وزارة التعليم العالي والبحث العلميّ
جامعة ديالـــــــــــــــــــى
كلية التربية للعلوم الصرفـــــــــة
قسم علوم الحيـــــــــــــــاة

دراسة العلاقة الوراثية الجزيئية والتعبير الجيني للسايتوكروم P450 بين النوعين *Tribolium castaneum* و *Tribolium confusum* استجابة للمبيدات الحشرية المختلفة

رسالة مقدمة
إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

سارة سلام حمد

بكالوريوس علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى
2018-2017

بإشراف

أ.د. عمار أحمد سلطان

1443هـ 2022 م

المقدمة Introduction

تتعرض الحبوب المخزونة ومنتجاتها إلى الكثير من آلافات التي تسبب أضراراً إقتصادية كبيرة، وهي تسبب تلف ما يقارب (10– 40 %) من حبوب المحاصيل المخزونة في العالم (الحديدي وآخرون،2014). وترجع الخسائر في جميع أنحاء العالم في المنتجات المخزنة وما بعد الحصاد بشكل أساسي إلى هجمات الحشرات (Ajaha وآخرون،2021). وغالباً ماتكون عمليات بدء الحصاد، والنقل، وطرق التخزين المناسبة غير كافية، وهي من بين أهم العوامل الحيوية التي تسبب خسارة ما بعد الحصاد (Kumar وKalita،2017 ; Abass وآخرون، 2018; Quellhorst وآخرون، 2020).إذ أثناء عملية الحصاد والتخزين ما بعد الحصاد، غالباً مايتم تكسير بذور الحبوب أو جرحها بواسطة مغذيات داخلية أُخرى مما يسهل على خنفساء الدقيق الحمراء *Tribolium castaneum* غزوها (Perkin وOppert ،2019).وتكون خسائر مابعد الحصاد للسلع الزراعية عالية جداً، إذ تصل إلى (10%) من المنتجات المحصودة في المناطق المعتدلة وتصل الى (50%) في المناطق المدارية (Wijayaratne وآخرون ،2018) .وغالباً ما تقلل طرق التخزين العلمي من هذه الخسائر بنسبة تصل إلى (2-1 %) (Kumar وKalita ،2017). إذ تؤدي جائحة Covid-19 إلى تفاقم استمرار انتشار الخسائر عن طريق زيادة حدوث تأخيرات في النقل، مما يسمح للآفات بالإنتشار في الشحنات (FAO ، 2020).

تعدُّ خنفساء الدقيق الحمراء،*Tribolium castaneum* (Herbst)؛وخنفساء الدقيق المتشابهة *Tribolium confusum* (Jacquelin du Val) (Coleoptera:Tenebrionidae) هي آفات متناغمة ومتشابهة شكلياً في المنتجات المخزنة وسميت الأخيرة بسبب الأرتباك حول هويتها لأنها تشبه إلى حدٍ كبيرٍ خنفساء الدقيق الحمراء(Walter، 1990). وهما من الحشرات الأكثر شيوعاً التي تصيب الأطعمة المخزنة، ولكن غالباً ما تختلف حساسيتها للمبيدات الحشرية المختلفة بشكل كبير، مما يضاعف الجهود المبذولة لإدارة التجمعات في الطحن ومرافق المعالجة

(Yao وآخرون، 2019).

وتعدُّ *T.castaneum* واحدة من أكثر الآفات الحشرية أهمية من الناحية الإقتصادية للمنتجات المخزنة (Salem وآخرون، 2017). وهي من أكثر الآفات تدميراً للحبوب المخزنة في جميع أنحاء العالم(Gao وآخرون ، 2020). على الرغم من إن هذا النوع يفضل الدقيق والمنتجات المطحونة، فقد تم تسجيله أيضاً على مجموعة متنوعة من الحبوب والسلع الخام الأُخرى مثل البقوليات والمكسرات والتوابل والحبوب والبذور الزيتية وبذور القطن والفواكه المجففة والفول وحبوب الكاكاو والأطعمة المصنعة (Abdullahi وآخرون،2018). وفيما يتعلق بالضرر الذي يلحق بالسلع حيث يمكن لهذه الآفة أن تعيش في مناخات متنوعة على مستوى العالم (Islam ،2017).

تتضمن الطرق المستخدمة للسيطرة على آفات حشرات الحبوب المخزنة المعالجات الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية (Isman ،2006). وتستخدم المبيدات الحشرية الكيميائية، مثل البيرثرويد والفوسفين والديكلوروفوس، للسيطرة على هذه الآفات (Bomzan وآخرون ،2018). ومن الناحية البيولوجية، فقد حظيت الكائنات الدقيقة الممرضة للحشرات بإهتمام كبير ، وخاصة الفطريات الممرضة للحشرات والتي تم فحصها من قبل العديد من الباحثين في جميع أنحاء العالم للسيطرة على العديد من أنواع الآفات الحشرية (Wakil وSchmitt،2015).

ويعتبر الفطر *Beauveria bassiana* أحد مسببات الأمراض الفطرية الحشرية الصديقة للبيئة والمهمة إقتصادياً،والتي تُستخدم على نطاق واسع كعامل تحكم بيولوجي لمختلف الآفات الحشرية (Yang وآخرون،Chen:2017وآخرون،2021).حيث تم الكشف عن أن *T. castaneum* قد طور من مقاومتهِ لبعض المبيدات الحشرية التي تستخدم عادة لمكافحة الآفات الحشرية مثل الفوسفين والملاثيون والفينيتروثيون والبيريميفو–ميثيل (Upadhyay وآخرون، 2018)، وكذلك طور من مقاومتهِ للفطر *B.bassiana* لأن إفرازات الجلد الدهنية لها خصائص مضادة للفطريات (Pedrini وآخرون، 2015).

كشفت العلاقات التكيفية بين بعض أنواع *Tribolium* والتي تم استنتاجها من الدراسات الخلوية لأعداد الكروموسومات إن مجموعة "*castaneum*" أكثر بدائية من مجموعة "*confusum* " (Smith ،1952).أن الكروموسومات الكاملة للتنميط النووي(2n) *T.castaneum* تساوي عشرين كروموسوم (2n=20، XY) بينما (2n) *T.confusum* يساوي ثمانية عشر كروموسوم (2n=18، XY)(Salman وآخرون، 2017).

تمت أيضاً دراسة العلاقات التطورية لأنواع *Tribolium* الأكثر شيوعاً عن طريق التحليل الكهربي للإيزوزيمات (Wool ، 1982). وفقاً لهذه الدراسة فإن *T. castaneum* و*T. confusum* ترتبط ارتباطاً وثيقاً مع *T.brevicornis* أكثر من إرتباطها ببعضها البعض. قد يُعزى سبب عدم التجانس بين *T.castaneum* و*T.confusum* إلى حقيقة أن مواقع RAPD لديها معدلات طفرة أعلى، وبالتالي فهي أكثر تعدداً من العلامات الأخرى (Santos وآخرون ،2011). كانت قيم الهوية الجينية بين *T.castaneum* و*T.confusum* منخفضة، ويمكن أن يُعزى ذلك إلى حقيقة أن الاختلاف الجيني يعتمد على الاستعمار والمضيف والضغوط الإنجابية بحيث ان أي نوع يتم توزيعهُ علىمجموعة كبيرة ومتنوعة من الظروف البيئية سيكون أكثر تغايراً وراثياً مقارنة بأنواع التوزيع المقيد (Santos وآخرون،2005).

وتهدف الدراسة الحالية إلى ما يلي:-

نظراً للأهمية الاقتصادية لأنْواع هذه الحشرة بإعتبارها آفات مخزنية ولكثرة تشابه النوعين *T. castaneum* و*T. confusum* من الناحية المظهرية اقتُرح موضوع الدراسة ليشمل الجوانب التالية:

1- دراسة وراثية جزيئية باستعمال عشرة بوادئ عشوائية للمقارنة بين النوعين *T. castaneum* و *T. confusum* وإيجاد علاقة النشوء والتطور بينهما وكذلك إستعمال جينين متخصصين من جينات دنا الميتوكوندريا وهما COI وCytb وعمل تسلسل نيوكليوتيدي لهما للمقارنة بينهما.

2- دراسة التعبير الجيني للجين P450 لكلا النوعين عند مكافحتهما كيميائياً وحيوياً.

الخلاصة

يعد النوع *Tribolium castaneun* والنوع *Tribolium confusun* الذان ينتميان إلى رتبة غمدية الأجنحة Coleoptera وعائلة خنافس الدقيق Tenebrionidae من آفات المحاصيل المخزونة ويكونان متشابهان من الناحية المظهرية لدرجة أنه لا يمكن التمييز بينهما . تم جمع 60 عينة من الحشرات الكاملة بواقع 30 عينة لكل نوع من مخازن الحبوب التابعة إلى محافظة ديالى خلال الفترة من شهر تشرين الأول عام 2020 لغاية شهر نيسان عام 2021 .

أظهرت نتائج الدراسة الجزيئية للبوادئ العشوائية والبالغ عددها 10 بوادئ 92 حزمة منها 66 حزمة ذات تعددية شكلية عند المقارنة بين النوع *T.castaneum* والنوع *T.confusum* ، إذ أعطى البادئ OP-B18 أقل عدداً من الحزم ذات التعددية الشكلية والبالغ عددها 6 حزمة بينما أعطى البادئ OP-C10 أعلى عدداً من الحزم ذات التعددية الشكلية والبلغ عددها 10 حزم ، إن أعلى نسبة مئوية لكفاءة البادئ ظهرت عند البادئ العشوائي OP-C18 وهي 14.13% بينما أقل نسبة مئوية لكفاءة البادئ ظهرت عند البادئين العشوائين OP-A15 و OP-B18 وهي 6.52 % ، إن أعلى نسبة مئوية للمقدرة التمييزية ظهرت عند البادئ OP-C10 وهي 15.1% بينما أقل نسبة مؤية ظهرت عن البادئ العشوائي OP-B18 وهي 4.54%.

وعند المقارنة بين النوع *T.castaneum* والنوع *T.confusum* بواسطة تضخيم الجين COI و الجين Cytb بإستخدام تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل أظهرت النتائج إن الوزن الجزيئي للحزم الناتجة هو 1000 و 500 زوج قاعدي ولكلا النوعين على التوالي ، وأظهر التسلسل النيوكلوتيدي لكل من الجين COI والجين Cytb وجود إختلاف بين النوعين على شكل طفرات إستبدال وحذف في بعض القواعد النتروجينية على طول التسلسل النيوكلوتيدي للجينين من جهة ومع عينة بنك الجينات من جهة أُخرى . أظهرت شجرة النشوء والتطور المبنية على أساس التسلسل النيوكلوتيدي لكل من الجين COI و Cytb وجود اختلاف بين النوعين من جهة وبين عينة بنك الجينات من جهة أُخرى وكذلك

2 : استعراض المراجع Literature Review

2-1:التصنيف العلمي للنوعين *Tribolium confusum* و *Tribolium castaneum*

إنَّ الموقع التصنيفي للحشرتين وحسب ماجاء بهِ Haines ،(1991) كالآتي

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Hexapoda

Class: Insecta

Order: Coleoptera

Superfamily:Tenebrionoidea

Family :Tenebrionidae

Subfamily:Tenebrioninae

Tribe:Triboliini

Genus:*Tribolium*

Species: *castaneum,confusum*

2-2 :دورة حياة الحشرة Life Cycle of Insect

2-2-1 خنفساء الدقيق الحمراء الصدئية *Tribolium castaneum*

إن دورة الحياة المعممة لـ *T.castaneum* هي دورة حياة حشرة كاملة الاعضاء .في ظل الظروف المثلى ، تكون دورة حياة *T.castaneum* هي عادة قصيرة جداً(Haines ،1991).

2-2-1-1 : دور البيضة Egg stage

البيض مائل للبياض صغير للغاية (مجهري) وأسطواني الشكل مع بقايا دقيق ملتصقة بالسطح بمساعدة مادة لزجة تغلف قشرة البيض وتستمر فترة البيض لمدة اسبوع واحد (4–7 أيام)، إذ يقيس