

شناسایی و شمارش تفرقی و کل سلول های خونی در مراحل مختلف زندگی
سوسک برگ خوار نارون (*Xanthogaleruca luteola* Mull. : Chrysomelidae)
(Coleoptera)

رقیه کهن^۱، جلال جلالی سندی^{۲*}، آرش زیبایی^۳

۱، دانشجوی کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی موسسه آموزش عالی جهاد دانشگاهی شعبه کاشمر
۲ و ۳ به ترتیب دانشیار و استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۷)

چکیده

انواع سلول های خونی و تعداد کل و تفرقی آنها در مراحل مختلف لاروی، شفیره و حشره کامل سوسک برگ خوار نارون *Xanthogaleruca luteola* مورد بررسی قرار گرفت. پنج نوع سلول خونی بر اساس مورفولوژی شناسایی شد که عبارتند از: پروهموسیت، پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، انوسیتوئید، اسفرولوسیت. شمارش تفرقی سلول ها نشان داد که فراوان ترین نوع سلول خونی در لارو سن یک، لارو سن دو، لارو سن سه و حشره کامل پلاسماتوسیت به ترتیب ۳۹، ۳۹/۵، ۴۶/۵، ۴۴/۵ درصد و در شفیره گرانولوسیت ۵۹/۵ درصد بود. شمارش کل سلول های خونی نیز مورد بررسی قرار گرفت که در لارو سن یک $۴۰/۴ \pm ۶۲۰$ ، لارو سن دو $۳/۵۰ \pm ۹۴۰$ ، لارو سن سه $۲۹ \pm ۱۲۵۳/۳$ ، شفیره $۳۴/۸ \pm ۱۹۵۶/۶$ و حشره کامل $۴۳/۳ \pm ۱۳۲۶/۶$ سلول در میلی متر مکعب خون بود. شناخت سلول های خونی و ویژگی های آن در سوسک برگ خوار نارون برای اولین بار انجام شده است و می تواند به عنوان مقدمه ای بر مطالعات آتی در زمینه سامانه ایمنی این آفت مهم مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: سلول های خونی، سوسک برگ خوار نارون، سامانه ایمنی، *Xanthogaleruca luteola*

* نویسنده مسئول jjalali@guilan.ac.ir

مقدمه

سیستم ایمنی ذاتی حشرات شامل دو نوع واکنش دفاعی هیومرال و سلولی است. دفاع هیومرال به مولکول های موثر شامل پپتیدهای ضد میکروبی و محصولات تولید شده کمپلکس آنزیم های پروتئازی نظیر مسیر فنول اکسیدازها اشاره می کند (Blandin and Levashina, 2004; Cornelis and Soderhall, 2004; Imler and Bulet, 2005; Theopold et al., 2004).

اما دفاع سلولی به پاسخ هایی نظیر فاگوسیتوز، کپسوله کردن و لخته شدن خون اشاره می کند که توسط سلول های خونی انجام می شوند (Gillespie et al., 1997; Irving et al., 2005; Lackie, 1988; Strand and Pech, 1995). در سیستم ایمنی حشرات پاسخ سلولی نسبت به پاتوژن ها یکی از مهم ترین وظیفه های سلول ها برای کاهش و یا از بین بردن عوامل بیماری زا است (Hoffman, 1995). انواع مختلفی از سلول ها در فرایند فاگوسیتوز مهاجمان کوچک و یا کپسوله کردن مهاجمان بزرگ که قابل فاگوسیتوز نیستند مشارکت می کنند (Chapman, 1998; Schmidt et al., 2001). با توجه به نقش بالقوه این سلول ها در فرایندهای ایمنی حشره در راسته های مختلف حشرات مطالعات زیادی در مورد آنها انجام شده است، اما این مطالعات در مورد راسته سخت بال پوشان اندک بوده است (Giglio et al., 2008).

سوسک برگ خوار نارون یکی از آفات مهم درخت نارون (*Ulmus spp*) در محیط های شهری است. این حشره با تغذیه از برگ علاوه بر کاهش مقاومت درختان نارون به بیماری مرگ هلندی نارون موجب صدمه به زیبایی آنها در فضای سبز شهری می شود. به علت استفاده وسیع از انواع گونه های نارون در فضای سبز شهرها، در بیشتر نقاط جهان خسارت این آفت به درختان نارون گزارش شده است (Arbab et al., 2001). دالستن (Dahlsten, 1994) گزارش کرد که در اثر تغذیه حشرات کامل، سوراخ های کوچک و گرد و در اثر تغذیه لاروها، توری شدن برگ ها بروز می کند. بی برگ شدن حاصل از خسارت آفت (Defoliation) آثار زیان باری دارد که شامل حذف سایه

درختان و مهم تر از آن کاهش ارزش زیبایی آنها است. به ویژه درخت های نارونی که در خیابان ها در معرض دید همگان قرار دارند و در ایجاد منظره سبز شهری نقش اساسی ایفا می کنند دچار صدمه می شوند. بی برگ شدن شدید باعث ضعیف و زوال درخت خواهد شد. از آنجا که سلول های خونی در سیستم ایمنی حشرات نقش ایفا می کنند و آن ها را در برابر استرس های ناشی از محیط و یا سموم شیمیایی و میکروبی محافظت می کنند، لذا بررسی و شناخت این سلول ها می تواند گام موثری در مطالعات بعدی در مورد تاثیر پاتوژن ها، آلاینده های محیطی و سموم شیمیایی به حساب آید.

مواد و روش ها

تخم و لارو سوسک برگ خوار نارون از درختان میزبان در رشت جمع آوری و در شرایط کنترل شده آزمایشگاه (25 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) پرورش داده شد. مراحل مختلف زیستی جهت شناسایی و شمارش تفرقی سلول ها انتخاب شدند. برای هر بررسی تعداد ۵ عدد از مراحل مختلف انتخاب و قبل از تهیه لام میکروسکوپی به مدت ۵ دقیقه درون بشر حاوی آب مقطر ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. جهت خون گیری یکی از پاهای لارو، شفیره و حشره کامل قطع و سپس یک قطره همولنف استخراج و روی یک لام تمیز قرار داده شد. به کمک لام دیگر یک لایه نازک تهیه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. برای رنگ آمیزی، رنگ ۱۰ بار رقیق شده گیمسا که با روش یگر (Yeager, 1945) تهیه شده بود به مدت ۲۰ دقیقه روی لام قرار داده شد. سپس از محلول اشباع شده لیتوم کربنات جهت تمایز رنگ هسته و سیتوپلاسم استفاده شد و در نهایت لام ها با آب مقطر شستشو شده و در آون ۵۰ درجه سانتی گراد خشک شدند. سپس در محیط تثبیت کانادا بالزام لام دائمی تهیه شد (Zibae and Jalali, 2001). Sendi, 2001).

صافی خشک و خیس ثبت شد و به صورت حجم همولنف ارائه شد. در این مطالعه برای سنین مختلف لاروی، شفیره و حشره کامل حجم همولنف اندازه‌گیری شد و برای هر مرحله رشدی ۱۰ تکرار در نظر گرفته شد. آنالیز داده‌های حاصله تحت نرم‌افزار SAS، (SAS, 1996) انجام و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بر اساس توصیف ارائه شده توسط جونز و گیگلیو و همکاران (Giglio *et al.*, 2008 Jones, 1967;) پنج نوع سلول‌خونی شامل پروهموسیت، پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، انوسیتوئید و اسفرولوسیت شناسایی شدند. در تحقیق حاضر پروهموسیت‌ها در مقایسه با سایر سلول‌ها دارای اندازه‌ی بسیار کوچک و هسته‌ی مشخص بودند و هسته حجم زیادی از سلول را در بر گرفته بود، هسته و شکل کلی پروهموسیت‌ها در سوسک برگ‌خوار نارون کاملاً گرد می‌باشد (شکل ۱- الف، و، ه). در این حشره طول و عرض پروهموسیت‌ها $5/5 \pm 0/5$ میکرومتر و نسبت طول سیتوپلاسم به هسته $1/46$ میکرومتر محاسبه شد (جدول ۱). فراوانی این سلول‌ها در مراحل مختلف رشدی حشره متفاوت بود که در لارو سن یک $5/5$ ، لارو سن دو $8/5$ ، لارو سن سه $13/5$ ، شفیره و حشره کامل ۱۱ درصد از سلول‌ها را شامل می‌شدند (جدول ۲).

پلاسماتوسیت‌ها در حشرات مختلف شکل منظمی ندارند و در گونه‌های و مراحل رشدی مختلف به شکل‌ها مختلفی دیده می‌شوند که به همین علت به این موارد چند-شکلی گفته می‌شود، در تحقیق کنونی این سلول‌ها به شکل دوکی و زائده‌دار مشاهده شده و هسته‌ی سلول بسیار واضح و مشخص و دایره‌ای شکل بود (شکل ۱- ب، ج، و). اهمیت پلاسموسیت‌ها در سیستم ایمنی و خون حشرات شرکت این سلول‌ها در فرایندهایی مانند فاگوسیتوز، تشکیل کپسول، تشکیل گره و ترمیم زخم‌ها و به طور کلی اکثر فرایندهای ایمنی سلولی می‌باشد. در این حشره طول و

جهت شناسایی و شمارش تفرقی سلول‌ها تعداد ۲۰۰ سلول شمارش شدند و در جدول ثبت شدند. جهت شناسایی سلول‌ها یک قطره همولنف تثبیت نشده از یک حشره زنده روی سطح لام تمیز سرازیر شد و با یک قطره ماده ضد انعقاد خون (مخلوطی از ۲٪ اسیدسیتریک و ۱٪ اسید-اسکوربیک در سرم فیزیولوژیکی مخلوط شد (Ephrussi and Beadle, 1936). با قرار دادن یک لام روی لام اسلاید آماده شد و توسط میکروسکوپ اختلاف فاز عکس‌برداری از سلول‌ها انجام شد. هر ۵ الی ۸ دقیقه محلول تازه ساخته می‌شد.

جهت بررسی و شمارش کل سلول‌های خونی، با قطع یکی از پاهای لارو، شفیره و حشره کامل همولنف آن توسط سمپلر کشیده شد، در هر تکرار از ۵ حشره حداقل ۱ میکرولیتر همولنف استخراج و در ۲۰ میکرولیتر ماده ضد انعقاد مخلوط شد. سپس محلول در لام نئوبار سرازیر شد و سلول‌های خونی در ۴ گوشه و یک منطقه مرکزی لام هر کدام به ابعاد ۱ میلی‌متر مربع شمارش شدند. تعداد سلول‌های خونی بر حسب سلول در میلی‌متر مکعب بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (Jones, 1962). در این فرمول عدد ثابت ۱۰ عمق حفره و تعداد حفره‌های شمارش شده ۵ عدد می‌باشد.

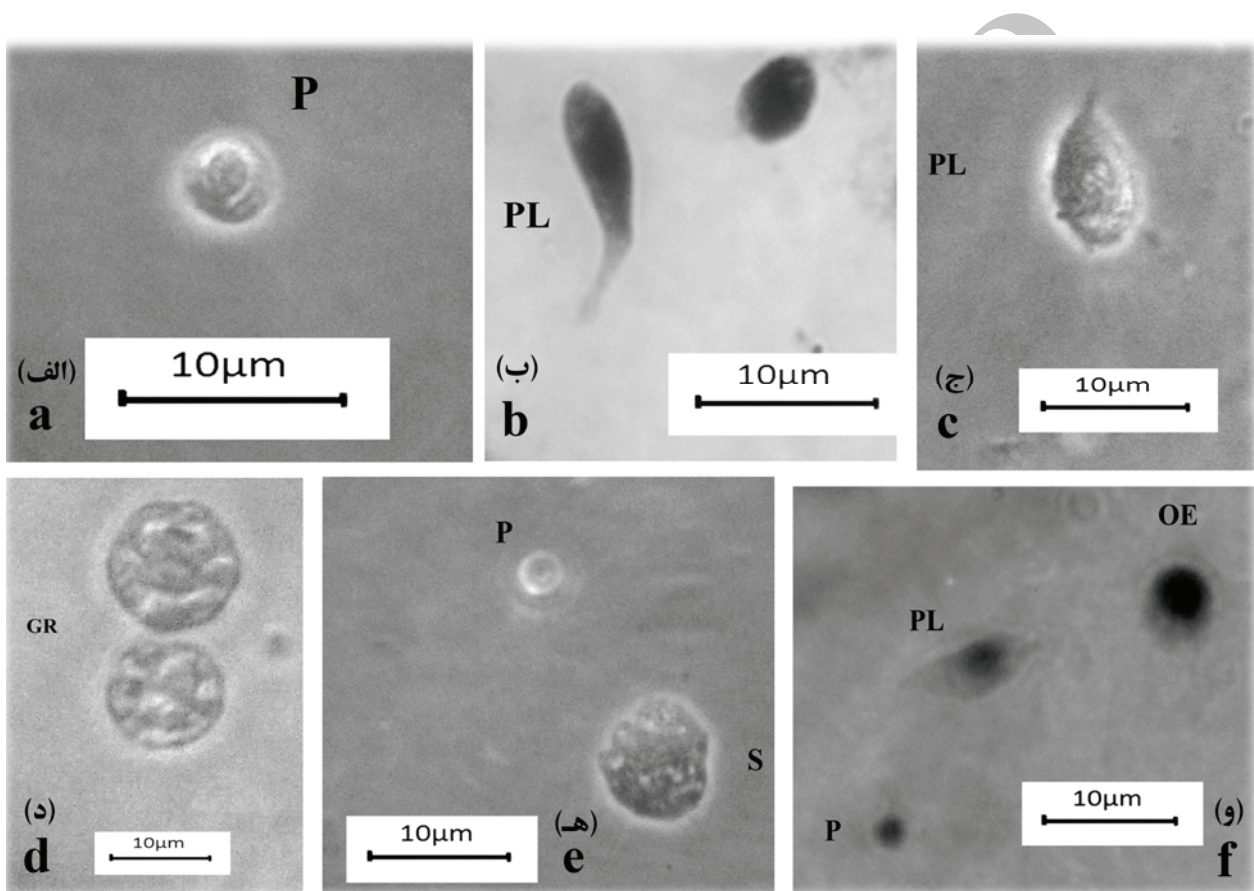
تعداد هموسیت‌ها در ۱ میلی‌متر مربع $\times 10$

تعداد حفره‌های شمارش شده

اندازه‌گیری حجم همولنف به طریق خون‌گیری با استفاده از روش ترا و همکاران (Terra *et al.*, 1975) در مورد لارو *Rhynchosciara americana* انجام شد. بدین صورت که وزن یک قطعه کوچک از کاغذ صافی به ابعاد ۱ سانتی‌متر مربع به صورت خشک اندازه‌گیری شد و سپس با قطع یکی از پاهای لارو، شفیره و حشره کامل یک قطره همولنف استخراج و روی کاغذ صافی ریخته و وزن کاغذ صافی خیس شده نیز اندازه‌گیری شد و تفاوت وزن کاغذ

گرد و بیضوی می باشند و در مقایسه با پلاسماتوسیت ها هسته آنها کوچک تر است. این سلول ها، شکننده هستند به این معنی که هنگام برخورد به جسم خارجی دیواره ی آنها پاره شده و محتویات داخلی سلول آزاد می شود، همچنین این سلول ها در فاگوسیتوز، تشکیل کپسول و انعقاد خون شرکت می کنند بنابراین مانند پلاسماتوسیت ها در کلیه ی فرآیندهای سیستم ایمنی حشره شرکت دارند (Chapman, 1998). گرانولوسیت های مشاهده شده در تحقیق حاضر تقریباً گرد

عرض پلاسماتوسیت ها به ترتیب $12 \pm 1/83$ و $4/5 \pm 0/5$ میکرومتر و نسبت طول سیتوپلاسم به هسته $3/2$ میکرومتر محاسبه شد (جدول ۱). این سلول ها در لارو سن یک، لارو سن دو، لارو سن سه و حشره کامل بیشترین فراوانی را داشته و به ترتیب ۳۹، ۳۹/۵، ۴۶/۵، ۴۴/۵ درصد کل سلول های خونی را تشکیل می دهند. در شفیره پلاسماتوسیت ها ۱۸/۵ درصد از کل سلول های خونی را به خود اختصاص می دهند (جدول ۲). گرانولوسیت ها معمولاً



شکل ۱. سلول های خونی سوسک برگ خوار نارون. الف- پروهموسیت (میکروسکوپ اختلاف فاز)، ب- پلاسماتوسیت (میکروسکوپ نوری)، ج- پلاسماتوسیت (میکروسکوپ اختلاف فاز)، د- گرانولوسیت (میکروسکوپ اختلاف فاز)، ه- پروهموسیت و اسفرولوسیت (میکروسکوپ اختلاف فاز)، و- پلاسماتوسیت و انوسیتوید (میکروسکوپ نوری)

Figure 1. Hemocytes of elm leaf beetle. a) prohemocyte (phase contrast microscopy), b) Plasmatocyte (light microscopy), c) Plasmatocyte (phase contrast microscopy), d) Granulocyte (phase contrast microscopy), e) Prohemocyte and Spherulocyte (phase contrast microscopy), f) Plasmatocyte and Oenocytoid (light microscopy)

کمتری برخوردارند. شمارش کل سلول‌های خونی سوسک برگ‌خوار نارون مورد بررسی قرار گرفت که در لارو سن یک $4 \pm 40 \pm 620$ لارو سن دو $50 \pm 3 \pm 940$ ، لارو سن سه $29 \pm 1253 \pm 3$ ، شفیره $8 \pm 34 \pm 1956 \pm 6$ و حشره کامل $3 \pm 43 \pm 1326 \pm 6$ سلول در میلی‌مترمکعب خون بود (جدول ۳).

بررسی حاضر در بسیاری از توصیف‌های ارائه شده از نظر شکل و فراوانی با منابع موجود در مورد سایر سخت‌بال‌پوشان مطابقت دارد، به عنوان مثال: ماناچینی (Manachini et al., 2011) در سرخرطومی قرمز نخل تعداد پلاسماتوسیت‌ها (تقریباً ۵۰ درصد)، گرانولوسیت‌ها (تقریباً ۳۵ درصد)، پروهموسیت‌ها (تقریباً ۸ درصد)، ائونوسیت‌ها (تقریباً ۴ درصد)، اسفرولوسیت‌ها (تقریباً ۳ درصد) گزارش کردند. در تحقیقی که آندارد و همکاران (Andrade et al., 2010) روی لارو *Anticarsia gemmatalis* ارائه دادند، تعداد سلول‌های خونی را به این ترتیب گزارش کردند، پلاسماتوسیت‌ها $8 \pm 47 \pm 1$ ، گرانولوسیت‌ها $8 \pm 15 \pm 1$ ، پروهموسیت‌ها $8 \pm 2 \pm 1$ ، اسفرولوسیت‌ها $9 \pm 25 \pm 2$ ، ائونوسیت‌ها $2 \pm 7 \pm 1$ ، ورمی‌سیت‌ها $5 \pm 0 \pm 1$. که همانند نتایج به دست آمده در تحقیق کنونی پلاسماتوسیت‌ها بیشترین فراوانی را در بین دیگر سلول‌های خونی نشان می‌دهند. آل خلیفه و سیدی‌کوی (Al-khalifa and Siddiqui, 1999) شش نوع سلول خونی به نام‌های پروهموسیت، پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، ائوسیتوئید، اسفرولوسیت و آدیپوهوموسیت در سرخرطومی *Rhynchophorus ferrugineus* گزارش کردند. ولی استراند (Strand, 2008) آدیپوهوموسیت را از اجزای بافت چربی می‌داند و در زمره سلول‌های خونی محسوب نمی‌کند. اندازه طول سلول‌ها در این سرخرطومی به ترتیب برابر ۱۹-۱۳، ۱۶-۱۲، ۱۲-۸، ۱۵-۱۱، ۱۰-۷، ۱۷-۱۳ میکرومتر ثبت کردند، که در تحقیق حاضر پنج نوع سلول به نام‌های پروهموسیت، پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، ائوسیتوئید و اسفرولوسیت شناسایی شد و اندازه این سلول‌ها به ترتیب $1 \pm 12 \pm 1$ ، $3 \pm 7 \pm 2$ ، $5 \pm 6 \pm 2$ ، $5 \pm 7 \pm 1$ ، $3 \pm 7 \pm 1$ و $5 \pm 5 \pm 0$ میکرومتر محاسبه شد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین طول سلول‌ها در سرخرطومی *R. ferrugineus* و گونه

و دارای هسته مشخصی هستند (شکل ۱-د). طول و عرض این سلول‌ها $3 \pm 7 \pm 1$ میکرومتر و نسبت طول سیتوپلاسم به هسته 9 ± 2 میکرومتر محاسبه شد (جدول ۱). گرانولوسیت‌ها در شفیره دارای بیشترین فراوانی بوده و 5 ± 9 در صد کل سلول‌های خونی را تشکیل می‌دهند. فراوانی گرانولوسیت‌ها در مراحل مختلف رشدی سوسک برگ‌خوار نارون در جدول ۲ آورده شده‌اند.

ائوسیتوئیدها دارای هسته‌ی کوچک اما دارای سیتوپلاسم حجیم و بزرگ‌اند، فاقد حرکت بوده و دیواره‌ی سلولی آن‌ها مانند گرانولوسیت‌ها شکننده می‌باشد (Chapman, 1998). این سلول‌ها در سوسک برگ‌خوار نارون دارای شکلی گرد با هسته کوچکند که هسته در حاشیه سیتوپلاسم قرار می‌گیرد (شکل ۱-و). طول ائوسیتوئیدها در این حشره $3 \pm 1 \pm 7$ میکرومتر و عرض آن $5 \pm 5 \pm 0$ میکرومتر و نسبت طول سیتوپلاسم به هسته 6 ± 2 میکرومتر محاسبه شد (جدول ۱). فراوانی ائوسیتوئیدها در مراحل مختلف رشدی حشره در جدول ۲ آورده شده است.

اسفرولوسیت‌ها سلول‌های گرد و فاقد حرکت بوده و دارای خاصیت فاگوسیتوزی‌اند، درون آن‌ها ذرات گرد به اندازه‌ی ۱ تا ۵ میکرون دیده می‌شود که واکوئل مانند به نظر می‌آیند و نقش آن‌ها هنوز مشخص نمی‌باشد اما گفته می‌شود که ممکن است نقش ذخیره‌ای داشته باشند و اظهار می‌شود که در برخی از حشرات در انتقال اجزای کوتیکول (مواد سازنده‌ی کوتیکول) نقش دارند (Chapman, 1998). این سلول‌ها در حشرات دارای دگرذیسی ناقص وجود ندارند. در تحقیق حاضر سلول‌های مذکور تقریباً بیضوی و نامنظم بودند و حاوی تعداد زیادی واکوئل و هسته‌ی کوچک در وسط سلول بودند (شکل ۱-ه). طول این سلول‌ها در این حشره $5 \pm 6 \pm 2$ میکرومتر و عرض آن $5 \pm 7 \pm 1$ میکرومتر و نسبت طول سیتوپلاسم به هسته 5 ± 2 میکرومتر محاسبه شد (جدول ۱). فراوانی این سلول‌ها در مراحل مختلف رشدی حشره متفاوت بود. فراوانی اسفرولوسیت‌ها در مراحل مختلف رشدی حشره در جدول ۲ آورده شده است. بنابراین اسفرولوسیت‌ها نسبت به دیگر سلول‌های خونی از فراوانی

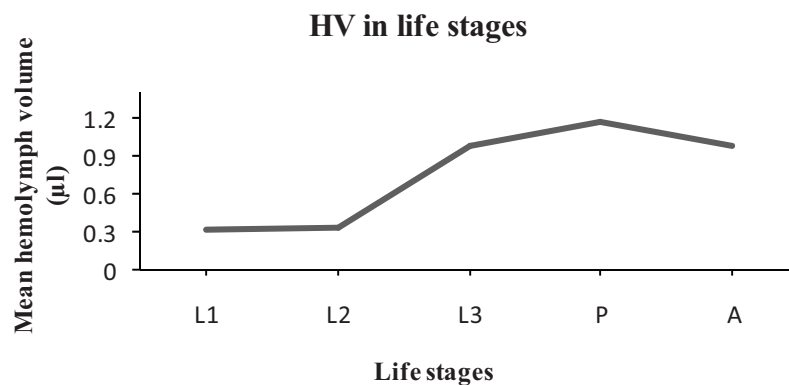
پشه کولکس انجام شد اندازه سلولها بر حسب میکرومتر برای سلولهای پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، اسفرولوسیت، انوسیتوئید، پروهموسیت و آدیپوهوسیت برابر ۲۲-۶، ۱۳-۸، ۱۰-۸، ۱۳-۸، ۸-۵، ۱۵-۸ میکرومتر محاسبه شد و در کل اندازه سلولها در سوسک برگ خوار نارون کوچکتر از سلول-های خونی پشه می باشد. در تحقیقی که توسط زیبایی و جلالی سندی (Zibae and Jalali Sendi, 2011) روی سلولهای خونی لاروهای سن پنجم دو بال پولکدار به نام های *Glyphodes pyloalis* و *Hyphntria cunea* انجام-گرفت. در هر گونه شش نوع سلول خونی که عبارتند از: پروهموسیت، پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، انوسیتوئید، اسفرولوسیت و آدیپوهوسیت شناسایی شد. شمارش تفرقی سلول های خونی نشان داد که گرانولوسیت و پلاسماتوسیت در هر دو گونه از فراوانترین سلولها بوده که به ترتیب ۲۷ و ۲۳ درصد برای برگ خوارتوت و ۲۸ و ۳۶ درصد برای پروانه سفید اشجار به ثبت رسید که دو نوع سلول مذکور در مراحل مختلف رشدی سوسک برگ خوار نارون مقدار متفاوتی دارد که به ترتیب در لاروسن یک ۲۸ و ۳۹، لاروسن دو ۱۹ و ۳۹/۵، لاروسن سه ۶/۵ و ۴۶/۵، شفیره ۵۹/۵ و ۱۸/۵ و حشره کامل ۲۰ و ۴۴/۵ درصد محاسبه شد و در شفیره گرانولوسیتها و در بقیه مراحل رشدی پلاسماتوسیتها از فراوانترین سلولها می باشد.

حجم همولنف یک عامل مهمی است که تعداد کل سلولهای در گردش را تحت تاثیر قرار می دهد. حجم همولنف همیشه ثابت نیست (Shapiro, 1979, Pathak, 1986) لذا افزایش یا کاهش آشکار در شمارش سلول خونی می تواند به دلیل افزایش یا کاهش در حجم همولنف باشد (Wheeler, 1963). حجم همولنف (HV) برای تمام مراحل زندگی سوسک برگ خوار نارون محاسبه شد. در سه مرحله لاروی به خصوص در لاروسن ۳ با افزایش اندازه لارو حجم همولنف هم افزایش یافت، بیشترین حجم همولنف در شفیره مشاهده شد و سپس حجم همولنف در حشره کامل مقداری کاهش یافت و تقریباً حجم همولنف لاروسن ۳ و حشره کامل برابر می باشد (شکل ۲).

مورد مطالعه در تحقیق کنونی مشاهده شد. در تحقیقی که توسط گیگلیو و همکاران (Giglio et al., 2008) روی سوسک *Carabus lefebvrei* Dejean انجام شد چهار نوع سلول خونی به نامهای پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، انوسیتوئید و پروهموسیت شناسایی شد و میانگین اندازه سلولها بر حسب میکرومتر به ترتیب ۸، ۱۰، ۱۳، ۱۵ گزارش کردند که در تحقیقات حاضر یک نوع سلول خونی دیگر علاوه بر سلولهای مذکور به نام اسفرولوسیت شناسایی شد و میانگین اندازه سلولها در مطالعه کنونی با سلولهای گونه *C. lefebvrei* تفاوت قابل ملاحظه ای داشت. سیلوا و همکاران (Silva et al., 2002) گزارشی از شمارش تفرقی و کل سلولهای خونی لاروسن ۳ پارازیت نشده *Anastrepha obliqua* ارائه دادند که در آن شش نوع سلول خونی پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، اسفرولوسیت، انوسیتوئید، پروهموسیت و آدیپوهوسیت شناسایی شد و در شمارش کل مقدار آن حدود $51/1 \pm 345/0$ سلول در میلی-مترمکعب همولنف گزارش شد اما در مطالعه حاضر پنج نوع سلول خونی به نامهای پروهموسیت، پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، انوسیتوئید و اسفرولوسیت شناسایی شد و تعداد کل سلولهای خونی لاروسن سه، $29 \pm 1253/3$ سلول در میلی-مترمکعب همولنف محاسبه شد، لذا مقدار آن به مراتب بیشتر از لاروسن سه *A. obliqua* می باشد و در شمارش تفرقی به ترتیب درصد فراوانی پلاسماتوسیت ۵۷/۶، گرانولوسیت ۴/۰، اسفرولوسیت ۰/۳، انوسیتوئید ۰/۳، پروهموسیت ۳۷/۵ و آدیپوهوسیت ۰/۳ گزارش کردند. در مطالعه ای که توسط برایر و همکاران (Brayer et al., 2004) روی سلولهای خونی *Culex quinquefasciatus* انجام شد شش نوع سلول خونی به نام-های پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، اسفرولوسیت، انوسیتوئید، پروهموسیت و آدیپوهوسیت شناسایی شد که درصد فراوانی آنها به ترتیب برابر ۴۳/۴، ۴/۳، ۱/۶، ۴/۶، ۹/۳، ۰/۸ محاسبه شد که باز هم تفاوت قابل ملاحظه ای بین اسفرولوسیتها و انوسیتوئیدهای این گونه با گونه مورد مطالعه در تحقیق کنونی مشاهده شد. همچنین در مطالعه ای که توسط برایر و همکاران (Brayer et al., 2004) روی

americana، حجم همولف را ۰/۳ در صد حجم بدن گزارش کردند و این نسبت به بقیه گزارش‌هایی که سایر محققین در مورد اغلب حشرات ارائه دادند کمتر بود. باک (Buck, 1953) اعلام کرد که سلول‌های خونی در بیشتر حشرات بین ۰/۵ تا ۱ درصد حجم کل همولف را اشغال می‌کنند. نتایج تحقیق حاضر می‌تواند قدم اول در ارائه نقش هموسیت‌های سوسک برگ‌خوار نارون تلقی شود. علاوه بر این، این نتایج می‌تواند دانش ما را در مورد روش‌های بازدارندگی فعالیت ایمنی سلول‌ها در این حشره افزایش دهد. نباید فراموش کرد که این سلول‌ها نقش مهمی در تعامل حشره با حمله پارازیتوئیدها، اثرات تخریبی محیطی و سموم به کار گرفته شده دارند.

گاردینر و استراند (Gardiner and Strand, 2000) گزارش کردند که غلظت در هر میکرولیتر همولف و حجم همولف در دوره طول رشد هر لارو در دو گونه بید مطالعه شده توسط این محققین افزایش داشت. آنها نتیجه‌گیری کردند که افزایش نمایی در وزن لارو در طول رشد می‌تواند دلیل افزایش در فراوانی هموسیت‌ها در هر لارو باشد. باراکو و کستانی (Barracco and Cestari, 1984)، حجم همولف مراحل مختلف لاروی دو جنس نر و ماده *Trichosia pubescens* را بررسی نمودند و نشان دادند که لاروهای ماده به دلیل داشتن اندازه بزرگ‌تر نسبت به لاروهای نر، میزان حجم همولف بیشتری داشتند. ترا و همکاران (Terra et al., 1975) برای لارو R.



شکل ۲- حجم همولف (μl) در مراحل مختلف زندگی سوسک برگ‌خوار نارون (n=10)، (SE± میانگین) لارو سن ۱-۳، شفیره و حشره کامل

Figure 2. Hemolymph volume (HV) in different stages of elm leaf beetle (n=10) (SE± M) L1- L3= larval stages 1-3, P=Pupa and A= Adult

جدول ۱- اندازه طول و عرض و نسبت طول سیتوپلاسم به هسته (میکرو متر) انواع سلول های خونی سوسک برگ خوار نارون (میانگین \pm خطای استاندارد)

Table 1. Length, width and cytoplasmic/ nuclear ratio (μm) of different hemocytes in *Xanthogaleruca luteola* (Mean \pm SE)

Measurement	PL	P	G	OE	S
Length	12 \pm 1.83	5.5 \pm 0.5	7.25 \pm 0.83	7.5 \pm 1.83	6.25 \pm 0.55
Width	4.5 \pm 0.5	5.5 \pm 0.5	7.25 \pm 0.83	5.5 \pm 0.5	5.75 \pm 0.5
AC/AN	3.2	1.46	2.9	2.6	2.5

PL= Plasmatocyte, P= Prohemocyte, G= Granulocyte, OE= Oenocyte, S= Spherolucyte, AC/AN= proportion of cytoplasm to nucleus length

جدول ۲- در صد انواع سلول های خونی در مراحل مختلف رشدی سوسک برگ خوار نارون

Table 2. The percentage of different hemocytes of *Xanthogaleruca luteola*

Life Stages	PL	P	G	OE	S
Larva 1	39	5.5	28	16.5	11
Larva 2	39.5	8.5	19	22.5	10.5
Larva 3	46.5	13.5	6.5	20	13.5
Pupa	18.5	11	59.5	3.5	7.5
Adult	44.5	11	20	15.5	9

PL= Plasmatocyte, P= Prohemocyte, G= Granulocyte, OE= Oenocyte, S= Spherolucyte

جدول ۳- تعداد کل سلول های خونی (سلول / میلی متر مکعب همولنف) در مراحل مختلف رشدی سوسک برگ خوار نارون (میانگین \pm خطای استاندارد)

Table 3. Total hemocyte count (cell / mm^3) in different stages of *Xanthogaleruca luteola* (Mean \pm SE), (P < 0.05; n = 3)

	Larva 1	Larva 2	Larva 3	Pupa	Adult
THC	620 \pm 40.4 d	940 \pm 50.3 c	1253.3 \pm 29 b	1956.6 \pm 34.8 a	1326.6 \pm 43.3 b

References

- Al- Khalifa, S. M, and Siddiqui, I. M. 1999. Study of free haemocytes of Red Palm Weevil. *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliver) (Coleoptera: Curculionidae) of Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences** 6(1): 3-7.
- Andrade, F. G., Negreiro, M. C. C., Levy, S. M., Fonseca, I. C. B., Moscardi, F. and Falleiros, A. M. F. 2010. Hemocyte Quantitative Changes in *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Infected by AgMNPV. **Brazilian Archives of Biological Technology** 53: 279-284.
- Arbab, A., Jalali Sendi, J. and Sahragard, A. 2001. On the biology of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola*. Mull.(Col.:Chrysomelidae) in laboratory conditions. **Entomological Society of Iran** 21(2): 73-85.
- Barracco, M. A. and Cestari, A. N. 1984. Hemocyte population dynamics in *Trichosia pubescens* larvae (Diptera: Sciaridae) and hemolymph analyses. **Review in Brazilian Genetics** 3, 477-495.
- Barracco, M. A. and Cestari, A. N. 1984. Studies on the Hemocytes of *Trichosia pubescens* (Diptera: Sciaridae) larvae. **Review in Brazilian Genetics** 3: 451-475.
- Bogdan, C., Rollingshof, M. and Diefenbach, A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology** 12: 64-76.
- Brayer, F., Araujo, H. R. C., Cavalcanti, M. G. S., Alves, L. C., and Peixoto, C. A. 2004. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Micron** 36: 352-367.
- Buck, J. B. 1953. Physical properties and chemical composition of insect blood. In: insect Physiology. (Roeder, K. D., ed.). **John Wiley & Son, New York**, 147-190.
- Chapman, R. F. 1998. The Insects (Structure and Function). **Cambridge University Press** pp. 94-141.
- Cornelis, L. and Soderhall, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Review** 198: 116-126.
- Dahlsten, D. L. 1994. Elm leaf beetle management-the California experience. **Plant protection Quarterly** 9: 42-43.
- Ephrusi, B. and Beadle, G. W. 1936. A technique of transplantation for *Drosophila*. **American Naturalist** 70: 218-23.
- Gardiner, E. M. M., Strand, M. R. 2000. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includes* and *Spodoptera frugiperda*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 43 (4): 147-164.
- Giglio, A., Battistella, S., Talarico, F. F., Brandmayr, T. Z. and Giulianini, P. G. 2008. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Cheatocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera: Carabidae), Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self challenge. **Micron** 39 (5): 552-558.
- Gillespie, J. P., Kanost, M. R. and Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology** 42: 611-643.
- Imler, J. L. and Bulet, P. 2005. Antimicrobial peptides in *Drosophila*, structures, activities and gene regulation. In *Mechanisms of Epithelial Defense* (D. Kabelitz and J. M. Schroder, Eds.). **Karger, Basel** 86. pp 1-21.
- Jones, J. C. 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. **American Zoologist**. 2, 209-246.
- Jones, J. C. 1967. Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* L. **Biological Bulletin** (Woods Hole) 132: 211-221.
- Lackie, A. M. 1988. Haemocyte behaviour. **Advances in Insect Physiology** 21: 85-178.
- 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.
- Pathak, J., 1986. Haemograms and endocrine control in insects; in *Immunity in invertebrates* (ed.) Brehelin (Berlin: Springer-Verlag) pp 49-59.
- Richardson, C. H., Burdette, R. C. and Eagleson, C. H. 1931. Larve blood volume. **Annals of the Entomology Society of America** 24: 503-506.
- Schmidt, O., Theopold, U. and Strand, M. 2001. Innate immunity and its evasion and by hymenoptera endoparasitoid. **Bioassay** 23: 344-351.

- Shapiro, L.**, 1979. Changes in haemocyte population. In Gupta A. P. (Ed.). *Insect haemocytes*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 475-525.
- Silva, J. E. B., Boleli, I. C. and Simoes, Z. L. P.** 2002. Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. **Brazilian Biology** 62(4A): 689-699.
- Strand, M. R.** 2008. Insect hemocytes and their role in immunity. In N. E. Beckage (Ed.). *Insect Immunity*. Academic Press USA. pp. 25-48.
- Strand, M. R. and Pech, L. L.** 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid–host relationships. **Annual Review of Entomology** 40: 31–56.
- Terra, W. R., Bianchi, A. G. and Lara, F. J. S.** 1975. Physical properties and chemical composition of the haemolymph of *Rhynchosciara americana* (Diptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology** 47: 117-129.
- Theopold, U., Schmidt, O., Soderhall, K. and Dushay, M. S.** 2004. Coagulation in arthropods, defence, wound closure and healing. **Trends in Immunology** 25: 289–294.
- Wheeler, R.**, 1963. Studies on the total haemocyte count and haemolymph volume in *Periplaneta americana*; *Federal Practitioner* 21: 123.
- Yeager, J. F.** 1945. The blood picture of the Southern armyworm (*Prodenia eridamin*). **Journal of Agricultural Research** 71: 1–40.
- Zibae, I. and Jalali Sendi, J.** 2011. Identification, differential and total count on hemocytes of *Hyphantria cunea* (Drury) and *Glyphodes pyloalis* Walker and investigation on the effect of JH I on these cells. **Journal of Entomological Society of Iran** 30(2): 47-67.

Archive of SID

Identification, total and differential counts of hemocytes in different life stages *Xanthogaleruca luteola* Mull. (Coleoptera: Chrysomellidae)

R. Kohan¹, J. Jalali Sendi^{*2}, A. Zibae³

1. M.Sc. Student, Institute of higher education, Jahade Daneshgahi, Kashmar branch, Kashmar, Iran
2 and 3. Associate Professor and Assistant Professor, respectively, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Guilan

(Received: May 30, 2012- Accepted: June 27, 2012)

Abstract

Various cell types, total and differential counts of hemocytes in different life stages of larva, pupa and adult of elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* were investigated. Five types of hemocytes based on the morphology were identified; Prohemocyte, Plasmatocyte, Granulocyte, Oenocytoid and Spherolucyte. Differential count showed the plasmatocyte as the most abundant cell type in Ist, IInd, III larval instar and adult insect as 39, 39.5, 46.5 and 44.5 percent, while the granulocyte was the most abundant cell type (59.5 percent) in pupa. Total hemocyte count was calculated and it was found to be 620 ± 40.4 , 940 ± 50.3 , 1253.3 ± 29 , 1956.6 ± 34.8 and 1326.6 ± 43.3 in Ist, IInd, III larval instar, pupa and adult insect. The identification of cell types and their characteristics could be used as a base for further investigation on the immunological system of this important pest.

Key words: hemocyte, *Xanthogaleruca luteola*. Immunological System.

*Corresponding author: jjalali@guilan.ac.ir