

بررسی تغییرپذیری یاخته‌های خونی و فعالیت فنل اکسیداز لارو پروانه
موم‌خوار بزرگ تیمار شده با دو گونه نematod
Steinernema feltiae و *Heterorhabditis bacteriophora*

۱. زهرا راحت‌خواه؛ ۲. جواد کریمی*؛ ۳. محمد قدمیاری؛ ۴. غلامحسین مروج
۱، ۲ و ۴. دانشجوی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی، دانشیار و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳. دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه گیلان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۰/۹)

چکیده

ایمنی در حشرات شامل بخش‌های مختلف دفاع رفتاری، فیزیکی و ایمنی ذاتی آنهاست. در این بررسی، مؤلفه‌های کلیدی دخیل در سازوکارهای ایمنی ذاتی لارو پروانه موم‌خوار بزرگ *Galleria mellonella* به عنوان حشره مدل، (شامل تغییر در شمار و انواع یاخته‌های خونی یا هموسیت‌ها و نیز تغییرپذیری فعالیت آنزیم فنل اکسیداز) در برابر دو گونه جدایه بومی نematod بیمارگر حشرات، *Heterorhabditis bacteriophora* و *Steinernema feltiae* بررسی شد. شمار کل یاخته‌های خونی لارو میزبان بی‌درنگ پس از تزریق گونه *H. bacteriophora* افزایش یافت. در بین تیپ‌های مختلف یاخته‌ای، پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها فراوانی بیشتری داشتند. در لاروهای تیمار شده با گونه *S. feltiae* این واکنش متفاوت بود. نematod اخیر تأثیری در نوسان سریع جمعیت یاخته‌های خونی در زمان‌های اولیه (پانزده دقیقه تا چهار ساعت) پس از تزریق نداشت. اما با گذشت زمان، در هشت و دوازده ساعت پس از تزریق، جمعیت یاخته‌های خونی در همولنف لاروهای تیمار شده با هر دو گونه نematod کاهش یافت. در بخش دفاع هیومرال نیز مشخص شد که گونه *H. bacteriophora* باعث تحریک و افزایش فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در پانزده دقیقه تا هشت ساعت پس از ورود به حفره عمومی می‌شود در حالی که، تغییر سطح کمی این آنزیم در زمان تقابل میزبان با گونه *S. feltiae* به مراتب کمتر بود.

کلیدواژگان: ایمنی حشرات، پاسخ یاخته‌ای، پاسخ هیومرال، بیمارگر حشرات، نematodهای بیمارگر حشرات.

مقدمه

کپسول، گره و فاگوسیتوز در بخش یاخته‌ای و تولید پروتئین‌های ضد میکروبی، فنل اکسیداز و انعقاد همولنف از جمله واکنش‌های بخش هیومرال به شمار می‌روند. اما این پاسخ‌ها، برخلاف ظاهر نه‌تنها از هم جدا نبوده بلکه نیروهای دفاعی وابسته به هم به شمار می‌آیند (Tsakas and Marmaras 2010).

سامانه ایمنی ذاتی در حشرات آخرین و مهم‌ترین بازدارنده دفاعی است که بیمارگرها یا انگل‌های حشرات با آن روبه‌رو می‌شوند و اغلب نقشی تعیین‌کننده در زنده‌مانی حشره دارد. این سامانه از دو بخش یاخته‌ای و هیومرال تشکیل شده است. واکنش‌هایی مثل تشکیل

نماتود و باکتری همزیست آنهایی که باعث مرگ حشره میزبان می‌شوند، مشخص شدند.

لاروهای بال‌پولک‌داران که به‌طور معمول به‌عنوان مدل آزمایشگاهی در بررسی‌های بیماری‌شناسی حشرات استفاده می‌شوند شامل گونه‌های *Manduca sexta*، *Galleria mellonella*، *Spodoptera littoralis* است (Nielsen-LeRoux et al. 2012)، در این میان لارو پروانه موم‌خوار بزرگ *G. mellonella*، به دلیل حساسیت بالا، سادگی پرورش، اندازه و دوره رشدی مناسب به عنوان مدل آزمایشگاهی برای پرورش و بررسی چگونگی تقابل نماتودهای بیمارگر حشرات و البته دیگر بیمارگرها حشرات با سامانه ایمنی حشرات استفاده می‌شود.

در این بررسی تأثیر جدایه‌های بومی نماتودهای بیمارگر *H. bacteriophora* و *S. feltiae* بر جمعیت انواع یاخته‌های خونی و فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز لاروهای میزبان که مهم‌ترین عامل دخیل در دفاع هیومرال است، بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

جمعیت لارو پروانه موم‌خوار بزرگ، در آزمایشگاه با برنامه غذایی مصنوعی شامل: آرد گندم (۵۴ درصد)، عسل (۲۷ درصد)، موم (۵/۴ درصد)، مخمر (۱۳/۵ درصد) و گلیسرین ۹۹ درصد (۵۰۰ میلی‌لیتر) پرورش یافت (Vilcinskas and Matha 1997). کلنی در شرایط تاریکی، دمای ۳۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 50 ± 5 درصد، نگهداری شد. لاروهای سن آخر در آزمایش استفاده شدند.

افزایش نماتودهای بیمارگر حشرات

به‌منظور گردآوری نماتودهای بیمارگر حشرات، نمونه‌های خاک در سال ۱۳۹۱، از شهرستان بجنورد، واقع در استان خراسان شمالی گردآوری شد. نمونه‌های جداسازی‌شده نماتود بیمارگر با استناد به مشخصات کلیدی ظاهری و ریخت‌سنجی (مرفومتریک) گروه‌بندی شدند. تعیین هویت جدایه‌های نماتود بیمارگر استخراج‌شده به روش مولکولی و با تجزیه و تحلیل اطلاعات ناحیه ژنی ITS انجام شد (Karimi et al. 2009). جدایه‌های بومی نماتودهای بیمارگر حشرات *H. bacteriophora* (KM000854) و *S. feltiae*

بیمارگرها حشرات (مانند، باکتری‌ها، قارچ‌ها، نماتودها و میکرواسپرودی‌ها) باید بر بازدارنده‌های دفاع فیزیکی و آن‌گاه ایمنی ذاتی میزبان غلبه کرده و قادر به ایجاد عفونت در میزبان باشند تا به‌عنوان عامل کنترل زیستی استفاده شوند (Vega and Kaya 2012). در بین بیمارگرها نماتودها اهمیت ویژه‌ای دارند، این گروه از بیمارگرها می‌توانند فعالانه در زیستگاه آفت (از جمله خاک، شاخ‌وبرگ و تنه درختان) به جست‌وجوی میزبان پرداخته و آن را آلوده کنند. گروه عمده‌ای از نماتودهای بیمارگر که به‌صورت تجاری علیه آفات مختلف به‌کار گرفته می‌شوند، مربوط به خانواده‌های *Steinernematidae* و *Heterorhabditidae* هستند، این نماتودها با باکتری‌هایی از خانواده *Enterobacteriaceae* رابطه همزیستی داشته و این همزیستی نقشی عمده در بیماری‌گری این گروه دارد (Grewal et al. 2005).

گونه‌های بسیاری از نماتودهای بیمارگر حشرات در کنترل آفات در نواحی مختلف جهان به کار گرفته شده‌اند، سخت‌بال‌پوشان، بال‌پولک‌داران و دو بالان از جمله مهم‌ترین میزبان‌هایی هستند که کاربرد نماتود بیمارگر علیه آنها موفقیت‌آمیز بوده است (Kaya and Lacey 2007). بیان این نکته ضروری است که کارایی نماتودهای بیمارگر حشرات افزون بر ویژگی‌های زهرآگینی به توانایی آنها در کامل کردن فرآیند بیماری‌زایی (نفوذ، غلبه بر سدهای ایمنی میزبان، رهاسازی باکتری همزیست) وابسته است که گونه‌های مختلف در این امر یکسان نیستند در همین راستا تورستون و همکاران پس از بررسی حساسیت کم سوسک کلرادو به نماتود بیمارگر *Steinernema carpocapsae* دریافتند، بیشتر لاروهای بیمارگر این نماتود در هموسل این حشره توسط کپسولی از یاخته‌های خونی به دام می‌افتد. بررسی‌های بیشتر نشان داد که حشره یادشده می‌تواند بیش از بیست‌ویک لارو بیمارگر نماتود را در هموسل خود به همین روش مهار کند (Thurston et al. 1994). پاسخ‌های ایمنی بسته به گونه میزبان و گونه و جدایه نماتود بیمارگر متفاوت است (Li et al. 2007). بنابراین بررسی تقابل نماتودهای بیمارگر با میزبان، در کاربرد این بیمارگرها به عنوان عامل‌های کنترل زیستی، ضروری است. در مسیر این بررسی بیماری‌گری ناشی از

۵:۱ با محلول ضد انعقاد (۱ گرم آسکوربیک اسید، ۱ گرم سیتریک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول رینگر) رقیق شد و سپس یاخته‌های خونی با استفاده از لام گلبول شمار نفوبار، شمارش شد. این آزمایش در چهار تکرار و کل آزمایش دو بار انجام شد.

شمارش افتراقی یاخته‌های خونی

به‌منظور بررسی تغییرپذیری جمعیت هر نوع یاخته خونی در رویارویی با نماتودهای بیمارگر، در زمان‌های مشخص ۱۵ دقیقه، ۲، ۴، ۸ و ۱۲ ساعت پس از تزریق، اسلایدهای میکروسکوپی از همولنف، تهیه شده و شمار دوپست یاخته از همه قسمت‌های اسلاید به صورت تصادفی شمارش شد (Gupta 1972). این آزمایش در چهار تکرار و کل آزمایش دو بار انجام شد.

دفاع هیومرال، بررسی واکنش آنزیم فنل‌اکسیداز

آنزیم فنل‌اکسیداز از مؤلفه‌های مهم دفاع هیومرال در حشرات است. بنابراین سنجش میزان فعالیت آنزیم یادشده در تقابل حشره با نماتود، می‌تواند شاخصی در درک میزان دفاع حشره باشد. پیش از ارزیابی فعالیت آنزیم، در آغاز میزان کل پروتئین همولنف لارو *G. mellonella*، به روش Bradford (1976) تعیین شد.

تعیین میزان پروتئین و رسم منحنی استاندارد

به‌منظور تعیین میزان پروتئین همولنف، در آغاز منحنی استاندارد پروتئین با استفاده از پروتئین استاندارد آلبومین گاوی به‌عنوان پروتئین خالص، در ده غلظت مختلف ۰ تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نیز معرف بردفورد، تهیه شد. برای تهیه معرف یادشده، ۱۰۰ میلی‌گرم پودر کوماسی بریلانت بلو (G250) (Merck®)، به ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درجه اضافه شد سپس ۱۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد به تدریج به محلول اضافه شد تا محلول به‌رنگ قهوه‌ای تیره درآمد. در نهایت حجم محلول به ۱ لیتر رسانده و با استفاده از کاغذ صافی، به‌آرامی صاف شد. غلظت‌های مختلف پروتئین استاندارد با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر (Stat Fax 3200®; Awareness Technology Inc.) (Florida, USA) در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

(KC675182) برای تلقیح لارو سن آخر پروانه موم‌خوار بزرگ استفاده شدند، سپس لاروهای آلوده به تله وایت انتقال یافته و پس از تکمیل چرخه زندگی در عرض ۵-۶ روز، لاروهای عفونت‌زا خارج شده، در ظرف‌های فالكون گردآوری و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شدند (Karimi et al. 2009).

شناسایی یاخته‌های خونی

به‌منظور شناسایی یاخته‌های خونی لارو پروانه موم‌خوار بزرگ، همولنف لاروها از راه قطع کردن پای سوم کاذب، گردآوری شد. سپس گستره‌ای از همولنف روی لام ایجاد شد. پس از خشک‌شدن همولنف در مجاورت هوا و در دمای اتاق، از ترکیب متانول: اسیداستیک (۳:۱) به‌عنوان تثبیت‌کننده استفاده شد (Altuntas et al. 2012)، پس از خشک‌شدن گستره همولنف، یاخته‌های خونی با استفاده از محلول گیمسا ۱۰ درصد، به مدت پانزده دقیقه، رنگ‌آمیزی شد و سپس با آب شسته و در مجاورت هوا خشک شد (Gupta 1972). یاخته‌های رنگ‌آمیزی‌شده با استفاده از میکروسکوپ (Olympus®)، مجهز به دوربین DP 71، بررسی و از آنها تصویر تهیه شد. یاخته‌های خونی با توجه به ویژگی‌های ظاهری و اندازه طول و عرض (بر حسب میکرومتر)، با استناد به اطلاعات ارائه‌شده توسط (Gupta 1972, Price and Ratcliffe 1974, Lavine and Strans 2002, Riberio and Brehelin 2006) از یکدیگر متمایز شدند.

تیمار با نماتود

در هر آزمایش، ده لارو بیمارگر نماتود همراه با ۱۰ میکرولیتر آب مقطر سترون با استفاده از سرنگ انسولین (Soft ject®) (۳۰G)، از محل پیش‌ران پای کاذب سوم، به هموسل بدن میزبان تزریق شد. برای تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد.

شمارش کلی یاخته‌های خونی

برای بررسی تغییرپذیری شمار کل یاخته‌های خونی، همولنف تازه در زمان‌های ۱۵ دقیقه، ۲، ۴، ۸ و ۱۲ ساعت پس از تزریق ده لارو بیمارگر نماتود از لاروهای میزبان، گردآوری شد. همولنف گردآوری‌شده به نسبت

گرانولوسیت، انوسیتوئید، اسفرولوسیت و پروهموسیت. پلاسماتوسیت‌ها به‌عنوان فراوان‌ترین جور یاخته‌ای، اندازه $17/31 \pm 0/79$ میکرومتر طول و $22/75 \pm 1/42$ میکرومتر عرض داشتند (شکل ۱- الف و ب)، گرانولوسیت‌ها هسته مرکزی و دانه‌های گرانول در سیتوپلاسم داشتند و اندازه آنها $14/77 \pm 0/65$ میکرومتر طول و $14/58 \pm 0/75$ میکرومتر عرض ثابت شد (شکل ۱- ج). انوسیتوئیدها $30/53 \pm 0/55$ میکرومتر طول و $16/83 \pm 0/35$ میکرومتر عرض، هسته جانبی و سیتوپلاسم شفافی داشتند (شکل ۱- د). اسفرولوسیت‌ها تخم‌مرغی شکل و حاوی گویچه‌هایی بودند، اندازه این یاخته‌ها $28/26 \pm 0/6$ میکرومتر طول و $17/93 \pm 0/51$ میکرومتر عرض بود (شکل ۱- ه). اندازه پروهموسیت‌ها $6/58 \pm 0/23$ میکرومتر طول و $3/45$ میکرومتر عرض ثابت شد (شکل ۱- و).

تغییرپذیری شمار کل یاخته‌های خونی

شمار کل یاخته‌های خونی در لارو تیمارشده با گونه *H. bacteriophora*، در پانزده دقیقه و دو ساعت پس از تزریق، در مقایسه با شاهد، افزایش معنی‌داری داشت ($F_{2,21} = 5/38$, $P \leq 0/05$; $F_{2,21} = 3/52$, $P \leq 0/05$)، اما از چهار ساعت پس از تزریق به تدریج شمار یاخته‌ها کاهش یافت، به طوری که در هشت و دوازده ساعت پس از تزریق، تراکم یاخته‌های خونی در همولف در کمترین سطح مشاهده شد ($F_{2,21} = 18/57$, $P \leq 0/05$, $F_{2,21} = 18/57$, $P \leq 0/05$). شمار کل یاخته‌های خونی در لارو تیمارشده با گونه *S. feltiae* در فاصله زمانی پانزده دقیقه تا چهار ساعت پس از تزریق، تغییر زیادی نداشت اما در هشت ساعت پس از تزریق، شمار کل آنها سیر کاهشی نشان داد (شکل ۲).

شمارش افتراقی یاخته‌های خونی

تغییرپذیری شمار پلاسماتوسیت‌ها در لارو پروانه موم‌خوار بزرگ تیمارشده با *H. bacteriophora*، در پانزده دقیقه، دو و چهار ساعت پس از تزریق، افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت ($P \leq 0/05$)، اما در زمان‌های هشت و دوازده ساعت پس از تزریق در مقایسه

برای تعیین میزان پروتئین، ۱۰ میکرولیتر از همولف رقیق‌شده، به معرف بردفورد اضافه شده و جذب آن در ۶۳۰ نانومتر خوانده شد (Bradford 1976). این آزمایش در چهار تکرار و کل آزمایش در دو نوبت تکرار شد.

بررسی تغییر سطح فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز لارو

G. mellonella در واکنش به نماتودهای بیمارگر حشرات به‌منظور بررسی تغییرپذیری فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولف لارو پروانه موم‌خوار بزرگ تیمارشده با نماتود بیمارگر، ۱۰ میکرولیتر از همولف لاروهای تیمارشده با هرگونه نماتود بیمارگر، در زمان‌های مشخص ۱۵ دقیقه، ۲، ۴، ۸ و ۱۲ ساعت پس از تزریق در ریزلوله (میکروتیوب)‌های ۰/۲ میلی‌لیتری روی یخ گردآوری شد، سپس بستره (سوبسترای) دوپامین هیدروکلراید^۱ با غلظت ۶۰ میلی‌مولار در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۸/۶ و DMF^۲ (۲ درصد)، اسیدفسفریک ۸۰ درصد و MBTH^۳ ۵ میلی‌مولار تهیه شد (Valadez- Lira et al. 2012). برای برآورد میزان جذب، در آغاز بستره به چاهک‌های میکروپلیت ریدر اضافه شد سپس بی‌درنگ همولف اضافه شده و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. محلول بستره روزانه تهیه و در ظرفی تیره نگهداری شد. تیمار شاهد با ۱۰ میکرولیتر آب تیمار شد. شرایط تکرار آزمایش همانند پیش بود.

تحلیل آماری

تفاوت بین میانگین تیمارها در هر آزمایش با استفاده از مقایسه تیمار با دو گونه نماتود با شاهد در هر زمان، به کمک آزمون LSD در سطح ۵ درصد با نرم‌افزار SAS(9.1) محاسبه شد.

نتایج

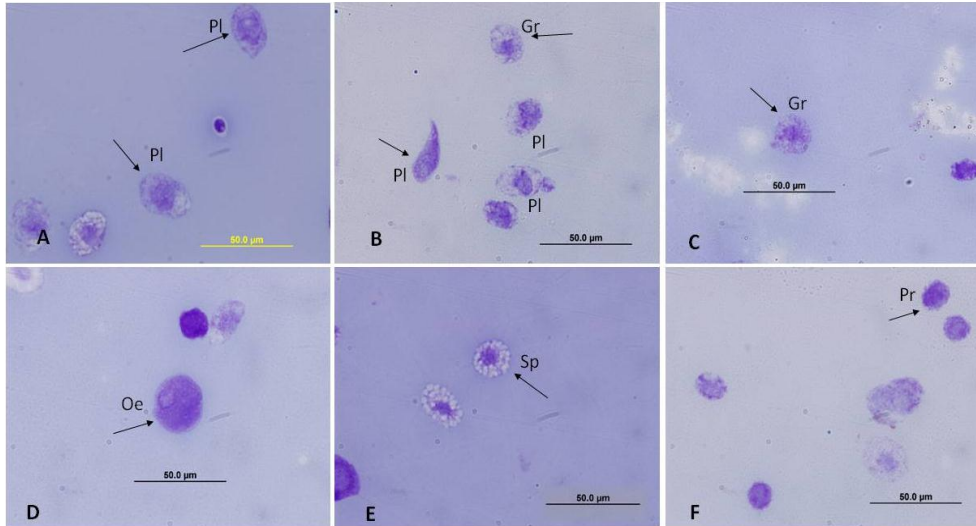
شناسایی یاخته‌های خونی

یاخته‌های خونی لارو پروانه موم‌خوار بزرگ، شامل پنج جور مختلف است که عبارتند از: پلاسماتوسیت،

1. Dopamin hydrochloride
2. Dimethylformamid
3. Meththyl 2-benzothiazolinone hydrozone hydrochloride

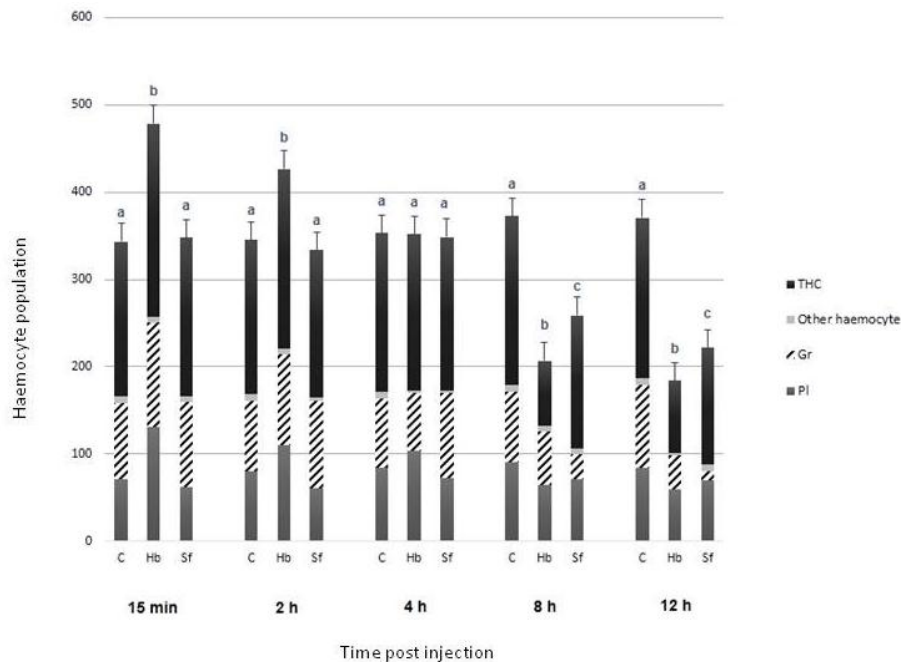
S. feltiae تفاوتی معنی‌دار در انبوهی پلاسماتوسیت‌ها در همهٔ زمان‌های پس از تیمار مشاهده نشد.

با شاهد کاهش ناچیز ولی معنی‌دار، نشان داد ($P \leq 0.05$), $F_{2,21} = 8.2$, $F_{2,21} = 77.1$). در لاروهای تیمار شده با گونهٔ



شکل ۱. یاخته‌های خونی در لارو پروانهٔ موم‌خوار بزرگ. A و B. پلاسماتوسیت، C. گرانولوسیت، D. آنوسیتوئید، E. اسفرولوسیت، F. پروهموسیت. Pl: پلاسماتوسیت، Gr: گرانولوسیت، Oe: آنوسیتوئید، Sp: اسفرولوسیت، Pr: پروهموسیت.

Figure 1. Haemocytes of *Galleria mellonella* larvae. A and B: plasmatocyte, C: granulocyte, D: oenocyte, E: spherulocyte, F: prohaemocyte. Pl: Plasmatocyte, Gr: Granulocyte, Oe: Oenocytoid, Sp: Spherulocytes, Pr: Prohaemocytes.



شکل ۲. تغییرپذیری جمعیت یاخته‌های خونی در لارو *Galleria mellonella* تیمار شده با دو گونه نematod بیمارگر. THC: شمار کل یاخته‌های خونی، Gr: گرانولوسیت، Pl: پلاسماتوسیت، C: تیمار شاهد، Hb: *Heterorhabditis bacteriophora*, Sf: *Steinernema feltiae*. حروف نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار میانگین شمار کل هموسیت‌ها بر پایهٔ آزمون LSD در سطح ۰/۰۵ درصد هستند. (۱۰۴ * میانگین شمار یاخته‌های خونی = THC).

Figure 2. Changes in haemocyte population in *G. mellonella* larvae treated with entomopathogenic nematode. Letters indicated significantly different in THC between treatments (Control, *H. bacteriophora* and *S. feltiae*) in each time post injection. Different letter(s) are significant at $p \leq 0.05$, according to LSD test. THC: Total haemocyte count, Gr: Granulocyte, Pl: Plasmatocyte, C: control, H.b: *Heterorhabditis bacteriophora*, S.f: *Steinernema feltiae*.

دفاع هیومرال

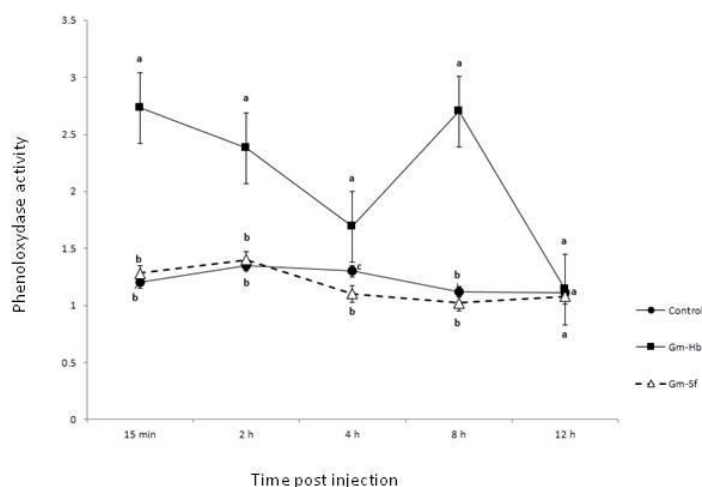
با توجه به منحنی استاندارد، میزان پروتئین اندازه‌گیری شده به روش بردفورد، در همولنف لارو *G. mellonella* برابر $6/35 \pm 0/3$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، محاسبه شد.

بررسی تغییر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لارو تیمار شده با نماتودهای بیمارگر حشرات

فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در همولنف لارو پروانه موم‌خوار بزرگ پس از تزریق نماتود بیمارگر در مقایسه با شاهد نوسان زیادی نشان داد. پانزده دقیقه پس از ورود لارو بیمارگر گونه *H. bacteriophora* به هموسل حشره، فعالیت آنزیم بی‌درنگ با شیب زیادی افزایش یافت و به سطح تفاوت معنی‌دار با شاهد رسید ($F_{2,21}=5, P \leq 0/05$)، سپس تا چهار ساعت، به تدریج کاهش یافت. در هشت ساعت پس از تیمار، دوباره فعالیت آنزیم افزایش ناگهانی نشان داد، اما در نهایت چهار ساعت بعد، در زمان دوازده ساعت پس از تزریق، فعالیت آن کاهش یافت. واکنش آنزیم فنل‌اکسیداز لارو پروانه موم‌خوار بزرگ در برابر گونه *S. feltiae* در مقایسه با گونه *H. bacteriophora* به مراتب کمتر بود، همچنین در مقایسه با تیمار شاهد اگرچه میزان فعالیت آنزیم کاهش نشان داد اما تفاوت معنی‌دار نبود (شکل ۳).

تزریق نماتود *H. bacteriophora* به لارو موجب شد شمار گرانولوسیت‌ها، بی‌درنگ در پانزده دقیقه تا دو ساعت پس از تزریق، افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد داشته باشد ($F_{2,21}=9/92, F_{2,21}=5/7, P \leq 0/05$)، ولی در زمان‌های هشت و دوازده ساعت پس از تزریق، تراکم این یاخته‌ها کاهشی معنی‌دار در قیاس با شاهد نشان داد ($F_{2,21}=26/1, F_{2,21}=109/5, P \leq 0/05$)، در مقابل در لاروهای تیمار شده با گونه *S. feltiae* تنها در دو ساعت پس از تزریق تراکم گرانولوسیت‌ها، افزایش کم، اما معنی‌داری در مقایسه با شاهد داشت ($P \leq 0/05$)، اما با گذشت زمان، در هشت و دوازده ساعت پس از تزریق، تراکم یاخته‌های یادشده کاهش شدیدی در مقایسه با شاهد نشان داد.

تغییرپذیری شمار انوسیتوئیدها در لاروهای تیمار شده با گونه *H. bacteriophora* و *S. feltiae* در زمان‌های پانزده دقیقه و دو ساعت، تفاوتی معنی‌دار با شاهد نداشت ($F_{2,21}=0/362, F_{2,21}=1/13, P \geq 0/05$)، اما با گذشت زمان، در دوازده ساعت به بیشترین شمار در مقایسه با شاهد رسید ($F_{2,21}=6/74, P \leq 0/05$). شمار پروموسیت‌ها در لاروهای تیمار شده با هر دو گونه نماتود *S. feltiae* و *H. bacteriophora* از دو تا دوازده ساعت پس از تزریق، کاهش معنی‌داری در مقایسه با شاهد داشت (۲، ۴، ۸ و ۱۲ ساعت)، ($F_{2,21}=6, P \leq 0/05$)، ($F_{2,21}=5/03, F_{2,21}=15/04, F_{2,21}=7$) (شکل ۲).



شکل ۳. تغییرات فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لارو *Galleria mellonella* تیمار شده با دو گونه نماتود بیمارگر، ($U/mg \text{ Protein} \pm SE$).

Gm: *Galleria mellonella*; Hb: *Heterorhabditis bacteriophora*; Sf: *Steinernema feltiae*.

Figure 3. Phenoloxidase activity in *G. mellonella* larvae. ($U/mg \text{ Protein} \pm SE$) Gm: *Galleria mellonella*; Hb: *Heterorhabditis bacteriophora*; Sf: *Steinernema feltiae*.

یاخته‌های باکتری همزیست نماتود، در همولنف ثبت شد. رهاسازی باکتری همزیست در هموسل میزبان، نقشی مهم در بروز بیماری‌گری دارد. *Photorehabdus luminescens* همزیست *H. bacteriophora* که در مدت‌زمان کوتاهی (سی دقیقه) پس از ورود به هموسل رها می‌شود، از راه‌های چندی از جمله از بین‌بردن پلیمریزاسیون یاخته‌های خونی و تخریب آنها باعث تسریع در بروز عفونت خونی می‌شود (Aktories et al. 2012). در برابر، واکنش ایجادشده توسط گونه *S. feltiae* بسیار متفاوت بود، برخلاف گونه اول، تزریق این نماتود به هموسل *G. mellonella* در ساعات اولیه، تغییر شایان توجهی در شمار یاخته‌های خونی ایجاد نکرد اما با گذشت زمان کاهش شمار کل یاخته‌های خونی مشاهده شد. عمده‌ترین دلیل این موضوع رهاسازی و افزونش باکتری همزیست *Xenorhabdus bovienii* در همولنف میزبان است که تا چهار ساعت پس از حضور نماتود در هموسل لارو رها شده، افزونش می‌شود (Wang 1994) و با اتصال به سطح یاخته‌های خونی باعث می‌شود قابلیت اتصال به مهاجم را از دست بدهند (Brivio et al. 2005). فاصله زمانی متفاوت در کاهش جمعیت یاخته‌های خونی، در دو تیمار به دلیل همین تفاوت در زمان رهاسازی باکتری همزیست در دو گونه نماتود بیمارگر است.

ترکیب متفاوت چربی (لیپید)های کوتیکول گونه *S. feltiae* باعث دفع پاسخ یاخته‌ای حشره می‌شود (Dunphy and Webster 1984)، همچنین در بررسی روی واکنش دفاعی علیه *Steinernema* به سازوکار "تقلید ملکولی" اشاره شده است، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که این جنس می‌تواند با اتصال و جذب پروتئین‌های همولنف میزبان در سطح پوست خودپوششی ایجاد کند که در هموسل به‌عنوان عامل بیگانه شناخته نشود. به کارگیری این سازوکار باعث می‌شود پاسخ‌های ایمنی یاخته‌ای و هیومرال با تأخیر در برابر این‌گونه فعال شده و نماتود فرصت رهاسازی باکتری همزیست را داشته باشد (Mastore and Brivio 2008). متناظر با پاسخ یاخته‌ای مشاهده‌شده، فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز نیز در برابر گونه *H. bacteriophora* نسبت به *S. feltiae* سریع‌تر و با شدت بیشتری مشاهده

بحث

چگونگی تقابل و تأثیر بیمارگرها حشرات در رویارویی با سامانه ایمنی ذاتی در بررسی‌های دیگری، از جمله (Ebrahimi et al. 2011, Li et al. 2009, El-Aziz et al. 2010, Valadez-Lira et al. 2011, Alvandi et al. 2014) بررسی شده است. در این بررسی تأثیر نماتودهای بیمارگر حشرات روی یاخته‌های خونی و فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز لارو پروانه موم‌خوار بزرگ به عنوان مدل آزمایشگاهی بررسی شد.

اندک زمانی پس از ورود لارو بیمارگر *G. mellonella* به حفره عمومی *H. bacteriophora* سامانه دفاع یاخته‌ای تحریک شده، شمار کل یاخته‌های خونی در واکنش به آن بی‌درنگ افزایش یافت. در بررسی دیگری نیز عنوان شده است که انگلی (پارازیت) شدن *Helicoverpa armigera* توسط نماتود *Ovomremis sinensis* باعث افزایش شمار کل یاخته‌های خونی می‌شود (Li et al. 2009). شمارش افتراقی یاخته‌های خونی در همان فاصله زمانی نشان داد که قسمت عمده افزایش تراکم یاخته‌های خونی مربوط به انواع گرانولوسیت و پلاسماتوسیت‌ها است. گرانولوسیت‌ها، یاخته‌هایی به شدت چسبنده هستند که شمار زیادی مولکول‌های شناسایی‌کننده¹ تولید می‌کنند که عمل شناسایی عامل بیگانه را ساده و آسان می‌کند (Strand 2008)، بنابراین، افزایش مشاهده‌شده در شمار گرانولوسیت‌ها طی زمان‌های اولیه ورود لارو بیمارگر نماتود، نشان‌دهنده عملکرد آن در فعال‌سازی سامانه دفاعی حشره در برابر عامل بیرونی است (Boucias and Pendland 1998, Roelwy and Ratcliffe 1980, Beckage 2008) و همچنین پلاسماتوسیت‌ها در کنار گرانولوسیت‌ها به‌عنوان یاخته‌های خونی مهم دخیل در پاسخ ایمنی حشرات شناخته شده‌اند (Pech and Strand 1996). با گذشت زمان حضور نماتود در هموسل لارو منجر به کاهش شمار کل یاخته‌های خونی و به‌دنبال آن شمار پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها شد. هم‌زمان با مشاهده این تغییرپذیری در جمعیت یاخته‌های خونی، با گذشت زمان، افزایش تراکم

علت وارد شدن در فعالیتهای ایمنی، کاهش می‌یابد (Yamashita and Iwabuchi 2001). در لارو پروانه موم‌خوار بزرگ تیمار شده با دو گونه نماتود، روند تغییرپذیری پروهموسیت کاهش بود، این کاهش مؤید نقش این نوع یاخته خونی در فعالیتهای دفاعی است. نتایج مشاهده‌های پاسخ یاخته‌ای و هیومرال نشان می‌دهد که گونه *H. bacteriophora* نسبت به گونه *S. feltiae*، در رویارویی با سامانه ایمنی تقابل شدیدتری دارد، در حالی که گونه *S. feltiae* با داشتن توانایی در پنهان ماندن و دوری از واکنش‌های ایمنی میزبان و نیز دفع موفق پاسخ‌های ایمنی، هم‌زمان با بروز عفونت خونی در آن، تقابل کمتری با سامانه ایمنی میزبان ایجاد می‌کند (Castillo et al. 2011). این ویژگی جنس *Steinernema* spp. باعث شده است در طول تکامل با صرف هزینه کمتر برای رویارویی با میزبان، دستیابی آسان‌تری به منابع میزبان داشته باشد.

شد. لارو بیمارگر *H. bacteriophora* در زمان اولیه ورود به هموسل باعث فعال‌سازی پاسخ هیومرال در میزبان شد. در مقابل، با ورود لارو بیمارگر گونه *S. feltiae* هیچ نوع واکنش هیومرال مشاهده نشد، ترکیبات سطح بدن نماتود در فعال‌سازی سامانه پروفنل‌اکسیداز نقشی مهم داشته و این ترکیبات در پوست *S. feltiae* باعث دفع سامانه ایمنی هیومرال می‌شوند (Brivio et al. 2002).

افزایش شمار انوسیتوئیدها در بازه زمانی بالاتر پس از تزریق، می‌تواند در ارتباط با نقش مهم این یاخته‌های خونی به‌عنوان منبع فنل‌اکسیداز باشد که به دنبال افزایش شمار آنها، به احتمال منجر به تولید بیشتر فنل‌اکسیداز از مسیر یاخته‌ای می‌شود (Ling and Yu 2006, 2005, Ribeiro Brehelin 2006).

پروهموسیت‌ها به‌مثابه یاخته‌های بنیادی هستند که در فرآیند واکنش، تبدیل به پلاسماتوسیت و گرانولوسیت، می‌شوند بنابراین با آغاز واکنش‌های دفاعی شمار آنها به

REFERENCES

- Altuntas H, Kilic AY, Uckan F, Ergin E (2012) Effects of gibberellic acid on hemocytes of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology* 41: 688-696.
- Alvandi J, Karimi J, Dunphy GB (2014) Cellular reactions of the white grub larvae, *Polyphylla adspersa*, against entomopathogenic nematodes. *Nematology* 16: 1047-1058.
- Aktorics K, Schean C, Papatheodorou P, Lang A (2012) Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. Bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. *Toxin* 60: 572-581.
- Brivio MF, Pagani M, Restelli S (2002) Immune suppression of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) humoral defenses induced by *Steinernema feltiae* (Nematoda, Rhabditida) involvement of the parasite cuticle. *Experimental Parasitology* 101: 149-156.
- Brivio MF, Mastore M, Pagani M (2005) Parasite-host relationship: a lesson from a professional killer. *Insect Science* 2: 41-53.
- Boucias DG, Pendland JC (1998) *Principle of insect pathology*, Kluwer Academic Publishers, Norewll, Massachusetts.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitating of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Beckage NE (2008) *Insect Immunology*, Academic Press. California.
- Castillo JC, Reynolds SE, Eleftherianos (2011) Insect immune responses to nematode parasites. *Trends in Parasitology* 27: 537-547.
- Dunphy GB, Webster JM (1984) Interaction of *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus* with the hemolymph of *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* 30: 883-889.
- Er A, Uc F, Kan DB, Rivers E, Ergin, Sak O (2010) Effects of parasitization and envenomation by the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) on hemocyte numbers, morphology, and viability of its host *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Annual review of Entomological Society of America* 103: 273-282.
- Ebrahimi L, Niknam G, Dunphy GB (2011) Hemocyte responses of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and the greater wax moth, *Galleria mellonella*, to the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Insect Science* 11: 1-13.
- Gupta AP (1972) *Insect hemocytes*. Cambridge University Press, New York.
- Grewal PS, Ehlers RU, Shapiro-Ilan DI (2005) *Nematode as biocontrol agent*, CABI Publishing. London.
- Iwamar R, Ashida M (1986) Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry* 16: 547-555.
- Kaya H, Lacey L (2007) Introduction to microbial control, In *Field manual of techniques in invertebrate pathology* (eds, Lacey L.A. and Kaya H.). Springer, 825. pp. Netherlands. 3-9.

- Karimi J, Kharazi-Pakdel A, Yoshiga T** (2009) Insect pathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, from Iran. IOBC/wprs Bulletin 45: 409-412.
- Mastore M, Brivio MF** (2008) Cuticular surface lipids are responsible for disguise properties of an entomoparasite against host cellular responses. *Developmental and Comparative Immunology* 32: 1050-1062.
- Nielsen-LeRoux CH, Gaudriault S, Ramarao N, Lereclus D, Givaudan A** (2012) How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Current Opinion in Microbiology* 15: 220-231.
- El-Aziz NM, Awad HH** (2010) Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. *Micron* 41:203-209.
- Lavine MD, Strand MR** (2002) Insect hemocyte and their role in cellular immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1237-1242.
- Li Q, Sun Y, Wang G, Liu X** (2009) Effect of the nematode *Ovomermis sinensis* on the hemocyte of its host *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology* 55: 47-50.
- Ling E, Yu X.-Q** (2005) Prophenoloxidase binds to the surface of hemocyte and involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1356-1366.
- Ribeiro C, Brehelin M** (2006) Insect hemocytes: what type of cell is that? *Journal of Insect Physiology* 52: 417-429.
- Rowley AF, Ratcliffe NA** (1980) Insect erythrocyte agglutinins. In vitro opsonization experiments with *Clitumnus extradentatus* and *Periplaneta americana* haemocytes. *Immunology* 40: 483-49.
- Pech LL, Strand MR** (1996) Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *Journal of Cell Science* 109: 2053-2060.
- Pandy JP, Tiwari RK** (2012) An overview of insect hemocyte science and its future application in applied and biomedical fields. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2: 82-105.
- Price CD, Ratcliffe A** (1974) A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders of blood. *Zellforsch* 147: 537-549.
- Strand M** (2008) Insect hemocyte and their role in immunity, in Beckage, N. E. *Insect Immunology*, Academic Press. California. 336 pp.
- SAS Institute** (2004) SAS Enterprise Guide ver.9.1.
- Thurston GS, Yule WN, Dunphy GB** (1994) Explanations for the low susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* to *Steinernema carpocapsae*. *Biological Control* 4: 53-58.
- Tsakas S and Marmaras VJ** (2010) Insect immunity and its signaling: an overview. *Insect Science Journal* 7: 228-238.
- Yamashita M, Iwabuchi K** (2001) *Bombix mori* prohemocytes division and differentiation in individual microcultures. *Journal of Insect Physiology* 47: 325-331.
- Vilcinskis A, Matha V** (1997) Effect of entomopathogenic fungi *Baeuveria bassiana* on the humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae (lep: Pyralidae). *European Journal of Entomology* 94: 461-472.
- Vega EF, Kaya HK** (2012) *Insect pathology* 2th edition, Academic Press, London, UK.
- Valadez-Lira JA, Alcocer-Gonzalez JM, Damas G, Nunez-Mejía G, Oppert B, Rodriguez-Padilla, Tamez-Guerra P** (2011) Comparative evaluation of phenoloxidase activity in different larval stage of four lepidopteron pests after exposure to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Science* 12: 1-11.
- Wang Y, Gugler R, Cui LW** (1994). Variation in immune response of *Popillio japonica* and *Acheta domesticus* to *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* species. *Journal of Nematology* 26: 11-18.

Fluctuations of haemocytes and phenol oxidase enzyme in the greater wax moth larvae, *Galleria mellonella* injected with *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema feltiae*

Zahra Rahatkhah¹, Javad Karimi^{2*}, Mohammad Ghadamyari³ and
Gholamhossein Morravej⁴

1, 2, 4. M.Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Protection,
Ferdowsi University of Mashhad, Iran

3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Guilan University, Iran

(Received: Feb. 4, 2015 - Accepted: Dec. 30, 2015)

ABSTRACT

Insect immunity comprises behavioral, physical and innate immunity. In this study, innate immune response of the greater wax moth larvae, *Galleria mellonella* against two species of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema feltiae*, as important biocontrol agents were studied. Total haemocyte count in larvae injected with *H. bacteriophora* increased immediately. In this case, plasmatocytes and granulocytes were the prevalent haemocyte types. The response of injected larvae with *S. feltiae* was different. There was no significant increase in haemocyte population by 15 min until 4 h after injection. Haemocyte populations in hemolymph of *G. mellonella* larvae after injection by both nematode species was decreased 8 and 12 h after post injection. In humoral response, *H. bacteriophora* caused a significant increase in phenoloxidase activity by 15 min until 8 h after injection to hemoceol. In contrast, phenoloxidase activity against *S. feltiae* showed lower fluctuation rather than those in treated larvae by *H. bacteriophora*. The result of cellular and humoral immune response of the larvae suggested that *H. bacteriophora* induced stronger reaction of the insect as compared with *S. feltiae*. The latter species not only evades of host immune response but also can suppress the immune responses, successfully. These, eventually suggests a weak interaction between the pathogen with host immune system.

Keywords: Insect immunity, cellular response, humoral response, insect pathology, entomopathogenic nematod.