

مقاله کوتاه علمی

**تغییرات سلول‌های خونی لارو بید چغندر قند (*Scrobipalpa ocellatella*)
تحت تاثیر تنش دما (Lepidoptera: Gelechiidae)**

مریم عجم حسنی*

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: shahroodm@gmail.com

**Hemocyte changes of larvae of the beet moth, *Scrobipalpa ocellatella*
(Lepidoptera: Gelechiidae) affected by thermal stress**

Maryam Ajam Hassani*

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology,
Shahrood, Iran.

* Corresponding author, E-mail: shahroodm@gmail.com

Abstract

The hemocytes of insects are one of the key components of immune system of insects against various stresses such as temperature changes. In hemolymph of *Scrobipalpa ocellatella*, five types of identified hemocytes including prohemocytes (PRs), plasmatocytes (PLs), granulocytes (GRs), oenocytoids (OEs) and spherulocytes (SPs) were identified. The effect of different thermal stresses was studied for 24 hours on cellular defense of fifth instar larvae. At 28 and 30°C, total hemocyte count (THC), GR_S and OE_S of larvae was increased significantly compared to the control (20±1°C). Also, chill stress (4°C) showed a significant decrease in THC, PLs, and GRs compared to the control. These findings could be used as a base for further investigation on the immunology studies of beet moth.

Key words: *Scrobipalpa ocellatella*, hemocytes, thermal stress

Received: 11 March 2021, Accepted: 11 May 2021.

بید چغندر قند یا شب پره لیتا با نام علمی، *Scrobipalpa ocellatella* Boyd. از جمله آفات اختصاصی و مهم چغندر قند است که هر سال خسارت زیادی را به انواع چغندرهای علوفه‌ای، وحشی و چغندر قند وارد می‌کند (Ganji & Moharrampour, 2015). در اثر خسارت این آفت، بوته‌ها زرد و خشک شده، وزن ریشه و درصد قند استحصالی کاهش می‌یابد.

هموسیت‌ها به عنوان اجزای اصلی سامانه ایمنی حشرات، سلول‌هایی هستند که در همولنف جریان داشته و در مقابل انواع تنش‌ها و عوامل بیگانه مهاجم به هموسل واکنش نشان می‌دهند (Lavine & Strand, 2002). این واکنش‌ها شامل تغییر در نوع، شکل و تعداد آنهاست. در واقع، ورود انواع آلودگی‌ها، تغییرات دمایی، گرسنگی، رژیم غذایی، دیابوز و ... از عوامل تاثیرگذار بر دفاع سلولی است که با مشارکت و فعالیت سلول‌های خونی همراه است (Stanley & Miller, 2006). در پاسخ به انواع تنش‌ها، گاه سلول‌ها دچار تقسیمات میتوزی شده و یا به نوع دیگری تبدیل می‌شوند (Pourali & Ajamhasani, 2018). گاه دیواره سلولی و غشا مضمحل می‌شود و هسته و سیتوپلاسم فشرده و یا گسترده شده و یا سلول به طور کامل از بین می‌رود (Pandey et al., 2010; Ghasemi et al., 2013). ثابت شده است که عوامل محیطی مانند دما، بر فعالیت‌های زیستی و فیزیولوژیکی حشرات مؤثر

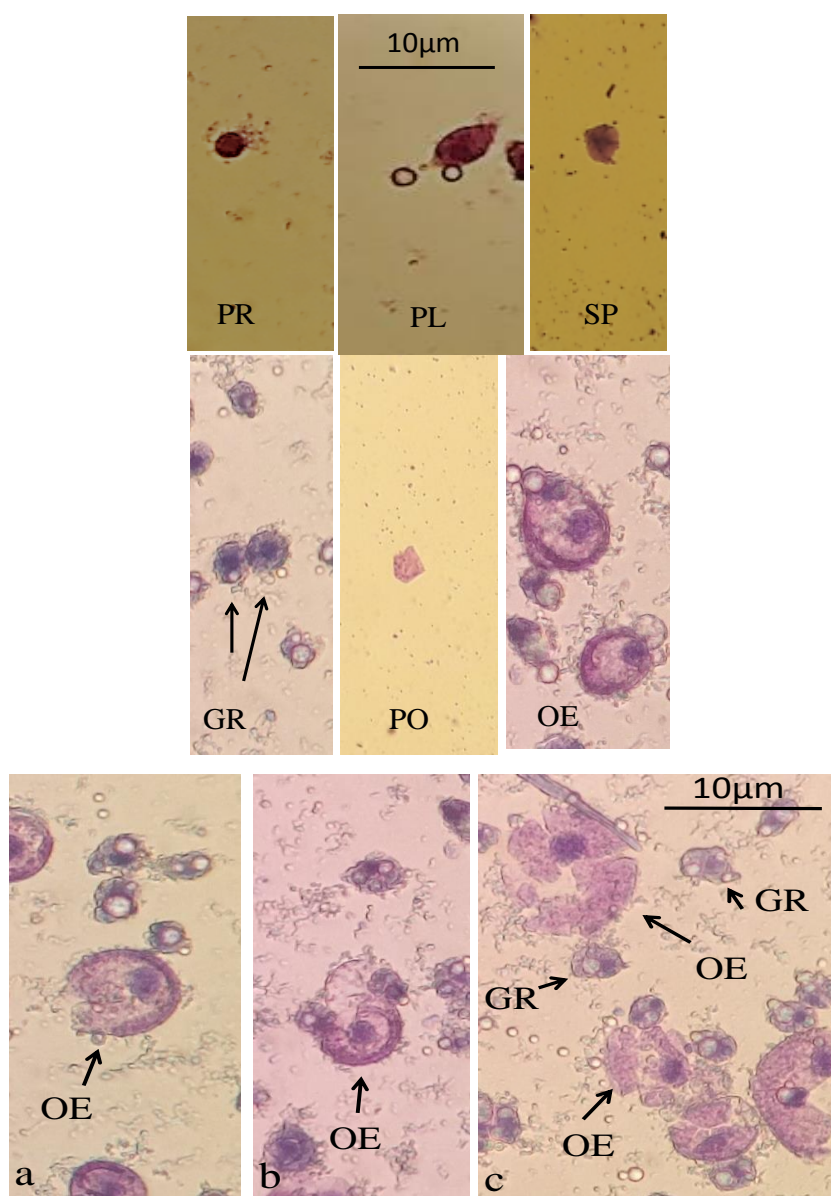
است. به علاوه، تأثیر دما بر همولنف حشرات مانند فراوانی سلول‌های خونی، ریخت شناسی و عملکرد آن‌ها گزارش شده است (Ribeiro & Brehélin, 2006). با توجه به اینکه بید چغندر قند از آفات جدی و کلیدی گیاه صنعتی چغندر قند در کشور ما محسوب می‌شود و تاکنون گزارش مستندی مبنی بر شناسایی سلول‌های خونی و ایمنی‌شناسی بید چغندر قند ارائه نشده است، به نظر می‌رسد، تحقیق حاضر با معرفی انواع سلول‌های خونی لارو این آفت و برهم‌کنش هموسیت‌ها با تنش دمایی بتواند گام موثری در راستای شناخت مقدماتی ویژگی‌های دفاع سلولی آن بردارد.

به منظور شناسایی سلول‌های خونی بید چغندر قند، بوته‌های آلوده از مزارع چغندر جوین جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از یک نسل پرورش، از لاروهای سن پنج در آزمایشات استفاده شد. سلول‌های خونی پس از رنگ‌آمیزی با محلول گیمسا و با کلیدهای معتبر با بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری شناسایی شدند. برای بررسی تأثیر تنش دما، آزمایش شامل ۴ تیمار و ۱۰ تکرار بود. تیمارها شامل لاروهایی بودند که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس (در یخچال با رطوبت نسبی ۴۵ درصد)، دمای ۲۸ و ۳۰ درجه سلسیوس (در اتاقک رشد با رطوبت نسبی ۴۵ درصد) قرار گرفتند. تیمار شاهد، شامل لاروهایی بود که در دمای 20 ± 1 درجه سلسیوس قرار داده شدند. هر تکرار شامل سه عدد لارو بود که در مجموع مقدار ۲ میکرولیتر همولنف از آنها جمع‌آوری شده و با ۱۰ میکرولیتر محلول ضدانعقاد تایسون مخلوط می‌شد. شمارش سلول‌های خونی با محاسبه تعداد سلول‌های خونی موجود در ۵ خانه از لام نئوبار (هر کدام به اندازه یک میلی‌متر مربع) با استفاده از فرمول (Jones, 1962) و در میلی‌متر مکعب همولنف محاسبه شد. مشاهدات با به‌کارگیری لام نئوبار انجام می‌شد. تجزیه داده‌ها با نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج این پژوهش نشان داد، پنج نوع سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، اونوسیتوبیدها و اسفرولوسیت‌ها در همولنف حشره وجود داشت. به علاوه شماری پدوسیت (از انواع پلاسموتوسیت‌ها) نیز مشاهده شد. در خون بیشتر گروه‌های بالپولکداران گزارشات مشابهی از حضور این هموسیت‌ها ثبت شده است. ویژگی‌های ظاهری سلول‌ها با مشخصات کلی هموسیت‌ها در گزارشات سایر محققین همخوانی داشت (Ebrahimi & Ajamhassani, 2020, Mahmoodzadeh et al, 2020, Blanco et al, 2017). پروهموسیت‌ها کوچکترین سلول‌ها با هسته درشت مرکزی مشاهده شدند. پلاسموتوسیت‌ها دوکی شکل و گرانولوسیت‌ها با اندازه‌های متوسط دارای سیتوپلاسمی پر از گرانول بودند. اونوسیتوبیدها با هسته جانبی در همولنف بید چغندر قند، بزرگترین سلول‌ها به لحاظ اندازه بودند و دیواره سلولی این سلول‌ها ضخیم‌تر از سایر سلول‌ها مشاهده شد. اسفرول‌ها در سطح سیتوپلاسم اسفرولوسیت‌ها این سلول‌ها را از بقیه متمایز می‌کند (شکل ۱). تعداد سلول‌ها و شکل گرانولوسیت‌ها و اونوسیتوبیدها تحت تأثیر تنش‌های سرما و گرما دچار تغییرات بیشتری نسبت به پلاسموتوسیت‌ها و پروهموسیت‌ها شدند (شکل‌های ۱ و ۲ و ۳). به طوری که تعداد کل، گرانولوسیت‌ها و اونوسیتوبیدها با افزایش دما افزایش قابل توجهی نشان داد و کاهش دما سبب کاهش بارز تعداد کل سلول‌ها، گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها شد (شکل ۲) به علاوه افزایش دما تا ۲۸ درجه سلسیوس سبب پاره شدن دیواره سلولی اونوسیتوبیدها شد (شکل ۱- a, b) دمای بیشتر یعنی ۳۰ درجه سلسیوس سبب اضمحلال دیواره سلولی گرانولوسیت‌ها، چند تکه شدن اونوسیتوبیدها و بیرون ریختن محتوای سلولی آنها شد (شکل ۱- c) به طوری که بالاترین درصد بدشکلی هموسیت‌ها در شرایط تنش دمایی مربوط به اونوسیتوبیدها و گرانولوسیت‌ها می‌باشد (شکل ۳). تأثیر تنش دما بر ویژگی‌های ایمنی سایر حشرات نیز گزارش شده است چنانکه در مطالعه روی لارو *Danaus chrysippus* L. نتایج نشان داد که تنش سرمایی باعث کاهش تعداد سلول‌های خونی می‌شود، در حالی که تنش گرمایی منجر به افزایش سلول‌های خونی می‌شود (Pandey et al., 2008). تأثیر

تنش گرمایی بر شکل هموسیت‌های لارو *Antherarea mylitta* Drury نشان داد که گرما منجر به تغییر شکل سلول‌ها می‌شود؛ به طوری که دمای ۵۰ درجه سلسیوس سبب واکنش‌هایی مانند فشردگی زائده‌های سیتوپلاسمی در پلاسموتوسیت‌ها، واکوئولیزاسیون در پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها و تکه تکه شدن هسته در پروهموسیت‌ها رخ داد که حتی در برخی موارد منجر به مرگ سلول شد (Pandey et al., 2010). به علاوه، دمای ۳۵ درجه سلسیوس منجر به افزایش بارز تعداد کل و پلاسموتوسیت‌های بید سبب زمینی *Phthorimaea operculella* zeller و تنش سرمایی ۴ درجه سلسیوس کاهش معنی‌دار سلول‌ها را به دنبال داشت (Poural & Ajamhassani, 2018).

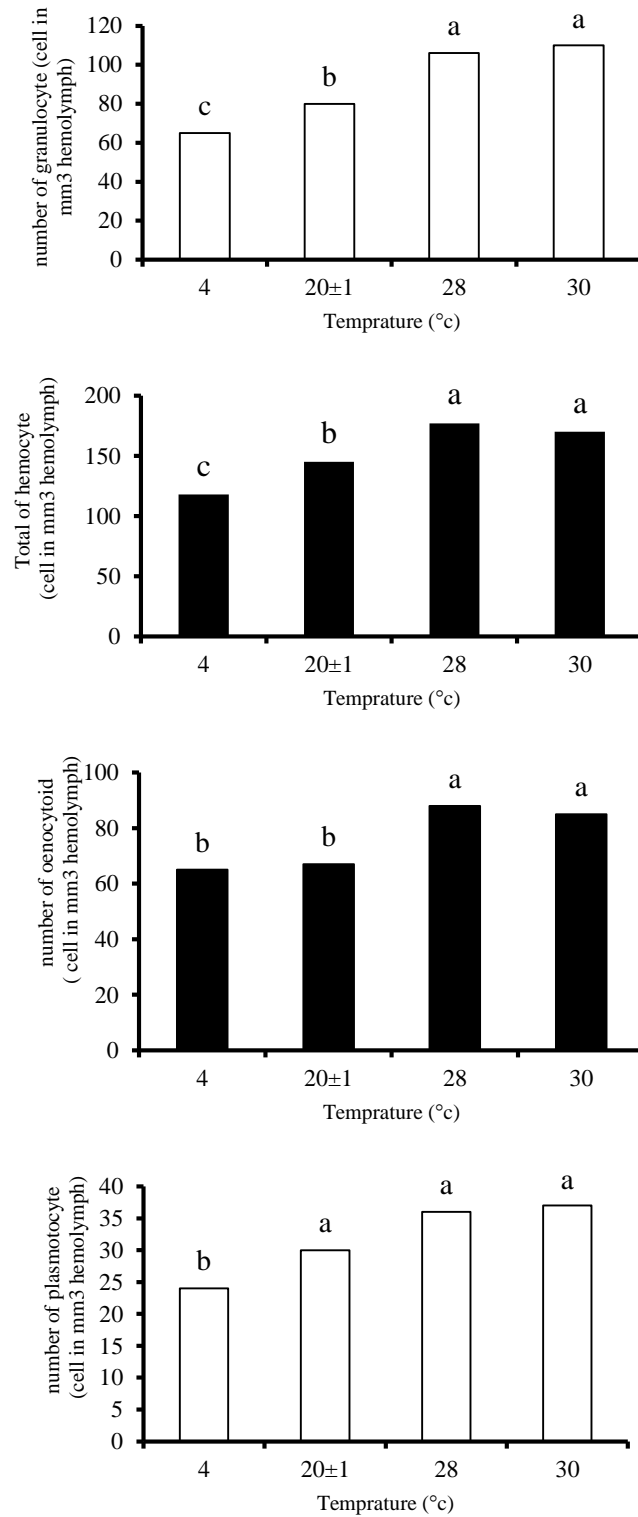
یافته‌های این پژوهش می‌تواند، زمینه تحقیقات تکمیلی در راستای ایمنی شناسی بید چغندر قند و به دنبال آن امکان بررسی بر هم‌کنش ایمنی حشره با عوامل بیماری‌زای حشرات را فراهم نماید.



شکل ۱- انواع سلول‌های خونی لارو بید چغندر قند *Scrobipalpa ocellatella* رنگ آمیزی شده با گیمسا. مشاهده با میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۴۰. (پروهوسیت=PR، گرانولوسیت=GR، پلاسموتوسیت=PL، اونوسیتوئید=OE، اسفروولوسیت=SP و پدوسیت به عنوان نوعی پلاسموتوسیت=PO) شکل‌های a و b: پاره شدن دیواره سلولی اونوسیتوئید تحت تاثیر تنش دمای ۲۸ درجه سلسیوس و شکل c: بدشکلی گرانولوسیت‌ها و تکه تکه شدن اونوسیتوئیدها و خروج محتویات سلولی آنها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس را نشان می‌دهد.

Fig. 1. Hemocyte types of *Scrobipalpa ocellatella* larvae by using Giemsa for light microscopic observations. PR=Prohemocyte, PL=Plasmotocyte, GR=Granulocyte, OE=Oenocytoid, SP=Spherulocyte, PO=Podocyte

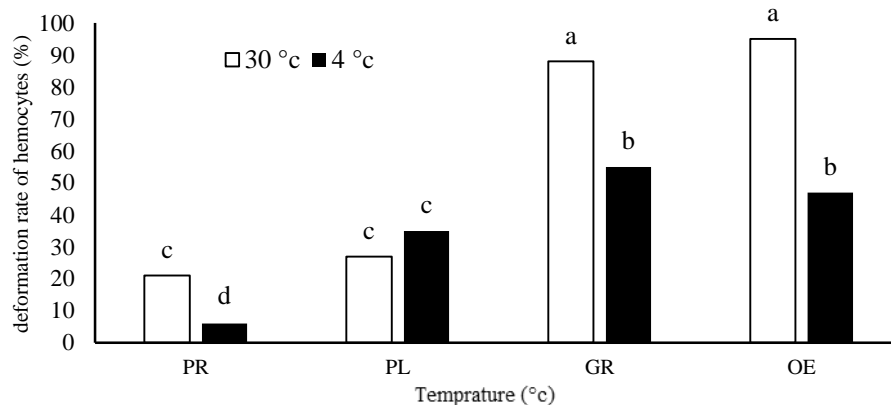
Figures a, b show tearing of cell wall in oenocytoids affected by thermal stress at 28°C and figure c shows deformation of granulocytes, fragmentation of oenocytoids and exit of cellular contents of them at 30°C.



شکل ۲- تاثیر تنش‌های دمایی بر تعداد کل سلول‌های خونی، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها و اونوسیتوئیدهای

لارو سن پنج *Scrobipalpa ocellatella*

Fig. 2. Effect of thermal stresses on total hemocyte count, granulocytes, plasmotocytes and oenocytoids number of fifth instar larvae of *Scrobipalpa ocellatella*



شکل ۳- میانگین درصد دفرمه شدن سلولهای خونی لارو بید چغندر قند *Scrobipalpa ocellatella* تحت تاثیر تنش های دمایی

Fig. 3. Mean percentage of deformation of hemocytes in larvae of *Scrobipalpa ocellatella* affected by thermal stresses

References

- Blanco, L. A. A., Crispim, J. S., Fernandes, K. M., de Oliveira, L. L., Pereira, M. F., Bazzoli, D. M. S. & Martins, G. F.** (2017) Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell and Tissue Research* 370(1), 153-168.
- Ebrahimi, M. & Ajamhassani, M.** (2020) Investigating the effect of starvation and various nutritional types on the hemocytic profile and phenoloxidase activity in the Indian meal moth *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Invertebrate Survival Journal* 17, 175-185.
- Ganji, Z. & Moharramipour, S.** (2015) Seasonal changes in supercooling point and cold tolerance in field collected larvae of the beet moth, *Scrobipalpa ocellatella* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Karaj, Iran. *Journal of Entomological Society of Iran* 35(2), 63-73. [In Persian with English summary].
- Ghasemi, V., Moharramipour, S. & Jalali Sendi, J.** (2013) Circulating hemocytes of Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella* Zell. (Lep: Pyralidae) and their response to thermal stress. *Invertebrate Survival Journal* 10, 128-140.
- Jones, J. C.** (1962) Current concepts concerning insect hemocytes. *American Zoologist* 2, 209-246.
- Lavine, M. D., & Strand, M. R.** (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect biochemistry and molecular biology* 32(10), 1295-1309.

-
- Mahmoudzadeh arzaneei, M., Hakimitabar, M. & Ajamhassani, M.** (2020) Identification of hemocytes and study on hemogram of plum fruit moth *Grapholita funebrana* (Treitschke) (Lep.: Tortricidae). *Plant Pest Research* 10(2), 93-97. [In Persian with English summary].
- Pandey, J. P., Tiwari, R. K. & Kumar, D.** (2008) Temperature and Ganglionectomy Stresses Affect Haemocyte Counts in Plain Tiger Butterfly, *Danaus chrysippus* L. (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Entomology* 5, 113-121.
- Pandey, J. P., Mishra, P. K., Kumar, D., Singh, B. M .K. & Prasad, B. C.** (2010) Effect of temperature on hemocytic immune responses of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. *Journal of Immunology Research* 3(2), 169-177.
- Pourali, Z. & Ajamhasani, M.** (2018) The effect of thermal stresses on the immune system of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), *Journal of Entomological Society of Iran* 37(4), 515-525. [In Persian with English summary].
- Ribeiro, C. & Brehélin, M.** (2006) Insect haemocytes: what type of cell is that, *Journal of insect physiology* 52(5), 417-429.
- Stanley, D. W. & Miller, J. S.** (2006) Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119(1), 1-13.
-