العدد الكرموزومي لحشرة الفواكه القشرية *Parthenolecanium corni* (Bouché) على أشجار اللوز في قرية رنكوس- محافظة ريف دمشق - سورية

Karyotyping of European Fruit Scale *Parthenolecanium corni* (Bouché) on almond trees in Village of Rankous (Damascus Countryside Governorate) Syria

أحمد بيراوي **محمد زهير محملجي*** **عبد النبي بشير***

اسماعيل أرشوكية** **لينة الأمير**

الهيئة العامة للتقانة الحيوية/ دمشق

* قسم وقاية النبات /كلية الزراعة/ جامعة دمشق

** قسم علم الحياة /كلية العلوم/ جامعة دمشق

Ahmed Berawe ***Mohamed Z. Mahmalji** ***Abd-Alnabi Basheer**

****Essmaiel Archoukieh** **Lina A.K AL-Amir**

National Commisson for Biotechnology \Damascus

*Faculty of Agriculture \ University of Damascus

**Faculty of Science\ University of Damascus

المستخلص

تمت دراسة الطابع النووي لحشرة الفواكه القشرية *Parthenolecanium corni* على أشجار اللوز في قرية رنكوس- سورية عام 2008 . أظهرت النتائج وجود 16 كروموسوم للحشرة باستخدام طريقة محضرات الهرس الموصوفة من قبل Gavrilov and Trapeznikova (2007) استبدل الجليد الجاف بالتجميد 140-°م (Cryo Freezer) .

Abstract

Karyotyping of European Fruit Scale *Parthenolecanium corni*(Bouché) studied on almond trees in Village of Rankous-Syria in 2008. Results showed there are 16 chromosomes of the insect by using the technique of squashing preparations described by Gavrilov and Trapeznikova (2007) without use of dry ice and substituting it with freezing at -140°C (Cryo Freezer).

المقدمة

تعد حشرة الفواكه القشرية *Parthenolecanium corni* (Bouché) واحدة من أهم الحشرات القشرية الرخوة التي تهاجم مدى واسع من العوائل النباتية [1،2] فهي تهاجم أكثر من 350 نوع نباتي تنتمي إلى 40 عائلة ، وخاصة أشجار الفاكهة ونباتات الزينة مثل الياسمين *Jasminum sp* والمرجان *Euonymus europaeus* ، وخاصة البساتين والحقول التي تستخدم فيها المكافحة الكيميائية بصورة عشوائية وغير مدروسة ، ويكون ضررها أكبر عند دخولها إلى مناطق جغرافية جديدة خالية من الأعداء الطبيعية التي تستطيع أن تحد من أضرارها[3،4] . تسبب الحشرات القشرية خسائر اقتصادية كبيرة للأشجار المثمرة حيث قدرت بـ 5 مليار دولار أميركي سنوياً في كافة أنحاء العالم وتسبب الحشرات القشرية الرخوة من فصيلة Coccidae حوالي ربع هذه الخسائر[5] . تعتبر حشرة الفواكه القشرية *P.corni* في أوربا واحدة من أهم الحشرات الضارة حيث سببت أضرار اقتصادية كبيرة لأشجار البندق في اليو نان [6] . تنتشر حشرة الفواكه القشرية في تركيا وإيران والجزائر وليبيا ولبنان وسوريا [8,7,1] كما تنتشر في كافة أنحاء بريطانيا [9] ، وسجلت لأول مرة في القسم التركي من جزيرة قبرص عام 2010 [10] .

الطابع النووي Karyotype هو عبارة عن عدد وشكل وحجم وترتيب الكروموسومات التي يملكها كل كائن حي ، حيث تختلف الخصائص الكرموزومية لكل نوع من الكائنات الحية ، فهي قد تكون طويلة لدى البعض وقصيرة لدى البعض الآخر ، كما يمكن لهذه ال كروموسومات أن تختلف عن بعضها البعض ضمن المجموعة الكرموسومية الواحدة من حيث الشكل والأبعاد . إن عدد الكروموسومات في الخليلكية ثابت ودائم لكل نوع من الكائنات الحية ، وهذا الثبات نسبي ، حيث أنه يمكن للعوامل الفيزيولوجية و الخليلك الناتج أثناء مرحلة الانقسام أن يؤدي إلى تغير في أعداد الكروموسومات [11] . إضافة إلى أن العدد الكرموزومي الأساسي المميز لخلايا

النوع والمسماة ب كروموسومات الطراز A توجد لدى بعض الأنواع كروموسومات إضافية سميت بكروموسومات الطراز B ، وهي تتلون بشدة خلال الطور الثاني وتملك سنتروميرات (جسيمات مركزية) طرفية . تتألف كروموسومات B من الكروماتين غير المتجانس وهي غير فعالة وراثيا ، ولا يؤثر العدد القليل لهذه الكروموسومات على الصفات الشكلية والخصائص الحياتية للنوع ، إلا أن وجودها بأعداد كبيرة في الخلية يؤدي إلى ظهور شذوذ في الخصائص والصفات المختلفة [11] . ويعتقد [12] أن النوع *Parthenolecanium corni* يمتلك كروموسومات الطراز B وإن دراسة الكروموسومات B (B-chromosomes) تساهم في فهم التطور الدقيق لمجتمعات الحشرات القشرية . بالإضافة إلى ذلك يوجد طراز ثالث من ال كروموسومات تسمى بالكروموسومات الجنسية X وY له علاقة بتحديد الجنس[11] . تعد الحشرات القشرية Coccidea من الكائنات الحية التي تملك أنظمة كروموسومية فريدة ومتنوعة ، فالأنواع المدارية وشبه المدارية لفصيلة Coccidae تملك 10 أنظمة للكروموسومات [14] ، وفي الدراسة التي أجريت في القسم الأوروبي من روسيا وجد ستة أنظمة للكروموسومات وهي :- 2n, Lecanoid, XX/X0, Diaspidid, Comstockiella,2n and Thelytoky[13] . إن النظام الكروموسومي XX/X0 هو نظام قديم في تحت فصيلة Coccinea وهو متوارث لدى جميع الأنواع التي تنتمي إلى الحشرات من رتبة Hemiptera . تم اكتشاف هذا النظام من الكروموسومات لدى لآلئ الأرض (.*Porphyrophora polonica*(L ، حيث أن الذكور تملك 13 كروموسوم والإناث 14 كروموسوم . لوحظ النظام ال كروموسومي2n-2n من قبل [13] لعدة أجناس من فصائل Ortheziidae ، Stictococcidae ، Eriococcidae ، وصف العالم [15] هذا النظام في النوع الاستوائي *Orheziapraelonga* . إن الأنظمة الكرموزومية Lecanoid, Comstockiella, Diaspidid, Dipliod Deuterotoky, Arrhenotoky, تملك صفات خاصة ومميزة ، مثل الكروماتينات غير المتجانسة للموقع الأبوي الذي يسبب كبح للكروموسوم الأبوي ، بينما تكون المورثات الناتجة عن الأم فعالة ونشيطة . وبناءا عليه فإن أنظمة Lecanoid ، Comstockiella ، Diaspidid كلها تكون ذات تكاثر جنسي ، بينما التكاثر لدى Arrhenotoky وDeuterotoky لاجنسي (بكري) . تتواجد الكروماتينات الأبوية غير المتجانسة في نظام Lecanoid في كافة مراحل الحياة ، أما لدى Comstockiella فان الموقع الأبوي للكروماتينات غير المتجانسة يكون مستقل(ككرموزومات منفصلة) يسقط أثناء تكوين الجنين ، لذلك يختلف عدد الكرموزومات لخلايا نفس النسيج ، ولدى Diaspidid فان الموقع الأبوي للكروماتينات غير المتجانسة غير متواجدة وتكون الذكور مضاعفة الصيغة الكرموزومية [13] . إن نظام الصيغة الكرموزومية هو من العوامل الهامة في تحديد فصائل الحشرات القشرية ، وحل بعض مشاكلها التصنيفية .

ونظراً لأهمية هذه الحشرة وقلة الدراسات التي أجريت على دراسة التنميط الكروموسومي للحشرات في سوريا ، فقد رأينا أن نجري هذه الدراسة والتي تهدف إلى دراسة الطابع النووي لحشرة الفواكه القشرية باستخدام محضرات الهرس ، وامكانية الحصول على نتائج باستخدام التجميد (-140^{O}م) (Cryo Freezer) بدل الجليد الجاف .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت العينات من بساتين اللوزيات المصابة بحشرة الفواكه القشرية في قرية رنكوس في محافظة ريف دمشق- سورية خلال شهر حزيران /2008 . حيث تقع رنكوس في الجزء الشمالي الغربي من محافظة ريف دمشق ، وتبعد عن مدينة دمشق 45 كم ، وترتفع عن سطح البحر (1650-2150)متر . يسود المنطقة مناخ معتدل صيفاً وبارد شتاءاً. أحضرت العينات إلى المختبر وفحصت تحت المكبرة Binocular . أخذت 100 أنثى قبل وضعها للبيض (بيوض ملقحة) ، وتم استثناء الإناث صغيرة الحجم والإناث المتطفل عليها والإناث التي بداخلها أحد أطوار المتطفلات ، ووضعت في المحلول المثبت .

تحضير المحاليل والملونات

حضرت المحاليل والملونات التالية

- المحلول المثبت Acetic acid-ethanol (1:3)(v/v): (25 مل إيثانول ethanol 95% + 75 مل حامض الخليك الثلجي) .
- حامض الخليك acetic acid 45% :(45 مل حامض الخليك الثلجي + 55 مل ماء مقطر) .

- حامض الهايدروكلوريك HCL (1N): (40.35 مل حامض الهايدروكلوريك+ 460 مل ماء مقطر) .
- محلول سورنسن الواقي pH 6.8 Sorensen's phosphate buffer [14]:

يتم تحضيرمحلولA ومحلولB:

1. محلولA: يتكون من (26.8 غرام مادة ثنائي فوسفات الصوديوم المائية ($Na_2HPO_4.7H_2O$)+473.2 مل ماء مقطر) .
2. محلولB: يتكون من (15.65غرام مادة فوسفات الصوديوم المائية ($NaH_2PO_4.2H_2O$) + 484.35 مل ماء مقطر) .

ثم يحضر المحلول الواقي: (24.5مل محلولA + 25.5 مل محلولB+ 50 مل ماء مقطر) .

- محلول لاكتوأسيتوأورسين Lactoacetoorsein [16]: (2 غرام orcein + 50 مل حامض اللاكتيك (lactic acid) 85% + 50 مل حامض الخليك الثلجي) .
- كاشف شيف Shiff's reagent [16]: (1 غرام fuchsin + 10 مل حامض كلور الماء النظامي + 2 غرام sodium metabisullfite + 300 ملغم فحم نباتي نشط + 100 مل ماء مقطر) .
- يتم تحضير محلولGiemsa stock[16]: (1 غرام Giemsa + 66 مل كليسرين + 66 مل ميثانول) .

ثم يحضر ملون غيمزا Giemsa (5%) [16]: (10 ملstock Giemsa+ 6 مل ميثانول + 84 مل محلول واقي Sorensen's phosphate bufferpH 6.8) .

- بلسم كندا (Entellan) .
- كحول اتيلي 96%.
- ماء مقطرdH_2O .

الكشف عن الكروموسومات

تم الكشف عن كروموسومات حشرة الفواكه القشرية *P.corni* باستخدام محضرات الهرس Squash الموصوفة من قبل[17] . وضعت عينات الإناث الحاوية على بيوض غير فاقسة مباشرة بعد إحضارها للمختبر في أنابيب تحتوي على المحلول المثبت لمدة 24 ساعة ، ثم غسلت ثلاث مرات بالكحول الاثيلي 96% ، بعد ذلك حفظت العينات في الكحول الاثيلي 96% ووضعت في البراد ، حيث يمكن ا ستخدامها في أي وقت . تم تشريح الإناث المحفوظة في البراد تحت المكبرة باستخدام أدوات تشريح دقيقة ومعقمة . حيث أخذت الأجنة بدون أخذ أي نسيج للحشرة ووضعت في قطرة من محلول حامض الخليك 45% (أو قطرة من محلول لاكتوأسيتوأورسين) وسط صفيحة زجاجية نظيفة جدا وتم هرس المحضر باستخدام ساترة زجاجية مع الانتباه إلى عدم تحريك الساترة أثناء عملية هرس المحضر بالضغط على الساترة باستخدام الأصبع .

تم صبغ المحضرات المهروسة باستخدام تقنية فولكن غيمزا Feulgen-Giemsa[18] . حيث وضعت المحضرات داخل المجمدة (Cryo Freezer) (-140°م) (بدلا من الجليد الجاف) ، بحيث يكون السطح الموجود عليه الساترة للأعلى ولمدة (1-2 دقيقة) ، ثم نزعت الساترات مباشرة باستخدام شفرة حلاقة . تم نقع المحضرات بالمحلول المثبت المحضر حديثاً لمدة 20 دقيقة ، ثم تركت المحضرات لتجف بالهواء . بعد ذلك عوملت المحضرات بمحلول حامض كلور الماء(N1) على درجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة ، ثم لمدة 7 دقائق على حرارة 60°م . بعدها غسلت المحضرات باستخدام الماء المقطر وتركت لتجف ثم صبغت المحضرات بكاشف شيف لمدة 30 دقيقة . غسلت المحضرات بالماء المقطر لمدة 5 دقيقة ثم بالمحلول الواقي pH 6.8 لمدة 5 دقيقة . أخيراً لونت المحضرات بملون غيمزا (5%) لمدة (20-30) دقيقة . بعد ذلك غسلت المحضرات بالماء المقطر وجففت بالهواء . ثم وضعت ساترات على المحضرات باستخدام محلول بلسم كندا مع الانتباه لعدم وجود فقاعات هواء بين الساترة والمحضر .

أخذت المحضرات إلى جهاز الكا ريوتايب ماركة Nikon Eclipse 80i موصول بحاسب شخصي مجهز ببرنامج Lucia cytogenetics أخذت الصور بواسطة كاميرا ديجتال (Nikon: Coolpix: E8800) . فحصت المحضرات بدقة بوجود بعض الخلايا في الطور الاستوائي metaphase وذلك لعد الكروموسومات .

النتائج والمناقشة

بينت نتائج فحص محضرات الهرس باستخدام التجميد (-140°م) في صورة (1) وجود 16 كروموسوم للحشرة في منطقة الدراسةحيث 2N=16 . ويتوافق هذا العدد مع ما أشير إليه من قبل [13] إلى أن حشرة الفواكه القشرية *P. corni* تملك 16 كروموسوم خلال دراسته التي أجراها في روسيا وذلك باستخدام الجليد الجاف في طريقته.

حيث يتم الكشف عن عدد الكروموسومات في الكائنات الحية أثناء مراحل الانقسام الخيطي أو الانقسام المنصف ، عن طريق تثبيت الخلايا ثم تلوينها ، ويتحقق التثبيت بفضل مجموعة من المواد الكيميائية ومن أشهر المثبتات المستعملة في مجالات الوراثة الخلوية محلول كارنو Carnoy`s solution المؤلف من ثلاثة أجزاء كحول ايتيلي95% وجزء واحد حامض الخليك الثلجي ، واستعمله [17] في دراسة خلايا الحشرات القشرية الرخوة ، وكذلك استعمل[19]محلول كارنو في دراسة كرموزومات فراشة *Cameraria ohridella* . وتستعمل العديد من الملونات لتلوين الكروموسومات ومن أهمها (ملون الكارمن الخليكي ، ملون الميثيلين الأزرق ، ملون الفوكسين الخليكي) . تشير الدراسات المرجعية إلى استخدام تقنية Feulgen-Giemsa للكشف عن كروموسومات أنواع فصيلة الحشرات القشرية الرخوة Coccidae . وكذلك طبق [19] تقنية-Feulgen Giemsa للكشف عن كرموزومات فراشة *Cameraria ohridella* .

تشير الدراسات إلى استخدام مادة الكوليشسين لدراسة عدد الكروموسومات ، حيث يتم حقن جسم الحشرات بالكوليشسين بتركيز 0.1-0.01%حيث تمنع تشكل الخيوط المغزلية وبالتالي الحصول على أعداد كثيرة من الخلايا في مرحلة الطور الاستوائي وهو الطور المناسب لعد ال كروموسومات، ويطبق ذلك على الحشرات كبيرة الحجم مثل الجراد [20] ، أما الحشرات صغيرة الحجم فمن الصعوبة حقن مادة الكوليشسين في جسمها لذلك يتم أخذ خلايا مبايض الحشرات صغيرة الحجم حيث احتمال الحصول على الخلايا في الطور الاستوائي Metaphase للانقسام الخيطي أكبر بسبب الانقسام السريع لخلايا المبايض ، لذلك تم جمع الاناث الواضعة للبيض من الحقل ، ووضعت في المحلول المثبت الذي ألحق الموت السريع بخلايا الحشرة حيث نفذ بسرعة إلى الخلايا وعرقل بعض التفاعلات الجارية فيها محدثا مجموعة من التبدلات غير العكوسة وحافظ على كافة مكونات الخلايا . إن حفظ العينات في الكحول الاثيلي 96% ووضعها في البراد على حرارة 5°م يحافظ عليها لمدة تصل إلى عدة أشهر دون أن يلحق أي ضرر بهذه الخلايا [17] .

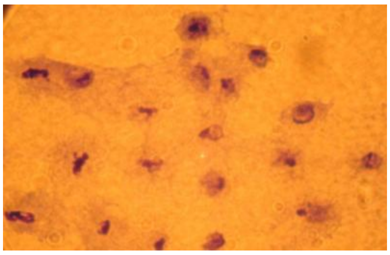
إن وضع قطرة من حامض الخليك 45% على الصفيحة يساعد في تفكيك النسج الخلوية عن بعضها لتسهيل هرسها . ويساعد وضع قطرة من محلول لاكتوأسيتوأورسين في صبغ الخلايا بسبب احتواءه على صبغة الأورسين [17] .

استخدمت عملية هرس المحضر بالساترة بهدف نشر خلايا الأجنة على الصفيحة الزجاجية والتصاقها حيث يتم نزع الساترة بهدوء من أطرافها الأربعة بعملية التجميد (Cryo Freezer)(المجمدة -140°م) عوضاً عن الجليد الجاف ، ونستطيع تقدير نجاح طريقة التجميد فيما اذا بقي النسيج بشكل كامل على الصفيحة ولم يبقى أي أثر منه على الساترة [11] .

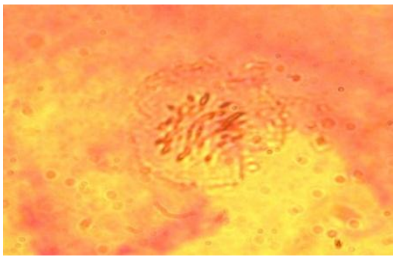
يستعمل حامض كلور الماء النظامي البارد لتحرير المجموعات الالدهيدية في جزيئة DNA بتفاعل اماهة من خلال معاملة المحضرات مرة ثانية بـحامض الهايدروكلوريك (المسخن إلى درجة 60م لإجراء تفاعل الاماهة) مما يؤدي إلى فصل الأسس الأزوتية البيورينية (أدينين- غوانين) من جزيئةDNA وبالتالي تصبح بقية الجزيئة حاملة للمجموعات الالدهيدية الحرة حيث تتحد مع جزيئات كاشف شيف ويؤدي ذلك إلى تشكيل جزيئات ملونة بالأحمر البنفسجي دليل نجاح تفاعل فولكن . حيث يلون كاشف شيف النواة و الكروموسومات فقط باللون الأحمر البنفسجي [11] .

بينت نتائج مشاهدة محضرات الهرس قلة عدد الخلايا في مرحلة الطور الاستوائي Metaphase ويلاحظ في أغلب الخلايا أن الكروموسومات متجمعة على شكل مجموعات كروماتينية كما في صورة (2) ، وتبين صورة (3)احدى الخلايا وهي في مرحلة هجرة الكروموسومات إلى قطبي الخلية . إن صعوبة الكشف عن كروموسومات حشرة الفواكه القشرية باستخدام محضرات الهرس يستدعي محاولة تطبيق تقنية الزرع الخلوي لخلايا الحشرة باستخدام أوساط زرع اصطناعية حيث تفيد هذه الطريقة بالحصول على عدد كبير من الخلايا في مرحلة الانقسام .

صورة (1): كروموسومات الحشرة(تكبير4x100x10) باستخدام صبغة شيف وصبغة غيمزا



صورة (2): الكروموسومات متجمعة على شكل مجموعات كروماتينية داخل الخلايا(تكبير100x10) باستخدام صبغة شيف وصبغة غيمزا



صورة (3): احدى الخلايا وهي في مرحلة هجرة الكروموسومات إلى قطبي الخلية(تكبير2x100x10) باستخدام صبغة شيف وصبغة غيمزا

المصادر

1. Ben-Dov, Y. (1993). A systematic catalogue of the soft scale insects of the world (Homoptera: Coccoidea: Coccidae). Sandhill Crane Press, Gainesville, FL. pp: 536.
2. Kawecki, Z. (1958). Studies on the genus *Lecanium*Burm. IV. Materials to a monograph of the brown scale, *Lecanium corni* Bouché, Marchal (female nec male) (Homoptera, Coccoidea, Lecaniidae). AnnalesZoologici. 135: 17-216.
3. Hamon, A.B. and Williams, M.L. 1984. The soft scale insects of Florida (Homoptera: Coccoidea: Coccidae). Arthropods of Florida and Neighboring Land Area. 1: 11-94.
4. Gill, R.J. (1988). The Scale Insects of California, Part I. The Soft Scales (Homoptera: Coccoidea: Coccidae). Sacramento, California, USA: California Department of Food, Agriculture.
5. Kosztarab, M. and Kozár, F. (1988). Scale Insects of Central Europe. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiadó.
6. Santas, L.A. (1985). *Parthenolecanium corni* (Bouche) an orchard scale pest producing honeydew foraged by bees in Greece. EntomologiaHellenica., 3(2):53-58.
7. Commonwealth Institute of Entomology. (1979). Distribution Maps of Pests, Series A. No 394.
8. CABI/EPPO, (2005). Distribution Maps of Plant Pests. Map No. 437. Wallingford, UK: CAB International.
9. Malumphy, C. 2010.Scale Insectsand White flies (Hemiptera: Coccoidaeand Aleyodoidea) of Bedfordshire. British Journal of Entomology and Natural History 23: 243–257.
10. Sisman, S and Lgentürk, S. 2010. Scale insects species (0000--p'Hemiptera: Coccoidea) in the Turkish Republic of Northern Cyprus. Turk J Zool. 34:219-224.
11. العّوا، أسامة و شهلا، جرجس . (1977) . علم الوراثة. دار المعارف للطباعة- كلية العلوم –جامعة دمشق . ص246.

12. Gavrilov, I.A. (2005). Systematics and cytogenetics of scale insects (Homoptera: Coccinea) of European Russia. Ph.D. Dissertation, Zoological Institute, Russian Academy of Sciences. St. Petersburg. p269.

13. Gavrilov, I.A. (2004). Taxonomic and Cytogenetic Studies of Scale Insects (Homoptera: Coccinea) of European Russia. Proc. Zool. Inst. Russ. Acad. Sci., No. 300.

14. Nur, U. (1980). Evolution of unusual chromosome systems in scale insects (Coccoidea: Homoptera). In: R.L. Blackman and M. Ashburner (Editors), Royal Entomological Society of London, 10th Symposium, Insect Cytogenetics, London, 24-25 September 1979. Blackwell, Oxford. pp: 97-117.

15. Brown, S.W. (1958). The chromosomes of an Orthezia species (Coccoidea: Homoptera). Cytologia. 23: 429–434.

16. Clark, G. (1981). Staining Procedures.4th edn. Williams and Wilkins, Baltimore, pp: 512.

17. Gavrilov, I.A. and I.V.Trapeznikova. (2007). Karyotypes and reproductive biology of some mealybugs (Homoptera: Coccinea: Pseudococcidae), Comp. Cytogenet. 1(2): 39-148.

18. Grozeva, S. and S. Nokkala. (1996). Chromosomes and their meiotic behavior in two families of the primitive infraoder Dipsocoromorpha (Heteroptera) // Hereditas. 125: 31-36.

19. De Prins, J., W. De Prins and U. D. Asta (2002). The karyotype of Cameraria ohridella (Lepidoptera:Gracillariidae). Phegea. 30(3): 81–88.

20. Turkoglu, S. andS. Koca. (2002). Karyotype, C- and G-band Patterns and DNA content of *Callimenus* (=*Bradyporus*)*macrogaster macrogaster*. 4pp. Journal of Insect Science. 2:24.