مقاله کوتاه علمی

بررسی شکل‌شناسی و فراوانی سلول‌های خونی شیخک *Blepharopsis mendica* (Mantodea: Empusidae)

مریم عجم‌حسنی، بیژن آهنگی‌رشتی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران

مسئول مکاتبات: مریم عجم‌حسنی، ایمیل: shahroodm@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۱۷ ۸(۱) ۱۵۹-۱۶۴ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۰۳

چکیده

شناسایی سلول‌های خونی، جزء مطالعات پایه‌ای فیزیولوژی سیستم گردش خون محسوب می‌شود. سلول‌های خونی به‌عنوان اولین سد دفاعی در ایمنی سلولی حشرات به شکل بیگانه‌خواری و گره‌زایی در بلوکه کردن عامل بیگانه مشارکت می‌کنند. در پژوهش حاضر، هموسیت‌های شیخک بالغ *Blepharopsis mendica* پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ برابر شناسایی شدند. در همولنف این حشره شکارگر، پنج نوع هموسیت شامل پروهموسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها مشاهده شدند. فراوان‌ترین سلول‌های خونی در پوره و بالغین این شیخک، اسفرولوسیت‌ها و سپس پلاسموتوسیت‌ها بودند. کمترین فراوانی متعلق به پروهموسیت‌ها بود. اونوسیتوئیدها بزرگترین سلول‌ها به لحاظ اندازه مشاهده شدند. اونوسیتوئیدها دارای یک هسته درشت که تقریباً به کناره غشای سلول کشیده شده است بوده و سطح سیتوپلاسم این سلول‌ها دانه‌دار بود. پروهموسیت‌ها با هسته مشخص مرکزی کوچک‌ترین سلول‌ها هستند. پلاسموتوسیت‌ها به شکل دوکی مشاهده شدند و پروفایل چندشکلی رایج در همولنف اکثر حشرات در این حشره مشاهده نشد. گرانولوسیت‌ها در اندازه‌های کوچک تا متوسط ولی بزرگ‌تر از پروهموسیت‌ها با دانه‌های گرانول مانند متراکم بودند. اسفرولوسیت‌ها در اندازه‌های متوسط تا درشت بوده، هسته مرکزی دارند و حفره‌های اسفرول متعدد، سیتوپلاسم این سلول‌ها را اشغال نموده است. وزن بدن و حجم خون بالغین بیشتر از پوره‌های سن پنج این شیخک بود. این مورد، جمعیت بالاتر هموسیت‌ها را در بالغین توجیه می کند. شناسایی هموسیت‌های شیخک‌ها به عنوان گروه بزرگ شکارگر آفات، کمتر مورد توجه محققین قرار گرفته است و پژوهش حاضر می‌تواند مقدمه‌ای برای مطالعات ایمنی‌شناسی آن‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: شیخک، همولنف، سلول‌های خونی، ریخت‌شناسی

مقدمه

راستهٔ شیخک‌ها با بیش از ۲۶۰۰ گونه، در زیست بوم‌های مختلف جنگل، بیابان، مزارع، باغ‌ها و گلخانه‌ها فعال بوده و دارای پراکنش جهانی هستند. شیخک‌ها به‌عنوان گروه بزرگ حشرات شکارگر، نقش موثری در مهار جمعیت سایر حشرات دارند (Patel *et al.*, 2016; Otte *et al.*, 2020). پوره‌ها و بالغین از شته‌ها، مگس‌ها، پشه‌ها، کنه‌ها، ملخ‌های شاخک کوتاه، شب‌پره‌ها و لارو بال‌پولک‌داران تغذیه می‌کنند (Bolu & Ozaslan, 2015). به‌علاوه در بعضی گونه‌ها خاصیت همخواری وجود دارد به طوریکه، ماده‌ها پس از جفتگیری با نرها، آن‌ها را مورد تغذیه قرار می‌دهند (Anonymous, 2014b).

حشرات به‌طور پیوسته در مواجهه با خطرات ناشی از تنش‌های محیطی، کمبود غذا، حمله دشمنان طبیعی و سموم هستند. تغییرات ریختی، رفتاری و زیستی حشرات در دوره زندگی آن‌ها، ساز و کار دفاعی آن‌ها را در برابر عوامل فوق نشان می‌دهد. با این حال، گاه عوامل بیگانه از جلد حشرات عبور کرده و به همولنف راه می‌یابند. سیستم گردش خون به عنوان آخرین مانع در برابر ورود عوامل بیگانه به هموسل، با مشارکت سلول‌های خونی و پپتیدهای ضد میکروبی، دفاع

فیزیولوژیک حشره را تضمین می‌کند. ثابت‌شده که اولین اقدام سامانه ایمنی در مقابل آلودگی‌ها، شناسایی عامل بیگانه و سپس فعالیت‌های بیگانه‌خواری و گره‌زایی است (Lavin & Str&, 2002, Correia, 2008). سلول‌های خونی به‌عنوان اجزای اصلی واکنش ایمنی در حشرات، نقش کلیدی را در ملانیزاسیون، بلوکه‌کردن و انهدام اسپور قارچ‌ها، باکتری‌ها و ذرات سموم دارند. شکل، تعداد و حتی نوع هموسیت‌ها در فرایندهای ایمنی، دچار تغییرشده و گاه هسته، سیتوپلاسم و غشای سلول‌های درگیر مضمحل شده و سلول از بین می‌رود. همراه با سنتز سلولهای خونی، سلول‌های مرده و فرسوده به سرعت با سلول‌های جدید جایگزین می‌شوند تا انتقال مواد غذایی، هورمون‌ها و فعالیت‌های ایمنی به‌طور دائم انجام شود (Li *et al.*, 2019) .

اولین مرحله در مطالعات فیزیولوژی همولنف حشرات، شناخت سلول‌های خونی است. تاکنون گزارشی مستند از ریخت‌شناسی و تراکم سلول‌های خونی شیخک‌ها ثبت نشده است. با توجه به اینکه شیخک‌ها گروه سودمندی از حشرات در زیست بوم‌های طبیعی و کشاورزی می‌باشند، به نظر می‌رسد در کنار مطالعات زیست‌شناسی و بوم‌شناختی، بررسی‌های فیزیولوژی مانند ایمنی‌شناسی در اتخاذ روش‌های بهتر پرورش آن‌ها ضروری است. چنانچه ظرفیت ایمنی شیخک‌ها به‌دلیل عملکرد موفق سلول‌های خونی در تقابل با سموم و قارچ‌ها بالا باشد، می‌توان امیدوار بود که پرورش و رهاسازی آن‌ها در کنترل حشرات آفت با موفقیت بیشتری همراه خواهد بود. بنابراین در این پژوهش، شناسایی و فراوانی سلول‌های خونی شیخک *Blepharopsis mendica* (Fabricius) مطالعه شد. این گونه یکی از گونه‌های رایج شیخک‌ها در دنیا و ایران می‌باشد (Rabeie *et al*, 2016) و در استان سمنان (منطقه مورد آزمایش) از فراوانی نسبتاً بالایی برخوردار است (نتایج منتشر نشده است).

مواد و روش‌ها

در تابستان ۱۳۹۹، شیخک‌های *B. mendica* و کیسه‌های تخم آن‌ها از باغ‌های پسته شهرستان سمنان جمع‌آوری و به اتاقک رشد منتقل شدند. شرایط اتاقک رشد (دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰ درصد، دورهٔ روشنایی به تاریکی ۱۴:۱۰ ساعت) در نظر گرفته شد. برای تغذیهٔ بالغین و نوزادان از شته‌های برگ پسته (Mordvilko) *Forda hirsuta* استفاده شد. شیخک‌های بالغ و شیخک‌های آخرین سن پورگی جداسازی شده و برای آزمایش استفاده شدند. شناسایی سلول‌های خونی پس از رنگ آمیزی با گیمسا و با استفاده از کلیدهای معتبر (Giglio *et al.*, 2008) انجام شد. برای شمارش تفرقی سلول‌های خونی در حجم مشخصی از همولنف، ۱۰۰ عدد سلول به‌طور تصادفی انتخاب شد و درصد فراوانی هر یک از انواع سلول‌ها تعیین شد. شمارش تفرقی سلول‌های خونی در ده عدد پوره سن پنج و ده عدد بالغ به طور جداگانه انجام شد. هم‌چنین وزن ده عدد از پوره‌های سن آخر و بالغین شیخک‌ها با ترازوی حساس تعیین و حجم همولنف آن‌ها با استخراج تمام همولنف به‌وسیله سرنگ Hamilton مشخص شد. برای شمارش کل سلول‌های خونی، همولنف حشرات با استفاده از میکروپیپت جمع‌آوری و با بافر فیزیولوژیک ضد انعقاد خون (Tyson) به نسبت ۳:۱۰ میکرولیتر (حجم همولنف: ۳ و حجم تایسون: ۱۰ میکرولیتر) رقیق شد. شمارش سلول‌های خونی با استفاده از لام نئوبار و بزرگنمایی ۴۰ برابر میکروسکوپ (BH2) الیمپوس (Olympus) انجام شد. شمارش سلول‌ها با استفاده از فرمول جونز و در میلیمتر مکعب همولنف با در نظر گرفتن ضریب رقت انجام شد (Jones, 1967).

عمق خانه‌های لام نئوبار× میزان رقت× ۱ میلیمتر مربع × تعداد سلول‌های خونی

تعداد خانه‌های شمارش‌شده از لام

نتایج و بحث

در همولنف شیخک *B. mendica* پنج نوع هموسیت مشاهده شد که شامل پروهموسیت‌ها، پلاسموتوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت‌ها بودند (شکل ۱). این سلول‌ها در همولنف اکثر حشرات وجود دارند مانند: کرم ابریشم *Bombyx mori* L. (Baishya *et al.*, 2015)، کرم آلو *Grapholita funebrana*

(Treitschke) (Mahmoodzadeh *et al.*, 2020)، شب پره هندی *Plodia interpunctella* Hubner (Ebrahimi & Ajamhassani, 2020)، سوسک کرگدنی خرما *Oryctes elegans* (Mutawa *et al.*, 2020) پروهموسیت‌ها کوچکترین سلول‌ها (جدول ۲) و کاملاً مدور مشاهده شدند. هسته درشت مرکزی تقریباً تمام حجم سلول را پر کرده است. فراوانی پروهموسیت‌ها در پوره‌ها و بالغین شیخک حدود ۷ درصد و کمترین فراوانی را بین سلول‌های خونی به خود اختصاص دادند (جدول ۱). پلاسموتوسیت‌ها در اندازه‌های کوچک تا متوسط بوده و در تمام موارد تنها به‌شکل دوکی با دو زائده سیتوپلاسمی کوچک بودند. فراوانی این سلول‌ها بعد از اسفرولوسیت‌ها و حدود ۲۸ درصد بود. در حالی‌که این سلول‌ها در همولنف اغلب حشرات چندشکلی داشته و به اشکال مختلف دوکی، ستاره‌ای، سیلندری، کرمی شکل با یک یا دو زائده کوتاه یا بلند دیده می‌شوند. سطح سیتوپلاسم پلاسموتوسیت‌ها صاف یا دانه‌دار است (Ajamhassani & Mahmoodzadeh, 2020). گرانولوسیت‌ها مدور و تخم‌مرغی شکل با اندازه‌های متوسط و سطح سیتوپلاسم پر از دانه‌های گرانول بود. این گرانول‌ها در بیگانه‌خواری عامل خارجی نقش داشته و تعداد آن‌ها معرف توان سلول در فرایند بیگانه‌خواری است. تعداد گرانولوسیت‌ها در شیخک‌های بالغ بیشتر از پوره‌ها و حدود ۱۸ درصد بود (جدول ۱). گرانولوسیت‌ها به‌عنوان مهمترین سلول‌های موثر در واکنش‌های ایمنی معمولا در سنین بالای لاروی بال‌پولک‌داران به‌همراه پلاسموتوسیت‌ها بیشترین فراوانی را (بیش از ۷۵ درصد نشان داده‌اند ولی در پژوهش حاضر بعد از اسفرولوسیت‌ها قرار گرفتند. اونوسیتوئیدها درشت‌ترین سلول‌های خونی شیخک به لحاظ سایز بودند (جدول ۲). هسته درشت کناری با رنگ‌آمیزی گیمسا به رنگ بنفش مشاهده شد (شکل ۱). سیتوپلاسم با دانه‌های گرانول پراکنده و کم‌رنگ‌تر از هسته مشاهده شد. فراوانی این سلول‌ها نیز مانند پروهموسیت‌ها پایین و حدود ۹–۸ درصد بود. اسفرولوسیت‌ها در تمام اندازه‌های کوچک تا بزرگ در همولنف شیخک مشاهده شدند. هسته تقریباً مرکزی و سیتوپلاسم پر از اسفرول بود. اسفرول‌ها به اشکال نامنظم تمام سطح سیتوپلاسم سلول‌ها را اشغال کرده‌اند. فراوانی اسفرولوسیت‌ها در شیخک‌های بالغ و پوره بسیار بالاتر از سایر سلول‌ها و حدود ۳۵ درصد بود (جدول ۱). اسفرولوسیت‌ها در همولنف گروه‌های مختلف حشرات معمولاً فراوانی پایینی دارند (Ghasemi *et al.*, 2013; Pourali & Ajamhassani, 2018).

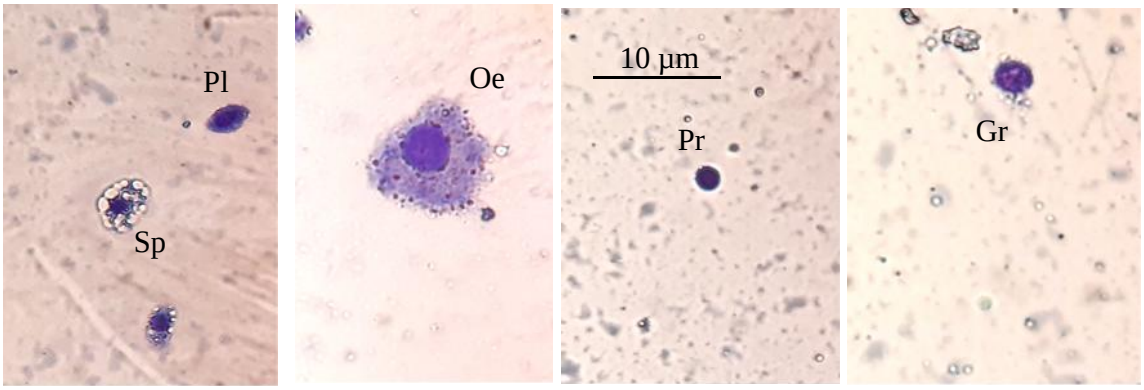
هر اندازه جثه لارو بال‌پولک‌داران افزایش یابد، به تدریج بر حجم همولنف و تعداد سلول‌های خونی آن‌ها افزوده می شود. در واقع، نیاز غذایی لاروهای سنین بالا و افزایش غلظت ترکیبات پروتئینی ضد میکروبی می‌تواند در تغییرات فراوانی هموسیت‌ها دخیل باشد (Gupta, 1985). اندازه بدن شیخک‌های بالغ از پوره های آن‌ها بیشتر است، بنابراین دارای میزان تغذیهٔ بیشتر و طبعاً حجم خون بیشتری بوده و لذا فراوانی سلول‌های خونی در گردش خون آن‌ها نسبت به پوره‌ها افزایش قابل توجهی پیدا می‌کند (جدول ۳).

شناخت ویژگی‌های سلول‌های خونی شیخک *B. mendica* به‌عنوان یکی از شکارگرهای عمومی حشرات آفت، می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات گسترده آینده برای شناخت جنبه‌های مختلف ایمنی این حشره باشد. آیا توان ایمنی شیخک‌ها در مقابل انواع آلودگی‌های ناشی از سموم، قارچ‌های بیمارگر و متابولیت‌های آن‌ها مناسب است؟ نوع رژیم غذایی و طعمه‌های مختلف به‌عنوان میزبان، چه تاثیری بر پاسخ‌های ایمنی این حشره می‌تواند داشته باشد؟ آیا تنش‌های گرسنگی و یا هم‌خواری بر واکنش‌های ایمنی شیخک تاثیر می‌گذارد؟ به نظر می‌رسد پژوهش‌های تکمیلی در راستای ایمنی‌شناسی شیخک‌ها و پاسخ به این سوالات می‌تواند امکان استفاده کارآمدتر از این حشرات مفید را در کنترل طبیعی آفات فراهم سازد.

جدول ۱– میانگین درصد انواع سلول‌های خونی شیخک *Blepharopsis mendica* (تعداد برای هر آزمایش ۱۰ عدد)

Table 1. Percentage mean of hemocyte types in *Blepharopsis mendica* (n=10)

Growth stages	Prohemocytes	Plasmotocytes	Granulocytes	Oenocytoids	Spherulocytes
Adult	7.5±0.8	28.4±3.3	18±2.2	8±1.1	35.1±4.3
Nymph	7.2±0.45	27.5±2.5	14.5±1.3	8±2.4	33.6±4.1



شکل ۱– انواع سلولهای خونی شیخک *Blepharopsis mendica* رنگ آمیزی‌شده با گیمسا برای مشاهده با میکروسکوپ نوری

Pl= پلاسموتوسیت، Gr= گرانولوسیت، Pr=پروهموسیت، Oe=اونوسیتوئید، Sp= اسفرولوسیت

Figure 1. Hemocyte types from *B. mendica* by Giemsa for light microscopic observations. Pr=Prohemocyte, Pl=Plasmotocyte, Gr=Granulocyte, Oe=Oenocytoid, Sp=Spherulocyte.

جدول ۲– اندازه‌های سلول‌های خونی شیخک *Blepharopsis mendica* (تعداد ۱۰ عدد پوره و ۱۰ عدد بالغ)

Table 2. Morphometric measurements of hemocytes of *Blepharopsis mendica* (n=10 nymph & n=10 adult)

Hemocyte type	Size (µm)	
	Length (Mean±Se)	Width (Mean±Se)
Prohemocyte	2.8±0.2	2.6±0.4
Plasmotocyte	3.7±1	2.8±0.3
Granulocyte	4.5±1.3	4±1.1
Oenocytiod	9.2±1.8	8.8±2.2
Spherulocyte	5.5±2.5	3.5±1.2

جدول ۳– وزن بدن، حجم همولنف و تعداد کل هموسیت‌های پوره سن پنج و بالغ شیخک *Blepharopsis mendica*

Table 3. Body weight, hemolymph volum & total number of hemocyte of nymphal & adult stages in *Blepharopsis mendica*

Growth stages	Body weight (g)	Blood volume (µL)	THC (cell×mm^{3}hemolymph)
Adult	1.4±0.2	5.2±0.5	106±10.6
Nymph	0.3±0.05	2.8±0.2	48.7±5.7

References

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 Persian with English summary).

Anonymous, (2014b): http://eol.org/pages/487055/overview (Last update, 09.12.2014).

Baishya, B.P., Bardoloi, S. & Bharali, R. 2015. Ultrastructure of the hemocytes of Muga Silkworm larva *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera; Saturniidae): a phase–contrast & electron microscopic study. International Journal Pureand Applied Biosceencei, 3(3): 234–240.

Bolu, H. & Ozaslan, C. 2015. *Mantis religiosa* L. (Mantodae: Mantida). A new host for Podagrion ppachimerum Walker (Hymenoptera: Torymidae) in Turkey. Agriculture & Forestry, 61(2): 183–187.

Correia, A.A. 2008. Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Dissertation, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

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.

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.

Giglio, A., Battistella, S., Talarico, F.F., Br&mayr, T.Z. & Giulianini, P.G. 2008. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus* (*Chaetocarabus*) *lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera: Carabidae), Cell types & their role in phagocytosis after in vivo artificial non–self–challenge. Micron, 39(5): 552–558.

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.

Jones, J.C. 1967. Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* (Linnaeus). The Biological Bulletin, 132(2): 211–221.

Lavine, M.D. & Strand M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32: 1295–1309.

Li T, Yan D, Wang X. Zhang L. & Chen P. 2019. Hemocyte changes during immune melanization in *Bombyx mori* infected with *Escherichia coli.* Insects, 10(301): 1–15.

Mahmoodzadeh, M., Hakimi tabar, M. & Ajamhassani, M. 2020. Identification of hemocytes and study on hemogram of plum fruit moth *Grapholita funebrana* (Treitschke) (Lep: Tortricidae). Accepted in Pest Plant Research. (In Persian with English summary).

Mutawa, MY, Ayaad, TH. & SHaurub, EH. 2020. Hemocyte profile, phagocytosis, and antibacterial activity in response to immune challenge of the date fruit stalk borer, *Oryctes elegans.* Invertebrate Survival Journal, 17: 147–162.

Otte, D.L., Spearman, L. & Stiewe, M.B.D. Mantodea Species file online. 2020. Available online: http://Mantodea.SpeciesFile.org (accessed on 7 January 2020).

Patel, SH., Singh, G. & Singh, R. 2016. Checklist of Global Distribution of Tarachodidae and Toxoderidae (Mantodea: Dictyoptera). International Journal of Contemporary Research and Review, 7(12): 20256–20270.

Pourali, Z. & Ajamhassani, 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. Supplementary, 37(4): 515–525.

Rabeeie, M.M., Rohani, A, Batiston, R. 2016. Investigation of founestic of Mantodea in south Khorasan province. 22 Iranian Plant Protection Congress. University of Tehran. 459.

Study on morphology and frequency of hemocytes of *Blepharopsis mendica* (Mantodea: Empusidae)

Maryam Ajamhassani, Bijan Ahangi Rashti

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Iran
Corresponding author: Maryam Ajamhassani, email: shahroodm@gmail.com

Received: Sept., 07, 2020 8(1) 159-164 Accepted: Dec., 23, 2020

Abstract

Identification of hemocytes is one of the basic studies of circulatory system physiology. Blood cells, as the first defense barrier to insect cellular immunity, participate in blocking the foreign particles in the form of phagocytosis and nodules. In the present study, homocytes of adults of *Blepharopsis mendica* were identified after staining with Gimsa and using a light microscope with a magnification of 40. In the hemolymph of this predatory insect, five types of homocytes were observed, including prohemocytes, granulocytes, plasmotocytes, oenocytoids, and spherulocytes. The most abundant blood cells in the nymphs and adults of this mantis were spherulocytes and plasmotocytes, respectively. The lowest abundance of cells belonged to prohemocytes. Oenocytoids were the largest cells. Oenocytoids had a large nucleus that extended almost to the side of the cell membrane and the cytoplasmic surface of these cells was granular. Prohemocytes were the smallest cells and observed with the distinct central nucleus. Plasmotocytes were observed as spindles, and the common polymorphic profile of most insects hemolymph was not observed in hemolymph of *B. mendica*. Granulocytes size were small to medium but were larger than prohemocytes with granule–like granules in cytoplasmic surface. Spherulocytes are medium to large, have a central nucleus, and numerous spherul occupy the cytoplasm of these cells. Adult body weight and blood volume were higher than the nymphs of this mantis. So, it is clear that there are higher populations of hemocytes in adults in comparison nymphs. The identification of mantis homocytes as a large group of pest predators is being investigated for the first time and can be used in the study of its immune features.

Keywords: blood cells, hemolymph, mantis, morphology