پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۰ (۴): ۴۶-۳۷ (۱۴۰۰)- مقاله پژوهشی
Journal of Applied Research in Plant Protection 10(4): 37-46 (2022)-Research Article

DOI: https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2021.13503

زهرآگینی و القای پاسخ های ایمنی توسط دو جدایه قارچ *Beauveria bassiana* علیه لاروهای پروانه سفید درختان *Hyphantria cunea*

مرتضی شهریاری[۱]، آرش زیبایی[۱]✉، سارا آقایی‌پور[۱]، ملاحت مجرب محبوب‌کار[۱]، حسن هدی[۲]

[۱]گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. [۲] بخش کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران، تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل، ایران. ✉ arash.zibaee@guilan.ac.ir

دریافت: ۹۹/۱۱/۷ بازنگری: ۹۹/۱۱/۲۵ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۶

چکیده

زهرآگینی دو جدایه ایرانی قارچ *Beauveria bassiana* روی لاروهای پروانه سفید درختان *Hyphantria cunea* از طریق زیست‌سنجی و ارزیابی واکنش‌های ایمنی با شمارش سلول‌های خونی و سنجش فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت‌های کشنده میانه (LC_{50}) شامل ۱۰^۵ × ۸/۸ و ۱۰^۶ × ۲/۳ اسپور بر میلی‌لیتر به ترتیب برای جدایه‌های AM-118 و BB3 با روش غوطه‌وری لاروها به دست آمد. همچنین مقادیر LT_{50} نیز به ترتیب ۳/۹۴ و ۵/۷۸ روز محاسبه شد. بیش‌ترین تعداد کل سلول‌های خونی و همچنین گرانولوسیت‌ها و پلاسماتوسیت‌ها، ۶-۳ ساعت پس از تزریق هر دو جدایه قارچی مشاهده شد. به عبارت دیگر تعداد کل سلول‌های خونی از ۱۰^۴×۱۶۰ سلول بر میلی‌لیتر به ۱۰^۴×۴۸۰ سلول در میلی‌لیتر رسید و تعداد گرانولوسیت‌ها و پلاسماتوسیت‌ها به ترتیب به ۱۰^۴×۲۰۰ و ۱۰^۴×۱۴۰ سلول در میلی‌لیتر افزایش یافت. تزریق لاروها با کنیدی‌های جدایه‌های AM-118 و BB3 باعث افزایش تعداد گره در فواصل زمانی ۲۴-۱۲ ساعت پس از تزریق و افزایش فعالیت آنزیم فنل اکسیداز پس از ۱۲-۶ ساعت شد و از ۰/۱۲ به ۰/۲ U/mg protein رسید. جدایه AM-118 در مقایسه با BB3، زهرآگینی بیشتری نسبت به لاروها نشان داد و در مدت زمان کم‌تر و غلظت کم‌تر سبب مرگ‌ومیر بیشتر شد. علاوه براین، پاسخ ایمنی لاروها نیز نسبت به این جدایه کم‌تر از جدایه BB3 بود. نتایج حاضر نشان می‌دهد که دو جدایه ایرانی قارچ بیمارگر *B. bassiana* روی لاروها زهرآگین هستند و سبب القای پاسخ‌های ایمنی شده و نشان‌گر درگیری فیزیولوژیک بین بیمارگر و میزبان می‌باشند.

کلمات کلیدی: ایمنی سلولی، پروانه سفید درختان، زهرآگینی، قارچ‌های بیمارگر حشرات

Virulence and induction of immune responses by the two isolates of *Beauveria bassiana* against the larvae of *Hyphantria cunea*

Morteza Shahriari[1], Arash Zibaee[1]✉, Sara Aghaeepour[1], Malahat Mojarab Mahboubkar[1], Hassan Hoda[2]

[1]Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht. Iran. [2]Iranian Research Department of Biological Control, Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension, Amol, Iran. ✉arash.zibaee@guilan.ac.ir

Received: 26 Jan 2021 Revised: 13 Feb 2021 Accepted: 16 Jun 2021

Abstract

Virulence of the two Iranian isolates of *Beauveria bassiana* was evaluated against the larvae of *Hyphantria cunea* through bioassay and immune responses. The median lethal concentrations (LC_{50}) for AM-118 and BB3 isolates calculated as 8.8×10^5 and 2.3×10^6 spore/mL. by using dipping method. The LT_{50} values were calculated as 3.94 and 5.78 days, respectively for AM-118 and BB3 isolates. The highest numbers of the total hemocytes, granulocytes, and plasmatocytes were observed 3-6 hours post-injection of both fungal isolates. On the other hand, the total number of hemocytes increased from 160×10^4 to 480×10^4 cell/mL and the numbers of granulocytes and plasmatocytes increased to 200×10^4 and 140×10^4 cell/mL, respectively. The larvae injection by the conidia of AM-118 and BB3 led to the increase of nodule numbers at time intervals of 12-24 hours and the activity of phenoloxidase after 6-12 hours of post-injection from 0.12 to 0.2 U/mg protein. The isolate AM-118 showed the higher virulence compared to BB3 and it caused the more mortality in the lower time and spore concentrations. Moreover, the immune responses of the larvae toward this isolate were lower than BB3 isolate. The current results demonstrate that the two Iranian isolates of the entomopathogenic, *B. bassiana*, are virulent against the larvae but they induce immune responses indicating physiological conflict between the pathogen and host.

Keyword: Cellular immunity, Entomopathogenic fungi, Fall webworm, Pathogenicity, Virulence

How to cite:
Shahriari M, Zibaee A, Aghaeepour S, Mojarab Mahboubkar M, Hoda H, 2022. Virulence and induction of immune responses by the two isolates of *Beauveria bassiana* against the larvae of *Hyphantria cunea*. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (4): 37–46.

مقدمه

پروانه سفید درختان *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Erebidae) آفتی چندین‌خوار و بومی آمریکای شمالی است که طی چند دهه گذشته به یک آفت بیگانه مهاجم تبدیل شده است و به درختان جنگلی و محصولات کشاورزی از جمله توت، فندق، افرا و بلوط خسارت می‌زند (Nakonechna *et al*. 2019). طبق بررسی‌های Rezaei *et al.* (2004) درختان مثمر و غیرمثمر همچون انار، انگور، بید، کیوی، موز، خرمالو، نارون، راش، توسکا و سپیدار از جمله میزبان‌های این آفت هستند. لاروهای این شب‌پره با تغذیه از برگ میزبان موجب کاهش شدید فتوسنتز شده و با تشکیل شبکه توری، اندام‌های هوایی گیاه را به‌هم چسبانده و باعث بدشکلی درختان می‌شوند. لاروها از درختان پهن برگ اعم از درختان مثمر و غیر مثمر، گیاهان زراعی، گیاهان زینتی و حتی علف‌های هرز تغذیه می‌کنند. بنابراین با توجه به دامنه میزبانی بسیار وسیع این آفت، خسارت اقتصادی بسیار زیادی به بخش-های کشاورزی، منابع طبیعی، فضای سبز شهرها و صنعت ابریشم وارد می‌شود که ضرورت مبارزه موثر با این آفت را نشان می‌دهند (Mikami *et al.* 2020). اگرچه در حال حاضر برای کنترل این آفت از آفت‌کش‌های شیمیایی استفاده می‌شود اما باید توجه داشت که استفاده بیش از حد ترکیبات شیمیایی سبب مشکلاتی نظیر باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در طبیعت و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی، مقاومت آفات و اثرات مخرب روی دشمنان طبیعی می‌شوند (Senthil-Nathan 2013). از این رو یافتن ترکیبات جایگزین که سازگار با محیط زیست می‌باشند ضرورت می‌یابد.

در طی چند دهه اخیر توجه به آفت‌کش‌های زیستی از قبیل قارچ‌ها، ویروس‌ها و باکتری‌های بیمارگر حشرات افزایش یافته است. در این بین، قارچ‌های بیمارگر حشرات قدرت بالایی در کنترل آفات از خود نشان داده‌اند و می‌توانند در کاهش جمعیت حشرات استفاده شوند (Lacey *et al*. 2001). موثرترین قارچ‌های بیمارگر حشرات در راسته Hypoceales (شاخه Ascomycota) قرار می‌گیرند. در میان قارچ‌های بیمارگر حشرات، گونه‌های جنس *Beauveria* روی طیف گسترده‌ای از آفات موثر بوده‌اند (Goettel *et al.* 2012). گزارش شده است که قارچ *B. bassiana* Vuillemin می‌تواند بیش از ۲۰۰ گونه از بندپایان را مورد حمله قرار دهد (Goettel *et al.* 2012). از این رو می‌توان از آنها به عنوان یک گزینه مناسب برای تولید انبوه و فرموله کردن آفت‌کش‌های قارچی علیه آفات زراعی، باغی، گلخانه‌ای و جنگلی استفاده کرد (Maniania *et al.* 2003; Goettel *et al.* 2012; Lacey *et al.* 2015).

کنیدیوم‌های قارچی پس از تماس با حشره میزبان، روی کوتیکول آن جوانه می‌زنند و لوله تندشی را جهت عبور از کوتیکول و نفوذ به هموسل ایجاد می‌کنند. علاوه بر این، کنیدیوم‌های قارچی با تولید آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و کیتیناز باعث هضم کوتیکول شده و به نفوذ بهتر اندام‌های قارچی کمک می‌کنند (Goettel *et al.* 2012). سپس قارچ درون بدن حشره تکثیر یافته و میزبان را با تولید توکسین و اشغال بافت‌ها از بین می‌برند (Hajek & Eastburn 2003; Mak *et al.* 2010). به‌طور کلی کوتیکول اولین خط دفاعی حشرات در برابر قارچ-های بیمارگر حشرات می‌باشد، اندام‌های قارچی پس از عبور از کوتیکول با واکنش سامانه ایمنی درون هموسل حشره میزبان رو به رو می‌شوند (Lopes *et al*. 2015). حشرات دارای سامانه ایمنی بسیار کارآمدی می‌باشند که آنها را قادر می‌سازد از طریق پاسخ‌های سلولی و هیومرال با عوامل میکروبی مقابله کنند (Tsakas & Marmaras 2010). واکنش‌های سلولی شامل بیگانه‌خواری (Phagocytosis)، تشکیل گره (Nodulation)، تشکیل ملانین (Melanization) و کپسوله کردن (Encapsulation) می‌باشند که توسط سلول‌های خونی صورت می‌گیرند (Lavine & Strand 2002). ایمنی هیومرال مبتنی بر سنتز پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial peptides)، فعالیت فنل اکسیداز (Phenoloxidase) و تولید عوامل اکسیداتیو می‌باشد (Liu *et al*. 2013). تعیین میزان بیمارگری قارچ‌های بیمارگر حشرات و بررسی پاسخ ایمنی حشره میزبان می‌تواند به تولید آفت‌کش‌های میکروبی کارآمد در مدیریت تلفیقی آفات کمک کند. علاوه بر این، پروانه سفید درختان به دلیل همه چیزخواری، به طیف وسیعی از درختان مثمر و غیر مثمر حتی در فضای شهری حمله می‌کند که لازم است با روش‌های ایمن کنترل مناسب انجام شود. در کنار ترکیبات با منشا گیاهی، بیمارگرهای قارچی به‌دلیل توان همه‌گیری گسترده به‌ویژه در شرایط جوی رطوبی، می‌توانند از گزینه‌های مطلوب برای کنترل این آفت در نظر گرفته شوند. از سوی دیگر، مشخص شده است که جدایه‌های بومی قارچ‌های بیمارگر به‌دلیل سازگاری بهتر با شرایط محیطی و برهم‌کنش با حشرات موجود می‌توانند کارایی بهتری نسبت به جدایه‌های تجاری یا جدایه‌های بدست آمده از سایر مناطق داشته باشند. از این رو، در پژوهش حاضر زهرآگینی دو جدایه Am-118 و BB3 قارچ

B. bassiana روی لاروهای سن چهارم پروانه سفید درختان مورد ارزیابی قرار گرفت. علاوه بر این، پاسخ ایمنی در لاروهای تیمار شده با جدایه‌های مورد بررسی، نیز ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

جمعیت آزمایشگاهی پروانه سفید درختان با استفاده از لاروهای وحشی جمع‌آوری شده از روی درختان توت اطراف رشت در ابتدای تابستان تهیه شد. نمونه‌ها به اتاقک رشد و در ظروف شفاف به ابعاد ۱۵×۱۰×۸ سانتی‌متر منتقل شده و تا تبدیل شدن به شفیره، روزانه برگ‌های تازه توت در اختیار آنها قرار داده شد. پرورش حشرات در انکوباتور با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۰ درصد و دوره روشنایی ۸ : ۱۶ (تاریکی: روشنایی) ساعت صورت گرفت. حشرات بالغ نر و ماده خارج شده از پوسته شفیرگی برای جفت‌گیری (نسبت ۱ به ۱) به داخل قفس‌های جفت‌گیری (۷۰ × ۷۰ × ۱۲۰ سانتی-متر) منتقل شدند. پروانه‌های ماده روی نوارهای دستمال کاغذی تخم‌ریزی کرده و در بازدید روزانه از قفس‌ها، دسته‌های تخم شب‌پره جمع‌آوری روی برگ‌های تازه توت داخل ظروف پتری به قطر ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع یک سانتی‌متر تا زمان تفریخ قرار داده شدند. پس از خروج لاروهای سن اول، به قفس-های پرورش انتقال داده شدند.

کشت قارچ

اسپور جدایه‌های AM-118 و BB3 قارچ *B. bassiana* (به ترتیب جدا شده از مزارع برنج آمل و خاک منطقه فشند استان البرز) روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar; Merck, Milan, Italy) درون ظرف‌های پلاستیکی با قطر ۸ سانتی‌متر کشت داده شد. ظرف‌های تلقیح شده با جدایه‌های مذکور در ژرمیناتور با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی به مدت ۱۵ روز قرار داده شدند. سپس با اسکالپل کنیدیوم‌ها به آرامی به لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌متری حاوی محلول ۰/۰۲ درصد توئین-۸۰ و گویچه‌های شیشه‌ای منتقل شد. فالکون‌های حاوی جدایه‌ها به مدت سه دقیقه به شدت تکان داده شدند تا اسپورها از هم جدا شده و سپس با لام گلبول شمار شمارش شدند تا محلول اصلی تهیه شود.

زیست سنجی

برای ارزیابی بیمارگری جدایه‌های قارچی، از غلظت‌های $۱۰^۴$، $۱۰^۵$، $۱۰^۶$، $۱۰^۷$ و $۱۰^۸$ کنیدیوم در میلی‌لیتر (برمبنای آزمون مقدماتی) به صورت غوطه‌وری لاروهای سن چهارم در سه تکرار ۱۰ تایی به ازای هر غلظت استفاده شد. غلظت‌ها توسط لام گلبول شمار و در محلول توئین-۸۰ به غلظت ۰/۰۵ درصد، تهیه شده و محلول بدون کنیدیوم برای تیمار لاروهای شاهد استفاده شد. ابتدا برای ضدعفونی سطحی و حذف ساپروفیت‌ها از سطح بدن لارو، هر لارو به مدت ۳۰ ثانیه در محلول هیپوکلریت‌سدیم (۰/۰۱ درصد) غوطه‌ور شده و به مدت ۳۰ ثانیه در آب دو بار تقطیر شستشو داده شدند. به‌منظور حذف آب اضافی لاروها به مدت یک دقیقه روی کاغذ صافی واتمن قرار داده شدند. سپس لاروها به ظروفی به ابعاد ۱۰ × ۵ سانتی‌متر حاوی برگ‌های توت وارد و پنبه‌ای خیس شده با آب مقطر استریل در گوشه‌ای از ظرف برای تامین رطوبت قرار داده شد. لاروها به مدت هفت روز در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ۶۰ درصد و دوره روشنایی به تاریکی ۱۶: ۸ در اتاقک رشد نگه‌داری شدند (Fan *et al.* 2013).

اثر جدایه‌های قارچی بر ایمنی سلولی لاروها

لاروهای سن چهارم با یک میکرولیتر از غلظت LC_{50} کنیدیوم بر میلی‌لیتر هر جدایه تهیه شده در محلول توئین ۰/۰۲ درصد، تزریق شدند. سپس همولنف ۱۰ عدد لارو سن چهارم با بریدن یکی از پاهای کاذب توسط لوله‌های مویینه (شرکت سیگما) جمع‌آوری و بلافاصله در محلول ضد انعقاد خون حاوی اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) به غلظت ۰/۰۱ مولار، گلوکز ۰/۱ مولار، کلرید سدیم ۰/۰۶۲ مولار و اسید سیتریک ۰/۰۲۶ مولار با اسیدیته ۴/۶ قرار داده شد (Azambuja *et al.* 1991). سپس در تکرارهای مختلف (۱۰ تکرار) ۵۰ میکرولیتر از همولنف هر لارو به طور جداگانه جمع آوری شد و به نسبت ۱ به ۳ با محلول ضد انعقاد خون مخلوط شدند و روی لام گلبول شمار قرار داده شدند. این کار در بازه-های زمانی یک، سه، شش، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق برای هر جدایه انجام شد. در هر بازه زمانی، تعداد کل سلول‌های خونی، تعداد پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها (به عنوان تعداد تفکیک شده) و تعداد گره‌های تشکیل شده شمارش شدند. در لاروهای شاهد هیچ تزریقی صورت نگرفت و در لاروهای کنترل منفی فقط محلول توئین ۰/۰۲ درصد تزریق شد (Zibaee & Malagoli 2014).

تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز به عنوان یکی از اجزای اصلی سامانه ایمنی حشرات برای تعیین اثر کنیدیوم‌ها در بازه‌های زمانی یک، سه، شش، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق غلظت LC_{50} جدایه‌ها، ارزیابی شد. سنجش فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز لاروها با روش هموسیت لایزیت (Hemocyte lysate) انجام شد (Leonard *et al*. 1985). در این روش همولنف هر لارو جمع آوری شده و با سرعت *g* ۲۰۰۰۰ در دمای پنج درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رونشین حذف شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (اسیدیته ۷) به ته‌نشین اضافه و سپس همگن شد. محلول اخیر دوباره در *g* ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رونشین حاصل برای سنجش آنزیمی استفاده شدند. بدین منظور، ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به ۵۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مولار ال-دهیدروکسی فنیل آلانین L-dihydroxyphenylalanin, L- (Dopa) اضافه شد. این مخلوط به مدت پنج دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و جذب نوری آن در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد (در سه تکرار).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه پروبیت داده‌های حاصل از مرگ‌ومیر برای محاسبه میزان LC_{50} و LT_{50} توسط نرم افزار Polo-Plus انجام شد. آزمایش‌های مربوط به ایمنی در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شده و اختلاف آماری بین داده‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 انجام شد (Finney 1971).

نتایج و بحث

بررسی زهرآگینی جدایه‌های B. bassiana روی لاروهای پروانه سفید درختان

نتایج حاصل از زیست‌سنجی دو جدایه *B. bassiana* روی لاروهای پروانه سفید درختان در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. میزان LC_{50} برای جدایه‌های AM-118 و BB3 به ترتیب معادل $۸/۸ \times ۱۰^{۵}$ و $۲/۳ \times ۱۰^{۶}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر و مقدار LT_{50} نیز به ترتیب معادل ۳/۹۴ و ۵/۷۸ روز پس از تزریق به دست آمد (جدول‌های ۱ و ۲). در این پژوهش با افزایش غلظت و زمان، میزان مرگ‌ومیر در لاروهای تیمار شده با هر دو جدایه افزایش یافت و همین طور جدایه AM-118 در مقایسه با BB3، زهرآگینی بیشتری از خود نشان داد و در مدت زمان کم‌تر و با تعداد اسپور کم‌تر سبب مرگ‌ومیر بیشتری در لاروها شد. برخلاف نتایج به دست آمده در این تحقیق، بیمارگری این دو جدایه (AM-118 و BB3) روی پوره‌های شپشک چای *Pseudococcus viburni* Signoret (Hemiptera: Pseudococcidae) مورد ارزیابی قرار گرفته و نشان داده شد که جدایه BB3 در غلظت و مدت زمان کم‌تر کارایی بیشتری در کنترل حشره آفت دارد (Maqsoudi *et al*. 2019).

Ajamhassani *et al.* (2011) اثرات زهرآگینی چهار جدایه از قارچ *B. bassiana* و یک جدایه از قارچ *Isaria farinosae* (Holmsk) را روی لاروهای سن چهارم پروانه سفید درختان ارزیابی کردند که جدایه فشند از قارچ *B. bassiana* با ۷۲/۵ درصد مرگ‌ومیر در غلظت $۱۰^{۸}$ زهرآگینی بیش‌تری نشان داد. Dhar *et al*. (2019) اثرات بیمارگری سه جدایه قارچ *B. bassiana* را روی لاروهای کرم برگ‌خوار توتون *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) بررسی و مشاهده کردند که جدایه BbR2 با ۸۳/۳۳ درصد مرگ‌ومیر در غلظت $۱۰^{۷}$، بیش‌ترین زهرآگینی را دارد.

در کل می‌توان استنباط کرد که جدایه AM-118 از روی لاروهای کرم ساقه‌خوار نواری برنج *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) جمع‌آوری شده است و بنابراین می‌تواند به صورت اختصاصی روی آفات بال‌پولک‌دار عمل کند در حالی‌که جدایه BB3 از خاک جمع‌آوری شده و عمومی‌تر عمل می‌کند. البته باید در نظر داشت که سازگاری یک جدایه به در معرض گرفتن با آفاتی از راسته‌ای خاص از حشرات به تنهایی نمی‌تواند ملاک اختصاصی بودن یا کارایی بهتر یک جدایه قارچی باشد، بلکه توان ذاتی آن در تولید مولکول‌های موثر در بیمارگری مثل پروتئین‌های هیدروفوبین (Hydrophobin)، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده کوتیکول و همین طور توانایی تولید بلاستوسپور فراوان و توکسین در هموسل میزبان نیز از عوامل بسیار مهم می‌باشند (Hajek & Eastburn 2003; Ramzi & Zibaee 2014).

جدول ۱. مقادیر LC_{50} (کنیدیوم/میلی‌لیتر) جدایه‌های *Beauveria bassiana* روی لاروهای سن چهارم پروانه سفید درختان.

Table 1. LC_{50} values (conidia/mL) of *Beauveria bassiana* isolates against the fourth instar larvae of fall webworm.

Isolate	Concentration	Mortality %	LC_{50} (CL 95%, conidia/mL)	X^2 (df)	Slope ± SE
AM-118	10^4	16.66 ± 3.33	8.8×10^5 (3.3×10^5-2.3×10^6)	1.869 (3)	0.564 ± 0.089
	10^5	30 ± 5.77			
	10^6	46.66 ± 8.81			
	10^7	66.66 ± 6.66			
	10^8	93.33 ± 6.66			
BB3	10^4	13.66 ± 3.33	2.3×10^6 (8.4×10^5-7.8×10^6)	0.918 (3)	0.491 ± 0.085
	10^5	23.33 ± 6.66			
	10^6	40 ± 5.77			
	10^7	56.66 ± 8.81			
	10^8	83.33 ± 8.81			

*Calculations were carried out by POLO-Plus software.

جدول ۲. مقادیر LT_{50} (روز) جدایه‌های *B. bassiana* روی لاروهای سن چهارم پروانه سفید درختان.

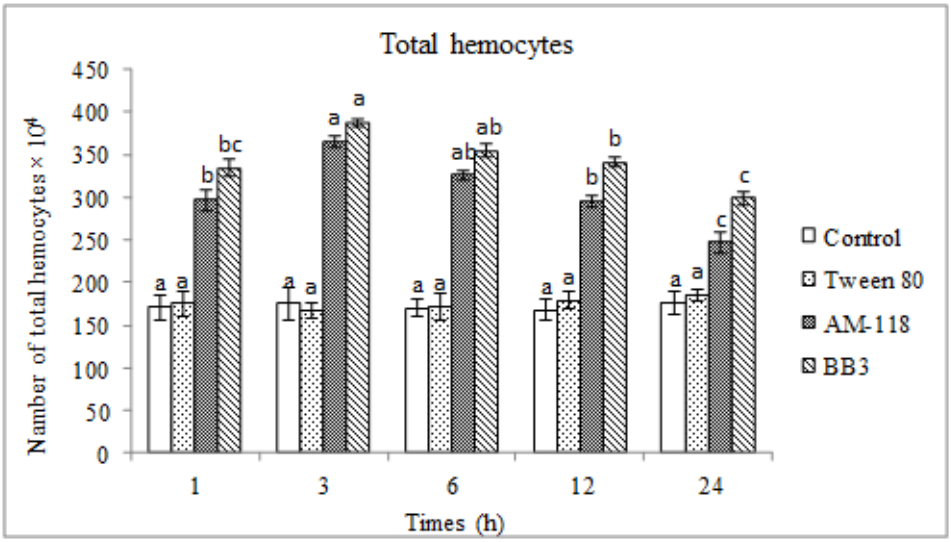
Table 2. LT_{50} values (day) of *Beauveria bassiana* isolates against the fourth instar larvae of fall webworm.

Isolate	LT_{50} (CL 95%, days)	X^2 (df)	Slope ± SE
AM-118	3.94 (4.93-5.30)	22.89 (6)	3.985 ± 462
BB3	5.78 (5.00-6.23)	13.22 (7)	5.484 ± 0.684

*Calculations were carried out by POLO-Plus software.

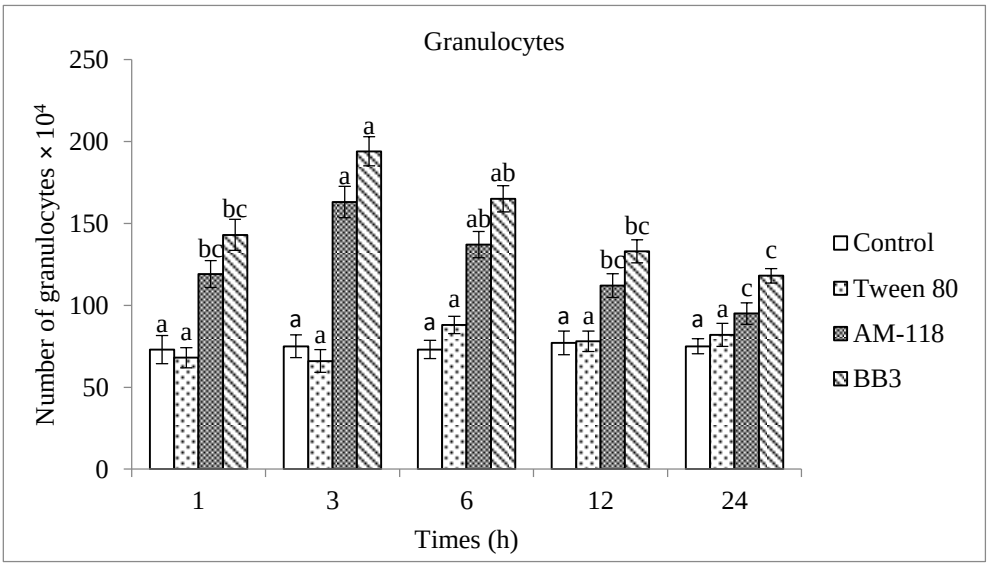
اثر جدایه‌های قارچی بر تعداد سلول‌های خونی لاروها

نتایج حاصل نشان می‌دهد که بیش‌ترین تعداد کل سلول خونی در سه و شش ساعت پس از تزریق با جدایه‌های AM-118 و BB3 مشاهده شد (شکل ۱). در بازه‌های زمانی مختلف تعداد سلول‌های خونی در لاروهای تزریق شده با جدایه BB3 بیش‌تر از جدایه AM-118 بود (شکل ۱). بیش‌ترین تعداد گرانولوسیت‌ها و پلاسماتوسیت‌ها در ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق با جدایه‌های AM-118 و BB3 مشاهده شد (شکل ۲ و ۳). اگرچه نوسان‌هایی در تعداد سلول‌های خونی در بازه‌های زمانی مختلف مشاهده شد اما بیش‌ترین تعداد سلول‌های خونی در بازه زمانی سه و شش ساعت پس از تزریق مشاهده شد و پس از آن تعداد سلول‌های خونی کاهش یافت. حضور کنیدیوم‌های قارچی در زمان‌های اولیه پس از تزریق در همولنف، سبب تحریک اندام‌های خون‌ساز به تولید سلول‌خونی و آزادسازی سلول‌های خونی متصل به بافت‌های بدن می‌شود (Beckage 2008). پس از آن با گذشت زمان تعداد سلول‌های خونی در گردش به علت تمایل به جمع شدن و تشکیل گره اطراف کنیدیوم‌های قارچی، کاهش می‌یابد (Yaroslavtseva *et al.* 2017). افزایش تعداد سلول‌های خونی در برابر آلودگی‌های قارچی در پژوهش‌های متعددی نشان داده شده است. افزایش تعداد سلول‌های خونی در لاروهای کرم ساقه‌خوار نواری برنج پس از تزریق با جدایه‌های مختلف قارچ‌های *B. bassiana*، *I. fumosoroseus*، *Lecanicilium lecanii* R. Zare & W. Gams و *Metarhizium anisopliae* مشاهده شده است (Zibaee & Malagoli 2014). Ajamhassani *et al.* (2013) گزارش کردند که جدایه‌های مختلف قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *I. farinosae* باعث افزایش تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در لاروهای پروانه سفید درختان می‌شوند. تزریق لاروهای شب‌پره موم خوار *Galleria mellonella* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) و سوسک کلرادوی سیب زمینی *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) با قارچ *M. robertsii* باعث افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های خونی شده است (Tomilova *et al.* 2016; Kryukov *et al.* 2020). در پژوهش حاضر، لاروهای تیمار شده با جدایه AM-118 در مقایسه با BB3، پاسخ ایمنی ضعیف‌تری از خود نشان دادند. این می‌تواند مربوط به تولید تعداد بیشتر بلاستوسپورها یا توکسین‌های سرکوب‌کننده سامانه ایمنی لارو باشد که شناسایی اسپورها و حذف ایمن آنها را در بدن حشره مختل می‌کند (Bandani 2005).



شکل ۱. تغییرات تعداد کل سلول‌های خونی در لاروهای پروانه سفید درختان تزریق شده با غلظت LC_{50} از جدایه‌های *Beauveria bassiana*. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌ها در هر تیمار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

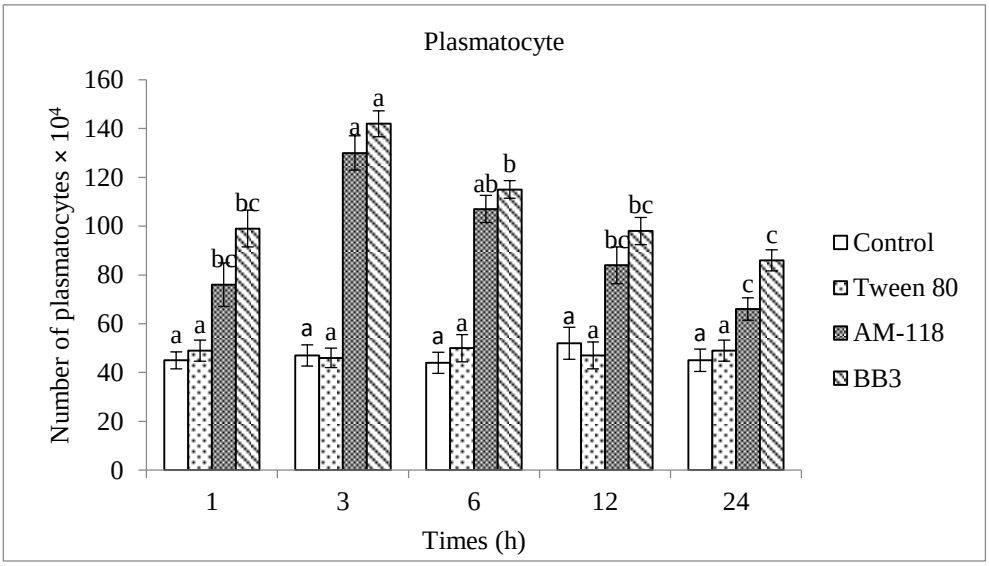
Figure 1. Changes in the total hemocyte numbers in the larvae of fall webworm injected by LC_{50} of *Beauveria bassiana* isolates. Different letters indicate significant differences among treatment in each time ($P \leq 0.05$).



شکل ۲. تغییرات تعداد گرانولوسیت‌ها در لاروهای پروانه سفید درختان تزریق شده با غلظت LC_{50} از جدایه‌های *Beauveria bassiana*. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌ها در هر تیمار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

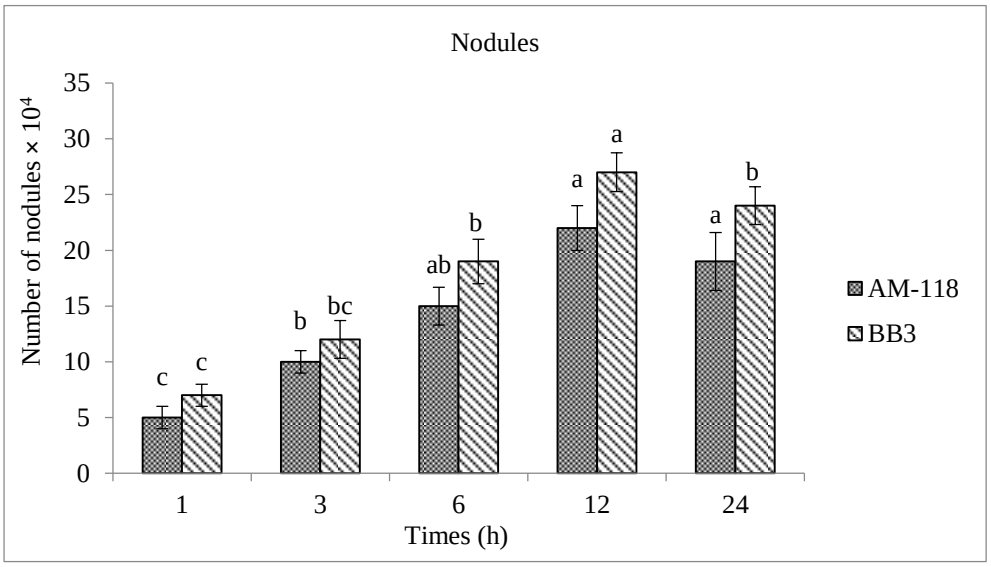
Figure 2. Changes in the granulocyte numbers in the larvae of fall webworm injected by LC_{50} of *Beauveria bassiana* isolates. Different letters indicate significant differences among treatment in each time ($P \leq 0.05$).

عامل میکروبی به داخل بدن حشرات می‌باشد (Chouvenc *et al.* 2009). کاهش تعداد سلول‌های خونی در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق می‌تواند به علت تجمع این سلول‌ها و تشکیل گره اطراف کنیدیوم‌های قارچی باشد. Zibaee & Malagoli (2014) گزارش کردند که تعداد گره در لاروهای کرم ساقه‌خوار نواری برنج پس از تزریق قارچ‌های *B. bassiana*، *I. fumosoroseus*، *L. lecanii* و *M. anisopliae* افزایش یافت. Ajamhassani *et al.* (2013) نشان دادند که قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *I. farinosae* باعث افزایش تعداد گره در لاروهای پروانه سفید درختان می‌شوند.



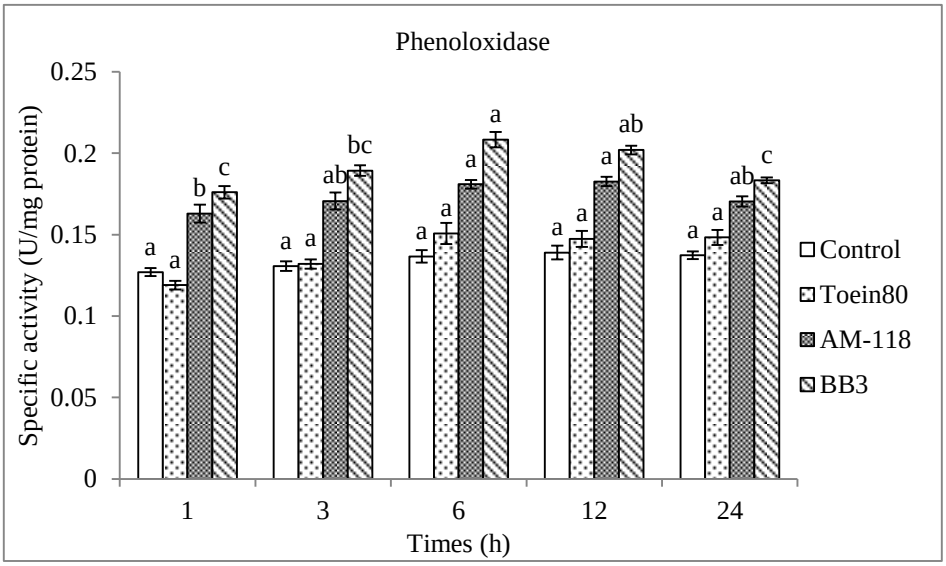
شکل ۳. تغییرات تعداد پلاسماتوسیت‌ها در لاروهای پروانه سفید درختان تزریق شده با غلظت LC_{50} از جدایه‌های *Beauveria bassiana*. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌ها در هر تیمار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

Figure 3. Changes in the plasmatocyte numbers in the larvae of fall webworm injected by LC_{50} of *Beauveria bassiana* isolates. Different letters indicate significant differences among treatment in each time ($P \leq 0.05$).



شکل ۴. تغییرات تعداد گره در لاروهای پروانه سفید درختان تزریق شده با غلظت LC_{50} از جدایه‌های *Beauveria bassiana* . حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌ها در هر تیمار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

Figure 4. Changes in the nodule numbers in the larvae of fall webworm injected by LC_{50} of *Beauveria bassiana* isolates. Different letters indicate significant differences among treatment in each time ($P \leq 0.05$).



شکل ۵. تغییرات فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در لاروهای پروانه سفید درختان تزریق شده با غلظت LC_{50} از جدایه‌های *Beauveria bassiana* . حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌ها در هر تیمار می‌باشد ($P \leq 0.05$).

Figure 5. Changes in the phenoloxidase activity in the larvae of fall webworm injected by LC_{50} of *Beauveria bassiana* isolates. Different letters indicate significant differences among treatment in each time ($P \leq 0.05$).

در تحقیق دیگری تزریق لاروهای پروانه برگخوار توتون با کنیدیوم قارچ‌های *B. bassiana* و *M. anisopliae* باعث افزایش تعداد گره در بازه‌های زمانی مختلف شد (Mirhaghparast *et al.* 2013). افزایش تعداد گره مبتنی بر افزایش تولید گرانولسیت‌ها و پلاسماتوسیت‌ها می‌باشد که اطراف عامل خارجی تجمع می‌یابند و تشکیل گره می‌دهند (Lavine & Strand 2002).

اثر جدایه‌های قارچی بر فعالیت فنل‌اکسیداز لاروها

فنل اکسیداز با تبدیل دی‌فنل به کوئینون از اجزای مهم در ایمنی حشرات و تولید ملانین می‌باشد (Gorman *et al.* 2007). ملانین در بسیاری از فرآیندهای موثر در ایمنی سلولی و هیومرال از قبیل سختی کوتیکول، تجمع سلول‌های خونی و تشکیل گره و ترمیم زخم نقش دارد (Gorman *et al.* 2007; Zdybicka-Barabas *et al.* 2014). بیش‌ترین فعالیت فنل اکسیداز در شش و ۱۲ ساعت پس از تزریق با جدایه‌های AM-118 و BB3 مشاهده شد (شکل ۵).

تزریق ملخ صحرائی *Schistocerca gregaria* (Forskal) (Orthoptera: Acrididae) با کنیدیوم‌های *M. anisopliae* باعث افزایش فعالیت فنل اکسیداز شده است (Gillespie *et al.* 2000).

از آن‌جایی که فنل اکسیداز در سلول‌های خونی تولید و ذخیره می‌شود، افزایش فعالیت فنل اکسیداز می‌تواند به افزایش تعداد سلول‌های خونی نسبت داده شود. فعالیت بیشتر فنل اکسیداز باعث افزایش انعقاد و ملانیزاسیون می‌شود و سبب مقاومت بیش‌تر حشره به بیمارگرها می‌گردد. ملانین با تولید مواد سمی و رادیکال‌های آزاد سبب مرگ عوامل بیمارگر در بدن میزبان می‌شوند (Yassine *et al.* 2012). تزریق لاروهای پروانه سفید درختان با قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *I. farinosae* باعث افزایش فعالیت فنل اکسیداز شده است (Ajamhassani *et al.* 2013). Zibaee & Malagoli (2014) مشاهده کردند که فعالیت فنل اکسیداز در لاروهای کرم ساقه‌خوار نواری برنج پس از تزریق با قارچ‌های *B. bassiana*، *I. fumosoroseus*، *L. lecanii* و *M. anisopliae* افزایش یافت. Binggeli *et al.* (2014) نشان دادند که افزایش فعالیت فنل اکسیداز باعث مقاومت به قارچ‌های بیمارگر *B. bassiana* و *M. anisopliae* در لاروهای مگس سرکه *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) می‌شود.

در پژوهش حاضر، جدایه‌های AM-118 و BB3 زهرآگینی مناسبی روی لاروهای پروانه سفید درختان داشتند و با افزایش غلظت کنیدیوم، میزان زهرآگینی آنها افزایش یافت. جدایه AM-118 در مقایسه با BB3، زهرآگینی بیشتری از خود نشان داد و در مدت زمان کم‌تر و با غلظت کم‌تر سبب مرگ و میر

بیشتر در لاروها شد. تزریق سوسپانسیون کنیدیومی جدایه‌های AM-118 و BB3، باعث افزایش فعالیت سامانه ایمنی در لاروها شد. بیش‌ترین فعالیت سلول‌های خونی در سه و شش ساعت پس از تزریق جدایه‌ها مشاهده شد. در بازه‌های زمانی مختلف، پاسخ ایمنی سلولی در لاروهای تزریق شده با جدایه BB3 بیشتر از جدایه AM-118 بود. شناختن نقش سلول‌های خونی در ایمنی حشرات در مقابل قارچ‌های بیمارگر حشرات، می‌تواند در برنامه‌های کنترل زیستی آفات جهت کارایی بهتر این عوامل کمک کند.

سپاس‌گزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به سبب تامین مالی پژوهش تشکر می‌شود.

References

Ajamhassani M, Jalali-Sendi J, Faresi M, Mehrabi A, 2011. Study of different isolates of *Beauveria bassiana* and *Isaria farinosae* on fourth instar larvae of *Hyphantria cunea* (Lep.: Arctiidae). *Iranian Journal of Forest and Range Protection Research* 9(1): 1–13 (In Persian with English abstract).

Ajamhassani M, Sendi JJ, Zibaee A, Askari H, Faresi MJ, 2013. Immunoliogical responses of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) to entomopathogenic fungi, *Beauveria Bassiana* (Bals. -Criy) and *Isaria farinosae* (Holmsk.) Fr. *Journal of Plant Protection Research* 53(2): 110–118.

Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA, 1991. Aspects of classification of Hemiptera hemocytes from six triatomine species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86: 1–10.

Bandani A 2005. Effects of *Tolypocladium cylindrosporum* and its secondary metabolites, efrapeptins, on the immune system of *Galleria mellonella* larvae. *Biocontrol Science and Technology* 15: 67-79.

Beckage NE, 2008. Insect Immunology. Academic press, 348 pp.

Binggeli O, Neyen C, Poidevin M, Lemaitre B, 2014. Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *PLoS Pathogen* 10: e1004067.

Chouvenc T, Su NY, Robert A, 2009. Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 234–241.

Dhar S, Jindal V, Jariyal M, Gupta VK, 2019. Molecular characterization of new isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and their efficacy against the tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 29(1): 2–9.

Fan J, Xie Y, Xue J, Liu R. 2013. The effect of *Beauveria brongniartii* and its secondary metabolites on the detoxification enzymes of the pine caterpillar, *Dendrolimus tabulaeformis. Journal of Insect Science* 13:44.

Finney A, 1971. Probit analysis (3rd ed.). Cambridge: Cambridge University Press. 272 pp.

Gillespie JP, Burnett C, Charnley AK, 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.

Goettel MS, Eilenberg J, Glare T, 2012. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Gilber LI, Gill SS (eds). Insect Control. Academic press. Pp. 387–431.

Gorman MJ, AC, Kanost MR, 2007. Characterization of tyrosine hydroxylase from *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 1327–1337.

Hajek AE, Eastburn CC, 2003. Attachment and germination of *Entomophaga maimaiga* conidia on host and non-host larval cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 82: 12–22.

Kryukov VY, Kryukova NA, Tomilova OG, Vorontsova Y, Chertkova E, *et al*, 2020. Comparative analysis of the immune response of the wax moth *Galleria mellonella* after infection with the fungi *Cordyceps militaris* and *Metarhizium robertsii*. *Microbial Pathogenesis* 141: 103995.

Lacey LA, Frutos R, Kaya H, Vail P, 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biological Control* 21: 230–248.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS, 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 1–41.

Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295–1309.

Leonard C, Kenneth S, Ratcliffe NA, 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberua craniifer* haemocytes. *Insect Biochemistry* 15: 803–810.

Liu QN, Zhu BJ, Wang L, Wei GQ, Dai LS, *et al*, 2013. Identification of immune response-related genes in the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* by suppression subtractive hybridization. *Journal of Invertebrate Pathology* 114: 313–323.

Lopes RB, Laumann RA, Blassioli-Moraes MC, Borges M, Faria M, 2015. The fungistatic and fungicidal effects of volatiles from metathoracic glands of soybean-attacking stink bugs (Heteroptera: pentatomidae) on the entomopathogen *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 77–85.

Mak P, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M, 2010. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Developmental Comparative Immunology* 34: 1129–1136.

Maniania NK, Ekesi S, Löhr B, Mwangi F, 2003. Prospects for biological control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, on chrysanthemum. *Mycopathologia* 155(4): 229–235.

Maqsoudi P, Ramzi S, Zibaee A, Khodaparast SA, 2019. Virulence comparison of two Iranian isolates of *Beauveria bassiana* Vuillemin against *Pseudococcus viburni* Signoret (Hemiptera: Pseudococcidae). *Trends in Entomology* 14: 63–70.

Mikami OK, Takamatsu M, Yarita R, 2020. Repurposing a traditional Japanese method of pest control for wintering pine moths, Komo-trap, for use against summer and winter populations of fall webworms. *Peer Journal* 8: 1–13.

Mirhaghparast SK, Zibaee A, 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.

Nakonechna YO, Stankevych SV, Zabrodina IV, Lezhenina, IP, Filatov, MO, *et al*, 2019. Distribution area of *Hyphantria cunea* Drury: the analysis of Ukrainian and world data. *Ukrainian Journal of Ecology* 9(3): 214–220.

Ramzi S, Zibaee A, 2014. Biochemical properties of different entomopathogenic fungi and their virulence against *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology* 24: 597–610.

Rezaei V, Jaafari Y, Moharramipour S, Talebi AA, 2004. Biological study of American white webworm *Hyphantria cunea* Drury (Lep.: Arctiidae) in Guilan province. *Proceeding of the 16th Iranian Plant Protection Congress* Vol. 1, Pests, 336.

Senthil-Nathan S, 2013. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. *Frontiers in Physiology* 4: 1e17.

Tomilova OG, Kryukov VY, Duisembekov BA, Yaroslavtseva ON, Tyurin MV, *et al*, 2016. Immune-physiological aspects of synergy between avermectins and the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* in Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 140: 8–15.

Tsakas S, Marmaras VJ, 2010. Insect immunity and its signaling: an overview. *Invertebrate Survival Journal* 7: 228–238.

Yaroslavtseva ON, Dubovskiy IM, Khodyrev VP, Duisembekov BA, Kryukov VY, *et al.*, 2017. Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* on Colorado potato beetle larvae. *Journal of Insect Physiology* 96: 14–20.

Yassine H, Kamareddine L, Osta MA, 2012. The mosquito melanization response is implicated in defense against the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *PLoS Pathogen* 8: e1003029.

Zdybicka-Barabas A, Mak P, Jakubowicz T, Cytryńska M, 2014. Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. *Archive of Insect Biochemistry and Physiology* 87: 1–12.

Zibaee A, Malagoli D, 2014. Immune response of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) larvae to different entomopathogenic fungi. *Bulletin of Entomological Research* 104(2): 155–163.

This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)