بیست‌ودومین کنگره گیاهپزشکی ایران

۶ تا ۹ شهریور ۱۳۹۵- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

مجموعه مقالات کنگره

تدوین: رضا طلایی حسنلویی

استاد دانشگاه تهران

بررسی سیستم دفاعی *Spodoptera exigua* در مقابل نماتود بیمارگر حشرات: نوسان سکروپین و سلول‌های خونی در طول آلودگی

ریحانه درسویی و جواد کریمی

آزمایشگاه پاتولوژی و کنترل بیولوژیک حشرات، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
Darsouei@stu.um.ac.ir

به‌دلیل رابطه منحصر به فرد *Steinernema carpocapsae* با *Xenorhabdus nematophila* بررسی سیستم ایمنی حشره میزبان در مقابل نماتود منوزنیک، باکتری همزیست و نماتود آگزنیک می‌تواند از اهمیت بالایی برخوردار باشد. در این بررسی بیان پپتید ضدمیکروبی سکروپین در لارو *Spodoptera exigua* در سه تیمار *S. carpocapsae* منوزنیک، *S. carpocapsae* آگزنیک و باکتری *X. nematophila* در ۲، ۴، ۸ و ۱۲ ساعت پس از تزریق اندازه‌گیری شد. در این بررسی همولنف لاروهای تیمار شده در زمان‌های مشخص همولنف جمع‌آوری و سپس RNA آن‌ها استخراج گردید. غلظت تمام RNA ها به ۱۰۰۰ نانوگرم رسانده شد و با غلظت‌های یکسان cDNA سنتز شد. در نهایت با استفاده از پرایمر اختصاصی، بیان سکروپین از نظر کمی با استفاده از تکنیک Real Time PCR اندازه‌گیری و از ژن EF2 به‌عنوان ژن housekeeping استفاده شد. نتایج نشان داد که نماتود منوزنیک قوی‌ترین اثر را در برابر سرکوب سیستم ایمنی حشره داشت. بیان سکروپین در لارو تیمار شده با نماتود منوزنیک *S. carpocapsae* و *X. nematophila* به ترتیب در ۸ و ۴ ساعت پس از تزریق به بیش‌ترین مقدار خود رسید و سپس کاهش یافت. در نماتود منوزنیک $2^{-\Delta\Delta Ct}$ در ۸ ساعت پس از تزریق به ۰/۹۶ و در باکتری همزیست در ۴ ساعت پس از تزریق به ۰/۵۶ رسید. در حالی‌که در لارو تیمار شده با نماتود آگزنیک، سطح بیان ژن سکروپین ثابت و پایین بود (میزان $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بین ۰/۰۲ تا ۰/۰۴ متغییر بود). دلیل این امر عاری بودن نماتود آگزنیک از باکتری همزیست بوده و نتایج این بررسی بیانگر این است که پپتید ضدمیکروبی سکروپین در زمان مواجه میزبان با نماتود *S. carpocapsae* آگزنیک القا نمی‌شود. الگوی بیان ژن سکروپین در زمان‌های مورد بررسی با واکنش‌های دفاع سلولی مطابقت داشت. شمارش سلول‌های خونی در لارو *S. exigua* نشان داد که تعداد کل سلول‌های خونی در لارو تیمار شده با نماتود منوزنیک، نماتود آگزنیک و باکتری همزیست به‌ترتیب ۱۲، ۴ و ۸ ساعت پس از تزریق به بیش‌ترین مقدار خود رسید. هم‌چنین، تعداد گرانولوسیت‌ها در لارو تیمار شده با نماتود منوزینک، آگزنیک و باکتری همزیست در ۸، ۲ و ۴ ساعت پس از تزریق افزایش یافت و به بیش‌ترین مقدار خود رسید. در میان سه تیمار مورد بررسی تعداد سلول‌های خونی در لارو تزریق شده با نماتود آگزنیک نسبت به سایر تیمارها تراکم بیشتری داشت، دلیل این امر عاری بودن نماتود از باکتری همزیستش *X. nematophila* بوده که مخرب سلول‌های خونی می‌باشد. نتایج دفاع سلولی و بیان ژن سکروپین نشان داد که حضور همزمان نماتود و باکتری همزیست روی غبله‌بر سیستم ایمنی اثر سینرژیست داشته و سیستم ایمنی میزبان را سرکوب می‌کنند. تحقیق جاری دیدگاهی جدید در زمینه‌ی الگوی بیان پپتیدهای ضدمیکروبی در طول بیماری‌زایی کمپلکس نماتود-باکتری باز کرد. هدف ما استفاده از این یافته‌ها برای فهم بهتر سازوکارهایی سیستم ایمنی میزبان در مقابل آلودگی به بیمارگر خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: سیستم ایمنی، پپتید ضدمیکروبی، نماتود، باکتری همزیست.

Dissecting the immune defense of *Spodoptera exiguae* against the entomopathogenic nematodes: fluctuation of Cecropin and haemocytes during infection

Reyhaneh Darsouei and Javad Karimi

Biocontrol and Insect Pathology Lab., Department of Plant Protection, School of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
Darsouei@stu.um.ac.ir

Due to the unique relationship of *Steinernema carpocapsae* with *Xenorhabdus nematophila*, survey on host immune system against monoxenic nematode, symbiotic bacteria and axenic nematode could be an important criterion. Here we measured the expression of cecropin of *Spodoptera exigua* larvae in three status including treated with monoxenic *S. carpocapsae*, axenic *S. carpocapsae* and *X. nematophila* at specified intervals, 2, 4, 8 and 16 hour post injection. In current study the haemolymph of treated larvae were collected, RNA extracted, the concentration of all extracted RNA were 1000 ng and cDNA synthesized by equal concentration. Finally, cecropin expression was measured with specific primer and Real Time PCR. Here EF2 gene was used as a housekeeping gene. The obtained results indicated monoxenic nematode is the strongest agent for suppression immune system of insect. The expression of cecropin in treated larvae with monoxenic *S. carpocapsae* and *X. nematophila* at 8 and 4 hour post injection reached to the maximum amount respectively, and then decreased. In monoxenic nematode 2^ΔΔCt at 8 hour post injection reached to 0.96 and in symbiotic bacteria treatment at 4 hour post injection was 0.56. While, in injected larvae with axenic nematode, expression level of cecropin were low and stabale. (2^ΔΔCt value was variable between 0.2 to 0.4). The obtained results indicated the cecropin doesn't induce in the host when infected with axenic nematode, *i.e* nematodes without symbiotic bacterium. The fluctuation pattern of the cecropin expression was in agreement of cellular response. The results about calculation of haemocytes change of the larvae indicated total haemocytes in treated larvae with monoxenic nematode, axenic nematode and symbiotic bacteria at 12, 4 and 8 hour post injection were increased to maximum rate, respectively. Also, the number of granulocytes in treated larvae with monoxenic, axenic and symbiotic bacteria at 8, 4 and 2 hour post injection were increased to maximum amount. Among the three treatments, total haemocyte count in treated larvae with axenic nematodes reached to 50 cells that more than other treatments, caused by axenic nematode, while symbiotic bacterium, *X. nematophila*, was absent. The results of cellular defense and cecropin expression showed synergistic effect of the nematode and its bacterium in the suppression of insect immune system. The current work provided new insight into expression pattern of AMPs during pathogenesis of bactohelminthic complex. We will discuss about utility of these finding for better understanding mechanisms of the host immunity versus pathogen infection.

Keywords: Immune system, Antimicrobial peptide, Nematode, Symbiotic bacteria