التوزيع الوراثي لخنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculatus*(F.) (Coleoptera: Brachidae) في ثلاث مناطق مختلفة في العراق

عادل علي حيدر[1] ، برهان مصطفى محمد[2] ، حقي إسماعيل خليل[3]

[1]قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة كركوك ، كركوك ، العراق

[2]قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[3]كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

(تاريخ الاستلام: 15 / 1 / 2013 ---- تاريخ القبول: 17 / 3 / 2013)

الملخص

نظرا لقلة الدراسات الوراثية الجزيئية حول حشرة خنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) في العراق، فقد تم دراسة الاختلافات الوراثية فيها بتقنية التفاعل البنائي ألتتابعي PCR (Polymerase Chain Reaction) ومضاعفة المورثة النووية 28SrDNA باستعمال بوادئ متخصصة لثلاث مجتمعات سكانية لهذه الحشرة أخذت من ثلاث مدن عراقية هي كركوك ، اربيل و تكريت من بذور اللوبيا المحلية المصابة (Leguminaceae or Fabaceae) L. *Vigna unguiculata*. أظهرت النتائج تشابه الأنماط المظهرية للحشرات وظهور أنماط حياتية تختلف مع بعضها في تتابعات النيوكلوتيدات وتراوحت المسافة الجينية بين العينات (0 - 0.26).

المقدمة

تعتبر العائلة البقولية (Leguminaceae or Fabaceae) من أهم العوائل النباتية لكونها تضم عددا كبيرا من المحاصيل الاقتصادية المهمة التي تستعمل كغذاء للإنسان ، والبعض من أجزائها كأعلاف للحيوانات، ومن أهمها بذور اللوبيا (Cowpea) L. *Vigna unguiculata* Walp. ، وتأتي بالمرتبة الثانية بعد محصولي الحنطة والشعير الحبوبية كمادة غذائية مهمة ومصدرا للبروتين الذي يؤلف من 20–32% من مكوناتها[1&2]. بالإضافة إلى احتوائها على نسب عالية من الكالسيوم ، الحديد ، فيتامينات B1، B2 والأحماض الامينية. وتقوم بزيادة خصوبة التربة من خلال تثبيتها للنايتروجين نظرا للعلاقة التكافلية التي تجمعها ببكتريا العقد الجذرية [3&4] . وقدرت المساحة المزروعة بها في العراق عام 2009 بـ 46712 دونم بمتوسط إنتاجية بلغت 1534.4 كغم [5]. تحتوي بذور اللوبيا على مثبطات للتريسين Trypsin والكيموتريسين Chymotrypsin، وكذلك على مركبات سيانوجينية Cyanogenic compounds وجميعها مركبات ضارة بالصحة ، الا أن هذه المركبات تتحطم بالحرارة ويتم التخلص منها عند الطبخ [6] . تهاجم محاصيل البقوليات العديد من الآفات الحشرية في الحقل والمخزن وتعد خنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera:Bruchidae) واحدة من أكثر الآفات إصابة لها في الحقل والمخزن على حد سواء [7]. تنتشر هذه الحشرة في معظم أنحاء العالم وخاصة أفريقيا وأمريكا الجنوبية وكذلك الشمالية ، وفي العراق فهي منتشرة في المحافظات الوسطى والجنوبية [8] . وتكمن خطورتها في انها متعددة العوائل (Polyphagous) وليرقات هذه الآفة القدرة على النمو والتطور على حوالي 35 نوعا من أنواع بذور البقوليات [9]. ووجد [10] إن نسب فقد الوزن في بذور اللوبيا التي من قبل هذه الحشرة لبذوراللوبيا قد تصل تصل إلى 90% بعد ستة أشهر من الخزن . وأحيانا ترتفع إلى 100% في بعض سلالاته [11]. ولاحظ [12] إن الحشرة الواحدة من خنفساء اللوبيا تستهلك ما يقارب 0.026 غم من وزن بذرة اللوبيا . ونظرا للأهمية الاقتصادية لهذه الحشرة وقلة الدراسات الوراثية عنها في العراق فقد تمت دراسة المورثة 28SrDNA بطريقة التفاعل البنائي التتابعي Polymerse Chain Reaction (PCR) لدراسة أختلاف المواقع الجغرافية القريبة من بعضها على التنوع الوراثي لخنفساء اللوبيا الجنوبية و لتوفير قاعدة بيانات حول هذه الحشرة والحصول على شجرة تطورها (Phylogenitic tree) لغرض الاستفادة منها في التصنيف و برامج المكافحة .

المواد وطرائق العمل

1- جمع العينات:

تم جمع بالغات خنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculatus* F. من بذور اللوبيا الحمراء المحلية (Local) المصابة من اسواق ثلاثة مدن في العراق وهي تكريت (Tikrit) ، كركوك (Kirkuk) وأربيل (Erbil) جدول (**1**) ونسبت إليها شفرات TC, KC, EC على التوالي ، شخصت الحشرات الكاملة فيما بعد في المتحف التاريخ الطبيعي في جامعة بغداد وسجلت إحداثيات مواقع جمع العينات باستخدام جهاز تحديد المواقع العالمية (GPS-etrex-Tiwan) ، وبيانات المناخ لكل منطقة من الهيئة العامة للأنواء الجوية والرصد الزلزالي ، وشخصت بذور اللوبيا الحمراء من قبل الهيئة العامة لفحص وتصديق البذور في أبي غريب . ربيت عينات من حشرات كل منطقة على بذوراللوبيا الحمراء مختبريا في الحاضنة في درجة حرارة 30±2 $^{\circ}$م ورطوبة نسبية 70±5 % لغاية الجيل الرابع (4G) للحصول على أجيال نقية وراثيا ،عزلت من كل عينة لكل منطقة خمسة أزواج من الكاملات (5 ذكور + 5 إناث) بعمر يوم واحد و وضعت كل زوج من الأزواج الخمسة من هذه الحشرات لكل عينة (5 ذكر + 5 أنثى) على 20 غم من بذور اللوبيا المعقمة

(خمس مكررات) داخل قناني زجاجية سعة (800) مل معقمة وأحكمت فوهاتها بواسطة قماش الململ ذو تهوية جيدة وربطت بأحزمة مطاطية ووضعت في الحاضنة على درجة حرارة30±2 ° . وضبطت الرطوبة النسبية 70±5 %وحفظت جميع الحشرات [30 حشرة (زوج لكل مكرر)] بواقع خمسة أزواج لكل منطقة أو مدينة بعد نفوقها مباشرة وكلا على حدة في كحول 70% داخل أنابيب اختبار بلاستيكية معقمة حجم 5 مل مرقمة لحين الاستعمال .

جدول (1) توضح مناخ ومواقع وسنة جمع العينات

المدينة	تكريت	كركوك	أربيل
المنطقة	المركز	المركز	المركز
GPS	34°54'10.05''N 43°37'27.00''E	35°28'11.09''N / 44°23'11.00''E	36°11'211.''N / 44°00'52.00''E
شفرة العينات	TC	KC	EC
سنة الجمع	2011	2011	2011
عدد العينات	10	10	10
معدل الرطوبة النسبية السنوية%	42.50	44.41	49.66
معدل كمية الأمطار السنوية mm	8.73	18.48	21.78
معدل سرعة الرياح السنوية m/ s	2.78	1.47	2.99
معدل درجات الحرارة السنوية°C	22.99	24.84	23.05

2- استخلاص الحمض النووي الدي اوكسي رايبوزي (DNA extraction) من *C.maculatus*

تم إجراء هذه العملية في مختبر البحوث في كلية العلوم – قسم علوم الحياة – جامعة كركوك ، أزيل الصدر (Thorax) من الحشرات كلا على حدة وأهملت الأجزاء الأخرى لتجنب التلوث [13]. باستعمال مشرط صغير معقم تحت المجهر التشريحي Olympus (Japan) . واستخلص الحمض النووي ألـ (DNA) باستعمال الطقم الجاهز G-spin Genomic DNA Extraction Kit ForCell/Tissue(Promega,USA). قيست نقاوة جميع العينات بواسطة جهاز Nano Drope Spectrophotometre (ND 1000, USA) وباستخدام البادئ (primer) جدول(2) والمجهزة من (Cinnagen–Iran) تم مضاعفة الموروثة 28SrDNA gene

جدول (2) أسم وموقع وتتابع الموروثة 28SrDNA المستخدمة في الدراسة

اسم الموروثة	موقعه	اسم البادئ	تتابع البادئ	المصدر
28S rDNA	النواة	D2CFD45F	5’–TACCGTGAGGGAAAGTTGAAA- 3’	[14]
		D2CRD45R	5’-AGACTCCTTGGTCCGTGTTT-3’	

بعملية التفاعل البنائي التتابعي PCR باستخدام GoTaq® Green Master Mix(Promega USA) الذي يتكون من GoTaq® DNA Polymerase 2X و dATP 400µM، 400µM dCTP،dGTP 400µM ، dTTP 400µM و MgCl2 3mM. وكما هو موضح في جدول **(3)** ، بجمع ظروف التفاعل 30 عينة داخل أنبوبة ابندروف (Eppendorf) حجم 1.5Ml ومن ثم نقل 25 µl من المجموع الكلي 750 µl إلى أنابيب ابندروف حجم 0.5Ml عدد 30، وضعت جميع الأنابيب في جهاز المبلمر الحراري PCR(Techne Tc.512, UK) بعد برمجتها جدول **(4)** .

جدول (3) أحجام المحاليل المستعملة لغرض مضاعفة ألـDNA لحشرات *C.maculatus*

المواد	حجم المحاليل المستعملة للعينة الواحدة
Master mix	10µl
F.Primer	2.5µl
R. Primer	2.5µl
DNA template	3.0µl
Nuclease free water	7.0µl
Total	25 µl

جدول (4) يمثل برنامج PCR للموروثة *28SrDNA* gene

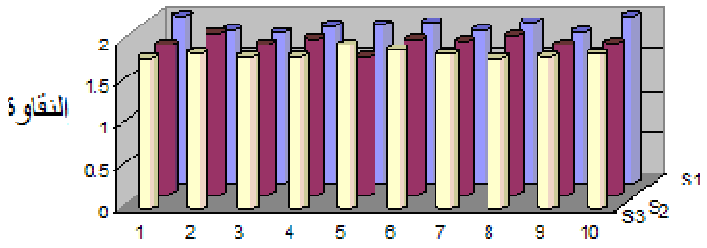
Program of PCR	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95 °C	2 min.	1
Denaturation	95°C	50 sec.	35
Annealing	48°C	50 sec.	
Extension	72°C	50 sec.	
Final extension	72°C	3min.	

Total time of PCR=2hr. and 5min

بعد انتهاء وقت البرنامج (2ساعة و5 دقائق) ، نقلت من كل أنبوبة 10µl من ناتج ألـ PCR (PCR product) إلى شريط لاصق مثبتة على سطح معقم محملة بـ 3µl من صبغة التحميل Loding dye (Bromophenol blue) وبعد المزج نقلت إلى هلام الاكاروز(1.5% gel agarose مع ethidium bromide 2µl) وتم الترحيل بجهاز (Gel electrophoresis (Akhtarian, Iran بفولتية 110 لمدة ساعة واحدة ثم اليفحص مباشرة تحت جهاز الأشعة فوق البنفسجية (Major science UK) وصور الهلام باستخدام كاميرا (Sony 14.1, Mega Pixel, Japan). وقبل إجراء عملية تتابع الحمض النووي (DNA sequencing)، أجريت عملية ألتفاعل البنائي التتابعي (PCR) مرة ثانية وأزيلت 6 حزم تمثل زوج أحدهما ذكر والاخر أنثى لكل منطقة لغرض دراسة التتابع فيه من الهلام بعد انتهاء العملية وجرت ننقيته باستعمال Gel purification kit (Geneaid- Korea) وتم إجراء التتابع في مركز الجينوم (Genome Center) في كلية العلوم والصحة في جامعة كويه (Koya University) بطريقة سنجر Sanger (procedure) ، باستخدام (Gene analytical sequencer AB Applied (Biosystems HITACHI, USA) وبمساعدة برنامج (Chromas software version 5.3.1,Germany) من الحاسوب مباشرة . اجريت عملية اصطفاف التتابع (Sequence Alignment) بالتتابع الموجود لهذه الموروثة في مصرف الجينات في (CBI (National Central Biotechnology Information في الانترنيت مع التتابع الناتج من هذه الدراسة والحصول على شجرة التطور باستخدام برنامج Geneious 5.5.6 (version) وتحديد مناطق حدوث الطفرات فيها.

النتائج والمناقشة

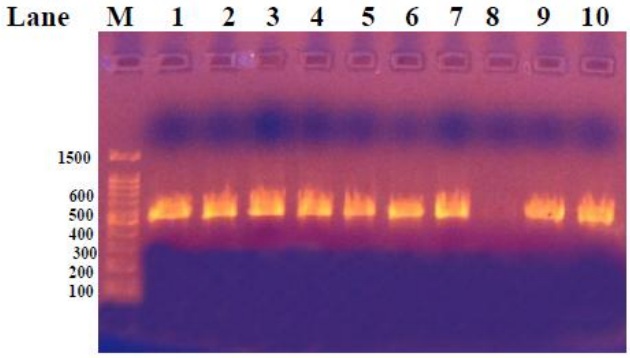
يوضح النتائج في الشكل **(1)** نقاوة مستخلصات الحمض النووي ألـDNA التي تراوحت بين(1.80 -2.00) لجميع العينات فقد تراوحت نقاوتها في حشرات مدينة كركوك (KC) وأربيل (EC) وتكريت (TC) بين (1.80-2.0) و (1.80 -1.95) و (1.80-1.96) على التوالي مما يدل على نقاوتها وانعدام الفروق المعنوية فيما بينها [14] .



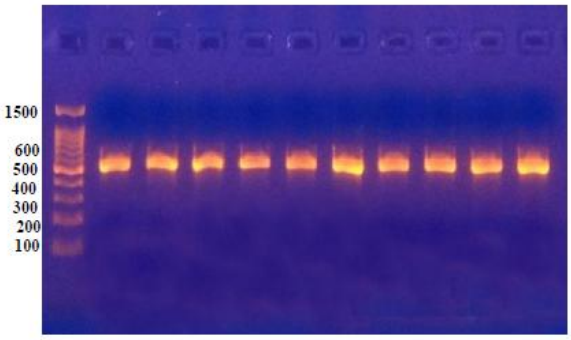
شكل(1) نقاوة الحامض النووي المستخلص لجميع العينات

S1:KC , S2: EC,S3: TC

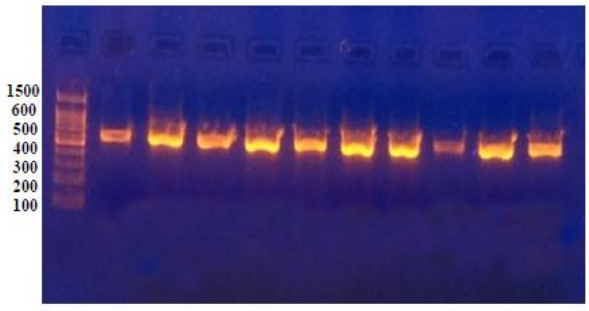
وبينت نتائج الهلام (صورة **1**) تكوين حزم (Bands) لجميع العينات تراوحت حجم ألـ DNA بين (600-500bp) وتتفق هذه النتيجة مع [15] و[16] حيث كانت(550bp) و (600bp) على التوالي لنفس الحشرة في السنغال .ولا تتفق مع [17] و[18] التي كانت (404bp) و (724bp) على التوالي في غرب أفريقيا .



KC (Kirkuk *Callosobruchus*)



EC (Erbil *Callosobruchus*)



TC (Tikrit *Callosobruchus*)

صورة 1 حجم ألـDNA لحشرات خنفساء اللوبيا الجنوبية والمعزولة باستخدام تقنية ألـPCR على هلام الاكاروز (1.5%)
1-5: Male , 6-10: Female, (M): Marker 1500bp

وكانت نتائج تتابعات الحامض النووي لجميع العينات على النحو التالي :

-sample-1-28s. KCM.seq……..440bp

CTTGAAAAGGGGTTCAGAAGTAAGTGAACCGTTCAGGGGTAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAA
AGGGGAAAGAAAAAAAAAGGTCGGATATCGGCGATGAGCAGCCGCGTGATGGAAGGCGTTCGCG
TTGTCCGCGCCTTCTGTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTTTTCCCCTAGTAGGACGTCGC
GATCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGAGTCCGTGTGCGATCGTTTCGGCGATTCGTGCT
CGAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACGGTATACAGATGGCGCGAGGCCGCTACGTTAAT
TAGCGTCCGACCCACGGCAAGCGCGTTCGATGCTAAGACGGCGATCGGACCTAGTGCCGATTCCGT
TTCCGGACGACTGTTGGCCTTGTGTATATCTTGGGCAGATCCTCG

|> gb|AY625367.1 Callosobruchus maculatus 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=724
Score = 648 bits (718), Expect = 0.0
Identities = 407/436 (93%), Gaps = 3/436 (1%)
Strand=Plus/Minus

اصطفاف تتابعات ذكر خنفساء اللوبيا المعزولة من كركوك مع تتابعات مصرف الجينات

```
Sample 2   TTGAAAAGGG-GTTCAGAAGTAAGTGAA-CCGTTCAGGGGTAA-CCTGAGAAACCCGAAA 58
                                                                        
G.bank 436 TTGAAGAGAGAGTTCAAGAGTACGTGAAACCGTTCAGGGGTAAACCTGAGAAACCCGAAA 7

Sample 59  GGTCGAAAGGGGAAAGaaaaaaaaaGGTCGGATATCGGCGATGAGCAGCCGCGTGATGGA 8
                                                                        
Sbjct 376  GGTCGAAAGGGGAAATTCATTCGCGTCTCGGATATCGGCGATGAGCAGCCGCGTGACGGA 17

Sample 119 AGGCGTTCGCGTTGTCCGCGCCTTCTGTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTTTT 8
                                                                        
Sbjct 316  TGGCGTTCGCGTTGTCCGCGCCTTCTGTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTTTT 57

Query 179  CCCCTAGTAGGACGTCGCGATCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGAGTCCGTG 38
                                                                        
Sbjct 256  CCCCTAGTAGGACGTCGCGATCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGAGTCCGTG 97

Query 239  TGCGATCGTTTCGGCGATTCGTGCTCGAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACGG 298
                                                                        
Sbjct 196  TGCGATCGTTTCGGCGATTCGTGCTCGAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACGG 37

Query 299  TATACAGATGGCGCGAGGCCGCTACGTTAATTAGCGTCCGACCCACGGCAAGCGCGTTCG 58
                                                                        
Sbjct 136  TATACAGATGGCGCGAGGCCGCTACGTTAATTAGCGTCCGACCCACGGCAAGCGCGTTCG 77

Query 359  ATGCTAAGACGGCGATCGGACCTAGTGCCGATTCCGTTTCCGGACGACTGTTGGCCTTGT 418
                                                                        
Sbjct 76   ATGCTAAGACGGCGATCGGACCTAGTGCCGATTCCGTTTCCGGACGACTGTNGGCCGNGN 17

                                                Query 419  GTATATCTTGGGCAGA 434
                                                                        
                                                Sbjct 16   GGATCTCTCGGACAGA 1
```

-sample 6-28s1.KCF.seq…….460bp

TTTAAAAGGCCCAGGGATTATAACTAATTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGAACTTCTATTGTT
CAATGAATTGGGAGGGGAATCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGAATTTCATTTTT
TATTACCATTTATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAGGATCAAAT
AACCCCCTCGGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCTATTTCACATATAAAGAC
ATTTTAGGCATATTAATTATATTATTTTTATTAACATTTTTAACACTCTATTCACCCTATTTTCTAGG
AGACCCTGATAATTTCACACCAGCGAATCCCTTAGTAACTCCTGCCCATATTAAGCCAAAATGATA
CTTCTTATTCGCCTATGCAATCCTACGGTCAATTCCTAATAAATTAGGAGGGGTAAAA

> gb|EF484385.1 Callosobruchus maculatus isolate Africa cytochrome b (cytb) gene,

partial cds; mitochondrial
Length=437
Score = 690 bits (764), Expect = 0.0
Identities = 396/405 (98%), Gaps = 0/405 (0%)
Strand=Plus/Plus

اصطفاف تتابعات أنثى خنفساء اللوبيا المعزولة من كركوك مع تتابعات مصرف الجينات

```
Query  18   TTATAACTAATTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGAACTTCTATTGTTCAATGAATTG  77
            ||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  33   TTATTACTAATTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGAACTTCTATTGTTCAATGAATTT  92

Query  78   GGAGGGGAATCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGAATTTCATTTTTTAT  37
            ||  |||||  |||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||
Sbjct  93   GGGGGGGATTCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGCATTTCATTTTTTAT  52

Query  138  TACCATTTATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAGGAT  97
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  153  TACCATTTATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAGGAT  12

Query  198  CAAATAACCCCCTCGGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCtatttca  57
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  213  CAAATAACCCCCTCGGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCTATTTTA  72

Query  258  catataaagacattttaggcatattaattatattattttattaacatttttaacactct  17
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  273  CATATAAAGACATTTTAGGCATATTAATTATATTATTTTTATTAACATTTTTAACACTCT  32

Query  318  attcaccctatttCTAGGAGACCCTGATAATTTCACACCAGCGAATCCCTTAGTAACTC  77
            |||||||  |||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||
Sbjct  333  ATTCACCTTATTTTCTAGGAGACCCTGATAATTTCACACCAGCAAATCCCTTAGTAACTC  92

Query  378  CTGCCCATATTAAGCCAAAATGATACTTCTTATTCGCCTATGCAA  422
            |||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  393  CTGCCCATATTAAGCCAGAATGATACTTCTTATTCGCCTATGCAA  437
```

-sample1-28s1.ECM.seq……518bp

CCTAGGAAAAGAATTCCAGAGTACGTGAACCGTTCAGGGGTAAACCTGAGAACCCGAAAGGTCGA
AAGGGGAGGGGGAGCTCCTCTCGGATATCGGCGATGAGCAGCCGCGGAGGGATGGGGTTCGCGTT
GTCCGCGCCTTCTGTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTTTTCCCCTAGTAGGACGTCGCGA
TCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGAGTCCGTGTGCGATCGTTTCGGCGATTCGTGCTCG
AACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACGGTATACAGATGGCGCGAGGCCGCTACGTTAATTA
GCGTCCGACCCACGGCAAGCGCGTTCGATGCTAAGACGGCGATCGGACCTAGTGCCGATTCCGTTT
CCGGACGACTGTTGGCCGTGTGTTATCTCTCGGACAGACCTCGTTCGAAACGCTGATCTGCGACGC
TATAGCTTTGGGTACTTTCAGGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTTATTAA

> gb|HQ845243.1.Callosobruchus maculatus isolate KAMK-03 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=551
Score = 710 bits (786), Expect = 0.0
Identities = 458/493 (93%), Gaps = 6/493 (1%)

Strand=Plus/Plus

اصطفاف تتابعات ذكر خنفساء اللوبيا المعزولة من أربيل مع تتابعات مصرف الجينات

```
Query  10   AGAATTCCAGAGTACGTGAA-CCGTTCAGGGGTAAACCTGAGAA-CCCGAAAGGTCGAAA  67
           ||| ||| |||||||||||| |||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct  40   AGAGTTCAAGAGTACGTGAAACCGTTCAGGGGTAAACCTGAGAAACCCGAAAGGTCGAAA  99

Query  68   GGGGAGGGGGAG-CTCCTCTCGGATATCGGCGATGAGCAGCCGCG-GAGGGATGGGGTTC  25
           |||||   | | | | |||||||||||||||||| |||| || ||| || ||||
Sbjct  100  GGGGAAATTCATTCGCGTTTCGGATATCGGCGATGAGCAGTCGCGTGACGGACGGCGTTC  59

Query  126  GCGTTGTCCGCGCCTTCT-GTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTTTTCCCCTAG  84
           |||| |||||| |||| | ||||| |||||||| |||||||||||||||||||| |
Sbjct  160  GCGTCGTCCGCTCCTTGTTGTTTTCCGAACCGGTAACGAACGCGTGCACTTTTCCCCTGG  19

Query  185  TAGGACGTCGCGATCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGAGTCCGTGTGCGATC  44
           |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  220  TAGGACGTCGCGATCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGAGTCCGTGCGCGATC  79

Query  245  GTTTCGGCGATTCGTGCTCGAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACGGTATACAG  304
           || |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  280  GTCTCGGCGATTCGCGCTCGAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACGGTATACAG  39

Query  305  ATGGCGCGAGGCCGCTACGTTAATTAGCGTCCGACCCACGGCAAGCGCGTTCGATGCTAA  64
           |||||||||||||||||| |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  340  ATGGCGCGAGGCCGCTACGTAAATTAGCGTCCGACCCGCGGCAAGCGCGTTCGATGCTAA  99

Query  365  GACGGCGATCGGACCTAGTGCCGATTCCGTTTCCGGACGACTGTTGGCCGTGTGTTATCT  24
           |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||| | ||||
Sbjct  400  GACGGCGATCGGACCTAGCGCCGATTCCGTTTCCGGACGACTGTTGGCCGTGCG-GATCT  58

Query  425  CTCGGACAGACCTCGTTCGAAACGCTGATCTGCGACGCTATAGCTTTGGGTACTTTCAGG  84
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  459  CTCGGACAGACCTCGTTCGAAACGCTGATCTGCGACGCTATAGCTTTGGGTACTTTCAGG  18

Query  485  ACCCGTCTTGAAA  497
           |||||||||||||
Sbjct  519  ACCCGTCTTGAAA  531
```

-sample6-28s1. ECF.seq……..515bp

TTTTTCGGGTTCACCTTTAAGGATCAGAGTCGTGAACCGTTCGGGGTAATCCTGCCCTTTCCGAAAG
GTCGAAGGGGAAGAAAGGGGAAGGGGAATGGGAGGACTCTTGAGGAAAGAGAAGCGTGTCGGCC
TTCTGTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTGTTCCCCTAGTAGGACGTCGCGATCCGTTGGG
TGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGATTTCGTGTGCGTTCGTTTCGGCAATTCGTGCTCGAACCCGCGA
TGTTCCGGCCGACTCAGTCGACGGTAAACAGATGGGGCGAGGCCGCTACCTTAATTTGCGGCCGAC
CCCGGGACATTCCCCCCCCGGTGATAACCACAGGGAACGGCCCCCCTGCTGAATCCCTATCCGGAC
CTCTTGTTGTCTCTTTTGGATCCCCCGGGGAAAATTTCTAATAATGGGGGGGCTGAATAAACTTTCC
TTTGGGTAATTTTAGGACACGTCTTTAAAACATGCGACCAGGGGAACTTAC

> gb|FJ000438.1Callosobruchus maculatus 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=428
Score = 316 bits (350), Expect = 8e-83Identities = 193/205 (94%),
Gaps = 0/205 (0%)
Strand=Plus/Plus

اصطفاف تتابعات أنثى خنفساء اللوبيا المعزولة من أربيل مع تتابعات مصرف الجينات

```
Query                                                                 129
       GCCTTCTGTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTGTTCCCCTAGTAGGACGTCGCG  88
                                                                     |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  71   GCCTTCTGTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTTTTCCCCTAGTAGGACGTCGCG
                                                                     30

Query  189  ATCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGATTTCGTGTGCGTTCGTTTCGGCAATT
                                                                     48
                                                                     |||||||||||||||||||||||||||||||| | ||||||| |||||||| |||
Sbjct  131  ATCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGAGTCCGTGTGCGATCGTTTCGGCGATT
                                                                     90

Query                                                                 249
       CGTGCTCGAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCAGTCGACGGTAAACAGATGGGGCGAGGC  08
                                                                     |||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||| |||||||| |||||||
Sbjct                                                                 191
       CGTGCTCGAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACGGTATACAGATGGCGCGAGGC  50

                                                    Query  309  CGCTACCTTAATTTGCGGCCGACCC  333
                                                                 |||||| |||||| ||| |||||||
                                                    Sbjct  251  CGCTACGTTAATTAGCGTCCGACCC  275
```

-sample 1.28s.TCM.seq……..451bp
CAACGGAGGGCCTTTCTCGGGATTCGAAGGACTAGGGCGGAAAAGCGAGGGCAGGAGCATGAGGC
GCTTGCCGTGGGTCGCACGCTGGTGACCATAGCGTGCTCTTTTCATCTGTTACCGTCCAGCGAGTCG
TGCGGGACATCCTGGGGTCCAGCACGAATCGCCGAAACGATCGCACACGGACTCTACCGCGAGCC
GTAGACCGACTCCCGACGAATCGCGCCGTCGTATTAGGGGAAAAGGGGGCCCCTTCGTCACCGGTT
CTAAAACCAAAAGGCGCGGACAACGCATAACGCCATCGGTAACGGGCCTGCTGCCGCTAATTTTCC
AGACCCAATGTTATTTTCCCTGTTCCTCTTTGAGGGTTCTCCATGTTAACCCTTAACCGGTTCCCCTA
TACTCTTTGAACTCTCTCTTCAACCCGTCTTTTAAACTTTCCCCACGGGAAAAT

>gb|AY625367.1 Callosobruchus maculatus 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=724
Score = 300 bits (332), Expect = 5e-78
Identities = 305/386 (79%), Gaps = 10/386 (3%)
Strand=Plus/Plus

اصطفاف تتابعات ذكر خنفساء اللوبيا المعزولة من تكريت مع تتابعات مصرف الجينات

```
Query  64   GCGCTTGCCGTGGGTCGCACGCTGGTGACCATAGCGTGCTCTTTTCATCTGT-TACCGTC  22
            ||||||||||||||||| |||||  | | | |||||  |||   |||||||  |||||||
Sbjct  82   GCGCTTGCCGTGGGTCGGACGCTAATTAACGTAGCGGCCTCGCGCCATCTGTATACCGTC  41

Query                                                                  123
      CAGCGAGTCGTGCGGGACATCCTGGGGTCCAGCACGAATCGCCGAAACGATCGCACACGG  82
            |||||||||  |||  |||||  |||  ||  ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                                                                  142
      GAGCGAGTCGGCCGGAACATCGCGGGTTCGAGCACGAATCGCCGAAACGATCGCACACGG  01

Query                                                                  183
       ACTCTACCGCGAGCCGTAGACCGACTCCCGACGAATCGCGCCGTCGTATTAGGGGAAAAG  42
            ||||  |||||||||||||||||  |||  |||  ||||||  ||||  ||  ||||||||||
Sbjct                                                                  202
      ACTCCACCGCGAGCCGTAGACCGACACCCAACGGATCGCGACGTCCTACTAGGGGAAAAG  61

Query                                                                  243
       GGGGCCCCTTCGTCACCGGTTCTAAAACCAAAAGGCGCGGACAACGCATAACGCCATCGG  02
            | | | ||||||||||||||  ||||  ||  ||||||||||||||  |||||||| |
Sbjct          262          TGCACGCGTTCGTCACCGGTTCGAAAAACAGAAGGCGCGGACAACGC-
                                                          GAACGCCATCCG  20

Query  303  TAACGGGCCTGCT-GCCGCTAATTTTCCAGAC-CCAATGTTATTTTCCCTGTTCCTCTTT  60
            | ||| | |||||   |||  ||  | | | |||| | ||||  | ||||||  |||  | ||
Sbjct  321  TCACGCGGCTGCTCATCGCCGATATCCGAGACGCGAATG--AATTTCCCCTTTCGACCTT  78

Query  361  GAGGGTTCTCCATGTTAACCCTTAACCGGTTCCCCTATACTCTTTGAACTCTCTCTTCAA  20
            |||||   ||  |||  ||||  | |  |||||  | |  |||||  ||||||||||||||||
Sbjct  379  TCGGGTTTCTCAGGTTTACCCCTGAACGGTTTCAC-GTACTC-TTGAACTCTCTCTTCAA  36

                                                Query  421  CCCGTCTTTTAAACTTTCCC-CACGG  445
                                                    | |||||  |||||||||  |||||
                                                Sbjct  437  AGTG-CTTTTCAACTTTCCCTCACGG  461
```

-sample6-28s1.TCF.seq……..508bp

GGAGGGTCAGAGTACGTGACGTTCAGGGTATCCTGAGCAACCCGAAGGTCGAAGGGGAAAGGGAG
GCGCGTCTCGGATATCGGCGATGAGCAGCCGCGTGACGGAAGGAAGTTCGCGTTGTCCGCGCCTTC
TGTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTTTTCCCCTAGTAGGACGTCGCGATCCGTTGGGTGT
CGGTCTACGGCTCGCGGTGGAGTCCGTGTGCGATCGTTTCGGCGATTCGTGCTCGAACCCGCGATG
TTCCGGCCGACTCGCTCGACGGTATACAGATGGCGCGAGGCCGCTACGTTAATTAGCGTCCGACCC
ACGGCAAGCGCGTTCGATGCTAAGACGGCGATCGGACCTAGTGCCGATTCCGTTTCCGGACGACTG
TTGGTCTTGTTGTTTCTCTCGGACAGACCTCGTTCGAAACGCTGATCTGCGACGCTATAGCTTTGGG
TACTTTCAGGACCCGTCTTGAAAACTCGGGACCAAGGGAGTCTTA

> gb|FJ000438.1 Callosobruchus maculatus 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=428
Score = 704 bits (780), Expect = 0.0
Identities = 410/419 (98%), Gaps = 3/419 (1%)
Strand=Plus/Plus

اصطفاف تتابعات أنثى خنفساء اللوبيا المعزولة من تكريت مع تتابعات مصرف الجينات

```
Query                                                                 67
      CGCGTCTCGGATATCGGCGATGAGCAGCCGCGTGACGGAAGGAAGTTCGCGTTGTCCGCG  26
                                                                        
Sbjct 13    CGCGTCTCGGATATCGGCGATGAGCAGCCGCGTGACGGATGGC-GTTCGCGTTGTCCGCG
                                                                      71

Query                                                                127
      CCTTCTGTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTTTTCCCCTAGTAGGACGTCGCGA  86
                                                                        
Sbjct 72    CCTTCTGTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTTTTCCCCTAGTAGGACGTCGCGA
                                                                      31

Query                                                                187
      TCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGAGTCCGTGTGCGATCGTTTCGGCGATTC  46
                                                                        
Sbjct 132   TCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGAGTCCGTGTGCGATCGTTTCGGCGATTC
                                                                      91

Query                                                                247
      GTGCTCGAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACGGTATACAGATGGCGCGAGGCC  06
                                                                        
Sbjct                                                                192
      GTGCTCGAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACGGTATACAGATGGCGCGAGGCC  51

Query                                                                307
      GCTACGTTAATTAGCGTCCGACCCACGGCAAGCGCGTTCGATGCTAAGACGGCGATCGGA  66
                                                                        
Sbjct                                                                252
      GCTACGTTAATTAGCGTCCGACCCACGGCAAGCGCGTTCGATGCTAAGACGGCGATCGGA  11

Query  367  CCTAGTGCCGATTCCGTTTCCGGACGACTGTTGGTCTTGTTGTTTCTCTCGGACAGACCT
                                                                      26
                                                                        
Sbjct  312   CCTAGTGCCGATTCCGTTTCCGGACGACTGTTGGCCGTG-TGGATCTCTC-GACAGACCT
                                                                      69

Query  427  CGTTCGAAACGCTGATCTGCGACGCTATAGCTTTGGGTACTTTCAGGACCCGTCTTGAA
                                                                     485
                                                                        
Sbjct  370   CGTTCGAAACGCTGATCTGCGACGCTATAGCTTTGGGTACTTTCAGGACCCGTCTTGAA
                                                                     428
```

وبينت نتائج الاصطفاف النيوكلوتيدات (Alignment) جدول (7) مع التتابعات المسجلة في مصرف الجينات (Gene bank) أن نسب التعريف (Identities) قد تراوحت بين (79-98) % وسجلت أعلى نسبة للتعريف بين ذكور وإناث الحشرة في كركوك بلغت (93 و98) % على التوالي بينما سجلت تكريت اقل نسبة تراوحت بين (79-98) % على التوالي . وتتفق هذه النتائج مع [20] الذين لاحظوا وجود اختلافات وراثية بين الذكور وإناث خنفساء اللوبيا *C.maculates* في مستويات الوزن الجزيئي لكلا الجنسين ضمن نفس المجموعة المرباه على حبوب ألماش (Mung) (L) *Vigna radiata* .

جدول (5) نسب التعريف بين جميع العينات مع مصرف الجينات

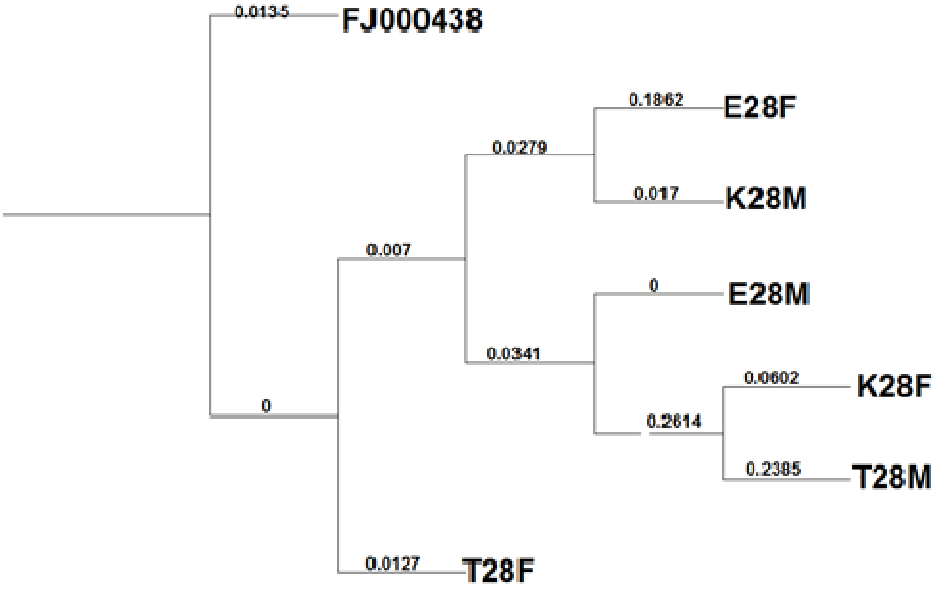
الموقع Version	التوافق Accession	نسبة التعريف Identities %	أزواج القواعد bp	ألجين Gene	الجنس Sex	شفرة الحشرة Insect code	رقم العمود Lane No.
AY625367.1	AY625367	93	440	28SrDNA	Male	KC	1
HQ845243.1	HQ845243	93	518			EC	
AY625367.1	AY625367	79	451			TC	
HQ845243.1	HQ845243	98	460		Female	KC	6
FJ000438.1	FFJ000438	94	515			EC	
		98	508			TC	

وأظهرت نتائج الجدول **(6)** تتابعات الحشرة بطريقة سنكر ، وتظهر الاختلافات الوراثية بوضوح عند مقارنة هذه التتابعات مع تلك الموجودة في مصرف الجينات (Gene bank) ، وقد ترجح هذه الاختلافات إلى الطفرات النقطية نتيجة لحدوث تغيرات في نيوكلوتيدة واحدة أو أكثر، ومن خلال الجدول تم تعداد جميع أنواع الطفرات ، وقد أظهرت طفرات الاستبدال (Transvertion) نسب عالية بلغت 50.31% تلاها الإحلال المكافئ (Transition) إذ بلغت 38.36% ولا تتفق هذه النتائج مع [16] والتي كانت نسب الإحلال المكافئ والاستبدال فيهما 62% و28% على التوالي ولكن نسبة الحذف المسجلة في دراسته 10% كانت قريبة من نتائجنا والتي بلغت 8.17%. ووجدت جميع حالات الحذف بين الذكور في جميع العينات والتي قد تكون بسبب طول عمرها مقارنة بالإناث [18] وهذا يعني بان فرص تعرضها للعوامل البيئية تكون أكثر من الإناث .

جدول (6) أنواع التغيرات الوراثية ونسبها المئوية للمورثة 28SrDNA لجميع المناطق

اسم المورثة Gene name	رقم العمود Lane No.	شفرة العينة Sample code	الإحلال المكافئ Transition	الاستبدال Transvertion	حذف Deletion	إضافة Insertion	المجموع Total
28SrDNA	1	KCM	7 (%31.81)	12 (%54.54)	3 (%13.63)	0	22 (%16.92)
		ECM	15(%44.11)	13(%38)	6 (%17.64)	0	34(%26.15)
		TCM	28(%37.83)	40(%54.05)	4 (%5.40)	2 (%2.70)	74(%56.92)
	المجموع	**3**	**50 (%39.06)**	**65(%50.78)**	**13 (%10.00)**	**2 (%1.56)**	**130**
	6	KCF	6 (%66.66)	3 (%33.33)	0	0	9 (%31.03)
		ECF	3(%25)	9(%75)	0	0	12 (%41.37)
		TCF	2(%25)	3(%37.5)	0	3 (%37.5)	8(%27.58)
	المجموع	**3**	**11(%37.93)**	**15(%51.72)**	**0.00**	**%(10.34)**	**29**
المجموع الكلي	**6**	**6**	**61 (%38.36)**	**80(%50.31)**	**13(%8.17)**	**5 (%3.14)**	**159**

وعند رسم شجرة التطور (Phylogenetic tree) وجدت المسافة الجينية بين العينات قد تراوحت بين 0-0.26 وأظهرت أنثى مدينة تكريت تباينا في المسافة مع قريناتها وقد تعود إلى تكوين أنماط حياتية (Biotypes) والتي تكون سائدة في الآفات الحشرية المخزنية أو بسبب نقل البذور المصابة لمسافات طويلة [20] .ووجد[21] إن العامل الجغرافي (Geographical factor) جدول (1) هو المحفز الأساسي لتكوين أنماط شبيهة (Subunits) ضمن المجتمع السكاني (Populations) .



شكل (1) شجرة التطور والمسافة الجينية بين العينات لحشرة خنفساء اللوبيا الجنوبية

المصادر

1. Salunke, D.K. (1982).Legume in human nutrition : current status and future research needs. Current Science. 93: 1173-1178.

2- Embaby, E.M. and Abdel Galil. M. (2006). Seed borne fungi and mycotxtin associated with some legume seed in Egypt. J. Appl. Sci. Resh., 2(1). 1064-1071.

3 - محمد علي ، عبد الزهرة كاظم. (1980) . دراسة تصنيفية لعائلة حنافس البقول في العراق . رسالة ماجستير، كلية العلوم – جامعة بغداد . العراق .

4- معيوف ، محمود احمد (1982). مدخل البقوليات في العراق. مطابع مديرية دار الكتب للطباعة والنشر– جامعة الموصل ،ص285.

5-مديرية الإحصاء الزراعي / الجهاز المركزي للإحصاء. (2009) . التقرير السنوي لإنتاج المحاصيل والخضروات. بغداد.

6- Fery , R. L. (1990). The cowpea: production, utilization, and research in the United States .Hort. 12: 197-222.

7– العزاوي، عبد الله فليح . مهدي، محمد طاهر . (1983) . حشرات المخازن . مديرية مطبعة جامعة الموصل. ص436.

8- الزبيدي ، فوزي شناوة. (1975) . تأثير درجات الحرارة والرطوبة النسبية غير الملائمة على نمو وبقاء أدوار معينة من خنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculatus* F. من عائلة سوسة البقول (Coleoptera: Bruchidae) من رتبة غمدية الاجنحة . رسالة ماجستير، كلية العلوم– جامعة بغداد ، العراق.

9-السنجاري ، سفيان حجي سيدو. (1975) .أستخدام الاشعة المايكروية لمكافحة خنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculatus* F.) (Coleoptera: Bruchidae) وتأثير ذلك في حياتيتها. رسالة ماجستير ، كلية التربية– جامعة الموصل . العراق.

10- Seck, D., Lognoy,G., Haubruge,E., Marlier,M. andGaspar,C. (1996). Alternative protection of cowpea seeds against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Bruchidae: Coleoptera) using hermitic storage alone or in combination with senegalensis (pers) lam ex poir . J.Stored Prod. Resh. 32:39-44.

11- Hashem, M.Y.(2000). Suggested procedures for apply carbon dioxide to control stored medicinal plant products from insect pests. J. Plant. Dis. Prot. 107: 212-217.

12- Umeozor, O .C. (2005) . Effect of the infection of *Callosobruchus maculatus* (Fab.) on the weight loss of stored cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Walp. J. Appl. Sci. Environ. Mngnt. 9(1): 169 -172.

13- Wang, Q. and Wang, X. (2012). Comparison of methods for DNA extraction from a single Chironomid for PCR analysis. Pakistan. J. Zool. 44 (2): 421-426.

14- Omar, W.W., Shafie, M.S.B. and Kasim, Z. (2009). DNA Extraction from different tissue of Cassidula aurisfelis for PCR study. Nature and Science. 7(9): 8-14.

15- Kergoat, G.J., Delobel, A., Fediere, G., Ru, B.L. and Silvain,J.F.(2005). Both host-plant phylogeny and chemistry have shaped the African seed – beetle radiation. Mol . Phylogenet. Evol. 35(3): 602- 611.

16- Ndiaye, A, Gauthier, P. and Sembene, M . (2011). Genetic discrimination of two cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) Bruchid (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae): *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Bruchidius atrolineatus* (Pic.) .Inter. J . Pla . Anim .Envi . Sci. 1(2): 196 – 201.

variation in polymorphic males of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) by RAPD-PCR. Cytologia. 71 (1): 57-62.
20- Tran. B.M.D. and Credland P.F. (1995). Consequences of inbreeding for the cowpea seed beetle, (*Callosobruchus maculatus* F., Coleoptera Bruchidae). Biolo. J. Linn. Soci. 56. 483-503.
21- Raja, M., William, S, J. and Hussian, K, J. (2009). Genitic diversity of *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). Popula. Intre .J. Integra.Biolo.8(1) : 15-18 .
17- Ndong, A, Kebek, H, Thiaw, C, Diome, T and Sembene,M. (2012). Genetic Distribution of the Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Bruchid *Callosobruchus maculatus* F., Coleoptera, Bruchidae) Populations in Different Agro-Ecological Areas of West Africa. J. Anim. Sci .Adv. 2(7): 616-630.
18- Lale, N, E , and Vidal , S. (2001) . Intraspecific and interspecific competition in *Callsobruchus maculatus* (F.) and *Callsobruchus subinnotatus* (Pic) on stored bambara groundnut *Vigna subterranae* (L.) verdcourt. j. Stor. Prod. Resh .37(4): 329-338.
19-Gill, T.K., Kumri, S., Sharma, V. L.,Badran, A.A.,Kumari ,M. and Sobit, R.C. (2006). Genetic

Genetic distribution of the southern cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in three different locations in Iraq

Adil A. Hayder[1] , Burhan. M. Mohammed[2] , Haqi , I . Kalil[3]
[1] *Faculty of science , Kirkuk university , Kirkuk , Iraq*
[2] *Faculty of Education , Tikrit university, Tikrit , Iraq*
[3] *Faculty of agriculture , Tikrit university , Tikrit , Iraq*

(Received: 15 / 1 / 2013 ---- Accepted: 17 / 3 / 2013)

Abstract
Due to little information's about the molecular genetics of the southern cowpea insect *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera: Bruchidae) in Iraq , therefore this investigation was done to study the genetic differences using of PCR technique (Polymerase Chain Reaction) and amplifying nuclear gene (28Sr DNA) with specific primers for three community populations of this insect taken from three cities in Iraq Kirkuk, Erbil and Tikrit from infested local cowpea seeds *Vigna unguiculata* L. (Leguminaceae or Fabaceae). Results revealed the similarity in phenotypes of *C. maculatus* populations and appearances biotypes difference from each other in nucleotide sequences ,and the genetic distance among samples ranged between (0 - 0.26).