جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة – ديالـــــــــــــــــى
كلّية التربية للعلوم الصرفـــــــة
قسم علوم الحيـــــــــــاة

دراسة جزيئية وبايوكيمياوية مقارنة لاربعة أنواع من عائلة الخنافس الأرضية (Family: Caribide) في محافظة ديالى

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلّية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الَمِاجستير في علوم الحياة

من قبل الطالب

عمار عبد الواحد جباره

بكالوريوس علوم الحياة – كلّية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى
2017-2016

إشراف

أ.د. عمار أحمد سلطان

1443هـ 2022 م

المقدمة Introduction

تشكلّ رتبة الخنافس 40% من رتب الحشرات المشخصة، إذ تعدُّ أنواعها من أكثر الانواع التي تم وصفها وتقدر الانواع المعروفة لها بين 5–8 مليون نوع، ولا تزال حتى اليوم تكتشف وتعرف انواع جديدة مِنها، فضلاً عن الانواع التي وجدت في المتحجرات (Kesdek، 2012). تتواجد الخنافس في معظم البيئات، من الحقول إلى الغابات والصحاري، على الرغم من ان بعض الانواع تكون مرتبطة بانظمة بيئية معينة مثل المروج او حقول المحاصيل، كما يمكن ان تستخدم كمؤشرات احيائية لتقييم تغييرات إستخدام الأراضي بين مختلف النظم البيئية (Certini وآخرون،2021).

تعدُّ الخنافس الأرضية carabid مجموعة متنوعة من الحشرات بأعداد تصل إلى أكثر من 40000 نوع في جميع انحاء العالم ، 2000 نوع منها تعيش في أمريكا الشمالية، إذ يتراوح احجام الخنافس البالغة بين 2مم إلى أكثر من 35مم (حوالي 1/8 بوصة إلى 1 بوصة) (Saska ، 2004)، أنَواعها الليلية ذات لون اسود او بني، تتواجد تحت الكتل ترابية او الصخور او جذوع الأشجار. ويمكن تمييز الخنافس الأرضية عن غيرها من انواع الخنافس الأخرى عن طريق سرعة تحركها نهاراً، قسم منها ذات الوان زاهية او منقوشة، ولها ارجل طويلة مما يسمح لها بالتحرك بسرعة لالتقاط الفريسة ولتجنب الحيوانات المفترسة الأخرى (Atamehr ،2013).

وهي تعدُّ من أهم المكونات للنظم البيئية الطبيعية والبشرية وتأتي أهميتها عن طريق حياتيتها المتنوعة وتواجدها في معظم البيئات وان أهمية الخنافس تأتي من الدور الأساسي لها في تنظيم اعداد مجموعة من الحشرات والرخويات واللافقريات الأخرى (Prosser وآخرون،2016)، ان البعض منها كخنفساء الدقيق وخنفساء سوسة القطن تتغذى على الحشرات واليرقات وبذلك فهي تعدُّ من عوامل المكافحة البيولوجية المهمة في النظم البيئية الزراعية بانواعها المختلفة (De Heij و Willenborg ،2020) وفي الوقت نفسه فان بعض انواع الخنافس الأرضية تعدّ من الانواع الانتهازية التي تستهلك

مجموعة متنوعة من الأغذية، ومع ذلك لوحظ ان غالبية الانواع مفترسة في المقام الأول وتتغذى على الحشرات الأخرى. تحدد معظم الانواع موقع الغذاء عن طريق البحث العشوائي على، وقد لوحظ ان الأناثَ تميل إلى اتباع نظام غذائي أكثر تنوعاً من الذكور وذلك لغرض زيادة حجم البيض وعدده (Lovie واخرون ،1996).

ان العديد منها تتغذى على المواد المخزونة كالأرز والقمح وبعضها تلتهم وتقضم الأشجار وهي بذلك تعدُّ آفة منزلية وزراعية تقضم الأثاث من الداخل وتهلك الزرع والمحصول (Rusynov وآخرون، 2019)، ومنها الجنس*Distichus planus* والجنس *Harpalus rufipes* الذي يعد المفترس الشائع للبذور وهو واسع الانتشار، إذ تم ادخاله إلى امريكا الشمالية في عام 1937 (Harrisonو Gallant ،2012)، إذ يتميز بجسم بيضوي ممدود وارجل مائلة إلى الحمرة وتتفاوت اطوالها من 1–25 ملم (Reshetniak وآخرون،2021) وهي خنافس كثيرة الحركة وتكون أكثر نشاطاً خلال الليل، وهذا النوع من الخنافس الأرضية يقوم بخزن البذور في الجحور تحت بقايا النباتات، كما انها تكون أكثر نشاطاً في المناطق ذات الغطاء النباتي مقارنة في تلك التي حرثت مؤخراً (Gospodarek و Petryszak ، 2019).

تمتاز الخنافس الأرضيه بتنوع دورات حياتها، إذ تتكاثر في فصل الخريف، وهي تسبب ضرراً لمحاصيل الحبوب القمح والدخن والشعير والشوفان وبدرجة أقل على النباتات البقولية كالبازلاء والفاصوليا والفول والمحاصيل الصناعية كالبنجر والبطاطس وزهرة عباد الشمس، وان الضرر الذي يسببه هذا النوع يكون كبيراً لانها فضلاً عن استهلاكها بذور وبراعم النباتات الزراعية فهو يهلك الأعشاب (Raupach وآخرون،2020).

يطلق على الاجناس *Chlaenius ningricornis* و الجنس *Barchinus bayardi* بالخنافس القاذفة وذلك بسبب نظامها الدفاعي عند تعرضها للخطر، إذ بإمكانها اطلاق رذإذ كيميائي

ضار على هيئة دفعات نبضيه سريعة، ويكون القذف مصحوباً بصوت فرقعة، إذ تقوم الخنفساء القاذفة بانتاج وتخزين نوعين من المركبات البايوكيمياوية في غدتان متخصصتان تقعان في نهاية بطن الحشرة متمثلة بالهيدروكينون وبيروكسيد الهيدروجين، فعندما تتعرض للتهديد تقبض الخنفساء العضلات التي تدفع المادتين المتفاعلتين عبر فتحات الى خارج جسمها اذ تكون هاتين المادتين الكيمياويتين غير فعالة وذلك بسبب تثبيطهما من قبل انزيمات متخصصة وعند اختلاطها تخضع المواد المتفاعلة لتفاعل كيميائي عنيف، وهو ما يؤدي إلى رفع درجة الحرارة لما يقرب من نقطة غليان المياه (Bousquet ،2012)، وان تراكم الضغط المقابل يدفع صمامات المدخل من غرف تخزين المتفاعلات للإغلاق، (Piper و2007,ROSS).ان يرقات هذا الجنس تكون عبارة عن اشباه طفيليات خارجية ويعتمد حجم جسمها البالغ على حجم عوائلها، متوزعة على نطاق واسع على المناطق الجغرافية باستثناء البر الرئيس لأستراليا (Jernelöv ، 2017).

بدأت الدراسات الجزيئية المنهجية في عام 1970 لأول مرة بإستخدام 16s rRNA لتصنيف البكتيريا (Gholamzadeh and Incekara ، 2016). في العشرين إلى 25 عأما الماضية، تم إستخدام الأدوات الجزيئية في مجموعات الكائنات الحية المختلفة على نطاق واسع لهذا الغرض (Patwardhan وآخرون،2014).

من المحتمل ان يتضمن نظام التصنيف النهائي للمملكة الحيوانية ما لا يقل عن 10 ملايين نوع مقسمة بين أكثر من مليون جنس. وبالنظر إلى هذا التنوع الكبير، فقد اصبح هناك إدراك متزايد انه من الضروري السعي للحصول على مساعدة تتقنية للوصف الأولي للكائنات والأعتراف بها لاحقًا (Ragan وآخرون،2014). أثار تطبيق بيانات الحمض النووي في التصنيف وتشخيص الانواع قدرًا كبيرًا من الجدل، ولكن هناك اتفاق عام على ان المعلومات الوراثية الجزيئية مفيدة لربط مراحل تطور

مختلفة من الكائنات الحية ولتحديد العينات المحفوظة جزئيًا غير المناسبة للدراسة المظهرية(Briggs وSummons ،2014) .

إذ توفر بيانات الحمض النووي نظأما للشخصية عالميًا لتشخيص جميع مراحل الحياة مع إمكانية التغلب على مشاكلَ العمل مع إشارات مختلفة. ولمعرفة الأختلافات بين الانواع قيد الدراسة فان هذا يتطلب العديد من الدراسات ومنها دراسة التغايرات الوراثية الجزيئية بين الأجناس المستخدمة في الدراسة في مناطق محددة من الجين يتم اختيارها مسبقا لان المَادة الوراثية هي الأساس في تطور الكائنات الحية (القرةغولي ،2013) .

تم بالفعل إستخدام نهج قائم على الحمض النووي لربط مراحل النمو المختلفة من أجل تحديد الصفات الوراثية للأفات الزراعية والانواع الغازية (Cock وآخرون، 2017) والحشرات ذات الأهمية الجنائية Forensics Entomology (Moemenbellah وآخرون،2018) ويرقات بعض الأنواع المتطفلة (Poyet وآخرون، 2013) والانواع المهددة بالانقراض Extinetion في مراحل حياتها المبكرة (Kueneman وآخرون، 2016). ومما ساعد على ذلك علم الاحياء الجزيئي Molecular Biology وتقنيات البصمة الوراثية Genetic finger Printing التي تعدُّ حديثاً من أهم الطرائق التصنيفية للحشرات فضلاً عن أهميتها في دراسة التباين الوراثي Genetic diversity بين الانواع (Gairola وآخرون، 2018) .

تم ايضاً إجراء محأولاًت أولية لمسح مجموعات اليرقات أو اليرقات المختلطة والبالغات بإستعمال طرائق دراسة الحامض النووي (Smith وآخرون،2018)، وتسمح دراسات المحتوى التصنيفي المتزايدة لقواعد بيانات الحامض النووي وتكنولوجيا التسلسل السريع الان ببناء الأشجار على نطاقات أكبر (Krehenwinkel وآخرون، 2019).

ومع ذلك، تعمل منهجيات علم الوراثة التقليدية على استيعاب مجموعة البيانات الضخمة هذه، في حين ان التقنيات المطورة حديثًا والأكثر قدرة على التعامل مع التحليلات واسعة النطاق، لم يتم انشاؤها بشكلً عام. في العقد الَماضي، سمح التقدم التقني في علم الاحياء الجزيئية لعلَماء الأحياء التطورية بجمع مجموعات كبيرة من بيانات تسلسل الحمض النووي في فترة زمنية قصيرة إلى حد معقول. وقد فتح هذا الطريق لدراسات مستفيضة حول نمط تطور العديد من الجينات الميتوكوندريا والنووية ولإستخدام تسلسل الحمض النووي لإعادة بناء العلاقات التطورية على مستويات تصنيفية مختلفة (Gauthier وآخرون، 2019).

يمكن تقسيم الواسمات الجزيئية Molecular markers الى واسمات الحمض النووي واسمات البروتين. تم إستخدام علأمات الحمض النووي على نطاق واسع بسبب عيوب الانزيمات المتجانسة والأيزوزيمات Isozymes التي يمكن الأشارة إليها باسم واسمات البروتين. تقدم الأف الجينات المشفرة للبروتين في الجين النووي لحقيقية النواة مصدر غني غير مستغل للبيانَات الوراثية لأبحاث علم الوراثة. تُظهر هذه الجينات عددًا من الخصائص المفضلة لتحليل النشوء والتطور (Khlestkina ، 2014). يمثل تحديد الانواع مكونًا محوريًا لدراسات التنوع الاحيائي والتخطيط لحفظ الانواع، ولكنه يمثل تحديًا للعديد من الانواع عند إستخدام السمات المظهرية فقط (على سبيل المثال، التحديد الصحيح لغير البالغين أو لمراحل اليرقات). ونتيجة للتقدم التقني الهائل في علم الاحياء الجزيئية خلال العشرين عأما الَماضية، أصبحت البيانات الجزيئية شائعة بشكلً متزايد في تحديد الانواع (Barke وآخرون، 2015).

إكتسب التضخيم العشوائي متعدد الاشكالRandom Amplified Polymorphic DNA (RAPD) أهمية نظراً لبساطته وكفاءته وعدم الحاجة إلى معلومات التسلسل الوراثي المسبقة، ومن ثم فقد تم إستخدامه بنجاح لدراسة أوجه التشابه الجيني وتحليل النشوء والتطور (Jain وآخرون،

2010). تستخدم علأمات RAPD بنجاح لتحديد انواع الحشرات المختلفة (Zahoor وآخرون، 2013). علاوة على ذلك، فانه يوفر فرصة لتقدير الأرتباط داخل الانواع المختلفة وفيما بينها بناءً على تباين الحامض النووي. يمثل الترميز الشريطي للحامض النووي المكون الرئيس في مجموعة أدوات التشخيص الحديثة لدراسات تقييم التنوع الالاحيائي الجزيئي والبحث التصنيفي (Hajibabaei وآخرون،2016). تعتمد فائدة الترميز الشريطي للحمض النووي على افتراض ان التباين الوراثي داخل النوع أصغر بكثير من التباين بين الانواع (Ratnasingham و Hebert ،2007).

ان آلية تحليل مكونات الكيوتكلّ Cuticle تعدُّ فعالة جدًا في تشخيص الانواع المعقدة والمستترة في الجماعة الواحدة التي يصعب تمييزها مظهرياً، فضلاً عن ان تحليل مكونات الكيوتكلّ ممكن ان تستخدم كوسيلة تصنيفية لتمييز الأختلافات في النوأقل المرضية في رتبة غمدية الأجنحة، وتتم بإستخدام تقنية كروموتوغرافيا الغاز(GC–MS) Gas Chromatography-Mass Spectrophotometer لتحليل مكونات الكيوتكلّ للتمييز بين الأجناس، وعن طريق هذه التقنية يتم استخلاص وتشخيص المركبات الهيدروكاربونية التي يتألف منها جليد الحشرة (ثامر وكريم ، 2013).

بالنظر لَمِا تقدم من أهمية الخنافس الأرضية في السيطرة البيولوجية على الحشرات الضارة الأخرى ولعدم وجود دراسات جزيئية وكيميائية تصنيفية للخنافس الأرضية في العراق. لذا اقترح موضوع الدراسة لتشمل الجوانب الأتية:

أولاً: الجانب الوراثي الجزيئي والذي يتضمن ايجاد العلاقة الوراثية بين الأجناس *H. rufipes*، *B. bayardi*، *D. planus* و *C. nigricornis*. في الدراسة ورسم شجرة النشوء والتطور Phylogenetic tree بإستخدام معلَمِات جزيئية عشوائية ومعلَمِات جزيئية متخصصة.

ثانيا: الجانب الكيميائي والذي يتضمن تحليل المحتوى الكيميائي للجسم لأجناس *H. rufipes* ، *B.bayardi*، *D. planus* و *C. nigricornis*. المستخدمة في الدراسة والمقارنة بين هذه الاجناس فيما تحتويه اجسامها من مركبات كيميائية.

وقد هدفت الدراسة الحالية الى :-

1-دراسة التنوع الوراثي في بعض أنواع الخنافس الأرضية.

2-دراسة العوامل الوراثية المشتركة بين بعض أنواع الخنافس الأرضية في المنطقة (كنوع ممثل عن كل جنس).

3-دراسة الامكانية والاستفادة من المكونات البايوكيمياوية لكيوتكل الحشرات الأرضية.

الخلاصة

تعدُّ عائلة الخنافس الأرضية Carabidae أكبر عائلة في رتبة غمدية الأجنحة Coleoptera من حيث عدد الأجناس والانواعِ إذ يقدر عدد الانواع التابعة لها حوالي 40000 في جميع انحاء العالم. تم جمع 60 عينة لبعض أجناس هذه العائلة من بساتين محافظة ديالى بواقع 15 عينة لكلَّ من الأجناس المتمثلة بالانواع *Distichus planus*، *Harpalus rufipes* ، and *Chlaenius nigricornis* *Brachinus bayardi* للمدة من بداية اب 2021 لغاية ايلول 2021 . قسمت العينات hgn مجموعتين تضمنت المجموعة الأولى 20 عينة بواقع 5 عينات لكلَّ نوع استعملت في الدراسة الجزيئية، والمجموعة الثانية تضمنت 40 عينة بواقع 10 عينات لكلَّ نوع استعملت لغرض الدراسة الكيمائية. تضمنت الدراسة الجزيئية استخلاص الحامض النووي الدنا لكلَّ نوع من انواع الدراسة الحالية بإستعمال عدة الأستخلاص Genomic DNA mini kits .

أظهرت نتائج الدراسة الجزيئية للبوادئ العشوائية البالغ عددها 10 بوادئ 36 حزمة منها 32 حزمة ذات تعدُّدية شكلَّية عند المقارنة بين الأجناس الأربعة ، إذ اعطى البادئ OP-B18 أعلى عدد حزم ذات تعدُّدية شكلَّية والبالغ عددها 6 حزمة بينما اعطى البادئ OP-A08 أقل عدد حزم ذات تعدُّدية شكلَّية والبالغ عددها 2 حزمة أما البوادئ OP–A15 ، OP–B09 و OP-B14 لم تعطي أي حزمة ذات تعدُّدية شكلَّية، إذ كان عدد الحزم 0.0 عند المقارنة بين الأجناس الأربعة ، وأظهرت النتائج، ايضاً ان كلَّ من البوادئ OP-A04 ، OP-A08 ، OP-C06 ، OP-C10 و OP-C18 أعطت نسبة 100% لكفاءة البادئ ، بينما البادئ OP-C15 اعطى نسبة 60% لكفاءة البادئ ، وان أعلى نسبة مئوية للمقدرة التمييزية ظهرت عند البادئ OP-A04 وهي 28.125% بينما أقل نسبة مئوية ظهرت عند البادئ OP-A08 وهي 6.25% أما البوادئ OP-A15 ، OP-B09 و OP-B14 لم تعطي أي نسبة مئوية للمقدرة التمييزية، إذ كانت النسبة 0.0% .