دراسة الاختلافات البروتينية لدى أطوار حشرة دبور ثمار اللوز *Eurytoma amygdali – Eurytomidae*

روضة سكر غالي [١] – وجيه قسيس [٢] – سلام لاوند [٣]

١– قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

٢– قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

٣– قسم التقانات الحيوية ، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

الملخص :

تم استخلاص البروتينات من اليرقات والعذارى والحشرات الكاملة وذلك من إناث وذكور حشرة دبور ثمار اللوز، وأجري الرحلان الكهربائي على هلامة متعدد الأكريلامايد. تبين وجود اختلافات في نوعية البروتينات الموجودة عند اليرقات والعذارى والحشرات الكاملة. يبدأ تركيز البروتينات عند اليرقات في الطور الأول ويزداد في الطور الثاني وبشكل واضح، أما في طور العذراء فنلاحظ استمرار وجود البروتينات في الطور الأول وتغيب معظمها في الطور الثاني. لوحظ وجود اختلافات بين البروتينات الموجودة عند الإناث عن تلك الموجودة عند الذكور حيث تبين وجود أحد البروتينات عند الإناث من عمر يوم واحد ويستمر وجوده حتى عمر ٧ أيام وهو البروتين الأنثوي الأساسي في تشكيل المح في البويضات.

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

المقدمة:

تعد 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 (Duval and Froment,1996)، وفي ربيع العام التالي تتحول إلى عذراء ومن ثم تظهر الحشرات الكاملة التي تتزاوج وتبدأ الأنثى بوضع البيض إفرادياً في ثمار اللوز الخضراء (Talhouk, 1977). يفقس البيض وتظهر اليرقات في أواخر شهر نيسان وبداية شهر أيار، حيث تبدأ اليرقة مباشرة بالتغذي على بذرة اللوز بشكل كامل تاركة منها الغلاف الخارجي (Duval,2005)، وتكون في هذه المرحلة بالطور الأول وفي منتصف وحتى أواخر شهر آب تتحول إلى الطور الثاني حيث تصبح بلون أبيض وفي هذا الطور 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، ٢٠٠٨)، هذا ولا توجد أي إشارة في الدراسات حول الدبور إلى تغذي الحشرة الكاملة وهذا ما لوحظ حقلياً وكذلك مخبرياً حيث تركت الحشرات الكاملة مخبرياً بدون غذاء ورغم ذلك بقيت معظمها حية لمدة ٧ أيام والقليل منها استمر أكثر من ذلك، ومن جهة أخرى عندما تم تزويد الحشرات بغذاء مكون من (عسل- حبوب طلع- ماء) لوحظ موت الحشرات إما في نفس اليوم أو في اليوم التالي، ولذلك يعد طور اليرقة مهم جداً بالنسبة للحشرات وخاصة تلك التي لا تتغذى خلال طور الحشرة الكاملة وذلك بسبب تراكم المخزون الغذائي خلال هذا الطور في الجسم الدهني والذي يلعب دوراً هاماً وخاصة أثناء عدم تناول الحشرة للطعام سواء أكانت هذه الفترة قصيرة أو

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، ١٩٩٣) ، ولذلك لا بد 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 والتي يتم تصنيعها في الجسم الدهني الذي يلقي بها في الدم وبمرور الدم في الفراغ الموجود بين الخلايا الجرابية يصل إلى سطح البويضة حيث يتم أخذ البروتينات الأنثوية من قبل خلايا البويضة عن طريق ظاهرة الابتلاع Pinocytose وتتحد الكريات الصغيرة الناتجة معاً لتشكيل كريات بروتينية كبيرة وتحاط بغشاء خاص (Triplehorn and Johnson, 2005).

أهداف البحث:

إجراء مقارنة بين البروتينات الموجودة عند اليرقات في الطور الأول والثاني، والعذراء في الطورين الأول والثاني وكذلك عند الحشرات الكاملة خلال الفترة التي تعيشها، ومقارنة البروتينات الموجودة عند الأنثى مع تلك الموجودة عند الذكر لمعرفة الاختلافات فيما بينها.

مواد وطرائق البحث:

نفذ البحث في مخبر التقانة الحيوية – كلية الزراعة – جامعة دمشق.

- فصلت الحشرات الكاملة فور انبثاقها وذلك بحسب الجنس ووضعت في علب بلاستيكية وتركت بدون غذاء وأخذت بالتتابع حسب العمر من يوم وحتى ٧ أيام، وهو العمر الذي تبقى فيه معظم الحشرات الإناث والذكور حية، وتم فصل الأطوار الحشرية بالاعتماد على مورفولوجية الأطوار كالتالي :

- **الأطوار الأنثوية:**

- اليرقة في الطور الأول Larva- Stage1:

اليرقة ذات لون رمادي عديمة الأرجل، الطول ٨.٥-٩ ملم (كاملاً دون انثناء) و٧ ملم (مع انثناء) عرض الجسم عند المركز٤- ٤.٥ ملم ، يكون الرأس واضحاً وعرضه ١ملم. وتبدو الفكوك العلوية بارزة ومزودة بسنّين واضحين ذات لون بني وتظهر كذلك الشفة العليا، أما نهاية البطن فتكون ممتدة ومستدقة إلى الخلف.

- اليرقة في الطور الثاني Larva- Stage2 :

تتداخل الحلقات البطنية في هذا الطور بشكل واضح، وبذلك تقصر ويكون طول اليرقة ٧-٧.٥ ملم (بدون انثناء)، و٦-٦.٥ ملم (مع انثناء)، عرض الجسم عند المركز ٣-٣.٥ ملم، عرض الرأس ١.٢٥ ملم وتكون اليرقة بلون أبيض.

- العذراء في الطور الأول Pupa-Stage1:

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

طول العذراء ٨-٨.٢٥ ملم. طول الرأس ١.٢٥ ملم وعرضه ٢ملم، طول الصدر٢.٣ ملم، ويكون بعرض ٢ ملم، طول منطقة الخصر٠.٥ ملم

وتكون بعرض ٢ ملم ،أما البطن فيكون بطول ٣.٧٥ ملم وعرضه عند أعرض نقطة ٢.٥ ملم ، عرض نهاية الجسم ٠.٧٥ ملم.

– العذراء في الطور الثاني Pupa-Stage2 :

تبدأ العذراء بالتلون باللون الأسود بدءاً من الرأس ثم الصدر فالبطن، وكذلك قرون الاستشعار المتميزة بسهولة فصلها عن الجسم، أما العيون المركبة فلونها أحمر برتقالي وكلما تقدمت العذراء في التحول إلى طور الحشرة الكاملة تتحول العيون إلى الأحمر الداكن. طول الجسم ٧ ملم مع الظاهر من آلة وضع البيض والذي يكون بطول ٠.٥ ملم ، طول الرأس ١.٥ ملم بعرض ١.٥–١.٧٥ ملم، طول الصدر ٢.٢٥ ملم بعرض ٢.٢٥ ملم، ، طول منطقة الخصر حوالي ٠.٤ ملم وعرضها ١.٧٥ ملم. البطن بطول ٤ملم ، وعرضه في أعرض نقطة ٢.٧٥ ملم، عرض نهاية البطن ٠.٥ ملم.

- الحشرة الكاملة :

أهم ما يميزها آلة وضع البيض في نهاية الجسم.

– **الأطوار الذكرية:**

- اليرقة في الطور الأول Larva- Stage1:

اليرقة ذات لون رمادي عديمة الأرجل، الطول ٦ملم (كاملاً دون انثناء) و٥ ملم (مع انثناء) عرض الجسم عند المركز ٢.٥ ملم ، الرأس مختزل غير واضح وغائر ضمن الصدر، أما بالنسبة لأجزاء الفم فهي غير واضحة ولكن تظهر بشكل تلون بني خطي في مقدمة الجسم. تكون نهاية البطن غير ممتدة إنما متضخمة ولا تستدق مهما تم تطبيق ضغط في نهاية الجسم . تشبه نهاية البطن عندها تلك الموجودة عند العذراء.

- اليرقة في الطور الثاني Larva- Stage2 :

بلون أبيض في هذا الطور وهي أقصر يصبح طولها ٤ ملم (بدون انثناء)، و٣ ملم (مع انثناء)، عرض الجسم عند المركز ٢.٥ ملم.

- العذراء في الطور الأول Pupa-Stage1:

الطول ٥.٥- ٦ ملم. عرض الرأس ١ملم، عرض الصدر ١.٧٥ملم ، طول الصدر٢ ملم، عرض منطقة الخصر ١.٢٥-١.٥ملم ، طول منطقة الخصر٠.٣ ملم، عرض البطن عند أعرض نقطة ٢ ملم ، طول البطن ٣ ملم، عرض نهاية الجسم ٠.٥ ملم، وتكون مدببة.

العذراء في الطور الثاني Pupa-Stage2 :

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. طول الجسم ٥ ملم، عرض الرأس ١.٢-١.٤ ملم، عرض الصدر ١.٥ ملم، طول الصدر ٢ ملم، و تكون الأرجل في أجزاءها العلوية بلون بني فاتح أما الأجزاء الطرفية فهي بلون كريمي. طول منطقة الخصر حوالي ٠.٢٥ ملم وعرض هذه المنطقة ١.٥ ملم. البطن بطول ٢.٥ملم ، عرض البطن في أعرض نقطة ١.٥ملم، عرض نهاية البطن ٠.٢ملم، تكون نهاية البطن مدببة.

- **استخلاص البروتين:**

تم طحن الأطوار الحشرية في محلول الاستخلاص المكون من (SDS10% 40ml ، Glycerol 15% 20ml، 8ml 1M Tris (PH=8.8)، 0.5 M EDTA 1ml ، H2o up to 100 ml)، باستخدام الهاون في جفنة بورسلان معقمة بالكحول وفق مايلي: أخذت يرقتين وعذراوين من كلا الجنسين وأيضاً حشرتين من كلاً من الذكور والإناث من عمر يوم واحد وحتى سبعة أيام وطحنت باستخدام ٥٠٠ ميكرو ليتر من محلول الاستخلاص، بعدها وضع الناتج في أنابيب Eppendorf في درجة حرارة -٢٠ °م لمدة ٢٤ ساعة، ثم

ثفلت الأنابيب لمدة ١٥ دقيقة على درجة حرارة ٤ ° م وبمعدل ١٢٠٠٠ 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 والمكونة من(Acrylamide37% 2.5ml ، AP 10% 80µl، TEMED 8µl، SDS10%50µl ، 0.5M H2O4ml، 0.5 M Tris base 0.325ml).

أما محلول الرحلان الكهربائي فيتكون من (SDS10% 1g، Tris base 3g ، 0.125M Glycine 14.4g ، H2O) .كانت شدة التيار الكهربائي 100v لمدة ساعتين.

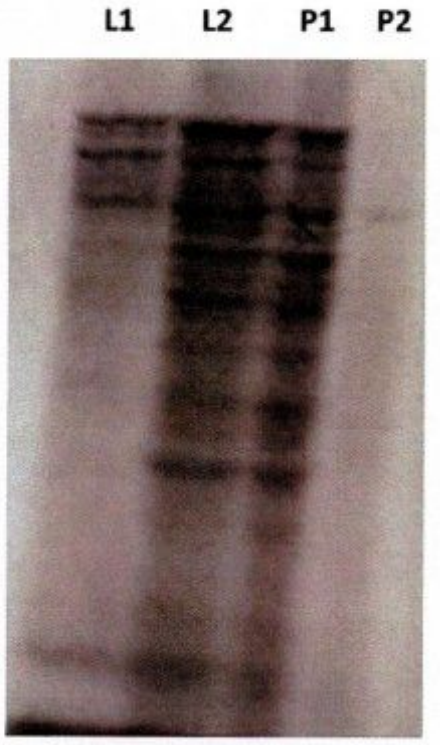
تم تلوين الهلامة بمحلول التلوين المكون من (Coomassie Brilliant blue R250، Methanole 80ml ، Glacial acetic acid 20ml ، 100ml H2O)، ومن ثم تم إزالة التلوين بإجراء عدة حمامات بمحلول إزالة تلوين الهلامة المكون من (Methanole 80ml ، Glacial acetic acid 20ml ، H2O 100ml).

النتائج والمناقشة :

- **الأطوار الأنثوية:**

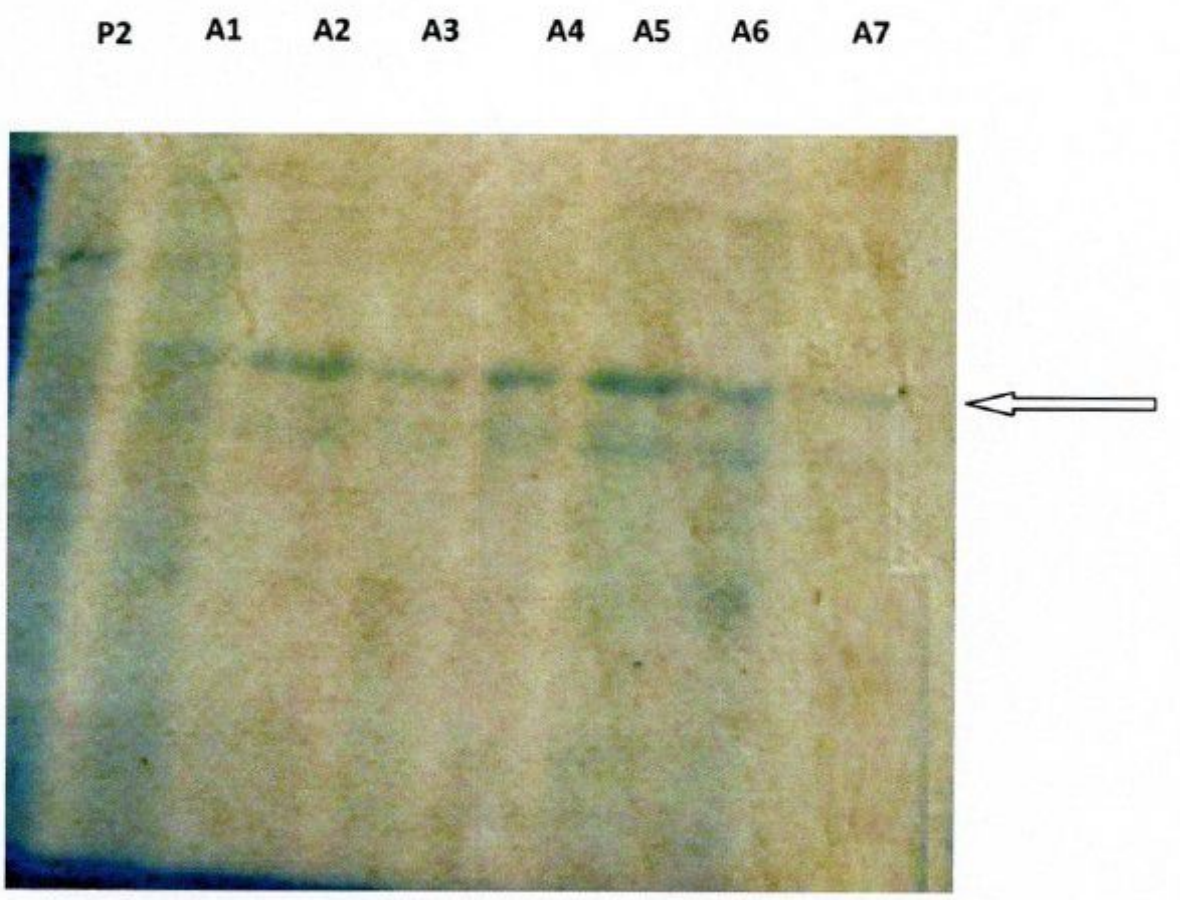
بينت الدراسة وجود العديد من البروتينات لدى اليرقة في الطور الأول، في حين يوجد أكثر البروتينات في الطور اليرقي الثاني وهذا يتفق مع ما ذكره (Schoeller,1980) بأن الخلايا الموجودة في الجسم الدهني تحتوي عند اليرقات الفتية على عدد قليل من المحتويات غير الخلوية، أما عند اليرقات المتقدمة فيزداد نمو هذه الخلايا وتخزن المواد البروتينية بشكل

أكبر، وقد لوحظ أن هذا المخزون الغذائي يتركز وتزداد كميته بشكل واضح قبل دخول اليرقة في طور السكون ولذلك يتم تركيز البروتينات في هذا الطور أكثر من الطور اليرقي الأول، وبمقارنة الطور الأول للعذراء مع الطور اليرقي الثاني لا نلاحظ وجود اختلافات بينهما وذلك لأن العذراء في هذا الطور لم تستهلك بعد أياً من هذه البروتينات، بينما نلاحظ نقص 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، وهذا ما يلاحظ في الشكل (1).



الشكل (1) البروتينات الموجودة عند اليرقات والعذارى لإناث دبور ثمار اللوز. L1–الطور اليرقي الأول، L2– الطور اليرقي الثاني، P1– الطور الأول للعذراء، P2– الطور الثاني للعذراء

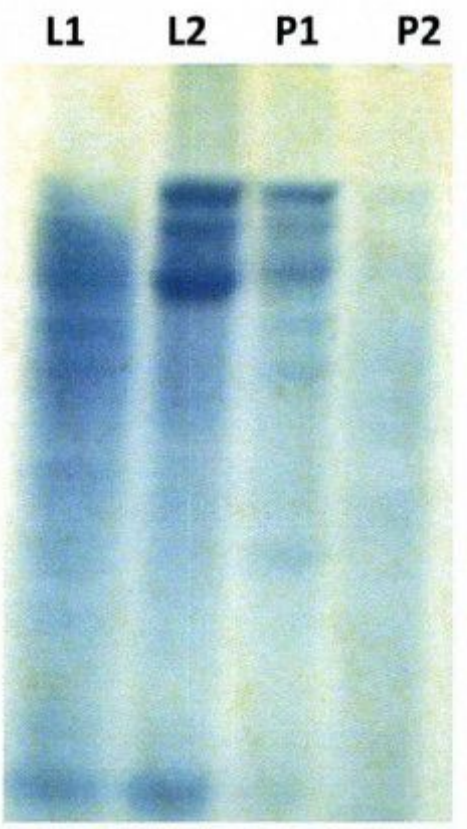
أما بالنسبة للحشرة الكاملة فلوحظ وجود قليل للبروتينات وذلك لأن الحشرة في هذه المرحلة لا تتغذى بالإضافة إلى استهلاك البروتينات التي كانت موجودة في بناء أنسجة الحشرة وهذا ما ذكره (Mordue,1980) بأن البروتينات لا تخزن بكميات كبيرة في طور الحشرة الكاملة. وجد أن هناك بروتين يستمر وجوده في الأنثى ابتداءاً من عمر يوم واحد ويستمر حتى عمر سبعة أيام، ويلاحظ وجوده في جميع العينات المدروسة، وهذا هو البروتين الأنثوي الذي تستخدمه الأنثى في تشكيل المح في البويضات ، حيث يوجد في دم الإناث ولا يوجد في دم الذكور وهذا ما يلاحظ من خلال الشكل (2).



الشكل(2) البروتينات الموجودة عند العذراء في الطور الثاني والحشرات الكاملة لإناث دبور ثمار اللوز. P2– الطور الثاني للعذراء، A1-A7– الإناث بعمر يوم وحتى سبعة أيام.

- الأطوار الذكرية:

نلاحظ أن البروتينات لا توجد إلا بكميات قليلة في اليرقة بالطور الأول ويزداد تركيزها في الطور الثاني ولكن بالرغم 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 الطور الأول تكون مشابهة لبروتينات اليرقة في العمر الثاني وتختفي معظم بروتينات الطور الثاني للعذراء لاستهلاكها في بناء أنسجة الحشرة الكاملة الشكل (3).



الشكل (3) البروتينات الموجودة عند اليرقات والعذارى لذكور دبور ثمار اللوز.L1–الطور اليرقي الأول، L2– الطور اليرقي الثاني، P1– الطور الأول للعذراء، P2– الطور الثاني للعذراء

في حين نجد أنه لم يلاحظ أية حزمة في الهلامة بالنسبة للحشرات الكاملة، ويفسر ذلك كونه تم استهلاك جميع البروتينات في طور العذراء لبناء أنسجة الحشرة الكاملة ويتم استهلاك المواد الدهنية والسكرية الموجودة في الجسم الدهني لدى الحشرات الكاملة.

تلعب الهرمونات دورا مهماً في محتوى الجسم الدهني والدم من البروتينات خلال أطوار الحشرة حيث يتدخل هرمون الانسلاخ Ecdysone خلال طور اليرقة لتراكم المخزون البروتيني، فقد وجد أن هرمون B-Ecdysone يحث على تصنيع البروتينات داخل الجسم الدهني ليرقات الطور 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 يفسر تركيز البروتينات في مرحلة اليرقة في الطور الثاني وكذلك العذراء في الطور الأول. أما 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، حيث تقوم هذه الغدد بتنظيم عمليات الاستقلاب ومراقبتها في الجسم الدهني وبخاصة مراقبة تشكل البروتينات الأنثوية لتشكل المح، ووجدت هذه الظاهرة عند الكثير من الحشرات ومنها بق الرودينوس والصرصار (قسيس،١٩٩٣).

الاستنتاجات:

- وجود اختلافات في المحتوى البروتيني بين اليرقات في الطورين الأول والثاني، والعذارى في الطورين الأول والثاني والحشرات الكاملة الذكور والإناث. يتم تركيز البروتينات في الطور اليرقي الثاني لدى يرقات دبور ثمار اللوز وذلك قبل الدخول في طور السكون.
- يتم استهلاك المحتوى البروتيني في الطور الثاني للعذراء عند إناث وذكور الدبور من أجل بناء أنسجة الحشرة الكاملة.
- يتم الاعتماد على محتوى الجسم الدهني من المواد الدهنية والسكرية خلال فترة حياة الحشرة الكاملة.
- يوجد البروتين الأنثوي عند إناث دبور ثمار اللوز والذي يستخدم في تشكيل مح البويضات وذلك إبتداءاً من اليوم الأول من عمر الحشرة الكاملة.

المراجع:

- سكر غالي روضة، ٢٠٠٨- رسالة ماجستير في وقاية النبات بعنوان دراسة بيوفيزيولوجية لحشرة دبور ثمار اللوز *Eurytoma amygdali End* *(Eurytomidae-Hymenoptera)* في وسط وجنوب سورية وطرائق مكافحته، ١٤٧ صفحة .
- قسيس وجيه، ١٩٩٣- فيزيولوجيا الحشرات. الطبعة الأولى، منشورات كلية الزراعة ،جامعة دمشق،٤٩٥ 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; FROMENT P ., 1996- **Ression de Eurytoma amygdali en France et les methodes de lutte possibles.** La prog J.Appl.Entomol, (17),176-182.
- - MORDUEW .,1980- **Insect Physiology.** 1st ed., Black Well Scientific Publication.364P.
- - ROCKSTEIN M., 1974- **The Physiology of Insects,** Academic Press, Newyork AND London.V(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. The Fruit-feeding insects,Eurytoma amygdali END.and Anarsia lineatella Zeitschriftfur** ,Angewandte.Entomology 83(2),145-154.
- TRIPLEHORN, C. A. ; JOHNSON, N. F., 2005 - **Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects** (7th Ed). Brooks / Thomson Cole USA.

Study of Protein differences in The Phases of Almond Seed Wasp. *Eurytoma amygdali* – *Eurytomidae.*

Rawda S.Ghali[1], Wajih F.Alkassis[2],Salam Lawand[3]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Damascus, Syria, P. O. Box 30621.
2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Damascus, Syria, P. O. Box 30621.
3. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Damascus, Syria, P. O. Box 30621.

Abstract:
The proteins of Larvae, Pupae and Adults (females, males) of almond seed wasp *Eurytoma amygdali* were extracted and electrophoresied on polyacrylamide gel. The results detected the differences in the quality of proteins between larvae, pupae and adults. The accumulation of proteins starts in the first stage of larva and increases clearly in the second stage and stays in the first stage of pupa, but the most of them will be absent in the second stage of pupa. There was a difference in the proteins between the females and males which was found a protein in the females (1-7 days) in age but it was absent in males , and this protein is essential for the yolk of ovocytes.

Key words: Almond seed wasp, Proteins, Larva, Pupa, Adult.