مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2013) المجلد (29) ــ العدد 2 ــ الصفحات: 181-191

دراسة الاختلافات البروتينية لدى أطوار حشرة دبور ثمار اللوز *Eurytoma amygdale*

روضة سكر غالي[1] و وجيه قسيس[2] و سلام لاوند[3]

المُلخَّص

استُخلصت البروتينات من اليرقات والعذارى والحشرات الكاملة؛ وذلك من إناث حشرة دبور ثمار اللوز وذكورها (*Eurytoma amygdali* – Eurytomidae) ، وأجري الرحلان الكهربائي على هلامة متعدد الأكريلامايد. تبيّن وجود اختلافات في نوعية البروتينات الموجودة عند اليرقات والعذارى والحشرات الكاملة. يبدأ تركيز البروتينات عند اليرقات في العمر الأول ويزداد في العمر الثاني بشكل واضح، أمَّا في طور العذراء فيلاحظ استمرار وجود البروتينات في بداية الطور وتغيب معظمها مع تقدم العذراء في العمر. لوحظ وجود اختلافات بين البروتينات الموجودة عند الإناث عن تلك الموجودة عند الذكور إذْ تبيّن وجود أحد البروتينات عند الإناث من عمر يوم واحد ويستمر وجوده حتى عمر 7 أيام، وهو البروتين الأنثوي الأساسي في تشكيل المح في البويضات.

الكلمات المفتاحية: دبور ثمار اللوز، البروتينات، يرقة ، عذراء، حشرة كاملة.

[1] و[2] قسم وقاية النبات، [3] قسم التقانات الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

Protein differences in the phases of almond seed wasp, *Eurytoma amygdali*.

R.S. Ghali[(1)], W. F. Alkassis[(2)] and S. Lawand[(3)]

Abstract

The proteins of larvae, pupae and adults (females, males) of almond seed wasp Eurytoma amygdali -Eurytomidae, were extracted and electro - pHoresied on polyacrylamide gel.

Results showed clear differences in the quality of proteins between larvae, pupae and adults. The accumulation of proteins started in the initial stage of larva and increased clearly in the second stage with a continuation in the first stage of pupa, but mostly absent with the progress of the pupa in a lifetime. It was observed that there were differences between the proteins found in females from those in males by showing the presence of a protein when the females from the age of one day and continued its existence until the age of 7 days and this protein was essential in the formation of the yolk of ovocytes.

Keywords: Almond seed wasp, Proteins, Larva, Pupa, Adults.

[(1), (2)] Dept of Plant Protec., [(3)] Dept of Crop sci Fac. Agric., Damascus Univ. Syria, P. O. Box 30621.

المقدمة

تعدُّ حشرة دبور ثمار اللوز من الحشرات ذات الأهمية الاقتصادية على أشجار اللوز، ويأتي الضرر من طور اليرقة التي تتغذى على بذرة اللوز بشكل كامل. تقضي هذه الحشرة فصل الشتاء بشكل يرقة مكتملة النمو داخل الثمرة الجافة (Duval و Froment ، 1996)، وفي ربيع العام التالي تتحول إلى عذراء، ومن ثم تظهر الحشرات الكاملة التي تتزاوج. تبدأ الأنثى بوضع البيض إفرادياً في ثمار اللوز الخضراء(Talhouk، 1977). يفقس البيض وتظهر اليرقات في أواخر شهر نيسان وبداية شهر أيار، إذْ تبدأ اليرقة مباشرة بالتغذي على بذرة اللوز بشكل كامل تاركة منها الغلاف الخارجي (Duval، 2005)، وتكون في هذه المرحلة بالعمر الأول وفي منتصف شهر آب حتى آخره تتحول إلى العمر الثاني إذ تصبح بلون أبيض، وفي هذا العمر تدخل في طور السكون وتستمر حتى منتصف شهر شباط حيث تبدأ بالتعذر لتخرج الحشرات الكاملة في أواخر شهر آذار. وللحشرة جيل واحد في العام (سكر غالي، 2008)، هذا ولا توجد أي إشارة في الدراسات عن الدبور إلى تغذي الحشرة الكاملة؛ وهذا ما لوحظ حقلياً وكذلك مخبرياً حيث تركت الحشرات الكاملة مخبرياً دون غذاء، ورغم ذلك بقيت معظمها حية مدة 7 أيام والقليل منها استمر أكثر من ذلك، ومن جهة أخرى لوحظ عند تزويد الحشرات بغذاء مكون من (عسل- حبوب طلع- ماء) موت الحشرات إمَّا في اليوم نفسه، أو في اليوم التالي، ولذلك يعدُّ طور اليرقة مهماً جداً بالنسبة إلى الحشرات ولاسيّما تلك التي لا تتغذى خلال طور الحشرة الكاملة؛ وذلك بسبب تراكم المخزون الغذائي خلال هذا الطور في الجسم الدهني الذي يؤدي دوراً مهماً ولاسيّما في أثناء عدم تناول الحشرة للطعام سواء أكانت هذه المدة قصيرة أم طويلة؛ وبذلك تستخدمه الحشرة من أجل الدخول في طور السكون والاستمرار في الحياة، أو من أجل بناء أنسجة الحشرة الكاملة في طور العذراء أو لتشكيل البويضات في طور الحشرة الكاملة (قسيس، 1993)، ولذلك لا بدَّ من وجود اختلافات سواء من حيث كمية البروتينات أو نوعية هذه البروتينات الموجودة في أجسام الأطوار المختلفة للحشرة، ويكون الاختلاف أيضاً بين البروتينات الموجودة عند الإناث وتلك الموجودة عند الذكور، خاصة أن هناك ما يسمى بالبروتينات الأنثوية (vitellogenin) التي تُصنَّع في الجسم الدهني الذي يلقي بها في الدم وبمرور الدم في الفراغ الموجود بين الخلايا الجرابية يصل إلى سطح البويضة حيث تؤخذ البروتينات الأنثوية من قبل خلايا البويضة عن طريق ظاهرة الابتلاع pinocytose وتتحد الكريات الصغيرة الناتجة معاً لتشكيل كريات بروتينية كبيرة محاطة بغشاء خاص (Triplehorn و Johnson، 2005).

الأهداف

إجراء مقارنة بين البروتينات الموجودة عند اليرقات في العمر الأول والثاني، والعذراء في الأيام الأولى من التعذر والمراحل المتأخرة من هذا الطور، وكذلك عند الحشرات الكاملة خلال المدة التي تعيشها، ومقارنة البروتينات الموجودة عند الأنثى بتلك الموجودة عند الذكر لمعرفة الاختلافات فيما بينها.

مواد البحث وطرائقه

نُفّذ البحث في مخبر التقانة الحيوية بكلية الزراعة في جامعة دمشق.

فصلت الحشرات الكاملة فور انبثاقها؛ وذلك بحسب الجنس ووضعت في علب بلاستيكية وتركت دون غذاء، وأخذت بالتتابع بحسب العمر من يوم وحتى 7 أيام، وهو العمر الذي تبقى فيه معظم الحشرات الإناث والذكور حية، وفُصلت الأطوار الحشرية بالاعتماد على مورفولوجية الأطوار كالآتي:

الأطوار الأنثوية:

اليرقة في العمر الأول First Instar:

اليرقة ذات لون رمادي عديمة الأرجل، الطول 8.5-9 ملم (كاملاً دون انثناء) و7 ملم (مع انثناء) عرض الجسم عند المركز4- 4.5 ملم، يكون الرأس واضحاً وعرضه 1ملم. وتبدو الفكوك العلوية بارزة ومزودة بسنّين واضحين ذات لون بني وتظهر كذلك الشفة العليا، أمَّا نهاية البطن فتكون ممتدة ومستدقة إلى الخلف.

اليرقة في العمر الثاني Second Instar:

تتداخل الحلقات البطنية في هذا الطور بشكل واضح، وبذلك تقصر ويكون طول اليرقة 7-7.5 ملم (دون انثناء)، و6-6.5 ملم (مع انثناء)، عرض الجسم عند المركز 3-3.5 ملم، عرض الرأس 1.25 ملم وتكون اليرقة بلون أبيض.

العذراء في المرحلة الأولى من التعذر First days of Pupa:

تكون العذراء في هذه المرحلة بلون كريمي، حرة محاطة بغشاء رقيق، الجسم طري جداً وهش، ولا يمكن تمييز آلة وضع البيض.

طول العذراء 8-8.25 ملم. وطول الرأس 1.25 ملم وعرضه 2ملم، طول الصدر 2.3 ملم، ويكون بعرض 2 ملم، طول منطقة الخصر0.5 ملم وتكون بعرض 2 ملم، أمَّا البطن فيكون بطول 3.75 ملم وعرضه عند أعرض نقطة 2.5 ملم، عرض نهاية الجسم 0.75 ملم.

العذراء في المرحلة المتقدمة من التعذر Later days of Pupa:

تبدأ العذراء بالتلون باللون الأسود بدءاً من الرأس ثم الصدر فالبطن، وكذلك قرون الاستشعار المتميزة بسهولة فصلها عن الجسم، أمَّا العيون المركبة فلونها أحمر برتقالي، وكلما تقدمت العذراء في التحول إلى طور الحشرة الكاملة تحولّت العيون إلى الأحمر الداكن. طول الجسم 7 ملم مع الظاهر من آلة وضع البيض الذي يكون بطول 0.5 ملم، وطول الرأس 1.5 ملم بعرض 1.5-1.75 ملم، وطول الصدر 2.25 ملم بعرض 2.25 ملم، وطول منطقة الخصر نحو 0.4 ملم وعرضها 1.75 ملم. البطن بطول 4 ملم، وعرضه في أعرض نقطة 2.75 ملم، وعرض نهاية البطن 0.5 ملم.

الحشرة الكاملة Adult:

أهم ما يميّزها آلة وضع البيض في نهاية الجسم.

الأطوار الذكرية:

اليرقة في العمر الأول First Instar:

اليرقة ذات لون رمادي عديمة الأرجل، الطول 6 ملم (كاملاً دون انثناء) و5 ملم (مع انثناء) عرض الجسم عند المركز 2.5 ملم، الرأس مختزل غير واضح وغائر ضمن الصدر، أمَّا أجزاء الفم فهي غير واضحة ولكن تظهر بشكل تلون بني خطي في مقدمة الجسم. تكون نهاية البطن غير ممتدة إنّما متضخمة ولا تستدق مهما

طُبّق ضغط في نهاية الجسم. تشبه نهاية البطن عندها تلك الموجودة عند العذراء.

اليرقة في العمر الثاني Second Instar:

بلون أبيض في هذا الطور وهي أقصر يصبح طولها 4 ملم (دون انثناء)، و3 ملم (مع انثناء)، وعرض الجسم عند المركز 2.5 ملم. يمثل الشكل (1) مقارنة اليرقة الأنثى باليرقة الذكر من حيث شكل نهاية البطن عند التمدد.

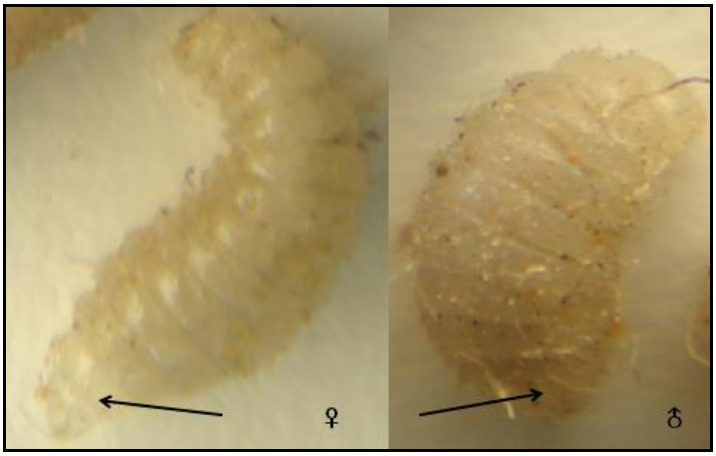
العذراء في المرحلة الأولى من التعذر First days of Pupa:

الطول 5.5- 6 ملم. وعرض الرأس 1ملم، وعرض الصدر 1.75ملم، وطول الصدر2 ملم، وعرض منطقة الخصر 1.25-1.5ملم، وطول منطقة الخصر0.3 ملم، وعرض البطن عند أعرض نقطة 2 ملم، وطول البطن 3 ملم، عرض نهاية الجسم 0.5 ملم، وتكون مدببة.

العذراء في المرحلة المتقدمة من التعذر Later days of Pupa:

تبدأ العذراء بالتلون باللون الأسود بدءاً من الرأس ثم الصدر فالبطن، قرون الاستشعار بلون أسود وهي سهلة الفصل عن الجسم، تكون العيون المركبة بلون أحمر. وطول الجسم 5 ملم، وعرض الرأس 1.2-1.4 ملم، وعرض الصدر 1.5 ملم، وطول الصدر 2 ملم،

وتكون الأرجل في أجزائها العلوية بلون بني فاتح أمَّا الأجزاء الطرفية فهي بلون كريمي. طول منطقة الخصر نحو 0.25 ملم وعرض هذه المنطقة 1.5 ملم. البطن بطول 2.5 ملم، وعرض البطن في أعرض نقطة 1.5ملم، وعرض نهاية البطن 0.2ملم، تكون نهاية البطن مدببة.



الشكل (1) مقارنة اليرقة الأنثى مع اليرقة الذكر من حيث شكل نهاية البطن عند التمدد.

استخلاص البروتين:

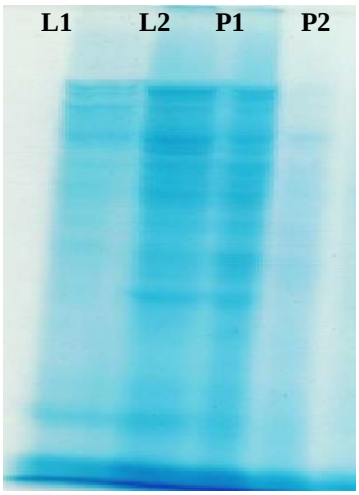
استُخلص وفق (Hames و Rickwood ، 1981) حيث طُحنت الأطوار الحشرية في محلوَل الاستخلاص المكون من (SDS10% 40ml، Glycerol 15% 20ml، 1M 8ml Tris (pH=8.8)، 0.5 M EDTA 1ml، H2o up to 100 ml)، كما يأتي: أخذت يرقتان وعذراوان من كلا الجنسين، وأيضاً حشرتان من كل من الذكور والإناث من عمر يوم واحد وحتى سبعة أيام وطحنت بالهاون في جفنة بورسلان معقمة بالكحول وباستخدام 500 ميكرو ليتر من محلول الاستخلاص، بعدها وضع الناتج في أنابيب eppendorf في درجة حرارة -20 °م مدة 24 ساعة، ثم ثفلت الأنابيب مدة 15 دقيقة في درجة حرارة 4 °م وبمعدل 12000 دورة/ دقيقة، نقلت المادة الطافية إلى أنابيب نظيفة وأضيفت صبغة برومو فينول الزرقاء، وأجري بعدها الرحلان الكهربائي العمودي؛ وذلك في هلامة متعدد الأكريلامايد المكونة من هلامة الفصل PH=8.8 (Acrylamide 2.5ml 37%، AP 10% 60µl، 1.5 M TEMED 6µl، SDS10%125µl، H2O 2ml، Tris base 3.25ml)، وهلامة التركيز PH=6.8 المكونة من (Acrylamide37% 2.5ml، AP 10% 80µl، 0.5M TEMED 8µl، DS10%50µl، H2O4ml، 0.5 M Tris base 0.325ml). أمَّا محلول الرحلان الكهربائي فيتكون من (SDS10% 1g، Tris base 3g 0.125M، 14.4g Glycine، H2O). كانت شدة التيار الكهربائي 100v مدة ساعتين.

لُوّنت الهلامة بمحلول التلوين المكون من (Coomassie Brilliant blue R250، Methanole 80ml، Glacial acetic acid 20ml، H2O 100ml)، ومن ثم أُزيل التلوين بإجراء عدة حمامات بمحلول إزالة تلوين الهلامة المكون من (Methanole 80ml، Glacial acetic acid 20ml، H2O 100ml).

النتائج والمناقشة

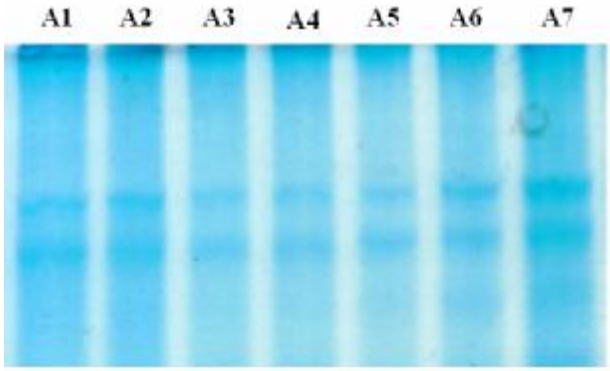
الأطوار الأنثوية:

بيّنت الدراسة وجود العديد من البروتينات لدى اليرقة في العمر الأول، في حين توجد أكثر البروتينات في العمر اليرقي الثاني، وهذا يتفق مع ما ذكره Schoeller (1980) بأن الخلايا الموجودة في الجسم الدهني تحتوي عند اليرقات الفتية على عدد قليل من المحتويات غير الخلوية، أمَّا عند اليرقات المتقدمة فيزداد نمو هذه الخلايا وتخزن المواد البروتينية بشكل أكبر، وقد لوحظ أن هذا المخزون الغذائي يتركز وتزداد كميته بشكل واضح قبل دخول اليرقة في طور السكون؛ ولذلك يجري تركيز البروتينات في هذا العمر أكثر من العمر اليرقي الأول، وبمقارنة المرحلة الأولى من تطور العذراء بالمرحلة المتقدمة من تطورها، لا نلاحظ وجود اختلافات بينهما؛ وذلك لأن العذراء في هذا الطور لم تستهلك بعد أياً من هذه البروتينات، في حين نلاحظ نقصاً في البروتينات الموجودة عند العذراء في الطور الثاني؛ وهذا نتيجة استخدام العذراء للبروتينات خلال عملية بناء أنسجة الحشرة الكاملة الجديدة. وقد ذكر Rockstein (1974) أن كمية البروتينات الموجودة في دم بعض الحشرات تنقص؛ وذلك خلال مرحلة العذراء (الشكل 2).



الشكل (2) البروتينات الموجودة عند اليرقات والعذارى لإناث دبور ثمار اللوز. L1- العمر اليرقي الأول، L2- العمر اليرقي الثاني، P1- المرحلة الأولى من التعذر، P2- المرحلة المتقدمة من التعذر.

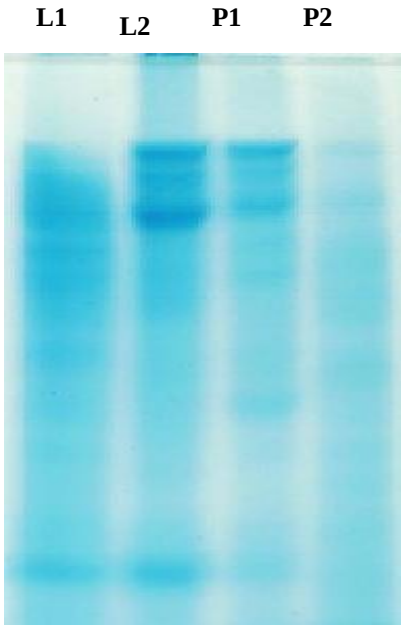
أمَّا بالنسبة إلى الحشرة الكاملة فلوحظ وجود قليل من البروتينات؛ وذلك لأن الحشرة في هذه المرحلة لا تتغذى فضلاً عن استهلاك البروتينات التي كانت موجودة في بناء أنسجة الحشرة، وهذا ما ذكره Mordue (1980) بأن البروتينات لا تخزن بكميات كبيرة في طور الحشرة الكاملة. وجد أن هناك بروتيناً يستمر وجوده في الأنثى ابتداءً من عمر يوم واحد ويستمر حتى عمر سبعة أيام، ويلاحظ وجوده في العينات المدروسة جميعها، وهذا هو البروتين الأنثوي الذي تستخدمه الأنثى في تشكيل المح في البويضات، حيث يوجد في دم الإناث ولا يوجد في دم الذكور، (الشكل 3).



الشكل (3) البروتينات الموجودة عند الحشرات الكاملة لإناث دبور ثمار اللوز. A1-A7- الإناث بعمر يوم وحتى سبعة أيام.

الأطوار الذكرية:

نلاحظ أن البروتينات لا توجد إلا بكميات قليلة في اليرقة بعمرها الأول ويزداد تركيزها في العمر الثاني، ولكن على الرغم من ذلك نلاحظ أن كميتها عند اليرقة الأنثى تكون أكبر من اليرقة الذكر، وبشكل واضح، والسبب يعود إلى أن الأنثى تخزن البروتينات بكميات أكبر لاستخدامها في تشكيل البويضات. يلاحظ أن بروتينات العذراء في المرحلة الأولى تكون مشابهة لبروتينات اليرقة في العمر الثاني، وتختفي معظم البروتينات في المرحلة التالية مع تقدم العذراء بالعمر لاستهلاكها في بناء أنسجة الحشرة الكاملة (الشكل 4).



الشكل (4) البروتينات الموجودة عند اليرقات والعذارى لذكور دبور ثمار -العمر اليرقي الأول، L2- العمر اليرقي الثاني، P1- المرحلة الأولى من التعذر، P2- المرحلة المتقدمة من التعذر

يبرهن عدم ملاحظة أية حزمة في الهلامة بالنسبة إلى الحشرات الكاملة، باستهلاك البروتينات جميعها في طور العذراء لبناء أنسجة الحشرة الكاملة، وتُستهلك المواد الدهنية والسكرية الموجودة في الجسم الدهني لدى الحشرات الكاملة.

تؤدي الهرمونات دوراً مهماً في محتوى الجسم الدهني والدم من البروتينات خلال أطوار الحشرة، إذْ يتدخل هرمون الانسلاخ ecdysone خلال طور اليرقة لتراكم المخزون البروتيني، فقد وجد أن هرمون B-ecdysone يحث على تصنيع البروتينات داخل الجسم الدهني ليرقات العمر الثالث لحشرة calliphora، ووجد أن الخلايا المعزولة من الجسم الدهني تأخذ الهرمون B-ecdysone بسرعة كبيرة؛ وذلك خلال قمة تصنيعها لبروتيناتها (Bourn، 1976)، وهذا ما يفسّر تركيز البروتينات في مرحلة اليرقة في العمر الثاني، وكذلك العذراء في مرحلتها الأولى. أمَّا في مرحلة الحشرة الكاملة فلا يوجد هذا الهرمون لغياب الغدد الصدرية التي تفرزه والذي يقوم بدور أساسي في تطور البيوض هو الغدد الصم corpora alata، إذْ تقوم هذه الغدد بتنظيم عمليات الاستقلاب ومراقبتها في

الجسم الدهني ولاسيَّما مراقبة تشكل البروتينات الأنثوية لتشكل المح، ووجدت هذه الظاهرة عند كثير من الحشرات، منها بق الرودينوس والصرصار (قسيس، 1993).

الاستنتاجات

- وجود اختلافات في المحتوى البروتيني بين اليرقات في العمرين الأول والثاني، والعذارى في المرحلتين الأولى والثانية والحشرات الكاملة الذكور والإناث.
- يجري تركيز البروتينات في العمر اليرقي الثاني لدى يرقات دبور ثمار اللوز؛ وذلك قبل الدخول في طور السكون.
- يُستهلك المحتوى البروتيني مع تقدم العذراء بالعمر عند إناث وذكور الدبور من أجل بناء أنسجة الحشرة الكاملة.
- يُعتمدُ على محتوى الجسم الدهني من المواد الدهنية والسكرية خلال مدة حياة الحشرة الكاملة.
- يوجد البروتين الأنثوي عند إناث دبور ثمار اللوز الذي يستخدم في تشكيل مح البويضات؛ وذلك ابتداءً من اليوم الأول من عمر الحشرة الكاملة.

References المراجع

سكر غالي، روضة. 2008 دراسة بيوفيزيولوجية لحشرة دبور ثمار اللــوز *Eurytoma amygdali End (Eurytomidae-Hymenoptera)* في وسط وجنوب سورية وطرائق مكافحته، أطروحــة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

قسيس، وجيه، 1993 - فيزيولوجيا الحشرات. الطبعة الأولى، منشورات جامعة دمشق، 495 صفحة.

Bourn, G. 1976. International review of cytology. Academic Press, New York and London, V.44: 24-38.

Duval, H . 2005. Eurytoma amygdali. le ravageur de l′amandier: e′tude de son comportment et de possibilite′s de lutte chimique. INRA, France, 65P.

Duval, H. and P. Froment. 1996. Ression de Eurytoma amygdali en France et les methodes de lutte possibles. La prog J.Appl. Entomol. Options Mediterraneennes 33:87-90.

Hames, B. D and D. Rickwood .1981.Gel electropHoresis of protein: a practical approach IRL Press, Washington, D.C.

Morduew, B. 1980. Insect PHysiology. 1st ed., Black Well Scientific Publication. 364P.

Rockestein, M. 1974. The PHysiology of Insects, Academic Press, Newyork and London. 35:46-59.

Schoeller, J. 1980. Les Insectes PHysiology, Development. 1st ed., Masson. Paris. 457P.

Talhouk, A. S. 1977. Contribution to the knowledge of almond pests in east mediterranean countries. V.The Fruit-feeding insects, Eurytoma amygdali END.andAnarsia lineatella Z. Zeitschriftfur Angewandte. Entomology 83(2):145-154.

Trplihorn, C. A. and N. F. Johnson. 2005. Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects (7th Ed.). Brooks, Thomson Cole. USA.

Received	**2012/08/01**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2012/11/07**	**قبول البحث للنشر**