

بررسی یاخته شناسی سلول های خونی کرم شاخدار فریون *Hyles euphorbiae* L. (Lepidoptera: Sphingidae)

مریم عجم حسنی

نویسنده مسوول: استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهرود (shahroodm@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۲/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۱۵

چکیده

سلول های خونی شاخص مهم ایمنی حشرات در برابر بیمارگرها و پارازیتوئیدها می باشند. با شناخت دقیق سلول های خونی و واکنش آنها در برابر عوامل بیگانه ای که به همولنف وارد می شوند، بهتر می توان جنبه های دفاع سلولی حشره را بررسی کرد. در این تحقیق، سلول های خونی مراحل مختلف لاروی، شفیره و بالغ شب پره *Hyles euphorbiae* L. با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. پنج نوع هموسیت در لاروها، شفیره و بالغ این حشره شناسایی شد که شامل پروهموسیت ها، گرانولوسیت ها، پلاسموتوسیت ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت ها بودند. همه انواع سلول های خونی در مراحل مختلف رشدی این حشره مشاهده شد ولی پراکندگی آنها در مراحل مختلف، متفاوت بود. شمارش کل سلول های خونی نشان داد که با افزایش سن لاروی، به تدریج بر تعداد سلول های خونی افزوده شد و در مراحل شفیرگی و بلوغ کاهش یافت. شمارش تفرقی سلول های خونی نشان داد که پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها در لاروهای سنین چهارم و پنجم بیشترین فراوانی را نسبت به سایر مراحل رشدی داشتند. تقسیم میتوزی گرانولوسیت ها در سنین اولیه لاروی مشاهده شد. شناخت سلول های خونی این حشره برای اولین بار انجام شده است و می تواند زمینه مطالعه ایمنی این حشره را در برابر پارازیتوئیدهای آن فراهم کند.

کلید واژه ها: سلول های خونی، شناسایی، *Hyles euphorbiae*

مقدمه

(۲۰۰۱). گونه های مختلف فریون در بسیاری از مراتع و مزارع ایران از جمله نواحی مرتعی استان آذربایجان غربی پراکنده است (کریم پور و همکاران، ۱۳۸۵). مشخص شده که این گیاهان توسط تعداد زیادی از حشرات به ویژه شب پره های برگ خوار مورد تغذیه قرار می گیرد (نیکدل و همکاران، ۱۳۹۰). یکی از این برگ خوارها، کرم شاخدار فریون^۱ با نام علمی *Hyles euphorbiae* L. می باشد. این حشره مونوفاژ، به عنوان یکی از گزینه های مناسب در کنترل زیستی انواع فریون ها شناسایی شده و از سال ۱۹۶۰ به همراه ۱۲ گونه دیگر به طور انبوه جهت کنترل بیولوژیک این گیاه

چرای بی رویه دام ها و کاهش تراکم گیاهان خوش خوراک مرتعی، به تدریج امکان گسترش گونه های مضر و علف های هرزی مانند فریون را فراهم کرده است. اغلب گیاهان جنس *Euphorbiae* (فریون) دارای شیرابه های سمی بوده و علاوه بر آلودگی مراتع، سبب مسمومیت های گوارشی در حیوانات و انسان می شوند (هین و میلر^۱، ۱۹۹۲؛ کرونبرگ^۲، ۲۰۰۷). به علاوه این گیاهان سبب محدود شدن زیستگاه های حیات وحش و کاهش تولید علوفه شده و خسارات زیادی به صنعت دامپروری وارد می کنند (ریچارد و همکاران^۳،

1- Hein & Miller

2- Kronberg

3- Richard *et al.*

4- spurge hawk moth

همکاران^۷، ۱۹۸۹). در اغلب حشرات، هموسیت های در گردش به آسانی توسط میکروسکوپ نوری و فلورسنت قابل شناسایی می باشند (لاوین و استرن^۸، ۲۰۰۲؛ لینگ و یو^۹، ۲۰۰۶). سلول های خونی حشرات که در منابع گزارش شده اند شامل پروهموسیت ها^{۱۰} به عنوان سلول های پایه، پلاسموتوسیت ها^{۱۱}، گرانولوسیت ها^{۱۲}، اسفرولوسیت ها^{۱۳} و اونوسیتوئیدها^{۱۴} هستند (گوپتا، ۱۹۹۱). تحقیقات نشان داده است که ورود عوامل بیماریزای حشرات مانند اسپور قارچ های بیماریزا و یا نماتدها و تخم پارازیتوئیدها به داخل همولف بر شکل و تعداد سلول های خونی تاثیر دارد. این تغییرات ریختی سلول های خونی و همچنین تغییر در تعداد آنها در فواصل مختلف پس از ورود، در راستای ایمنی سلولی یعنی بیگانه خواری و گره زایی صورت می گیرد (ناهلا و همکاران^{۱۵}، ۲۰۱۰). همچنین ریخت شناسی و فراوانی سلول ها در مراحل رشدی یک گونه نیز تفاوت هایی نشان می دهد که به عوامل مختلفی مانند سن، جنسیت، گرسنگی، پوست اندازی، دما و استرس های محیطی وابسته است (سانجایان و همکاران^{۱۶}، ۱۹۹۶؛ شارما و همکاران^{۱۷}، ۲۰۰۸؛ پندی و همکاران^{۱۸}، ۲۰۱۰). کرم شاخدار فرفیون یکی از عوامل کنترل بیولوژیک موثر علیه گونه های سمی فرفیون می باشد، لذا حفاظت از این دشمن طبیعی در برابر شکارگرها و پارازیتوئیدها در مراتع و مزارع کشورمان حائز اهمیت می باشد. با شناخت ویژگی های سلول های خونی و تغییرات جمعیت آنها در طول زندگی حشره، بهتر می توان جنبه های ایمنی آن را

سمی در امریکا و کانادا رهاسازی می شود (فورناساری^۱، ۱۹۹۶؛ پمبرتون و همکاران^۲، ۱۹۸۹). لاروهای درشت پروانه *H. euphorbiae* بسیار پرخوار هستند و در سنین بالا، تمام ساقه، برگ و جوانه های گل گونه های فرفیون را مورد تغذیه قرار می دهند (کریم پور و همکاران، ۱۳۸۴). نوپرسیکی و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که لاروهای جنس *Hyles* به دلیل تغذیه از فرفیون دارای ترکیبات تری ترپنوئید در جلد و همولف خود هستند که وجود این ترکیبات، نوعی دفاع شیمیایی برای حشره محسوب می شود به طوری که مانع شکار لاروها توسط شکارگرها می شوند، در حالی که شفیره های *Hyles* مورد حمله شکارگرها قرار می گیرند (نوپرسیکی و همکاران^۳، ۲۰۰۲). تا کنون تعدادی مگس پارازیتوئید شفیره از خانواده Tachinidae برای این حشره گزارش شده است (کریم پور و همکاران، ۱۳۸۴) که به طور عمده به عنوان انگل پروانه های خانواده Sphingidae گزارش شده اند (تسچورسینگ و هرتینگ^۴، ۲۰۰۱؛ کارا و تسچورسینگ^۵، ۲۰۰۳). ولی گزارشی از پارازیتسم لاروهای *Hyles* ارائه نشده است که شاید این موضوع به وجود ترکیبات شیمیایی کوتیکول جلد و همولف لاروها مرتبط باشد. جهت نیل به نتایج دقیق تر، علاوه بر دفاع شیمیایی، بررسی سیستم دفاع فیزیولوژیک حشره در مراحل زیستی مختلف قابل توجه می باشد. در واقع، شناخت سلولهای خونی و ارزیابی وضعیت ایمنی سلولی لاروها و شفیره های *Hyles* می تواند تا حدود زیادی روشن کننده مقاومت یا حساسیت هر مرحله زیستی به عوامل بیگانه مانند تخم پارازیتوئیدها باشد. براساس ویژگی های ریخت شناسی، عملکرد و شیمی بافت، چندین نوع سلول خونی در حشرات شناسایی شده اند (گوپتا^۶، ۱۹۸۵؛ برهلین و

7- Brehelin *et al.*
8- Lavine & Strand
9- Ling & Yu
10- Prohemocyte
11- Plasmotocyte
12- Granulocyte
13- Spherulocyte
14- Oenocytoid
15- Nahla *et al.*
16- Sanjayan *et al.*
17- Sharma *et al.*
18- Pandey *et al.*

1- Fornasari
2- Pemberton *et al.*
3- Nowierski *et al.*
4- Tschorsnig & Herting
5- Kara & Tschorsnig
6- Gupta

از خشک شدن، مقداری ماده رنگ آمیزی گیمسا^۴ (محلول ۹:۱ گیمسا و آب مقطر) روی اسمیر گذاشته شد، پس از گذشت ۲۰ دقیقه، لام در آب مقطر قرار گرفت تا محلول رنگی شسته شود. سپس لام به مدت ۱۰ ثانیه در کربنات لیتیم اشباع شده قرار داده شد. (این امر به منظور تثبیت رنگ سلول‌ها انجام گرفت). لام در آب مقطر شستشو داده شد و در آون ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت تا خشک شود. با استفاده از کانادا بالزام (رقیق شده با گزیلول) لام دائمی تهیه شد. انواع سلول‌های خونی با توجه به منابع موجود شناسایی شد (بیگر^۵، ۱۹۴۵). جهت مشاهده و شناسایی سلول‌های خونی از بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری Olympus BH2 استفاده شد. قطر سلول‌ها بر اساس میکرومتر محاسبه شد. برای شمارش کل سلول‌های خونی، همولنف ۱۵ لارو، ۱۵ سفیره و ۱۵ حشره بالغ با استفاده از میکروپی‌پت جمع‌آوری و با بافر فیزیولوژیک رقیق شد. مقدار ۴ میکرولیتر از همولنف با ۲۰۰ میکرولیتر ماده ضد انعقاد رقیق شد. ماده ضد انعقاد به کار رفته در آزمایش محلول تایسون^۶، (NaCl 72 Mm, Na₂SO₄ 9 Mm, Glycerol 43Mm, Methyl violet 0.06 Mm, Distilled water) بود (محمود و یوسف، ۱۹۸۵)^۷. شمارش سلول‌های خونی با استفاده از لام نئوبار و بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری انجام گرفت. شمارش کل با محاسبه میانگین تعداد سلول‌های خونی موجود در ۵ خانه از لام نئوبار (هر کدام به ابعاد ۱ میلی متر مربع) انجام شد. تعداد سلول‌های خونی آزاد در گردش برای هر مرحله رشدی با استفاده از فرمول $THC \times HV$ (تعداد کل سلول‌های خونی \times حجم خون) محاسبه شد.

شمارش سلول‌ها با استفاده از فرمول جونز^۸ (۱۹۶۷) و در میلی‌متر مکعب همولنف انجام شد:

در برابر عوامل خارجی مطالعه کرد. به علاوه، این مطالعات می‌تواند در جهت تعیین حساسیت و یا مقاومت *H. euphorbiae* به انواع علف کش‌های فریون و مکانیسم تاثیر آنها نیز به کار گرفته شود. بنابراین هدف از تحقیق حاضر، شناسایی انواع سلول‌های خونی و بررسی فراوانی آنها در مراحل مختلف لاروی، شفیرگی و بالغ با استفاده از میکروسکوپ نوری است.

مواد و روش‌ها

پرورش حشرات

در اواخر فصل بهار، لاروهای شاخدار فریون *H. euphorbiae* از روی گونه‌های جنس فریون در مراتع استان آذربایجان غربی (نواحی اطراف رود ارس) جمع‌آوری شدند. لاروهای در حال تغذیه روی شاخه و برگ‌ها و یا در حال استراحت زیر بوته‌ها، به طور مستقیم با دست جمع‌آوری شده و با توجه به عدم امکان دسترسی به حشرات کامل در طبیعت، در آزمایشگاه (دما $26 \pm 1^\circ C$ و رطوبت نسبی ۷۰-۶۰٪ در شرایط نوری ۱۴:۱۰ ساعت روشنایی به تاریکی) اقدام به پرورش لاروها شد. ظروف پرورش شفاف به ابعاد ۸×۱۵×۲۰ سانتی متری حاوی شاخه و برگ فریون برای پرورش لاروها در نظر گرفته شد. حشرات کامل بعد از حدود ۲۰ روز خارج شده و تخم‌ریزی کردند. لاروهای سنین مختلف، سفیره‌ها و بالغین برای مطالعات سلول‌شناسی در نظر گرفته شدند.

شمارش کل^۱ (THC)، هموسیت‌های آزاد در گردش^۲ (HIC) و تفریقی^۳ (DHC) سلول‌های خونی با استفاده از میکروسکوپ نوری

به منظور شناسایی سلول‌های خونی، همولنف ۱۰ لارو (۱۰ تکرار) جمع‌آوری شد. ابتدا یک پای کاذب لارو را بریده و مقدار ۱۰ میکرولیتر از همولنف را روی یک لام گذاشته و با لام دیگر یک اسمیر تهیه شد. پس

4- Giemsa

5- Yeager

6- Toissin

7- Mahmood & Yousef

8- Jones

1- Total Hemocyte Count

2- Hemocyte In Circulation

3- Differential Hemocyte Count

مثال هموسیت های مگس سرکه *Drosophila melanogaster* L. را لاملوسیت، سلول های کریستالی و پلاسموتوسیت معرفی کرده اند (لانوت و همکاران^۳، ۲۰۰۱؛ استرند^۴، ۲۰۰۸). بورگز و همکاران^۵ در سال ۲۰۰۸، سلول های اسفرولی را در خون سن *Rhodnius prolixus* W. گزارش نکردند. در همولنف سفیده کلم *Pieris rapae* Boisduva نیز ۴ نوع سلول خونی شامل پروهموسیت، پلاسموتوسیت، گرانولوسیت و اونوسیتوئید شناسایی شد (کویان و همکاران^۶، ۲۰۱۲). در بال پولکداران، هموسیت ها را بر اساس ریخت شناسی، به پنج نوع تقسیم کرده اند: سلول های ساقه ای پروهموسیت، بیگانه خوارهای پلاسموتوسیت، سلول های گرانولی، اونوسیتوئید و اسفرولوسیت (استرند و پیچ^۷، ۱۹۹۵). در تحقیق حاضر، پنج نوع سلول خونی مذکور در همولنف کرم شاخدار فرفیون مشاهده شدند. پروهموسیت ها کوچک ترین سلول ها ($4-2.5\mu m$) با هسته مرکزی و مدور مشاهده شدند. هسته صورتی رنگ متمایل به آبی تیره (با رنگ آمیزی گیمسا) تقریباً تمام حجم سیتوپلاسم را اشغال کرده است به طوری که سیتوپلاسم به شکل لایه ای نازک به کناره غشای سلول کشیده شده است (شکل ۱). تقریباً در تمام مطالعات ریخت شناسی هموسیت ها، پروهموسیت ها چنین مشخصاتی داشته اند (جلالی و صالحی^۸، ۲۰۰۸؛ زیبایی و همکاران^۹، ۲۰۱۱؛ کویان و همکاران^{۱۰}، ۲۰۱۲؛ عجم حسنی و همکاران^{۱۱}، ۲۰۱۳؛ قاسمی و همکاران^{۱۱}، ۲۰۱۳). این سلول ها در همولنف همه راسته های حشرات به جز *Odonata* و *Thysanura* گزارش شده اند (گوپتا، ۱۹۸۵). تعداد این سلول ها در لاروهای سن اول و دوم کرم شاخدار فرفیون به طور معنی داری

عمق \times میزان رقت $\times 1mm^2$ \times تعداد هموسیت ها
خانه های لام گلبول شمار

تعداد خانه های شمارش شده از لام

میزان رقیق شدن همولنف با ماده ضد انعقاد: ۵۰ برابر، عمق خانه های لام گلبول شمار: ۱۰، تعداد خانه های شمارش شده از لام گلبول شمار: ۵

اندازه گیری حجم همولنف^۱ (HV)

حجم همولنف به طور مستقیم با گرفتن تمام همولنف از مراحل زیستی مختلف و با استفاده از میکروبی پت انجام شد (ترا و همکاران^۲، ۱۹۷۵). وزن یک قطعه کاغذ صافی به صورت خشک اندازه گیری شد و سپس با قطع یک پای شکمی از لارو، تمام همولنف آن گرفته شده و روی کاغذ صافی قرار گرفته و توزین شد. در مورد شفیرها و حشرات کامل، یک سوزن استریل به آرامی در شکم حشره وارد کرده و خون گیری انجام شد. تفاوت وزن کاغذ صافی خشک و تر ثبت شد و به عنوان حجم همولنف در نظر گرفته شد. برای هر مرحله زندگی ۱۵ حشره لحاظ شد.

تجزیه داده ها:

تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار SAS انجام شد و مقایسه میانگین ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

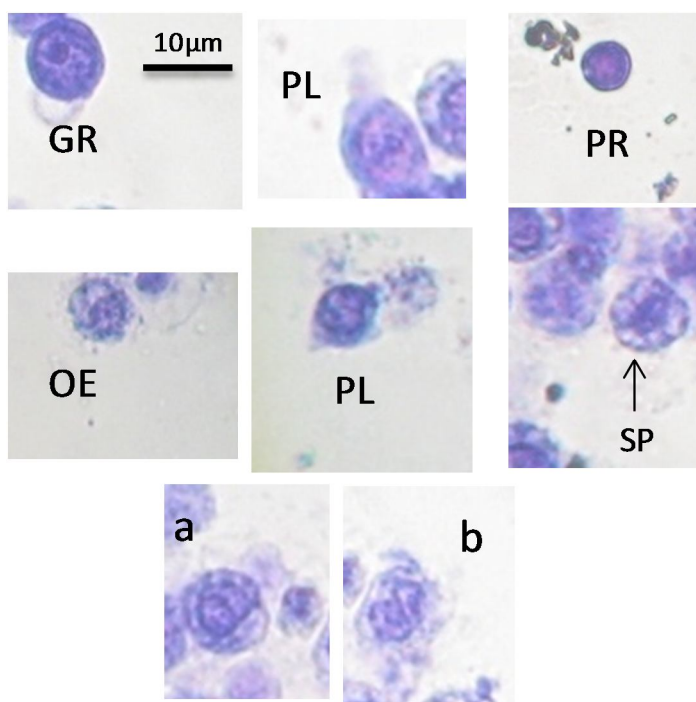
نتایج و بحث

بررسی یاخته شناسی هموسیت ها

با استفاده از میکروسکوپ نوری، سلول های خونی مراحل لاروی، شفیره و بالغ شاخدار فرفیون *H. euphorbiae* شناسایی شد. این سلول ها شامل پروهموسیت ها، پلاسموتوسیت ها، گرانولوسیت ها، اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت ها بودند. مطالعات نشان داده است که طبقه بندی سلول های خونی، در حشرات مختلف و حتی در مراحل زیستی مختلف، متفاوت بود. به عنوان

3- Lanot et al.
4- Strand
5- Borges et al.
6- Qian et al.
7- Strand & Pech
8- Jalali & Salehi
9- Zibae et al.
10- Ajamhassani et al.
11- Ghasemi et al.

1- Hemocyte Volum
2- Terra et al.



شکل ۱- سلول های خونی کرم شاخدار فرفیون *H. euphorbiae*

PR= پروهموسیت، PL= پلاسموتوسیت، GR= گرانولوسیت، OE= اونوسیتوئید، SP= اسفرولوسیت، a و b: گرانولوسیت های در حال تقسیم

آنها صاف و بدون گرانول مشاهده شد. در اغلب بال پولکی ها، پلاسموتوسیت ها فاقد گرانول هستند (ریبریو و برهلین^۳، ۲۰۰۶). این سلول ها در همولنف مراحل زیستی کرم شاخدار فرفیون (به جز لارو سن ۵ و حشره کامل) بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند ($F=60, df_i=6, df_e=63, p \leq 0.0001$) (جدول ۱). پلاسموتوسیت ها بیشترین اندازه طولی ($21 - 27 \mu m$) را در مقایسه با سایر هموسیت های *H. euphorbiae* داشتند (جدول ۲). این سلول ها بعد از اونوسیتوئیدها در همولنف *Spodoptera litura* (Fabricus) و کرم ابریشم *Bombyx mori* L بزرگترین سلول ها گزارش شدند (لینگ و همکاران، ۲۰۰۳). گرانولوسیت ها با اندازه تقریبی ۱۲-۳/۵ میکرومتر بزرگتر از پروهموسیت ها بوده و گاه از اونوسیتوئیدها و اسفرولوسیت ها نیز درشت تر بودند (شکل ۱) (جدول

بیشتر از سایر مراحل بود، $F=166, df_i=6, df_e=63, p \leq 0.0001$) (جدول ۱). پلاسموتوسیت ها در حشرات مختلف دارای اشکال متنوعی می باشند و حتی در مراحل رشدی مختلف نیز اشکال نامنظمی دارند (لیو و همکاران^۱، ۲۰۱۳). در این تحقیق، پلاسموتوسیت ها دوکی شکل با دو زایده سیتوپلاسمی کوچک دیده شدند. مشخص شده که زواید سیتوپلاسمی پلاسموتوسیت ها در چسبیدن به عامل بیگانه و تشکیل کپسول نقش عمده دارند (لینگ و همکاران^۳، ۲۰۰۳). در پلاسموتوسیت های جوانتر به طور معمول زواید سیتوپلاسمی هنوز تشکیل نشده و بنابراین تشخیص آنها از گرانولوسیت ها به نسبت سخت بود. هسته درشت و صورتی رنگ (رنگ آمیزی گیمسا) به شکل گرد یا بیضی در مرکز سلول قرار دارد (شکل ۱). سیتوپلاسم

3- Riberio & Brehelin

1- Liu et al.

2- Ling et al.

و آشیدا^۷، ۱۹۸۶؛ جیانگ و همکاران^۸، ۱۹۹۷؛ لینگ و همکاران، ۲۰۰۵). فراوانی این سلول ها نسبت به گرانولوسیت ها و پلاسموتوسیت ها کمتر بود (جدول ۱). میزان پراکندگی آنها در شفیره پروانه برگ خوار مرکبات *Papilio demoleus* L. (جلالی و صالحی، ۲۰۰۸) حدود ۸٪ و در لاروهای *Anticarsia gemmatalis* (آندرد و همکاران^۹، ۲۰۰۳) و برگ خوار سفید اشجار *Hyphantria cunea* (Drury) (عجم حسنی و همکاران، ۲۰۱۳) ۵٪ اعلام شده است. در تحقیق گاردینر و استرنند ثابت شد اونوسیتوئیدهای در گردش *S. frugiperda* نمی توانند به اونوسیتوئید یا هموسیت دیگری تقسیم شوند (گاردینر و استرنند^{۱۰}، ۲۰۰۰). با توجه به اینکه پروهموسیت ها نیز قابلیت تغییر به اونوسیتوئیدها را ندارند، بنابراین اونوسیتوئیدها در بال پولک داران فقط از اندام های هماتوپویتییک منشا می گیرند (لیو و همکاران، ۲۰۱۳). اسفرولوسیت ها سلول هایی به نسبت بزرگ (۹-۳/۶) میکرومتر (جدول ۲) و دارای یک هسته فشرده، درشت و مشخص هستند. سطح سیتوپلاسم این سلول ها دارای اسفرول های متعددی است که به اشکال نامنظم در همولنف *H. euphorbiae* دیده می شوند (شکل ۱). اسفرولوسیت ها به طور معمول در اثر تقسیم پروهموسیت ها، گرانولوسیت ها و پلاسموتوسیت ها ایجاد می شوند. این سلولها در واکنش های ایمنی فعالیتی ندارند و اغلب در انتقال ترکیبات جلدی شرکت می کنند (ساس و همکاران^{۱۱}، ۱۹۹۴). پراکندگی این سلول ها در همه مراحل زیستی کرم شاخدار فریون پایین و حدود ۱۰-۳٪ بود (جدول ۱).

۲). این سلول ها اغلب دایره ای شکل با هسته فشرده مشخص مرکزی یا کناری بوده و سطح سیتوپلاسم آنها از گرانول پر شده بود. ظاهر گرانولی این سلول ها امکان شناسایی آنها را با میکروسکوپ نوری تسهیل می کند (واگو^۱، ۱۹۹۱). نقش گرانول ها در ارتباط با بیگانه خواری و شرکت در گره زایی ثابت شده است. در واقع گرانولوسیت ها اولین سلول های مشارکت کننده در تشکیل گره اطراف عامل بیگانه و نکروزه کردن آن محسوب می شوند (آکای و ساتو^۲، ۱۹۷۳؛ گیلسپی و همکاران^۳، ۱۹۹۷؛ استرنند، ۲۰۰۸؛ تاناکا و یاماگاکا^۴، ۲۰۱۱). این سلول ها بیشترین جمعیت را در همولنف لاروهای سن ۵ و بالغ *H. euphorbiae* داشتند ($F=72.5$, $df_1=6$, $df_2=63$, $p \leq 0.0001$) (جدول ۱). لینگ نیز در سال ۲۰۰۳ فراوان ترین سلول های خونی کرم ابریشم را گرانولوسیت ها گزارش کرد. فراوانی گرانولوسیت ها در همه راسته های حشرات به ویژه بال پولک داران بالا می باشد. ثابت شده این سلول ها قابلیت تقسیم به اسفرولوسیت ها را دارند (یاماشیتا و ایوابوکی^۵، ۲۰۰۱). در نتیجه می توانند در ذخیره و انتقال هم موثر باشند. در این تحقیق، تصویر تقسیم گرانولوسیت ها در مراحل اولیه نشان داده شده است (شکل ۱). اونوسیتوئیدها سلولهای گرد یا تخم مرغی و بزرگتر از پروهموسیت ها ولی کوچکتر از سایر سلول های خونی به طول تقریبی (۲-۵/۳) میکرومتر مشاهده شدند (جدول ۲). هسته مشخص به رنگ آبی روشن مایل به صورتی (پس از رنگ آمیزی) به یک سمت سلول کشیده شده بود. اونوسیتوئیدها یکی از منابع تولید آنزیم فنل اکسیداز، عامل ملانیزاسیون همولنف در بال پولک داران شناخته شده اند (آشیدا و همکاران^۶، ۱۹۸۳؛ ایواما

7- Iwama & Ashida

8- Jiang *et al.*9- Andrade *et al.*

10- Gardiner & Strand

11- Sass *et al.*

1- Wago

2- Akai & Sato

3- Gillespe *et al.*

4- Tanaka & Yamakawa

5- Yamashita & Iwabuchi

6- Ashida *et al.*

و *Manduca sexta* (L.) پروهموسیت ها و پلاسموتوسیت ها وجود دارند (ناردی و همکاران، ۲۰۰۳). و پروهموسیت ها قبل از رهاسازی از این اندام ها به پلاسموتوسیت ها تغییر شکل می دهند. این پلاسموتوسیت ها در کرم ابریشم قابلیت تبدیل به گرانولوسیت ها، اسفرولوسیت ها و اونوسیتوئیدها را دارند (بولتون، ۱۹۷۹). پروهموسیت ها در زمان دفاع سلولی و یا ترمیم زخم، با تقسیم میتوزی به اشکال پلاسموتوسیت و گرانولوسیت تبدیل می شوند. طبق گزارش ها، پروهموسیت ها در شرایط *In Vitro* نمی توانند به اونوسیتوئیدها تبدیل شوند (یاماشیتا و ایوبوکی، ۲۰۰۱). پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها در سنین چهار و پنجم لاروی بیشترین فراوانی را در بین هموسیت ها داشتند. این سلول ها مهمترین سلول های شرکت کننده در فرآیندهای دفاع سلولی می باشند. تحقیقات قبلی نیز نشان داده است که به ویژه در بال پولک داران، مجموع فراوانی پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها ۹۵-۸۵٪ کل سلول های خونی را شامل می شود (بیتز و همکاران، ۲۰۰۸؛ استرن، ۲۰۰۸). مانچینی گزارش کرد پلاسموتوسیت ها حدود ۵۱٪ و گرانولوسیت ها ۳۶٪ جمعیت هموسیت های سرخرطومی حنایی خرما (*Rhynchophorus ferrugineus*) را تشکیل می دهند (ماناچینی و همکاران، ۲۰۱۱). ثابت شده است که لاروهای سنین بالا حساسیت کمتری در مقابل عوامل بیگانه نشان می دهند. به عبارتی، جمعیت بیشتر سلول های مهم در ایمنی (پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها)، مقاومت بالاتر لاروهای بزرگتر را به همراه دارد (والادز- لیرا و همکاران، ۲۰۱۱). تعداد پلاسموتوسیت ها و گرانولوسیت ها در لارو سن ۵ *H. euphorbiae* بیشتر بود ولی در مرحله شفیرگی و حشره کامل، این تعداد

شمارش کل (THC)، هموسیت های آزاد در گردش (HIC) و تفریقی (DHC) سلول های خونی با استفاده از میکروسکوپ نوری

تعداد کل سلول های خونی با افزایش سن ارتباط مستقیم نشان داد. بیشترین (THC) مربوط به لارو سن پنجم و کمترین تعداد کل هموسیت ها در لارو سن اول مشاهده شد ($F=1154, df_f=6, df_e=98, p\leq 0.0001$) (جدول ۳). افزایش تعداد کل هموسیت ها در مراحل زیستی بالاتر در نتایج دیگر محققین نیز گزارش شده است (خسروی و همکاران، ۲۰۱۲؛ عجم حسنی و همکاران، ۲۰۱۳). به نظر می رسد تغییرات هورمونی عوامل مهمی هستند که در ارتباط با جمعیت سلول های خونی و نوع آنها در طول رشد نقش دارند (شاپرو، ۱۹۷۹). زمانی که یکی از آنالوگ های هورمون جوانی یعنی متوپرن^۱ به لاروهای کرم ابریشم تزریق شد، سطح هموسیت ها بدون تغییر معنی داری ثابت ماند در حالی که، تزریق ۲۰-اکدیزون^۲، تعداد سلول های خونی را پس از ۱۸ ساعت به طور قابل ملاحظه ای افزایش داد (لیو و همکاران، ۲۰۱۳). نیاز غذایی لاروهای سنین بالا و افزایش غلظت ترکیبات پروتئینی ضد میکروبی نیز می تواند در تغییرات فراوانی هموسیت ها دخیل باشد (گوپتا، ۱۹۸۵). شمارش تفریقی سلول های خونی نشان داد که جمعیت انواع سلول های خونی در مراحل مختلف زیستی *H. euphorbiae* متفاوت است. پروهموسیت ها فراوان ترین سلول های خونی در همولنف لارو سن ۱ بودند اما به تدریج از تراکم آنها در سنین بعدی کاسته شد. در واقع، پروهموسیت ها به عنوان سلول های پایه قابلیت تبدیل به سایر سلول ها را در طول رشد و در زمان واکنش ایمنی دارند (یاماشیتا و ایوبوکی، ۲۰۰۱). ثابت شده است که در اندام های هماتوپوئیک^۵ *Spodoptera frugiperda* (Smith)

6- Nardi et al.

7- Beaulaton

8- Beetz et al.

9- Manachini et al.

10- Valadez et al.

1- Khosravi et al.

2- Shapiro

3- Methoprene

4- 20-ecdysone

5- Hematopoietic organs

مریم عجم حسنی: بررسی یاخته شناسی سلول های خونی کرم...

جدول ۱- درصد فراوانی انواع سلول های خونی در مراحل زیستی کرم شاخدار فریبون *H. euphorbiae*

مرحله رشدی	پروهموسیت	پلاسموتوسیت	گرانولوسیت	اونوسیتوئید	اسفرولوسیت
لارو سن ۱	۲۸/۳±۰/۸a	۳۰/۳±۱/۵d	۲۸/۲±۰/۴de	۹/۶±۰/۵a	۵/۲±۰/۲b
لارو سن ۲	۲۷/۶±۱/۱a	۳۳/۲±۰/۶cd	۳۰d	۶/۲±۰/۴bc	۴/۶±۰/۱ab
لارو سن ۳	۱۸/۲±۱/۳b	۳۷/۵±۱/۸b	۳۵/۳±۱/۸c	۷/۳±۰/۴b	۳/۱±۰/۲bc
لارو سن ۴	۱۰/۶±۰/۸c	۴۱/۶±۱/۳a	۴۰/۲±۱/۳b	۵/۵±۰/۶c	۴/۵±۰/۵b
لارو سن ۵	۵/۵±۱/۲d	۴۲/۶±۰/۸a	۴۵±۱/۲a	۵/۶±۰/۴c	۳/۳±۰/۷bc
شفیره	۱۴/۲±۰/۵bc	۳۵/۷±۰/۶bc	۳۲/۳±۲c	۱۰±۰/۸a	۸/۴±۰/۴ab
حشره کامل	۱۰±۰/۴c	۳۲±۱/۲c	۳۸/۲±۰/۵bc	۱۱a	۱۰/۵±۰/۸a

حروف کوچک مشابه در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی دار بر مبنای گروه بندی توکی در سطح احتمال ۰/۰۵.

جدول ۲- اندازه گیری های مرفومتریک سلول های خونی مراحل زیستی کرم شاخدار فریبون *H. euphorbiae* (تعداد حشرات ۲۰ عدد)

مرفولوژی سلولهای خونی	اندازه (میکرومتر)	
	طول (±se میانگین)	عرض (±se میانگین)
پروهموسیت	۳/۱±۰/۸	۱/۸±۰/۴
پلاسموتوسیت	۱۵/۳±۸/۲	۷/۱±۳/۸
گرانولوسیت	۷/۴±۴/۴	۶/۱±۱/۳
اونوسیتوئید	۴/۴±۱/۵	۳/۳±۰/۹
اسفرولوسیت	۶/۸±۳/۲	۴/۵±۰/۴

جدول ۳- وزن بدن، حجم همولنف، شمارش کل و هموسیت های آزاد در گردش در هر مرحله رشدی کرم شاخدار فریبون *H. euphorbiae*

مرحله رشدی	وزن بدن (گرم)	حجم همولنف (میکرولیتر)	تعداد کل سلول های خونی (سلول × ۱۰ ^۳ میلی لیتر مکعب خون)	تعداد سلول های در گردش (سلول × ۱۰ ^۳ میلی لیتر مکعب خون)
لارو سن ۱	۱/۴±۰/۳d	۵/۵±۰/۳f	۲۱/۲±۵/۲g	۱۱۵/۴±۱/۴g
لارو سن ۲	۲/۲±۰/۲cd	۱۰/۴±۰/۷e	۳۲/۴±۶/۲f	۳۳۶±۴/۳f
لارو سن ۳	۲/۷±۰/۴c	۱۳/۷±۰/۵d	۴۷/۴±۵/۵d	۶۴۴/۴±۲/۷d
لارو سن ۴	۳/۳±۰/۵b	۱۸/۲±۱b	۵۸/۲±۳/۳b	۱۰۴۷/۴±۳/۳b
لارو سن ۵	۴/۱±۰/۳a	۲۲/۵±۱/۲a	۶۴/۵±۴/۴a	۱۴۱۹/۵±۵/۲a
شفیره	۳/۵±۰/۲b	۱۵/۳±۰/۷c	۵۶/۲±۳/۵c	۸۴۶±۲/۴c
حشره کامل	۳±۰/۴bc	۱۱/۶±۰/۸e	۴۳/۵±۲/۵e	۵۰۰/۲±۲e

حروف کوچک مشابه در هر ستون نشانگر عدم اختلاف معنی دار بر مبنای گروه بندی توکی در سطح احتمال ۰/۰۵.

H. می تواند نشانگر وضعیت مطلوب ایمنی *euphorbiae* در برابر بیمارگرها، پارازیتوئیدها و سموم باشد.

سپاس‌گزاری

از دکتر مسعود علی پور اصل که در نمونه برداری های صحرائی و پرورش حشرات همکاری داشتند و از دانشکده کشاورزی شاهرود به خاطر حمایت و مساعدت در اجرای این تحقیق قدردانی می شود.

کاسته شد هرچند که نسبت فراوانی این سلول ها بالا بود. اونوسیتوئیدها و اسفرولولوسیت ها در تمام مراحل جمعیتشان پایین بود به طوری که تقریباً ۱۱-۳٪ جمعیت کل سلول ها را تشکیل دادند.

حجم همولنف (HV)

حجم همولنف (HV) عامل مهمی است که تعداد کل هموسیت های در حال گردش را تحت تاثیر قرار می دهد (شاپیرو، ۱۹۷۹؛ پاتاک^۱، ۱۹۸۶). حجم همولنف همیشه ثابت نیست و بسته به مراحل رشدی مختلف متفاوت است. حجم همولنف برای مراحل مختلف زیستی *H. euphorbiae* محاسبه شد. کمترین حجم همولنف در لارو سن ۱ به دست آمد و به تدریج با افزایش اندازه لارو و وزن بدن بر حجم همولنف افزوده شد تا در لارو سن ۵ به بیشترین حد رسید، $(F=397, df_f=6, df_e=98, p \leq 0.0001)$ در واقع، افزایش وزن لارو در طول رشد می تواند بر حجم همولنف و در نتیجه فراوانی هموسیت ها موثر باشد (گاردینر و استرن، ۲۰۰۰). در بررسی حجم همولنف لاروهای نر و ماده *Trichosia (Morgante) pubescens* مشخص شد لاروهای ماده به دلیل داشتن اندازه بزرگتر، حجم همولنف بیشتری دارند (باراکو و کستاری^۲، ۱۹۸۴). در تحقیق حاضر، وزن لاروهای سن آخر و حجم همولنف آنها از سایر مراحل بیشتر بود که می تواند موید افزایش معنی دار فراوانی هموسیت ها در این مرحله باشد. حجم همولنف در مرحله شفیرگی و بالغ *H. euphorbiae* کمتر از لارو سن ۵ به دست آمد.

نتیجه گیری

لاروها، شفیره و بالغین کرم شاخدار فرفیون دارای ایمنوسیت های بالایی در همولنف خود هستند. با توجه به اینکه نقش سلول های خونی به عنوان عوامل کلیدی در سیستم ایمنی حشرات ثابت شده است، این موضوع

1- Pathak

2- Barracco & Cestari

منابع

۱. کریمپور، ی.، فتحی پور، ی.، طالبی، ع. ا. و محرمی پور، س. ۱۳۸۴. زیست شناسی شب پره برگخوار فرفیون *Simyra dentinosa* (Lep., Noctuidae) و شناسایی پارازیتوئیدهای آن در ارومیه. مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۶: ۴۷۵-۴۸۴.
۲. کریمپور، ی.، فتحی پور، ی.، طالبی، ع. ا. و محرمی پور، س. ۱۳۸۵. زیست شناسی شب پره *Hyles euphorbiae* (Lep., Sphingidae) روی گونه های فرفیون و شناسایی پارازیتوئیدهای آن در آذربایجان غربی. مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۷: ۷۲۷-۷۳۵.
۳. نیکدل، م.، دردایی، ع. ا. و پزشکی، م. ح. ۱۳۹۰. معرفی برگ خواران فرفیون و پارازیتوئیدهای آنها در مراتع استان آذربایجان شرقی. دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران. ۹(۱): ۴۶-۵۲.
4. Ajamhassani, M., Jalali Sendi, J., Zibaee, A., Askary, H., and Farsi, M. J. 2013. Immunological responses of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) to entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.-Criy) and *Isaria farinosae* (Holmsk.) FR. Journal of Plant Protection Research, 53(2): 110-118.
5. Akai, H., and Sato, S. 1973. Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). International Journal of Insect Morphological Embryology, 2: 207-31.
6. Andrade, F., Negreiro, M., Gregorio, E., and Moscardi, F. 2003. Hemocytes of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: morphological and quantitative studies. Acta Microscopia, 12: 59-63.
7. Ashida, M., Ishizaki, Y., and Iwahana, H. 1983. Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell walls or beta-1, 3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochemistry Biophys Research Commun, 113: 562-568.
8. Barracco, M.A., and Cestari, A.N. 1984. Hemocyte population dynamics in *Trichosia pubescens* larvae (Diptera: Sciaridae) and hemolymph analyses. Review in Brazilian Genetics, 3, 477-495.
9. Beaulaton, J. 1979. Hemocytes and hemocytogenesis in silkworms. Biochimie, 61: 157-164.
10. Beetz, S., Holthusen, T.K., Koolman, J., and Trenczek, T. 2008. Correlation of hemocyte counts with different developmental parameters during the last larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochemistry and Physiology, 67: 63-75.

11. Borges, A.R., Santos, P.N., Furtado, A.F., and Figueiredo, R.C. 2008. Phagocytosis of latex beads and bacteria by hemocytes of the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Micron*, 39: 486-494.
12. Brehélin, M., Drif, L., Baud, L., and Boemare, N. 1989. Insect haemolymph: cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry*, 19: 301-307.
13. Fornasari, L. 1996. Biology and ethology of *Aphthona* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae, Alticinae) associated with *Euphorbia* spp. (Euphorbiaceae), In Jolivet, P. H. A. and M. L. Cox (eds.). *Chrysomelidae Biology*, Vol. 3. Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands pp. 293-313.
14. Gardiner, E.M.M., and Strand, M. R. 2000. Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includense*. *Journal of Insect Physiology*, 45: 113-126.
15. Ghasemi, V., Moharramipour, S., and Sendi, J. 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.
16. Gillespie, J.P., Kanost, M. R., and Trenzcek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42: 711-643.
17. Gupta, A.P. 1985. Cellular elements in the haemolymph. In: Kerkut, G. A., Gilbert, L. I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Cambridge University Press, pp: 85-127.
18. Gupta, A.P. 1991. Insect immunocytes and other hemocytes: roles in cellular and humoral immunity. In: Gupta, A.P. (Ed.), *Immunology of Insects and Other Arthropods*. CRC Press, Boca Raton, pp. 19-118.
19. Hein, D.G., and Miller, S. D. 1992. Influence of leafy spurge on forage utilization by cattle. *Journal of Range Management*, 45: 405 – 407.
20. Iwama, R., and Ashida, M. 1986. Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry*, 16: 547-555.
21. Jalali, J., and Salehi, R. 2008. The hemocyte types, differential and total count in *Papilio demoleus* L. (Lepidoptera: Papilionidae) during post- embryonic development. *Munal Entomology Zoology*, 3(1): 199-218.
22. Jiang, H., Wang, Y., and Kanost, M. R. 1997. Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: Molecular cloning of subunit ProPO-P1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 835-850.
23. Jones, J.C. 1967. Changes in the hemocyte picture of *Galleria mellonella* L. *Biology Bulletin*, (Woods Hole) 132:211-221.

24. Kara, K., and Tschorsnig, H. P. 2003. Host catalogue for the Turkish Tachinidae (Diptera). *Journal of Applied Entomology*, 127, 465-476.
25. Khosravi, R., Jalali Sendi, J., and Ghasemi, V. 2012. Identification of hemocytes in carob moth, *Ectomoyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Plant Pests Research*, 2: 29-39.
26. Kronberg, S. L., 2007. Study aims at making cattle graze spurge. Available at http://www.livestockweekly.com/papers/97/01/30/30_spurge.html (visited 4 November 2011).
27. Lanot, R., Zachary, D. Holder, F., and Meister, M. 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 230: 243-257.
28. Lavine, M.D., and Strand, M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry Molecular and Biology*, 32: 1295-1309.
29. Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R., Kobayashi, Y., Tu, Z., and Funayama, T. 2003. Why does hemocyte density rise at the wandering stage in the silkworm, *Bombyx mori*? *Journal of Insect Biotechnology Sericol*, 72: 101-10.
30. Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R., and Kiguchi, K. 2005. Hemocyte differentiation in the hematopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*: prohemocytes have the function of phagocytosis. *Cell and Tissue Research*, 320: 535-543.
31. Ling, E., and Yu, X. 2006. Hemocytes from the tobacco hornworm *Manduca sexta* have distinct functions in phagocytosis of foreign particles and self-dead cells. *Immunology*, 30: 301-309.
32. Liu, F., Xu, Q., Zhang, Q., Lu, A., Beerntsen, B., and Ling, E. 2013. Hemocytes and hematopoiesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Invertebrate Survival Journal*, 10: 102-109.
33. Mahmood, A., and Yousaf, M. 1985. Effect of some insecticides on the hemocytes of *Gryllus bimaculatus* de Geer. *Pakistan Journal of Zoology*, 17(1): 71-84.
34. Manachini, B., Arizza, V., Parrinello, D., and Parrinello, N. 2011. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 360-365.
35. Nahla, M., Hanan, Abd El-Aziz, A., and Awad, H. 2010. Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. *Micron*, 41. 203–209.
36. Nardi, J.B., Pilas, B., Ujhelyi, E., Garsha, K., and Kanost, M. R. 2003. Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. *Dev Genes Evolution*, 213: 477-491.

37. Nowierski, R.M., Zeng, Z., Schroeder, D., Gassmann, A., FitzGerald, B. C., and Cristofaro, M. 2002. Habitat associations of *Euphorbia* and *Apthona* species from Europe: development of predictive models for natural enemy release using ordination analysis. *Journal of Biological Control*, 23: 1-17.
38. Pandey, J. P., Mishra, P. K., Kumar, D., Singh, B. M. K., and Prasad B. C. 2010. Effect of temperature on hemocytic immune responses of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* . *Research Journal Immunology*, 3: 169-177.
39. Pathak, J., 1986. Haemograms and in endocrine control in insects; in *Immunity in invertebrates* (ed.) Brehelin (Berlin: Springer-Verlag) pp 49-59.
40. Pemberton, R.W., and Wang, R. 1989. Survey for natural enemies of *Euphorbia esula* L. in northern China and inner Mongolia. *Chinese Journal of Biological Control*, 5: 64-67.
41. Qian, Z., Huang, J., Zhu, J., and Ye, G. 2012. Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by the endoparasitic wasp *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): Effects of parasitism on differential hemocyte counts, micro- and ultra-structures of host hemocytes. *Journal of Insect Science*, 19: 485–497.
42. Ribeiro, C., and Brehelin, M. 2006. Insect haemocytes: What type of cell is what. *Journal of Insect Physiology*, 52: 417-429.
43. Richard, R.D., Prosser, C.W., and O’Brein, C. 2001. Operations component contributions to team leafy spurge, area-wide integrated management of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) p. 162. In: Modera, N. D. (Ed.) *Proceedings of leafy spurge symposium*. June 19 – 21.
44. Sass, M., Kiss, A., and Locke, M. 1994. Integument and hemocyte peptides. *Journal of Insect Physiology*, 40: 407-421.
45. Shapiro, M. 1979. Changes in hemocyte populations. In: Gupta A.P. (ed.), *Insect hemocytes*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 475-524.
46. Sanjayan, K.P., Ravikumar, T., and Albert, S. 1996. Changes in the haemocyte profile of *Spilostethus hospes* (Fab.) (Heteroptera: Lygaeidae) in relation to eclosion, sex and mating. *Journal of Biochemistry*, 21: 781-788.
47. Sharma, P.R., Sharma, O.P., and Saxena, B. P. 2008. Effect of sweet flag rhizome oil (*Acorus calamus*) on hemogram and ultrastructure of hemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Micron*, 39: 544-551.
48. Strand, M. R., and Pech, L. L. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology*, 40: 31-56.
49. Strand, M. R. 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science*. 15: 1-14.

50. Tanaka, H., and Yamakawa, M. 2011. Regulation of the innate immune responses in the silkworm, *Bombyx mori*. *Invertebrate Survival Journal*, 8: 59-69.
51. Terra, W. R., Bianchi, A. G., and Lara, F. J. S. 1975. Physical properties and chemical composition of the haemolymph of *Rhynchosciara americana* (Diptera) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 47: 117-129.
52. Tschorsnig, H.P., and Herting, B. 2001. The tachinids (Diptera: Tachinidae) of central Europe: identification keys for the species and data on distribution and ecology. State Museum of Natural Science, 151 pp. Stuttgart, Germany.
53. Valadez-Lira, J. A., Gonzalez, J. M., Damas, G., Meja, G., Oppert, B., Padilla C., and Guerra, P. 2011. Comparative evaluation of phenoloxidase activity in different larval stages of four lepidopteran after exposure to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Science*, 12(80): 1-11.
54. Wago, H. 1991. Phagocytic recognition in *Bombyx mori*. In: Gupta AP (ed) *Immunology of insects and other arthropods*. CRC Press, Boca Raton, pp 215–235.
55. Yamashita, M., and Iwabuchi, K. 2001. *Bombix mori* prohemocytes division and differentiation in individual microcultures. *Journal of Insect Physiology*, 47: 325-331.
56. Yeager, J. F. 1945. The blood picture of the southern armyworm (*Prodenia eridania*). *Journal of Agricultural Research*, 71: 1-40.
57. Zibae, A., Bandani, A., Talaei, R., and Malagoli, D. 2011. Cellular immune reactions of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*, to the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and its secondary metabolites. *Journal of Insect Science*, 11: 138. 1-16.