نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران، ۲۳: (۲)، ۱۳۸۲

عکس‌العمل سیستم ایمنی سلولی *Locusta migratoria* (Orth.: Acrididae) در مقابل جدایه‌ی فشند *Beauveria bassiana* (Moniliales, Moniliaceae)

مهران غزوی[1]، عزیز خرازی پاکدل[2] و جعفر ارشاد[1]

چکیده

در این تحقیق ابتدا گروه‌های مختلف سلول‌های خونی بر اساس خصوصیات مرفولوژیک سلول‌های گسترده شده تشخیص داده شد که شامل پلاسماتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، کوآگولوسیت‌ها و پروهموسیت‌ها بود. سپس تغییرات تعداد سلول‌های خونی در روند پیشرفت بیماری مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نشان داد که تعداد کل سلول‌های خونی طی سه روز اول بیماری افزایش یافته و در روز سوم به اوج خود می‌رسد (با تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪)، متعاقب آن در روزهای بعدی این تعداد کاهش یافت. از نظر تغییرات تعداد هر یک از سلول‌های فوق‌الذکر به تفکیک نیز همین روند مشاهده شد با این تفاوت که سلول‌های کوآگولوسیت علاوه بر افزایش تعداد در سه روز اول، از نظر نسبت درصد نیز افزایش نشان دادند. بررسی‌ها نشان داد که با پیشرفت بیماری قدرت بیگانه خواری سلول‌های خونی کاهش یافته و قبل از مرگ حشره سلول‌های خونی قادر به ایجاد پاهای کاذب نبوده و نمی‌توانستند عناصر قارچی را ببلعند. علیرغم اینکه سلول‌های خونی در مراحل ابتدایی بیماری قادر به فاگوسیتوز اسپورهای هوایی تزریق شده به هموسل حشره و بلاستوسپورهای قارچ بودند ولی این عمل به نابودی عناصر قارچی منجر نشد و آنها با جوانه زدن و تکثیر، سلول‌های خونی را از بین برده و بدن حشره را اشغال کردند. از دیگر اثرات بیماری روی سیستم ایمنی سلولی ایجاد گره بود که این گره‌ها گاهی فاقد عناصر قارچی بوده و تحت تاثیر متابولیت‌های مترشحه

۱- مؤسسه‌ی تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴-۱۹۳۹۵، تهران

۲- دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تهران، کرج

این مقاله در تاریخ ۱۳۸۲/۶/۱۷ دریافت و چاپ آن در تاریخ ۱۳۸۲/۱۰/۹ به تصویب نهایی رسید.

توسط قارچ ایجاد شد.

واژگان کلیدی: *Beauveria bassiana*، *Locusta migratoria*، سلول‌های خونی، ایمنی سلولی

مقدمه

حشرات به طور پیوسته در معرض میکروارگانیزم‌های بالقوه بیمارگر، از جمله تک‌یاخته‌ای‌ها قرار دارند. اما این رویارویی ندرتا باعث ایجاد عفونت در حشره می‌گردد. حشرات دارای یک سیستم پیچیده‌ی دفاعی در مقابل بیمارگرها و انگل‌ها می‌باشند. این سیستم شامل جلد و دستگاه گوارش به عنوان یک سد فیزیکی، عکس‌العمل هماهنگ سلول‌های مختلف خونی[1] هنگامی که سدهای فیزیکی شکسته می‌شوند و ساخت تحریکی پپتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی توسط بافت چربی می‌باشد (۳). ایمنی در حشرات بیشتر شبیه دستگاه ایمنی ذاتی مهره داران است. خصوصیت این سیستم دادن پاسخ‌های سریع و نسبتاً غیر اختصاصی سلولی و پلاسمایی در مقابل موجود مهاجم است و به نظر میرسد که این خصوصیت در مراحل بسیار ابتدایی تکامل جانور کسب شده است. حشرات قادر هستند بافت پیوندی را شناخته و به آن عکس‌العمل نشان دهند. به طوریکه در این جانوران، پس زدن پیوند بافت از گونه‌های دیگر[2] و حتی افراد همان گونه[3] مشاهده شده است. علائم مولکولی بسیار ظریف که در شناسایی پیوند بافت به کار می‌روند با پلی‌مرهایی که منحصراً در میکرو ارگانیزم‌ها یافت می‌شوند متفاوت هستند. در بندپایان نیز همانند مهره‌داران سیستم‌هایی برای شناسایی الگوهای اختصاصی مولکولی پلی ساکاریدهای میکروارگانیزم‌ها تکامل یافته است. این موضوع در پاسخ ایمنی حشرات و دیگر بندپایان در مقابل پپتیدوگلیکان‌هایی که فقط در دیواره سلولی باکتری‌ها یافت می‌شوند لیپو پلی‌ساکاریدهای غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی و β-۱ و ۳ گلوکانها و β-۱ و ۳ مانان‌های دیواره سلول‌های قارچها آشکارا مشاهده می‌شود.

۱- haemocytes

۲- xenografts

۳- allografts

برعکس دیگر بافت‌ها مانند بافت چربی و اپیدرم، عکس‌العمل سلول‌های خونی در مقابل موجودات مهاجم قابل روئیت بوده و بدین جهت می‌توان از سلول‌های خونی برای مطالعه پدیده شناسایی مولکول‌ها و موجودات غیر خودی استفاده نمود. عکس‌العمل سلول‌های خونی در مقابل موجودات بیگانه و مهاجم را می‌توان در سه گروه بیگانه خواری[۱]، تشکیل گره[۲] و کپسوله کردن[۳] طبقه بندی نمود (۳).

توانایی غلبه بر سیستم ایمنی حشره یکی از مهمترین خصوصیاتی است که یک عامل بیمارگر قارچی مناسب بایستی آن را دارا باشد. در غیر اینصورت حتی اگر عامل مورد نظر بتواند سدهای فیزیکی مانند کوتیکول را نیز شکسته و به بدن حشره وارد شود قادر نخواهد بود آن را بیمار کند. از سوی دیگر شناسایی و مطالعه‌ی ساز و کارهایی که باعث غلبه عامل بیمارگر بر سیستم ایمنی حشره می‌شود به ما کمک می‌نماید تا با اتخاذ تدابیر لازم مانند به کارگیری جدایه‌های دارای زهرآگینی بالا از رها شدن حشره از بیماری جلوگیری نماییم. در این بررسی چگونگی عکس العمل سیستم ایمنی سلولی *Locusta migratoria* در مقابل یک جدایه‌ی زهرآگین از *Beauveria bassiana* مورد توجه قرار گرفته است.

روش بررسی

۱- پرورش حشرات: ابتدا ملخ‌های کامل نر و ماده از طبیعت (نیشکر کاری‌های هفت تپه و کارون خوزستان) جمع‌آوری شد و با پرورش آنها در آزمایشگاه از حشرات کامل حاصله برای انجام آزمایشات استفاده گردید. جهت پرورش حشرات از قفس‌هایی به ابعاد ۵٤×۲۵×۳۵ سانتی‌متر از جنس پلکسی گلاس استفاده شد. دو سمت قفس ها تا نیمه و کف قفس به طور کامل با توری سیمی پوشیده شد. در قسمت جلوی قفس حفره‌هایی برای قرار دادن لوله‌های تخم‌ریزی تعبیه گردید. برای تامین گرمای تشعشعی یک لامپ ٦۰W تنگستن در سقف قفس نصب و این لامپ به یک تایمر متصل شد تا زمان روشنایی و خاموشی به کمک آن تنظیم

۱- Phagocytosis

۲- Nodule Formation

۳- Encapsulation

گردد. قفس‌های پرورش درون اتاق حرارت ثابت با مشخصات دمای زمان روشنایی: ۳۰°C، دمای زمان تاریکی: ۲۵°C، رطوبت نسبی: ۵ ± ۴۰٪، زمان روشنایی ۱۲ ساعت، زمان تاریکی ۱۲ ساعت قرار داده شدند. برای تغذیه ملخ‌ها از گیاهچه گندم استفاده گردید که به صورت روزانه در اختیار آنها قرار می‌گرفت. به عنوان غذای مکمل و برای تامین آب مورد نیاز ملخ‌ها از برگ کاهو استفاده شد. با توجه به تغذیه خوب پوره‌ها و حشرات کامل از جو پرک در صورت نیاز این ماده غذایی جایگزین گیاهچه گندم شد.

برای تخمگذاری حشرات ماده ابتدا ماسه بادی را با آب شسته سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۲۰° C ضد عفونی شد. ماسه ضد عفونی شده درون لوله‌های آلومینیومی به قطر ۳/۵ و ارتفاع ۱۱ سانتی‌متر ریخته شده و به آن ۱۴ سانتی‌متر مکعب آب مقطر اضافه گردید و در اختیار حشرات ماده آماده تخم‌ریزی قرار گرفت. لوله‌ها درون انکوباتوری با درجه حرارت ۳۰°C داخل ظروف پلکسی گلاس با کف و درپوش توری قرار داده شدند و تا زمان تفریخ تخمها در همان محل باقی ماندند. برای یکنواختی نتیجه در انجام آزمایشات از حشرات کامل نر F_1 به بعد استفاده شد.

۲-گرفتن همولنف: ابتدا برای جلوگیری از انعقاد همولنف هنگام خون‌گیری، حشرات به مدت چند دقیقه در یخدان یخچال قرار گرفتند، سپس پای عقب آنها به طرف بالا و جلو خم شد تا غشای آرترودیال ران پای عقب نمایان شود آنگاه این محل توسط الکل ۷۵٪ ضدعفونی و با کمک سوزن 29G سوراخ گردید. پس از خروج همولنف و نمایان شدن قطره‌ای از آن، این قطره بسته به منظور آزمایش یا توسط لوله موئین ۱۰۰ میکرولیتری یا به وسیله‌ی سرنگ انسولین استریل مجهز به سوزن زیر جلدی جمع‌آوری گردید. لوله‌های موئین قبل از گرفتن همولنف در دمای ۱۸۰°C به مدت سه ساعت سترون شد.

۳- تهیه‌ی تک لایه از سلول‌های خونی: برای این منظور ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر سرم هویل[۱] روی یک لام کاملاً تمیز و استریل شده قرار داده شد. سپس طبق روش بالا از حشره ۱۰۰ میکرولیتر همولنف گرفته شد و با سرم هویل روی لام مخلوط و درون اتاقک مرطوب در

۱- Hoyle

دمای اتاق قرار داده شد. پس از گذشت نیم ساعت لام از اتاقک خارج و لامل‌گذاری گردید و سلول‌های خونی از نظر ساختمانی با میکروسکوپ فاز کنتراست مطالعه گردید. برای تهیه پرپاراسیون موقت، به جای لامل‌گذاری چند قطره فرمالین ٤٪ درون سرم هویل به تک لایه اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه دیگر درون اتاقک مرطوب نگهداری شد. پس از انقضای این مدت لام خارج گردید و تک لایه با سرم هویل شستشو شد تا فرمالین اضافی و سلول‌هایی که به سطح لام نچسبیده بودند از پرپاراسیون جدا شوند. در پایان یک قطره ژله گلیسیرین مذاب روی لام قرار داده شد و لامل‌گذاری صورت گرفت.

٤- **شمارش سلول‌های خونی:** برای شمارش کل سلول‌های خونی بدون در نظر گرفتن نوع آن همولنف جمع آوری شده با کمک لوله موئین به لام گلبول شمار منتقل گردید و سلول‌های خونی مستقیماً شمارش شد. برای شمارش گروه‌های مختلف سلول‌های خونی ابتدا ٤۰۰ میکرولیتر سرم هویل به درون یک سرنگ یک میلی‌لیتری کشیده شد سپس غشای آرترودیال پای عقب با کمک سوزن استریل سوراخ گردید تا قطره‌ای از همولنف خارج شود. قطره همولنف توسط سرنگ حاوی محلول هویل جمع‌آوری و با آن مخلوط گردید. سپس محتویات سرنگ روی یک لام که قبلاً به خوبی شستشو شده (ابتدا با مایع ظرفشویی و آب گرم شستشو، سپس ۱۰ بار با آب شیر و ۱۰ بار با آب مقطر آب کشی شد) و در دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت استریل گردیده بود (جهت زدودن کلیه اندوتوکسین‌های باکتریایی موجود بر روی لام) قرار داده شد. این لام نیم ساعت در اتاقک مرطوب قرار گرفت و پس از لامل‌گذاری گروه‌های مختلف سلول‌های خونی به طور تصادفی تا مجموع ۱۰۰ عدد شمارش و تعداد هر کدام به تفکیک یادداشت شد.

۵- **رنگ آمیزی سلول‌های خونی:** برای رنگ آمیزی سلول‌های خونی یک قطره از همولنف پوره سن ۵ یا حشره کامل با سوراخ کردن غشای آرترودیال پای عقب روی یک سمت یک لام تمیز و سترون شده چکانده شد و سپس با کمک لامی دیگر این قطره در سطح لام اول گسترده شد. همولنف گسترده شده ابتدا در دمای اتاق خشک و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در الکل متیلیک مطلق تثبیت گردید. پس از خارج نمودن نمونه از الکل و تبخیر الکل

اضافی، لام به مدت نیم ساعت در محلول ۱ به-۳۰ گیمسا[۱] رنگ آمیزی گردید. آنگاه لام به مدت ۳۰ ثانیه با آب مقطر شستشو و سپس یک بار در بافری با pH ۶/۹ فرو برده شد. پس از زدودن بافر اضافی و خشک نمودن لام در دمای اتاق، عمل سوار کردن با کمک صمغ سداکس[۲] صورت گرفت.

۶- بررسی وجود گره‌ها: برای مشاهده گره‌های موجود در همولنف ملخها، ابتدا با کمک سرنگ انسولین مجهز به سوزن 29G مقدار ۴۰۰ میکرولیتر بافر ضد انعقاد خنک (۵ درجه سانتی‌گراد) به غشای بین مفصلی مفصل سوم شکم ملخ‌های بیمار تزریق شد. بافر ضد انعقاد از اختلاط ۳/۹۲ گرم NaOH، ۱۰/۵۲ گرم NaCl ، ۶/۳۳ گرم EDTA و ۸/۶۲ گرم اسید سیتریک با یک لیتر آب مقطر و استریل نمودن محلول حاصل با فیلتر غشایی ۰/۴۵ میکرون تهیه گردید. پس از گذشت ۳ دقیقه با کمک قیچی ظریف استریل شکافی در غشای گردن ایجاد و ۴۰۰ میکرولیتر دیگر بافر به حشره تزریق شد تا همولنف حشره به همراه گره‌ها از محل شکاف ایجاد شده خارج گردد. این همولنف برای مطالعات بعدی درون شیشه‌های بیژو[۳] ۵ میلی‌لیتری سترون شده جمع‌آوری گردید. برای مشاهده‌ی گره‌ها از میکروسکوپ فاز کنتراست استفاده گردید. اجتماع تعداد ۱۰ سلول خونی یا بیشتر، یک گره در نظر گرفته شد (۶).

۷- بررسی تغییرات کمی سلول‌های خونی در اثر آلودگی با قارچ: جهت مطالعه تغییرات تعداد سلول‌های خونی در سیر پیشرفت بیماری، آزمایشی با ۵ تیمار در قالب طرح کرت‌های دو بار خرد شده در زمان طراحی گردید که در آن انواع مختلف سلول‌های خونی به عنوان فاکتور اصلی در ۵ سطح، تیمار و شاهد به عنوان فاکتور B در ۲ سطح (تیمار فرعی) و روزهای نمونه برداری (روز اول تا پنجم بعد از آلوده سازی) در ۵ سطح (تیمار فرعی) به عنوان فاکتور C در نظر گرفته شدند. این آزمایش در ۱۰ تکرار و برای رعایت یکنواختی روی حشرات نر انجام گرفید و هر حشره نر با 10^4 هاگ جدایه‌ی فشند (که از خاک باغی در فشند جدا شده و با کد IRAN403C در کلکسیون قارچ‌های بخش رستنی‌های مؤسسه تحقیقات آفات

۱- Giemsa

۲- Caedax

۳- Bijou

و بیماری‌های گیاهی اوین نگهداری می‌شود) با قرار دادن سوسپانسیون هاگ در زیرِ پیش‌گرده آلوده شد.

نتایج

مطالعه‌ی سلول‌های خونی *L. migratoria* وجود ٤ نوع سلول به شرح زیر را مشخص نمود:

۱- پلاسماتوسیت‌ها[۱]: در بررسی سلول‌های خونی با میکروسکوپ فاز کنتراست و نومارسکی دو نوع پلاسماتوسیت تشخیص داده شد. نوع اول که تعداد آنها نیز بیشتر بود دارای تعداد زیادی واکوئل بوده (شکل ۱-A) و نوع دوم سلول‌های بدون واکوئل بودند. واکوئلها در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست، به صورت نورانی دیده شدند. هر دو نوع پلاسماتوسیتها دارای گرانول‌هایی (دانه‌هایی) به رنگ تیره بودند. هسته پلاسماتوسیتها به اشکال کروی و بیضوی دیده شد که هستکها (معمولاً به تعداد ۲ عدد) درون آن قابل مشاهده بودند.

پلاسماتوسیتها در اثر تماس با سطح لام پس از گذشت مدت زمانی بین ۱۵ تا ۳۰ دقیقه تولید پاهای کاذبی[۲] به شکل تیغه[۳] نمودند (شکل ۱-A) که مهمترین عامل تمیز آنها از سلول‌های دانه‌دار یا گرانولوسیتها بود. شکل تیغه‌ها متغیر و در مجموع تاج مانند بودند. گاهی اوقات راس این تیغه‌ها به صورت زوائدی میخ مانند رشد می‌نمود.

۲- سلول‌های دانه‌دار[٤]: این گروه از سلول‌های خونی به اشکال گرد تا بیضوی مشاهده گردید. در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست سلول به صورت نورانی دیده شد (شکل ۱-B). هسته این سلولها گرد و تقریباً در وسط واقع شده بود. سلول‌های دانه‌دار پس از تماس با سطح صاف و سپری شدن ۱۵ تا ۳۰ دقیقه تولید پاهای کاذب نخ مانند (filopodia) نمودند (شکل ۱-B). گاهی اوقات قسمت نزدیک به مبدأ این پاهای کاذب کمی گسترده شد. در سلول‌های دانه‌دار تعداد زیادی گرانول مشاهده گردید.

۱- Plasmatocytes

۲- Pseudopodia

۳- Lamellopodia

٤- Granulocytes

۳- کوآگولوسیت‌ها[۱]: شکل این سلولها گرد یا اندکی بیضوی بوده و زیر میکروسکوپ فاز کنتراست درخشان بود. در صورت تماس با سطوح تولید پای کاذب نکرده و حاشیه آنها کاملاً یکنواخت بود. پس از تماس با سطوح محتویات خود را آزاد نموده و تولید لخته کردند. سیتوپلاسم این سلولها شفاف و بی‌رنگ بود. لخته[۲] به صورت رشته‌هایی این سلول‌ها و دیگر گروه‌های سلول‌های خونی را به هم متصل نمود.

گاهی اوقات غشاء پلاسمایی کاملاً پاره شده و هسته‌ها به صورت آزاد مشاهده شدند. هسته‌ی این سلول‌ها در مرکز، به صورت مماس داخل مشاهده شد (شکل۲-A). رنگ‌آمیزی این گروه از سلول‌ها با محلول گیمسا وجود شکاف‌های ریزی بر روی غشاء سلولی را مشخص نمود که سیتوپلاسم از طریق آنها به خارج نشت نموده بود.

٤- پروهموسیت‌ها (پیش سلول‌های خونی)[۳]: این سلول‌ها به اشکال گرد تا نزدیک به گرد (به صورت نامحسوس بیضی شکل) مشاهده شدند. هسته آنها نسبت به سلول بسیار بزرگ و نوار باریکی از سیتوپلاسم آن را احاطه کرده بود. هسته در مرکز سلول مشاهده می‌شد (شکل ۲-B). پروهموسیتها نیز در صورت تماس با سطوح تولید پای کاذب نمودند. این گروه از سلولها به طور محسوسی از دیگر سلول‌های خونی کوچک تر بوده و در پرپاراسیون‌های تهیه شده از همولنف به آنها کمتر برخورد شد. ابعاد سلول‌های خونی و نسبت هسته به سیتوپلاسم آنها در جدول ۱ آمده است.

تجزیه واریانس تاثیر بیماری روی تغییرات کمی سلول‌های خونی نشان داد که گروه‌های مختلف این سلول ها از نظر تعداد در سطح ۱٪ با هم تفاوت معنی دار دارند. تیمار و شاهد و تعداد سلول‌های خونی در روزهای مختلف نیز در سطح ۱٪ تفاوت معنی دار داشتند. تاثیر متقابل نوع سلول‌های خونی و تیمار، نوع سلول خونی و زمان، تیمار و زمان و نوع سلول خونی، تیمار و زمان نیز همگی در سطح ۱٪ تفاوت معنی دار داشتند (جدول۲). مقایسه میانگین تعداد گروه‌های مختلف سلول‌های خونی با آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که

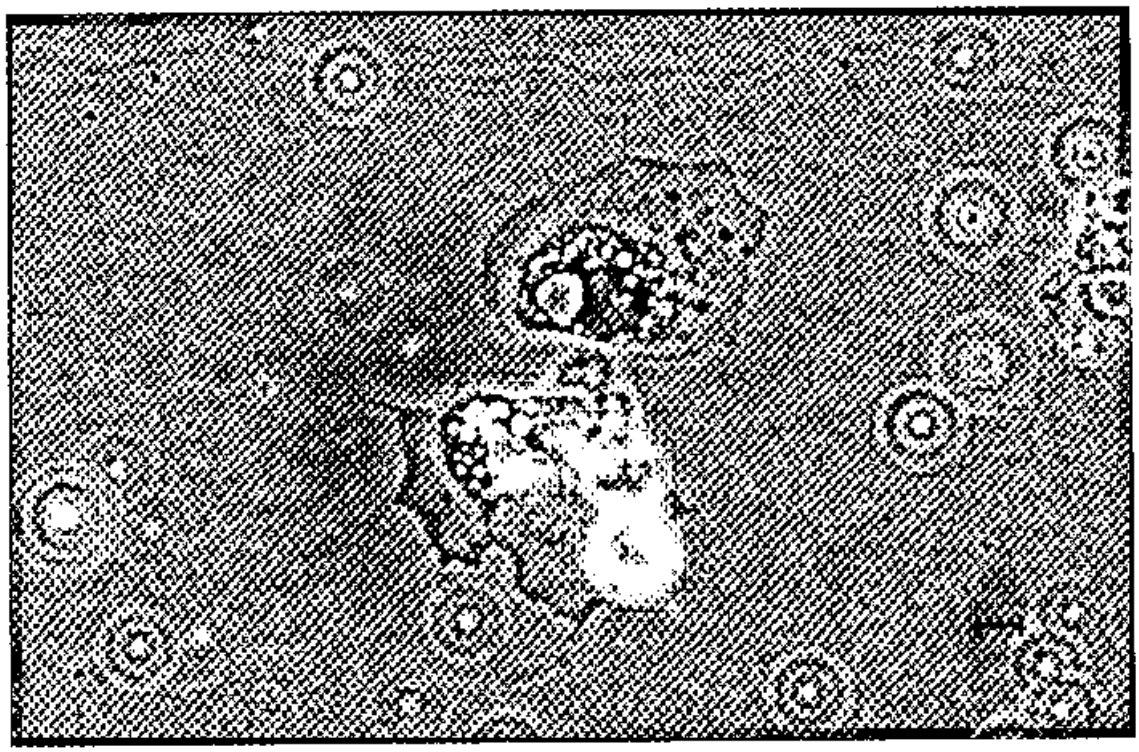
۱- Coagulocytes

۲- Coagulum

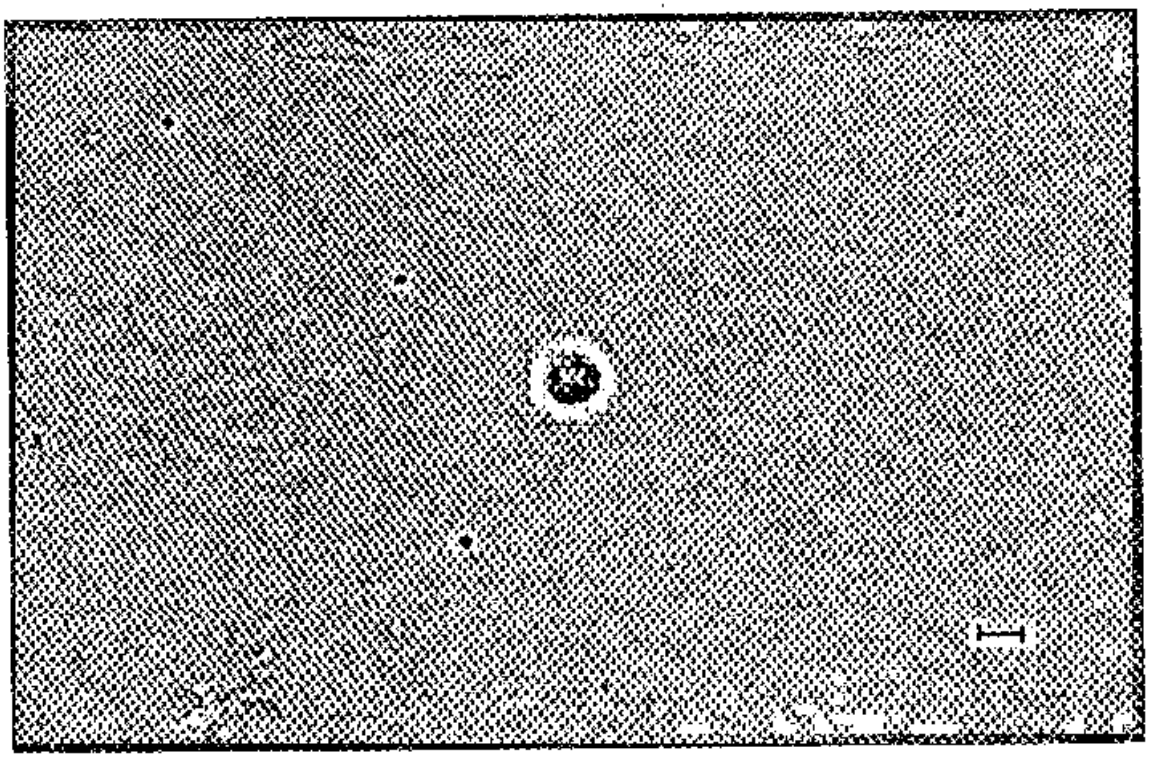
۳- Prohaemocytes

تعداد پلاسماتوسیتها از دیگر سلولها بیشتر بوده و به تنهایی در یک گروه قرار می‌گیرد و پس از آن سلول‌های دانه‌دار، کوآگولوسیتها و پروهموسیتها گروه‌های بعدی را به خود اختصاص می‌دهند (جدول ۳). از نظر اثر متقابل تعداد سلول‌ها در زمان‌های مختلف، بیشترین تعداد سلول خونی در روز سوم پس از آلودگی مشاهده شد که با دیگر گروه‌ها تفاوت معنی‌دار داشت. پس از آن تعداد سلولها در روز دوم، اول، چهارم و پنجم هر کدام در یک گروه جداگانه قرار گرفتند که همگی در سطح ۱٪ با هم تفاوت معنی‌دار داشتند (جدول ٤).

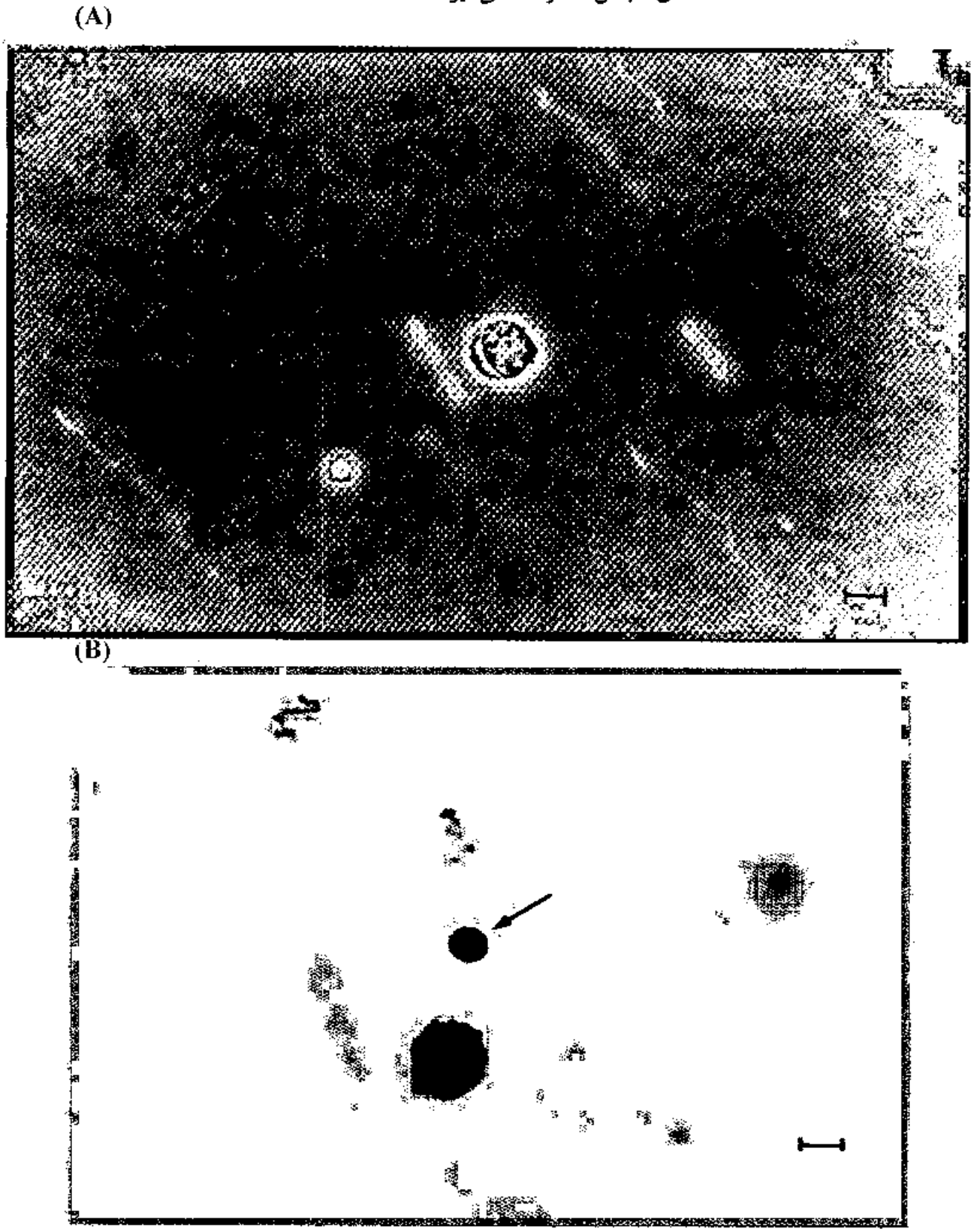
(A)



(B)



شکل ۱: A- پلاسماتوسیت‌های واکوئل‌دار *L. migratoria* (مقیاس ۱۰μ) B- سلول‌های دانه‌دار *L. migratoria* در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست (مقیاس ۱۰μ).



شکل ۲: ۸ تصویر یک کوآگولوسیت *L. migratoria* زیر میکروسکوپ فاز کنتراست (مقیاس ۱۰µ). B- تصویر یک پروهموسیت *L. migratoria* رنگ‌آمیزی شده با گیمسا (مقیاس ۵µ).

جدول ۱: مشخصات سلول‌های خونی *L. migratoria*

نوع سلول خونی Cell Type	میانگین طول ±SE	میانگین عرض ±SE	میانگین طول هسته ±SE	نسبت هسته به سیتوپلاسم Nucleous/cytoplasmic Ratio
پلاسماتوسیت‌ها	۳۸/۳۱±۵/۸۸	۱۶/۹۲±٤/۹۲	۱۲/٤٦±۱/۵۰	۰/۳۲۵۳
سلول‌های دانه‌دار	۱۵/٤۷±۱/٦۹	۱۲/۷۹±۱/۱۸	۹/٦۳±۰/۵۹	۰/٦۲۲٤
کوآگولوسیت‌ها	۱۵±۰/٤۱	۱۳/٤۸±۰/۳٦	۹/۵۷±۰/۲۱	۰/٦۳۸۳
پروهموسیت	٤/٤±۰/۲۱۱	-	۳/۳۵±۰/۱۹۸	۰/۷٦۱۳

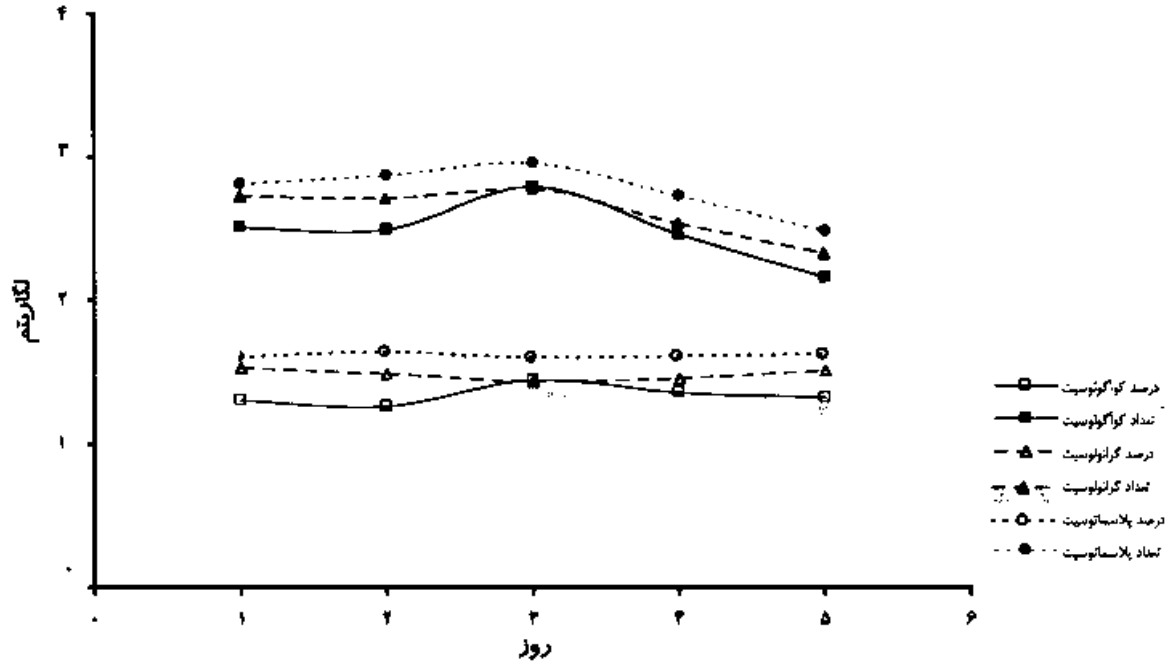
شمارش افتراقی سلول‌های خونی نشان داد که تعداد پلاسماتوسیت‌ها، سلول‌های دانه‌دار و کوآگولوسیت‌ها ابتدا در طی روند آلودگی افزایش و سپس کاهش می‌یابد. با مراجعه به (شکل ۳) مشخص می‌شود که تعداد هر سه گروه سلول خونی طی سه روز اول افزایش داشته است. اما از نظر درصد تنها کوآگولوسیت‌ها هستند که افزایش نشان می‌دهند. درصد پلاسماتوسیتها در طول روند آلودگی ثابت بوده و درصد سلول‌های دانه‌دار کاهش نیز یافته است.

برای بررسی علت افزایش سلول‌های خونی در ملخ‌های *L. migratoria* که به *B. bassiana* آلوده شده بودند، سلول‌های خونی ثابت که روی پرده پشتی حد فاصل سینوس دور قلبی و سینوس احشایی (شکل ٤) قرار داشتند در حشرات سالم و حشراتی که ۵ روز از آلودگی آنها می‌گذشت، با بزرگنمایی ٤۰۰ بوسیله‌ی میکروسکوپ شمارش شد. نتیجه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ بین تعداد این سلولها در حشرات سالم و آلوده وجود دارد (جدول ۵).

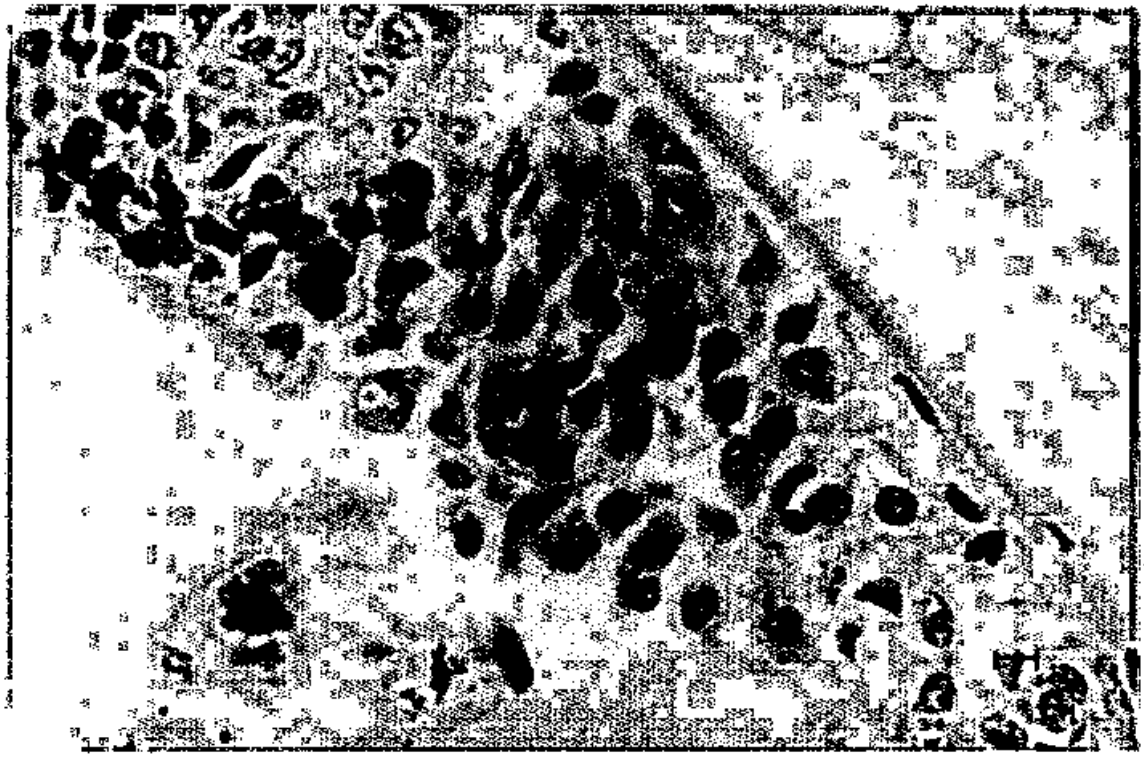
مطالعه همولنف حشراتی که ۲ تا ۳ روز قبل کنیدی‌های هوایی جدایه‌های ایرانی قارچ *B. bassiana* به آنها تزریق شده بود نشان داد که سلول‌های خونی ملخ *L. migratoria* قادر هستند که این کنیدی‌ها را به سهولت اندوسیتوز کنند ولی کنیدی‌های بلعیده شده بی اثر نشده و سلول خونی قادر به کشتن و هضم آنها نبود بلکه این کنیدی‌ها جوانه زده و پس از شکافتن غشای پلاسمایی سلول خونی تولید بلاستوسپور می‌نمودند (شکل ۵). در مورد بلاستوسپورها نیز مشاهده گردید که سلول‌های خونی در مراحل ابتدایی آلودگی قادرند با عمل بیگانه‌خواری

تعداد اندکی از آنها را ببلعند ولی این عمل نیز موفقیت آمیز نبوده و بلاستوسپورها قادر بودند درون سلول خونی تکثیر یابند (شکل ٦) و در نهایت آن را از بین ببرند.

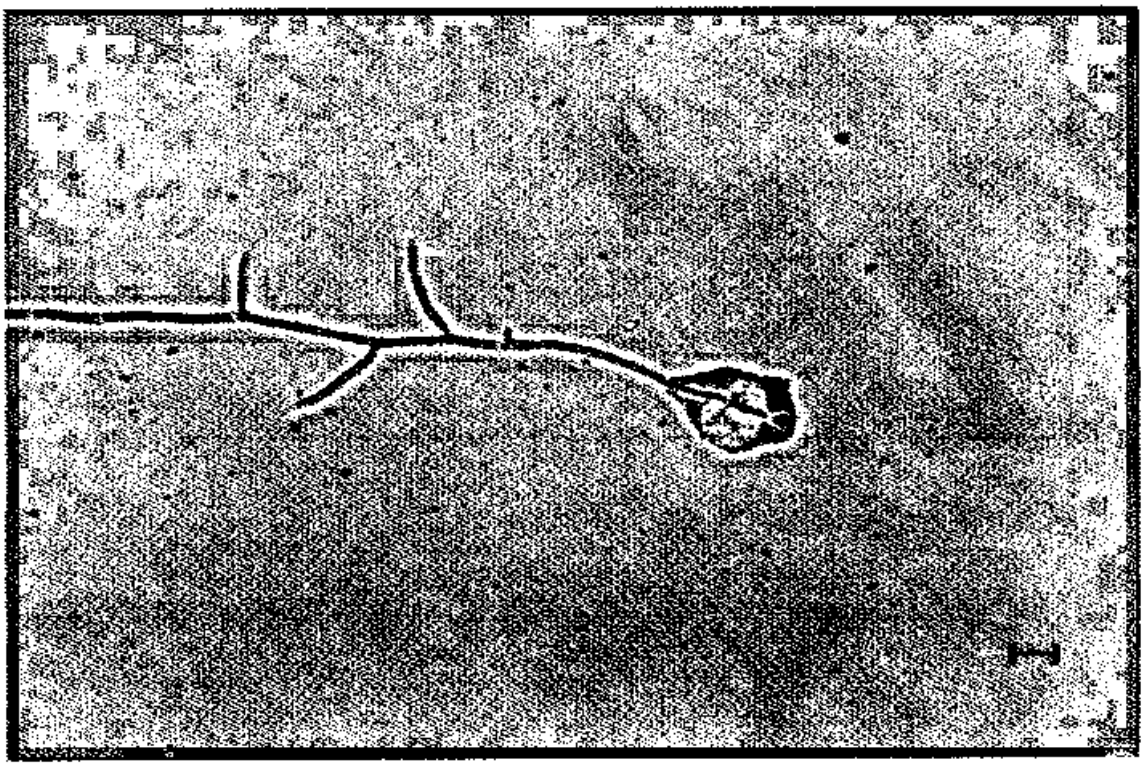
در مراحل نهایی بیماری و قبل از مرگ حشره سلول‌های خونی به صورت کروی در آمده و قادر به گستردن پاهای کاذب خود نبودند. در این نمونه‌ها بلاستوسپورها به تعداد زیاد حتی در تماس با سلول‌های خونی مشاهده شدند ولی سلول‌های خونی عکس‌العملی در مقابل آنها نشان نداده و قادر به انجام عمل بیگانه‌خواری و یا تولید گره نبودند. علاوه بر این در سطح سلولها برجستگی‌های تاول مانندی مشاهده شد (شکل ۷) و در بعضی موارد محتویات سلول نیز به بیرون راه یافت.



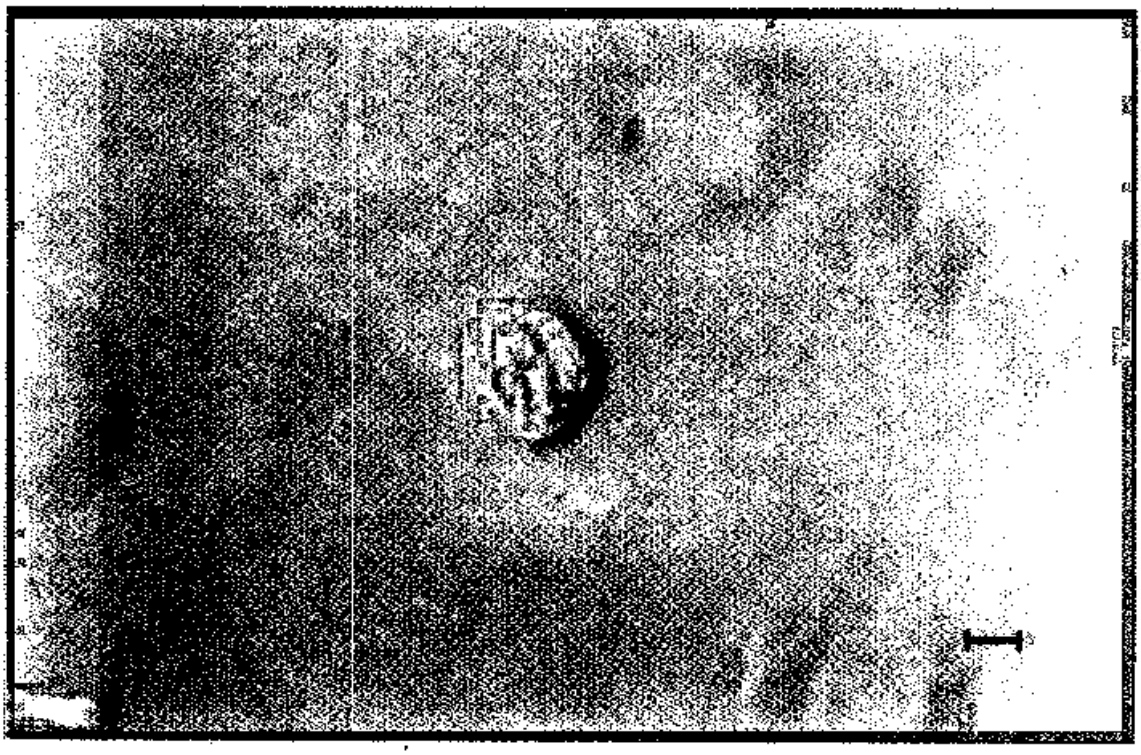
شکل ۳: تغییرات تعداد و نسبت درصد سلول‌های خونی *L. migratoria* در طول عفونت قارچی



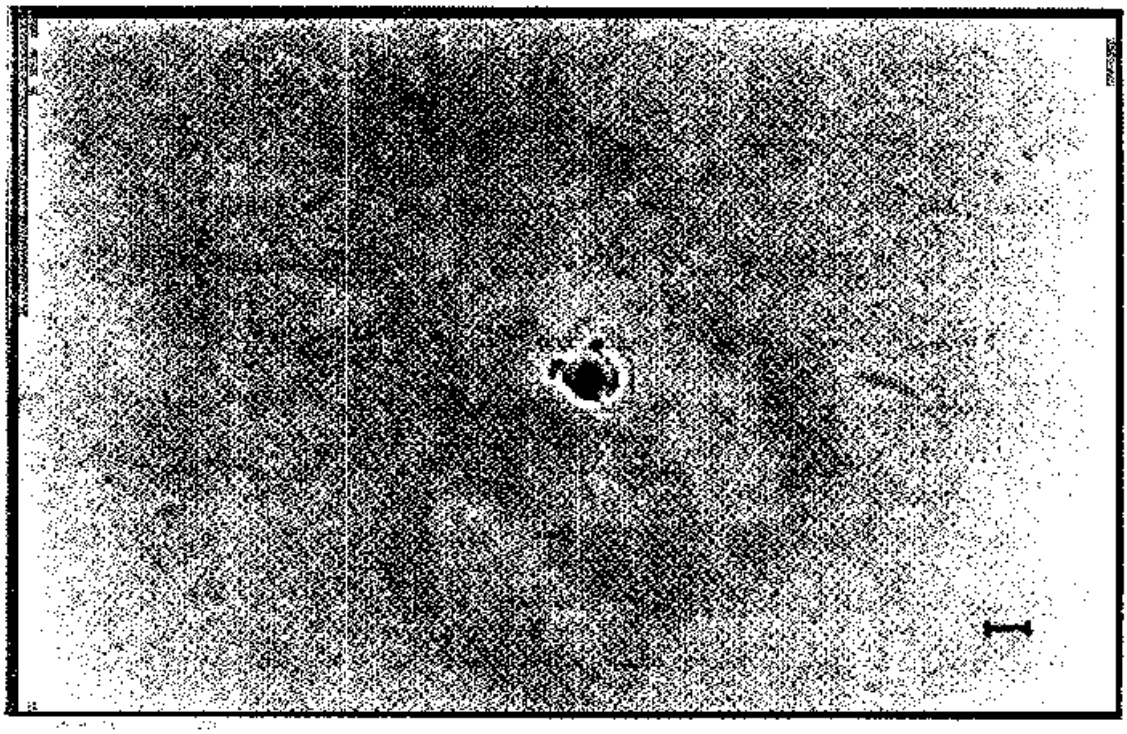
شکل ٤: تجمع سلول‌های خونی روی پرده پشتی در حشره‌ی سالم (مقیاس ۱۰μ).



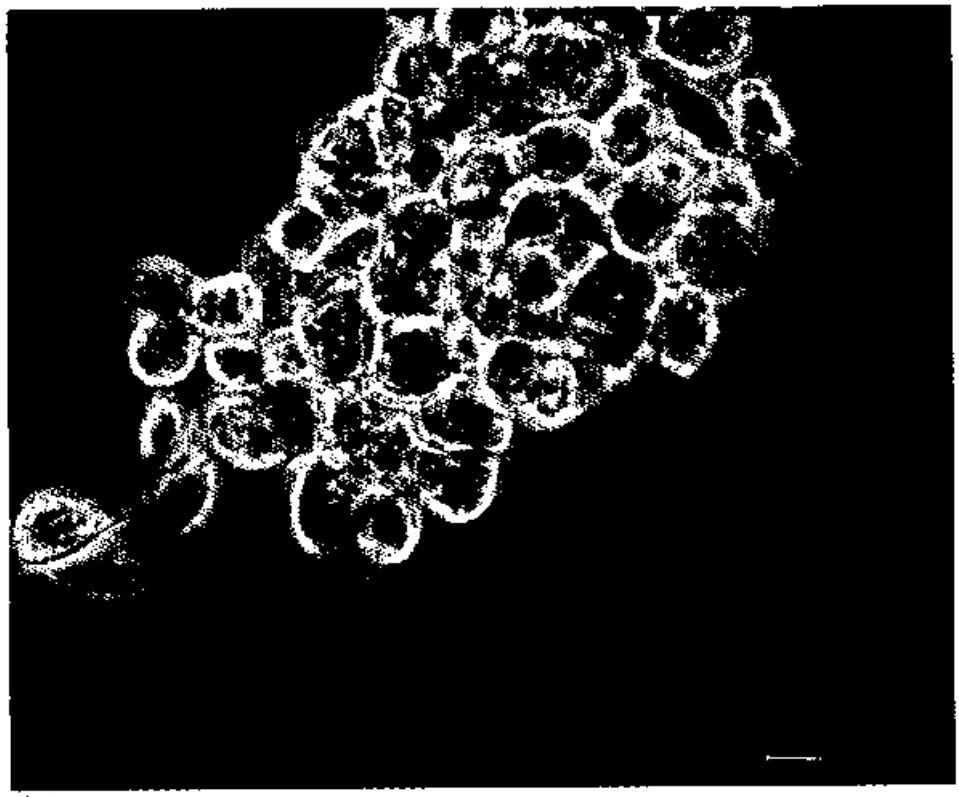
شکل ٥: جوانه زدن کنیدی هوایی اندوسیتوز شده درون سلول خونی (مقیاس ۱۰ μ).



شکل ٦: تکثیر بلاستوسپور اندوسیتوز شده و پر کردن فضای داخلی سلول خونی (مقیاس۵μ).



شکل ۷: ایجاد برجستگی‌های تاول مانند در سطح سلول‌های خونی تحت تاثیر عفونت قارچی (مقیاس ۱۰μ).



شکل ۸ : پدید آمدن گره در اثر عفونت قارچی (مقیاس ۱۰μ).

بحث

یکی از دلایل کاهش تعداد سلول‌های خونی در روزهای چهارم و پنجم می‌تواند تاثیر متابولیت‌های قارچی و ذرات قارچی روی سلول‌های خونی و پدید آمدن گره‌ها باشد. در واقع با پیشرفت آلودگی تعداد بیشتری گره در همولنف حشرات مشاهده شد (شکل ۸). برخی از این گره‌ها که از گرد هم آمدن سلول‌های خونی پدید آمده بودند مشکینه شده و به رنگ قهوه‌ای بودند ولی درون آنها عناصر قارچی مانند بلاستوسپورها مشاهده نشد. در آزمایشی دیگر کنیدی‌های هوایی (هاگ‌های حاصل از محیط کشت) و همولنف حشرات بیمار پس از روز سوم آلودگی به حشرات سالم تزریق گردید. در هر دو مورد حشرات به بیماری آلوده شدند و گره در همولنف آنها تشکیل گردید. ملانیزاسیون در مورد تزریق کنیدی‌های هوایی با شدت بیشتری مشاهده شد. شمارش افتراقی سلول‌های خونی نشان داد که تعداد پلاسماتوسیتها، سلول‌های دانه‌دار و کوآگولوسیتها ابتدا در طی روند آلودگی افزایش و سپس کاهش می‌یابد. با مراجعه به شکل ٦ مشخص می‌شود که تعداد هر سه گروه سلول خونی طی

سه روز اول افزایش داشته است. اما از نظر درصد تنها کوآگولوسیتها هستند که افزایش نشان می‌دهند. درصد پلاسماتوسیتها در طول روند آلودگی ثابت بوده و درصد سلول‌های دانه‌دار کاهش نیز یافته است.

استراند و پچ (۱۳) نشان دادند که برای مهار موجودات غیر خودی که وارد بدن حشره می‌شوندبا همکاری سلول‌های دانه‌دار و پلاسماتوسیتها گره و کپسول به وجود می‌آید. مرحله اول شناسایی و چسبیدن به موجود غیر خودی را سلول‌های دانه‌دار انجام می‌دهند و موجود بیگانه را با یک لایه سلولی می‌پوشانند. سپس روی این لایه سلول‌های دانه‌دار لایه‌های متعددی از سلول‌های پلاسماتوسیت قرار می‌گیرند و در پایان هنگامی که کپسول به اندازه مورد نظر رسید با یک لایه دیگر از سلول‌های دانه‌دار پوشیده شده و عمل تشکیل کپسول پایان می‌پذیرد. تشکیل کپسول با دریافت علائمی از موجود غیر خودی آغاز می‌شود که این علائم لزوماً با تماس آن موجود منتقل نمی‌شوند، بلکه علائم مورد نظر که به صورت لیپو پلی‌ساکاریدهای موجود بیگانه هستند می توانند در محیط آزاد شده و پس از رسیدن به سلول‌های خونی (سلول‌های دانه‌دار یا کوآگولوسیتها) تشکیل کپسول یا گره را باعث شوند. وجود گره‌های فاقد عناصر قارچی در همولنف *L. migratoria* پس از آلودگی به بیمارزی می‌تواند نشانه فرآیند اخیر باشد. همین موضوع باعث کاهش یافتن سلول‌های خونی در روزهای پایانی چرخه عفونت می‌شود.

گونارسون (٦) با تزریق هاگ قارچ *Metarhizium anisopliae* لامینارین (نوعی β-۱ و ۳-گلوکان)، زایموزان و لیپو پلی ساکاریدهای باکتری *Serratia marcescens* به هموسل ملخ صحرایی موفق شد تولید گره‌ها را به مقادیر مختلف تحریک کند که بیشترین تعداد گره در اثر تزریق هاگ قارچ به وجود آمد.

جدول ۲: تجزیه‌ی واریانس تغییرات کمی سلول‌های خونی *L. migratoria* در اثر ابتلا به بیماری قارچی

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F	احتمال
بلوک	۹	۱۸۰۵۲۹/۸۲۱	۲۰۰۵۸/۸۶۹	٤/٤٧٥٧	۰/۰۰۰٥
نوع سلول خونی	٤	۱۰۸٥٤۸٥۲٥/۲۲۸	۲۱۱۳۷۱۳۱/۳۰۷	٦۰٥٥/۰۰۳٤	۰
خطا	۳٦	۱٦۱۳٤۳/۷۱۲	٤٤۸۱/۷۷۰		
تیمار	۱	۹۹٦۷۳/۰۸۱	۹۹٦۷۳/۰۸۱	۱۷/٤۲٥۰	۰/۰۰۰۱
نوع سلول خونی × تیمار	٤	۱۲٤۳٤۳/٤۰۲	۳۱۰۸٥/۸٥۱	٥/٤۳٤٥	۰/۰۰۱۲
خطا	٤٥	۲٥۷٤۰٥/۳٤۲	٥۷۲۰/۱۱۹		
زمان	٤	٤٥۰۳۲۲۸/۰۹۳	۱۱۲٥۸۰۷/۰۲۳	۱۷٤/۹۷۸۸	۰
نوع سلول خونی × زمان	۱٦	۲۹۸٤۷۷۰/۳۷۷	۱۸٦٥٥٤/۳۹۹	۲۸/۹۹٥۳	۰
تیمار × زمان	٤	٥۱٤۷۷۳٥/۰٥۷	۱۲۸٦۹۳۳/۷٦٤	۲۰۰/۰۲۲۰	۰
نوع سلول خونی × تیمار × زمان	۱٦	۳۲۲۹۱٤۹/٤۷۳	۲۰۱۸۲۱/۸٤۲	۳۱/۳٦۸٦ *	۰
خطا	۳٦۰	۲۳۱٦۲۲٦/۳۰۰	٦٤۳۳/۹٦۲		
مجموع	٤۹۹	۱۲۷٥/۸۸۹			

جدول ۳: مقایسه‌ی میانگین برای نوع سلول‌های خونی

نوع سلول خونی	میانگین	گروه بندی
کواگولوسیت‌ها	۳۲٦/۳	d
سلول‌های دانه‌دار	٤۷۹/٥	c
پلاسماتوسیت‌ها	٦٤۱/٥	b
مجموع	۱٤٤۷/۳٦۰	a
پروهموسیت‌ها	٤٤٥/۹	e

جدول ٤: مقایسه میانگین برای زمان

زمان	میانگین	گروه بندی
روز اول	۳۲٦/۳٤۰	c
روز دوم	٦٤۹/۹۳٥	b
روز سوم	۷۲۷/۰٥٥	a
روز چهارم	٥٤۹/٦۳۰	d
روز پنجم	٤٤٥/۹۲۰	e

جدول ٥: مقایسه تعداد سلول‌های خونی ثابت در حشرات سالم و بیمار *L. migratoria*

	تعداد	میانگین	SE
حشرات سالم	۱۲	۱٤٤/۳	۷/٤
حشرات آلوده	۱۲	۷٥	۷
T= ٦/۷۹ P= ۰			

یکی دیگر از دلایل کاهش سلول‌های خونی پس از پیشرفت بیماری می‌تواند از بین رفتن سلول‌های خونی در اثر متابولیت‌های سایتوتوکسیک قارچی باشد. مازت و همکاران (۱۱) دریافتند که *B. bassiana* طی عفونت قارچی متابولیت‌های سمی تولید می‌کند که فعالیت هموسیت‌ها را در لارو *Spodoptera exigua* کاهش می‌دهد. در مورد *M. anisopliae* var *acridum* نیز مشخص شده است که دستروکسین ترشح شده توسط این قارچ برای سلول‌های خونی سمی بوده و آنها را از بین می‌برد (۱۲).

زهرابه‌های دستروکسینA و E و سایتوکالازین که توسط قارچ *M. anisopliae* هنگام ایجاد عفونت در حشرات ترشح می‌شوند قادرند روی مرفولوژی و اسکلت سلولی[1] سلول‌های خونی شب پره *Galleria mellonella* تاثیر گذاشته و آنها را تغییر دهند (۱۷).

۱- cytoskeleton

پلاسماتوسیت‌هایی که از حشرات آلوده جدا شده بودند در چسبیدن و گسترده شدن روی سطوح از خود نقصان نشان داده و در آنها به اسکلت سلولی که با کمک میکروتوبولها و رشته‌های اکتین شکل می‌گیرد صدمه وارد شده بود. وارد آمدن صدمه به اسکلت سلولی که مهمترین عامل در حرکت سلول است از انجام اعمالی مانند ایجاد پاهای کاذب و انجام عمل اندوسیتوز جلوگیری می‌نماید. علاوه بر این تحت تاثیر این زهرابه‌ها تاول‌هایی در سطح سلول‌های خونی پدید آمد (۱۶).

گرچه زهرابه‌هایی که تاکنون از محیط کشت *B. bassiana* جدا شده با زهرابه‌های *M. anisopliae* متفاوت هستند ولی تحقیق حاضر نشان داد که آلودگی با *B. bassiana* علائم مشابهی در سلول‌های خونی *L. migratoria* ایجاد می نماید. هونگ و بوسیاس (۷) و هونگ و همکاران (۸) بازداشته شدن هموسیت‌های لاروهای *Spodoptera exigua* از تشکیل پاهای کاذب و گسترده شدن روی سطوح را پس از آلوده شدن به جدایه‌ای از *B. bassiana* گزارش نمودند. مطالعات بعدی نشان داد این تغییرات تحت اثر ترکیبات سمی محلول (زهرابه‌ها) که در طی بیماری قارچی ترشح می‌شوند صورت می‌گیرند (۱۱).

بروز علائم مشابه در هموسیت‌های *L. migratoria* آلوده شده به *B. bassiana* نیز می‌تواند به علت ترشح ترکیبات مشابه توسط جدایه‌های ایرانی مورد آزمایش باشد. اثبات این امر مطالعات تکمیلی در جهت جداسازی و شناسایی این ترکیبات را طلب می‌نماید.

طبق نظر جیلسپی و همکاران (٤) سلول‌های سازنده پروفنل اکسیداز در ملخ‌ها کوآگولوسیت‌ها هستند و یکی از مهمترین ساز و کارهای دفاعی در حشرات فعال شدن پیش آنزیم پروفنل اکسیداز و تبدیل آن به فنل اکسیداز است که در فرآیندهای مختلفی مانند کپسوله شدن و تولید گره نقش مهمی بازی می‌کند. افزایش درصد و تعداد کوآگولوسیتها در ملخ‌های بیمار نشانه فعال شدن سیستم دفاعی حشره برای مقابله با عامل بیماری می‌باشد.

به طور کلی نتایج بالا نشان می‌دهد که سیستم دفاعی حشره در مقابل تهاجم *B. bassiana* فعال می‌شود (تعداد سلول‌های خونی افزایش می‌یابد، گره تولید می‌شود و ...) ولی این سیستم قادر نیست قارچ را مهار کرده و از پیشرفت بیماری جلوگیری کند زیرا عامل بیماری از یک سو با تولید متابولیت‌های سمی فعالیت این سیستم را مختل می‌کند و از سوی

دیگر با رشد سریع و گسترده از تاثیر این سیستم (برای مثال عمل فاگوسیتوز) رهایی می‌یابد.

تجزیه و تحلیل وقایعی که پس از نفوذ قارچ به بدن میزبان اتفاق می‌افتد نشان داده است سلول‌های قارچی تولید شده به صورت در زیوه[۱] قادرند از عکس العمل‌های ایمنی سلولی میزبان دوری جسته، آنها را خنثی نموده یا در مقابل آنها مقاومت کنند. سلول‌های قارچی (بلاستوسپورهای) گونه‌های *Paecilomycis fumosoroseus*، *B. bassiana* و *Nomurea rileyi* دارای اپی‌توپ‌های[۲] منحصر به فرد سطحی هستند که توسط سلول‌های خونی در گردش قابل شناسایی نمی‌باشند. مشخص شده است که پادتن‌های پلی کلونال تهیه شده برای اندام‌های هیفی *N. rileyi* با غشاء سلولی سلول‌های دانه‌دار بیگانه خوار *S. exigua* نیز واکنش تقاطعی نشان می‌دهند. موضوع اخیر نشان دهنده توانایی بالقوه تقلید عامل بیمارگر از سلول‌های خونی میزبان می‌باشد (۱).

بنا به گفته تانادا و کایا (۱۵) تولید بلاستوسپور ساز و کار دیگری برای رهایی قارچ از اثرات بازدارنده سیستم ایمنی حشره است. زیرا این عناصر قارچی فاقد گیرنده‌های مناسب برای اتصال هموسیت ها و اپسنین‌ها[۳] هستند. در نتیجه سیستم ایمنی حشره قادر نیست آنها را به صورت مؤثر شناسایی کرده و با عمل بیگانه‌خواری از بین ببرد.

با توجه به نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مشخص می‌شود که سلول‌های خونی ملخ *L. migratoria* قادر هستند که کنیدی‌های هوایی قارچ *B. bassiana* را به خوبی شناسایی نموده و آنها را فاگوسیتوز کنند و عمل بیگانه‌خواری را در مورد بلاستوسپورها نیز انجام دهند. ولی عمل بیگانه‌خواری در مورد هیچکدام از این عناصر قارچی موفقیت آمیز نیست. گرچه اندام‌های هیفی فاقد دیواره سلولی معمول که در دیگر عناصر قارچی مشاهده می‌شود هستند ولی لایه‌ای نازک متشکل از رشته‌ها روی غشاء سلولی آنها را می‌پوشاند (۹). فاگوسیتوز بلاستوسپورهای جدایه‌های ایرانی توسط سلول‌های خونی نشانگر این امر است که

۱- in vivo

۲- epitops

۳- Opsonin = موادی هستند که توسط سیستم ایمنی حشره ترشح شده، به سطح جسم خارجی می‌چسبند و باعث شناسایی آن توسط سلول‌های خونی و پدیده بیگانه‌خواری می‌شوند.

اپی‌توپ‌های قابل شناسایی روی این دیواره رشته ای وجود دارد. حالت مشابهی در مورد لاروهای *G. mellonella* که به قارچ *M. anisopliae* آلوده شده بودند نیز مشاهده شده است (۱۶). با توجه به اینکه بلاستوسپورهای بلعیده شده از بین نرفته و درون سلول‌های خونی تکثیر می‌شوند عمل بیگانه‌خواری نه تنها کمکی در جلوگیری از گسترش بیماری نمی‌نماید بلکه با انتقال سلول‌های خونی آلوده به نقاط مختلف بدن حشره بیماری گسترش نیز پیدا می‌کند. باید خاطر نشان ساخت که سلول‌های خونی حشره پس از پیشرفت بیماری و تاثیر زهرابه‌های قارچی روی آنها قادر به عمل بیگانه‌خواری نیستند و عدم توانایی در بیگانه‌خواری (حداقل در مورد سلول‌های خونی *L. migratoria* و بلاستوسپورهای *B. bassiana*) آنطور که در بالا از قول عده‌ای از محققین ذکر گردید به علت عدم تشخیص اپی‌توپ‌های آنتی ژنیک موجود بر روی بلاستوسپورها نیست.

به نظر می‌رسد که مهمترین عوامل در غلبه قارچ *B. bassiana* بر سیستم ایمنی حشره مسموم نمودن سلول‌های خونی با زهرابه‌ها، رشد سریع و تکثیر بلاستوسپورها و فرار از غیر فعال شدن و بالاخره عدم توانایی سلول‌های خونی مسموم شده در نابود کردن عناصر قارچی از طریق فاگوسیتوز باشد.

References

1- Boucias, D. G. and Pendland, J. C. 1998. Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers. Boston, Masachusetts.

2- Davies, D. H.; Hayes, Siva - Jhothy, M.t. 1991. Encapsulation in insects: Polydinaviruses and encapsulation-promoting factors. In: Immunity of insects and other arthropods, ed. AP Gupta, pp. 120-132. Boca Raton: CRC

3- Gillespie, J. P.; Kanost, M. R. and T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annual Review of Entomology. 42: 611-643.

4- 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.

5- Götz, P. 1986. Encapsulation in arthropods. In: Immunity in Invertebrate: Cells, Molecules and Defense Reactions, ed. Brehelin, pp. 153-170. Berlin: Springer Verlag

6- Gunnarsson, S. G. S. 1985. Hemocytic aggregation in *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. Journal of Invertebrate Pathology. 46: 312-319.

7- Hung, S. H. and Boucias, D. G. 1992. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of beet army worm, *Spodoptera exigua*. Journal of Invertebrate Pathology. 60: 152-158.

8- Hung, S. H.; Boucias, D. G. and Vey, A. 1993. Effect of *Beauveria bassiana* and *Candida albicans* on the cellular defense response of *spodoptera exigua*. Journal of Invertebrate Pathology. 61: 179-187.

9- Inglis, G. D.; Goettel, M. S.; Butt, T. M. and Strasser, H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing biocontrol agents. In: Fungi as biocontrol agents (eds. Butt, T. M.; Jackson, C. and Magan, N.) pp. 23-69. CABI Publishing, Wallingford, UK.

10- Karp, A. D. 1993. The response to foreign tissue transplants in insects. In: Parasites and pathogens of insects. Vol. I Parasites, (eds. N. E. Beckage, S. N. Thompson) pp.305-316. San Diego: Academic

11- Mazet, I.; Hung, S. Y. and Boucias, D. G. 1994. Dectection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. Experientia. 50: 142-147.

12- Samuels, R. I.; Charnley, A. K. and Reynolds, S. E. 1988. The role of destruxins in the pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobbaco horn worm,

Manduca sexta. Mycopathologia 104: 51- 58

13- Strand, M. R. and Johnson, J. A. 1996. Characterization of monoclonal antibodies to hemocytes of *Pseudoplusia includens*. Journal of Insect Physiology. 42: 21-31

14- Sussman, A. S. 1952. Studies of an insect mycosis. 3. Histopathology of an aspergillosis of *Platysamia cecropia* L. Annual of Entomological Society of America. 45: 243-245

15- Tanada, Y. and H. K. Kaya. 1993. Insect Pathology. Academic Press, London. pp.666

16- Vilicinskas, A.; Matha, V. and Götz, P. 1997. Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. Journal of Insect Physiology. 43(5): 475-483.

17- Vilicinskas, A.; Matha, V. and Götz, P. 1997. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Journal of Insect Physiology. 43(12): 1149-1159.

Journal of Entomological Society of Iran. 23 (2), 2004

The Response of the Cellular Immune System of *Locusta migratoria* (Orth.: Acrididae) to Fashand Isolate of *Beauveria bassiana* (Moniliales, Moniliaceae)

M. Ghazavi[1], A. Kharazi-Pakdel[2] and J. Ershad[1]

Abstract

Haemocytes of *L. migratoria* are categorized on the basis of morphlogical characteristics of spread cells in four groups, namely plasmatocytes, granulocytes, coagulocytes and prohaemocytes. In the current study the cell number fluctuation was studied during the progress of infection. The results showed that the total haemocyte count (THC) increased during the first three days of infection and decreased subsequently (significant at 99% confidence interval comparing controls). Regarding Differential Haemocyte count (DHC), the similar trend was observed, although the relative percent of coagulocytes increased compared to the other three cell categories. Furthermore, along with the spreading of disease the phagocytic potential of blood cells decreased and prior to insect's death these cells were unable to spread their pseudopodia to engulf fungal elements. Although the blood cells were able to phagocytise the aerial conidia injected to insects' haemocoel in the beginning of infection and blastospores produced in the course of fungal proliferation, these fungal elements were not killed and after germination or multiplication they destroyed the cells, in which they enclosed and colonized their host body. The other impact of the disease on insect's cellular immune system was the production of granulomas that were sometimes without fungal elements and were produced under the effects of fungal metabolites.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Locusta migratoria*, Haemocytes, Immune system.

1- Plant Pests and Diseases Reserch Institute, P.O.Box 1454 Tehran, 19395 Iran.

2- College of Agriculture, Tehran University, Karaj.