وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة وراثية وتقييم بعض المواد النانوية على بعض الجوانب الحياتية لنوعين من جنس *Dacus* Fabricius,1805 (Diptera:Tephritidae)

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه

فلسفة في علوم الحياة

من قبل الطالب

حسين محمد بريسم التميمي

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

2009

ماجستير علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

2016

بأشراف

أ . د عمار أحمد سلطان **أ . د زياد طارق خضير**

١٤٤٢هـ 2020م

1- المقدمة Introduction :

تُعد محاصيل العائلة القَرعية كالخيار و(خيار القثاء) والقَرع بأنواعهِ المُختلفة كالكوسة ، العسلي والعناگي والبطيخ والرقي من المحاصيل الإقتصادية التي لها أهمية كبيرة في العراق (الشالجي والجوراني ، 2017) ، أذ تصاب ثمار هذه العائلة بأنواع مختلفة من الآفات الحشرية التي تسبب خسائر إقتصادية كبيرة ، والتي تشمل حشرات ذبابة ثمار القرعيات من الجنس *Dacus* (Fabricius,1805) وخصوصاً ذبابة ثمار القرع والخيار من النوع *D. ciliatus* (Loew,1862) وذبابة ثمار البطيخ الكبرى النوع *D. frontalis* (Beker,1922) التي تعود إلى عائلة ذباب الفاكهة Tephritidae رتبة ثنائية الاجنحة Diptera ، إذ تكمن خطورة هذه الآفات الحشرية في كونها تضع بيوضها داخل الثمرة مسببة التوائها وتخصُرها فضلاً عن أنَ يرقاتها تتغذى على الُلب وتترك ثقوبا كثيرة في الثمار بعدَ خروجها للتعذر مما يؤدي إلى تصلب وتعفن وتَلف هذه الثمار (Flaih ،2013)، وقد تمَ تشخيص هذه الأنواع من الحشرات لأول مرة في العراق عام 1989م وبالتحديد في محافظتي واسط وميسان من قبل مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي/ جامعة بغداد على أنَها ذبابة ثمار القرعيات (Moans وAbdul-Rassoul ، 1989) ، وتمتاز هذه الأنواع بسرعة التكاثر والقدرة العالية لأدورها غير الكاملة على الاختباء في لُب الثمار والتربة هرباً من أعدائها الطبيعية الأمر الذي يجعل استخدام المبيدات الكيميائية السائدة حالياً في مكافحتها ليس لهُ فائدة كبيرة في تقليل نسبة الإصابة بها الى حد كبير(Aboragheef ، 2013) ، كذلك أجريت العديد من الدراسات والبحوث لإيجاد الطرائق الأكثر ملائمة لغرض مكافحتها والحصول على نتائج جيدة في تقليل أضرارها الإقتصادية والبيئية بنسبة كبيرة جدا ، ومن هذه الطرق استخدام المكافحة المتكاملة لهذه الحشرة من خلال دراسة العوامل المؤثرة على عملية السكون لها ومنها الفترة الضوئية ودرجة الحرارة والغذاء (Al-Jorani وآخرون ،2014) ؛ أوضحَ (Hanawi وآخرون ،2016) أنَ انتهاء مدة السبات لهذه الحشرة يعتمد بصورة اساسية على ارتفاع درجات الحرارة ، وفي السنوات الاخيرة أتجهَ العديد من الباحثين إلى إعداد دراسات وبحوث علمية الهدف الأهم منها هو التوصل إلى طرائق حديثة لمكافحة ذبابة ثمار القرعيات ومن هذه الطرق استخدام مواد كيميائية ذات تأثير كبير على أدوار حياتها المختلفة لكي تكون الأكثر استخداماً في السنوات القادمة لبرامج المكافحة المتكاملة للآفات الحشرية وتعتمد بالدرجة الأساس على استخدام المواد النانوية Nano- materials مع المبيدات الحشرية الأعتيادية وهذه المواد هي عبارة عن جسيمات صغيرة يتراوح حجمها بين 1-100 نانومتر تُستخدم بكثرة في مكافحة الآفات الحشرية لمعرفة النسبة المئوية لقتل الحشرة في حالة المكافحة بها (علي ، 2017) ؛ أجريت العديد من التجارب الحقلية والمختبرية لتقييم الآثار السلبية والإيجابية للمواد النانوية على النباتات والحيوانات والإنسان قبلَ الشروع باستخدامها لمكافحة

الحشرات (Samih وآخرون ،2011) ؛ أنَ تقنية النانو هي مجال واعد للبحوث الميدانية متعددة التخصصات كونها تفتح مجالاً واسعاً من الفرص في العديد من التخصصات العلمية والتطبيقية مثل المبيدات الحشرية والطب والأدوية والبستنة والزراعة بالإضافة إلى الفوائد الكبيرة لاستخدامها التي تشمل السيطرة على الآفات الحشرية من خلال التحكم بتراكيب وقواعد المبيدات الحشرية في حالة استخدامها مع تلك المبيدات بصورة مشتركة ، والسبب الاساسي لذلك هو أنَ استخدام المبيدات الحشرية لهُ آثار ضارة على الإنسان والحيوان فضلاً عن أنهُ يسبب أحياناً إنخفاض في خصوبة التربة (Spaek وآخرون ،2012) ، كما أظهرت المواد النانوية المستخدمة في مكافحة الآفات الحشرية خصائص جديدة مثل القوة الاستثنائية والتفاعل الكيميائي العالي وامتلاكها القدرة على إحداث تغييرات عديدة في التركيب الجيني لجسم الحشرة ، لذا أصبحت تقنية النانو في السنوات الأخيرة واحدة من أكثر الطرق استخداما لمكافحة الآفات (Bhattacharyya وآخرون ،2010) ، ومن أهم المواد النانوية المستخدمة حالياً لمكافحة مختلف الآفات الحشرية بعدَ خلطها بالمبيدات الاعتيادية وبتراكيز معينة TiO_2,MgO,Ag,ZnO والجسيمات النانوية لكبريتات الكاديوم CdS وNanoimidacloprid وغيرها والتي تمتلك نشاطا مضاداً للميكروبات ومسببات الأمراض النباتية والحيوانية بالإضافة إلى كونها غير سامة أو ضارة للإنسان والحيوان (Jayarambabu وآخرون ،2016) . إنَ إجراء المكافحة باستخدام المواد النانوية يتطلب دراسة تأثيرها على الجينات المسؤولة عن عملية الطيران والخصوبة أو التكاثر للحشرات المدروسة من خلال دراسة التغاير الوراثي الجزيئي بين جينات الحشرة قبلَ وبعدَ إجراء عملية المكافحة لها باستعمال تلك المواد (Cleveland وآخرون ،2012) ؛ تُعد دراسة التغاير الوراثي الجزيئي بينَ الأنواع المختلفة من الحشرات في مناطق معينة يتم تحديدها مسبقا الأساس في نجاح طريقة المكافحة الوراثية لأنَ المادة الوراثية هي الأساس في تطور الكائنات الحية المختلفة (القرةغولي ، 2013) ، وقد استخدمت في الدراسات الوراثية الجزيئية ما يطلق عليها بمؤشرات الدنا DNA Markers وهي عبارة عن تسلسلات من الحامض النووي DNA يمكن من خلالها تحديد أي موقع على الكروموسوم أو الجينوم وبالتالي تستعمل في دراسة جميع العلاقات الوراثية بينَ الأنواع المدروسة من خلال إيجاد البصمة الوراثية بينَ تلكَ الأنواع (Baco وCairns ،2012) ، توضح مؤشرات الـ DNA التغاير في البيانات الوراثية الموجودة عندَ الأنواع المدروسة والناتجة عن حدوث طفرات نقطية من نوع الحذف والاستبدال أو الإضافة أو إعادة الترتيب للنكلوتيدات في جينات الكائنات الحية المختلفة (Moura وآخرون ، 2011) ، لذا استعملها العديد من الباحثين في دراسة التصنيف الجزيئي للأنواع Molecular taxonomy وتصميم الخرائط الوراثية Genetic maps ودراسة التنوع الوراثي Genetic diversity (Jalali وآخرون ، 2015) وفي هذه الدراسة اعتمدت ثلاثة جينات أساسية في دراسة التغاير الوراثي

الجزيئي بين النوعين *D. ciliatus* و*D. frontalis* وهما الجنين CAD وEF1-alpha التي تنتمي إلى دنا النواة والجين COI لدنا المايتوكوندريا ، ومن الدراسات والبحوث العلمية التي يجب إجرائها أيضاً لنجاح مكافحة الآفات الحشرية العائدة لنفس الجنس باستعمال المواد النانوية هي استعمال نظام المقياس الهندسي للشكل الظاهري للجناح Geometric Morphometric of wing لدراسة التغايرات الوراثية الكمية في شكل الجَناح وحجمهِ لأي حشرة لأنهُ يبين مدى الاختلافات التي سوفَ تحدث بينَ أفراد النوع الواحد نتيجة لاستخدام المواد النانوية وهذا النظام هو طريقة حديثة بالنسبة للدراسات المتخصصة في مجال الوراثة الكمية Quantitative genetics ، أنَ الميزة الأساسية لهذا النظام هي الاستخدام الشامل لبيانات شكل الجَناح وحجمهِ من خلال نقاط أو معالم يتم تثبيتها على أماكن معينة في جناح الحشرة ومن خلال تلك البيانات يتم تحليل التباين في شكل وحجم الجناح للأنواع المختلفة (Brereton ، 2015) ، أنَ تقنية المقياس الهندسي لشكل الجَناح وحجمهِ توفر بيانات مهمة جداً في دراسة الأنواع المعقدة من الحشرات كما في الأنواع العائدة لرتبة ثنائية الأجنحة Diptera (Klingenberg ،2011) ، ويعد Comstock (1893) أول من استخدمَ عروق أجنحَة الحشرات في التصنيف التقليدي للأنواع (Karsten وآخرون ، 2016) ، ويستند عمل المقياس الهندسي لشكل الجَناح وحجمهِ على وضع نقاط معالم Landmarks معينة على تقاطعات عروق أجنحة الحشرة بحيث تُسَجل على كل جناح وتؤخذ لها صور رقمية متناسقة تبدأ من قاعدة الجناح وتمتد على طول تقاطعات العروق معَ بعضها البعض وتقاطعات العروق معَ حافة الجناح (Rohlf ، 2013a) ، ومن خلال هذه المعالم تجري المقارنة بينَ جميع الأنواع العائدة لنفس العائلة لإيجاد الحجم المركزي للجناح وبالتالي معرفة التباين الذي يحدث بينها (Rohlf ، 2013b) . نظراً لما تقدمَ من إيجاز حولَ الأهمية الإقتصادية لنوعي ذبابة ثمار القرعيات *D. ciliatus* و*D. frontalis* ولقلة الدراسات الخاصة باستخدام المواد النانوية في مكافحة هذه الأنواع من الحشرات أقترحَ موضوع الدراسة ليتضمن الجوانب التالية :

أولا : الجانب الجزيئي الذي يركز على المقارنة الجزيئية بينَ ذبابتي *D. ciliatus* و*D . frontalis* باستعمال مَعلمات جزيئية متخصصة من دنا النواة والمايتوكوندريا .

ثانيا : الجانب الكمي الذي يركز على المقارنة الوراثية الكمية بينَ النوعين باستعمال نظام المقياس الهندسي لشكل الجَناح وحجمهِ .

ثالثا : الجانب الحياتي الذي يركز على اختبار تأثير أوكسيد المغنسيوم والتيتانيوم النانوي على الهلاك التراكمي لبعض الأدوار الحياتية لكلا النوعين والمقارنة بين نوعي المادة النانوية من حيث التأثير على ذلك .

I

الخُلاصة

دُرست المقارنة الوراثية الجزيئية والكمية والحياتية بينَ نوعين من ذُبابة ثمار القرعيات في وسط العراق وهما *Dacus ciliatus* (Loew,1862) و*Dacus frontalis* (Becker,1922) ، والتي تمَ الحصول على عيناتهما من مختبر الإدارة المتكاملة للآفات / دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا بتأريخ 2/23/ 2019، إذ بلغت مدة الجيل الواحد لكل نوع 25 يوماً من البيضة إلى الحشرة الكاملة ، وبعدَ الانتهاء من تربية حشرات كلا النوعين أجريت المقارنة الوراثية الجزيئية بينَ النوعين أعلاه اعتماداً على عذارى الجيل الثالث المعاملة بالتركيز نصف القاتل (LC_{50} (0.250 ml/L لأوكسيد المغنيسيوم النانوي وغير المعاملة من خلال استخلاص الـ DNA بواسطة عدة الاستخلاص Gnomic DNA Mini Kit-tissue وبواقع 20 عينة قبلَ المعاملة و20 عينة بعدَ المعاملة لكلا النوعين . تراوحت نقاوة الـ DNA المستخلص لجميع العينات ما بينَ 1.8 إلى 2 نانوميتر ، وبعدَ ذلكَ تمَ تضخيم قطعة من الجين لكل من الجينات COI ، CAD و EF-1 alpha بواسطة استعمال تقانة تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR ، إذ أظهرت نتائج التَضخيم بأنَ الوزن الجزيئي للجينات الثلاثة هو 350bp ، 310bp و450bp على التوالي لكل من عينات النوعين المعاملة وغيرالمعاملة ، بعدَ ذلكَ تمَ عمل التسلسل النيوكلوتيدي لكل جين من الجينات الثلاثة وبواقع 16 عينة لكل جين مقسمة إلى 8 عينات لكل نوع أي 4 قبلَ المعاملة و4 بعدَ المعاملة . بينت نتائج تحليل التسلسل النيوكلوتيدي لكل جين من الجينات الثلاثة ولكلا النوعين وجود طفرات نقطية من نوع الحذف والاستبدال موزعة على مواقع مختلفة من التسلسل النيوكلوتيدي عندَ مقارنة عينات النوع الواحد المعاملة بالتركيز نصف القاتل LC_{50} لأوكسيد المغنيسيوم النانوي وغير المعاملة من جهة ومع عينات بنك الجينات المختارة في هذه الدراسة من جهة أخرى ، كما أظهرت نتائج تحليل التسلسل النيوكلوتيدي لكل جين من الجينات الثلاثة وجود طفرات نقطية من نوع الاستبدال في مواقع مختلفة من التسلسل النيوكلوتيدي عندَ مقارنة عينات النوع *D.ciliatus* مع عينات النوع *D.frontalis* الطبيعية غير المعاملة ، ومن خلال شجرة التقارب الوراثي Phylogenetic tree لوحظَ بأنَ قيمة البعد الوراثي بين عينات النوع الواحد المعاملة بالتركيز النصف القاتل LC_{50} لأوكسيد المغنيسيوم النانوي وغير المعاملة تساوي0.00 ولكن بينَ عينات كلا النوعين تساوي 0.03 ، 0.0023 و0.0013 للجينات COI ، CAD و-EF 1 alpha على التوالي من جهة ومع عينات بنك الجينات المختارة في هذهِ الدراسة 0.0085 ، 0.0093 و0.0024 للجينات الثلاثة على التوالي من جهة أخرى ، أما من الناحية الوراثية الكمية فقد أجريت المقارنة بين النوعين باستعمال نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه وهذا النظام يَعتمد على وضع إحداثيات للمعالم ما بينَ تقاطعات العروق الطولية معَ العروق المستعرضة ونهايات العروق الطولية للجناح ، حيث استعملَ في هذهِ الدراسة 30 جناح أيمن لكل نوع وبواقع 15 جناح أيمن للذكور و15جناح أيمن للإناث في كل تحليل . أنَ