تحقیقات آفات گیاهی
۱۴۰۲ -۱۳(۲):۸۱ -۸۵
Open access
doi: 10.22124/iprj.2023.25067.1528
pISSN:2322-2409
eISSN: 2538-6123

مقاله کوتاه علمی

ریخت‌شناسی سلول‌های خونی لارو شب‌پره گاما *Plusia gamma* (Lep.: Noctuidae)

مریم عجم حسنی
گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود
شناسه ارکید: 0000-0003-2707-9604

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۴)

چکیده

سلول‌های خونی، مهم‌ترین اجزای خونی در سیستم گردش خون حشرات هستند که علاوه بر غذارسانی به سلول‌ها و بافت‌های بدن، نقش کلیدی در دفاع فیزیولوژیک دارند. در این پژوهش، سلول‌های خونی شب‌پره گاما *Plusia gamma* به عنوان یک آفت همه‌جایی و پرخوار شناسایی و بررسی شد. بدین منظور، همولنف لاروهای این حشره جمع‌آوری شد و پس از استقرار روی لام و رنگ‌آمیزی با محلول گیمسا، سلول‌های خونی آن‌ها شناسایی شد. پنج نوع سلول خونی در همولنف لاروهای شب‌پره گاما مشاهده شد که شامل پروهموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها بودند. پروهموسیت‌ها کوچک‌ترین نوع سلول‌ها و مدور با هسته مرکزی، گرانولوسیت‌ها در اندازه‌های بزرگ‌تر از پروهموسیت‌ها، مدور به همراه گرانول‌های فراوان در سیتوپلاسم، پلاسموتوسیت‌ها اغلب دوکی‌شکل با یک یا دو زائده سیتوپلاسمی، اونوسیتوئیدها تخم‌مرغی‌شکل با هسته جانبی و اسفرولوسیت‌ها به‌نسبت درشت با سیتوپلاسم حفره‌دار در همولنف لارو سن چهارم شب‌پره گاما وجود داشتند. فراوانی گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در لاروهای سنین چهارم و پنجم این حشره حدود ۷۰٪ بود که بیشتر از سایر سلول‌ها بود. در حالی‌که در لاروهای سنین پایین‌تر، تراکم پروهموسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها نسبت به سایر سلول‌ها بیشتر بود. یافته‌های ما می‌تواند به عنوان گام نخست برای بررسی هماتولوژی شب‌پره گاما مورد استفاده قرار گیرد.

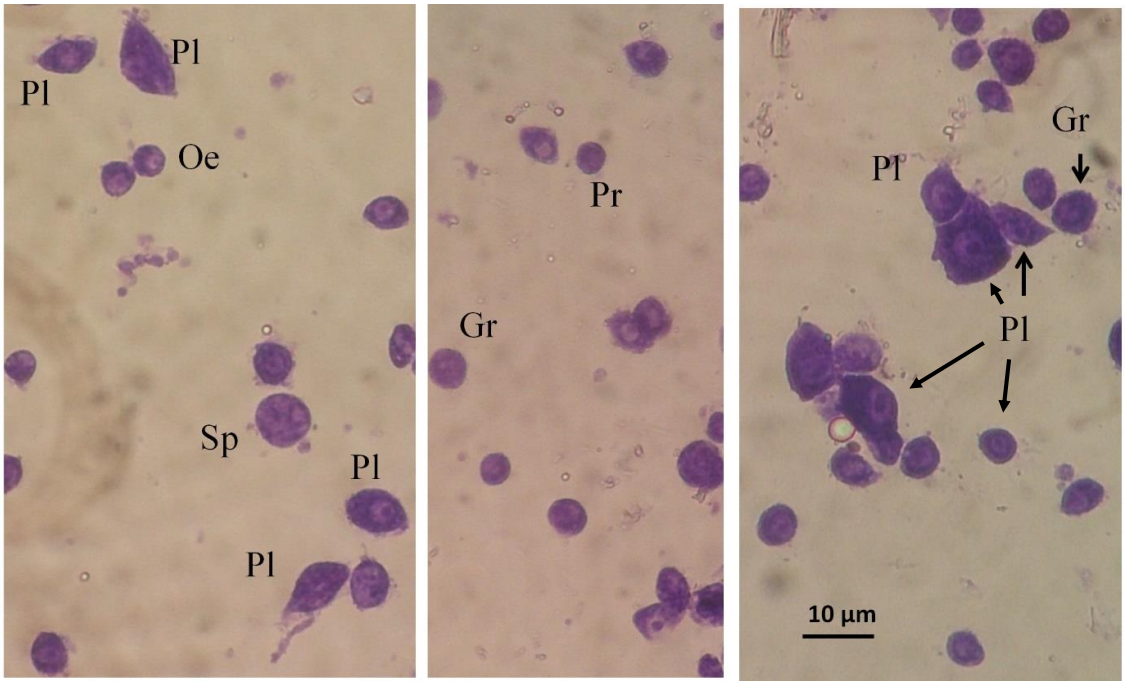
واژه‌های کلیدی: ایمنی سلولی، شب‌پره گاما، همولنف

نویسنده مسئول: shahroodm@gmail.com

CC BY

شب‌پره گاما *Plusia gamma* (Linnaeus) یا *Antographa gamma*، حشره‌ای چندین‌خوار است که لاروهایش رژیم غذایی برگ‌خواری داشته و به بیش از ۳۰۰ گونه گیاهی خسارت وارد می‌کند. لاروها از انواع سبزی‌جات و گیاهان گلخانه‌ای متعلق به خانواده‌های مختلف گیاهی مانند گندمیان، بقولات، کاسنی، اسفناجیان، چلیپاییان، سیب زمینی، پنبه، پیاز و غیره تغذیه می‌کنند (Erazo-monero *et al*, 2019). گاه شدت خسارت لاروها در مزارع و باغچه‌ها به حدی زیاد است که زمین نیاز به واکاری دارد. از آنجا که این حشره فاقد دیاپوز اجباری است، می‌تواند در شرایط مساعد در تمام طول سال فعال بوده و خسارت‌زا باشد. ایمنی‌شناسی، یکی از جنبه‌های مهم بررسی‌های فیزیولوژی گردش خون حشرات می‌باشد. چرا که این گروه از موجودات در تمام طول دوره زندگی در مواجهه با سموم، آلاینده‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها بوده و می‌بایست از سامانه ایمنی قدرتمندی در برابر آلودگی‌ها برخوردار باشند. طبعا حشرات ضعیف و یا بیمار که توان دفاعی شایسته‌ای در رویارویی با خطرات ندارند، زنده‌مانی مناسبی نداشته و به زودی تلف خواهند شد. سیستم ایمنی حشرات، با فعالیت سلول‌های خونی به ویژه گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها ضامن حفظ و زنده‌مانی حشرات در مقابل انواع تنش‌ها و آلودگی‌ها است. این سلول‌ها ابتدا عامل مهاجم را شناسایی کرده و با تغییر شکل و جمعیت در ساعت‌های اولیه ورود عوامل بیگانه به بدن، واکنش نشان می‌دهند. در واقع، اولین اقدام دفاعی بدن را بعد از دفاع جلدی انجام می دهند (Lavine & Strand, 2002). برای انجام آزمایش، لاروهای سنین مختلف شب‌پره گاما از مزارع کاهو (حومه شاهرود)، جمع‌آوری و به آزمایشگاه (دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰٪ و دوره روشنایی به تاریکی ۱۰: ۱۴ ساعت) منتقل شدند. لاروها در ظروف پرورش قرار گرفتند و با برگ کاهو تغذیه شدند. پس از یک نسل پرورش، برای جمع‌آوری همولنف، ابتدا از منطقه شکمی لارو، محدوده پاهای دروغین دوم و سوم برش زده و همولنف با استفاده از میکروپیپت استخراج شد. مقدار ۵ میکرولیتر از همولنف روی لام قرار داده شد و پس از دقایقی از محلول رنگی گیمسا برای رنگ‌آمیزی سلول‌ها استفاده شد. ده تا پانزده دقیقه بعد، لام با آب مقطر شسته شد و سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری Olympus BH2 با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر بررسی شدند و با کمک منابع علمی (Gupta, 1985) شناسایی سلول‌ها انجام و درصد فراوانی هر نوع سلول در سنین لاروی محاسبه شد (Yeager, 1945). سی عدد لارو برای شناسایی و محاسبه فراوانی هموسیت‌ها استفاده شد. بر اساس نتایج، پنج نوع هموسیت شامل پروهموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها، و اسفرولوسیت‌ها در همولنف لارو شب‌پره گاما مشاهده شد. پروهموسیت‌ها به عنوان سلول‌های پایه به شکل مدور و کوچک‌ترین سلول‌ها بودند. فراوانی این سلول‌ها در لاروهای سنین چهار و پنج این حشره پایین و حدود ۷ تا ۹ درصد بود. گرانولوسیت‌ها دارای اندازه‌های متوسط تا بزرگ با گرانول‌های فراوان در سیتوپلاسم بودند و فراوانی حدود ۲۸ تا ۳۰ درصد را در لاروهای سنین بالای شب‌پره گاما به خود اختصاص دادند. تراکم گرانول‌های سیتوپلاسم در گرانولوسیت‌ها با فعالیت بیگانه‌خواری و گره-زایی آنها ارتباط مستقیم دارد؛ ضمن اینکه گیرنده‌های شناسایی‌کننده عامل بیگانه در سطح گرانولوسیت‌ها مستقر است و از این رو، گرانولوسیت‌ها به عنوان اولین سلول‌های مشارکت‌کننده در فرایند دفاع حشرات محسوب می‌شوند (Borges *et al*, 2008). پلاسموتوسیت‌ها به اشکال دوکی، چشمی و ستاره‌ای به ابعاد مختلف حضور داشتند و در همولنف سنین چهار و پنج لاروی به ترتیب با فراوانی حدود ۳۹ تا ۴۴ درصد مشاهده شدند. فعالیت پلاسموتوسیت‌ها به همراه گرانولوسیت‌ها در مقابله با تنش‌ها و آلودگی‌ها، ایمنی سلولی حشرات را شامل می‌شود که در واقع، بخش قابل توجهی از ایمنی ذاتی آن‌ها است (Beckage, 2008). اونوسیتوئیدها مدور یا بیضی شکل دارای هسته جانبی با فراوانی ۵ تا ۱۰ درصد در لاروهای سنین چهار و پنج و اسفرولوسیت‌ها مدور با سیتوپلاسم حفره‌دار و اندازه‌ای بزرگ‌تر از گرانولوسیت‌ها با فراوانی

بسیار پایین (۱ تا ۲ درصد) مشاهده شدند (شکل ۱) (جدول-های ۱ و ۲). گزارش‌های مشابهی از حضور این پنج نوع سلول خونی و با خصوصیات ریخت‌شناسی مشابه در همولنف سایر بالپولکداران مانند پروانه برگ‌خوار مرکبات، کرم ابریشم، بید آرد، پروانه موم‌خوار بزرگ، بید سیب-زمینی، لیسه سیب، بید چغندرقند و غیره منتشر شده است (Jalali and Salehi, 2008, Tan *et al*, 2013, Ghasemi *et al*, 2013, Blanco *et al*, 2017, Pourali and Ajamhassani, 2018, Ajamhassani and Mahmoodzadeh, 2020, Ajamhassani, 2021).



شکل ۱- انواع سلول‌های خونی لارو *Plusia gamma* رنگ‌آمیزی‌شده با گیمسا. مشاهده با میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۴۰ برابر (پروهموسیت=Pr، گرانولوسیت=Gr، پلاسموتوسیت=Pl، اونوسیتوئید=Oe، اسفرولوسیت=Sp)

Figure 1. Hemocyte types from *Plusia gamma* larvae by Giemsa for light microscopic observations 40x Pr=Prohemocyte, Pl=Plasmotocyte, Gr=Granulocyte, Oe=Oenocytoid, Sp=Spherulocyte

جدول ۱- اندازه مرفومتریک انواع سلول‌های خونی لارو سن چهارم *Plusia gamma*

Table 1. Morphometric size of hemocytes of fourth instar larvae of *Plusia gamma* (n=30)

Hemocyte	Size (µm)	
	Length (Mean±SE)	Width (Mean±SE)
Prohemocyte	2.5±0.7	2.2±1
Plasmotocyte	10.5±4.7	5.2±2.2
Granulocyte	5±3.1	5±2.5
Oenocytoid	3.2±2.3	3±2.1
Spherulocyte	4.1±3.2	4.2±2.8

جدول ۲- فراوانی سلول‌های خونی در همولنف سنین مختلف لاروی *Plusia gamma*

Table 2. Hemocyte abundance in different larval stages of *Plusia gamma* (n=30)

Larval stage	Frequency of hemocyte (%)				
	Prohemocyte	Plasmotocyte	Granulocyte	Oenocytoid	Spherulocyte
2nd instar larvae	35±4.4	29±5.2	23±2.2	8±4.2	2±1.5
3rd instar larvae	23±3.2	30.6±2.2	19±3.8	10±3.2	1±0.2
4th instar larvae	8.8±0.2	41.5±2.8	30±0.55	6.6±3.2	1.8±0.4
5th instar larvae	8.5±2.7	41±3.2	27.8±1.5	8.1±1.5	0.5±0.05

فراوانی گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها در همولنف لاروهای سنین بالای بالپولکداران بیش از ۷۰ درصد است (Strand, 2008)، که نتایج ما با آن همسو است. به نظر می‌رسد، افزایش میزان تغذیه و حجم همولنف در سنین بالاتر لاروی، منجر به مشارکت بیشتر سلول‌های خونی در فرایندهای دفاع ایمنی و تقویت توان سامانه ایمنی حشره در برابر تنش‌ها و عوامل بیمارگر شود. تغذیه بالاتر لاروهای درشت‌تر و افزایش حجم پروتئین‌های ضد میکروبی در هموسل، در تغییرات جمعیت سلول‌های خونی آنها دخیل است (Gupta, 1985). با توجه به اهمیت خسارت شب‌پره گاما و لزوم شناسایی پارامترهای خونی به عنوان اجزای مهم ایمنی حشرات، نتایج این بررسی اولیه می‌تواند زمینه بررسی‌های بعدی ایمنی‌شناختی این حشره را فراهم سازد.

References

Ajamhassani, M. (2021). Hemocyte changes of larvae of the beet moth, *Scrobipalpa ocellatella* (Lepidoptera: Gelechiidae) affected by thermal stress. *Journal of Entomological Society of Iran*, 41(1), 101–103. (In Farsi). **Doi: 10.22117/jesi.2021.353933.1412**

Ajamhassani, M. & Mahmoodzadeh, M. (2020). Cellular defense responses of 5th instar larvae of the Apple Ermine Moth, *Yponomeuta malinellus* (Lepidoptera: Yponomeutidae) against starvation, thermal stresses, and entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Animal Research*, 4(2), 59-68. (In Farsi).

Beckage, N. E., (2008). Insect Immunology, Academic Press. California.

Blanco, L. A. A., Crispim, J. S., Fernandes, K. M., de Oliveira, L. L., Pereira, M. F., Bazzolli, 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. **DOI:10.1007/s00441-017-2653-5**

Borges, A. R., Santos, P. N., Furtado, A. F. & Figueiredo, R. C. (2008). Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduvidae). *Micron*, 39, 486-49. **DOI:10.1016/j.micron.2007.01.007**

Erazo-Moreno, M., Carneiro, E. & Specht, A. (2019). Was the Silver Y Moth *Autographa gamma* (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) in South America? *Journal of Agricultural Science*, 11(2), 132-138. **DOI:10.5539/jas.v11n2p132**

Ghasemi, V., Moharramipour, S., & Jalali Sendi, J. (2013). Circulating hemocytes of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zell. (Lep: Pyralidae) and their response to thermal stress. *Invertebrate Survival Journal, 10,* 128-140.

Gupta, A. P. (1985). Cellular elements in the haemolymph, pp. 85–127. In: Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. (eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Cambridge University Press.

Jalali, J. & Salehi, R. (2008). The hemocyte types, differential and total count in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) during post-embryonic development. *Munis Entomology & Zoology Journal*, 3(1), 199-216.

Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry Molecular and Biology, 32,* 1295-1309. **Doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9**

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 Farsi]. **Doi: 10.22117/jesi.2018.116103**

Strand, M. R. (2008). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect immunology*, no? 25–47. **Doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x**

Tan, J., Xu, M., Zhang, K., Wang, X., Chen, S., Li, T., Xiang, Z. & Cui, H. (2013). Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology, 59(6),* 595-603. **DOI:10.1016/j.jinsphys.2013.03.008**

Yeager, J. F. (1945). The blood picture of the Southern armyworm (*Prodenia eridamin*). *Journal of Agricultural Research, 71,* 1–40.

Plant Pest Research
2023- 13 (2): 81-85

Open access
doi: 10.22124/iprj.2023.25067.1528
pISSN: 2322-2409
eISSN: 2538-6123

Short paper

Morphology of hemocytes in *Plusia gamma* (Lep.: Noctuidae) larvae

M. Ajamhasssani
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology
ORCID iD: 0000-0003-2707-9604

(Received: July 23, 2023- Accepted: August 26, 2023)

Abstract

Hemocytes are the most important hemolymph components in the circulatory system of insects, which in addition to feeding all cells and tissues of the body, play a key role in physiological defense. In this research, the identification of hemocytes in the gamma moth as a cosmopolitan and omnivorous pest was considered. To perform experiments, hemolymph was collected from pest larvae, and the cells were identified after settling on a slide and staining with Giemsa solution. Five types of hemocytes were observed in the hemolymph of insect larvae, including prohemocytes, granulocytes, plasmotocytes, oenocytoids, and spherulocytes. Prohemocytes are the smallest cells and round with a central nucleus were present in the fourth instar larvae of the moth. granulocytes are larger than prohemocytes, round with abundant granules in the cytoplasm, spindle-shaped plasmotocytes with one or two cytoplasmic cells, egg-shaped onocytoids with a lateral nucleus, and relatively large spherulocytes with spherule-shape cytoplasm. The frequency of granulocytes and plasma cells in fourth and fifth instar larvae was about 70% and more than other cells. While in younger larvae, the density of prohemocytes and plasmotocytes was relatively higher than other cells. Our findings can be used as the first stage of hematology studies of *Plusia gamma*.

Key words: Cellular immune, hemolymph, *Plusia gamma*

Corresponding author: shahroodm@gmail.com