

شناسایی سلول‌های خونی لارو شب‌پره *Ectomoyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)

رویا خسروی^{۱*}، جلال جلالی سندی^۲ و وحید قاسمی^۳

۱ و ۲ به ترتیب دانشجوی دکتری حشره شناسی کشاورزی و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان ۳، دانشجوی دکتری حشره شناسی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۷)

چکیده

حشرات برای مقابله با عوامل بیماری‌زا و پارازیتوئیدها از واکنش‌های دفاعی سلولی و هومورال استفاده می‌کنند. سلول‌های خونی حشرات نقش اساسی در سیستم ایمنی آن‌ها داشته و دارای اشکال و فعالیت متنوع هستند. شناسایی سلول‌های خونی و جمعیت آن‌ها در جهت کنترل بهتر آفت مورد نظر به ما کمک خواهد کرد. در این تحقیق سلول‌های خونی شب‌پره *Ectomoyelois ceratoniae* در پنج سن لاروی با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفتند. برای شناسایی این سلول‌ها از رنگ‌آمیزی گیمسا استفاده شد. پنج نوع هموسیت در لارو این حشره شناسایی شد که عبارتند از: پرسلول‌های خونی، پلاسماتوسیت‌ها (با چندین شکل مورفولوژیکی)، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها و انوسیتوئیدها. همه سلول‌ها در همه مراحل مورد بررسی وجود داشتند. اشکال تقسیم میتوزی نیز در بین پلاسماتوسیت‌ها، پروهموسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها مشاهده شد. شمارش کل سلول‌ها در مراحل مختلف نشان داد که با افزایش سن لاروی تعداد کل سلول‌های در حال گردش نیز افزایش می‌یابد. با شمارش تفریقی سلول‌های خونی نیز مشخص شد که پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در همه مراحل به جز لارو سن یک بیشترین فراوانی را به خود اختصاص می‌دهند.

واژه های کلیدی: سلول‌های خونی، شمارش تفریقی، شب‌پره خرنوب، مطالعه میکروسکوپی

مقدمه

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 همولف در حشرات است که منجر به حساسیت و یا مقاومت حشره در برابر عامل بیماری‌زا می‌شود (Lavin and Strand, 2002).

بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک، عملکرد و شیمی بافت، چندین نوع از سلول‌های خونی حشرات شناسایی شده‌اند (Gupta, 1985; Brehelin and Zachary, 1986). معمول‌ترین سلول‌های خونی حشرات که در منابع گزارش شده‌اند پروهموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسماتوسیت‌ها، اسفرلوسیت‌ها و ائوسیت‌ها هستند. مطالعات تمایز سلول‌های خونی در چندین گونه از حشرات پروهموسیت‌ها را به عنوان سلول پایه مشخص کرده‌اند که از سایر انواع هموسیت قابل تمیز هستند (Gupta, 1985). در کرم ابریشم *Bombyx mori* ثابت شد که به طور تقریبی ۴۳٪ از پروهموسیت‌ها به پلاسماتوسیت‌ها، اسفرلوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها تبدیل می‌شوند (Yamashita and Iwabuchi, 2001).

با توجه به این که سلول‌های خونی دارای نقش بسیار مهمی در سیستم ایمنی حشرات هستند و آن‌ها را در برابر عوامل میکروبی، استرس‌های ناشی از محیط و سموم شیمیایی محافظت می‌کنند، شناسایی سلول‌های خونی و جمعیت آن‌ها ما را در جهت کنترل بهتر آفت مورد نظر کمک خواهد کرد. یکی از جنبه‌هایی که می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد، یافتن بهترین بیمارگر برای کنترل آفت و ارزیابی توانایی حشره برای بهبود یافتن از آلودگی به بیمارگر است (Parmakelis et al., 2008). در این مطالعه انواع سلول‌های خونی موجود، ویژگی‌های مورفولوژیکی و تغییرات جمعیت سلول‌های خونی در سنین مختلف لاروی با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی بررسی شد. با توجه به این که سلول‌های خونی شاخصی از اختلالات فیزیولوژیکی هستند این تغییرات می‌تواند به حساسیت به حشره‌کش‌ها و مطالعه نحوه تاثیر آن‌ها ارتباط داده شود.

شب‌پره خرنوب *Ectomoyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) آفت میوه و چندین‌خوار است. خرنوب، آکاسیا، اقایا، بادام، فندق، گردو، انار، انجیر، پرتغال، گریپ‌فروت، شاه‌بلوط، ازگیل ژاپنی، تمرهندی، سیر، خرما، زیتون، سیب، گلابی، به، هلو، زردآلو، پسته، خرما، خشک، کشمش، انجیرخشک و سایر میوه‌های خشک به عنوان میزبان‌های آن در دنیا گزارش شده است (Mehrnejad, 1993). این آفت بیشتر روی خشکبار در انبار فعالیت می‌کند، همچنین آفت مرکبات نیز محسوب می‌شود. این آفت همه‌جائی بوده و در کشورهای مدیترانه‌ای روی گیاه خرنوب فعالیت می‌کند. میوه‌های گیاه خرنوب که در مناطق مدیترانه‌ای می‌روید، میزبان عمده این حشره هستند و به همین دلیل آن را شب‌پره خرنوب نامیده‌اند. این حشره در کشورهای عراق، عربستان، ترکیه، ارمنستان، استرالیا، فلسطین، ایتالیا، آمریکای مرکزی، کالیفرنیا و کشورهای ناحیه مدیترانه پراکنش دارد. شب‌پره خرنوب *E. ceratoniae* آفت کلیدی و مهم‌ترین عامل کاهش کمی و کیفی انار در کشور ایران محسوب می‌شود (Norouzi et al., 2008). همچنین این آفت روی پسته در طبیعت، هنگام رسیدن محصول و در انبار در مدت نگهداری، زیان‌های قابل توجهی وارد می‌سازد. انجیر نیز یکی دیگر از میزبان‌های مهم این آفت در ایران است (Mehrnejad, 1993).

حشرات در همولف خود دارای سلول‌های خونی هستند که این سلول‌های خونی عامل اصلی پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال شامل فاگوسیتوز و کپسوله شدن، و القاء پپتیدهای ضد میکروبی، مولکول‌های چسبندگی سلولی، لیزوزیم، لکتین‌ها و سیستم پیش فنل اکسیداز می‌باشند (Hoffman et al., 2004; Kanost et al., 2003). این سلول‌ها دارای اشکال و فعالیت متنوع هستند. شکل ظاهری و اندازه این سلول‌ها از زمانی به زمان دیگر بر حسب شرایط فیزیولوژیکی حشره تغییر می‌کند. روش‌های آزمایش و طبقه‌بندی سلول‌های خونی هنوز استاندارد نشده و طبقه‌بندی‌ها و شکل‌های مختلفی از آن‌ها به چاپ رسیده است. حشرات دارای سیستم دفاعی مختلف هستند و حتی سیستم دفاعی یک حشره در

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

لاروهای سن آخر شب‌پره خرنوب از باغ‌های انار شهرستان محلات جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. لاروها درون ظروف مخصوص پرورش روی غذای مصنوعی (آرد ۷۲ گرم، مخمر ۱ گرم، گلیسرین ۱۰ گرم، عسل ۱۲ گرم، آب ۵ میلی‌لیتر) در دمای ثابت $28 \pm 1^\circ \text{C}$ و رطوبت نسبی ۷۰-۸۰٪ در شرایط نوری ۱۶:۸ (روشنایی: تاریکی) قرار گرفتند (Teimury, 2011). مراحل لاروی، پیش شفیرگی و شفیرگی در این ظروف سپری شد. پس از ظهور حشرات کامل، آن‌ها به ظروف استوانه‌ای مخصوص تخم‌ریزی به ابعاد 50×20 سانتی‌متر منتقل شدند. سپس تخم‌ها به ظروف مخصوص پرورش لارو روی غذای مصنوعی منتقل شدند و مراحل لاروی و شفیرگی در این ظروف سپری شد.

شمارش تفریقی و کل سلول‌های خونی با میکروسکوپ نوری

به طور مختصر، برای شمارش تفریقی سلول‌های خونی ابتدا سطح شکمی لاروها (۱۰ لارو) با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شده، سپس با بردن پای کاذب مقدار ۵ میکرولیتر همولنف جمع‌آوری شد. همولنف روی لام قرار داده شد و با لام دیگر با شیب ۴۵ درجه اسمیر تهیه شد. اجازه داده شد تا همولنف به مدت ۲۰ دقیقه در هوای اتاق خشک شود. بعد از آن، سلول‌های خونی با استفاده از رنگ گیمسا به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و سپس با آب مقطر شسته شدند. سپس لام را به مدت ۵ ثانیه داخل محلول کربنات لیتیم فرو برده شد و دوباره با آب مقطر شسته شد. بعد از خشک شدن لام، با استفاده از کانادابالزام لام دائمی تهیه شد. برای شمارش تفریقی در هر لام ۱۰۰ سلول از ۴ گوشه لام شمارش و انواع سلول‌ها تعیین شد. قطر سلول‌ها بر اساس میکرومتر محاسبه و تصاویر لازم تهیه شد.

برای شمارش کل سلول‌های خونی یکی از پاهای کاذب قطع و ۵ میکرولیتر همولنف با ۱۵ میکرولیتر ماده ضد انعقاد (۰/۰۹۸ M NaOH، ۰/۱۸۶ M NaCl، ۰/۰۱۷ M EDTA و ۰/۰۴۱ M اسید سیتریک، pH ۴/۵) رقیق شد (Amaral et

al., 2010). سپس محلول در لام نئوبار قرار گرفته و تعداد سلول‌های خونی در ۴ گوشه و یک منطقه مرکزی، هر کدام به ابعاد ۱ میلی‌متر مربع، شمارش شد. تعداد سلول‌های خونی بر حسب سلول در میلی‌لیتر محاسبه شد.

توصیف سلول‌های خونی با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای مشاهده سلول‌های خونی با میکروسکوپ الکترونی روبشی از روش مناچینی (Manachini et al., 2011) با ایجاد تغییرات جزئی استفاده شد. ابتدا لایه نازکی از همولنف لارو سن پنج در گلو تار آلد هید ۲٪ در بافر فسفات $\text{pH} = 7$ تثبیت شد. سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت نگهداری شد. پس از آن نمونه‌ها در محلول ۱٪ اسمیموم تترا اکسید در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت شدند و برای مدت ۱۵ دقیقه در سری استون ۳۰٪، ۵۰٪، ۷۵٪، ۹۵٪ و ۱۰۰٪ خشک شدند. پس از آن نمونه‌ها در ماده هگزامتیل دی سیلانازان (HMDS) قرار گرفتند و با حدود ۳۰-۲۵ نانومتر طلا پوشانده شده و با میکروسکوپ الکترونی روبشی (VEGA TESCAN) مورد بررسی قرار گرفتند و تصاویر لازم تهیه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده برای هر آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی مورفولوژیکی سلول‌ها

در تحقیق حاضر سلول‌های خونی مراحل لاروی شب‌پره خرنوب با تمرکز بر ویژگی‌های مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی روبشی سلول‌های خونی در حال گردش در این حشره توصیف شدند. در این مطالعه ۵ نوع هموسیت در مراحل لاروی شب‌پره خرنوب مشاهده شد که عبارت بودند از: پروهموسیت‌ها، پلاسماتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اسفرولوسیت‌ها و انوسیتوئیدها. وگو و کیتانو (Wago and

رفتاری در این سلول را گزارش کرده‌اند که آن را از پلاسماتوسیت مجزا می‌کند، آن‌ها در (*Prodenia*, Jones, 1959) و (*Calpododes ethlius* Stoll, 1973) (Lai-Fook, 1973) به عنوان پلاسماتوسیت طبقه‌بندی شده‌اند. در بیشتر گونه‌های بال‌پولک‌داران، گرانول در پلاسماتوسیت‌ها وجود ندارد (Ribeiro and Brehelin, 2006)، اما در *Galleria mellonella* این سلول‌ها ممکن است حاوی گرانول باشند (Shemit and Ratcliffe, 1977). تمامی محققین معتقدند که پلاسماتوسیت‌ها در تشکیل کپسول در اطراف اجسام خارجی بزرگ، یا گره‌های اطراف توده‌ای از باکتری نقش دارند. تعدادی از محققین نقش فاگوسیتوزی پلاسماتوسیت‌ها را تأیید کرده‌اند (Ratcliffe and Rowley, 1975; Tojo, 2000; Ling and Yu, 2006; et al., 2000) اما تعدادی دیگر به وضوح بیان کرده‌اند که آن‌ها نقش فاگوسیتوزی ندارند (Akai and Sato, 1973; Neuwirth, 1974; Beaulaton, 1979).

گرانولوسیت‌ها به اشکال گرد و بیضوی و سلول‌هایی کوچک‌تر از پلاسماتوسیت‌ها و بزرگ‌تر از پروهموسیت‌ها هستند (جدول ۲) و در مقایسه با پلاسماتوسیت‌ها دارای هسته کوچک‌تر می‌باشند. این سلول‌ها به خاطر داشتن تعداد زیاد گرانول در سیتوپلاسم به آسانی از سایر سلول‌ها تشخیص داده می‌شوند (شکل ۱-د). سطح گرانولوسیت‌ها هنگام مشاهده با میکروسکوپ الکترونی روبشی به صورت نامنظم و دارای برجستگی‌های کوچک است (شکل ۲-د). یکی از وظایف اصلی گرانولوسیت‌ها فاگوسیتوز است که توسط تعداد زیادی از محققین هم در حالت *in vivo* و هم در *in vitro* به اثبات رسیده است (Akai and Sato, 1973; Neuwirth, 1974; Raina, 1976; Brehelin and Hoffmann, 1980; Yokoo et al., 1995; Ribeiro et al., 1996; Pendland and Boucias, 1996; Butt and Shields, 1996; Tojo et al., 2000; Nardi et al., 2001; Costa et al., 2005). همچنین مشخص شده است گرانولوسیت‌ها اولین سلول‌هایی هستند که با جسم خارجی تماس پیدا کرده و تشکیل گره یا کپسول را آغاز می‌کنند (Ribeiro and Brehelin, 2006).

(Kitano, 1985) تنها سه نوع هموسیت را در همولنف سفیده کلم *Pieris rapae crucivora* Boisduval تشخیص دادند. هر چند طبقه‌بندی سلول‌های خونی در حال گردش حشرات گاهی اوقات مبهم است و واژه‌های استفاده شده برای طبقه‌بندی هر نوع سلول متفاوت است. طبقه‌بندی سلول‌های خونی برای راسته‌های مختلف و حتی در یک راسته نیز تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد (Brehelin et al., 1978; Lavin and Strand, 2002; Ribeiro and Strand and Pech, 2006). استرند و پیچ (1995) سلول‌های خونی بال‌پولک‌داران را بر اساس مورفولوژی به پنج طبقه تقسیم‌بندی کرده‌اند؛ پروهموسیت‌ها، سلول‌های گرانولی، پلاسماتوسیت‌ها، سلول‌های اسفرولی و انوسیتوئیدها. همه این پنج نوع هموسیت در مطالعه حاضر یافت شد.

پروهموسیت‌ها کوچک‌ترین سلول‌های خونی مشاهده شده در همولنف شب‌پره خرنوب بودند (جدول ۲). بعد از رنگ‌آمیزی با گیمسا این سلول‌ها با سیتوپلاسم آبی روشن (بازوفیل) و هسته به رنگ ارغوانی تیره رؤیت شدند (شکل ۱-الف). آن‌ها دارای شکل بیضوی، هسته بزرگ و سیتوپلاسمی به شکل لایه نازک هستند. در هنگام مشاهده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نیز سطح پروهموسیت کاملاً صاف بود و در مقایسه با سایر سلول‌ها اندازه کوچکی داشتند (شکل ۲-الف). پروهموسیت‌ها از همه راسته‌های حشرات مورد مطالعه به جز ماهی‌نقره‌ای‌ها و طیاره‌مانندها گزارش شده‌اند (Gupta, 1985).

پلاسماتوسیت‌ها دارای اشکال مختلف کروی، بیضوی، دوکی و کرمی شکل هستند. بعد از رنگ‌آمیزی با گیمسا سیتوپلاسم و هسته دارای رنگ مشابه با پروهموسیت و دارای هسته مشخص و دایره‌ای شکل هستند (شکل ۱ ب و ج). این سلول‌ها نیز هنگام مشاهده با SEM دارای سطح صاف و بدون برجستگی بودند (شکل ۲-ب و ج). پلاسماتوسیت‌ها در فرآیندهای ایمنی مانند فاگوسیتوز و تشکیل گره نقش دارند. شناسایی سلول‌های کرمی‌شکل به عنوان یک نوع سلول مجزا در بسیاری از مطالعات حشرات مورد توجه قرار نگرفته است. با وجود این که تعدادی از محققین تفاوت‌های

معیاری برای اندازه‌گیری غلظت سلول‌های خونی در همولنف است (سلول/میلی‌لیتر). تعداد کل سلول‌های خونی در حال گردش در حشرات همراه با وضعیت فیزیولوژیکی و رشد و نمو تغییر می‌کند (Beetz et al., 2008). امارال و همکاران (Amaral et al., 2010) تعداد کل سلول‌های خونی در روزهای مختلف لارو سن سوم *Melipona scutellaris* را $10^5 \times 8-6$ سلول در میلی‌لیتر گزارش کردند.

شمارش تفریقی سلول‌های خونی (DHC) نشان داد که بیشترین جمعیت پروهموسیت‌ها در لارو سن اول وجود دارد و ۲۰/۷٪ از کل جمعیت سلول‌ها را تشکیل می‌دهند. پلاسماتوسیت‌ها همواره در تمامی سنین در مقایسه با سایر سلول‌های خونی بیشترین جمعیت را داشتند. جلالی سندی و صالحی (Jalali Sendi and Salehi, 2008) نشان دادند جمعیت پروهموسیت‌ها در همه مراحل لاروی به جز لارو سن یک دارای کمترین مقدار است. بیشترین جمعیت پلاسماتوسیت‌ها مربوط به سنین اولیه است و تعداد آن‌ها در سن ۴ و ۵ در مقایسه با سنین اولیه به شکل معنی‌داری کاهش یافته است. گرانولوسیت‌ها در لارو سن ۴ دارای بالاترین تعداد هستند و ۳۷٪ از جمعیت سلول‌ها را تشکیل می‌دهند و کمترین تعداد این سلول‌ها در لارو سن ۱ مشاهده شد. اسفرولوسیت‌ها و انوسیتوئیدها نیز تقریباً ۷-۲٪ جمعیت کل سلول‌ها را تشکیل داده و در تمامی سنین کمترین تعداد را داشتند (جدول ۱).

مطالعات قبلی نیز نشان داده است که فراوانی نسبی انواع مختلف سلول‌های خونی ثابت نبوده و فرض شده است با فعالیت‌های تغذیه و پوست اندازی مرتبط باشد (Shapiro, 1979; Mhalingam and Muralirangan, 1995). اکای و ساتو (Akai and Sato, 1971) گزارش کردند که افزایش اکدایستروئیدها در همولنف کرم ابریشم با رهاسازی شدید سلول‌های خونی از اندام‌های هماتوپوئیتیک همراه خواهد بود و ناکاهارا و همکاران (Nakahara et al., 2003) تأیید کردند این سلول‌های خونی در ابتدا شامل پروهموسیت‌ها و پلاسماتوسیت‌ها بودند. نتایج مشابهی برای سایر شب‌پره‌ها *Pseudoplusia includes* و *Spodoptera*

انوسیتوئیدها سلول‌های گرد و بیضوی با هسته کوچک هستند که دارای سیتوپلاسم حجیم بوده و در سیتوپلاسم آن‌ها ذرات گرد، صفحه‌ای یا سوزنی مشاهده می‌شود. سیتوپلاسم به رنگ آبی دیده می‌شود و هسته در مرکز قرار نداشته و به صورت جانبی می‌باشد (شکل ۱-ه). در بال‌پولکداران، فنول اکسیداز که مسئول ملانیزاسیون همولنف است، در این سلول‌ها وجود دارد (Neuwirth, 1973; Essawy et al., 1985; Riebeiro et al., 1996). ثابت شده است که فنول اکسیداز در ائوسیت‌های کرم ابریشم سنتز شده و در هنگام تجزیه سلول‌ها به درون پلاسمای آزاد می‌شود (Iwama and Ashida 1986; Ashida et al., 1988).

اسفرولوسیت‌ها سلول‌های گرد و بیضوی و تقریباً بزرگ بوده که دارای تعداد کمی اسفرول‌های برجسته و بزرگ می‌باشند. هسته این سلول‌ها نیز کوچک بوده و در مرکز سلول فشرده و متراکم شده است (شکل ۱-و). حضور اسفرول‌ها باعث شده است تا این سلول دارای اشکال نامنظم باشد. اسفرولوسیت‌ها حداقل در تعداد کمی از حشرات خاصیت فاگوسیتوزی و تجزیه‌کنندگی دارند (Gupta, 1970). ویگلسورس (Wigglesworth, 1959) معتقد است که این سلول‌ها در انتقال موادی از قبیل هورمون‌ها و مواد سازنده کوتیکول نقش دارند. اسفرولوسیت‌ها به عنوان منبعی برای ذخیره برخی از پروتئین‌های خون عمل می‌کنند (Akai and Sato, 1973).

اشکال تقسیم میتوزی بیشتر در میان پروهموسیت‌ها مشاهده شد. سلول‌ها بیشتر در مراحل متافاز، آنافاز و تلوفاز قرار داشتند. تعداد کمی از پلاسماتوسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها نیز در طی تقسیم میتوزی رؤیت شدند. در حالی که لی و گیلبرت (Lea and Gilbert, 1966) در لارو *Hyalophora cecropia* هیچ گونه تقسیم میتوزی در مورد اسفرولوسیت‌ها مشاهده نکردند.

تعداد کل سلول‌های خونی در حال گردش (THC) از مقدار پائین ($10^5 \times 10$ سلول/میلی‌لیتر) در لارو سن دوم شروع می‌شود و به تدریج با افزایش سن لاروی افزایش یافت و در لارو سن پنجم به $10^5 \times 36$ سلول/میلی‌لیتر رسید. THC

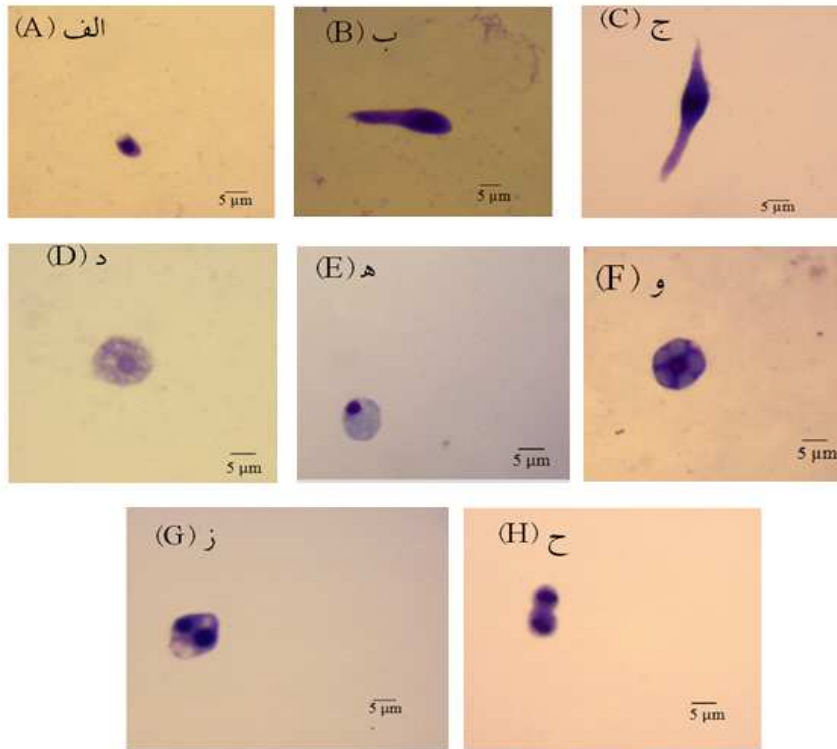
شمارش تفریقی سلول‌های خونی در *Spodoptera frugiperda* نشان داد که پلاسماتوسیت‌ها فراوان‌ترین نوع سلول‌های خونی (۶۳٪) در سنین اولیه هستند اما در سنین آخر تعداد گرانولوسیت‌ها (۵۹٪) از سایر سلول‌ها بیشتر است (Gardiner and strand, 2000). فراوان‌ترین نوع سلول‌های خونی در سوسک سرخرطومی خرما (*Rhynchophorus ferrugineus*) پلاسماتوسیت‌ها (۵۰٪) و گرانولوسیت‌ها (۳۷٪) بودند (Manachini et al., 2011).

نتیجه گیری کلی

سلول‌های خونی نقش مهمی در دفاع حشرات علیه بیمارگرها، پارازیتوئیدها و سایر دشمنان دارند. مطالعه حاضر تأیید می‌کند که جمعیت پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها به طور قابل توجهی در لاروهای سن آخر بیشتر از سایر مراحل رشدی است. از آنجا که این دو نوع سلول در حشرات به عنوان سلول‌های دفاعی در نظر گرفته می‌شوند، در این مراحل احتمال بقاء حشره در مقابل عوامل بیماری‌زا بیشتر است.

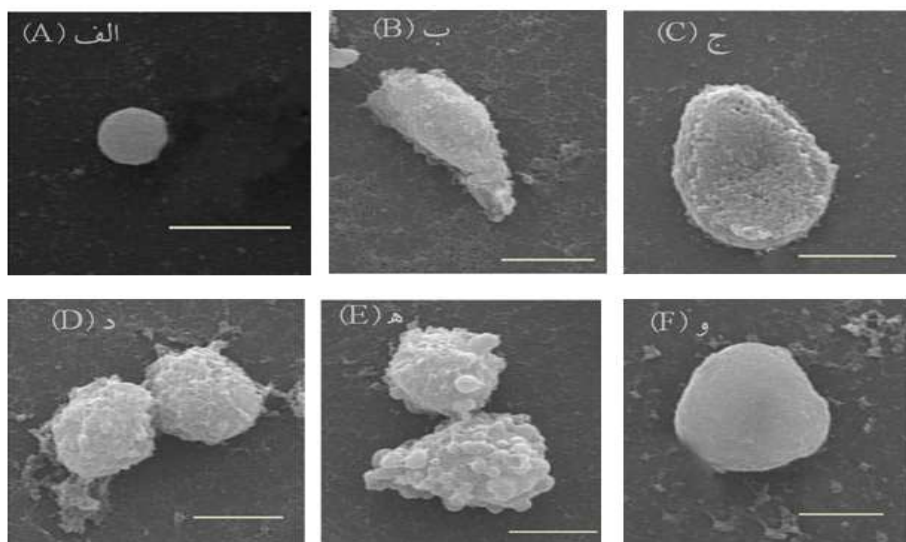
frugiperda (Gardiner and Strand, 2000) و *Manduca sexta* (Nardi et al., 2003) گزارش شده است. استرنند (Strand, 2008) بیان می‌کند اندام‌های هماتوپوئیتیک در بال‌پولک‌داران منبع مهمی از پلاسماتوسیت‌ها هستند که روی دیسک‌های بالی قرار دارند. جمله بالا نشان می‌دهد که سلول‌های خونی آزاد شده از اندام‌های هماتوپوئیتیک (شامل پروهموسیت‌ها و پلاسماتوسیت‌ها) می‌توانند در اوایل مرحله هر سن لاروی افزایش یابند، که با مشاهده حاضر در مورد شب‌پره خرنوب صدق می‌کند. هر چند سازنده‌های سلول‌های رها شده از اندام‌های هماتوپوئیتیک، چه در مورد پروهموسیت‌ها و چه در مورد پلاسماتوسیت‌ها هنوز نیاز به تأیید دارد.

پروهموسیت‌ها به دلیل نقششان به عنوان سلول‌های پایه نسبت به سایر انواع سلول‌های خونی دارای اهمیت ویژه‌ای هستند و به ندرت بیش از ۵٪ کل جمعیت هموسیت را تشکیل می‌دهند (Chapman, 1998). یاماشیتا و ایواجچی (Yamashita and Iwabuchi, 2001) ثابت کردند که در کرم ابریشم پروهموسیت‌ها می‌توانند به پلاسماتوسیت‌ها یا گرانولوسیت‌ها تغییر یابند. علاوه بر این چن و همکاران (Chain et al., 1992) نشان دادند که گرانولوسیت‌ها احتمالاً از پلاسماتوسیت‌ها مشتق شده‌اند و اشکال واسط بین دو نوع سلول در سوسری *Periplaneta americana* مشاهده شده است.



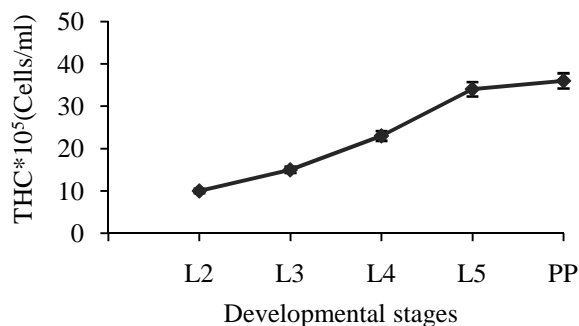
شکل ۱- سلول‌های خونی لارو شب‌پره خرنوب *Ectomyelios ceratoniae* رنگ‌آمیزی شده با گیمسا جهت مشاهده با میکروسکوپ نوری. پروهموسیت (الف)، اشکال مختلف پلاسماتوسیت (ب) و (ج)، گرانولوسیت (د)، اتنوسیت (ه)، اسفرولوسیت (و)، سلول‌های خونی در مراحل مختلف تقسیم میتوزی (ز) و (ح).

Figure 1. Hemocytes from *Ectomyelios ceratoniae* larvae stained by Giemsa for light microscopy observations. Prohemocyte (A), Different form of plasmatocyte (B-C), Granulocyte (D), Oenocytoid (E), Spherulocyte (F), and hemocytes at different steps of mitosis process (G-H).



شکل ۲- سلول‌های خونی لارو شب‌پره خرنوب *Ectomyelios ceratoniae* با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی: پروهموسیت (الف)، پلاسماتوسیت (ب-ج)، گرانولوسیت (د)، اسفرولوسیت (ه) و انوسیتوئید (و) مقیاس: ۱۰ میکرومتر

Figure 2. Scanning electron microscopy of carob moth, *Ectomyelios ceratoniae* hemocytes: Prohemocyte (A), Plasmatocytes (B-C), Granulocytes (D), spherulocytes (E), and Oenocytoids (F). Scale bar: 10 µm.



شکل ۳- تغییر در تعداد کل سلول‌های خونی (THC) در سنین مختلف لاروی *Ectomyelios ceratoniae* حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سنین مختلف است (ANOVA, $p < 0.01$).

L2: لارو سن ۲، L3: لارو سن ۳، L4: لارو سن ۴، L5: لارو سن ۵ و PP: پیش شفیره

Figure 3. Changes in total hemocyte count (THC) during the larval instars of *Ectomyelios ceratoniae* Different letters indicate significant differences between groups (ANOVA, $p < 0.01$).

L2: Second instar larva, L3: Third instar larva, L4: Fourth instar larva, L5: Fifth instar larva and PP: Prepupae stage

جدول ۱- در صد انواع سلول‌های خونی در سنین مختلف لاروی شب‌پره خرنوب *Ectomoyelios ceratoniae* (میانگین \pm خطای استاندارد)

Table 1. The percentage of different hemocytes in larvae instars of carob moth, *Ectomoyelios ceratoniae* (Mean \pm S.E.)

| Larval instars | PL | GR | OE | SP | PR |
|----------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| 1 | 56.60 \pm 1.9 a | 19.00 \pm 1.6 d | 1.2 \pm 0.72 c | 2.00 \pm 0.5 c | 20.70 \pm 2.29 a |
| 2 | 55.70 \pm 1.9 a | 27.2 \pm 2.26 c | 4.00 \pm 1.11 b | 2.4 \pm 0.12 c | 10.7 \pm 1.35 b |
| 3 | 57.00 \pm 2.04 a | 29.1 \pm 2.38 c | 4.4 \pm 0.82 ab | 4.8 \pm 0.35 b | 5.6 \pm 1.5 c |
| 4 | 47.2 \pm 1.8 b | 37.00 \pm 1.46 a | 4.5 \pm 1.12 b | 5.3 \pm 0.49 b | 5.6 \pm 1.51 c |
| 5 | 48.8 \pm 1.46 b | 34.00 \pm 1.53 b | 5.3 \pm 1.02 a | 6.9 \pm 0.98 a | 5.00 \pm 1.45 c |

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

Means within columns followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test)

Values are shown as mean \pm S.E. ($n = 10$)

جدول ۲- اندازه گیری‌های مورفومتریک سلول‌های خونی لارو سن پنجم شب‌پره خرنوب *Ectomyelios ceratoniae*

Table 2. Morphometric measurement ranges of hemocytes in fifth larval instar of carob moth, *Ectomyelios ceratoniae*

| Cell type | Size (μ m) | |
|-----------|-----------------|-------|
| | Length | Width |
| PR | 2.5-4.5 | 2.5-6 |
| PL | 12.5-25 | 8-14 |
| GR | 12-16 | 7-11 |
| OE | 10-16 | 9-13 |
| SP | 10-14 | 9-11 |

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

Values are shown as minimum - maximum ($n = 20$)

References

- Akai, H. and Sato, S. 1973. Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm *Bombyx mori* L. **International Journal of Insect Morphology and Embryology** 2: 207–231.
- Amaral, I. M. R., Neto, J. F. M., Pereira, G. B., Franco, M. B., Beletti, M. E., Kerr, W. E., Bonetti, A. M. and Ueira-Vieira, C. 2010. Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): cell types and their role in phagocytosis. **Micron** 41: 123–129.
- Ashida, M., Ochiai, M. and Niki, T. 1988. Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. **Tissue and Cell** 20: 599–610.
- Beaulaton, J. 1979. Hemocytes and hemocytogenesis in silkworms. **Biochimie** 61: 157–164.
- Beetz, S., Holthusen, T. K., Koolman, J. and Trenczek, T. 2008. Correlation of hemocyte counts with different developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 67: 63–75.
- Brehélin, M., Zachary, D. and Hoffmann, J. A. 1978. A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect orders. **Cell and Tissue Research** 195: 45–57.
- Brehélin, M. and Hoffmann, J. A. 1980. Phagocytosis of inert particles in *Locusta migratoria* and *Galleria mellonella*: study of ultrastructure and clearance. **Journal of Insect Physiology** 26: 103–111.
- Brehélin, M. and Zachary, D. 1986. Insect Haemocytes: A New Classification to Rule Out the Controversy. *Immunity in Invertebrates*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 36–48.
- Butt, T. M. and Shields, K. S. 1996. The structure and behaviour of Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) hemocytes. **Journal of Invertebrate Pathology** 68: 1–14.
- Chain, B. M., Leyshon-Soland, K. and Siva-Jothy, M. T. 1992. Haemocyte heterogeneity in the cockroach *Periplaneta americana* analyzed using monoclonal antibodies. **Journal of Cell Science** 103: 1261–1267.
- Chapman, R. F. 1998. The insects' structure and function. Cambridge: Cambridge University
- Costa, S. C. P., Ribeiro, C., Girard, P. A., Zumbihl, R. and Brehélin, M. 2005. Modes of phagocytosis of Gram-positive and Gram-negative bacteria by *Spodoptera littoralis* granular haemocytes. **Journal of Insect Physiology** 51: 39–46.
- Essawy, M., Maleville, A. and Brehélin, M. 1985. The haemocytes of *Heliothis armigera*: ultrastructure, cytochemistry and functions. **Journal of Morphology** 186: 255–264.
- Gardiner, E. M. M. and Strand, M. R. 2000. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includes* and *Spodoptera frugiperda*. **Archives of Insect Biochemistry & Physiology** 43 (4): 147–164.
- Gupta, A. P. 1970. Midgut lesions in *Epicauta cinerea* (Coleoptera: Meloidae). **Annual Entomological Society of America** 63:1786–8.
- Gupta, A.P. 1985. *Comprehensive Insect's Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford.
- 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, pp. 19–118.
- Hoffmann, J. A. 2003. The immune response of *Drosophila*. **Nature** 426: 33–38.
- Iwama, R. and Ashida, M. 1986. Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry** 16: 547–555.
- Jalali Sendi, J. and Salehi, R. 2008. The hemocyte types, differential and total count in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) during post-embryonic development. **Munis Entomology and Zoology** 30 (1): 199–216.
- Jones, J. C. 1959. A phase contrast study of the blood cells in *Prodenia* larvae (Lepidoptera). **Quart. Journal of Microbial Science** 100: 17–23.
- Kanost, M. R., Jiang, H. and Yu, X. Q. 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. **Immunological Reviews** 198: 97–105.
- Lai-Fook, J. 1973. The structure of the haemocytes of *Calpododes ethlius* (Lepidoptera). **Journal of Morphology** 118: 79–104.
- Lavine, M. D. and Strand, M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 32: 1295–130.
- Lea, S. M. and Gilbert, L. I. 1966. The hemocytes of *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera). **Journal of Morphology** 118 (2): 197–215.
- Ling, E. and Yu, X. Q. 2006. Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self dead cells. *Developmental and Comparative Immunology* 30: 301–309.

- Mahalingam, V. and Muralirangan, C.** 1995. Hemocytic profile, mitotic index and hemograms of *Atractomorpha crenulata* (Fab.) (Orthoptera: Pyrgomorphidae). **Phytophaga** 7: 73-81.
- 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
- Mehrnejad M. R.** 1993. Biology of the carob moth *Apomyelois ceratoniae* a new pest of pistachio in Rafsanjan. **Applied Entomology and Phytopathology** 66 (1-2): 1-12.
- Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M. and Kamimura, M.** 2003. In vitro studies of hematopoiesis in the silkworm: Cell proliferation and hemocyte discharge from the hematopoietic organ. **Journal of Insect Physiology** 49 (10): 907-16.
- Nardi, J. B., Gao, C. and Kanost, M. R.** 2001. The extracellular matrix protein lacunin is expressed by a subset of hemocytes involved in basal lamina morphogenesis. **Journal of Insect Physiology** 47: 997-1006.
- 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.
- Neuwirth, M.** 1973. The structure of the hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). **Journal of Morphology** 139: 105-112.
- Neuwirth, M.** 1974. Granular haemocytes, the main phagocytic blood cells in *Calpodex ethlius*. **Canadian Journal of Zoology** 52: 783-784.
- Norouzi, A., Talebi, A. A. and Fathipour, Y.** 2008. Development and demographic parameters of the carob moth *Apomyelois ceratoniae* on four diet regimes. **Bulletin of Insectology** 61 (2): 291-297.
- Parmakelis, A., Slotman M.A., Marshall, J.C., Awono-Ambene, P.H., Antonio-Nkondjio, C.** 2008. The molecular evolution of four anti-malarial immune genes in the *Anopheles gambiae* species complex. **BMC Evolution Biology** 8: 79.
- Pendland, J. C. and Boucias, D. G.** 1996. Phagocytosis of lectin-opsonized fungal cells and endocytosis of the ligand by insect *Spodoptera exigua* granular hemocytes: an ultrastructural and immunocytochemical study. **Cell and Tissue Research** 285: 57-67.
- Raina, A.K.** 1976. Ultrastructure of the larval hemocytes of the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology** 5: 187-195.
- Ratcliffe, N. A. and Rowley, A. F.** 1975. Cellular defense reactions of insect hemocytes in vitro: phagocytosis in a new suspension culture system. **Journal of Invertebrate Pathology** 26, 225-233.
- Ribeiro, C. and Brehelin, M.** 2006. Insect haemocytes: What type of cell is that? **Journal of Insect Physiology** 52: 417-429.
- Ribeiro, C., Simoes, N. and Brehélin, M.** 1996. Insect immunity: the haemocytes of the armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role in defence reactions. In vivo and in vitro studies. **Journal of Insect Physiology** 42: 815-822.
- Schmit, A. R. and Ratcliffe, N. A.** 1977. The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae. **Journal of Insect Physiology** 23: 175-184.
- Shapiro, M.** 1979. Changes in haemocyte population; in *Insect haemocytes* (ed.) A. P. Gupta (Cambridge: Cambridge University Press) pp: 475-525.
- Strand, M. R.** 2008. The insect cellular immune response. **Insect Science** 15: 1-14.
- Strand, M. R. and Pech, L. L.** 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annual Review Entomology** 40: 31-56.
- Teimury, N.** 2011. Investigation on biological characteristics, feeding indices of carob moth *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) on two commercial Pistachio cultivars. M.S. Thesis. University of Guilan.
- Tojo, S., Naganuma, F., Arakawa, K., and Yokoo, S.** 2000. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Journal of Insect Physiology** 46: 1129-1135.
- Wago, H. and Kitano, H.** 1985. Morphological and functional characterization of the larval haemocytes of the cabbage white butterfly *Pieris rapae crucivora*. **Applied Entomology and Zoology** 20: 1-7.
- Wigglesworth, V. B.** 1959. Insect blood cells. **Annual Review of Entomology** 4:1-16.
- Yamashita, M. and Iwabuchi, K.** 2001. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. **Journal of Insect Physiology** 47: 325-331.
- Yokoo, S., Gotz, P. and Tojo, S.** 1995. Phagocytic activities of haemocytes separated by two simple methods from larvae of two lepidopteran species, *Agrotis segetum* and *Galleria mellonella*. **Applied Entomology and Zoology** 30: 343-350.

Identification of hemocytes in carob moth, *Ectomoyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) larvae

R. Khosravi^{1*}, J. Jalali Sendi² and V. Ghasemi³

1, 2 Ph.D. Student of Entomology and Associate professor, respectively, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Guilan, 3 Ph.D. Student of Entomology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University

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

Abstract

Insects use humoral and cellular immune responses against attack of pathogens and parasitoids. Insect hemocytes have important roles in immune systems with diverse forms and activities. The identification of hemocytes and knowledge of their population could help us for better controlling of the respective insect pest. In this research the hemocytes of Carob moth *Ectomoyelois ceratoniae* in five larval instars were examined using optical and scanning electron microscopy. Giemsa staining was used to identify these cells. Five identified types of hemocytes in this insect were; Prohemocyte, plasmatocyte (with several morphological forms), granulocytes, spherulocytes, and oenocytoids. All hemocytes types were detected in each larval instar. Mitotic divisions were observed among plasmatocyte, prohemocyte and spherulocytes. Total hemocyte counts in different instars showed that THC increases with increase in larval instars. Differential counts of hemocytes revealed that granulocytes and plasmatocytes are most abundant in all stages of larvae except in first instar larva.

Key words: Hemocytes, Differential count, Carob moth, Microscopic studies

*Corresponding author: khosravi.roya@yahoo.com