

آسیب‌شناسی بافتهای روده میانی لاروهای

Ostrinia nubilalis persica Mutuura & Munroe 1970

(Lep.: Pyralidae: Pyraustinae)

تغذیه کرده از اسپوروتوکسین باکتری

Bacillus thuringiensis واریته *kurstaki**

نگارش

حسن عسکری^۱ - عزیز خرازی پاکدل^۲

بهروز شاهسون بهبودی^۳ - نسرین معظمی^۴

چکیده:

لاروهای سن چهارم کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت زیرگونه *persica* از باکتری *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* با دز ۵۰۰ p.p.m. در وزن غذا تغذیه شدند. آسیب‌شناسی لاروهای آلوده در مقایسه با شاهد توسط میکروسکوپ نوری نشان داد که سلولهای پوششی استوانه‌ای روده میانی در مقایسه با سلولهای سالم، متورم شده و حفره‌های سلولهای گوبلت وسیعتر شده‌اند. مطالعات میکروسکوپ الکترونی مشخص نمود که در اثر استفاده از اسپوروتوکسین، میکروویلی سلولهای پوششی استوانه‌ای روده میانی از بین می‌روند.

۱ - مهندس حسن عسکری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، بخش حیابیت و حفاظت منابع طبیعی، کرج - ایران،

صندوق پستی ۳۴۳-۳۱۵۸۵

۲ - دکتر عزیز خرازی پاکدل، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج - ایران

۳ - دکتر بهروز شاهسون بهبودی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران - ایران

۴ - دکتر نسرین معظمی، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، صندوق پستی ۱۱۵-۲۳۱۶۵

* - این مقاله در تاریخ ۱۳۷۲/۹/۱۷ به دفتر نامه انجمن واصل شده است.

سلولها متورم و حفره دار، هسته آمیبی شکل و فرورفتگیهای درونی غشاء سیتوپلاسمی در قاعده سلولهای پوششی کاهش می یابد. پیش رفتگیهای سیتوپلاسمی درون حفره سلولهای گوبلت از بین رفته و مجرای سر سلول (neck connecting) بزرگتر می شود. مطالعه توسط میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ نیز نشان داد که در قله سلولهای پوششی استوانه ای روده میانی، پارگی شدیدی وجود دارد و بین این سلولها از هم گسیختگی دیده می شود.

مقدمه:

کرم ساقه خوار اروپایی ذرت (*Ostrinia nubilalis*) یک آفت پسی فاژ در منطقه شمال (فرحبخش، ق. ۱۳۴۰؛ نعیم، عزیزالله ۱۳۵۸؛ امیری ۱۳۶۹؛ Barbulescu, Al., 1975؛ Mutuura, A., & E. Munroe 1970، و سایر نقاط ایران عبائی، م و عادل۱۳۶۲) می باشد. این حشره دارای سه زیرگونه است که زیرگونه *persica* از ناحیه میازندان گزارش شده است (Mutuura, A. & E. Munroe, 1970). توصیف شکل شناسی حشره توسط عسکری در سال ۱۳۷۱ به عمل آمده است.

مطالعات آسیب شناسی لوله گوارشی حشرات مختلف در اثر تغذیه از باکتری *Bacillus thuringiensis* نشان داده است که سلولهای پوششی روده میانی از غشاء قاعده ای جدا و به داخل حفره لوله گوارش می ریزند. غشاء پلاسمایی از هم گسیخته و تعداد زیادی حفره در سلولها دیده می شوند (Hoopingartner & Materu 1964; Heimpel & Angus, 1959). در لاروهای *Ostrinia nubilalis* که از واریته *thuringiensis* تغذیه کرده اند ماهیچه های طولی و حلقوی تحت تأثیر قرار گرفته و حرکات طبیعی خود را از دست داده و منقبض شده اند. علائم بیماری از ناحیه جلویی روده میانی (Proventricular) همراه با تخریب میکروویلیها، شبکه اندوپلاسمی و از بین رفتن چربیها تا ناحیه انتهایی روده میانی مشاهده شده است (Sutter, G.R., et al., 1967).

مطالعه بر روی سلولهای روده میانی کرم ابریشم (*Bombyx mori*) که از *B. thuringiensis* واریته *kurstaki* تغذیه کرده بودند نشان داده است که بلور سمی بعد از یک دقیقه پس از هضم موجب واکنشهای سیتوپلاسمی در سلولهای استوانه ای پوششی می شود. میکروویلیها ناهمگن و میکروفیلانهای داخلی نیز به تدریج محو و شبکه اندوپلاسمی گسترده گی پیدا می کند (Percy, J. & P.G. Fast, 1983). مطالعات بافت شناسی دستگاه گوارش لارو *Manduca sexta* با دز کمی از اسپور و توکسین باکتری (۱-۱۰ پی پی ام) از فرآورده *Thuricide* و مقایسه آن با اثر گرسنگی بر روی لارو نشان داد که سلولهای پوششی استوانه ای در روده میانی عکس العمل مشابهی را برای هر دو بروز می دهند (Delello, E., et al., 1984).

مطالعات میکروسکوپی ایمنی شناسی (Immunolocation) محل خاصی را برای تأثیر

توکسین روی سلولهای روده میانی مشخص نکرده و ظاهراً غشاء پلاسمایی هر دو طرف بافت (مخاطی و قاعده‌ای) به‌طور یکسان تحت تأثیر سم قرار می‌گیرند (Ryerse, J.S., et al. 1990).

روش و وسایل:

تهیه لارو: لاروها از مزارع ذرت (دشت ناز ساری، شمال ایران) جمع‌آوری و در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاه با دمای $1^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ ، رطوبت $5 \pm 70\%$ و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، روی محیط غذای مصنوعی (رائی‌پور، احمد ۱۳۶۰؛ Poitout, S., et al., 1972) پرورش داده شدند. برای مطالعات آسیب‌شناسی از لاروهای نسل دوم که در آزمایشگاه پرورش یافته بودند، استفاده گردید.

تهیه باکتری: وارسته *kurstaki* از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، بخش بیوتکنولوژی گرفته شد. برای آلوده‌سازی لاروها، ترکیب اسپوروتوکسین باکتری با غذای مصنوعی بدون آنتی‌بیوتیک با دز ۵۰۰ پی‌پی‌ام در وزن غذا آمیخته شد و در اختیار لاروهای سن چهارم قرار گرفت. بعد از ۴۸ ساعت تغذیه در شرایط مشابه با پرورش اولیه، از لاروها نمونه‌برداری و ادامه کار به شرح زیر انجام شد.

آسیب‌شناسی:

الف - میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن: با استفاده از روش (Audrey, M. Glauert, 1975) بافتها به شرح زیر آماده مطالعه شدند.

لاروها به‌طور جداگانه در فیکساتور گلو تار آل‌دئید ۳٪ در دمای صفر درجه سانتی‌گراد تشریح شدند. سپس روده میانی آنها خارج گردید و در فیکساتور فوق به مدت ۳ ساعت تثبیت شد. شستشوی بافتها در بافر فسفات با $\text{PH} = 7/3$ و $0/1$ مول به عمل آمد. تثبیت مجدد بافتها با اسید اسمیک ۱٪ محلول در بافر فوق، به مدت ۲ ساعت انجام شد. آبیگری از بافتها توسط استن و قالبگیری در رزین Epon 812 صورت گرفت. پس از تهیه برشهای بسیار نازک مقاطع بر روی گرید با استات اورانیل اشباع‌شده به مدت ۲۵ دقیقه و سترات سرب به مدت ۷ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید.

ب - میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ: پس از تثبیت لاروها توسط گلو تار آل‌دئید و اسید اسمیک مانند روش فوق، آبیگری با درجات صعودی الکل اتیلیک انجام شد. بلافاصله بعد از این مرحله یک برش طولی در روده‌های میانی ایجاد و روی یک قطعه کاغذ فیلتر چسبانده شدند. پس از پوشش دادن بافتها با طلا، با میکروسکوپ اسکینینگ مورد مطالعه قرار گرفتند.

پ - استفاده از برشهای نیمه نازک رزینی با میکروسکوپ نوری (Semi section): از بلوکهایی که برای میکروسکوپ الکترونی تهیه شده بود، برشهایی به ضخامت یک میکرون تهیه و روی لام شیشه‌ای قرار گرفتند و سپس با *Bleue de méthylène-O* رنگ آمیزی و به وسیله میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

نتایج:

الف) سیتولوژی روده میانی

سه نوع سلول را در بخش معده میانی می توان تشخیص داد.

۱ - سلولهای پوششی استوانه‌ای (Columnar cells): این سلولها قطبی بوده، در بخش داخلی خود به حفره عمومی لوله گوارش ختم می‌شوند و در این ناحیه دارای میکروویلی‌هایی (Microvillies) می‌باشند که سبب افزایش سطح غشاء و بالا رفتن عمل جذب مواد غذایی می‌شوند. در حالت عادی این میکروویلیها دارای نظم و انسجام بوده و توسط غشاء نرم (Peritrophic membrane) محافظت می‌شوند (عکس A-۱، B-۱ و ۶).

۲ - سلولهای گوبلت (Goblet cells): این سلولها در کنار و بین سلولهای پوششی استوانه‌ای قرار داشته و حاوی یک حفره داخلی می‌باشند. در داخل این حفره پیشرفتگیهای سیتوپلاسمی دیده می‌شوند (عکس ۳ و ۱۷) مشاهدات مرفولوژیکی ما با آنچه DeIello, E. در سال ۱۹۸۴ منتشر کرده است مطابقت دارد.

۳ - سلولهای ترمیمی (Regenerative cells): این سلولها در قاعده و یا ناحیه بیرونی دیواره روده میانی قرار گرفته و وظیفه‌شان جایگزین شدن به جای سلولهای قدیمی است (عکس ۲). اندازه این سلولها کوچکتر از انواع دیگر بوده و دارای سیتوپلاسم دانس (متراکم) و شبکه اندوپلاسمیک گسترده و هسته‌های آنها دارای کروماتین فعال می‌باشند که احتمالاً دلالت بر سنتز پروتئین بالا در این سلولها دارد.

ب) سیتوپاتولوژی روده میانی در اثر استفاده از اسپوروتوکسین

۱ - سلولهای پوششی استوانه‌ای

۱-۱ - میکروویلیها در ناحیه سر سلولهای پوششی به ساختمان میکروفیبریلار (Micro fibrillar) ختم می‌گردند که در زیر غشاء پلاسمایی سلول به صورت یک شبکه بسیار ظریف گسترده است. در داخل هر میکروویلی، میکروتوبولها (Microtubules) قرار گرفته‌اند

که یک سر آنها به درون شبکه میکروفیبریلار دوانده شده و به صورت یک کلاف و همانند یک فونداسیون (پی) برای نگهداری میکروویلیها عمل می‌کنند. بعد از تغذیه از اسپوروتوکسین، در درجه اول این شبکه ناپدید و به تدریج از تعداد میکروویلیها کاسته می‌شود (عکس ۶ و ۷). میکروویلیها به صورت ناهمگن و حبابی شکل درآمده و نهایتاً از غشاهای سلولهای پوششی جدا می‌شوند (عکس ۵) و حتی خود سلولهای پوششی استوانه‌ای نیز به صورت حباب و یا پیازی تغییر شکل می‌دهند (عکس ۴ و ۵). مطالعه سطحی سلولهای پوششی با میکروسکوپ الکترونی اسکیننگ نشان می‌دهد که حالت پیشرفته‌تر بیماری با پاره شدن سلولهای پوششی استوانه‌ای و تخلیه شدن مواد درون سلولی آنها به داخل حفره گوارشی اتفاق می‌افتد (عکس ۹ و ۱۰). در حالی که در سلولهای لاروهای غیرآلوده هیچگونه تخریبی مشاهده نگردید (عکس ۸). از طرف دیگر به نظر می‌رسد که در بین سلولهای پوششی لاروهای آلوده به علت از بین رفتن چسبندگی بین سلولها، فواصل و از هم گسیختگی به وجود می‌آید (عکس ۹). این فواصل در مورد لاروهای سالم وجود ندارد.

۱-۲ - ارگانها

در سلولهای پوششی روده لاروهایی که تحت تاثیر اسپوروسم قرار گرفته‌اند، فرورفتگیها و چین خوردگیهای غشاء قاعده‌ای سیتوپلاسمی کاهش یافته است (عکس ۱۴ و ۱۵). در این سلولها حفرات به تعداد بسیار محسوسی افزایش یافته و شبکه اندوپلاسمی گسترده‌تری داشته است (عکس ۱۲) و ریبوزومهای آزاد کاهش یافته‌اند. به نظر می‌رسد که فعالیت‌های اتوفاژی در سیتوپلاسم این سلولها افزایش می‌یابد. تغییر شکل در میتوکندریها نظیر افزایش حجم و نیز افزایش در تعداد تیغه‌های داخلی آن در اثر تنفس بیشتر در سلولهای آلوده قابل توجه می‌باشد. دستگاه گلژی نیز متورم شده ولی ظاهراً ساختمان خود را حفظ کرده است. هسته حالت کروی خود را از دست داده و غشاء آن چین خورده و بی نظم و اصطلاحاً آمیبی شکل می‌شوند، همچنین منافذ غشاء هسته نیز گشادتر به نظر می‌رسند (عکسهای ۱۱ و ۱۲ و ۱۳).

۲- سلولهای گوبلت (Goblet cells)

سلولهای گوبلت نیز تحت تاثیر اسپوروسم تغییر می‌کنند. اولین اثر قابل مشاهده افزایش حجم حفره سلول گوبلت مخصوصاً در بخش جلویی روده میانی است. همچنین مجرای تنگه اتصال (neck connecting) که به داخل حفره لوله گوارش باز می‌شود، در سلولهای گوبلت آلوده و شیتر از سلولهای سالم می‌باشد (عکس ۱۶).

پیشرفتگیهای سیتوپلاسمی به داخل حفره سلولهای گوبلت نظم خود را به کلی از دست داده و به تدریج از بین می‌روند (عکس ۱۸). سلولهای گوبلت در قسمت میانی و عقبی روده اصلی تغییرات کمتری را داشته‌اند (عکس ۱۷).

بحث:

تخریب شبکه میکرو فیبریلار و جدا شدن میکرو ویلیها در اثر تغذیه از اسپوروتوکسین باکتری اولین اثر محسوس روی سلولهای پوششی استوانه‌ای است. همین عکس‌العمل را Percy, J., et al., (1983) با تزریق توکسین و ۱ تا ۴ دقیقه بعد از هضم آن در داخل روده میانی گزارش می‌کنند. کاهش تدریجی، فرورفتگیها و چین خوردگیهای غشاء سیتوپلاسمی در قاعده سلولهای پوششی استوانه‌ای و کاهش غلظت سیتوپلاسمی نیز با تحقیقات Reinser, W.M., et al., (1989) بر روی سلولهای پوششی استوانه‌ای لوله‌های مالپیگی مطابقت دارد. این محققین اختلال در تبادلات یونی بین این سلولها و محیط خارج را دلیل این تغییرات ساختمانی می‌دانند. سلولهای گوبلت نیز در آزمایشهای ما به همین ترتیب دچار تخریب شده‌اند. (Delello, 1984) عقیده دارد که این سلولها مسئول ورود یون پتاسیم به داخل روده می‌باشند. سایر محققین گفته‌اند که در لاروهای پروانه‌ها بعضی از مواد زائد نظیر فلزات و رنگدانه‌ها در حفره سلول گوبلت یا سیتوپلاسم آن ذخیره شده و هنگام جلداندازی به خارج دفع می‌شود. ما فکر می‌کنیم که توکسین احتمالاً با اختلال در امر ورود و خروج یونها و سایر مواد، بر روی ساختمان و عمل غشاء اثر سریع گذاشته و اختلالات مرفولوژیکی را پدید می‌آورد. طبیعتاً در این مورد باید تحقیقات دقیقتری به انجام برسد.

تخریب در سلولهای پوششی روده میانی بستگی به دز و مدت زمان تأثیر توکسین و اسپور دارد. به عبارت دیگر چنانچه زمان تأثیر طولانی‌تر باشد تمام سلولهای پوششی اعم از سلولهای استوانه‌ای و سلولهای گوبلت در بخشهای جلویی، میانی و انتهایی به‌طور یکسان تخریب می‌شوند.

بررسی سطح غشاء این سلولها با میکروسکوپ الکترونی اسکیننگ تخریب شدیدی را بعد از ۴۸ ساعت تحت تأثیر اسپوروسم باکتری نشان داد. این اثر که برای اولین بار گزارش می‌گردد شاید باز هم به دلیل اختلال در تبادلات غشاء باشد. مشاهدات با میکروسکوپ نوری و الکترونی در ارتباط با تغییرات شکل‌شناسی و تخریب سلولها با آنچه که Ebersold et al., (1977) در مورد *Pieris brassicae* (Endo & Nishiitsutsuji-Uwo (1980,1981) در مورد کرم ابریشم؛ (Heimple & Angus, 1959) و (Nishiitsutsuji - Uwo & Endo (1981) مطالعات (Sutter et al., (1967) با استفاده از وارپته *thuringiensis* بر روی *O. nubilalis* نتایج نسبتاً مشابهی را با بخشی از تحقیقات ما نشان می‌دهد. آنها اعتقاد دارند که اسپور سبب تغییر PH روده میانی شده و باکتری قادر به تجدید حیات می‌باشد. به اعتقاد ما این مسئله برای وارپته *kurstaki* نیاز به تحقیقات بعدی دارد. چون اسپورها ظاهراً قادر به جوانه زدن در PH بالای موجود در روده میانی نیستند.

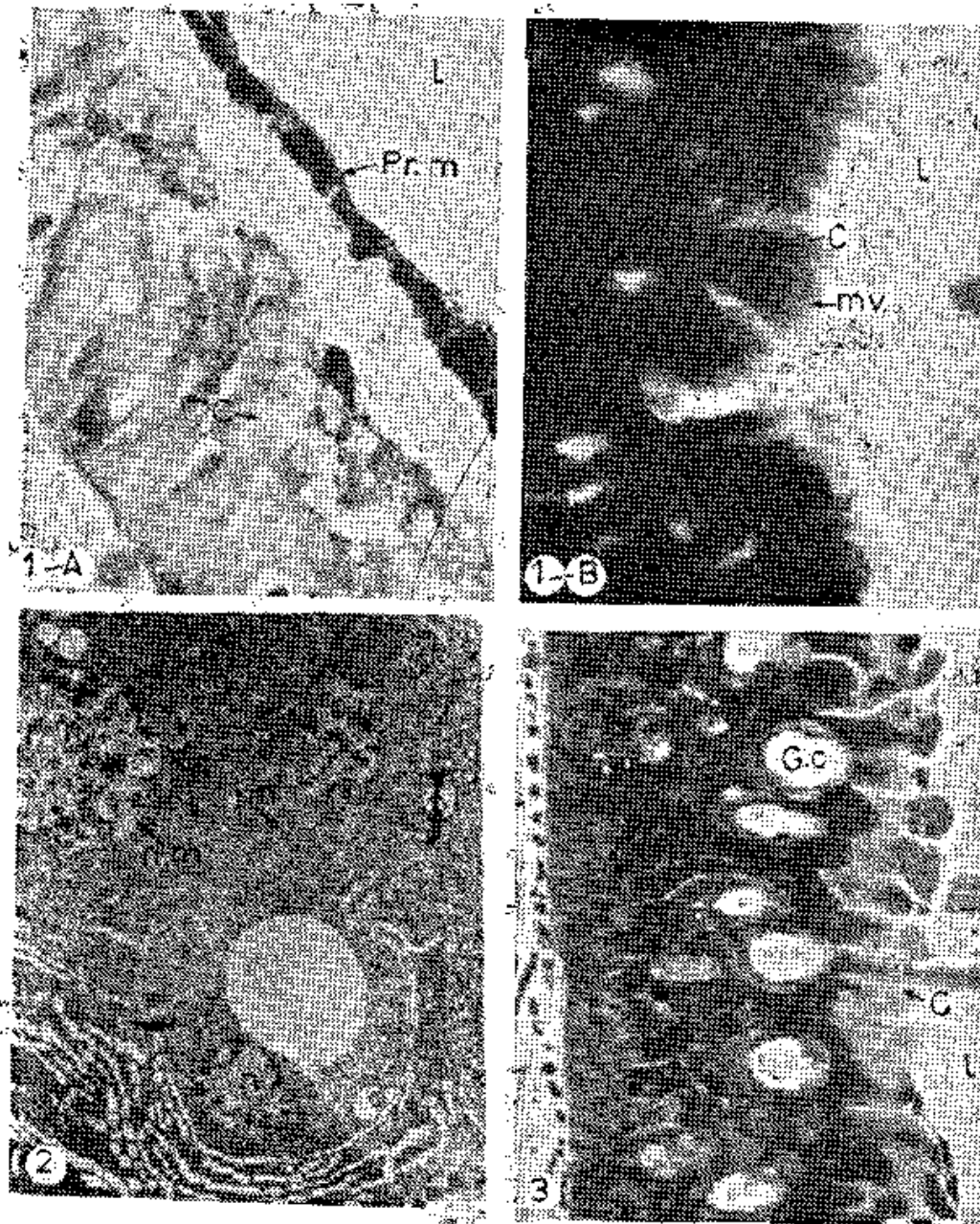
به طور کلی روند پیشرفت بیماری در لاروهای الوده که با بروز علائم برونی به سرور - س تغذیه، عدم تحرک، تأخیر رشد و فلج شدن بدن مشخص می شود، منطبق بر تغییراتی است که در سلولهای پوششی رخ داده بود اختلالات مزبور لاروهای آلوده را دچار ناهنجاریهای فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی کرده و نهایتاً موجب مرگ می گردیدند.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، آزمایشگاه سیتولوژی دانشکده علوم دانشگاه تهران و مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی ایران که در فراهم آوردن امکانات لازم برای این مطالعه ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع فارسی:

۱. امیری، بهنام - ۱۳۶۹
- بررسی بیولوژی کرم ساقه خوار اروپایی ذرت (*Ostrinia nubilalis* Hüb.) و توانایی پادارزیتوئیدی تریکوگراما در مبارزه بیولوژیک با آن در شرق مازندران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۶۴ ص.
۲. رائی پور، احمد - ۱۳۶۰
- بررسی نقش قندهای مختلف در تغذیه لاروهای پروانه *O. nubilalis*. نشریه آفات و بیماریهای گیاهی، جلد ۵، شماره (۱ و ۲)، ص ۳۹-۵۶
۳. عبائی، منصور و ابراهیم عادل - ۱۳۶۲
- فهرست آفات درختان و درختچه های جنگلی و غیر مشر ایران. چاپ ندا، مؤسسه بررسی آفات و بیماریهای گیاهی، ۱۴۷ ص
۴. عسکری، حسن - ۱۳۷۱
- بررسیهای آزمایشگاهی در چگونگی بیماریزایی *Bacillus thuringiensis* Ber. روی کرم ساقه خوار اروپایی ذرت (*Ostrinia nubilalis* subsp. *persica* (Lep. - Pyralidae)
- پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، ۱۹۲ ص.
۵. فرحبخش، قدرت الله - ۱۳۴۰
- فهرست آفات مهم نباتات و فرآورده های کشاورزی ایران. نشریه شماره ۱، حفظ نباتات وزارت کشاورزی، ۱۵۳ ص
۶. نعیم، عزیزالله - ۱۳۵۸
- ذرت، انتشارات مؤسسه بررسی آفات و بیماریهای گیاهی، ۲۳۵ ص.



عکس 1-A: قسمتی از مقطع عرضی لوله گوارشی لارو. رنگ آمیزی با اتوزین و هماتوکسیلین هریس $\times 1300$

عکس 1-B: سلولهای پوششی استوانه‌ای روده میانی در لاروهای سالم. برش نیمه‌نازک، رنگ آمیزی با آبی متیلن $\times 7100$

عکس 2: سلولهای ترمیمی در قاعده و یا ناحیه بیرونی دیواره روده میانی TEM $\times 11000$

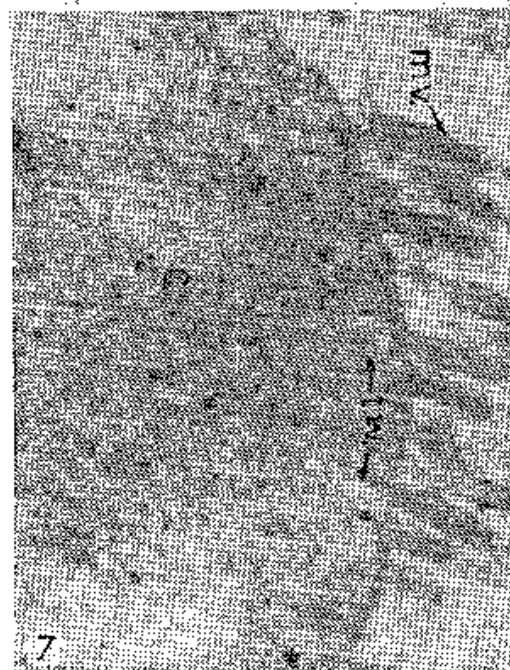
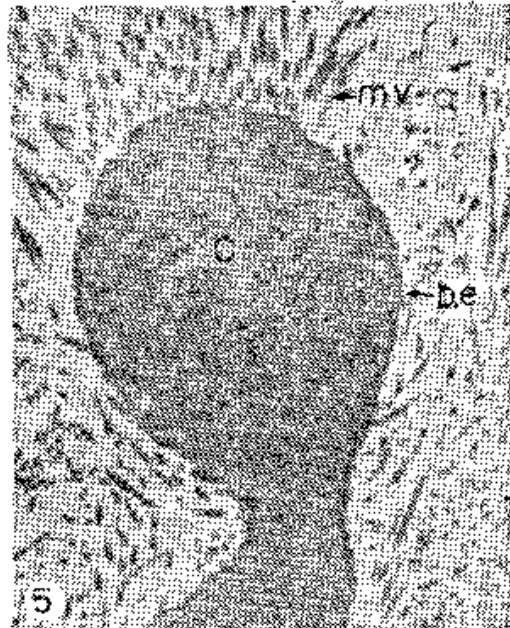
عکس 3: سلولهای گوبلت و حفره مرکزی آنها در ناحیه جلویی روده لاروهای سالم، برش نیمه‌نازک، رنگ آمیزی با آبی متیلن $\times 7100$

C = سلول پوششی استوانه‌ای g.c = سلول گوبلت G.c = حفره سلول گوبلت

i.m = غشای بین سلولی l = حفره لوله گوارشی mv. = میکروویلی

n = هسته n.m = غشای هسته R.c = سلولهای ترمیمی

Pr.m = غشای نرم محافظت‌کننده



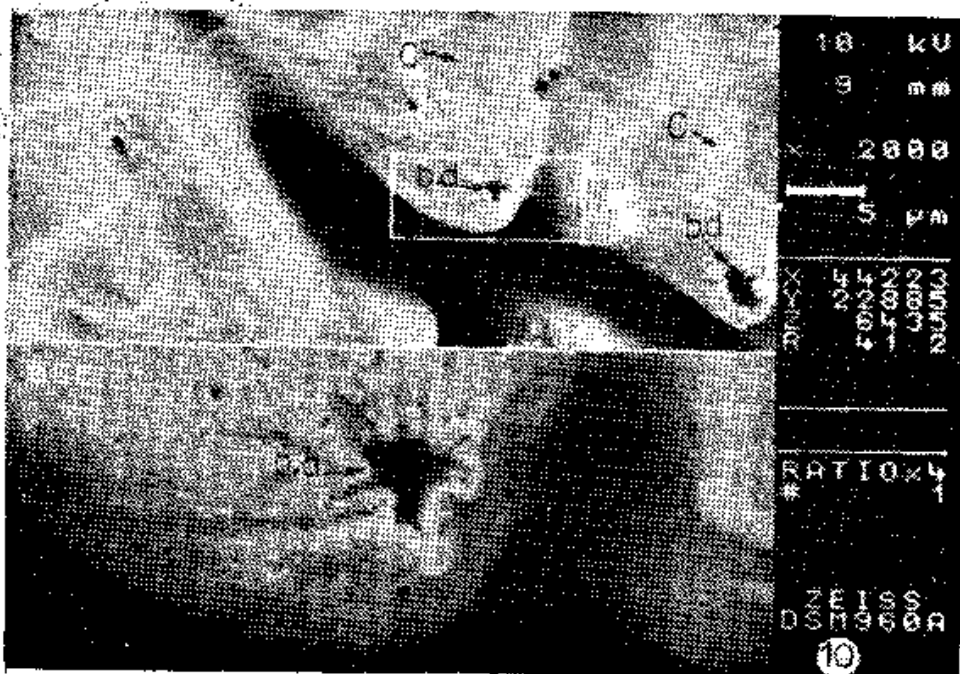
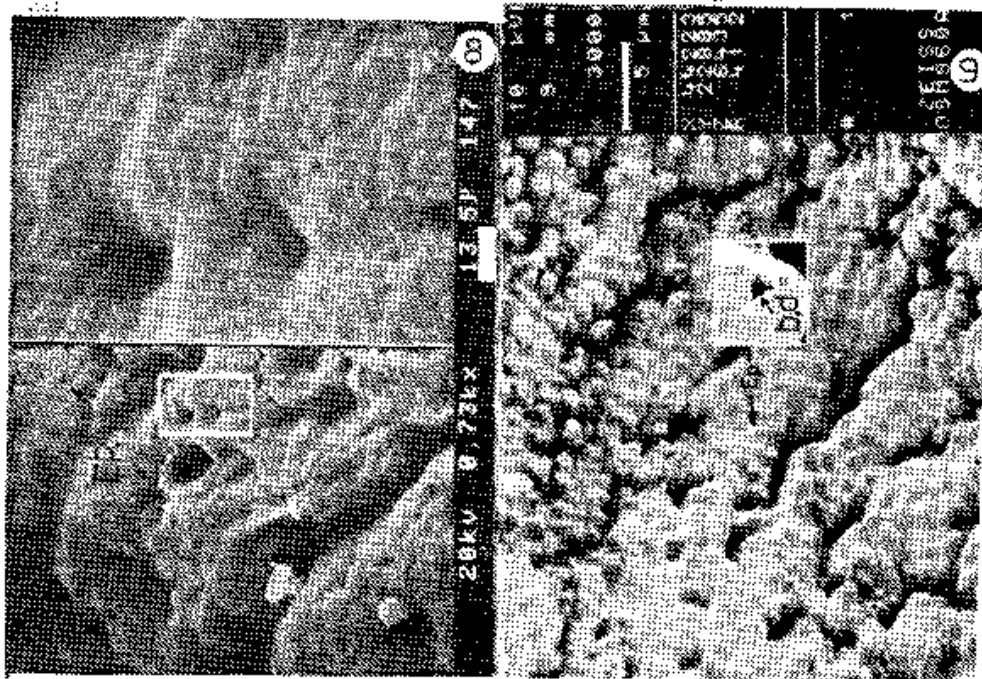
عکس ۴) سلولهای پوششی استوانه‌ای روده میانی لارو آلوده که متورم و حبابی شکل شده‌اند. پرش نیم‌مغنازک، رنگ‌آمیزی با آب متیلن $\times 7100$

عکس ۵) تورم و حبابی شدن سلول پوششی استوانه‌ای روده میانی و جدا شدن میکروویلی‌های آن در لارو آلوده $\times 27300$ TEM

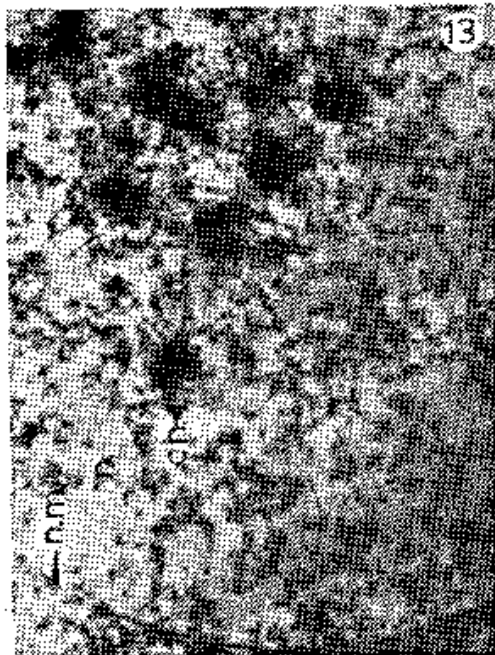
عکس ۶) انسجام شبکه میکروفیبریلار در زیر غشاء سلولهای پوششی استوانه‌ای و استواری میکروویلیها در روده میانی لارو سالم $\times 71000$ TEM

عکس ۷) تخریب و ناپدید شدن شبکه میکروفیبریلار در زیر غشاء سلولهای پوششی استوانه‌ای در لارو آلوده $\times 71000$ TEM

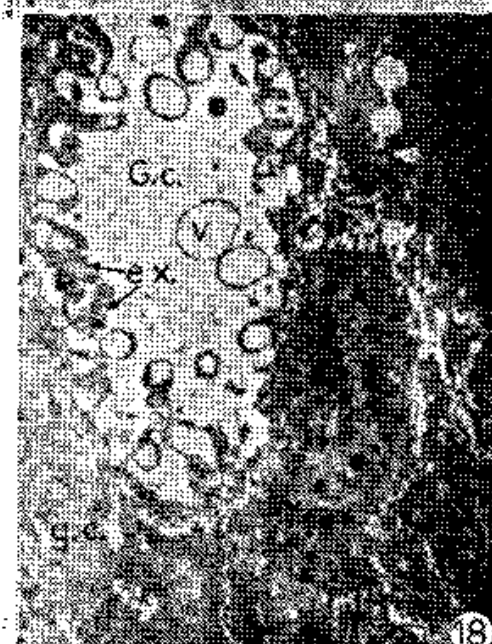
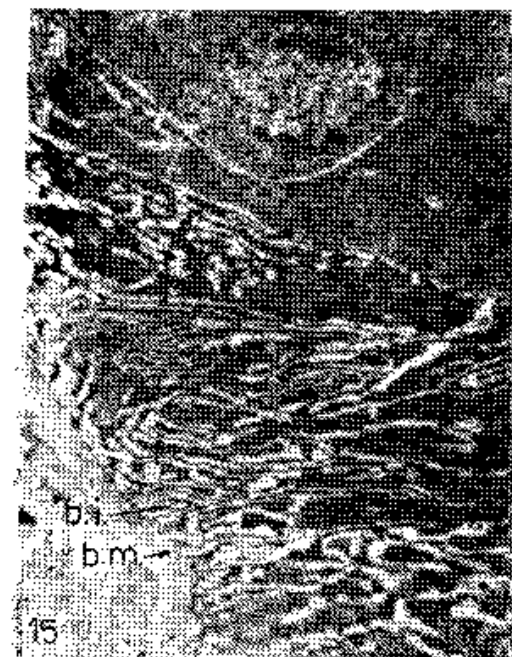
b.e. = حبابی یا پیازی شدن c. = سلول پوششی استوانه‌ای m.t. = میکروتوبول
mv. = میکروویلی t.w. = شبکه زیری یا شبکه میکروفیبریلار



- عکس ۸) سطح بیرونی غشاء سلولهای استوانه‌ای و پیوستگی آنها در لارو سالم
SEM (dual magnification)
- عکس ۹) پارگی شدید در قله سلولهای پوششی استوانه‌ای روده میانی و شکافهای بین آنها در لارو آلوده
SEM (dual magnification)
- عکس ۱۰) پارگی شدید در قله سلولهای پوششی استوانه‌ای روده میانی در لارو آلوده، قسمتی از عکس شماره ۹
SEM (dual magnification)
- سلولهای اپیتلیال (پوششی) = Ep. پارگی = b.d. سلولهای پوششی استوانه‌ای = C



- عکس (۱۱) نظم و شکل کروی هسته و غشاء آن در سلولهای پوششی استوانه‌ای در لارو سالم TEM $\times 15000$
- عکس (۱۲) تغییر غشاء هسته، گسترده و فعال شدن شبکه آندوپلاسمی خشن در لارو آلوده TEM $\times 15000$
- عکس (۱۳) نظم غشاء هسته و منافذ آن، انتشار هتروکروماتین و یوکروماتین در هسته سلولهای پوششی استوانه‌ای در لارو سالم. TEM $\times 34000$
- عکس (۱۴) فرورفتگیهای غشاء سیتوپلاسمی در قاعده سلولهای پوششی استوانه‌ای در لارو سالم TEM $\times 45000$
- یوکروماتین = E.ch غشاء قاعده‌ای = b.m چین خوردگیهای غشاء قاعده‌ای = b.i
 غشاء هسته = n هسته = H.ch هتروکروماتین = H.ch
 شبکه آندوپلاسمی خشن = r.e.r منفذ غشاء هسته = n.p



عکس ۱۵) کاهش فرورفتگیهای غشاء سیتوپلاسمی و چین خوردگیهای آن به داخل سلولهای پوششی استوانه‌ای در لارو آلوده TEM $\times 13000$

عکس ۱۶) قسمتی از یک سلول گوپلت در لارو آلوده که حفره مرکزی، تنگه اتصال و نیز قسمتی از دریچه آنرا نشان می‌دهد. به از بین رفتن پیشرفتگیهای سیتوپلاسمی توجه شود. TEM $\times 11000$

عکس ۱۷) پیشرفتگیهای سیتوپلاسمی به داخل حفره مرکزی سلولهای گوپلت در لاروهای سالم TEM $\times 19000$

عکس ۱۸) تخریب پیشرفتگیهای سیتوپلاسمی در داخل حفره سلول گوپلت در روده میانی در لارو آلوده TEM $\times 19000$

چین خوردگیهای غشاء قاعده‌ای = b.i.

غشاء قاعده‌ای = b.m.

پیشرفتگیهای سیتوپلاسمی به داخل حفره سلول گوپلت = ex.

حفره سلول گوپلت = G.c.

سلول گوپلت = g.c.

تنگه اتصال = n.c.

دریچه سلول گوپلت = v.g.

**Histopathology of midgut of European Corn Borer
(*Ostrinia nubilalis persica* Mutuura & Munroe 1970)
(*Lep.-Pyralidae: Pyraustinae*)**

larvae treated with *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* **

By

H. Askary¹, A. Kharazi Pakdel², B. Sh. Behbudi³, N. Moazami⁴

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*; European corn borer;
Ostrinia nubilalis persica, *Pyralidae*, Histopathology of midgut

SUMMARY

The midgut section of fourth stage larvae of E.C.B. (*O. nubilalis persica*) which treated with spore and crystal of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* as well as non treated larvae were studied by light microscope, transmission and scanning electron microscope.

The result of histopathology showed that a few of midgut columnar cells appear bulbous eversion and the number of microvilli had considerably decreased. The microvilli were swollen and were not uniform in diameter, a loose in terminal web of microfibrillar was observed. The nuclei exhibit fewer lobes (amoeban form) appeared swollen and nuclear pores were easily observed. A general vacuolization in columnar cell, disruption of extension of cytoplasm into goblet cavity and enlargement the cavity in goblet cell were observed.

The scanning of inner surface of midgut have showed that columnar cells break down causing secretion of cytoplasm into gut lumen.

1. Eng. Hassan Askary, Forestry & Rangeland Research Inst. of Iran, Karadj - Iran.
P.O.Box: 31585-343

2. Dr. Aziz Kharazi Pakdel, Agricultural Faculty, Tehran Univ.; Karadj - Iran

3. Dr. Behruz Shahsavani Behbudi, Science Faculty, Tehran Univ.; Tehran - Iran

4. Dr. Nasrin Moazami, Iranian Res. Org. for Science & Technology P.O.Box: 33165-115

* Received for publication 8.12.1993

REFERENCES

- AUDREY, M. GLAUERT, 1975 : Practical methods in Electron Microscopy, Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. North-Holland, American Elsevier, 207p.
- BARBULESCU, AL, 1975 : -Observation on the biology, ecology and attacks of the (E.C.B) *Ostrinia nubilalis* in the Area of RASHT - IRAN. *Analele inst. de cercetari pentyu cereale si plante Tehnice Fundulea*, vol. XL, Seria C, 7p.
- DELELLO, E., et al. 1984 : Histopathological effects of *B. thuringiensis* on the midgut of *Manduca sexta* low doses compared with fasting. *J. invertebrate Path.* 43: 169-181.
- EBERSOLD, H.R., et al. 1977 : Changes in the fine structure of the epithelium of *Pieris brassicae* induced by the delta-endotoxin of *B. thuringiensis*. *Bull. Soc. Entomology, Swissl*, 50: 269-276.
- ENDO, Y. & J. NISHITSUTSUJI -, WUO 1981 : Mode of action *B. thuringiensis* delta - endotoxin: Histopathological changes in the silkworm midgut. *J. invertebrate pathology*, 36: 90-103.
-
- 1981 : Mode of action *B. thuringiensis* delta - endotoxin: Ultrastructural changes of midgut. epithelium of *Pieris*, *Lymantria* and *Ephestia* larvae. *App. Entomology Zool.* 16: 231-241.
- HEIMPEL, A. M., & T.A. ANGUS, 1959 : The site of action of crystaliferous bacteria in Lepidoptera larvae. *Insect pathology.* 1: 152-170.
- HOOPINGARNER, R. & M. E. A. MATERU, 1964 : The Toxicology and histopathology of *Bacillus thuringiensis* to *Galleria mellonella*. *J. insect Pathology*, 6 : 26-30.
- MUTUURA, A., & E. MUNROE, 1970 : Taxonomy and distribution of the E.C.B. and allied species: Genus *Ostrinia* (Lep. Pyralidae). Pub. the *Entomological society of Canada*, Ottawa, 112p.
- NISHITSUTSUJI - WUO, J., & V. ENDO, 1981 : Mode of action of *B. thuringiensis* delta - endotoxin: effect on *Galleria mellonella* (Lep. Pyralidae). *App. Entomol. Zool.* 16: 79-87.
- PERCY, J., & P.G. FAST, 1983 : *Bacillus thuringiensis* Crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. invertebrate Pathology*, 41: 86-98.
- POITOUT, S., R. BUES & C. LE RUMER, 1972 : Elévation sur milieu artificiel simple de deux noctuelles parasites du coton *Earias insulana* et *Spodoptera littoralis*. *Entoml. Exp. App.* 15: 341-350.
- REISNER, W.M, et al, 1989 : Effect of *B. thuringiensis* kurstaki delta - endotoxin on insect malpighian tubule, structure and function. *J. invertebrate pathology* 54: 175-190.
- RYERSE, J. S., et al, 1990 : Light microscop immunolocation of *B. thuringiensis* kurstaki delta endotoxin in the midgut and malpighian tubules of the Tobacco Budworm, *Heliothis virescens*. *J. invertebrate Pathology.* 56: 86-90.
- SUTTER, G. R., & E. S. RAUN, 1967 : Histopathology of E.C.B. larvae (*O. nubilalis*) treated with *B. thuringiensis*. *J. invertebrate pathology*, vol. 9: 90-103.