه گونه شناسایی کردند. این دو بالان شامل *Sarcophaga ruficornis* Fab.، *Musca domestica* L. و *Chrysoma megacephala* Fab. بودند. پنج نوع سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها در دوبالان مذکور مشاهده شدند. شمارش تفرقی سلول‌های خونی این سه گونه از دوبالان نشان داد که تعداد پروهموسیت-ها در طول مراحل لاروی کاهش یافته است در حالی که تعداد پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها در این بازه افزایش یافته است. این نتیجه گیری تا حدودی موید نتیجه پژوهش حاضر است زیرا افزایش تعداد ایمنوسیت‌های شب‌پره‌ی هندی با افزایش سن لاروی افزایش یافت و تعداد پروهموسیت‌ها در سنین آخر لاروی کم‌ترین میزان خود را نشان داد. هیلیر[۴] و استرند (۲۰۱۴) در راستای بررسی پاسخ ایمنی سلولی پشه‌های خانواده Culicidae، تنها سه نوع سلول خونی شامل گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئید-ها و پروهموسیت‌ها را شناسایی کردند. در سرخرطومی حنایی نخل *Rhynchophorus ferrogineus* (Olivier) پنج نوع هموسیت شناسایی شده است. این سلول‌ها شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها هستند. بیش-ترین فراونی سلول‌های خونی در همولنف سرخرطومی حنایی نخل مربوط به پلاسموتوسیت‌ها و

[۱] Castellanos-Martínez
[۲] Lagueux
[۳] Pal, Kumar
[۴] Hillyer

گرانولوسیت‌ها بوده است ( ماناچینی و همکاران، ۲۰۱۱). با توجه به این که تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به عنوان ایمنوسیت‌های موجود در همولنف، بیش‌ترین درصد را در همولنف شب‌پره‌ی هندی به خود اختصاص داده اند، نتایج بررسی ایمنی سرخرطومی حنایی نخل می‌تواند نتایج تحقیق حاضر را تایید کند. کهن و همکارن (۲۰۱۲) با هدف شناسایی و شمارش کل و تفرقی سلول‌های خونی مراحل مختلف زندگی سوسک برگ‌خوار نارون *X. luteola* پنج نوع سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها در همولنف سوسک برگ‌خوار نارون مشاهده کردند که این نتایج مشابه تحقیق حاضر است. با شناسایی سلول‌های خونی *Protaetia brevitarsis* (Kolbe) مشخص شد که شش نوع سلول خونی در همولنف این سوسک وجود دارد. این سلول‌ها شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و آدیپوهموسیت‌ها می‌باشند. در این سوسک بیش‌ترین تعداد سلول‌های خونی مربوط به آدیپوهموسیت‌ها بوده است در صورتی که در شب‌پره هندی آدیپوهموسیت مشاهده نشده است (کن[۱] و همکاران ۲۰۱۴). خسروی و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی وضعیت سلول‌های خونی زنبور *Arge ochropus* Gmelin چهار نوع سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها را مشاهده کردند. بیش‌ترین فراوانی مربوط به پلاسموتوسیت‌ها بود. تعداد کل هموسیت‌های این زنبور در طول مراحل رشدی متغیر بود و در مرحله شفیرگی به اوج خود رسید ولی بعد از شفیرگی به آهستگی کاهش یافت. مرفولوژی سلول‌های خونی این زنبور تا حد زیادی مشابه شب‌پره هندی بود ولی در این زنبور پروهموسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها گزارش نشده اند.

به طور کلی در خون لاروهای بال‌پولک‌داران عموما پنج تیپ سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها گزارش شده است. بر اساس طبقه بندی‌هایی که تا کنون صورت گرفته است، تعداد، نوع، عملکرد و سایز سلول‌های خونی در بال‌پولک‌داران

[۱] Kwon

مختلف، دارای شباهت‌ها و تفاوت هایی است. به عنوان مثال در سال ۱۹۸۷، دیویس[۱] و همکاران در راستای بررسی ایمنی سلولی کرم جوانه تنباکو *Heliothis virescens* Fabricius، پنج نوع سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها را مشاهده کردند. آن‌ها پلاسموتوسیت‌ها را به عنوان تنها سلول خونی دارای وسیله حرکتی که همان زوائد سیتوپلاسمی هستند معرفی کردند. در تحقیق حاضر، همه‌ی این پنج نوع سلول در همولنف لاروشب-پره‌هندی نیز مشاهده شدند و تا حد زیادی از نظر شکل‌شناسی مشابه سلول های خونی *H. virescens*، بودند. اسفرولوسیت های کرم جوانه تنباکو و شب‌پره‌ی هندی از نظر شکل ظاهری شباهت بسیار زیادی دارند. به علاوه که پروفایل چندشکلی در پلاسموتوسیت‌های هر دوی این بال‌پولک‌داران گزارش شده است.

جلالی و صالحی (۲۰۰۸) در تحقیقی جهت شناسایی و بدست آوردن تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی پروانه برگ‌خوار مرکبات *Papilio demoleus* L. بر اساس طبقه بندی سلول‌های خونی توسط جونز(۱۹۶۲)، شش نوع سلول خونی در پروانه‌ی برگ‌خوار مرکبات شامل پنج نوع سلول خونی رایج بال پولک داران به علاوه‌ی آدیپوهموسیت‌ها مشاهده کردند. هم چنین دو نوع دیگر از سلول‌های خونی یعنی ورمیسیت‌ها و پودوسیت‌ها را که نوعی پلاسموتوسیت هستند در همین پروانه شناسایی کردند. در این بررسی روند کاهشی تعداد پروهموسیت‌ها با افزایش سن لاروی موید نتایج بدست آمده از پروهموسیت های شب‌پره هندی است. اگر چه در شب‌پره‌ی هندی بیش‌ترین تعداد سلول خونی در سنین پایین به ایمنوسیت ها اختصاص داشت اما در پروانه‌ی برگ‌خوار مرکبات پروهموسیت‌ها بیش‌ترین درصد سلول‌های خونی را در سن اول لاروی به خود اختصاص داده اند. درصد فراوانی پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت ها در همولنف پروانه‌ی برگ‌خوار مرکبات با افزایش سن لاروی افزایش پیداکرده است، در تحقیق حاضر نیز همین نتایج به جز برای اسفرولوسیت در همولنف شب‌پره هندی مشاهده شد. خسروی و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی سلول‌های خونی شب‌پره‌ی خرنوب

[۱] Davies

*E. ceratoniae* نشان دادند، که درصد پروهموسیت‌ها در سن اول لاروی بیش‌ترین میزان را نسبت به سنین لاروی بالاتر دارد ولی درصد سایر سلول‌هایی خونی در سن آخر بیش‌ترین میزان را داشته اند. در تحقیق حاضر نیز با افزایش سن لاروی درصد همه سلول‌های خونی به جز پروهموسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها، افزایش یافته است. از نظر شکل ظاهری پلاسموتوسیت‌ها در شب‌پره‌ی خرنوب فاقد گرانول گزارش شده‌اند، در حالی که در همولنف لارو شب‌پره‌ی هندی پلاسموتوسیت ها اغلب دارای گرانول بودند. در نتیجه‌ی شناسایی سلول‌های خونی لارو سن چهارم *Agrotis ipsilon* Hufnagel نیز پنج سلول مذکور مشاهده شدند و ویژگی‌های شکل شناسی آن‌ها بیان شد (آواد[1]، ۲۰۱۲). سلول‌های خونی شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella* Zell. شامل پنج سلول اصلی به علاوه پودوسیت ها و ورمیسیت‌ها بود. تعداد کل سلول‌های خونی به تدریج با افزایش سن لاروی بیش‌تر شد و در شفیره به اوج خود رسید. ایمنوسیت‌ها فراوان ترین سلول‌های خونی در تمامی مراحل رشدی بودند (قاسمی و همکاران، ۲۰۱۳). تمامی این نتایج در مورد شب‌پره‌ی آرد با نتایج مشابه به‌دست آمده از شب‌پره هندی مطابقت داشت. مطالعات انجام شده روی برگ‌خوار سفید اشجار *Hyphantrie cunea* (Drury)، توسط عجم حسنی و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که پنج نوع سلول خونی اصلی در همولنف این حشره وجود دارد. با بررسی فراوانی سلول‌های خونی شب‌پره‌ی هندی نتایجی شبیه به هموگرام برگ‌خوار سفید اشجار بدست آمد. به طوری که از نظر شکل و اندازه سلول‌های خونی، این دو حشره تا حدودی به یکدیگر شباهت دارند. در مطالعات عجم حسنی (۱۳۹۳) پنج نوع سلول خونی در پروانه‌ی *Utethesia pulchella* L. شناسایی شد. درصد فراوانی ایمنوسیت‌ها و شکل ظاهری سلول های خونی این شب‌پره شباهت زیادی به شب‌پره هندی دارد. خسروی و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعاتی که روی سلول‌های خونی برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis* Walker انجام دادند، نیز حضور پنج نوع سلول خونی اصلی بال‌پولک‌داران را تایید کردند. سلول‌های خونی این پروانه نیز به لحاظ شکل ظاهری و فراوانی مشابه

[1] Awad

ریخت شناسی و تراکم شب‌پره هندی بود. طی مطالعات انجام شده توسط زیبایی و ملاگلی[۱] (۲۰۱۴) کرم ساقه خوار برنج *Chilo suppresalis* Walker دارای سلول‌های خونی پایه یعنی پروهموسیت‌ها، ایمنوسیت‌ها یعنی پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، و دو سلول دیگر شامل اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها بودند. فعالیت ایمنی این سلول‌ها در ایمنی ساقه‌خوار برنج در برابر *bassiana Beauveria*، *Metarhizium anisopliae*، *Isaria fumosoroseus* و *Lecanicilium lecanii* بالا ارزیابی شد به طوری که این حشره از دفاع خوبی در برابر تنش‌ها برخوردار می‌باشد. عجم‌حسنی در سال ۱۳۹۴ برای اولین بار ۵ نوع هموسیت اصلی بال‌پولک‌داران را در مراحل مختلف لاروی، شفیرگی و بالغ کرم شاخ‌دار فرفیون *Hyles euphorbiae* L. شناسایی کرد. نتایج حاصل از مطالعه‌ی سلول‌های خونی کرم شاخدار فرفیون نیز موید تحقیق حاضر بود. در لارو نوعی برگ‌خوار انگور *E. ambiguella*، فقط چهار نوع سلول خونی شامل پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها مشاهده شدند. پروهموسیت‌ها در هیچ یک از مراحل رشدی مشاهده نشد. فقدان پروهموسیت‌ها به دلیل بررسی سلول-های خونی لارو سن پنجم بود و بر اساس مطالعات فالریوز[۲] وهمکاران (۲۰۰۳)، نسبت پروهموسیت‌ها با افزایش سن لاروی کاهش می‌یابد و حتی ممکن است فراوانی آن به صفر برسد و این می تواند عدم وجود و کاهش تعداد پروهموسیت ها را در سنین آخر لاروی حشرات توجیه کند (ووگل‌ویت[۳] و همکاران ۲۰۱۶). در پروانه‌ی موم‌خوار *G. mellonella* Linnaeus به وسیله‌ی کاوشگرهای مولکولی و خواص رنگ‌آمیزی همین پنج نوع سلول شناسایی شد. در پروانه‌ی موم خوار، فراوان ترین سلول‌های خونی گرانولوسیت‌ها و سپس پلاسموتوسیت‌ها گزارش شده است ولی در تحقیق حاضر فراوان‌ترین سلول‌های خونی پلاسموتوسیت‌ها و سپس گرانولوسیت‌ها بودند (بلانکو[۴] و همکاران، ۲۰۱۷). در کرم ساقه‌خوار ذرت *Sesamia cretica*، همانند سفیده کلم و و برگ‌خوار انگور فقط چهار نوع سلول خونی گزارش

[۱] Malagoli
[۲] Falleiros
[۳] Vogelweith
[۴] Blanco

شده است. بر اساس مشاهدات همولنف این حشره فاقد پروهموسیت می باشد (صادقی و همکاران، ۲۰۱۷).

در تحقیق حاضر نتایج آزمایش‌های مربوط به بررسی دفاع سلولی شب‌پره‌ی هندی در برابر تنش‌های گرسنگی، رژیم‌های غذایی و جنسیت نشان داد که این فاکتورها همگی بر سامانه‌ی ایمنی این حشره به طور معنی‌داری تاثیرگذار هستند. بر اساس نتایج حاصل از سایر تحقیق‌ها نیز تغذیه، جنسیت، دیاپوز، دما، طول دوره‌های بی غذایی و عوامل بیمارگر بر فراوانی سلول‌های خونی، فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز و پپتیدهای ضد میکروبی مهم ارزیابی شدند. در سال ۲۰۱۲، تریگس و نل[۱] تعاملات بین متغیرهای محیطی و وضعیت ایمنی *P.interpunctella* را مورد بررسی قرار دادند. این متغیرهای محیطی شامل دما، کیفیت غذایی و جمعیت بودند. دو نوع رژیم غذایی به کار رفته در این آزمایش شامل رژیم غذایی معمولی (نسبت ۱۰ : ۱ : ۱ از سبوس گندم، مخمر آب جو، گلیسرول) و رژیم غذایی ضعیف (نسبت ۱۰ : ۰/۵ : ۰/۵ از سبوس گندم، مخمر آب جو، گلیسرول) بود. مشخص شد که کیفیت رژیم غذایی بیش‌ترین و مهم‌ترین تاثیر را روی عملکردهای ایمنی لاروهای شب‌پره‌ی هندی دارد، لاروهای پرورش یافته با رژیم غذایی معمولی فارغ از شرایط دمایی یا جمعیتی خاص، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز، بیش‌ترین تعداد سلول‌های خونی و بیش‌ترین وزن را به خود اختصاص دادند. نتایج این آزمایش تا حدود بسیار زیادی نتایج تحقیق حاضر را تایید می‌کند، زیرا رژیم غذایی مصنوعی به کار رفته در تحقیق حاضر (نسبت ۱/۶ : ۸ : ۲ : ۲ از پودر مالت ، پودر جوانه‌ی گندم، گلیسرول، عسل) شباهت زیادی از نظر ارزش غذایی به رژیم غذایی مورد استفاده در آزمایش تریگس و نل دارد. به طوری که لاروهای شب‌پره‌ی‌هندی پرورش یافته روی رژیم غذایی مصنوعی بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز را به خود اختصاص دادند. هم‌چنین از نظر تعداد کل سلول‌های خونی لاروهای تغذیه کرده از غذای مصنوعی جایگاه دوم بعد از رژیم غذایی نخود و کشمش را به خود اختصاص دادند. آدامو و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی اثر محرومیت‌های غذایی بر شبکه‌ی سیستم ایمنی کرم شاخدار تنباکو *M. sexta* دریافتند که محرومیت

[۱] Triggs, Knell

غذایی اثرات پیچیده و متناقضی بر سامانه‌ی ایمنی این حشره دارد به طوری که موجب تغییرات ذخایر انرژی کوتاه مدت مانند چربی‌ها و بلند مدت مانند پروتئین‌ها، تغییر در بیان ژن‌های مربوط به ایمنی، تغییر در فعالیت آنزیم‌های کلیدی موثر در ایمنی، کاهش غلظت آنتی اکسیدان‌های اصلی، کاهش مقاومت به تنش‌های اکسیداتیو و کاهش مقاومت به باکتری‌ها می‌شود. آن‌ها متوجه شدند که در اثر محرومیت‌های غذایی، آستانه‌ی فعال‌سازی برای برخی پاسخ‌های ایمنی مانند سامانه‌ی فنل‌اکسیداز کاهش می‌یابد. آدامو و همکاران (۲۰۱۶) در ادامه‌ی تحقیقات خود نشان دادند رژیم غذایی روی تمامی متغیرهای مربوط به تولید انرژی و عملکردهای سیستم ایمنی کرم شاخدار تنباکو اثر قابل توجهی دارد، چنان‌چه لاروهایی که از رژیم‌های غذایی با ارزش خیلی پایین تغذیه کردند، میزان چربی کم‌تری داشتند و غلظت گلوکز و ترهالوز و تعداد کل پروتئین در آن‌ها تا حد زیادی کاهش یافت. لاروهای کرم شاخدار تنباکو که از رژیم‌های غذایی با ارزش بالا (غذای کلنی که همان غذای طبیعی کرم شاخدار تنباکو است) تغذیه کردند، سریع‌تر مراحل رشدی خود را طی نمودند و تعداد کل سلول‌های خونی آن‌ها به طور معنی‌داری بیش‌تر از لاروهای تغذیه کرده از رژیم های غذایی کم ارزش (نسبت ۱ : ۳ از غذای کلنی و سلولز غیر تغذیه‌ای) و فاقد ارزش (۱۴۰ گرم سلولز به همراه ۵۰۰ میلی‌لیر آب، فاقد منابع کربوهیدرات) بود. هم چنین لاروهایی که روی رژیم غذایی فاقد ارزش پرورش یافته بودند قبل از رسیدن به سن پنجم لاروی، از بین رفتند. این در حالی است که در تحقیق حاضر نیز فعالیت آنزیم فنل اکسیداز، تعداد کل سلول‌های خونی و تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به طور معنی داری تحت تاثیر رژیم غذایی قرار گرفت. در مطالعه روی تاثیر رژیم‌های غذایی بر فعالیت‌های ایمنی زنبور عسل غلظت و فراوانی هموسیت‌ها در حشراتی که از منابع غذایی بدون پروتئین تغذیه کرده بودند، پایین‌تر از شاهد بود. این حشرات مقاومت کم‌تری در برابر بیماری‌ها نشان دادند. در حالی که خون حشراتی که از منابع دارای پروتئین بهره‌مند شده بودند حاوی گرانولوسیت و پلاسموتوسیت بیش‌تری نسبت به سایر تیمارها بود، در نتیجه فعالیت دفاعی آن‌ها در برابر بیماری ها بیش تر مشاهده شد. این نتایج موید تاثیر بسزای نوع ماده غذایی مصرفی بر سامانه ایمنی حشرات دارد (آلوکس و همکاران، ۲۰۱۰). در تحقیقی دیگر،

ووگل‌ویت و همکاران (۲۰۱۵) با هدف ارزیابی تغییرات عملکردهای ایمنی *E.ambiguella*، تحت تاثیر رژیم‌های غذایی، بیان کردند که مقاومت حشرات در برابر دشمنان طبیعی مختلف، به طور قطعی به رژیم غذایی لارو بستگی دارد و چالش ایمنی به تنهایی و یا به همراه رژیم غذایی بر فراوانی انواع هموسیت‌ها اثر می‌گذارد. مطالعات آن‌ها نشان داده است که درصد عصاره‌ی انگور در رژیم‌های غذایی بر عملکرد سیستم ایمنی *E.ambiguella* تاثیر گذار بوده است و به این معناست که تنوع در عملکردهای ایمنی *E.ambiguella* تغذیه کرده از واریته های مختلف انگور، به علت تفاوت‌های ترکیبات مغذی در گیاه میزبان است و در واقع لاروهای تغذیه کرده از انگورهای با میزان قند بالا، ایمنی قوی‌تری در برابر باکتری‌های *Bacillus cereus*، *Beauveria bassiana* و *Serratia marcescens* نشان دادند. ترکیبات موجود در گیاهان میزبان حشرات، در واقع عامل تنوع در رژیم‌های غذایی هستند. برای مثال پروانه‌ی *Junonia coenia* Hübner دارای یک میزبان حاوی ایرینوئید گلیکوزید به نام بارهنگ برگ‌نیزه‌ای و میزبان دیگر فاقد این ماده به نام گل میمونی زرد می‌باشد. ایریدوئید گلیکوزید ترکیبی دارای طعم تلخ و دارای فعالیت مهارکنندگی و ضد حشرات است که در برخی گونه‌های گیاهی یافت می شود. آزمایش-های اینگر[۱] (۲۰۱۷) نشان دادند که تعداد کل سلول‌های خونی در اثر تغذیه از بارهنگ برگ نیزه‌ای، در مقایسه با گل میمون زرد بیش‌تر شد. هم چنین تعداد کل هموسیت‌ها با افزایش سن لاروی افزایش پیدا کرد. علی‌رغم بالا بودن تعداد هموسیت‌ها در افراد تغذیه کرده از بارهنگ برگ نیزه‌ای، اثری معنی داری از ملانیزاسیون مشاهده نشد و درصد ملانیزاسیون تحت تاثیر گیاه میزبان نبود، در حالی که سن لاروی تاثیر قابل توجهی بر درصد ملانیزاسیون داشت بدین صورت که در لاروهای با سنین پایین، درصد بالاتری از ملانیزاسیون مشاهده شد. این یافته نشان می دهد ایمنی در طول زندگی لارو بیش‌تر می‌شود. تعداد کل هموسیت‌ها در لاروهای تغذیه کرده از بارهنگ برگ نیزه‌ای به طور معنی‌داری بیش‌تر از گل میمون زرد بود. هم چنین میزان ایریدوئید گلیکوزید با افزایش سن لاروی، جز در سن پنجم بیش‌تر شد، افزایش قابل توجه هموسیت‌ها با افزایش سن، از این ایده پشتیبانی می کند که لاروهای پرورش

[۱] Enger

یافته روی بارهنگ برگ نیزه‌ای، ظرفیت بیش‌تری در عملکردهای ایمنی دارند، زیرا تعداد هموسیت بیش‌تری برای شرکت در پاسخ‌های ایمنی دارند که به نوعی توان بالای آن‌ها را برای مقابله با پارازیتوئیدها و پاتوژن‌ها توجیه می‌کند. براساس نتایج بدست آمده از شمارش تعداد کل سلول‌های خونی در سنین مختلف لاروی شب‌پره هندی، مشاهده شد با افزایش سن لاروی تعداد کل سلول‌های خونی افزایش یافته‌است. از طرفی تعداد کل سلول‌های خونی در رژیم غذایی نخود و کشمش به طور معنی‌داری بیش‌تر از سه رژیم غذایی دیگر بود. سطح گلوکز در رژیم های غذایی که غنی از کربوهیدرات هستند بیشتر است. به نظر می رسد که بالا رفتن سطح ترهالوز در خون این حشرات، تعداد و عملکرد سلول های خونی آن ها را تغییر می‌دهد. ولی در شب پره‌ی هندی میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی مصنوعی نسبت به سه رژیم نخودوکشمش، گردو و پسته به طور معنی داری بیش‌تر شد. این نتایج در مورد شب‌پره‌ی هندی، تا حدودی مشابه عملکردهای ایمنی *J.coenia* است. با بررسی اثر کیفیت پروتئین تغذیه‌ای بر عملکردهای ایمنی پروانه‌ی برگ‌خوار *Spodoptera litturalis* (Biosduval)، مشاهده شد لاروهایی که از رژیم غذایی حاوی پروتئین های با کیفیت بالا تغذیه کرده‌اند، دارای بقا و سرعت رشد بیش‌تر، فعالیت بیش‌تر آنزیم فنل اکسیداز، میزان پروتئین خون بالاتر و فعالیت بالای آنتی باکتریال آنزیم لیزوزیم، نسبت به لاروهای پرورش یافته با پروتئین‌های بی کیفیت بودند. این لاروها هم چنین دارای کوتیکول ملانیزه شده‌ی سنگین‌تری بودند و ثابت شد که تغذیه به عنوان یک عامل کلیدی در ملانیزاسیون حشرات موثر است (لی[۱] و همکاران، ۲۰۰۸).

خصوصیات فیزیکوشیمیایی خون حشرات به طور محسوسی تحت تاثیر شرایط تنش قرار می گیرد (داهلمن[۲]،۱۹۷۳). این ضعف در عملکرد خون می تواند در بکارگیری روش هایی جهت کنترل آفات مهم اقتصادی، موثر باشد. به عنوان مثال گرسنگی نیز به عنوان یک تنش مهم در زندگی حشرات تلقی

[۱] Lee
[۲] Dahlman

می‌شود که می‌تواند سامانه‌ی ایمنی حشره را تحت الشعاع قرار دهد. در تحقیق حاضر، تاثیر دوره های گرسنگی بر تعداد سلول های خونی شب پره هندی معنی دار بود، به طوری که با افزایش زمان گرسنگی تا ۷۲ ساعت، تعداد کل و تفرقی سلول‌های لاروهای سن پنجم، به طور بارزی کاهش یافت اما لاروها زنده ماندند و به شفیره تبدیل شدند. در مطالعات مربوط به اثر گرسنگی بر وضعیت ایمنی لاروهای سن پنجم کرم شاخدار تنباکو، *M. sexta* نیز نتایج مشابهی مشاهده شد. هر چند که لارو های کرم شاخدار تنباکو با گرسنه ماندن بعد از سه روز تلف شدند (داهلمن، ۱۹۷۳). در تحقیقی دیگر گرسنگی منجر به کاهش معنی دار فعالیت فنل اکسیداز در همولنف هر دو جنس نر و ماده سوسک *T. molitor* شد کخ مطابق با تحقیق حاضر بود (سیواجوتی و تامپسون، ۲۰۰۲). ولی بعد از تغذیه سطح فنل اکسیداز به سرعت افزایش یافت. سیوا و تامپسون اظهار کردند که سطح بالای فنل اکسیداز با تولید انرژی حاصل از تغذیه همراه است. پاسخ های ایمنی در زنبور مقدس[۱] در افراد گرسنه و تغذیه کرده تفاوت معنی‌داری داشت و این تفاوت معنی‌دار می‌تواند موید نتایج تحقیق حاضر باشد (اشمیدت همپل و اشمیدت همپل، ۱۹۹۸). در همین راستا ثابت شده که گرسنگی تاثیر منفی بر مقدار متابولیسم مگس سرکه *D. melanogaster* دارد (واس و ناپی، ۲۰۰۱). وقتی متابولیسم کاهش می‌یابد تولید پپتیدهای ضد میکروبی (مانند آپولیپوفورین III موثر در انتقال چربی ها) کاهش می‌یابد. لاروهای شب‌پره موم‌خوار گرسنه میزان کمتری پپتیدهای ضدمیکروبی مانند لیپوکالین و پروتئین های ایمنی مانند آپولیپوفورین و آریل فورین نسبت به لاروهای شاهد نشان دادند. به علاوه در لاروهای گرسنه غلظت سلول‌های خونی پایین‌تر بوده و به آلودگی ها حساس تر بودند. (بانویل و همکاران، ۲۰۱۲). مطالعات ایمنی شناسی لاروهای گرسنه زنبور عسل *A. mallifera* نشان داد که در لاروهای گرسنه مانده به مدت هفت روز غلظت پپتیدهای ضدمیکروبی مانند ترنس فرین و آریل فورین کاهش یافت. به علاوه در این حشرات بین تغذیه و فعالیت-های عصبی رابطه مستقیم مشاهده شد (آلوکس و همکاران، ۲۰۱۰). به طوری که گرسنگی بر رفتار

[۱] bumble-bee

یادگیری زنبورهای عسل تاثیر منفی نشان داد (تات[1] و همکاران، ۲۰۰۵). میزان آریل فورین و لیپوفورین در لاروهای پروانه کرم ابریشم که رژیم غذایی کم کالری دریافت کرده بودند کاهش یافت (لی[2] و همکاران، ۲۰۰۹). در واقع کاهش یا حذف غذا می تواند پاسخ ایمنی حشرات را تغییر دهد چرا که انرژی تولید شده با تغذیه برای هموستازیس و فعالیت های ایمنی ضروری است (بانویل و همکاران، ۲۰۱۲). گرسنگی یک تنش است که با متابولیسم چربی ها در اندام چربی یا رها سازی آمینواسید ها از پروتئین-های ذخیره‌ای در همولنف مرتبط است. ویگلس‌ورس در سال ۱۹۶۵ اظهار نمود که سوسک های شاخک بلندی که میزان تری هالوز آن‌ها با تنش گرسنگی کاهش می‌یابد بعد از ۷۲ ساعت تعداد سلول های خونی آن ها کاهش یافته و در نهایت می میرند. به علاوه افزایش در ترکیبات جامد خون و پروتئین کل، وابسته به ارزش غذایی بوده و تایید کننده فعالیت شدید متابولیکی در اندام چربی است. این موضوع می تواند با تغییر تعداد کل سلول‌های خونی همراه نباشد ولی قطعا حجم خون را تغییر خواهد داد. البته در زنبور عسل تعداد ژن های موثر در ایمنی یک سوم حشرات انفرادی است و انواع دیگر پروتئین های دفاعی مانند گلوکز اکسیداز در دفاع در برابر بیمارگرها اهمیت بیش‌تری دارند (اوانس[3] و همکاران، ۲۰۰۶). از طرف دیگر حشراتی که از رژیم‌های غذایی حاوی پروتئین و غنی تغذیه می‌کنند اسیدهای آمینه ضروری را دریافت کرده و در بافت چربی و تخمدان‌ها ذخیره می‌کنند. این حشرات از نظر اندازه وزن سنگین‌تری از سایر حشرات داشته و بنابراین حجم خون بیش‌تری دارند. این موضوع در مورد *B. terrestris* هم گزارش شده است (تاسی و اوپنیل[4]، ۲۰۰۸).

جنسیت نیز عامل موثر در فعالیت های ایمنی است چنانچه سیواجوتی و تامپسون (۲۰۰۲) مشخص نمودند که فعالیت‌های فنل‌اکسیداز در حشرات کامل نر *T. molitor* که مدت ۵ روز گرسنه مانده بودند بیش تر از حشرات ماده بود. به گزارش رادهیکا و همکاران در سال ۱۹۹۸، در نر های *T. molitor* حدود

[1] Toth
[2] Li
[3] Evans
[4] Tasei, Aupinel

۳۰ درصد فعالیت فنل‌اکسیداز در خون بیش‌تر از ماده‌هاست. در حشرات، ماده‌ها در تخم‌دان فنل‌اکسیداز تولید می‌کنند (فردیگ[۱] و همکاران، ۱۹۹۳). یعنی سطح فنل‌اکسیداز در همولنف آن‌ها پایین‌تر از همولنف افراد نر است. به عبارت دیگر نرها توان دفاعی بالاتری نسبت به ماده ها دارند. بالاتر بودن سطح فنل‌اکسیداز در خون نرها و پاسخ ایمنی آن ها در برابر پارازیت‌ها توسط نیگام[۲] و همکاران (۱۹۹۷) مشاهده شده است. در راستای بررسی اثر جنسیت بر پاسخ ایمنی دو گونه سیرسیرک *Telegryllus commodus* Walker و *Telegryllus oceanicus* LeGuillou مشاهده شد واکنش کپسوله شدن در جنس نر، بیش‌تر از ماده‌هاست (زاک[۳] و همکاران، ۲۰۰۴) در نتایج تحقیق حاضر تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در همولنف لاروهای جنس ماده شب‌پره هندی بیش‌تر از نرها بود اما تعداد اونوسیتوئیدها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان نداد. فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لاروهای نر شب‌پره‌ی هندی بیش‌تر از ماده بود اما این تفاوت معنی‌دار نبود.

[۱] Ferdig
[۲] Nigam
[۳] Zuk

## ۴-۱۰- پیشنهادات

۱. با توجه به دامنه وسیع میزبان‌های انباری و فرآوری شده‌ی شب‌پره هندی، پیشنهاد می‌شود که آزمایشات مربوط به تاثیر رژیم‌های غذایی برای سایر میزبان‌ها نیز انجام شود تا بتوان دید وسیع‌تری در مورد پاسخ ایمنی شب‌پره هندی نسبت به اکثر رژیم‌های غذایی بدست آورد.

۲. پیشنهاد می‌شود برهم‌کنش آفت‌کش‌های رایج در کنترل آفات انباری و بیمارگرهایی مانند قارچ‌های بیمارگر حشرات با سیستم ایمنی شب‌پره‌ی هندی مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد.

۳. فعالیت آنزیم‌های گوارشی مانند انواع کربوهیدرازها و پروتئازها نقش تعیین کننده‌ای در وضعیت ایمنی حشرات دارد. بنابراین توصیه می‌شود که فعالیت این آنزیم‌ها در شب‌پره‌ی هندی در حضور رژیم‌های غذایی مختلف و یا حمله بیمارگرها مورد مطالعه قرار گیرد.

۴. قدرت ایمنی حشرات تحت تاثیر پارامترهای محیطی و یا حمله‌ی عوامل مهاجم، روی پارامترهای زیستی و جمعیتی آن‌ها اثر گذار است. به نظر می‌رسد اندازه‌گیری شاخص‌های تغذیه شب‌پره هندی، میزان زادآوری، طول عمر و وضعیت نتاج این حشرات همراه با آزمایشات ایمنی شناسی مورد بررسی قرار داده شود.

# منابع

بندانی، ع. ر. (۱۳۸۹) **"فیزیولوژی حشرات"** چاپ اول. موسسه انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ص ۳۱۷.

خسروی، ر. جلالی سندی، ج. و قاسمی، و. (۱۳۹۱) "شناسایی سلولهای خونی لارو شب پره خرنوب "*Ectomoyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera.: Pyralidae) **تحقیقات آفات گیاهی**. جلد ۲، شماره ۳، صفحه ۳۹-۲۹.

عجم حسنی، م. (۱۳۹۴) "بررسی یاخته شناسی سلول های خونی کرم شاخدار فرفیون *Hyles euphorbiae* L. (Lepidoptera: Sphingidae)" **مجله علمی کشاورزی**، جلد ۳۸، شماره ۳، صفحه ۶۲-۵۰.

عجم حسنی، م. (۱۳۹۳) "بررسی دفاع سلولی لاروهای *Utethesia pulchella* (Lepidoptera: Arctiidae)**مهار زیستی در کشاورزی**، جلد ۲، شماره ۱، صفحه ۶۷-۵۷.

قاسمی و، (۱۳۹۲)، پایان نامه دکتری : " تاثیر دما و تنظیم کننده‌های رشد روی پاسخ ایمنی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) در برابر دو گونه قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae*

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**, 219(5), 706-718.

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.)" **Journal of Plant Protection Research**, 53(2), 110-118.

Akai, H. and Sato, S. (1973) "Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)" **International Journal of Insect Morphological Embryology**, 2: 207-31.

Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., and Le Conte, Y. (2010) "Diet effects on honeybee immunocompetence" **Biology letters**, 6: 562-565

Alvandi, J., Karimi, J., and Dunphy, G. B. (2014) “Cellular reactions of the white grub larvae, *Polyphylla adspersa*, against entomopathogenic nematodes” **Nematology**, 16(9), 1047-1058.

Allotey, J., and Goswami, L. (1990) “Comparative biology of two phycitid moths, *Plodia interpunctella* (Hubn.) and *Ephestia cautella* (Wlk.) on some selected food media” **International Journal of Tropical Insect Science**, 11(2): 209-215.

Al-Rawadeh, A. (2010) “The role of starvation on selective immunological parameters in land snail *Helix aspersa*” **Advances in Environmental Biology**, 265-271.

Anggraeni, T., and PUTRA, R. E. (2011) “Cellular and humoral immune defenses of *Oxya japonica* (Orthoptera: Acrididae) to entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*” **Entomological Research**, 41(1), 1-6.

Arbogast, R. T., Lecato, G. L., and Van Byrd, R. (1980) “External morphology of some eggs of stored-product moths (Lepidoptera Pyralidae, Gelechiidae, Tineidae)” **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, 9(3), 165-177.

Arnold, J. W. and Hinks, C. F. (1976) “Haemopoiesis in Lepidoptera. I. The multiplication of circulating haemocytes” **Canadian Journal of Zoology**, 54(6): 1003–1012.

Ashhurst, D. E., and Richards, A. G. (1964) “Some histochemical observations on the blood cells of the wax moth, *Galleria mellonella* L.” **Journal of morphology**, 114(2), 247-253.

Ashida, M., and Brey, P. T. (1995) “Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix” **Proceedings of the National Academy of Sciences** 92(23): 10698-10702.

Awad, H. H. (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): 157-170.

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

Beeman, S. C., Wilson, M. E., Bulla, L. A., and Consigli, R. A. (1983) "Structural characterization of the hemocytes of *Plodia interpunctella*" **Journal of Morphology**, 175(1): 1-16.

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): 153-168.

Bogdan, C., Röllinghoff, M., and Diefenbach, A. (2000) "Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity" **Current opinion in immunology**, 12(1): 64-76.

Bohn, H. (1986), "**Hemolymph clotting in insects. In Immunity in Invertebrates**", Cells, Molecules and Defense Reactions. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 188-207.

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): 486-494.

Brehelin, M., and Zachary, D. (1986) "**Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy**", In Immunity in invertebrates, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 36-48

Butt, D., Aladaileh, S., O'Connor, W. A., and Raftos, D. A. (2007) "Effect of starvation on biological factors related to immunological defence in the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*)" **Aquaculture**, 264(1): 82-91.

Castellanos-Martínez, S., Prado-Alvarez, M., Lobo-da-Cunha, A., Azevedo, C., and Gestal, C. (2014) "Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes" **Developmental & Comparative Immunology**, 44(1): 50-58.

Ceraul, S. M., Sonenshine, D. E., Ratzlaff, R. E., and Hynes, W. L. (2003) "An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae)" **Insect biochemistry and molecular biology**, 33(11): 1099-1103.

Cheng, T. C., and Guida, V. G. (1980) "Hemocytes of Bulinus truncatus rohlfsi (Mollusca: Gastropoda)" **Journal of Invertebrate Pathology**, 35(2): 158-167.

Cranshaw, W. S., and Peairs, F. B. (1990) "Insect pests of home-stored foods" **Service in action**, no. 5.501.

Cuénot, L. (1897) "Les globules sanguins et les organes lymphoides des invertébrés" **Arch D'Anat Microsc**, 1, 153-192.

Dahlman, D. L. (1973) "Starvation of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. 1. Changes in hemolymph characteristics of 5th-stage larvae" **Annals of the Entomological Society of America**, 66(5): 1023-1029.

Davies, D. H., Strand, M. R., and Vinson, S. B. (1987) "Changes in differential haemocyte count and in vitro behaviour of plasmatocytes from host *Heliothis virescens* caused by *Campoletis sonorensis* polydnavirus" **Journal of Insect Physiology**, 33(3): 143147-145153.

Donaghy, L., Kim, B. K., Hong, H. K., Park, H. S., and Choi, K. S. (2009) "Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*" **Fish & shellfish immunology**, 27(2): 296-301.

Enger, M. C. (2017), Undergraduate honors theses, "**Effects of host plant and developmental stage on caterpillar immune response**" Ecology and Evolutionary Biology, University of Colorado Boulder.

Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. L., Jiang, H., and Hultmark, D. (2006) "Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*" **Insect molecular biology**, 15(5): 645-656.

Falleiros, Â. M. F., Bombonato, M. T. S., and Gregório, E. A. (2003) "Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae)" **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 46(2): 287-294.

Fasulo, T. R., and Knox, M. A. (2007) "Indianmeal Moth, *Plodia interpunctella* (Hübner)(Insecta: Lepidoptera: Pyralidae).

Fearon, D. T. (1997) "Seeking wisdom in innate immunity" **Nature**, 388(6640): 323-324.

Ferdig, M. T., Beerntsen, B. T., Spray, F. J., Li, J., and Christensen, B. M. (1993) "Reproductive costs associated with resistance in a mosquito-filarial worm system" **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 49(6): 756-762.

Gardiner, E. M. M., and Strand, M. R. (2000) "Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*" **Archives of insect biochemistry and physiology**, 43(4): 147-164.

Gardiner, E. M., and Strand, M. R. (1999) "Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includes*" **Journal of Insect Physiology,** 45(2): 113-126.

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, 128-140.

Gillespie and, J. P., Kanost, M. R., and Trenczek, T. (1997) "Biological mediators of insect immunity" **Annual review of entomology**, 42(1): 611-643.

Gupta, A. P. (1985) "Cellular elements in the hemolymph", **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology** 3, 401-451.

Gupta, A. P. (1991). "**Insect immunocytes and other haemocytes roles in cellular and humoral immunity**", Immunology of insects and other arthropods, CRC press, Florida, pp.19-118.

Gupta, A. P. (2009). "**Insect hemocytes (Development, Forms, Functions, and Techniques)**", Cambridge University Press, Cambridge, 614 pp.

Hamlin, J. C., and Phillips, M. E. (1931). "**Biology of the Indian-meal moth on dried fruits in California**" United states department of Agriculture, Washington, D. C. No. 242.

Heinrich, C. (1956) "American moths of the subfamily Phycitinae" Bulletin (United States National Museum); 207.

Hillyer, J. F., and Strand, M. R. (2014) "Mosquito hemocyte-mediated immune responses" **Current opinion in insect science**, 3: 14-21.

Hine, P. M. (1999) “The inter-relationships of bivalve haemocytes” **Fish & Shellfish Immunology**, 9(5): 367-385.

Hinton, H. E. (1943) “The larvae of the Lepidoptera associated with stored products” **Bulletin of Entomological Research**, 34(3): 163-212.

Hollande, A. C. (1911) “Etude histologique comparée du sang des insectes ahémorrhée et des insectes sans hémorrhée” **Arch Zool**, 5: 283-323.

Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W., and Klapper, R. (2003) “The two origins of hemocytes in *Drosophila*” **Development**, 130(20): 4955-4962.

Jalali, J., and Salehi, R. (2008) “The hemocyte types, differential and total count in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) during post-embryonic development” **Munis Entomology & Zoology**, 1: 199-216.

Johnson, D. E., Brookhart, G. L., Kramer, K. J., Barnett, B. D., and McGaughey, W. H. (1990) “Resistance to *Bacillus thuringiensis* by the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*: comparison of midgut proteinases from susceptible and resistant larvae” **Journal of invertebrate pathology**, 55(2): 235-244.

Jones, J. C. (1959) “A phase contrast study of the blood-cells in *Prodenia* larvae (Order Lepidoptera)” **Journal of Cell Science**, 3(49): 17-23.

Jones, J. C. (1962) “Current concepts concerning insect hemocytes” **American Zoologist**, 2(2): 209-246.

Khosravi, R., Sendi, J. J., Zibaee, A., and Shokrgozar, M. A. (2014) “Immune reactions of the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill and two developmental hormones” **Invertebrate Survival Journal**, 11(1).

Klowden, M. J. (2008) “Physiological Systems in Insects” **Academic Pr**.

Kohan, R, Jalali, S. J., and Zibaee, A. (2012) “Identification, total and differential counts of hemocytes in different life stages *Xanthogaleruca luteola* Mull.(Coleoptera: Chrysomellidae)” **Journal of Plant Pests Research**, 2(2): 63-73.

Krams, I., Kecko, S., Kangassalo, K., Moore, F. R., Jankevics, E., Inashkina, I., and Rantala, M. J. (2015) “Effects of food quality on trade-offs among growth, immunity and survival in the greater wax moth *Galleria mellonella*” **Insect science**, 22(3): 431-439.

Kwon, H., Bang, K., and Cho, S. (2014) “Characterization of the hemocytes in Larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis*: involvement of granulocyte-mediated phagocytosis” **PloS one**, 9(8): e103620.

Lackie, A. M. (1988) “Haemocyte behavior” **Advances in Insect Physiology**, 21: 85-178.

Lavine, M. D., and Strand, M. R. (2002) “Insect hemocytes and their role in immunity” **Insect biochemistry and molecular biology**, 32(10): 1295-1309.

Lee, K. P., Simpson, S. J., and Wilson, K. (2008) “Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect” **Functional Ecology**, 22(6): 1052-1061.

Lehrer, R. I., & Ganz, T. (1999) “Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence” **Current opinion in immunology**, 11(1): 23-27.

Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K., and Ganz, T. (1993) “Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells” **Annual review of immunology**, 11(1): 105-128.

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

Li, J. Y., Chen, X., Fan, W., Moghaddam, S. H. H., Chen, M., Zhou, Z. H. and Zhong, B. X. (2009) “Proteomic and bioinformatic analysis on endocrine organs of domesticated silkworm, *Bombyx mori* L. for a comprehensive understanding of their roles and relations” **Journal of proteome research**, 8(6): 2620-2632.

Li, P., Yin, Y. L., Li, D., Kim, S. W., and Wu, G. (2007) “Amino acids and immune function” **British Journal of Nutrition**, 98(2): 237-252.

Li, P., Yin, Y. L., Li, D., Kim, S. W., and Wu, G. (2007) “Amino acids and immune function” **British Journal of Nutrition**, 98(2): 237-252.

Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R., and Kiguchi, K. (2005) "Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis" **Cell and tissue research**, 320(3): 535-543.

Lowenberger, C. (2001) "Innate immune response of *Aedes aegypti*" **Insect biochemistry and molecular biology**, 31(3): 219-229.

Mahmood, A., and Yousaf, M. (1985) "Effect of some insecticides on the haemocytes of *Gryllus bimaculatus*" **de Geer. Pak. J. Zool**, 17(1): 71-84.

Manachini, B., Arizza, V., Parrinello, D., and Parrinello, N. (2011) "Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier)(Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*" **Journal of invertebrate pathology**, 106(3): 360-365.

Mbata, G. N. (1985) "Some physical and biological factors affecting oviposition by *Plodia interpunctella* (Hubner)(Lepidoptera: Phycitidae)" **International Journal of Tropical Insect Science,** 6(5): 597-604.

Meister, M., and Lagueux, M. (2003) "*Drosophila* blood cells" **Cellular microbiology**, 5(9): 573-580.

Meister, M., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (2000). "**The antimicrobial host defense of *Drosophila*. In Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System**" Springer, Berlin Heidelberg, pp.17-36.

Merchant, D., Ertl, R. L., Rennard, S. I., Stanley, D. W., and Miller, J. S. (2008) "Eicosanoids mediate insect hemocyte migration" **Journal of insect physiology**, 54(1): 215-221.

Mohandass, S., Arthur, F., Zhu, K., and Throne, J. (2007) "Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products" **Journal of Stored Products Research**, 43(3): 302-311

Mullen, M. A., and Arbogast, R. T. (1977) "Influence of Substrate on Oviposition by Two Species of Stored-Product Moths" **Environmental Entomology,** 6(5): 641-642.

Muta, T., and Iwanaga, S. (1996) "The role of hemolymph coagulation in innate immunity" **Current opinion in immunology**, 8(1): 41-47.

Nappi, A., Poirié, M., and Carton, Y. (2009) "The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps" Advances in parasitology, 70: 99-121.

Nation, J. L. (2008). "**Insect physiology and biochemistry**", CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 560.

Nigam, Y., Maudlin, I., Welburn, S., and Ratcliffe, N. A. (1997) "Detection of Phenoloxidase Activity in the Hemolymph of Tsetse Flies, Refractory and Susceptible to Infection with *Trypanosoma brucei rhodesiense*" Journal of invertebrate pathology, 69(3): 279-281.

Patil, A., and Shah, U. (2012) "Ultrastructural studies of hemocytes in scorpion Heterometrus xanthopus" ***The Bioscan***, 7: 491-493.

Paillot, A., and Noel, R. (1928) "Recherches histophysiologiques sur les cellules péricardiales et les éléments du sang des larves d'insectes (*Bombyx mori* et Pieris brassicae)" **Bull. hist. appl**, 5: 105-128.

Pal, R., and Kumar, K. (2014) "A comparative study of haemocytes in three cyclorrhaphous dipteran flies" **International Journal of Tropical Insect Science**, 34(3): 207-216.

Pandey, J. P. (2004), Doctoral dissertation, Ph. D Thesis, "**Studies on stress induced haematological changes in *Dysdercus cingulatus* Fabr.(Heteroptera: Pyrrhocoridae) and *Danais chryssipus* (Lepidoptera: Nymphalidae)**", VBS Purvanchal University, Jaunpur, India.

Pandey, J. P., Tiwari, R. K., and Chaubey, A. K. (2003)a "Effects of repeated haemolymph withdrawals on haemocyte counts and moulting in lemon-butterfly, *Papilio demoleus* L. **NISCAIR-CSIR, India,** 41(12): 1436-144.

Pandey, J. P., Tiwari, R. K., and Chaubey, A. K. (2003)b "Studies on haemocytes of lemon-butterfly, *Papilio demoleus* L. under certain stress conditions" **J. Animal Morphology Physiology**, 50: 33-44.

Phillips, T. W., and Strand, M. R. (1994) "Larval secretions and food odors affect orientation in female *Plodia interpunctella*" **Entomologia experimentalis et applicata**, 71(3): 185-192.

Phillips, T. W., Berberet, R. C., and Cuperus, G. W. (2000), "**Post-harvest integrated pest management**" Encyclopedia of food science and technology. 2nd ed.-Wiley Inc., New York, pp. 2690-2701.

Pourali, Z. and Ajamhasani, M. (2017) "The effect of thermal stresses on the immune system of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae)" **2nd Iranian International Congress of Entomology**

Radhika, M., Nazar, A. A., Munuswamy, N., and Nellaiappan, K. (1998) "Sex-linked differences in phenol oxidase in the fairy shrimp *Streptocephalus dichotomus* Baird and their possible role (Crustacea: Anostraca)" **Hydrobiologia**, 377(1-3): 161-164.

Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W., and Rhodes, C. P. (1985) "Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances**" International review of cytology**, 97: 183-350.

Ratcliffe, Norman Arthur, and Arthur Frederic Rowley, eds. "Invertebrate blood cells" Vol. 2. Academic Pr, 1981.

Rees, D. P. (2004), "**Insects of stored products**" CSIRO publishing.

Richards, O. W., and Thomson, W. S. (1932) "A contribution to the study of the genera *Ephestia*, GN.(including Strymax, Dyar), and *Plodia*, GN.(Lepidoptera, Phycitidae), with notes on parasites of the larvae" **Ecological Entomology**, 80(2): 169-247.

Rowley, A. F. and Ratcliff, N. A. (1981). "**Invertebrate blood cells**", Ratcliffe, N. A. and Rowlry, A. F. (Eds.). Vol. 2. Academic Press, New York, pp. 421-488.

Ryan, R. O., and van der Horst, D. J. (2000) "Lipid transport biochemistry and its role in energy production" **Annual review of entomology**, 45(1): 233-260.

Sadeghi, R., Hadizadeh Raeisi, N., and Jamshidnia, A. (2017) "Immunological Responses of *Sesamia cretica* to *Ferula ovina* Essential Oil" **Journal of Insect Science**, 17(1).

Sanjayan, K. P., Ravikumar, T. and Albert, S. (1996) “Changes in the haemocyte profile of *Spilostethus hospes* (Fab) (Heteroptera: Lygaeidae) in relation to eclosion, sex and mating” **Journal of Bioscience**, 21: 781-788.

Saxena, B. P., Sharma, P. R., and Tikku, K. (1988) “Scanning electron microscopical studies of the haemocytes of *Spodoptera litura* Fabr.” **Cytologia**, 53(2): 385-391.

Schmid-Hempel, P. (2005) “Evolutionary ecology of insect immune defenses” **Annual Review of Entomology**, 50: 529-551.

Schmid-Hempel, R., and Schmid-Hempel, P. (1998) “Colony performance and immunocompetence of a social insect, *Bombus terrestris*, in poor and variable environments” **Functional Ecology**, 12(1): 22-30.

Schmidt, O., Theopold, U., and Strand, M. (2001) “Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids” **BioEssays**, 23(4): 344-351.

Schulten, G. G. M., and Roorda, F. A. (1984) “Storage insects in imported products mainly of tropical origin” **Entomol. Bericht**, 44: 65-69.

Sharma, P. R., Sharma, O. P. and Saxena, B. P. (2008) “Effect of sweet flag rhizome oil (Acoruscalamus) on hemogram and ultrastructure of hemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)” **Micron**, 39(5): 544-551.

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

Siva-Jothy, M. T., Moret, Y., & Rolff, J. (2005) “Insect immunity: an evolutionary ecology perspective” **Advances in insect physiology**, 32: 1-48.

Söderhäll, K., and Cerenius, L. (1992) “Crustacean immunity” **Annual Review of Fish Diseases**, 2: 3-23.

Stalmach, M., Wilczek, G., Homa, J., and Szulinska, E. (2015) “Antioxidative and immunological responses in the haemolymph of wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) exposed to starvation and dimethoate” **Environmental Pollution,** 206: 551-559.

Strand M .R., and Pech, L .L.(1995) “Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships” **Annual Review of Entomology**, 40(1), 31-56.

Strand, M. R. (2008). “The insect cellular immune response” **Insect science**, 15(1): 1-14.

Tasei, J. N., and Aupinel, P. (2008) “Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes tested on larvae produced by bumblebee workers (*Bombus terrestris*, Hymenoptera: Apidae)” **Apidologie**, 39(4): 397-409.

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

Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A., and Hartenstein, V. (1994) “Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*” **Development**, 120(7): 1829-1837.

Tiwari, R. K., Pandey, J. P., and Kumar, D. (2006) “Effects of Neem-based insecticides on metamorphosis, haemocytes and reproductive behavior in the red cotton bug, *Dysdercus koenigii* Fabr.(Heteroptera: Pyrrhocoridae)” Entomon-trivandrum, 31(4): 267.

Tiwari, R. K., Pandey, J. P., & Salehi, R. (2002) “Haemopoietic organs and effect of their ablation on total haemocyte count in lemon-butterfly, *Papilio demoleus* L.” **NISCAIR-CSIR, India,** 40(10): 1202-1205.

Toth, A. L., Kantarovich, S., Meisel, A. F., and Robinson, G. E. (2005) “Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees” **Journal of Experimental Biology**, 208(24): 4641-4649.

Triggs, A., and Knell, R. J. (2012) “Interactions between environmental variables determine immunity in the Indian meal moth *Plodia interpunctella*” **Journal of Animal Ecology**, 81(2): 386-394.

TsuJi, H. (1998) “Experimental invasion of a food container by first-instar larvae of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* Hubner, through pinholes” **Medical entomology and zoology**, 49(2): 99-104.

Vass, E., and Nappi, A. J. (2001) “ Fruit Fly Immunity: The fruit fly provides a suitable experimental model for studying various aspects of the cellular and humoral mechanisms,

genetics, signaling cascades, and cytotoxic molecules involved in insect innate immunity" **AIBS Bulletin**, 51(7): 529-535.

Vogelweith, F., Moreau, J., Thiéry, D., and Moret, Y. (2015) "Food-mediated modulation of immunity in a phytophagous insect: An effect of nutrition rather than parasitic contamination" **Journal of insect physiology**, 77: 55-61.

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: 33-39.

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): 179-190.

Wigglesworth, V. B. (1965) "**The principles of insect physiology**" Methuen, New York, pp. 380-382.

Wigglesworth, V. B. (1947) "**The principles of insect physiology**" 1st Edn., Methuen, London, pp. 434

Wiliamse, G. C. (1964) "The life-history of the Indian meal-moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lep. Pyralidae) in a warehouse in Britain and on different foods" **Annals of Applied Biology**, 53(3): 459-475

Willott, E., Trenczek, T., Thrower, L. W., and Kanost, M. R. (1994) "Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*" **European journal of cell biology**, 65(2): 417-423.

Wilson, R., and Ratcliffe, N. A. (2000) "Effect of lysozyme on the lectin-mediated phagocytosis of *Bacillus cereu*s by haemocytes of the cockroach, *Blaberus discoidalis*." **Journal of Insect Physiology**, 46(5): 663-670.

Wyatt, G. R. (1961) "The biochemistry of insect hemolymph" **Annual review of entomology**, 6(1): 75-102.

Yeager, J. F. (1945) “The Blood Picture of the Southern Armyworm (*Prodenia Eridana*)” **US Government Printing Office**.

Zibaee, A., & Malagoli, D. (2014) “Immune response of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) larvae to different entomopathogenic fungi” **Bulletin of entomological research,** 104(2): 155-163.

Zuk, M., Simmons, L. W., Rotenberry, J. T., and Stoehr, A. M. (2004) “Sex differences in immunity in two species of field crickets” **Canadian Journal of Zoology**, 82(4): 627-634.

Abstract:

Blood cells are an important indicator of insect immunity against pathogens, parasitoid, starvation stresses, nutritional diets, sex, diapause and environmental factors such as temperature. Insects use of reactions of cellular and humeral defense in contrast to any stress or attacking of external agent. Hemocytes play an important role in cellular immune system of insects and have many forms and activities. Also, antimicrobial peptides, such as the phenol oxidase enzyme, are one main components of insects humeral defense. By accurate recognition of hemocytes condition and evaluating the activity of the phenoloxidase enzyme can be better understood the insect physiological defense aspects and these will help to adopt their physiological control strategies. In this study, firstly hemocytes of Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) were identified by staining with Giemsa and by light microscopy. The amount of enzyme activity of phenoloxidase was measured by method of hemocyte lysite in the presence of L-DOPA substrate and 1 molar phosphate buffer. Five types of hemocytes including prohemocytes (PRs), plasmatocytes (PLs), granulocytes (GRs), oenocytoids (OEs) and spherulocytes (SPs) were identified in larvae hemolymph of Indian meal moth. The frequency of hemocytes in 3$^{td}$, 4$^{th}$ and 5$^{th}$ instar larvae showed that the number of PLs and GRs in the higher age of larvae were the most abundant. In addition, the total hemocyte count (THC) increased significantly in the higher age of larvae. The effect of starvation periods on THC was significant, and decreased significantly with the increase in the length period of starvation. The number of PLs and GRs decreased significantly after 72 hours of starvation. Increasing in the duration of starvation caused a significant decrease in the activity of the enzyme phenoloxidase. The results of the experiment on the effect of nutritional diets including pea and raisin, walnut, pistachios and artificial diet showed that the maximum THC, PLs and OEs were attributed to the larvae fed with pea and raisin. The amount of phenoloxidase activity in larvae fed on artificial diet was significantly higher than the other diets. THC in females was significantly higher than males and the frequency of each hemocyte except PRs in females was significantly higher than males. The activity of Phenol oxidase enzyme in males was more than females, but did not show any significant difference. The results of this study showed that the THC, differential hemocyte count (DHC) and amount of phenol oxidase activity in 5$^{th}$ instar larvae of Indian meal moth were largely influenced by starvation periods, nutritional diets and sex.

**Keywords:** Indian meal moth, starvation periods, nutritional diets, sex, Phenol oxidase enzyme, immunity

**Shahrood University of Technology**

**Faculty of Agricalture**

## M.Sc. Thesis in Entomology

# The effects of diet and starvation stress on cellular immune reactions of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hὺbner) (Lepidoptera: Pyralidae)

By: Mitra Ebrahimi

Supervisores:

Dr. Maryam Ajamhassani

November 2017