

## تأثیر فلز روی ( $Zn^{2+}$ ) بر سیستم ایمنی سلولی کرم قوز پنبه *Helicoverpa armigera* Hübner (Lep.: Noctuidae)

عادل باغبان<sup>۱</sup>، جلال جلالی سندی\*<sup>۱</sup> و آرش زیبایی<sup>۱</sup>

۱- گروه گیاه پزشکی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۲۷

### چکیده

عوامل متعدد طبیعی مانند آتشفشان، آب چشمه‌ها، فرسایش و فعالیت‌های انسانی همچون استخراج از معادن، احتراق سوخت‌های فسیلی و کشاورزی سبب تجمع فلزات سنگین در خاک و انتقال این فلزات به گیاهان می‌شود. در بین فلزات سنگین، روی به عنوانی فلزی ضروری به حساب می‌آید. در این تحقیق تأثیر غلظت‌های میانه از این فلز (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ماده غذایی) بر سامانه ایمنی سلولی کرم قوز پنبه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تعداد کل سلول‌های خونی (THC) کرم قوز پنبه در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از این فلز به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش دارد. در شمارش تفرقی سلول‌های خونی (DHC) در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم روی، پروهموسیت‌ها نسبت به شاهد به طور معنی‌داری کاهش نشان دادند اما اونوسیتوئیدها در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داشتند. همچنین در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از این فلز پاسخ ایمنی (گره‌زایی) با تزریق ماده غیرزنده لاتکس بید به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داشت. درک تأثیر فلزات سنگین در غلظت‌های مختلف بر سامانه ایمنی آفات می‌تواند کمک شایانی به درک سازوکار ایمنی در پاسخ به تنش‌های محیطی و کنترل آفات بکند.

**واژه‌های کلیدی:** تنش محیطی، پاسخ ایمنی، سلول‌های خونی، لاتکس بید، فلزات سنگین، گره‌زایی

## مقدمه

(Koricheva *et al.*, 1998). به طور کلی حشرات جونده و مکنده در میان حشرات خشکی‌زی بیش‌تر در معرض آلودگی از طریق گیاهان در تنش فلزات سنگین قرار دارند تا جایی که اثرات منفی به وضوح روی حشرات دیده می‌شود (van Ooik *et al.*, 2007). پژوهش‌های انجام گرفته روی حشرات مختلف بیش‌تر رشد و تولید مثل را مورد بررسی قرار داده‌اند. این موضوع که گیاهان به عنوان واسطه و منتقل‌کننده فلزات به حشرات گیاه‌خوار می‌باشند به وضوح ثابت شده است (Linguist, 1992). اگر فلزات می‌توانند بر رشد اثر بگذارند پس این توانایی را دارند که روی سامانه‌های دیگر حشرات همانند سامانه ایمنی نیز اثرگذار باشند (van Ooik *et al.*, 2007). بیشتر بررسی‌های انجام گرفته در زمینه ایمنی در برابر آلودگی فلزات سنگین روی بی مهرگانی مثل حلزون‌ها، خرچنگ‌ها و دوکفه‌ای‌ها است (van Ooik *et al.*, 2007) و در مورد ایمنی حشرات تحقیقات بسیار کمی انجام شده است.

واکنش ایمنی حشرات یک شاخص مهم حساسیت میزبان به آلودگی است. میزبان‌های مقاوم قادر به متوقف کردن پیشرفت آلودگی هستند (Washburn *et al.*, 2000). به‌طور معمول، سیستم ایمنی به موجودات مهاجم بعد از تشخیص بیگانه بودن آن یا خسارتی که به غشاء پایه وارد می‌کند با پاسخ‌های ایمنی سلولی<sup>۳</sup> و هیومرال<sup>۴</sup> واکنش نشان می‌دهد (Gillespie *et al.*, 2000; Lavin and Strand, 2000). واکنش‌های دفاع سلولی به طور معمول سریع ولی دفاع هیومرال چند ساعت پس از آلودگی رخ می‌دهد (Stanley and Miller, 2006). سلول‌های خونی ایمنی سلولی را با بیگانه‌خواری<sup>۵</sup>، کپسوله‌کردن<sup>۶</sup> و ایجاد گره<sup>۷</sup> تنظیم می‌کنند. واکنش‌های دفاع سلولی منجر به تغییرات مرفولوژیکی سلول‌های خونی و نیز تغییر در تعداد آنها می‌شود. این تغییرات ظاهری و ساختاری در سلول‌های خونی نشان می‌دهد که فرآیند فعالیت آنها با مصرف بالای

توانایی انسان در استخراج و استفاده از فلزات نقش عمده‌ای در پیشرفت جامعه امروز ایفا می‌کند (Wilson, 1994). بیش‌تر فلزات دامنه‌ی وسیعی برای استفاده دارند اما این استفاده وسیع هزینه سنگینی را بر محیط زیست وارد کرده است: "فلزات سنگین"<sup>۱</sup>؛ با تمام گزارش‌ها از تاثیر منفی آن‌ها، هم اکنون نیز در حال وارد شدن به محیط هستند (Han *et al.*, 2002). فلزات سنگین بخش مهم آلودگی‌های زیست محیطی می‌باشند و تاثیر زیان‌آوری بر سلامت انسان، جوامع خشکی‌زی و جوامع آبی‌زی دارند (Duruibe *et al.*, 2007). به طور معمول، مقدار فلزات سنگین به جز مناطقی که در مجاورت منابع آلودگی قرار دارند در محیط کم است؛ با این حال، به دلیل خاصیت تجمع و ماندگاری طولانی مدت فلزات سنگین در محیط زیست، از نظر سمیت و تاثیر آن روی اکولوژی مورد توجه است (Malakar *et al.*, 2009). تجمع فلزات سنگینی نظیر روی<sup>۲</sup> در حشراتی که از گیاهان تغذیه می‌کنند ثابت شده است (Lindquist, 1992). بیش‌تر مطالعات انجام گرفته بر تاثیر مستقیم منفی فلزات سنگین روی موجودات زنده انجام شده است. این اثرات مستقیم به صورت تاثیر کلی نشان دهنده سمیت فلزات سنگین بر فرآیندهای زیستی مختلف است که حتی در مواردی باعث مرگ و میر می‌شود. این تاثیر به طور کلی وابسته به غلظت است اما بعضی از فلزات به عنوان عناصر غذایی کم مصرف در بسیاری از موجودات زنده لازم و ضروری می‌باشند. فلزاتی مانند روی (Zn)، مس (Cu) و آهن (Fe) به عنوان فلزات ضروری محسوب می‌شوند؛ به این معنی که بدن جانوران و گیاهان به این یون‌های فلزی برای رشد و نمو خود و انجام فرآیندهای سوخت و ساز نیاز دارند ولی مقادیر بالای این فلزات باعث ایجاد مسمومیت می‌شوند (van Ooik *et al.*, 2007). تاثیر آلودگی فلزات سنگین روی حشرات گیاه‌خوار در راسته‌های مختلف بسیار متفاوت است

3. Cellular immune response
4. Humeral immune response
5. Phagocytosis
6. Encapsulation
7. Nodulation

1. Heavy metals
2. Zinc

انرژی همراه است. کاهش قطرات چربی و گلیکوژن با افزایش تعداد میتوکندری نشان می‌دهد که چربی و گلیکوژن منابع انرژی برای واکنش‌های ایمنی محسوب می‌شوند (Borges *et al.*, 2008). سلول‌های خونی در بال‌پولک‌دران به پروهموسیت‌ها<sup>۸</sup>، پلاسماتوسیت‌ها<sup>۹</sup>، گرانولوسیت‌ها<sup>۱۰</sup>، اونوسیتوئیدها<sup>۱۱</sup> و اسفرولوسیت‌ها<sup>۱۲</sup> تقسیم می‌شوند (Strand, 2008). گرانولوسیت‌ها وظیفه شناسایی مواد خارجی، بیگانه‌خواری، گره‌زایی و کپسوله کردن است، این سلول‌ها بر اساس وجود گرانول‌های حاوی آنزیم‌ها که در سراسر سیتوپلاسم آن‌ها پراکنده شده است و حالت قرینه‌ای که دارند شناسایی می‌شوند (Pech and Strand, 1996; Lavine and Strand, 2002). در مقابل پلاسماتوسیت‌ها این حالت قرینه را ندارند و اعمال بیگانه‌خواری، گره‌زایی و کپسوله کردن را انجام می‌دهند (Russo *et al.*, 2001; Lavine and Strand, 2002). اسفرولوسیت‌ها در بازسازی بافت‌ها، انتقال هورمون‌ها، تولید پروتئین‌ها و تغذیه نقش دارند (Ratcliffe *et al.*, 1985). اونوسیتوئیدها در تولید فنل اکسیداز نقش دارند (Lavine and Strand, 2002) and پروهموسیت‌ها، به عنوان کوچک‌ترین هموسیت‌ها در لاروهای بال‌پولک‌داران کم‌تر از ۱٪ از کل سلول‌ها را شامل می‌شوند (Lavine and Strand, 2002; Jirvanichpaisal *et al.*, 2006; Strand *et al.*, 2006). در بیگانه‌خواری، سلول‌های خونی به شکل انفرادی و جداگانه عامل بیگانه را که از نظر اندازه کوچک هستند نابود می‌کند (Borges *et al.*, 2008). کپسوله کردن در مورد قطعات درشت بیگانه مانند پارازیتوئیدها و نماتدها با شرکت تعداد زیادی سلول خونی رخ می‌دهد و در زمان ورود باکتری‌ها و یا اسپورهای قارچ به داخل بدن حشره، این پاسخ ایمنی گره‌زایی نامیده می‌شود. گره و کپسول از نظر ساختمانی مشابه‌اند و شامل یک لایه، دو لایه و یا چند لایه سلول خونی می‌باشند

می‌شود (Lavine and Strand, 2002). عوامل محیطی مانند آتشفشان، آب چشمه‌ها و فرسایش و هم‌چنین فعالیت‌های انسانی همانند استخراج از معادن، استفاده از سوخت‌های فسیلی و کشاورزی باعث تجمع فلزات سنگین در خاک و سمیت برای گیاهان و جانوران شده است (Sharma and Agrawal, 2005). آلودگی فلزات سنگین ممکن است سبب تاثیر بر ساختمان غذایی جوامع جانوران شود (Fleeger *et al.*, 2003). این تاثیر از آن جهت قابل توجه خواهد بود که می‌تواند بر رابطه‌ی بین شکار و شکارگر در جوامع آب‌زی و خشکی - زی و هم‌چنین رابطه‌ی پارازیت و پارازیتوئید در جوامع خشکی‌زی تاثیر بگذارد (van Ooik *et al.*, 2007). عنصر روی را در جدول تناوبی با (Zn) نشان می‌دهند که عدد اتمی آن ۳۰ است. این فلز در گروه ۱۲ جدول تناوبی قرار دارد و فلزی به رنگ سفید متمایل به آبی است که بر اثر رطوبت هوا تیره رنگ می‌شود و در حین احتراق رنگ سبز برآقی تولید می‌کند (Maret, 2001). فلز روی ۷۵ قسمت در میلیون<sup>۱۳</sup> از پوسته زمین را تشکیل داده است و از نظر فراوانی عناصر سازنده پوسته زمین، بیست و چهارمین عنصر است. آب دریاها ۳۰۰ قسمت در بیلیون<sup>۱۴</sup> روی دارند و جو ۰/۱ تا ۴ میکروگرم/متر مکعب روی را در خود جای داده است (Emsley, 2011). روی به عنوان عنصری ضروری<sup>۱۵</sup> در انسان، حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها

- 8 . Prohemocytes
- 9 . Plas matocytes
- 10 . Granulocytes
- 11 . Oenocytoids
- 12 . Spheru locytes

13 . ppm

14 . ppb

15 . Essential element

دارا بودن دیابوز اختیاری پرورش داد. همین امر سبب شده است که از این آفت به عنوان حشره مدل در بسیاری از پژوهش‌هایی که نیاز به حضور آفت در طول سال را دارد استفاده شود.

با توجه به افزایش روزافزون آلودگی‌های زیست محیطی و تجمع مواد آلاینده در خاک و گیاه، تاثیر جانی آن در آفتی کلیدی هم‌چون کرم قوزه پنبه قابل توجه خواهد بود؛ بنابراین در این تحقیق سعی شد تاثیر جانی فلز سنگین روی بر سامانه ایمنی کرم قوزه پنبه مورد بررسی و بحث قرار گیرد.

### مواد و روش‌ها

#### پرورش و تیمار کرم قوزه پنبه با فلز روی (Zn)

در اوایل فصل تابستان سال ۱۳۹۳ لاروهای سنبل مختلف کرم قوزه پنبه از مزارع گوجه فرنگی شهرستان آستانه اشرفیه در شرق استان گیلان ( $37^{\circ}15'35''$  (شمالی)  $49^{\circ}56'40''$  (مختصات جغرافیایی) جمع‌آوری شدند. کلنی در شرایط آزمایشگاهی با دمای  $26 \pm 1$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $65 \pm 10\%$  و دوره‌ی روشنایی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی روی غذای مصنوعی بر پایه لویا چشم بلبلی (Shorey and Hale, 1965) پرورش داده شدند. به دلیل ضروری بودن فلز سنگین روی، مقدار میانه گزارش شده در گزارش‌های مختلف به عنوان بالاترین غلظت در نظر گرفته شد (Liu et al., 2007; Parizanganeh et al., 2010; Nazir et al., 2011). غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم از نمک کلراید روی ( $ZnCl_2$  Sigma) (۰.۰۱ استفاده شد و پس از حل کردن در آب مقطر و ایجاد غلظت پایه ۲۰۰۰ قسمت در میلیون<sup>۱۶</sup>، غلظت‌های مشخص شده به غذای مصنوعی اضافه شدند. لاروهای تازه تفریخ شده روی غذای مصنوعی عاری از فلز سنگین برای دو سن لاروی پرورش داده شدند. سپس، لاروهای سن سوم (کم‌تر از ۲۴ ساعت) به صورت جداگانه به مدت ۷ روز با غذای

شناخته می‌شود (Maret, 2001; Parsad, 2008). این فلز دومین فلز فراوان در جانداران بعد از آهن است و تنها فلزی است که در تمامی طبقه‌های آنزیمی حاضر است (Broadly et al., 2007). در پروتئین‌ها، یون‌های روی بیش‌تر همراه با اسیدهای آمینه آسپارتیک<sup>۱۶</sup>، گلوتامیک<sup>۱۷</sup>، سیستین<sup>۱۸</sup> و هیستیدین<sup>۱۹</sup> می‌باشند (Brandt et al., 2009). این فلز به عنوان یکی از مهم‌ترین کودهای ریز مغذی مطرح است (Nielsen, 2012). اگر چه روی فلزی ضروری برای سلامتی جانوران و انسان است ولی مقادیر بالای آن می‌تواند مضر باشد. مقادیر بالای روی باعث کاهش جذب مس و آهن می‌شود (Fosmire, 1990). یون آزاد روی بسیار سمی است و گزارش شده است که یک میکرومولار از این یون توانایی نابودی بسیاری از جانداران را دارد. همچنین، ۶ میکرومولار از این یون باعث مرگ و میر ۹۳٪ دافنی‌ها در آب شد (Muysen et al., 2006). به طور طبیعی روی به دلیل هوازدگی صخره‌ها به خاک وارد می‌شود ولی انسان‌ها با استفاده از سوخت‌های فسیلی، استخراج از معادن، کودهای فسفاته، فاضلاب و خرده‌های سطوح گالوانیزه باعث بالا رفتن روی در خاک می‌شوند. ثابت شده است که مقادیر بالای روی برای گیاه سمی است اگر چه سمیت روی خیلی کم گسترش دارد (Broadly et al., 2007). مقادیر بالاتر از ۵۰۰ قسمت در میلیون روی در خاک باعث کاهش جذب آهن و منگنز توسط ریشه گیاه می‌شود (Maret, 2001). کرم قوزه پنبه<sup>۲۰</sup> *Helicoverpa armigera* Hübner یکی از آفات مهم پنبه و دیگر محصولات زراعی و غیرزراعی است (Matthews, 1999). چندین خوار بودن، قدرت تحرک خیلی زیاد، قدرت باروری بالا و وجود دیابوز اختیاری در این گونه باعث شده است تا از آفات مهم محصولات کشاورزی محسوب شوند. از طرف دیگر این آفت کلیدی را می‌توان روی غذای مصنوعی به صورت مستمر به دلیل

16. Aspartic acid

17. Glutamic acid

18. Cysteine

19. Histidine

20. A american cotton bollworm

## تزریق لاتکس بید<sup>۲۲</sup> و شمارش گره

لاتکس بید به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق و برای شاهد از آب مقطر استفاده شد. ابتدا لاروهای تیمار شده با فلز سنگین و شاهد به مدت چند دقیقه روی یخ بی‌حس شدند. پس از آن سطح شکمی ضدعفونی شده و با استفاده از سرنگ همیلتون ۱ میکرولیتر از محلول حاوی لاتکس بید به سطح شکمی لارو، بین پاهای دوم و زیر جلد تزریق شد. جهت جلوگیری از خون‌ریزی لارو، لارو پس از تزریق نیز به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت تا فعالیتش کاهش پیدا کند. پس از ۲۴ ساعت همولنف جمع‌آوری شده و پس از رقیق کردن با ماده ضد انعقاد (NaOH ۰/۰۹۸ مولار، NaCl ۰/۱۸۶ مولار، EDTA ۰/۰۱۷ و ۰/۰۴۱ مولار اسید سیتریک، pH ۴/۵)، با استفاده از لام نتوبار تعداد گره‌ها شمارش شدند. آزمایش در ۳ تکرار و هر تکرار با ۵ لارو انجام شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی<sup>۲۳</sup> در سطح ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL نسخه ۲۰۱۰ استفاده شد.

## نتایج و بحث

### اثر فلز روی بر تعداد کل سلول‌های خونی کرم قوز پنبه

شکل ۱ اثر فلز سنگین روی را بر شمارش کل سلول‌های خونی کرم قوز پنبه نشان می‌دهد. در تیمار این آفت با فلز روی در دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، تعداد کل سلول‌های خونی به طور معنی‌داری افزایش نشان داد اما در غلظت ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم تفاوت آماری با شاهد مشاهده نشد.

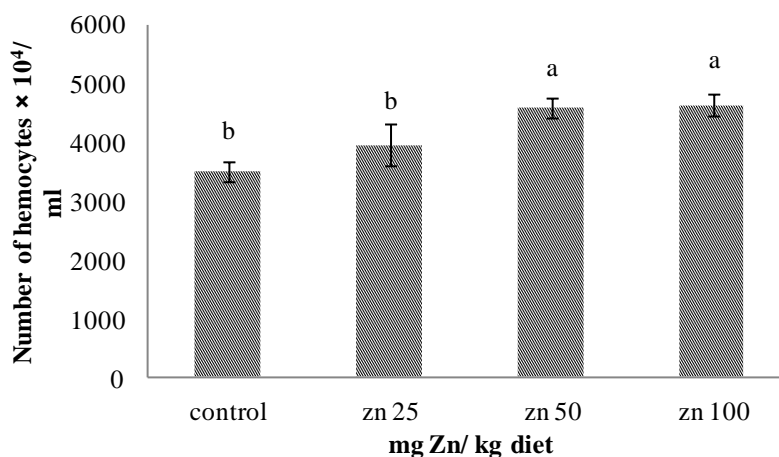
مصنوعی حاوی فلز سنگین روی تیمار شدند. برای شاهد از آب مقطر استفاده شد.

### شمارش کل (THC) و تفرقی (DHC) سلول‌های خونی کرم قوز پنبه

برای شمارش کل سلول‌های خونی، پس از استقرار لاروها در آب ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، پای کاذب انتهایی بریده شده و ۵ میکرولیتر از همولنف لارو توسط میکروپیت جمع‌آوری شد. همولنف به ۱۴۵ میکرولیتر (نسبت ۱ به ۲۹) ماده ضد انعقاد (NaOH ۰/۰۹۸ مولار، NaCl ۰/۱۸۶ مولار، EDTA ۰/۰۱۷ و ۰/۰۴۱ مولار اسید سیتریک، pH ۴/۵) اضافه شد (Amaral et al., 2010). سپس محلول در لام نتوبار قرار گرفته و تعداد سلول‌های خونی در ۴ گوشه و یک منطقه مرکزی، هر کدام به ابعاد ۱ میلی‌متر مربع شمارش شدند. تعداد سلول‌ها بر حسب سلول در میلی‌لیتر محاسبه شد.

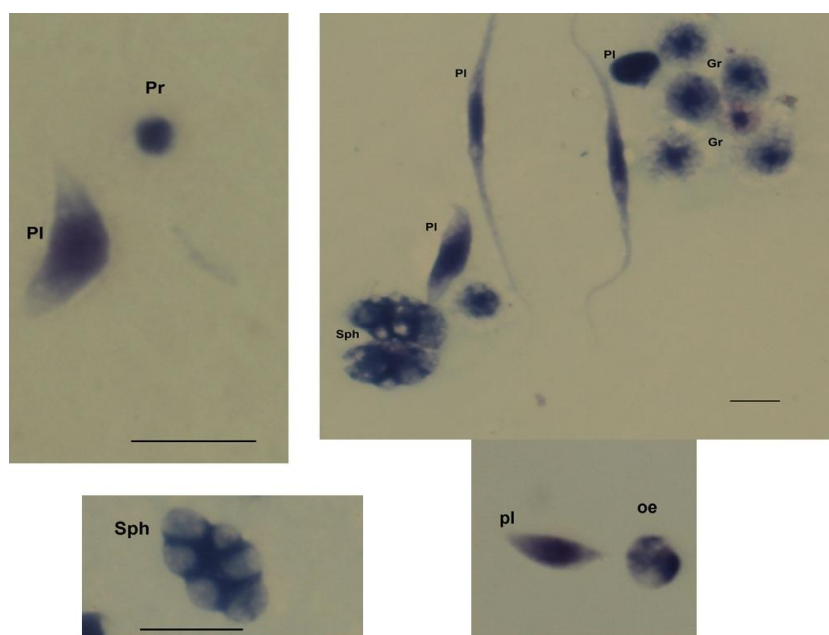
برای شمارش تفرقی سلول‌های خونی ابتدا لاروها به مدت ۵ دقیقه در آب ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند و پس از خشک شدن، سطح شکمی لاروها با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شد. سپس پای کاذب انتهایی بریده شده و ۵ میکرولیتر همولنف روی لام قرار داده شد و به کمک لام دیگر با شیب ۴۵ درجه، اسمیر تهیه شد. پس از خشک شدن همولنف در هوای اتاق، سلول‌ها با رنگ گیمسا رقیق شده با آب مقطر (نسبت ۱ به ۱۰) به مدت ۱۴ دقیقه رنگ‌آمیزی و سپس با آب مقطر شسته شدند. به منظور تمایز رنگ سیتوپلاسم و هسته از یک‌دیگر لام‌ها به مدت ۵ ثانیه داخل محلول اشباع کربنات لیتیم غوطه‌ور و پس از آن دوباره با آب مقطر شسته شدند. بعد از خشک شدن با استفاده از کانادابالزام، لام دائمی تهیه شد و لام‌ها به مدت ۳ روز در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در آون قرار داده شدند تا خشک شوند. شمارش تفرقی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus BH-2 و با شمارش ۲۰۰ سلول از ۴ گوشه لام انجام شد (Jalali and Salehi, 2008).

THC و DHC هر کدام در ۳ تکرار و هر تکرار با ۱۰ لارو انجام شد.



شکل ۱- اثر روی بر میانگین  $SE \pm$  شمارش کل سلول‌های خونی (THC). میانگین‌های با حروف مشابه در تیمارها اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (Tukey's test,  $P < 0.05$ ).

Figure 1. The effect of zinc on total hemocytes count (THC). Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey's test,  $P < 0.05$ ).



شکل ۲- سلول‌های خونی در لارو کرم قوزه پنبه *Helicoverpa armigera* رنگ آمیزی شده با گیمسا جهت مشاهده با میکروسکوپ نوری. پروهموسیت (Pr)، پلاسماتوسیت (Pl)، گرانولوسیت (Gr)، اونوسیتوئید (Oe) و اسفرولوسیت (Sph). مقیاس: ۵ میکرومتر.

Figure 2. Hemocytes from American cotton bollworm *Helicoverpa armigera* larvae stained by Giemsa for light microscopy observation. Prohemocyte (Pr), Plasmatocyte (Pl), Granulocytes (Gr), Oenocytoids (Oe) and Spherulocyte (Sph). Scale bar: 5  $\mu$ m.

تعداد سلول‌های خونی به عنوان ملاکی برای اندازه‌گیری تنش در بسیاری از بی‌مهرگان پیشنهاد شده است

موفقیت پاسخ دفاعی بستگی به تعداد و انواع سلول‌های خونی دارد (Russo *et al.*, 2001). در این رابطه پایش

رادیكال‌های آزاد نقش مهمی در هموستازی جانوران ایفا می‌کنند. متالوتیونین‌ها مقدار یون‌های آزاد در دسترس را کاهش می‌دهند و زمانی که بدن نیاز به سطوح مختلف این یون‌ها را داشته باشد، آن‌ها را به سامانه برمی‌گردانند (Marino et al., 1998). این دلیل شاید محکم‌ترین دلیل برای افزایش در تعداد کل سلول‌های خونی در لاروهای کرم غوزه پنبه در تیمار با روی باشد. از طرفی دیگر قدرت حمل و ذخیره‌سازی فلزات سنگین در هموسیت‌ها منطقی به نظر می‌رسد. احتمالاً این دو عامل در کنار هم باعث افزایش تعداد کل سلول‌های خونی *H. armigera* شده‌اند.

### اثر فلز روی بر شمارش تفرقی سلول‌های خونی کرم قوزه پنبه

در شناسایی سلول‌های خونی لارو کرم قوزه پنبه ۵ نوع سلول خونی پروهموسیت، پلاسماتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید و اسفروولوسیت شناسایی شدند (شکل ۲).

شکل ۳ شمارش تفرقی سلول‌های خونی کرم قوزه پنبه را نشان می‌دهد. غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از روی باعث کاهش معنی‌دار در تعداد تفرقی پروهموسیت‌ها نسبت به شاهد شد. پلاسماتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد نشان ندادند اما غلظت‌های بالای این فلز (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) باعث افزایش معنی‌دار اونوسیتوئیدها شد. اسفروولوسیت‌ها تفاوتی در تیمار با غلظت‌های مختلف روی نسبت به شاهد از خود نشان ندادند.

تغییر در تعداد سلول‌ها عموماً به دلایل مختلفی مانند نیاز غذایی، دفاع سلولی، تولید عوامل ایمنی، عوامل ضد میکروبی، ضد ویروسی و تولید تیروزین جهت اسکراتینزاسیون و ملانینزاسیون اتفاق می‌افتد (Gupta, 1985). کاهش در میزان پروهموسیت‌ها را می‌توان به دلیل تبدیل این سلول‌ها به سلول‌های دیگر هم‌چون گرانولوسیت‌ها یا پلاسماتوسیت‌ها دانست (Jirvanichpaisal et al., 2006; Johansson et al., 2006). این امکان وجود دارد که پروهموسیت‌ها با تبدیل به هموسیت‌های دیگر به‌ویژه گرانولوسیت‌ها و

(Lorenzon et al., 2001; Mayrand et al., 2005) به عقیده رابینسون و رایان (Robinson and Ryan, 1988) هموسیت‌ها توانایی انتقال فلزات را به صورت داخل سلولی دارند. این انتقال به وسیله سیتوپلاسم و یا در داخل وزیکول‌های لیزوزومی انجام می‌شود. هموسیت‌های صدف‌های دو کفه‌ای مقادیر بالایی از فلزات سنگین را در خود، به خصوص در لیزوزیم‌ها جمع می‌کنند (Matozzo et al., 2001). پاسخ معمول در این جانوران نسبت به آلودگی فلزات سنگین افزایش در تعداد سلول‌های خونی آزاد گزارش شده است (Pipe and Coles, 1995). پایپ و همکاران (Pipe et al., 1999) در بررسی اثر مس بر شمارش کل سلول‌های خونی صدف *Mytilus edulis* افزایش تعداد کل سلول‌های خونی را گزارش کردند. دلیل آن‌ها برای افزایش تعداد کل سلول‌ها، تغییر در تعداد و افزایش تعداد یکی از انواع سلول‌های این صدف به نام بازوفیلیک بود. در گزارشی دیگر آهرن و همکاران (Ahearn et al., 2004) گزارش کردند یون‌های روی به‌وسیله هموسیت‌های خرچنگ *Homarus americanus* پخش می‌شوند. وی این عمل را نوعی فرآیند سم‌زدایی قلمداد کرد. هم‌چنین پیری و همکاران (Pirie et al., 1984) در بررسی هموسیت‌های صدف خوراکی گزارش کردند که روی و مس در سلول‌های خونی توسط وزیکول‌های محصور به غشا، تجمع پیدا می‌کنند با وجود این، زمانی که غلظت این فلزات بالا می‌رود، تاثیر منفی نظیر از بین رفتن یک پارچگی اسکلت سلولی در هموسیت‌های این صدف مشاهده می‌شود.

از طرفی دیگر هموسیت‌ها در تولید متالوتیونین‌ها<sup>۲۴</sup> نقش دارند (Roesijadi et al., 1997; Park et al., 2001; Coutinho and Barbosa, 2007). متالوتیونین‌ها پروتئین‌هایی کوتاه و غنی از سیستئین هستند که وظیفه هموستازی<sup>۲۵</sup> و سم‌زدایی<sup>۲۶</sup> فلزات سنگین را بر عهده دارند. این پروتئین‌ها با اتصال به فلزات سنگین و نظیف کردن

24 . Metallothioneins

25 . Homeostasis

26 . Detoxification

### اثر فلز سنگین روی بر پاسخ ایمنی (گره‌زایی)

در شکل ۴ پاسخ ایمنی لارو کرم قوزه پنبه در برابر تزریق لاتکس بید در تیمار با غلظت‌های مختلف روی را نشان داده شده است. تیمار با روی سبب افزایش معنی‌دار تعداد گره تشکیل شده به دلیل تزریق لاتکس بید در بیشینه غلظت از این فلز (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) نسبت به شاهد (توئین -۸۰) شد.

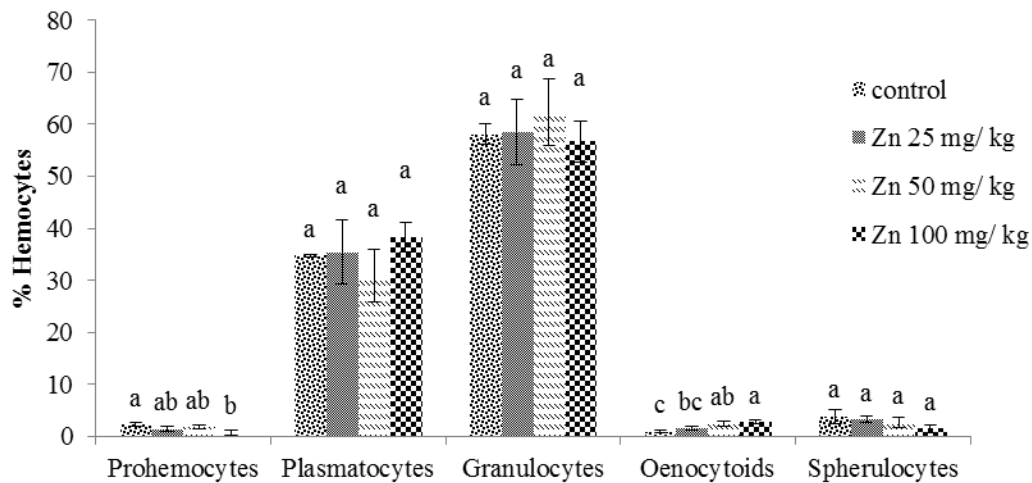
بین پاسخ ایمنی هم‌چون کپسوله کردن و تعداد هموسیت‌های آزاد در همولنف هم‌بستگی مثبت وجود دارد (Rantala *et al.*, 2008). این دلیل احتمالا محکم‌ترین دلیل برای نتایج حاصل از اثر روی بر واکنش گره‌زایی در لارو کرم قوزه پنبه است. ون اویک و همکاران (van ooik *et al.*, 2007) نیز به این نکته اشاره کردند که آلودگی با فلزات سنگین سبب بالا رفتن پاسخ ایمنی سفیره‌های *Epirrita autumnata* Borkhausen می‌شود. در ادامه، بررسی دقیق‌تر پاسخ ایمنی نشان داد که غلظت‌های بالای فلزات سنگین باعث کاهش کپسوله کردن در *E. autumnata* می‌شود (van Ooik *et al.*, 2008). نتایج آن‌ها نشان داد که غلظت ۳۰۰ میکروگرم/گرم از نیکل سبب کاهش معنی‌دار نرخ کپسوله کردن در سفیره‌های این حشره می‌شود در حالی که در غلظت کمینه (۱۶۹ میکروگرم/گرم) نرخ کپسوله کردن نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری دارد. این پژوهشگران برای اندازه‌گیری اثر نیکل از نمک سولفات‌ها این فلز استفاده کردند و با توجه به نتایج قبل که نشان داده است سولفات اسیدپتیمه معده میانی را بالا می‌برد و پاسخ ایمنی را دستخوش تغییرات می‌کند پس تغییرات در پاسخ ایمنی به این دلیل است اما با توجه با این پژوهش و تحقیقات مختلف دیگر، ماهیت فلز و غلظت مورد استفاده از آن، زمان و همچنین گونه مورد آزمایش

پلاسماتوسیت‌ها به توانایی سیستم ایمنی بدن در انتقال فلز سنگین روی یا تولید متالوتیونین افزوده باشد. از طرفی دیگر با توجه به نتایج به دست آمده در آزمایش مربوط به THC این موضوع روشن می‌شود که به طور کلی پروهموسیت‌ها وظیفه اصلی خود را که تبدیل به دیگر سلول‌ها است انجام می‌دهند ولی این امر سبب نشده است که اندام‌های هموپوئیتیک با فرآیند هموسیت‌سازی<sup>۲۷</sup> پروهموسیت‌های جدید را تولید کند و همین امر سبب کاهش درصد پروهموسیت‌ها در مقابل دیگر هموسیت‌ها شده است. همچنین با بالا رفتن غلظت روی، تعداد اونوسیتوئیدها افزایش پیدا کرد. همانطور که قبلا ذکر شد تولید آنزیم مهم فنل اکسیداز از وظایف اونوسیتوئیدها است. دویوسکی و همکاران (Dubovskiy *et al.*, 2011) در بررسی اثر نیکل بر میزان فعالیت فنل اکسیداز در *Galleria mellonella* Linnaeus گزارش کردند که در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکروگرم/گرم ماده غذایی فعالیت این آنزیم افزایش دارد. آن‌ها افزایش در این آنزیم را به دلیل خسارتی که به غشای پایه معده میانی وارد آمده است دانسته‌اند که این امر سبب آزادسازی بعضی از میانجی‌های ایمنی به داخل هموسل می‌شود. ژیا و همکاران (Xia *et al.*, 2005) گزارش کردند که نرخ آپوپتوزیز<sup>۲۸</sup> در لاروهای *Spodoptera litura* Fabricius در تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از روی برابر با ۱,۲۸ درصد است و با بالا رفتن میزان غلظت روی، نرخ آپوپتوزیز در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم روی به بیش‌تر از ۶۳ درصد سلول‌های خونی می‌رسد. احتمالا سطوح مختلف ملانیزاسیون می‌تواند فرآیندهای وابسته به رادیکال و وابسته به آنتی‌اکسیدان مثل آپوپتوزیز یا استرس‌های اکسیداتیو را القا کند که خود به وسیله فلزات معین القا می‌شود (Migula *et al.*, 2004; Pech and Strand, 2000; Duboviskii *et al.*, 2010) و با افزایش ترشح فنل اکسیداز، افزایش در تعداد اونوسیتوئیدها در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم مشاهده شده است.

27. Hematopoiesis

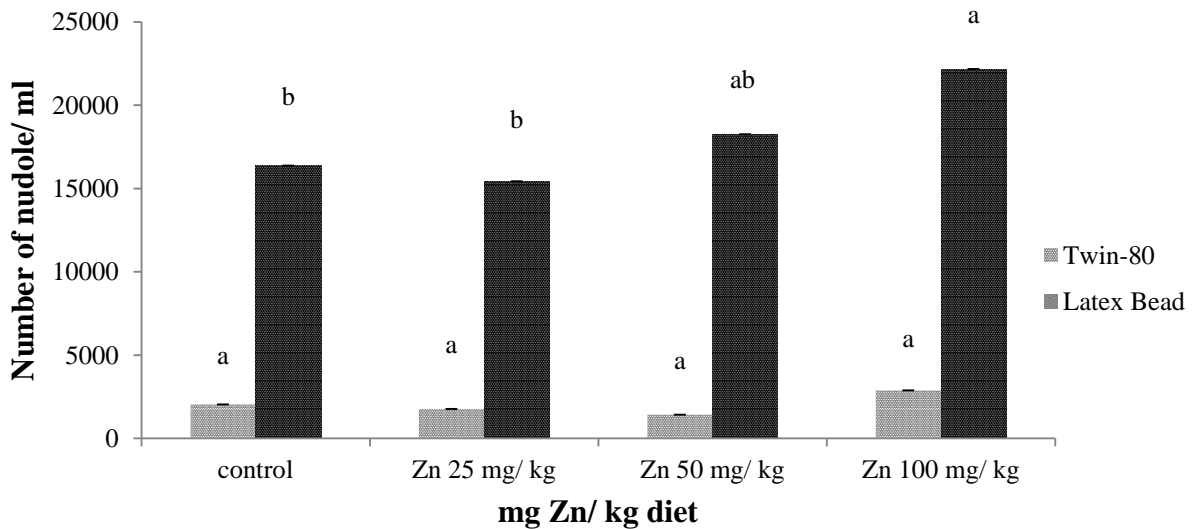
28. Apoptosis





شکل ۳- اثر روی بر میانگین  $\pm$  SE شمارش تفرقی سلول‌های خونی (DHC). میانگین‌های با حروف مشابه در تیمارها اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (Tukey's test,  $P < 0.05$ ).

Figure 3. The effect of zinc on differential hemocytes count (DHC). Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey's test,  $P < 0.05$ ).



شکل ۴- اثر روی بر میانگین  $\pm$  SE واکنش گره‌زایی با لانتکس بید. میانگین‌های با حروف مشابه در تیمارها اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (Tukey's test,  $P < 0.05$ ).

Figure 4. Effect of zinc on nodule formation with latex bead. Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey's test,  $P < 0.05$ ).

هموسیت‌ها دارند، تعداد هموسیت‌ها و تنوع آن‌ها، به عنوان معیاری برای توضیح اثرات متفاوت فلزات در نظر گرفته

تأثیرات بسیار متفاوتی بر پاسخ ایمنی داشته‌اند و در نتیجه باید در بررسی این‌گونه تأثیرات که رابطه قوی با

بر موجودات تاثیر بگذارند تاکنون مورد بررسی کمتری قرار گرفته است به ویژه زمانی که بحث در مورد فلزات سنگین ضروری مانند روی، آهن یا مس باشد که نقش بسیار مهمی را در فیزیولوژی بدن جانداران ایفا می کنند. این موضوع زمانی بیشتر مورد توجه قرار می گیرد استفاده از این فلزات روز به روز در کشاورزی بیشتر می شود و یکی از مهم ترین دلایل تجمع فلزات سنگین در محیط را به کودهای کشاورزی استفاده شده نسبت می دهند.

پاسخ ایمنی آفتی کلیدی چون کرم قوزه پنبه با توجه به این تحقیق بالا رفت. این که دقیقاً سازوکار پاسخ ایمنی نسبت به فلزات چگونه است در حال حاضر به طور واضح مشخص نیست ولی این موضوع حتماً باید در نظر گرفته شود که پاسخ هایی مثل گره زایی یا کپسوله کردن که به طور قوی با هموسیت ها رابطه دارند، باید جامع تر، کامل تر و با در نظر گرفتن تعداد و نوع سلول های خونی باشد. این پاسخ از آن نظر مورد توجه است که ثابت کرد که عوامل محیطی توانایی تاثیر بر سازوکار ایمنی را دارند و از نظر مدیریت تلفیقی آفات، بالا رفتن پاسخ ایمنی یک آفت، مدیریت کنترل آن آفت را تحت تاثیر قرار می دهد. درک تاثیر عوامل محیطی و استرس های ناشی از آن بر واکنش های ایمنی می تواند راه کارهای مفیدی را برای کنترل آفات داشته باشد.

#### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان برای حمایت از این پژوهش، کمال تشکر را دارند. همچنین از سرکار خانم دکتر رویا خسروی به دلیل کمک در آزمایش های ایمنی شناسی سپاسگزاری می کنند.

شود. این موضوع که چندین عامل در اثر فلزات سنگین بر پاسخ ایمنی اثرگذارند در پژوهشی که سان و همکاران (Sun et al., 2011) نیز انجام دادند به خوبی به چشم می خورد. در این مورد زمان نقشی کلیدی در پاسخ ایمنی داشت به طوری که اثر ۱۰ میلی گرم / کیلوگرم از نیکل به مدت ۳ نسل پیاپی بر *S. litura* باعث کاهش پاسخ ایمنی شد.

تعریف فلز سنگین در منابع مختلف بسیار متفاوت است و محققین مختلف در علم شیمی با توجه به چگالی، ظرفیت اکسیداسیون و یا وزن مولکولی این عناصر، تعاریف متفاوتی را بیان کرده اند اما هرچه هست، در این واژه بار منفی خاصی از نظر سمیت وجود دارد. این موضوع سبب شده که حتی فلزاتی که ضروری هستند را نیز در زمره فلزات سنگین از نظر بار منفی واژه تعریف کنیم که در عمل، چه در انسان، چه در گیاهان و چه در موجودات دیگر این طور نیست. عوامل متعددی می توانند بر اثر فلزات سنگین بر موجودات تاثیرگذار باشند. اولین و مهم ترین مورد "ماهیت فلز" است و در کنار این ویژگی، "غلظت فلز"، "مدت زمان" و "گونه مورد آزمایش" نیز توانایی تغییر در تاثیر فلزات سنگین را دارند. این موارد بیان کننده این است که ماهیت هر فلز از نظر ضروری بودن یا غیر ضروری بودن تا چه اندازه می تواند بر سیستم های مختلف بدن یک جاندار هم چون ایمنی تاثیرگذار باشد. همچنین غلظت فلز در درجه بعدی دارای اهمیت ویژه ای است. غلظت های بالا از فلزات سنگین توانایی سمیت را دارند و به خوبی در تحقیقات مختلف ثابت شده است ولی این موضوع که اثر مقادیر پایین از این فلزات چگونه می تواند

#### References

- Ahearn, G., Mandal, P. and Mandal, A. 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *Journal of Comparative Physiology B* 174 (6): 439-452.
- 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 (2): 123-129.

- Borges, A., Santos, P., Furtado, A. and Figueiredo, R.** 2008. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Micron** 39 (4): 486-494.
- Brandt, E. G., Hellgren, M., Brinck, T., Bergman, T. and Edholm O.** 2009. Molecular dynamics study of zinc binding to cysteines in a peptide mimic of the alcohol dehydrogenase structural zinc site. **Physical Chemistry Chemical Physics** 11 (6): 975-983.
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I. and Lux, A.** 2007. Zinc in plants. **New Phytologist** 173 (4): 677-702.
- Coutinho, H. D. and Barbosa, A. R.** 2007. Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. **Silva Lusitana** 15 (1): 103-117.
- Dubovskii, I., Grizanov, E., Chertkova, E., Slepneva, I., Komarov, D., Vorontsova, Y. L. and Glupov, V.** 2010. Generation of reactive oxygen species and activity of antioxidants in hemolymph of the moth larvae *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) at development of the process of encapsulation. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology** 46 (1): 35-43.
- Dubovskiy, I., Grizanov, E., Ershova, N., Rantala, M. and Glupov, V.** 2011. The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Chemosphere** 85 (1): 92-96.
- Duruibe, J., Ogwuegbu, M. and Ekwurugwu, J.** 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences** 2 (5): 112-118.
- Emsley, J.** 2011. Nature's building blocks: an AZ guide to the elements. Oxford University Press.
- Fleeger, J. W. and Carman, K. R., Nisbet, R. M.** 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **Science of the Total Environment** 317 (1): 207-233.
- Fosmire, G. J.** 1990. Zinc toxicity. **The American Journal of Clinical Nutrition** 51 (2): 225-227.
- Gillespie, J. P., Burnett, C. and Charney, 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 (4): 429-437.
- Gupta, A.** 1985. Cellular elements in the hemolymph. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology** 3: 401-451.
- Han, F. X., Banin, A., Su, Y., Monts, D. L., Plodinec, J. M., Kingery, W. L. and Triplett, G. E.** 2002. Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. **Naturwissenschaften** 89 (11): 497-504.
- Jalali, 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** 1(3): 199-216.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L. and Söderhäll, K.** 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology** 211 (4): 213-236.
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K.** 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture** 191 (1): 45-52.
- Koricheva, J., Larsson, S. and Haukioja, E.** 1998. Insect performance on experimentally stressed woody plants: a meta-analysis. **Annual Review of Entomology** 43 (1): 195-216.
- Lavine, M. and Strand, M.** 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 32 (10): 1295-1309.
- Lindqvist, L.** 1992. Accumulation of cadmium, copper, and zinc in five species of phytophagous insects. **Environmental Entomology** 21 (1): 160-163.
- Liu, J., Dong, Y., Xu, H., Wang, D. and Xu, J.** 2007. Accumulation of Cd, Pb and Zn by 19 wetland plant species in constructed wetland. **Journal of Hazardous Materials** 147 (3): 947-953.
- Lorenzon, S., Francese, M., Smith, V. and Ferrero, E.** 2001. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. **Fish & Shellfish Immunology** 11 (6): 459-472.
- Malakar, C., Ganguly, A. and Haldar, P.** 2009. Influence of cadmium on growth, survival and clutch size of a common Indian short horned grasshopper, *Oxya fuscovittata*. **American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences** 1 (1): 32-36.

- Maret, W.** 2001. Zinc biochemistry, physiology, and homeostasis—recent insights and current trends. **Biomaterials** 14 (3): 187-190.
- Marino, F., Stürzenbaum, S., Kille, P. and Morgan, A.** 1998. Cu–Cd interactions in earthworms maintained in laboratory microcosms: the examination of a putative copper paradox. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology** 120 (2): 217-223.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D. and Marin, M.** 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 41 (2): 163-170.
- Matthews, M.** 1999. Heliothine moths of Australia. CRC press.
- Mayrand, E., St-Jean, S. D. and Courtenay, S. C.** 2005. Haemocyte responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: can the immune system recuperate? **Aquaculture Research** 36 (10): 962-971.
- Migula, P., Laszczyca, P., Augustyniak, M., Wilczek, G., Rozpedek, K., Kafel, A. and Woloszyn, M.** 2004. Antioxidative defence enzymes in beetles from a metal pollution gradient. **Biologia-Bratislava** 59 (5): 645-654.
- Muysen, B. T., De Schampelaere, K. A. and Janssen, C. R.** 2006. Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology** 77 (4): 393-401.
- Nazir, A., Malik, R. N., Ajaib, M., Khan, N. and Siddiqui, M. F.** 2011. Hyperaccumulators of heavy metals of industrial areas of Islamabad and Rawalpindi. **Pakistan Journal of Botany** 43 (4): 1925-1933.
- Nielsen, F. H.** 2012. History of zinc in agriculture. **Advances in Nutrition: An International Review Journal** 3 (6): 783-789.
- Parizanganeh, A., Hajisoltani, P. and Zamani, A.** 2010. Concentration, distribution and comparison of total and bioavailable metals in top soils and plants accumulation in Zanjan Zinc Industrial Town-Iran. **Procedia Environmental Sciences** 2: 167-174.
- Park, J. D., Liu, Y. and Klaassen, C. D.** 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. **Toxicology** 163 (2): 93-100.
- Pech, L. L. and Strand, M. R.** 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. **Journal of Cell Science** 109 (8): 2053-2060.
- Pipe, R., Coles, J., Carissan, F. and Ramanathan, K.** 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology** 46 (1): 43-54.
- Pipe, R. K. and Coles, J. A.** 1995. Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. **Fish & Shellfish Immunology** 5 (8): 581-595.
- Pirie, B. J., George, S. G., Lytton, D. G. and Thomson, J. D.** 1984. Metal-containing blood cells of oysters: ultrastructure, histochemistry and X-ray microanalysis. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom** 64 (01): 115-123.
- Prasad, A. S.** 2008. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. **Molecular Medicine** 14 (5-6): 353.
- Rantala, M. J., Koskimäki, J., Taskinen, J., Tynkkynen, K. and Suhonen, J.** 2000. Immunocompetence, developmental stability and wingspot size in the damselfly *Calopteryx splendens* L. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B :Biological Sciences** 267 (1460): 2453-2457.
- Ratcliffe, N., Rowley, A., Fitzgerald, S. and Rhodes, C.** 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **International Review of Cytology** 97 (183): 350.
- Robinson, W. and Ryan, D.** 1988. Transport of cadmium and other metals in the blood of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*. **Marine Biology** 97 (1): 101-109.
- Roesijadi, G., Brubacher, L., Unger, M. and Anderson, R.** 1997. Metallothionein mRNA induction and generation of reactive oxygen species in molluscan hemocytes exposed to cadmium *in Vitro*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology** 118 (2): 171-176.
- Russo, J., Brehelin, M. and Carton, Y.** 2001. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **Journal of Insect Physiology** 47 (2): 167-172.

- Sharma, R. K. and Agrawal, M.** 2005. Biological effects of heavy metals: an overview. **Journal of environmental biology/Academy of Environmental Biology, India** 26 (2 Suppl): 301-313.
- Shorey, H. and Hale, R.** 1965. Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 58 (3): 522-524.
- Stanley, D. W. and Miller, J. S.** 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 119 (1): 1-13.
- Strand, M. R.** 2008. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Immunology**:25-47.
- Strand, M. R., Beck, M. H., Lavine, M. D. and Clark, K. D.** 2006. Microplitis demolitor bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplusia includens*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 61 (3): 134-145.
- Sun, H. X., Dang, Z., Xia, Q., Tang, W. C. and Zhang, G. R.** 2011. The effect of dietary nickel on the immune responses of *Spodoptera litura* Fabricius larvae. **Journal of Insect Physiology** 57 (7): 954-961.
- Van Ooik, T., Pausio, S. and Rantala, M. J.** 2008. Direct effects of heavy metal pollution on the immune function of a geometrid moth, *Epirrita autumnata*. **Chemosphere** 71 (10): 1840-1844.
- Van Ooik, T., Rantala, M. J. and Saloniemi, I.** 2007. Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in the geometrid moth *Epirrita autumnata*. **Environmental Pollution** 145 (1): 348-354.
- Washburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan, F. F., Beckage, N. E. and Volkman, L. E.** 2000. Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus. **Journal of Insect Physiology** 46 (2): 179-190.
- Wilson, A.** 1994. The living rock: the story of metals since earliest times and their impact on developing civilization. Woodhead publishing.
- Xia, Q., Sun, H., Hu, X., Shu, Y., Gu, D. and Zhang, G.** 2005. Apoptosis of *Spodoptera litura* larval hemocytes induced by heavy metal zinc. **Chinese Science Bulletin** 50 (24): 2856-2860.

## The effect of zinc ( $Zn^{2+}$ ) on cellular immune system of American cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lep.: Noctuidae)

A. Baghban<sup>1</sup>, J. Jalali Sendi<sup>\*1</sup> and A. Zibae<sup>1</sup>

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan.

(Received: February 18, 2015- Accepted: May 17, 2015)

---

### Abstract

Natural activities such as volcanic eruptions, erosion, springs water and human activities such as exploration, mining, agriculture and fossil fuels forms due accumulation of heavy metals in soil and implicit toxicity to plants, animals and humans. Among heavy metals, Zinc is considered as an essential element. The effect of median concentrations of zinc (25, 50 and 100 mg/ kg diet) was studied on cellular immune of American cotton bollworm. Our results demonstrated significant increase in total hemocytes count (THC) in 50 and 100 mg/kg concentrations of zinc compared to the control. In differential hemocytes count (DHC), prohemocytes were significantly reduced in 100 mg/ kg concentration of zinc but in 50 and 100 mg/ kg concentrations of zinc, oenocytoids increased significantly compared to the control. After latex bead injection, immune response (nodulation) significantly was enhanced in 100 mg/ kg concentration of zinc compared to the control. Understanding, the influence of environmental factors and stresses on immune responses can be effective solutions for pest control.

**Key words:** Environment stresses, Heavy metals, Hemocytes, Latex Bead, Nodulation, Immune response.

---

\* Corresponding author: Jjalali@guilan.ac.ir