

## شناسایی سلول‌های خونی و مطالعه هموگرام کرم آلو *Grapholita funebrana* (Treitschke) (Lep.: Tortricidae)

مریم محمودزاده ارزنه‌ئی، مسعود حکیمی تبار\* و مریم عجم حسنی

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۱۱

### چکیده

سامانه گردش خون و سلول‌های خونی (هموسیت‌ها) در دفاع سلولی حشرات نقش مستقیم دارد. تغییرات شکل، تعداد و نوع سلول‌های خونی، شاخص مهم واکنش موجود زنده به آلودگی و یا تنش هستند. در این تحقیق، سلول‌های خونی لارو کرم آلو *Grapholita funebrana* (Treitschke) با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ۴۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. شناسایی سلول‌ها با رنگ آمیزی گیمسا انجام گرفت. پنج نوع سلول خونی در لارو این حشره شناسایی شد که عبارتند از گرانولوسیت‌ها (GRs)، پلاسموتوسیت‌ها (PLs)، اونوسیتوئیدها (OEs)، پروهموسیت‌ها (PRs) و اسفروولوسیت‌ها (SPs). بررسی درصد فراوانی هموسیت‌ها در لاروهای سنین مختلف کرم آلو نشان داد که گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها فراوان‌ترین سلول‌ها در لاروهای سنین چهار و پنج آفت می‌باشند. تعداد هموسیت‌ها به تدریج با افزایش سنین لاروی افزایش یافت. به علاوه، اجزای هموگرام شامل وزن لاروی، حجم همولنف، و تعداد کل سلول‌ها نیز بررسی و تعیین شدند. این مطالعه نشان داد که با افزایش سن لاروی و اندازه آن به تدریج بر حجم همولنف و تعداد کل سلول‌های خونی افزوده می‌شود. کرم آلو یکی از آفات جدی باغ‌های آلو در کشور محسوب می‌شود و بررسی‌های ایمنی‌شناسی روی این آفت کمتر مورد توجه بوده است، لذا در این تحقیق، شناسایی انواع سلول‌های خونی کرم آلو و تعیین فراوانی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: *Grapholita funebrana*، مورفولوژی سلول‌های خونی، حجم خون

وزن ده عدد از لاروهای سنین مختلف تعیین و حجم همولنف آن‌ها مشخص شد. برای شمارش کل سلول‌های خونی، همولنف لاروها جمع‌آوری و با بافر فیزیولوژیک ضد انعقاد خون (Tyson) به نسبت ۲:۱۰ میکرولیتر (حجم همولنف: ۲ و حجم محلول تایسون: ۱۰ میکرولیتر) رقیق شد. شمارش سلول‌های خونی با استفاده از لام ثنوبار و بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ (Olympus (BH2 انجام گرفت. شمارش سلول‌ها با استفاده از فرمول جونز و در میلی‌متر مکعب همولنف انجام شد (Jones, 1967).

در همولنف کرم آلو پنج نوع هموسیت شامل گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها، پروهموسیت‌ها و اسفرولوسیت‌ها مشاهده شد. پلاسموتوسیت‌ها با پروفایل چندشکلی و سیتوپلاسم صاف و دانه‌دار مشاهده شدند (شکل ۱). گرانولوسیت‌ها در بین سلول‌های خونی بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند (جدول ۱). بیشتر کروی، بیضی یا تخم مرغی شکل با هسته کوچک و مرکزی دیده شدند. سطح سیتوپلاسم این سلول‌ها حاوی گرانول‌های فراوان هستند (شکل ۱). پروهموسیت‌ها کوچک‌ترین سلول‌ها با سیتوپلاسم نازک در اطراف هسته درشت مشاهده شدند (شکل ۱). اونوسیتوئیدها دارای سیتوپلاسم ضخیم و فاقد گرانول، گرد یا تخم مرغی شکل با هسته کوچک جانبی و مشخص هستند که به طور کامل به کناره‌ی سلول کشیده شده‌اند (شکل ۱). اسفرولوسیت‌ها سلول‌هایی به نسبت بزرگ و دارای یک هسته درشت و مشخص هستند. سطح سیتوپلاسم این سلول‌ها دارای اسفرول‌های متعددی است که به شکل‌های نامنظم در همولنف حشره دیده شدند (شکل ۱). این مشخصات ظاهری انواع هموسیت‌ها در بسیاری از بالپولکداران مانند پروانه‌ی موم‌خوار *Galleria mellonella*، ساقه‌خوار برنج *Chilo suppressalis* Walker، کرم ابریشم *Bombyx mori* L.، کرم خراط *Zeuzera pyrina* L. و لیسه سیب *Yponomeuta malinellus* Zeller نیز گزارش شده است (Zibae and Malagoli, 2014; Baishya et al., 2015; Blanco et al., 2017; Ajamhassani, 2019; Ajamhassani and Mahmoodzadeh, 2020).

کرم آلو با نام علمی *Grapholita funebrana* یکی از آفات مهم خانواده رزاسه به ویژه آلو و گوجه است (Zhang, 1994). ثابت شده که همولنف حشرات با مشارکت سلول‌های خونی و فعالیت سامانه فنل اکسیداز در مقابل انواع تنش‌های دمایی، تغذیه‌ای، ورود عوامل بیمارگر، سموم و آلاینده‌ها و حتی دیابوز واکنش نشان می‌دهد که برای جلوگیری از هدررفت مواد مایع بدن حشرات (Hemostasis system) ضروری است (Li et al, 2019). سلول‌های خونی با تغییر شکل و تعداد در فرآیندهای ایمنی به شکل بیگانه‌خواری و گره‌زایی فعالیت می‌کنند و گاه منجر به حذف عامل مهاجم و پیشگیری از توسعه آلودگی در خون می‌شوند (Strand, 2008). با شناخت ویژگی‌های سلول‌های خونی به عنوان رکن اصلی دفاع سلولی، بهتر می‌توان از عوامل کنترل بیولوژیک و میکروبی در مهار آفت استفاده کرد. بنابراین در این تحقیق، انواع سلول‌های خونی کرم آلو، ویژگی‌های مرفولوژیکی، تغییرات جمعیت و هموگرام مورد بررسی قرار گرفت. در خرداد ماه ۱۳۹۷ میوه‌های آلوده به کرم آلو (رقم آلو سیاه) از درختان آفت زده در باغ‌های شهرستان تربت جام و حومه جمع‌آوری شدند. میوه‌های آلوده به اتاچک رشد (دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰٪، دوره روشنایی به تاریکی ۱۴:۱۰ ساعت) منتقل شدند. به لاروها اجازه داده شد درون میوه‌های آلوده به رشد خود ادامه دهند تا به شفیره و حشره کامل تبدیل شوند. از پروانه‌ها، تخم‌گیری شد و تخم‌ها روی میوه‌های سالم آلو منتقل شدند. پس از چند روز، با بازبینی روزانه میوه‌ها، لاروهای سنین مختلف بر اساس طول بدن و عرض کپسول سر شناسایی (Dyar, 1890) و جداسازی شدند. شناسایی سلول‌های خونی پس از رنگ-آمیزی با گیمسا و با استفاده از کلیدهای معتبر (Giglio et al., 2008) انجام شد. برای شمارش تفریقی سلول‌های خونی در مقدار مشخصی از همولنف، ۱۰۰ عدد سلول به طور تصادفی انتخاب شده و درصد فراوانی هر یک از انواع سلول-ها تعیین شد. شمارش تفرقی سلول‌های خونی در ۲۰ عدد لارو از هر سن لاروی به طور جداگانه انجام گرفت. همچنین

چهار و پنج کرم آلو که دارای وزن بالاتری نسبت به سایر سنین لاروی بودند، به طور معنی‌داری دارای حجم خون بیشتر بوده و از این لحاظ در یک گروه آماری قرار گرفتند ( $F=9.5$ ,  $df_{t,e}=19,45$ ,  $p\leq 0.0001$ ) (جدول ۲). به نظر می‌رسد نیاز غذایی لاروهای سنین بالا و افزایش غلظت ترکیبات پروتئینی ضد میکروبی می‌تواند در تغییرات فراوانی هموسیت‌ها دخیل باشد (Gupta, 1985).

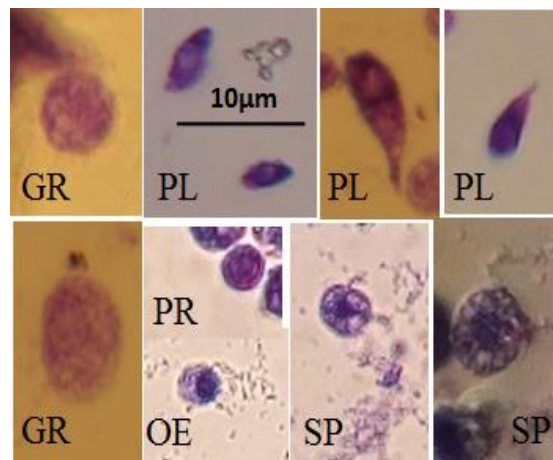
کرم آلو جزو آفات اقتصادی کشور ما محسوب می‌شود و هر ساله در چند نوبت علیه آن سمپاشی انجام می‌شود. شناخت ویژگی‌های سلول‌های خونی مانند مرفولوژی و فراوانی آن‌ها به ما کمک می‌کند تا بتوانیم روش‌های مختلف کنترل میکروبی را علیه آن امکان‌سنجی نماییم. هر چند که بررسی‌های بعدی در زمینه واکنش‌های دفاعی این حشره به عوامل مهاجم بیگانه مانند ذرات سموم و اسپور قارچ‌ها به منظور معرفی بهتر سامانه ایمنی آن ضروری است.

بررسی جمعیت هموسیت‌ها در سنین مختلف لاروی نشان دهنده ارتباط مستقیم بین وزن لاروها با حجم خون و تعداد کل سلول‌ها بود (جدول ۲). بیشترین تعداد کل سلول‌ها در لاروهای سن پنج و کمترین آن‌ها در لاروهای سن اول مشاهده شد ( $F=28.5$ ,  $df_{t,e}=9,45$ ,  $p\leq 0.001$ ). پروهموسیت‌ها به عنوان سلول‌های بنیادی در سنین پایین لاروی بیشترین فراوانی را داشتند، ولی به تدریج با افزایش سن لاروی از جمعیت آنها کاسته شد ( $F=18.22$ ,  $df_{t,e}=19,45$ ,  $p\leq 0.003$ ) (جدول ۱). گرانولوسیت‌ها ( $F=15.44$ ,  $df_{t,e}=19,45$ ,  $p\leq 0.0001$ ) و پلاسموتوسیت‌ها ( $F=38.5$ ,  $df_{t,e}=19,45$ ,  $p\leq 0.001$ ) در سنین بالای لاروی بیشترین فراوانی را داشتند. این سلول‌ها در مجموع حدود ۸۰-۷۵٪ تراکم کل سلول‌ها را در سنین چهار و پنج لاروی به خود اختصاص دادند (جدول ۱). در مطالعه حجم خون لاروهای سنین مختلف مشاهده شد با افزایش جثه بدن به تدریج بر حجم خون افزوده شد، به طوری که لاروهای سن

## References

- Ajamhassani, M. 2019. Study on morphology and frequency of hemocytes in *Osphranteria coerulescense* (Redt) (Coleoptera: Cerambycidae) and *Zeuzera pyrina* L. (Lepidoptera: Cossidae) larvae, two wood boring insects of Iran. **Iranian Journal of Forest and Range Protection Research**, 17(2): 96-106 (In Farsi).
- Ajamhassani, M. and 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).
- Baishya, B. P., Bardoloi, S. and Bharali, R. 2015. Ultrastructure of the hemocytes of Muga Silkworm larva *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera; Saturniidae): a phase-contrast and electron microscopic study, **International Journal Pure and Applied Bioscience** 3(3): 234-240.
- Blanco, L. A. A., Crispim, J. S., Fernandes, K. M., de Oliveira, L. L., Pereira, M. F., Bazzolli, D. M. S. and Martins, G. F. 2017. Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Cell and Tissue Research** 370(1): 153-168.
- Dyar, H. C. 1890. The number of molts of lepidopterous larvae. **Journal Psyche** 5: 420-422.
- Giglio, A., Battistella, S., Talarico, F. F., Brandmayr, T. Z. and Giulianini, P. G. 2008. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): Cell types and their role in phagocytosis after in vivo artificial non-self-challenge. **Micron** 39(5): 552-558.
- Gupta, A. P., 1985. Cellular elements in the hemolymph. **Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology**, 3: 401-451.
- Jones, J. C., 1967. Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* (Linnaeus). **The Biological Bulletin**, 132(2): 211-221.
- Li, T., Yan, D., Wang, X., Zhang, L. and Chen P. 2019. Hemocyte changes during immune melanization in *Bombyx mori* infected with *Escherichia coli*. **Insects** 10(301): 1-15.
- Strand, M. R. 2008. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect immunology** 25-47.
- Zhang, B. C. 1994. Index of Economically Important Lepidoptera. CAB International, Wallingford. UK, 599 p.

Zibae, A. and Malagoli, D. 2014. Immune response of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) larvae to different entomopathogenic fungi. **Bulletin of Entomological Research** 104: 155-163.



شکل ۱- انواع سلول‌های خونی لارو کرم آلو رنگ‌آمیزی شده با گیمسا برای مشاهده با میکروسکوپ نوری

PL = پلاسموتوسیت، GR = گرانولوسیت، PR = پروهموسیت، OE = اونسیتوئید، SP = اسفرو لوسیت

Figure 1. Hemocyte types from *Grapholita funebrana* larvae by Giemsa for light microscopic observations. PR=Prohemocyte, PL=Plasmotocyte, GR=Granulocyte, OE=Oenocytoid, SP=Spherulocyte

جدول ۱- میانگین درصد انواع سلول‌های خونی کرم آلو (تعداد برای هر آزمایش ۲۰ عدد)

Table 1. Percentage mean of hemocyte types in *Grapholita funebrana* (n=20)

Larval stages	Prohemocyte	Plasmotocyte	Granulocyte	Oenocytoid	Spherulocyte
First instar larvae	2.78a±23.5	1.3c±30.5	1.65d±28	1.3b±8	2.67a±10
Second instar larvae	2.24b±15.5	2.5ab±33.6	1.8c±34.5	0.5ab±7.5	1.35a±10
Third instar larvae	1.45b±16.5	1.43ab±35.5	1.2c±31	1.55a±10.67	0.5b±6.6
Forth instar larvae	0.5c±3.4	2.65a±38	1.5b±44.5	2.22a±9.57	4c
Fifth instar larvae	0.01d±1.8	2.7a±38.3	1.23a±48.5	1.8c±3.51	0.05ab±8.2

حروف کوچک غیر مشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۰/۰۵

Different letters in each column show significantly difference among treatment using Tukey's range test (ANOVA, P≤0.05).

جدول ۲- وزن بدن، حجم همولنف و تعداد کل هموسیت‌های مراحل لاروی کرم آلو

Table 2. Body weight, hemolymph volume and total number of hemocyte of larval stages in *Grapholita funebrana*

Larval stages	Weight body (mg)	Blood volume (µl)	THC (cell×mm <sup>3</sup> hemolymph)
First instar larvae	0.02d±1.06	0.07d±0.8	8.7d±68.5
Second instar larvae	0.27c±3.46	0.01c±2	22.68c±115.5
Third instar larvae	0.23b±6.88	0.07b±3.2	25.7b±175
Forth instar larvae	0.5a±11.2	0.06a±6.58	44.6a±352.67
Fifth instar larvae	1a±10	0.05a±6.3	35.5a±324.77

حروف کوچک غیر مشابه در هر ستون نشانگر اختلاف معنی‌دار بر مبنای گروه‌بندی توکی در سطح احتمال ۰/۰۵

Different letters in each column show significantly difference among treatment using Tukey's range test (ANOVA, P≤0.05).

Short paper

## Identification of hemocytes and study on hemogram of plum fruit moth *Grapholita funebrana* (Treitschke) (Lep.: Tortricidae)

M. Mahmoudzadeh Arzaneei, M. Hakimitabar\* and M. Ajamhassani

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

(Received: April 30, 2020- Accepted: July 22, 2020)

---

### Abstract

The hemolymph circulatory system and hemocytes play a direct role in insect's cellular defense. Changes in the shape, number and type of hemocytes are important indicators of an organism's reaction to infection or stress. In this study, larval hemocytes of *Grapholita funebrana* Treitsch were examined using light microscopy at 40 magnifications. Hemocytes were identified by Giemsa staining. Five types of hemocytes were identified in larvae of these insects as follows: granulocytes (GRs), plasmotocytes (PLs), oenocytoids (OEs), prohemocytes (PRs) and spherulocytes (SPs). Examination of the percentage of hemocytes in different larval instars of *G. funebrana* showed that granulocytes and plasmotocytes are the most abundant hemocytes in fourth- and fifth-stage larvae. The differential number of hemocytes gradually increased as the larvae developed. Also, hemogram components including larval hemolymph volume and total number of hemocytes were determined. This study showed that volume of hemolymph and similarly the total number of hemocytes have a direct relation with the larval growth and body size. *Grapholita funebrana* is one of the most serious pests of plum orchards in Iran and immunological studies on this pest are rare. Thus, in the current study, types and number of cellular elements have been taken into consideration.

**Key words:** *Grapholita funebrana*, morphology of hemocytes, blood volume