

مطالعه هموگرام و تأثیر تنش دما بر فراوانی ایمنوسیت‌های کرم جگری *Cossus cossus* (Lepidoptera: Cossidae)

مریم عجم‌حسینی^{۱*} و زهرا پورعلی^۲

۱-نویسنده مسئول، استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

پست الکترونیک: shahroodm@gmail.com

۲-دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۹/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۱۴

چکیده

ورود عوامل بیماری‌گر، عفونت‌ها و آلاینده‌های محیط به همولف حشرات، تنش‌های دمایی و تغییرات رژیم غذایی، سامانه ایمنی حشرات را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ایمنی حشرات شامل مؤلفه‌هایی است که سلول‌های خونی اجزای اصلی آن محسوب می‌شوند. در این تحقیق، مطالعه مرفولوژی و تغییرات تراکم سلول‌های خونی در همولف کرم جگری در برابر تنش‌های دمایی مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های خونی مراحل مختلف لاروی پروانه کرم جگری *Cossus cossus* پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا بررسی و واکنش این سلول‌ها در برابر دماهای ۴ و ۳۰ درجه سلسیوس ارزیابی شد. پنج نوع هموسیت شامل پروهموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولولوسیت‌ها در لاروها شناسایی شد، ولی پراکندگی آنها در مراحل مختلف لاروی متفاوت بود. شمارش کل سلول‌های خونی نشان داد که با افزایش سن لاروی و جثه بدن، به تدریج بر تعداد سلول‌های خونی و حجم همولف افزوده می‌شود. شمارش تفرقی سلول‌های خونی نشان داد که پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در لاروهای سنین پنجم و ششم بیشترین فراوانی را نسبت به سایر مراحل رشدی داشتند. گرانولوسیت‌ها در برابر تنش گرما و سرما بیشترین تغییرات فراوانی را نشان دادند و پلاسموتوسیت‌ها نیز تحت تأثیر سرما به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. بنابراین به نظر می‌رسد شناخت ویژگی‌های هموسیت‌های این آفت چوب‌خوار و تغییرات فراوانی ایمنوسیت‌ها در مقابل تنش‌های دمایی بتواند به‌عنوان مقدمه‌ای بر مطالعات ایمنی‌شناسی این آفت قلمداد شود. قطعاً برای بررسی برهم‌کنش سیستم ایمنی کرم جگری با عوامل بیماری‌گر و سنجش به‌صرفه‌بودن کنترل میکروبیولوژیک، نیاز به تحقیقات تکمیلی است.

واژه‌های کلیدی: کرم جگری، هموسیت‌ها، تنش دمایی، ایمنی‌شناسی.

مقدمه

کامبیوم و آوندها تغذیه کرده و گاه در تنه یک درخت مسن، کلنی بزرگی از لاروهای سنین مختلف مشغول تغذیه هستند، بنابراین درخت آسیب‌دیده به شدت ضعیف می‌شود (Hannon et al., 2017). البته تاکنون روش مشخص کنترلی علیه آن ارائه نشده است، زیرا معمولاً آفت درجه یک و جدی تلقی نمی‌شود مگر در شرایط طغیان که می‌تواند یک درخت کهن‌سال را با تغذیه از تنه و بافت‌های مرکزی کاملاً

کرم جگری یا Goat moth با نام علمی *Cossus* یکی از آفات مهم چوب‌خوار انواع درختان جنگلی مانند نارون، بلوط، بید، صنوبر، زبان‌گنجشک و راش است. لاروهای خسارت‌زای این حشره روی تنه درختان سیب هم فعالیت می‌کنند. دوره زندگی لاروی این پروانه زیر پوست درختان میزبان تا چهار سال طول می‌کشد. لاروها از

ریخته می‌شود (Ghasemi et al., 2013). در تحقیقات پورعلی و عجم‌حسینی در سال ۲۰۱۸، دمای پایین (۴ درجه سلسیوس) سبب کوچک شدن سلول‌های خونی لارو بید سیب‌زمینی و چروکیدگی دیواره سلولی آنها شد. به‌علاوه تقسیمات میتوتیک در پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و به‌ویژه گرانولوسیت‌ها گاه در اثر تنش‌های دمایی به شدت تحریک می‌شود (Pourali & Ajamhassani, 2018).

با توجه به اینکه سلول‌های خونی فاکتور مهمی در سیستم ایمنی حشرات هستند، شناسایی آنها و جمعیت‌شان ما را در راستای کنترل بهتر حشره موردنظر کمک می‌کند. کرم جگری دارای پارازیتوئیدی اختصاصی از دوبالان با نام علمی *Xylotachina diluta* است. این مگس‌ها لاروهای آفت را در دالان‌های تنه پارازیته می‌کنند. شایان ذکر است که فراوانی سلول‌های خونی در لاروهای سنین مختلف متفاوت است. به‌عبارت‌دیگر توانایی لاروها در مقابله با تخم پارازیتوئیدها می‌تواند متفاوت باشد. بنابراین یکی از جنبه‌های مورد بررسی در کنترل بیولوژیک کرم جگری توسط این پارازیتوئید این است که آیا توان دفاعی لاروهای سنین پایین و بالا در برابر پارازیتیسیم یکسان است یا خیر؟ درواقع با مطالعه واکنش‌های ایمنی حشره در برابر پارازیتوئیدها و ارزیابی ظرفیت حشره برای مبارزه با آلودگی ناشی از پارازیتیسیم بهتر می‌توان از عوامل کنترل بیولوژیک در کنترل آفات استفاده کرد (Parmakelis et al., 2009). هدف از این تحقیق، بررسی انواع سلول‌های خونی، ویژگی‌های مرفولوژیکی، فراوانی و تغییرات جمعیت آنها در سنین مختلف لاروی کرم جگری با استفاده از میکروسکوپ نوری و مطالعه واکنش هموسیت‌ها در برابر تنش‌های دمایی است. این مطالعات می‌تواند زمینه تحقیقات تکمیلی را برای شناخت ویژگی‌های سامانه دفاع سلولی این حشره فراهم کند.

مواد و روش‌ها

در اواسط زمستان سال ۱۳۹۴، لاروهای سنین مختلف پروانه کرم جگری از تنه شکسته یک درخت زبان‌گنجشک

نابود کند. شناخت ویژگی‌های فیزیولوژیک حشرات می‌تواند در راستای اتخاذ راهکارهای کنترل آنها مؤثر باشد و ایمنی‌شناسی آفات یکی از جنبه‌های مطالعات فیزیولوژی محسوب می‌شود. براساس گزارش‌های محققان، پس از لایه‌های کوتیکولی جلد و سلول‌های اپیتلیومی لوله گوارش، ایمنی سلولی آخرین و مهمترین سد دفاع حشره در برابر انواع تنش‌ها و عوامل بیگانه است و اغلب نقش تعیین‌کننده در بقای حشره دارد. در این بخش، نقش مشارکت سلول‌های خونی و فعالیت سیستم فنل اکسیداز پررنگ است (Bulet & Stocklin, 2005). درواقع، ورود هر عامل آلوده محیطی، اسپور قارچ‌ها، ذرات سموم، تنش‌های دمایی، نوع تغذیه، دیاپوز و حتی جنسیت، بر شکل و تعداد سلول‌های خونی و فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز مؤثر است و این واقعیت در گروه‌های مختلف بی‌مهرگان که فاقد ایمنوگلوبولین هستند به اثبات رسیده است (Söderhäll & Cerenius, 1998; Bao et al., 2007). معمولاً ایمنی سلولی در ساعات اولیه ورود تنش به همولنف حشره رخ می‌دهد. پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها سلول‌های اصلی مقابله‌کننده با تنش یا عامل مهاجم هستند که با بلعیدن عامل بیگانه به‌طور انفرادی (فاگوسیتوز) یا تشکیل لایه‌هایی اطراف آن به‌طور گروهی (گره‌زایی) سبب انهدام قطعه بیگانه می‌شوند. مشخص شده حشرات دارای سامانه ایمنی قوی می‌توانند تنش را تحمل کرده و از بحران عبور کنند و نیز در صورت ورود عامل بیگانه از پیش‌روی و توسعه آلودگی جلوگیری نموده و درنهایت بر آن غلبه کنند. بنابراین ردیابی تعداد سلول‌های خونی به‌عنوان معیاری برای سنجش تحمل تنش در بسیاری از بی‌مهرگان پیشنهاد شده است (Correia, 2008).

دما نقش مهم در رشد حشرات و سازوکار هموستازیس دارد (Ghasemi et al., 2013). نقش دما در فرایندهای سامانه ایمنی حشرات نیز ثابت شده است. دما تراکم سلول‌های خونی را به‌طور معنی‌داری تغییر داده و گاهی مرفولوژی سلول‌ها را دستخوش تغییر می‌کند. غشای سلول‌های خونی پاره شده و محتویات سلولی به بیرون

تئوبار (هریک به ابعاد ۱ میلی متر مربع) انجام شد. شمارش سلول‌ها با استفاده از فرمول (Jones, 1962) و در میلی متر مکعب همولنف انجام گردید.

اندازه‌گیری حجم همولنف (Hemolymph Volum)

حجم همولنف به‌طور مستقیم با گرفتن تمام همولنف از مراحل زیستی مختلف و با استفاده از میکروبی‌پت انجام شد (Terra et al, 1975). ابتدا وزن یک قطعه کاغذ صافی به‌صورت خشک اندازه‌گیری شد و پس از گرفتن تمام همولنف با قطع یک پای دروغین از لارو و قرار دادن روی آن، دوباره توزین گردید. تفاوت وزن کاغذ صافی خشک و تر ثبت و به‌عنوان حجم همولنف در نظر گرفته شد. برای هر مرحله زندگی ۱۵ تکرار لحاظ شد.

آزمایش بررسی تنش دما بر فراوانی سلول‌های خونی

لاروهای سن ششم به مدت ۲۴ ساعت در تنش دمای ۴ و ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. تیمار شاهد شامل ۱۰ عدد لارو سن شش بود که در دمای آزمایشگاه 25 ± 1 درجه سلسیوس قرار داده شدند. لاروها بعد از ۲۴ ساعت خون‌گیری شدند و شمارش سلول‌های خونی آنها با لام تئوبار انجام شد. آزمایش شامل ۳ تیمار و هر تیمار شامل ۲۰ تکرار بود. طرح آزمایش کامل تصادفی و داده‌ها با نرم‌افزار SAS تجزیه شدند.

نتایج

بررسی یاخته‌شناسی سلول‌ها

در این مطالعه، پنج نوع هموسیت در همولنف لارو پروانه کرم جگری شناسایی شد. این سلول‌ها شامل پروهموسیت، گرانولوسیت، پلاسموتوسیت، اونوسیتوئید و اسفرولوسیت هستند. پروهموسیت‌ها کوچک‌ترین سلول‌ها در لاروهای مورد مطالعه بودند. این سلول‌های مدور دارای هسته گرد، تیره و درشت بوده که بیشترین فضای سلول را اشغال کرده و سیتوپلاسم آبی رنگ به شکل نواری باریک به کناره غشای سلول کشیده شده است (شکل ۱). هسته این سلول‌ها معمولاً مرکزی و سیتوپلاسم دارا یا فاقد گرانول بود. طول پلاسموتوسیت‌ها در لاروهای پروانه کرم جگری حدود ۱۵

در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود جمع‌آوری و به آزمایشگاه (دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰٪ و نسبت روشنایی به تاریکی ۱۴:۱۰ ساعت) منتقل شدند. لاروها با هدف مطالعات شناسایی سلول‌های خونی روی سرشاخه‌های نازک درختان زبان‌گنجشک پرورش داده و بررسی گردیدند. از لاروهای سن شش در آزمایش‌های بررسی دما استفاده شد. لازم به ذکر است که طول بدن لارو سن شش $7/5 \pm 1$ سانتی‌متر و عرض کپسول سر آن $5/8 \pm 0/5$ میلی‌متر است.

شمارش کل و تفریقی سلول‌های خونی کرم جگری

به‌منظور شناسایی سلول‌های خونی، همولنف ۱۰ عدد لارو (۱۰ تکرار) جمع‌آوری شد. ابتدا یک پای کاذب لارو را بریده و مقدار ۱۰ میکرولیتر از همولنف را روی یک لام گذاشته و با لام دیگر یک اسمیر تهیه شد. پس از خشک شدن، مقداری ماده رنگ‌آمیزی گیمسا (محلول ۹:۱ گیمسا و آب‌مقطر) روی اسمیر گذاشته، پس از گذشت ۲۰ دقیقه، لام در آب‌مقطر قرار گرفت تا محلول رنگی شسته شود. سپس لام به مدت ۱۰ ثانیه در کربنات لیتیم اشباع شده قرار داده شد (این امر به‌منظور تثبیت رنگ سلول‌ها انجام شد). سپس لام در آب‌مقطر شست‌وشو داده شد و در آن ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت تا خشک شود. با استفاده از کانادا بالزام (رقیق‌شده با گزیلول) لام دائمی تهیه شد. برای شمارش تفریقی، ۱۰۰ سلول شمارش و انواع آنها با توجه به منابع موجود شناسایی شد (Yeager, 1945; Jones, 1967; Gupta, 1985). قطر سلول‌ها براساس میکرومتر محاسبه شد. برای شمارش کل سلول‌های خونی، همولنف لاروهای حشرات با استفاده از میکروبی‌پت جمع‌آوری و با بافر فیزیولوژیک به نسبت ۱:۲۵ میکرولیتر رقیق شد. شمارش سلول‌های خونی با استفاده از لام تئوبار و بزرگ‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ (Olympus (BH2 انجام گردید. ماده ضدانعقاد به‌کاررفته در آزمایش محلول (NaCl₂ 72 Mm, Na₂SO₄ 9 Mm, Glycerol 43 Mm, Methyl violet 0.06 Mm, Distilled water) بود. شمارش کل با محاسبه میانگین تعداد سلول‌های خونی موجود در پنج خانه از لام

اختصاص دادند. گرانولوسیت‌ها با فراوانی حدود ۴۵-۴۰٪ در لاروهای درشت سنین پنج و شش بیشتر از سایر سنین لاروی مشاهده شدند ($F=455, df_{t,e}=5, 54, p \leq 0.0001$) (جدول ۱). این سلول‌ها به همراه پلاسموتوسیت‌ها در مجموع بالاترین فراوانی هموسیت‌ها را در لاروهای سنین بالا نشان دادند (جدول ۲). با افزایش سن لاروی به تدریج در سنین بالا، فراوانی اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. فراوانی اونوسیتوئیدها حدود ۱۸-۱۰ درصد و اسفرولوسیت‌ها در نهایت به ۱۰ درصد می‌رسید (جدول ۱).

اندازه‌گیری حجم همولنف (Hemolymph Volum)

با افزایش جثه لاروها و وزن بدن از سن اول به بعد به تدریج بر حجم همولنف افزوده شد. نتایج نشان داد که کمترین حجم خون متعلق به لارو سن اول و بالاترین حجم خون در لاروهای سن ششم به مقدار 32 ± 2 میکرولیتر وجود دارد ($F=32, df_{t,e}=6, 54, p \leq 0.004$) (جدول ۳).

آزمایش بررسی تنش دما بر فراوانی سلول‌های خونی

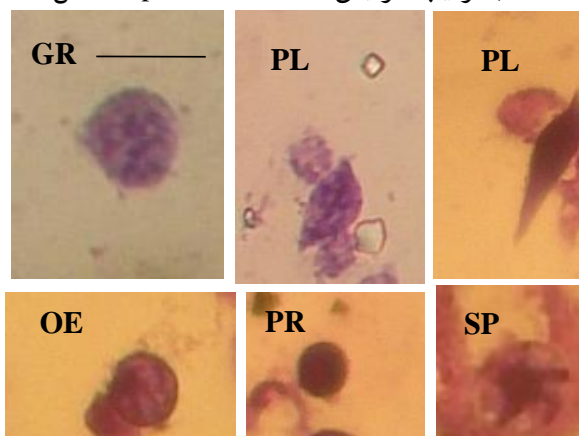
یافته‌های این تحقیق به وضوح تأثیر تنش‌های دمایی بر تعداد کل سلول‌های خونی، پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌های کرم جگری را نشان داد. براساس نتایج، دمای بالا سبب افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌ها و دمای پایین کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌ها را به همراه داشت. به‌طوری‌که تعداد کل سلول‌ها تحت تأثیر دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌طور معنی‌داری از شاهد بالاتر بود و تعداد کل سلول‌ها در لاروهایی که تحت تنش سرما (دمای ۴ درجه سلسیوس) قرار گرفتند نسبت به شاهد کاهش یافت ($F=63.5, df_{t,e}=2, 26, p \leq 0.0001$) (شکل ۲). تأثیر دما بر تعداد گرانولوسیت‌ها نیز مشابه قبل بود. به این معنی که دمای بالا افزایش معنی‌دار گرانولوسیت‌ها و دمای پایین کاهش آنها را نسبت به شاهد به همراه داشت ($F=50.5, df_{t,e}=2, 26, p \leq 0.0001$) (شکل ۳). سلول‌های پلاسموتوسیت گروه دیگری از سلول‌های مشارکت‌کننده در ایمنی حشره هستند که تنش سرما سبب کاهش معنی‌دار آنها نسبت به شاهد شد ($F=80, df_{t,e}=2, 26, p \leq 0.0001$) (شکل ۴).

میکرومتر بود که تقریباً بزرگ‌ترین طول سلولی را داشتند (جدول ۲). گرانولوسیت‌ها سلول‌هایی نسبتاً درشت و دارای تعداد زیادی گرانول در سطح خود بودند. این سلول‌ها اغلب مدور یا بیضی شکل هستند. گرانولوسیت‌ها با اندازه تقریبی $5/5 \pm 0/4$ میکرومتر (جدول ۲) بزرگ‌تر از پروهموسیت‌ها بوده و گاه از اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها نیز درشت‌تر مشاهده شدند (شکل ۱). اونوسیتوئیدها سلول‌های گرد یا تخم‌مرغی و بزرگ‌تر از پروهموسیت‌ها ولی کوچک‌تر یا هم‌اندازه گرانولوسیت‌ها بودند. هسته به رنگ آبی تیره (پس از رنگ‌آمیزی) به یک سمت سلول کشیده شده است. فراوانی این سلول‌ها نسبت به گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها کمتر بود. اسفرولوسیت‌ها سلول‌هایی نسبتاً درشت و دارای یک هسته مشخص هستند (شکل ۱).

شمارش کل و تفریقی سلول‌های خونی در لارو پروانه کرم جگری

تعداد کل سلول‌های خونی با افزایش سن لاروی ارتباط مستقیم نشان داد. به‌عبارتی همراه با افزایش وزن و جثه لاروها حجم همولنف افزایش یافته و بالتبع تعداد سلول‌های خونی در گردش آنها نیز افزایش یافت (جدول ۳). بیشترین (Total Hemocyte Count) مربوط به لارو سن ششم (وزن لارو $0/1 \pm 5$ گرم) به تعداد 3045 ± 132 عدد سلول در میلی‌متر مکعب همولنف و کمترین تعداد کل سلول‌های خونی در لارو سن اول (وزن لارو $0/2 \pm 0/8$ گرم) به تعداد 14 ± 166 عدد سلول در میلی‌متر مکعب خون مشاهده شد ($F=546, df_t=5, df_e=54, p \leq 0.0001$). فراوانی پروهموسیت‌ها در لاروهای سنین اول و دوم بیشتر از سایر مراحل و حدود $F=656, df_{t,e}=5, 54, p \leq 0.0001$ (۲۴-۲۳٪) بود (جدول ۲). پلاسموتوسیت‌ها به شکل دوکی، یا دارای یک زائده سیتوپلاسمی نسبتاً کشیده مشاهده شدند و فراوانی آنها در لاروهای سنین پنج و شش (۴۴-۴۰٪) به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر سلول‌ها مشاهده شد (جدول ۱) ($F=734, df_t=5, df_e=54, p \leq 0.0001$). براساس مشاهدات، پلاسموتوسیت‌ها در همه مراحل لاروی کرم جگری بیشترین فراوانی را بین سایر سلول‌ها به خود

F=21.5, $df_{t,e}=2,26$,) و کاهش معنی داری داشت (شکل ۴). تعداد پروهموسیت ها نیز تحت تأثیر دماهای بالا و پایین نسبت به شاهد به ترتیب افزایش (شکل ۵). ($p \leq 0.0001$)



شکل ۱- انواع سلول های خونی لارو پروانه کرم جگری *Cossus cossus* رنگ آمیزی شده با Giemsa

مشاهده با میکروسکوپ نوری (بزرگ نمایی ۴۰، GR=گرانولوسیت، PL=پلاسموتوسیت، OE=اونوسیتوئید، PR=پروهموسیت، SP=اسفرولوسیت)

جدول ۱- میانگین درصد انواع سلول های خونی کرم جگری *Cossus cossus* (تعداد برای هر آزمایش ۱۰ عدد) (Mean±SE)

مرحله رشدی	پروهموسیت	پلاسموتوسیت	گرانولوسیت	اونوسیتوئید	اسفرولوسیت
لارو سن ۱	24±2/5a	27±4/3cd	20±0/5d	15±1/3b	10±2/3ab
لارو سن ۲	23±2/5a	26±2/5d	22±1/8d	18±0/5a	10±0/5a
لارو سن ۳	10±0/8b	32±2/3c	31±3/2c	15±1/5b	8±0/5c
لارو سن ۴	2±0/5c	38±4/5b	41±3/5b	11±2/5c	4d
لارو سن ۵	2/2±1/1c	40±2/7a	41±1/5b	10±1/8c	3/7±1/5d
لارو سن ۶	2/5±1c	44±1/1a	47±2/5a	5±1/2d	3±0/5de

حروف کوچک مشابه در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی دار بر مبنای گروه بندی توکی در سطح احتمال ۰/۰۵ است (ANOVA, $p \leq 0.05$).

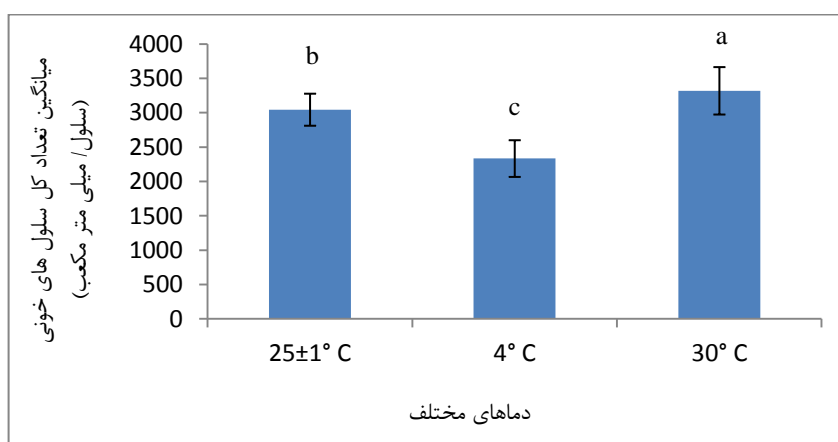
جدول ۲- اندازه گیری های مرفومتریک سلول های خونی کرم جگری *Cossus cossus* (تعداد حشرات ۲۰ عدد) (Mean±SE)

انواع سلول های خونی	اندازه (میکرومتر)	
	طول (±se میانگین)	عرض (±se میانگین)
پروهموسیت	4±1/1	3/2±0/8
پلاسموتوسیت	13/5±4	3±1/5
گرانولوسیت	5/5±1/5	4/5±2
اونوسیتوئید	4±2/5	5±1/2
اسفرولوسیت	8±2/2	6±2/4

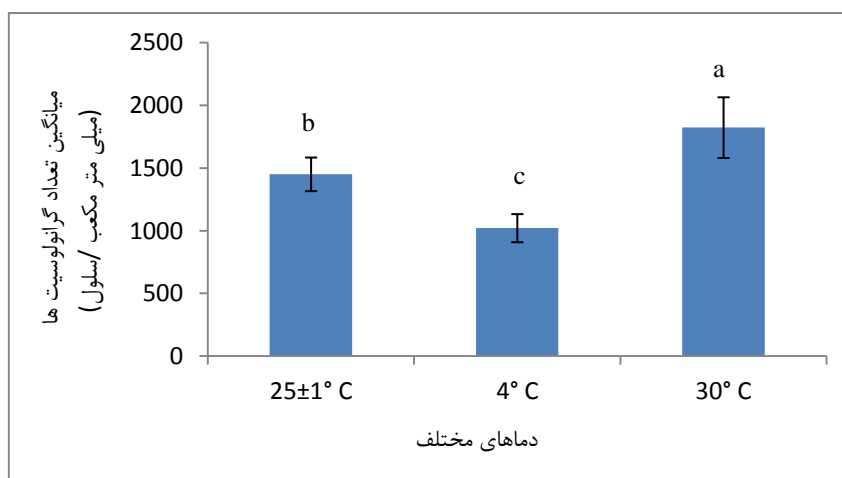
جدول ۳- وزن بدن، حجم همولنف و تعداد کل هموسیت‌های مراحل لاروی کرم جگری (*Cossus cossus*) (Mean±SE)

مرحله رشدی	وزن بدن (گرم)	حجم همولنف (میکرولیتر)	تعداد کل هموسیت (سلول×میلی‌متر مکعب خون)
لارو سن ۱	۰/۲d	۱۰±۰/۷f	۱۶۶±۱۴f
لارو سن ۲	۰/۶±۰/۲d	۱۴±۱/۱e	۲۵۶±۱۸e
لارو سن ۳	۱/۸±۰/۳c	۱۷/۵±۱d	۷۷۰±۳۲d
لارو سن ۴	۳/۵±۰/۵b	۲۰±۲c	۱۶۷۸±۷۸c
لارو سن ۵	۴/۵±۰/۲a	۲۷/۵±۳b	۲۴۵۵±۲۱۳b
لارو سن ۶	۵±۰/۱a	۳۲±۲ a	۳۰۴۵±۴۳۲a

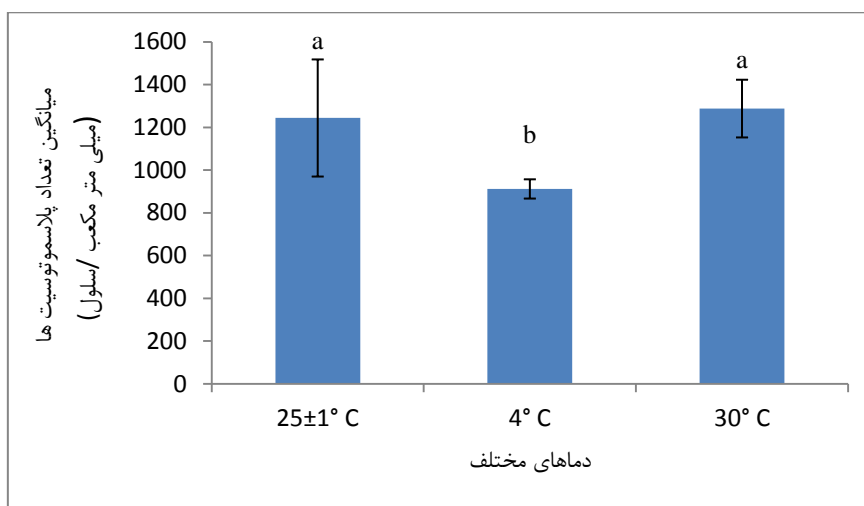
حروف کوچک مشابه در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۰/۰۵ است (ANOVA, $p \leq 0.05$).



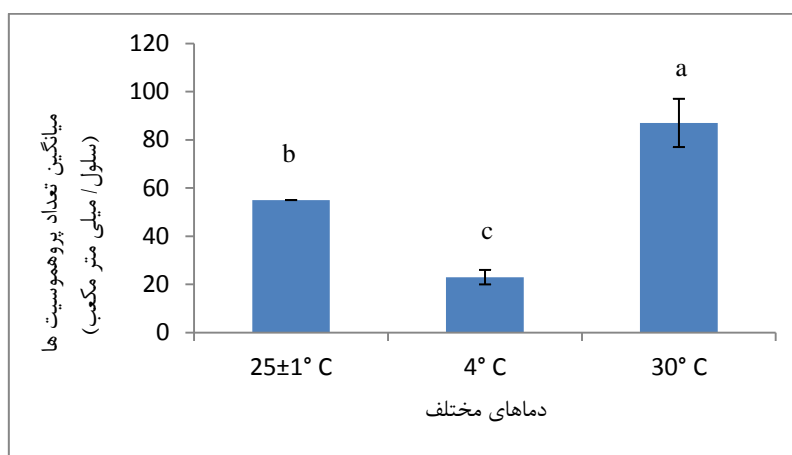
شکل ۲- تأثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد کل سلول‌های خونی لاروهای سن ششم کرم جگری (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)



شکل ۳- تأثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد گرانولوسیت‌های لاروهای سن ششم کرم جگری (تعداد سلول/میلی‌متر مکعب)



شکل ۴- تأثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد پلاسموتوسیت‌های لاروهای سن ششم کرم جگری (تعداد سلول/میلی متر مکعب)



شکل ۵- تأثیر تنش‌های دمایی مختلف بر تعداد پروهموسیت‌های لاروهای سن ششم کرم جگری (تعداد سلول/میلی متر مکعب)

(Ajamhassani, 2015)، لارو بید سیب‌زمینی *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Pourali & Ajamhassani, 2018)، لارو لیسه سیب *Yponomeuta malinellus* (Ajamhassani & Mahmoodzadeh, 2019) و کرم خراط *Zeuzera pyrina* L. (Ajamhassani, 2019) وجود دارند. شمارش تفرقی سلول‌های خونی نشان داد که جمعیت انواع سلول‌های خونی در مراحل زیستی کرم جگری متفاوت است. فراوانی پروهموسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های پایه تقریباً در سنین پایین لاروی بیشتر بود ولی در سنین بالا کاهش یافت. در واقع، پروهموسیت‌ها قابلیت تبدیل به سایر

بحث

در مطالعات ایمنی‌شناسی اولین گام شناخت ویژگی‌های سلول‌های خونی است. در این تحقیق پنج نوع سلول خونی مشاهده شد که در اغلب بال‌پولک‌داران گزارش شده است (Strand, 2008). پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولولوسیت‌ها در همولنف شب‌پره خرنوب *Ectomoyeloides ceratoniae* Zeller (Khosravi et al., 2012)، برگ‌خوار سفید اشجار *Hyphantria cunea* (Zeller) (Ajamhassani et al., 2013)، کرم شاخدار فرفیون *Hyles euphorbiae* (L)

مشارکت‌کننده در تشکیل گره اطراف عامل بیگانه و نکروزه کردن آن محسوب می‌شوند (Strand, 2008). فراوانی گرانولوسیت‌ها در همه راسته‌های حشرات به‌ویژه بال‌پولک‌داران بالاست. در همولنف کرم جگری، گرانولوسیت‌ها بالاترین فراوانی را در بین هموسیت‌ها داشتند و قابل پیش‌بینی است که بتوانند در فرایندهای ایمنی این حشره به خوبی فعالیت کنند (Yamashita & Iwabuchi, 2001). اونسیتوئیدها یکی از منابع مهم تولید آنزیم فنل اکسیداز، عامل ملانیزاسیون همولنف در بال‌پولک‌داران شناخته شده‌اند (Ashida et al., 1983; Iwama & Ashida, 1986; Jiang et al., 1997; Ling et al., 2005). تراکم اونسیتوئیدها در خون کرم جگری ۱۵-۵٪ بود. میزان پراکنندگی آنها در سفیره پروانه برگ‌خوار مرکبات *Papilio demoleus* L. حدود ۸٪ (Jalali & Salehi, 2008) و در لاروهای *Anticarsia gemmatalis* Hub. (Andrade et al., 2010) و برگ‌خوار سفید اشجار ۱۰-۵٪ (Ajamhassani et al., 2013) و در لارویبید سیب‌زمینی ۴٪ گزارش شده است (Pourali & Ajamhassani, 2018). اسفرولوسیت‌ها یکی دیگر از سلول‌های خونی هستند که ظاهراً در واکنش‌های ایمنی فعالیتی ندارند و اغلب در انتقال ترکیبات جلدی شرکت می‌کنند. این سلول‌ها کمترین فراوانی را در خون کرم جگری داشتند.

هموگرام بررسی وضعیت سلول‌های خونی حشره در یک مرحله رشدی و در یک زمان خاص است. در این تحقیق، اجزای هموگرام لاروهای سنین مختلف یعنی تعداد کل سلول‌های خونی، وزن لاروی و حجم همولنف ثبت شد و نتایج نشان داد که تعداد کل سلول‌های خونی با افزایش سن لاروی ارتباط مستقیمی دارد. در واقع افزایش تراکم هموسیت‌ها در لاروهای با وزن بیشتر و حجم خون بالاتر اتفاق می‌افتد. البته افزایش تعداد کل هموسیت‌ها در مراحل زیستی بالاتر در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است (Khosravi et al., 2012; Ajamhassani et al., 2013). بنابراین به نظر می‌رسد تغییرات هورمونی عوامل مهمی هستند که در ارتباط با جمعیت سلول‌های خونی و تنوع آنها

سلول‌ها را در طول رشد و در زمان واکنش ایمنی دارند (Beaulaton, 1979).

ثابت شده است که در اندام‌های هماتوپویتیکی *Manduca sexta* و *Spodoptera frugiperda* (Smith) (L.)، پروهموسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها وجود دارند (Nardi et al., 2003) و پروهموسیت‌ها قبل از رهاسازی از این اندام‌ها به پلاسموتوسیت‌ها تغییر شکل می‌دهند. پروهموسیت‌ها در زمان دفاع سلولی، یا ترمیم زخم، با تقسیم میتوزی به اشکال پلاسموتوسیت و گرانولوسیت تبدیل می‌شوند. پلاسموتوسیت‌ها به همراه گرانولوسیت‌ها فراوان‌ترین سلول‌های خونی لاروهای سنین بالای کرم جگری بودند که به دلیل نقش آنها در فعالیت‌های ایمنی، به آنها ایمنوسیت گفته می‌شود (Lakshmi et al., 1987). پلاسموتوسیت‌ها مهم‌ترین سلول‌ها در کیسوله کردن عامل بیگانه هستند (Nardi et al., 2003; Strand, 2008) که در این تحقیق دارای پروفایل چندشکلی بوده و معمولاً سیتوپلاسم آنها صاف مشاهده شد. ثابت شده است که لاروهای سنین بالا حساسیت کمتری در مقابل عوامل بیگانه نشان می‌دهند. به عبارتی، جمعیت بیشتر سلول‌های مهم در ایمنی (پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها)، مقاومت بالاتر لاروهای بزرگ‌تر را به همراه دارد (Valadez-Lira et al., 2011). گزارش‌های دیگر محققان نیز حکایت از فراوانی پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در لاروهای سنین بالای اغلب بال‌پولک‌داران دارد. به طوری که Ajamhassani و همکاران (۲۰۱۳) مجموع فراوانی گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها را در لاروهای سنین چهار و پنج پروانه برگ‌خوار سفید اشجار *H.cunea* (Drury) حدود ۸۵٪ اعلام کردند. همچنین فراوانی ایمنوسیت‌ها در لاروهای سن پنج کرم شاخدار فریون *H. euphorbia* حدود ۸۴٪ گزارش شد (Ajamhassani, 2015). مجموع فراوانی این سلول‌ها در همولنف لارو سن آخر لیسه سیب بالا گزارش شده است (Ajamhassani & Mahmoodzadeh, 2019). نقش گرانول‌ها در ارتباط با بیگانه‌خواری و شرکت در گره‌زایی ثابت شده است. در واقع گرانولوسیت‌ها اولین سلول‌های

به ترتیب افزایش و بعد کاهش می‌یابد. درصد پلاسموتوسیت‌ها در تمام مراحل آزمایش کاهش یافت. علاوه بر این تنش‌های دمایی سرما و گرما بر ساختار هموسیت‌ها تأثیر گذاشته و موجب شکسته شدن غشای پلاسما و تکه‌تکه شدن هسته و اندام‌های سلولی می‌شود (Pandey *et al.*, 2008 b). طبق مشاهدات Ghasemi و همکاران در سال ۲۰۱۳ در رابطه با واکنش‌های ایمنی لارو بید آرد در برابر تنش‌های دمایی، شکل سلول‌های خونی و تعداد آنها دچار تغییرات شدیدی شد. نتایج آنان نشان داد که درجه حرارت بالا (۴۰ درجه سلسیوس) سبب افزایش قابل توجهی در تعداد کل سلول‌های خونی به ویژه اونوسیتوئیدها و پلاسموتوسیت‌ها و درجه حرارت پایین (۴ درجه سلسیوس) منجر به کاهش قابل توجهی در تعداد کل سلول‌های خونی شد. دیواره سلولی پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به عنوان مهمترین سلول‌های خونی شرکت‌کننده در ایمنی سلولی، در برابر دمای حدود ۴۰ درجه سلسیوس پاره شدند و محتویات سلولی آنها به داخل همولنف پخش شد (Ghasemi *et al.*, 2013). در همین راستا تأثیر دما بر تعداد کل سلول‌های خونی و تراکم ایمنوسیت‌های لارو بید سیب‌زمینی (Pourali & Ajamhassani, 2018) و لارو لیسب سیب (Ajamhassani & Mahmoodzadeh, 2019) به طور معنی‌داری مشهود بود.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه صنعتی شاهرود به دلیل فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی قدردانی می‌کنند.

منابع مورد استفاده

- Ajamhassani, M., Sendi, J.J., Zibae, A., Askary, H. and Farsi, M.J. 2013. Immunological Responses of *Hyphantria Cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) to Entomopathogenic Fungi, *Beauveria Bassiana* (Bals.-Crie) and *Isaria Farinosae* (Holmsk.) Fr. Journal of Plant Protection Research, 53: 110-118.
- Ajamhassani, M. 2015. Study of cytology of hemocytes in the Spurge hawk-moth, *Hyles euphorbiae* L. (Lepidoptera: Sphingidae). Plant Protection

در طول رشد نقش دارند (Shapiro, 1979). نیاز غذایی لاروهای سنین بالا و افزایش غلظت ترکیبات پروتئینی ضدمیکروبی نیز می‌تواند در تغییرات فراوانی هموسیت‌ها دخیل باشد (Gupta, 1985).

تغییرات دما به عنوان یک عامل محیطی مؤثر بر فراوانی سلول‌های خونی حشرات و واکنش‌های دفاعی آنها شناخته شده است (Gillespie *et al.*, 2000; Mowlds & Kavanagh, 2008). در این بررسی نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده به وضوح نشان داد که تنش گرما سبب افزایش قابل توجهی در تعداد کل هموسیت‌ها و در مقابل تنش سرما کاهش قابل توجهی را در تعداد کل هموسیت‌ها به همراه داشت. بنابراین به نظر می‌رسد در معرض قرار دادن حشره در دمای بالا، می‌تواند سازگاری محیطی لارو را از طریق یک رفتار تنظیم حرارت یعنی افزایش تعداد کل هموسیت‌ها و به ویژه افزایش گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در پی داشته باشد. مطالعاتی که در رابطه با اثر دما بر تعداد هموسیت‌های حشرات مختلف توسط محققان انجام شده، مؤید این مطلب است. در بررسی‌های انجام شده روی *Antheraea mylitta* (Drury) تغییراتی در تعداد تفرقی سلول‌های خونی تحت تنش‌های دمایی مشاهده شد. به طوری که براساس مشاهدات کاهش قابل توجهی در تعداد کل سلول‌های خونی در دمای پایین مشاهده شد، اما در دمای بالا افزایش قابل توجهی دیده نشد (Pandey *et al.*, 2010). در یک مطالعه دیگر روی لارو *Danaus chrysippus* L. نشان داده شد که تنش سرما سبب کاهش تعداد سلول‌های خونی می‌شود، با وجود این تنش گرمایی افزایش معنی‌دار سلول‌های خونی را به دنبال داشت (Pandey *et al.*, 2008 a). Pandey و همکاران در سال ۲۰۰۸ شمارش کل و تفرقی سلول‌های خونی را در لاروهای سن پنجم *Danaus chrysippus* L. تحت تنش دمایی مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که سرما موجب کاهش تعداد سلول‌های خونی و گرما افزایش تعداد سلول‌های خونی را به دنبال دارد. میانگین تعداد پروهموسیت‌ها پس از گرم شدن و سرد شدن

- prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect biochemistry, 16(3): 547-555.
- Jalali, J. and Salehi, R. 2008. The hemocyte types, differential and total count in *Papilionodemoleus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) during post-embryonic development. Munis Entomology & Zoology Journal, 1: 199-216.
- Jiang, H., Wang, Y., Ma, C. and Kanost, M.R. 1997. Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. Insect biochemistry and molecular biology, 27(10): 835-850.
- Jones, J.C. 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. American Zoologist, 2: 209-246.
- Jones, J.C. 1967. Changes in the haemocyte picture of *Galleriamellonella* (Linnaeus). Biology Bulletin, 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: 29-39.
- Lakshmi, K. and Gupta, P. 1987. Variation in hemocyte populations during various developmental stages of *Blatella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Zoology Science, 4: 307-313.
- 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. Cell and Tissue Research, 320: 535-543.
- Mowlds, P. and Kavanagh, K. 2008. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleriamellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. Mycopathologia, 165: 5-12.
- Nardi, J.B., Pilas, B., Ujhelyi, E., Garsha, K. and Kanost, M.R. 2003. Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. Development Genes and Evolution, 213: 477-491.
- Pandey, J.P., Tiwari, R.K. and Kumar, D. 2008 a. Temperature and ganglionectomy stresses affect haemocyte counts in plain tiger butterfly, *Danaus chrysippus* L. (Lepidoptera: Nymphalidae). Journal of Entomology, 5(2): 113-121.
- Pandey, J.P., Tiwari, R.K. and Kumar, D. 2008 b. Reduction in haemocyte mediated immune response in *Danaus chrysippus* following treatment with neem based insecticides. Journal of Entomology, 5: 200-206.
- Pandey, J.P., Mishra, P.K., Kumar, D., Singh, B.M.K. and Prasad, B.C. 2010. Effect of temperature on hemocytic immune responses of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. Research Journal of Immunology, 3(2): 169-177.
- Parmakelis, A., Slotman, M.A., Marshall, J.C., Awono-Ambene, P.H. and Antonio-Nkondjio, C. 2009. The molecular evolution of four anti-malarial immune genes (Agricultural Science Journal), 38(3): 49-62.
- Ajamhassani, M. and Mahmoodzadeh, M. 2019. Cellular defense responses of 5th instar larvae of the Apple Ermine Moth, *Yponomeuta malinellus* (Lepidoptera: Yponomeutidae) against starvation, thermal stresses and entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*. Journal of Animal Researches, 4(2): 59-68.
- Ajamhassani, M. 2019. 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. Accepted in Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 17(2): 96-106.
- Andrade, F.G.D., Negreiro, M. C.C.D., Levy, S.M., Fonseca, I.C.D. B., Moscardi, F. and Falleiros, Â.M.F. 2010. Hemocyte quantitative changes in *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected by AgMNPV. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53(2): 279-284.
- Ashida, M., Ishizaki, Y. and Iwahana, H. 1983. Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell walls or beta-1, 3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 113: 562-568.
- 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.
- Beaulaton, J. 1979. Hemocytes and hemocytogenesis in silkworms. Biochemistry, 61: 157-164.
- Bulet, P. and Stöcklin, R. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. Protein Pept Lett, 12(1): 3-11.
- Correia, A.A. 2008. Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Dissertation, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Ghasemi, V., Moharrampour, S. and Jalali Sendi, J. 2013. Circulating hemocytes of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep: Pyralidae) and their response to thermal stress. Invertebrate Survival Journal, 10: 128-140.
- Gillespie, J.P., Burnett, C. and Charnley, A.K. 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. Journal of Insect Physiology, 46: 429-437.
- Gupta, A.P. 1985. Cellular elements in the hemolymph. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L. I. (Eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Cambridge University Press, pp. 85-127.
- Hannon, E.R., Rodstrom, R.A., Chong, J.M. and Brown, J.J. 2017. Carpenterworm Moth. Washington State University Extension.
- Iwama, R. and Ashida, M. 1986. Biosynthesis of

- Physical properties and chemical composition of the haemolymph of *Rhynchosciara Americana* (Diptera) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 47: 117-129.
- Valadez-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.
- Yamashita, M. and Iwabuchi, K. 2001. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *Journal of insect physiology*, 47(4-5): 325-331.
- Yeager, J.F. 1945. The blood picture of the southern armyworm (*Prodenia eridania*). *Journal of Agricultural Research*, 71: 1-40.
- 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. Supplementary*, 37(4): 515-525.
- Shapiro, M. 1979. Changes in hemocyte populations. In: Gupta AP (ed.), *Insect hemocytes*, Cambridge University Press, 475-524.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current opinion in immunology*, 10(1): 23-28.
- Strand, M.R. 2008. The insect cellular immune response. *Journal Insect Science*, 15: 1-14.
- Terra, W. R., Bianchi, A. G. and Lara, F. J. S. 1975.

Hemogram study and effect of thermal Stresses on abundance of immunocytes in larvae of Goat Moth, *Cossus cossus* (Lepidoptera: Cossidae)

M. Ajamhassani^{1*} and Z. Pourali²

1*- Corresponding author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
E-mail: shahroodm@gmail.com

2- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Semnan, Iran

Received: 06.10.2019

Accepted: 08.12.2019

Abstract

The introduction of pathogens, infections and environmental pollutants into the insect hemolymphs, thermal stresses and nutritional diet changes, affect the insect immune system. Insect immunity consists of the components among which the hemocytes are the main ones. In the present study, the morphology and changes in density of the hemocytes in the hemolymph of the *Cossus cossus* L. were studied against thermal stresses. The hemocytes of all larval stages of *C. cossus* were examined by Giemsa and the response of these cells was evaluated at temperatures of 4 °C and 30 °C. Five identified types of hemocytes in this insect were; Prohemocyte, Plasmotocyte, Granulocyte, Oenocytoide and Spherulocyte. All hemocyte types were detected in each stage but frequency of them in each stage was different. Total Hemocyte Count showed that by increasing larval instars and body size, hemocyte rate increased gradually. Differential hemocyte counts indicated that plasmotocytes and granulocytes were the most abundant in the fifth and sixth instar larvae compared to other growth stages. So, the fifth and sixth instars larvae have the highest blood volume and hemocytes count. Granulocytes showed the highest abundance variation under heat and cold stresses, and plasmotocytes also decreased significantly under the influence of cold stress. It seems that understanding the hemocyte characteristics of this pest and the frequency of immunocyte changes in response to thermal stresses can be considered as an introduction on immunological studies of this pest. Certainly, further investigation is needed to study the interaction of the immune system of *C. cossus* with pathogens and to evaluate the efficacy of microbiological control.

Key words: Goat Moth, hemocytes, thermal stress, Immunology.