

## بررسی ریخت‌شناسی و فراوانی سلول‌های خونی لاروهای سوسک شاخک‌بلند رزاسه *Osphranteria coerulescense* Redt (Coleoptera: Cerambycidae) و کرم خراط *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae) دو آفت چوب‌خوار ایران

مریم عجم‌حسینی<sup>\*۱</sup>

\*۱- نویسنده مسئول، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

پست الکترونیک: shahroodm@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۰۴

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۲۱

### چکیده

سلول‌های خونی فاکتور مهم دفاع حشره در برابر عوامل بیگانه مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها، یا ذرات سموم هستند. مطالعه مرفولوژی سلول‌های خونی و فراوانی آنها به‌عنوان اولین گام در شناخت ویژگی‌های دفاع سلولی حشرات ضروریست. در این تحقیق، انواع سلول‌های خونی و جمعیت آنها در همولف لارو سوسک شاخک‌بلند رزاسه *Osphranteria coerulescense* و کرم خراط *Zeuzera pyrina* بررسی شد. چهار نوع هموسیت شامل پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت و اونوسیتوئید در همولف هر دو آفت شناسایی شدند. اسفرولوسیت‌ها در همولف کرم خراط مشاهده شدند. پدوسیت‌ها (نوعی پلاسموتوسیت) در لاروهای سن دوم و سوم سوسک شاخک‌بلند رزاسه وجود داشتند. پروهموسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های بنیادی، سلول‌هایی کوچک بوده و اغلب مدور با هسته مرکزی مشاهده شدند. پلاسموتوسیت‌ها ظاهر چندشکلی داشته و به‌همراه گرانولوسیت‌ها فراوان‌ترین سلول‌های همولف سوسک شاخک‌بلند رزاسه و کرم خراط بودند. گرانولوسیت‌ها دارای اندازه‌های متغیر و اغلب کروی یا تخم‌مرغی شکل با هسته درشت بودند و بیشترین فراوانی را در لاروهای سنین بالای کرم خراط داشتند. اونوسیتوئیدها نیز به‌صورت سلول‌هایی کوچک تا متوسط و تخم‌مرغی شکل با هسته جانبی مشاهده شدند. اسفرولوسیت‌ها معمولاً سلول‌هایی گرد یا کشیده و بزرگ‌تر از گرانولوسیت‌ها بودند. شمارش کل سلول‌های خونی در مراحل مختلف لاروی هر دو حشره نشان داد که تعداد سلول‌ها با سن لاروی ارتباط مستقیم داشت. تعداد کل سلول‌ها در سن سوم سوسک شاخک‌بلند رزاسه و سن پنجم کرم خراط بیشتر از سایر سنین لاروی بود. با شمارش تفریقی سلول‌ها، فراوانی پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در همه سنین لاروی از سایر سلول‌ها بیشتر بود. این یافته‌ها می‌تواند در راستای ایمنی‌شناسی سوسک شاخک‌بلند رزاسه و کرم خراط آنها مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های خونی، سوسک شاخک‌بلند رزاسه، کرم خراط، مطالعه میکروسکوپی.

### مقدمه

Cossidae از آفات مهم چوب‌خوار می‌باشند. مناطق انتشار سوسک شاخک‌بلند رزاسه در نواحی پارناکتیک آسیا مانند ایران، عراق و پاکستان گزارش شده است (HamidiMotlagh, 2005). این سوسک در استان‌های

سوسک شاخک‌بلند رزاسه (گلسرخیان) *Osphranteria coerulescense* Redt (Coleoptera: Cerambycidae) و کرم خراط *Zeuzera pyrina* Linnaeus (Lepidoptera: Cossidae)

(2002).

براساس ویژگی‌های مرفولوژیک و عملکرد و شیمی بافت، چندین نوع سلول خونی در حشرات شناسایی شده‌اند (Gupta, 1985; Brehelin et al., 1989). هموسیت‌ها در گردش اغلب حشرات به آسانی توسط میکروسکوپ نوری و فلورسنت مشاهده می‌شوند (Ling & Yu, 2006). سلول‌های خونی حشرات که در منابع گزارش شده‌اند شامل پروهموسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های پایه، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولولوسیت‌ها و اونوسیتوبیدها هستند (Gupta, 1991; Strand & Pech, 1995). تحقیقات نشان داده‌اند که ورود بیمارگرهای حشرات مانند اسپور قارچ‌ها و یا نماتدها و تخم‌های پارازیتوبیید به داخل همولنف، بر شکل و تعداد سلول‌های خونی تأثیر دارد. این تغییرات مرفولوژیک سلول‌های خونی و همچنین تغییر تعداد آنها در فواصل مختلف پس از ورود، در راستای دفاع سلولی یعنی بیگانه‌خواری و گره‌زایی انجام می‌شود (Nahla et al., 2010).

سوسک شاخک‌بلند رزاسه و کرم خراط دارای پارازیتوبییدهای متعددی از خانواده‌های Sphecidae، Ichneumonidae و Encyrtidae می‌باشند (Hamidi Motlagh, 2005; Heinrich, 1978; Hilpert, 1992; Noyes, 2013). این زنبورها لاروهای آفت را در دالان‌های سرشاخه‌ها انگلی می‌کنند. یکی از جنبه‌های مهم مورد مطالعه می‌تواند بررسی واکنش‌های ایمنی حشره در برابر پارازیتوبییدها و ارزیابی توانایی حشره در تقابل با آلودگی ناشی از پارازیتیسیم باشد. همچنین با سلول‌شناسی و ایمنی‌شناسی یک حشره بهتر می‌توان از راهبردهای کنترل میکروبیولوژیک علیه آن استفاده نمود (Parmakelis et al., 2008). حشرات دارای سامانه ایمنی قوی، از پیشرفت آلودگی ناشی از قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر جلوگیری کرده و گاه بر آن غلبه می‌کنند. در این صورت هدف کنترل بیولوژیک محقق نشده و در مقابله بین حشره و عامل میکروبی، حشره موفق خواهد بود (Ajamhassani, 2015). با توجه به اینکه دو حشره سوسک شاخک‌بلند رزاسه و

مختلف ایران پراکنده بوده و دارای طیف وسیع میزبانی است. لاروهای این آفت گاه به‌شدت از بافت کامبیوم و سرشاخه‌های جوان درختان میوه (سیب، گلابی، به، بادام، گیلاس، آلبالو، زردآلو، هلو، آلو، گوجه، زالزالک و سنجد) و درختان و درختچه‌های زینتی و جنگلی (نسترن، به‌ژاپنی، گیلاس وحشی، گوجه وحشی، بلوط، نارون، چنار و زبان‌گنجشک) تغذیه می‌کنند و موجب سرخشکیدگی درختان، زردی برگ‌ها و کوچک ماندن جوانه‌ها و میوه‌ها می‌شوند. کرم خراط نیز آفت مهم درختان گردو، سیب، گلابی، به، گیلاس، آلو، انگور و نارون در اروپا و آسیاست (Alford, 2007). بروز خشکسالی‌های متوالی سبب افزایش گسترش خسارت این آفت در سال‌های اخیر شده است، به‌طوری که دامنه خسارت آفت در حال حاضر استان‌های شرقی و مرکزی ایران را به‌شدت دربرگرفته است (Rohani & Samih, 2012).

حشرات برای دفاع در برابر آفت‌کش‌ها و بیمارگرهای مهاجم از راهبردهای مختلفی استفاده می‌کنند. ایمنی با حضور سلول‌های خونی و ترکیبات سنتز شده از آنها یکی از انواع سیستم‌های دفاعی حشرات و در واقع نشان‌دهنده ایمنی ذاتی آنهاست. واکنش‌های ایمنی سلولی و مزاجی شامل بیگانه‌خواری، تشکیل گره و کپسول کردن عوامل بیگانه و فعال شدن سیستم پروفتل اکسیداز (ملانیزاسیون) و تولید پپتیدهای ضد میکروبی شامل همولین، لیزوزیم، سکروپین، گلاورین و غیره است که در بسیاری از گروه‌های بی‌مهرگان مانند نرم‌تنان، خاریوستان، ایزوپودا، دوکفه‌ای‌ها و حشرات دیده می‌شوند (Bao et al., 2007; Cannon et al., 2004; Soderhal et al., 1994). حشرات دارای سیستم‌های دفاعی فیزیولوژیک مختلفی می‌باشند و حتی سیستم دفاعی یک حشره در مراحل مختلف نشو و نمایی آن متفاوت است. این تفاوت‌ها ناشی از اختلاف در تعداد و تنوع سلول‌های خونی، قدرت بیگانه‌خواری آنها و تشکیل گره و همچنین گوناگونی انواع و غلظت پروتئین‌های ضد میکروبی همولنف حشرات هستند که منجر به حساسیت و یا مقاومت حشره در برابر بیمارگرها و یا پارازیتوبییدها می‌شود (Lavin & Strand, 2010).

کرم خراط در پنج سن لاروی انجام شد (باید ذکر شود که لارو سن سوم سوسک شاخک‌بلند، آخرین سن لاروی این حشره است که طول بدن آن حدود  $2 \pm 0.4$  سانتی‌متر و عرض کپسول سر آن  $3 \pm 0.4$  میلی‌متر است). همچنین لارو سن پنجم کرم خراط به طول  $5 \pm 0.7$  سانتی‌متر و عرض کپسول سر آن  $1 \pm 0.5$  میلی‌متر است. به‌منظور شناسایی سلول‌های خونی، یک پای کاذب لارو با یک اسکالپل استریل بریده شد و با استفاده از یک میکروپیت، همولف جمع‌آوری شد. همولف ۱۰ لارو (۱۰ تکرار) از هر سن لاروی به‌طور جداگانه جمع‌آوری شد. برای شمارش تفریقی ۱۰۰ عدد سلول شمارش شدند و انواع آنها با توجه به منابع (Gupta, 1985) موجود شناسایی گردید. طول و عرض سلول‌ها بر حسب میکرومتر برای ۲۰ عدد لارو کامل از هر حشره محاسبه شد. برای شمارش کل سلول‌های خونی، همولف لاروهای حشرات (پس از بریدن یک پای کاذب با اسکالپل) با استفاده از میکروپیت جمع‌آوری و با بافر فیزیولوژیک به نسبت ۱:۲۵ رقیق شد. شمارش سلول‌های خونی با استفاده از لام نتوبار و بزرگ‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ Olympus (BH2) انجام گردید. ماده ضدانعقاد به‌کار رفته در آزمایش، محلول Tyson کلرید سدیم  $2/72$  میلی‌مولار، سولفات سدیم ۹ میلی‌مولار، گلیسرول ۴۳ میلی‌مولار، متیل ویولت  $0/06$  میلی‌مولار و آب مقطر) بود. شمارش کل با محاسبه میانگین تعداد سلول‌های خونی موجود در پنج خانه از لام نتوبار (هریک به ابعاد ۱ میلی‌متر مربع) انجام شد (Jones, 1967).

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش‌های مربوط به شمارش کل، در قالب طرح فاکتوریل انجام شد که فاکتور اول گونه و فاکتور دوم سن لاروی بوده است و برای تعیین درصد سلول‌های خونی هر سن لاروی برای هر گونه به‌طور مجزا، طرح کامل تصادفی با پنج تیمار (هموسیت) استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

کرم خراط به‌عنوان دو آفت مهم اغلب مناطق ایران مطرح هستند، همچنین تاکنون مطالعه‌ای بر ویژگی‌های سلول‌های خونی آنها انجام نشده است. از این‌رو در این تحقیق انواع سلول‌های خونی، ویژگی‌های مرفولوژیک، فراوانی و تغییرات جمعیت آنها در سنین مختلف لاروی این دو گونه با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. نتایج این‌گونه مطالعات می‌تواند در شناخت ایمنی‌شناسی آنها و واکنش به انواع حشره‌کش‌های میکروبی و شیمیایی یا تأثیر تنش‌هایی مانند تغییرات دمایی، نوع تغذیه یا تأثیر آلاینده‌ها مؤثر باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### جمع‌آوری و پرورش حشرات

در اواسط فصل بهار، حشرات کامل سوسک شاخک‌بلند رزاسه از روی ساقه‌های گل‌محمدی و کرم‌های خراط از تنه درختان گردوی حومه شاهرود با استفاده از تله‌های نوری جمع‌آوری و به‌همراه شاخه‌های جوان میزبان به اتاق رشد (دمای  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ، رطوبت نسبی ۷۰-۶۰ درصد در شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنایی به ۱۰ ساعت تاریکی) منتقل شدند. پس از جفت‌گیری و تخم‌گذاری حشرات کامل در ظروف پرورش استوانه‌ای شکل به ابعاد  $20 \times 50$  سانتی‌متر، سرشاخه‌های جوان و جدیدی در ظروف قرار داده شدند تا لاروها بتوانند از آنها تغذیه کنند. با توجه به اینکه لاروها داخل سرشاخه‌ها فعالیت و با حفر دالان از بافت‌های مرکزی تنه تغذیه می‌کنند، از این‌رو در فواصل زمانی معین، سرشاخه‌ها شکسته می‌شدند و مراحل لاروی مختلف مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. بدین ترتیب، خون‌گیری و مطالعات سلول‌شناختی لاروها از خردادماه تا اواخر تابستان، یعنی زمان غیرفعال شدن و دیابوز لاروهای سن آخر ادامه یافت.

شناسایی، اندازه‌گیری و شمارش کل و تفریقی سلول‌های خونی

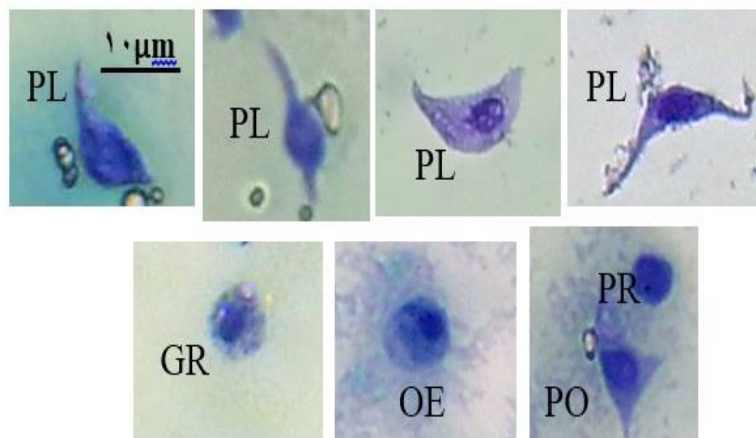
شناسایی سلول‌ها و شمارش کل و تفریقی آنها در سوسک شاخک‌بلند رزاسه در سه سن لاروی و در کرم

## نتایج

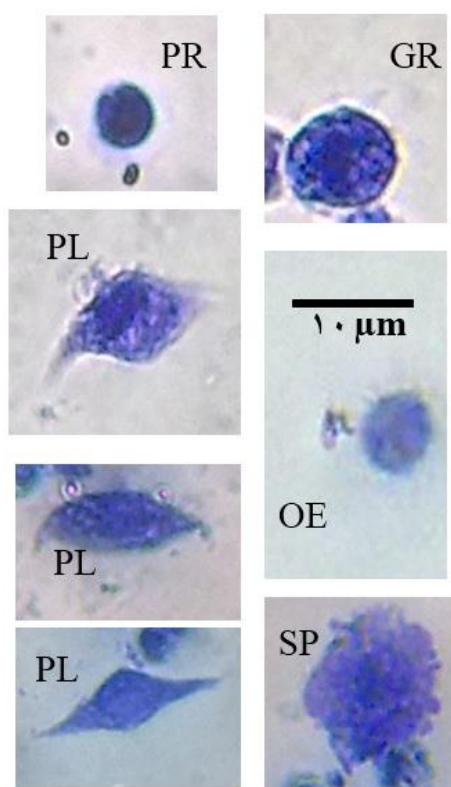
## بررسی مورفولوژیک سلول‌های خونی

در این مطالعه، پنج نوع هموسیت در لاروهای کرم خراط و لاروهای سوسک شاخک بلند رزاسه مشاهده شدند. در همولنف هر دو گونه پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و اونوسیتوییدها حضور داشتند. به علاوه در لاروهای سن دوم و سوم سوسک، پدوسیت‌ها نیز مشاهده شدند و در کرم خراط اسفرولولوسیت نیز مشاهده شد. پروهموسیت‌ها کوچک‌ترین سلول‌ها در لارو هر دو گونه مورد مطالعه بودند. این سلول‌های مدور دارای هسته‌ای گرد، تیره و درشت هستند که بیشترین فضای سلول را اشغال می‌کنند. سیتوپلاسم آبی رنگ نیز به شکل نواری باریک به کناره غشای پلاسمایی کشیده شده است (شکل‌های ۱ و ۲). پلاسموتوسیت‌ها دارای ظاهر چندشکلی بوده و اندازه طولی این سلول‌ها در هر دو حشره مورد مطالعه از سایر سلول‌ها بیشتر بود (شکل ۱ و ۲) (جدول ۲). این سلول‌ها کروی، کشیده و دوکی‌شکل با یک یا دو زائده سیتوپلاسمی مشاهده شدند. هسته درشت و آبی رنگ (بعد از رنگ‌آمیزی با گیمسا) اغلب در مرکز سلول واقع شده بود. سیتوپلاسم صاف و گاه این سلول‌ها در کرم خراط دارای گرانول‌های

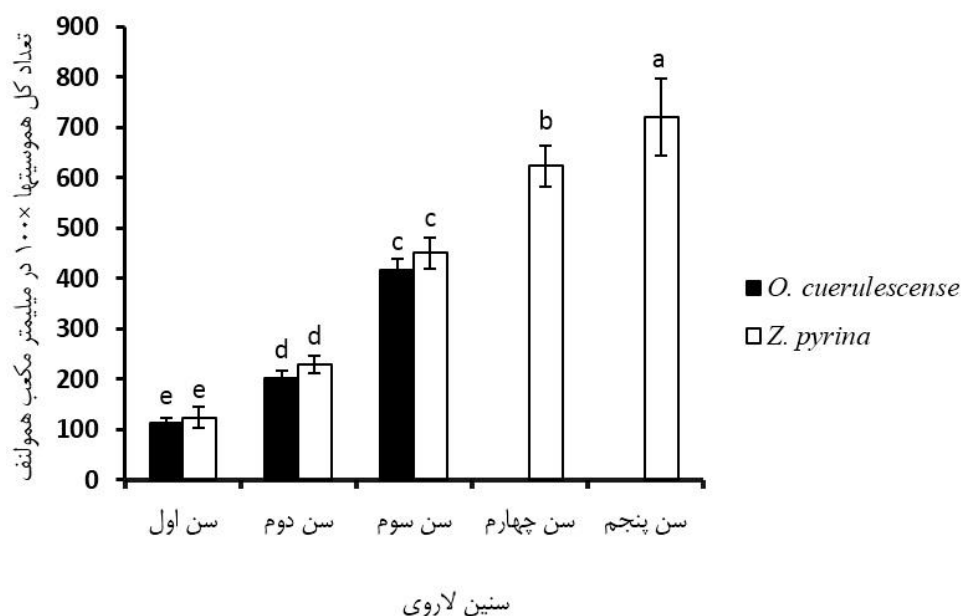
بسیار ریز می‌باشد. این سلول‌ها در همولنف لاروهای سنین مختلف سوسک شاخک بلند رزاسه بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. گرانولوسیت‌ها سلول‌هایی گرد یا بیضوی بودند و در دو حشره مورد مطالعه در اندازه‌های متوسط تا بزرگ دیده شدند. این سلول‌ها از پلاسموتوسیت‌ها کوچک‌تر ولی از پروهموسیت‌ها و اونوسیتوییدها بزرگ‌تر هستند. هسته در موقعیت مرکزی یا جانبی قرار دارد و سطح سیتوپلاسم با گرانول‌های فراوانی اشغال شده است. اونوسیتوییدها به صورت سلول‌هایی گرد یا تخم‌مرغی و بزرگ‌تر از پروهموسیت‌ها ولی کوچک‌تر از سایر سلول‌های خونی در هر دو حشره مشاهده شدند. هسته به رنگ آبی تیره (پس از رنگ‌آمیزی) به یک سمت سلول کشیده شده بود. فراوانی این سلول‌ها نسبت به گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در هر دو حشره مورد مطالعه کمتر بود. اسفرولولوسیت‌ها سلول‌هایی نسبتاً درشت و دارای یک هسته فشرده مشخص بودند. سطح سیتوپلاسم این سلول‌ها دارای گویچه‌های متعددی است. در کرم خراط گاهی شکل‌های نامنظمی را ایجاد می‌کنند (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱- سلول‌های خونی لارو سن سوم *O. coerulea* رنگ‌آمیزی شده با گیمسا، مشاهده با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰، PL = پلاسموتوسیت، GR = گرانولوسیت، OE = اونوسیتویید، PR = پروهموسیت، PO = پدوسیت



شکل ۲- سلول‌های خونی لارو سن پنجم *Z. pyrina* رنگ‌آمیزی شده با گیمسا، مشاهده با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰  
 PR = پروهموسیت، PL = پلاسموتوسیت، GR = گرانولوسیت، OE = اونوسیتوئید، SP = اسفرولوسیت



شکل ۳- تعداد کل سلول‌های خونی در سنین مختلف لاروی سوسک شاخک‌بلند رزاسه و کرم خراط در میلی‌متر مکعب همولنف (حروف غیرمشابه اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال پنج درصد در آزمون توکی نشان می‌دهند)

شمارش کل و تفریقی سلول‌های خونی تعداد کل سلول‌های خونی از لارو سن اول تا لارو سن آخر در هر دو حشره مورد مطالعه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $F=940.5; df_{t,e}=7,72; P \leq 0.0001$ ) (شکل ۳). طبق نتایج در سنین مختلف لاروی سوسک شاخک‌بلند رزاسه بالاترین تعداد کل سلول‌های خونی را داشت، به‌طوری‌که در لارو سن سوم به میزان  $410 \pm 15/5$  عدد در میلی‌متر مکعب خون و در کرم خراط در همولنف لارو سن پنجم به تعداد  $745 \pm 36/5$  عدد در میلی‌متر مکعب خون و پایین‌ترین تراکم هموسیت‌ها نیز در لاروهای سن اول هر دو گونه دیده شد (شکل ۳).

شمارش تفریقی سلول‌های خونی نشان داد که فراوانی پروهموسیت‌ها در لاروهای سنین مختلف هر دو گونه به‌طور معنی‌داری متفاوت بود ( $F=58.2; df_{t,e}=7,72; P \leq 0.0001$ )، به‌طوری‌که این تفاوت در تعداد پلاسموتوسیت‌های سنین مختلف لاروی سوسک شاخک‌بلند و کرم خراط ( $F=36.5; df_{t,e}=7,72; P \leq 0.0001$ )، گرانولوسیت‌ها ( $F=54.6; df_{t,e}=7,72; P \leq 0.0001$ ) و اونوسیتوئیدهای هر دو آفت ( $F=28.7; df_{t,e}=7,72; P \leq 0.0001$ ) نیز مشهود بود. به‌علاوه اینکه فراوانی اسفرولوسیت‌های سنین مختلف لاروی کرم خراط به‌طور معنی‌داری متفاوت بود ( $F=22.6; df_{t,e}=4,45; P \leq 0.0001$ ) (جدول ۱). پلاسموتوسیت‌ها در همه سنین لاروی سوسک شاخک‌بلند رزاسه بیشترین جمعیت را داشتند. در حالی که در همولنف لاروهای سنین بالای کرم خراط، گرانولوسیت‌ها فراوان‌ترین سلول‌ها (۴۵-۴۰ درصد) بودند. نتایج نشان داده‌اند که پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به‌ویژه در سنین آخر لاروی هر دو حشره بیشترین فراوانی را داشتند. پروهموسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های پایه یا Stem cell در لارو سن اول هر دو حشره بالاترین فراوانی را نسبت به سایر سنین لاروی داشته ولی به‌تدریج با رشد لارو در سنین بالاتر از فراوانی پروهموسیت‌ها کاسته شد. اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها در تمام سنین لاروی جمعیت‌شان پایین بود، به‌طوری‌که تقریباً ۱۰-۴ درصد از جمعیت کل سلول‌ها را تشکیل دادند. پدوسیت‌ها در لاروهای سنین دوم و سوم سوسک شاخک‌بلند رزاسه به میزان حدود ۱ درصد مشاهده شدند.

جدول ۱- میانگین درصد انواع سلول‌های خونی در سنین مختلف لاروی سوسک شاخک‌بلند رزاسه و کرم خراط

حشرات	سنین لاروی	پروهموسیت	پلاسموتوسیت	گرانولوسیت	اونوسیتوئید	اسفرولوسیت	پدوسیت
سوسک شاخک‌بلند رزاسه	سن اول	25/4 ± 3/5a	48/3 ± 3/6b	22/5 ± 3/2d	2 ± 0/2c	-	-
	سن دوم	15/7 ± 2/5c	54 ± 4/2a	24/7 ± 0/5c	3/2 ± 1bc	0/8 ± 0/5a	-
	سن سوم	7/2 ± 1/2d	55/6 ± 1/2a	29 ± 3/3c	8 ± 1/1a	1/4 ± 0/7a	-
کرم خراط	سن اول	27/8 ± 2/4a	32/6 ± 2/2ed	38/6 ± 1/2b	1 ± 0/2d	2/2 ± 0/4c	-
	سن دوم	18/4 ± 2/6b	32/8 ± 1/8d	37/2 ± 4b	2/2 ± 0/7c	3 ± 0/5bc	-
	سن سوم	15/3 ± 1/8b	33 ± 4/5d	42/6 ± 3/2a	4/2 ± 1/2b	3/6bc	-
	سن چهارم	4 ± 0/5e	35/6 ± 2/2c	43 ± 2/2a	4/6 ± 1b	4/2 ± 0/2b	-
	سن پنجم	2/2 ± 1/3ef	37/4 ± 3/2c	45 ± 2/2a	7 ± 1/6b	10/5 ± 2/1a	-

در هر ستون، کلیه میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه در سطح احتمال پنج درصد در آزمون توکی دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. Columns show mean ± SE and statistical differences were marked by different letters at  $p < 0.05$ , Tukey's test

جدول ۲- اندازه‌گیری‌های مرفومتريک سلول‌های خونی لاروهای سن سوم سوسک شاخک‌بلند رزاسه و سن پنجم کرم خراط (n=۲۰)

حشرات	انواع سلول‌ها	میانگین طول (میکرومتر)	میانگین عرض (میکرومتر)
سوسک شاخک‌بلند رزاسه	پروهوسیت	۳±۱/۲	۲/۲±۰/۲
	پلاسموتوسیت	۱۹/۵±۷	۵/۵±۱/۸
	گرانولوسیت	۶±۱/۸	۶±۱
	اونوسیتوید	۷±۲	۶±۱/۸
	پدوسیت	۷/۵±۳	۷/۵±۱
	پروهوسیت	۲/۷±۰/۵	۲/۷±۰/۵
	پلاسموتوسیت	۱۲/۵±۹	۴±۱/۵
	گرانولوسیت	۱۰/۲±۲	۶±۲/۲
	اونوسیتوید	۶/۲±۲/۳	۴/۷±۲
کرم خراط	اسفرولوسیت	۱۱±۸/۳	۹/۵±۵/۳

## بحث

سنین بالاتر بود اما در سنین بعدی از تراکم آنها کاسته شد. جلالی و همکاران (۲۰۰۸) نیز کاهش پروهوسیت‌ها را در سنین بالاتر لاروی پروانه برگ‌خوار مرکبات گزارش کردند. در واقع پروهوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها جزو اولین سلول‌های تولید شده در اندام‌های هموسیت‌زا می‌باشند که به خون وارد می‌شوند. پروهوسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های پایه دارای اهمیت خاصی هستند و می‌توانند به پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها تغییر یابند، بنابراین فراوانی آنها در سنین بالاتر به دلیل تقسیم آنها به ایمونوسیت‌ها کاهش می‌یابد (Yamashita & Iwabuchi, 2001).

گرانولوسیت‌ها بیشترین جمعیت را در همولف لاروهای سنین سوم تا پنجم کرم خراط داشتند. Ling و همکاران (۲۰۰۳) و (Pourali & Ajamhassani, 2018) نیز گرانولوسیت‌ها را فراوان‌ترین سلول‌های خونی کرم ابریشم و لارو بید سیب‌زمینی *P. operculella* گزارش کردند. فراوانی گرانولوسیت‌ها در همه راسته‌های حشرات به‌ویژه بالپولکداران بالاست. در سوسک شاخک‌بلند رزاسه نیز بعد از پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها بیشترین فراوانی را در خون حشره داشتند (جدول ۱). این سلول‌ها قابلیت تشخیص عامل بیگانه را دارند و اولین سلول‌های شرکت‌کننده در بیگانه‌خواری،

گزارش‌های مشابهی مبنی بر وجود پنج نوع هموسیت در همولف حشرات وجود دارد، همانطور که ثابت شده هموسیت‌های مشاهده شده در این تحقیق، در همولف لاروهای سن پنجم بید کلم *Plutella xylostella* (Linnaeus) سرخرطومی حنایی خرما *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Manachini et al., 2011)، شب‌پره خرنوب *Ectomoyeloides ceratoniae* Zeller (Khosravi et al., 2012) کرم تارتن پاییزی *Hyphantria cunea* (Drury) (Ajamhassani et al., 2013) کرم ابریشم *Bombyx mori* (L.) (Tan et al., 2013)، شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Anagasta kuehniella* Zeller (Ghasemi et al., 2013)، کرم شاخدار فریون *Hyles euphorbia* (L.) (Ajamhassani, 2015) لارو بید سیب‌زمینی *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Pourali & Ajamhassani, 2018) و لارو لیس‌ه سیب *Hyponomeuta malinellus* (Ajamhassani & Mahmoodzadeh, 2019) وجود دارند.

پروهوسیت‌ها در خون همه حشرات به‌جز طیاره‌مانندها و دم‌مویی‌ها گزارش شده‌اند (Gupta, 1985). فراوانی پروهوسیت‌ها در سن اول لاروی هر دو حشره از سایر



گرانولوسیتها و پلاسموتوسیتها) در لاروهای سن پنجم پروانه برگ‌خوار شبدر علوفه‌ای *Utethesia pulchella* (Ajamhassani, 2014) و کرم شاخدار فرفیون *Hyles euphorbia* L. (Ajamhassani, 2015) بیش از ۷۰٪ گزارش شد. به‌علاوه اینکه مجموع فراوانی گرانولوسیتها و پلاسموتوسیتها در همولف لاروهای سن آخر شب‌پره هندی و بید سیب‌زمینی حدود ۹۰٪ اعلام شد (Ebrahimi & Ajamhassani, 2018; Pourali & Ajamhassani, 2017).

از این رو به نظر می‌رسد فراوانی بالاتر سلول‌های مؤثر در واکنش‌های ایمنی (پلاسموتوسیتها و گرانولوسیتها) منجر به افزایش دفاع سلولی لاروهای سنین بالا می‌شود. بنابراین لاروهای بزرگ‌تر در برابر بیمارگرها و پارازیتوئیدها مقاومت بیشتری را نشان می‌دهند (Valades, 2011). در همین راستا، مشخص شده که لاروهای درشت *Spodoptera littura* در مقابل جدایه‌های بیماری‌زای قارچ *Beauveria bassiana* و ذرات سنتزی لاتکس بید، پاسخ ایمنی مناسبی نشان داده و با گره‌زایی و فعالیت سامانه فنل اکسیداز توانست اسپورهای قارچ را ملانیزه کند (Ajamhassani, 2013).

اونوسیتوئیدها در همه گزارش‌ها به شکل تخم‌مرغی با هسته جانبی مشاهده شده است. فراوانی اونوسیتوئیدها از گرانولوسیتها و پلاسموتوسیتها در این تحقیق به‌طور معنی‌داری کمتر بود. میزان پراکندگی آنها در شفیره پروانه برگ‌خوار مرکبات *Papilio demoleus* L. (Jalali & Salehi, 2008) حدود ۸ و در لاروهای *Anticarsia gemmatalis* Hub. (Andrade et al., 2003) درصد ۵ در لاروهای شب‌پره هندی *Plodia interpunctella* (Ebrahimi & Ajamhassani, 2017) و لارو بید سیب‌زمینی (Pourali & Ajamhassani, 2018) ۱۰-۵ درصد گزارش شده است. اونوسیتوئیدها به‌عنوان یکی از منابع تولید آنزیم‌های فنل‌اکسیداز یعنی عامل ملانیزاسیون همولف بالپولکداران شناخته شده‌اند (Ling et al., 2005).

براساس مشاهدات این تحقیق، همراه با افزایش سن لاروی و به‌دنبال آن افزایش وزن لاروها قطعاً حجم خون نیز افزایش می‌یابد و منطقی است که تعداد هموسیتها نیز

گره‌زایی و ترمیم زخم می‌باشند (Strand & Pech, 1995; Tanaka & Yamakawa, 2011).

ظاهر گرانولی این سلول‌ها امکان شناسایی آنها را با میکروسکوپ نوری تسهیل می‌کند (Wago, 1991).

پلاسموتوسیتها همواره دارای پروفایل چند شکلی هستند. در اغلب بالپولکداران، به شکلهای سیلندری شکل با یک یا دو زائده، دوکی یا ستاره‌ای دیده می‌شوند. سیتوپلاسم این سلول‌ها گاه صاف و گاهی دارای گرانول‌های بسیار ریز است. ولی در اغلب بالپولکداران، پلاسموتوسیتها فاقد گرانول هستند (Riberio & Brehelin, 2006). این سلول‌ها در همولف آفات این پژوهش از سایر سلول‌ها بزرگ‌تر مشاهده شدند. پلاسموتوسیت‌های کرم ابریشم *Bombyx mori* L. نیز از اونوسیتوئیدها کوچک‌تر ولی از سایر سلول‌ها بزرگ‌تر گزارش شده‌اند (Ling et al., 2003). پلاسموتوسیتها به همراه گرانولوسیتها فراوان‌ترین سلول‌های خونی همه حشرات می‌باشند که به‌دلیل نقش آنها در فعالیت‌های ایمنی، به آنها ایمونوسیت گفته می‌شود. پلاسموتوسیتها مهم‌ترین سلول‌ها در انکپسوله کردن عوامل بیگانه هستند (Nardi et al., 2003; Strand & Pech, 1995). این سلول‌ها به سطح عامل بیگانه می‌چسبند و با گستراندن زائده‌های سیتوپلاسمی به سرعت آن را دربرمی‌گیرند (Ling et al., 2003). تراکم پلاسموتوسیتها و گرانولوسیتها در سنین بالای لاروی بیشتر از سنین پایین در هر دو حشره مشاهده شد. به‌عبارت‌دیگر، مجموع فراوانی پلاسموتوسیتها و گرانولوسیتها در بسیاری از بالپولکداران به بیش از ۸۵٪ می‌رسد، همانطور که مشخص شده این مقدار در لاروهای سن پنجم کرم تارتن پاییزی نزدیک به ۸۶ درصد کل سلول‌های خونی بود (Ajamhassani et al., 2013).

Ghasemi و دیگران (۲۰۱۳) نیز مجموع پلاسموتوسیتها و گرانولوسیتها را در لاروهای سن آخر *Anagasta kuehniella* Zeller حدود ۷۴ درصد گزارش کردند. همچنین ثابت شده که پلاسموتوسیتها حدود ۵۱ و گرانولوسیتها ۳۶ درصد از جمعیت هموسیت‌های سرخرطومی حنایی خرما *Rhynchophorus ferrugineus* را شامل می‌شوند (Manachini et al., 2011). فراوانی ایمونوسیتها



- euphorbia*. (Lepidoptera: Sphingidae). Journal of Plant Protection, 38(3): 49-62 (In Persian).
- Ajmehassani, M. and Mahmoodzadeh, M. 2019. Cellular defense responses of 5<sup>th</sup> instar larvae of the Apple Ermine Moth, *Yponomeuta malinellus* (Lepidoptera: Yponomeutidae) against starvation, thermal stresses and entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*. accepted in Journal of Animal Researches.
- Ajmehassani, 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.-Cryi) and *Isaria farinosae* (Holmsk.) Fr. Journal of Plant Protection Research, 53(2): 110-118.
- Alford, D.V. 2007. Pests of Fruit Crops – A Colour Handbook. Manson Publishing, UK.
- Andrade, F., Negreiro, M., Gregorio, E. and Moscardi, F. 2003. Hemocytes of *Anticarsia gemmatilis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: morphological and quantitative studies. Acta Microscopica, 12: 59-63.
- Bao, Y., Yamano, Y. and Morishima, I. 2007. Induction of hemolin gene expression by bacterial cell wall components in eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. Molecular Biology, 146: 147-151.
- Brehelin, M., Drif, L., Baud, L. and Boemare, N. 1989. Insect haemolymph: Cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. Insect Biochemistry, 19: 301-307.
- Cannon, J.P., Haire, R.N., Rast, J.P. and Litman, G.W. 2004. The phylogenetic origins of the antigen-binding receptors and somatic diversification mechanisms. Immunological Reviews, 200: 12-22.
- Ebrahimi, M. and Ajmehassani, M. 2017. The effects of starvation stresses and nutritional diets on the immune system of Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). 2nd Iranian International Congress of Entomology, 73.
- Ghasemi, V., Moharrampour, S. and Sendi, J.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.
- Gupta, A.P. 1985. Cellular elements in the haemolymph. In: Kerkut, G. A., Gilbert, L. I. (Eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology Cambridge University Press, 85-127.
- Gupta, A.P. 1991. Insect immunocytes and other hemocytes: roles in cellular and humoral immunity. In: Gupta, A. P. (Ed.), Immunology of Insects and Other Arthropods. CRC Press, Boca Raton, 19-118.

به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. افزایش تعداد کل هموسیت‌های لاروهای سنین بالاتر در پروانه برگ‌خوار مرکبات (*Papilio demoleus* L. (Jalali & Salehi, 2008)، کرم تارتن پاییزی (*Hyphantria cunea* (Drury) (Ajmehassani et al., 2013)، کرم شاخدار فریون *H. euphorbia* (Ajmehassani, 2015) و شب‌پره هندی (Ebrahimi & Ajmehassani, 2017) نیز گزارش شده است. بنابراین به‌نظر می‌رسد که افزایش جمعیت سلول‌های خونی لاروهای سنین بالاتر به‌دلیل افزایش نیاز غذایی، دفاع سلولی و تولید عوامل ایمنی مانند هم‌گلوتینین‌ها، عوامل ضد میکروبی و ضد ویروسی و تولید تیروزین برای اسکراتیزاسیون و ملانیزاسیون می‌باشد (Gupta, 1985).

در این تحقیق، خصوصیات مرفولوژیک سلول‌های خونی دو حشره شاخک‌بلند رزاسه و کرم خراط تعیین شد. همچنین تغییرات جمعیت هموسیت‌ها در طول دوره لاروی آنها مشخص شد. ایمنی شاخص مهم حساسیت حشرات به آلودگی‌ها می‌باشد. آیا قدرت دفاع سلولی این حشرات در برابر اسپور قارچ‌ها یا باکتری‌های بیمارگر در حدی هست که از روند آلودگی جلوگیری کند؟ توان دفاعی این حشرات در برابر غلظت‌های مختلف عوامل بیمارگر چگونه است؟ با توجه به اهمیت نقش هموسیت‌ها در دفاع فیزیولوژیک، یافته‌های این تحقیق می‌تواند در درک بهتر واکنش‌های ایمنی سوسک شاخک‌بلند گل‌سرخیان و کرم خراط به عواملی مانند استرس‌های محیطی، گرسنگی، بیمارگرها و پارازیتوئیدها مؤثر بوده و در برنامه‌های کنترل میکروبیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد.

#### منابع مورد استفاده

- Ajmehassani, M. 2014. Cellular reactions of *Spodoptera littura* (Fabricus) (Lepidoptera: Noctuidae) against entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. Plant Pest Research, 4(2): 59-68 (In Persian).
- Ajmehassani, M. 2014. Study on cellular defense of larvae of *Utethesia pulchella* (Lepidoptera: Arctiidae) against *Beauveria bassiana* and *Isaria farinosae*. Biocontrol in Plant Protection, 2(1): 57-67 (In Persian).
- Ajmehassani, M. 2015. Study on hemocytes of *Hyles*

- Kanost, M.R. 2003. Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. *Developmental Genes Evolution*, 213: 477-491.
- Noyes, J.S. 2013. UniversalChalcidoidea Database. World Wide Web electronic publication. <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids> (Accessed: 24 April 2013).
- Parmakelis, A., Slotman, M.A., Marshall, J.C., Awono-Ambene, P.H. and Antonio-Nkondjio, C. 2008. The molecular evolution of four anti-malarial immune genes in the *Anopheles gambiae* species complex. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 79.
- 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*, 37(4): supplementary, 515-525.
- Riberio, C. and Brehelin, M. 2006. Insect haemocytes: What type of cell is. *Journal of Insect Physiology*, 52: 417-429.
- Rohani, M. and Samih, M.A. 2012. The efficiency of pheromone traps in attracting and capturing *Zeuzerapyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae) in walnut orchards. *International Journal of Agricultural Science*, 2(7): 583-587 (In Persian).
- Soderhal, K., Cerenius, L. and Johansson, M.W. 1994. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 712: 155-161.
- Strand, M.R. and Pech, L.L. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology*, 40: 31-56.
- Tan, J., Xu, M., Zhang, K., Wang, X., Chen, S., Li, T., Xiang, Z. and Cui, H. 2013. Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 59: 595-603.
- Tanaka, H. and Yamakawa, M. 2011. Regulation of the innate immune responses in the silkworm. *Invertebrate Survival Journal*, 8: 59-69.
- Valades-Lira, J.A., Gonzalez, J.M., Damas, G., Meja, G., Oppert, B., Padilla, C. and Guerra, P. 2011. Comparative evaluation of phenoloxidase activity in different larval stages of four lepidopteran after exposure to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Science*, 12(80): 1-11.
- Wago, H. 1991. Phagocytic recognition in *Bombyx mori*. In: Gupta AP (ed.) *Immunology of insects and other arthropods*. CRC Press, Boca Raton, pp 215-235.
- Yamashita, M. and Iwabuchi, K. 2001. *Bombyx mori* prohemocytes division and differentiation in individual microcultures. *Journal of Insect Physiology*, 47: 325-331.
- Hamidi Motlagh, H. 2005. Study on population density and damage intensity of *Ospthranteria coerulescens* Redt. (Col: Cerambycidae) and its natural enemies on different genotypes of *Rosa damascena*. Master science thesis. Islamic Azad University, 94p (In Persian).
- Heinrich, G. 1978. Eastern Palearctic Hymenopterous insects of the subfamily Ichneumoninae. Leningrad, 1-81.
- Hilpert, H. 1992. Zur Systematik der Gattung *Ichneumon* Linnaeus, 1758 in der Westpalaearktis (Hymenoptera, Ichneumonidae, Ichneumoninae). *Entomofauna*, 6: 1-389.
- Jalali, J. and Salehi, R. 2008. The hemocyte types, differential and total count in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) during postembryonic development. *Munis Entomology & Zoology Journal*, 3(1): 199-218.
- Jones, J.C. 1967. Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* L. *The Biological Bulletin*, (Woods Hole), 132: 211-221.
- Khosravi, R., Jalali Sendi, J. and Ghasemi, V. 2012. Identification of hemocytes in carob moth, *Ectomoyeloisceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Plant Pests Research*, 2(3): 29-39 (In Persian)
- Lavin, M.D. and Strand, M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1295-1309.
- Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R., Kobayashi, Y., Tu, Z. and Funayama, T. 2003. Why does hemocyte density rise at the wandering stage in the silkworm, *Bombyx mori*?. *Journal of Insect Biotechnology Sericology*, 72: 101-10.
- Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R. and Kiguchi, K. 2005. Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. *Journal of Cell and Tissue Research*, 320: 535-543.
- Ling, E. and Yu, X. 2006. Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells. *Immunology*, 30: 301-309.
- Manachini, B., Arizza, V., Parrinello, D. and Parrinello, N. 2011. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 360-365.
- Nahla, M., Hanan, Abd El-Aziz. and Awad, H. 2010. Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. *Micron*, 41: 203-209.
- Nardi, J.B., Pilas, B., Ujhelyi, E., Garsha, K. and

## Study on morphology and frequency of hemocytes in *Osphranteria coerulescense* (Redt) (Coleoptera: Cerambycidae) and *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae) larvae, two wood boring insects of Iran

M. Ajamhassani<sup>1\*</sup>

<sup>1\*</sup>- Corresponding author, Department Plant Protection, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran  
E-mail: shahroodm@gmail.com

Received: 12.11.2018

Accepted: 25.05.2019

### Abstract

Hemocytes as the immune system are important factors against fungi, bacteria and insecticide particles. Studying the morphology of hemocytes and their frequency is essential as the first stage in identification of cellular immune characteristics. In the present research, the types of hemocytes were investigated in the haemolymph of *Osphranteria coerulescense* and *Zeuzera pyrina* larvae after staining with Giemsa and by light microscopy at 40x magnification. Four types of hemocytes including prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes and oenocytoides were identified in hemolymph of both pests. Spherulocytes and podocytes were observed only in hemolymph of *Z. pyrina* and 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> instars larvae of *Osphranteria coerulescense*, respectively. Prohemocytes as stem cells were small and often round with central nucleus. Plasmatocytes had often polymorphism profile and together with granulocytes were the most abundant hemocytes in both insects. Granulocytes are variable in size, round or oval shape with large nucleus in relation to cell size. They were the most abundant cells in the hemolymph of 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> instars of *Zeuzera pyrina*. Oenocytoid were also found to be generally small to medium-sized, oval shape with round and eccentric nucleus. Spherulocytes were usually rounded or elongated cells and larger than Granulocytes. The total hemocytes count at different larval stages of both insects showed that the number of cells was directly related to larval age. The total number of cells was higher in the 3<sup>rd</sup> instar larvae of *O. coerulescense* and 5<sup>th</sup> instar larvae of *Z. pyrina* in comparison to the other instars. Differential hemocyte count showed that frequency of Plasmatocytes and Granulocytes were the highest in all of larval instars. The present study provides detailed information of hemocyte profile and hemogram of two wood boring insects. These findings could be used as a basis for further investigation on the immunology studies of *Osphranteria coerulescense* and *Zeuzera pyrina*.

**Key words:** Hemocytes, *Osphranteria coerulescense*, *Zeuzera pyrina*, Microscopic study.