

* التشخيص الجزيئي لأنواع الجنس *Cotesia* spp في مدينة الديوانية باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة PCR

محمد صالح مهدي اليعقوبي- جامعة القادسية/ كلية التربية – قسم علوم الحياة

Mohammed.Mahdi@qu.edu.iq

سعدى محمد هلال - جامعة بابل/ كلية العلوم للبنات

محمد رضا عنون – جامعة القادسية/ كلية العلوم

الخلاصة

شملت الدراسة الحالية جمع عينات من يرقات وعذارى المتطفلات الحشرية التي تهاجم يرقات أبو دقيق أوراق السدر *Tarucus rosacea* المتغذية على أوراق أشجار السدر في محافظة القادسية بالإضافة إلى تشخيص المتطفلات بالاعتماد على الصفات الجزيئية، إذ أظهرت نتائج الدراسة أنه عند استخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة PCR في تشخيص الجنس وتم تشخيص نوعان من المتطفلات الحشرية التابعة للجنس *Cotesia* على يرقات فراشة أوراق السدر *T. rosacea* في محافظة الديوانية أحدهما له نسبة تطابق وصلت إلى 99% مع النوع *C. sesamiae* ، أما الآخر فهو نوع فريد Unique وذلك حسب التفرع الشجري لذلك الجنس، وإن كل نوع يمتلك صفات مظهرية مختلفة تماماً عن النوع الآخر.

كلمات مفتاحية: غشائية الأجنحة ، PCR ، *Cotesia sesamiae* ، Braconidae .

* البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.

المقدمة

تعود حشرة فراشة اوراق السدر *T. rosacea* إلى رتبة حرشفية الأجنحة Lepidoptera عائلة الزرق والنحاسيات Lycaenidae والتي هي عائلة ذات انتشار واسع، إذ تضم عدد كبير من الأنواع الصغيرة إلى متوسطة الحجم يقدر بعدة الآف، وهي ذات ألوان مختلفة تتدرج من الأزرق إلى البنفسجي والنحاسي (13 ، 1).

يُعد جنس الطفيلي *Cotesia* sp. من الأجناس المهمة والتي بدأت تأخذ حيزاً في الدراسات الحيوية المتعلقة بمكافحة الآفات الحشرية، إذ أن جميع الأنواع التي تعود إليه هي طفيليات على الحشرات من حرشفية الأجنحة على وجه الخصوص (5 ; 6 ; 9).

إن جنس الـ *Cotesia* هو جنس كبير جداً ومجموعة واسعة من المتطفلات الأولية primary parasitoids لآفات عديدة، ويُعد جنس ذو انتشار عالمي وموجود في كل مكان تقريباً، إذ يضم ما بين ١٥٠٠-٢٠٠٠ نوع، وهو الجنس الشائع تقريباً لتحت العائلة Microgasterinae كما أنه ثاني أكبر جنس فيها، ويعد من أكثر المجاميع تعقيداً في تحت هذه الرتبة، وأن أغلب أنواعه هي إجتماعية، وحوالي ربع عددها فردية المعيشة (4 ; 12 ; 11 ; 7 ; 14 ; 8) .

وفي دراسة أجراها (10) أشاروا فيها إلى أن أفراد عائلة Braconidae تُعد ذات انتشار واسع وكبير في كل انحاء العالم تقريباً، فقد ذكروا تسجيل عشرة أطوار يرقية لمتطفلات مرافقة مع حفارات سيقان الذرة الصفراء والبيضاء وخصوصاً النوعين *Chilo partellus* (Swinhoe) و *Sesamia clamistis* (Hampson) (Crambidae : Lepidoptera) و (Noctuidae : Lepidoptera) في كينيا، وقد اتضح أن من بين الأنواع العشرة المسجلة في هذه الدراسة كان النوع *C. sesamiae* هو أكثر نوع من المتطفلات كان شائعاً، وقد أصاب جميع أنواع حفارات السيقان وبنسبة تطفل كلية على اليرقات بلغت ٨٥,٢%.

وفي دراسة أجراها (11) على أنواع مختلفة تابعة للجنس *Cotesia* جُلبت من تسع مناطق جغرافية مختلفة ومن خمس قارات، إذ تم تشخيصها ومعرفة أنواعها عن طريق استخلاص الـ DNA لتلك العينات باستعمال تقنية الـ PCR، وقد تبين من النتائج وجود النوع *C. flavipes* في كل من عينات تايلند وكينيا، ووجود النوع *C. sesamiae* في عينة كينيا أيضاً، ووجود النوع *C. plutella* في عينات كل من تايوان، ماليزيا، بريطانيا، كينيا، بنين، تايلند، وجنوب أفريقيا، كما وجود النوع *C. glomerata* في عينة الهند والنوع *C. rubecula* في عينة أستراليا.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات Samples collection

تمّ جمع شرانق Cocoons الطفيل من على شجيرات السدر وبشكل يومي والتي تمّ اختيارها وبشكل عشوائي وبأوقات مختلفة أيضاً خلال النهار ومن محطات الجمع الثلاث، وامتدت مدة الجمع على مدار عام كامل ابتداءً من بداية شهر آيار/٢٠١٣ ولغاية نهاية شهر نيسان/٢٠١٤.

بعد جمع العينات وضعت بداخل أطباق بتري بلاستيكية ومن ثم في حافظه خاصة مغلقة، ونُقلت على الفور إلى مختبر الحشرات في قسم علوم الحية بكلية التربية. حُفظت النماذج المعزولة للطفيليات البالغة في الثلاجة وبدرجة حرارة ٤° م حسب ما ذكره (3) في دراستهم عن طرق حفظ العينات المماثلة من الطفيليات الحشرية، ومن أماكن وأوقات الجمع المذكورة في أعلاه. شملت العينات المستخدمة في الدراسة الجزيئية مجموعتين؛ الأولى مثلت نماذج بالغات النوع الأسود Black wasp والثانية نماذج بالغات النوع الأحمر Red wasp للطفيلي وبمعدل (١٠) نماذج لكل عينة لغرض التحليل الجزيئي واستخلاص الحمض النووي DNA.

حفظ وإدامة العينات

وضعت النماذج في داخل حاضنة مبردة خاصة cooled incubator (شركة Gallenkamp) وبدرجة حرارة ٣٠° م ± 2 وهي درجة الحرارة الملائمة لها وحسب ما ذكره (٢)، كما زودت الحاضنة بأطباق بتري زجاجية تحوي ماء لغرض توفير الرطوبة الملائمة للعينات.

تشخيص العينات

عُزلت بعض النماذج الخاصة ببالغات الطفيلي البازغة التي تم الحصول عليها بالخطوة السابقة ووضعت بداخل أنابيب اختبار test tubes خاصة حاوية على كحول ايثيلي ethanol بتركيز ٩٠% ووضعت بداخل ثلاجة freezing refrigerator وبدرجة حرارة ٤° م ، إذ مثلت طريقة فعالة للحفاظ على نماذج الطفيليات ولفترات طويلة حسب ما ذكره (3). كما تمّ عزل نماذج من الطفيليات البالغة (ذكور وأناث) على حده لغرض التشخيص الجزيئي باستخدام تفاعل سلسلة البلمرة PCR.

الدراسة الجزيئية Molecular Study

البادئات Primers

تم تصميم البادئات الخاصة بجين 16S rRNA gene الخاص بتشخيص أنواع جنس *Cotesia* في هذا البحث اعتماداً على التسلسل الجيني لجين 16S rRNA gene الموجود في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank وذلك باستعمال برنامج تصميم البادئات Primer 3 plus. وتم تجهيز تلك البادئات عن طريق شركة Bioneer في كوريا.

Primer	Sequence		Amplicon
<i>Cotesia</i> sp. 16S rRNA gene	F	TGCAGTATAAATAACTGTACAAAG GCA	317bp
	R	TGCTGTTATCCCTAAGGTAATTTA ATT	

Cotesia sp. RSR-2005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial
GenBank: AY936218.1.

طريقة العمل Methods

فحص تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase chain reaction (PCR)

تم إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة للتحري عن جين 16S rRNA الخاص بتشخيص أنواع حشرة *Cotesia* وحسب الطريقة التي ذكرها (2006) Rattan *et al.* في دراستهم على أنواع الجنس وكما يأتي:
يتكون الفحص من عدة خطوات:-

١- استخلاص الحمض النووي النسيجي Tissue genomic DNA

extraction

تم إجراء استخلاص الحمض النووي من نماذج جنس *Cotesia* وذلك باستعمال عدة الـ (Genomic DNA extraction kit Tissue) المجهزة من شركة Geneaid الأمريكية، وتم إجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة المرفقة مع العدة.



صورة رقم (١): تمثل الطفيلي *Cotesia sesamiae* الأسود Black wasp (منظر جانبي).



صورة رقم (٢): تمثل الطفيلي *Cotesia sp.* الأحمر Red wasp (منظر جانبي).

٢- فحص الحمض النووي المستخلص DNA examination

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص وذلك باستعمال جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) الخاص بالكشف وقياس تركيز الأحماض النووية إذ يتم الكشف عن الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي (ng/μl) DNA وقياس نقاوة الحمض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260/280nm).

تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستعمال عدة الـ AccuPower® PCR PreMix المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة وكما في الجدول التالي:

PCR master mix		Volume
DNA template		5μL
Primers	F. primer	1.5μL
	R. primer	15μL
PCR water		12μL
Total		20μL

حالات الدورات الحرارية لفحص البي سي آر PCR Thermocycler conditions

تم إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة باستعمال جهاز البي سي آر PCR thermocycler.

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 C	5 min
Denaturation	30	95 C	5 sec.
Annealing		60 C	30 sec
Extension		72 C	45 sec
Final extension	1	72 C	7 min
Hold	-	4 C	Forever

الترجيل الكهربائي للهلام Gel electrophoresis

تم إجراء الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الأكرورز بنسبة ١,٥% وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product ، وحسب تعليمات الشركة المثبتة مع العدة.

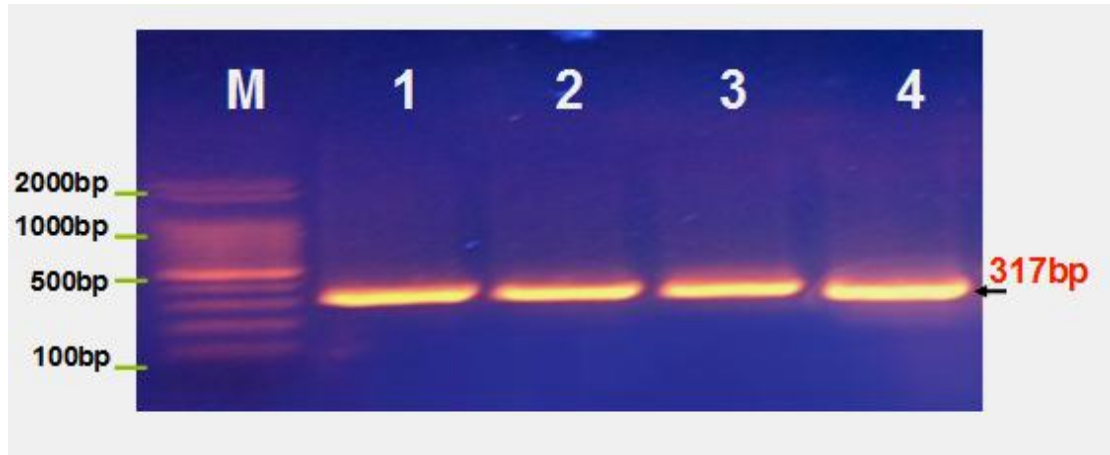
طريقة تسلسل الحمض النووي DNA sequencer method

تم إجراء طريقة تسلسل الحمض النووي لتحديد نوع جنس *Cotesia* المشخص بطريقة الصفات المظهرية وطريقة فحص الـ PCR وذلك من خلال إجراء تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis لجين 16S rRNA gene ، إذ في البداية تم إجراء تفاعل الـ PCR البالغ طوله (317bp PCR product) بعد ذلك تم إرسال ناتج تفاعل PCR إلى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية وذلك لإجراء تسلسل الحمض النووي باستعمال جهاز . AB DNA sequencing system

النتائج والمناقشة

إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة PCR

تم إجراء تفاعل سلسلة البلمرة (PCR) وذلك للتحري عن جين الـ (16s rRNA) الموجود في جنس الطفيل *Cotesia* ، حيث يمتاز هذا الجين بكونه يحتوي على تسلسل قواعد نيتروجينية متغيرة من نوع لآخر ضمن هذا الجنس. أظهرت نتائج فحص الـ PCR للعينات المأخوذة للحشرة عن تفاعل عالي الخصوصية والحساسية بظهور حزم واضحة لنوعي الجنس قيد الدراسة بناتج طوله 317 bp على هلام الأكاروز، وكما مبين في الشكل (١).



الشكل (١): يمثل صورته الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين الـ 16S rRNA الخاص بتشخيص أنواع الجنس *Cotesia*. حيث يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر من رقم (١ و ٢) للنوع *Cotesia* الأسود و الحفر من رقم (٣ و ٤) للنوع *Cotesia* الأحمر الموجبة للفحص بناتج طوله 317 bp.

DNA sequencer تحليل نتائج تسلسل الحمض النووي

تم إجراء فحص تسلسل الحمض النووي لجين 16s rRNA الخاص بجنس الحشرة وذلك لتحليل التتميط النوعي باستعمال تحليل الشجرة الوراثية وباستعمال برنامج (MEGA6). حيث أظهرت نتائج التحليل الوراثي وجود تشابه واضح للعينة Black wasp المحلية مع النوع *C. sesamiae* والمسجلة عالمياً في موقع NCBI - Genbank ، بينما أظهرت نتائج التحليل الوراثي للعينة الأخرى Red wasp المحلية اختلافاً واضحاً بالمقارنة مع بقية أنواع جنس *Cotesia* مما يدل على كونها نوعاً جديداً من ضمن هذا الجنس. وكما مبين في الشكلين (٢) و(٣).

[illegible]

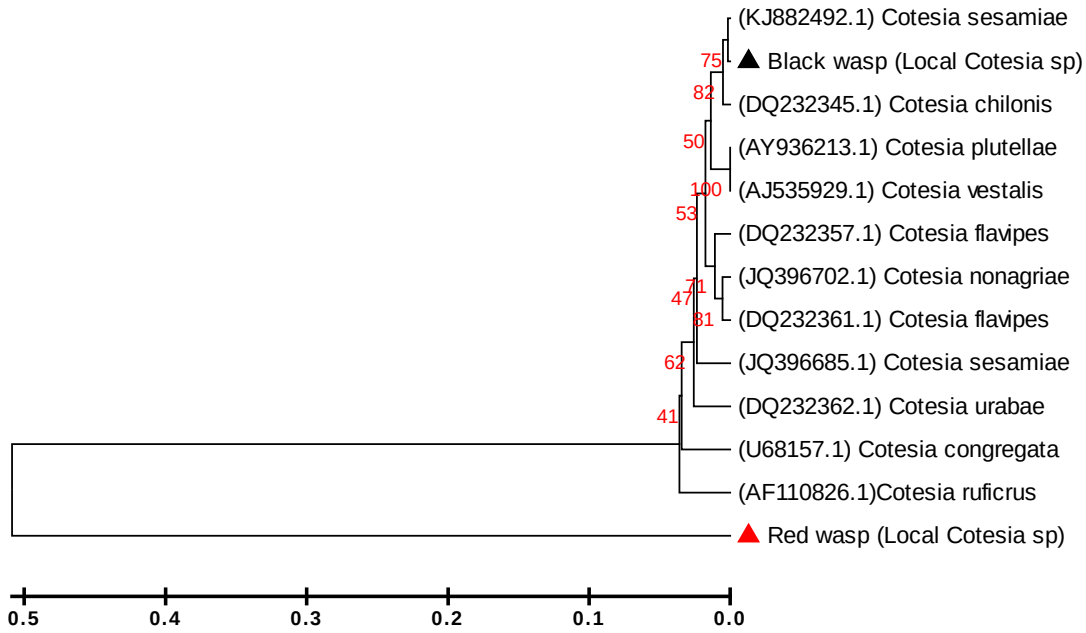
الشكل (٢): يمثل تحليل متعددة اصطفاف تسلسل القواعد الجينية (Multiple sequence alignment analysis) باستعمال برنامج (MEGA6) لنتائج فحص تفاعل تسلسل البلمرة PCR لجين 16S rRNA gene في جنس *Cotesia* ، حيث يلاحظ التشابه الواضح لاصطفاف تسلسل القواعد لجين 16S rRNA gene في جنس *Cotesia* sp. المحلية مع أنواع جنس الـ *Cotesia* sp. المسجلة في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank الظاهرة في الصورة.

يتبين من خلال الجدول (١) والذي أرسل من خلال موقع الجينات العالمي - NCBI Genbank نسب التطابق بين العزلات العالمية وبين العزلتين المحليتين اللتين تم الحصول عليهما في الدراسة الحالية. إذ يلاحظ نسبة تطابق عالية جداً بالنسبة للعينة المحلية الأولى (Black wasp) مع النوع *C. sesamiae* بلغت 99%، في حين لم تُظهر التطابقات الأخرى أي تطابق بنسبة عالية مع أي نوع آخر بالنسبة للعينة المحلية الثانية (Red wasp) كما حصل مع العينة الأولى، واعتبر بذلك نوع محلي جديد لهذا الجنس.

جدول (١): جدول التطابق الوراثي بين الحشرات المحلية (نوعي الجنس) مع الأنواع الأخرى للجنس *Cotesia* المسجلة عالمياً في موقع بنك الجينات العالمي.

Blast <i>Cotesia</i> sp.	Homology Sequence Identity	
	Black wasp	Red wasp
<i>Cotesia sesamiae</i> (KJ882492.1)	99%	93%
<i>Cotesia chilonis</i> (DQ232345.1)	98%	95%
<i>Cotesia nonagriæ</i> (JQ396702.1)	97%	93%
<i>Cotesia vestalis</i> (AJ535929.1)	97%	93%
<i>Cotesia plutellæ</i> (AY936213.1)	97%	97%
<i>Cotesia flavipes</i> (DQ232361.1)	97%	93%
<i>Cotesia urabæ</i> (DQ232362.1)	97%	Not identity
<i>Cotesia congregata</i> (U68157.1)	94%	93%
<i>Cotesia ruficrus</i> (AF110826.1)	94%	94%

ذكر (11) في دراستهم بأن التعاقبات الجينية في تسلسل القواعد النيتروجينية في العينات أوضحت درجة عالية من التماثل داخل الأنواع (وصلت إلى 98%)، ولهذا السبب فإن العينات يمكن ان تُنقل أو تُرد بشكلٍ موثوق إلى الأنواع مهما تكن أصولها الجغرافية، وذكر بأنه يستنتج من ذلك أن الجين 16S هو دليلٌ موثوق لتشخيص أنواع جنس الـ *Cotesia*.



الشكل (3): المخطط الشجري لدرجة التشابه والاختلاف بين أنواع الجنس *Cotesia* باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة PCR.

ويلاحظ من خلال الشكل (٣) تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis لجنس *Cotesia* في الدراسة الحالية باستعمال برنامج (MEGA 6)، حيث تم استعمال تحليل الشجرة الوراثية من نوع (UPGMA tree) (Unweighted Pair Group Method) with Arithmetic Mean، إذ أظهرت نتائج التحليل وجود تقارب واضح للطيفيل الأسود Black wasp المحلي مع نوع (KJ882492.1) *Cotesia sesamiae* المسجلة في موقع الـ NCBI-Genbank ، على حين أظهر النوع الأحمر Red wasp المحلي إختلافاً واضحاً بالمقارنة مع بقية الأنواع الأخرى الظاهرة في تحليل الشجرة الوراثية.

كما تمّ الحصول على كودات التسجيل الخاصة بالأنواع المشخصة في الدراسة للجنس *Cotesia* والتي أرسلت من موقع بنك الجينات العالمي NCBI Genbank ، بالإضافة إلى وثيقة التسجيل الرسمي لأنواع جنس الـ *Cotesia* والتي سُجلت في الدراسة الحالية في موقع بنك الجينات العالمي والتي أرسلت كذلك من الموقع المذكور.

* Molecular Identification to Species of Genus
Cotesia spp in Al-Diwaniyah City
By PCR Technician

Mohammed Saleh Mahdi - Al-Qadisiyah University/ College of Education-
Department of Biology

Mohammed.Mahdi@qu.edu.iq

Saadi Mohammed Hilal - Babylon University/ College of Science
Mohammed Redha Annon - University of Al-Qadisiyah/ College of Science

Abstract

Present study involve the collecting of samples of larvae and pupa of parasitoids that attack the larvae of ***Tarucus rosacea*** feeding on leaves of ***Zizyphus*** trees on Al-Qadisiyah Province addition to identification of parasitoids depending on the molecular characters.

The results of present study show that when use the polymeric chain reaction (PCR) technician to identify the Genus and the species will identify two species of insect parasitoid that following the genus ***Cotesia*** on the ***Tarucus rosacea*** larvae at Al-Diwaniyah Province one of them have correspondence percent reach to (99%) with ***C. sesamiae***, while the other is a unique species depending on the tree clade of the Genus, and any species that have a morphological features completely different from the other.

Key words: Hymenoptera , Braconidae , PCR , ***Cotesia sesamiae***

* The research is a part of Ph.D. dissertation in the case of the first researcher.

المصادر

- ١- جيلوت، سيدريك (١٩٩٢). علم الحشرات Entomology. ترجمة د. علي شعلان معيلف و د. سعدي محمد هلال. جامعة البصرة. كلية الزراعة. مطبعة دار الحكمة. ١١١٥ ص.
- ٢- محمد، علي محمد و الصعيدي، عبد الحكم عبد اللطيف (٢٠٠٣). أساسيات علم بيئة الحشرات. مصر. القاهرة. مكتبة الدار العربية للكتاب. ٤٤٥ ص.
- 3- **Carvalho, A.O.R. and Vieira, L.G.E. (2000).** Systematics, Morphology and Physiology. Comparison of preservation methods of *Atta* spp. (Hymen.: Formicidae) for RAPD Analysis. An. Soc. Entomol. Brasil. 29(3): 489-496.
- 4- **Gupta, A. and Lokhande, S.A. (2013).** A New host record and a new combination in *Cotesia* Cameron (Hymenoptera: Braconidae) from India. Journal of Threatened Taxa 5(2): 3678-3681.
- 5- **Hayakawa, Y. ; Yazaki, K. ; Yamanaka, A. and Tanaka, T. (1994).** Expression of polydnavirus genes from the parasitoid wasp *Cotesia kariyai* in two noctuid hosts. Mol. Biol., 3(2): 97-103.
- 6- **Hayakawa, Y. and Yazaki, K. (1997).** Envelope protein of parasitic wasp symbiont virus, polydnavirus, protects the wasp eggs from cellular immune reactions by the host insect. Eur. J. Biochem., 246(3): 820-826.
- 7- **Inanc, F. (2002).** *Cotesia pappi* sp. N. (Hymenoptera : Braconidae : Microgasterinae) from Turkey. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 48(2): Pp. 157-160.
- 8- **Jacobson, N.L. (1991).** Parasitoid and larval food plant records for three Peruvian moths (Arctiidae, Saturniidae). Journal of the lepidopterists Society, 45(2): 173-175.
- 9- **Matsumoto, H. ; Nogguchi, H. and Hayakawa, Y. (1998).** Primary cause of mortality in the armyworm larvae simultaneously parasitized by parasitic wasp and infected with bacteria. Eur. J. Biochem., 252(2): 299-304.
- 10- **Niyibigira, E.I. ; Abdullah, Z.S. ; Overholt, W.A. ; Lada, V.Y. and Van Huis, A. (2001).** Distribution and abundance in maize and sorghum of

Lepidopteran stem borers and associated indigenous parasitoids in Zinziber. International centre of Insect physiology and ecology (ICIPE), Kenya. Insect science and its Application, 21(4): 335–346.

- 11- **Rattan, R.S. ; Reineke, A. ; Hadapad, A. ; Gupta, P.R. and Zebitz, C.P.W. (2006).** Molecular phylogeny of *Cotesia* species (Hymenoptera: Braconidae) inferred from a 16S gene. Scientific Correspondence. Current Science, 91(11): 1460–1461.
- 12- **Santana, H. Gil ; Marques, O.M. and Tangerini, N. (2008).** New parasitoid of *Automeris melanops* (Walker) (Lepidoptera: Saturniidae: Hemileucinae). Magistra, Cruz das Almas–BA, 20(1): 109–111.
- 13- **Smart, P. (1976).** The Illustrated Encyclopedia of the butterfly world. The Hamlyn Publishing Ltd. 275 pp.
- 14- **Whitfield, J.B. (1998).** Subfamilia Microgasterinae. p. 338–371. In Wharton, R.A. ; Marsh, P.M. and Sharkey, M.J. (Eds.). Manual para de la familia Braconidae (Hymenoptera) del Nuevo Mundo. Washington: The International Society of Recebido: 2006.