نشریه علمی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران
جلد ۲۱ شماره ۱، صفحه ۲۰۵-۲۰۰ (۱۴۰۲)
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijfrpr.2023.362741.1591
شناسه دیجیتال (DOR):20.1001.1.17350859.1402.21.1.12.3

مقاله کوتاه

شکل‌شناسی سلول‌های خونی (Lepidoptera: Noctuidae) *Spodoptera litura* آفت توت جنگلی

مریم عجم حسنی*

*– نویسنده مسئول، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران، پست الکترونیک: shahroodm@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۴

چکیده

نقش فاکتورهای خونی به‌ویژه سلول‌های خونی در مبارزه با هر عامل بیگانه وارد شده به همولنف، کلیدی است و شناسایی این سلول‌ها و تنوع آنها، اولین مرحله از مطالعات دفاع حشرات است. ازاین‌رو، این تحقیق به منظور بررسی شکل سلول‌های خونی پروانه *Spodoptera litura* انجام شد. از لاروهای سن پنجم حشره در آزمایش‌ها استفاده شد. شرایط پرورش لاروها دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰٪ و دوره روشنایی به تاریکی ۱۴:۱۰ ساعت بود. بر اساس مشاهدات با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۴۰، پنج تیپ سلول خونی شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها در همولنف لارو حشره وجود دارد. پروهموسیت‌ها مدور با هسته درشت مرکزی بودند و فراوانی آنها در خون لارو سن پنج حدود ۱۰ درصد به دست آمد. پلاسموتوسیت‌ها به دو شکل رایج دوکی با دو زائده مشخص و کشیده و ورمی شکل مشاهده شدند. این سلول‌ها بزرگترین هموسیت‌ها از نظر اندازه طولی بودند. هسته مشخص مرکزی و سیتوپلاسم دانه‌دار دارند. فراوانی پلاسموتوسیت‌ها حدود ۳۸ درصد بود. گرانولوسیت‌ها مدور و در اندازه‌های بزرگتر از پروهموسیت‌ها با گرانول‌های زیاد در سطح سیتوپلاسم مشاهده شدند و بالاترین فراوانی را در بین هموسیت‌ها به خود اختصاص دادند. اونوسیتوئیدها دایره‌ای شکل و هسته جانبی مشخص دارند و فراوانی آنها حدود ۸ درصد است. اسفرولوسیت‌ها با سیتوپلاسم حفره‌دار و دیواره سلولی نازک مشاهده شدند. کمترین فراوانی هموسیت‌ها در لارو سن پنج *S. litura* مربوط به این سلول‌ها و کمتر از یک درصد به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های خونی، میکروسکوپ نوری، *Spodoptera litura*

مقدمه

پروانه *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) یک آفت پلی‌فاژ بسیار مخرب در تمام اقلیم‌های دنیا شناخته شده است. لاروهای پرخوار این آفت از برگ‌های گیاهان خانواده‌های متعدد گیاهی مانند گرامینه، پنیرکیان، چلیپاییان، رزاسه، بقولات، چتریان، نعناعیان، اسفناجیان، کاسنی، مرکبات، اکالیپتوس، سیب‌زمینی و توت تغذیه می‌کنند (Ahmad *et al*, 2013). لاروهای آفت به شدت از برگ‌های توت جنگلی تغذیه کرده و هر لارو سن پنج آفت به طور متوسط روزانه دو تا چهار برگ توت را تغذیه می‌کند (نتایج داده مشاهده‌ای توسط نویسنده). انواع دفاع سلولی این آفت در مقابل قارچ‌ها (Gao *et al*, 2022)، باکتری‌ها و متابولیت‌های گیاهی

(Vengateswari *et al*, 2020) و سموم (Irfan *et al*, 2019) قبلاً گزارش شده است و نشان دهنده ظرفیت بالای ایمنی این حشره در برابر انواع تنش‌ها و آلودگی‌ها می‌باشد. سلول‌های خونی با تغییر در تعداد و تقسیمات میتوتیک گرانولوسیت‌ها و گره‌زایی در ساعات اولیه ورود عامل بیگانه به همولنف به آلودگی واکنش نشان داده‌اند. پروهموسیت‌ها به عنوان سلول‌های پایه‌ای در زمان واکنش‌های ایمنی به سلول‌های دیگر مشتق می‌شوند و گرانولوسیت‌ها و پلاسموتوسیت‌ها سلول‌های اصلی درگیر با عوامل بیگانه شناخته شده‌اند. متعاقباً آنزیم فنل‌اکسیداز و پپتیدهای ضد میکروبی وارد عمل شده و در بلوکه کردن عامل بیگانه و دفع آن مشارکت می‌کنند (Lavin and Strand, 2002).

برگ‌های توت جنگلی منبع اصلی غذای کرم ابریشم *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) در نوغانداری‌های استان گیلان است و صنعت تولید ابریشم وابسته به حفظ و حمایت درختچه‌های توت در مقابل آفات مهمی مانند *S. litura* می‌باشد. با توجه به اهمیت خسارت‌زایی این حشره روی توت و گیاهان مختلف زراعی و مرتعی و نقش اساسی سلول‌های خونی آن در تقابل با عوامل میکروبی، در این پژوهش معرفی دقیق سلول‌های خونی *S. litura* و اندازه‌های آنها هدف قرار داده شد. قطعاً شناسایی بهتر ویژگی‌های ظاهری پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌های این حشره می‌تواند در مطالعات ایمنی‌شناسی آفت و روش‌های کنترل میکروبی آن، تأثیرگذار باشد.

مواد و روش‌ها

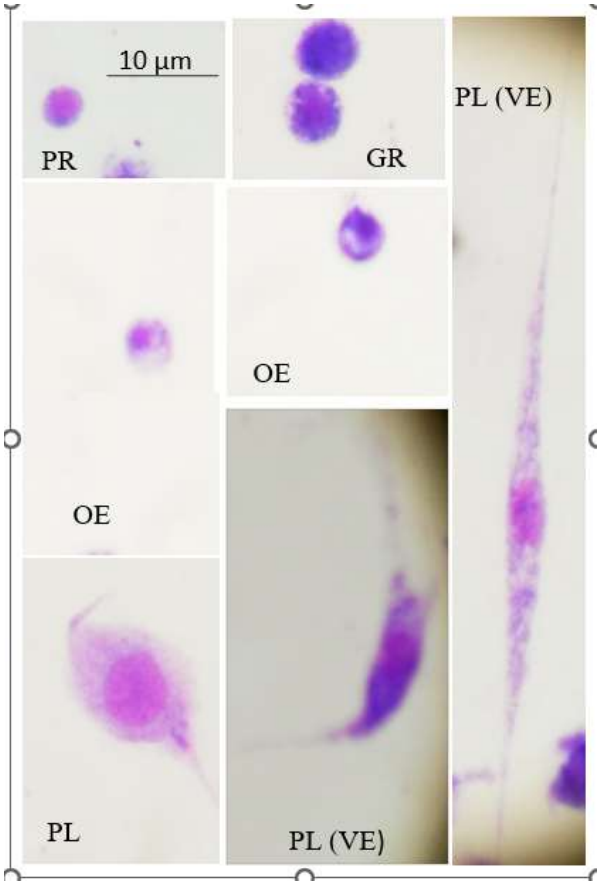
دسته‌جات تخم‌های سفید رنگ آفت از روی درخت توت جنگلی در محوطه دانشگاه گیلان جمع آوری و به آزمایشگاه گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی منتقل شد. لاروها پس از تفریخ با برگ‌های توت مورد تغذیه قرار گرفتند و پس از یک نسل پرورش، از لاروهای سن پنج در آزمایش‌ها استفاده شد. همولنف لاروها با برش یک پای کاذب هر لارو توسط میکروپیپت جمع‌آوری شد و روی لام معمولی قرار داده شد. مقداری گیمسا روی همولنف قرار داده شد و پس از حدود ۱۵ دقیقه، لام شسته شد و سلول‌ها با میکروسکوپ نوری Olympus 40 و بزرگنمایی ۴۰ مشاهده شدند. شناسایی سلول‌ها با استفاده از منابع معتبر (Gupta, 1985) انجام شد و درصد فراوانی سلول‌ها محاسبه (Yeager, 1945) و تعداد سی عدد لارو برای شناسایی و محاسبه فراوانی هموسیت‌ها استفاده گردید.

نتایج و بحث

بر اساس مشاهدات میکروسکوپ نوری، پنج سلول خونی شامل پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت، اونوسیتوئید و اسفرولوسیت در همولنف لاروهای سن پنجم پروانه *S. litura* مشاهده شد. گزارش‌های سلول‌شناسی بیشتر محققان، وجود این پنج سلول را در خون بال‌پولک‌داران تأیید می‌کند، مانند *Galleria mellonella* (Blanco *et al*, 2012)، *Plodia interpunctella* (Ebrahimi and Ajmhassani)، *Scrobipalpa ocellatella* (Ajamhassani, 2021)، *Hypneomeuta mallinellus* (Ajamhassani and Mahmoodzadeh, 2020) و غیره. به علاوه مشخصات ظاهری گزارش شده در مورد هموسیت‌های این بال‌پولک‌داران شباهت زیادی به نتایج این تحقیق دارد.

در همولنف لارو *S. litura*، پروهموسیت‌ها کوچکترین سلول‌ها به شکل مدور با هسته درشت مرکزی دیده شدند. هسته در رنگ‌آمیزی گیمسا صورتی رنگ و کاملاً از سیتوپلاسم متمایز است. هسته حجم بالایی از سلول را اشغال کرده و سیتوپلاسم آبی مایل به ارغوانی به شکل یک نوار باریک به حاشیه سلول محدود شده است (شکل ۱). فراوانی این سلول‌ها حدود ۱۰ درصد بود (جدول ۲). پلاسموتوسیت‌ها بزرگترین سلول‌ها از نظر اندازه بودند (جدول ۱). این سلول‌ها هسته مشخص مرکزی داشته که با گیمسا به رنگ صورتی مشاهده

می‌شود. سیتوپلاسم آنها آبی مایل به بنفش و دانه‌دار است. طول این سلول‌ها در فرم‌های دوکی یا چشمی شکل به حدود ۱۵ میکرومتر رسید و اندازه فرم‌های ورمیسیت (سلول‌های کرمی شکل با دو زائده طویل) در حدود ۶۰–۲۰ میکرومتر مشاهده شد که مقداری کم نظیر در اندازه سلول‌های خونی حشرات است. ثابت شده است که اندازه بزرگ سلول‌ها در به دام انداختن عامل مهاجم مؤثر است (Ajamhassani, 2021). شاید بتوان گفت یکی از دلایل بارز سامانه ایمنی قوی این حشره در بیشتر گزارش‌ها به مرفولوژی پلاسموتوسیت‌های مشارکت کننده در این حشره مربوط باشد، زیرا پلاسموتوسیت‌های درشت این حشره از یکسو با داشتن زائده‌های بلند و از سوی دیگر درصد فراوانی بالا (۳۸٪) (جدول ۲) می‌توانند در فرایندهای بیگانه‌خواری و تشکیل گره اطراف عوامل بیگانه با موفقیت عمل کنند. گرانولوسیت‌ها سلول‌هایی مدور با سیتوپلاسم مملو از گرانول هستند (شکل ۱). فراوانی بالای ۴۰ درصد این سلول‌ها (جدول ۲) و گرانولهای فراوان سطح این سلول‌ها، این امکان را به آنها می‌دهد که بتوانند دفاع فیزیولوژیک مناسبی در مقابل آلودگی‌ها و اسپور قارچ‌ها و باکتری‌ها داشته باشند. مجموع فراوانی پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در همولنف لارو سن پنج *S. litura* حدود ۷۰ درصد محاسبه شد که با مقادیر مشابه در بال‌پولک‌داران دیگر همخوانی دارد (Nardi *et al*, 2003). به نظر می‌رسد با افزایش سن لاروی و بالارفتن ظرفیت ایمنی، تراکم سلول‌های مشارکت کننده در ایمنی (پلاسموتوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها) افزایش می‌یابد که بخشی از این افزایش را می‌توان به تقسیمات میتوزی سلول‌های پایه‌ای پروهموسیت و گرانولوسیت‌ها مرتبط دانست. اونوسیتوئیدها مدور با هسته جانبی و فراوانی ۸ درصد بودند. اندازه آنها تا حدودی بزرگتر از پروهموسیت‌ها است (جدول ۱). هسته با رنگ‌آمیزی گیمسا، کاملاً از سیتوپلاسم متمایز می‌باشد (شکل ۱). این سلول‌ها در بیشتر بال‌پولک‌داران، منابع بالقوه تولید فنل‌اکسیداز محسوب می‌شوند. اسفرولوسیت‌ها با کمترین فراوانی (کمتر ۱ درصد) دارای سیتوپلاسم حفره‌دار و دیواره سلولی نازک هستند (شکل ۱ و جدول ۲) که نقش مؤثری در فعالیت‌های ایمنی حشرات نداشته و در انتقال ترکیبات از اپیدرم به کوتیکول جلد مداخله می‌کنند.



شکل ۱- انواع سلول‌های خونی لارو ***Spodoptera litura*** رنگ‌آمیزی شده با گیمسا

مشاهده با میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۴۰. (پروهموسیت=**PR**، گرانولوسیت=**GR**، پلاسموتوسیت=**PL**، اونوسیتوئید=**OE**، اسفرولوسیت=**SP** و ورمی‌سیت به عنوان نوعی پلاسموتوسیت= **VE**)

Figure 1. Hemocyte types from *Spodoptera litura* larvae by Giemsa for light microscopic observations 40x. PR=Prohemocyte, PL=Plasmotocyte, GR=Granulocyte, OE=Oenocytoid, SP=Spherulocyte, VE=Vermicyte

جدول ۱- اندازه‌های مرفومتریک انواع سلول‌های خونی ***Spodoptera litura***

Table 1. Morphometric size of haemocytes of fourth instar larvae of *Spodoptera litura* (n=30)

Hemocytes	Size (µm)	
	Length (mean±se)	Width (mean±se)
Prohemocytes	3.5±1.2	3.2±1.3
Plasmotocytes	15.4±8.2	10±2
Vermicyte	41.4±22.2	5.4±2.2
Granulocytes	5.7±2.3	5.5±2.5
Oenocytoids	5.7±1.3	4.6±1.1
Spherulocyte	4.4±3.2	2±2.8

جدول ۲- فراوانی سلول‌های خونی در همولنف لاروهای سن پنج ***Spodoptera litura*** با تغذیه از برگ توت جنگلی

Table 2. percentage of haemocytes in fifth instar larvae of *Spodoptera litura* (n=30) by feeding on forest berry leaf.

Developmental stage	Frequency of hemocyte (%)				
	Prohemocytes	Plasmotocytes	Granulocytes	Oenocytoids	Spherulocyte
Fifth instar larvae	10.5±4.7	38±3.2	41±1.5	8.4±0.5	0.5±0.05

منابع مورد استفاده

-Ahmad, M., Ghaffar, A. and Rafiq, M. 2013. Host plants of leaf worm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. Asian Journal of Agriculturs and Biology. 1(1), 23-28.

-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 Persian with English summary).

-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.

-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.

-Gao, Y., Lou, M., Wang, X., He, X., Lu, W. and Zheng, X. 2022. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* PfBb and Immune Responses of a Non-Target Host, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Insects. 13, 1-21.

-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.

-Irfan, M., Sabri, M., Abdullah, A., Hussain, M. and Ahmdani, M. 2019. Quantitative changes of heamocytes in *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in response to different insecticides. Journal of Entomology and Zoology Studies. 7(3), 533-537.

-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).

-Nardi, J. B., Pilas, B., Ujhelyi, E., Garsha, K. and Kanost, M. R. 2003. Hematopoietic organs of Manduca sexta and hemocyte lineages. Development, Genes and Evolution 213: 477-491.

-Vengateswari, G., Arunthirumeri, M., & Shivakumar, M. S. 2020. Effect of food plants on *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae immune and antioxidant properties in response to *Bacillus thuringiensis* infection. Toxicology Reports. 7: 1428-1437.

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

Morphology of hemocytes in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), forest berry pest

M. Ajamhassani*

*- Corresponding Author, Assistant Prof., Department of Plant Protection, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran. E-mail: shahroodm@gmail.com

Received: 30.06.2023 Accepted: 15.08.2023

Abstract

The role of hemolymph factors, especially hemocytes, in combating foreign invaders introduced into the hemolymph, is crucial, and identifying these cells and their diversity is the first step in insect immune studies. Therefore, the present study aims to investigate the morphology of hemocytes in the larvae of *Spodoptera litura*. Fifth instar larvae were used in the experiments. The larvae were reared under the conditions of a temperature of 25± 1 °C, relative humidity of 50%, and a photoperiod of 14: 10 (light: dark). Based on observations using a light microscope at 40× magnification, five types of hemocytes, including prohemocytes, plasmatocytes, granulocytes, oenocytoids, and esferocytes, were found in the hemolymph of the insect larvae. Prohemocytes were rounded with a large central nucleus, and their abundance in the hemolymph of fifth instar larvae was approximately 10%. Plasmatocytes were commonly observed in a binucleated form with distinct elongated and pointed protrusions, as well as in a worm-like shape. These were the largest hemocytes in terms of longitudinal size. They had a centrally positioned distinct nucleus and granular cytoplasm. The abundance of plasmatocytes was approximately 38%. Granulocytes were round and larger than prohemocytes, characterized by numerous granules in their cytoplasm. They exhibited the highest abundance among hemocytes. Oenocytoids had a circular shape and a lateral nucleus, with an abundance of approximately 8%. Esferocytes had a vacuolated cytoplasm and thin cell walls. They had the lowest abundance among hemocytes in the fifth instar *S. litura* larvae, accounting for less than 1%.

Key words: hemocyte, light microscopy, *Spodoptera litura*.