

صلى الله عليه وسلم



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد حشره شناسی

پاسخ ایمنی لارو بید کلم (*Plutella xylostella* (Linnaeus)

به باکتری بیماریزای *Bacillus thuringiensis*

نگارنده : مجتبی زارعی

استاد راهنما :

دکتر مریم عجم حسنی

اسفند ۱۴۰۰

تقدیم بہ:

ہمسر عزیزم ہمراہ ہمیشگی زندگیم

و محضراز شمنیدرم

و روح مادر عزیزم

کہ بامہربانی چگونہ زیستن را بہ من آموختہ 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 که در تمام طول زندگی‌مان با وجود مشغله‌های فراوان همواره صبوری پیشه کرده و مشوق من بوده و همچنین پدر بزرگوارم که وجودشان همیشه گرمابخش زندگی‌م بوده و در پشت سر گذاشتن این مسیر ، همواره پشتیبان و مشفق من بودند بی نهایت متشکرم و همواره قدردان همدلی‌ها و محبت‌هایشان هستم . سعادت ، سلامت و بهروزشان را از خداوند منان خواستارم و همچنین روح مادر نازنینم که یاد ایشان همیشه تسلای خاطر‌م بوده از پروردگار عالم تمنای آرامش ابدی دارم .

تقدیر می‌کنم ، از استاد ارجمندم سرکار خانم دکتر عجم حسنی به عنوان استاد راهنما به پاس زحمات و الطاف بی‌نهایتشان که مرا در طی این دوره ، صبورانه راهنمایی و یاری نمودند .

همچنین از اساتید بزرگوارم جناب آقای دکتر علی درخشان شادمهری و آقای دکتر مسعود حکیمی تبار که اندوخته و تجربیات فراوانشان را در طی دوران تحصیل دلسوزانه در اختیارمان قرار دادند سپاسگذارم. امید است بتوانم ادای دین نمایم و به خواسته‌ی ایشان جامه عمل بپوشانم .

الهی ، سلامت و سعادت ایشان را از درگاهت خواستارم .

تعهد نامه

اینجانب مجتبی زارعی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته حشره شناسی کشاورزی/ دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه پاسخ ایمنی لارو بید کلم (*Plutella xylostella* (Linnaeus) به باکتری بیماریزای *Bacillus thuringiensis* تحت راهنمایی دکتر مریم عجم حسنی متعهد می شوم

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید . حقوق معنوی تمام افرادی که در به 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

بید کلم با نام علمی *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) از آفات مهم خانواده چلیپاییان یا کلمیان است که هر ساله خسارت شدیدی به انواع کلم مانند گل کلم، کلم پیچ، کلم بروکلی، کلم قمری و همچنین کلزا، شلغم، خردل، تربچه و شاهی وارد می کند. کنترل این آفت مهم مزارع کلزای کشورمان عمدتاً با استفاده از روشهای مختلف شیمیایی و باکتری بیماریزای *Bacillus thuringiensis* انجام می شود. مطالعات بر هم کنش بین عوامل بیمارگر و عوامل دفاعی حشرات در سال های اخیر رو به رشد چشمگیری داشته است چرا که نتایج این تحقیقات می تواند در اتخاذ روشهای کنترل میکروبی مناسب علیه آفات مثر ثمر باشد. همولنف حشرات حاوی مهمترین اجزای دفاعی یعنی هموسیت هاست. خون در انتقال و ذخیره غذا و دفاع در مقابل میکروارگانیسمها فعالیت می کند. موفقیت سیستم ایمنی وابسته به تعداد و تیپ سلولهای خونی است. گاه عملکرد خوب سلولهای خونی مانع پیشرفت آلودگی در بدن می شود. در پژوهش حاضر، تاثیر باکتری بیماریزای *Bacillus thuringiensis* و تنش های دما بر فراوانی هموسیت ها و فعالیت فنل اکسیداز بررسی شد. ابتدا غلظت زیر کشنده باکتری با استفاده از آزمون زیست سنجی تعیین شد. برای این منظور ۳۰۰ لارو هم سن بید کلم در ۴ تکرار به همراه برگ های کلزای آلوده شده به غلظت های مختلف باکتری شامل ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ پی پی ام در ظروف پتری قرار داده شدند و تلفات لاروها بعد از ۲۴ ساعت ثبت شد. سپس با مشخص شدن غلظت ۴۰ پی پی ام به عنوان غلظت زیر کشنده آزمایشات ایمنی شناسی انجام شد. در آزمایش اول ایمنی شناسی، برگهای کلزا با غلظت زیر کشنده باکتری تیمار شده ، لاروهای سن دو ، سه ، چهار و پنج پس از تغذیه از برگها در فواصل ۱۲ و ۲۴ ساعت خون گیری شدند. در آزمایش دوم نیز لاروها به مدت ۱۲ ساعت در دو دمای ۴ و ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و تنش دما روی هموسیت های آنها بررسی شد. نتایج نشان داد که تغذیه از برگ های کلزای آلوده به باکتری پس از گذشت ۱۲ و ۲۴ ساعت سبب افزایش معنی دار کل سلول ها، پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها و فعالیت فنل اکسیداز نسبت به شاهد شد. تنش های دمایی نیز افزایش فراوانی هموسیت ها و فعالیت فنل اکسیداز را نسبت به شاهد سبب شدند که این افزایش در لاروهایی که تنش دمای بالا را تحمل کرده بودند معنی دار بود. قطعاً تحقیقات تکمیلی نیاز است تا بتوان با شناخت ویژگی های ایمنی جمعیت های حساس و مقاوم بید کلم، امکان استفاده از روش های کنترل میکروبی را علیه آن ارزیابی نمود.

کلمات کلیدی: بید کلم، فراوانی سلولهای خونی، باکتری بیماریزای باسیلوس تورنژینسیس، دما

فهرست مطالب

فصل اول	۱
مقدمه و کلیات	۱
۱-۱ مقدمه و کلیات :	۲
۲-۱ اهداف تحقیق	۳
فصل دوم	۵
بررسی منابع	۵
۱-۲ معرفی آفت :بید کلم یا شب پره پشت الماسی (<i>Plutella xylostella</i> (L.)	۶
۲-۲ مورفولوژی آفت	۷
۱-۲-۲ حشره بالغ	۷
۲-۲-۲ تخم	۸
۳-۲-۲ لارو	۹
۴-۲-۲ شفیره	۱۰
۳-۲ بیولوژی شب پره پشت الماسی	۱۱
۴-۲ میزبانهای گیاهی	۱۲
۵-۲ خسارت	۱۲
۶-۲ سازوکارهای دفاعی درحشرات	۱۴
۱-۶-۲ دفاع غیراختصاصی	۱۴
۲-۶-۲ دفاع اختصاصی ایمنی	۱۴
۷-۲ همولنف حشرات	۱۴
۸-۲ سلول های خونی	۱۴
۹-۲ انواع سلول های خونی	۱۶
۱۰-۲ اعمال سلول های خونی	۱۷
۱-۱۰-۲ ایجاد لخته و ترمیم زخم	۱۷
۲-۱۰-۲ بیگانه خواری	۱۷
۳-۱۰-۲ تشکیل کپسول و ملانیزاسیون	۱۷
۴-۱۰-۲ تشکیل گره	۱۸
۱۱-۲ آنزیم فنل اکسیداز	۱۸
۱۲-۲ تحقیقات انجام شده در مورد شناسایی سلول های خونی	۱۹
۱۳-۲ تحقیقات انجام شده در مورد تاثیر عوامل بیمارگر بر سیستم ایمنی حشرات	۲۱

۲-۱۴	تحقیقات انجام شده در مورد تاثیر تنش های دمایی بر سیستم ایمنی حشرات	۲۱
۲۳	فصل سوم	
۲۳	موادوروش ها	
۳-۱	کشت گیاه میزبان	۲۴
۳-۲	پرورش بید کلم	۲۴
۳-۳	شناسایی سلول های خونی بید کلم	۲۴
۳-۴	شمارش کل سلول های خونی	۲۵
۳-۵	شمارش تفرقی سلول های خونی	۲۶
۳-۶	سمیت حشره کش بیولوژیک <i>Bacillus thuringiensis</i> روی لارو سن پنج بید کلم	۲۶
۳-۷	بررسی ایمنی لارو بید کلم در برابر باکتری بیماریزای <i>Bacillus thuringiensis</i>	۲۷
۳-۸	بررسی ایمنی بید کلم در مقابل تنش های دما	۲۸
۳-۹	تعیین فعالیت فنل اکسیداز:	۲۸
۲۹	فصل چهارم	
۲۹	نتایج و بحث	
۴-۱	شناسایی انواع سلول های خونی :	۳۰
۴-۲	شمارش کل (total hemocyte count) سلول های خونی بید کلم	۳۱
۴-۳	سمیت حشره کش بیولوژیک <i>Bacillus thuringiensis</i> بر لارو سن پنج بید کلم	۳۹
۴-۴	بررسی تاثیر <i>B.t</i> روی تعداد کل و انواع سلولهای خونی لارو سن پنج بید کلم	۳۹
۴-۵	بررسی تاثیر <i>B. t</i> بر فعالیت آنزیم فنلاکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم	۴۲
۴-۶	بررسی تاثیر دماهای مختلف روی تعداد سلول های خونی لاروهای سن پنج بید کلم	۴۳
۴-۷	بررسی تاثیر تنش های دمایی مختلف بر فعالیت آنزیم فنلاکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم	۴۶
۴-۸	بحث	۴۸
۵۵	منابع	

فهرست اشکال

- شکل ۱-۲ حشره کامل بید کلم (اصلی) ۷
- شکل ۲-۲ تخم بید کلم (اصلی) ۸
- شکل ۲-۳ لارو بید کلم (اصلی) ۹
- شکل ۴-۲ شفیره بید کلم (اصلی) ۱۰
- شکل ۵-۲ خسارت بید کلم روی گیاه کلزا (اصلی) ۱۳
- شکل ۱-۳ (الف) جمع آوری همولنف لاروهای بید کلم با میکروپیت - (ب) قرار دادن همولنف مخلوط شده با محلول تایسون روی لام نئوبار جهت شمارش سلول های خونی ۲۶
- شکل ۱-۴ تصاویر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰) از سلول های خونی رنگ آمیزی شده با Giemsa در لارو سن پنج حشره *Plutella xylostella* ۳۱
- شکل ۲-۴ فراوانی کل سلول های خونی در همولنف لاروهای سنین مختلف و شفیره و حشره بالغ بید کلم ۳۲
- شکل ۳-۴ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی لارو سن دو بید کلم ۳۳
- شکل ۴-۴ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی لارو سن سه بید کلم ۳۴
- شکل ۵-۴ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی لارو سن چهار بید کلم ۳۵
- شکل ۶-۴ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی لارو سن پنج بید کلم ۳۶
- شکل ۷-۴ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی شفیره بید کلم ۳۷
- شکل ۸-۴ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی حشره کامل بید کلم ۳۸
- شکل ۹-۴ تاثیر باکتری B. t بر تعداد کل هموسیت های لاروهای سن پنج بید کلم ۴۰
- شکل ۱۰-۴ تاثیر باکتری B. t بر تعداد گرانولوسیت های لاروهای سن پنج بید کلم ۴۰
- شکل ۱۱-۴ تاثیر باکتری B. t بر تعداد پلاسموتوسیت های لاروهای سن پنج بید کلم ۴۱
- شکل ۱۲-۴ تاثیر باکتری B. t بر تعداد پروهموسیت های لاروهای سن پنج بید کلم ۴۱
- شکل ۱۳-۴ تاثیر باکتری B.t بر فعالیت آنزیم فنلاکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم ۴۲
- شکل ۱۴-۴ تاثیر تنش دما بر تعداد کل هموسیت های لاروهای سن پنج بید کلم ۴۴
- شکل ۱۵-۴ تاثیر تنش دما بر تعداد گرانولوسیت های لاروهای سن پنج بید کلم ۴۴
- شکل ۱۶-۴ تاثیر تنش دما بر تعداد پلاسموتوسیت های لاروهای سن پنج بید کلم ۴۵
- شکل ۱۷-۴ تاثیر تنش دما بر تعداد پروهموسیت های لاروهای سن پنج بید کلم ۴۵
- شکل ۱۸-۴ تاثیر تنش دما بر تعداد اونوسیتوئیدهای لاروهای سن پنج بید کلم ۴۶
- شکل ۱۹-۴ تاثیر تنش دما بر فعالیت آنزیم فنلاکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم ۴۷

فهرست جداول

جدول ۴-۱ سمیت حشره کش بیولوژیک <i>Bacillus thuringiensis</i> بر لارو سن پنج بید کلم <i>Plutella</i>	
.....xylostella	۳۹

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه و کلیات :

گیاه کلم از تیره کروسیفر یا چلیپائیان (Brassicaceae) است. گیاهان تیره کروسیفر با حدود ۳۵۰ جنس و بیش از ۳۵۰۰ گونه، دارای ارزش اقتصادی بسیار بالایی به صورت تازه یا فرآورده می باشد. این گیاهان منبع ادویه، روغن های خوراکی و صنعتی، غذای دام و کود سبز به حساب می آیند (Talekar und Shelton, ۱۹۹۳). گیاهان تیره چلیپائیان در آب و هوای گرمسیری و معتدل و در سیستم های محصولی مختلف از باغچه های حیاط گرفته تا زمین های زراعی کاملاً مکانیزه و در سطح گسترده کشت می شوند. چلیپاییان در رژیم غذایی اکثر کشورها سبزیجاتی پرمصرف هستند (Talekar and Shelton, ۱۹۹۳). سبزی های این خانواده به دلیل داشتن روغن خردل اشتهاآور بوده و اگر چه اکثراً مصرف تازه خوری دارند ولی برخی نظیر گل کلم بیشتر در صنایع تبدیلی استفاده می شوند (خانجانی، ۱۳۸۵).

در سال ۲۰۰۳ مناطق گسترده ای در دنیا خردل (Mustard)، کلم گل (Cauliflower) و کلم (Cabbage) کشت می شده است که حدود ۰/۸۶ الی ۰/۸۸ میلیون هکتار تخمین زده می شده است (Talekar and Shelton, 1993). در کشور ما در مورد سطح زیر کشت و میزان تولید این گیاهان اطلاعات کاملی وجود ندارد، ولی میزان مصرف آن ها در کشور با توجه به تنوع محصولات این تیره، بالاست (خانجانی، ۱۳۸۵).

در اواسط قرن بیستم همزمان با به وجود آمدن سموم مصنوعی دفع حشرات آفت و عملکرد مناسب و اثر قاطع برخی از این سموم مخصوصاً سموم فسفره، عرضه ای این محصولات زیاد شد و در طول سال های اخیر مصرف بیش از حد این سموم جزو مرسوم ترین روش های کشاورزی محسوب می شود. پیدایش نسل مقاوم به سموم شیمیایی در بین جمعیت آفات، همچنین مسئله ای باقیمانده ای سموم و تاثیر مخرب زیست محیطی، بوجود آمدن آفات ثانویه و نابود شدن دشمن طبیعی از مشکلات جدی استفاده سموم شیمیایی به حساب می آید. باتوجه به این شرایط شیوه های زیادی مورد تحقیق قرار گرفتند و بالاخره شیوه مدیریت تلفیقی آفات برای سلامت محصول با کمترین اثرات سوء و کنترل و مدیریت پایدار آفات مورد تایید و انتخاب قرار گرفت. یکی از شیوه های مهم مهار آفات که امروزه در مدیریت تلفیقی آفات درخور توجه است،

روش کنترل بیولوژیک است. بکار گرفتن عوامل بیمارگر یا فراورده‌های آن‌ها برای مهار جمعیت آفات در واقع قسمتی از مبارزه بیولوژیک است که در آن از عوامل میکروارگانیسم برای کاهش جمعیت آفات هدف استفاده می‌شود.

عوامل بیمارگر تنوع خیلی زیادی دارند که مهم‌ترین آنها *Bacillus thuringiensis* می‌باشد. این باکتری یکی از موفق‌ترین عوامل کنترل میکروبی بوده و امروزه به عنوان یک حشره کش میکروبی بکار برده می‌شود. *B.thuringiensis* تحت نام‌های تجاری مختلفی در کشورهای زیادی برای کنترل بسیاری از آفات با طیف وسیع استفاده شده است. از عواملی که باعث شده تا این باکتری به عنوان یک عامل بیولوژیک موفق معرفی شود، می‌توان به طیف وسیع تاثیر آن علیه لاروهایی از راسته بال پروانه‌ها و نداشتن اثرات بیماری زایی روی مهره داران از جمله انسان را اشاره کرد. همچنین تولید آسان و داشتن خاصیت نسبتاً مناسب انبارداری به خصوص در حالت ترکیب پودری و کاهش مقاومت حشرات نسبت به این باکتری باتوجه به مصرف مکرر آن از جمله مزایای استفاده از این سم میکروبی می‌باشد.

با توجه به اهمیت کاربرد باکتری *B.t* در کنترل بید کلم و از طرفی شناخت بیشتر ویژگی‌های بید کلم در تحقیق حاضر اهدافی مد نظر قرار داده شد.

۱-۲ اهداف تحقیق

- شناسایی انواع هموسیت‌های در گردش همولنف بید کلم و تعیین فراوانی آن‌ها در سنین لاروی
- مطالعه تعداد تفرقی سلولهای خونی در لاروهای سنین مختلف، شفیره و بالغین بید کلم
- تعیین وضعیت ایمنی سلولی لاروهای سن پنجم بید کلم در برابر غلظت زیر کشنده باکتری *B.t*
- تعیین وضعیت ایمنی سلولی لاروهای سن پنجم بید کلم تحت تاثیر تنش‌های دمایی
- تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز لاروهای تحت تاثیر باکتری *B.t* و تنش‌های دمایی

فصل دوم

بررسی منابع

۱-۲ معرفی آفت: بید کلم یا شب پره پشت الماسی *Plutella xylostella*(L.)

بید کلم، مهم‌ترین آفت چلیپائیان در سرتاسر دنیا و مهم‌ترین آفت مزارع کلم‌پیچ و کلم‌گل در ایران می‌باشد و به چلیپائیان دیگر نظیر شلغم، تربچه، ترب و کلزا نیز خسارت می‌زند (Afiunizadeh et al., 2013; Furlong et al., 2011).

در سال‌های اخیر بید کلم در ایران حالت طغیانی پیدا کرده است، به‌طوری‌که استفاده از انواع حشره‌کش‌های متداول حتی تا ده برابر دوزهای توصیه‌شده قادر به کنترل این آفت نیستند (Afiunizadeh and Karimzadeh, 2015). پیدایش آفت به طور اتفاقی از اروپا (مدیترانه) گزارش شد اما امروزه از سراسر اروپا، آفریقای شمالی و جنوبی، آسیا، استرالیا، آمریکای شمالی و جنوبی و نواحی معتدل گزارش شده است (Hardly, 1938).

این حشره در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۱۷ توسط افشار به صورت یکی از آفات مهم کلم شرح داده شده است (خانجانی، ۱۳۸۵). بید کلم در ایران در سواحل دریای خزر و اطراف تهران (مرزبان و بنی‌عامری، ۱۳۸۳)، فارس (اللهیاری و تقی‌زاده، ۱۳۷۹) و احتمالاً در تمام نقاط کشور انتشار دارد (خانجانی، ۱۳۸۵). این آفت در تمام طول سال به جز یک دوره محدود در فصل بارش گیاهان میزبان خود را تهدید می‌کند.

عمده خسارت آفت مربوط به مرحله ی لاروی است. لاروهای آن به تمام قسمت های گیاه اعم از ساقه، برگ، دم برگ، گل، اندام های بذری حمله کرده و در جمعیت های بالا باعث تخریب شدید مزرعه و در مرحله ی گیاهچه باعث مرگ گیاهچه و در مرحله تشکیل جوانه های گلدهی با تخریب آن ها مانع از تشکیل اندام های گلدهی می شوند. در مواردی به جز رگبرگ، تمام قسمت های آن توسط لارو آفت خورده می شود. بطوری که نابودی ۷۰ الی ۹۰ درصد محصول دور از انتظار نیست. بیشترین خسارت آن در کلزا در اوج گلدهی و غلاف بندی است که مصادف با نسل دوم آفت هست (Harcourt, 1975; Mitchell et al, 1997).

۲-۲ مورفولوژی آفت

۱-۲-۲ حشره بالغ

طول بدن حشرات کامل هفت میلی متر و عرض بدن حشره با بال های باز ۱۷-۱۱ میلی متر می باشد. رنگ بدن پروانه خاکستری تیره و رنگ بال های جلویی قهوه ای متمایل به زرد همراه با نقطه ها یا لکه های سیاه رنگ است. بال های جلویی باریک و لبه های خارجی گرد است که مجهز به ریشک های بلند می باشد. در حاشیه عقبی بال های جلویی، نوار سفیدرنگ موج داری وجود دارد که موقع جمع شدن بال ها و هنگامی که دلبه سفید کنار هم قرار می گیرند، نقش نقره ای در پشت بال ها ایجاد می کند و به همین جهت به آن ها شب پره پشت الماسی گفته می شود. همچنین اندازه پروانه های نر و ماده یک اندازه می باشد (خانجانی، ۱۳۸۵). به طور متوسط ماده ها ۱۶/۲ و نرها ۱۲/۱ روز زنده هستند، حشره ماده تخم های خود را در حدود ۱۰ روز می گذارد، محدوده تخم هایی که حشره ماده می گذارد از ۱۸ تا ۳۵۶ تخم و به طور متوسط ۱۵۹

عدد است (خانجانی، ۱۳۸۴)



شکل ۱-۲ حشره کامل بید کلم (اصلی)

۲-۲-۲ تخم

تخم های این حشره ، بیضوی (۰/۴۴-۰/۲۶ میلی متر) به رنگ سبز کمرنگ یا زرد در مراحل اولیه ی رشد و در مراحل نهایی رشد تیره بوده و متناسب با سطح برگ به صورت انفرادی یا گروهی ۸ - ۲ تایی در هر دو طرف برگ و نزدیک رگبرگ ها و در گودی برگ ها یا روی ساقه های جوان در موارد نادر در قسمت های دیگر گیاه گذاشته می شوند . قبل از تفریخ ، تخم ها تیره شده و لاروهای جوان که در زیر پوشش تخم قرار دارند، قابل مشاهده هستند (Hartcourt,1975 : Capinera,2001)



شکل ۲-۲ تخم بید کلم (اصلی)

لاروهای این حشره، کوچک سبزرنگ و بسیار فعال بوده و در مواقع احساس خطر به شدت پیچ و تاب خورده و از طریق ترشح تار ظریفی از محل خطر فرار می کنند. طول بدن لاروی از سن یک تا چهار به ترتیب حدود ۱/۷ الی ۳/۵، ۷، ۱۱/۲ میلی متر هست. عرض کپسول سر لاروی نیز از سن یک تا چهار به ترتیب حدود ۰/۱۶، ۰/۲۵، ۰/۳۷، ۰/۶۱ میلی متر هست. لاروها دارای موهای ریز و کوتاه در طول بدن خود می باشند که در هاله سفیدرنگ موجود در سطح پوست محصور شده اند. علاوه بر سه جفت پای قفس سینه، دارای پنج جفت پای کاذب شکمی در قسمت جلو شکم و یک جفت پای کاذب شکمی پای آنال در قسمت انتهایی شکم هست. پاهای آنال در تمام سنین لاروی به نحوی قرار گرفته اند که از دید انتهایی V شکل دیده می شوند. لاروها ممکن است در سنین اولیه با لارو سنین اول کرم غوزه هلیوتیس اشتباه گرفته شوند (Capintera, 2001).

لاروها در ابتدای دوره زندگی شان بی رنگ می باشند، اما به تدریج به رنگ سبز درمی آیند. در ابتدا عادات غذایی لاروها به شکل مینوز برگ فعالیت می کند، ولی در پایان سن اول از حالت مینوز خارج شده و پس از آن از اپیدرم پایینی برگ تغذیه می کنند (خانجانی، ۱۳۸۴)



شکل ۲-۳ لارو بید کلم (اصلی)

۴-۲-۲ شفیره

شفیره های این حشره در روزهای ابتدایی تشکیل سبزرنگ، سپس زرد و قهوه ای رنگ، به طول حدود ۱۰ تا ۱۲ میلی متر و در داخل پیله ابریشمی در تمام سطح گیاه در برگ و معمولا در سطح زیرین برگ ها اتفاق می افتد (Capinera, 2011; Talhouk, 1996; Klinkowaski, 1976).

در کلم گل و کلم سیاه (ایتالیایی) شفیرگی معمولا روی گل های کوچک (گلچه) اتفاق می افتد. متوسط دوره شفیرگی در حدود ۸/۵ روز است (Anonymous, 2005; Capinera, 2011).



شکل ۴-۲ شفیره بید کلم (اصلی)

۲-۳ بیولوژی شب پره پشت الماسی

شب پره پشت الماسی به عده ای از گیاهان خانواده چلیپاییان بالاخص انواع کلم (کلم برگ، کلم گل و کلم قمری، شلغم، کلزا، خردل و کروسيفرهای وحشی حمله می کند . افراد بالغ می توانند تا ۷ الی ۹ هفته زنده بمانند، اما معمولاً طول عمر آن ها نزدیک به دوهفته می باشد (Harcourt, 1957). حشرات کامل معمولاً در طول روز روی گیاهان میزبان استراحت کرده و کمی قبل از غروب فعال شده و بیشترین جفت گیری و تخم ریزی در این زمان رخ می دهد. حشرات کامل معمولاً از شهدگلها تغذیه میکنند. حشره ماده بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ تخم به طور متوسط ۱۵۰ تخم می گذارد که در مدت ۶/۵ روزتفریخ می گردند. تخم ها بیشتر در نزدیک رگبرگ ها گذاشته شده و لاروهای سن یک پس از خروج از تخم ، رگبرگ اصلی راسوراخ کرده و شروع به تغذیه می کنند. لاروها علاوه بر تغذیه از برگ ، فضولات سیاه رنگی نیز برجا می گذارند که باعث کثیف شدن بوته ها می شود (خانجانی ۱۳۸۴). معمولاً نسبت تخم های گذاشته شده روی قسمت بالا به پایین برگ ۳ به ۲ می باشد و به ندرت اتفاق می افتد که این حشره روی ساقه تخم گذاری کند (Avrduc, 1987). این حشره دارای ۴ سن لاروی می باشد که از همه قسمت های برگ به جز قسمت مومی برگ و بیشتر از سطح زیرین برگ تغذیه می کنند و برگ را به حالت پنجره ای درمی آورند. دما در طول دوره لاروی اثرگذار است (Bhalla) and Dubey, 1986). گلی زاده (۱۳۸۶) دوره های رشد و نموی مراحل مختلف رشدی را برای شب پره پشت الماسی را در دماهای ۳۵، ۳۲، ۳۰، ۲۵، ۲۸، ۲۰، ۱۵، ۱۰ درجه سانتی گراد در منطقه تهران را محاسبه کرد . متوسط طول دوره رشدی در ۲۵ درجه برای تخم $2/86 \pm 0/03$ ، برای لارو $7/38 \pm 0/14$ برای پیش شفیره ، $0/51 \pm 0/09$ و برای شفیره $3/35 \pm 0/12$ و مجموعاً $14/2 \pm 0/12$ روز گزارش کرد. شفیره این حشره ظریف و به طول ۱۰ تا ۱۲ میلی متر و به رنگ زرد روشن متمایل به قهوه ای است که داخل پیله نازک به پشت برگ می چسبد (Talhouk, 1969). طول دوره شفیرگی ۵ تا ۱۵ روز می باشد. پروانه های ماده یک روز بعد از جفتگیری ، تخم های خود را در سطح برگ ها و یا کنار رگبرگ ها قرار می دهند (Wang et al., 2005). حشرات بالغ عمده فعالیت خود را شب انجام می دهند (Harcourt, 1957). بید کلم حشره ای چند نسلی است و معمولاً می تواند تا ۱۲ نسل داشته باشد (Rivaney, 1962).

(نسبت جنسی حشرات کامل درمزرعه معمولاً ۱:۱ بوده و بیشتر جفتگیری ها در همان روز خروج از شفیره روی می دهد. باروری در اولین نسل سال در بالاترین حد بوده و به تدریج در ادامه فصل کاهش می یابد (Capinera, 2001).

۲-۴ میزبان های گیاهی

تیره چلیپائیان یا Brassicacae شامل سبزی های بسیار متنوعی می شود که در میان آن ها کلم ها با بالاترین تنوع از اهمیت بیشتری برخوردار می باشند . به غیر از کلم ها که دوساله هستند، بقیه سبزی ها یکساله محسوب می شوند، همگی جزء گیاهان فصل سرد بوده و حساسیت بالایی نسبت به گرمای زیاد دارند (خانجانی، ۱۳۸۵). پروانه بید کلم به برگ عده ای از گیاهان خانواده چلیپائیان بالاخص انواع کلم (کلم برگ، کلم گل، کلم قمری، کلم پیچ، کلم دکمه ای ، کلم سیاه، کلم چینی) ، شلغم، کلزا، خردل، تربچه، کلم سبز، شاهی و دیگر گیاهان وحشی تیره چلیپائیان) حمله می کند. اگرچه همه این ها ترجیح یکسانی ندارند ولی کلم برگ معمولاً به وسیله پروانه های تخم گذار انتخاب می شود، علف های هرز خردل و تربچه میزبان مهمی هستند. مخصوصاً اینکه در فصل قبل از کاشت در دسترس آفت هستند (Ronal and Jayma, 2017)

۲-۵ خسارت

خسارت بید کلم توسط لاروهای آفت اتفاق می افتد. اگرچه لاروها خیلی کوچک هستند، اما در تراکم های بالا می توانند به طور کامل بافت برگ گیاه میزبان را نابود سازند. این امر به ویژه به جوانه ها و نشاهای کوچک آسیب زیادی وارد می کند و ممکن است تشکیل جوانه ها در کلم ، کلم بروکلی و کلم گل را مختل سازد. حضور لاروها به ویژه در گلچه ها ممکن است به بی مصرف شدن کامل گلچه منجر شود، حتی اگر میزان خسارت به بافت برگ ناچیز باشد (Devaraj, 1995).

لاروها پس از خروج از تخم، رگبرگ های اصلی راسوراخ کرده و یا در سطح زیرین برگ ها به تغذیه می پردازند. در حمله های شدید، بوته های جوان ممکن است از بین بروند (Abro, 1992).



شکل ۲-۵ خسارت بید کلم روی گیاه کلزا (اصلی)

۲-۶ سازوکارهای دفاعی در حشرات

۲-۶-۱ دفاع غیر اختصاصی

دفاع غیر اختصاصی اولین روش دفاعی حشرات در برابر عوامل مهاجم مانند بیمارگرها و پارازیت ها که شامل دفاع رفتاری یا دور کردن عامل مهاجم می باشند. دفاع کوتیکول جلدی دومین مانع دفاعی است که تا حدود زیادی باعث محدود شدن ورود عامل مهاجم می شوند. سومین راه دفاعی، دفاع فیزیولوژیک مانند تغییر در تعداد سلولهای خونی و فعالیت فنل اکسیداز (Narayan, 2004) و دفاع ژنتیک مانند مقاوت ژنتیکی به بیمارگرهای باکتریایی (Mcgaughey, 1985) و ویروسی (Briese, 1981) می باشد.

۲-۶-۲ دفاع اختصاصی ایمنی

۲-۷ همولنف حشرات

به طور عمده همولنف مایعی بیرنگی است که در تمام فضای هموسل بندپایان گردش می کند. ۱۵ تا ۳۰ درصد کل بدن و ۱۵ تا ۷۰ درصد حجم کل بدن را تشکیل می دهد. همولنف ترکیبی از پلاسما و هموسیت هایی است که در آن معلق هستند. پلاسما علاوه بر هموسیت حاوی موادشیمیایی زیادی است.

۲-۸ سلول های خونی

ذرات معلق در پلاسمای خون را ، سلول خونی می نامند که علیه پاتوژن هایی که به هموسل حمله می کنند واکنش های سریع و موثری ، نشان می دهند. بخش زنده ای از سیستم ایمنی حشرات هستند و از لحاظ بیوشیمیایی دارای حساسیت بالایی هستند. شکل ظاهری این سلول ها از زمانی به زمان دیگر در یک حشره تغییر می کند و شکل آن ممکن است در جریان تثبیت، رنگ آمیزی و سایر مراحل جمع آوری و تهیه آن ها تغییر کند. سلول های خونی انواع پاسخ های دفاعی در حشرات را به عهده دارند. که این پاسخ ها در سیستم ایمنی حشرات نسبت به پاتوژن ها یکی از مهمترین وظیفه های سلول ها برای کاهش و یا از بین بردن عوامل بیماری زا است (Hoffman, 1995). واکنش های ایمنی سلولی و مزاجی شامل بیگانه خواری ،

تشکیل گره وکپسول کردن عوامل بیگانه و فعال شدن سیستم پروفنل اکسیداز (ملانیزاسیون) و تولید پپتیدهای ضد میکروبی شامل همولین، لیزوزیم، سکروپین و غیره است که در بسیاری از گروه های بی مهرگان مانند نرم تنان، خارپوستان، ایزوپودا، دوکفه ای ها و حشرات دیده می شوند (Cannon *et al.*, 2004; bao). حشرات دارای سیستم های دفاعی فیزیولوژیک مختلفی می باشند (Soderhal *et al.*, 1944; *et al.*, 2007). حشرات دارای سیستم های دفاعی فیزیولوژیک مختلفی می باشند که این سیستم دفاعی حتی در مراحل مختلف نشو و نمایی یک حشره متفاوت است. این تفاوت ها ناشی از اختلاف در تعداد و تنوع سلول های خونی، قدرت بیگانه خواری آن ها و تشکیل گره و گوناگونی انواع و غلظت پروتئین های ضد میکروبی همولنف حشرات هستند که منجر به حساسیت و یا مقاومت حشره در برابر بیمارگرها و یا پارازیتوئیدها می شود (Lavin and Strand, 2007). ورود هر عامل آلوده محیطی، اسپورقارچ ها، ذرات سموم، تنش های دمایی، نوع تغذیه، دیابوز و حتی جنسیت، بر شکل و تعداد سلول های خونی و فعالیت آنزیم فنل اکسیداز مؤثر است و این واقعیت در گروه های مختلف بی مهرگان که فاقد ایمنوگلوبولین هستند به اثبات رسیده است (Bao Cerenius, 1998; Soderhall, *etal* 2007). هموسیت ها در گردش خون اغلب حشرات به آسانی توسط میکروسکوپ نوری و فلورسنت مشاهده می شوند (Ling and Yu, 2006). تحقیقات نشان داده اند که ورود بیمارگرهای حشرات مانند اسپورقارچ ها و یا نماتدها و تخم های پارازیتوئید به داخل همولنف، بر شکل و تعداد سلول های خونی تأثیر دارد. این تغییرات مورفولوژیک سلول های خونی و همچنین تغییر تعداد آنها در فواصل مختلف پس از ورود، در راستای دفاع سلولی یعنی بیگانه خواری و گره زایی انجام می شود (Nahla *et al.*, 2010). معمولاً ایمنی سلولی در ساعات اولیه ورود تنش به همولنف حشره رخ می دهد. مشخص شده حشرات دارای سامانه ایمنی قوی می توانند تنش را تحمل کرده و از بحران عبور کنند و نیز در صورت ورود عامل بیگانه از پیشروی و توسعه آلودگی جلوگیری نموده و در نهایت بر آن غلبه کنند. بنابراین ردیابی تعداد سلول های خونی به عنوان معیاری برای سنجش تحمل تنش در بسیاری از بی مهرگان پیشنهاد شده است (Correia, 2008) با توجه به اینکه سلول های خونی فاکتور مهمی در سیستم ایمنی حشرات هستند، شناسایی آن ها و جمعیتشان ما را در راستای کنترل بهتر حشره مورد نظر کمک می کند.

۹-۲ انواع سلول های خونی

براساس ویژگی های مورفولوژی، عملکرد و شیمی بافت، چندین نوع سلول خونی در حشرات شناسایی شده اند (Gupta, 1985; Brehelin, et al 1989).

در همولنف اغلب بالپولکداران پنج نوع سلول خونی مشاهده شده است. چنانکه این هموسیت ها شامل: پروهموسیت ها، پلاسموتوسیت ها، گرانولوسیت ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت ها در همولنف شب پره خرنوب (*Ectomoyeloid ceratoniae* Zeller (Khosravi et al., 2012)، کرم تارتن پاییزی *Hyphantria* (Ajamhassani et al., 2013) (*cunea* (Drury)، پروانه برگخوار شبدر *Utethesia pulchella*، کرم شاخدار *Phthorimaea operculella* (L) (*Hyles euphorbia* (عجم حسنی، ۱۳۹۳)، لارو بید سیب زمینی *Yponomeuta malinellus* (عجم حسنی و محمودزاده، ۱۳۹۹) و کرم خراط *Zeuzera pyrina* L (عجم حسنی، ۱۳۹۸) وجود دارند. شمارش تفریقی سلول های خونی نشان داد که جمعیت انواع سلول های خونی در مراحل مختلف زیستی متفاوت است. پروهموسیت ها به عنوان سلول های پایه فراوانی شان تقریباً در سنین پایین لاروی بالاتر ولی در سنین بالا کاهش می یابد. در واقع، پروهموسیت ها قابلیت تبدیل به سایر سلول ها را در طول رشد و در زمان واکنش ایمنی دارند (Beaulaton, 1979). ثابت شده است که در اندام های هماتوپوئیک *frugiperda* (*Spodoptera* (Smith) و (*Manduca sexta* (L.)، پروهموسیت ها و پلاسموتوسیت ها وجود دارند (Nardi et al, 2003). تحقیقات نشان داده است که ورود عوامل بیماریزای حشرات مانند اسپور قارچ های بیماری زا و یا نماتدها و تخم پارازیتوئیدها به داخل همولنف بر شکل و تعداد سلول های خونی تاثیر دارد. این تغییرات ریختی سلول های خونی و همچنین تغییر در تعداد آن ها در فواصل مختلف پس از ورود، در راستای ایمنی سلولی یعنی بیگانه خواری و گره زایی صورت می گیرد (Nahla et al, 2010). همچنین مورفولوژی و فراوانی سلول ها در مراحل رشدی یک گونه ۹ نیز تفاوت هایی نشان می دهد که به عوامل مختلفی مانند سن، جنسیت، گرسنگی، پوست اندازی، دما و استرس های محیطی وابسته است (Sanjayan and et al, 1996 ؛ Sharma and et al, 2008 ؛ Pandey and et al, 2010).

۲-۱۰ اعمال سلول های خونی

۲-۱۰-۱ ایجاد لخته و ترمیم زخم

در اثر ایجاد زخم در بدن حشرات تغییرات فیزیولوژیکی مانند افزایش ویسکوزیته خون و تحریک فیبرهای چسبناک غیرمحللول گلیکوسیلالات ۱ ، باعث به دام انداختن عوامل بیماری زا و سلول های خونی شده و محل زخم را می پوشاند (Gregoria, 1974 ; Sherfer and *et al*, 2004). همچنین سلول های خونی به ترکیب هموکینین ترشح شده از سلول های اپیتلیومی صدمه دیده نزدیک زخم، جلب شده (Cherbas, 1973) و در اثر تحریکات ایجاد شده ، آنزیم فنل اکسیداز از داخل سلول های خونی ترشح و فعال شده و از طریق ملانیزاسیون باعث از بین رفتن مهاجمین و ایجاد مانع فیزیکی غیر قابل نفوذ در برابر آن ها می شود (Siva-Jothy, 2005).

۲-۱۰-۲ بیگانه خواری

بعضی از سلول های خونی قادر به بلعیدن عامل خارجی وارد شده به بدن مانند باکتری ها و قارچ ها هستند (Gillespie and *et al*, 1997). تعداد کمی از باکتری ها ، اسپور قارچ ها یا پروتوزوآها توسط پلاسماتوسیت ها فاگوسیتوز می شوند. هیچ موجود زنده غیر بیماری زا و کم بیماری زایی بطور موثر توسط این روش نابود نمی شود. این جمله بدان معنی است که روش هایی که آنها به وسیله آن کشته می شوند ، شناخته نشده است (سندی و زیبایی، ۱۳۹۱).

۲-۱۰-۳ تشکیل کپسول و ملانیزاسیون

در کپسول شدن به دلیل اینکه سلول های خونی قادر به بلعیدن عامل خارجی بزرگ مانند نماتد و تخم های پارازیتوئید نیستند، در نتیجه در اطراف آن جمع شده و عامل را از محیط اطراف منزوی می کنند. پاره شدن دیواره ای سلول های خونی باعث فعال شدن پیش آنزیم پروفنل اکسیداز شده و باعث ملانیزاسیون قسمت های مرکزی توده می شود (Lavine and strand, 2002).

۲-۱۰-۴ تشکیل گره

گره وقتی تشکیل می شود که جمعیت بالایی از یک عامل مهاجم کوچک، مثل باکتری ها و قارچ ها و غیره وارد بدن حشره شوند. در صورتی که اگر تعداد عامل مهاجم کم باشد، به وسیله ی فرایند فاگوسیتوز از بدن حذف می شوند. سلول های خونی در اطراف توده هایی از عوامل خارجی قرار گرفته و گره تشکیل می دهند و آن ها را مانند تشکیل کپسول از محیط اطراف منزوی می کنند. سلول های شرکت کننده در فرایند تشکیل گره مانند فرایند کپسول، گرانولوسیت ها و پلاسماتوسیت ها هستند. در گره، قسمت های مرکزی توده ممکن است مانند تشکیل کپسول ملانیزه شود (بندانی، ۱۳۸۹).

۲-۱۱ آنزیم فنل اکسیداز

آنزیم فنل اکسیداز در پروکاریوتها و یوکاریوتها به صورت گسترده ای وجود دارد. این آنزیم در گیاهان و جانوران به چشم می خورد و حاوی عنصر مس است. بنابراین از نظر تکاملی در ارتباط نزدیک با هموسیانین در بندپایان بوده و حتی توالی اسید آمینه آن شباهت زیادی با توالی اسید آمینه هموسیانین دارد. شباهت بین این دو پروتئین به ۹۴ تا ۴ درصد می رسد (Chan and *et al*, 2006).

آنزیم فنل اکسیداز در همولنف به صورت یک پروآنزیم غیرفعال با نام پروفنل اکسیداز موجود است. این آنزیم یک عامل کلیدی در ایمنی است و نقش مهمی در انعقاد، ملانیزاسیون و بهبود زخم دارد (Soderhall and Cerenius, 1992).

فعال سازی آنزیم پروفنل اکسیداز در نتیجه پاسخ به تنش هایی نظیر حمله بیمارگرها، پارازیتوئیدها، دوره های گرسنگی و تغییرات دما می باشد (Ashida, 1997). از آنجا که سلول های خونی یکی از منابع بالقوه تولید پروفنل اکسیدازها هستند و سلول های اونوسیتوئیدها در بالپولکداران به عنوان سلول تولید کننده ی پروفنل اکسیداز شناخته شده اند (Iwama and Ashide, 1989 ; Jiang and *et al*, 1997). بنابراین افزایش کل سلول های خونی ممکن است منجر به افزایش فعالیت پروفنل اکسیداز پس از تنش های مختلفی از قبیل افزایش دما، تغییر رژیم غذایی و یا حمله عوامل بیگانه به همولنف شود.

۲-۱۲ تحقیقات انجام شده در مورد شناسایی سلول های خونی

در حشرات چندین نوع سلول خونی بر اساس ویژگی های ریخت شناسی، عملکرد و شیمی بافت، شناسایی شده اند (Brehelin and et al, 1989 ; Gupta, 1985). طبقه بندی سلول های خونی حشرات بعضی وقت ها مبهم بوده و کلمات بکار برده شده برای طبقه بندی هر نوع سلول تفاوت دارد. در بین راسته های مختلف و حتی در یک راسته نیز تفاوت هایی در طبقه بندی سلول های خونی با یکدیگر وجود دارد (Brehelin and et al, 1978 ; Strand and Pech, 1995 ; Lavine and strand, 2002 ; Ribeiro and Brehelin, 2006). سلول های خونی در یک نوع طبقه بندی با استفاده از دو معیار گروه بندی می شوند. در گروه اول، سلول های خونی را بر اساس ویژگی های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و عملکردی گروه بندی می کنند (Kaaya and ratcliffe, 1982). در حالیکه در گروه دوم، سلول های خونی توسط موقعیت آناتومیک گروه بندی می شوند. بنابراین بر اساس سلول هایی که در گردش خون هستند و یا سلول هایی که به بافت های بدن مانند لوله گوارش، جلد و یا بافت های ماهیچه ای متصل هستند و هموسیت های متصل نامیده می شوند؛ گروه بندی می شوند (King and Hillyer, 2013 ; Honti and et al, 2014). طبق طبقه بندی اخیر استرند (۲۰۰۸) پنج نوع سلول خونی در حشرات به خصوص پروانه ها شناسایی شده است که شامل پروهموسیت ها، پلاسموتوسیت ها، گرانولوسیت ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت ها می باشند. در تحقیقات بسیاری از محققین وجود پنج نوع سلول خونی ثابت شده است. به طور مثال، در سال ۱۳۹۸ پنج نوع هموسیت در همولنف لارو پروانه کرم جگری (*Cossus cossus* (Lepidoptera: Cossidae) شناسایی شد (عجم حسنی و پورعلی، ۱۳۹۸). در همولنف لارو سن چهارم بید سیب زمینی *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) پنج نوع سلول خونی شناسایی شد (عجم حسنی و پورعلی، ۱۳۹۷). در بررسی یاخته شناسی سلول های خونی کرم شاخدار فرفیون (*Hyles* (Lepidoptera: Sphingidae) *euphorbiae* L پنج نوع هموسیت در لاروها، شفیره و بالغ این حشره شناسایی شد (عجم حسنی، ۱۳۹۴). در همولنف لارو سن چهارم پروانه *Utethesia pulchella* (Lepidoptera: Arctiidae) در مقابل قارچ های *Beauveria bassiana* و *Esaria farinosae* پنج نوع هموسیت شناسایی شد (عجم حسنی

۱۳۹۳). در همولنف لاروهای سوسک شاخک بلند رزاسه *Osphranteria coerulescense* Redt (Coleoptera: Cerambycidae) و کرم (Lepidoptera: Cossidae) *Zeuzera pyrina* L. چهار نوع هموسیت شامل پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت و اونوسیتوئید شناسایی شدند (عجم حسنی، ۱۳۹۲). در همولنف لارو سن پنجم لیسه سیب پنج نوع سلول خونی مشاهده گردید (عجم حسنی و محمودزاده، ۱۳۹۹). پنج نوع سلول خونی طی بررسی شناسایی سلول های خونی لارو شب پره خرنوب *Ectomoyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) Zeller (خسروی و همکاران، ۱۳۹۱). برای اولین بار در سال ۱۳۹۴ در مراحل مختلف لاروی، شفیرگی و بالغ کرم شاخدارفرفیون پنج نوع سلول خونی (*Hyleseuphorbiae* L (Lepidoptera: Sphingidae) شناسایی شد (عجم حسنی، ۱۳۹۴). در بررسی همولنف پروانه برگخوار توت (*Glyphodes pyloalis* (Walker) و پروانه سفید اشجار (*Hyphantria cunea* (Drury) پنج نوع سلول خونی گزارش شد (جلالی سندی و زیبایی، ۱۳۸۹). در بررسی سلول های خونی لارو سن پنجم کرم ابریشم *Bombix mori* پنج نوع سلول خونی شناسایی شده است (Akai and Sato, 1973). در سال ۱۳۹۵ در بررسی واکنش سیستم ایمنی سلولی ملخ آسیایی *Locusta migratoria* (Orth: Acrididae) در مقابل جدایه *B. bassiana* Fashand چهار نوع سلول خونی شناسایی شد (غزوی و همکاران، ۱۳۸۲). راحت خواه و همکاران (۱۳۹۵)، در پروانه موم خوار بزرگ *Galleria mellonella* L (Lepidoptera: Pyralidae) پنج نوع سلول خونی شناسایی کردند. پنج نوع سلول خونی در مطالعه سلول های خونی پروانه ی برگخوار مرکبات *Papillio demoleus* L. شناسایی شد (جلالی و صالحی، ۲۰۰۸). در بررسی سلول های خونی در ملخ *Oxya japonica* Thunberg (Orthoptera: Acrididae) شش نوع سلول خونی شناسایی شده است (Anggraeni and et al (2011). Vogelweith and et al (2016) در همولنف لاروهای سن پنجم *Eupoecilia ambiguella* Hbn. چهار نوع سلول خونی گزارش کردند.

۲-۱۳ تحقیقات انجام شده در مورد تاثیر عوامل بیمارگر بر سیستم ایمنی حشرات

تحقیقات زیادی مبنی بر واکنش های ایمنی حشرات در برابر ورود عوامل خارجی مانند قارچ ها، باکتری ها و یا ترکیبات سنتزی و شیمیایی به همولنف انجام شده است. برای مثال در سال ۱۳۹۳ بررسی دفاع سلولی لاروهای *Utethesia pulchella* (Lepidoptera: Arctiidae) در مقابل قارچ های *Isaria farinosae* و *Beauveria bassiana* انجام گرفت (عجم حسنی، ۱۳۹۳). واکنش های دفاع سلولی لارو لیسه سیب در برابر باکتری بیماری زای *Bacillus thuringiensis* انجام شد (عجم حسنی و محمودزاده، ۱۳۹۷). در تحقیق دیگری عجم حسنی و پورعلی در سال ۱۳۹۷ تاثیر دو جدایه قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* بر ایمنی لارو سن چهارم بید سیب زمینی *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) بررسی کردند. عجم حسنی در سال ۱۳۹۳ پاسخ ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم *S. litura* را علیه دو جدایه از قارچ *B. bassiana* و ذرات سنتزی لاتکس بید مورد بررسی قرار داد. عجم حسنی و همکاران (۲۰۱۳)، واکنش ایمنی پروانه برگخوار سفید آمریکایی *H. cunea* را در برابر چهار ایزوله از قارچ عامل بیماری حشرات به نام *B. bassiana* و یک ایزوله از *I. farinosae* (Holmsk.) مورد بررسی قرار دادند. واکنش ایمنی سن گندم *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) در برابر قارچ *B. bassiana* توسط زیبایی و همکاران (۲۰۱۱) بررسی شد. اثر هورمون جوانی I بر سلول های خونی پروانه سفید اشجار *H. cunea* و پروانه برگخوار توت *Glyphodes pyloalis* (Walker) انجام شده است (جلالی سندی و زیبایی، ۱۳۸۹)، واکنش دفاع سلولی سن خون خوار *Rhodnius prolixus* را در مقابل باکتری *E. coli* توسط بورگس و همکاران (۲۰۰۸) بررسی گردید.

۲-۱۴ تحقیقات انجام شده در مورد تاثیر تنش های دمایی بر سیستم ایمنی حشرات

دما نقش مهم در رشد حشرات و سازوکار هموستازیس دارد. نقش دما در فرایندهای سامانه ایمنی حشرات نیز ثابت شده است. دما تراکم سلول های خونی را به طور معنی داری تغییر داده و گاهی مورفولوژی سلول ها را دستخوش تغییر می کند (قاسمی و همکاران، ۲۰۱۳). ردیابی تعداد سلول های خونی به عنوان

معیاری برای سنجش تحمل تنش در بسیاری از بی مهرگان پیشنهاد شده است (Correia ، 2008). مطالعه هموگرام و تأثیر تنش دما بر فراوانی ایمنوسیت‌های کرم جگری (*Cossus cossus* (Lepidoptera: Cossidae) انجام شد (عجم حسنی و پورعلی ، ۱۳۹۸). عجم حسنی و پورعلی همچنین در سال ۱۳۹۶ تأثیر تنش‌های دمایی روی سامانه ایمنی بید سیب زمینی (*Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) را بررسی کردند. نتایج نشان داد که تعداد کل هموسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌های لاروهایی که تحت تنش دمایی بالا قرار گرفتند، نسبت به شاهد به طور معنی داری افزایش یافت. همچنین در اثر تنش سرما تعداد کل هموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها نسبت به شاهد کاهش معنی داری نشان داد. واکنش‌های دفاع سلولی لارو لیسه سیب در برابر تنش‌های دمایی معنی دار بود. بطوریکه تعداد کل و تفرقی سلول‌ها به جز پروهموسیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و در دمای ۴ درجه سلسیوس کاهش قابل توجهی نشان داد (عجم حسنی و محمودزاده ، ۱۳۹۷).

فصل سوم

موادوروش ها

۳-۱ کشت گیاه میزبان

برای پرورش بید کلم، گیاه کلزا رقم نپتون به عنوان گیاه مرجح آفت استفاده شد. برای این منظور بذور کلزا در گلدان های پلاستیکی (باقطر ۲۰ سانتیمتر) حاوی خاک استریل شده مخلوط با خاک برگ و در شرایط گلخانه ای در دمای 25 ± 5 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ درصد بدون کاربرد حشره کش کشت شدند. برای کشت از ۴ عدد بذر در داخل هر گلدان استفاده شد تا از جوانه زنی بذر اطمینان حاصل شود. سپس بهترین بوته انتخاب و حفظ شده و بوته های اضافی حذف شدند. گیاهان در حدود ۵ هفته پس از کشت در آزمایش ها استفاده شدند. به جز بذوری که داخل گلدان کشت شدند ۱۰۰ متر مربع دیگر در زمینی در مزرعه شهرستانک کلزا کشت شد و به مرور به داخل گلدان انتقال یافت و نشا شد تا از کمبود میزبان گیاهی مورد نیاز برای تغذیه لاروها جلوگیری گردد.

۳-۲ پرورش بید کلم

کلنی اولیه بید کلم از مزارع کلزای کشت و صنعت جوبین تهیه و به آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی (درون اتاقک رشد با دمای 20 ± 1 و رطوبت نسبی ۵۰٪ و دوره نوری ۱۴:۱۰ ساعت) منتقل شد. جهت پرورش لاروها از ظروف پرورش به ابعاد $30 \times 15 \times 20$ سانتیمتر استفاده شد که در سطح بالایی پوشیده از توری ارگانزا است. تغذیه لاروها با استفاده از برگ های کلزا انجام شد. روزانه ظروف مورد بازبینی قرار گرفته و از فضولات لاروی پاکسازی شده و برگ های جدید جهت تغذیه در ظرف قرار داده شد.

۳-۳ شناسایی سلول های خونی بید کلم

به منظور شناسایی سلول های خونی، همولنف ۱۰ لارو (۱۰ تکرار) جمع آوری می شود. ابتدا یک پای کاذب لارو را با اسکالپل بریده و مقدار ۱۰ میکرولیتر از همولنف را روی یک لام گذاشته و با لام دیگر یک اسمیر تهیه می شود. پس از خشک شدن، مقداری ماده رنگ آمیزی گیمسا (محلول ۹:۱ گیمسا و آب مقطر) روی اسمیر گذاشته، پس از گذشت ۲۰ دقیقه، لام را در آب مقطر قرار داده تا محلول رنگی

شسته شود. سپس لام به مدت ۱۰ ثانیه در کرینات لیتیم اشباع شده قرار داده می‌شود (این امر به منظور تثبیت رنگ سلول‌ها انجام می‌گیرد). لام را مجدداً در آب مقطر شستشو داده و در آن ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده تا خشک گردد. با استفاده از کانادا بالزام (رقیق شده با گزیلول) لام دائمی تهیه می‌شود و انواع آن‌ها با توجه به منابع موجود شناسایی شدند (Yeager, 1945). جهت مشاهده و شناسایی سلول‌های خونی از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ استفاده شد. قطرسلول‌ها براساس میکرومتر محاسبه می‌شود.

۳-۴ شمارش کل سلول‌های خونی

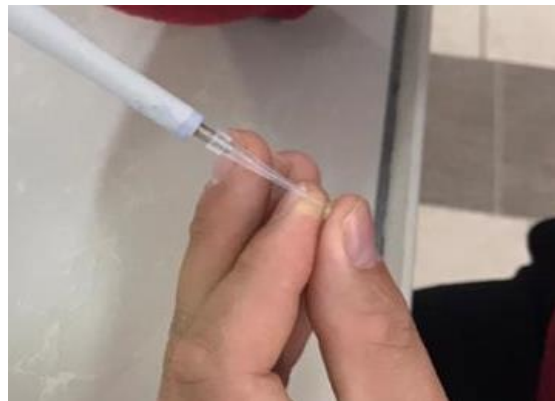
برای شمارش کل سلول‌های خونی، همولنف ۲۰ عدد لارو سن ۲، ۲۰ عدد لارو سن ۳، ۲۰ عدد لارو سن ۴ و ۲۰ عدد لارو سن ۵ و ۲۰ عدد شفیره و ۲۰ عدد حشره کامل به طور جداگانه با استفاده از میکروپی‌ت جمع‌آوری و با بافر فیزیولوژیک رقیق می‌شوند. ماده ضد انعقاد به کار رفته در آزمایش محلول تایسون است. شمارش سلول‌های خونی با استفاده از لام نئوبار و بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری انجام خواهد گرفت. شمارش کل با محاسبه میانگین تعداد سلول‌های خونی موجود در ۵ خانه از لام نئوبار (هر کدام به ابعاد ۱ میلی متر مربع) انجام می‌شود (Jones, 1967) (شکل ۳-۲)

$$\text{عمق خانه های لام نئوبار} \times \text{میزان رقت} \times 1 \text{ میلیمتر مربع} \times \text{تعداد سلولهای خونی} = \text{تعداد کل سلول های خونی}$$

تعداد خانه های شمارش شده از لام



ب



الف

شکل ۳-۱ (الف) جمع آوری همولنف لاروهای بید کلم با میکروپیپت - (ب) قرار دادن همولنف مخلوط شده با

محلول تایسون روی لام نئوبار جهت شمارش سلول های خونی

۳-۵ شمارش تفرقی سلول های خونی

جهت شمارش تفرقی سلول های خونی، ۱۰۰ سلول از ۱۰ لارو سن دو، سه، چهار، پنج، شفیره و حشره کامل به صورت تصادفی انتخاب شده و پس از رنگ آمیزی با گیمسا با بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری و روی هماسیتومتر شمارش شدند.

۳-۶ سمیت حشره کش بیولوژیک *Bacillus thuringiensis* روی لارو سن پنجم بید کلم

ترکیب بیولوژیک استفاده شده در تحقیق حاضر، *Bacillus thuringiensis* زیرگونه Kurstaki به شکل پودری و ساخت شرکت سی بی سی (CBC) از کشور ایتالیا می باشد که از مرکز تحقیقات کشاورزی شاهرود تهیه شد. جهت انجام آزمایشات زیست سنجی، غلظت های ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ پی پی ام از ترکیب فوق در آب مقطر تهیه شد و به برگهای کلزا تیمار شدند. برای هر غلظت، ۶۰ عدد دیسک برگ کلزا به شعاع ۲ سانتیمتر و ۶۰ عدد لارو سن پنج بید کلم در نظر گرفته شد. (تعداد تکرارها برای هر تیمار ۴ عدد و هر تکرار شامل ۱۵ عدد لارو بود). با کمک میکروپیپت، ترکیب *B.t* به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در مرکز هر برگ قرار داده شد. پس از خشک شدن، روی هر برگ یک عدد لارو سن پنج قرار گرفت. هر لارو به همراه

برگ مورد تغذیه آن به یک پتری به طور جداگانه منتقل شدند. تیمار شاهد شامل لاروهایی بود که روی برگهای کلزای تیمار شده با ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر قرار گرفتند. پتری ها به اتاقک رشد با دمای 20 ± 1 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰٪ و نسبت روشنایی به تاریکی ۱۴:۱۰ ساعت انتقال یافته و به لاروها اجازه داده شد که مدت زمان ۲۴ ساعت از برگهای آلوده تغذیه کنند. پس از ۲۴ ساعت، غلظتی از ترکیب که ۲۵٪ تلفات لاروها را به همراه داشت به عنوان غلظت LC_{25} (پی پی ام) در نظر گرفته شد و از آن در آزمایشات ایمنی شناسی استفاده شد.

۷-۳ بررسی ایمنی لارو بید کلم در برابر باکتری بیماریزای *Bacillus thuringiensis*

در این آزمایش دیسکهای برگ به شعاع ۲ سانتی متر تهیه شد و در ظروف پتری دیش به طور جداگانه یک عدد دیسک برگ آلوده شده به غلظت ۴۰ پی پی ام *B.t* (غلظت زیر کشنده که در آزمایش قبل به دست آمد) به همراه یک عدد لارو سن پنج قرار داده شد و مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت به لاروها اجازه داده شد تا از برگها تغذیه کنند. سپس آزمایش های ایمنی شناسی روی لاروها انجام گرفت. این آزمایش شامل سه تیمار بود: شاهد (لاروهایی که از برگهای کلزای تیمار شده با آب مقطر تغذیه کردند)، لاروهایی که ۱۲ ساعت از برگهای آلوده به باکتری تغذیه کردند و لاروهایی که ۲۴ ساعت از برگهای آلوده تغذیه کردند. برای هر تیمار ۴۰ عدد لارو در نظر گرفته شد که شامل ۴ تکرار ۱۰ تایی بود. به این شکل که هر تکرار شامل همولنف ده لارو بود که با هم مخلوط شده و به نسبت ۲:۱۰ میکرولیتر با بافر تایسون رقیق می شدند. شمارش سلولها با فرمول جونز محاسبه شد (Jones, 1967).

$$\text{عمق خانه های لام} \times \text{میزان رقت} \times 1 \text{ میلیمتر مربع} \times \text{تعداد سلولهای خونی} = \text{تعداد کل سلول های خونی}$$

$$\text{تعداد خانه های شمارش شده از لام}$$

۳-۸ بررسی ایمنی بید کلم در مقابل تنش های دما

لاروهای سن پنج بید کلم به مدت ۲۴ ساعت تحت تنش دمای ۴ و ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. تیمار شاهد شامل لاروهایی بود که در دمای آزمایشگاه قرار داشتند. لاروها بعد از ۲۴ ساعت خون گیری شدند و شمارش سلولهای خونی آنها با فرمول جونز انجام شد. آزمایش شامل ۳ تیمار و هر تیمار شامل ۴ تکرار ۱۰ تایی (لارو) بود. طرح آزمایش کامل تصادفی و تجزیه داده ها با نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام شد.

۳-۹ تعیین فعالیت فنل اکسیداز:

برای تعیین اثر باکتری *B.t* و تنش دما (۴ و ۳۰ درجه سلسیوس) روی فعالیت فنل اکسیداز لاروهای مورد آزمایش از روش هموسیت لایزیت استفاده شد (Leonard *etal*, 1985). در این روش همولنف لاروهای هر تیمار جداگانه جمع آوری شده و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رونشین حذف شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=۷) به رسوبات اضافه شده و سپس هموژنیزه شد. محلول اخیر دوباره در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رونشین حاصل در برآوردهای آنزیمی استفاده شد. بدین منظور، ۲۵ میکرولیتر از نمونه ها به ۵۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مولار L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) و ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات اضافه شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شده و سپس توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. آزمایش در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه داده ها با استفاده از برنامه نرم افزاری SAS نسخه ۹/۲ و مقایسه ای میانگین ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۱٪ انجام شد.

فصل چہارم

نتایج و بحث

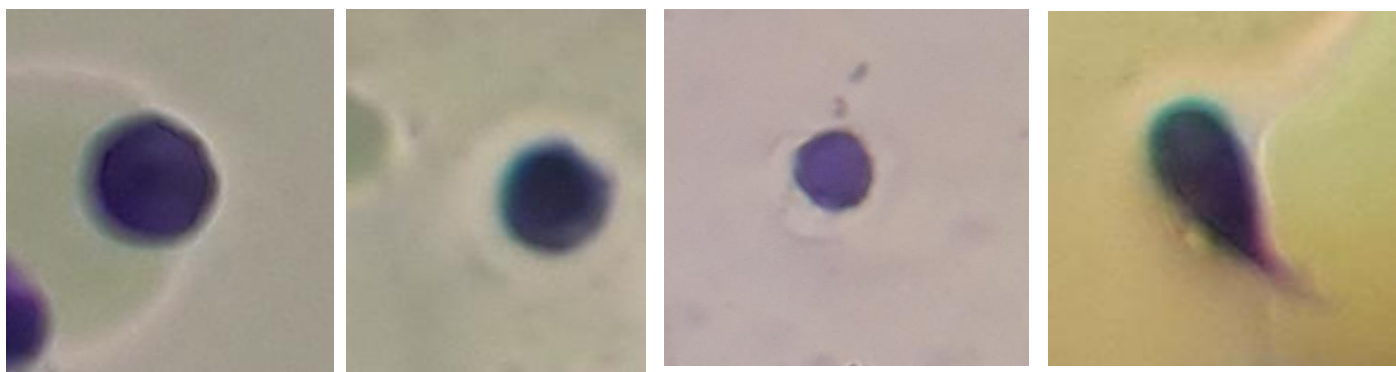
۴-۱ شناسایی انواع سلول های خونی :

بر اساس کلید شناسایی ارائه شده توسط جونز (۱۹۶۷) و گیگلیو و همکاران (۲۰۰۸) و با استفاده از میکروسکوپ نوری ، سلول های خونی سنین لاروی دو ، سه ، چهار و پنج بید کلم شناسایی شدند.

این سلول ها شامل پروهموسیت ها، پلاسموتوسیت ها، گرانولوسیت ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت ها بودند.

پروهموسیت ها کوچکترین سلول ها بودند. این سلول های مدور دارای هسته های گرد، تیره و درشت هستند که بیشترین فضای سلول را اشغال می کنند. هسته این سلول ها با رنگ آمیزی گیمسا به رنگ آبی تیره مشخص شد. سیتوپلاسم آبی رنگ نیز به شکل نواری باریک به کناره غشای پلاسمایی کشیده شده است. (شکل ۴-۱). پلاسموتوسیت ها دوکی شکل با یک یا دو زائده سیتوپلاسمی در طرفین و گاهی بدون زوائد بوده که در اندازه های متنوع مشاهده شدند. هسته درشت و آبی رنگ (بعد از رنگ آمیزی با گیمسا) اغلب در مرکز سلول واقع شده بود. (شکل ۴-۱). گرانولوسیت ها سلول هایی مدور و یا بیضی شکل بوده که از پروهموسیت ها درشت تر بوده و سطح سیتوپلاسم آنها دارای دانه های ریز گرانول بود. اندازه گرانولوسیت ها متنوع و از کوچک تا سلول هایی درشت در خون حشره مشاهده شد. در مقایسه با پلاسموتوسیت ها هسته ی آن ها کوچکتر است (شکل ۴-۱). اونوسیتوئیدها سلول های گرد با هسته جانبی کوچک ولی سیتوپلاسم حجیم دیده شدند. اندازه آن ها از کوچک تا متوسط است. از پروهموسیت ها بزرگتر بوده ولی معمولاً از گرانولوسیت ها کوچکتر هستند (شکل ۴-۱) .

اسفرولوسیت ها سلول هایی نسبتاً درشت و دارای یک هسته فشرده بودند که سطح سیتوپلاسم این سلول ها دارای حفراتی است که آن ها را اسفرول می نامند (شکل ۴-۱).



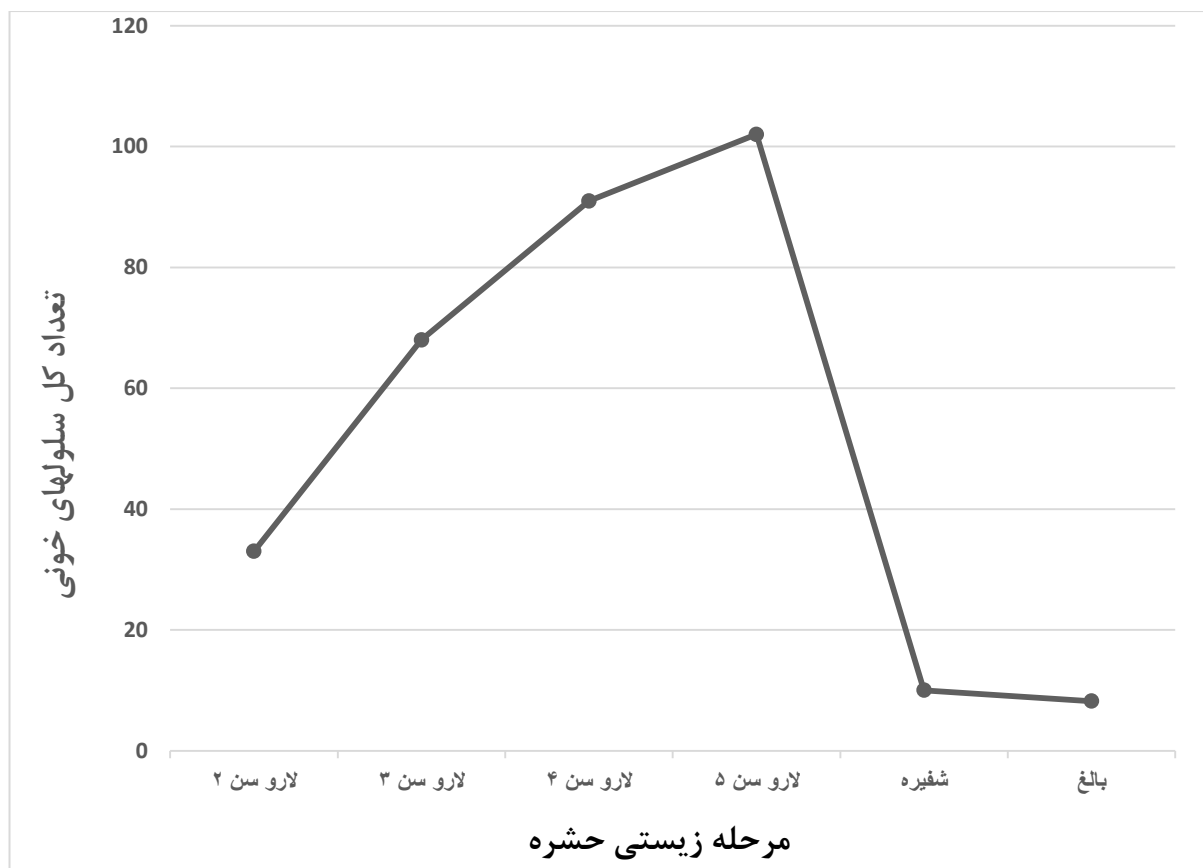
شکل ۴-۱ تصاویر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۴۰) از سلول های خونی رنگ آمیزی شده با Giemsa در لارو

سن پنج حشره *Plutella xylostella*

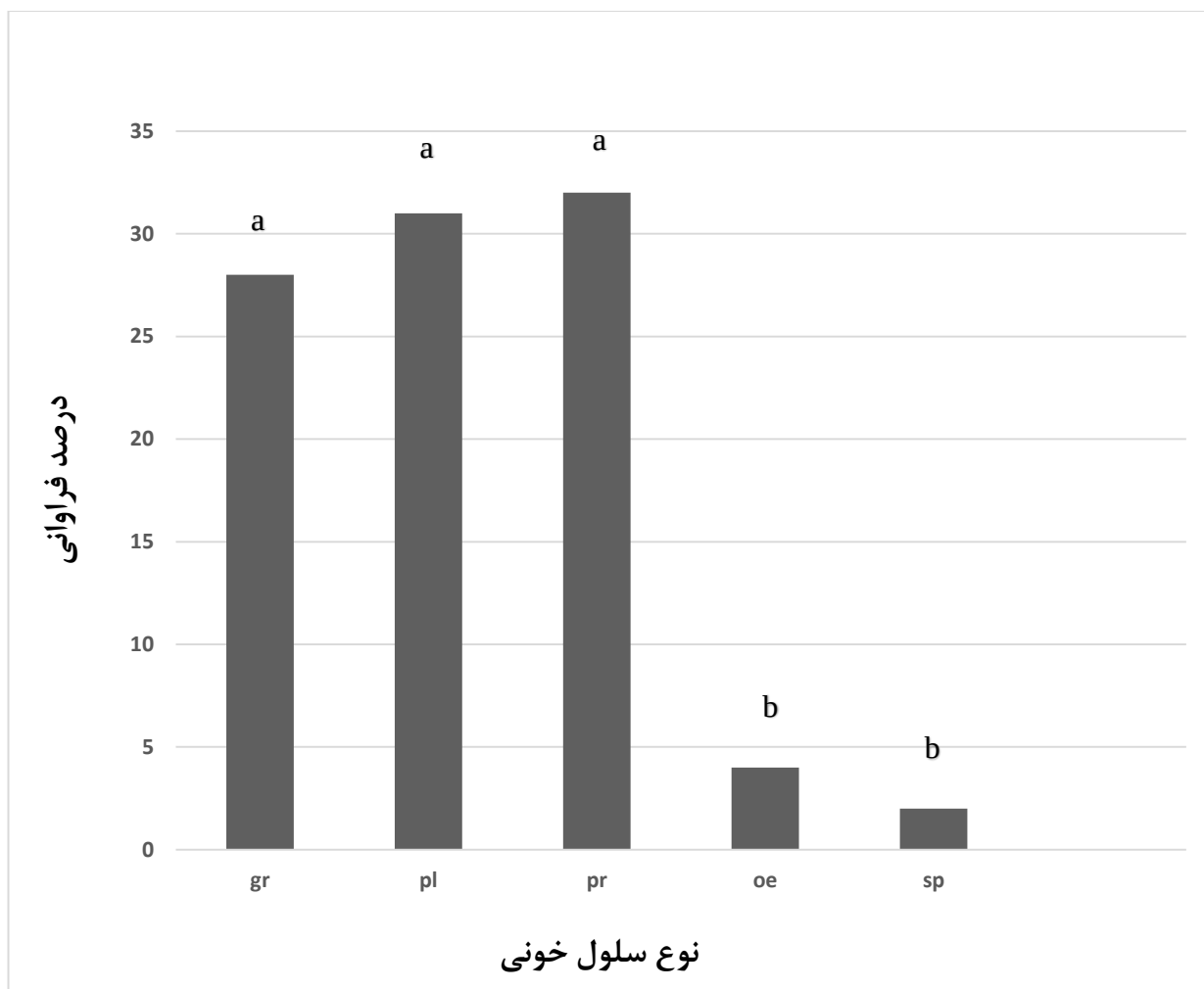
پروهموسیت PR-پلاسموتوسیت PL - گرانولوسیت GR - اونوسیتوئید OE - اسفرولوسیت SP

۴-۲ شمارش کل (total hemocyte count) سلول های خونی بید کلم

شمارش کل سلول های خونی حشره بید کلم نشان داد که در لارو سن دوم 33 ± 4 ، لارو سن سه 68 ± 11 ، لارو سن چهار 91 ± 6 ، لارو سن پنج 102 ± 8 ، شفیره 10 ± 3 و حشره بالغ $8/2 \pm 2$ سلول در میلی متر مربع خون مشاهده شد (شکل ۴-۲).



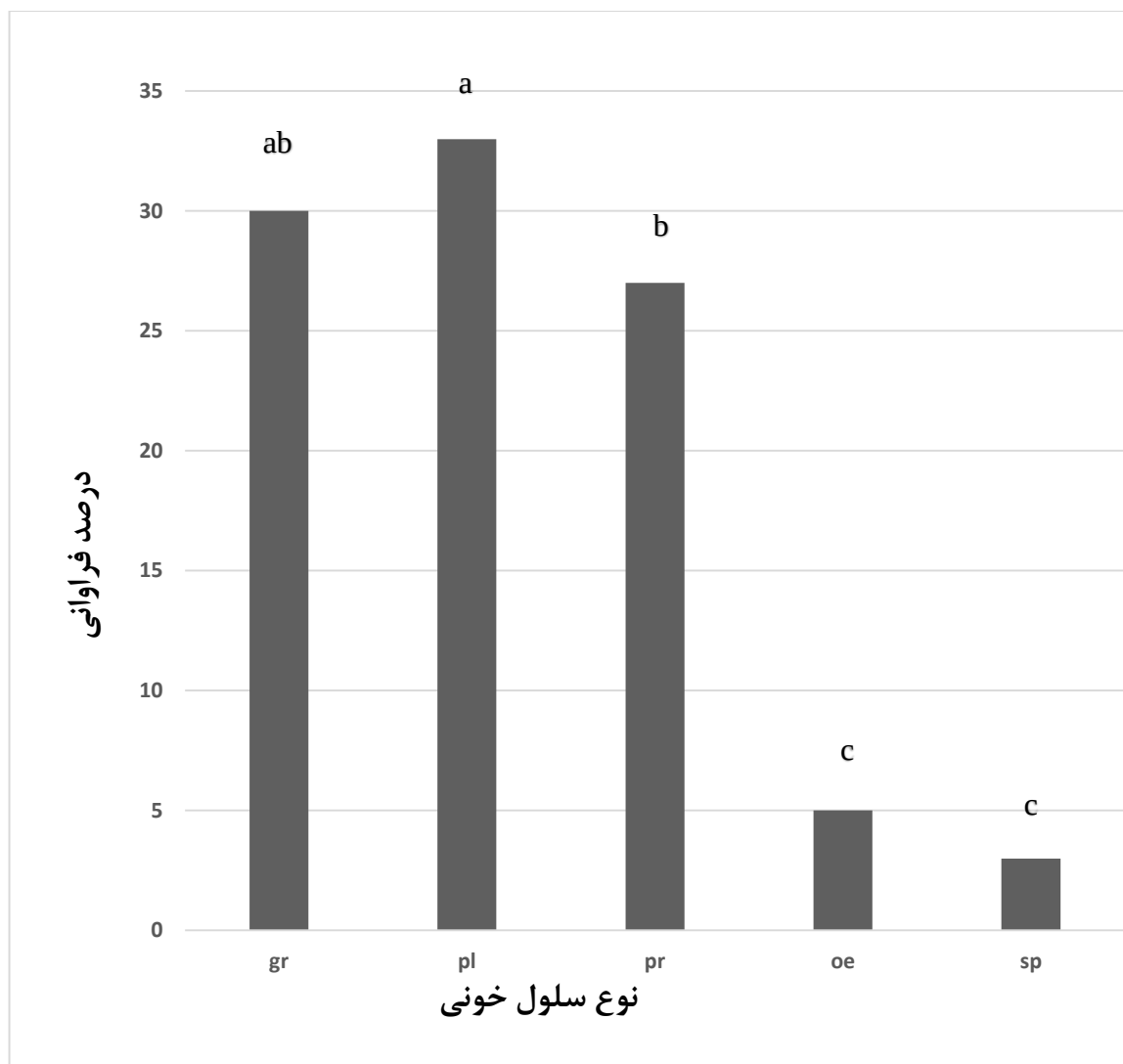
شکل ۴-۲ فراوانی کل سلول های خونی در همولنف لاروهای سنین مختلف و شفیره و حشره بالغ بید کلم



شکل ۳-۴ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی لارو سن دو بید کلم

گرانولوسیت gr - پلاسموتوسیت pl - پروهموسیت pr - اونوسیتوئید oe - اسفرولوسیت sp

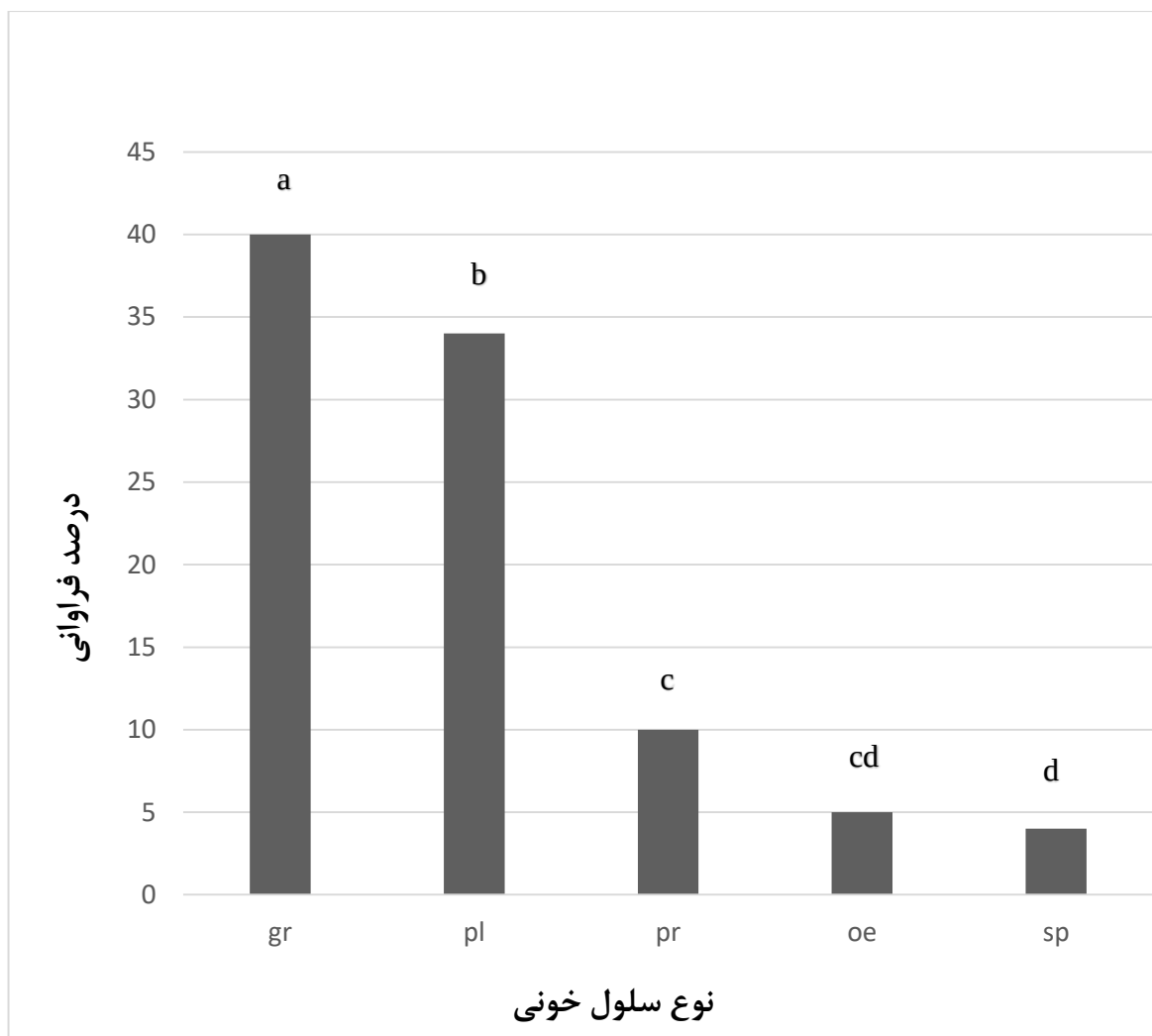
در لارو سن دو پروهموسیت ها به عنوان سلول های پایه و بنیادین سلول های خونی با ۳۲ درصد دارای بیشترین فراوانی بوده و پس از آن ها پلاسموتوسیت ها با ۳۱ درصد و گرانولوسیت ها با ۲۸ درصد دارای بیشترین فراوانی می باشند. اونوسیتوئیدها با ۴ درصد و اسفرولوسیت ها با ۲ درصد به ترتیب دارای کمترین درصد فراوانی سلول های خونی در لارو سن ۲ می باشند (شکل ۳-۴).



شکل ۴-۴ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی لارو سن سه بید کلم

گرانولوسیت gr - پلاسموتوسیت pl - پروهموسیت pr - اونوسیتوئید oe - اسفرولوسیت sp

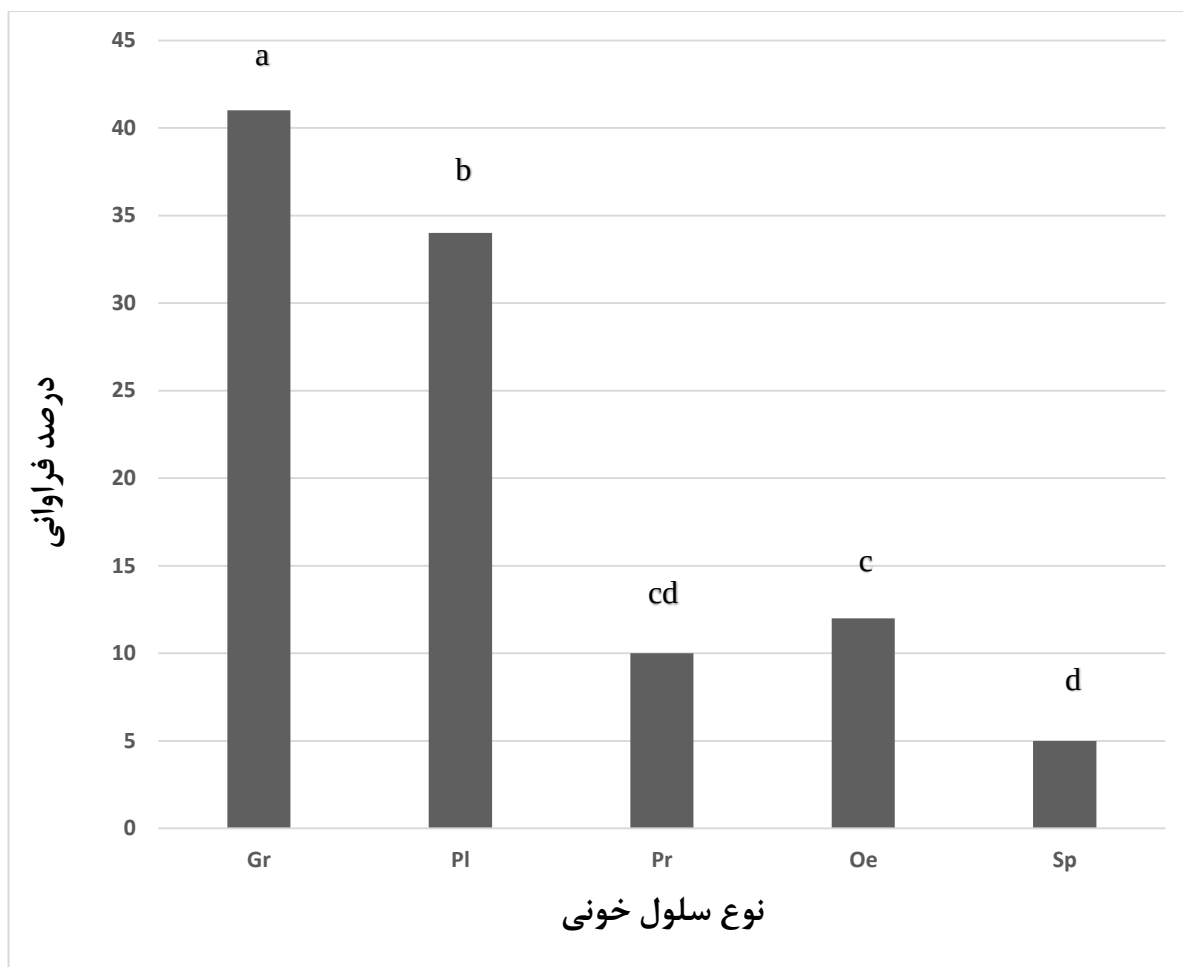
در لارو سن سه بید کلم پلاسموتوسیت ها با ۳۳ درصد دارای بیشترین فراوانی در بین سلول های خونی می باشند و پس از آن گرانولوسیت ها با ۳۰ درصد و پروهموسیت ها با ۲۷ درصد فراوانترین سلول ها می باشند. اونوسیتوئیدها با ۵ درصد و اسفرولوسیت ها با ۳ درصد نیز همانند لارو سن دو دارای کمترین فراوانی در بین سلول های خونی لارو سن سه بید کلم را شامل می شوند (شکل ۴-۴).



شکل ۴-۵ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی لارو سن چهار بید کلم

گرانولوسیت gr - پلاسموتوسیت pl - پروهموسیت pr - اونوسیتوئید oe - اسفرولوسیت sp

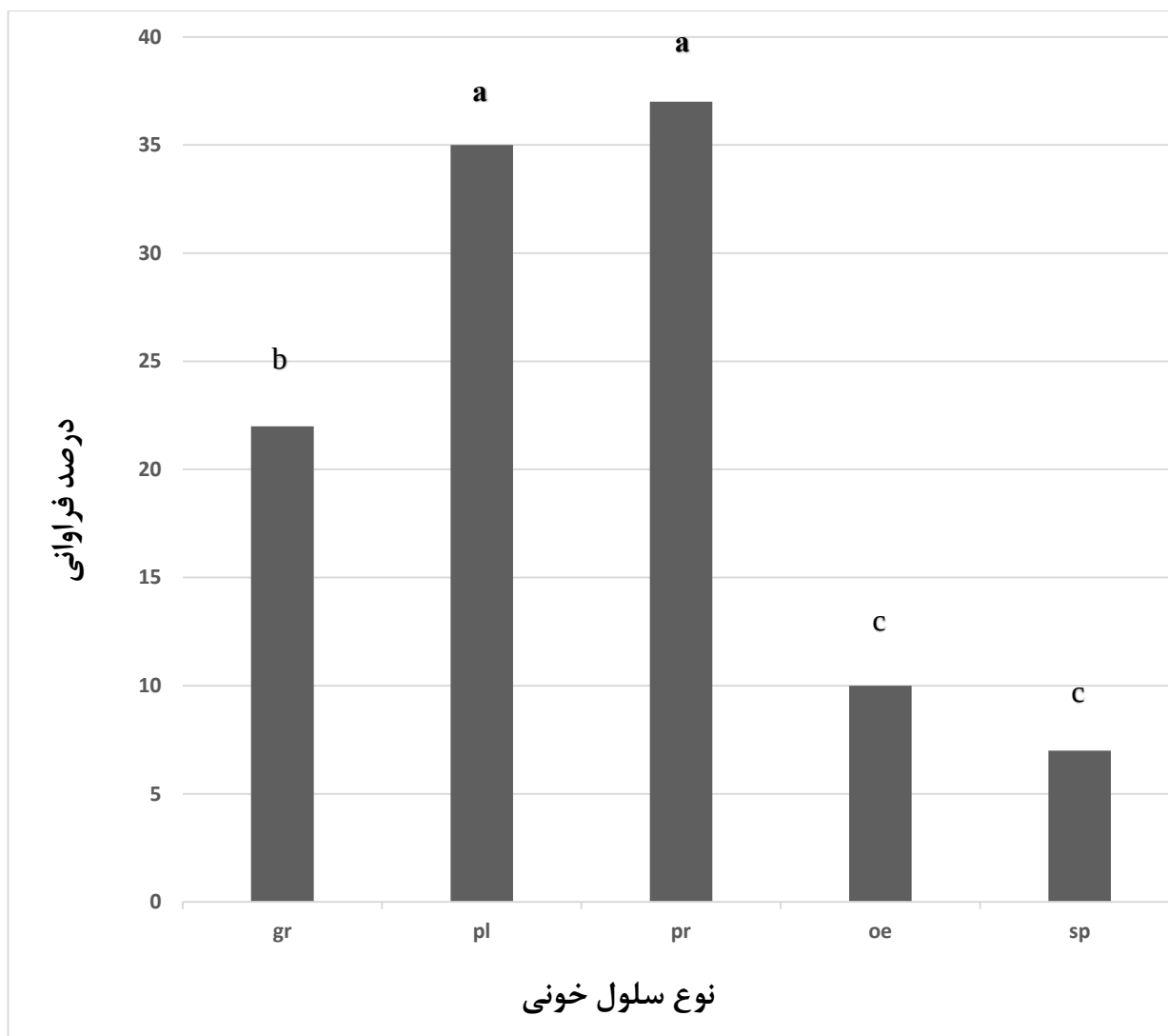
در لارو سن چهاربید کلم گرانولوسیت ها و پلاسموتوسیت ها بیش از ۷۰ درصد سلول های خونی را شامل می شوند که سهم گرانولوسیت ها ۴۰ درصد و پلاسموتوسیت ها ۳۴ درصد سلول های خونی می باشد. پروهموسیت ها ۱۰ درصد فراوانی دارند و اونوسیتوئیدها با ۵ درصد واسفرولوسیت ها با ۴ درصد دارای کمترین فراوانی در بین سلول های خونی لارو سن چهار می باشند (شکل ۴-۵).



شکل ۴-۶ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی لارو سن پنج بید کلم

گرانولوسیت gr - پلاسموتوسیت pl - پروهموسیت pr - اونوسیتوئید oe - اسفرولوسیت sp

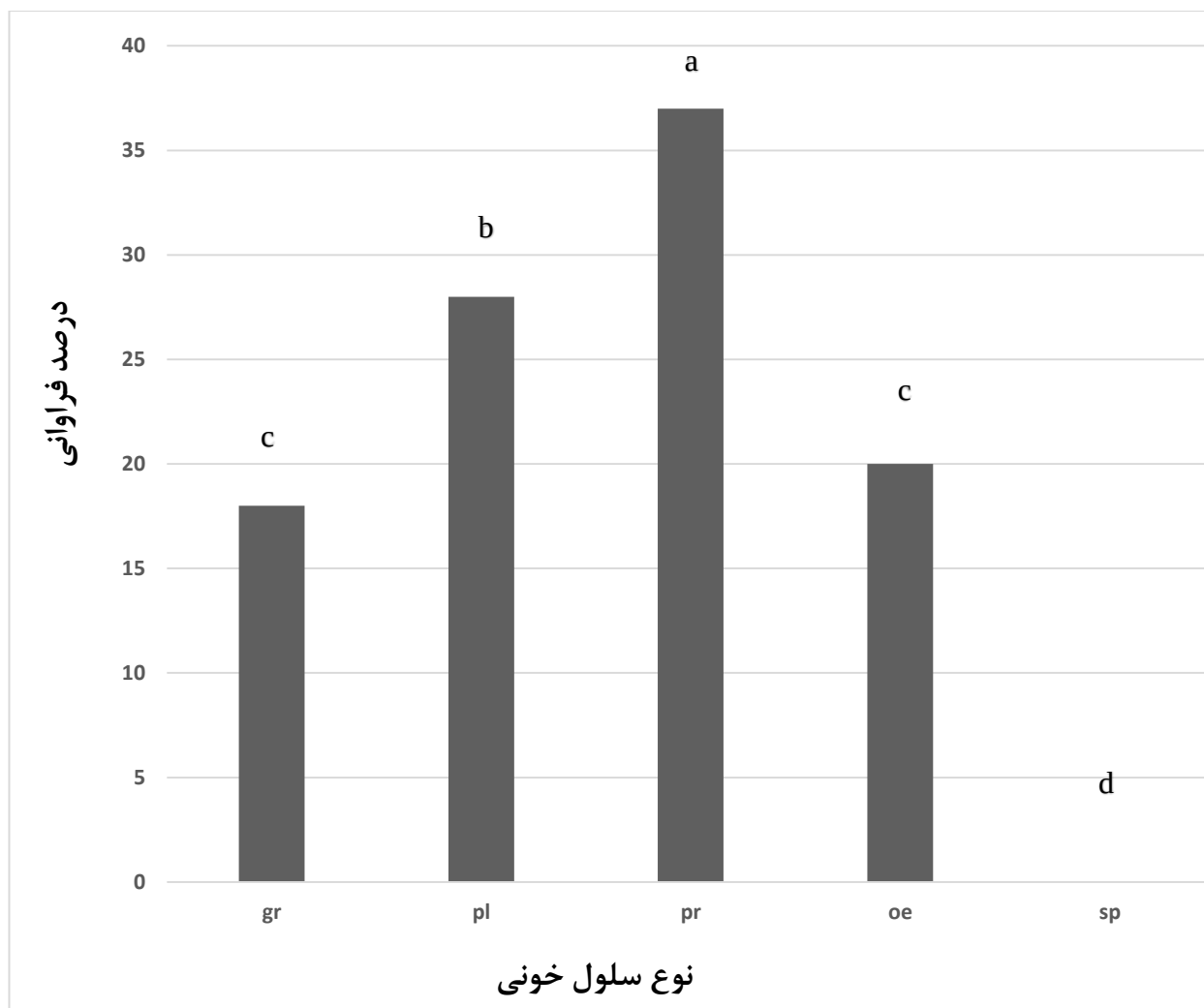
در لارو سن پنج که لارو سن آخر بید کلم می باشد گرانولوسیت ها و پلاسموتوسیت ها در مجموع همچنان بیش از ۷۰٪ تراکم سلول های خونی را شامل می شوند. گرانولوسیت ها ۴۱ درصد و پلاسموتوسیت ها ۳۴ درصد سلول های خونی را شامل می شوند. پروهموسیت ها ۱۰ درصد و اونوسیتوئیدها ۱۲ درصد فراوانی را در خون بید کلم دارند و کمترین فراوانی سلول ها متعلق به اسفرولوسیت ها با ۵ درصد می باشد (شکل ۴-۶).



شکل ۴-۷ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی شفیره بید کلم

گرانولوسیت gr - پلاسموتوسیت pl - پروهموسیت pr - اونوسیتوئید oe - اسفرولوسیت sp

در شفیره بید کلم همانند لارو سن دو پروهموسیت ها بیشترین فراوانی را در بین انواع سلول ها دارند که شامل ۳۷ درصد بوده و سپس پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها به ترتیب با ۳۵ درصد و ۲۲ درصد دارای بیشترین فراوانی هستند. اونوسیتوئیدها با ۱۰ درصد و اسفرولوسیت ها با ۷ درصد کمترین فراوانی را دارند (شکل ۴-۷).



شکل ۴-۸ میانگین درصد فراوانی سلول های خونی حشره کامل بید کلم

گرانولوسیت gr - پلاسموتوسیت pl - پروهموسیت pr - اونوسیتوئید oe - اسفرولوسیت sp

در حشره کامل مانند شفیره پروهموسیت ها دارای بیشترین فراوانی با ۳۷ درصد بوده و سپس پلاسموتوسیت ها با ۲۸ درصد بیشترین فراوانی را دارند. در همولنف حشره کامل بر خلاف سایر مراحل زیستی بید کلم اونوسیتوئیدها نیز ۲۰ درصد از کل سلول های خونی را شامل می شوند و اسفرولوسیت نیز برخلاف سایر مراحل زیستی حشره وجود ندارد (شکل ۴-۸).

۳-۴ سمیت حشره کش بیولوژیک *Bacillus thuringiensis* بر لارو سن پنج بید کلم

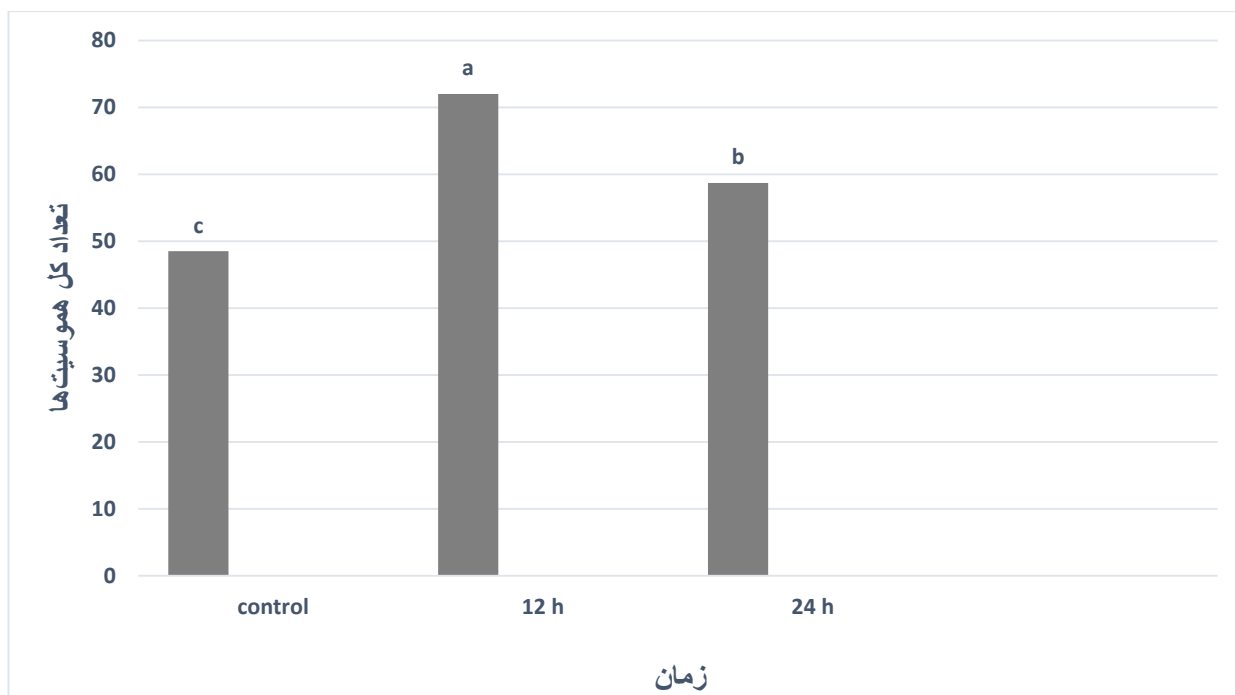
جدول سمیت باکتری *B.t* بر لاروهای بید کلم حاصل از آنالیز با polo-pc به دست آمد. میزان LC_{25} حدود ۳۶-۵۱/۵ بود. به عبارتی دوزهایی که در این دامنه قرار می گیرند سبب ۲۵ درصد تلفات حشرات می شوند. بنابراین از دوز ۴۰ پی پی ام که جزء LC_{25} محسوب می شود در آزمایشات ایمنی شناسی حشره بید کلم استفاده گردید (جدول ۴-۱).

جدول ۴-۱ سمیت حشره کش بیولوژیک *Bacillus thuringiensis* بر لارو سن پنج بید کلم *Plutella xylostella*

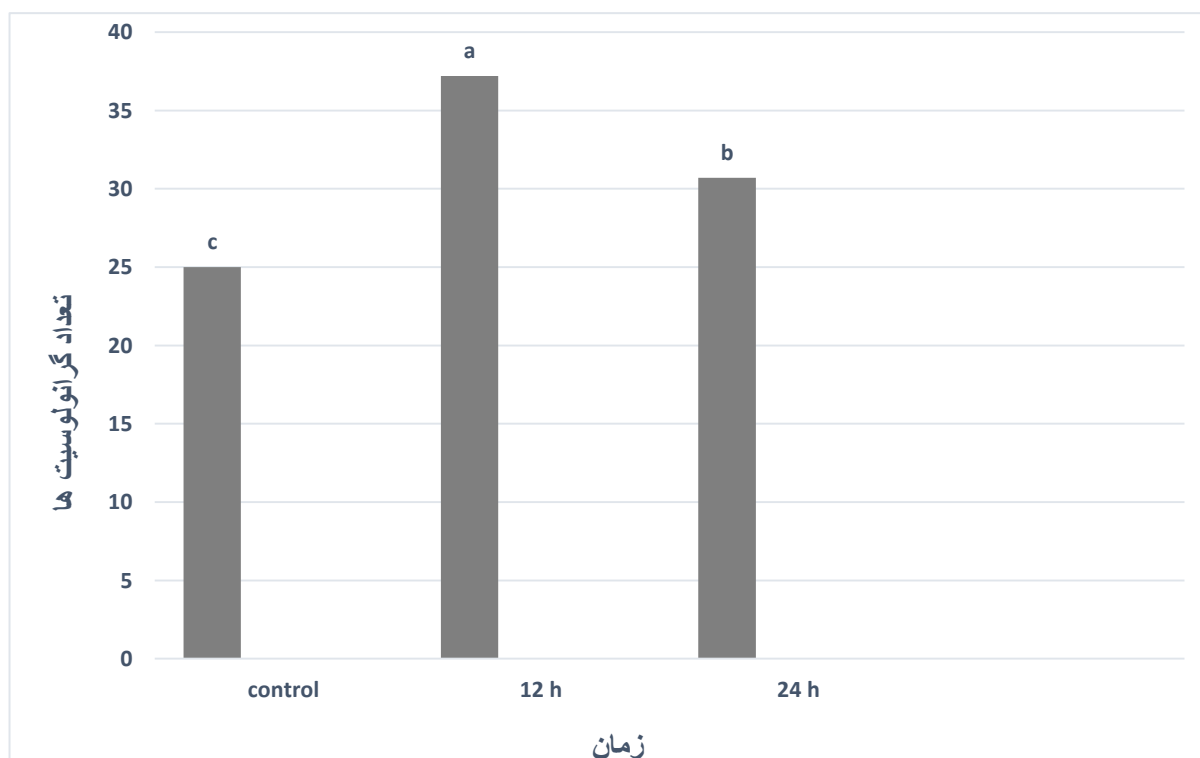
Pest	Numbers	Chi-square	Slope $\pm$ se	$LC_{25}(90\%FL)$	$LC_{50}(90\%FL)$
<i>Plutella xylostella</i>	300	1.5	2.2 $\pm$ 0.53	36-51.5 ppm	65.5-110 ppm

۴-۴ بررسی تاثیر *B.t* روی تعداد کل و انواع سلول های خونی لارو سن پنج بید کلم

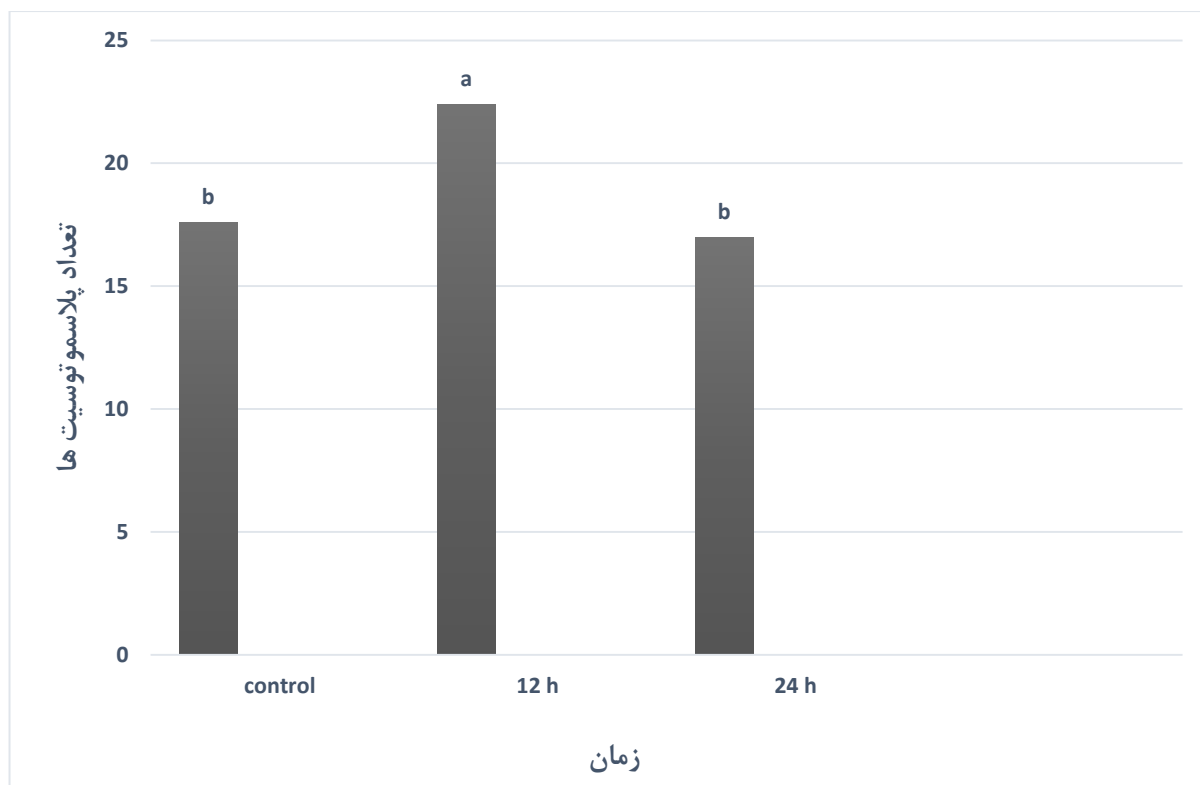
نتایج نشان داد که واکنش ایمنی لاروهای که از برگ های آلوده به باکتری *B. t* تغذیه کردند معنی دار بوده است. بیشترین تغییرات معنی دار روی سلول های خونی بعد از ۱۲ ساعت تغذیه لاروها از برگ های آلوده به باکتری رخ داده است به طوریکه پس از ۱۲ ساعت افزایش معنی داری در تعداد کل سلول های خونی ($F=22.5$, $df_{t,e}=2$, 37; $p\leq 0.002$)، گرانولوسیت ها ($F=45.6$, $df_{t,e}=2$, 37; $p\leq 0.0001$)، پلاسموتوسیت ها ($F=36.7$, $df_{t,e}=2$, 37; $p\leq 0.001$) و پروهموسیت ها ($F=12.5$, $df_{t,e}=2$, 37; $p\leq 0.0006$) نسبت به شاهد اتفاق افتاده است. به تدریج با گذشت زمان تعداد کل و تعداد گرانولوسیت ها لاروها تا زمان ۲۴ ساعت کاسته شد ولی در همولنف لاروهای که ۲۴ ساعت از برگ های آلوده تغذیه کرده بودند همچنان تعداد کل سلول های خونی و گرانولوسیت ها و پروهموسیت ها بالاتر از لاروهای شاهد بود (شکل های ۴-۹، ۴-۱۰، ۴-۱۱، ۴-۱۲).



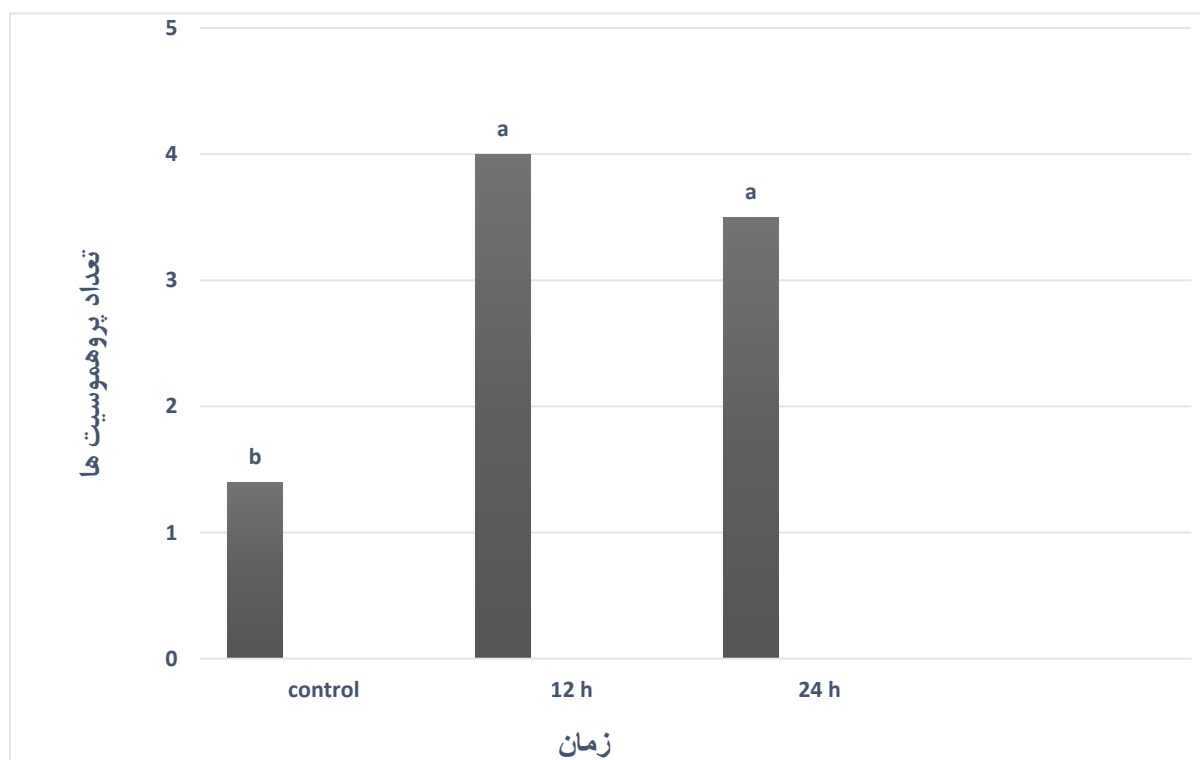
شکل ۹-۴ تاثیر باکتری *B. t.* بر تعداد کل هموسیت های لاروهای سن پنج بید کلم



شکل ۱۰-۴ تاثیر باکتری *B. t.* بر تعداد گرانولوسیت های لاروهای سن پنج بید کلم



شکل ۴-۱۱ تاثیر باکتری *B. t* بر تعداد پلاسموتوسیت های لاروهای سن پنج بید کلم

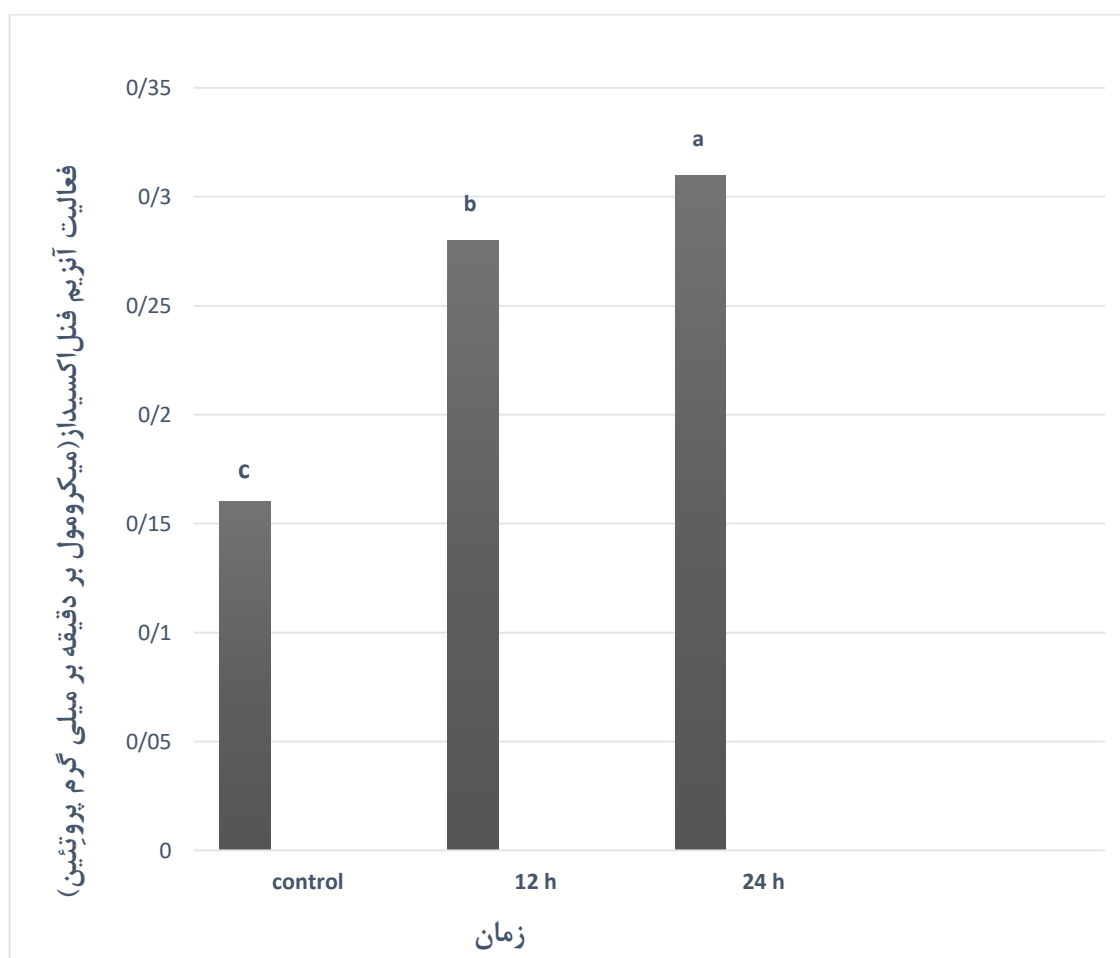


شکل ۴-۱۲ تاثیر باکتری *B. t* بر تعداد پروهموسیت های لاروهای سن پنج بید کلم

۵-۴ بررسی تاثیر *B. t* بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم

نتایج این آزمایش نشان داد که تغذیه از برگ‌های آلوده به باکتری *B. t* سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم فنل اکسیداز شد ($F=19.72$, $df_{t,e}=2, 37$; $p\leq 0.0001$). میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در لاروهای که به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت از برگ‌های آلوده به باکتری تغذیه کرده بودند به ترتیب با میانگین 0.28 ± 0.01 و 0.31 ± 0.02 میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین به طور معنی‌داری نسبت به شاهد

افزایش یافت (شکل ۴-۱۳)

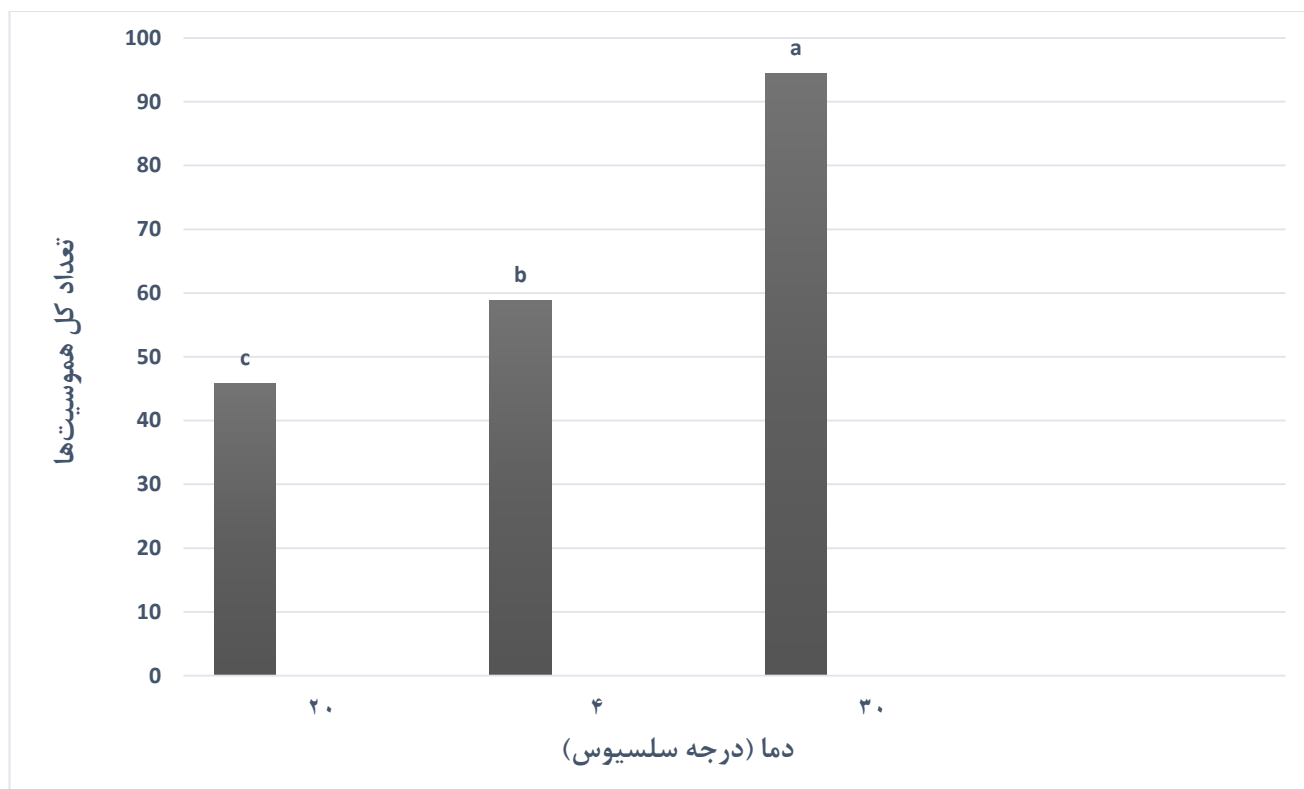


شکل ۴-۱۳ تاثیر باکتری *B. t* بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم

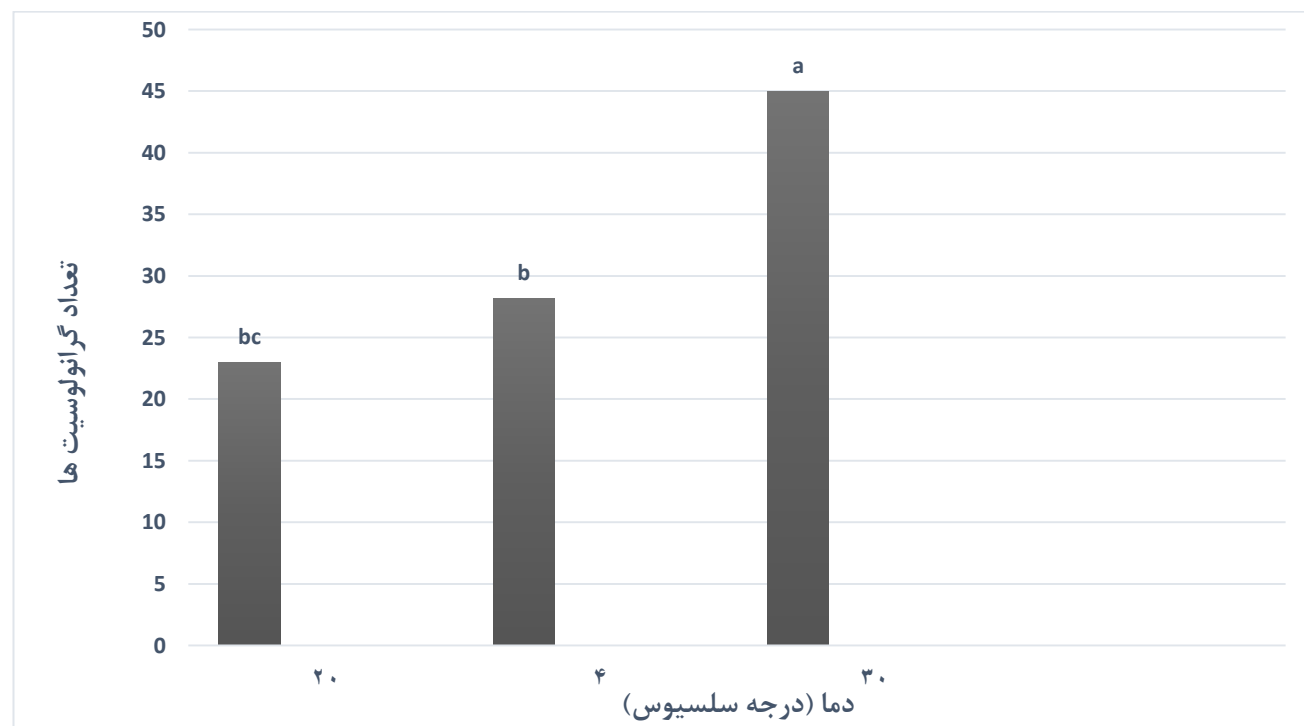
۴-۶ بررسی تاثیر دماهای مختلف روی تعداد سلول‌های خونی لاروهای سن پنج بید کلم

واکنش‌های دفاع سلولی لارو سن پنج بید کلم در برابر تنش‌های دمایی (۴ و ۳۰ درجه سلسیوس) معنی‌دار بود. نتایج حاصل از تاثیر دمایی مختلف روی هموسیت‌های لارو سن پنج بید کلم نشان می‌دهد که در لارو-هایی که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند؛ تعداد کل هموسیت‌ها، گرانولوسیت-ها، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها نسبت به شاهد (دمای 20 ± 1 درجه سلسیوس) افزایش یافت. به طوریکه تغییرات معنی داری در تعداد کل هموسیت‌ها ($F=21.3, df_{t,e}=2, 37; p \leq 0.005$)، گرانولوسیت‌ها ($F=17.7, df_{t,e}=2, 37; p \leq 0.05$)، پلاسموتوسیت‌ها ($F=32.4, df_{t,e}=2, 37; p \leq 0.0001$) و اونوسیتوئیدها ($F=10.6, df_{t,e}=2, 37; p \leq 0.003$) نسبت به شاهد ایجاد شد. همچنین در اثر تنش سرما (دمای ۴ درجه سلسیوس)، تعداد کل هموسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و اونوسیتوئیدها نسبت به شاهد افزایش یافت. در این دما تغییرات معنی داری در تعداد کل هموسیت‌ها ($F=22.5, df_{t,e}=2, 37; p \leq 0.0001$)، گرانولوسیت‌ها ($F=15.6, df_{t,e}=2, 37; p \leq 0.003$) و اونوسیتوئیدها ($F=25.8, df_{t,e}=2, 37; p \leq 0.05$) و پروهموسیت‌ها نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل

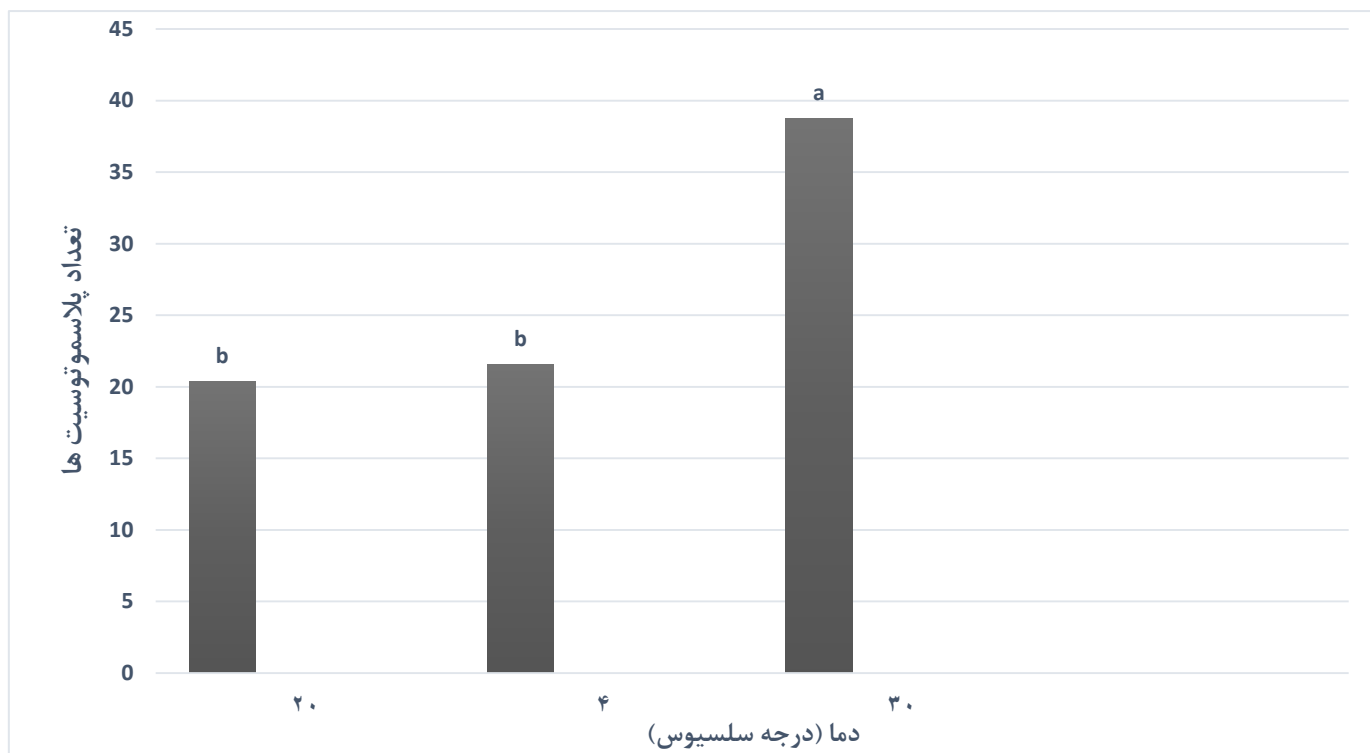
های ۴-۱۴، ۴-۱۵، ۴-۱۶، ۴-۱۷، ۴-۱۸)



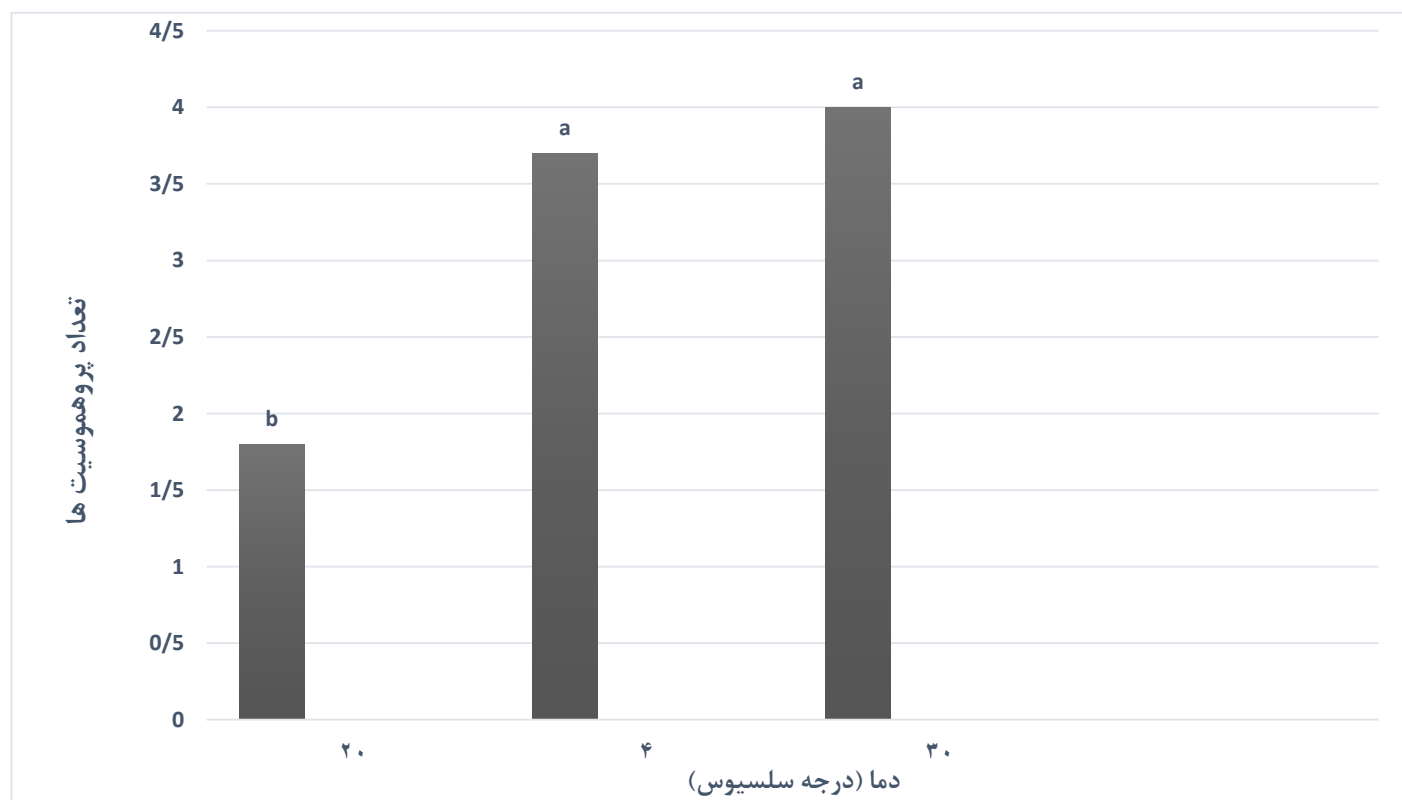
شکل ۴-۱۴ تاثیر تنش دما بر تعداد کل هموسیت‌های لاروهای سن پنج بید کلم



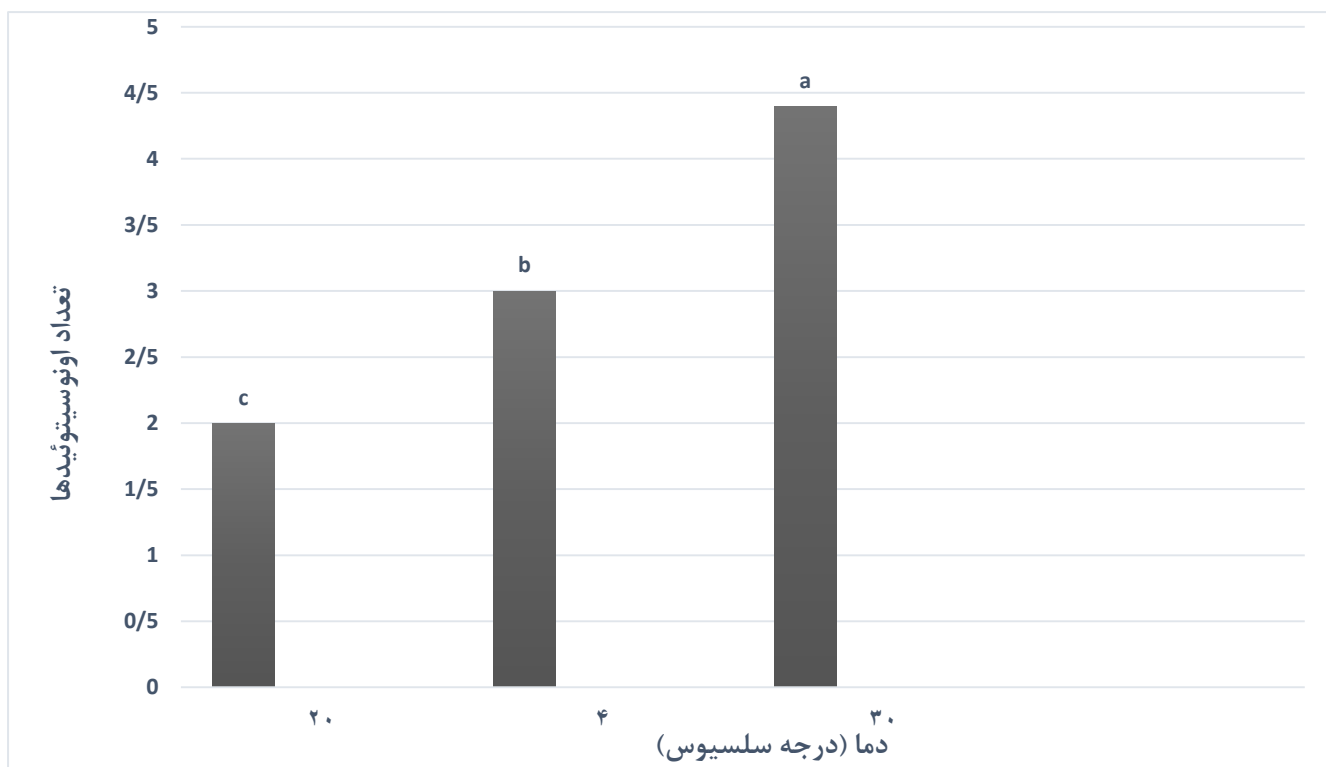
شکل ۴-۱۵ تاثیر تنش دما بر تعداد گرانولوسیت‌های لاروهای سن پنج بید کلم



شکل ۴-۱۶ تاثیر تنش دما بر تعداد پلاسموتوسیت های لاروهای سن پنج بید کلم



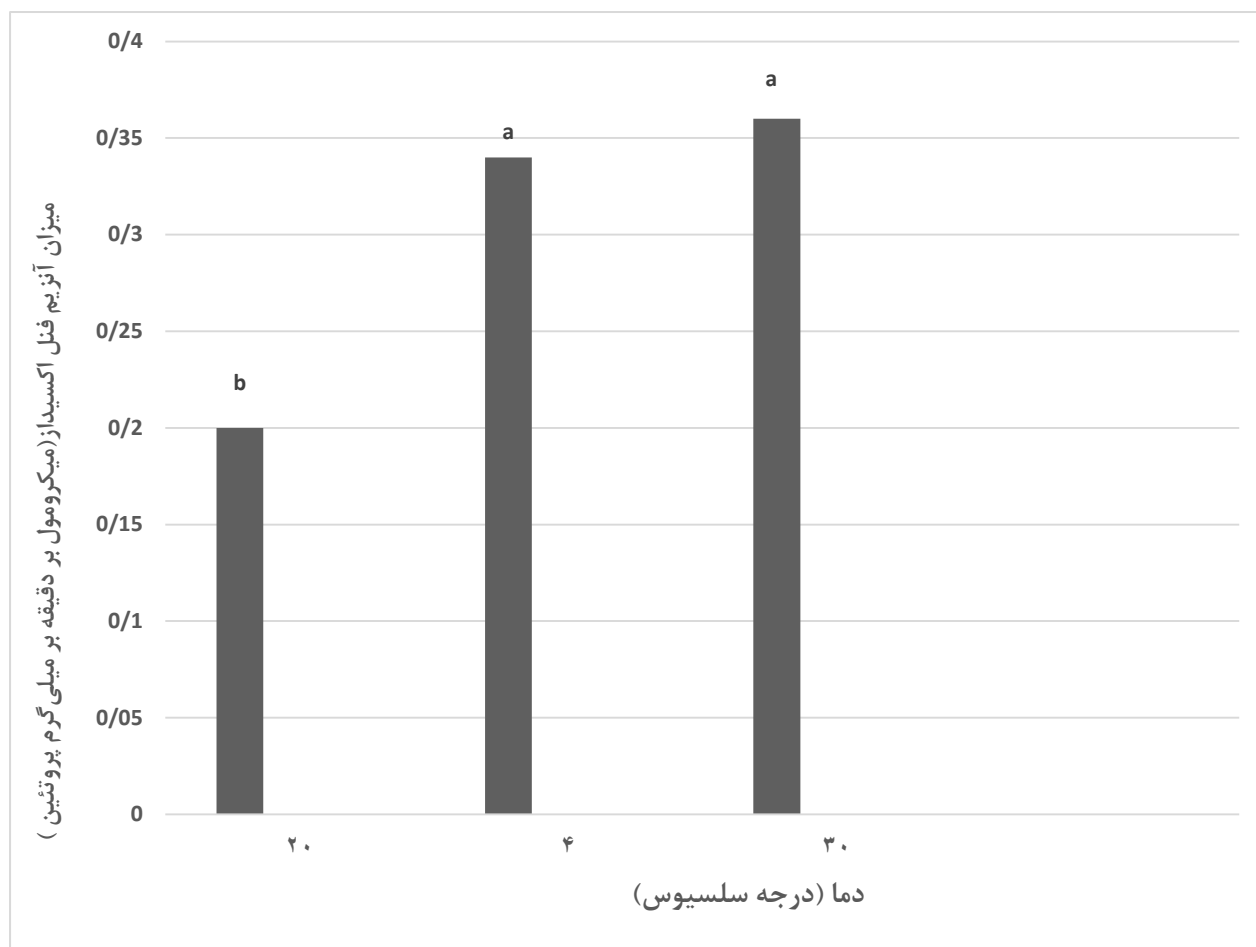
شکل ۴-۱۷ تاثیر تنش دما بر تعداد پروهموسیت های لاروهای سن پنج بید کلم



شکل ۴-۱۸ تاثیر تنش دما بر تعداد اونوسیتوئیدهای لاروهای سن پنج بید کلم

۴-۷ بررسی تاثیر تنش‌های دمایی مختلف بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم

نتایج این آزمایش نشان داد که افزایش و کاهش دما به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم فنل اکسیداز را افزایش می‌دهد ($F=18.6$, $df_{t,e}=2, 37$; $p \leq 0.003$). فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در شاهد 0.2 ± 0.001 میکرو-مول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بود که به طور قابل توجهی پایین تر از فعالیت آن در لاروهای تحت تنش دمایی ۴ درجه سلسیوس (0.34 ± 0.01 میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) و دمایی ۳۰ درجه سلسیوس (0.36 ± 0.04 میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) بود (شکل ۴-۱۹).



شکل ۴-۱۹ تاثیر تنش دما بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در همولنف لارو سن پنج بید کلم

شناسایی سلولهای خونی اولین گام در مطالعه فیزیولوژی گردش خون حشرات محسوب می شود. چرا که سلول های خونی به عنوان مؤلفه های هموگرام، نقش مؤثری در تشخیص عامل بیگانه و انهدام آن دارند. همچنین تأثیر هر نوع تنش گرما و سرما و عامل محیطی دیگر نیز به طوری معنی داری بر تعداد آن ها تأثیر دارد. تقریباً در خون لاروهای همه بالپولک داران حضور پنج نوع هموسیت اثبات شده است، که عبارتند از:

پروهموسیتها، گرانولوسیتها، پلاسموتوسیتها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت ها.

در خون لاروهای بیدکلم، نتایج نشان دهنده حضور و فعالیت این ۵ نوع سلول خونی می باشد. نتایج مشابهی نیز در تحقیقات دیگران مبنی بر وجود این سلول های خونی گزارش شده است مانند: کرم گلوگاه انار (Khosravi *etal*, 2012)، شب پره مدیترانه ای آرد (Chasemi *etal*, 2013)، بید سیب زمینی (Pourali and Ajamhassani, 2018)، کرم آلو (Mahmoodzadeh *etal*, 2020) بیدچغندر قند (Ajamhassani, 2021)، سرخرطومی حنایی خرما (Manachini *etal*, 2011)، شب پره خرنوب (Khosravi *etal*, 2012) *Ectomoyelois ceratoniae* Zeller، کرم ابریشم (Tan *etal*, 2013)، کرم تارتن پاییزی (Ajamhassani *et al*, 2013)، کرم شاخدار فرفیون (Ajamhassani, 2015)، و لارو لیسه سیب (Ajamhassani and Mahmoodzadeh, 2019). بنابراین، نتایج این تحقیق از منظر انواع سلول های خونی موجود در همولنف بید کلم با نتایج اکثر محققین در این رابطه همخوانی دارد. بر اساس گزارشات محققین ایمنی شناسی حشرات ثابت شده که جمعیت هموسیت های در گردش خون می تواند به سرعت در پاسخ به جراحات جلد، گرسنگی، نوع تغذیه، تغییرات دمایی و آلودگی ناشی از میکروارگانیسم ها، ذرات سموم و آلاینده های محیطی تغییر کند (Mowlds *etal*, 2008; Duarte *etal*, 2020). این تغییر اصولاً به شکل تغییر در مورفولوژی و فراوانی پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها مشاهده می شود. پروهموسیت ها به عنوان سلول های پایه و بنیادی در طول هماتوپوئیز ساخته شده و به همراه پلاسموتوسیت ها از اندام های هماتوپوئیتیک آزاد می شوند. این سلول ها در شرایط تنش یا ورود عامل بیگانه به همولنف به سایر سلول ها مشتق شده و به این ترتیب آمادگی دفاع سلولی را افزایش می دهند. پلاسموتوسیت ها و

گرانولوسیت ها به عنوان سلول های اصلی مشارکت کننده در ایمنی سلولی مداخله می کنند (Lavin and Strand, 2002). مجموع فراوانی این سلول ها در لارو کامل اکثر بالپولکداران حدود ۸۰ تا ۹۰٪ کل سلول های خونی را شامل می شود. نتایج این تحقیق حاکی از این بود که تعداد کل سلول های خونی با افزایش سن لاروی ارتباط مستقیم دارد. به عبارتی همراه با افزایش وزن و جثه لاروها تعداد سلول های خونی در گردش خون بیشتر می شود. همچنین مشخص شد که در سنین پایین لاروی پروهموسیت ها به عنوان سلول های پایه بیشترین فراوانی را دارند که پس از رشد لاروها و تبدیل آن ها به سنین بالاتر این سلول ها به پلاسموتوسیت و گرانولوسیت که سلول های اصلی مشارکت کننده در دفاع سلولی می باشند، تبدیل می شوند. همچنین پس از تبدیل شدن به شفیره و حشره کامل که دفاع سلولی کاهش می یابد، تعداد ایمنوسیت ها کاهش یافته و پروهموسیت ها فراوان تر می شوند. این نتایج با نتایج سایر محققین نیز مطابقت داشت. در مطالعه فراوانی سلول های خونی لارو سن پنج بید کلم مشخص شد که ۷۵ درصد از سلول های خونی این حشره پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها می باشند. همچنین نتایج نشان دادند که پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها به ویژه در سنین آخر لاروی حشرات سوسک شاخک بلند رزاسه و کرم خراط بیشترین فراوانی را داشتند. پروهموسیت ها به عنوان سلول های پایه یا Stem cell در لارو سن اول هر دو حشره بالاترین فراوانی را نسبت به سایر سنین لاروی داشته، ولی به تدریج با رشد لارو در سنین بالاتر از فراوانی پروهموسیت ها کاسته شد (عجم حسنی، ۱۳۹۸). همانطور که مشخص شده مقدار پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها در لاروهای سن پنجم کرم تارتن پاییزی نزدیک به ۸۶ درصد کل سلولهای خونی بود (Ajamhassani et al, 2013). تحقیقات آندرید و همکاران (2010) روی لارو *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: noctuidae) نشان داد که ایمنوسیت ها در لارو سن آخر این حشره فراوانترین سلول ها می باشند. قاسمی و همکاران (۲۰۱۳) نیز مجموع پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها را در لاروهای سن آخر *Anagasta kuehniella* Zeller حدود ۷۴ درصد گزارش کردند. همچنین ثابت شده که پلاسموتوسیت ها حدود ۵۱ درصد و گرانولوسیت ها ۳۶ درصد از جمعیت هموسیت های سرخرطومی حنایی خرما *Rhynchophorus ferrugineus* را شامل می شوند (Manachini et al, 2011).

بلانکو و همکاران (2017) ثابت کردند که فراوانترین سلول های خونی در همولنف لارو سن آخر پروانه موم خوار بزرگ گرانولوسیت ها و پلاسموتوسیت ها هستند. فراوانی گرانولوسیت ها و پلاسموتوسیت ها در لاروهای سن پنجم پروانه برگخوار شبدر علوفه ای *Utethesia pulchella* (Ajamhassani, 2014) و کرم شاختار فرفیون *Hyles euphorbia L.* (Ajamhassani, 2015) بیش از ۷۰ درصد گزارش شد. به علاوه اینکه مجموع فراوانی گرانولوسیت ها و پلاسموتوسیت ها در همولنف لاروهای سن آخر شب پره هندی و بید سیب زمینی حدود ۹۰ درصد اعلام شد (Ajamhassani and Pourali, 2017; Pourali and Ajamhassani, 2018). از این رو به نظر میرسد فراوانی بالاتر سلولهای مؤثر در واکنشهای ایمنی (پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها) منجر به افزایش دفاع سلولی لاروهای سنین بالا می شود. بنابراین لاروهای بزرگتر در برابر بیمارگرها و پارازیتوئیدها مقاومت بیشتری نشان می دهند (Valades, 2011). در بخشی از تحقیق حاضر دفاع لاروهای سن پنجم بید کلم پس از تغذیه از برگ های کلزای آلوده به باکتری *B.t* با افزایش معنی دار همه ی سلول های خونی و فعالیت آنزیم فنل اکسیداز همراه بود. این تغییر تقریباً در همان ساعات اولیه ورود آلودگی به هموسل رخ داد که از ویژگی های دفاع سلولی جانوران است (Standly and Miller, 2006). در واقع، در فاصله زمانی حدود ۱۲ ساعت پس از ورود عامل بیگانه به بدن لارو، سامانه دفاع یاخته ای تحریک می شود. چنین به نظر می آید که در این فرایند، تعداد زیادی هموسیت جدید تولید می شود و جایگزین هموسیت هایی می شود که در واکنش به عامل بیگانه نابود می شوند (Li et al, 2019). ضمن اینکه قسمت عمده این افزایش مربوط به گرانولوسیت ها و پلاسموتوسیت ها است. این سلولها نقش عمده در فعالیت های بیگانه خواری، تشکیل گره و کپسول اطراف عامل بیگانه دارند و ثابت شده به همراه توکسین های ترشح شده و فعالیت اجزای فنل اکسیداز سبب ملانیزاسیون و بلوکه شدن عامل آلوده می شوند (Beckage, 2008). نتایج نشان داد با گذشت زمان تا ۲۴ ساعت سامانه ایمنی حشره کمی ضعیف تر شد ولی همچنان فراوانی سلول های خونی در پاسخ به ذرات *B. t* بالاتر از شاهد بود. بنابراین تغییر معنی دار تعداد سلول های خونی و برگشت آنها به حالت اولیه، یک فعالیت فیزیولوژیکی سیستم گردش خون در مقابل *B.t* است. چرا که حفظ هموستازیس موجود زنده در تمام مراحل رشدی ضروری است (Nakahara et al, 2003). محققین

دیگر نیز مشخص کرده اند که حضور عامل مهاجم در همولنف حشره به ویژه در ساعات اولیه حضور عامل بیگانه منجر به تغییر در تراکم هموسیت ها به ویژه ایمنوسیت ها می شود. زیبایی و همکاران (۲۰۱۱) حمله قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* به همولنف سن گندم را ۳ ساعت پس از ورود عامل بیگانه به گردش خون حشره بسیار تأثیر گذار دانسته و ملاحظه کردند که در این زمان بیشترین تغییر در تعداد هموسیت ها رخ داد. عجم حسنی و همکاران (۲۰۱۳)، تغییر سلولهای خونی لارو شب پره اشجار را ۶ ساعت پس از حمله قارچ *B. bassiana* معنی دار مشاهده کردند.

بررسی پاسخ ایمنی کرم ساقه خوار نواری برنج (*Chilo suppressalis* walker (lep:pyralidae) در برابر قارچ های بیمارگر *B. bassiana*، *Metarhizium anisopliae*، *I. fumosoroseus* و *Lecanicillium lecanii* توسط زیبایی و ملاگلی (۲۰۱۴) انجام شد. نتایج این بررسی مشخص کرد که بیشترین تعداد کل خونی ۳ ساعت بعد از تزریق قارچ *B. bassiana* و ۶ ساعت بعد از تزریق سایر قارچ ها حاصل شد.

زیبایی و همکاران (۲۰۱۴)، تغییرات فراوانی گرانولوسیت ها را در کرم ساقه خوار برنج در ساعات اولیه ورود عامل قارچی گزارش نمودند. مطالعه اثرات تزریق اسپور قارچ های *B. bassiana* و *M. anisopliae* روی لارو سن ۵ *Spodoptera littoralis* توسط میر حق پرست و همکاران (۲۰۱۳) انجام گردید و اثرات آن بر سیستم ایمنی سلولی و آنزیم های شرکت کننده در متابولیسم تعیین شد. ایمنوسیت ها در شش ساعت پس از تزریق هردو قارچ بیشترین تعداد را داشتند و اندازه گیری مقدار فعالیت آنزیم فنل اکسیداز نشان داد که در زمان ۶ تا ۱۲ ساعت بعد از تزریق قارچ *B. bassiana* و بعد از ۱۲ ساعت بعد از تزریق قارچ *M. anisopliae* بیشترین فعالیت این آنزیم حاصل گردید.

پاسخ ایمنی سلولی سن خون خوار *R. prolixus* در برابر باکتری بیماری زای *E. coli* تغییرات شدید مورفولوژیکی و همچنین افزایش تعداد سلول ها را به همراه داشت که نهایتاً سیستم ایمنی حشره به باکتری بیماری زا غالب شد (Borges and et al, 2008). تأثیر قارچ *M. anisopliae* بر روی واکنش ایمنی *Galleria mellonella* توسط سوفای و هاشم (۲۰۰۱) بررسی شد. آنها اعلان کردند که بعد از تیمار با قارچ تعداد کل سلول های خونی نسبت به شاهد افزایش معنی داری نشان داده است.

نتایج بررسی پاسخ ایمنی ملخ صحرایی در برابر قارچ بیماری زای *M. anisoplia* افزایش معنی دار تعداد کل سلول های خونی حشره تیمار شده با قارچ نسبت به شاهد را نشان داد (Gillespie and et al, 2000).

ورود اسپورهای قارچ بیمارگر *Beauveria bassiana* به همولنف لارو پروانه برگخوار سفید اشجار *Utethesia pulchella* L. (عجم حسنی ۱۳۹۳) و لارو بید سیب زمینی (*Phthorimaea operculella* Zeller) (Pourali and Ajamhassani, 2018) در فاصله ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق قارچ، به شدت سبب افزایش معنی دار هموسیت ها و افزایش حجم خون گردید. سلول های خونی لاروهای کرم ابریشم *Bombyx mori* در ساعات اولیه هجوم باکتری *Escherichia coli* دچار تغییر در مورفولوژی و تعداد شدند. گرانولوسیت ها و پلاسموتوسیت ها با گره زایی اطراف عامل بیگانه در شرکت در ملانیزاسیون فعالیت کردند (Li et al, 2019).

پاسخ ایمنی *Spodoptera litura* تغذیه کرده از رژیم غذایی غنی از هیدرات کربن در مقابل نماتد بیمارگر *Mesorhabditis belari*، باکتری همزیست و متابولیت های آن کاملاً معنی دار بود (Manjula et al, 2020). همچنین در تقابل سلولهای خونی با قارچ بووریا در خون شب پره شبدر علوفه ای، واکنش های ایمنی در ۶ ساعت اولیه ورود عامل بیگانه محسوس تر بود (عجم حسنی، ۱۳۹۴). در نتایج مربوط به لیسه سیب، تأثیر باکتری B.t بر فراوانی هموسیت های لاروسن ۵ این حشره، پاسخ ایمنی حشره در ۶ ساعت اولیه حضور باکتری بسیار معنی دار بود (Ajamhassani and Mahmoodzadeh, 2020). نتایج تحقیق حاضر با نتایج فوق مطابقت دارد از این نظر که هموسیت های حشرات مورد آزمایش همواره واکنش مثبتی با تغییر شکل و تعداد در مقابل عامل بیگانه در ۳-۶ ساعت ابتدای ورود عامل قارچی یا باکتریایی نشان می دهند. در واقع گرانولوسیت ها بوسیله پروتئین های پکتین که در سطح گرانول های خود مجهز به آنها هستند در اولین اقدام، حضور عامل بیگانه را شناسایی و تأیید می کنند. سپس با تقیسمات میتوتیک پروهموسیت ها و گرانولوسیت ها و انشقاق آن ها به سلول های ایمنوسیت، تعداد سلول های مشارکت کننده در ایمنی و به دنبال آن تعداد کل سلول های خونی افزایش معنی داری می یابد. (Lavin and strand, 2008; Zibae et al, 2011)

دما نقش مهم در رشد حشرات و ساز و کار هموستازیس دارد (Ghasemi et al, 2013). نقش دما در فرایندهای سامانه ایمنی حشرات نیز ثابت شده است. در تحقیق حاضر تنش های دمایی گرما و سرما هر دو به افزایش معنی دار جمعیت هموسیت ها و فعالیت فنل اکسیداز منتهی شد. به علاوه دیواره سلولی گرانولوسیت ها در تنش با دمای بالا پاره شده و اندامک های سلولی به بیرون از سلول ریخته شد. از طرفی سرما سبب کوچک و فشرده شدن سلول های خونی به ویژه گرانولوسیت ها شده و دیواره سلولی اغلب سلولها چروکیده شده بود (نتایج مشاهده ای). تغییرات تعداد و شکل سلول های خونی تحت تأثیر تنش های دمایی در تحقیقات سایر محققین نیز مشاهده شده است. به عبارت دیگر نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات مرتبط همخوانی نشان داده است. چنانکه پورعلی و عجم حسنی در سال ۲۰۱۸ مشاهده کردند که تغییرات دمایی سبب تغییر تعداد سلول ها و ایمنوسیت ها در بازه های زمانی کوتاه مدت می شود. هموسیت های بید چغندر بسیار حساس به تنش های دمایی بالا بوده و دیواره سلولی آن ها به ویژه گرانولیسیت ها و اونوسیتوئیدها در دمای ۲۸-۳۰ درجه دچار پارگی شد. محتویات سلولی کاملاً به بیرون از سلول ریخته شده و سلول ها مضمحل شدند. به علاوه سرمای ۴ درجه سانتی گراد سبب فشردگی دیواره سلول ها و کوچک شدن هسته سلول ها شد (Ajamhassani, 2021). قاسمی و همکاران نشان دادند دما تراکم سلولهای خونی شب پره بید آرد *Ephestia kuehniella zeller* را به طور معنی داری تغییر داده ، غشای سلولهای خونی پاره شده و محتویات سلولی به بیرون ریخته می شود (Ghasemi et al, 2013). در تحقیقات پورعلی و همکاران در سال ۲۰۱۸، دمای پایین (۴ درجه سلسیوس) سبب کوچک شدن سلول های خونی لارو بید سیب زمینی و چروکیدگی دیواره سلولی آن ها شد (Pourali and Ajamhassani, 2018). تأثیر تنش های دمایی بر فراوانی هموسیت ها در لارو لیسه سیب (Ajamhassani and Mahmoodzadeh, 2020) و کرم جگری L (Ajamhassani and Pourali, 2020) نیز مشهود بود. در این بررسی ها دمای ۳۵-۴۰ درجه سلسیوس در بازه زمانی ۲۴ ساعت سبب افزایش معنی دار تعداد کل هموسیت ها، پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها شد و سرما با دمای ۴ درجه سلسیوس کاهش معنی دار هموسیت ها را به همراه داشت.

به نظر می رسد دماهای بالا و پایین می توانند حتی در زمان های کوتاه مانند ۲۴ و ۴۸ ساعت علاوه بر تعداد روی شکل سلول های خونی هم تأثیر نامطلوبی داشته باشند. به طوری که سلول ها دفرمه شده و یا محتویات آنها خارج شده که در این صورت، سلول قطعاً کارایی لازم را برای مقابله با تنش نداشته و ایمنی تضعیف می شود. توجه به این نکته و استفاده از نتایج بر هم کنش تنش های دما با ایمنی حشرات می تواند در استفاده از روش های مهم کنترل حشرات با استفاده از اثرات دما مؤثر باشد. البته حتماً تحقیقات تکمیلی مورد نیاز است تا به نتایج مطلوب در این راستا دست یافت. در آزمایشات این تحقیق، تأثیر تنش دما و ورود باکتری به همولنف سامانه فنل اکسیداز را تحریک و سبب افزایش معنی دار فعالیت این آنزیم شد.

در تحقیق حاضر مشاهده شده همراه با افزایش معنی دار تعداد گرانولوسیت ها در مقابله با تنش، فعالیت سامانه فنل اکسیداز نیز افزایش قابل توجهی یافت. البته باید در نظر داشت که یکی از منابع بالقوه تولید فنل اکسیداز در بالپولکداران اونوسیتوئیدها هستند (Jiang et al, 1997) و فراوانی این سلول ها نیز هنگام تنش های دمایی تغییر محسوسی پیدا کرد. تغییر در تعداد سلول های خونی، به عنوان ارکان اصلی و پایه ای دفاع فیزیولوژیک، سامانه ایمنی حشره را تحت تأثیر قرار می دهد. چنانچه ایمنی حشره از توانمندی بالا برخوردار باشد، می تواند بر عامل بیگانه فایق آید و بر عکس گاه مشاهده شده که سیستم ایمنی ضعیف سبب پیشرفت آلودگی شده است که در این صورت، نتیجه برهمکنش به نفع قارچ یا باکتری بیماری زا خواهد بود. در واقع، نوع واکنش حشره به عامل میکروبی مهاجم، کارایی روش های کنترل مانند کنترل میکروبیولوژیک و شیمیایی را تا حدود زیادی مشخص می کند. لذا مطالعه و بررسی اثرات متقابل آلودگی حاصل از باکتری ها و قارچ های بیمارگر در همولنف با اجزای دفاع سلولی و هیومرال حشره ضروری است تا بتوان در اتخاذ روش های کنترل میکروبی با تدبیر بیشتری اقدام نمود.

منابع

بندانی، ع. ر. ۱۳۸۹. فیزیولوژی حشرات (هموستازیس، کوتیکول، اندام چربی، خون، p450، تنظیم دما) دانشگاه تهران. موسسه انتشارات. چاپ اول. ۴۵۷ صفحه.

جلالی سندی، ج. و زیبایی، آ. ۱۳۸۹. شناسایی و شمارش تفرقی و کل هموسیت های لارو پروانه ی سفید اشجار، (lep: *Hyphantria cunea* (arctiidae) و برگخوار توت، *Glyphodes pyloalis* (lep: crambidae)، و بررسی تاثیر هورمون جوانی I روی این سلول ها. نشریه نامه ی انجمن حشره شناسی ایران. ۳۰(۲):۶۷-۴۷.

خانجانی، م. ۱۳۸۴. آفات سبزی و صیفی ایران. انتشارات دانشگاه بو علی سینا، چاپ اول، ۴۶۷ صفحه.

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

خسروی، ر. جلالی سندی، ج. و قاسمی، و. ۱۳۹۱. شناسایی سلول های خونی لارو شب پره خرنوب

Ectomoyelois ceratoniae Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) تحقیقات آفات گیاهی، ۲(۳):۳۹-۳۰.

راحت خواه، ز. کریمی، ج. قدمیاری، م. و مروج، غ. ۱۳۹۵. بررسی تغییر پذیری یا خته های خونی و فعالیت فنل اکسیداز لارو پروانه موم خوار بزرگ تیمار شده با دو گونه نماتد *feltiae steinernema* و *heterorhabditis bacteriophora* کنترل بیولوژیک آفات و بیماری های گیاهی. ۵(۱):۴۷-۳۹.

عجم حسنی، م. ۱۳۹۲. بررسی پاسخ های دفاع سلولی سوسک سرشاخه خوار رزاسه *osphranteria*

coerulescens (coleoptera: cerambycidae)

redtenbacher نسبت به قارچ های بیمارگر *Beauveria bassiana* - *Isaria farinosae*. سومین همایش ملی مدیریت کنترل آفات (ipmc). ۴۴۳. شماره ۱۰. صفحه ۸۳۵-۸۵۰.

عجم حسنی، م. (۱۳۹۳ الف). بررسی دفاع سلولی لاروهای (Lepidoptera: *Utethesia pulchella*)

Arctiidae در مقابل قارچ های *Isaria farinosae* و *Beauveria bassiana*. مهارزیستی در گیاه پزشکی، جلد ۲. شماره یک. صفحه ۶۷-۵۷.

عجم حسنی، م. ۱۳۹۳ ب. واکنش های 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 سلول های خونی کرم شاخدار *Hyles euphorbiae* L.

(Lepidoptera : sphingidae) مجله علمی کشاورزی، جلد ۳۸. شماره ۳. صفحه ۶۲-۵۰.

عجم حسنی، م. پورعلی، ز. ۱۳۹۸. مطالعه هموگرام و تأثیر تنش دما بر فراوانی ایمنوسیت های کرم جگری *Cossus* (Lepidoptera: Cossidae). نشریه علمی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگل ها و مراتع ایران. جلد ۱۷، شماره ۲. صفحه ۲۳۹-۲۵۰.

عجم حسنی، م. محمودزاده، م. ۱۳۹۷. واکنش دفاع سلولی لارو لیسه سیب در برابر تنش های گرسنگی دمایی و باکتری بیماری زای *Bacillus thuringiensis*. مجله پژوهش های جانوری. جلد ۳۳، شماره ۱، صفحه ۵۹-۶۸.

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

گلی زاده، ع.، ۱۳۸۷. نیازهای دمای و دینامیسم جمعیت شب پره پشت الماسی (*Plutella xylostella* (L.))

(lep.: plutellidae) در منطقه تهران ، رساله دکتری حشره شناسی ، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۹۱ ص.

Ajamhassani, M., Sendi, J.J., Zibae, A., Askary, H. and Farsi, M.J. 2013. Immunological 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: 110-118.

Akai , h., and 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.

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

Anggraeni, T ., and putra, R.E.(2011).cellular and humoral immune defenses of *oxya japonica* (orthoptera: Acrididae) to entomopathogenic fungi *metarhizium anisopliae*. Entomological research,41(1),1-6.

Araujo, H. R. C., Cavaleanti, M. G. S., Santos, S. S., Alves, L. C. and brayner, F.A., 2008. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Micron 39:184-189.

Arnold, J. W.(1952). The haemocytes of the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* zell. (Lepidoptera: pyralididae). Canadian journal of zoology, 30(6),352-364.

Ashida, M. (1997). Recent advances in research on the insect prophenoloxidase

Cascade . Molecular Mechanism of immune Responses in insects , 22(4) , 135-172.

Avrdc. (1987. 1984) progress report. Shanhua, Taiwan: Asian vegetable. Research and development center. 480 pp.

Bao, Y., Yamano, Y. and Morishima, I. 2007. Induction of hemolin gene expression by bacterial cell wall components in eri-silkworm, *Samia cynthiaricini*. Molecular Biology, 146: 147-151.

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

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

- Brayner, F.A., Araujo, H. R. C., Cavalcanti, M.G. S., Alves, L. C., and Peixoto, C.A.(2005). Ultra structural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Micron* , 36(4),359-367.
- Bhalla, O. P., Dubey, J. K.1986. Bionomics of the diamondback moth in the northwestern Himalaya. 170, 55-61.
- Borges, A. R., Santos, P. N., Furtado, A. F., and Figueiredo, R. C. B. Q. 2008.
- Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Micron*, 39(4),486-494.
- Brayner, F. A., Araujo, H. R. C., Cavalcanti, M. G. S., Alves, L. C., and Peixoto, C. A.(2005). Ultrastructural characterization of the hemocytes of *culex quinquefasciatus*(diptera: culicidae). *Micron* , 36(4),359-367.
- Brehelin, M., Zachary, D and Hoffmann, j. A. 1978. A comparative Ultra structural study of blood cells from nine insect orders. *Cell and tissue research*, 195(1),45-57.
- Brehelin , M., Drif, L., baud, L., and boemare, N.1989. Insect haemolymph: cooperation between humoral and cellular factors in *locusta migratoria*. *Insect biochemistry*, 19(3), 301-307.
- Cantwell, L., 1974. Insect deases. Volumes I and II. Marcel decker inc., new York .
- Capinera, J. L.2001. Handbook of vegetable pests. Academic press, new York , USA.
- Capinera, J. L. 2005. *Plutella xylostella* (lep, pluttelidae) available in:
<http://extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/pluttela.htm>.
- Chan, Q. W., Howes, C. G., and 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. 99-141.
- Cherbas, L., 1973. The induction of an in jury reaction in cultured hemocytes from saturniid pupae. *Jornal of insect physiology* 19,2011-2023.
- Duarte, J. P., Silva, C. E., Ribeiro, P. B and Carcamo, M. C. (2020). Do dietary stresses affect the immune system of *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae)? *Brazillian Journal of Biology*. 80(1), 73-80.
- Ebrahimi, M. and Ajamhassani, M. 2020. The Effects of Starvation Challenges and Nutritional Diets on Immunity System of Indian Meal Moth *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera Pyralidae). *Invertebrate Survival Journal*.17, 175-185
- Fahimi, A., Kharrazi-pakdel, A. and Talae-Hassanloui, R. (2008). Evaluation of effect of PxGV-Taiwanii on cabbage moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in laboratory conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11(13), 1768- 1770.

Ferre, J. and Van Rie, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual Review of Entomology 47, 501-533.

Ghasemi, V., Moharramipour, S., and Jalali sendi, J. (2013). Circulating hemocytes of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* zell.(lep : pyralidae) and their response to thermal stress. Invertebrate survival journal, 10,128-140.

Gillespie and, j. p., kanost, M. R., and trenczek , T .1997. Biological mediators of insect immunity . Annual Review of Entomology , 42(1), 611-643.

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

Gregoria, C., (1974). Hemolymph coagulation. In the physiology of insect. Vol .5. Academic press, 309-360.

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

Gupta, S., kaul, V., Shankar, U. and Rai, S.2008. efficacy of local isolate of steinernema carpocapsae against *plutella xylostella*(L). vegetable science, 35(2),148-151.

Harcourt, D. G. 1957. Biology of the Diamondback Moth, *plutella xylostella* (Lepidoptera: plutellidae), in eastern Ontario . II. Life history, behavior, and host relationships. Canadian Entomologist, 89,554-564.

Hannon, E.R., Rodstrom, R.A., Chong, J.M. and Brown, J.J. 2017. Carpenterworm Moth. Washington State University Extension.

Hardy, J. E. (1938). *Plutella maculipennis* Curtis, its natural and biological control in England. Bulletin of entomological research, 29, 343-372.

Hernandez, S., Lanz, H., Rodriguez, M.H., Torres, J.A., Martinez, P.A. and Tsutsumi, V. 1999. Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. Journal of Medical Entomology, 36, 426-434.

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

Honti, V., Csordas, G., Kurucz, E., markus, R., and Ando, I. 2014. The cell-mediated immunity of drosophila melanogaster. Hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. Developmental and Comparative Immunology,42(1),47-56.

Huang, F., Shi, M. and Yang, Y. (2009). Changes in hemocytes of *Plutella xylostella* after parasitism by *Diadegma semiclausum*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 70(3). 177-187.

Iqbal, M., verkerk, R. H. J., Furlong, M. J., Ong, P. C., Syed, A. R. and wright, D. J.(1996). Evidence for resistance to *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. Kurstaki HD-1,Bt subsp . Aiza wai and A bamectin in field populations of *Plutella xylostella* from Malaysia, pesticide science , 48:89-97.

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

Jalali, J., and salehi, R.(2008). The hemocyte types , differential and total count in *papilio demoleus* L.(Lepidoptera: papilionidae) during post - embryonic development. Mun. Ent. Zoo1, 1, 199-216.

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

Jones, J C. 1967. Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* L. Biological Bulletin, 132: 211-221.

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

Kfir, R. (1998). Origin of the diamondback moth (Lepidoptera: plutellidae). Annals of entomological society of America, 91:164-167.

Khosravi, R.Jalali, Sendi, J., Zibae, A., and Shokrgozar, M. A.(2014). Immune reactions of the lesser mulberry pyralid, *glyphodes pyloalis* walker (Lepidoptera: pyralidae) to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuill and two developmental hormones, 11(1), 11-21

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.

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

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

Li, T.; Yan, D., Wang, X.; Zhang, L.; Chen, P. 2019. Hemocyte Changes During Immune Melanization in *Bombyx Mori* Infected with *Escherichia coli*. Insects, 10(301), 1-15

Lim, G. S. 1968. Biological control of diamondback moth. In N. S. Talekar and T. D. Griggs (Ed), Diamondback moth management: proceeding of the first international Workshop, pp. Asian vegetable research and development center, shanhua, Taiwan 195-171.

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

Ma, G. Roberts , H. Sarjan, M. Feath erstone, N. Lahnstein, J. Akhurst, R. Schmidt, O. 2005. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35 (7) 729-739.

Manjula, P. Lalitha ,K. Shivakumar, M. S. 2020. Diet composition has a differential effect on immune tolerance in insect larvae exposed to *Mesorhabditis belari*, *Enterobacter hormaechei* and its metabolites. Journal of Experimental Parasitology, 208, 1-7

- Mcgaughey, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *B.thuringiensis*. science, 229, 193-194.
- Mirhaghpour, S. K., Zibae, A., and Hajizadeh, J. 2013. Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on cellular immunity and intermediary metabolism of *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae). Invertebrate Survival Journal, 10, 110-119.
- Mohan, M. and Gujar, G. T. 2003. local variation in susceptibility of the diamondback moth, *plutella xylostella* (linneaus) to insecticides and detoxifying enzymes. Crop Protection, 22,495-504.
- Mowlds, P. and Kavanagh, K. 2008. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. Mycopathologia, 165, 5-12.
- Mowlds, P. and Kavanagh , K. 2008 Effect of pre –incubation temperature on susceptibility of galleria mellonella larvae to infection by candida albicans. Mycopathologia 165, 5-12.
- Narayan, K.,2004. Insect defence: its impact on microbial control of insect pests. Current science, 86:800-814.
- Nakahara, Y.; Kanamori, Y.; Kiuchi, M.; Kamimura, M. 2003. In vitro studies of hematopoiesis in the silkworm: Cell proliferation in and hemocyte discharge from the hematopoietic organ. Journal of Insect Physiology. 49, 907–916.
- Nation, J. L. 2008. Insect physiology and biochemistry, CRC Press, Boca Raton , Florida, pp. 560.
- Negreiro, M. C. C. Andrade, F. G. D. Falleiros, A. M. F. 2004. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. Semina: Ciências Agrárias 25 (4): 293-308.
- Pandey, J.P., Mishra, P.K.,Kumar, D., Singh, B.M.K, and Prasad, B.C. 2010. effect of temperature on hemocytic immune responses of tropical tasar silkworm, *antheraea mylitta* . Research Journal of immunology, 3 , 169-177.
- Pourali, Z. and Ajamhassani, M. 2018. The effect of thermal stresses on the immune system of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal of Entomological Society of Iran.Supplementary, 37(4), 515-525.
- Preston, J.W. and Taylor, R. L., 1970. Observation on the phenoloxidase system in the haemolymph of the cockroach *Leucophaea maderae*. Journal of insect physiology, 16:1729-1744.
- Rahman, M. M., Roberts , H. L. S., Sarjan, M., Asgari, S., Schmidt, O. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101 (9): 2696-2699.
- Ribeiro, c., and Brehelin, M.2006. Insect haemocytes: what type of cell is that?. *Journal of insect physiology*, 52(5), 417-429.

Ribeiro, L., Teixeira, V., Cunha, F., Teixeira, A. Siqueira, H. 2012. Immunological response of resistant and susceptible *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis*. Revista Colombiana de Entomología, 38 (2) 208-214.

Rivaney, E. 1962. Field crop pests in the near east. W. Junk, den haag ,450 pp.

Ronald, F. L. M. and jayma, M. 2007. *Plutella xylostella* (Linnaeus). Available on the <http://www.extento.hawaii.edu/kbase /crop/Type/plutella.htm>

Sayyed, A. H. Raymond, B. Ibiza-Palacios, M. S. Escriche, B. Wright, D.J. 2004. Genetic and biochemical characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Applied and Environmental Microbiology, 70 (12), 7010-7017.

Sewify, G. H., and 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 .

Shelton, A. M., wyman, J. A., cushion, N. L., Apfelbeck, K, Denney, T. J., Mahr, S. E. R. and eigenbrode, S. D. 1993. Insecticide resistance of diamondback moth *plutella xylostella* (lep: plutellidae), in north America. Journal of economic entomology, 8:11-19.

Silva, J. E. B., Boleli, I. C., and Simoes, 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.

Siva-jothy. M. T., Moret, and Rolff, J., 2005. Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. Advances in insect physiology, 32, 1-48.

Soderhall, K., and cerenius, L.1992.Crustacean immunity. Annual review of fish diseases,2,3-23.

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

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

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

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

Talekar, N. S. and Shelton, A. M. 1993. Biology ecology and management of diamondback moth. Annual review of entomology, 38:275-301.

talhouk, A. M. 1969. Insects and mites injurious to crops in middle eastern countries. Paul parey, verlage, berlin, hamburg, 239pp.

Talekar, N. S. 1992. Introduction of diadegma semicla usum for the control of diamondback moth in Taiwan . pp. 263-270. In:talker, N.S. (Ed), diamondbackMoth and other crucifer pest. Proceedings of the second international workshop,Tainan, Taiwan.

- Verker, R. H. J. and wright, D. J. 1996. Multitrophic interactions and management of the diamondback moth: a review . Bulletin of entomological research, 86,205-216.
- Vogelweith, F., Moret, Y., Monceau, K., Thiery, 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.
- Wang, X. P. Feng, Y.L. and zhang, Z. N. 2005.Effect of male and female multiple on the fecundity, fertility, and longevity off diamondback moth, *Plutella xylostella* (L). Blackwell, veriage, berlin, Journal of entomological sciences, 129(1), 39-42.
- Whalon, M. E. Mota -Sanchez, D. Hollingworth , R. M. 2008. Analysis of global pesticide resistance in arthropods. p. 5-31. In: Whalon, M. E. (Ed.). Global Pesticide Resistance in Arthropods. CABI Publishing. Wallingford. United States of America. 192 p.
- 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.
- Zhao, J. Z., Collins, H. L., Li, Y. X., Mau, R. F. L., Thompson, G. D., Hertlein, M. Andaralo, J. T., Boykin, R. and Shelton, A. M. 2006. Monitoring of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance of spinosad, indoxacarb, and emamectin benzoate. Journal of Economic Entomology. 99(1), 176-181.
- Zibae, A., Zibae, I., and J.Sendi, 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.
- Zibae, 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.
- Zibae, 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

Cabbage willow with the scientific name of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is one of the important pests of the family of Brassicaceae or Cruciferae, which annually causes severe damage to cabbage varieties such as cauliflower, Cabbage, Broccoli, Kohlrabi, as well as Rapeseed, Turnip, Mustard, Garden radish and Garden cress. Control of this important pest in our rapeseed fields is mainly done using various chemical methods and the pathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis*. Studies on the interaction between pathogens and insect defense factors have been growing significantly in recent years because the results of this research can be effective in adopting appropriate microbial control methods against fruitful pests. Insect hemolymph contains the most important defense components, namely hemocytes. Blood is involved in the transport and storage of food and defense against microorganisms. The success of the immune system depends on the number and type of blood cells. Sometimes the good functioning of blood cells prevents the development of infection in the body. In the present study, the effect of *B.thuringiensis* pathogenicity and temperature stress on homocyte abundance and phenol oxidase activity was investigated. First, the sub-lethal concentration of bacteria was determined using a bioassay test. For this purpose, 300 larvae of cabbage willow in 4 replications with canola leaves infected with different concentrations of bacteria including 20, 30, 50, 100 and 200 ppm were placed in petri dishes and larval mortality was recorded after 24 hours. Immunological tests were performed after determining the concentration of 40 ppm as the sub-lethal concentration. In the first experiment, rapeseed leaves were treated with sub-lethal concentrations of bacteria and larvae aged 2 , 3 , 4 , 5 blood sample were taken at 12 and 24 hours after feeding on the leaves. In the second experiment, the larvae were exposed to temperatures of 4 and 30 degrees Celsius for 12 hours and temperature stress was examined on their homocyt. The result showed that feeding on canola leaves infected with bacteria after 12 and 24 hours caused a significant increase in total cells, plasmocytes and granulocytes and phenol oxidase activity compared to the control, which was more significant in larvae that tolerated high temperature stress. Certainly, additional research is needed to be able to evaluate the possible use of microbial control methods against cabbage willow by recognizing the safety characteristics of susceptible and resistant populations.

Keywords: *Plutella xylostella* , Abundance of blood cells, *Bacillus thuringiensis*, Temperature



Faculty of Agriculture
M.Sc. Thesis in Entomology

Immunological response of larvae of diamondback moth
Plutella xylostella (Linnaeus)(Lepidoptera:Plutellidae)
to entomophotegenic bacteria Bacillus thurinjiensis

By: Mojtaba zarei

Supervisor:

Dr. Maryam ajamhasani

February 2022