

بررسی دفاع سلولی لاروهای *Utethesia pulchella* (Lepidoptera: Arctiidae) در مقابل قارچ‌های*Isaria farinosae* و *Beauveria bassiana*

مریم عجم حسنی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شاهرود، پست الکترونیکی: shahroodm@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۹/۱۸

۶۷-۵۷(۱)۲

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۸/۲۰

چکیده

دفاع سلولی حشرات یکی از راه‌کارهای مهم آن‌ها در برابر عوامل بیگانه مانند اسپور قارچ‌ها، باکتری‌ها، نماتدها و تخم پارازیتوئیدها می‌باشد. با شناخت سیستم ایمنی حشره بهتر می‌توان از روش‌های کنترل میکروبی علیه آن‌ها استفاده کرد. در این تحقیق، واکنش ایمنی سلولی لاروهای سن چهارم پروانه *Utethesia pulchella* L. در برابر دو جدایه از قارچ *Beauveria bassiana* (Bals.-Crie) شامل Fashand و 566 و یک جدایه قارچ *Isaria farinosae* (Holmsk) Fr. به نام 1872c بررسی شد. غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر از جدایه‌های قارچی به لاروها تزریق شدند و فعالیت سلول‌های خونی، گره‌زایی و آنزیم فنل اکسیداز پس از ۱، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت ارزیابی شدند. تیمار شاهد شامل لاروهایی بود که با آب مقطر تزریق شدند. تعداد کل سلول‌ها، تعداد پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق حداکثر بود که تفاوت معنی‌داری را با شاهد نشان داد. اما به تدریج پس از ۶ ساعت تعداد کل سلول‌ها و تعداد افتراقی سلول‌های خونی کاسته شد. پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در فرایند گره‌زایی شرکت کرده و منجر به نابودی عامل بیگانه شدند. فرایند گره‌زایی در فواصل زمانی ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق عوامل بیگانه در همولنف حشره حداکثر بود. فعالیت فنل اکسیداز در حضور سوبسترای L-DOPA اندازه‌گیری شد. این پارامتر با تعداد سلول‌های خونی در زمان‌های مختلف ارتباط مستقیم نشان داد. بالاترین فعالیت این آنزیم ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق بود. نتایج این بررسی نشان داد که لاروهای *U. pulchella* فعالیت دفاعی خوبی در برابر اسپورهای این ۳ جدایه نشان دادند و توانستند با ایجاد گره‌ها اطراف عامل بیگانه آن‌ها را نابود کنند.

واژه‌های کلیدی: دفاع سلولی، سلول خونی، *Utethesia pulchella*، *Isaria farinosae*، *Beauveria bassiana*

مقدمه

پراکنش آن در آفریقا، اروپا، نیوزیلند، آسیای مرکزی، فیلیپین، هند و مناطقی از استان‌های جنوبی ایران می‌باشد (Nayar et al., 1998). امروزه روش کنترل میکروبی مانند استفاده از قارچ‌های بیمارگر حشرات در کاهش جمعیت حشرات مؤثر ارزیابی شده است. کنیدی‌های بیماری‌زای این عوامل بیمارگر توان‌تندش و نفوذ به هموسل حشرات را دارند و گاه می‌توانند بر سیستم دفاعی حشره غلبه کنند (Abood et al., 2010). با درک بهتر اثرات متقابل قارچ بیمارگر- ایمنی سلولی حشره بهتر می‌توان غلبت یکی را بر دیگری مشخص نمود. در واقع، پاسخ‌های سیستم ایمنی در حشرات، معرف ورود عامل آلودگی به همولنف است. میزبان‌های مقاوم قادر به متوقف کردن پیشرفت آلودگی

پروانه‌ی *Utethesia* (Lepidoptera: Arctiidae) *pulchella* L. یا Crimson Speckled Moth از آفات مهم شبدر علوفه‌ای در مناطق جنوبی کشورمان است. لاروهای این حشره به‌طور دسته‌جمعی از برگ‌ها و جوانه‌های شبدر تغذیه کرده و گاه منجر به بی‌برگی کامل این گیاه مرتعی می‌شوند. لاروهای *U. pulchella* با دارا بودن انواع آنزیم‌های پروتئاز در سیستم گوارش خود، این گیاهان را به عنوان مهمترین منبع تغذیه خود قرار داده‌اند (Ajmehassani et al., 2012). خسارت *U. pulchella* روی گل‌های بعضی پنبیرکیان و گیاهان دارویی مانند گاوزبان و آنگوزه هم گزارش شده است (Martin, 1993).

راستای کنترل آفات باشد. بر این اساس، به منظور درک بیشتر سیستم ایمنی *U. pulchella* در برابر عوامل مهاجم، در تحقیق حاضر، دفاع سلولی لاروهای سن چهارم این حشره در برابر دو جدایه از قارچ بیمارگر *B. bassiana* و یک جدایه از قارچ *I. farinosae* در مدت زمان ۱۲ ساعت ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها پرورش حشرات

در اواسط فصل بهار و هم‌زمان با تخم‌ریزی پروانه‌های *U. pulchella*، یک دسته تخم از روی پنیرکیان جمع‌آوری شد و در آزمایشگاه در شرایط دمایی 26 ± 1 درجه‌ی سلسیوس، دوره‌ی روشنائی به‌تاریکی، $14:10$ ساعت و رطوبت نسبی 75 ± 5 درصد به‌منظور پرورش لاروهای حاصل از تفریح آن‌ها نگهداری شدند. لاروهای تازه تفریح شده در ظروف پرورش به‌ابعاد $15 \times 10 \times 8$ سانتی‌متر مکعب محتوی برگ‌های پنیرک قرار داده شدند. با اندازه‌گیری طول بدن و عرض کپسول سر، لاروهای سن چهارم برای آزمایش‌های ایمنی شناسی استفاده شدند.

کشت و نگهداری جدایه‌های قارچ بیماری‌زای *B. bassiana* و *I. farinosae*

دو جدایه بیماری‌زای قارچ *B. bassiana* (تهیه شده از موسسه‌ی گیاه‌پزشکی کشور) شامل Fashand (جداسازی شده از خاک منطقه‌ی فشد توسط غزوی) و 566 (جداسازی شده از سن گندم در اصفهان توسط پارکر) و یک جدایه از *I. farinosae* (به‌نام 1872c جدا شده از سفیره *Hyphantria cunea* (Drury) در دیناچال گیلان توسط عجم حسنی) روی محیط PDA کشت شدند. برای نگهداری جدایه‌ها به‌مدت طولانی از محیط PCA استفاده شد. پس از گذشت ۸ روز از کشت قارچ‌ها، غلظت مناسب (اسپور در میلی‌لیتر که در آزمایش‌های پایلوت توسط نویسندگان تعیین شده بود) تهیه شده و برای بررسی‌های ایمنی شناسی استفاده شد. در آزمایش‌های ایمنی شناسی، غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (Zibae et al., 2011).

هستند (Washburn et al., 2000). به‌طور معمول سیستم ایمنی به موجودات مهاجم بعد از تشخیص بیگانه بودن آن یا خسارتی که به غشاء پایه وارد می‌کند با پاسخ‌های سلولی و هیومرال واکنش نشان می‌دهد (Gillespie et al., 1997; Lavine & Strand, 2002). این پاسخ‌های دفاعی فیزیولوژیک گاه بسیار قوی بوده و منجر به برتری ایمنی حشره نسبت به عامل بیگانه شده است. به‌طوری که با انهدام عامل مهاجم (اسپور قارچ، باکتری و یا نماتد بیماری‌زا) توسط هموسیت‌های حشره، اعمال عامل بیمارگر به‌منظور کنترل حشره یا به‌عبارتی کنترل میکروبیولوژیک ناموفق بوده است و در نتیجه هدف اصلی که کاهش خسارت آفت به‌دنبال استفاده از بیمارگر است محقق نخواهد شد. در همین راستا، Borges et al. (2008)، اظهار کردند که واکنش دفاع سلولی سن خون‌خوار *Rhodnius prolixus* در مقابل باکتری *Escherichia coli* با افزایش تعداد سلول‌های خونی و تغییرات مرفولوژیکی شدید این سلول‌ها همراه بود که در نهایت منجر به غالب شدن سیستم ایمنی حشره بر این باکتری گردید. همچنین زمانی که سوسک‌های (Olivier) *Diclodispa armigera* با قارچ *B. bassiana* آلوده شدند، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها اسپورهای قارچ را با فرایند بیگانه‌خواری بلعیدند و با افزایش زمان تلقیح قارچ، زایده‌های سیتوپلاسمی حاصل از سلول‌های ایمنوسیت اطراف عامل بیگانه افزایش یافت به‌طوری که حشره توانست تمام اسپورها را بلوکه کرده و به‌همراه سیستم فنل اکسیداز آن‌ها را ملانیزه و دفع کند (Moushumi et al., 2008).

حشرات دارای سیستم دفاعی مختلف می‌باشند و حتی سیستم دفاعی یک حشره در مراحل مختلف زیستی آن متفاوت است. این تفاوت‌ها ناشی از اختلاف در تعداد و تنوع سلول‌های خونی و قابلیت آن‌ها در قدرت بیگانه‌خواری و تشکیل گره و همچنین گوناگونی انواع و غلظت پروتئین‌های ضد میکروبی همولنف در حشرات است که منجر به حساسیت و یا مقاومت حشره در برابر عامل بیماری‌زا می‌شود. به‌نظر می‌رسد بررسی برهمکنش بین ایمنی حشرات و عوامل بیگانه وارد شده به همولنف می‌تواند انگیزه‌ای جدید در بهره‌گیری بهتر عوامل میکروبی در

با بافر فیزیولوژیک رقیق شد. شمارش سلول‌های خونی با استفاده از لام نئوبار و بزرگ‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری (Olympus (BH2 انجام شد. شمارش کل با محاسبه‌ی میانگین تعداد سلول‌ها در ۵ خانه از لام نئوبار × ضریب رقت $\times 10^4$ میلی لیتر انجام شد. ماده‌ی ضد انعقاد به کار رفته در آزمایش محلول Tyson (NaCl, Na₂SO₄), Glycin, Methyl violet و Distilled water) بود. برای هر یک از زمان‌های مورد آزمایش ۵ تکرار در نظر گرفته شد. شمارش پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نیز مانند محاسبه‌ی تعداد کل سلول‌ها انجام شد.

بررسی تأثیر اسپورهای قارچی بر تشکیل گره

بعد از تزریق، در فواصل زمانی ۱، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت میزان ۵ میکرولیتر همولنف حشرات جمع‌آوری شده و پس از رقیق شدن با محلول تایسون روی لام نئوبار قرار داده شد. حاصل ضرب میانگین تعداد گره‌های تشکیل شده در ۵ خانه از لام گلبول شمار با ضریب رقت $\times 10^4$ میلی لیتر ملاک شمارش گره‌ها بود.

تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

برای تعیین اثر اسپورهای قارچ روی سیستم فنل اکسیداز لاروهای مورد آزمایش از روش هموسیت‌لازیت استفاده شد (Leonard et al., 1985). در این روش برای هر تیمار و در هر زمان (۱، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت)، همولنف لارو جمع‌آوری شده و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع روشن‌شده حذف شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH=7) به رسوبات اضافه شد و سپس هموژنیزه شدند. محلول اخیر دوباره با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رو نشین حاصل در برآوردهای آنزیمی استفاده شد. بدین منظور، ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌ها به ۵۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی‌مولار L-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) و ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات اضافه شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شده و سپس توسط دستگاه Elisa reader در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. این آزمایش در ۵ تکرار انجام شد.

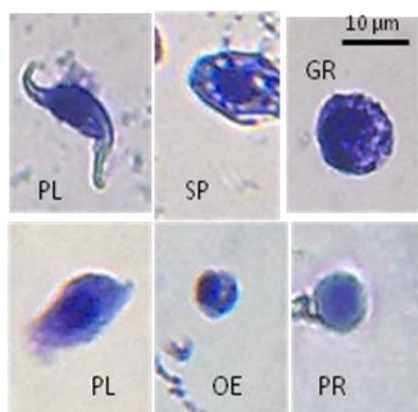
شناسایی سلول‌های خونی و رنگ آمیزی آن‌ها

به منظور شناسایی سلول‌های خونی، همولنف ۱۰ لارو سن چهارم (۱۰ تکرار) جمع‌آوری شد. ابتدا یک پای کاذب آن را بریده و مقدار ۲۰ میکرولیتر از همولنف را روی یک لام گذاشته و با لام دیگر یک اسمیر تهیه شد (Gupta, 1985). پس از خشک شدن، مقداری ماده رنگ‌آمیزی گیمسا (محلول گیمسا و آب مقطر به نسبت ۹:۱) روی اسمیر گذاشته، پس از گذشت ۲۰ دقیقه، لام در آب مقطر قرار گرفت تا محلول رنگی شسته شود. سپس لام به مدت ۱۰ ثانیه در کربنات لیتیم اشباع شده قرار داده شد. (این کار به منظور تثبیت رنگ روی سلول‌ها انجام شد). سپس لام در آب مقطر شستشو داده شد و در آن ۵۰ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت تا خشک شود. با استفاده از دو قطره کانادا بالزام (رقیق شده با گزیلول) در محل سلول‌ها روی لام و قرار دادن لامل روی لام، اسلاید دائمی تهیه شد. شناسایی سلول‌های خونی با توجه به منابع موجود انجام شد (Gupta, 1985; Jones, 1967).

تزریق اسپورهای دو جدایه قارچ *B. bassiana* و یک جدایه *I. farinosae* به لاروهای سن چهارم

به منظور جلوگیری از تحرک لاروها، آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه روی قطعاتی از یخ قرار داده شدند. سطح شکمی بدن لاروها با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شد و سپس با استفاده از سرنگ هم‌میلتون ۲ میکرولیتر از غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر، به سطح شکمی لاروها در محدوده‌ی پاهای دروغین دوم و سوم تزریق شد. سپس محل زخم با پارافلم پوشانده شد. برای لاروهای تیمار شاهد آب مقطر تزریق شد. پس از تزریق، لاروها به ظروف پرورش حاوی برگ‌های پینک منتقل شدند.

بررسی تأثیر اسپورهای قارچ *B. bassiana* و *I. farinosae* روی تعداد کل سلول‌های خونی و ایمنوسیت‌ها بعد از تزریق اسپور به لاروهای سن ۴، تعداد کل سلول‌های خونی در فواصل زمانی ۱، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت توسط لام نئوبار شمارش شده و با شاهد (لاروهای تزریق شده با آب مقطر) مقایسه شدند. به این ترتیب از هر لارو مقدار ۵ میکرولیتر همولنف جمع‌آوری شد و به نسبت ۱:۲۵



شکل ۱- انواع سلول‌های خونی لارو *U. pulchella* رنگ آمیزی شده با گیمسا برای مشاهده با میکروسکوپ نوری. PR= پروهموسیت، PL= پلاسموتوسیت، GR= گرانولوسیت، OE= اونوسیتوئید، SP= اسفرولوسیت.

Fig. 1- Hmocyte types from *U. pulchella* larvae by Giemsa for light microscopic observations. PR=Prohemocyte, PL=Plasmotocyte, GR=Granulocyte, OE=Oenocytoid, SP=Spherulocyte.

جدول ۱- اندازه گیری‌های مرفومتریک سلول‌های خونی مراحل زیستی *U. pulchella* (تعداد نمونه لارو مورد بررسی ۲۰ عدد).

Table 1- Morphometric measurements of hemocytes of *U. pulchella*. (n=20)

Hemocyte type	Size (μm)	
	Length (Mean±SE)	Width (Mean±SE)
Prohemocyte	4.2 ± 0.4	3.2 ± 1.4
Plasmotocyte	16.2 ± 4.6	5.3 ± 0.8
Granulocyte	8.5 ± 2.4	5.2 ± 0.7
Oenocytoid	4 ± 0.4	3.5 ± 0.1
Spherulocyte	7.7 ± 2.0	5.5 ± 1.0

بررسی تأثیر قارچ‌های *B. bassiana* و *I. farinosae* بر تعداد کل سلول‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها

تعداد کل سلول‌های خونی در لاروهای تیمار شده با اسپورهای قارچ همه‌ی جدایه‌ها از نظر آماری اختلاف معنی داری با شاهد نشان داد. تمام تیمارها ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق سبب افزایش تعداد کل سلول‌ها شدند که در بین آن‌ها اثر جدایه‌ی *Fashand* پس از ۳ ساعت بارزتر بود (F= 52, df_t = 3, df_e = 16, P≤0.0001). به عبارتی این جدایه ۳ ساعت پس از تزریق سبب افزایش معنی دار تعداد کل سلول‌ها به میزان $10^4 \times (344 \pm 8)$ عدد در میلی لیتر خون شد.

آنالیز آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار (شاهد و سه جدایه قارچ) و ۵ تکرار و برای هر زمان (۱، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت) به طور جداگانه انجام شد. تجزیه‌ی داده‌ها با استفاده از برنامه‌ی نرم‌افزاری SAS و مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج

بررسی مرفولوژی سلول‌های خونی

در همولنف لارو سن چهارم پروانه *U. pulchella* پنج نوع هموسیت با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus (BH2) مشاهده شد که شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها و اونوسیتوئیدها هستند. پروهموسیت‌ها به عنوان سلول‌های ساقه‌ای، سلول‌هایی کوچک و اغلب مدور با هسته‌ی مرکزی مشاهده شدند. پراکنندگی این سلول‌ها در همولنف لاروهای مورد بررسی، ۵-۱۰ درصد بود. پلاسموتوسیت‌ها پروفایل چندشکلی داشته و به اشکال کشیده و سیلندری شکل، دارای یک یا دو زائده سیتوپلاسمی تا حدودی کشیده هستند. سیتوپلاسم این سلول‌ها گاه دارای گرانول‌های بسیار کوچک و اندک می‌باشد. گرانولوسیت‌ها بیشترین فراوانی را در خون دارند. دارای اندازه‌های متغیری بوده و اغلب کروی یا تخم مرغی شکل با هسته درشت مشاهده شدند. گرانول‌های فراوان سطح سیتوپلاسم گرانولوسیت‌ها را اشغال می‌کنند. پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در مجموع حدود ۷۲-۷۰ درصد از فراوانی هموسیت‌ها را به خود اختصاص می‌دهند. اونوسیتوئیدها سلول‌هایی کوچکی و تخم مرغی شکل با هسته جانبی مشاهده شدند که هسته‌ی مدور آن‌ها به طور کامل به کناره‌ی غشای سلول کشیده شده است. پراکنندگی اونوسیتوئیدها در خون ۱۵-۱۲ درصد تعیین شد. اسفرولوسیت‌ها به طور معمول سلول‌هایی گرد یا کشیده و بزرگ‌تر از گرانولوسیت‌ها هستند، هسته آن‌ها مرکزی یا جانبی و اسفرول‌های زیادی در سیتوپلاسم خود دارند و کمترین درصد سلول‌های خونی یعنی ۱-۳ درصد را داشتند (شکل ۱) (جدول ۱).

تعداد گره‌ها در مقابله با اسپوره‌های جدایه Fashand به تعداد $10^4 \times (31/8 \pm 1/5)$ عدد در میلی‌لیتر خون و ۶ ساعت پس از تزریق تشکیل شد ($F=19.2, df_t=3, df_e=16, P \leq 0.0001$). تعداد گره‌های حاصل از برخورد گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها با اسپوره‌های جدایه‌های 566 و 1872c در رده‌ی بعد از جدایه Fashand و در زمان ۶ ساعت پس از تزریق ایجاد شد که اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت. با گذشت زمان تا ۱۲ ساعت به تدریج از تعداد گره‌ها کاسته شد که این موضوع نشانگر واکنش ایمنی بالاتر سلول‌های خونی در ساعات اولیه ورود عامل بیگانه قارچی می‌باشد (جدول ۵).

تعیین فعالیت آنزیم فنل اکسیداز

در فواصل زمانی پس ورود اسپوره‌های قارچی به بدن لاروهای *U. pulchella*، سیستم فنل اکسیداز فعال می‌شود. هم‌چنان‌که همراه با افزایش تعداد سلول‌های خونی میزان فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد. جدایه‌ی Fashand بیشترین فعالیت فنل اکسیداز را به میزان $(0/21 \pm 0/02)$ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین ۳ ساعت پس از تزریق در همولنف لاروهای تیمار شده به دنبال داشت. افزایش فعالیت فنل اکسیداز در ۶ ساعت پس از تزریق نیز نسبت به شاهد معنی‌دار بود. جدایه‌های 566 و 1872c نیز در همین فواصل زمانی فعالیت فنل اکسیداز را در همولنف لارو حشره افزایش داده و در مرتبه‌ی بعد از جدایه‌ی Fashand قرار گرفتند (جدول ۶).

جدایه‌ی Fashand در فاصله‌ی ۳ ساعت پس از تزریق بالاترین تعداد پلاسموتوسیت‌ها به مقدار $10^4 \times (167/4 \pm 5)$ عدد در میلی‌لیتر همولنف ($F=97, df_t=3, df_e=16, P \leq 0.0001$) و نیز بیشترین تعداد گرانولوسیت‌ها به مقدار $10^4 \times (141/4 \pm 4/7)$ عدد در میلی‌لیتر خون را در مقایسه با سایر تیمارها سبب شد ($F=75.2, df_t=3, df_e=16, P \leq 0.0001$) (جدول ۲، ۳ و ۴). نتایج نشان داد که در زمان ۶ ساعت پس از تزریق تأثیر تیمارهای قارچی بر تعداد کل، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها بالا بود ولی نسبت به زمان قبلی (یعنی ۳ ساعت پس از تزریق) از تعداد سلول‌ها کاسته شده بود. اثر جدایه‌های 566 و 1872c نسبت به جدایه‌ی Fashand بر تعداد سلول‌ها کمتر مشاهده شد. هرچند که این دو جدایه نیز در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق سبب افزایش تعداد کل، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نسبت به شاهد شدند و به لحاظ آماری هر دو در یک گروه آماری قرار گرفتند. با گذشت زمان به تدریج اثر تیمارها کاسته شد به طوری که پس از گذشت ۱۲ ساعت از زمان تزریق، تعداد کل سلول‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها کاهش یافت (جدول ۲، ۳ و ۴).

بررسی تأثیر اسپوره‌های قارچی بر گره‌زایی

پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در تقابل با اسپوره‌های قارچی با تشکیل یک یا چند لایه اطراف اسپورها سبب ایجاد گره شدند. اولین گره‌ها در زمان ۳ ساعت بعد از تزریق اسپوره‌های هر سه جدایه مشاهده شد ولی بالاترین

جدول ۲- تأثیر دو جدایه‌ی Fashand و 566 از قارچ *B. bassiana* و جدایه‌ی 1872c از قارچ *I. farinosae* بر تعداد کل سلول‌های خونی *U. pulchella*.

Table 2- The effect of Fashand and 566 isolates of *B. bassiana*, and 1872c isolate of *I. farinosae* on the total number of hemocyte ($\times 10^4/\text{mL}$) of *U. pulchella*.

Treatments	Post Injection (hours)			
	1h	3h	6h	12h
Control	211±8.4 a	214.4±8.4 c	230.8±7 b	222±8.2 a
Fashand	215±8.8 a	344±8 a	299.2±6.5 a	211±5.5 ab
566	211.4±10 a	256.6±7.4 b	242±3.3 b	185.4±2.3 b
1872c	208±7 a	270.4±5.2 b	255.2±4.4 b	204.4±5 ab

حروف مختلف در هر ستون، تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارها را با استفاده از آزمون توکی نشان می‌دهد.

Different letters in each column show significantly difference among treatment using Tukey's range test ($P \leq 0.05$).

جدول ۳- تأثیر دو جدایه‌ی Fashand و 566 از قارچ *B. bassiana* و یک جدایه‌ی 1872c از قارچ *I. farinosae* بر تعداد پلاسموتوسیت‌های *U. pulchella*.

Table 3- The effect of Fashand and 566 isolates of *B. bassiana*, and 1872c isolate of *I. farinosae* on the number of plasmotocyte ($\times 10^4/\text{mL}$) of *U. pulchella*.

Treatments	Post Injection (hours)			
	1h	3h	6h	12h
Control	75.6±2.1 a	76.4±3 c	72.6±2.5 c	73.4±2.2 b
Fashand	82.2±1.7 a	167.4±5 a	136.4±2.6 a	95.8±3 a
566	78±2.4 a	117.2±2 b	105.6±2.7 b	76.8±2 b
1872c	77.4±2.2 a	125±4.5 b	112.6±2.4 b	97±4.4 a

حروف مختلف در هر ستون، تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارها را با استفاده از آزمون توکی نشان می‌دهد.

Different letters in each column show significantly difference among treatment using Tukey's range test ($P \leq 0.05$).

جدول ۴- تأثیر دو جدایه‌ی Fashand و 566 از قارچ *B. bassiana* و یک جدایه‌ی 1872c از قارچ *I. farinosae* بر تعداد گرانولوسیت‌های *U. pulchella*.

Table 4- The effect of Fashand and 566 isolates of *B. bassiana*, and 1872c isolate of *I. farinosae* on the number of granulocyte ($\times 10^4/\text{mL}$) of *U. pulchella*.

Treatments	Post Injection (hours)			
	1h	3h	6h	12h
Control	67.8±3.4 a	72.8±2.6 c	70.2±3.5 b	72.4±2.5 a
Fashand	67±2 a	141.4±4.7 a	106.4±4 a	73.4±2.6 a
566	66.2±2.5 a	97.8±3.4 b	87±2 b	62.2±2 ab
1872c	70.4±3 a	90.4±1.8 b	74±3.1 b	58.4±2.6 b

حروف مختلف در هر ستون، تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارها را با استفاده از آزمون توکی نشان می‌دهد.

Different letters in each column show significantly difference among treatment using Tukey's range test ($P \leq 0.05$).

جدول ۵- تأثیر دو جدایه‌ی Fashand و 566 از قارچ *B. bassiana* و یک جدایه‌ی 1872c از قارچ *I. farinosae* بر گره‌زایی در *U. pulchella*.

Table 5- The effect of Fashand and 566 isolates of *B. bassiana*, and 1872c isolate of *I. farinosae* on the nodul formation ($\times 10^4/\text{mL}$) of *U. pulchella*.

Treatments	Post Injection (hours)			
	1h	3h	6h	12h
Control	0.2±0.2 a	1 b	1.6±0.6 c	1 a
Fashand	0.7±0.4 a	14±2.2 a	31.8±4.6 a	7.2±2.4 a
566	0.4±0.2 a	10.8±2.2 b	17.4±1.5 b	0.8±0.3 b
1872c	0.2±0.6 a	11.8±0.3 a	20±2.7 b	3±1 b

حروف مختلف در هر ستون، تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارها را با استفاده از آزمون توکی نشان می‌دهد.

Different letters in each column show significantly difference among treatment using Tukey's range test ($P \leq 0.05$).

جدول ۶- تأثیر دو جدایه‌ی *Fashand* و 566 از قارچ *B. bassiana* و یک جدایه‌ی 1872c از قارچ *I. farinosae* بر فعالیت فنل اکسیداز (میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) در *U. pulchella*.

Table 6- The effect of *Fashand* and 566 isolates of *B. bassiana*, and 1872c isolate of *I. farinosae* on the phenoloxidase activity ($\times 10^4$ /mL) ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) of *U. pulchella*.

Treatments	Post Injection (hours)			
	1h	3h	6h	12h
Control	0.082±0.005 a	0.08±0.004 c	0.1±0.007 c	0.075±0.004 a
Fashand	0.09±0.009 a	0.22±0.006 a	0.16±0.002 a	0.008±0.004 a
566	0.074±0.002 a	0.16±0.003 b	0.14 a	0.073±0.001 a
1872c	0.08±0.005 a	0.17±0.004 b	0.12±0.008 b	0.09 a

حروف مختلف در هر ستون، تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارها را با استفاده از آزمون توکی نشان می‌دهد.

Different letters in each column show significantly difference among treatment using Tukey's range test ($P \leq 0.05$).

بحث

متابولیت‌ها متفاوت بوده و منجر به رفتارهای ایمنی مختلفی توسط حشره می‌شود چنان‌که رفتار ایمنی سلولی *L. Galleria mellonella* در برابر قارچ‌های بیماری‌زای *B. bassiana* و *Metarhizium anisopliae* (Metsch) متفاوت گزارش شده است (Viliciskas et al., 1997). از طرفی وضعیت ایمنی هر لارو به دلیل مقدار هماتوپویزی و تولید سلول‌های خونی و بسته به جنسیت متفاوت است (Barreda & Belosevic, 2001).

در فرایند تشکیل گره اغلب پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها و گاه اسفرولوسیت‌ها مشارکت می‌کنند (Lavin & Strand, 2002). در تحقیق حاضر با گذشت ۳ ساعت از زمان تزریق اسپورها، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به شکل یک یا دو و یا چند لایه اطراف عامل بیگانه قرار گرفته و پس از ملانیزه کردن آن را منهدم کردند. فعالیت ایمنی به شکل گره‌زایی در لاروهای سن چهارم با گذشت ۶ ساعت از زمان تزریق به شدت افزایش یافت و این به دلیل افزایش معنی دار ایمنوسیت‌ها در زمان یاد شده بود.

یافته‌های دیگر محققین نیز بیانگر فعالیت ایمنی حشرات در زمان‌های اولیه ورود اسپور قارچ یا باکتری به همولنف حشره می‌باشد. دفاع سلولی مگس‌های سرکه پرازیته شده با کپسوله کردن عامل پرازیت و توسط لاملوسیت‌ها انجام می‌شود. لاملوسیت‌ها به پرازیت حمله‌ور شده و یک کپسول اطراف آن تشکیل می‌دهند. مولکول‌های سمی ایجاد شده در طول ملانیزاسیون منجر به کشته شدن پرازیت می‌شوند (Meister et al., 1994). زیبایی و همکاران، دفاع سلولی سن گندم در برابر

پاسخ ایمنی شناسی لاروهای سن چهارم پروانه‌ی *U. pulchella* در برابر جدایه‌های قارچی در این تحقیق با افزایش معنی دار پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها، فرایند گره‌زایی و افزایش فعالیت سیستم فنل اکسیداز همراه بود. این واکنش‌های دفاعی اغلب در ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق اسپورها صورت گرفت. در واقع، بیشترین فعالیت ایمنی سلولی حشرات در ساعات اولیه ورود عامل بیگانه به بدن اتفاق می‌افتد و به تدریج با گذشت زمان پاسخ سلولی کاهش می‌یابد (Standly & Miller, 2006). پروهموسیت‌ها به عنوان سلول‌های پایه خون در زمان دفاع سلولی تقسیم میتوزی انجام داده و به سلول‌های شرکت کننده در بیگانه‌خواری و تشکیل گره (پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها) تبدیل می‌شوند. بنابراین افزایش قابل توجه ایمنوسیت‌ها در ساعات اولیه ورود اسپورها به همولنف تا حدود زیادی به این پدیده مرتبط است (Arnold & Hinks, 1976). جدایه‌ی *Fashand* بالاترین تغییر در تعداد کل سلول‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها را ۳ ساعت پس از ورود اسپورها به همولنف لارو ایجاد کرد. در همین زمان فعالیت گره‌زایی و فنل اکسیداز نیز حداکثر بود. به عبارتی نتایج حاصل، موید یک ارتباط مستقیم بین تعداد سلول‌های خونی و فعالیت‌های ایمنی *U. pulchella* در مقابل جدایه‌های *B. bassiana* و *I. farinosae* می‌باشد. تأثیر جدایه‌های 566 و 1872c نسبت به شاهد معنی دار ولی کمتر از جدایه‌ی *Fashand* بود. به نظر می‌رسد که خواص فیزیولوژیکی هر جدایه به لحاظ نوع ترکیبات شیمیایی و

واکنش ایمنی، غشای سلولی اونوسیتوئیدهای *U. pulchella* دچار تخریب می‌شد که خود می‌تواند استدلالی مبتنی بر آزادسازی فنل اکسیداز باشد. هر چند که این تغییرات سلولی و متلاشی شدن اونوسیتوئیدها در طول آزمایش به‌لحاظ آماری مورد بررسی قرار نگرفت.

به‌طور کلی، نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده‌ی نوعی غلبه‌ی سیستم ایمنی لاروهای *U. pulchella* بر جدایه‌های قارچی *B. bassiana* و *I. farinosae* می‌باشد. به‌طوری‌که لاروهای تزریق شده با غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر توانستند در برابر عامل بیگانه زنده مانده و به‌فعالیت‌های زیستی خود مانند تغذیه و تولید مثل ادامه دهند. گره‌زایی ایمنوسیت‌ها منجر به متلاشی شدن اسپورها شد. فنل اکسیداز نیز با ملانیزه کردن اسپورها سبب خروج آن‌ها از همولنف گردید. در واقع در تقابل بین ایمنی حشره-قارچ بیمارگر، غلظت به کار رفته از سوسپانسیون قارچ نتوانست به‌عنوان یک گزینه‌ی مناسب جهت کنترل، عمل کند. اما سوال این است که واکنش ایمنی حشره در برابر غلظت‌های بالاتر قارچ چگونه است؟ و آیا لاروهای سنین پایین‌تر توان مقاومت در برابر این غلظت‌ها را دارند؟ چنانچه دفاع سلولی *U. pulchella* بتواند بر غلظت‌های بالاتر قارچ نیز فایز آید و تلفاتی در بین لاروهای تیمار شده مشاهده نشود می‌توان چنین استنتاج نمود که جدایه‌های نامبرده در این تحقیق عامل موفق‌ی در برنامه‌های کنترل بیولوژیک حشره مذکور نبوده و قابل توصیه نمی‌باشند و می‌بایست از روش‌های دیگر کنترل و یا عوامل کنترل‌کننده‌ی طبیعی دیگر استفاده کرد. نتایج بعضی محققین هم گاه نشان‌گر غالبیت ایمنی بر عامل بیمارگر و یا بالعکس می‌باشد. چنان‌که *Sewify et al.* (1993) گزارش کرده بودند ۴۸ ساعت پس از تزریق اسپورهای *M. anisopliae* به کرم خراط *Zeuzera pyrina* (L.)، افزایش معنی‌دار در تعداد کل سلول‌های خونی حشره مشاهده می‌شود که با بلوکه شدن اسپورها و انهدام آن‌ها همراه است. این در حالی است که به‌گزارش *Dunphy et al.* (1992) سلول‌های خونی پروانه ابریشم باف ناجور *Lymantria dispar* (L.) در برابر باکتری‌های *Xenorhabdus luminescens* و *X. nematophilus* به‌ترتیب

جدایه‌های *B. bassiana* را ۳ ساعت پس از ورود عامل بیگانه گزارش کردند (*Zibae et al.*, 2011). افزایش معنی‌دار پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در تقابل با *B. bassiana* و گره‌زایی در پروانه‌ی برگ‌خوار سفید آمریکایی و پروانه‌ی برگ‌خوار توت ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق اسپورها به لارو مشاهده شد (*Ajamhassani et al.*, 2013; *Khosravi et al.*, 2014). پاسخ سلولی پروانه‌ی *Spodoptera litura* (Fabricus) در مقابل ذرات سنتزی لاتکس بید نیز ۶ ساعت پس از ورود عامل بیگانه معنی‌دار گزارش شد (*Ajamhassani*, 2014).

تزریق اسپورهای ۳ جدایه قارچی به لاروهای *U. pulchella* در تحقیق حاضر، سبب افزایش فعالیت فنل اکسیداز شد. فنل اکسیدازها در همولنف حشرات به‌شکل یک زایموژن غیرفعال به نام پروفنل اکسیداز می‌باشد و تحت تأثیر زخمی شدن بخشی از بدن یا ورود آلودگی (یک پاتوژن مانند قارچ یا باکتری) فعال می‌شود. یکی از محصولات واکنش‌های فنل اکسیداز، رنگ‌دانه‌ی ملانین می‌باشد. ملانین در سطح پارازیت‌های کپسوله شده، گره‌های سلول‌های خونی و محل‌های زخم و خراش رسوب می‌کند و خود به کشته شدن بیمارگرها و انگل‌ها کمک می‌کند. ملانین‌اسیون پارازیت‌های کپسوله شده یک پاسخ دفاعی مهم در حشراتی مانند ناقلین بیماری‌های انسان است (*Michel et al.*, 2005). از طرف دیگر، کپسول‌های ملانیزه جذب غذا را بلوکه کرده و بنابراین منجر به کشته شدن حشره در نتیجه گرسنگی می‌شوند (*Nappi & Christensen*, 2005). در حشرات، سلول‌های خونی یکی از منابع مهم پروفنل اکسیداز محسوب می‌شوند و در راسته‌ی بال‌پولکی‌ها، اونوسیتوئیدها مهمترین تولیدکننده‌ی آن شناخته شده‌اند (*Jiang et al.*, 1997). به‌گزارش (*Hernandez et al.*, 1999)، گرانولوسیت‌ها هنگام ورود عامل مهاجم با تغییرات غشای سلولی می‌توانند فنل اکسیداز را در حضور سوبسترای L-DOPA آزاد نمایند. در تحقیق حاضر هم‌زمان با افزایش سلول‌های خونی مانند گرانولوسیت‌ها فعالیت فنل اکسیداز نیز افزایش معنی‌داری نشان داد که این نتایج با گزارش هرناوندز منطبق می‌باشد. به‌علاوه، طی مشاهدات در زمان‌های

می‌رسد مطالعه اثرات متقابل ایمنی حشره هدف- قارچ بیمارگر، می‌تواند جنبه‌های اقتصادی جدیدتری از کنترل بیولوژیک را ارائه دهد تا ضمن ارزیابی کارآمد بودن عامل کنترل علیه حشره آفت، استفاده از روش‌های بیولوژیک مقرون به صرفه نیز باشد.

۱/۵ و ۵ ساعت پس از تزریق حفره‌دار می‌شوند و با گذشت زمان، لیپو پلی ساکاریدهای دیواره‌ی سلولی باکتری بر ساختار سلول‌های خونی و اجسام چربی تأثیر گذاشته و موجب متلاشی شدن آن‌ها می‌شود
با توجه به صرف هزینه‌های لازم جهت تولید، کشت و پرورش و حتی فرمولاسیون قارچ‌های بیمارگر، به نظر

Reference

- Abood, F., Bajwa, G.A. Ibrahim, Y.B. & Sajap, A.S. 2010.** Pathogenicity of *Beauveria bassiana* against the Tiger moth, *Atteva sciodoxa* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Journal of Entomology, 7(1): 19-32.
- Ajamhassani, M., Zibae, A., Sendi, J.J., Askary, H. & Farar, N. 2012.** Proteolytic activity in the midgut of the Crimson Speckled Moth *Utethesia pulchella* (Lepidoptera: Arctiidae). Journal of Plant Protection Research, 52(3): 364-369.
- Ajamhassani, M., Sendi, J., Zibae, A., Askary, H. & Farsi, M. 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(2): 110-118.
- Ajamhassani, M. 2014.** Cellular immune reactions of *Spodoptera litura* (Fabricus) (Lepidoptera.: Noctuidae) against entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. Plant Pests Research, 4 (2): 59-68.
- Arnold, J W., Hinks, C F. 1976.** Haemopoiesis in Lepidoptera. The multiplication of circulating haemocytes. Journal of Zoology, 54:1003-1012.
- Barreda, D.R. & Belosevic, M. 2001.** Transcriptional regulator of hemopoiesis. Immunology. 25: 763-789.
- Borges, A.R., Santos, P.N. Furtado, A.F. & Figueiredo, R.C. 2008.** Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). Micron, 39: 486-49.
- Dunphy, G., & Bouchier, R. 1992.** Responses of Nonimmune Larvae of the Gypsy Moth, *Lymantria dispar*, to Bacteria and the Influence of Tannic Acid. Journal of Invertebrate Pathology, 60: 26-32.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R. & Trenczek, T. 1997.** Biological mediators of insect immunity. Annual Review of Entomology, 42: 711-643.
- Gupta, A.P. 1985.** Cellular elements in the haemolymph, pp. 85-127. In: Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Cambridge University Press.
- Hernandez, S., Lanz, H., Rodriguez, M.H., Torres, J.A., Martinez, P.A. & Tsutsumi, V. 1999.** Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. Journal of Medical Entomology, 36: 426-434.
- Jiang, H., Wang, Y., Ma, C. & Kanost, M.R. 1997.** Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: Molecular cloning of subunit ProPO-P1. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 27: 835-850.
- Jones, J C. 1967.** Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* L. Biological Bulletin, 132: 211-221.
- Jones, J.C. & Liu, D.P. 1969.** The effects of ligaturing *Galleria mellonella* larvae on total haemocyte counts and on mitotic indices among haemocytes. Journal of Insect Physiology, 15:1703-1708.

- Khosravi, R. Sendi, J.J. Zibae, A. & Shokrgozar, M.A. 2014.** Immune reactions of the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill and two developmental hormones. *Invertebrate Survival Journal*, 11: 11-21.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1295-1309.
- Leonard, C., Soderhall, K.N. & Ratcliffe, A. 1985.** Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Balbifer cranifer* haemocytes. *Insect Biochemistry*, 15: 803-810.
- Martin, D. J. 1993.** Pollination ecology of an important dryland browse Acacia (*Acacia tortilis*) in Pastoralist landscapes in Kenya. *Horticulture Science*, 63: 132-137.
- Meister, M., Braun, A., Kapper, C., Reichhart, J. M. & Hoffman, J. A. 1994.** Insect immunity. A transgenic analysis in *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *EMBO Journal*, 5958-5966.
- Michel, K., Budd, A. Pinto, S. Gibson, T. & Kafatos, F. 2005.** *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO reports*, 6: 891-897.
- Moushumi, P.H.,L., Hazarika, K., Barooah, M., Puzari, K.C. & Kalita, S. 2008.** Interaction of *Diclidispa armigera* (Coleoptera: Chrysomelidae) haemocytes with *Beauveria bassiana*. *International Journal of Tropical Insect Science*, 28(2): 88-97.
- Nappi, A.J., & Christensen, B.M. 2005.** Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 443-459.
- Nayar, K.K., Ananthkrishnan, T.N. & David, B.V. 1998.** *General and Applied Entomology*. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi.
- Sewify, G.H. & Sharaf, A.A.A. 1993.** Susceptibility of the larvae of leopard moth *Zeuzera pyrina* L. to infection with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). *Bulletin of the Entomological Society of Egypt*, 71: 185-193.
- Stanley, D. & Miller, J.S. 2006.** Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119: 1-13.
- Vilcinskis, A., Matha, V. 1997.** Effects of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, 43: 1149-1159.
- Washburn, J.O., Haas-Stapleton, E.J. Tan, F.F. Beckage, N.E. & Volkman, L.E. 2000.** Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Insect Physiology*, 46: 179-190.
- Zibae, A., Bandani, A. Talaei, R. & Malagoli, D. 2011.** Cellular immune reactions of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. *Journal of Insect Science*, 11: 138: 1-16.

**Study on cellular defense of larvae of *Utethesia pulchella* (Lepidoptera: Arctiidae)
against *Beauveria bassiana* and *Isaria farinosae***

Maryam Ajamhassani

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Shahrood.

Corresponding Author: shahroodm@gmail.com

Received: Oct. 24, 2014

2 (1) 57-67

Accepted: Dec. 09, 2014

Abstract

Cellular immune of insects is one of the important defense methods against foreign agents such as spore of fungi, bacteria, nematodes and egg of parasitoides. Identification of immune system help to better use microbial control methods. Cellular immune of 4th instars of *Utethesia pulchella* L. was investigated against two isolations of *Beauveria bassiana* (Fashand and 566) and one isolated of *Isaria farinosae* (1872c). Activity of hemocytes, nodulation and phenoloxidase activity was measured too. 10⁵ spore/ml concentration of spores was injected to larvae in 1, 3, 6 and 12 h intervals. Control treatment was larvae in which was injected by distilled water. Total of hemocyte, plasmatocyte and granulocyte number was maximum in 3 and 6 h after injection. Plasmatocytes, granulocytes engulfed foreign particles to form nodul. Nodulation was the highest in 3 and 6 h after injection. Phenoloxidase activity was determined in the presence of L-DOPA as a substrate in intervals after injection of fungal spores. There was a direct correlation between phenoloxidase activity and total of hemocyte. Phenoloxidase activity was the highest in 3 and 6 h after injection. Results showed that larvae of *U. pulchella* have immune reaction against spores of 3 isolations and could be remove foreign agent by nodulation.

Keywords: *Beauveria bassiana*, Cellular defense, Hemocyte, *Isaria farinosae*, *Utethesia pulchella*
