

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دانشکده علوم کشاورزی

گروه گیاه پزشکی

(حشره شناسی)

واکنش های ایمنی پروانه برگ خوار سفید اشجار

Beauveria نسبت به قارچ *Hyphantria cunea* (Drury)
bassiana

از:

مریم عجم حسنی

استاد راهنما:

دکتر جلال جلالی سندی

استادان مشاور:

دکتر آرش زیبایی و دکتر محمدجعفر فارسی

دی ماه ۱۳۹۱

از دست و زبان که بر آید
کز عهده شکرش به در آید
بی شک اگر لطف و عنایت حضرت حق همراه نبود، انجام مراحل مختلف این تحقیق میسر نمی‌گشت. یگانه مهربان را شاکرم
که چونان همیشه، دستم گرفت و راه هموار نمود تا از این مرحله نیز به خوبی عبور نمایم.
بر خود لازم می‌دانم از زحمات بی‌شائبه پدر و مادرم در طول تمام مقاطع تحصیلی‌ام تشکر نموده و بر دستان پرمهرشان بوسه
می‌زنم. چراغ وجودشان در زندگی‌م همواره روشن و مستدام باد.
سپاس فراوان پیشکش استاد راهنمای فرزانه و بزرگواریم جناب آقای دکتر جلالی که مدت ۱۱ سال افتخار شاگردی ایشان را
داشته و پیوسته از محضرشان کسب فیض نموده‌ام.
امتنان فراوان از اساتید محترم مشاور آقایان دکتر زیبایی و دکتر فارسی به پاس راهنمایی‌های ارزنده‌شان.
از اساتید محترم مدعو آقایان دکتر محرمی‌پور، دکتر صحراگرد و دکتر حاجی‌زاده که زحمت بازخوانی این مجموعه را به عهده
داشتند نهایت سپاس و قدردانی را دارم.
کمال تشکر از همه اساتید محترم گروه گیاه‌پزشکی که در دوره دکترا از کمک‌ها و مشاوره‌شان بهره برده‌ام.
از کارشناس محترم گروه جناب آقای مهندس سلیمی و آقایان خاتمی و خشنود متشکرم.
از همکاران محترم گروه تحقیقات حمایت و حفاظت در موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، موسسه تحقیقات
گیاه‌پزشکی کشور، همکاران محترم مرکز تحقیقات پرورش کرم ابریشم پسیخان، پرسنل محترم مزرعه تحقیقاتی پرند و پرنیان
در ماسال و دوستان عزیزم که هر کدام به نحوی، مرا در سال‌های اجرای تحقیق یاری رساندند بسیار سپاسگزارم.

مریم عجم حسنی

دی ماه ۱۳۹۱

صفحه	عنوان
۱	فصل اول-مقدمه و کلیات
۲	۱-مقدمه
۵	فصل دوم- بررسی پاسخ‌های ایمنی پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار.....
۷	۲-مقدمه
۷	۱-۲-دفاع در حشرات
۷	۱-۱-۲-ایمنی غیر اختصاصی در حشرات
۷	۱-۱-۲-۱-دفاع شیمیایی
۸	۱-۱-۲-۲-دفاع رفتاری
۹	۱-۱-۲-۳-دفاع مرفولوژیکی
۱۰	۱-۲-۱-۲-ایمنی ذاتی اختصاصی در حشرات
۱۰	۱-۲-۱-۲-۱-سیستم ایمنی
۱۱	۱-۲-۱-۲-۱-اندام‌های هماتوپویتیک
۱۲	۱-۲-۱-۲-۱-هماتوپویوز
۱۳	۱-۲-۱-۲-۱-انواع سلول‌های خونی
۱۳	۱-۲-۱-۲-۱-پروهموسیت‌ها
۱۴	۱-۲-۱-۲-۱-پلاسموتوسیت‌ها
۱۵	۱-۲-۱-۲-۱-پدوسیت‌ها
۱۵	۱-۲-۱-۲-۱-ورمیسیت‌ها
۱۵	۱-۲-۱-۲-۱-گرانولوسیت‌ها
۱۶	۱-۲-۱-۲-۱-اوونوسیت‌ها
۱۶	۱-۲-۱-۲-۱-اسفرولوسیت‌ها
۱۷	۱-۲-۱-۲-۱-ترومبوسیت‌ها
۱۷	۱-۲-۱-۲-۱-کوآگولوسیت‌ها
۱۷	۱-۲-۱-۲-ایمنی سلولی
۱۸	۱-۲-۱-۲-۱-بیگانه خواری
۱۸	۱-۲-۱-۲-۱-کپسوله کردن و تشکیل گره
۲۰	۱-۲-۱-۲-۱-انعقاد خون
۲۱	۱-۲-۱-۲-۱-واکنش‌های هیومرال
۲۲	۱-۲-۱-۲-۱-مسیرهای متابولیکی انتقال سیگنال
۲۲	۱-۲-۱-۲-۱-پروتئین‌های ذخیره‌ای
	۱-۲-۱-۲-همولین

۲۳	۱-۲-۱-۲-آتاسین
۲۳	۱-۲-۱-۲-لیزوزیم
۲۴	۱-۲-۱-۲-آریل فورین
۲۴	۱-۲-۱-۲-آپولیپوفورین
۲۵	۱-۲-۱-۲-گلورین
۲۵	۱-۲-۱-۲-سکروپین
۲۵	۱-۲-۱-۲-لکتین
۲۶	۱-۲-۱-۲-ایکوزانوئیدها
۲۷	۲-۲-۱-۲-تغییرات مرفولوژیکی سلول‌های خونی و تغییر در تعداد آنها در تقابل با بیمارگرها
۲۹	۱-۲-۱-۲-فنل اکسیداز
۲۹	۱-۲-۱-۲-ملانیزاسیون
۳۰	۱-۲-۱-۲-ساختار و منابع تولید پروفنل اکسیداز
۳۱	۱-۲-۱-۲-تنظیم فعالیت پروفنل اکسیداز
۳۱	۱-۲-۱-۲-سرین پروتازها
۳۱	۱-۲-۱-۲-پاسی فاستین
۳۲	۱-۲-۱-۲-کونیتز
۳۲	۱-۲-۱-۲-سرپین‌ها
۳۳	۱-۲-۱-۲-پروتئین‌هایی که مستقیماً از فعالیت فنل اکسیداز جلوگیری می‌کنند
۳۳	۳-۲-۱-۲-اثرات متقابل دفاع هیومرال (سیستم فنل اکسیداز) با عوامل بیگانه
۳۴	۴-۲-۱-۲-اهداف پژوهش
۳۵	۲-۲-مواد و روش‌ها
۳۵	۱-۲-۱-۲-پرورش حشرات
۳۵	۲-۲-۲-کشت و نگهداری جدایه‌های قارچ بیماریزای <i>Beauveria bassiana</i>
۳۵	۳-۲-۲-جدایه‌های قارچی مورد استفاده
۳۶	۴-۲-۲-شناسایی سلول‌های خونی و رنگ آمیزی آنها
۳۶	۵-۲-۲-شمارش سلول‌های خونی
۳۷	۶-۲-۲-تعیین تعداد کل و تفکیک شده سلول‌های خونی در سنین مختلف لاروی
۳۷	۷-۲-۲-تزریق اسپورهای ۴ جدایه قارچ <i>Beauveria bassiana</i> و یک جدایه <i>Isaria farinosae</i> و لاتکس بید به لاروهای سن ۴ دو روزه
۳۷	۸-۲-۲-بررسی تاثیر اسپورهای قارچ <i>Beauveria bassiana</i> و <i>Isaria farinosae</i> و لاتکس بید روی تعداد کل سلول‌های خونی
۳۸	۹-۲-۲-بررسی تاثیر اسپورهای قارچ <i>Beauveria bassiana</i> و <i>Isaria farinosae</i> و لاتکس بید روی بیگانه خواری
۳۸	۱۰-۲-۲-بررسی تاثیر اسپورهای قارچ <i>Beauveria bassiana</i> و <i>Isaria farinosae</i> و لاتکس بید در تشکیل گره
۳۸	۱۱-۲-۲-تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

۳۹	۱۲-۲-۲- تجزیه آماری
۴۰	۳-۲- نتایج
۴۰	۱-۳-۲- شناسایی سلول‌های خونی
۴۴	۲-۳-۲- تعیین تعداد کل و تفکیک شده سلول‌های خونی در سنین مختلف لاروی
۴۵	۳-۳-۲- بررسی تاثیر اسپوره‌های قارچ <i>Beauveria bassiana</i> و <i>Isaria farinosae</i> و لاتکس بید روی تعداد ...
۴۹	۴-۳-۲- بررسی تاثیر اسپوره‌های قارچ <i>Beauveria bassiana</i> و <i>Isaria farinosae</i> و لاتکس بید روی بیگانه خواری
۵۱	۵-۳-۲- بررسی تاثیر اسپوره‌های قارچ <i>Beauveria bassiana</i> و <i>Isaria farinosae</i> و لاتکس بید روی تشکیل گره
۵۲	۶-۳-۲- بررسی تاثیر اسپوره‌های قارچ <i>Beauveria bassiana</i> و <i>Isaria farinosae</i> و لاتکس بید روی فعالیت
۵۴	۴-۲- بحث
۵۹	۱-۴-۲- مقاومت حشره به عامل بیمارگر
۶۰	۲-۴-۲- نوع عامل بیمارگر و شدت آلودگی
۶۲	۵-۲- نتیجه‌گیری کلی
۶۴	۶-۲- پیشنهادات
۶۵	فصل سوم- خالص سازی و بررسی ویژگی‌های آنزیمی فنل اکسیداز....
۶۷	۳- مقدمه
۶۷	۱-۳- خالص سازی
۶۷	۱-۱-۳- تکنیک‌های رایج در خالص سازی
۶۷	۱-۱-۱-۳- رسوب دهی با آمونیوم سولفات
۶۷	۲-۱-۱-۳- دیالیز
۶۷	۳-۱-۱-۳- ژل فیلتراسیون
۶۸	۴-۱-۱-۳- کروماتوگرافی به روش تعویض یونی
۶۹	۵-۱-۱-۳- کروماتوگرافی به روش میل ترکیبی
۶۹	۲-۱-۳- خالص سازی پپتیدهای ضد میکروبی همولنف حشرات
۷۰	۳-۱-۳- تاثیر دما و اسیدیته بر ساختار پروتئین
۷۱	۴-۱-۳- خالص سازی فنل اکسیداز
۷۲	۵-۱-۳- اهداف پژوهش
۷۳	۲-۳- مواد و روش‌ها
۷۳	۱-۲-۳- تهیه‌ی نمونه‌ها
۷۳	۲-۲-۳- تهیه ستون‌های خالص سازی
۷۳	۱-۲-۲-۳- ستون ژل فیلتراسیون (سفاریل جی- ۱۰۰)
۷۳	۲-۲-۲-۳- ستون تعویض یونی (سفارز)
۷۴	۳-۲-۳- خالص سازی
۷۴	۴-۲-۳- تعیین کاینیتیک آنزیم، اسیدیته و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

۷۴	۳-۲-۵-تاثیر ترکیبات مختلف بر فعالیت فنل اکسیداز
۷۵	۳-۲-۶-ژل الکتروفورز
۷۶	۳-۲-۷-تجزیه آماری
۷۷	۳-۳-نتایج
۷۹	۳-۳-۱-تعیین کاینیتیک آنزیم، اسیدیته و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم فنل اکسیداز
۸۰	۳-۳-۲-تاثیر ترکیبات مختلف بر فعالیت فنل اکسیداز
۸۴	۳-۴-بحث
۸۸	۳-۵-نتیجه گیری کلی
۸۹	۳-۶-پیشنهادها
۹۰	فصل چهارم- بررسی بیماری‌گری قارچ‌های <i>Isaria farinosae</i> و <i>Beauveria bassiana</i> روی پروانه‌ی برگ‌خوار سفید
۹۲	۴-مقدمه
۹۲	۴-۱-پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار
۹۲	۴-۱-۱-روش‌های کنترل <i>H. cunea</i>
۹۲	۴-۱-۱-۱-کنترل شیمیایی
۹۳	۴-۱-۱-۲-کنترل فرمونی
۹۳	۴-۱-۱-۳-اقدام‌های قرنطینه‌ای
۹۳	۴-۱-۱-۴-دشمنان طبیعی
۹۴	۴-۱-۱-۵-عوامل بیمارگر
۹۵	۴-۱-۱-۶-قارچ‌های بیمارگر حشرات
۹۶	۴-۱-۱-۶-بیمارگری
۹۶	۴-۱-۱-۶-دامنه بیمارگری، اختصاص میزبانی و زهرآگینی
۹۷	۴-۱-۱-۶-جنس <i>Beauveria</i>
۹۷	۴-۱-۱-۶-رده بندی و مرفولوژی
۹۸	۴-۱-۱-۶-ویژگی‌های ظاهری گونه <i>B. bassiana</i>
۹۸	۴-۱-۱-۶-زهرابه‌های <i>B. bassiana</i>
۹۹	۴-۱-۱-۶-جنس <i>Isaria</i>
۱۰۰	۴-۱-۱-۶-گونه <i>Isaria farinosae</i>
۱۰۰	۴-۱-۱-۶-ویژگی‌های ظاهری گونه‌ی <i>I. farinosae</i>
۱۰۱	۴-۱-۱-۶-متابولیت‌های <i>Isaria</i>
۱۰۱	۴-۱-۱-۶-عوامل غیر زنده و زنده مؤثر در رشد، پایداری و فعالیت <i>I. farinosae</i>
۱۰۱	۴-۱-۱-۶-دما

۱۰۲	۴-۱-۱-۶-رطوبت نسبی
۱۰۲	۴-۱-۱-۶-نور
۱۰۳	۴-۱-۱-۶-نوع جدایه‌ی قارچ <i>Isaria</i>
۱۰۳	۴-۱-۱-۶-گیاهان میزبان آفت هدف
۱۰۷	۴-۱-۱-۷-اهداف پژوهش
۱۰۸	۴-۲-مواد و روش‌ها
۱۰۸	۴-۲-۱-پرورش حشرات
۱۰۸	۴-۲-۲-جدایه‌های قارچی مورد استفاده
۱۰۸	۴-۲-۳-کشت و تکثیر قارچ‌های بیماریزا و تعیین غلظت‌های مورد آزمایش
۱۰۸	۴-۲-۴-آزمایش‌های زیست‌سنجی
۱۰۸	۴-۲-۴-۱-بررسی بیماری‌گری جدایه‌های قارچی <i>I. farinosae</i> و <i>B. bassiana</i> روی لاروهای سن ۴
۱۰۹	۴-۲-۴-۲-بررسی حساسیت لاروهای سنین ۲، ۳ و ۵ به زهراگین‌ترین جدایه
۱۰۹	۴-۲-۴-۵-تجزیه آماری
۱۱۰	۴-۳-نتایج
۱۱۳	۴-۴-بحث
۱۱۶	۴-۵-نتیجه‌گیری کلی
۱۱۷	۴-۶-پیشنهادها
۱۱۹	۵-منابع

- شکل ۲-۱- انواع سلول‌های خونی لارو سن چهار دو روزه‌ی پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار
- شکل ۲-۲- GR: گرانولوسیت، PL: پلاسموتوسیت (میکروسکوپ فازکنتراست، بزرگ‌نمایی ۴۰)
- شکل ۲-۳- SP: اسفرولوسیت (میکروسکوپ فازکنتراست، بزرگ‌نمایی ۴۰)
- شکل ۲-۴- Nodule: گره، PR: پروهموسیت (میکروسکوپ فازکنتراست، بزرگ‌نمایی ۴۰)
- شکل ۲-۵- میانگین تعداد کل سلول‌های خونی $\times 10^4$ در میلی‌لیتر همولنف لاروهای سنین مختلف
- شکل ۲-۶- میانگین درصد فراوانی سلول‌های خونی در لاروهای سنین مختلف پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار
- شکل ۲-۷- میانگین تعداد کل سلول‌های خونی $\times 10^4$ در میلی‌لیتر همولنف لاروهای سن چهار دو روزه
- شکل ۲-۸- میانگین تعداد پلاسموتوسیت‌ها $\times 10^4$ در میلی‌لیتر همولنف لاروهای سن چهار دو روزه ..
- شکل ۲-۹- میانگین تعداد گرانولوسیت‌ها $\times 10^4$ در میلی‌لیتر همولنف لاروهای سن چهار دو روزه
- شکل ۲-۱۰- میانگین تعداد اوونوسیت‌ها $\times 10^4$ در میلی‌لیتر همولنف لاروهای سن چهار دو روزه
- شکل ۲-۱۱- میانگین تعداد پروهموسیت‌ها $\times 10^4$ در میلی‌لیتر همولنف لاروهای سن چهار دو روزه
- شکل ۲-۱۲- میانگین تعداد پلاسموتوسیت‌های بیگانه‌خوار $\times 10^4$ در میلی‌لیتر همولنف لاروهای سن چهار دو روزه .
- شکل ۲-۱۳- میانگین تعداد گرانولوسیت‌های بیگانه‌خوار $\times 10^4$ در میلی‌لیتر همولنف لاروهای سن چهار دو روزه ..
- شکل ۲-۱۴- میانگین تعداد گره‌ها $\times 10^4$ در میلی‌لیتر همولنف لاروهای سن چهار دو روزه تحت تاثیر جدایه ...
- شکل ۲-۱۵- میانگین فعالیت فنل اکسیداز لاروهای سن چهار دو روزه تحت تاثیر جدایه‌های قارچی و لاتکس بید
- شکل ۳-۱- تعداد فرکشن‌های گرفته شده از ستون‌های اول و دوم و اوج فعالیت آنزیم فنل اکسیداز در آنها
- شکل ۳-۲- منحنی لاینوربورگ-پلات نشان دهنده پارامترهای آنزیمی فنل اکسیداز پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار
- شکل ۳-۳- تاثیر اسیدبته بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز
- شکل ۳-۴- تاثیر دما بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز
- شکل ۳-۵- ژل الکتروفورز آنزیم فنل اکسیداز خالص شده
- شکل ۴-۱- رگرسیون پروبیت مرگ و میر لاروهای سن ۴ دو روزه تحت تاثیر جدایه‌های قارچ

- جدول ۱-۲. مشخصات جدایه‌های قارچی ۳۶
- جدول ۱-۳. خالص سازی آنزیم فنل اکسیداز پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار ۷۷
- جدول ۲-۳. تاثیر یون‌های فلزی و نمکی و بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار. ۸۲
- جدول ۱-۴. LD₂₅ و LD₅₀، با حدود اطمینان (٪۹۵) جدایه‌های *B. bassiana* و یک جدایه‌ی *I. farinosae* روی لاروهای سن ۴ پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار ۱۱۰
- جدول ۲-۴. LD₂₅، LD₅₀، حدود اطمینان (٪۹۵) جدایه‌ی Fashand در مقابل لاروهای سن ۲، ۳ و ۵ پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار ۱۱۱

- جدول ضمیمه ۷۴-مقایسه‌ی میانگین تعداد گره‌ها ۳ ساعت پس از تزریق تیمارها با آزمون توکی ۱۶۰
- جدول ضمیمه ۷۵-تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر تیمارها بر تعداد گره‌ها پس از ۶ ساعت ۱۶۰
- جدول ضمیمه ۷۶-مقایسه‌ی میانگین تعداد گره‌ها ۶ ساعت پس از تزریق تیمارها با آزمون توکی ۱۶۰
- جدول ضمیمه ۷۷-تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر تیمارها بر تعداد گره‌ها پس از ۱۲ ساعت ۱۶۱
- جدول ضمیمه ۷۸-مقایسه‌ی میانگین تعداد گره‌ها ۱۲ ساعت پس از تزریق تیمارها با آزمون توکی ۱۶۱
- جدول ضمیمه ۷۹-تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر تیمارها بر تعداد گره‌ها پس از ۲۴ ساعت ۱۶۱
- جدول ضمیمه ۸۰-مقایسه‌ی میانگین تعداد گره‌ها ۲۴ ساعت پس از تزریق تیمارها با آزمون توکی ... ۱۶۱
- جدول ضمیمه ۸۱-تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر تیمارها بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز پس از ۱ ساعت ۱۶۲
- جدول ضمیمه ۸۲-مقایسه‌ی میانگین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز ۱ ساعت پس از تزریق تیمارها با آزمون توکی ... ۱۶۲
- جدول ضمیمه ۸۳-تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر تیمارها بر آنزیم فعالیت فنل اکسیداز پس از ۳ ساعت ۱۶۲
- جدول ضمیمه ۸۴-مقایسه‌ی میانگین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز ۳ ساعت پس از تزریق تیمارها با آزمون توکی ... ۱۶۳
- جدول ضمیمه ۸۵-تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر تیمارها بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز پس از ۶ ساعت ۱۶۳
- جدول ضمیمه ۸۶-مقایسه‌ی میانگین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز ۶ ساعت پس از تزریق تیمارها با آزمون توکی .. ۱۶۳
- جدول ضمیمه ۸۷-تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر تیمارها بر فعالیت آنزیم فنل اکسیداز پس از ۱۲ ساعت ۱۶۴
- جدول ضمیمه ۸۸-مقایسه‌ی میانگین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز ۱۲ ساعت پس از تزریق تیمارها با آزمون توکی .. ۱۶۴
- جدول ضمیمه ۸۹-تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر تیمارها بر فعالیت فنل اکسیداز پس از ۲۴ ساعت ۱۶۴
- جدول ضمیمه ۹۰-مقایسه‌ی میانگین فعالیت فنل اکسیداز ۲۴ ساعت پس از تزریق تیمارها با آزمون توکی .. ۱۶۵
- جدول ضمیمه ۹۱- تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر دما روی فعالیت آنزیم فنل اکسیداز ۱۶۷
- جدول ضمیمه ۹۲-مقایسه‌ی میانگین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز تحت تاثیر دماهای مختلف با آزمون توکی.... ۱۶۷
- جدول ضمیمه ۹۳- تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر اسیدیته (pH) روی فعالیت آنزیم فنل اکسیداز ۱۶۷
- جدول ضمیمه ۹۴-مقایسه‌ی میانگین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز تحت تاثیر اسیدیته‌های (pH) مختلف با آزمون توکی ۱۶۸
- جدول ضمیمه ۹۵- تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر یونهای فلزی و نمکی مختلف روی فعالیت آنزیم فنل اکسیداز ۱۶۸
- جدول ضمیمه ۹۶- مقایسه‌ی میانگین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز تحت تاثیر یونهای فلزی و نمکی با آزمون توکی.... ۱۶۹
- جدول ضمیمه ۹۷- تجزیه‌ی واریانس مربوط به تاثیر بازدارنده‌های سنتزی روی فعالیت آنزیم فنل اکسیداز ۱۶۹
- جدول ضمیمه ۹۸- مقایسه‌ی میانگین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز تحت تاثیر بازدارنده‌های سنتزی با آزمون توکی .. ۱۷۰
- جدول ضمیمه ۹۹- تجزیه‌ی واریانس تاثیر تیمارهای مختلف قارچی بر لاروهای سن چهار پروانه‌ی برگ‌خوار سفید ۱۷۲
- جدول ضمیمه ۱۰۰- مقایسه‌ی میانگین‌های (آزمون دانکن) درصد تلفات لاروهای سن چهار تحت تاثیر جدایه‌های ... ۱۷۲
- جدول ضمیمه ۱۰۱- مقایسه‌ی میانگین‌های (آزمون دانکن) درصد تلفات لاروهای سن چهار تحت تاثیر غلظت‌های ۱۷۲
- جدول ضمیمه ۱۰۲- تجزیه‌ی واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف جدایه فشن‌د بر لاروهای سنین مختلف پروانه‌ی برگ‌خوار. ۱۷۳
- جدول ضمیمه ۱۰۳- مقایسه‌ی میانگین‌های (آزمون دانکن) درصد تلفات لاروها در سنین مختلف ۱۷۳
- جدول ضمیمه ۱۰۴- مقایسه‌ی میانگین‌های (آزمون دانکن) درصد تلفات لاروهای سنین مختلف تحت تاثیر غلظت‌های ... ۱۷۳

واکنش‌های ایمنی سلولی پروانه برگ‌خوار سفید اشجار (*Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) نسبت به قارچ *Beauveria bassiana*

مریم عجم حسنی

چکیده

پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار (*Hyphantria cunea* Drury (Lep.: Arctiidae) یکی از آفات مهم درختان جنگلی در استان گیلان می‌باشد که گاه شدت خسارت لاروهای آن منجر به بی‌برگی کامل درختان می‌شود. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات متقابل بین ایمنی سلولی پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار در برابر قارچ‌های بیماری‌زای *Isaria* و *Beauveria bassiana* و *farinosae* خالص‌سازی و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی فنل‌اکسیداز در لاروهای سن پنجم پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار و اثر بیماری‌زایی ۴ جدایه‌ی قارچ *B. bassiana* و یک جدایه‌ی *I. farinosae* روی لاروهای سن ۴ پروانه‌ی سفید اشجار و نیز حساسیت لاروهای سنین مختلف به بیماری‌زاترین جدایه انجام شد. پنج نوع سلول خونی در همولنف لاروهای سن ۴ دو روزه پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار شناسایی شد که شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اوونوسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها بودند. تاثیر ۴ جدایه از قارچ بیمارگر *B. bassiana* و یک جدایه *I. farinosae* و لاتکس-بید روی ایمنی سلولی و فعالیت فنل‌اکسیداز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به شکل بیگانه‌خواری در برابر قطعات بیگانه فعالیت می‌کنند و این ذرات را می‌بلعند. بیشترین فعالیت بیگانه‌خواری در ۳۰ و ۶۰ دقیقه پس از تزریق عامل بیگانه رخ داد. اما گره‌زایی به‌طور عمده در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از ورود عامل بیگانه به همولنف در همه‌ی تیمارها مشاهده شد. تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها بعد از تزریق تیمارها افزایش یافت. فعالیت فنل‌اکسیداز با حضور سوبسترای L-DOPA در فواصل مشخص بعد از تزریق اسپور جدایه‌ها و لاتکس بید تعیین شد. آنزیم فنل‌اکسیداز با ریکاوری ۰/۱۲ و فعالیت ویژه ۲۳/۳۸ (فعالیت آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین) به میزان ۹/۶۷ بار خالص شد. V_{max} و K_m به ترتیب ۴/۰۸ میلی‌مول و ۱۲/۹۸ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین به‌دست آمد. اسیدیته و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم خالص‌شده در حضور سوبسترای L-DOPA میزان ۱۰ و ۳۵ درجه‌ی سلسیوس تعیین شد. یون‌های روی، مس، پتاسیم و سدیم به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیم را افزایش دادند و بازدارنده‌های سنتزی مانند دی اتیل دی تیو کاربامات و فنیل متیل سولفونیل فلوراید به‌طور معنی‌داری سبب کاهش فعالیت آنزیم شدند. وزن مولکولی آنزیم خالص شده ۳۳ کیلو دالتون تعیین شد. آزمایش زیست‌سنجی با ۵ تیمار قارچی (فاکتور اول) و ۶ غلظت (فاکتور دوم) به همراه شاهد (آب مقطر) با ۴ تکرار و در هر تکرار ۱۰ عدد لارو سن ۴ در طرح پایه کاملاً تصادفی انجام‌شد. لاروها به روش Topical با قارچ آلوده‌شدند. لاروهای شاهد با آب مقطر حاوی ۰/۰۳ درصد Tween-۸۰، تیمارشدند. نتایج نشان داد که جدایه‌ی Fashand با ایجاد تلفات ۳۹ درصد بیشترین و جدایه 1872c در رده‌ی بعدی قرارداداشت. در میان غلظت‌های به‌کاربرده‌شده، غلظت 10^8 بیشترین تلفات را به میزان ۵۸ درصد ایجاد کرد. به‌علاوه جدایه‌ی Fashand در غلظت 10^8 بالاترین تلفات لاروی را به میزان ۷۲/۵ درصد و جدایه‌ی 566 در همان غلظت کمترین مرگ و میر را به میزان ۴۲/۵ درصد به همراه داشت. LD_{50} محاسبه‌شده برای دو جدایه‌ی فوق به‌ترتیب $(6/9 \times 10^4 - 6/9 \times 10^3)$ و $(2 \times 10^3 - 2/1 \times 10^9)$ کنیدی در میلی‌لیتر بود. همچنین حساسیت لاروهای سنین دوم، سوم و پنجم به بیمارگرترین جدایه نیز در یک آزمایش جداگانه بررسی‌شد. حساسیت لاروهای سنین مختلف به جدایه‌ی Fashand متفاوت بود. لاروهای سنین دوم و سوم به ترتیب ۵۷ و ۵۱ درصد تلفات را نشان دادند در حالی‌که لاروهای سن پنجم ۲۹ درصد تلفات نشان دادند. در ضمن غلظت 10^8 بالاترین تلفات را به میزان ۸۵ درصد ایجاد کرد.

کلمات کلیدی: پروانه برگ‌خوار سفید اشجار، واکنش‌های ایمنی، خالص‌سازی فنل‌اکسیداز، زیست‌سنجی، *Isaria* و *B. bassiana* *farinosae*

Cellular immune reactions of *Hyphantria cunea* (Drury)(Lepidoptera: Arctiidae) to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*

Maryam Ajamhassani

Abstract

Hyphantria cunea Drury (Lep.: Arctiidae) is one of the important forest pests in Guilan province. Damage of larva of this insect that sometimes lead to leafless calls for drastic measures. So this research was carried out to study the immunological responses of *H. cunea* to entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Isaria farinosae*, purification and characterization of phenoloxidase from the hemolymph of *H. cunea* and pathogenicity of four isolates of *B. bassiana* and one isolate of *I. farinosae* on 4th larvae of *H. cunea*. Five morphological types of hemocyte were recognized in hemolymph of the 4th instar larvae of *H. cunea*. These hemocytes were namely prohemocytes, plasmotocytes, granulocytes, oenocytoids and spherulocytes. Tests were done on effects of four isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Fashand, Spt-22, Ir-K-40 and 566), one isolate of *Isaria farinosae* and latex-beads on the cellular immune defense mechanism and PO activity of *H. cunea*. Observation showed that plasmotocytes and granulocytes engulfed fungal pathogens by phagocytosis. The most phagocytosis occurred 30 and 60 min after injection but nodulation occurred in 3 and 6 hours after injection of different treatments. Total hemocyte count (THC) and granulocyte and plasmotocyte numbers increased after injection of spores. Phenoloxidase activity was determined in the presence of L-DOPA as a substrate in intervals after injection of fungal spores and latex beads. The purification fold of phenoloxidase was determined as 9.67 with a recovery of 0.12 and a specific activity of 23.28 U/mg protein identified. Kinetic parameters of purified PO from the insect *H. cunea* were determined. The Michaelis constant (K_m) and the maximal velocity (V_{max}) were 4.08 and 12.98 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein, respectively.

The optimal pH and temperature of the enzyme for oxidation of L-DOPA were 10.0 and 35 °C, respectively. The ions Zn^{2+} , Cu^{2+} , K^+ and Na^+ significantly increased the enzyme activity and synthetic inhibitors such as diethyldithiocarbamate (DETC) significantly decreased it. Finally, it was found that purified PO had a molecular mass of 33 KDa. Bioassay tests were conducted in the form of factorial and completely randomized design with 30 treatments and four replications. Ten larvae were topically infected with fungus spores. The control larvae were treated with distilled water plus Tween 80 0.03%. Results showed that Fashand isolate caused the highest percent mortality (39%), whereas 1872c was second in importance. In 10^8 concentrations Fashand caused the highest mortality (72.5%) and 566 had the lowest mortality (42.5%). LD50s of the above isolates were 0.2×10^3 (6.6×10^3 - 6.9×10^4) and 3.1×10^7 (4.8×10^6 - 2.1×10^9) conidia/ml., respectively. Susceptibility of different larval instars was varied too. Second and third instars had the most mortality rate (57 and 51%) respectively. In 10^8 concentrations Fashand isolate caused the 85% mortality.

Key words: *Hyphantria cunea*, Immunological responses, Purification of Phenoloxidase, Bioassay, *Beauveria bassiana* and *Isaria farinosae*

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱- مقدمه

پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار (*Hyphantria cunea* (Drury)(Lepidoptera: Arctiidae) یکی از آفات مهم درختان مثمر و غیرمثمر در مناطق شمالی کشورمان به‌ویژه استان گیلان می‌باشد. لاروهای این حشره در سنین بالا گاه به علت تغذیه زیاد، پهنک برگ گیاهان میزبان را به‌طور کامل به شکل توری در می‌آورند. حدود ۶۳۰ گونه میزبان گیاهی برای این حشره شناسایی شده اما توت و افرا‌ی سیاه میزبان ترجیحی لاروهای این پروانه می‌باشند. طول دوره یک نسل آن حدود ۴۵ روز بوده و در شرایط استان گیلان دارای ۲ نسل در سال می‌باشد. از زمان ظهور این آفت برای اولین بار در لشت نشا (استان گیلان) اقدام‌های قرنطینه‌ای و ردیابی‌های منطقه‌ای انجام گرفته است [یارمند و همکاران، ۲۰۰۹]. استفاده از تله‌های فرومونی، سموم شیمیایی و دشمنان طبیعی آفت به‌ویژه پارازیتوئیدها و نیز باکتری باسیلوس توررنزینسیس نتایج خوبی را در پایین آوردن سطح جمعیت این حشره در مناطق مختلف دنیا به همراه داشته است [Sikura et al., 1988; Yang et al., 2005 and Yarmand et al., 2009]. علیرغم تحقیقات گسترده‌ای که در زمینه کنترل (شیمیایی، مکانیکی، و بیولوژیک) پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار صورت گرفته اما تاکنون گزارشی در خصوص تاثیر قارچ‌های بیماریزای حشرات بر آن به ثبت نرسیده است. قارچ‌های بیماریزگر حشرات بیشتر از طریق کوتیکول خارجی و نفوذ لوله تندشی به داخل هموسل، حشره را بیمار می‌کنند [Charnley, 1984]. پس از ورود قارچ به حفره عمومی بدن، اسپورها تکثیر یافته و تمام هموسل را فرا می‌گیرند. برخی از گونه‌های بیماریزگر نوعی توکسین در بدن حشره تولید می‌کنند و بدین ترتیب مرگ میزبان آلوده را تسریع می‌کنند [Roberts, 1981]. لاروهای پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار به‌ویژه در سنین پایین به طور متراکم بوده و رفتار دسته‌جمعی دارند، این رفتار حشره برای اعمال روش‌های کنترل میکروبی مانند محلول‌پاشی قارچ‌های بیماریزگر یک امتیاز محسوب می‌شود. از طرفی شرایط اقلیمی استان گیلان نیز به لحاظ رطوبتی برای رشد و جوانه‌زنی قارچ مناسب می‌باشد لذا بخشی از این پژوهش بر اساس تعیین بیماریزایی قارچ‌های بیماریزگر *Beauveria bassiana* و *Isaria farinosae* بر زنده‌مانی پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار طراحی شد.

واکنش‌های ایمنی، یک شاخص مهم حساسیت میزبان به آلودگی است. پاسخ حشرات به عوامل بیگانه مانند اسپور قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و نماتدها به شکل ایمنی غیر اختصاصی و اختصاصی بروز می‌کند [Strand and Lavin, 2002; Kanost et al., 2007]. ایمنی غیر اختصاصی به معنای مشارکت جلد، لایه‌های کوتیکولی لوله گوارش، منافذ تنفس و سیستم تناسلی در دفع عامل خارجی است که موانع فیزیکی عوامل بیگانه به شمار می‌روند. ایمنی اختصاصی در حشرات از نوع ذاتی است چرا که حشرات فاقد ایمنوگلوبین می‌باشند [Gillespie et al., 1997]. ایمنی ذاتی اختصاصی مشتمل بر دفاع سلولی و هیومرال می‌باشد. نقش

سلول‌های خونی در بیگانه‌خواری [Borges et al., 2008] و تشکیل گره و کپسول [Nardi et al., 2003] پر رنگ می‌باشد. گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها به عنوان ایمنوسیت‌های حشرات در فعالیتهای ایمنی طیف وسیعی از بال‌پولکداران نقش کلیدی دارند [Strand and Lavine, 2002]. به علاوه، پپتیدهای ضد میکروبی، لکتین‌ها، سیستم پروفنل اکسیداز و ملانیزاسیون در واکنش‌های هیومرال فعالیت می‌کنند [Bulet et al., 1999]. در واقع، برآیندی از فعالیتهای دفاعی، رفتاری، مرفولوژیکی، ژنتیکی و فیزیولوژیکی، حشره را در برابر عوامل زنده و غیر زنده بیگانه محافظت می‌کند. بنابراین، بدیهی است بررسی تعامل بین ایمنی حشرات با عوامل بیگانه می‌تواند رویکردی جدید در بهره‌گیری بهتر و مناسب‌تر عوامل میکروبی باشد. چنانچه حشره توانایی کافی برای انهدام عامل خارجی را نداشته باشد از پای در آمده و در نبرد بین حشره-عامل بیگانه، عامل بیگانه موفق است. به منظور درک قدرت ایمنی پروانه برگ‌خوار سفید اشجار در برابر عوامل بیگانه در بخش دیگری از این تحقیق، واکنش‌های ایمنی پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار در مقابل قارچ‌های بیمارگر *Beauveria bassiana* و *Isaria farinosae* و ماده سنتزی غیر زنده لاتکس بید در مدت زمانی ۲۴ ساعت ارزیابی شده است.

یکی از عوامل مهم در ایمنی حشرات آنزیم فنل اکسیداز می‌باشد. این آنزیم با ورود گلیکوپروتئین‌های دیواره باکتری یا پپتیدوگلیکان‌های اسپوره‌های قارچ و یا ایجاد زخم و جراحت در جلد حشره فعال شده و با تولید کوئینون، رادیکال‌های آزاد و در نهایت ملانیزه کردن عامل بیگانه منجر به مرگ آن می‌شود. فعالیت این سیستم توسط سرین پروتئازها و یون کلسیم تنظیم می‌شود [Cerenius and Soderhall, 2004]. شناخت ویژگی‌های فیزیولوژیک، بررسی پارامترهای کاینیتیکی فنل اکسیداز و سرانجام کنترل فعالیتهای این آنزیم، سبب ضعیف کردن ایمنی حشره و غالبیت عوامل میکروبی خواهد شد، تا جایی‌که ارزیابی‌های تکمیلی می‌تواند در کاهش جمعیت آفت و خسارت ناشی از آن مفید باشد. بنابراین، خالص سازی فنل اکسیداز، بررسی دامنه‌ی فعالیت آن در دما و اسیدیته بهینه و تاثیر برخی یون‌ها و بازدارنده‌ها بر میزان فعالیت این آنزیم در بخشی از این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفت.

بنابر آنچه گفته شد اهدافی که در این رساله پی‌گیری می‌شوند عبارتند از:

- شناسایی سلول‌های خونی پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار و نقش آنها در ایمنی حشره
- بررسی تعداد کل و تفرقی سلول‌های خونی در رویارویی با اسپوره‌های قارچی *Isaria farinosae* و *Beauveria bassiana* و ذرات لاتکس بید در فواصل زمانی مختلف تا ۲۴ ساعت

- تعیین میزان بیگانه‌خواری سلول‌های ایمنوسیت در ۹۰ دقیقه ابتدای تزریق اسپورهای قارچی و لاتکس بید به همولنف حشره
- تعیین میزان مشارکت سلول‌های خونی در تشکیل گره در فواصل زمانی پس از ورود اسپورهای قارچی و لاتکس بید به همولنف حشره تا ۲۴ ساعت
- تعیین فعالیت فنل‌اکسیداز در تقابل با اسپورهای قارچی و لاتکس بید در فواصل زمانی مختلف تا ۲۴ ساعت
- خالص سازی آنزیم فنل‌اکسیداز پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار
- بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیک فنل‌اکسیداز مانند پارامترهای کاینتیکی
- تعیین دما و اسیدیته بهینه برای فعالیت فنل‌اکسیداز
- بررسی نقش یون‌های فلزی و نمکی و بازدارنده‌های سنتزی در فعالیت فنل‌اکسیداز
- بررسی غلظت‌های لگاریتمی موثر ۴ جدایه قارچ *Beauveria bassiana* و یک جدایه از قارچ *Isaria farinosae* بر زنده‌مانی لاروهای سن ۴ پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار
- بررسی تاثیر بیماریزاترین جدایه بر میزان زنده‌مانی لاروهای سنین مختلف پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار

فصل دوم

بررسی پاسخ‌های ایمنی پروانه‌ی برگ‌خوار سفید اشجار

Hyphantria cunea (Drury)

(Lepidoptera.:Arctiidae) در مقابل قارچ‌های بیمارگر

Isaria farinosae و *Beauveria bassiana*