بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی

واکنش‌های دفاع فیزیولوژیک بید سیب‌زمینی *Phthorimaea operculella* Zell. در مقابل تنش‌های دمایی و قارچ *Beauveria bassiana*

نگارنده:

زهرا پورعلی

استاد راهنما:

مریم عجم‌حسنی

بهمن‌ماه ۱۳۹۶

شماره: ۳۹۴/ک
تاریخ: ۱۳۹۶/۱۲/۲

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 / آقای زهرا پورعلی با شماره دانشجویی۹۴۳۷۴۵۴ رشته: گیاهپزشکی گرایش: حشره شناسی کشاورزی تحت عنوان واکنش‌های دفاع فیزیولوژیک بید سیب‌زمینی *Phthorimaea operculella* Zell. در مقابل تنش‌های دمایی و قارچ *Beauveria bassiana*

که در تاریخ ۱۳۹۶/۱۱/۲ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می‌گردد:

قبول (با درجه: عالی.....) ☑ **مردود** ☐

نوع تحقیق: **نظری** ☐ **عملی** ☑

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

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمدرضا 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).

تقدیم به :

همسر عزیزم همراه و مشفق همیشگی زندگیم

و محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم

که با مهربانی چگونه زیستن را به من آموخته اند.

قدردانی

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این دوره را به پایان برسانم.

در ابتدا از همسر عزیزم، پدر و مادر مهربانم و برادرانم که وجودشان همیشه گرمابخش و تسلای خاطر بوده و در پشت سر گذاشتن این مسیر همواره پشتیبان و مشفق من بودند، بی‌نهایت متشکرم و همواره قدردان همدلی‌ها و محبت‌هایشان هستم. سعادت، سلامت و بهروزی‌شان را از خداوند منان خواستارم.

تقدیر و تشکر می‌کنم از استاد ارجمندم سرکار خانم دکتر عجم حسنی به عنوان استاد راهنما به پاس زحمات و الطاف بی نهایتشان، راهنمایی‌های عالمانه‌اشان و وجودشان که سرشار از مهربانی و عطوفت است.

از مدیریت محترم گروه گیاه‌پزشکی جناب آقای دکتر حکیمی تبار به خاطر تمامی هدایت‌ها و نقطه نظرات بی دریغشان کمال تشکر را دارم.

از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر درخشان شادمهری بخاطر مشاورت‌های همه جانبه‌ی خود تشکر می‌نمایم.

از مسئول محترم آزمایشگاه سرکار خانم مهندس عبداللهی به پاس همکاری ایشان سپاسگزارم.

از دوستان عزیزم خانم‌ها مهندس ولی زاده و مهندس ابراهیمی که در سپری کردن این دوره همواره از کمک‌های ایشان بهره‌مند بودم، سپاسگزاری می‌کنم.

تعهد نامه

اینجانب **زهرا پورعلی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته حشره شناسی کشاورزی/ دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **واکنش‌های دفاع فیزیولوژیک بید سیب‌زمینی *Phthorimaea operculella* Zell. در مقابل تنش‌های دمایی و قارچ *Beauveria bassiana***

تحت راهنمائی 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 دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول 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، یکی از اجزای مهم سیستم ایمنی حشرات در برابر انواع تنش‌ها مانند حمله بیمارگرها، پارازیتوئیدها، دوره‌های گرسنگی و تغییرات دمایی می‌باشند. شناخت ویژگی‌های سلول‌های خونی، فراوانی آن‌ها و بررسی میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در مطالعات ایمنی شناسی سلولی حائز اهمیت می‌باشد. در این تحقیق سلول‌های خونی لارو سن چهارم(Zeller) *Phthorimaea operculella* پس از رنگ‌آمیزی با Giemsa با میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ۴۰ شناسایی شدند. پنج نوع سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند. فراوانی سلول‌های خونی و فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز لاروهای سن چهارم این آفت تحت تاثیر استرس‌های دمایی و نیز پس از تغذیه از ۵ رقم سیب زمینی شامل سانته، اگریا، فونتانه، آلفا پا بلند و آلفا بررسی شد. همچنین واکنش ایمنی لارو سن چهارم بید سیب زمینی در برابر دو جدایه از قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* شامل Fashand و 47 پس از گذشت ۳، ۶ و ۱۰ ساعت بررسی شد. نتایج اثرات مختلف دما بر سامانه ایمنی بید سیب زمینی نشان داد که تعداد کل سلول‌های خونی و پلاسموتوسیت-های لاروهایی که به مدت ۲۴ ساعت تحت تنش دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، در مقایسه با دمای شاهد (۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد) به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ، کاهش معنی‌داری در تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها نسبت به دمای شاهد ایجاد شد. نتایج اثر دو جدایه قارچ بر دفاع سلولی بید سیب زمینی نشان داد که تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها بعد از گذشت ۳ ساعت به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت. افزایش تعداد سلول‌های خونی در جدایه Fashand به طور محسوس‌تری صورت گرفت. سپس تعداد کل سلول‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در زمان‌های ۶ و ۱۰ ساعت پس از تزریق به تدریج کاهش یافت. پروهموسیت‌ها نیز به عنوان سلول‌های پایه، کاهش معنی داری ۶ ساعت پس از تزریق اسپورها نشان دادند. نتایج اثرات پنج رقم سیب زمینی بر سامانه ایمنی بید سیب زمینی نشان داد که بیش‌ترین تعداد کل سلول‌های خونی، گرانولوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها در لاروهای تغذیه کرده از رقم اگریا بود و کمترین فراوانی این سلول‌ها در لاروهایی بود که از رقم آلفا تغذیه کردند. بیش-ترین تعداد پروهموسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها به ترتیب مربوط به لاروهای تغذیه کرده از ارقام سانته و اگریا حاصل شد. فعالیت فنل اکسیداز در حضور سوبسترای L- DOPA اندازه گیری شد. این پارامتر در لاروهای تحت تنش دما و تغذیه کرده از ارقام مختلف متغیر بود. دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد سبب

افزایش معنی‌دار فعالیت فنل‌اکسیداز و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد کاهش معنی‌دار این پارامتر را به دنبال داشت. بیش‌ترین فعالیت فنل اکسیداز در لاروهای تغذیه کرده از رقم اگریا و کم‌ترین آن مربوط به لارو-های تغذیه کرده از رقم آلفا پابلند بود. با توجه به ضعف ایمنی حشره در دمای پایین، فعال شدن پاسخ ایمنی در برابر هر دو جدایه قارچ Fashand و 47 و همچنین رقم اگریا، بنابراین استفاده از سیستم خنک کننده در انبارها، تلفیق استفاده از ارقام مقاوم و قارچ‌های بیمارگر حشرات در جهت کنترل بهتر این حشره کمک خواهد کرد.

کلمات کلیدی: بید سیب زمینی، سلول‌های خونی، تنش‌های دمایی، قارچ بیمارگر حشرات، رژیم‌های غذایی، آنزیم فنل‌اکسیداز

مقاله‌ی مستخرج از پایان نامه

The effect of thermal stresses on the immune system of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae)

دفاع سلولی بید سیب زمینی *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) در برابر قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana*

فهرست مطالب

فصل اول- مقدمه و کلیات ۱

فصل دوم- بررسی منابع ۵

۲-۱- بید سیب‌زمینی ٦

۲-۲- جایگاه رده‌بندی ٦

۲-۳- شکل شناسی مراحل زیستی ٦

۲-۳-۱- حشره کامل ٦

۲-۳-۲- تخم ۷

۲-۳-۳- لارو ۷

۲-۳-۴- شفیره ۸

۲-۴- زیست‌شناسی ۸

۲-۵- تغذیه و خسارت ۹

۲-۶- همولنف حشرات ۱۰

۲-۷- سلول‌های خونی ۱۱

۲-۸- انواع سلول‌های خونی ۱۲

۲-۹- اندام‌های هماتوپوئتیک ۱۳

۲-۱۰- سیستم ایمنی حشرات ۱٤

۲-۱۱- پاسخ ایمنی هیومرال در حشرات ۱۷

۲-۱۲- پاسخ ایمنی سلولی در حشرات ۱۸

۲-۱۲-۱- بیگانه‌خواری ۱۹

۲-۱۲-۲- تشکیل گره ۱۹

۲-۱۲-۳- تشکیل کپسول ۲۰

۲-۱۲-۴- ملانیزه شدن ۲۱

۲-۱۳-آنزیم فنل‌اکسیداز ۲۲

۲-۱۴- قارچ ***Beauveria bassiana*** به عنوان عامل بیمارگر و بیگانه ۲۳

۲-۱۵- مطالعات انجام شده در زمینه شناسایی سلول‌های خونی ۲٤

۲-۱۶- مطالعات انجام شده در زمینه تاثیر تنش‌های دمایی بر سامانه ایمنی حشرات ۲۶
۲-۱۷- مطالعات انجام شده در زمینه تاثیر عوامل بیمارگر مختلف بر سامانه ایمنی حشرات ۲۷
۲-۱۸- مطالعات انجام شده در زمینه تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر سامانه ایمنی حشرات ۲۹
فصل سوم- مواد و روش‌ها ۳۳
۳-۱- پرورش و تهیه کلنی بید سیب‌زمینی ۳٤
۳-۲- تهیه و کشت قارچ *B. bassiana* ۳٤
۳-۳- شناسایی سلول‌های خونی بید سیب‌زمینی ۳۵
۳-۴- شمارش کل سلول‌های خونی (Total Hemocyte Count) ۳۵
۳-۵- بررسی تاثیر دما روی تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی بید سیب‌زمینی ۳٦
۳-۶- بررسی وضعیت ایمنی سلولی لاروهای سن چهار بید سیب زمینی در برابر دو جدایه از قارچ *B. bassiana* ۳٦
۳-۷- بررسی اثر پنج رقم مختلف سیب زمینی بر سامانه ایمنی بید سیب زمینی ۳۷
۳-۸- تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز ۳۷
فصل چهارم- نتایج و بحث ۳۹
۴-۱- شناسایی سلول‌های خونی بید سیب زمینی ٤۰
۴-۲- شمارش کل (Total Hemocyte Count) و تفرقی (Differential Hemocyte count) سلول‌های خونی *P. operculella* ٤٦
۴-۳- بررسی تاثیر تنش دما بر تعداد کل سلول‌های خونی (THC) و انواع سلول‌های خونی *P. operculella* ۵۳
۴-۴- تاثیر تنش دما بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در همولنف بید سیب‌زمینی ۵٦
۴-۵- بررسی وضعیت ایمنی سلولی لاروهای سن چهار بید سیب زمینی در برابر دو جدایه از قارچ *B. bassiana* ٦۱
۴-۶- بررسی اثر پنج رقم مختلف سیب زمینی بر سامانه ایمنی بید سیب زمینی ۷۰
۴-۷- اثر مختلف پنج رقم مختلف سیب زمینی بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در همولنف بید سیبزمینی ۷۳
۴-۸- نتیجه‌گیری کلی ۷۸
۴-۹- پیشنهادات ۸۰
منابع ۸۱

فهرست اشکال

شکل ۲-۱- خسارت بید سیب زمینی به غده و ایجاد دالان‌هایی در آن..... ۱۰

شکل۴-۱- تصاویر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰) از سلول‌های خونی رنگ‌آمیزی شده با Giemsa در لارو حشره *P. operculella* ۴۱

شکل ۴-۲- تصویر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰) از سلول‌های گرانولوسیت در حال تقسیم میتوزی در لاروهای سن چهارم *P. operculella* ۴۱

شکل ۴-۳- فراوانی کل سلول‌های خونی در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی ۴۶

شکل ۴-۴- فراوانی پروهموسیت‌ها در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی..... ۴۷

شکل ۴-۵- فراوانی پلاسموتوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی ۴۷

شکل ۴-۶- فراوانی گرانولوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی ۴۸

شکل ۴-۷- فراوانی اونوسیتوئیدها در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی ۴۹

شکل ۴-۸- فراوانی اسفرولوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی ۴۹

شکل ۴-۹- فراوانی سلول‌های خونی مختلف در همولنف لاروهای سن چهارم بید سیب زمینی..... ۵۰

شکل ۴-۱۰- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد کل سلول‌های خونی بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب) ۵۴

شکل ۴-۱۱- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد پلاسموتوسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب) ۵۴

شکل ۴-۱۲- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد اونوسیتوئیدهای بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)..... ۵۵

شکل ۴-۱۳- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد گرانولوسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب) ۵۵

شکل ۴-۱۴- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد پروهموسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)..... ۵۶

شکل ۴-۱۵- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف بید سیب‌زمینی ۵۷

شکل ۴-۱۶- تاثیر دو جدایه ی فشند و ۴۷ از قارچ *B. bassiana* بر تعداد کل سلول‌های خونی *P. operculella* ۶۱

شکل ۴-۱۷- تاثیر دو جدایه ی فشند و ۴۷ از قارچ *B. bassiana* بر تعداد گرانولوسیت‌های *P. operculella* ۶۲

شکل ۴-۱۸- تاثیر دو جدایه ی فشند و ۴۷ از قارچ *B. bassiana* بر تعداد پلاسموتوسیت‌های *P. operculella* ۶۲

شکل ۴-۱۹- تاثیر دو جدایه ی فشند و ۴۷ از قارچ *B. bassiana* بر تعداد پروهموسیت‌های *P. operculella*..... ۶۳

شکل ۴-۲۰- تاثیر ارقام مختلف سیب زمینی بر تعداد کل سلول‌های خونی بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب) ۷۰

شکل ۴-۲۱- تاثیر ارقام مختلف سیب زمینی بر تعداد پلاسموتوسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب) ۷۱

شکل ۴-۲۲- تاثیر ارقام مختلف سیب زمینی بر تعداد اونوسیتوئیدهای بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب).....۷۱

شکل ۴-۲۳- تاثیر ارقام مختلف سیب زمینی بر تعداد گرانولوسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب) ۷۲

شکل ۴-۲۴- تاثیر ارقام مختلف سیب زمینی بر تعداد پروهموسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب) ۷۲

شکل ۴-۲۵- تاثیر ارقام مختلف سیب زمینی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف بید سیب‌زمینی ۷۳

فهرست جداول

جدول۲-۱- مقایسه ی طول بدن و عرض کپسول سر در چهار سن لاروی بید سیب زمینی *Phthorimaea operculella* (محرمی‌پور، ۱۳۶۸).....۷

فصل اول

مقدمه و کلیات

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) به عنوان یکی از مهم ترین محصولات غـذایی در دنیـا محسوب می‌شود، از نظر اهمیت بعد از محصولاتی چون گندم، برنج و ذرت در مقام چهارم قرار داشته و در ایران نیز از جایگاه ویژه‌ای در تغذیه مردم برخوردار است (پیوست، ۱۳۸۵) و از نظر تامین غذای مردم جهان پس از گنـدم و بـرنج در رتبـه سـوم قـرار دارد (فـائو[1]، ۲۰۱۴). سـیب زمینـی در زمـره محصولات غده ای است که دارای کربوهیدرات (نشاسته) زیادی بوده و نقش مهمـی در تغذیـه مـردم جهان دارد و به دلیل عملکرد بسیار بالا در واحد سطح، انرژی و مقدار پروتئین تولیدی در واحد سطح سیب زمینی بیش از گندم و برنج می‌باشد (خواجه پور، ۱۳۷۰). این محصول در بـیش از ۱۲۵ کشـور رشد کرده و به طور تقریبی بیش از یک میلیارد نفر روزانه آن را مصرف می‌کنند. بقای صدها میلیـون نفر در کشورهای در حال توسعه به سیب زمینی بستگی دارد. کشت این محصـول در کشـورهـای در حال توسعه در حال گسترش است، چرا که سهولت کشت و محتـوی مغـذی سـیب زمینـی آن را بـه عنوان یک غذا و محصول ارزشمند برای میلیون‌ها کشاورز تضمین می‌کند. کشورهای در حال توسـعه اکنون بزرگ‌ترین تولیدکننده و واردکننده سیب زمینی و محصولات سیب زمینی هستند. دولـت پـرو برای حمایت از تولید سیب زمینی داخلی و حفظ تولید و تشویق مردم به مصرف بیش‌تر سیب زمینی، از سیب زمینی به عنوان نان استفاده می‌کند. یک شرکت تولیدی دولتی روزانه بیش از ۱۲۰۰۰ قرص نان تولید می‌کند که در آن از یک سوم سیب زمینی آب پز و دو سوم آرد گندم استفاده شـده اسـت. جایگزین شدن یک سوم سیب زمینی له شده به جای آرد گندم باعث شده که نان نرم‌تر، خوشمزه‌تر، مغذی‌تر و ارزان‌تر از نانی شود که فقط از گندم تشکیل شده است. از ژانویه ۲۰۰۸، در زندان‌های پـرو و بسیاری از مدارس دولتی نان سیب زمینی با نام (papa pan) توزیع می‌شـود (نبـامبی[2] و همکـاران، ۲۰۰۹). در دنیا سطح زیر کشت سیب زمینی به طور گسترده ای در حال افـزایش اسـت و بـر طبـق

1. Fao
2. Nebambi

گزارش فائو (۲۰۱۴)، تولید جهانی سیب زمینی در سال ۲۰۱۲ بیش از ۳۰۰ میلیون تن بود. در ایران، سطح زیر کشت سیب زمینی در سال ۱۳۹۰ به حدود ۱۸۶ هزار هکتار افزایش یافت و سالانه در حدود شش میلیون تن سیب زمینی در کشور تولید می‌شود (آنونیموس[1]، ۲۰۱۳). در حال حاضر مهم‌ترین مناطق تولید سیب زمینی در ایران استان‌های زنجان، آذربایجان شرقی و غربی، همدان، اصفهان، فارس و خراسان می‌باشند. سیب زمینی همواره در تمام نقاط دنیا در معرض حمله تعداد زیادی از عوامل بیمارگر گیاهی از جمله ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و آفات قرار می‌گیرد که در بین آن‌ها بید سیب زمینی با نام علمی *Phthorimaea oprculella* Zeller (Lep: Gelechiidae) بعد از عوامل منتقل کننده ی ویروس به عنوان عمده ترین عامل خسارتزا به سیب زمینی در جهان شناخته شده است (خانجانی، ۱۳۸۶) که یکی از مهمترین عوامل محدود کننده ی تولید سیب زمینی در سراسر جهان است (راندون[2] و همکاران، ۲۰۰۷). آفت مذکور مهم‌ترین مشکل سیب زمینی در انبارها تحت شرایط گرم و خشک تابستان‌ها می‌باشد (ون آرکس و گبهارت [3]، ۱۹۹۰). به نظر می‌رسد که این آفت بومی آمریکای جنوبی است جایی که میزبان اصلی آن یعنی سیب زمینی می‌باشد (راتشیلد[4]، ۱۹۸۶). با این حال این حشره در سراسر جهان و هر مکانی که گیاهان خانواده Solanaceae در آنجا یافت و یا کشت شوند، حضور دارد. سِرشت و ماهیت همه جایی این حشره، آن را به توانایی حضور در محدوده وسیع اقلیمی سازگار کرده است. این آفت در سال ۱۹۷۰، به عنوان یک آفت جدی و مهم برای تولیدکنندگان سیب زمینی ظاهر شد و در نتیجه ی آن محققان زیادی در این زمینه مطالعات گسترده ای انجام دادند (فنمور[5]، ۱۹۷۹؛ راندون و همکاران، ۲۰۰۸). به تجربه ثابت شده است که مبارزه شیمیایی با این آفت به دلیل مخفی بودن آن در درون برگ‌ها، ساقه و غده‌ها و همچنین به

1. Anonymous
2. Rondon
3. Von Arx & Gebhardt
4. Rothschild
5. Fenemore

دلیل بروز مقاومت سریع به حشره کش‌ها به تنهایی کافی نبوده و بایستی با بکارگیری روش‌های مختلف زراعی، مکانیکی، بیولوژیک و شیمیایی با این آفت مقابله نمود (بیکن[1] و همکاران، ۱۹۷۲). هم‌چنین به دلیل خسارت عمده‌ای که توسط این آفت در انبار به محصول وارد می‌شود، علاوه بر روش‌های توصیه شده در مقابله با این آفت در مزرعه، نکات مربوط به دوره انبارداری نیز می‌بایست رعایت گردند. با توجه به تأثیر نامطلوب اقتصادی بید سیب‌زمینی و لزوم کنترل آن، شناخت ویژگی‌های سلول‌های خونی[2] این حشره مانند ریخت‌شناسی و فراوانی آن‌ها در مطالعات ایمنی شناسی و برهمکنش‌های دفاع سلولی در برابر ترکیبات شیمیایی، آلاینده‌ها، اسپور قارچ‌های بیمارگر، تنش‌های محیطی مانند دما و نیز اثرات رژیم‌های غذایی مختلف بر سامانه ایمنی این حشره در جهت کنترل بهتر آن به ما کمک خواهد کرد. بنابراین اهداف این تحقیق عبارتند از:

ـ شناسایی انواع سلول‌های خونی در گردش خون *P. operculella*

ـ بررسی تعداد کل سلول‌های خونی و تعداد تفرقی آن‌ها

ـ بررسی تاثیر تنش‌های دمایی بر روی فراوانی سلول‌های خونی

- تعیین وضعیت ایمنی سلولی لاروهای سن چهار بید سیب زمینی در برابر دو جدایه از قارچ *B. bassiana*

- بررسی اثرات مختلف پنج رقم مختلف سیب زمینی بر سامانه ایمنی بید سیب زمینی

- تاثیر دماهای بالا و پایین و پنج رقم مختلف سیب زمینی بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در همولنف بید سیب زمینی

1. Bacon
2. Hemocytes

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- بید سیب‌زمینی

بید سیب‌زمینی(Lepidoptera: Gelechiidae) *Phthorimaea operculella*، از آفات الیگوفاژ محصولات خانواده‌ی Solanaceae شامل سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، توتون، بادمجان، فلفل، بامیه و تاجریزی بوده و به طور وسیعی در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده شده است (فنمور، ۱۹۸۸).

۲-۲- جایگاه رده‌بندی

بید سیب‌زمینی در رده‌ی حشرات (Insecta)، راسته‌ی بالپولک‌داران (Lepidoptera)، زیر راسته Microlepidoptera، بالا خانواده‌ی Gelechioidea، خانواده‌ی Gelechiidae، زیر خانواده‌ی Gelechiinae و قبیله‌ی Gnorimoschemini قرار دارد (راندون، ۲۰۱۰).

۲-۳- شکل شناسی مراحل زیستی

۲-۳-۱- حشره کامل

حشره کامل، شب پره‌ی کوچکی است که عرض آن با بال‌های باز ۱۵-۱۰ میلی‌متر است. بال‌های جلویی خاکستری مایل به قهوه‌ای تیره و گاهی نیز زرد روشن می‌باشد. سطح بال‌های جلویی دارای لکه‌های کوچکی است که از تراکم فلس‌های تیره رنگ به وجود آمده‌اند. در قاعده عقبی بال‌ها معمولاً دو لکه مایل به سیاه و کشیده دیده می‌شود که اغلب به هم می‌رسند. بال‌ها در قسمت انتها باریک و نوک تیز شده اند. حاشیه عقبی بال‌های جلویی و حاشیه جلویی و عقبی بال‌های عقبی مجهز به ریشک‌های طویل خاکستری رنگ می‌باشد (راندون، ۲۰۱۰). هنگام استراحت بال‌ها به صورت شیروانی روی بدن قرار می‌گیرند. شکم در نرها نسبتاً کشیده و در قسمت انتها در طرفین حلقه هشتم، مجهز

به یک دسته موی بلند می‌باشند. شکم در افراد ماده متورم و فاقد دسته موی بلند در حلقه آخر است (راتشیلد، ۱۹۸۶).

۲-۳-۲- تخم

تخم ها بیضی شکل و کوچکتر از یک میلی متر است. رنگ آن ابتدا صدفی مایل به سفید ولی به تدریج همراه با رشد جنین به رنگ زرد در می‌آید. پس از کامل شدن رشد جنین، رنگ آن خرمایی مایل به سیاه می‌شود (راندون و همکاران، ۲۰۰۷).

۲-۳-۳- لارو

این حشره دارای چهار سن لاروی است. طول بدن در لارو کامل، به طور متوسط ۱۰ میلی‌متر و حداکثر به ۱۲ میلی‌متر می‌رسد. رنگ بدن لارو سن اول سفید مایل به زرد و در سن اخر به رنگ‌های خاکستری متمایل به صورتی و سبز روشن دیده می‌شود. در لاروهای سن چهار، نرها از ماده‌ها با حضور دو بیضه‌ی مایل به زرد و طویل متمایز می شوند. لاروها در صورتی که از برگ و یا سایر اندام های هوایی سیب زمینی تغذیه کرده باشند به رنگ سبز و در صورتی که از غده تغذیه کنند کرم رنگ و با هاله ای صورتی دیده می شوند (اسماعیلی، ۱۳۹۰). کپسول سر در لاروها به رنگ قهوه‌ای روشن است و با اندازه گیری عرض کپسول سر می‌توان به سنین مختلف لاروی پی برد (جدول ۲-۱).

جدول۲-۱- مقایسه ی طول بدن و عرض کپسول سر در چهار سن لاروی بید سیب زمینی *Phthorimaea operculella* (محرمی‌پور، ۱۳۶۸)

سنین مختلف لاروی	متوسط طول بدن (میلی‌متر)	عرض کپسول سر(میلی‌متر)
اول	۱/۵۹	۰/۱۷ -۰/۲۲
دوم	۳/۲۷	۰/۲۹ -۰/۴۱
سوم	۵/۷۴	۰/۴۶ -۰/۶۵
چهارم	۹/۹۵	۰/۷۷ -۰/۹۲

۲-۳-۴- شفیره

طول بدن شفیره بید سیب زمینی به طور متوسط ۷/۱ میلی‌متر است. رنگ بدن در ابتدای تشکیل به رنگ قهوه ای روشن ولی با گذشت زمان و سخت شدن پوست بدن به رنگ قهوه‌ای تیره تغییر می‌یابد (حبیبی ۱۳۶۵). شفیره اغلب درون پیله دوکی شکل زبر و به رنگ سفید تیره تشکیل می‌شود (راندون، ۲۰۱۰).

۲-۴- زیست‌شناسی

این آفت حشره ای شب پرواز و معمولا در طول روز غیر فعال بوده و تخمگذاری شب هنگام و در تاریکی انجام می گیرد (اسماعیلی، ۱۳۹۰). جفت گیری ۱۶-۲۰ ساعت پس از ظاهر شدن حشرات بالغ صورت می گیرد که حدود ۸۵ تا ۲۰۰ دقیقه طول می کشد. این شب پره‌ها می‌توانند در میان شکاف‌های موجود در خاک حرکت کرده و مسیر کوتاهی را در میان خاک سست، برای پیدا کردن غده‌ها و تخم ریزی روی آن‌ها ایجاد کنند (اسماعیلی، ۱۳۹۰). حشرات ماده در مزرعه روی برگ‌ها، خاک و باقیمانده‌ی گیاهان یا غده‌هایی که از خاک بیرون زده اند تخم گذاری می‌کنند (راندون، ۲۰۰۷). حشرات بالغ برگ‌ها را برای تخم ریزی ترجیح داده (اسماعیلی، ۱۳۹۰) و در صورت دسترسی به شاخ و برگ سیب زمینی، در خاک تخم ریزی نمی‌کنند (تراینر[1]، ۱۹۷۵). برخی مطالعات آزمایشگاهی نشان دادند که حشرات ماده تخم‌های خود را به صورت انفرادی یا دسته ای (۲۰-۲ عدد) در اطراف جوانه ها، شکاف ها، فرورفتگی های پوست غده سیب زمینی قرار می دهند (ال- علی[2] و همکاران، ۱۹۷۵). حشرات کامل پروازهای ضعیفی دارند (فنمور، ۱۹۸۸). هرچند که مطالعات اخیر نشان داده که آن‌ها می توانند به مدت بیش از ۵ ساعت تا ده کیلومتر بدون توقف پرواز کنند ولی

1. Traynier
2. Al-Ali

نمی توانند در بادهای سریع (با سرعت بیش از ۵-۶ متر بر ثانیه) پرواز کنند. این آفت فاقد دیاپوز حقیقی بوده و در صورت مطلوب بودن شرایط محیطی در مزرعه و انبارهای فاقد سیستم خنک کننده، می تواند تا ۱۸ نسل در سال تولید کند (اسماعیلی، ۱۳۹۰). بید سیب زمینی زمستان را در کرج به صورت لاروهای سنین بالا و شفیره در داخل غده های آلوده در انبار و یا زیر خاک در مزرعه سپری می‌کند. دوره جنینی تخم به شرایط آب و هوایی بستگی دارد و به نظر می‌رسدکه در دمای کمتر از ده درجه سانتی گراد تکامل آن متوقف می شود. دوره جنینی تخم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، سه الی چهار روز طول می‌کشد. به نظر برخی محققین، این حشره شش نسل در سال دارد، به طوری که طول هر نسل در تابستان یک ماه، زمستان چهار ماه و در بهار و پاییز دو ماه است. هرچند در آزمایشگاه تولید هفت نسل از این حشره گزارش شده است.

۲-۵- تغذیه و خسارت

آلودگی مزارع با حمله و تخم ریزی حشرات بالغ این آفت آغاز می شود. لاروهای این آفت در برگ، ساقه، دمبرگ و غده‌های سیب‌زمینی دالان‌هایی حفر می‌کند و خسارت اصلی آن مربوط به حفر دالان در غده‌های سیب‌زمینی است. ولی در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری در مزرعه و روی برگ های گیاه میزبان نیز خسارت قابل توجهی ایجاد می‌کند. در انبارها، پس از تکمیل دوره لاروی، لارو سن آخر از غده بیرون آمده و در روی غده‌ها، کیسه‌ها و یا قفسه‌های داخل انبار تبدیل به شفیره می‌گردند (خانجانی، ۱۳۸۵). اگرچه خسارت مزرعه‌ای حاصل از آسیب برگ‌های محصول سیب‌زمینی توسط این آفت در مقایسه با آلودگی غده‌های سیب‌زمینی نسبتا کمتر می باشد (گرافت[1]، ۱۹۱۷)، اما در نواحی نسبتا گرمسیری لاروهای بید سیب‌زمینی معمولاً با حفر کانال‌هایی در برگ‌ها، اپیدرم بالایی و پایینی برگ را دست نخورده باقی می‌گذارند که در نهایت منجر به کاهش سطح فتوسنتزی و کوچک ماندن

1. Graft

اندازه غده‌ها می‌گردد (راندون، ۲۰۱۰). در انبارها آلوده شدن غده‌ها ممکن است بازارپسندی محصول را کاهش داده و آسیب غده‌ها در انبار، مخصوصاً در انبارهای فاقد سیستم خنک کننده می‌تواند بسیار شدید باشد (آرنون[1] و همکاران، ۱۹۹۸). بید سیب‌زمینی در شرایط مساعد مزرعه با ایجاد نسل‌های پیاپی جمعیت انبوهی را ایجاد می‌کند. این آفت باعث کاهش کیفیت محصول شده و خطر آلودگی به عوامل بیماری‌زای قارچی و باکتریایی را افزایش می‌دهد. هم‌چنین حمله آفت به اندام‌های هوایی و غده‌ها می تواند عملکرد سیب‌زمینی را به طور قابل ملاحظه‌ای پایین بیاورد (کاپینرا[2]، ۲۰۰۱).

شکل ۲-۱- خسارت بید سیب زمینی به غده و ایجاد دالان‌هایی در آن

۲-۶- همولنف حشرات

به طور عمده همولنف مایعی بی‌رنگ شبیه به خون در مهره‌داران است که در داخل بدن بندپایان و در تماس مستقیم با بافت جانور گردش می‌کند. ۱۵ تا ۳۰٪ وزن کل بدن و ۱۵ تا ۷۰٪ حجم کل بدن را تشکیل می‌دهد. همولنف ترکیبی از مایع پلاسما است و سلول‌های همولنف که هموسیت نامیده می‌شوند، در آن معلق هستند. پلاسما علاوه بر هموسیت حاوی موادشیمیایی زیادی است. دستگاه گردش خون باز از مشخصات بندپایان مانند عنکبوت‌ها، سخت‌پوستان، و حشرات می‌باشد. به این معنا

1. Arnone
2. Capinera

که همولنف محدود به رگ‌ها نیست (چپمن[1]، ۱۹۹۸؛ وایت[2]، ۱۹۶۱). به علاوه غیربندپایانی مانند نرمتنان هم دستگاه گردش خون باز دارند. همولنف دارای وظایفی چون حمل و انتقال مواد غذایی به سلول‌ها، دفع مواد زائد خون، ذخیره آب، عامل چرب کننده و لغزنده بین اندام‌های داخلی، تبادل گرمایی، ایجاد فشار هیدرواستاتیکی، واکنش‌های ایمنی، انعقاد خون و بهبود زخم‌ها می‌باشد هر چند در انتقال گازهای تنفسی نقشی ندارد (نیشن[3]، ۲۰۰۸).

۲-۷- سلول‌های خونی

هموسیت‌ها سلول‌هایی هستند که در داخل همولنف گردش می‌کنند و واکنش‌های سریع و موثری علیه پاتوژن‌هایی که به هموسل‌ها حمله می‌کنند، نشان می‌دهند (لاوین[4] و استرند[5]، ۲۰۰۲). بخش زنده‌ای از سیستم ایمنی حشرات هستند و از لحاظ بیوشیمیایی دارای حساسیت بالایی هستند. شکل ظاهری این سلول‌ها از زمانی به زمان دیگر در یک حشره تغییر می‌کند و شکل آن ممکن است در جریان تثبیت، رنگ آمیزی و سایر مراحل جمع آوری و تهیه‌ی آن‌ها تغییر کند. سلول‌های خونی انواع پاسخ‌های دفاعی در حشرات را به عهده دارند. که این پاسخ‌ها در سیستم ایمنی حشرات نسبت به پاتوژن‌ها یکی از مهم‌ترین وظیفه‌های سلول‌ها برای کاهش و یا از بین بردن عوامل بیماری‌زا است (هافمن[6]، ۱۹۹۵). تنوع بسیاری در پاسخ‌های دفاعی بدن حشرات وجود دارد که این به دلیل تنوع گونه‌های حشرات می‌باشد (اشمید همپل[7]، ۲۰۰۵). با این حال، تعدادی از پاسخ‌های ایمنی ذاتی در بسیاری از حشرات مورد مطالعه قرار گرفته است. این پاسخ‌ها شامل تشکیل گره، کپسوله شدن، ملانیزاسیون و بیگانه‌خواری در نتیجه‌ی مکانیسم دفاعی و حرکت هورمون‌ها و مواد تغذیه‌ای برای

1. Chapman
2. Wyatt
3. Nation
4. Lavine
5. Strand
6. Hoffmann
7. Schmid-Hempel

رشد مناسب و بهبود زخم از طریق اتصال به بافت‌ها می‌باشند. این فرایندها به طور کلی در شناخت عوامل بیماری‌زا، علائم بیوشیمیایی و پاکسازی نهایی همولنف از میکروارگانیسم‌های مهاجم عمل می‌کنند (روزالز[1]، ۲۰۱۱). پاسخ‌های ایمنی هیومرال شامل بیوسنتز پپتیدهای ضد میکروب، فعال شدن آنزیم‌ها از قبیل لیزوزیم و سیستم پروفنل‌اکسیداز، تنظیم انعقاد همولنف و تولید گونه‌های اکسیژنه‌ی فعال می‌باشد (جیانگ[2]، ۲۰۰۸؛ تساکاس و مارماراس[3]، ۲۰۱۰).

۲-۸- انواع سلول‌های خونی

مطالعه سلول‌های خونی حشرات به ۱۵۰ سال قبل باز می‌گردد و بیش‌تر در مورد بالپولک‌داران، بال-غشائیان، سخت بالپوشان و دوبالان انجام شده است (گوپتا[4]، ۱۹۸۵). طبقه بندی سلول‌های خونی هنوز استاندارد نشده و طبقه‌بندی‌ها و شکل‌های مختلفی از آن‌ها به چاپ رسیده است (نیشن، ۲۰۰۲). با این حال طبقه‌بندی آن‌ها با استفاده از مرجع و کلیدهای شناسایی، امکان مطالعات بیش‌تر در مورد عملکرد آن‌ها فراهم می‌کند. برای رده‌های حشرات مختلف، سلول‌های خونی دارای اشکال مختلف، عملکرد و نام متفاوت هستند (لاوین و استرند، ۲۰۰۲). برای اهداف عملی مقایسه بین حشرات مختلف، از نام‌های سلولی که برای بالپولک‌داران تعریف شده استفاده می‌کنیم (استرند، ۲۰۰۸a) که انواع آن‌ها به ویژه در بالپولک‌داران عبارتند از: پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها.

1. Rosales
2. Jiang
3. Marmaras
4. Gupta

۲-۹- اندام‌های هماتوپوئتیک

هموسیت‌ها سلول‌های خونی متحرکی هستند که در تمام فضای خارج سلولی حرکت کرده و در همه رده‌های شاخه جانوران وجود دارند. سلول‌های خونی نقش مهمی در شکل دادن محیط خارج سلولی و پاسخ ایمنی ایفا می‌کنند. سلول‌های خونی به طور پیشرفته به سلول‌های اپیتلیالی که با سیستم عروقی (اندوتلیا) و حفره‌های بدن (مزوتلیا) متصل هستند، نزدیک هستند. در مهره داران و حشرات، از یک سلول منفرد و مشترک که همانژیوبلاست[1] نامیده می‌شود، اندوتلیوم عروقی و سلول‌های خونی تشکیل می‌شود. در جانوران بالغ، به نظر می‌رسد که بسیاری از سلول‌های خونی تمایز یافته توانایی تکثیر را حفظ می‌کنند؛ با این حال، در اغلب مواردی که از نزدیک بررسی شده، بخش عمده ای از تکثیر سلول‌های خونی در اندام‌های تخصص یافته ای به نام اندام‌های هماتوپوئتیک[2] اتفاق می‌افتد. اندام‌های هماتوپوئتیک محیطی را فراهم می‌کنند که سلول‌های بنیادی خون تمایز نیافته قادر به خودنوسازی و تمایز به چندین رده از سلول‌های خون‌ساز هستند که انواع مختلفی از سلول‌های خونی را ایجاد می‌کند. هماتوپوئزیز در مهره داران، در مغز استخوان اتفاق می‌افتد و در تحقیقات گسترده‌ای توسط ایمونولوژیست‌ها و زیست شناسان مورد بحث قرار گرفته است. اما در مورد تشکیل سلول‌های خونی در بی مهرگان اطلاعات کمتری در دسترس است. سلول‌های خونی معمولا طول عمری از چند روز تا چند هفته دارند و نیاز به جایگزینی دائمی دارند. علاوه بر این، با توجه به این که نیاز به سلول-های خونی (به ویژه در موجوداتی که در فرایندهای مربوط به پاسخ ایمنی و فرایند بهبود زخم‌ها و احیا درگیرند) در طول زمان تغییر می‌کند، میزان تولید سلول‌های خونی باید با این شرایط متغیر سازگار باشد. همانطور که ذکر شد سلول‌های خونی در بافت‌های تخصص یافته ی اندام‌های هماتوپوئتیک تولید می‌شوند. اندام‌های هماتوپوئتیک در طول حیات موجودات، شمار زیادی سلول

1. Hemangioblasts
2. Hematopoietic

خونی تولید کرده و بدین ترتیب اندام‌های خون‌ساز (هماتوپوئتیک) باید با سلول‌های بنیادی خود تجدید شوند. اگرچه اندام‌های هماتوپوئتیک به طور عموم با سیستم عروقی مرتبط است، با این حال موقعیت و ساختار داخلی آن در بندپایان فوق العاده متغیر است. در حشرات، اندام‌های هماتوپوئتیک با رگ پشتی ارتباط دارند و غدد لنفاوی نامیده می‌شوند. برای مدت‌های طولانی به نظر می‌رسید که بافت‌های لنفاویِ به هم فشرده محل بیگانه‌خواری را نشان می‌دهند، چرا که آن‌ها معمولاً حاوی پلاسموتوسیت‌های بالغ و یا گرانولوسیت‌هایی هستند که فعالیت بیگانه‌خواری دارند (ناتینگ[1]، ۱۹۵۱؛ جونز[2]، ۱۹۷۰؛ هینکس[3] و آرنولد[4]، ۱۹۷۷). همچنین گزارش شده که تکثیر سلول‌های خونی توسط تقسیم سلول‌های در گردش خون نیز صورت می‌گیرد (توبر[5]، ۱۹۳۶؛ فیر و اوکانر[6]، ۱۹۶۵؛ فیر و مک-کلین[7]، ۱۹۶۸؛ هافمن و همکاران، ۱۹۷۹). شواهد تجربی آشکاری درمورد نقش اندام هماتوپوئتیک وجود دارد که نشان داده با حذف این ساختار تعداد سلول‌های خونی در گردش خون به شدت کم می‌شوند (نیتونو[8] و همکاران، ۱۹۶۴).

۲-۱۰- سیستم ایمنی حشرات

واکنش سلولی در سیستم ایمنی حشرات یک مانع یا سد مهم در برابر فرایند آلودگی می‌باشد (هافمن، ۲۰۰۳، ۱۹۹۵). حشرات سیستم ایمنی‌شان را در مقابله با پاتوژن‌های مختلفی که وارد بدن‌شان می‌شود و یا تنش‌های متعددی که به آن‌ها وارد می‌شود، فعال می‌کنند (جانوای و مدزیتو[9]،

1. Nutting
2. Jones
3. Hinks
4. Arnold
5. Tauber
6. Feir & O’Connor
7. McClain
8. Nittono
9. Janeway & Medzhitov

۲۰۰۲؛ راتکلیف و ویتن[1]، ۲۰۰۴؛ نپی و کریستنسن[2]، ۲۰۰۵). در واقع پاسخ ایمنی حشرات، شامل تمام فرایندهایی است که حشرات از خود در برابر حمله ارگانیسم‌هایی از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها، پارازیتوئیدها و یا آلاینده‌ها و تنش‌های دما، نوع تغذیه و دیاپوز حفاظت می‌کنند (گیلسپی[3] و همکاران، ۱۹۹۷؛ سودرهال و سرنیوس[4]، ۱۹۹۸؛ لاوین و استرند، ۲۰۰۲؛ اشمید همپل، ۲۰۰۵؛ زیبایی و همکاران، ۲۰۱۱). سیستم ایمنی حشرات ذاتی می‌باشد که شامل دفاع سلولی و هیومرال است (بکیج[5]، ۲۰۰۸). دفاع هیومرال به مولکول‌های موثر شامل پپتیدهای ضد میکروبی و محصولات تولید شده کمپلکس آنزیم‌های پروتئازی نظیر مسیر فنل‌اکسیدازها اشاره می‌کند (بلاندین و لواشینا[6]، ۲۰۰۷؛ کورنلیس[7] و سودرهال، ۲۰۰۴؛ ایملر و بولت[8]، ۲۰۰۵؛ تئوپولد[9] و همکاران، ۲۰۰۴). در میان سازوکارهای دفاعی در شروع عفونت، سیستم‌های دفاعی به سرعت، مانند پپتیدهای ضد میکروبی، گیرنده‌های تشخیص عامل بیگانه مانند لکتین‌ها و سلول‌های بیگانه‌خواری درگیر در شناسایی و از بین بردن پاتوژن، فعال می‌شوند، که این مجموعه طیف گسترده‌ای از پاسخ‌های سلولی می‌باشد. این پاسخ‌ها نشان دهنده‌ی سیستم ایمنی ذاتی می‌باشند. در مهره‌داران مانند پستانداران، شناخت آنتی‌ژن توسط گیرنده‌های خاصی از لنفوسیت‌های T و B است که در عین حال، لایه‌های کامل‌تری از سیستم دفاعی مانند سیستم ایمنی اکتسابی شناخته شده است. این پاسخ در زمان‌های بعد در طول دوره‌ی عفونت فعال می‌شود. برای حشرات، این دیدگاه است که آن‌ها همانند بی مهرگان دیگر، تنها به پاسخ ایمنی ذاتی در مبارزه با میکروارگانیسم‌های مهاجم می‌پردازند. بر اساس تعریف، ایمنی ذاتی فاقد

1. Ratcliffe & Whitten
2. Nappi & Christensen
3. Gillespie
4. Soderhall & Cerenius
5. Beckage
6. Blandin & Levashina
7. Cornelis
8. Imler & Bulet
9. Theopold

ویژگی‌های ایمنی اکتسابی است (روزالز، ۲۰۱۱). میلیون‌ها گونه از حشرات در زیستگاه‌های اکولوژیکی متفاوتی زندگی می‌کنند. این تنوع زیستی، حشرات را در معرض انواعی از آلودگی‌ها از جمله ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و تک یاخته‌ها قرار می‌دهد. حشرات که تکامل سیستم ایمنی ذاتی دارند، پاسخ‌های سریع و کارآمدی در برابر عوامل بیماریزا ایجاد می‌کنند. در حشرات اولین خط دفاعی و موانع فیزیکی در برابر پاتوژن‌ها و پارازیت‌ها، موانع ساختاری نظیر اسکلت خارجی یا کوتیکول، غشاء پری تروفیک، اپیتلیوم روده‌ی میانی و پوشش کیتینی تراشه‌ها می‌باشد (لوونبرگر[1]، ۲۰۰۱؛ هافمن، ۲۰۰۳). با این حال زمانی که این سد شکسته شود، فعل و انفعالات پیچیده ای از ایمنی ذاتی هیومرال و واکنش‌های ایمنی سلولی، هم در بافت‌ها و هم در هموسل (محفظه داخلی بدن) حشرات، ایجاد می شود که منجر به حذف سریع میکروارگانیسم ها می شود. اولین گام در مطالعات دفاع فیزیولوژیک حشرات، شناخت سلول‌های خونی آن‌هاست. همانطور که گفته شد دفاع هیومرال مربوط به پپتیدهای ضد میکربی وآنزیم‌هایی است که تشکیل ملانین ودفع عمل مهاجم را تنظیم می‌کنند (بولت و همکاران، ۱۹۹۹). درمقابل، ایمنی سلولی مربوط به پاسخ های دفاعی سلول‌های خونی می‌باشد (ریزکای[2]، ۱۹۸۴). حضور هم‌زمان دفاع هیومرال و ایمنی سلولی، حشره‌ای با دفاع قدرتمند علیه مهاجمان مضر از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها، تک‌یاخته‌ها و ... می سازد (بولت و همکاران، ۱۹۹۹). به علاوه، حشره‌ای با سیستم ایمنی قوی، قادر به تحمل تنش‌های حاصل از جراحت و زخم در سطح جلد، گرسنگی و نیز تنش‌های حاصل از تغییرات محیطی مانند دما می‌باشد (واشبورن[3] و همکاران، ۲۰۰۰). واکنش‌های ایمنی سلولی فوری و به صورت موضعی پس از حمله یک عامل مهاجم در هموسل فعال می‌شوند، در حالی که واکنش‌های هیومرال چند ساعت پس از آلودگی ظاهر می‌شوند و به نسبت آرام عمل می‌کنند. موانع فیزیکی، سیستم دفاعی هیومرال و سلولی با هم، ارائه یک سیستم

1. Lowenberger
2. Rizki
3. Washburn

دفاعی موثر برای یک حشره هستند. این عوامل، با این حال، به تنهایی و به طور منظم کار نمی‌کنند و در میان آن‌ها برهمکنش پیچیده‌ای وجود دارد. به عنوان مثال، سلول‌های خونی و دیگر سلول‌های حشرات مولکول‌هایی تولید می‌کنند که اتصال بین میکروارگانیسم‌ها و سلول‌های خونی را افزایش می‌دهد (موریگ و شیتک[1] و همکاران، ۱۹۷۹؛ ویسنر[2] و همکاران، ۱۹۷۹؛ بریویو[3] و همکاران، ۲۰۱۰؛ کیم[4] و همکاران، ۲۰۱۰).

۲-۱۱- پاسخ ایمنی هیومرال در حشرات

واکنش ایمنی هیومرال می‌تواند غیر اختصاصی (برای کنترل انواع پاتوژن مختلف) و یا اختصاصی (برای کنترل پاتوژن خاص) باشد، و همچنین می‌تواند موضعی یا سیستمیک باشد. پاسخ به پاتوژن‌های باکتریایی در حشرات مختلف به خصوص در مگس میوه، *Drosophila melanogaster*، به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است. پاسخ موضعی می‌تواند در معده رخ دهد، که احتمالا شایع ترین محل تهاجم پاتوژن‌های باکتریایی می‌باشد. پپتیدوگلیکان‌ها روی دیواره‌های سلولی بسیاری از باکتری‌ها تولید می‌شوند و این ترکیبات می‌توانند سنتز سطح دوم دفاعی یعنی AMP را تحریک کنند. اگر یک پاتوژن باکتریایی یا قارچی به هموسل حمله کند، حضورش توسط گیرنده‌های شناسایی الگو تشخیص داده می‌شود، و این به نوبه‌ی خود باعث یک واکنش سیستمیک و تنظیم سنتز AMP در اجسام چربی و همولنف می‌باشد (بردریک[5] و همکاران، ۲۰۰۹). بیش از ۲۰ نوع سنتز AMP در هفت رده از حشرات شناخته شده است. برخی از آنزیم‌ها از قبیل لیزوزیم و استرازها همچنین می‌توانند به عنوان سنتز AMP، به کار گرفته شوند. باکتری‌های گرم مثبت و قارچ‌ها به طور عمده

1. Mohrig & Schittek
2. Wiesner
3. Brivio
4. Kim
5. Broderick

باعث راه اندازی مسیر Toll می‌شوند، که به نوبه باعث سنتز AMP که مربوط به کنترل این میکروب‌ها است، می‌شود. با این حال، در بیشتر حشرات سنتز AMP در برابر قارچ‌های بیماری‌زا موثر نیست (گلینسکی و بوکزک[1]، ۲۰۰۳). Toll و Jak- STAT ، مسیرهای مشخصی می‌باشد که نقش دفاعی در برابر ویروس‌ها را به عهده دارند (دوسترت[2] و همکاران، ۲۰۰۵؛ زامبون[3] و همکاران، ۲۰۰۶).

۲-۱۲- پاسخ ایمنی سلولی در حشرات

پاسخ‌های ایمنی سلولی شامل بیگانه‌خواری، تشکیل گره و کپسول می‌باشد. این پاسخ‌ها توسط سلول‌های خونی مختلف انجام می‌شود و اغلب توسط ملانیزاسیون به دنبال هم می‌آیند. بیگانه‌خواری زمانی رخ می‌دهد که هر سلول خونی به تنهایی، پاتوژن‌های کوچک مانند باکتری‌ها، اسپور قارچ‌ها و یا ویروس‌ها که در غلظت پایین وارد بدن شده را احاطه می‌کنند (لینگ و یو[4]، ۲۰۰۵؛ استرند، ۲۰۰۸ a؛ کوریهارا[5] و همکاران، ۱۹۹۲). تشکیل گره، احتمالا دفاع اولیه در برابر قارچ‌های بیماری‌زای حشرات است که ترکیبی از سد کوتیکولی و از بین بردن سموم قارچی می‌باشد (وی و گوتز[6]، ۱۹۸۶؛ گیلنسکی و بوکزک، ۲۰۰۳). تشکیل کپسول پاسخ سلولی به پارازیت‌های بسیار بزرگ مانند نماتدها و تخم پارازیتوئیدها می‌باشد. این پاسخ شبیه به گره می‌باشد (رانتالا[7] و همکاران، ۲۰۰۳؛ استرند، ۲۰۰۸b). تولید ملانین به طور معمول توسط پاسخ سلولی رخ می‌دهد و در گره‌ها ریخته می‌شود (جیانگ و همکاران، ۱۹۹۸؛ گولدسورتی[8] و همکاران، ۲۰۰۳). مسیر ملانیزاسیون توسط سلول‌های خونی فعال می‌شود، در جایی که پروتئازهای سرین منتشر می‌شوند و PO زنجیروار تحریک می‌شود

1. Glinski & Buczek
2. Dostert
3. Zambon
4. Ling & Yu
5. Kurihara
6. Vey & Gotz
7. Rantala
8. Goldsworthy

(کوریهارا و همکاران، ۱۹۹۲؛ گاجوسکی[1] و همکاران، ۲۰۰۷). پروتئازهای سرین در فعالیت‌ها و انعقاد همولنف (در پاسخ به ایجاد زخم)، درگیر هستند؛ در نتیجه عواملی که سرین پروتئازها را تحت تاثیر قرار می‌دهند اثرات فیزیولوژکی گسترده‌تری دارند (جیمز و زو[2]، ۲۰۱۲).

۲-۱۲-۱- بیگانه‌خواری

بیگانه‌خواری فرایندی است که سلول‌های تشخیص دهنده به ذرات سم یا عامل بیگانه کوچک که غلظت کمی دارند، متصل می‌شوند و آن‌ها را می‌بلعند (به طور معمول بزرگ‌تر از ۰/۵ µm). بیگانه-خواری پاسخ تکاملی سلول‌های حفاظت شده و احتمالا قدیمی‌ترین سازوکار دفاعی در مقابل میکروارگانیسم‌های مهاجم است. در طول بیگانه‌خواری ذرات مورد نظر ابتدا توسط گیرنده‌های فاگوسیتیک شناسایی می‌شوند، سپس مسیرهای مختلف سیگنالینگ در داخل سلول فعال می‌شوند (جونز و همکاران، ۱۹۹۹). این سیگنال‌ها منجر به تغییرات شگرفی در پویایی غشاء پلاسما و اسکلت سلولی می‌شوند. غشاء گسترش پیدا می‌کند و زائده‌های سیتوپلاسمی اطراف ذرات را احاطه می‌کنند. در عرض چند لحظه غشاء در انتها بسته می‌شود و ذرات اضافی یا پس مانده‌ها توسط غشاء پلاسما جدید که از فاگوزوم مشتق شده احاطه می‌شوند (یونگ[3] و همکاران، ۲۰۰۶).

۲-۱۲-۲- تشکیل گره

تشکیل گره، پاسخ سلولی غالب در حشرات به آلودگی‌های باکتریایی و قارچی می‌باشد و از تجمع چند سلول خونی که تعداد زیادی از باکتری‌ها را به دام می‌اندازند، تشکیل شده است. این فرایند زمانی شروع می‌شود که سلول‌های خونی، با مولکول‌های ضد میکروبی در همولنف، باکتری‌ها را احاطه

1. Gajewski
2. James & Xu
3. Yeung

می‌کنند. سلول‌های خونی با باکتری‌های گیر افتاده‌ی خود، که به صورت دانه‌های کوچک است با پیوستن به سلول‌های خونی دیگر به شکل گره‌های بزرگ رشد می‌کنند. گره‌ها زمانی که با لایه‌هایی از سلول‌های خونی مسطح پوشانده شوند، کامل می‌شوند. در برخی موارد، گره‌ها نیز تیره می‌شوند. این گره که توسط ملانین پوشیده شده یک راه موثر برای جداسازی باکتری‌های مهاجم از همولنف می‌باشد، چرا که آن‌ها باید یک دیوار نفوذ ناپذیر بین گره و بقیه‌ی ارگانیسم حشرات تشکیل دهند. روند تشکیل گره به طور کامل مشخص نیست، اما به وضوح ایکوزانوئیدها به احتمال زیاد برای تشکیل گره در بسیاری از گونه‌های حشرات مهم هستند (میلر[1] و همکاران، ۱۹۹۹؛ شرستا[2] و کیم، ۲۰۰۹؛ ژائو[3] و همکاران، ۲۰۰۹؛ شرستا و همکاران، ۲۰۱۰). پروفنل‌اکسیداز (pro PO) و دوپادکربوکسیلاز (Ddc) نیز در این فرایند درگیر هستند و در سلول‌های خونی مگس میوه‌ی مدیترانه‌ای *C. capitata* وجود دارند (سیدری[4] و همکاران، ۲۰۰۸).

علاوه بر این برای ژن‌های ایمنی، دو پروتئین جدید از لارو (*Antheraea mylitta* D.) و از لارو کرم ابریشم (*Bombyx mori*) به نام‌های Noduler (گانده[5] و همکاران، ۲۰۰۷) و Reeler (بائو[6] و همکاران، ۲۰۱۱) شناسایی کردند. گزارش شده که این پروتئین‌ها برای تشکیل گره در مقابل *Escherichia coli* k^{12} و باکتری *Bacillus subtilis* ضروری می‌باشد (روزالز، ۲۰۱۱).

۲-۱۲-۳- تشکیل کپسول

1. Miller
2. Shrestha
3. Zhao
4. Sideri
5. Gandhe
6. Bao

تشکیل کپسول واکنشی از سلول‌های خونی نسبت به عواملی بزرگ‌تر از نظر اندازه، مانند پارازیت‌ها، پروتوزآ، نماتدها و تخم پارازیتوئیدها می‌باشد. سلول‌های خونی شامل پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت-ها به عامل بیگانه متصل می‌شوند و در لایه‌های سلولی متعدد به شکل کپسول اطراف آن تشکیل می-شود. کپسول به طور معمول در پایان ملانیزه می‌شود (لینگ و یو، ۲۰۰۶a). در داخل کپسول ارگانیسم‌های مهاجم توسط محصولات واکنش سیتوتوکسیک یا کمبود اکسیژن (خفگی) از بین می‌روند (کارتن[1] و همکاران، ۲۰۰۹؛ نپی و همکاران، ۲۰۰۹).

۲-۱۲-۴- ملانیزه شدن

ملانیزاسیون شامل تشکیل ملانین می‌باشد. این فرایند در طول بهبود زخم فعال می‌باشد و همچنین در گره و تشکیل کپسول در برابر پاتوژن‌های بزرگ یا پارازیت‌ها دخالت دارد (لاوین و استرند، ۲۰۰۱؛ لاوین و استرند، ۲۰۰۲؛ کانوست[2] و همکاران، ۲۰۰۴؛ نپی وهمکاران، ۲۰۰۹). آنزیم فنل‌اکسیداز (PO)، آنزیم کلیدی در این فرآیند است. تبدیل پروفنل‌اکسیداز (pro PO) به فنل‌اکسیداز (PO) توسط واسطه‌ای به نام سرین پروتئازها انجام می‌شود (سرنیوس و همکاران، ۲۰۰۸؛ الفتریانوس و رونیس[3]، ۲۰۱۱) که در مگس سرکه‌ی بالغ و همچنین در بالپولک‌داران و در سنتز پروتئین‌های شناسایی الگو[4] (PRR) مانند پروتئین شناسایی پپتیدوگلیکان[5] (PGRP) (یوشیدا[6] و همکاران، ۱۹۹۶؛ اشیای[7] و همکاران، ۱۹۹۹) یا پروتئین شناسایی بتا ۱ و ۳ گلوکان (betaGRP) (اشیای و همکاران، ۱۹۸۸، ۲۰۰۰) مورد نیاز می‌باشد. واکنش این پروتئین‌های شناسایی با پپتیدوگلیکان‌های میکروبی یا

1. Carton
2. Kanost
3. Eleftherianos & Revenis
4. Pattern Recognition Receptors
5. Peptidoglycan Recognition Protein
6. Yoshida
7. Ochiai

مولکول‌های بتا ۱ و ۳ گلوکان آغازگر فعالیت زنجیره‌ی پروفنل‌اکسیداز (proPO) می‌باشد. سپس PO متصل به سطوح خارجی غشاهای سلول خونی می‌شود (لینگ و یو، ۲۰۰۵)، که در آن‌جا شکل گیری ملانین آغاز می‌شود. PO روی تیروزین واکنش انجام می‌دهد و آن را تبدیل به دوپا می‌کند، سپس دوپا می‌تواند با دکربوکسیلیتد و آنزیم دوپادکربوکسیلاز (Ddc) به دوپامین تبدیل شود یا بیشتر اکسیده شود و به دوپاکوئینون تبدیل شود. کوئینون سمی بوده و در نهایت به ملانین تبدیل می‌شود و از همولنف دفع می‌گردد (مارماراس و لام پروپولو[1]، ۲۰۰۹).

۲-۱۳- آنزیم فنل‌اکسیداز

آنزیم فنل‌اکسیداز در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها به صورت گسترده ای وجود دارد. این آنزیم در گیاهان و جانوران به چشم می‌خورد و حاوی عنصر مس است. بنابراین از نظر تکاملی در ارتباط نزدیک با هموسیانین در بندپایان بوده و حتی توالی اسیدآمینه آن شباهت زیادی با توالی اسیدآمینه هموسیانین دارد. شباهت بین این دو پروتئین به ۳۰ تا ۴۰ درصد می‌رسد (چان[2] و همکاران، ۲۰۰۶). آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف به صورت یک پروآنزیم غیرفعال با نام پروفنل‌اکسیداز موجود است. این آنزیم یک عامل کلیدی در ایمنی است و نقش مهمی در انعقاد، ملانیزاسیون و بهبود زخم دارد (سودرهال و سرنیوس، ۱۹۹۲). فعال سازی آنزیم پروفنل‌اکسیداز در نتیجه ی پاسخ به استرس‌هایی نظیر حمله بیمارگرها، پارازیتوئیدها، دوره‌های گرسنگی و تغییرات دما می‌باشد (آشیدا[3]، ۱۹۹۷). از آن‌جا که سلول‌های خونی یکی از منابع بالقوه تولید پروفنل‌اکسیدازها هستند و سلول‌های اونوسیتوئیدها در بالپولک‌داران به عنوان سلول تولید کننده ی پروفنل‌اکسیداز شناخته شده اند

1. Lampropoulou
2. Chan
3. Ashida

(ایواما[1] و آشیدا، ۱۹۸۶؛ جیانگ و همکاران، ۱۹۹۷)، بنابراین افزایش کل سلول‌های خونی ممکن است منجر به افزایش فعالیت پروفنل‌اکسیداز پس از تنش‌های مختلفی از قبیل افزایش دما، تغییر رژیم غذایی و یا حمله عوامل بیگانه به همولنف شود.

۲-۱۴- قارچ *Beauveria bassiana* به عنوان عامل بیمارگر و بیگانه

آفت‌کش‌های قارچی به عنوان عوامل بیمارگر حشرات در کنترل بیولوژیک در نظر گرفته می‌شوند و به عنوان جایگزین یا مکمل حشره‌کش‌های شیمیایی استفاده می‌شوند (کلارکسون و چارنلی[2]، ۱۹۹۶). با این وجود اطلاعات کمی در مورد فیزیولوژی، ژنتیک و شناخت مولکولی قارچ‌های بیماری‌زای حشرات وجود دارد، به همین دلیل استفاده‌ی گسترده از آن‌ها عقب افتاده است (جین[3] و همکاران، ۲۰۱۰). برای پیشرفت استفاده از آفت‌کش‌های قارچی، سعی شده است که توضیحات واضح‌تری از مکانیسم‌های قارچ‌های بیماری‌زا داده شود (جین و همکاران، ۲۰۱۰). قارچ‌های بیماری‌زای حشرات، مانند *Metarhizium anisopliae* و *B. bassiana* به میزبان خود حمله می‌کنند و از طریق اسکلت خارجی یا کوتیکول، مستقیم به بدن میزبان نفوذ می‌کنند. به این صورت که کنیدی‌های قارچ به کوتیکول حشره متصل شده، سپس قارچ جوانه زده، رشد می‌کند و به داخل جلد نفوذ می‌کند. این قارچ‌ها علاوه بر فائق شدن به سد کوتیکول، توانایی تکثیر در هموسل حشره را دارند. پس از ورود به هموسل، سلول‌های قارچ با سلول‌های خونی درگیر شده و بنابراین سلول‌های خونی سبب تولید پروتئین‌ها و پپتیدهایی می‌شوند که ایمنی هیومرال در آن نقش دارد (بورگس[4] و همکاران، ۲۰۰۸). قارچ‌های بیماری‌زای حشرات درون گروه‌های طبقه بندی قارچ‌های اصلی پراکنده هستند و شیوه‌ی

1. Iwama
2. Clarkson & Charnley
3. Jin
4. Borges

زندگی منحصر به فردی دارند و مدت‌های زیادی می‌باشد که سازگاری پیدا کرده اند (خاچاتوریانس[1]، ۱۹۹۶). قارچ بیماری‌زای حشرات *B. bassiana* دارای یک پراکنش جهانی است و تحت مطالعه‌ی فشرده به عنوان کنترل بیولوژیک علیه حشرات آفت می‌باشد. دامنه‌ی میزبانی وسیعی دارد و قادر به هدف قرار دادن تعداد متنوعی از گونه‌های بندپایان می‌باشد (چو[2] و همکاران، ۲۰۰۶). قارچ *B. bassiana* متعلق به راسته‌ی Hypocrealean و شاخه‌ی Ascomycota می‌باشد. *B. bassiana* توسط آژانس حفاظت محیط زیست برای استفاده‌ی تجاری در برابر انواع آفات کشاورزی، از جمله مگس سفید، بالپولک‌داران، سخت‌بال‌پوشان، راست‌بالان و پسیل‌ها تاکید شده است (چو و همکاران، ۲۰۰۶). قارچ‌های بیماری‌زای موفق باید بتوانند آلودگی ناشی از پاسخ‌هایی مانند ملانیزاسیون و سلول‌های خونی فعال را خنثی کنند (بومن[3]، ۱۹۸۱؛ پندلند و بوسیاس[4]، ۱۹۸۵؛ پندلند و همکاران، ۱۹۹۳؛ ریلی[5]، ۱۹۹۷). چنان‌چه حشره از سیستم ایمنی قوی‌تر بهره‌مند باشد، بر اسپورهای قارچ غلبه یافته و هدف کنترل میکروبیولوژیک محقق نمی‌شود (عجم حسنی، ۱۳۹۳a).

۲-۱۵- مطالعات انجام شده در زمینه شناسایی سلول‌های خونی

بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، عملکرد و شیمی بافت، چندین نوع سلول خونی در حشرات شناسایی شده‌اند (گوپتا، ۱۹۸۵؛ برهلین[6] و همکاران، ۱۹۸۹). طبقه‌بندی سلول‌های خونی حشرات گاهی اوقات دارای ابهام است و واژه‌های استفاده شده برای طبقه‌بندی هر نوع سلول متفاوت است. در طبقه‌بندی سلول‌های خونی، راسته‌های مختلف و حتی در یک راسته نیز تفاوت‌هایی با یکدیگر نشان

1. Khachatourians
2. Cho
3. Boman
4. Pendland & Boucias
5. Riley
6. Brehélin

می‌دهند (برهلین و همکاران، ۱۹۷۸؛ لاوین و استرند، ۲۰۰۲؛ ریبرو[1] و برهلین، ۲۰۰۶؛ استرند و پچ[2]، ۱۹۹۵). در یک نوع طبقه‌بندی، سلول‌های خونی با استفاده از دو معیار طبقه‌بندی می‌شوند. اولین گروه، سلول‌های خونی را بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و عملکردی طبقه‌بندی می-کند (کایا[3] و راتکلیف، ۱۹۸۲)، در حالیکه در دومین گروه، سلول‌های خونی توسط موقعیت آناتومیک طبقه‌بندی می‌شوند. بنابراین بر اساس سلول‌هایی که در گردش خون هستند و یا سلول‌هایی که به بافت‌های بدن مانند لوله گوارش، جلد و یا بافت‌های ماهیچه‌ای متصل هستند و هموسیت‌های متصل[4] نامیده می‌شوند؛ طبقه‌بندی می‌شوند (کینگ و هلیر[5]، ۲۰۱۳؛ هانتی[6] و همکاران، ۲۰۱۴). طبق طبقه بندی اخیر استرند (۲۰۰۸a)، ۵ نوع سلول خونی در حشرات به ویژه بالپولک‌داران شناسایی شده است که شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها می‌باشند. در تحقیقات بسیاری از محققین وجود ۵ نوع سلول خونی ثابت شده است. به طور مثال، راحت‌خواه و همکاران (۱۳۹۵)، پنج نوع سلول خونی در پروانه موم‌خوار بزرگ *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) شناسایی کردند. در سال ۱۳۹۴ برای اولین بار پنج نوع سلول خونی در مراحل مختلف لاروی، شفیرگی و بالغ کرم شاخ‌دار فرفیون *Hyles euphorbiae* L. (Lepidoptera:Sphingidae) شناسایی شد (عجم‌حسنی، ۱۳۹۴). ووگل‌ویس[7] و همکاران (۲۰۱۶)، چهار نوع سلول خونی در همولنف لاروهای سن پنجم *Eupoecilia ambiguella* Hbn. گزارش کردند. کن[8] و همکاران (۲۰۱۴)، شش نوع سلول خونی در سوسک (*Protaetia brevitarsis seulensis* Kolbe) شناسایی کردند. در بررسی شناسایی سلول‌های خونی لارو شب پره خرنوب Zeller

1. Ribeiro
2. Pech
3. Kaaya
4. Sessile hemocytes
5. King & Hillyer
6. Honti
7. Vogelweith
8. kwon

Ectomoyelois ceratoniae (Lepidoptera: Pyralidae) ، پنج نوع سلول خونی در لارو این حشره شناسایی شد (خسروی و همکاران، ۱۳۹۱). شش نوع سلول‌خونی در ملخ (Orthoptera: Acrididae) *Oxya japonica* Thunberg شناسایی شده است (انگرینی[1] و همکاران، ۲۰۱۱). در همولنف پروانه سفید اشجار(Drury) *Hyphantria cunea* و پروانه برگخوار توت (Walker) *Glyphodes pyloalis* پنج نوع سلول خونی گزارش شد (جلالی سندی و زیبایی، ۱۳۸۹). با مطالعه‌ی سلول‌های خونی پروانه‌ی برگ‌خوار مرکبات.L *Papillio demoleus* به وسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی، پنج نوع سلول خونی شناسایی شد (جلالی و صالحی، ۲۰۰۸). در مطالعه عکس العمل سیستم ایمنی سلولی ملخ آسیایی (Orth: Acrididae) *Locusta migratoria* در مقابل جدایه *B. bassiana* Fashand چهار نوع سلول خونی شناسایی شد (غزوی و همکاران، ۱۳۸۲). در پروانه‌ی برگ‌خوار *Spodoptera* Fabricius *litura*، ۹ نوع سلول خونی معرفی شده است (ساکسنا[2] و همکاران، ۱۹۸۸). شش نوع سلول خونی در لارو سن پنجم شب‌پره هندی شناسایی شده است (بیمن[3] و همکاران، ۱۹۸۳). در همولنف لارو سن پنجم کرم ابریشم *B. mori* ، پنج نوع سلول خونی شناسایی شده است (آکای و ساتو[4]، ۱۹۷۳). با این حال، اولین گزارش سلول‌های خونی درمورد شپش انسان *Pediculus humanus* Linnaeus است؛ که سوآمردام[5] آن‌ها را در این حشره مطالعه کرده است (سوآمردام، ۱۷۳۷).

۲-۱۶- مطالعات انجام شده در زمینه تاثیر تنش‌های دمایی بر سامانه ایمنی حشرات

شرایط محیطی مانند دما از فاکتورهای مهم و تأثیر گذار بر تعداد سلول‌های خونی و متعاقباً قدرت دفاع فیزیولوژیک حشرات است (قاسمی و همکاران، ۲۰۱۳). واکنش‌های ایمنی شب‌پره مدیترانه ای *Ephestia kuehniella* Zell ، در برابر تنش‌های دمایی مورد بررسی قرار گرفت (قاسمی و

1. Anggraeni
2. Saxena
3. Beeman
4. Akai & Sato
5. Swammerdam

همکاران، ۲۰۱۳). مطالعاتی که در رابطه با اثر درجه حرارت بر روی تعداد سلول‌های خونی حشرات مختلف، توسط محققین صورت گرفته، نشان داده که درجه حرارت پایین، تعداد کل سلول‌های خونی حشرات را کاهش داده (تیواری و شوکلا[1]، ۲۰۰۰؛ توبر و ییگر[2]، ۱۹۳۵) به علاوه گزارش شده که درجه حرارت بالا، تعداد سلول‌های خونی را افزایش می‌دهد (توبر و ییگر، ۱۹۳۵؛ روزنبرگر[3] و جونز، ۱۹۶۰). علاوه بر این، اطلاعات بسیار کم و متناقضی درمورد اثر درجه حرارت بر تعداد تفرقی سلول‌های خونی[4] ، وجود دارد (پندی[5] و همکاران، ۲۰۰۳؛ بهرا[6] و همکاران، ۱۹۹۹؛ آرنولد، ۱۹۵۲). در همین راستا، تاثیر دما بر تعداد و فراوانی سلول‌های خونی در مراحل رشدی مختلف مشخص شده است (کیوچی[7] و همکاران، ۲۰۰۸؛ پندی و همکاران، ۲۰۰۳؛ گاردینر[8] و استرند، ۲۰۰۰؛ لاکی[9]، ۱۹۸۸).

۲-۱۷- مطالعات انجام شده در زمینه تاثیر عوامل بیمارگر مختلف بر سامانه ایمنی حشرات

گزارشات متعددی نیز مبنی بر واکنش‌های ایمنی حشرات مختلف در برابر ورود عوامل بیگانه مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها و یا ترکیبات سنتزی به همولنف وجود دارد. به عنوان مثال عجم حسنی (۱۳۹۳b)، واکنش‌های ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم *S. litura* را علیه دو جدایه از قارچ *B. bassiana* و ذرات سنتزی لاتکس بید بررسی کرد. عجم حسنی (۱۳۹۳a)، همچنین واکنش ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم پروانه *Utethesia pulchella* L. (Lepidoptera: Arctiidae)، را در برابر دو جدایه از قارچ *B. bassiana* (Bals.-Criy) و یک جدایه از قارچ *Isaria farinosae* نیز بررسی کرد. عجم حسنی و

1. Tiwari & Shukla
2. Yeager
3. Rosenberger
4. Differential Hemocyte Count
5. Pandey
6. Behera
7. Kiuchi
8. Gardiner
9. Lackie

همکاران (۲۰۱۳)، پاسخ ایمنی پروانه برگخوار سفید آمریکایی *H. cunea* را در برابر چهار ایزوله از قارچ بیماری‌زای حشرات به نام *B. bassiana*، و یک ایزوله از *I. farinosae* (Holmsk.)، بررسی کردند. زیبایی و همکاران (۲۰۱۱)، واکنش ایمنی سن گندم *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) را در برابر قارچ *B. bassiana* بررسی کردند کردند. اثر هورمون جوانی I بر روی سلول‌های خونی پروانه سفید اشجار *H. cunea* و پروانه برگخوار توت *Glyphodes pyloalis* (Walker) انجام شده است (جلالی سندی و زیبایی، ۱۳۸۹). زمانی که سوسک‌های *Diclodispa armigera* (Olivier) با قارچ *B. bassiana* آلوده شدند، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها؛ اسپورهای قارچ را با فرایند بیگانه خواری بلعیدند و با افزایش زمان تلقیح قارچ، زایده‌های سیتوپلاسمی حاصل از سلول‌های ایمنوسیت اطراف عامل بیگانه افزایش یافت به طوری که حشره توانست تمام اسپورها را بلوکه کرده و به همراه سیستم فنل اکسیداز آن‌ها را ملانیزه و دفع کند (موشومی[1] و همکاران، ۲۰۰۸). در همین راستا بورگس و همکاران (۲۰۰۸)، واکنش دفاع سلولی سن خون‌خوار *Rhodnius prolixus* را در مقابل باکتری *E. coli* بررسی کردند. در یافته‌ی دیگری، دفاع سلولی مگس‌های سرکه پارازیته شده با کپسوله کردن عامل پارازیت و توسط لاملوسیت‌ها انجام شد. لاملوسیت‌ها به پارازیت حمله‌ور شده و یک کپسول اطراف آن تشکیل دادند. مولکول‌های سمی ایجاد شده در طول ملانیزاسیون منجر به کشته شدن پارازیت شدند (میستر[2] و همکاران، ۱۹۹۴).

1. Moushumi
2. Meister

۲-۱۸- مطالعات انجام شده در زمینه تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر سامانه ایمنی حشرات

از آنجا که تغذیه حشرات از منابع غذایی مختلف نقش مهمی در رشد، تولید مثل، بقا، ذخیره انرژی برای زمستان‌گذرانی و ... ایفا می‌کند، بنابراین نوع رژیم غذایی و بهره‌مندی از غذای مطلوب و یا عدم استفاده از غذای مناسب و کافی و حتی محرومیت و گرسنگی حشرات تأثیر زیادی بر قدرت ایمنی حشره می‌گذراد. همچنین کمبود مواد غذایی این سامانه را مختل کرده و حساسیت افراد به بیماری‌ها را افزایش می‌دهد (لی[1] و همکاران، ۲۰۰۷). اثر تنش‌های گرسنگی و رژیم‌های غذایی مختلف روی سامانه ایمنی شب پره هندی انجام شده است و مشاهده شد که با افزایش دوره گرسنگی، تعداد کل سلول‌های خونی به شدت کم می‌شود. تأثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر سامانه ایمنی این حشره نشان داد که بیش‌ترین تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها مربوط به لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های غذایی نخود و کشمش بود و کم‌ترین تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به ترتیب مربوط به لاروهای تغذیه کرده از رژیم‌های غذایی پسته، غذای مصنوعی و گردو بود (ابراهیمی و عجم حسنی، ۲۰۱۷). ووگل‌ویس و همکاران (۲۰۱۶)، در بررسی تغییرات غلظت سلول‌های خونی لاروهای *E. ambiguella* تحت تأثیر رژیم‌های غذایی مختلف، دریافتند که غلظت کل سلول‌های خونی و غلظت هر سلول خونی به تنهایی در بین رژیم‌های غذایی مختلف، نیز متفاوت است و در نتیجه پاسخ به چالش ایمنی هم متفاوت خواهد بود. کرامس[2] و همکاران (۲۰۱۵) رشد، ایمنی و زنده مانی لاروهای پروانه موم‌خوار بزرگ *G. mellonella* را پس از تغذیه از سه رژیم غذایی با کیفیت و انرژی بالا، کیفیت متوسط و کیفیت پایین مورد بررسی قرار

1. Li
2. Krams

دادند و تغییرات معنی داری در پاسخ‌های ایمنی مانند کپسوله کردن، همچنین در میزان رشد و مرگ و میر در بین لاروهای تغذیه کرده از این رژیم‌های مختلف مشاهده کردند. کمبود یا فقدان مواد غذایی ضروری می‌تواند بر پاسخ‌های ایمنی حشرات تأثیرگذار باشد. چرا که میزان تغذیه برای حفظ هومئوستازی و عملکردهای ایمنی بدن، انرژی مورد نیاز را فراهم می‌کند (بانویل[1] و همکاران، ۲۰۱۲). چنان‌که در بررسی بانویل و همکاران (۲۰۱۲)، اثر محرومیت غذایی بر توانایی لاروهای *G. mellonella* برای مقاومت در برابر آلودگی قارچ *Candida albicans* انجام شد و نشان داد که لارو-هایی که به مدت هفت روز از غذا محروم شدند، حساسیت بیش‌تری در برابر آلودگی با مخمر *C. albicans* داشتند. همچنین همولنف لاروهای گرسنه سبب کاهش بیان برخی از پپتیدهای ضد میکروبی مانند لیپوکالین[2] و پروتئین‌های ایمنی مانند آپولیپوفورین[3] و آریل‌فورین[4] شد. بنا به گزارشاتی کمبود پروتئین‌های غذایی نیز، می‌تواند سبب افزایش حساسیت ارگانیسم‌ها به بیماری شود (آلوکس[5] و همکاران ۲۰۱۰). مطالعات کمی به بررسی رابطه بین تغذیه از پروتئین و ایمنی در حشرات پرداخته است. با این حال در مطالعه آلوکس و همکاران (۲۰۱۰)، در رابطه با اثر رژیم‌های غذایی روی سیستم ایمنی زنبور *Apis mallifera* مشاهده شد که رژیم‌های غذایی حاوی گرده پلی-فلورال[6] در مقایسه با رژیم‌های غذایی گرده مونوفلورال[7] سبب افزایش فعالیت بیش‌تر گلوکزاکسیداز شد. تات[8] و همکاران (۲۰۰۵)، مشاهده کردند که محرومیت از مواد غذایی در زنبور عسل *A. mallifera* منجر به اختلال در فرایند رفتار یادگیری آن‌ها می‌شود که ارتباط روشنی بین تغذیه و عملکرد عصبی را نشان می‌دهد.

1. Banville
2. Lipocalin
3. Apolipophorin
4. Arylphorin
5. Alaux
6. Polyfloral
7. Monofloral
8. Toth

تحقیق حاضر پیرامون دفاع سلولی بید سیب‌زمینی در برابر قارچ *B. bassiana* و تنش‌های دمایی و همچنین نقش رژیم‌های مختلف غذایی بر سیستم ایمنی این حشره انجام شده است. از آنجا که سلول‌های خونی در سیستم ایمنی حشرات نقش مهمی ایفا می‌کنند و آن‌ها را در برابر استرس‌های ناشی از محیط و یا سموم شیمیایی و میکروبی محافظت می‌کنند، لذا بررسی و شناخت این سلول‌ها می‌تواند گام موثری در مطالعات بعدی به حساب آید تا اطلاعات کاملی از ساختار مورفولوژیکی و فراوانی آن‌ها ارائه کند و به عنوان منبعی برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین بررسی تغییرات دمایی و تأثیر آن بر ایمنی سلولی بید سیب‌زمینی می‌تواند در کنترل دمای انبارها و مدیریت این آفت مهم انباری کشورمان مثمرثمر باشد. از طرفی مطالعه برهمکنش بین اسپور قارچ و سلول‌های خونی بید سیب زمینی، جنبه هایی از وضعیت ایمنی این حشره مهم انباری را روشن خواهد ساخت.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱- پرورش و تهیه کلنی بید سیب‌زمینی

در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۵، جمعیت اولیه بید سیب‌زمینی جهت تشکیل کلنی از غده‌های آلوده‌ی رقم سانته‌ی موجود در آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشکده‌ی کشاورزی شاهرود تهیه شد. کلنی بید سیب‌زمینی داخل قفسه آلومینیومی با ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر و ابعاد دهانه ۳۰×۳۰ سانتی‌متر و همچنین ظروف پلاستیکی به ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر و قطر ۱۴ سانتی‌متر که محتوی غده‌های سیب‌زمینی بود، مستقر شدند. دهانه قفسه توسط یک طلق شیشه‌ای پوشیده شد و فقط یک وجه آن توسط یک پارچه ضخیم آستین مانند پوشانده شد تا امکان دستیابی به غده‌ها و حشرات جهت انتقال آن‌ها بوجود آید. غده‌ها به طور روزانه مورد بازبینی قرار گرفتند و هنگامی که توسط لاروها مصرف و یا فاسد شدند، با غده‌های تازه جایگزین شدند. جهت تغذیه‌ی شب پره‌ها پس از تولد و تکامل تخمدان‌ها برای تخم ریزی بیش‌تر، قطره‌های بسیار کوچک عسل به سطح داخلی سقف ظروف پرورش مالیده شد. کلیه آزمایشات در داخل اتاقک رشد با دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵±۴۵٪ انجام گرفت. از سنین چهارم لاروی برای آزمایشات ایمنی شناسی و از سنین دو، سه و چهار برای بررسی فراوانی انواع سلول‌های خونی استفاده شد.

۳-۲- تهیه و کشت قارچ *B. bassiana*

دو جدایه بیماریزای قارچ *B. bassiana* شامل Fashand (جداسازی شده از خاک منطقه Fashand توسط غزوی و تهیه شده از موسسه گیاهپزشکی کشور) و 47 (جداسازی شده از خاک جنگل ابر شاهرود توسط حیدری) روی محیط PDA کشت شدند. برای نگهداری جدایه‌ها به مدت طولانی از محیط PCA استفاده شد. این محیط از اسپورزایی زیاد جلوگیری می‌کند و میزان زنده مانی جدایه‌ها را در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌دهد. پس از گذشت هشت روز از کشت قارچ‌ها، غلظت $۱۰^{۵}$ اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد و جهت بررسی‌های ایمنی شناسی مورد استفاده قرار گرفتند.

۳-۳- شناسایی سلول‌های خونی بید سیب‌زمینی

به منظور شناسایی سلول‌های خونی، همولنـف ۱۰ لارو از سـنین مختلـف لاروی (۱۰ تکـرار) مـورد بررسی قرار گرفت. سپس با ایجاد برش در محدوده بین بند ۳ و ۴ شکمی لارو با اسـکالپل، مقـدار دو میکرولیتر از همولنف لارو روی یک لام گذاشته شد و با لام دیگر یک اسمیر تهیه شد. پس از خشـک شدن، مقداری ماده رنگ‌آمیزی گیمسا (محلول ۹:۱ گیمسا و آب مقطر) روی اسمیر قرار گرفت و پس از گذشت ۲۰ دقیقه، جهت شستن محلول رنگی لام در آب مقطر قرار گرفت. سپس لام به مـدت ۱۰ ثانیه در کربنات لیتیم اشباع شده قرار داده شد (این امر به منظور تثبیت رنگ سلول‌ها انجام گرفـت). لام مجددا در آب مقطر شستشو داده شد و در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خشک گردد و در نهایت انواع سلول‌ها با توجه به منابع موجـود شناسـایی شـدند (ییگـر، ۱۹۴۵). جهـت مشـاهده و شناسایی سلول‌های خونی از میکروسکوپ نوری Olympus BH2 با بزرگنمایی ۴۰ استفاده شد.

۳-۴- شمارش کل سلول‌های خونی (Total Hemocyte Count)

برای شمارش کل سلول‌های خونی، همولنف ۱۰ عدد لارو سن چهار، سه و دو به طور جداگانه با استفاده از میکروپی‌پت جمع‌آوری و با بافر فیزیولوژیک رقیق شدند. ماده ضد انعقاد به کار رفته در آزمایش محلول تایسون بود (محمود و یوسف[1]، ۱۹۸۵). شمارش سلول‌های خونی با استفاده از لام نئوبار[2] و بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری Olympus BH2 انجام شد. شمارش کل با محاسبه تعداد سلول‌های خونی موجود در پنج خانه از لام نئوبار (هر کدام به ابعاد یک میلی متر مربع) انجام شد (جونز، a۱۹۶۷) و با فرمول ۳-۱ محاسبه گردید (جونز، ۱۹۶۲).

1. Mahmood & Yousuf
2. hemocytometer

(فرمول ۳-۱) عمق خانه های لام گلبول شمار × میزان رقت × $۱mm^۲$ × تعداد سلول‌های خونی

تعداد خانه های شمارش شده از لام

۳-۵- بررسی تاثیر دما روی تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی بید سیب‌زمینی

برای این منظور ۲۰ عدد از لاروهای سن چهار بید سیب‌زمینی استفاده شدند. تیمارها شامل غده‌های آلوده به بید سیب‌زمینی بود که به مدت ۲۴ ساعت در دو دمای ۴ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تیمار شاهد نیز غده‌های آلوده‌ای بود که در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و اونوسیتوئیدهای لاروهای تیمار شده شمارش شدند. تجزیه داده‌ها با نرم افزار SAS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۱٪ انجام گرفت.

۳-۶- بررسی وضعیت ایمنی سلولی لاروهای سن چهار بید سیب زمینی در برابر دو جدایه از قارچ *B. bassiana*

برای انجام این آزمایش از لاروهای سن چهار بید سیب زمینی استفاده شد. به منظور جلوگیری از تحرک لاروها، آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه روی قطعاتی از یخ قرار داده شدند. سطح شکمی بدن لاروها با الکل ۷۰٪ ضدعفونی شد و سپس با استفاده از سرنگ هامیلتون، دو میکرولیتر از غلظت $۱۰^۵$ اسپور در میلی‌لیتر سوسپانسیون (که در آزمایشات پایلوت به آن دست یافتیم) به سطح شکمی لاروها محدوده بند ۳ و ۴ شکمی تزریق شد. سپس محل زخم با پارافین پوشانده شد. حشرات شاهد نیز با آب مقطر تزریق شدند و پس از تزریق به ظروف پرورشی مورد نظر منتقل شدند. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با سه تیمار (شاهد و دو جدایه قارچ) و ۱۰ تکرار و برای هر زمان (۳، ۶ و ۱۰)

ساعت به طور جداگانه انجام شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از برنامه نرم افزاری SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام گرفت.

۳-۷- بررسی اثر پنج رقم مختلف سیب زمینی بر سامانه ایمنی بید سیب زمینی

برای انجام این آزمایش ۲۰ عدد لارو سن چهار بید سیب زمینی پرورش یافته روی هر یک از ارقام سیب زمینی شامل سانته، اگریا، فونتانه، آلفا پا بلند و آلفا انتخاب شدند. این ارقام از رقم‌های رایج سیب زمینی در منطقه‌ی مجن و بسطام می‌باشد. تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و اونوسیتوئیدهای لاروهای تغذیه کرده از هر رقم شمارش شدند. تجزیه داده‌ها با نرم افزار SAS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۱٪ انجام گرفت.

۳-۸- تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

برای تعیین اثر دما و ارقام مختلف سیب زمینی روی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز لاروهای مورد آزمایش از روش هموسیت لایزیت استفاده شد (لئونارد[1] و همکارن، ۱۹۸۵). در این روش برای هر تیمار، همولنف ۳۰ لارو سن چهار بید سیب زمینی جمع آوری شد و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رو نشین حذف شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (PH=۷) به رسوبات اضافه شد و سپس هموژنیزه شدند. محلول اخیر دوباره در 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) و ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات اضافه شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه

1. Leonard

شد و طول موج نمونه‌ها توسط دستگاه Elisa reader در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد. هر تکرار شامل مجموع همولنف ۳۰ لارو سن چهار بود که با هم مخلوط شدند. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام گرفت.

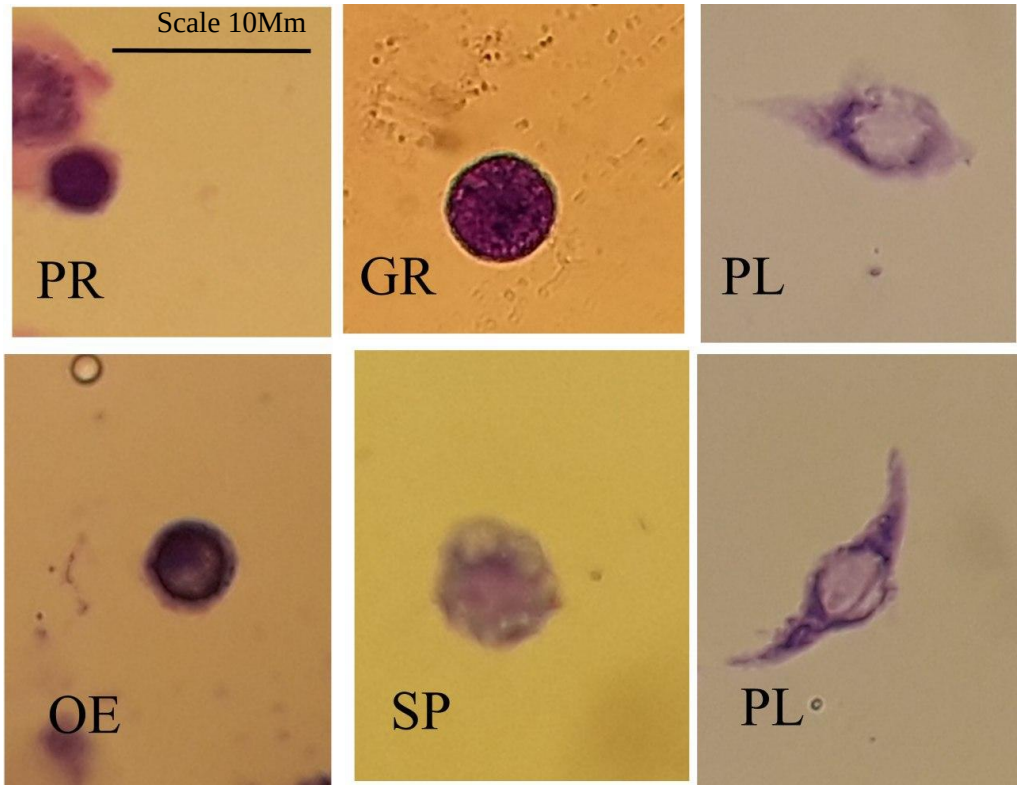
فصل چهارم

نتایج و بحث

۴-۱- شناسایی سلول‌های خونی بید سیب زمینی

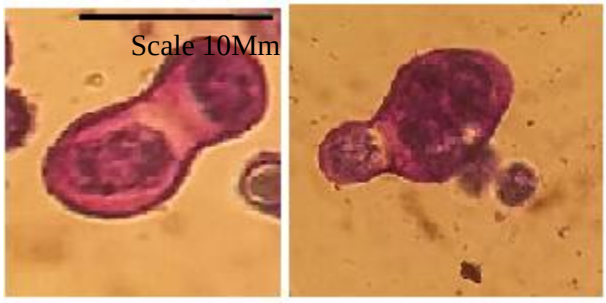
با استفاده از میکروسکوپ نوری و بر اساس کلید شناسایی ارائه شده توسط جونز (۱۹۶۷a) و گیگلیو[1] و همکاران (۲۰۰۸)، سلول‌های خونی سنین لاروی دو، سه و چهار بید سیب زمینی *P. operculella* شناسایی شدند. این سلول‌ها شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها بودند. پروهموسیت‌ها به صورت مدور و کوچک‌ترین سلول‌ها با هسته مشخص و مرکزی که حجم زیادی از سلول را در برگرفته، مشاهده شدند. هسته این سلول‌ها با رنگ آمیزی گیمسا به رنگ آبی تیره مشخص شد (شکل۴-۱). پلاسموتوسیت‌ها دوکی شکل با دو زائده سیتوپلاسمی در طرفین و گاهی بدون زوائد بوده که در لارو بید سیب زمینی دارای پروفایل چند شکلی بوده و در اندازه‌های متنوع مشاهده شدند (شکل۴-۱). گرانولوسیت‌ها سلول‌هایی مدور و یا بیضی شکل بودند که از پروهموسیت‌ها درشت‌تر بوده و سطح سیتوپلاسم آن‌ها دارای دانه‌های ریز گرانول بود. اندازه گرانولوسیت‌ها متنوع و از کوچک تا سلول‌هایی درشت در خون حشره مشاهده شد. در مقایسه با پلاسموتوسیت‌ها هسته‌ی آن‌ها کوچک‌تر است (شکل۴-۱). اونوسیتوئیدها سلول‌های دایره‌ای شکل با هسته جانبی کوچک اما سیتوپلاسم حجیم مشاهده شدند. اندازه این سلول‌ها از کوچک تا متوسط است. از پروهموسیت‌ها بزرگ‌تر بوده ولی معمولا از گرانولوسیت‌ها کوچک‌تر هستند. (شکل۴-۱). اسفرولوسیت‌ها یا سلول‌های اسفرولی با یک هسته‌ی فشرده مشاهده شدند که سطح سیتوپلاسم این سلول‌ها دارای حفراتی به نام اسفرول بود (شکل۴-۱).

1. Giglio



شکل۴-۱- تصاویر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰) از سلول‌های خونی رنگ‌آمیزی شده با Giemsa در لارو حشره *P. operculella*

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



شکل ۴-۲- تصویر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰) از سلول‌های گرانولوسیت در حال تقسیم میتوزی در لاروهای سن چهارم *P. operculella*

شناسایی انواع سلول‌های خونی حشرات، نشانگر اولین مرحله از شناخت ویژگی‌های جامع ایمنی شناسی است و برای شناخت گام‌های بعدی در راستای ایمنی شناسی، این مرحله اساسی است

(زیبایی و ملاگلی[1]، ۲۰۱۴). بررسی حاضر در زمینه شناسایی سلول‌های خونی، با بسیاری از توصیفات ارائه شده از نظر شکل با منابع موجود در مورد سایر حشرات مطابقت دارد. برای مثال، راحت‌خواه و همکاران (۱۳۹۵)، در بررسی تغییرپذیری یاخته‌های خونی لارو پروانه موم‌خوار بزرگ *G. mellonella* ، پنج نوع سلول خونی نام برده را در این حشره شناسایی کردند. در کرم ساقه‌خوار ذرت *Sesamia cretica* فقط چهار نوع سلول خونی گزارش شده است. بر اساس مشاهدات همولنف این حشره فاقد پروهموسیت می باشد (صادقی و همکاران، ۲۰۱۷). 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. دلیل احتمالی که اسفرولوسیت‌ها در این حشره مشاهده نشد، می‌تواند مقادیر بسیار کم این سلول خونی در همولنف حشره بخصوص سنین بالای لاروی باشد. ووگل‌ویس و همکاران (۲۰۱۶)، با هدف تعیین انواع مختلف سلول‌های خونی در همولنف لاروهای سن پنجم *E. ambiguella* چهار نوع سلول خونی شامل پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید و اسفرولوسیت را در این حشره مشاهده کردند. عجم حسنی (۱۳۹۳a) پنج نوع سلول خونی را در پروانه‌ی *U. pulchella* گزارش داد که نتایج ما مشابه آن بود. پال و کومار[2] (۲۰۱۴)، نیز با هدف مقایسه وضعیت سلول‌های خونی سه گونه از دوبالان زیر راسته‌ی سیکلورافا[3]، شامل *Sarcophaga ruficornis* Fab.، *Musca domestica* L. و *Chrysoma megacephala* Fab. پنج نوع سلول خونی را در این سه گونه شناسایی کردند. زیبایی و ملاگلی (۲۰۱۴)، چهار نوع سلول خونی شامل پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت و اونوسیتوئید را در کرم ساقه خوار نواری برنج *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera:Crambidae) گزارش کردند. قاسمی و همکاران (۲۰۱۳)، مشاهده کردند که سلول‌های خونی شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella* شامل پنج

1. Malagoli
2. Pal & Kumar
3. Cyclorrhapha

سلول اصلی و دو نوع مورفوتایپ شامل ورمی‌سیت و پودوسیت می‌باشد. کهن و همکاران (۱۳۹۱)، همانند تحقیق حاضر پنج سلول خونی را در سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* Mull (Coleoptera: Chrysomelidae) شناسایی کردند. ماناچینی[1] و همکاران (۲۰۱۱) نیز، همه‌ی این پنج سلول را در سرخرطومی قرمز نخل *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) گزارش کردند. ال‌عزیز و آواد[2] (۲۰۱۰)، پنج نوع سلول خونی پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اسفرولوسیت و آدیپوهموسیت را در لارو سن چهارم (Lepidoptera: Noctuidae) *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) گزارش کردند. در تحقیقی که توسط گیگلیو و همکاران (۲۰۰۸) روی سوسک *Carabus lefebvrei* Dejean (Coleoptera: Carabidae) انجام شد، چهار نوع سلول خونی به نام‌های پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید و پروهموسیت شناسایی شد. بررسی‌ها روی *Danaus chrysippus* L. (Lepidoptera:Nymphalidae) نشان داده است که شش نوع سلول خونی در همولنف این بالپولک‌دار وجود دارد (ریبرو و برهلن، ۲۰۰۶). در مطالعه ای که توسط براینر[3] و همکاران (۲۰۰۵) روی سلول‌های خونی *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) انجام شد، شش نوع سلول خونی به نام‌های پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید، اسفرولوسیت و آدیپوهموسیت شناسایی شد. غزوی و همکاران (۱۳۸۲)، چهار نوع سلول خونی شامل پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت و کوآگولوسیت در ملخ آسیایی *L. migratoria* شناسایی کردند. 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 لاگوس[4]، ۲۰۰۳).

1. Manachini
2. El-Aziz & Awad
3. Brayner
4. Lagueux

سیلوا[1] و همکاران (۲۰۰۲)، گزارشی از انواع سلول‌های خونی لارو سن سوم پارازیت نشده *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) ارائه دادند، که در آن شش نوع سلول خونی پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید، اسفرولوسیت و آدیپوهموسیت شناسایی شده است. در تحقیقی که توسط آل هرینی و سوهایل[2] (۲۰۰۱) روی ملخ صحرایی *Schistocerca gregaria* (Forsk) (Orthoptera Acrididae) انجام شد، همانند تحقیق حاضر پنج نوع سلول خونی پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید، اسفرولوسیت شناسایی شده است. در سال ۱۹۸۷، دیویس[3] و همکاران در راستای بررسی ایمنی سلولی کرم جوانه تنباکو *Heliothis virescens* Fabricius، پنج نوع سلول خونی را در این حشره همانند تحقیق حاضر شناسایی کردند. باراکو و کستاری[4] (۱۹۸۴)، چهار نوع سلول خونی به نام‌های پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت و اونوسیتوئید در لارو *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae) گزارش کردند. گزارشی از انواع سلول‌های خونی در لارو *Manduca sexta* (Linnaeus). (Lepidoptera: Sphingidae) توسط هروهوو و دان[5] (۱۹۸۲) ارائه شد، که همانند تحقیق حاضر پنج نوع سلول پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید، اسفرولوسیت شناسایی شده است. کن و همکاران (۲۰۱۴)، شش نوع سلول خونی در همولنف سوسک *P. brevitarsis* مشاهده کردند. این سلول‌ها شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و آدیپوهموسیت‌ها بودند. در این سوسک بیش‌ترین تعداد سلول‌های خونی مربوط به آدیپوهموسیت‌ها بوده است. قبل از آن نیز آل خلیفه و سیدیگوی[6] (۱۹۹۹)، این شش نوع سلول خونی را در

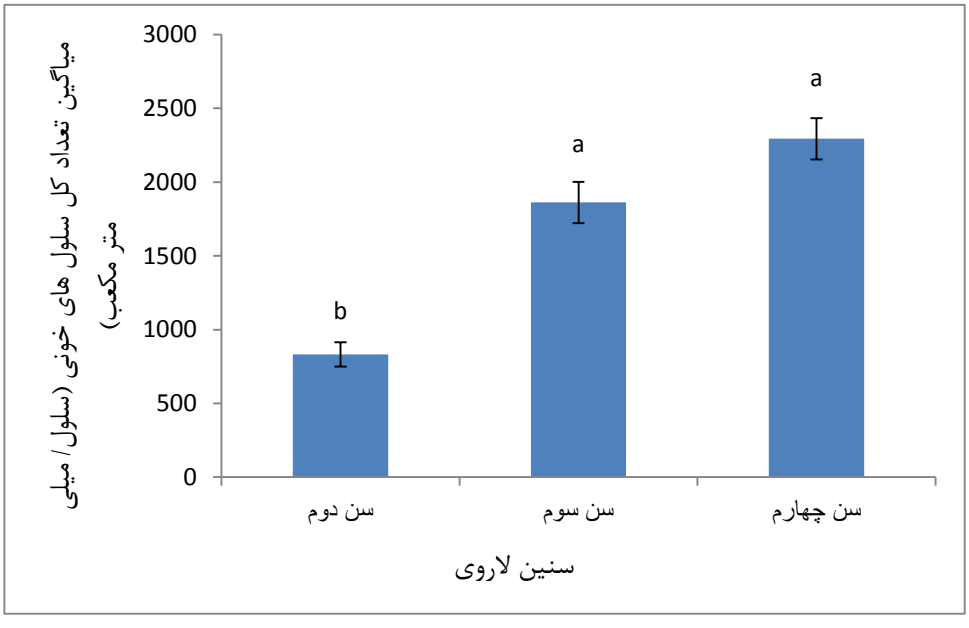
1. Silva
2. Al-Harini & Suhail
3. Davies
4. Barracco & Cestari
5. Horohov & Dunn
6. Al- Khalifa & Siddiqui

سرخرطومی *Rhynchophorus ferrugineus* گزارش کردند، ولی استرند (۲۰۰۸)، آدیپوهموسیت را از اجزای بافت چربی می‌داند و در زمره ی سلول‌های خونی محسوب نمی‌کند. با توجه به نتایج حاصل از اندازه گیری‌های سلولی نشان داده شده است که هر یک از مورفوتیپ‌های سلول دارای اندازه‌های متنوعی هستند. در این مطالعه نیز اشکال متنوعی از برخی سلول‌های خونی و بویژه گرانولوسیت‌ها مشاهده شد که اندازه آن‌ها متنوع و از کوچک تا سلول‌هایی درشت در خون حشره پراکنده بودند. این تغییرات متنوع در شکل و اندازه‌ی سلول‌های خونی مشکلاتی در طبقه بندی آن‌ها ایجاد کرده است چرا که سلول‌های خونی حشرات بسیار پلی‌مورف هستند و به نظر می‌رسد که تنوع زیاد این مورف‌ها بستگی به سن حشره، مرحله‌ی رشدی، چگونگی تغذیه و گونه‌ی حشرات دارد (جونز، ۱۹۶۲؛ لایفوک و نیوورت[1]، ۱۹۷۲). ابقای سلول‌های خونی در گردش خون لارو بالپولک‌داران، به انتشار سلول‌های خونی از اندام‌های هماتوپیوتیک و همچنین تقسیم میتوز سلول‌های خونی در سیستم گردش خون نسبت داده شده است (گاردینر و استرند، ۲۰۰۰). سطح فعالیت میتوزی در سلول‌های خونی درگردش به ندرت از ۱٪ در همه‌ی موارد تجاوز می‌کند (جونز، ۱۹۶۷a؛ جونز، ۱۹۶۷b؛ جونز و لیو[2]، ۱۹۶۸)، اما در *P. operculella* نشان داده شد که این فعالیت با مرحله‌ی رشدی مختلف حشره متفاوت است. در تحقیق حاضر اشکال تقسیم میتوزی نیز به وفور در گرانولوسیت‌های لاروهای سن چهارمی که تغذیه مناسبی از غده‌های سیب زمینی داشتند، مشاهده شد (شکل ۴-۲).

1. Lai-Fook & Neuwirth
2. Liu

۴-۲- شمارش کل (Total Hemocyte Count) و تفرقی (Differential Hemocyte count) سلول‌های خونی *P. operculella*

شمارش کل سلول‌های خونی بید سیب زمینی نشان داد که در لارو سن دوم ۸۲/۵۲± ۸۳۱/۳، لارو سن سوم ۱۴۰/۳۹± ۱۸۶۱/۵ و لارو سن چهارم ۱۳۹/۱۱± ۲۲۹۳/۳ سلول در میلی‌متر مکعب خون مشاهده شد (شکل ۴-۳).

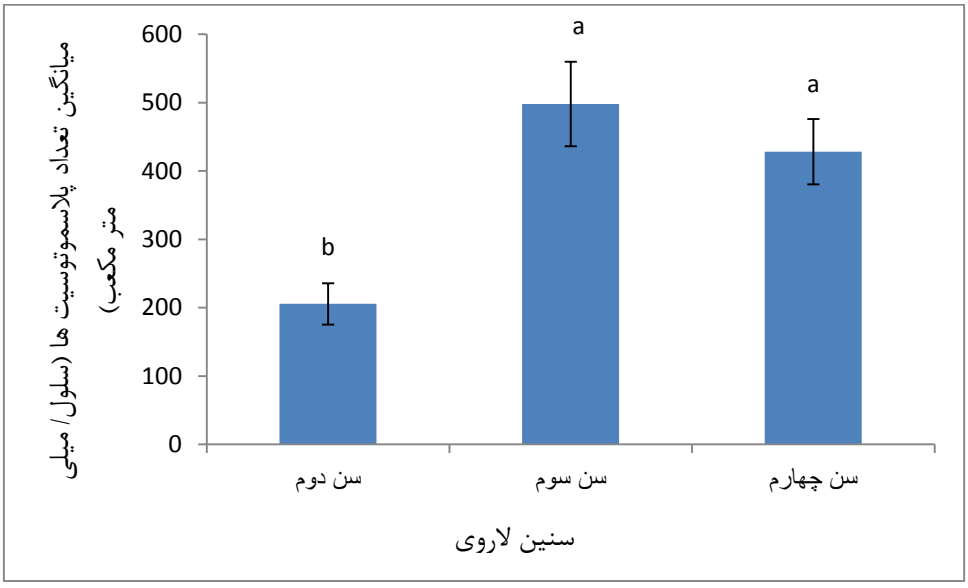


شکل ۴-۳- فراوانی کل سلول‌های خونی در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی

فراوانی پروهموسیت‌ها پس از اسفرولوسیت‌ها نسبت به سایر سلول‌های خونی دارای کمترین مقدار بود. تعداد این سلول‌ها در لاروهای سن چهارم به طور معنی داری بیشتر از سنین دوم و سوم لاروی بود ($F = ۸/۳۴$ ، $df = ۲$ ، $P \leq ۰/۰۰۱۵$) (شکل۴-۴).

شکل ۴-۴- فراوانی پروهموسیت‌ها در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی

پلاسموتوسیت‌ها پس از گرانولوسیت‌ها بیشترین فراوانی را در این حشره داشتند. این سلول‌ها در لارو-های سن چهارم و سن سوم بید سیب زمینی به طور معنی داری بیشتر از سنین دوم لاروی بودند (F = ۹/۹۸ ، df = ۲ ، P ≤۰/۰۰۰۶) (شکل۴-۵).

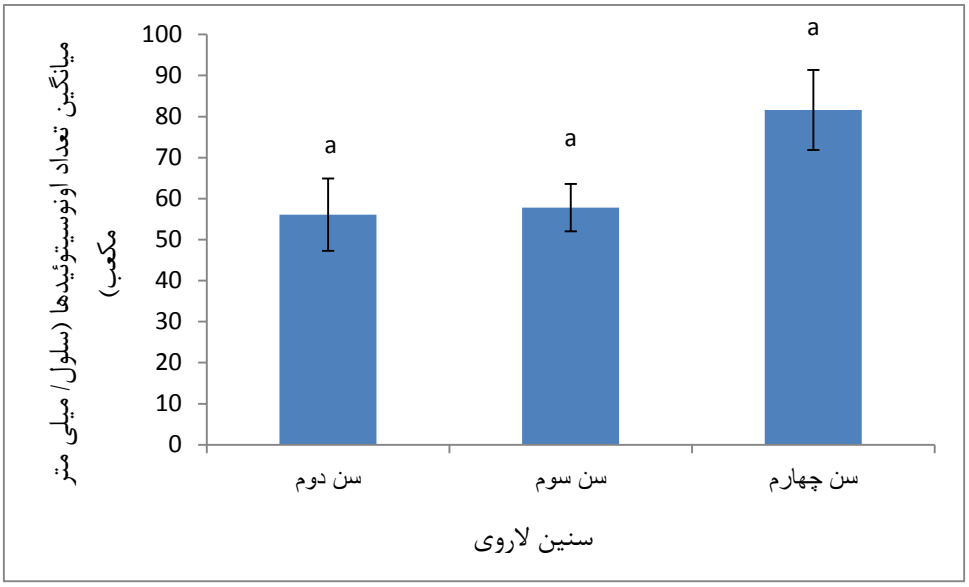


شکل ۴-۵- فراوانی پلاسموتوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی

گرانولوسیت‌ها بیش‌ترین فراوانی را در همولنف این حشره به خود اختصاص دادند. با شمارش تفرقی سلول‌های خونی مشخص شد که گرانولوسیت‌ها به همراه پلاسموتوسیت‌ها بیش‌ترین فراوانی کل سلول‌های خونی لارو سن چهار بید سیب زمینی را به خود اختصاص دادند. این سلول‌ها در لاروهای سن چهارم و سن سوم بید سیب زمینی به طور معنی داری بیشتر از سنین دوم لاروی بودند (F = ۳۷/۳۳ ، df = ۲ ، P ≤۰/۰۰۰۱) (شکل۴-۶).

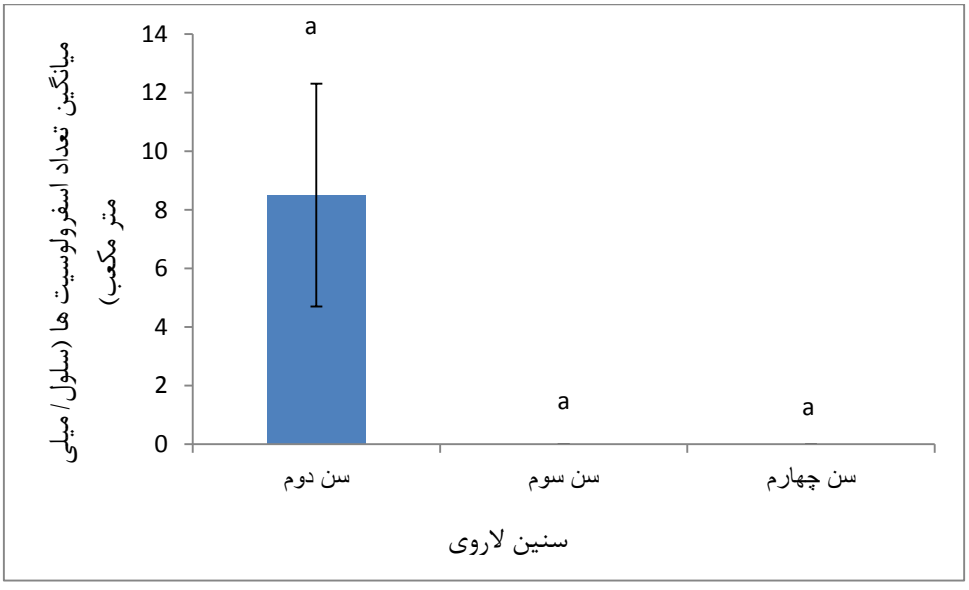
شکل ۴-۶- فراوانی گرانولوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی

فراوانی اونوسیتوئیدها نسبت به گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها کمتر بود، اما اختلاف معنی داری در تعداد اونوسیتوئیدها در مراحل لاروی سنین ۲، ۳ و ۴ مشاهده نشد (F = ۲/۹۶ ، df = ۲ ، P ≤۰/۰۶۸۷) (شکل۴-۷).

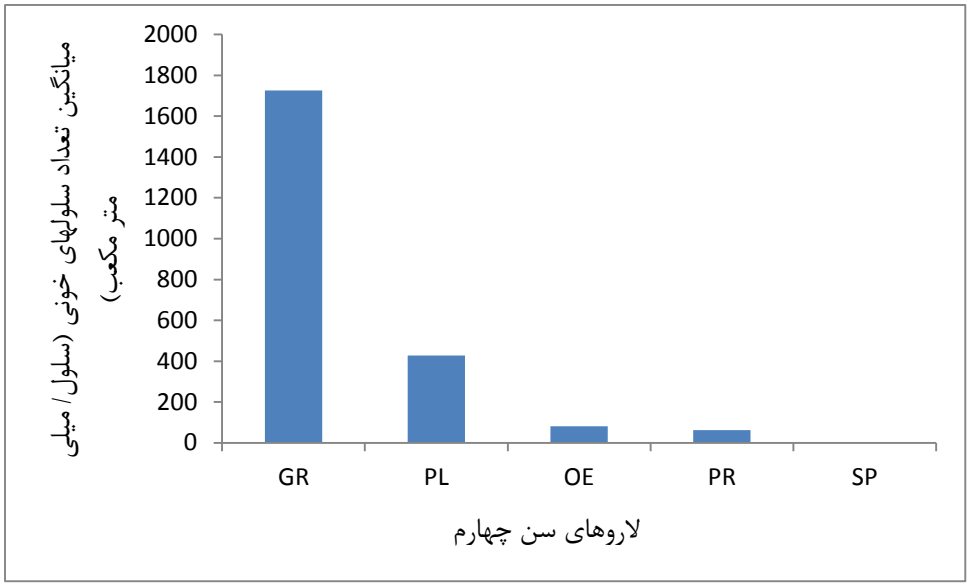


شکل ۴-۷- فراوانی اونوسیتوئیدها در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی

اسفرولوسیت‌ها کم‌ترین میزان فراوانی سلول‌های خونی را به خود اختصاص دادند. این سلول‌ها در سنین دوم لاروی به میزان نسبتا کمی مشاهده شد به طوری که اختلاف معنی داری با سنین سوم و چهارم مشاهده نشد ($F = ۵/۰۰$ ، $df = ۲$ ، $P \leq ۰/۰۱۴۲$) (شکل۴-۸).



شکل ۴-۸- فراوانی اسفرولوسیت‌ها در همولنف لاروهای سن دوم، سوم و چهارم بید سیب زمینی



شکل ۴-۹- فراوانی سلول‌های خونی مختلف در همولنف لاروهای سن چهارم بید سیب زمینی

طبق نتایج حاصل، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها بیش‌ترین تعداد را در بین سلول‌های خونی لارو-های چهارم لاروی بید سیب زمینی را به خود اختصاص دادند و فراوانی گرانولوسیت‌ها نسبت به پلاسموتوسیت‌ها در این حشره بیش‌تر بود. این سلول‌ها به عنوان ایمنوسیت‌ها بیش‌ترین مشارکت را در فعالیت‌های ایمنی حشرات دارند و ثابت شده که در لاروهای سنین بالای بالپولک‌داران بیش‌ترین فراوانی را در بین انواع سلول‌های خونی به خود اختصاص می‌دهند (عجم حسنی، ۱۳۹۴؛ کهن و همکاران، ۱۳۹۱). مشاهدات ما تا حدودی با تحقیقات سایر محققین در مورد میزان فراوانی ایمنوسیت‌ها در همولنف مطابقت دارد. چنانکه بلانکو[1] و همکاران (۲۰۱۷)، نشان دادند که فراوان-ترین سلول‌های خونی در همولنف پروانه‌ی موم خوار، گرانولوسیت‌ها و سپس پلاسموتوسیت‌ها بود. خسروی و همکاران (۲۰۱۶)، نیز در شمارش تفرقی سلول‌های خونی زنبور *A. ochropus* نشان دادند که پلاسموتوسیت‌ها فراوان‌ترین سلول‌ها در طول سنین اولیه‌ی لاروی بودند در حالیکه گرانولوسیت‌ها

1. Blanco

بیش‌ترین فراوانی سلول‌های خونی در سنین آخر لاروی را به خود اختصاص دادند. عجم حسنی (۱۳۹۳a)، گزارش کرد که ایمنوسیت‌ها فراوان‌ترین سلول‌ها نسبت به سایر سلول‌ها در تمام مراحل رشدی لارو پروانه‌ی *U. pulchella* بودند. قاسمی و همکاران (۲۰۱۳)، نیز ایمنوسیت‌ها را به عنوان فراوان‌ترین سلول‌های خونی در تمام مراحل رشدی لارو شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *E. kuehniella* گزارش کردند. کهن و همکاران (۱۳۹۱)، گزارش کردند که پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در مجموع بیش‌ترین درصد فراوانی را در هر سه سنین لاروی *X. luteola* به خود اختصاص داده است. مطالعات پیشین نیز نشان داده است که پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها مسئول پاسخ‌های ایمنی سلولی در بسیاری از لاروهای حشرات بالپولک‌دار مانند *M. sexta* (لینگ و یو، ۲۰۰۶b) و *G. mellonella* (توجو[1] و همکاران، ۲۰۰۰) بوده است و معمولا با همدیگر مجموعا بیش از ۵۰٪ فراوانی سلول‌های خونی در گردش خون را شامل می‌شوند (لاکی، ۱۹۸۸؛ راتکلیف، ۱۹۹۳). ماناچینی و همکاران (۲۰۱۱)، تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها را به ترتیب تقریبا ۵۰٪ و ۳۵٪ در سرخرطومی قرمز نخل گزارش کردند. در تحقیقی که توسط زیبایی و جلالی (۲۰۱۱) روی سلول‌های خونی لاروهای سن پنجم دو بالپولک‌دار به نام‌های پروانه سفید اشجار *H. cunea* و پروانه برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis* انجام گرفت، با شمارش تفرقی سلول‌های خونی نشان داده شد که پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در هر دو گونه از فراوان‌ترین سلول‌ها بوده که به ترتیب ۲۳ و ۲۷ درصد برای برگ‌خوار توت و ۳۶ و ۲۸ درصد برای پروانه سفید اشجار به ثبت رسید. در تحقیقی که آندرید[2] و همکاران (۲۰۱۰) روی لارو *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) ارائه دادند، تعداد پلاسموتوسیت‌ها را ۴۷/۸٪ و گرانولوسیت‌ها را ۱۵/۸٪ گزارش کردند که همانند نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها دارای بیش‌ترین

1. Tojo
2. Andrade

فراوانی در بین دیگر سلول‌های خونی می‌باشند. سیلوا و همکاران (۲۰۰۲) گزارشی از شمارش تفرقی و تعداد کل سلول‌های خونی لارو سن سوم پارازیت نشده *Anastrepha obliqua* ارائه دادند، که تعداد کل سلول‌های خونی برابر ۵۱/۱±۳۴۵/۰ سلول در میلی‌متر مکعب همولنف گزارش شد. اما در مطالعه حاضر تعداد کل سلول‌های خونی لارو سن سوم بید سیب زمینی ۱۴۰/۳۹±۱۸۶۱/۵ سلول در میلی-متر مکعب همولنف محاسبه شد، لذا مقدار آن به مراتب بیش‌تر از لارو سن سوم *A. obliqua* می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر بازگو کننده‌ی افزایش معنی‌دار تعداد کل سلول‌های خونی و گرانولوسیت‌های لاروهای سن چهارم نسبت به لاروهای سنین دوم بود. یعنی با افزایش سن لاروی و در پی آن افزایش جثه‌ی حشره و حجم همولنف، تعداد سلول‌های خونی زیاد می‌شود. تحقیقات دیگر محققین نیز تایید کننده این مطلب است. چنانکه عجم حسنی (۱۳۹۴)، در بررسی یاخته شناسی سلول‌های خونی کرم شاخدار فرفیون *H. euphorbiae* مشاهده کرد که با افزایش سن لاروی به تدریج بر تعداد کل سلول-های خونی افزوده می‌شود ولی با ورود به مرحله‌ی شفیرگی و بالغ این میزان کاهش می‌یابد. قاسمی و همکاران (۲۰۱۳)، گزارش کردند که تعداد کل سلول‌های خونی با افزایش سن لاروی شب‌پره مدیترانه‌ای *E. kuehniella* به تدریج افزایش می‌یابد و در شفیره به بیش‌ترین مقدار می‌رسد. کهن و همکاران (۱۳۹۱)، نیز مشاهده کردند که با افزایش سن لاروی *X. luteola* تعداد کل سلول‌های خونی و پلاسموتوسیت‌ها به طور معنی‌داری بیش‌تر می‌شود. خسروی و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی سلول-های خونی شب‌پره‌ی خرنوب *E. ceratoniae* گزارش کردند که درصد تمام سلول‌های خونی به جز پروهموسیت‌ها در سن آخر لاروی این حشره بیش‌ترین میزان را به خود اختصاص داده در حالی که پروهموسیت‌ها در سنین اول لاروی بیش‌ترین میزان را نسبت به سنین بالاتر لاروی دارد. در لارو کرم ابریشم *B. mori*، که اغلب به عنوان مدل اصلی برای ایمنی بالپولک‌داران معرفی شده است، مشخص شده که پروهموسیت‌ها به عنوان سلول‌های پایه‌ی قدرتمند هستند که نقش اصلی آن‌ها تولید سایر

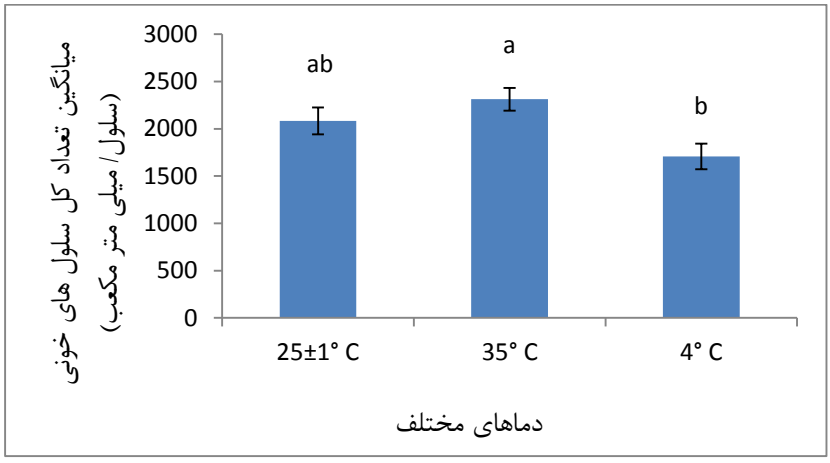
سلول‌های خونی در حشرات می‌باشد (نیشن، ۲۰۰۲؛ واگو[1]، ۱۹۹۱). پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به عنوان سلول‌های مسئول در فرایندهای ایمنی و اونوسیتوئیدها در فرایند ملانیزاسیون نقش دارند (ایواما و آشیدا، ۱۹۸۶). همچنین نتایج محققین نشان داده که گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها انواع مختلفی از ژن‌های ایمنی را بیان می‌کنند و نقش‌های متعدد آن‌ها در ایمنی کرم ابریشم گزارش شده است (ناکاهارا[2] و همکاران، ۲۰۰۹). گرانولوسیت‌ها به عنوان سلول‌های شکننده[3] نیز معرفی شده‌اند زیرا که هنگام برخورد به جسم خارجی، دیواره‌ی آن‌ها پاره شده و محتویات داخلی سلول آزاد شده و به بیرون می‌ریزد (چپمن، ۱۹۹۸). دیواره‌ی سلولی اونوسیتوئیدها همانند گرانولوسیت‌ها شکننده می‌باشد (چپمن، ۱۹۹۸). مطالعات نشان داده است که اسفرولوسیت‌ها عملکرد ژنتیکی ایمنی را ندارند، زیرا آن‌ها قادر به بیان اکثر ژن‌های مربوط به ایمنی نیستند. بنابراین پیشنهاد شده است که نقش متمایزی از چهار نوع دیگر سلول‌ها ایفا کند که بیش‌تر نقش ذخیره‌ای می‌باشد (ناکاهارا و همکاران، ۲۰۰۹). نوسانات ایجاد شده در تعداد سلول‌های خونی، در بسیاری از گونه‌های حشرات، از انتشار سلول‌های خونی از اندام هماتوپوئتیک و پیوستن سلول‌ها به بافت‌های داخلی تاثیر می‌پذیرد (تو[4] و همکاران، ۲۰۰۲؛ اوکازاکی[5] و همکاران، ۲۰۰۶).

۴-۳- بررسی تاثیر تنش دما بر تعداد کل سلول‌های خونی (THC) و انواع سلول‌های خونی *P. operculella*

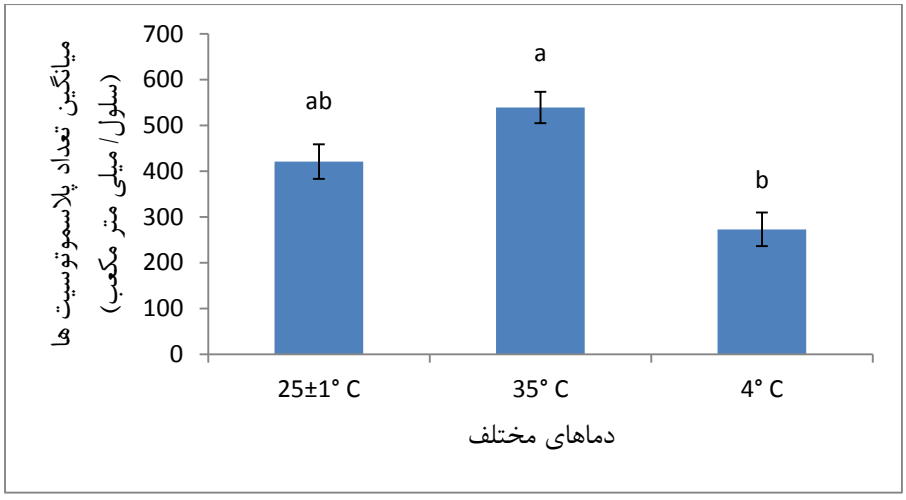
بر اساس نتایج، اثر تنش‌های دمایی (۴ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد) بر سامانه ایمنی بید سیب زمینی معنی‌دار بوده است. همانطور که در نمودارها آمده است. در لاروهایی که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند، تغییرات معنی داری در تعداد کل سلول‌های خونی ($P \leq ۰/۰۰۸۲$ ،

1. Wago
2. Nakahara
3. Fragile cells
4. Tu
5. Okazaki

۲ = df ، ۵/۲۴ = F) (شکل ۴-۱۰) و پلاسموتوسیت‌ها نسبت به شاهد مشاهده شد (۰/۰۰۰۱≤ P ، ۲ = df ، ۱۳/۴۷ = F) (شکل ۴-۱۱).



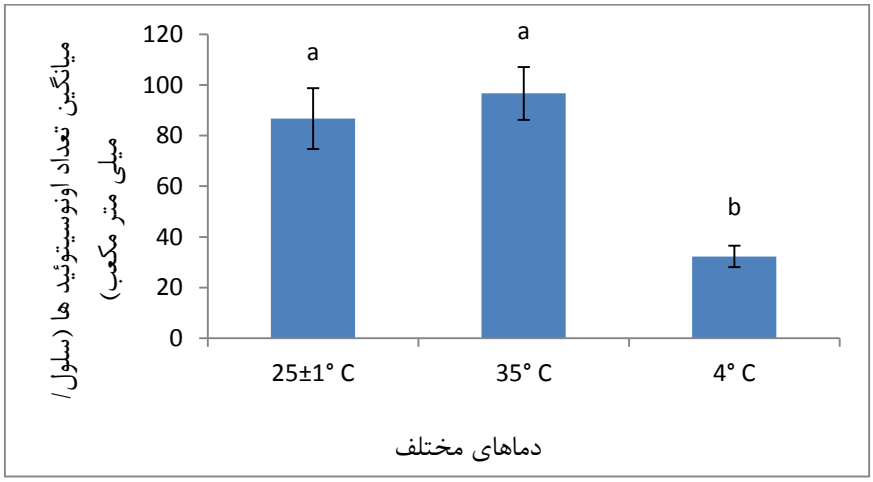
شکل ۴-۱۰- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد کل سلول‌های خونی بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)



شکل ۴-۱۱- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد پلاسموتوسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

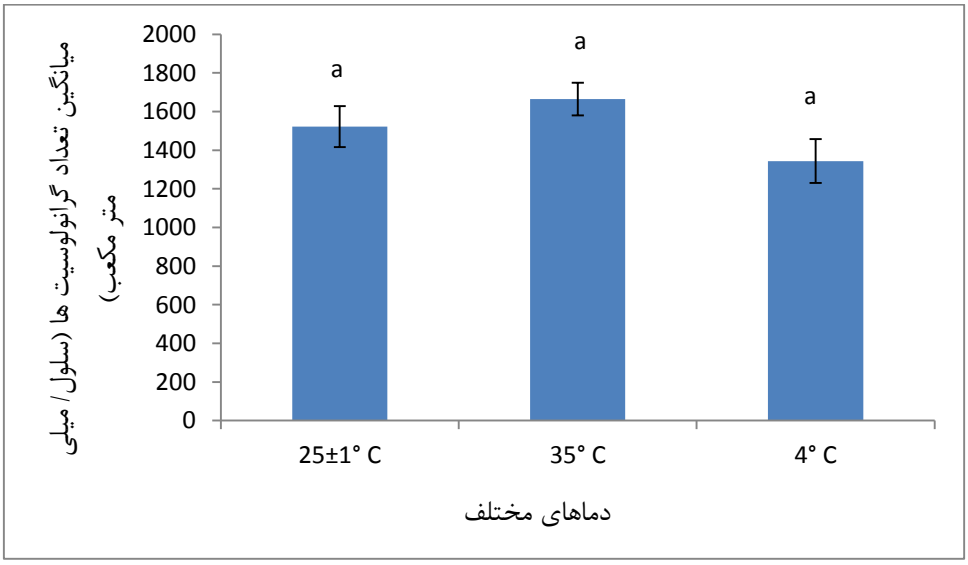
همچنین در اثر تنش سرما (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد)، تعداد کل سلول‌های خونی، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و اونوسیتوئیدها نسبت به شاهد کاهش یافت. به طوری که تغییرات

در تعداد کل سلول‌های خونی (P ≤۰/۰۰۸۲ ، df = ۲ ، F = ۵/۲۴) (شکل ۴-۱۰)، پلاسموتوسیت‌ها (P ≤۰/۰۰۰۱ ، df = ۲ ، F = ۱۳/۴۷) (شکل ۴-۱۱) و اونوسیتوئیدها (P ≤۰/۰۰۰۱ ، df = ۲ ، F = ۱۲/۲۴) (شکل ۴-۱۲) نسبت به شاهد معنی دار بودند.



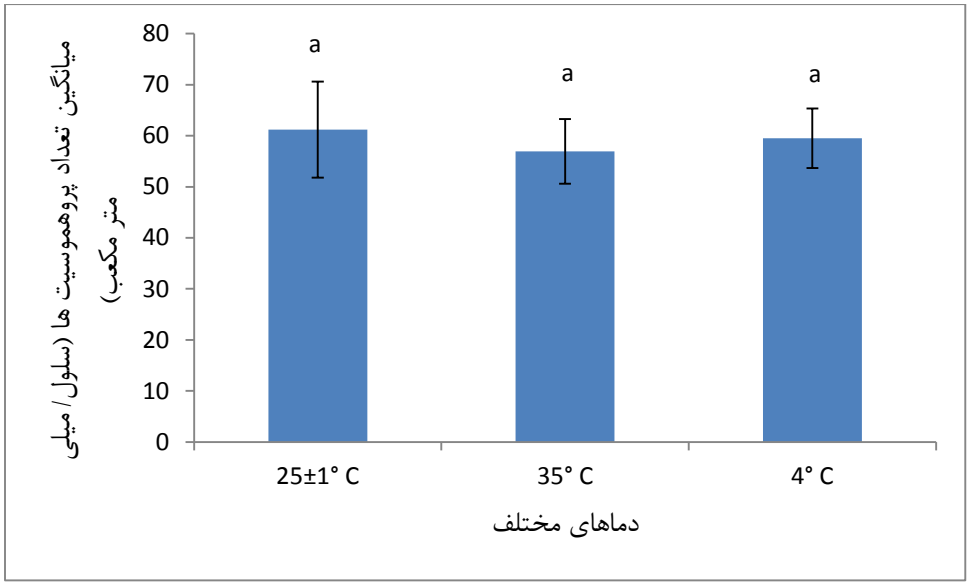
شکل ۴-۱۲- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد اونوسیتوئیدهای بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

در اثر تنش دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، تعداد گرانولوسیت‌ها افزایش و در اثر تنش ۴ درجه سانتی-گراد، این سلول‌ها کاهش یافت اما اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده نشد (شکل ۴-۱۳).



شکل ۴-۱۳- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد گرانولوسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

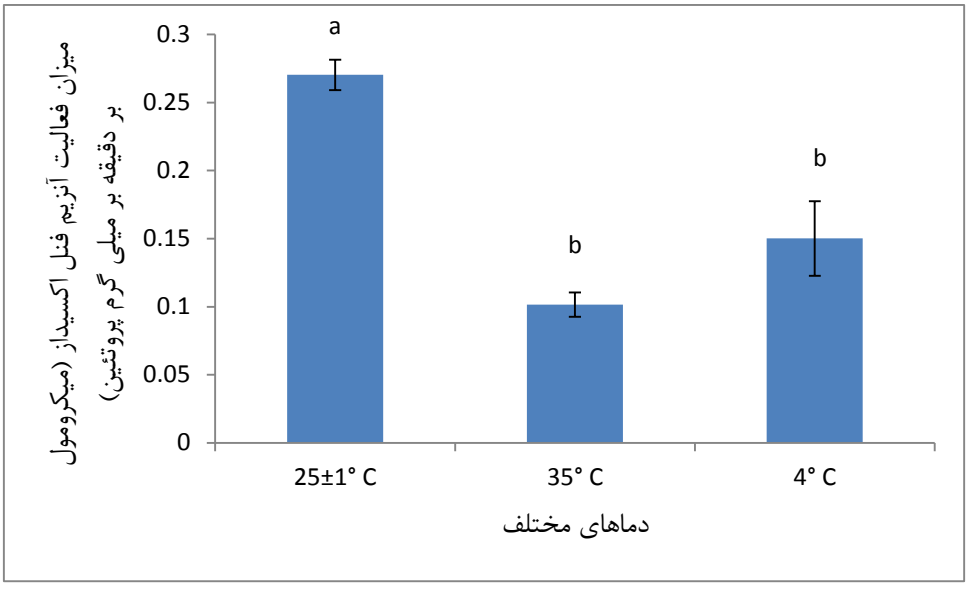
در اثر تنش دمای ۳۵ و ۴ درجه سانتی‌گراد، تعداد پروهموسیت‌ها نسبت به شاهد کاهش یافت اما اختلاف معنی‌دار نبود (شکل۴-۱۴).



شکل ۴-۱۴- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد پروهموسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

۴-۴- تاثیر تنش دما بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در همولنف بید سیب‌زمینی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که افزایش و کاهش دما موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم فنل اکسیداز می‌شود ($F = ۲۳/۷۵$ ، $df = ۲$ ، $P \leq ۰/۰۰۱۴$). فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در شاهد، ۰/۲۷۰±۰/۰۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود که به طور معنی داری از میزان فعالیت آن در لاروهای تحت تنش دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد (۰/۱۰۱ ±۰/۰۰۹) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین و ۴ درجه سانتی‌گراد (۰/۱۵۰±۰/۰۲۷) میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین، بیش‌تر است (شکل ۴-۱۵).



شکل ۴-۱۵- تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف بید سیب‌زمینی

دما یکی از فاکتورهای مهم و تأثیرگذار بر سیستم ایمنی حشرات است. همانطور که حرارت‌های پایین و بالا یکی از منابع استرس برای حشرات هستند، ممکن است که تعداد سلول‌های خونی بطور مستقیم توسط تغییر در درجه حرارت تغییر کند. نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده در تحقیق حاضر به وضوح نشان داد که تنش گرما سبب افزایش قابل توجهی در تعداد کل سلول‌های خونی یعنی ۱۱۹/۶۸± ۲۳۱۳/۰ سلول در میلی‌متر مکعب همولنف می‌شود. در مقابل، تنش سرما کاهش قابل توجهی در تعداد کل سلول‌های خونی به میزان ۱۳۵/۵۶± ۱۷۰۸/۵ سلول در میلی‌متر مکعب همولنف را به همراه داشت. بنابراین بنظر می‌رسد که در معرض قرار دادن حشره در دمای بالا، می-تواند سازگاری محیطی لارو را از طریق یک مکانیسم خود تنظیم حرارت مانند افزایش تعداد کل سلول‌های خونی و به خصوص افزایش پلاسموتوسیت‌ها بالا ببرد. مطالعاتی که در رابطه با اثر درجه حرارت بر تعداد سلول‌های خونی حشرات مختلف، توسط محققین صورت گرفته، نشان دهنده نتایج متفاوتی است. عده ای تاکید کردند که درجه حرارت پایین، تعداد کل سلول‌های خونی را در حشرات

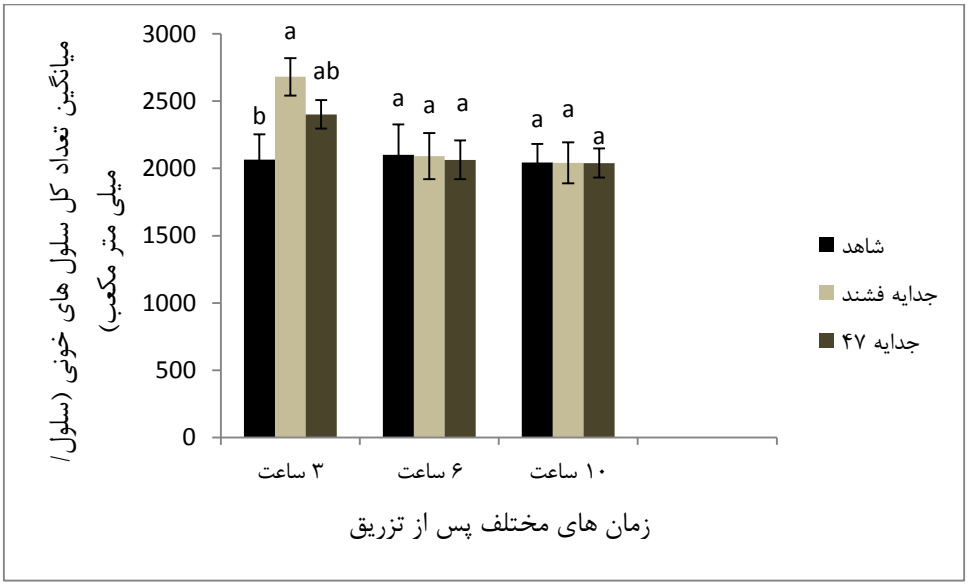
مختلف کاهش داده (توبر و ییگر، ۱۹۳۵؛ تیواری و شوکلا، ۲۰۰۰) و درجه حرارت بالا، تعداد کل سلول‌های خونی را افزایش می‌دهد (توبر و ییگر، ۱۹۳۵؛ روزنبرگر و جونز، ۱۹۶۰) که نتایج ما با آن‌ها مطابقت داشت. در برخی از موارد هیچ تغییری در تعداد کل سلول‌های خونی بالپولک‌داران در دمای پایین مشاهده نشده است (آرنولد، ۱۹۵۲؛ روزنبرگر و جونز، ۱۹۶۰). گزارشاتی از پندی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در رابطه با تاثیر دما بر شکل و تعداد سلول‌های خونی بالپولک‌داران بیان شد. درواقع تنش گرما باعث تغییر معنی داری در پاسخ‌های ایمنی سلول‌های خونی کرم ابریشم گرمسیری *D. Antheraea mylitta* (Lepidoptera:Saturniidae) می‌شود. در این بررسی تغییرات تعداد تفرقی سلول‌ها، تحت تاثیر استرس‌های دمایی مختلف قابل توجه بود. تعداد پروهموسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها، تحت تاثیر سرما کاهش یافت درحالی که افزایش مختصری در تعداد گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها، آدیپوهموسیت‌ها و اونوسیتوئیدها مشاهده شد. در لاروهای تحت تنش گرمایی، مقدار پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها افزایش یافت درحالی که سایر سلول‌های خونی کاهش یافتند. حرارت‌های کوتاه مدت (۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت)، الگوهای متفاوتی در فراوانی نسبی انواع مختلف سلول‌های خونی نشان دادند. قرار گرفتن در معرض گرما برای یک دوره کوتاه نیز، سبب صدمه به ساختار سلول‌ها می‌شود. به علاوه پندی و همکاران اعلام کردند که پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها تنها گروهی هستند که همیشه تحت رژیم‌های مختلف دمایی تاثیرپذیرتر از سایر سلول‌های خونی هستند. در تحقیق حاضر نیز پلاسموتوسیت‌ها در تنش‌های دمایی دارای نوسانات معنی‌داری شدند. تاثیر تنش‌های حرارتی روی شکل سلول‌های خونی لارو *A. mylitta* نشان داد که تنش گرمایی سبب به هم‌ریختگی شکل سلول‌ها شده است. به طوریکه زمانی که لاروها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند، واکنش‌هایی مانند از دست دادن تراکم زائده‌های سیتوپلاسمی در پلاسموتوسیت‌ها، واکوئولیزاسیون در پلاسموتوسیت‌ها و

گرانولوسیت‌ها و تکه تکه شدن هسته در پروهموسیت‌ها رخ داد که حتی در مواقعی منجر به مرگ سلولی شد (پندی و همکاران، ۲۰۱۰). در مطالعه حاضر نیز کوچک شدن سلول‌ها در اثر سرما و یا پاره شدن غشای سلولی در نتیجه تنش دمای بالا مشاهده شد که داده‌ها آمار برداری نشده است. در یک مطالعه‌ی دیگر روی لارو *D. chrysippus*، نشان داده شد که تنش سرما سبب کاهش تعداد سلول‌های خونی می‌شود با این وجود، تنش گرمایی افزایش سلول‌های خونی را به دنبال داشت (پندی و همکاران، ۲۰۰۸). طبق مشاهدات قاسمی و همکاران (۲۰۱۳) در رابطه با واکنش‌های ایمنی Zell *Ephestia kuehniella* در برابر تنش‌های دمایی، شکل سلول‌های خونی و تعداد آنها تحت تاثیر تنش‌های دمایی بالا به شدت دستخوش تغییر شد. دیواره سلولی پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به عنوان مهم‌ترین سلول‌های خونی شرکت کننده در ایمنی سلولی، در دمای حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد پاره شدند و محتویات سلولی آن‌ها به داخل همولنف پخش شد. جونز در سال ۱۹۶۷، در بررسی تغییرات تعداد کل سلول‌های خونی در طول مرحله رشدی لارو *G. mellonella*، به این نتیجه دست یافت که گرمای ثابت و غیر ثابت هر دو سبب افزایش تعداد کل سلول‌های خونی می‌شوند، هرچند مقدار آن در حشراتی که تحت گرمای ثابت قرار گرفتند؛ به طور قابل توجهی بالاتر بود. وی پیشنهاد کرد که این افزایش در تعداد سلول، احتمالا به دلیل از دست دادن آب بدن در نتیجه‌ی خشک شدن آن در اثر گرما است (جونز، ۱۹۶۷). در بررسی توبر و ییگر در سال ۱۹۳۵، نرخ تقسیم میتوزی سلول-های خونی *Blaberus sp* که در معرض دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، افزایش یافت (توبر و ییگر، ۱۹۳۵). بررسی‌ها روی *D. chrysippus* نشان داده است که شش نوع سلول خونی در همولنف این بالپولک‌دار وجود دارد (ریبرو و برهلن، ۲۰۰۶). بررسی‌ها روی سلول‌های خونی *D. chrysippus* نشان داده که این سلول‌های خونی، اثرات نامطلوب استرس‌های (سرمایی و گرمایی) را آشکار می‌سازند که ممکن است مشابه استرس ناشی از سمی شدن همولنف سن Fabr. (Hemiptera:

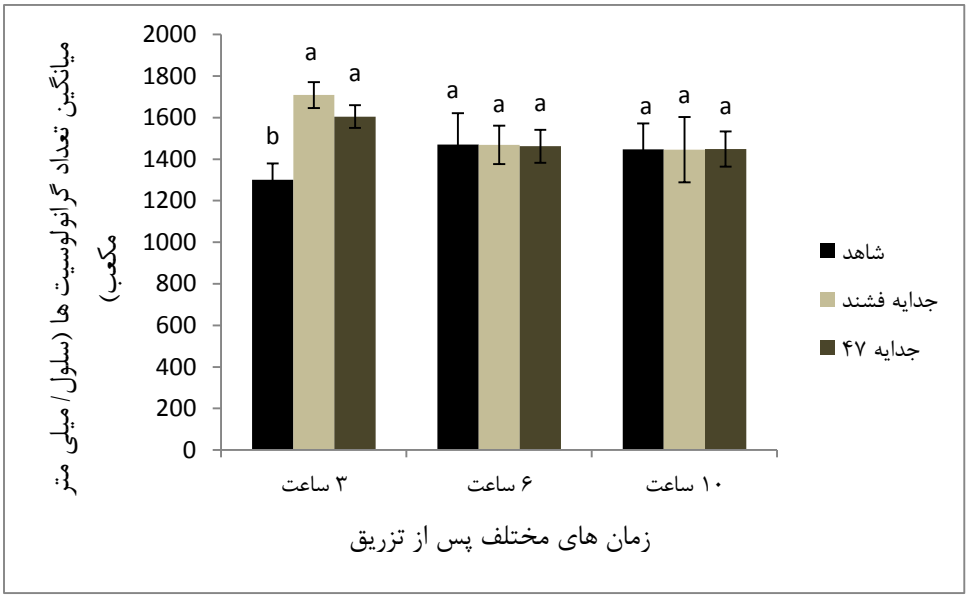
Dysdercus koenigi Pyrrhocoridae) باشد (تیواری و همکاران، ۲۰۰۶). سلول‌های خونی *D. chrysippus* به دما حساس بوده و به نظر می‌رسد پروهموسیت‌ها حساس‌ترین سلول‌های خونی نسبت به بقیه سلول‌ها باشند که به طور کلی مسئول عملکرد طبیعی فیزیولوژیک خون به عنوان سلول‌های پایه می‌باشند (پندی و همکاران، ۲۰۰۸). در تحقیق حاضر، در نتیجه تنش‌های دمایی، فراوانی پلاسموتوسیت‌ها بیش‌تر از سایر سلول‌ها دستخوش تغییرات شده است. با توجه به اینکه پروهموسیت‌ها به عنوان سلول‌های پایه‌ی تمایز نیافته همیشه در همولنف حضور دارند و منبع سلول-های خونی گوناگون هستند، در زمان تنش یا حمله بیمارگر به سلول‌های مؤثر در ایمنی تقسیم می-شوند و از طرف دیگر خود پلاسموتوسیت‌ها نیز تحت تقسیمات میتوزی قرار می‌گیرند (واگو، ۱۹۹۱)، به نظر می‌رسد که این افزایش معنی‌دار پلاسموتوسیت‌ها در دمای بالا منطقی باشد. به علاوه دماهای پایین در زمان دیاپوز حشرات، حجم همولنف را کاهش می‌دهد و سلول‌های خونی بیش‌تر به دیواره-های بدن و یا لوله گوارش اتصال یافته و از گردش خون خارج می‌شوند (بندانی، ۲۰۰۵) که این مسئله می‌تواند نتایج مربوط به کاهش معنی‌دار سلول‌های خونی بید سیب زمینی را در اثر سرما توجیه نماید. با توجه به این‌که پلاسموتوسیت‌ها پس از گرانولوسیت‌ها، فراوان‌ترین سلول‌های خونی لارو سن چهارم بید سیب زمینی را به خود اختصاص داده و بیش‌ترین مشارکت را به همراه گرانولوسیت‌ها در فرایندهای دفاع سلولی حشره دارند، به نظر می‌رسد تغییرات معنی‌دار این سلول تحت شرایط دمایی مختلف بتواند به طور فاحشی سامانه ایمنی بید سیب زمینی را تحت الشعاع قرار دهد. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، تعداد پلاسموتوسیت‌ها در اثر تنش گرما افزایش قابل توجهی داشت و در مقابل تنش سرما سبب کاهش معنی‌داری در تعداد پلاسموتوسیت‌ها شد.

۴-۵- بررسی وضعیت ایمنی سلولی لاروهای سن چهار بید سیب زمینی در برابر دو جدایه از قارچ *B. bassiana*

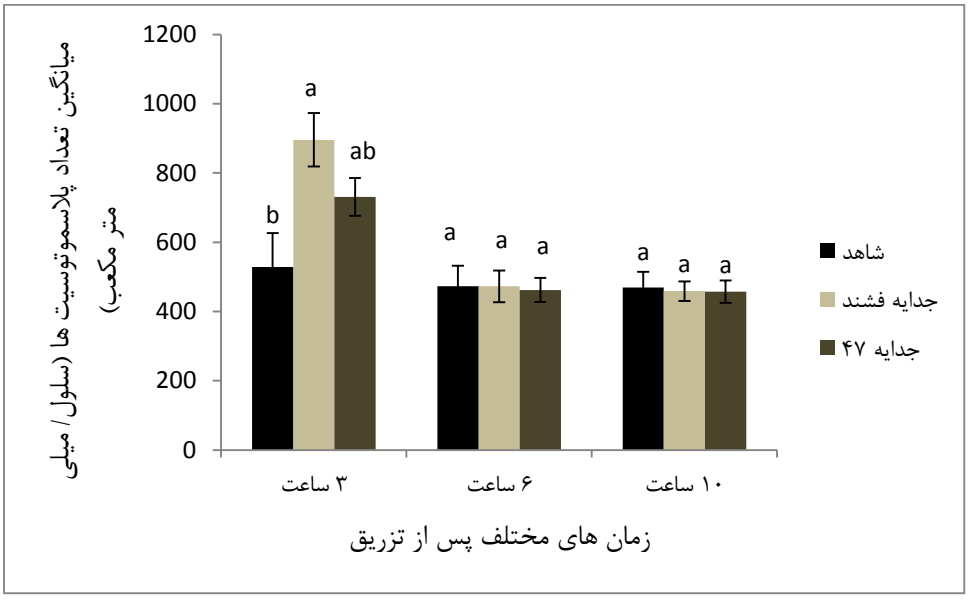
نتایج نشان داد که واکنش ایمنی لاروهای تیمار شده با قارچ بیمارگر، معنی‌دار بوده است. بیش ترین تغییرات معنی‌دار روی سلول‌های خونی در زمان های ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق قارچ رخ داده است. به طوری که پس از ۳ ساعت از تزریق اسپورهای دو جدایه Fashand و 47، افزایش معنی‌داری در تعداد کل سلول‌های خونی (P ≤۰/۰۲۳۹ ، df = ۲ ، F = ۴/۳) (شکل ۴-۱۶)، گرانولوسیت‌ها (P ≤۰/۰۰۰۵ ، df = ۲ ، F = ۱۰/۲۴) (شکل ۴-۱۷) و پلاسموتوسیت‌ها (P ≤۰/۰۱۰۱ ، df = ۲ ، F = ۵/۴۸) (شکل ۴-۱۸) نسبت به شاهد اتفاق افتاده است.



شکل ۴-۱۶- تاثیر دو جدایه ی فشند و ۴۷ از قارچ *B. bassiana* بر تعداد کل سلول‌های خونی *P. operculella*

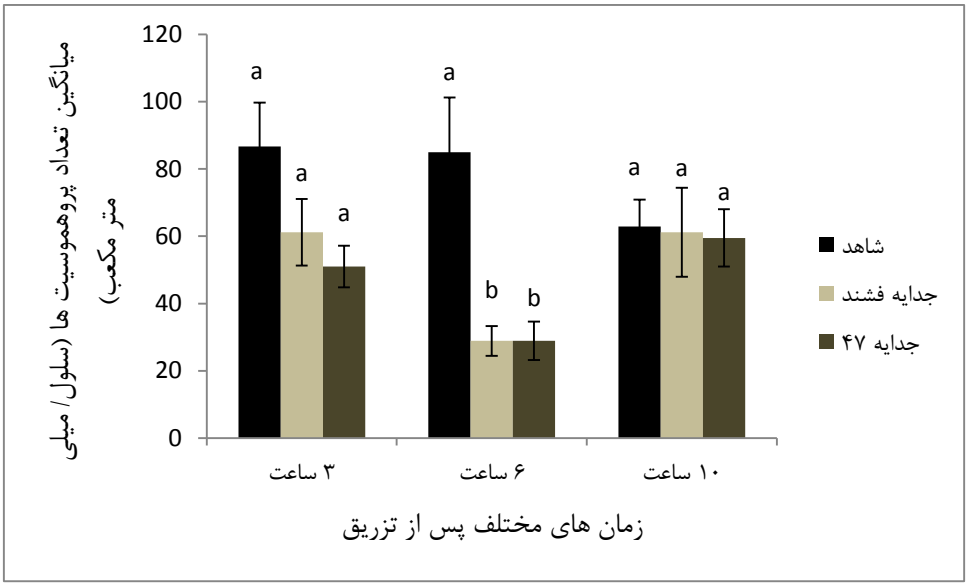


شکل ۴-۱۷- تاثیر دو جدایه ی فشند و ۴۷ از قارچ *B. bassiana* بر تعداد گرانولوسیت‌های *P. operculella*



شکل ۴-۱۸- تاثیر دو جدایه ی فشند و ۴۷ از قارچ *B. bassiana* بر تعداد پلاسموتوسیت‌های *P. operculella*

در زمان ۶ ساعت پس از تزریق هر دو جدایه، پروهموسیت‌ها (F = ۹/۹۸ ، df = ۲ ، P ≤۰/۰۰۰۶) کاهش معنی داری نسبت به شاهد داشتند. اما ۱۰ ساعت پس از تزریق هر دو جدایه هیچ اختلاف معنی‌داری در تراکم سلول‌های خونی نسبت به شاهد مشاهده نشد (شکل ۴-۱۹).



شکل ۴-۱۹- تاثیر دو جدایه ی فشند و ۴۷ از قارچ *B. bassiana* بر تعداد پروهموسیت‌های *P. operculella*

نتایج دیگر محققان نیز مؤید تأثیر معنی‌دار عامل بیگانه بر فراوانی سلول‌های خونی بوده است. این تغییر در همان ساعات اولیه ورود آلودگی به همولنف رخ می‌دهد. به طور مثال، خسروی و همکاران (۲۰۱۴)، اثر اسپورهای *B. bassiana* (Bals.-Criv) را بر عملکرد سیستم ایمنی لاروهای پروانه برگ-خوار توت *Glyphodes pyloalis* Walker بررسی کردند. شمارش کل و تفرقی سلول‌های خونی نشان داد که آلودگی توسط *B. bassiana* موجب تغییرات قابل توجهی در تعداد سلول‌های خونی شده است. در ابتدای آزمایش و پس از آلودگی با قارچ تعداد کل سلول‌های خونی افزایش یافته اما پس از ۱۲ و ۲۴ ساعت کاهش یافت. بنابراین با پیشرفت آلودگی تعداد کل سلول‌های خونی و به خصوص گرانولوسیت‌ها بطور قابل توجهی کاهش یافتند. کاهش مشابه در تعداد سلول‌های خونی در گردش خون آلوده به قارچ *B. bassiana* لاروهای *Spodoptera exigua* نیز مشاهده شد (هانگ[1] و بوسیاس، ۱۹۹۲). زیبایی و ملاگلی (۲۰۱۴)، واکنش‌های ایمنی کرم ساقه خوار نواری برنج *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera:Crambidae) را در برابر تعدادی از قارچ‌های بیماری‌زای

1. Hung

حشرات شامل ایزوله‌های BB1، BB2 و BB3 از *B. bassiana*، *M. anisopliae*، *I. fumosoroseus* و *Lecanicilium lecanii* بررسی کردند. نتایج نشان داد که بیش‌ترین تعداد کل سلول‌های خونی، سه ساعت پس از تزریق ایزوله‌های *B. bassiana* و شش ساعت پس از تزریق دیگر تیمارها بدست آمد. بیش‌ترین تعداد پلاسموتوسیت‌ها، سه ساعت پس از تزریق ایزوله ی BB1 حاصل شد. در حالی که دو ایزوله ی دیگر از *B. bassiana* و دیگر قارچ‌های بیماری زای حشرات، سبب افزایش پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در شش ساعت پس از تزریق شدند. عجم حسنی (۱۳۹۳b)، در بررسی واکنش‌های ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم *S. litura* علیه دو جدایه از قارچ *B. bassiana* و ذرات سنتزی لاتکس بید، نشان داد که در زمان‌های سه و شش ساعت پس از تزریق، تعداد کل سلول‌ها، تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نسبت به شاهد به طور معنی‌داری بالاتر بود. فعالیت آنزیم فنل-اکسیداز نیز اندازه گیری شد و نشان داد که بالاترین فعالیت این آنزیم در زمان‌های سه و شش ساعت پس از تزریق تیمارها بود. در انتها سلول‌های خونی این حشره در مقابله با عامل بیگانه‌ای چون اسپور قارچ و ذرات سنتزی لاتکس بید، فعالیت مثبتی از خود نشان داده و با تشکیل گره اطراف اسپورها، توانستند آن‌ها را از بین ببرند. همچنین عجم حسنی (۱۳۹۳a)، در بررسی دیگر روی واکنش ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم پروانه *U. pulchella*، در برابر دو جدایه از قارچ *B. bassiana* (Bals.-Criv) و یک جدایه از قارچ *I. farinosae* نشان داد که در زمان‌های سه و شش ساعت پس از تزریق، تعداد کل سلول‌ها، تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نسبت به شاهد به طور معنی‌داری بالاتر بود. همچنین فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز اندازه گیری شد و نشان داد که این پارامتر با تعداد سلول‌های خونی در زمان‌های مختلف ارتباط مستقیم داشت. بالاترین فعالیت این آنزیم سه و شش ساعت پس از تزریق بود. در نهایت مشخص شد که این حشره نیز از سیستم ایمنی مناسبی در مقابل عوامل مهاجم برخوردار است. عجم حسنی (۱۳۹۲)، در بررسی پاسخ‌های دفاع سلولی سوسک سرشاخه‌خوار رزاسه

Osphranteria coerulescens Redtenbacher نسبت به قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *I. farinosae*، مشاهده کرد که تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی حشره نسبت به هر دو قارچ، سه ساعت پس از تزریق نسبت به شاهد افزایش یافت. در حشرات تیمار شده با جدایه‌های Fashand و Ir-K40 تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در سه ساعت پس از تزریق حداکثر بود و به تدریج در زمان‌های بعدی کاهش یافت. همچنین در تیمار 1872 c، تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در شش و ۱۲ ساعت پس از تزریق حداکثر بود. همچنین در این بررسی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لاروهای تیمار شده با جدایه‌های Fashand و Ir-K40 پس از سه ساعت و در حشرات تیمار شده با جدایه 1872 c پس از شش و۱۲ ساعت افزایش معنی‌داری نشان داد. کهن و جلالی سندی (۲۰۱۳)، پاسخ ایمنی سوسک برگ‌خوار نارون *X. luteola* را در برابر قارچ *B. bassiana* و دز زیر کشنده اسانس درمنه *Artemisia annua* در ساعات مختلف (۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴) پس از تزریق قارچ در آزمایشگاه مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که تعداد پلاسموتوسیت‌ها ۲۴-۳ ساعت پس از تزریق قارچ به طور معنی داری نسبت به شاهد کاهش یافت. تعداد گرانولوسیت‌ها نیز ۲۴-۱ ساعت پس از تیمار به تدریج کاهش یافت. همچنین پس از تزریق اسانس *A. annua*، تعداد کل سلول‌های خونی در ۱۲ ساعت پس از تیمار کاهش معنی داری داشت. تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نیز در مقایسه با شاهد کاهش یافت. اما این روند کاهش در پلاسموتوسیت‌ها بیشتر بود. عجم حسنی و همکاران (۲۰۱۳)، در بررسی پاسخ ایمنی پروانه برگخوار سفید آمریکایی *H. cunea* در برابر چهار ایزوله از قارچ بیماری‌زای حشرات به نام *B. bassiana*، و یک ایزوله از *I. farinosae*، گزارش کردند که ۶ ساعت پس از تزریق اسپورهای قارچ بیمارگر در همه جدایه‌ها، تعداد کل سلول‌های خونی و تعداد ایمنوسیت‌های در گردش خون به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت. میرحق پرست و همکاران (۲۰۱۳)، در مطالعه ای اسپور قارچ‌های *B.*

bassiana و *M. anisopliae* را به سن پنجم لاروی *Spodoptera littoralis* Boisduval تزریق کردند و اثرات آن‌ها را بر ایمنی سلولی و آنزیم‌های مشارکت کننده در متابولیسم تعیین کردند. بیش‌ترین تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در ۶ ساعت پس از تزریق برای هر دو قارچ بیماری زای حشرات مشاهده شد. همچنین با اندازه گیری میزان فعالیت فنل‌اکسیداز مشخص شد که بیش‌ترین فعالیت این آنزیم در زمان ۶ تا ۱۲ ساعت پس از تزریق اسپور قارچ *B. bassiana* و پس از ۱۲ ساعت از تزریق اسپور قارچ *M. anisopliae* بدست آمد. زیبایی و همکاران (۲۰۱۱)، واکنش ایمنی سن گندم *E. integriceps* را در برابر قارچ *B. bassiana* با افزایش معنی‌دار تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی حشره پس از ۳ ساعت گزارش کردند. انگرینی و همکاران (۲۰۱۱)، دفاع سلولی ملخ *O. japonica* را نسبت به قارچ بیماری‌زای حشرات *M.anisopliae* بررسی کردند و گزارش کردند که تعداد کل سلول‌های خونی پس از تیمار با غلظت های مختلف قارچ نسبت به شاهد کاهش معنی داری نشان می‌دهد. جلالی سندی و زیبایی (۱۳۸۹)، در بررسی اثر هورمون جوانی I بر روی سلول‌های خونی پروانه سفید اشجار *H. cunea* و پروانه برگخوار توت *G. pyloalis* مشاهده کردند که این هورمون ضمن ایجاد تغییرات ساختاری در دو سلول مهم یعنی پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها کاهش معنی‌داری در تعداد آن‌ها نسبت به شاهد ایجاد می‌کند (جلالی سندی و زیبایی، ۱۳۸۹). اریکسون[1] و همکاران (۲۰۰۹)، کاهش در تعداد سلول‌های خونی را پس از قرار دادن پروانه کرم حلقه‌ای کلم *Trichoplusia ni* در معرض دزهای کم *Bacillus thuringiensis* (Btk) و پس از تزریق *E. coli* گزارش دادند. بورگس و همکاران (۲۰۰۸)، اظهار کردند که واکنش دفاع سلولی سن خون‌خوار *R. prolixus* در مقابل باکتری *E. coli* با افزایش تعداد سلول‌های خونی و تغییرات مورفولوژیکی شدید این سلول‌ها همراه بود که در نهایت منجر به غالب شدن سیستم ایمنی حشره بر این باکتری گردید.

1. Ericsson

بندانی (۲۰۰۵)، مشاهده کرد که تعداد کل سلول‌های خونی *G. melonella* در مقایسه با شاهد پس از آلودگی با قارچ بیماری‌زای حشرات *Tolypocladium cylindrosporum* کاهش می‌یابد. سِوِفای و هاشم[1] (۲۰۰۱)، اثر قارچ *M. anisopliae* را روی پاسخ ایمنی سلولی *G. mellonella* بررسی کردند و گزارش کردند که تعداد کل سلول‌های خونی پس از تیمار با قارچ نسبت به شاهد افزایش معنی داری نشان می‌دهد.گیلسپی و همکاران (۲۰۰۰)، واکنش ایمنی سلولی ملخ صحرایی *S. gregaria* در مقابل قارچ *M. anisopliae* بررسی کردند. نتایج نشان داد که تعداد کل سلول‌های خونی ملخ‌های تیمار شده با قارچ نسبت به شاهد افزایش معنی داری نشان می‌دهد. دآزامبیوجا[2] و همکاران (۱۹۹۱)، افزایش شدید در تعداد کل سلول‌های خونی *R. prolixus* پس از آلوده سازی توسط *Enterobacter cloacae* گزارش دادند. هروهوو و دان (۱۹۸۲)، طی آزمایشی به لارو کرم شاخدار توتون *M. sexta*، باکتری *Pseudomonas aeruginosa* تزریق کردند و گزارش کردند که تعداد سلول‌های خونی به خصوص یک ساعت پس از تزریق نسبت به شاهد افزایش می‌یابد (هروهوو و دان، ۱۹۸۲). جانسون[3] و همکاران (۱۹۸۱)، پس از تیمار توسط باکتری، کاهش در تعداد سلول‌های خونی را گزارش دادند. طبق مطالعات متعددی که محققین گزارش داده اند، تعداد سلول‌های خونی درگیر در پاسخ ایمنی نسبت به پاتوژن‌های مختلف دارای نوسانات زیادی است (بیدچکا[4] و خاچاتوریانس، ۱۹۸۷؛ هانگ و بوسیاس، ۱۹۹۲؛ سوفای و هاشم، ۲۰۰۱؛ چوونک[5] و همکاران، ۲۰۰۹؛ انگرینی و همکاران، ۲۰۱۱؛ زیبایی و همکاران، ۲۰۱۱). این نوسانات در تعداد سلول‌های خونی را می‌توان به برخی عوامل مانند مداخله ی احتمالی سلول‌های خونی در فرایند تشکیل گره پس از تزریق، اثر سیتوتوکسی متابولیت ثانویه قارچی بر روی سلول‌های خونی و آسیب غشا به علت ترکیب سطح اسپور (عمدتاً پروتئین‌های

1. Sewify & Hashem
2. De Azambuja
3. Johnson
4. Bidochka
5. Chouvenc

آبگریز) نسبت داد. همچنین اختلاف در تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها پس از تزریق توسط *B. bassiana* می‌تواند به خواص مختلف اسپور قارچی و توانایی آن‌ها در تولید متابولیت های ثانویه و ترکیب سطح اسپور نسبت داده شود (میرحق پرست و همکاران، ۲۰۱۳). روزنبرگر و جونز (۱۹۶۰) گزارش دادند که حضور پاتوژن در همولنف می‌تواند پاسخ ایمنی حشره را فعال کند و سبب تغییر در تعداد کل سلول‌های خونی شود. برخی از نویسندگان گزارش دادند که حضور پاتوژن در همولنف موجب کاهش تعداد سلول‌های خونی در گردش خون می‌شود (راتکلیف و همکاران، ۱۹۸۵؛ مورتون[1] و همکاران، ۱۹۸۷؛ ریورز[2] و همکاران، ۲۰۰۲). ریچاردز و ادواردز[3] (۱۹۹۹)، افزایش تعداد سلول‌های خونی را توسط تحریک هموسیت‌زایی پس از ورود عامل بیگانه گزارش کردند. عده ای از محققین کاهش تعداد کل سلول‌های خونی را پس از ورود عامل بیگانه گزارش کردند (کهن و جلالی سندی، ۲۰۱۳؛ الفتریانوس و همکاران، ۲۰۰۸؛ گیگلیو و همکاران، ۲۰۰۸؛ اریکسون و همکاران، ۲۰۰۹؛ آندرید و همکاران، ۲۰۱۰؛ انگرینی و همکاران، ۲۰۱۱؛ ماناچینی و همکاران، ۲۰۱۱). مثلا کهن و جلالی سندی (۲۰۱۳)، پیشنهاد دادند که کاهش تعداد کل سلول‌های خونی سوسک برگ‌خوار نارون *X. luteola* ممکن است به دلیل فعال شدن پاسخ‌های ایمنی و یا به علت دفاع سلول‌های خونی علیه پاتوژن یا اسانس باشد. طبق نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر، افزایش مشاهده شده در شمارش کل سلول‌های خونی به افزایش هر دو نوع ایمنوسیت یعنی گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها بستگی دارد، که مشارکت و مداخله ایمنی سلولی را نسبت به اسپورهای قارچی تزریق شده، نشان می‌دهد. کاهش تعداد کل سلول‌های خونی در پایان آزمایش ناشی از کاهش هر دو جمعیت گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها است. این کاهش می‌تواند به علت آلودگی سلول‌ها (چین و اندرسون[4]، ۱۹۸۳؛

1. Morton
2. Rivers
3. Richards & Edwards
4. Chain & Anderson

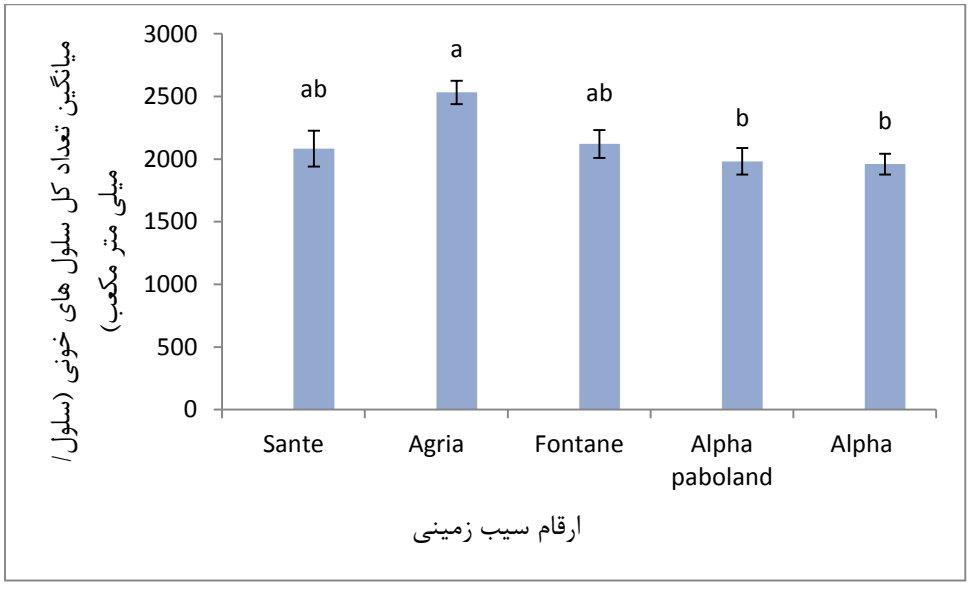
گیلسپی و همکاران، ۲۰۰۰؛ گونارسون[1]، ۱۹۸۸)، یا دفاع سلول‌ها (والترز[2] و راتکلیف، ۱۹۸۳؛ توجو و همکاران، ۲۰۰۰؛ سالت[3]، ۱۹۷۰) و یا به علت تعلل در فرایند بیگانه‌خواری (ویلسینسکاس[4] و همکاران، ۱۹۹۷) باشد. این نتایج با یافته‌های زیبایی و ملاگلی (۲۰۱۴) روی واکنش‌های ایمنی کرم ساقه خوار نواری برنج *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera:Crambidae) در برابر چندین قارچ بیماری‌زای حشرات مطابقت دارد. چرا که در نتایج آن‌ها نیز کاهش تعداد کل سلول‌های خونی، گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در پایان آزمایش گزارش شد. مازت[5] و همکاران (۱۹۹۴)، گزارش کردند که *B. bassiana* متابولیت‌های سمی تولید می‌کند، بنابراین آلودگی کرم برگ خوار چغندر *S. exigua* به این قارچ، سبب کاهش فعالیت سلول‌های خونی لارو می‌شود. دستروکسین[6] ترکیبی تولید شده از قارچ *M. anisopliae* است که در برابر سلول‌های خونی لارو شاخدار توتون *M. sexta* سمی است و آن‌ها را از بین می‌برد (ساموئلز[7] و همکاران، ۱۹۸۸؛ هاکسام[8] و همکاران، ۱۹۸۹). همچنین زهرابه‌های دستروکسین A و E و سایتوکالازین که توسط قارچ *M. anisopliae* هنگام ایجاد عفونت در حشرات ترشح می‌شوند، قادرند روی مرفولوژی و اسکلت سلولی سلول‌های خونی شب پره *G. mellonella* تاثیر گذاشته و آن‌ها را تغییر دهند (ویلسینسکاس و همکاران، ۱۹۹۷). زیبایی و همکاران (۲۰۱۱)، نشان دادند که متابولیت‌های ثانویه قارچی از فعالیت بیگانه‌خواری سلول‌های خونی *E. integriceps* جلوگیری می‌کند و مانع تشکیل گره‌ها می‌شود. زیبایی و ملاگلی (۲۰۱۴)، برای بررسی علت احتمالی کاهش سلول‌های خونی اثرات عصاره‌های قارچی را در شکل گیری گره‌ها محاسبه کردند و مشاهده کردند که عصاره‌های قارچی گره‌زایی را در لاروهای *C.suppressalis*

1. Gunnarsson
2. Walters
3. Salt
4. Vilcinskas
5. Mazet
6. Destruxins
7. Samuels
8. Huxham

تحریک می‌کند و بیشترین تعداد گره در شش و ۱۲ ساعت پس از تزریق همراه با افزایش سلول‌های خونی در گردش خون می‌باشد. آن‌ها پیشنهاد دادند که کاهش سلول‌های خونی ممکن است ترجیحاً ناشی از اثر سمی جدایه‌های قارچی باشد.

۴-۶- بررسی اثر پنج رقم مختلف سیب زمینی بر سامانه ایمنی بید سیب زمینی

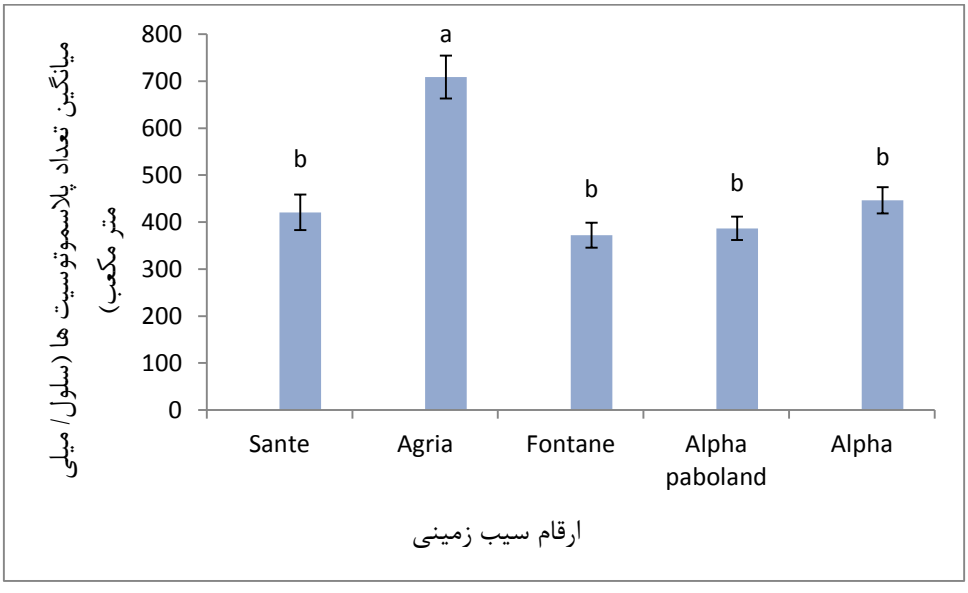
نتایج نشان داد که نوع رژیم مورد تغذیه بر تعداد سلول های خونی لاروهای سن چهارم بید سیب-زمینی موثر است. بیش‌ترین تعداد کل سلول های خونی (F = ۴/۴۷ ، df = ۴ ، P ≤۰/۰۰۲۴)، مربوط به رقم اگریا با میانگین ۹۴± ۲۵۳۲/۲ عدد در میلی متر مکعب همولنف بود (شکل ۴-۲۰).



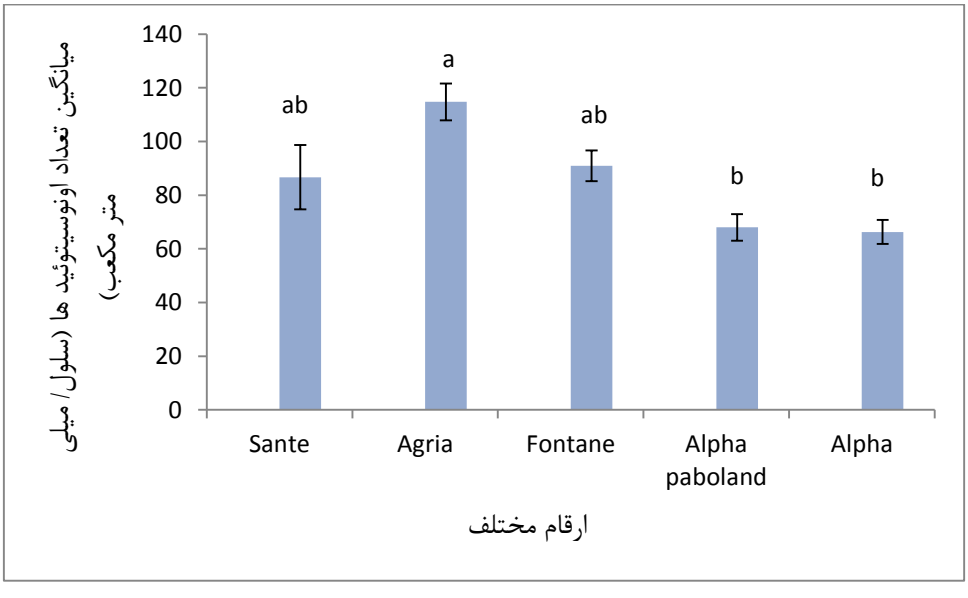
شکل ۴-۲۰- تاثیر ارقام مختلف سیب زمینی بر تعداد کل سلول های خونی بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

تعداد کل سلول‌های خونی در لاروهای تغذیه کرده از چهار رقم فونتانه، سانته، آلفا پابلند و آلفا به ترتیب برابر با ۱۱۱/۷۶ ±۲۱۲۰/۸، ۱۴۳/۶۵±۲۰۸۳/۴، ۱۰۵/۶۸± ۱۹۸۲/۲ و ۸۲/۵۸± ۱۹۶۰/۱ عدد در میلی‌متر مکعب همولنف بود (شکل ۴-۲۰). بیش‌ترین تعداد کل پلاسموتوسیت‌ها (P ≤ ۰/۰۰۰۱،

۴ = df ، ۱۷/۱۲ = F) (شکل ۴-۲۱) و اونوسیتوئیدها (۰/۰۰۰۱ ≥ P، ۴ = df ، ۷/۲۹ = F) (شکل ۴-۲۲) مربوط به لاروهایی بود که از رقم اگریا تغذیه کردند.

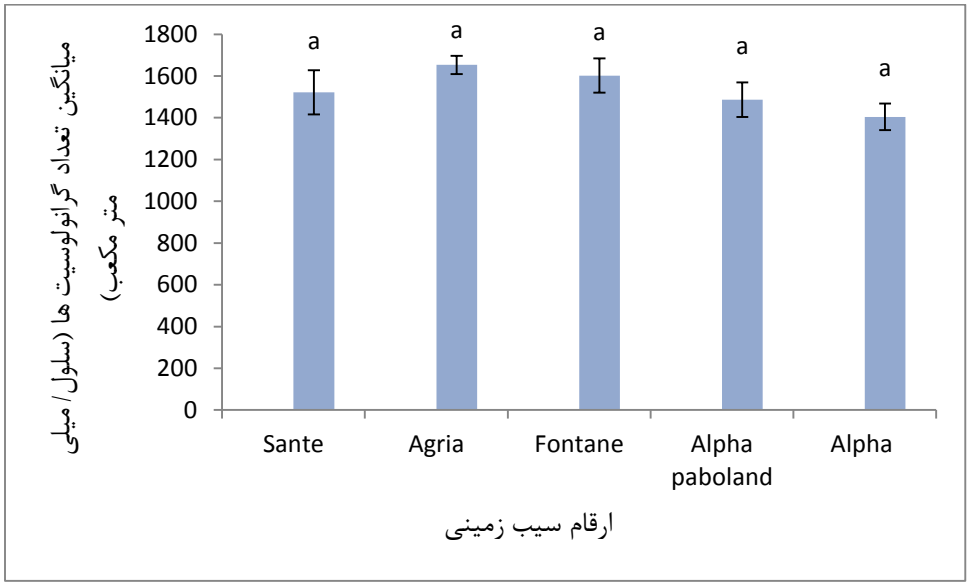


شکل ۴-۲۱- تاثیر ارقام مختلف سیب زمینی بر تعداد پلاسموتوسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

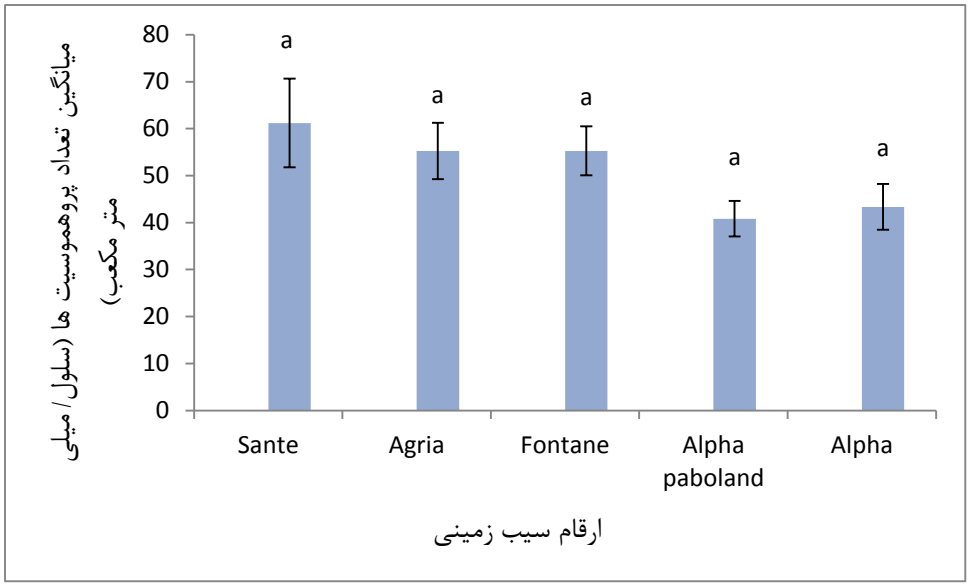


شکل ۴-۲۲- تاثیر ارقام مختلف سیب زمینی بر تعداد اونوسیتوئیدهای بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

بر اساس مشاهدات، نوع تغذیه بر تعداد گرانولوسیت‌ها (P ≤ ۰/۱۹۷، df = ۴ ، F = ۱/۵۴) (شکل ۴-۲۳) و پروهموسیت‌ها (P ≤ ۰/۱۰۲۴، df = ۴ ، F = ۱/۹۹) (شکل ۴-۲۴) در لاروهای تغذیه کرده از تیمارهای مختلف تأثیر معنی‌داری نداشت.



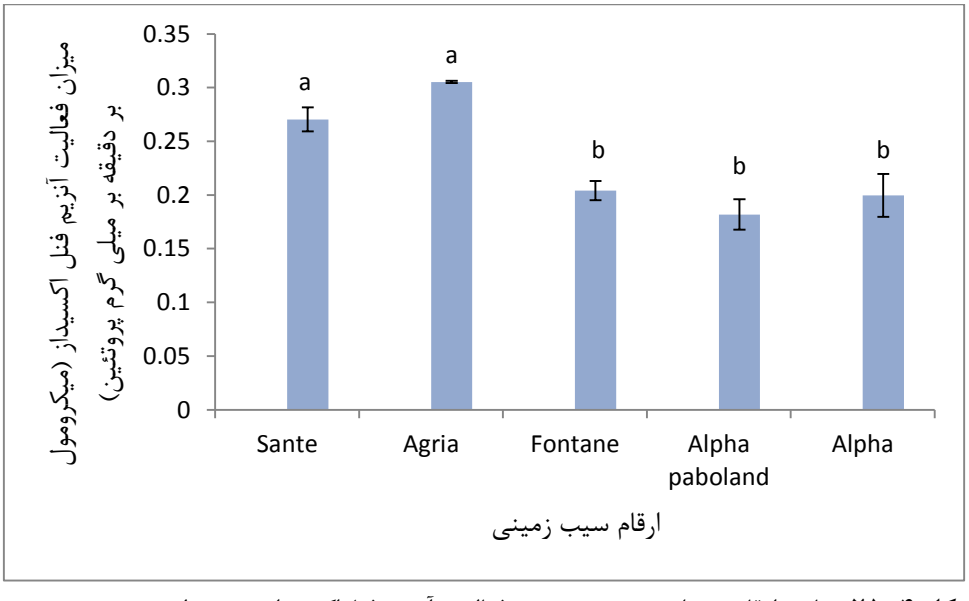
شکل ۴-۲۳- تاثیر ارقام مختلف سیب زمینی بر تعداد گرانولوسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)



شکل ۴-۲۴- تاثیر ارقام مختلف سیب زمینی بر تعداد پروهموسیت‌های بید سیب زمینی (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)

۴-۷- اثر مختلف پنج رقم مختلف سیب زمینی بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در همولنف بید سیب‌زمینی

نتایج نشان داد که نوع رژیم غذایی (که در این آزمایش از ارقام مختلف سیب‌زمینی استفاده شد)، می‌تواند بر میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز موثر باشد. بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لاروهای تغذیه کرده از رقم اگریا با میانگین ۰/۳۰۵±۰/۰۰۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود که به طور معنی‌داری از ارقام فونتانه، آلفا و آلفا پا بلند بیش‌تر بود (P ≤۰/۰۰۰۲ ، df = ۴ ، F = ۱۷/۳۴). میزان فعالیت این آنزیم در لاروهای تغذیه کرده از چهار رقم سانته، فونتانه، آلفا و آلفا پا بلند به ترتیب برابر با ۰/۲۷۰ ±۰/۰۱۱، ۰/۲۰۴±۰/۰۰۸، ۰/۱۹۹ ±۰/۰۱۹ و ۰/۱۸۱ ±۰/۰۱۴ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین بود (شکل ۴-۲۵).



شکل ۴-۲۵- تاثیر ارقام مختلف سیب‌زمینی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف بید سیب‌زمینی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نوع رژیم مورد تغذیه بر سامانه ایمنی لاروهای بید سیب‌زمینی تأثیر گذار است. در این تحقیق برای بررسی رژیم‌های غذایی از ۵ رقم مختلف سیب‌زمینی استفاده شد و

مشخص شد که بیش‌ترین تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها مربوط به لاروهای تغذیه کرده از رقم اگریا بود و کم‌ترین تعداد کل سلول‌های خونی، گرانولوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها مربوط به لاروهای تغذیه کرده از رقم آلفا بدست آمد. همچنین بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لاروهای تغذیه کرده از رقم اگریا بدست آمد که به طور معنی داری از سایر ارقام سیب زمینی بیش‌تر بود. از آن‌جا که لاروهای بید سیب زمینی به منبع غذایی غنی از کربوهیدارت به عنوان منبع انرژی برای تحرک و تخم‌ریزی نیاز دارند، بنابراین رژیم‌های غذایی مختلف و کیفیت غذایی میزبان تأثیر فاحشی بر این پارامترها در حشره می‌گذارد (وینکلر[1] و همکاران، ۲۰۰۵). در منابع مختلف رقم اگریا نسبت به دیگر ارقام به عنوان رقمی مقاوم برای مدیریت آفات شناخته شده است و سبب کاهش نرخ ذاتی افزایش جمعیت بید سیب زمینی شده است (گلی زاده و رزمجو، ۲۰۱۰)، می‌توان چنین استنباط کرد که لاروهای تحت آزمایش با تغذیه از این رقم نسبت به سایر ارقام، ایمنی خود را بالاتر برده، چنان‌که تعداد سلول‌های خونی بیش‌تر و فعالیت بالاتر آنزیم فنل‌اکسیداز در این لاروها، افزایش قدرت ایمنی آن‌ها را توجیه می‌کند. از طرفی، گزارش شده است که ارقام مقاوم از جمله اگریا به لحاظ منابع کربوهیدراتی قابل هضم، غنی‌تر از سایر ارقام بوده ولی با توجه به مقادیر بالای نشاسته خشک و از طرفی پایین بودن مقادیر پروتئین محلول آن، این رقم می‌تواند در طولانی مدت به عنوان یک عامل محدود کننده‌ی رشد و نمو لاروها عمل می‌کند (داس[2] و همکاران، ۱۹۹۳). بنابراین هر چند که این رقم توانسته است سبب تغذیه بیش‌تر لاروها و در نتیجه افزایش حجم همولنف سلول‌های خونی و نیز افزایش فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در مدت ۲۴ ساعت شود، با این حال تحقیقات بیش‌تری برای پی بردن به چگونگی اثرات طولانی مدت این رقم مقاوم روی سامانه ایمنی بید سیب زمینی مورد نیاز است. ابراهیمی و عجم حسنی (۲۰۱۷)، در بررسی تأثیر رژیم‌های غذایی

1. Winkler
2. Das

مختلف شامل نخود وکشمش، گردو، پسته و غذای مصنوعی روی سامانه ایمنی شب پره هندی، نشان دادند که بیش‌ترین تعداد کل سلول‌های خونی و تعداد پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها مربوط به لاروهای تغذیه کرده از رژیم غذایی نخودوکشمش بود. به عبارتی رژیم‌های غذایی غنی‌تر از لحاظ ترکیبات هیدروکربن‌ها تا حدود زیادی در تعداد سلول‌های خونی و در پی آن ایمنی حشره تأثیر معنی‌داری دارند. تحقیق حاضر نیز با یافته‌های ابراهیمی و عجم حسنی (۲۰۱۷)، مطابقت دارد. چرا که تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدهای لاروهای تغذیه کرده از رقم غنی از کربوهیدرات اگریا به طور معنی‌داری نسبت به سایر ارقام بالاتر بود. آدامو[1] و همکاران (۲۰۱۶) در طی تحقیقات خود دریافتند که محدودیت‌های غذایی سبب کاهش ذخایر انرژی بلند مدت مانند چربی‌ها و کوتاه مدت مانند قندها در پروانه کرم شاخدار تنباکو *M. sexta* می‌شود. محدودیت غذایی همچنین منجر به تغییر بیان ژن‌های ایمنی، تغییر فعالیت آنزیم‌های مهم ایمنی، کاهش غلظت آنتی اکسیدان-های مهم مانند گلوتاتیون، کاهش مقاومت در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شد. اما به نظر می‌رسد اثر کم‌تری روی مقاومت به قارچ بگذارد. همچنین در لاروهایی که از تغذیه محروم بودند، آستانه فعال سازی برخی از واکنش‌های ایمنی مانند فنل‌اکسیداز کاهش یافت. در تحقیقی دیگر، ووگل‌ویس و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی عملکرد سیستم ایمنی شب‌پره *E.ambiguella*، نشان دادند که درصد عصاره‌ی انگور در رژیم‌های غذایی، سبب تغییرات عملکرد سیستم ایمنی این حشره شده است و این موضوع بیانگر این است که تنوع در دفاع ایمنی لاروهای تغذیه کرده از واریته های مختلف انگور، در نتیجه‌ی اختلاف ترکیبات مغذی در گیاهان میزبان می‌باشد. بنابراین لاروهایی که از انگورهای غنی از قند، تغذیه کردند، ایمنی قوی‌تری در برابر پاتوژن‌های مختلف از خود نشان دادند. بانویل و همکاران (۲۰۱۲)، در بررسی اثر محرومیت غذایی لاروهای *G. mellonella* در برابر آلودگی

1. Adamo

با *C. albicans* نشان دادند که تعداد سلول‌های خونی این لاروها در مقایسه با لاروهای شاهد کم‌تر بود؛ اما سلول‌های خونی این لاروها همانند لاروهای شاهد همان توانایی لازم برای کشتن سلول‌های مخمر *C. albicans* را داشتند. اگر چه محرومیت لاروهای *G. mellonella* از غذا منجر به کاهش پاسخ‌های سلولی و ایمنی و افزایش حساسیت نسبت به آلودگی شد. بانویل و همکاران (۲۰۱۲)، همچنین گزارش کردند که فقدان و یا کمبود مواد غذایی بر میزان متابولیسم تأثیرگذار است و در نتیجه باعث کاهش تنظیم عملکرد سیستم ایمنی می‌شود. تریگس و نل[1] (۲۰۱۲)، اثر فاکتورهای محیطی شامل دما، کیفیت رژیم غذایی و تراکم جمعیت با وضعیت ایمنی *P.interpunctella* را بررسی کردند. نتایج نشان داد که کیفیت رژیم غذایی بیش‌ترین اثر را روی واکنش‌های ایمنی لاروهای شب‌پره‌ی هندی داشت، لاروهای پرورش یافته روی رژیم غذایی با کیفیت خوب، بدون مد نظر قرار دادن شرایط دمایی یا تراکم جمعیت، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز، بیش‌ترین تعداد سلول‌های خونی و بیش‌ترین وزن را به خود اختصاص دادند. همچنین در تیمارهای حرارت ندیده تراکم بالای جمعیتی اثر کمی بر وزن حشرات داشت در حالیکه در تیمارهای حرارت دیده، افزایش تراکم جمعیت اثر منفی بر وزن حشرات داشت. در مطالعه آلوکس و همکاران (۲۰۱۰)، روی تاثیر رژیم‌های غذایی بر سیستم ایمنی زنبور عسل مشخص شد که غلظت سلول‌های خونی در زنبورهای تغذیه کرده از رژیم‌های غذایی سرشار از پروتئین، نسبت به زنبورهای شاهد بیش‌تر بود و این زنبورها از مقاومت خوبی در برابر بیماری‌ها برخوردارند. همچنین زنبورهای تغذیه کرده از منابع پروتئینی دارای فراوانی بیش‌تری در تعداد سلول‌های گرانولوسیت و پلاسموتوسیت نسبت به دیگر زنبورها بودند. لی[2] و همکاران (۲۰۰۸)، با بررسی اثر کیفیت پروتئین مورد تغذیه بر واکنش‌های ایمنی پروانه-ی برگ‌خوار *Spodoptera litturalis* (Biosduval)، مشاهده کردند، لاروهایی که از رژیم غذایی

1. Triggs & Knell
2. Lee

پروتئین های با کیفیت بالا تغذیه کردند، دارای بقا و رشد بیش‌تر، میزان فعالیت بیش‌تر آنزیم فنل-اکسیداز و پروتئین خون بالاتر نسبت به لاروهای پرورش یافته با پروتئین‌های بی‌کیفیت بودند. لی و همکاران (۲۰۰۶)، همچنین گزارش دادند لاروهای پروانه‌ی برگ‌خوار *S. litturalis*، که از رژیم‌های غذایی با پروتئین کم تغذیه کردند، دارای مقاومت کم‌تری در برابر حمله ویروس‌ها نسبت به لاروهایی که از رژیم‌های غذایی با کیفیت پروتئینی بالا تغذیه کردند؛ بودند. این لاروها توانستند با انتخاب رژیم غذایی حاوی پروتئین بالا در هنگام ابتلا به آلودگی خود را محفوظ نگه دارند. در لاروهای پروانه کرم ابریشم مشاهده شده است که تغذیه حشره از رژیم غذایی کم کالری، منجر به کاهش بیان آریل‌فورین و لیپوفورین[1] می‌شود (لی و همکاران، ۲۰۰۹). در مقابل محرومیت شپشه آرد *Tribolium castaneum* Herbst از مواد غذایی، سبب افزایش بیان ریز RNA های اختصاصی شده است (فریتاک[2] و همکاران، ۲۰۱۲) که این امر بیانگر واکنش‌های مختلف حشرات نسبت به رژیم‌های غذایی مختلف می‌باشد. همچنین محرومیت غذایی کوتاه مدت (شش ساعت) در مگس سرکه سبب افزایش رونویسی ژن پپتیدهای ضد میکروبی حتی در صورت فقدان پاتوژن‌ها می‌شود (بیکر[3] و همکاران، ۲۰۱۰).

1. Lipophorin
2. Freitak
3. Becker

۴-۸- نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اینکه تاکنون اطلاعاتی در مورد شناسایی سلول‌های خونی بید سیب‌زمینی، فراوانی آن‌ها در مراحل مختلف رشدی این حشره و واکنش آن‌ها نسبت به عوامل بیمارگر مهاجم، تنش دما و نوع تغذیه ثبت نشده است، در این تحقیق ویژگی‌های شکل شناسی سلول‌های خونی حشره *P. operculella* و تغییر در تعداد سلول‌های خونی در طول آزمایشات مختلف از قبیل تأثیر تنش‌های دمایی، اثر دو جدایه از قارچ بیمارگر حشرات، اثر ارقام مختلف و همچنین میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز بررسی شد. یافته‌های ما تاثیر معنی‌دار تیمارهای فوق را روی تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی بید سیب زمینی تأیید کرد. چنانکه تغییرات در تعداد سلول‌های خونی لاروهای تیمار شده با دماهای تنش‌زا، نسبت به لاروهایی که در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند، کاملاً محسوس بود. به طوری که دمای چهار درجه سانتی‌گراد سبب کاهش معنی‌دار در تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها و همچنین کوچک شدن سلول‌های خونی شد. به علاوه آنزیم فنل-اکسیداز به عنوان یک فاکتور بسیار مهم در فرایندهای دفاع، زمانی که غده‌های آلوده به لارو در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داشتند؛ کاهش چشمگیر فعالیتی داشت که این موضوع می‌تواند مؤید ضعف ایمنی حشره در دماهای پایین باشد. با توجه به این نتایج و خسارت بالای این آفت در انبارهای فاقد سیستم خنک کننده، دماهای پایین می‌تواند از طریق کاهش میزان رشد حشره و پایین آوردن فعالیت سیستم ایمنی آن در کنترل و مدیریت این حشره، موفق عمل کند. اثرات ارقام مختلف سیب زمینی بر سامانه ایمنی بید سیب زمینی نشان از افزایش معنی‌دار کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها در لاروهای تغذیه کرده از رقم اگریا نسبت به سایر ارقام داشت. از آن‌جا که این رقم مقاوم حاوی منبع غنی از هیدروکربن‌ها می‌باشد، می‌توان این افزایش در تعداد سلول‌ها را توجیه کرد و از طرفی مقادیر بالای نشاسته خشک و بالعکس مقادیر پایین پروتئین محلول

این رقم، در دراز مدت می‌تواند اثر بازدارندگی بر تغذیه حشره داشته و ضعیف شدن سیستم ایمنی حشره در نتیجه متوقف شدن رشد و نمو لاروها را به همراه داشته باشد. بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که این رقم نسبت به سایر ارقام، در برنامه مدیریت تلفیقی آفات بهتر عمل کند. اثر دو جدایه قارچ بیمارگر حشرات شامل Fashand و 47 در برابر بید سیب زمینی سبب فعال شدن پاسخ ایمنی این حشره شد. به عبارت دیگر افزایش معنی‌دار تعداد کل سلول‌های خونی، گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در لاروهای تیمار شده با هر دو جدایه قارچ نسبت به لاروهای شاهد، سه ساعت پس از تزریق قارچ معنی‌دار بود. در واقع، پاسخ ایمنی سلولی در ساعات اولیه ورود عامل بیگانه به همولنف رخ می‌دهد و به تدریج با گذشت زمان تا ۲۴ ساعت، این واکنش کاهش می‌یابد و ایمنی هیومرال فعال می‌شود. به نظر می‌رسد مطالعات بعدی در زمینه پاسخ‌های ایمنی این حشره به عوامل مهاجم بیگانه، بتواند سامانه ایمنی این آفت را نسبت به آن‌ها بهتر معرفی نماید. هر چند که برای درک بیشتر ویژگی‌های ایمنی شناسی این حشره آزمایشات تکمیلی بیش‌تری مورد نیاز است. در پایان، با توجه به اهمیت اقتصادی بید سیب‌زمینی و لزوم کنترل آن، شناخت ویژگی‌های سلول‌های خونی این حشره مانند ریخت‌شناسی و فراوانی آن‌ها در مطالعات ایمنی شناسی و برهمکنش‌های دفاع سلولی در برابر ترکیبات شیمیایی، آلاینده‌ها، اسپور قارچ‌های بیمارگر و باکتری‌ها در جهت کنترل بهتر آفت مورد نظر به ما کمک خواهد کرد.

۴-۹- پیشنهادات

۱- مطالعات گسترده در زمینه شناسایی سیستم ایمنی هیومرال بید سیب زمینی

۲- بررسی اثر غلظت‌ها و جدایه‌های مختلف از قارچ‌های بیمارگر حشرات مانند*B. bassiana*، *M. anisopliae* و همچنین اسپور باکتری‌ها روی سامانه ایمنی بید سیب زمینی

۳- مطالعه برهمکنش بین بتاگلوکان‌های دیواره اسپور قارچ و سلول‌های خونی بید سیب زمینی، برای روشن ساختن جنبه هایی از وضعیت ایمنی این حشره مهم انباری

۴- بررسی تأثیر غلظت‌های زیرکشنده سموم مختلف روی سامانه ایمنی بید سیب زمینی

۵- بررسی تأثیر سایر ارقام سیب زمینی مانند ارقام آریندا، بامبو، مارفونا، رانومی، کایزر، ساتینا، راموس و غیره و همچنین رژیم غذایی مصنوعی بر سامانه ایمنی بید سیب زمینی

منابع

اسماعیلی، ن. (۱۳۹۰). مقایسه ی پارامترهای زیستی بید سیب زمینی (*Phthorimaea operculella* Lepidoptera: Gelechiidae) روی ارقام مختلف سیب زمینی در شرایط آزمایشگاهی. **پایان نامه دوره کارشناسی ارشد،** دانشگاه محقق اردبیلی.

پیوست، غ. (۱۳۸۵). سبزیکاری، **انتشارات دانش پذیر**.

جلالی سندی، ج و زیبایی، آ. (۱۳۸۹). شناسایی و شمارش تفرقی و کل هموسیت‌های لارو پروانه‌ی سفید اشجار،(Lep: Arctiidae) *Hyphantria cunea* و برگخوار توت، *Glyphodes pyloalis* (Lep: Crambidae)، و بررسی تاثیر هورمون جوانی I روی این سلول‌ها. **نشریه نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران**. ۳۰(۲): ۶۷-۴۷.

حبیبی، ج. (۱۳۶۵). بررسی‌های مقدماتی بید سیب زمینی *Phthorimaea oprculella* یک آفت جدید و قرنطینه ای در کرج و فارس. **خلاصه مقالات هشتمین کنگره گیاهپزشکی ایران،** اصفهان.

خانجانی، م. (۱۳۸۵). آفات گیاهان زراعی ایران. **انتشارات دانشگاه بوعلی سینا،** همدان.

خانجانی، م. (۱۳۸۶). آفات گیاهان سبزی و صیفی ایران. چاپ سوم، **انتشارات دانشگاه بوعلی سینا،** همدان.

خسروی، ر. جلالی سندی، ج. و قاسمی، و. (۱۳۹۱). شناسایی سلول‌های خونی لارو شب پره خرنوب *Ectomoyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) . **تحقیقات آفات گیاهی**. ۲(۳): ۳۹-۳۰.

خواجه پور، م. (۱۳۷۰). زراعت نباتات صنعتی. **انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه صنعتی اصفهان**.

راحت‌خواه، ز. کریمی، ج. قدمیاری، م. و مروج، غ. (۱۳۹۵). بررسی تغییرپذیری یاخته‌های خونی و فعالیت فنل اکسیداز لارو پروانه موم‌خوار بزرگ تیمارشده با دو گونه نماتد *Steinernema feltiae* و *Heterorhabditis bacteriophora*. **کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی**. ۵(۱): ۴۷-۳۹.

عجم حسنی، م. (۱۳۹۲). بررسی پاسخ‌های دفاع سلولی سوسک سرشاخه‌خوار رزاسه *Osphranteria coerulescens* Redtenbacher (Coleoptera: Cerambycidae) نسبت به قارچ‌های بیمارگر *Beauveria bassiana* و *Isaria farinosae* . **سومین همایش ملی مدیریت کنترل آفات** (IPMC). ۴۴۳.

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

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

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

غزوی، م. خرازی پاکدل، ع. و ارشاد، ج. (۱۳۸۲). عکس العمل سیستم ایمنی سلولی *Locusta migratoria* (Orth: Acrididae) در مقابل جدایه *Beauveria bassiana* Fashand (Moniliales, Moniliaceae). **نامه ی انجمن حشره شناسی ایران**، ۲۳(۲): ۱۰۱-۷۷.

کهن، ر. جلالی سندی، ج. و زیبایی، آ. (۱۳۹۱). شناسایی و شمارش تفرقی و کل سلول‌های خونی در مراحل مختلف زندگی سوسک برگ‌خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* Mull (Coleoptera: Chrysomelidae) . **تحقیقات آفات گیاهی**. ۲ (۲): ۷۲-۶۳.

محرمی‌پور، س. و شجاعی، م. (۱۳۶۸). روش آزمایشگاهی تولید انبوه بید سیب زمینی به منظور استفاده در مبارزه بیولوژیک. **نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران**. دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. ص ۴۸.

Adamo, S. A., Davies, G., Easy, R., Kovalko, I., & 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., & Farsi, M. J. (2013). Immunoliogical Responses of *Hyphantria Cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) to Entomopathogenic Fungi, *Beauveria Bassiana* (Bals.-Criy) and *Isaria Farinosae* (Holmsk.) Fr. ***Journal of Plant Protection Research***, *53*(2), 110-118.

Akai, H., & Sato, S. (1973). Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* L.(Lepidoptera: Bombycidae). ***International Journal of Insect Morphology and Embryology***, *2*(3), 207-231.

Al-Ali, A. S., Al-Neamy, I. K., Abbas, S. A., & Abdul-Masih, A. M. E. (1975). Observations on the biology of the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zell.(Lepidoptera, Gelechiidae) in Iraq. ***Journal of Applied Entomology***, *79*(1-4), 345-351.

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

Al-Hariri, M. K., & Anjum, S. (2001). Effect of lambdacyhalothrin and deltamethrin on the haemocytes of Desert Locust, *Schistocerca gregaria* Forsk. ***Int J Agric Biol***, *3*, 81-84.

Al- Khalifa, S. M and Siddiqui, L. M. 1999. study of free hemocytes of Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) of Saudi Arabia. ***Saudi journal of Biology Science***, *6*(1), 3-7.

Andrade, F. G. D., Negreiro, M. C. C. D., Levy, S. M., Fonseca, I. C. D. B., Moscardi, F., & Falleiros, Â. M. F. (2010). Hemocyte quantitative changes in *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected by AgMNPV. ***Brazilian Archives of Biology and Technology***, *53*(2), 279-284.

Anggraeni, T., & 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.

Anonymous (2013). Agricultural Statistics. Volume I Crop production. Bureau for statistics and information technology of planning and Economical division, ***Ministry of Jihad Agriculture***. (In Persian).

Arnold, J. W. (1952). The haemocytes of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kühniella* Zell.(Lepidoptera: Pyralididae). ***Canadian Journal of Zoology***, *30*(6), 352-364.

Arnone, S., Musmeci, S., Bacchetta, L., Cordischi, N., Pucci, E., Cristofaro, M., & Sonnino, A. (1998). Research inSolanum spp. of sources of resistance to the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller). ***Potato Research***, *41*(1), 39-49.

Ashida, M. (1997). Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. *" **Molecular Mechanism of Immune Responses in Insects"***, 135-172.

Bacon, O. G., McCalley, N. F., Riley, W. D., & James, R. H. (1972). Insecticides for control of potato tuberworm and green peach aphid on potatoes in California. ***American Potato Journal***, *49*(8), 291-296.

Bandani, A. R. (2005). Effects of *Tolypocladium cylindrosporum* and its secondary metabolites, efrapeptins, on the immune system of *Galleria mellonella* larvae. ***Biocontrol science and technology***, *15*(1), 67-79.

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

Bao, Y. Y., Xue, J., Wu, W. J., Wang, Y., Lv, Z. Y., & Zhang, C. X. (2011). An immune-induced reeler protein is involved in the *Bombyx mori* melanization cascade. ***Insect biochemistry and molecular biology***, *41*(9), 696-706.

Barracco, M. A., & Cestari, A. N. (1984). Studies on the hemocytes of *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae) larvae. ***Revista Brazilian De Genetica***. *7*(3), 451-475.

Beckage, N. E. (2008). Insect immunology. ***Journal Elsevier***, Amsterdam, the Netherlands.

Becker, T., Loch, G., Beyer, M., Zinke, I., Aschenbrenner, A. C., Carrera, P., ... & Hoch, M. (2010). FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. ***Nature***, *463*(7279), 369-373.

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

Behera, M. K., Behera, R., & Patro, B. (1999). Studies on the haemocytes of the common chrysanthemum aphid, *Macrosiphoniela sanborni*. ***Indian J Entomol***, *61*, 51-55.

Bidochka, M. J., & Khachatourians, G. G. (1987). Hemocytic defense response to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. ***Entomologia experimentalis et applicata***, *45*(2), 151-156.

Blandin, S. A., & Levashina, E. A. (2007). Phagocytosis in mosquito immune responses. ***Immunological reviews***, *219*(1), 8-16.

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

Boman, H. G. (1981). Insect responses to microbial infections. ***Microbial control of pests and plant diseases***, *1970-1980*.

Borges, A. R., Santos, P. N., Furtado, A. F., & 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.

Brayner, F. A., Araújo, H. R. C., Cavalcanti, M. G. S., Alves, L. C., & Peixoto, C. A. (2005). Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). ***Micron***, *36*(4), 359-367.

Brehélin, M., Zachary, D., & Hoffmann, J. A. (1978). A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect orders. ***Cell and tissue research***, *195*(1), 45-57.

Brehélin, M., Drif, L., Baud, L., & Boemare, N. (1989). Insect haemolymph: cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. ***Insect Biochemistry***, *19*(3), 301-307.

Brivio, M. F., Mastore, M., & Nappi, A. J. (2010). A pathogenic parasite interferes with phagocytosis of insect immunocompetent cells. ***Developmental & Comparative Immunology***, *34*(9), 991-998.

Broderick, N. A., Welchman, D. P., & Lemaitre, B. (2009). ***Recognition and response to microbial infection in Drosophila*** (pp. 13-33). Oxford University Press: New York, NY, USA.

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., & Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. ***Developmental & Comparative Immunology***, *23*(4), 329-344.

Capinera, J. L. (2001). Handbook of vegetable pests. ***Academic Press***, New York, USA.

Carton, Y., Frey, F., & Nappi, A. J. (2009). Parasite-induced changes in nitric oxide levels in *Drosophila paramelanica*. ***Journal of Parasitology***, *95*(5), 1134-1141.

Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. ***Immunological reviews***, *198*(1), 116-126.

Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. ***Trends in immunology***, *29*(6), 263-271.

Chain, B. M., & Anderson, R. S. (1983). Inflammation in insects: The release of a plasmatocyte depletion factor following interaction between bacteria and haemocytes. ***Journal of Insect Physiology***, *29*(1), 1-4.

Chan, Q. W., Howes, C. G., & Foster, L. J. (2006). Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. ***Molecular & Cellular Proteomics***, *5*(12), 2252-2262.

Chapman, R. F. (1998). The insects structure and function. ***Cambridge University Press***, pp. 94- 141.

Cho, E. M., Liu, L., Farmerie, W., & Keyhani, N. O. (2006). EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana*. I. Evidence for stage-specific gene expression in aerial conidia, in vitro blastospores and submerged conidia. ***Microbiology***, *152*(9), 2843-2854.

Chouvenc, T., Su, N. Y., & Robert, A. (2009). Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. ***Journal of invertebrate pathology***, *101*(3), 234-241.

Clarkson, J. M., & Charnley, A. K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. ***Trends in microbiology***, *4*(5), 197-203.

Das, G. P., Magallona, E. D., Raman, K. V., & Adalla, C. B. (1993). Growth and development of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller), on resistant and susceptible potato genotypes in storage. ***Philippine Entomologist***, *9*, 15-27.

Davies, D. H., Strand, M. R., & 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.

De Azambuja, P., Garcia, E. S., Ratcliffe, N. A., & Warthen, J. D. (1991). Immune-depression in *Rhodnius prolixus* induced by the growth inhibitor, azadirachtin. ***Journal of Insect Physiology***, *37*(10), 771-777.

Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., ... & Imler, J. L. (2005). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. ***Nature immunology***, *6*(9), 946-953.

Ebrahimi, M., & Ajamhassani, M. (2017). 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***, 73.

El-Aziz, N. M. A., & Awad, H. H. (2010). Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. ***Micron***, *41*(3), 203-209.

Eleftherianos, I., Baldwin, H., & Reynolds, S. E. (2008). Developmental modulation of immunity: changes within the feeding period of the fifth larval stage in the defence reactions of *Manduca sexta* to infection by Photorhabdus. ***Journal of insect physiology***, *54*(1), 309-318.

Eleftherianos, I., & Revenis, C. (2011). Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. ***Journal of innate immunity***, *3*(1), 28-33.

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

FAO (2014). FAO statistical yearbooks - world food and agriculture. FAO Chief Statistician, and Director, ***Statistics Division***, United Nations.

Feir, D., & O'Connor, G. M. (1965). Mitotic activity in the hemocytes of *Oncopeltus fasciatus* (Dall). ***Experimental cell research***, *39*(2-3), 637-642.

Feir, D., & McClain, E. (1968). Induced Changes in the Mitotic Activity of Hemocytes of the Large Milkweed Bug, *Oncopeltus fasciatus* 1 2. ***Annals of the Entomological Society of America***, *61*(2), 416-421.

Fenemore, P. G. (1979). Oviposition of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell.(Lepidoptera: Gelechiidae); the influence of adult food, pupal weight, and host-plant tissue on fecundity. ***New Zealand Journal of Zoology***, *6*(2), 389-395.

Fenemore, P. G. (1988). Host-plant location and selection by adult potato moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae): a review. ***Journal of Insect Physiology***, *34*(3), 175-177.

Freitak D, Knorr E., Vogel, H., & Vilcinskas, A. (2012).Gender- and stressor-specific microRNA expression in *Tribolium castaneum*. ***Biology letters***, *8*:860-863.

Gajewski, K. M., Sorrentino, R. P., Lee, J. H., Zhang, Q., Russell, M., & Schulz, R. A. (2007). Identification of a crystal cell-specific enhancer of the black cells prophenoloxidase gene in *Drosophila*. ***Genesis***, *45*(4), 200-207.

Gandhe, A. S., John, S. H., & Nagaraju, J. (2007). Noduler, a novel immune up-regulated protein mediates nodulation response in insects. ***The Journal of Immunology***, *179*(10), 6943-6951.

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

Ghasemi, V., Moharramipour, S., & Jalali Sendi, J. (2013). Circulating hemocytes of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zell.(Lep: Pyralidae) and their response to thermal stress. ***Invertebrate Survival Journal***, *10*, 128-140.

Giglio, A., Battistella, S., Talarico, F. F., Brandmayr, T. Z., & Giulianini, P. G. (2008). Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus* (*Chaetocarabus*) *lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. ***Micron***, *39*(5), 552-558.

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

Gillespie, J. P., Burnett, C., & Charnley, A. K. (2000). The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var acridum. ***Journal of Insect Physiology***, *46*(4), 429-437.

Glinski, Z., & Buczek, K. (2003). Response of the Apoidea to fungal infections. ***Apiacta***, *38*, 183-189.

Graft, J. E. (1917). The potato tuber moth. ***Technology Bulletin of United States Department of Agriculture***, *427*, 1-58.

Goldsworthy, G., Mullen, L., Opoku-Ware, K., & Chandrakant, S. (2003). Interactions between the endocrine and immune systems in locusts. ***Physiological entomology***, *28*(1), 54-61.

Gunnarsson, S. G. S. (1988). Infection of Schistocerca gregaria by the fungus *Metarhizium anisopliae*: Cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. ***Journal of invertebrate pathology***, *52*(1), 9-17.

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

Hinks, C. F., & Arnold, J. W. (1977). Haemopoiesis in Lepidoptera. II. The role of the haemopoietic organs. ***Canadian Journal of Zoology***, *55*(10), 1740-1755.

Hoffmann, J. A., Zachary, D., Hoffmann, D., Brehelin, M., & Porte, A. (1979). Postembryonic development and differentiation: hemopoietic tissues and their functions in some insects. ***Insect Hemocytes***, 29-66.

Hoffmann, J. A. (1995). Innate immunity of insects. ***Current opinion in immunology***, *7*(1), 4-10.

Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. ***Nature***, *426*(6962), 33-38.

Honti, V., Csordás, G., Kurucz, É., Márkus, R., & Andó, I. (2014). The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. ***Developmental & Comparative Immunology***, *42*(1), 47-56.

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

Hung, S. Y., & Boucias, D. G. (1992). Influence of Beauveria bassiana on the cellular defense response of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. ***Journal of Invertebrate Pathology***, *60*(2), 152-158.

Huxham, I. M., Lackie, A. M., & McCorkindale, N. J. (1989). Inhibitory effects of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on cellular immunity in insects. ***Journal of Insect Physiology***, *35*(2), 97-105.

Imler, J. L., & Bulet, P. (2005). Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. In ***Mechanisms of epithelial defense*** (Vol. 86, pp. 1-21). Karger Publishers.

Iwama, R., & Ashida, M. (1986). Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. ***Insect biochemistry***, *16*(3), 547-555.

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

James, R. R., & Xu, J. (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. ***Journal of invertebrate pathology***, *109*(2), 175-182.

Janeway Jr, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. ***Annual review of immunology***, *20*(1), 197-216.

Jiang, H., Wang, Y., Ma, C., & Kanost, M. R. (1997). Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. ***Insect biochemistry and molecular biology***, *27*(10), 835-850.

Jiang, H., Wang, Y., & Kanost, M. R. (1998). Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila easter*. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, *95*(21), 12220-12225.

Jiang, H. (2008). The biochemical basis of antimicrobial responses in *Manduca sexta*. ***Insect Science***, *15*(1), 53-66.

Jin, K., Zhang, Y., Fang, W., Luo, Z., Zhou, Y., & Pei, Y. (2010). Carboxylate transporter gene JEN1 from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* is involved in conidiation and virulence. ***Applied and environmental microbiology***, *76*(1), 254-263.

Johnson, P. T., Stewart, J. E., & Arie, B. (1981). Histopathology of *Aerococcus viridans* var. homari infection (Gaffkemia) in the lobster, *Homarus americanus*, and a comparison with histological reactions to a gram-negative species, *Pseudomonas perolens*. ***Journal of Invertebrate Pathology***, *38*(1), 127-148.

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

Jones, J. C. (1967a). Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* (Linnaeus). ***The Biological Bulletin***, *132*(2), 211-221.

Jones, J. C. (1967b). Normal differential counts of haemocytes in relation to ecdysis and feeding in Rhodnius. ***Journal of Insect Physiology***, *13*(8), 1133-1141.

Jones, J. C., & Liu, D. P. (1968). A quantitative study of mitotic divisions of haemocytes of *Galleria mellonella* larvae. ***Journal of insect physiology***, *14*(8), 1055-1061.

Jones, J. C. (1970). Hemocytopoiesis in insects. ***Regulation of hematopoiesis***, *1*, 7-65.

Jones, S. L., Lindberg, F. P., & Brown, E. J. (1999). Phagocytosis In: Paul WE, ed. ***Fundamental Immunology***. 198, 97-105.

Kaaya, G. P., & Ratcliffe, N. A. (1982). Comparative study of hemocytes and associated cells of some medically important dipterans. ***Journal of Morphology***, *173*(3), 351-365.

Kanost, M. R., Jiang, H., & Yu, X. Q. (2004). Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. ***Immunological reviews***, *198*(1), 97-105.

Khachatourians, G. G. (1996). Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In ***Human and animal relationships*** (pp. 331-363). Springer Berlin Heidelberg.

Khosravi, R., Sendi, J. J., Zibaee, A., & 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*, 11-21.

Khosravi, R., Sendi, J. J., Brayner, F. A., Alves, L. C., & Feitosa, A. P. S. (2016). Hemocytes of the Rose Sawfly *Arge ochropus* (Gmelin)(Hymenoptera: Argidae). ***Neotropical entomology***, *45*(1), 58-65.

Kim, C. H., Shin, Y. P., Noh, M. Y., Jo, Y. H., Han, Y. S., Seong, Y. S., & Lee, I. H. (2010). An insect multiligand recognition protein functions as an opsonin for the phagocytosis of microorganisms. ***Journal of Biological Chemistry***, *285*(33), 25243-25250.

King, J. G., & Hillyer, J. F. (2013). Spatial and temporal in vivo analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. ***BMC biology***, *11*(1), 55.

Kiuchi, T., Aoki, F., & Nagata, M. (2008). Effects of high temperature on the hemocyte cell cycle in silkworm larvae. ***Journal of insect physiology***, *54*(2), 454-461.

Kohana, R., & Sendi, J. J. (2013). Immune responses of Elm Leaf Beetle *Xanthogaleruca luteola* Mull. (COL: Chrysomellidae) to *Beauveria bassiana* and *Artemisia annua* essential oil. ***SOAJ Entomological Studies***, *2*, 16-25.

Krams, I., Kecko, S., Kangassalo, K., Moore, F. R., Jankevics, E., Inashkina, I., ... & 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.

Kurihara, Y., Shimazu, T., & Wago, H. (1992). Classification of hemocytes in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae): II. Possible roles of granular plasmatocytes and oenocytoids in the cellular defense reactions. ***Applied Entomology and Zoology***, *27*(2), 237-242.

Kwon, H., Bang, K., & 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 behaviour. ***Advances in Insect Physiology***, *21*, 85-178.

Lai-Fook, J., & Neuwirth, M. (1972). The importance of methods of fixation in the study of insect blood cells. ***Canadian Journal of Zoology***, *50*(7), 1011-1013.

Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2001). Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. ***Journal of Insect Physiology***, *47*(9), 965-974.

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

Lee, K. P., Cory, J. S., Wilson, K., Raubenheimer, D., & Simpson, S. J. (2006). Flexible diet choice offsets protein costs of pathogen resistance in a caterpillar. ***Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences***, *273*(1588), 823-829.

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

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

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

Li, J. Y., Chen, X., Fan, W., Moghaddam, S. H. H., Chen, M., Zhou, Z. H., ... & 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.

Ling, E., & Yu, X. Q. (2005). Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. ***Insect biochemistry and molecular biology***, *35*(12), 1356-1366.

Ling, E., & Yu, X. Q. (2006a). Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. ***Developmental & Comparative Immunology***, *30*(3), 289-299.

Ling, E., & Yu, X. Q. (2006b). Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells. ***Developmental & Comparative Immunology***, *30*(3), 301-309.

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

Manachini, B., Arizza, V., Parrinello, D., & 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.

Mahmood, T., & Yousuf, M. (1985). Effect of some insecticides on the hemocytes of *Gryllus bimaculatus* de Geer. ***Pakistan Journal of Zoology***, *17*(1),71-84.

Marmaras, V. J., & Lampropoulou, M. (2009). Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. ***Cellular signalling***, *21*(2), 186-195.

Mazet, I., Hung, S. Y., & Boucias, D. G. (1994). Detection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. ***Experientia***, *50*(2), 142-147.

Meister, M., Braun, A., Kapper, C., Reichhart, J. M., & Hoffman, J. A. (1994). Insect immunity. A transgenic analysis in *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. ***The European Molecular Biology Organization Journal***, *13*(24), 5958–5966.

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

Miller, J. S., Howard, R. W., Rana, R. L., Tunaz, H., & Stanley, D. W. (1999). Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of the cricket, *Gryllus assimilis*. ***Journal of insect physiology***, *45*(1), 75-83.

Mirhaghparast, S. K., Zibaee, A., & Hajizadeh, J. (2013). Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on cellular immunity and intermediary metabolism of *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae). ***Invertebr Surviv J***, *10*, 110-119.

Mohrig, W., & Schittek, D. (1979). Phagocytosis-stimulating mediators in insects. ***Acta biologica et medica Germanica,*** *38*(7), 953-958.

Morton, D. B., Dunphy, G. B., & Chadwick, J. S. (1987). Reactions of hemocytes of immune and non-immune *Galleria mellonella* larvae to *Proteus mirabilis*. ***Developmental & Comparative Immunology***, *11*(1), 47-55.

Moushumi, P. H. L., Hazarika, K., Barooah, M., Puzari, K. C., & Kalita, S. (2008). Interaction of *Dicladispa armigera* (Coleoptera: Chrysomelidae) haemocytes with *Beauveria bassiana*. ***International Journal of Tropical Insect Science***, 28(2), 88–97.

Nakahara, Y., Shimura, S., Ueno, C., Kanamori, Y., Mita, K., Kiuchi, M., & Kamimura, M. (2009). Purification and characterization of silkworm hemocytes by flow cytometry. *Developmental & Comparative Immunology*, *33*(4), 439-448.

Nappi, A. J., & Christensen, B. M. (2005). Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. ***Insect biochemistry and molecular biology***, *35*(5), 443-459.

Nappi, A., Poirié, M., & 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. (2002). Digestion. Insect physiology and biochemistry. ***Boca Raton: CRC press***, 27-64.

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

Nebambi, L., Ortiz, O., Haverkort, A., & Caldiz, D. (2009). Sustainable potato production. Guidelines for developming countries. ***Food and Agriculture Organizations of the United Nations***, 94 p.

Nittono, Y., Tomabechi, S., & Onodera, N. (1964). Total haemocyte counts from the larvae and moths cauterized on their imaginal wing discs and the neighboring parts in their larval stage. ***18th Sericulture Congress Japan Sericulture Society***.20.

Nutting, W. L. (1951). A comparative anatomical study of the heart and accessory structures of the orthopteroid insects. ***Journal of Morphology***, *89*(3), 501-597.

Okazaki, T., Okudaira, N., Iwabuchi, K., Fugo, H., & Nagai, T. (2006). Apoptosis and adhesion of hemocytes during molting stage of silkworm, *Bombyx mori*. ***Zoological science***, *23*(3), 299-304.

Ochiai, M., & Ashida, M. (1988). Purification of a beta-1, 3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. ***Journal of Biological Chemistry***, *263*(24), 12056-12062.

Ochiai, M., & Ashida, M. (1999). A pattern recognition protein for peptidoglycan cloning the cDNA and the gene of the silkworm, *Bombyx mori*. ***Journal of Biological Chemistry***, *274*(17), 11854-11858.

Ochiai, M., & Ashida, M. (2000). A pattern-recognition protein for β-1, 3-glucan the binding domain and the cDNA cloning of β-1, 3-glucan recognition protein from the silkworm, *Bombyx mori*. ***Journal of Biological Chemistry***, *275*(7), 4995-5002.

Pal, R., & 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., Tiwari, R. K., & Chaubey, A. K. (2003). Studies on haemocytes of lemon-butterfly, Papilio demoleus L. under certain stress conditions. ***J. Anim. Morphol. Physiol,*** *50*, 33-44.

Pandey, J. P., Tiwari, R. K., & Kumar, D. (2008). Temperature and Ganglionectomy Stresses Affect Haemocyte Counts in Plain Tiger Butterfly, *Danaus chrysippus* L. (Lepidoptera: Nymphalidae). ***Journal of Entomology***, *5*, 113-121.

Pandey, J. P., Mishra, P. K., Kumar, D., Singh, B. M. K., & Prasad, B. C. (2010). Effect of temperature on hemocytic immune responses of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. ***Res. J. Immunol***, *3*, 169-177.

Pendland, J. C., & Boucias, D. G. (1985). Hemagglutinin activity in the hemolymph of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected with the fungus Nomuraearileyi. ***Developmental & Comparative Immunology***, *9*(1), 21-30.

Pendland, J. C., Hung, S. Y., & Boucias, D. G. (1993). Evasion of host defense by in vivo-produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. ***Journal of bacteriology***, *175*(18), 5962-5969.

Rantala, M. J., Vainikka, A., & Kortet, R. (2003). The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. ***Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences***, *270*(1530), 2257-2261.

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

Ratcliffe, N. A. (1993). Cellular defense responses of insects: unresolved problems. In ***Parasites and pathogens of insects*** (pp. 267-304).

Ratcliffe, N. A., & Whitten, M. A. (2004). Vector immunity. In Gillespie, S. H., Smith, G. L., & Osbourn, A. (Eds). Microbe-vector interactions in vector- borne diseases. ***Journal Cambrige University Press England***, 200-245.

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

Richards, E. H., & Edwards, J. P. (1999). Parasitization of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidade) by the ectoparasitic wasp *Eulophus pennicornis*: effects of parasitization, venon and starvation on host haemocytes. ***Journal of Insect Physiology***, *45*, 1073-1083.

Riley, P. A. (1997). Melanin. ***The international journal of biochemistry & cell biology***, *29*(11), 1235-1239.

Rivers, D. B., Ruggiero, L., & Hayes, M. (2002). The ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker)(Hymenoptera: Pteromalidae) differentially affects cells mediating the immune response of its flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). ***Journal of insect physiology***, *48*(11), 1053-1064.

Rizki, T. M., & Rizki, R. M. (1984). The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. In ***Insect ultrastructure*** (pp. 579-604). Springer US.

Rondon, S. I., DeBano, S. J., Clough, G. H., Dogramaci, M., Schreiber, A., Jensen, A., ... & Barbour, J. (2007). ***Biology and management of the potato tuberworm in the Pacific Northwest***. [Covallis, Or.]: Oregon State University Extension Service.

Rondon, S.I., S.J. DeBano, G.H. Clough, P.H. Hamm, and A. Jensen. (2008). Ocurrence of the potato tuber moth in the Columbia Basin of Oregon and Washington. In Integrated Pest Management for the Potato Tuber Moth, *Phthorimaea operculella* Zeller – a Potato Pest of Global Importance. Tropical Agriculture 20, Advances in Crop Research 10, ed. J. Kroschel and L. Lacey, 9–13. Weikersheim: Margraf.

Rondon, S. I. (2010). The potato tuberworm: a literature review of its biology, ecology, and control. ***American Journal of Potato Research***, *87*(2), 149-166.

Rosales, C. (2011). Phagocytosis, a cellular immune response in insects. ***ISJ***, *8*, 109-131.

Rosenberger, C. R., & Jones, J. C. (1960). Studies on total blood cell counts of the southern armyworm larva, *Prodenia eridania* (Lepidoptera). ***Annals of the Entomological Society of America***, *53*(3), 351-355.

Rothschild, G. H. L. (1986). The potato moth—an adaptable pest of short-term cropping systems. ***The ecology of exotic animals and plants***, 144-162.

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

Salt, G. (1970). The Cellular Defence Reactions of Insects. ***Cambridge University Press, Cambridge***. Pp: 421–488.

Samuels, R. I., Charnley, A. K., & Reynolds, S. E. (1988). The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. ***Mycopathologia***, *104*(1), 51-58.

Saxena, B. P., & 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. ***Annu. Rev. Entomol***., *50*, 529-551.

Sewify, G. H., & Hashem, M. Y. (2001). Effect of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on cellular defence response and oxygen uptake of the wax moth *Galleria mellonella* L.(Lep., Pyralidae). ***Journal of Applied Entomology***, *125*(9-10), 533-536.

Shrestha, S., & Kim, Y. (2009). Various eicosanoids modulate the cellular and humoral immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. ***Bioscience, biotechnology, and biochemistry,*** *73*(9), 2077-2084.

Shrestha, S., Park, Y., Stanley, D., & Kim, Y. (2010). Genes encoding phospholipases A 2 mediate insect nodulation reactions to bacterial challenge. ***Journal of insect physiology***, *56*(3), 324-332.

Sideri, M., Tsakas, S., Markoutsa, E., Lampropoulou, M., & Marmaras, V. J. (2008). Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. ***Immunology,*** *123*(4), 528-537.

Silva, J. E. B., Boleli, I. C., & Simões, Z. L. P. (2002). Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. ***Brazilian Journal of Biology***, *62*(4A), 689-699.

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

Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. ***Current opinion in immunology***, *10*(1), 23-28.

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

Strand, M. R. (2008b). Insect hemocytes and their role in immunity. ***Insect immunology***, 25-47.

Strand, M. R., & Pech, L. L. (1995). Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. ***Annual review of entomology***, *40*(1), 31-56.

Swammerdam, J. (1738). ***Bybel der natuure of Historie der insecten, tot zeekere soorten gebracht, door voorbeelden, ontleedkundige onderzoekingen van veelerhande kleine gediertens, als ook door kunstige kopere plaaten opgeheldert*** (Vol. 2). apud Isaacum Severinum.

Tauber, O. E., & Yeager, J. F. (1935). On Total Hemolymph (Blood) Cell Counts of Insects I. Orthoptera, Odonata, Hemiptera, and Homoptera. ***Annals of the Entomological Society of America***, *28*(2), 229-240.

Tauber, O. E. (1936). Mitosis of circulating cells in the hemolymph of the roach, *Blatta orientalis*. ***Iowa State Coll J Sci***, *10*, 373-381.

Theopold, U., Schmidt, O., Söderhäll, K., & Dushay, M. S. (2004). Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends in immunology*, *25*(6), 289-294.

Tiwari, R. K., & Shukla, R. S. (2000). Effect of certain stresses and 20-hydroxyecdysone injection on total haemocyte count in lemon-butterfly, *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera). ***Proceedings of the National Academy of Sciences, India***, *70*, 243-254.

Tiwari, R. K., Pandey, J. P., & Kumar, D. (2006). Effects of neem-based insecticides on metamorphosis, haemocytes and reproductive behaviour in the red cotton bug, *Dysdercus koenigii* Fabr. (Heteroptera: Pyrrhocoridae). Journal of Entomology, *31*(4), 267-271.

Tojo, S., Naganuma, F., Arakawa, K., & Yokoo, S. (2000). Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. ***Journal of Insect Physiology***, *46*(7), 1129-1135.

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

Traynier, R. M. M. (1975). Field and laboratory experiments on the site of oviposition by the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zell.)(Lepidoptera, Gelechiidae). ***Bulletin of Entomological Research***, *65*(3), 391-398.

Triggs, A., & 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.

Tsakas, S., & Marmaras, V. J. (2010). Insect immunity and its signalling: an overview. ***Invertebrate Survival Journal***, *7*(2): 228-238.

Tu, Z. L., Kobayashi, Y., Kiguchi, K., Watanabe, H., & Yamamoto, K. (2002). Effects of heavy-ion radiosurgery on the hemopoietic function of the silkworm *Bombyx mori*. ***Journal of radiation research***, *43*(3), 269-275.

Vey, A., & Gotz, P. (1986). Antifungal cellular defense mechanisms in insects. In: Gupta, AP (Ed) Hemocytic and humoral immunity in Arthropods. ***Journal JohnWiley and Sons Inc., NY***, 89-116.

Vogelweith, F., Moreau, J., Thiéry, D., & 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., & Moreau, J. (2016). The relative abundance of hemocyte types in a polyphagous moth larva depends on diet. ***Journal of insect physiology***, *88*, 33-39.

Von Arx, R., & Gebhardt, F. (1990). Effects of a granulosis virus, and *Bacillus thuringiensis* on life-table parameters of the potato tubermoth, *Phthorimaea operculella*. ***Entomophaga***, *35*(1), 151-159.

Vilcinskas, A., Matha, V., & Götz, P. (1997). Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. ***Journal of Insect Physiology***, *43*(12), 1149-1159.

Wago, H. (1991). Phagocytic recognition in *Bombyx mori*. In: Gupta, A. P. (Ed.). Immunology of insects and other arthropods. ***Boca Raton***: CRC Press.

Walters, J. B., & Ratcliffe, N. A. (1983). Studies on the in vivo cellular reactions of insects: fate of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodules. ***Journal of Insect Physiology***, *29*(5), 417-424.

Washburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan, F. F., Beckage, N. E., & 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.

Winkler, K., Wäckers, F. L., Stingli, A., & Van Lenteren, J. C. (2005). *Plutella xylostella* (diamondback moth) and its parasitoid *Diadegma semiclausum* show different gustatory and longevity responses to a range of nectar and honeydew sugars. ***Entomologia Experimentalis et Applicata***, *115*(1), 187-192.

Wiesner, A., Wittwer, D., & Götz, P. (1996). A small phagocytosis stimulating factor is released by and acts on phagocytosing *Galleria mellonella* haemocytes in vitro. ***Journal of insect physiology***, *42*(9), 829-835.

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 eridania*). ***Journal of Agricultural Research***, *71*, 1-40.

Yeung, T., Ozdamar, B., Paroutis, P., & Grinstein, S. (2006). Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. ***Current opinion in cell biology***, *18*(4), 429-437.

Yoshida, H., Kinoshita, K., & Ashida, M. (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the *silkworm, Bombyx mori*. ***Journal of Biological Chemistry***, *271*(23), 13854-13860.

Zambon, R. A., Vakharia, V. N., & Wu, L. P. (2006). RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. ***Cellular microbiology***, *8*(5), 880-889.

Zhao, F., Stanley, D., Wang, Y., Zhu, F., & Lei, C. L. (2009). Eicosanoids mediate nodulation reactions to a mollicute bacterium in larvae of the blowfly, *Chrysomya megacephala*. ***Journal of insect physiology***, *55*(3), 192-196.

Zibaee, A., Bandani, A., Talaei-Hassanlouei, R., & Malagoli, D. (2011). Cellular immune reactions of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. ***Journal of Insect Science***, *138*, 1-16.

Zibaee, I., & Jalali Sendi, J. (2011). Identification, differential and total count on hemocytes of *Hyphantria cunea* (Drury) and *Glyphodes pyloalis* Walker and investigation on the effect of JH I on these cells. ***Journal of Entomological Society of Iran***, *30*(2), 47-67.

Zibaee, A., Zibaee, I., & Sendi, J. J. (2011). A juvenile hormone analog, pyriproxifen, affects some biochemical components in the hemolymph and fat bodies of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). ***Pesticide biochemistry and physiology***, *100*(3), 289-298.

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.

Abstract

The hemocytes are one of the important components of immune system of insects against various stresses such as pathogens attack, parasitoids, starvation periods and thermal changes. Hemocytes characteristics recognition, their frequency and the investigation of the amount of Phenoloxidase enzyme activity is important in the cellular immunological studies. In this study hemocytes of fourth instar larvae of potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) were identified after staining with Giemsa and by light microscopy at 40x magnification. 5 types of hemocytes include of prohemocytes (PRs), plasmatocytes (PLs), granulocytes (GRs), oenocytoids (OEs) and spherulocytes (SPs) were identified. The frequency of hemocytes and the activity of Phenoloxidase enzyme in the fourth instar larvae of this pest were investigated under the influence of thermal stresses and also after feeding on five potato cultivars (Sante, Agria, Fontane, Alpha and Alpha paboland). The immune responses of fourth instars larva of the potato tuber moth was also investigated against two isolates of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Fashand and 47) After 3, 6 and 10 hours. The results of different thermal effects on immune system of potato tuber moth showed that total hemocyte count (THC) and PLs of larvae which were for 24 hours under temperature stress of 35 ° C, was increased significantly compared to the control (25±1 °C). Also, chill stress (4 °C) showed a significant decrease in THC, PLs and OEs compared to the control. The effect results of two isolates of fungi on cellular defense of potato tuber moth, showed that the THC, PLS and GRs increased significantly after 3 hours compared to the control. Increase in the number of homocysts in the isolate of Fashand was clearly seen. Then the THC, PLs and GRs decreased gradually at 6 and 10 hours after injection. Prohemocytes as stem cells, showed a significant decrease in 6 hours after spores injection. The results effects of five potato cultivars on on immune system of potato tuber moth showed that the maximum THC, GRs and OEs were attributed to the larvae fed on Agria cultivar and the minimum frequency of these hemocytes were in the larvae fed on Alpha cultivar. The maximum PRs and PLs were obtained from larvae fed on the Sante and Agria cultivars, respectively. The amount of enzyme activity of phenoloxidase was measured in the presence of L-DOPA substrate.

This parameter was varied in larvae which were under the influence of thermal stresses and also larvae which fed on different cultivar. The temperature of 25±1 °C resulted in a significant increase in the activity of phenoloxidase enzyme and temperature of 35 ° C resulted in a significant decrease in this parameter. The maximum activity of Phenoloxidase enzyme was in larvae that fed on Agria cultivar and minimum of it was attributed to the larvae fed on Alpha paboland cultivar. Due to low immunity of this insect at low temperature, the activation of the immune response against both Fashand and 47 isolates, as well as the Agria cultivar, therefore, the use of a cooling system in the storages, combining the use of resistant cultivars and entomopathogenic fungi will help to better control of this.

Key words: *Phthorimaea operculella,* hemocytes, thermal stresses, Entomopathogenic fungi, nutritional diets, phenoloxidase enzyme

Faculty of Agricalture

M.Sc. Thesis in Entomology

Physiological defense reactions of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell. against to thermal stresses and fungi *Beauveria bassiana*

By:

Zahra Pourali

Supervisor:

Dr. Maryam Ajamhassani

January 2018