دراسة انتاجية ووراثية لخنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae)

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

[1] كلية العلوم ، جامعة كركوك ، كركوك ، العراق

[2] كلية التربية ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

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

الملخص

اللوبيا *Vigna unguiculata* (L.) Walp من المحاصيل البقولية التي تزرع في أفريقيا الاستوائية لبذورها الغنية بالبروتينات ، المشكلة الرئيسية في المحافظة عليها بعد الحصاد في الحقول والمخازن نظرا لمهاجمتها من قبل العديد من الآفات الحشرية ومن أهمها خنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) والتي تسبب خسائر كمية ونوعية كبيرة للبذور المصابة عن طريق ثقب البذور ، تقليل الوزن والقيمة التجارية وا ِنبات البذور . ونظرا لقلة الدراسات الجزيئية حول هذه الحشرة في العراق، فقد تم دراسة الاختلافات الوراثية بتقنية التفاعل البنائي ألتتابعي PCR (Poly Chain Reaction) ومضاعفة مورثة بيوت الطاقة (سايتوكروم ب) باستعمال بوادئ متخصصة لثلاث مجتمعات سكانية كركوك ،اربيل و تكريت في العراق ، أظهرت النتائج إن معدل الحشرات البازغة على بذور اللوبيا كانت 37.2، 27.6 و 20.6 للمناطق الثلاثة على التوالي وتشابهه الأنماط المظهرية وظهورأنماط جينية تختلف مع بعضها في تتابعات النيوكلوتيدات وتراوحت المسافة الجينية بين العينات (0 - 0.19).

المقدمة

تعد اللوبيا Cowpea (*Vigna unguiculata*) (L.) Walp. من المحاصيل البقولية التي تعود إلى عائلة البقوليات (F: Leguminaceae or Fabaceae) التي يرتفع فيها نسبة البروتين عن بقية الخضر البقولية ويعتقد إن اسم اللوبيا مشتقة من اليونانية ومن الكلمة (Lobus) بمعنى قرن[1] ، وقد زرعت اللوبيا منذ القدم في أفريقيا واسيا، ونقلت إلى الأمريكيتين في القرن السابع عشر [2]،وتعتبر نيجيريا (Nigeria) أكبر دولة منتجة ومستهلكة للوبيا ، إذ تقدر إنتاجها السنوي بـ 2 مليون طن متري [4 &3] . تزرع اللوبيا لأجل استعمال القرون الخضراء والبذور الجافة ، وتوكل أوراقها والأفرع الصغيرة في المناطق الاستوائية من أفريقيا واسيا ، تعد اللوبيا من بين أهم الخضر الورقية في عديد من الدول الأفريقية [5]. تصاب البقوليات وخصوصاً اللوبيا بالعديد من الآفات الحشرية الحقلية و المخزنية التي تسبب خسائر اقتصادية كبيرة منها ، من اللوبيا (*Aphis craccivora* Koch) ، ثربس الازهار (*Megalurothrips sjostedti*) وسوسة المخزن Storage weevil ومن أهمها خنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) [6] . تعد هذه الحشرة من الآفات المهمة التي تهاجم بذور البقوليات في الحقول والمخازن والذي يؤدي إلى فقدانها الكثير من قيمها الغذائية والاقتصادية نتيجة لفقدانها الكثير من خصائصها منها الوزن والبروتين ونسب الإنبات ، إضافة إلى الروائح الكريهة المصاحبة للإصابات الشديدة في المخازن نتيجة للاختلاط أجسام الحشرات الميتة وبقايا جلود انسلاخها وفضلاتها مع البذور [7] . إن معظم الأضرار تحدثها الأطوار اليرقية جراء تغذيتها على الحبوب وقد تصل الخسائر إلى 80% من الوزن الجاف للبذور عند تركها دون حماية لمدة 6 أشهر [8] . وترتفع إلى 87% خلال 9 أشهر [3] إن الدراسات التي أجريت على الحشرات الذي اعتمدت بشكل أساسي وجوهري على الصفات المظهرية ، لتحديد الاختلافات بين العديد من الأجناس و الأنواع قد بدأت بالتلاشي تدريجيا بفضل تطور التقنيات الحيوية والاعتماد على الحمض النووي DNA لدراسة تلك الصفات ومنها التفاعل البنائي التتابعي PCR (Poly Chain Reaction) . ونظراً لقلة مثل هذه الدراسات في العراق والوطن العربي على هذه الحشرة بهذه الطريقة فقد تم إجراء هذه الدراسة لما لها من أهمية في توفير قاعدة بيانات (Database) للباحثين وطلبة الدراسات العليا حول تتابع القواعد النايتروجينية (Sequences) ودراسة ميزات وشجرة التطور (Phylogenitic tree) فيها.

المواد وطرائق العمل

1- جمع العينات :

تم جمع بالغات خنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculatus* F. من بذور اللوبيا الحمراء المصابة من أسواق ثلاث مدن في العراق وهي مدينة تكريت (Tikrit) ، كركوك (Kirkuk) وأربيل (Erbil) جدول (1) ونسبت إليها شفرات EC, KC ,TC على التوالي ، شخصت الحشرات الكاملة فيما بعد في المتحف التاريخ الطبيعي من قبل الدكتور محمد صالح عبد الرسول وسجلت إحداثيات مواقع جمع العينات باستخدام جهاز تحديد المواقع العالمية (GPS-etrex- Tiwan) ، وبيانات المناخ لكل منطقة من الهيئة العامة للأنواء الجوية والرصد الزلزالي، زرعت الحشرات على اللوبيا الحمراء في 2±30 ْم ورطوبة 5±70 في ظروف المختبر (حاضنة) لغاية الجيل الرابع (4G) ،عزلت من كل منطقة 5 أزواج من الكاملات (5

ذكور + 5 إناث) بعمر يوم واحد و زرعت ألأزواج الخمسة من هذه الحشرات لكل منطقة على 20 غم من بذور اللوبيا معقمة ولخمس مكررات داخل قناني زجاجية سعة 800 مل معقمة وأحكمت فوهاتها بواسطة قماش الململ ذو تهوية جيدة وربطت بأحزمة مطاطية ووضعت في الحاضنة على نفس الدرجة الحرارية والرطوبة المذكورة أعلاه لدراسة بعض الأوجه الحياتية فيها وحفظت جميع الحشرات [30 حشرة (زوج لكل مكرر) بواقع خمسة أزواج] لكل منطقة أو مدينة بعد نفوقها مباشرة وكلاً على حدة في كحول 70% داخل أنابيب اختبار بلاستيكية معقمة حجم 5 مل مرقمة لحين الاستعمال. وتم حساب النسبة المئوية للإنتاجية حسب المعادلة الآتية [9] :

$$\text{النسبة المئوية للإنتاجية} = \frac{\text{عدد الحشرات الخارجة}}{\text{عدد البيض الموضوع}} \times 100$$

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 أوكسي رايبوزي (DNA extraction)

تم إجراء هذه العملية في مختبر البحوث في كلية العلوم – قسم علوم الحياة – جامعة كركوك ، أزيلت منطقة الصدر (Thorax) من الحشرات كلا على حدة وأهملت الأجزاء الأخرى لتجنب التلوث [10]. باستعمال مشرط صغير معقم تحت المجهر التشريحي (Olympus- Japan) . واستخلص الحمض النووي ألـ DNA باستعمال الطقم الجاهز G-spin Genomic DNA) Extraction Kit (For Cell/Tissue) 50 Test Promega , USA). تمت قياس نقاوة جميع العينات بواسطة جهاز Nano Drope (Spectrophotometre ND 1000, USA). وباستخدام البادئ المتخصص (Specific primer) جدول(2) والمجهزة من (Cinnagen –Iran) ، أجريت مضاعفة الموروثة *Cytb* بعملية التفاعل البنائي التتابعي (PCR) باستخدام (GoTaq® Green Master Mix Promega USA) الذي يتكون من (2X GoTaq®DNA Polymerase و 400µM dATP، 400µM dGTP،400µM dCTP ، 400µM dTTP و 3mM MgCl2). وكما هو موضح في جدول (3) ، بجمع ظروف التفاعل 30عينة داخل أنبوبة ابندروف (Eppendorf) حجم 1.5 Ml ومن ثم نقلت 25µl من المجموع الكلي 750 µl إلى أنابيب ابندروف حجم 0.5 Ml عدد 30 ، وضعت جميع الأنابيب في جهاز PCR (Techne Tc.512 UK) بعد برمجتها جدول (4) .

جدول (2) أسم وموقع وتتابع الموروثة *Cyt b* المستخدمة في الدراسة

اسم الموروثة	تواجده	اسم البادئ	تتابع البادئ	المصدر
Cyt. b	الميتوكوندريا	CB1F	5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3'	[11]
		CB2R	5'-ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT-3	

جدول (3) أحجام المواد المستعملة لغرض مضاعفة ألـDNA

المواد	عدد العينات = 1	عدد العينات = 30
Master mix	10µl	300 µl
F.Primer	2.5µl	75 µl
R. Primer	2.5µl	75 µl
DNA template	3µl	90 µl
Nuclease free water	7µl	210 µl
Total	25 µl	750 µl

جدول (4) يمثل برنامج PCR للموروثة *Cyt.b* 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 (2 ساعة و 5 دقائق) ، نقلت من كل أنبوبة (10 µl) بواسطة ماصة دقيقة من ناتج ألـ PCR (PCR product (إلى شريط لاصق مثبتة على سطح معقم محملة بـ 3 µl من صبغة التحميل Loding dye (Bromophenol blue) نقلت بعدها إلى الهلام الاكاروز Ethidium bromide +1.5% gel agarose) و حلت باستخدام (2µl Gel electrophoresis Akhtarian,) (Iran على 110V لمدة ساعة واحدة مع معلم (1.5Kb (Marker ، فحصت 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 ألـ PCR مرة ثانية وأزيلت 6 حزم (Bands) من زوج (1 ذكر + 1 أنثى) لكل منطقة لغرض دراسة التتابع فيه من الهلام ونقي باستعمال (Gel purification kit – Geneaid, Korea) وتم قراءة التتابع في مركز الجينوم (Genome Center) في كلية العلوم والصحة في جامعة كوية (Koya University) في قضاء كويسنجق التابعة لمحافظة أربيل 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 .واجري عملية اصطفاف التتابع (Sequence Alignment) بالتتابع الموجود لهذه الموروثة في مصرف الجينات في (NCBI (National Central Biotechnology Information في الانترنيت مع التتابع الناتج من هذه الدراسة إنشاء شجرة التطور باستخدام برنامج (Geneious 5.5.6 version) وتحديد مناطق حدوث الطفرات فيها.

النتائج والمقارنة :

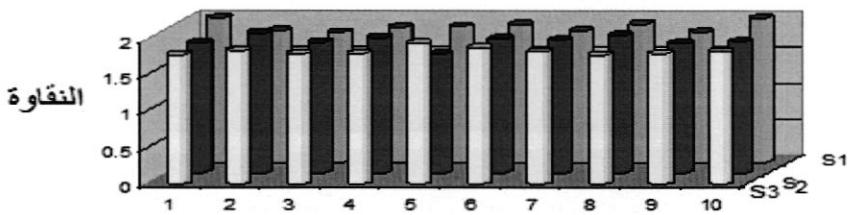
أظهرت نتائج الجدول (5) أختلاف في عدد البيوض الموضوعة والإنتاجية للحشرة على اللوبيا الحمراء مع ظهور فروق معنوية ، فكانت عدد البيوض 72.2 ، 63.8 ، 56.6 و الانتاجية 51.52% ، 43.26% ، 36.39% في كركوك ، اربيل وتكريت على التوالي وهذه النتائج تتفق مع كل من [12] الذي ذكر بان الاختلافات في تفضيل وضع البيض والفرق بين البيوض في مجموعتين من خنفساء اللوبيا الجنوبية *C. maculatus* احدهما من أسيا والآخر من أفريقيا إلى الاختلافات الوراثية .و التغيرات الفسلجية (Physiological changes) بسبب العوامل المناخية جدول (1) [13] و أكدا [14] وجود اختلاف في الصفات الوراثية لخنفساء اللوبيا الجنوبية المعزولة عن أماكن جغرافية معينة ووضحا بان العامل الرئيسي لتكوين (Subunits) داخل مجتمعات هذه الحشرة هو العامل الجغرافي (geographical factor).

جدول (5) عدد البيوض والحشرات البازغة والإنتاجية في المدن الثلاثة التي شملها المسح

المدينة	البذور (20) غم	عدد الحشرات	عدد البيوض الموضوعة	عدد الحشرات البازغة	الإنتاجية %
تكريت	لوبيا حمراء *Vigna unguiculata* (L.)	(5) أزواج	56.6 C	20.6 C	36.39 C
كركوك			72.2 A	37.2 A	51.52 A
اربيل			63.8 B	27.6 B	43.26 B

*الاحرف المتشابهة في العمود الواحد تعني عدم وجود فروقات معنوية بينها بمستوى معنوية $P \leq 0.05$

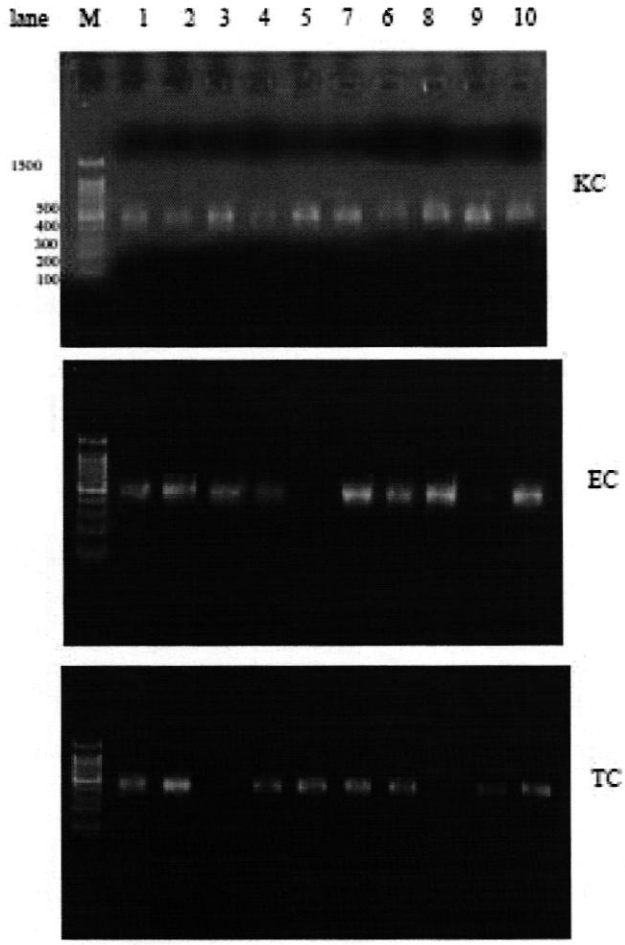
ووضح الشكل (1) نقاوة مستخلصات الحمض النووي ألـDNA التي تراوحت بين 1.80-2.00 لجميع العينات فقد تراوحت نقاوتها في حشرات المعزولة من مدينة كركوك (KC) وأربيل (EC) و تكريت (TC) بين 1.80-2.0 و 1.80 -1.95 و 1.80-1.96 على التوالي مما يدل على نقاوتها [15].



شكل(1) نقاوة الحمض النووي المستخلص لجميع العينات

S1:KC , S2: EC,S3: TC

وأظهرت نتائج ترحيل الهلام صورة (1) باستخدام البادئ المتخصص تكوين حزم لجميع العينات في المناطق الثلاثة تراوحت بين 500- 400 bp وهذه النتيجة تتفق مع [16] و[17]التي كانتا 448bp و 482bp على التوالي للموروثة *Cytb* لخنفساء اللوبيا الجنوبية في غرب أفريقيا ولا تتفق مع [11] حيث كانت 600bp لنفس الحشرة في السنغال .



صورة (1) تمثل نواتج ألـPCR على هلام الاكاروز (5. 1%) للمناطق الثلاثة

1500bp:(M): Marker
1---5 : Male
6--10 :Female

وكانت نتائج تتابعات الحمض النووي للموروثة (*Cyt.b*) لجميع العينات على النحو التالي :

-sample 1cb1. KCM seq.....450bp

TAAGGTCAGATATTACTATTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGAACTTCTATTGTTCAATGAATTT
GGGGAGGATTCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGCATTTCATTTTTTATTACCATT
TATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAGGATCAAATAACCCCCTC
GGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCTATTTCACATATAAAGACATTTTAGGC
ATATTAATTATATTATTTTTATTAACATTTTTAACACTCTATTCACCCTATTTTCTAGGAGACCCTGA
TAATTTCACACCAGCGAATCCCTTAGTAACTCCTGCCCATATTAAGCCAGAATGATACTTCTTATTC
GCCTATGCAATCCTACGGTCAATTCCTAATAAATTAGGAGGTGTAAA

> gb|EF484385.1 *Callosobruchus maculatus* isolate Africa cytochrome b (*cytb*) gene, partial cds; mitochondrial
Length=437
Score = 706 bits (782), Expect = 0.0
Identities = 402/408 (99%), Gaps = 1/408(0%) Strand=Plus/Plus

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

```
Query  7    CAGATATTACTA-TTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGAACTTCTATTGTTCAATGAA  65
            ||| ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  30   CAGTTATTACTAATTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGAACTTCTATTGTTCAATGAA  89

Query  66   TTTGGGGAGGATTCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGCATTTCATTTTT  25
            |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  90   TTTGGGGGGGATTCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGCATTTCATTTTT  49

Query  126  TATTACCATTTATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAG  85
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  150  TATTACCATTTATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAG  09

Query  186  GATCAAATAACCCCCTCGGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCtatt  245
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  210  GATCAAATAACCCCCTCGGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCTATT  69

Query  246  tcacatataaagacattttaggcatattaattatattattttattaacatttttaacac  05
            | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  270  TTACATATAAAGACATTTTAGGCATATTAATTATATTATTTTTATTAACATTTTTAACAC  29

Query  306  tctattcaccctattttCTAGGAGACCCTGATAATTTCACACCAGCGAATCCCTTAGTAA  65
            |||||||| |||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  330  TCTATTCACCTTATTTTCTAGGAGACCCTGATAATTTCACACCAGCAAATCCCTTAGTAA  89

Query  366  CTCCTGCCCATATTAAGCCAGAATGATACTTCTTATTCGCCTATGCAA  413
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  390  CTCCTGCCCATATTAAGCCAGAATGATACTTCTTATTCGCCTATGCAA  437
```

-sample 6.cb1. KCF seq.....455bp

TGGGGGTCAGTTTATTACTTATTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGAACTTCTATTGTTCAATGAA
TTTGGGGAGGATTCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGCATTTCATTTTTTATTACC
ATTTATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAGGATCAAATAACCCC
CTCGGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCTATTTCACATATAAAGACATTTTAG
GCATATTAATTATATTATTTTTATTAACATTTTTAACACTCTATTCACCCTATTTTCTAGGAGACCCT
GATAATTTCACACCAGCGAATCCCTTAGTAACTCCTGCCCATATTAAGCCAGAATGATACTTCTTAT
TCGCCTATGCAATCCTACGGTCAATTCCTAATAAATTAGGAGGTGTAAAAA

> gb|EF484385.1 *Callosobruchus maculatus* isolate Africa cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial
Length=437
Score = 708 bits (784), Expect = 0.0
Identities = 400/405 (99%), Gaps = 0/405 (0%) Strand=Plus/Plus

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

```
Query  12   TTATTACTTATTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGAACTTCTATTGTTCAATGAATTT  71
            ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  33   TTATTACTAATTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGAACTTCTATTGTTCAATGAATTT  92

Query  72   GGGGAGGATTCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGCATTTCATTTTTTAT  31
            |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  93   GGGGGGGATTCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGCATTTCATTTTTTAT  52

Query  132  TACCATTTATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAGGAT  91
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  153  TACCATTTATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAGGAT  12

Query  192  CAAATAACCCCCTCGGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCtatttca 251
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  213  CAAATAACCCCCTCGGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCTATTTTA  72

Query  252  catataaagacattttaggcatattaattatattattttattaacattttaacactct  11
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  273  CATATAAAGACATTTTAGGCATATTAATTATATTATTTTTATTAACATTTTTAACACTCT  32

Query  312  attcaccctatttttCTAGGAGACCCTGATAATTTCACACCAGCGAATCCCTTAGTAACTC  71
            |||||| |||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct  333  ATTCACCTTATTTTCTAGGAGACCCTGATAATTTCACACCAGCAAATCCCTTAGTAACTC  392

Query  372  CTGCCCATATTAAGCCAGAATGATACTTCTTATTCGCCTATGCAA  416
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  393  CTGCCCATATTAAGCCAGAATGATACTTCTTATTCGCCTATGCAA  437
```

-sample 1-cb1. ECM. seq.....451bp

ATAGGGGAAGGGGCGTTAGGGAGGATAACGGAGAGAACAACGGGTGAAAAAAAGAGAAAAGCA
GAACCGCTTCTTCTGTTTTTCGAACCGGTGACCAACGCGTGCACTTTTCCCCTATTTGGACGTCGCG
ATCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCACGGTGGAGTCCGTGTGCGATCGTTTCGGCGATTCGTGCTC
GAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACCGTATACAGATGGAGCGAGGCCGCTTCGTTAATT
ATCGTACGACCCAAGGCAAGCGCGTTCGATGCTAAGACGGCGATCGGGACCTAGTGCCGATTCCGT
TTCCGGACGACTGTTGTTCGTGTGTATCTCTCTGACAGACCTCGTTCGAAACGCTGATCTGCGACGC
TATAGCTTTGGGTACTTTCACGACCCGTCTTTGAAACTTTCCACCAAGGAGACTC

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

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

```
Query 67  CCGCTTCTTCTGTTTTTCGAACCGGTGACCAACGCGTGCACTTTTCCCCTATTTGGACGT
26
          |||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||| | |||||
Sbjct 67  CCGCGCCTTCTGTTTTTCGAACCGGTGACGAACGCGTGCACTTTTCCCCTAGTAGGACGT
26

Query                                                                 127
CGCGATCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCACGGTGGAGTCCGTGTGCGATCGTTTCGGC 86
          |||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct 127 CGCGATCCGTTGGGTGTCGGTCTACGGCTCGCGGTGGAGTCCGTGTGCGATCGTTTCGGC
86

Query                                                                 187
GATTCGTGCTCGAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACCGTATACAGATGGAGCG 46
          |||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||| |||
Sbjct                                                                 187
GATTCGTGCTCGAACCCGCGATGTTCCGGCCGACTCGCTCGACGGTATACAGATGGCGCG 46

Query                                                                 247
AGGCCGCTTCGTTAATTATCGTACGACCCAAGGCAAGCGCGTTCGATGCTAAGACGGCGA 06
          ||||||| ||||||| ||| |||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct                                                                 247
AGGCCGCTACGTTAATTAGCGTCCGACCCACGGCAAGCGCGTTCGATGCTAAGACGGCGA 06

Query 307 TCGGGACCTAGTGCCGATTCCGTTTCCGGACGACTGTTGTTCGTGTGTATCTCTCTGACA
66
          || |||||||||||||||||||||||||  ||||| ||||| ||||
Sbjct 307 TC-GGACCTAGTGCCGATTCCGTTTCCGGACGACTGTTGGCCGTGTGGATCTCTC-GACA
64

Query                                                                 367
GACCTCGTTCGAAACGCTGATCTGCGACGCTATAGCTTTGGGTACTTTCACGACCCGTCT 26
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct 365 GACCTCGTTCGAAACGCTGATCTGCGACGCTATAGCTTTGGGTACTTTCAGGACCCGTCT
24

Query 427 T 427
          |
Sbjct 425 T 425
```

-sample 6cb1. ECF.seq.....451

CAAAGTGGGGCCCGTTTTTTTCAAGTATTTGAAAGGCCTCGCCGGAAAAAAAGGGGGGAAAAGTA
AGGCTTGCGTGGGCGGACTCTGATTAACATAGCGGCTCGCGCCCTCTGTTAGAGTCCACCGAGTCG
GCCGGGACATCGCGGGGTCCAGCACGAATTGCCGGAGCGATCGCACTCGGACTCCCCCGCTAGCCC
CAGACAGGCCCCCAACGGATCGCGCCGTCGTATTGGGGGAAAAGGGGGCCCGCTTCGTCACTTGTT
GGAAAACCCAAGGGCAGGGGACATCCGATAACCCCATCGGCCACCGGCCTGTTGTCCGTTAATTTT
TCAGACGGATTTTTTTCTCCCTTTTTCCCCTGGCGGGTTTTCCGGTGTAACCCTGAAACGGGTTCCCT
ATACTTTTGGACTCCTTTTTGAACGGGTTTTGAACCTTCCCCCAGGGGGTATAA

gb|EF484385.1 *Callosobruchus maculatus* isolate Africa cytochrome b (cytb),gene partial cds; mitochondrial
Length=437
SScore = 199 bits (220), Expect = 1e-47
Identities = 285/384 (74%), Gaps = 13/384 (3%)
Strand=Plus

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

```
Query 68  GCTTGC-GTGGG-CGGACTCTGATTAACATAGCGGC-TCGCGCCCTCTGT-TAGAGTCCA 23
          |||||| |||| |||| || ||||| |||||| |||||| |||| ||  ||| |
Sbjct 84  GCTTGCCGTGGGTCGGACGCTAATTAACGTAGCGGCCTCGCGCCATCTGTATACCGTCGA
43

Query124
CCGAGTCGGCCGGGACATCGCGGGGTCCAGCACGAATTGCCGGAGCGATCGCACTCGGAC 83
          |||||||||| |||||||| || |||||||| |||| | |||||||| |||||
Sbjct144
GCGAGTCGGCCGGAACATCGCGGGTTCGAGCACGAATCGCCGAAACGATCGCACACGGAC 03

Query184
TCCCCCGCTAGCCCCAGACAGGCCCCCAACGGATCGCGCCGTCGTATTGGGGGAAAAGGG 43
          ||| |||| ||||  |||| | | |||||||||||| |||| || | |||||||| |
Sbjct                                                                  204
TCCACCGCGAGCCGTAGACCGACACCCAACGGATCGCGACGTCCTACTAGGGGAAAAGTG 63

Query244
GGCCCGCTTCGTCACTTGTTGGAAAACCCAAGGGCAGGGGACATCCGATAACCCCATCGG 03
          | || |||||||  ||| |||| | | ||| | |||||  ||  ||| |||| |
Sbjct 264  CACGCG-TTCGTCACCGGTTCGAAAAACAGAAGGC-GCGGACA-ACGCGAACGCCATCCG
20

Query 304  CCACCGGCCTGTTGTCCGTTAATTTTTCAGACG-GAttttttCTCCCTTTTTCCCCTGG 62
          ||| | ||| |  ||  || |  |||| || |  || ||| |||  |||
Sbjct 321  TCACGCGGCTGCTCATCGCCGATATCCGAGACGCGAATGAATT-TCCCCTTTCGACCTTT
79

Query  363  CGGGTTT-TCCGGTGTAACCCTGAAACGGGTTCCCTATACTTTTGGACTC-CTTTTTGAA
420
          ||||||| || ||| || |||| |||| ||| |  |||| ||| |||| || ||  ||
Sbjct  380   CGGGTTTCTCAGGTTTACCCCTG-AACGGTTTCAC-GTACTCTTGAACTCTCTCTTCAAA
437

Query  421  CGGGTTTTGAACCTTCCCCCAGGG  444
          | |||| ||| ||||| || ||
Sbjct  438  GTGCTTTTCAACTTTCCCTCACGG  461
```

-sample 1cb1 . TCM. seq.....451bp

TGAAGGTCAAGGTTATTACTATTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGACTTCTATTGTTCAATGAA
TGGGGGGGGATTCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGCATTTCATTTTTTATTACCA
TTTATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAGGATCAAATAACCCCCT
CGGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCTATTTCACATATAAAGACATTTTAGG
CATATTAATTATATTATTTTTATTAACATTTTTAACACTCTATTCACCCTATTTTCTAGGAGACCCTG
ATAATTTCACACCGGCGAATCCCTTAGTAACTCCTGCCCATATTAAGCCAGAATGATACTTCTTATT
CGCCTATGCAATCCTACGGTCAATTCCTAATAAATTAGGAGGTGTAAA

> gb|EF484385.1 *Callosobruchus maculatus* isolate Africa cytochrome b (*cytb*) gene,
partial cds; mitochondrial
Length=437
Score = 686 bits (760), Expect = 0.0
Identities = 398/406 (98%), Gaps = 3/406 (1%)
Strand=Plus

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

```
Query 12  GTTATTACTA-TTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGA-CTTCTATTGTTCAATGAATg 69
          ||||||||| |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct 32  GTTATTACTAATTTAGTCTCTGCTATCCCATATTTAGGAACTTCTATTGTTCAATGAATT
91

Query 70  -gggggggATTCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGCATTTCATTTTTTA 28
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 92  TGGGGGGGATTCGCAGTCGATAACGCAACTTTAACCCGATTCTTTGCATTTCATTTTTTA
51

Query 129 TTACCATTTATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAGGA
88
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 152 TTACCATTTATCGTTACTGCATTTGTAATTATCCATCTCTTATTCCTCCACCAAACAGGA
11

Query 189 TCAAATAACCCCCTCGGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCtatttc 48
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| Sbjct 212
TCAAATAACCCCCTCGGAACTATAAAAAATATTGATAAAATCCCATTCCACCCCTATTTT 71

Query 249 acatataaagacattttaggcatattaattatattattttattaacatttttaacactc 08
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 272 ACATATAAAGACATTTTAGGCATATTAATTATATTATTTTTATTAACATTTTTAACACTC
31

Query 309 tattcaccctatttttCTAGGAGACCCTGATAATTTCACACCGGCGAATCCCTTAGTAACT 68
          ||||||| |||||||||||||||||||||| || ||||||||||||
Sbjct 332 TATTCACCTTATTTTCTAGGAGACCCTGATAATTTCACACCAGCAAATCCCTTAGTAACT
91

Query 369 CCTGCCCATATTAAGCCAGAATGATACTTCTTATTCGCCTATGCAA 414
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 392 CCTGCCCATATTAAGCCAGAATGATACTTCTTATTCGCCTATGCAA 437
```

-sample 16-cb1. TCF. seq.....464bp

GAAAAAAAAGGGGGGAGGCCCCTTTCTCAAGGTTTGAAAGGACTGTGCAGAAAAAGGGGGGGGG
AAAGGGCTGAATCCGCTTGCCGGGGTCGGAACTGGTGAAACGAAGCGGGCTCTTGTCCTCTGTATA
GAGTCAGGGAGTCGGGGGGGACAGCGCGGGGCCGAGGACGAATCGCCGGAGCGATCGGTTACGG
ACTCCAGCGCGAGAACGAAGACCGGCTCCGGCCGAATCGCGACGCCGTATTAGGGGGAAAGGGGG
CCCGTCCGTTACTGATCGGAAAAACCAAGGGGAGGGACATCGCAAACAACAACGGCAACGGGACT
GATTGTCGATAATTTTTGAGGGACGAATGGTATTTCCCCTGTACCACTTGGAGGGACCTCGAGGTA
AACCCTGAACGGGGTACCTATACTCTTTGGGCTCTTTCTGGAACGGGTTTTAAAACTTGCCCCAAGG
GGATATT

gb|EF484385.1 *Callosobruchus maculatus* isolate Africa cytochrome b (cytb) gene ،
partial cds; mitochondrial
Length=437
SScore = 127 bits (140), Expect = 7e-26
Identities = 207/290 (71%), Gaps = 6/290 (2%)

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

```
Query 78   CGCTTGCCG-GGGTCGGAA-CTGGTGAAACGAAGCGGGCTCTTGTCCTCTGTATAGAGTC
35
           |||||||| |||||||  ||  | || ||  |||| |||  | |  |||||||  |||
Sbjct 83   CGCTTGCCGTGGGTCGGACGCTAATTAA-CGTAGCGGCCTCGCGCCATCTGTATACCGTC
41

Query136   -AGGGAGTCgggggggACAGCGCGGGGCCGAGGACGAATCGCCGGAGCGATCGGTTACGG
94
           || ||||||  || ||| ||||||  |||| ||||||||||| | ||||||  ||||
Sbjct142
GAGCGAGTCGGCCGGAACATCGCGGGTTCGAGCACGAATCGCCGAAACGATCGCACACGG 01

Query195
ACTCCAGCGCGAGAACGAAGACCGGCTCCGGCCGAATCGCGACGCCGTATTAGGGGGAAA 54
           |||||| ||||||  || ||||||  | ||   || ||||||||  | || ||||||  |||
Sbjct                                202                                ACTCCACCGCGAG-
CCGTAGACCGACACCCAACGGATCGCGACGTCCTACTAGGGGAAAA 60

Query255
GGGGGCCCGTCCGTTACTGATCGGAAAAACCAAGGGGAGGGACATCGCAAACAACAACGG 14
           ||  | ||| ||| || | |  |||||||  | ||   |||||  ||| |||  || | |
Sbjct261
GTGCACGCGTTCGTCACCGGTTCGAAAAACAGAAGGCGCGGACAACGCGAACGCCATCCG 20

Query 315 CAACGGGACTGATTGTCGATAATTTTTGAGGGACGAATGGTATTTCCCCT 364
           |||  | |||  |  |||   ||  |  |||   ||||| | ||||||||
Sbjct 321  TCACGCGGCTGCTCATCGCCGATATCCGAGACGCGAAT-GAATTTCCCCT 369
```

حيث أظهرت الاصطفاف النيوكلوتيدات (Alignment) جدول (7) مع التتابعات المسجلة في مصرف الجينات (Gene bank) بان نسبة التعريف (Identities) قد تراوحت بين 71-99 % وسجلت أعلى نسبة للتعريف بين ذكور وا ناث الحشرة في كركوك بلغت 99 و99 % على التوالي بينما سجلت تكريت اقل نسبة تراوحت بين 71-98 % على التوالي .

جدول (7) نسب التعريف بين العينات مع مصرف الجينات

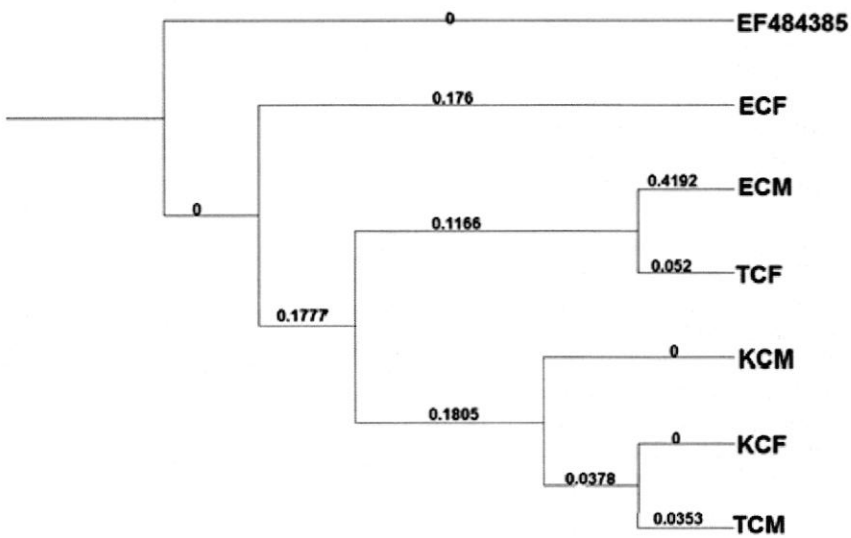
الموقع Version	Gene bank	التوافق Accession	نسبة التعريف % Identities	أزواج القواعد bp	ألجين Gene	الجنس Sex	شفرة الحشرة Insect code	رقم العمود No. Lane
EF484385.1	EF484385		99	450	*Cyb.*	Male	KC	1
			98	451			EC	
			98	451			TC	
			99	455		Female	KC	6
			74	451			EC	
			71	464			TC	

وأظهرت تتابعات الحشرة بطريقة سنكر جدول (8) أماكن حدوث التغيرات (الطفرات Mutations) في كل عينة بمقارنتها مع مصرف الجينات (Gene bank) وتم تعداد جميع الطفرات وحسب أنواعها وقد ترجع هذه الاختلافات إلى الطفرات النقطية (Point mutations) ووجدت بان أكثر الطفرات التي حدثت تعود إلى الاستبدال (Transversion) بنسب بلغت 54.06% وهذه النسبة لا تتفق ما سجله [16] والتي كانت أعلى بكثير بلغت 86.3% تليها الإحلال المكافئ (Transition) والتي كانت قليلة مقارنة بدراستنا بلغت 37.32% وذلك عند دراستهم لهذه الموروثة (*Cyb*) و باستعمال نفس البادئ المتخصص بين مجتمعات من خنفساء اللوبيا الجنوبية في مناطق بيئية مختلفة من غربأفريقيا . وكانت ذكوروا ناث خنفساء اللوبيا في مدينة اربيل أكثرتأثراً وحدثت فيها طفرات بنسب عالية مقارنة ببقية العيناتو التي قد تعود إلى التغيرات المناخية والتي تعمل كعوامل ضغط (Stress factor) يحفز الحشرة على التكيف (Adaptation) لغرض الاستمرارية [16] . ولوحظ بان نسب الاستبدال في الإناث عالية في جميع العينات إذ بلغت 54.49% مقارنة بالذكور والتي بلغت 42.27% وقد تعود إلى تعرضهم لعوامل خارجية كالدرجات الحرارية (الواطئة والعالية) و تمثل هذه الجينات مصدر نشاط الحشرة في السلسلة التنفسية في المايتوكوندريا التي تزودها بالطاقة اللازمة (ATP) لإتمام عملياتها الحيوية من طيران وتكاثر .

جدول (8) أنواع الطفرات الوراثية ونسبها المئوية للمورثة *Cyt.b* 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
Cyt.b	1	KCM	(%66.66) 4	(%16.66)1	(%16.66)1	0	%(20.68)6
		ECM	(25.00)3	(%80.00) 12	0	0	%(51.72)15
		TCM	(%50) 4	(%12.5) 1	(%37.5) 3	0	%(27.58)8
	المجموع	**3**	**(%37.93)11**	**(%48.27)14**	**(%13.79)4**	**0**	**29**
	6	KCF	(%80) 4	(%20)1	0	0	%(2.77) 5
		ECF	(%35.48) 33	(%55.91) 52	(%7.52) 7	(%1.07) 1	%(51.66) 93
		KCF	(%36.58) 30	(%56.09) 46	(%2.43) 2	(%3.65) 3	%(45.55)82
	المجموع	**3**	**(%37.22)7**	**(%55.00) 99**	**(%5.00)9**	**(%2.22)4**	**180**
المجموع الكلي	**6**	**6**	**(%37.32) 78**	**(%54.06)113**	**(%6.22) 13**	**(%1.91)4**	**209**

استخدمت المورثة *Cyt.b* gene في دراسات عديدة لغرض التعرف على الأنواع وفي التصنيف التطوري لكائنات متعددة [18]و وضحت النتائج مدى التقارب بين العينات عند رسم شجرة التطور شكل (2) فقد تراوحت المسافة الجينية بين 0-0.19 مما يعني وجود قرابة قوية وتتفق هذه النتيجة مع [16] والتي كانت 0-0.047 الذين أكدوا كذلك عن تأثر التركيبة الوراثية لسكان حشرة خنفساء اللوبيا الجنوبية في غرب أفريقيا وبشدة بالمناطق البيئية- الزراعية (Agro- Ecological zone).ولوحظ من الشجرة تفرعها من التوافق (gb|EF484385 : Accession) مما يؤكد أن عودة أصول هذه الحشرة إلى أفريقيا ونتيجة للتغيرات البيئة مقارنة مع بيئته الأصلية حدثت فيها بعض التغيرات الوراثية .



شكل (2) شجرة التطور للمورثة *Cyt.b* تمثل درجة القرابة بين العينات

المصادر

1

- مركز البحوث الزراعية المصرية . (2003) . الليبيا . وزارة الزراعة واستصلاح الأراضي، نشرة2003/778- جمهورية مصر العربية . 22ص .

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

3- Singh, B. (2006). Safe storage of legume seeds from pests- A case study in cowpeas .ASA-CSSA-SSSA. International Annual Meetings. IITA c/o L.W.Lambourn and Co. Crydon , CR 93 EE , England Academiae Scientiarun Hungarioae .7 (4) :453-463.

4- Timko, M .P, Rushton, P. J , Laudeman T.W, Bokowiec M.T, Chipumuro, E. Cheung, F. Town , C .D. Chen, X .F . (2008) . Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. BMC, Genome. 9:103.

5- Ahenkora, K. H. K, Adu-Dapaah , A .Asafo-Adjei , J. N . Asafo –Agyei ,N . Adjei. J, and Konadu. E.Y.O. (1998 . Protein productivity and economic feasibility of dual-purpose cowpea . Hort. Sci .33 (7) : 1160-1162 .

6- Obopile,M., Ositile, B. (2010) . Life table and population parameters of cowpea aphid, *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae) on five cowpea *Vigna unguiculata* (L. Walp.) varieties. J. Pest Sci 83:9-14.

7- IITA.(1989). Research brief, vol.9. International Innstitute of Tropical Agriculture. Ibada.Nigeria. Ivbijaro,M.F.1983a.Preservation of cowpea,*Vigna unguiculata*(L.) Walp.with the neem seed, *Azadirachta indica* . A. Juss. Protection. Ecology. 5,177-182.

8- Caswell,G.H.(1961) . The infestation of cowpea in wertern Nigeria. Trop.Sci. 3: 154-158 .

9- Szentest, A . (1972) . Studies on the mass rearing of *Acanthoscelides obtectus* Say. (Coleoptera: Bruchidae). Acta Phytopatholgica Academiae Scientiarun Hungarioae .7 (4) : 453-463 .

10- 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 .

11- Ndiaye , A. , Gauthier , P . and Sembene , M . (2011) . Genetic discrimination o 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

12- Fox , C.W., Stillwell, R.C., Amarillo, A.R., Czesak, M.E.and Messina, F.J. (2004). Genetic architecture of population differences in oviposition behaviour of the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. J. Evol. Biol. 17:1141–1151.

13-Siegfried ,B.D. and Scoff, J.G. (1992). Biochemical characterization of hydrolytic and oxidative enzymes in insect resistant and susceptible strains of the German cockroach (Dictyoptera: Blatellidae) .J.Eco.Entomol. 85: 1092-1098 .

14- Bieri, J. Kawecki, T.J. (2003). Genetic architecture of differences between populations of cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) evolved in the same environment. Evol. Int. J. Org. Evol., 57: 274–287.

15- 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.

16- 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

17- 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 Molecular Phylogenetics and Evolution 35(3): 602- 611.

18- Kuwayama, R., and T. Ozawa. (2000). Phylogenetic relationships among European red deer, wapiti, and sika deer inferred from mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 15:115-123.

Productivity and genetic study of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae)

Adil A. Hayder[1], Burhan. M. Mohammed[2], Haqi, I. Kalil[3]

[1] *Faculty of science, Kirkuk university, Kirkuk, Iraq*
[2] *Education, Tikrit university, Tikrit, Iraq*
[3] *Faculty of agriculture., Tikrit university, Tikrit, Iraq*

Abstract

The cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp is a leguminous crops cultivated in tropical Africa for its seeds rich in proteins. The main problem for its production is the conservation of the harvests. In the fields and storages, the seeds are attacked by several pests, the southern cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera: Bruchidae) are the most important pests of cowpea beans which causes substantial quantitative and qualitative losses manifested by seeds perforation and reduction in weight, trade value and germinability of seeds. In view of few molecular studies have been done about this insect in Iraq, we study the genetic differences by PCR (Poly Chain Reaction) amplifying mitochondrial gene *Cyt. b* with specific primers for three community populations Kirkuk, Tikrit and Erbil in Iraq. Results reveal the adult insect emergence average was 37.2, 27.6, 20.6 respectively, similarity in phenotypes and appearances genotypes difference from each other in nucleotide sequences ,the genetic distances among samples ranged between (0 - 0.19).