Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied Science | مجلة إبن الهيثم للعلوم الصرفة و التطبيقية
No. 3 Vol. 25 Year 2012 | 2012 السنة 25 المجلد 3 العدد

دراسة التنوع الوراثي في الدنا المايتوكوندري mtDNA لحشرة ذبابة فاكهة البحر المتوسط *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera:Tephritidae) بأستخدام طريقة PCR-RFLP في ثلاث من محافظات المنطقة الوسطى من العراق.(1)

محمد مهدي جواد ، حسن سعيد الأسدي ، أحسان عرفان حسين
قسم علوم الحياة، كلية التربية – ابن الهيثم ، جامعة بغداد
استلم البحث في: 5 حزيران 2012 قبل البحث في: 12 ايلول 2012

الخلاصة

أجريت دراسة للتنوع الوراثي في جزء من الجين NADH4 (ND4) من الدنا المايتوكوندري mtDNA لحشرة ذبابة فاكهة البحر المتوسط *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) يبلغ طوله 400 زوج قاعدي بأستخدام طريقة PCR-RFLP ،وبأ ستخدام الانزيم القاطع EcoRV في عينات جمعت من ثلاث محافظات تقع في وسط العراق هي كربلاء ،وبغداد ،والكوت، وقد بينت النتائج وجود تنوع وراثي في هذه المنطقة من الجين بين عينة محافظة الكوت والعينتين الأخرتين طبقا لنتائج الهضم بوساطة الانزيم القاطع EcoRV .

الكلمات المفتاحية: mtDNA ،*Ceratitis capitata* ،EcoRV،ND4

المقدمة

تعد ذبابة فاكهة البحر المتوسط Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) أو Medfly ،أهم آفة زراعية على مستوى العالم [1] ; [2] ، إذ تتغذى على أكثر من 300 نوع من المحاصيل الزراعية[3] وبالرغم من ان أصولها تعود إلى جنوب الصحراء الأفريقية [4] إلا إنها تنتشر الآن في معظم دول العالم وقد وجدت في جنوب أوربا وأستراليا وأمريكا اللاتينية [2] ؛ [5] وأمريكا الشمالية [6]. لقد كان أول تسجيل للحشرة في العراق في اربعينيات القرن الماضي من الحيدري [7] ثم أعيد تسجيلها في السبعينيات من القرن نفسه من Al-Ali [8] وقد سجل الجبوري وجودها خلال الاعوام القليلة الماضية مرة أخرى [9] ونحن هنا ندرسها من الناحية الوراثية الجزيئية وفي ثلاث محافظات تحتوي على بساتين مصابة بالحشرة وذلك لإنشاء قاعدة بيانات (Database) خاصة بالحشرة في العراق وللمساعدة في القضاء عليها بأقل الخسائر ولتجنب الاضرار الاقتصادية الناتجة بسبب اجتياحها أو اعادة اجتياحها للمناطق المدروسة ومعرفة مصدر قدومها في كل مرة وللتعريف بأضرارها وصفاتها التي تصل الى المستويات الجزيئية الدقيقة، فضلا عن دراسة التنوع الوراثي لها. لقد استخدمت الدنا المايتوكوندري mtDNA والمعروف ببصمته الوراثية الفريدة في الدراسات التصنيفية ودراسة هجرة الكائنات الحية وفي البحوث التشخيصية Diagnostics والأدلة الجنائية Forensics [10]. وبالنسبة الى هذه الافة فلقد استخدم الدنا المايتوكوندري لمعرفة التنوع الوراثي Genetic diversity في مجتمعات سكانية أخذت من مناطق متعددة ومعرفة مصدر قدومها [6] ؛ [11] ؛ [12] .

المواد وطرائق العمل

مناطق الجمع والفاكهة المصابة

أعتمدت هذه الدراسة على أكثر من 200 أنموذج جمعت من أماكن متعددة في ثلاث محافظات من وسط العراق وهي كربلاء وبغداد والكوت وللمدة من شهر شباط 2010 إلى شهر آذار من السنة نفسها ومن شهر تشرين الثاني 2010 إلى شهر آذار 2011 بالنسبة الى ثمرة اللالنكي *Citrus reticulate* L. (Mandarin) والكاكي(Kaki) *Diospyros kaki* إما ثمار المشمش *Prunus arminiaca* L. المصابة وثمار التين *Ficus carica* L. فلقد جمعت من شهر حزيران لسنة 2010 إلى شهر تموز من السنة نفسهاومن شهر ايار لسنة 2011 إلى شهر حزيران من نفس السنة وقد جمعت ثمار الكمثرى (العرموط) (Pears) *Pyrus communis*المصابة في شهر حزيران من السنة نفسها 2011 وقد أصابت الذبابة في بساتين كربلاء العنب *Vitis* sp. ، والتمر(الأشرسي) *Phoenix dactylifera* وهو مؤشر زراعي خطير جدا على العراق . ولقد جمعت العينات في بغداد من مناطق الكريعات والراشدية والطارمية والمدائن ،ومن مناطق الحر وعون في كربلاء ، ومنطقتي الصويرة و الحفرية في الكوت . وضعت الثمار المصابة في قفص زجاجي وثبت عليه مكان وتاريخ الجمع. تكون أبعاد القفص 20 × 20 × 40 سم يحوي من أحد جانبيه

---

(1) البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الاول.

المربعين على فتحة دائرية الشكل قطرها 15 سم محاطة بقماش الأوركنزا أو قماش آخردقيق الفتحات لمنع خروج الحشرة ولإدخال وتبديل المواد الغذائية والماء، تكون التغذية بخميرة 3 : 1 سكر مع قليل من الماء توضع على قطن في صحن بتري صغير كل 3-7أيام ، ويجهز القفص بأنبوبة فيها فتيلة من الشاش تحتوي على الماء الذي يصعد في فتيلة الشاش وذلك لتربية الحشرة لحين نضجها التام ،ثم سحبها من القفص لحفظها إما بالتجفيف أو بالكحول 70% وتفرش أرضية القفص بنشارة الخشب الناعمة أو التربة النهرية (الزميج) لتسهيل مكان تكوين العذارى ويراقب القفص يوميا للحصول على البالغات. يوضع القفص داخل حاضنة بدرجة حرارة 25 ± 1 °م ورطوبة 70 ± 5 و 12\12 ساعة ضوء وظلام لغرض إدامة المستعمرة لمدة أطول للحصول على الحشرات الكاملة أو اليرقات لغرض الدراسة.

استخلاص الد نا

لقد إستخلص دنا الحشره الكلي بعد هرس الحشره بوساطة قمة الماصة الدقيقة بعد اغلاقها بالحرارة وبإستخدام العدة الخاصة بالإستخلاص وهي (DNeasy blood and tissue kit from Qiagen ,UK) ، إذ استخدمت عدة الإستخلاص بإتباع نشرة طريقة العمل(Protocol) المرفقه ،إذ يتم الحصول في النهاية على 200µL من DNA المذاب في المحلول النهائي المستعمل.

طريقة PCR-RFLP

استخدم زوج من البادئة المتخصصة (N4-8883 و N-4-N-9243) (جدول 1) وكما يأتي لتضخيم المنطقة الممتدة داخل الجينND4 من الدنا المايتوكوندري، ويبلغ طولها حوالي 400 زوج قاعدي تقريبا وهي المنطقة التي سيتم قطعها لاحقا بالأنزيم EcoRV.

تضخيم الدنا بإستخدام جهاز تقانة PCR

أضيفت الكميات الاتية من المواد المستعملة لعمل جهاز PCR لغرض تضخيم منطقة الجينات بإستخدام البادئات المذكورة آنفا وكما يأتي:

12.5 مايكروليتر من الخليط الرئيسي PCR mix من شركة (NEB,NewEngland Biolabs)
2 + 2 مايكروليتر من كل بادئة (أمامي وراجع)
5.5 مايكروليتر من الماء المضاعف تقطيره Double distilled water
3 مايكروليتر من DNA

يتم وضع الخليط المحتوي على الدنا المستخلص من عينات ذبابة البحر المتوسط وزوج البادئين المناسبين مع المواد الأخرى وبالنسبة المذكورة آنفا يتم وضعه في جهاز Thermal cycler الخاص بتقانة PCR من صنع شركة (شركة Applied biosystems , USA موديل 2720) ، حيث يتم تشغيل البرنامج الاتي ولكلا زوجي البادئة المستخدمة لتضخيم جزء الجين المستهدف وكمايأتي :

1- الدنترة	2 دقيقة	94°م	1 دورة
2- ارتباط البادئات	30 ثانية	94°م	40 دورة
	30 ثانية	46°م	40 دورة
	2 دقيقة	66 °م	40 دورة
3- استطالة البادئات	2 دقيقة	72°م	1 دورة
4- حضن	∞	4°م	-

ثم تم ترحيل 10مايكروليتر من نواتج الجهاز بوساطة 2% من هلام الاكاروز وباستعمال صبغة CYBRsafe المشعة من شركة (Invitrogen ,USA) لتشخيص القطعة الجينية المطلوب هضمها بأنزيم القطع (شكل 1).

ثم يتم هضم الجزء الناتج من التضخيم بوساطة جهاز تقانة PCR من أنزيم القطع EcoRV وحسب الاضافات الاتية:

1 مايكروليتر من انزيم القطع
4 مايكروليتر DNA (نواتج PCR المحتوية على الجين المطلوب)
0.2 مايكروليتر من البومين المصل البقري BSA
2 مايكروليتر من داريء أنزيم القطع RE buffer
12.8 مايكروليتر ماء مقطر

فيصبح المجموع الكلي للخليط 20 مايكروليتر يحضن في حمام مائي أو الحاضنة أو باستخدام جهاز PCR نفسه لغرض الحضن مدة 4 ساعات وبدرجة حرارة 37°م حتى يتم الهضم التام . بعد ذلك يرحل الناتج بهلام الاكاروز بتركيز 2% وباستعمال صبغة CYBRsafe المشعة وتصوير النتائج (شكل 2)..

النتائج والمناقشة

إستخدم جزء من الجين (ND4) من الدنا المايتوكوندري وطوله 400 زوج قاعدي (شكل 1) لغرض دراسة التنوع الوراثي فيه إذ استعمل أنزيم القطع EcoRV الذي يتعرف على تسلسل معين هو (GATATC) ويقوم بقطعه كما تم توضيح ذلك في طريقة العمل، إذ يكون القطع الواحد منتج لقطعتين يكون طول الأكبر 300 زوج قاعدي والقطعة الأخرى كان طولها 100 زوج قاعدي وهو ما تم إيجاده في معظم العينات المدروسة ،إذ إن الأنزيم EcoRV قام بعمله وقطع من منطقة واحدة منتجا قطعتين في معظم العينات إلا عينة واحدة فقط من عينة محافظة الكوت (شكل2) التي لم يقطعها مبينا وجود تنوع وراثي في عينات المنطقة الوسطى من العراق.وبذلك فأن العينة التي تقطع أعطيت الرمز A والتي لم تقطع أعطيت الرمز B وهكذا فلقد حصلنا على رمزين هما A و B الناتجة من قطع وعدم قطع المنطقة التي طولها 400 زوج قاعدي على التوالي وذلك تبعاً للتسمية المستعملة من Gasparich

وجماعته [13] الذين استخدموا طريقة PCR- RFLP على الجين المستخدم في هذه الدراسة وهو ND4 لأول مرة ، إذ تم تقطيع قطعة من الدنا المايتوكوندري وهي جزء من الجين ND4 تحتوي على موقع واحد للهضم بأنزيم القطع (EcoRV) فضلا عن استخدامهم جينات وانزيمات قاطعة أخرى لأجزاء أخرى من الدنا المايتوكوندري ، إذ درسوا التنوع الوراثي للقطع الناتجة أو التي لم تنتج أو لم يتم تقطيعها ومن هنا جاء التنوع.

وقد عاود Gasparich وجماعته [14] العمل مستخدمين منطقتين من الدنا المايتوكوندري للحشرة هذه المرة هما ND4 و ND5 ولكن مع ثلاثة أنزيمات قاطعة هي (MnlI, XbaI, EcoRV) على التوالي بعد أن وجدوا تنوعاً عالياً بين المجاميع السكانية لذبابة البحر المتوسط في هاتين المنطقتين من الدنا المايتوكوندري لها وقد استخدموها على ما يقرب من مئة عينة سكانية حول العالم وبطريقة PCR-RFLP وبترتيب معين إذ إن كل أنزيم يقطع يعطى له الحرف A والأنزيم الذي لا يقطع يعطى له الحرف B وبالترتيب للحصول على صيغة من ثلاثة حروف.

وهكذا إستخدمت طريقة PCR-RFLP لدراسة التنوع الوراثي في ذبابة الفاكهة في المحافظات الوسطى من العراق ولتأسيس قاعدة بيانات مستقبلية تفيد عند إجتياح الحشرة للعراق من جديد ولمعرفة مصدرها وهل أن ذلك المصدر من المنطقة نفسها أم من غيرها ولم تستخدم طريقة RFLP لوحدها (التي لا تستند الى تقانة PCR) أو أي طريقة أخرى مثل RAPD (استخدام بادئات عشوائية لتضخيم مناطق مختلفة من الدنا بوساطة جهاز تقانة PCR) وذلك نتيجة لاختلاف الأهداف وتعددها وحسب الطريقة الملائمة لتحقيق الغرض المطلوب .

لقد بينت هذه الدراسة الجزيئية وجود تنوع وراثي في عينة محافظة الكوت مقارنة بعينتي محافظتي كربلاء وبغداد ومع ذلك كان لابد من اجراء دراسات من هذا النوع لاسيما بالحشرة نظرا لكونها تعود في كل مرة يتم القضاء عليها في منطقة معينة وتهاجم المنطقة نفسها مرة أخرى وخلال مدة زمنية قصيرة دون معرفة مصدرها أو ان كان لديها مقاومة ضد مبيد معين أستعمل في تلك المنطقة للحد من انتشارها ومالذي تم عمله للتعامل معها ،وما هي طرائق مكافحتها في المنطقة التي جاءت منها إذ أن العديد من البحوث دلت على وجود مقاومة للمبيدات المستخدمة ضد سلالات معينة من هذه الحشرة [15].

لذا توصي هذه الدراسة بفحص المواد الزراعية الداخلة للبلد وذلك لأن إهمال هذه الحالة لايؤدي الى تدهور الزراعة في البلد ،انما الى زيادة أعداد العاطلين عن العمل وتدهور الحالة الإقتصادية لمناطق الريف وغيرها من الأمور المعروفة.

المصادر

1-Copeland, R.S. ; Wharton, R.A. ; Luke, Q. and De Meyer, M. (2002) Indigenous hosts of Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae) in Kenya. Annals Entomol. Soc. Am., 95(6): 672-694.

2-White,I.M. and Elson-Harris ,M.M. (1992) Fruit flies of important significance :Their identification and bionomics,CAB international pub.,Wallingford,UK,601Pp

3-Liquido, N. J.; Shinoda, L. A. and Cunningham, R. T.(1991) Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): an annotated world review , Entomological Society of America, Miscellaneous, 77.

4-De Meyer, M.; Copeland, R.S. ; Wharton, R.A. and McPheron, B.A. (2004) On the geographic origin of the medfly, Ceratitis capitata (Wiedemann). In Barnes , B. (ed.), Proceedings of the 6th International Symposium of Fruit Flies of Economic Importance. Ist eg Scientific Publications, Irene, South Africa. 45–53.

5-Malacrida, A. R.; Gomulski, L. M.; Bonizzoni M.; Bertin, S.; Gasperi, G. and Guglielmino, C. R., (2007), Globalization and fruit fly invasion and expansion: the medfly paradigm, Genetica 131:1-9.

6-Barr, N. B. (2009), Pathway Analysis of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Using Mitochondrial DNA., J. Econ. Entomol. 102(1): 401-411.

7- الحيدري ، درويش ،(1947) ، ذبابة الفاكهة ، مجلة الزراعة العراقية ، المجلد الثاني ، الجزء الرابع ، 225 – 229 .

8-Al-Ali ,A.S. (1976) *Chaetirellia cazthami* on sunflower , FAO plant protection bulletin , 133-135.

9- الجبوري ، ابراهيم جدوع ،(2007) ، ذبابة ثمار فاكهة البحر المتوسط افة في بساتين الحمضيات و الفاكهة الاخرى ، المشاكل الحلول المقترحة ، نشرة ارشادية / وزارة الزراعة العراقية ، 43 صفحة .

10-Chandra, S. B. C.; Vlk, J. L. and Kapatral, V. (2006) Comparative insect mitochondrial genomes: Differences despite conserved genome synteny, African Journal of Biotechnology, 5 (14):1308-1318

11-Lanzavecchia, S. B.; Cladera, J. L. ; Faccio, P. ; Marty, N. P.; Vilardi, J. C.and Zandomeni R. O. (2008) Origin and Distribution of *Ceratitis capitata* Mitochondrial DNA haplotypes in Argentina., Ann. Entomol. Soc. Am. 101(3): 627-638.

12-Elfekih,S.;Haymer,D.S.;Mediouni,J.;Hajlaoui,M.R.andMakni,M.(2006), Survey of mitochondrial DNA markers in populations of *Ceratitis capitata* (Wiedmann) from Tunisia.,

Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Salvador, Brazil, Fruit Flies of Economic Importance: From Basic to Applied Knowledge, :53-57.

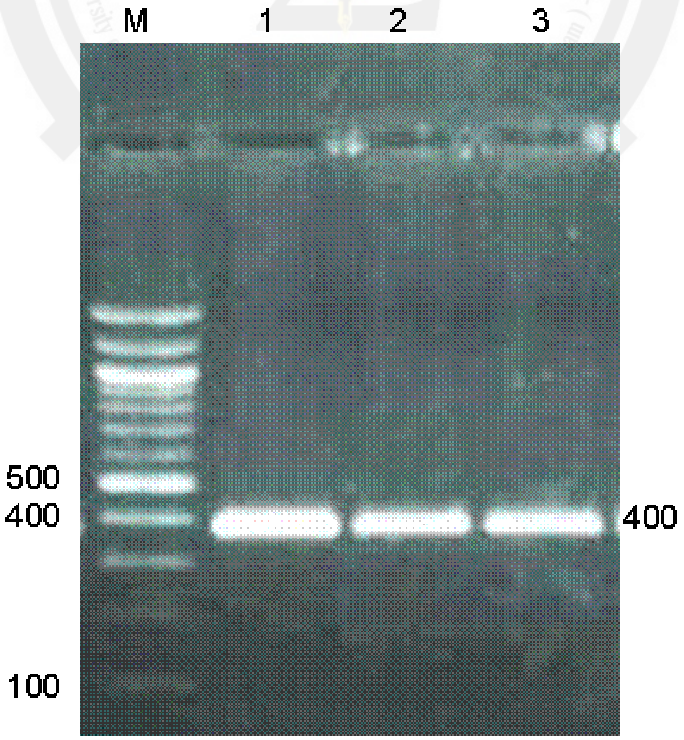
13-Gasparich,G.E.; Sheppard,W.S.; Han,H.Y.; McPherson,B.A. and Steck,G.J. (1995) Analysis of mitochondrial DNA and development of PCR-based diagnostic molecular markers for Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) populations. Insect Mol Biol. 4(1):61-67.

14-Gasparich, G. E.; Silva, J. G. , Han; H. Y. , McPheron, B. A. ; Steck, G. J. and Sheppard W. S. (1997) Population genetic structure of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) and implications for worldwide colonization patterns. Ann. Entomol. Soc. Amer. 90(6):790-797.

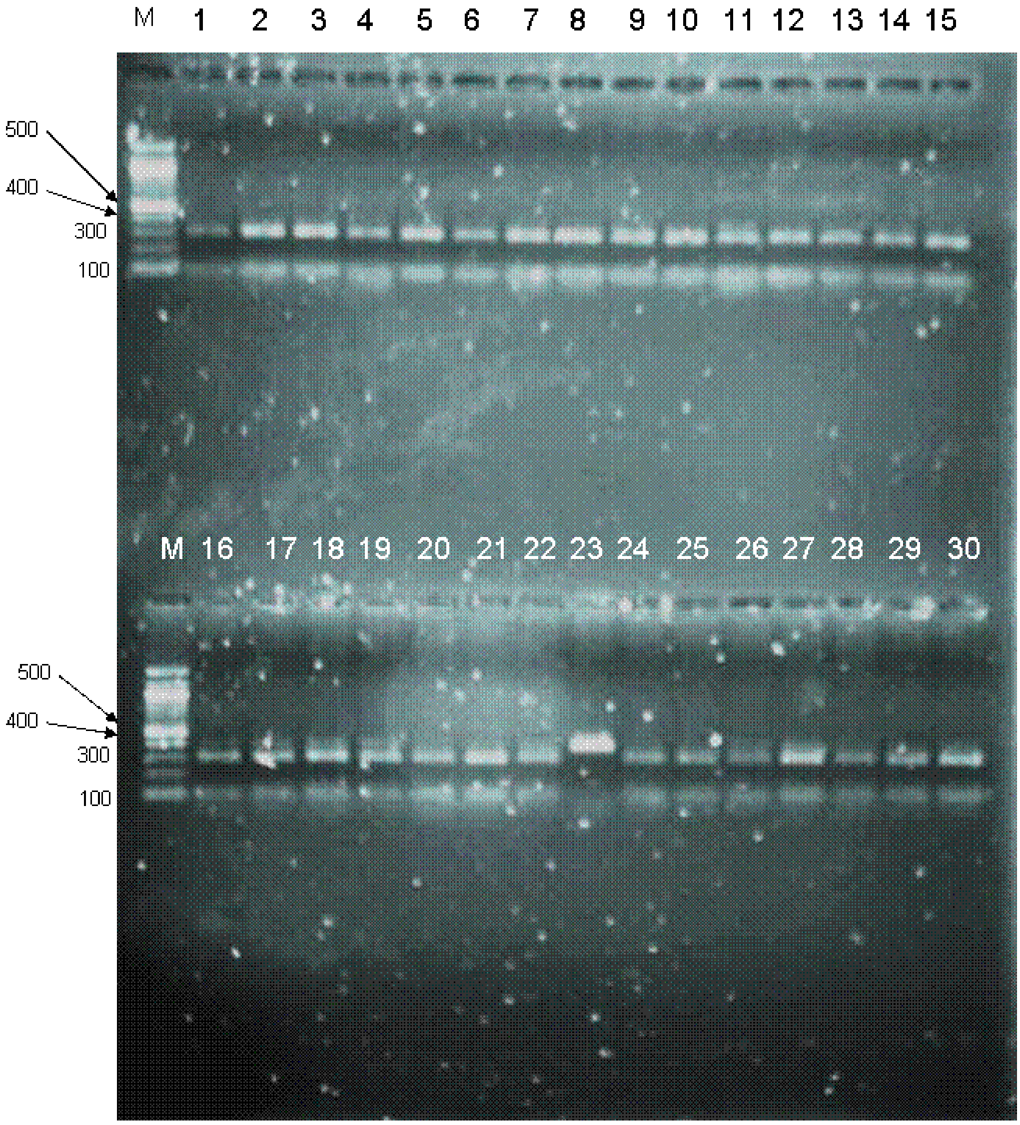
15-Magana,C.;Hernandez-Crespo,P.;Ortego,F. and Castanera,P. (2007) Resistance to Malathion in field population of *Ceratitis capitata*.,J.Econ.Entomol.,100(6):1836-1843.

جدول (1): زوج البوادي ء المستخدمة والجين المستهدف.

الجين المستهدف	تسلسل البادئة من القواعد النتروجينيه	رمز البادئة	الاتجاه
جزء من الجين NADH4 من الدنا المايتوكوندري	5-TAATAATCCATATCCTCCTA-3	N-4-J-8883	F (أمامي)
	5-TTAGTTTTAACATTTAGAAG-3	N-4-N-9243	R (راجع)



شكل (1) :اختبار زوج البادئين (N-4-J-8883 وN-4-N-9243) يعطي قطعة من الجين المدروس طولها 400 زوج قاعدي تقريبا من الجين ND4 من الدنا المايتوكوندري لذبابة فاكهة البحر المتوسط *Ceratitis capitata* الارقام تشير الى عينات الدنا المأخوذه من المحافظات الثلاثة عينة كربلاء، 2 عينة بغداد، 3 عينة الكوت، M يمثل واصم الوزن الجزيئي Molecular weight marker من 100-1517 زوجاً قاعدياً من شركة(New England biolabs،UK) ، المرحلة ب2% من هلام الاكاروز.



شكل (2): تقطيع جزء من الجين ND4 بوساطة انزيم القطع EcoRV ، M=الواصم الجزيئي Molecular marker (من 100-1517زوجاً قاعدياً من شركة (NewEngland Biolabs,UK) ، 1= الجين المستهدف بطول 399 زوجاً قاعدياً ; 1-30 عينة من محافظة الكوت(في 2 % من هلام الاكاروز) العينة رقم 23 لم يحدث فيها هضم بوساطة الانزيم القاطع مما يعطي الدليل على وجود التنوع الوراثي في عينة المحافظة.

Study of Genetic Polymorphism in the Mitochondrial DNA of the Mediterranean Fruit Fly *Ceratitis Capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera:Tephritidae)Using the Method of PCR-RFLP in Three Governorates in the Middle Region of Iraq.

M.M.Jawad, H.S.Al-Asady, I.A.Hussein
Department of Biology, College of Education Al-Haitham/ University of Baghdad
Received in: 5 June 2012 Accepted in: 12 September 2012

Abstract

Genetic polymorphism in a fragment of NADH (ND4),400bp long from the Mitochondrial DNA (mtDNA) of Mediterranean fruit fly *ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) using PCR-RFLP method with the restriction enzyme EcoRV in samples collected from three governorates in the middle of Iraq. The purposes of this study is to establish database, discover the introduction source as well as studying the genetic diversity for this economic pest in Iraq. The results show that there is a genetic polymorphism of the studied gene fragment among Kut governorate as compaired with the other studied samples according to digestion results of the restriction enzyme EcoRV.

Keywords: EcoRV :، *Ceratitis capitata* ، mtDNA , ND4