وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة وراثية جزيئية وكيميائية مقارنة بين نوعين من جنس *Chrysomya sp.* (Diptera:Calliphoridae) في العراق

رسالة مقدمة الى مجلس

كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى كجزء من متطلبات نيل درجة

الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

شفاء وليد خالد

بكالوريوس علوم حياة 2012

بأشراف

أ.م.د عمار احمد سلطان القرةغولي **أ.م.د غالب ادريس عطية**

١٤٣٩هـ ٢٠١٨ م

المقدمة Introduction

تعد الحشرات كائنات مهمة جداً للإنسان؛ إذ تسبب أنواعٌ مختلفة منها أضراراً للإنسان والحيوان والنبات، ولا ترجع أهميتها لأعدادها الكبيرة فقط ولكن لأدوارها الخطيرة في حياة الإنسان وبيئته والكائنات المتعايشة معه، فالكثير منها يكون ضررها مباشراً بتغذيتها على المنتجات أو المواد التي يستعملها الإنسان (نوشي ،2010)، ويتعدى ضرر الآفات الحشرية التأثير المباشر في صحة الإنسان والحيوان إلى نقله العديد من مسببات الأمراض وتؤلف أنواع الآفات الحشرية التابعة لأغلب عوائل رتبة ثنائية الأجنحة الجزء المهم من الآفات الحشرية الناقلة لمسببات الأمراض التي تضم عائلة الذباب الأسود Simuliidae الناقل لمسببات مرض عمى الأنهار Onchocereiasis وعائلة ذباب الرمل Psychodidae الناقل لمسببات مرض الملاريا Malaria والحمى الصفراء Yellow fever وحمى الضنك Dengue fever والتهاب السحايا Encephalitis وعائلة ذباب الخيل Tabanidae الناقل لمسببات مرض Loiasis وعائلة الذباب المعدني Calliphoridae وذباب اللحم Sarcophagidae التي تقوم العديد من أنواعها بنقل مسببات أمراض الكوليرا والدزنتري وشلل الأطفال والتيفوئيد والسحايا كما ويسبب بعضها أنواعاً عديدة من حالات التدويد Myiasis في الأنسان والحيوان (Ihemanma واخرون ، 2013)، ومن هذه الأنواع ذبابة الدودة الحلزونية *Chrysomya sp.* التي تنتمي إلى عائلة الذباب الأزرق Calliphoridae رتبة ثنائية الأجنحة التي تعد من الآفات الخطيرة جداً على الحيوانات ذوات الدم الحار ومنها حيوانات الحقل الداجنة مثل الأغنام والابقار والماعز، والحيوانات البرية مثل الغزال والأرنب الحقلي والكلاب السائبة والثعالب (Al-Taweel وآخرون، 2000)، إذ تكمن خطورتها في إكمال دورة حياتها ولا سيما يرقاتها التي تعد إجبارية التطفل Obligatory parasite على النسيج الحي مسببة الحالة المرضية المعروفة بالنبر (التدويد) وهذا يؤدي إلى خسائر فادحة في الثروة الحيوانية في حال إهمال الجروح المصابة وقد تؤدي إلى هلاك الحيوانات لاسيما حديثة الولادة فضلاً عن تسببها

في خسائر غير مرئية للحيوانات البرية وذلك لعدم القدرة على متابعتها ومعالجتها، وبالتزامن مع ظهور أنواع اخرى من الذباب المعدني الذي له أهمية طبية وبيطرية تشترك يرقاتها مع يرقات التدويد الأولي Primary myiasis في إحداث الأصابة ومن هذه الأنواع ذباب يعود للعائلة Calliphoridae وهي *Chrysomya megacephalia*، وإن إصابتها تلي الإصابة الأولى Primary infection محدثة إصابة ثانوية Secondary infection تؤدي إلى حالة التدويد الثانوي Secondary mayiasis تعيش هذه الذبابة وتتكاثر بصورة طبيعية على المواد المتفسخة (عكيلي وآخرون، 2016)، وتعد *Ch. megacephalia* مهمة من الناحية الطبية والبيطرية والأقتصادية وبسبب طبيعة حياتها وتغذيتها فإنها تساهم في نقل العديد من مسببات الأمراض للإنسان والحيوان ولاسيما البكتيرية منها، وقد وجد إن ما تنقله بالغات هذا النوع من الممرضات أكبر بكثير مما تقوم بنقله الذبابة المنزلية (Chaiwong واخرون، 2014)، وإن لهذا النوع قدرة فائقة على إكتشاف أماكن الجثث إذ تتمكن هذه الحشرات من شم الروائح المنبعثة من الجثة وتبدأ بوضع البيوض حول الفتحات الطبيعية كالأنف والفم أوالجروح إن وجدت (موسى، 2012)، وقد وجد إن بالغات هذا النوع ذات شبه كبير بذبابة الدودة الحلزونية *Chrysomya bezziana* ولكنها أكبر حجماً وإن وجود هذا النوع من الحشرات له علاقة بوجود ذبابة الدودة الحلزونية *Ch.bezziana* المسببة للتدويد الأولي وإن بالغات ذبابة *Ch.megacephala* تتناوب في التغذية على مثل هذه الجروح محدثة الإصابة الثانوية وغالباً ما توجد في الاماكن القريبة من تواجد الإنسان إذ توجد النفايات والمواد العضوية حيث وجدت منتشرة في غينيا في الجزر القريبة من المحيط الهادي وانتشرت بعد ذلك بصورة واسعة في الهند واليابان وجنوب امريكا (عكيلي، 2010)، يضاف إلى ذلك فإن النوع *Chrysomya albiceps* الذي يعد مهماً في الكشف عن الجرائم وملابسات وظروف الجريمة ووقت إرتكابها ومرتكبها ومعرفة أسباب الوفاة ومكان حدوثها وما إذا تم نقل الجثة من مكانها (Sathe واخرون، 2013)، والذي ينتشر في كل مكان تكثر فيه القمامة،

فضلات الطعام والمجازر، جثث الحيوانات والإنسان، فضلات وروث الحيوانات، يعد من الحشرات ذات الأهمية الطبية والبيطرية ويشكل وجودها بإعداد كبيرة مصدر إزعاج للإنسان وحيوانته الداجنة، فهو يقوم بنقل العديد من مسببات الأمراض للإنسان والحيوان وتساهم في حدوث التدويد الثانوي الاختياري في الحيوان والإنسان مما يؤدي إلى حصول أضرار صحية معقدة قد تترك أثاراً دائمة (Fernandes واخرون، 2009)، وبسبب الضرر الذي تسببه هذه الحشرات فقد تطلب مكافحتها عن طريق الوسائل المعروفة كإستعمال المبيدات الكيميائية المصنعة، كما يمكن لتقنية الحشرات العقيمة ان تكون وسيلة فعالة في مكافحة بعض الآفات من خلال كبح أو خفض سكان الآفة ضمن موقع محدد أو إبادة كاملة أو التخلص من جميع أفراد الآفة في المناطق المعزولة (الربيعي وأخرون، 2016)، إنَّ نجاح هذه التقنية يتطلب بدوره العديد من الدراسات ومنها دراسة التغايرات الوراثية الجزيئية بين المجتمعات السكانية للحشرة في مناطق محدودة يتم اختيارها مسبقا لان المادة الوراثية هي الأساس في تطور الكائنات الحية (القرةغولي، 2013)، ومما ساعد على ذلك علم البيولوجيا الجزيئي Molecular Biology وتقنيات البصمة الوراثية Genetic finger Printing التي تعد من اهم الطرائق التصنيفية للحشرات فضلاً عن اهميتها في دراسة التباين الوراثي بين افراد المجموعات السكانية (Shah واخرون، 2013)، وقد أستخدم في هذه الدراسة إثنان من جينات دنا المايوتوكوندريا mtDNA وهما Cytochrome Oxidaes I و Cytochrome Oxidaes II Gene لدراسة التباين الوراثي لكلا النوعين من الذبابة الحلزونية التابعين لجنس *Chrysomya Sp.*، كما عُدّت تقنية المقياس الهندسي للجناح من قبل الكثيرين احدى الطرق التصنيفية الحديثة والدقيقة لأنواع الحشرات (Bloch ; 2008, Tofilski وآخرون، 2010)، وتعمل تقنية المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح على تثبيت أحداثيات أو نقاط معينة أو معالم Landmarks بحيث تسجل على كل جناح وتؤخذ لها صور رقمية بشكل متناسق وتبدأ هذه النقاط من قاعدة الجناح وتمتد على تقاطعات عروق الجناح مع بعضها البعض وكذلك

تقاطعات العروق مع حافة الجناح (Lyra وآخرون، 2009)، ومن خلال هذه المعالم تجري المقارنة بين أنواع الحشرات في المناطق المراد دراستها وكذلك المقارنة بين أفراد المجموعة السكانية الواحدة وتوضيح مدى التقارب بينها، وللحصول على الحجم المركزي للجناح يتم الاعتماد على الأشكال المضلعة التي تنتج عن الارتباطات بين نقاط المعالم التي توضع على الجناح (القرةغولي، 2013)، كما إنَّ آلية تحليل مكونات الكيوتكل تعد فعالة جداً في تشخيص الأنواع المعقدة والمستترة في الجماعة الواحدة التي يصعب تمييزها مظهرياً، فضلاً عن أنَّ تحليل مكونات الكيوتكل ممكن أن تستخدم كوسيلة تصنيفية لتمييز الاختلافات في النواقل المرضية في رتبة ثنائية الأجنحة، وتتم باستخدام تقنية كروموتوغرافيا الغاز GC لتحليل مكونات الكيوتكل للتمييز بين الانواع، ومن خلال هذه التقنية يتم استخلاص وتشخيص المركبات الهيدروكاربونية التي يتألف منها جليد الحشرة (ثامر وكريم، 2013)، ونظراً لما تقدم من إيجاز حول الأهمية الطبية لكلا النوعين من الذبابة الحلزونية التابعة لجنس *Chrysomya sp.* ولقلة وجود دراسات وراثية جزيئية وكمية وكيميائية حول هذه الحشرة وللتمكن من مكافحة هذه الحشرة والقضاء عليها هدفت الدراسة:

اولاً: مقارنة وراثية جزيئية بين النوعين *Ch.megacephala* و *Ch.albiceps* التابعة لجنس *Chrysomya* باستخدام تقنية PCR وباستخدام بوادئ متخصصة لجيني دنا المايتوكوندريا وهما COI و COII للتوصل إلى درجة التقارب الوراثي بين هذين النوعين.

ثانياً: مقارنة وراثية كمية بين النوعين *Ch.megacephala* و *Ch.albiceps* باستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه.

ثالثاً: المقارنة بين النوعين *Ch.megacephala* و *Ch.albiceps* من ناحية تركيب جدار الجسم والأحشاء الداخلية من المركبات الكيميائية العضوية باستخدام جهاز GC–MS.

الخلاصة

درست العلاقة الوراثية الجزيئية الكمية والكيميائية بين نوعين مختلفين من الذبابة الحلزونية التي تعود للجنس *Chrysomya* وهما *Ch.megacephala* و *Ch.albecips* والتي جمعت عيناتها من بعض مناطق وسط العراق متمثلة بمحافظة ديالى، وقد تم دراسة الحشرة من ثلاثة جوانب مختلفة، الأول هو الدراسة الوراثية الجزيئية والجانب الثاني هو الدراسة الوراثية الكمية ، أما الجانب الثالث فهو الدراسة الكيميائية للحشرة الكاملة مشتملة على جدار الجسم والأحشاء الداخلية، إذ استخدم في هذه الدراسة الطرق الحياتية الجزيئية من أجل الكشف عن التنوع الوراثي الجزيئي والكمي لهذين النوعين من الحشرة، وقد تم استخلاص الحامض النووي الـ DNA من جسم الحشرة الكاملة وذلك باستخدام عدة الاستخلاص Genomic DNA Mini Kit-Tissue، ومن ثم تم ترحيل الـ DNA المعزول على هلام الاكاروز ترحيلاً كهربائياً، وتراوحت نقاوة الـ DNA المعزول من 1.8–2 نانومتر ، وبعدها تم تضخيم قطعة من الـ mtDNA والذي يتألف من الجين Cytochrome Oxidase I و Cytochrome Oxidase II باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل وبوجود زوجين من البوادئ المتخصصة وبواقع زوج لكّل جين وباتجاهين أمامي Forward، وعكسي Reverse، ثم جرت دراسة التسلسل التتابعي لجزء من جيني المايتوكوندريا COI وCOII والمضخم بوساطة الـ (PCR) إذ درس التسلسل التتابعي لـ 24 عينة وبواقع 12عينة لكل نوع، حيث أظهرت نتائج التسلسل التتابعي تنوع وراثي واضح بين عينات النوعين المختلفين من الذبابة الحلزونية وإن هذا التنوع كان عبارة عن طفرات نقطية من نوع الحذف والاستبدال وذلك عندما تم مقارنة تسلسل القواعد النتروجينية بين النوعين، وايضاً عند المقارنة مع عينتي بنك الجينات لكل جين، وقد تم حساب عدد الطفرات وتحديد مواقعها ونوعها لكل عينة من عينات النوعين قيد الدراسة.