



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة العلاقة الوراثية الجزيئية والكمية بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

Chrysomya bezziana (Villeneuve, 1914)

(Diptera:Calliphoridae)

في العراق

رسالة مقدمة الى مجلس

كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى كجزء من متطلبات نيل درجة

الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان

من قبل الطالب

حسين محمد بريس التميمي

بكالوريوس علوم حياة 2009

بإشراف

أ.م.د. عمار احمد سلطان القرعة غولي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

يَا أَيُّهَا النَّاسُ ضُرِبَ مَثَلٌ فَاستَمِعُوا لَهُ إِنَّ الَّذِينَ تَدْعُونَ مِنْ دُونِ اللَّهِ لَنْ

يَخْلُقُوا ذُبَابًا وَلَوْ اجْتَمَعُوا لَهُ وَإِنْ يَسْلُبْهُمُ الذُّبَابُ شَيْئًا لَا يَسْتَنْقِذُوهُ مِنْهُ

ضَعُفَ الطَّالِبُ وَالْمَطْلُوبُ (73)

صدق الله العلي العظيم

(سورة الحج : الایة 73)

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن أعداد هذه الرسالة الموسومة (دراسة العلاقة الوراثية الجزيئية والكمية بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Chrysomya bezziana* (Villeneuve, 1914) (Diptera: Calliphoridae) في العراق) التي قدمها طالب الماجستير (حسين محمد بريسم التميمي) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية بأشرافي بحيث أصبحت بأسلوب لغوي سليم خال من الأخطاء غير الصحيحة والتعابير ، ولأجله وقعت .

التوقيع:

الاسم : ابراهيم رحمن حميد الأركي

المرتبة العلمية : أستاذ دكتور

التاريخ : / /

بسم الله الرحمن الرحيم

اقرار المشرف

اشهد أن أعداد هذه الرسالة الموسومة (دراسة العلاقة الوراثية الجزيئية والكمية بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Chrysomya bezziana* (Villeneuve,1914) (Diptera:Calliphoridae) في العراق) التي قدمها طالب الماجستير (حسين محمد بريسيم التميمي) قد تم بأشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان .

التوقيع:

المشرف: عمار احمد سلطان

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد دكتور

التاريخ: / /

اقرار لجنة الدراسات العليا

بناءا على التوصيات التي تقدم بها المشرف والمقوم اللغوي أرشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: عمار احمد سلطان

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد دكتور

التاريخ: / /

توصيات رئيس قسم علوم الحياة

بناءا على التوصيات المتوافرة أرشح هذه الرسالة الى المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: عمار احمد سلطان

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد دكتور

التاريخ: / /

بسم الله الرحمن الرحيم

اقرار لجنة المناقشة والتقويم

نحن رئيس وأعضاء لجنة المناقشة الموقعين في أدناه نشهد أننا اطلعنا على الرسالة الموسومة (دراسة العلاقة الوراثية الجزيئية والكمية بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم قدمها طالب الماجستير (حسين محمد بريس التميمي) وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان ، وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدناها مستوفية لمتطلبات درجة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان بتقدير (امتياز) .

عضو اللجنة (رئيسا)	عضو اللجنة	عضو اللجنة
الاسم: رزاق شعلان عكل	الاسم: رياض علي عكلي	الاسم: خنساء سلمان فرمان
المرتبة: أ.م.د	المرتبة: أ.م.د	المرتبة: م.د
العنوان: جامعة بغداد/مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي	العنوان: وزارة العلوم والتكنولوجيا/ دائرة البحوث الزراعية	العنوان: جامعة ديالى / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: / /	التاريخ: / /	التاريخ: / /

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

عضو اللجنة (مشرفا)	التوقيع:
الاسم: عمار احمد سلطان	الاسم: غالب ادريس عطية
المرتبة: أ.م.د	المرتبة: أستاذ مساعد دكتور
العنوان: جامعة ديالى / كلية التربية للعلوم الصرفة	العنوان: جامعة ديالى / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: / /	التاريخ: / /

الاهداء

الى من علمني منذ الصغر حب العلم وتقديسه.....

الى من زرع في نفسي كل المعاني والصفات الطيبة

الى من غذى في روحي حب الناس جميعا واحترامهم

والذي العزيز رحمه الله

الى رمز المحبة والعطف والحنان...

الى التي من تحت قدميها نال الجنان

والدتي الحبيبة

الى من كانت لي سنداً وعونا في كل شيء

الى شريكة حياتي ورفيقة عمري.....

زوجتي الحبيبة

الى المستقبل القادم بكل أنواره وطموحاته وأحلامه.

الى ثمرة فؤادي وزهور حياتي.....

أولادي الأمانة

الى من كانوا لي عوناً في الشدائد.....

أخوتي وأخواتي الأعزاء.....

اهدي ثمرة جهدي المتواضع مع كل التقدير والاحترام.....

الباحث

شكر وتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على اشرف الأنبياء والمرسلين حبيبنا وحبیب
اله العالمين أبي الزهراء محمد وعلى اله الطيبين الطاهرين .

أن من دواعي سروري واعتزازي وأنا انهي دراستي هذه أن أتقدم بالشكر والتقدير الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة وخص بالذكر السيد عميد الكلية المحترم الأستاذ المساعد الدكتور غالب ادريس عطية وكذلك أتقدم بالشكر والتقدير الى رئاسة قسم علوم الحياة لمساعدتهم لي في اكمال بحثي وفي مقدمتهم أستاذي الفاضل الدكتور عمار احمد سلطان القرةغولي (رئيس القسم) المحترم لاقتراحه موضوع الدراسة والإشراف المباشر على البحث بكل خطواته فضلا عما أبداه لي من أفكار وارشادات وتوجيهات علمية رصينة وتقديمه لي كل العون وكل التسهيلات وبدون أي تردد واستثناء لأكمال دراستي في المجالين العملي والنظري ، فائق شكري وتقديري واحترامي لكل من الدكتور أياد احمد الطويل معاون مدير عام دائرة البحوث الزراعية في وزارة العلوم والتكنولوجيا والدكتور محمد صالح عبد الرسول/ جامعة بغداد/ مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي لتوجيهاتهم العلمية السديدة ومساعدتهم لي في انجاز البحث، شكري وتقديري وامتناني للأستاذ المساعد الدكتور رزاق شعلان عكل/مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي/قسم الحشرات واللافقریات في جامعة بغداد الذي بذل جهودا عالية في مساعدتي في مجال تشخيص وتربية الحشرة بتوجيهات العلمية السديدة في كل وقت ، وأتقدم بالشكر والتقدير والامتنان للدكتورة شذى يوسف عايد/مركز مكافحة المتكاملة للآفات /دائرة البحوث الزراعية في وزارة العلوم والتكنولوجيا لمساعدتها لي في تحليل نتائج البحث، شكري وتقديري الى الأستاذ المساعد الدكتور رياض علي عكيلي دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا لمساعدته لي في انجاز البحث ، كما اشكر السادة أعضاء لجنة المناقشة لتفضلهم بقبول قراءة موضوع الرسالة ومناقشتها وأتقدم أيضا بالشكر والتقدير للمقوم اللغوي ، بالغ الشكر والتقدير الى منتسبي قسم الحشرات واللافقریات في مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي/ جامعة بغداد وخص بالذكر الأستاذ المساعد الدكتور هناء هاني الصفار رئيس القسم و الأستاذ المساعد الدكتور عامر متعب حسين مدير المركز لمساعدتي وتسهيل مهمتي في انجاز موضوع التشخيص ، وأخيرا أتقدم بالشكر والامتنان الى جميع زملائي وزميلاتي طلبة الدراسات العليا وأدعو من الله العلي العظيم أن يوفق الجميع

الباحث

الخلاصة

درست العلاقة الوراثية الجزيئية والكمية بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (*Chrysomya bezziana* Vill.) والتي جمعت عيناتها من بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه ، اذ أخذت عينات الحشرة من هذه المناطق لغرض تربيتها واكمال دراسة الجانب العملي في المجالين الجزيئي والكمي ، وقد استخدمت في هذه الدراسة الطرق الحياتية الجزيئية للكشف عن التنوع الوراثي الجيني في ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* عزل ألد DNA من ذكور واناث الحشرة باستخدام عدة الاستخلاص Genomic DNA Mini Kit-Tissue وتراوحت نقاوة ألد DNA المعزول من عينات مناطق الدراسة الثلاثة المذكورة أعلاه من 1.8 الى 2 نانوميتر، بعد ذلك تم تضخيم قطعة من DNA النواة المعزول التي تتألف من ألجين EF-1.gene والجين White gene وكذلك جرى تضخيم قطعة من DNA الماييتوكوندريا mtDNA المعزول التي تحوي على ألجين Cytochrome b(CB) باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) وبوجود ثلاثة أزواج من البوداي المتخصصة Specific Primers بواقع زوجين لكل جين وبأتجاهين مختلفين أمامي Forward وعكسي Reverse ، ثم جرى بعد ذلك دراسة التسلسل ألتتابعي لجزء من جين النواة White gene المضخم بواسطة جهاز ألد PCR والذي بلغ طول التسلسل النيوكلوتيدي الواضح والمأخوذ منه عند دراسة التسلسل ألتتابعي 526bp زوجا قاعديا وقد كان عدد أفراد العينات المدروسة للمناطق الثلاثة في هذه ألجين (3) حشرات ، حيث أظهرت النتائج أن هناك تنوعا وراثيا بسيطا بين عينات منطقتي الشمال و الوسط من جهة وعينات المنطقة الجنوبية من جهة أخرى وهذا التنوع ظهر بشكل طفرات نقطية Point mutations من نوع الحذف والاستبدال عند مقارنة تسلسل القواعد النتروجينية بين العينات المدروسة للمناطق الثلاثة ، كذلك تم مقارنة العينة المحلية الأكثر تكرارا في تسلسل القواعد النتروجينية مع عيني بنك ألجينات التي تعود أحداها للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* والأخرى لذبابة التدويد الثانوي *Ch.megacephala* والتي تنتمي لنفس الرتبة والعائلة والجنس والسبب في اختيار هذه العينة هو عدم وجود دراسات محلية حول تضخيم جين دنا النواة White gene وجين دنا الماييتوكوندريا Cytochrome b(CB) لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم فضلا عن ان الدراسات العالمية في هذا المجال ولهذه الحشرة بالذات قليلة جدا والموجود منها اختص بدراسة عدد كبير وغير محدود من المجتمعات السكانية للحشرة على مستوى العالم، كذلك فان مقارنة العينات المحفوظة مع العينات المدروسة لمناطق العراق الثلاثة أعلاه يعطي نتائج دقيقة جدا في تمييز المجتمعات السكانية للذبابة الحلزونية للعالم القديم . وقد وجد عند إجراء المقارنة بين عينة

ب

بنك الجينات الخاصة لذبابة النوع *Ch.megacephala* وعينة الدراسة المحلية التي اختيرت للمقارنة (*Ch.bezz.S*) استبدالا في 45 قاعدة نتروجينية موزعة على طول التسلسل النيوكليوتيدي للعينات المدروسة في هذا ألجين لأنهما نوعان مختلفان، بينما كان عدد طفرات الاستبدال مع عينة بنك الجينات الخاصة بذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم اقل من ذلك بكثير وهذا يعني أنهما متطابقتان وتعودان الى نوع واحد ، اذ وجد أن نسبة التطابق بينهما من ناحية التقارب في عدد ومواقع طفرات الحذف والاستبدال في التسلسل التتابعي للقواعد النتروجينية تتراوح بين 84-89%، وقد جرى أيضا دراسة التسلسل التتابعي للقواعد النتروجينية لجزء من ألجين Cytochrome b(CB) الموجود في DNA المايكوكوندريا والذي بلغ طول التسلسل النيوكليوتيدي الواضح والمأخوذ منه للدراسة 556bp زوجا قاعديا، وكان عدد العينات المدروسة لهذا ألجين من المجتمعات السكانية الثلاث للحشرة في بعض مناطق شمال ووسط وجنوب العراق هو 9 عينات بواقع 3 منها لكل منطقة ، وقد لوحظ أن هناك تنوعا وراثيا بسيطا بشكل طفرات نقطية من نوع الحذف والاستبدال في بعض مواقع القواعد النتروجينية للتسلسل النيوكليوتيدي لعينات الدراسة وخاصة العينة التي تمثل حشرات الجيل الثالث لمنطقة الوسط التي اختيرت لأنها الأكثر تكرارا لغرض المقارنة مع عينات بنك الجينات العالمية التي تعود أحداها للذبابة الحلزونية للعالم القديم (*JQ655221.1Ch.bezz*) والعينة الأخرى تعود لذبابة (*JQ655204.1 Ch.mega*). فضلا عن ذلك وجد أثناء المقارنة أن عينة الجيل الثالث لمنطقة الوسط (M3) أقرب من ناحية التشابه في العدد والمواقع التي يحدث فيها الاستبدال الى عينة بنك الجينات الخاصة بالذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* بينما لوحظ أن هناك استبدالا بين عينة الجيل الثالث للمنطقة الوسطى وعينة بنك الجينات العائد لذبابة النوع *Ch.megacephala* في 82 قاعدة نتروجينية موزعة على طول التسلسل النيوكليوتيدي وهذا يدل على أنهما نوعين مختلفين. كما وجد أيضا أن نسبة التطابق بين عينة الجيل الثالث لمنطقة الوسط وعينة الذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* في بنك الجينات هي 84% ومع عينة *Ch.megacephala* هي 81% ، وكذلك وجد في دراسة التسلسل التتابعي للجين CB عدم وجود طفرات نقطية من نوع الحذف في عينات المنطقة الجنوبية وذلك لأختلاف الظروف البيئية في هذه المنطقة عما هي عليه في المنطقتين الشمالية والوسطى ، وقد استخدم في هذه الدراسة نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه للكشف عن التغيرات الوراثية الكمية في شكل وحجم مساحة الجناح الأيمن لذكور وأناث الجيلين الأول والثالث بين المجتمعات السكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* في بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه ، اذ بلغ معدل الحجم المركزي Centroid Size للجناح الأيمن في ذكور الجيل الأول 1131.4,1093.2,1332.8 مايكرون لعينات بعض مناطق العراق الثلاثة الشمالية والوسطى والجنوبية وعلى التوالي ، ومعدل الحجم المركزي للجناح الأيمن في ذكور حشرات الجيل الثالث 1040.8,1116.4,1246.5 مايكرون لعينات المناطق الثلاث وعلى

ج

التوالي ، أما معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن في اناث الجيل الأول لبعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه فقد بلغ 1157.9,1179.6,1284.3 مايكرون وعلى التوالي، بينما بلغ معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لأناث الجيل الثالث في المناطق الثلاثة 1054.4,1199.9,1290.9 مايكرون وعلى التوالي ، وقد أظهرت نتائج التحليل الاحصائي باستخدام اختباري F و T عدم وجود فروق معنوية في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور و أناث الجيلين الأول والثالث بين عينات مناطق الدراسة الثلاث باستثناء فرق معنوي واحد وجد في إحدى عينات أناث حشرات الجيل الثالث للمنطقة الجنوبية، وكذلك لوحظ وجود فروق معنوية قليلة جدا في شكل وحجم الجناح الأيمن لبعض ذكور واناث الجيلين الأول والثالث بسبب تأثير الحشرة باختلاف الظروف البيئية للمناطق الثلاثة التي جمعت منها العينات عند استخدام تحليل التباين ANOVA .

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
الفصل الأول		
1	المقدمة Introduction	3-1
الفصل الثاني		
2	استعراض المراجع Literature Review	42-4
1-2	التصنيف العلمي للذبابة الحلزونية للعالم القديم <i>Chrysomya bezziana</i> (Vill.)	4
2-2	انتشار ذبابة الدودة الحلزونية للعام القديم	7-5
3-2	الأهمية الطبية للذبابة الحلزونية	10-8
4-2	دورة حياة ذبابة الدودة الحلزونية ووصف أدوارها	14-11
5-2	تربية ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم مختبريا	16-15
6-2	طرائق مكافحة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم	21-16
1-6-2	المكافحة الكيميائية Chemical control	18-17
2-6-2	المكافحة الوراثية Genetic Control	20-18
1-2-6-2	المكافحة الوراثية باستخدام تقنية الحشرات العقيمة S I T	19-18
2-2-6-2	شروط تطبيق تقنية الحشرات العقيمة	20-19
3-6-2	المكافحة الاحيائية Biological Control	21 -20
7-2	طرائق تشخيص ذبابة الدودة الحلزونية القديم Methods for <i>Chrysomya bezziana</i>	42 -21
1-7-2	التشخيص بالاعتماد على المظهر الخارجي Morphological Identification	21
2-7-2	التشخيص الوراثي الجزيئي Molecular Identification	35-22
1-2-7-2	أنواع مؤشرات ألدنا Types of DNA markers	25 -23

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
A-1-2-7-2	مؤشرات ألدنا المعتمد على التهجين الجزيئي Molecular hybridization –Based DNA markers	24 - 23
B-1-2-7-2	مؤشرات ألدنا المعتمد على تفاعل سلسلة ألدنا Polymerase chain Reaction(PCR) Based markers	25- 24
2-2-7-2	تقنية أنزيم بلمرة التفاعل المتسلسل Polymerase chain Reaction (PCR)	30 - 26
1-2-2-7-2	مرحلة المسخ Denaturation Stage	26
2-2-2-7-2	مرحلة ارتباط البادئات Primer anaealing stage	27
3-2-2-7-2	مرحلة الاستطالة Extension stage	27
3-2-7-2	أنزيم البلمرة PCR Enzyme	28
4-2-7-2	البادئ The Primer	29- 28
5-2-7-2	المحلول المنظم PCR Buffer	29
6-2-7-2	مؤشرات دنا المايكوكوندريا mtDNA markers	32-30
7-2-7-2	طريقة التسلسل التتابعي	33-32
8-2-7-2	الدراسات السابقة المتعلقة بالوراثة الجزيئية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم	35-34
3-7-2	التشخيص بالاعتماد على المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه	42-35
1-3-7-2	أنواع المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه	40-37
A-1-3-7-2	المقياس الهندسي التقليدي Traditional Geometric morphometric	37
B-1-3-7-2	المقياس الهندسي المعتمد على المعالم Landmark –based Geometric morphometric	38-37
C-1-3-7-2	المقياس الهندسي المعتمد على التراكب Procrustes - based Geometric morphometric	39-38

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
D-1-3-7-2	المقياس الهندسي المعتمد على المخطط Outline- based Geometric morphometric	40-39
2-3-7-2	الدراسات السابقة المتعلقة باستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه في المقارنة بين المجتمعات السكانية المختلفة للحشرة	42-40
الفصل الثالث		
3	المواد وطرائق العمل Materials and methods	61-43
1-3	المواد Materials	46-43
1-1-3	الأجهزة والمواد المستخدمة في هذه الدراسة	45-43
2-1-3	المحاليل والمواد الكيميائية المستخدمة في هذه الدراسة	46-45
3-1-3	محتويات عدة استخلاص ألدنا DNA	46
2-3	طرائق العمل Methods	61-46
1-2-3	تربية الذبابة الحلزونية للعالم القديم <i>Chrysomya bezziana</i> (Vill.)	51-46
3-3	الدراسة الوراثية الجزيئية Molecular Genetic Study	58-52
1-3-3	استخلاص ألدنا DNA DNA Extraction	53-52
2-3-3	محاليل الاستخلاص Buffers used in DNA Extraction	52
3-3-3	طريقة الاستخلاص	53- 52
4-3-3	تقرير نوعية ألدنا DNA المستخلص DNA Extraction Quality	55-53
A-5-3-3	المحاليل المستخدمة	53
B-5-3-3	الترجيل على هلام اللاكاروز Gel Electrophoresis	55-54
6-3-3	تفاعلات Specific –PCR	56-55

رقم الصفحة	الموضوع	التسلسل
55	استخدام ثلاثة بواقي متخصصة	1-6-3-3
56	المحاليل والمواد اللازمة لأجراء التفاعلات	2-6-3-3
57-56	طريقة العمل	3-6-3-3
58-57	الترحيل الكهربائي	4-6-3-3
61-58	الدراسة الوراثية الكمية Quantitative Genetic Study	4-3
58	تحضير العينات Specimens Processing	1-4-3
60-59	جمع البيانات Data collecting	2-4-3
61	البرامجيات Software	3-4-3
الفصل الرابع		
127- 62	النتائج والمناقشة Results and Discussion	4
88-62	الدراسة الوراثية الجزيئية Molecular genetics Study	1-4
62	نتائج عزل ألدنا DNA Isolation Results	1-1-4
65-63	نتائج تضخيم ألبين - Elongation factor 1.gene	2-1-4
67-65	نتائج تضخيم ألبين White gene	3-1-4
68-67	نتائج تضخيم ألبين Cytochrome b	4-1-4
69	دراسة التسلسل ألتتابعي للقواعد النتروجينية Studying of Nitrogen Bases	5-1-4
77-70	المقارنة بين مجتمعات الذبابة الحلزونية من ناحية ألبين White gene	1-5-1-4
88-78	المقارنة بين مجتمعات الذبابة الحلزونية من ناحية ألبين Cytochrom b	2-5-1-4
127-89	الدراسة الوراثية الكمية Quantitative genetic Study	2-4
110-89	دراسة التباير الوراثي الكمي لشكل الجناح وحجمه لذكور الجيل الأول والثالث	1-2-4

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
2-2-4	دراسة التغيرات الوراثي الكمي لشكل الجناح وحجمه لاناث الجيل الأول والثالث	127-110
الفصل الخامس		
5	الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations	129-128
1-5	الاستنتاجات Conclusions	128
2-5	التوصيات Recommendations	129
المصادر References		
	أولا : المصادر العربية	133-130
	ثانيا: المصادر الأجنبية	153-134
	الملاحق	165-154
	ملخص الرسالة باللغة الانكليزية	A,B,C

قائمة الجداول

الترسل	عنوان الجدول	رقم الصفحة
1	الأجهزة المستعملة والشركات المصنعة والمنشأة	45-43
2	المحاليل والمواد الكيميائية الأصل والمنشأ	46-45
3	محتويات عدة استخلاص أـ DNA	46
4	البودئ المستخدمة وتسلسلاتها	55
5	مكونات خليط التفاعل الرئيسي Master Mix	56
6	ظروف تفاعل EF-1.gene and white gene Specific –PCR	57
7	ظروف تفاعل CBI Specific – PCR	57
8	مقارنة الحجم المركزي للجناح الأيمن بين ذكور الجيل الأول لثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	100
9	مقارنة الحجم المركزي للجناح الأيمن بين ذكور الجيل الثالث لثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	100
10	مقارنة مسافات مهالانوبز MahalanobiS Distances لذكور الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	104
11	مقارنة مسافات مهالانوبز Mahalanobis Distances لذكور الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	105
12	تحليل التباين ANOVA لتماثل حجم الجناح الأيمن في ذكور الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	106

التسلسل	عنوان الجدول	رقم الصفحة
13	تحليل التباين ANOVA لتماثل شكل الجناح الأيمن في ذكور الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	106
14	تحليل التباين ANOVA لتماثل حجم الجناح الأيمن في ذكور الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	106
15	تحليل التباين ANOVA لتماثل شكل الجناح الأيمن في ذكور الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	107
16	مقارنة الحجم المركزي للجناح الأيمن بين اناث الجيل الأول لثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	117
17	مقارنة الحجم المركزي للجناح الأيمن بين اناث الجيل الثالث لثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	118
18	مقارنة مسافات مهالانوبز Mahalanobis Distances لاناث الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	122
19	مقارنة مسافات مهالانوبز Mahalanobis Distances لاناث الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	123
20	تحليل التباين ANOVA لتماثل حجم الجناح الأيمن في اناث الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	123

التسلسل	عنوان الجدول	رقم الصفحة
21	تحليل التباين ANOVA لتماثل شكل الجناح الأيمن في اناث الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	123
22	تحليل التباين ANOVA لتماثل حجم الجناح الأيمن في اناث الجيل الثالث بين ثلاث مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	124
23	تحليل التباين ANOVA لتماثل شكل الجناح الأيمن في اناث الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	124

قائمة الاشكال

التسلسل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1	عملية تضاعف قطع آل DNA بواسطة آل PCR	25
2	خارطة العراق	50
3	خرائط محافظات السليمانية – ديالى- ميسان مؤشر عليها مناطق جمع عينات الذبابة الحلزونية	51
4	مقارنة رصف Alignment القواعد النتروجينية بين المجتمعات السكانية للذبابة الحلزونية لقطعة من ألدا النووي تشمل ألجين White gene	77-76
5	مقارنة رصف Alignment القواعد النتروجينية بين المجتمعات السكانية للذبابة الحلزونية لقطعة من ألدا النووي تشمل ألجين Cytochrome b	88-86
6	معدل احداثيات المعالم للجنح الأيمن في ثلاثة مجتمعات سكانية لذكور الجيل الأول للذبابة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i>	93
7	معدل احداثيات المعالم للجنح الأيمن في ثلاثة مجتمعات سكانية لذكور الجيل الثالث للذبابة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i>	93
8	الشكل الانتشاري لتوزيع ذكور الجيل الأول للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	96
9	الشكل الانتشاري لتوزيع ذكور الجيل الثالث للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	96
10	الحجم المركزي Centriod Size للأجنحة اليمنى لذكور الجيل الأول للذبابة الحلزونية <i>Ch. bezziana</i> بين الربع 10% و الربع 90%	98

التسلسل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
11	الحجم المركزي Centriod Size للأجنحة اليمنى لذكور الجيل الثالث للذبابة الحلزونية <i>Ch. bezziana</i> بين الربيع 10% و الربيع 90%	98
12	الحجم المركزي Centriod Size للأجنحة اليمنى لذكور الجيل الأول للذبابة الحلزونية <i>Ch. bezziana</i> بين الربيع 25% والربيع 75 %	99
13	الحجم المركزي Central Size للأجنحة اليمنى لذكور الجيل الثالث للذبابة الحلزونية <i>Ch. bezziana</i> بين الربيع 25% والربيع 75 %	99
14	التحليل التمييزي Discriminant analysis لاحداثيات معالم الأجنحة اليمنى لذكور الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bazziana</i>	104
15	التحليل التمييزي Discriminant analysis لاحداثيات معالم الأجنحة اليمنى لذكور الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bazziana</i>	105
16	معدل احداثيات المعالم للجناح الأيمن من ثلاثة مجتمعات سكانية لاناث الجيل الأول للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	110
17	معدل احداثيات المعالم للجناح الأيمن من ثلاثة مجتمعات سكانية لاناث الجيل الثالث للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	111
18	الشكل الانتشاري لتوزيع اناث الجيل الأول للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	113
19	الشكل الانتشاري لتوزيع اناث الجيل الثالث للذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i>	114
20	الحجم المركزي Central Size للأجنحة اليمنى لاناث الجيل الأول للذبابة الحلزونية <i>Ch. bezziana</i> بين الربيع 10% و الربيع 90%	115

التسلسل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
21	الحجم المركزي Central Size للأجنحة اليمنى لاناث الجيل الثالث للذبابة الحلزونية <i>Ch. bezziana</i> بين الربيع 10% و الربيع 90%	116
22	الحجم المركزي Central Size للأجنحة اليمنى لاناث الجيل الأول للذبابة الحلزونية <i>Ch. bezziana</i> بين الربيع 25% والربيع 75 %	116
23	الحجم المركزي Central Size للأجنحة اليمنى لاناث الجيل الثالث للذبابة الحلزونية <i>Ch. bezziana</i> بين الربيع 25% والربيع 75 %	117
24	التحليل التمييزي Discriminant analysis لاحداثيات معالم الأجنحة اليمنى لاناث الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bazziana</i>	121
25	التحليل التمييزي Discriminant analysis للأحداثيات معالم الأجنحة اليمنى لاناث الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية <i>Ch.bazziana</i>	122

قائمة الصور

التسلسل	عنوان الصور	رقم الصفحة
1	دورة حياة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i> قوة التكبير X8	14
2	طور الحشرة الكاملة لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i> قوة التكبير X10 A - أنثى B - ذكر	14
3	طور العذراء لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i> قوة التكبير X10	48
4	طور الحشرة الكاملة لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i> قوة التكبير X10	49
5	الجناح الأيمن لذكر الذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i> قوة التكبير X45	60
6	الجناح الأيمن لأنثى الذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i> قوة التكبير X45	60
7	نواتج ألدنا المعزول من ذكور وإناث الذبابة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i> قوة التكبير X10	61
8	نواتج تضخيم الجين Elongation factor -1.gene من دنا النواة لذكور وإناث ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i> قوة التكبير X10	63
9	نواتج تضخيم الجين White gene من دنا النواة لذكور وإناث ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i> قوة التكبير X10	65

التسلسل	عنوان الصور	رقم الصفحة
10	ناتج تضخيم ألجين Cytochrome b من دنا النواة لذكور وإناث ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i> قوة التكبير X10	67
11	الجناح الأيمن لذكر الذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i> من المجتمع السكاني شمال العراق . قوة التكبير X45	89
12	الجناح الأيمن لأنثى الذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i> من المجتمع السكاني شمال العراق . قوة التكبير X45	89
13	الجناح الأيمن لذكر الذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i> من المجتمع السكاني وسط العراق . قوة التكبير X45	90
14	الجناح الأيمن لأنثى الذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i> من المجتمع السكاني وسط العراق . قوة التكبير X45	90
15	الجناح الأيمن لذكر الذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i> من المجتمع السكاني جنوب العراق . قوة التكبير X45	91
16	الجناح الأيمن لأنثى الذبابة الحلزونية <i>Ch.bezziana</i> من المجتمع السكاني جنوب العراق . قوة التكبير X45	91

قائمة المختصرات Abbreviation

الاختصار	المصطلح الكامل
Ch	<i>Chrysomya</i>
bezz	<i>bezziana</i>
Vill	Villeneuve
EF-1.gene	Elongation Factor -1.gene
CB	Cytochrome b
mtDNA	Mitochondrial DNA
MW	Molecular Weight
bp	base pairs
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplification polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
SIT	Sterile Insect Technique
dTTP	Deoxy Thymidine Triphosphate
dCTP	Deoxy Cytosine Triphosphate
dATP	Deoxy Adenosine Triphosphate
dGTP	Deoxy Guanosine Triphosphate
COI, II	Cytochrome Oxidase I , II
CPS	Carbamoyl phosphate Synthetase
TBE	Tirs Borat

الاختصار	المصطلح الكامل
EDTA	Ethylene Diamine Tetra acetic Acid
UV	Ultraviolet
MCS	Mean Centroid Size
St.D	Standard Deviation
Va	Variance
A.D	Absolute Differences
NCBI	National Center for Biotechnology Information
FAO	Food And griculture Organization
IAEA	International Atomic Energy Agency
MOG	Morphometria Geometrica
COO	Collection of Co Ordinates
TET	Tabla Espacios Tabulacions
PAD	Permutaiones Analysis Discriminante
COV	Mancova
ASI	Asymmetry of Shape and Size

قائمة الملاحق

التسلسل	عنوان الملحق	رقم الصفحة
1	دليل عدة استخلاص ألدنا Genomic DNA Mini Kit (Tissue)	154-158
2	دليل مكونات خليط التفاعل الرئيس للـ PCR	159
3	أنواع البواديء المستخدمة في الدراسة	160-162
4	دليل المؤشر الجزيئي (2000 bp-100bp) DNA ladder	163
5	كتاب تشخيص عينات ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم <i>Ch.bezziana</i> (Vill.)	164-165

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

1-المقدمة Introduction

تعد الحشرات بصورة عامة وخاصة الطبية منها إحدى العناصر المهمة للمحافظة على التوازن الطبيعي للبيئة على الرغم من أن بعضها يهدد الأمن الغذائي ولاسيما الثروة الحيوانية فضلا عن انه يؤثر على الصحة العامة للانسان والحيوان بشكل كبير جدا ومنها ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (*Chrysomya bezziana* (Vill.) التي تنتمي الى عائلة الذباب الأزرق Calliphoridae رتبة ثنائية الأجنحة Diptera التي تعد من الآفات الخطيرة جدا على جميع الحيوانات ذوات الدم الحار ومنها حيوانات الحقل الداجنة مثل الأغنام والأبقار والماعز والجاموس (Al-Taweel وآخرون، 2000) ، والحيوانات البرية مثل الغزلان والأرانب الحقلية والكلاب السائبة والثعالب (شيمان، 1987)، وتكمن خطورة هذه الحشرة في اكتمال دورة حياتها ولا سيما يرقاتها من طور اليرقي الأول الى طور اليرقي الثالث في الأنسجة الحية لجسم الحيوان أو الانسان بحسب المضيف الذي تضع الحشرة البالغة البيوض فيه اذن فهي اجبارية التطفل Obligatory parasite حيث تهاجم الجروح في الحيوانات الداجنة والبرية وخاصة الجروح التي تحدث في الحبل السري للحيوانات حديثة الولادة وجروح العمليات الجراحية التي تجري على الحيوانات مثل أخصي و ازالة القرون (Smith وآخرون، 2001) ، فضلا عن الجروح الناتجة عن عضات الكلاب والقراد والأسلاك الشائكة التي تحاط بها الحقول والبساتين والتي تسبب الجروح الواسعة والعميقة جدا للحيوان (Blood و Radositits، 1989)، مسببة الحالة المرضية المعروفة بداء النبر(التدويد) Myiasis (Raposo وآخرون، 2012)، وبالتالي تسبب خسائر كبيرة جدا في الثروة الحيوانية في حالة الاهمال وعدم علاج جروح الحيوانات المصابة وقد تؤدي الى هلاك هذه الحيوانات وخاصة حديثة الولادة فضلا عن أنها تسبب خسائر غير مرئية في الحيوانات البرية وذلك لعدم القدرة على متابعة تلك الحيوانات وعلاجها من الاصابة (Mombeni وآخرون، 2014) ، ولهذه الأسباب تعد ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* من أهم وخطر الآفات الحشرية المهددة للثروة الحيوانية ولصحة الانسان (الجواري، 2000)، وقد بدا تسجيل أول حالات التدويد ولاصابة بداء التدويد في العراق في أيلول 1996 من قبل الهيئة العامة للبيطرة التابعة لوزارة الزراعة وشخصت من قبل مركز بحوث و متحف التاريخ الطبيعى العراقي/ جامعة بغداد على أنها يرقات ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (*Ch. bezziana* Abdul-Rassoul وآخرون، 1996) ، ثم انتشرت بعد ذلك في معظم مناطق ومحافظات العراق وخاصة الزراعية منها حيث أن سرعة انتشار الاصابة بها والنتيجة من طبيعة ومعيشة الحشرة وقابليتها العالية جدا على الطيران الى مسافات بعيدة كانت مشابهة لأصابة الذبابة الحلزونية للعالم الحديث *Cochliomyia hominivorax* (العاني، 1997)، ولاستئصال هذه الآفة الحشرية والقضاء عليها نهائيا في أي منطقة يمكن استخدام تقنية الحشرات

العقمة Sterile insect technique وذلك لما حققته تلك التقنية من نجاح كبير في استئصال ذبابة الدودة الحلزونية للعالم الحديث (السراي، 2002)، اذ يطالب المهتمون بسلامة البيئة ونظافتها من التلوث ومن مخاطر استخدام المبيدات الكيميائية مختلفة الأنواع باستخدام هذه التقنية الفعالة جدا (Wyss، 2002)، أن نجاح هذه التقنية يتطلب بدوره العديد من الدراسات ومنها دراسة التغيرات الوراثية الجزيئية بين المجتمعات السكانية للحشرة في مناطق محدودة يتم اختيارها مسبقا لان المادة الوراثية هي الأساس في تطور الكائنات الحية (القرة غولي، 2013)، أن دراسة التغيرات الوراثية توفر المعلومات الأساسية عن تطابق السلالة المختبرية المهيئة للاطلاق بعد التشيع، كذلك فان مثل هذه الدراسات تعطي مؤشرات مهمة عن أصل وتركيب طبعة النواة karyotype للأنواع التابعة لنفس الجنس (Cevallos و Nation، 2004)، وقد استخدمت في هذا النوع من الدراسات الوراثية الجزيئية مؤشرات ألدنا DNA Markers التي تعرف بأنها تتابعات من ألدنا يمكن الاستدلال من خلالها على موقع معين على الكروموسوم أو الجينوم حيث أنها تستخدم لدراسة وتوضيح العلاقة الوراثية بين الأفراد وإيجاد البصمة الوراثية (Weigand وآخرون، 1993)، لأنها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثية المخزونة فيهم والنتيجة عن طفرات الحذف أو الإدخال أو إعادة الترتيب للنوكليوتيدات في جينات الأفراد المدروسة ولأي سبب كان مثل الطفرات الوراثية (Sharma وآخرون، 1994)، ونتيجة لذلك استخدمت في العديد من الدراسات ومنها دراسة التصنيف الجزيئي Molecular Taxonomy والدراسات التطورية Evolution Studies وبناء الخرائط الوراثية المختلفة Genetic Maps كما أنها أصبحت مهمة جدا في دراسة التنوع الوراثي Genetic Diversity اذ أنها تعد الاختيار الأفضل في تطور الخطط الملائمة لحفظ الأنواع (Karp وآخرون، 1997)، وفي هذه الدراسة تم اعتماد ثلاث جينات اثنان منها تمثل DNA النواة وهما EF-1. Gene و White Gene، أما ألجين الثالث فيمثل دنا الماييتوكوندريا mtDNA Gene Cytochrome b(CB) لدراسة التباين الوراثي والتنوع الحيوي للذبابة الحلزونية للعالم القديم في بعض من مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه وفقا لما جاء في القرة غولي (2013) مع إجراء بعض التحويرات عليها واختلاف جنس ونوع الحشرة، ومن الدراسات الأخرى التي تم أجزائها وساهمت في نجاح تطبيق تقنية الحشرات العقمة Sterile Insect Technique هي استخدام نظام المقياس الهندسي للشكل الظاهري للجناح Geometric Morphometric of wing لدراسة التغيرات الوراثية الكمية في شكل وحجم جناح ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم، اذ انه يبين مدى التقارب والتباعد الوراثي والاختلاف بين المجتمعات السكانية الثلاثة للحشرة المراد دراستها والأسباب المؤدية الى ذلك، أن نظام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح هو طريقة حديثة ومتقدمة بالنسبة للدراسات الخاصة في مجال الوراثة الكمية Quantitative Genetics والذي يستخدم لقياس التباين الكبير في شكل الجناح وحجمه (Bookstein، 1991)، وقد أظهرت

دراسات عديدة ومختلفة عن الحشرات الطبية أن المقياس الهندسي للشكل الظاهري لجناح الحشرة Morphometric لديه القدرة العالية على تحديد التباين بين المجتمعات السكانية المنفصلة جغرافيا للأنواع التي تنتمي لنفس الجنس وبنسبة عالية (Solano وآخرون، 1999؛ Bouyer وآخرون، 2007؛ Gomes-Palacio وآخرون، 2012) ، أن الهدف الأساسي من استخدام هذه التقنية هو لتحديد ما اذا كان نظام المقياس الهندسي لشكل وحجم جناح الحشرة يمكن أن يكون أداة بديلة أو مكمل للمؤشرات الجزيئية في دراسة المجتمعات السكانية لحشرة الذبابة الحلزونية للعالم القديم وبالتالي تكون له أهمية كبيرة جدا وأساسية في تحديد أصل أي عينات منها وبشكل واضح ودقيق جدا (Ready وآخرون، 2009) ، يقوم المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح على تثبيت أحداثيات أو نقاط معينة أو معالم Landmarks بحيث تسجل على كل جناح وتؤخذ لها صور رقمية بشكل متناسق وتبدأ هذه النقاط من قاعدة الجناح وتمتد على تقاطعات عروق الجناح مع بعضها البعض وكذلك تقاطعات العروق مع حافة الجناح (Lyra وآخرون، 2009)، وبواسطة هذه المعالم تجري المقارنة بين المجتمعات السكانية للحشرة في المناطق المراد دراستها وكذلك المقارنة بين أفراد المجموعة السكانية الواحدة وتوضيح مدى التقارب بينها، وللحصول على الحجم المركزي للجناح يتم الاعتماد على الأشكال المضلعة التي تنتج عن الارتباطات بين نقاط المعالم التي توضع على الجناح (القرة غولي، 2013) ، ونظرا لما تقدم من أيجاز حول الأهمية الطبية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* التي استوطنت في معظم مناطق العراق وبدرجات متفاوتة وبحسب توفر الظروف البيئية الملائمة لنموها في كل منطقة ولقلت وجود دراسات وراثية جزيئية حول هذه الحشرة وكذلك لكي نتمكن من تطبيق تقنية الحشرات العقيمة لمكافحة هذه الحشرة والقضاء عليها نهائيا اقترح موضوع الدراسة ليشمل الجوانب الآتية :

أولا : تربية حشرة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* و التي جمعت من شمال العراق ووسطه وجنوبه لغاية الجيل الثالث لي تتلائم مع الظروف المختبرية وأعدادها للدراسة الوراثية والكمية .

ثانيا : الجانب الوراثي الجزيئي والذي يركز على دراسة التباين الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية للحشرة من شمال العراق ووسطه وجنوبه باستعمال مؤشرات DNA النواة و DNA الماييتوكوندريا وباستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي (Polymerase Chain Reaction (PCR) .

ثالثا: الجانب الوراثي الكمي والذي يركز على استخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه للمقارنة بين المجتمعات السكانية الثلاثة للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* في العراق والكشف عن التباينات الوراثية الكمية بين هذه المجتمعات .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

1-2 التصنيف العلمي لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم Classification for

Chrysomya bezziana (Vill.)

تنتمي الذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* الى عائلة الذباب الأزرق Calliphoridae رتبة ثنائية الأجنحة Diptera ضمن صنف الحشرات Insecta وهي من الحشرات ذات الأهمية الطبية (Aklilv، 2011)، وتعتبر رتبة ثنائية الأجنحة ثاني اكبر رتب صنف الحشرات اذ تضم حوالي (160,000) نوع مقسمة الى 140 عائلة مختلفة الأنواع والأعداد والأشكال والتركيب والفعالية (Borror وآخرون، 1989)، ومنها عائلة الذباب الأزرق التي تنتمي اليها ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم والتي تعتبر اهم الأنواع التي تنتمي لتلك العائلة (سليط وآخرون، 1984) ويمكن توضيح الموقع التصنيفي لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم اعتمادا على ما جاء في Aklilv (2011).

Kingdom:Animalia

Subkingdom:Metazoa

Phylum:Arthropoda

Subphylum : Mandibulata

Class : Insecta

Subclass : Pterygota

Division : Endo pterygota

Order: Diptera

Suborder : Brachycera

Section : Muscomorpha

Superfamily : Oestroidae

Family : Calliphoridae

Subfamily : Chrysomyinae

Genus : *Chrysomya*

Species : *Ch . bezziana* (Vill , 1914)

والأسم الشائع Common Name حاليا في العديد من الدراسات والأبحاث لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم هو Old World Screwworm Fly (Rosati و Vanlaerhoven، 2006)، كما ان هناك أسما شائعا حاليا وهو مرادف لأسم عائلة الذباب الأزرق أو المعدني Calliphoridae التي تنتمي اليها ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* وهذا الأسم هو Blowflies كما جاء في Aklilv (2011) .

2: 2 إنتشار ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

Dispersal of old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana*

سجلت حالة الإصابة بذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* (Vill.) لأول مرة في العراق وبالتحديد في محافظة بغداد/ منطقة شيخ حمد من قبل متحف التاريخ الطبيعى العراقي على انها ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (Abdul-Rassoul وآخرون، 1996)، وجرى التأكيد والمصادقة على ذلك التشخيص من قبل متحف التاريخ الطبيعى البريطانى بشكل نهائى (Starr وآخرون، 2000) ثم توسعت حالات الإصابة بالانتشار شرقا الى محافظة ديالى وصولا الى منطقة خانقين قرب الحدود الايرانية وغربا في الفرات الأوسط (بابل، كربلاء، النجف، القادسية والمثنى) ، ثم سجلت بعد ذلك حالات اصابة اخرى في محافظات الأنبار، صلاح الدين، كركوك وجنوب محافظة السليمانية كذلك توسعت حالات انتشار الإصابة بذبابة الدودة الحلزونية لتشمل أيضا المحافظات الجنوبية اذ سجلت في ذي قار، ميسان و البصرة (العزي، 2005)، كما أشار Abul-hab و Kessl (1998) الى انتشار هذه الآفة الخطرة والضارة في معظم محافظات العراق وخاصة المحافظات الوسطى والجنوبية بنسب كبيرة جدا نتيجة لتوفر الظروف البيئية الملائمة لها ،اذ يتأثر تواجد ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* وانتشارها بدرجة الحرارة والرطوبة النسبية ومعدل هطول الأمطار ونوع التربة والغطاء النباتي الذي يغطي سطح التربة (الطويل، 2005) ، وبالرغم من استعمال الكيماويات ومعالجة الجروح والتقييف بواسطة الإرشاد الزراعي الا ان اتساع رقعة انتشار الحشرة سنة بعد اخرى يدفع الى التعايش معها بأستخدام طرق ووسائل المكافحة التقليدية على أمل ان تستخدم فيما بعد تقنية الحشرات العقيمة للقضاء عليها نهائيا كوسيلة حديثة وفعالة وذات نتائج ايجابية في مجال مكافحة الآفات الضارة (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 2005)، ان الانتشار السريع والواسع وبنسب كبيرة جدا لهذه الآفة في عموم محافظات العراق يعكس بشكل واضح وغير قابل للشك القابلية التكاثرية العالية لها (الجواري، 2000)، ومن خلال القيام بعملية المسح الميداني لنسبة الإصابة في المواشي والحيوانات الداجنة بذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم في عموم محافظات العراق كان عدد الأصابات التراكمية منذ تسجيل الإصابة لأول مرة في 1996/9/9 ولغاية 2010/9/12 هي 137592 اصابة مسجلة في المستشفيات البيطرية للمحافظات ،اذ يتوزع هذا العدد الكبير من الأصابات على عموم محافظات العراق وبنسب متفاوتة بين كل محافظة واخرى ،اذ تكون مرتفعة جدا في المحافظات الوسطى والجنوبية وتنخفض بشكل كبير في المحافظات الشمالية التي سجلت فيها حالات اصابة فردية وقليلة جدا ومتفاوتة في بعض الأحيان قياسا بالمحافظات المجاورة لها (Al-Ani وآخرون، 2014) ، اما انتشار ذبابة *Ch. bezziana* وتواجدها على مستوى الوطن العربي فقد توسع وأصبح بنسب عالية جدا كون هذه

الحشرة ذات قدرة عالية على التكاثر السريع والطيران لمسافات بعيدة تصل الى 100 كيلومتر مما يجعل انتشارها واستيطانها في العديد من الدول العربية احتمالا كبيرا حيث سجلت حالات تدويد بهذه الحشرة لأول مرة في الكويت في الاعوام 1997 والامارات 1998 والسعودية وقطر 1999 (العوني، 2005)، وتم رصد حالات الأصابة بهذا النوع في اليمن لأول مرة عام 2008 بعد اكتشاف انتشار هذا النوع من الذباب في المحافظات الشمالية بالقرب من الحدود مع المملكة العربية السعودية وخاصة في محافظات صعدة وحجة والمحويت فضلا عن السهل التهامي ثم توسعت رقعت الأصابة في الأعوام اللاحقة لتشمل بقية المحافظات اليمنية وخاصة ذات الغطاء النباتي الكثيف وبنسب كبيرة جدا وصلت في عموم الثروة الحيوانية الى حوالي 68% خلال الأعوام 2008 و2009 و2010 (العنسي، 2012) ، ولقد كانت معظم الأصابات التي حدثت في دولة الامارات العربية نتيجة انتشار الحشرة بشكل كبير خلال موسم هطول الأمطار من السنة ،اما في أشهر الصيف فكانت الأصابات نادرة (السراي، 2002)، وقد ذكر في دراسة انتشار وتوزيع هذا النوع من الذباب التي قام بها Spradbery (1992) ان نسبة الأصابة بهذه الحشرة في سلطنة عمان للأعوام 1988 و1989 هي 85% للمواشي كالأغنام والأبقار والماعز بالإضافة الى الخيول والحمير في الأشهر الباردة وتنعدم في الأشهر الحارة من السنة، ان تاريخ دخول الذبابة الى منطقة الخليج العربي والانتشار فيها كان في عام 1977، اذ دخلت الى مملكة البحرين أولا نتيجة لاستيراد أغنام مصابة باليرقات من استراليا ثم انتشرت بعد ذلك الى باقي دول الخليج العربي (Kloft وآخرون، 2001)، اما على المستوى العالمي فان التوزيع الجغرافي او انتشارها بنسب عالية في عدد كبير جدا من دول العالم، فقد سجلت حالات الأصابة في العديد من محافظات ايران وبنسب كبيرة جدا (Navidpour وآخرون، 1996)، وفي فبراير من العام 2003 أكتشف في خليج بنما ان شحنات المواد الغذائية المستوردة من مصانع الأغذية في ولاية تشيباس المكسيكية توجد فيها يرقات ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (James وآخرون، 2006)، وكذلك تنتشر هذه الحشرة في الكثير من المناطق المدارية وجنوب الصحراء الافريقية وبعض البلدان في اواسط اسيا وتنتشر بشكل دائم جنبا الى جنب مع ذبابة الدودة الحلزونية للعالم الحديث *Cochliomyia hominivorax* في استراليا ونيوزيلندا ومناطق نصف الكرة الأرضية الغربي بشكل واضح يثير الانتباه للدارسين في مجال التوزيع الجغرافي للحشرة (Khan و Line، 2010)، وقد صنفت ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم في استراليا بانها الأكثر تهديدا للثروة الحيوانية وبصورة مباشرة مقارنة بباقي الآفات والحشرات الطبية، اذ انها تسبب داء التدويد Myiasis الذي يؤدي الى خسائر مادية كبيرة في مجال الثروة الحيوانية تقدر أوتصل سنويا الى حوالي 70 مليون دولار (Cason و Greeing، 2009)، اما في الهند فقد أدت الأصابة بهذه الآفة الى حدوث مضاعفات شديدة الخطورة على صحة الانسان والحيوان ومن هذه المضاعفات الأصابة بمرض سرطان الخلايا الحشوية في الوجه لأمرأة تبلغ من

العمر 65 عاما نتيجة الأهمال وعدم المعالجة وبعد إجراء الفحوصات على عينات من الدم مع الشوائب التي اخذت من مكان الجرح والذي كانت تخرج منه رائحة نتنة جدا تبين ان هناك ديدان منتشرة في وجه المصاب شخصت على انها يرقات ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (Kwong وآخرون، 2007)، اذن فان هذه الحشرة التي تمتاز بلونها الأخضر والأخضر المزرق تتوزع جغرافيا على نطاق واسع في البلدان الأستوائية وشبه الأستوائية في قارة افريقيا والتمثلة بشمال افريقيا، النيجر، نيجيريا، تشاد، السنغال ومالي، وكذلك تتواجد اوتنتشر بشكل كبير في جنوب شرق اسيا وبالتحديد في ماليزيا ، اندونيسيا ، بورما ، فيتنام ، كمبوديا ، تايلند ، الفلبين وغينيا الجديدة (Kumarasinghe وآخرون، 2000)، مسببة خسائر منظورة كبيرة جدا في اقتصاد تلك البلدان وخاصة التي تشكل الثروة الحيوانية جزء كبير من المواد التي تصدرها الى البلدان الأخرى فضلا عن تأثيرها على صحة الانسان نتيجة معيشة يرقاتها على الأنسجة الحية له مسبب مرض التدويد في العديد من بلدان العالم الثالث (Robio وآخرون ، 2006) .

3-2 الأهمية الطبية للذبابة الحلزونية للعالم القديم Medical importance of *Chrysomya bezziana*(Vill.)

يعد هذا النوع من الحشرات ذات الأهمية الطبية البالغة والمسببة للأمراض سواء للانسان أو الحيوان ،اذ تعد العامل الرئيس المسبب لمرض التدويد في جميع انحاء المناطق المدارية من العالم القديم (Spradbery، 1994)، وتعد أنواع عائلة الذباب الأزرق المعدني الأكثر انتشارا في ظل الظروف المناخية الحارة والرطوبة وبتالي فان المناطق المحيطة بالخليج العربي والشرق الأوسط موطن رئيسي لتلك الحشرة بأجناسها المعروفة المنتشرة حاليا (Sutherst وآخرون، 1989)، فضلا عن ذلك فان النشاطات البشرية العديدة المتمثلة بزراعة الأشجار والري المستمر بالإضافة الى وجود مجاري المياه الطبيعية وزيادة نسبة الرطوبة يمكن ان تجعل حتى الأماكن السلبية منها مكان مناسب وموسمي لتواجد هذا النوع من الذباب (Siddig وآخرون، 2005) ، وقد ذكر Raposo وآخرون (2012) ان مرض التدويد الأولي تسببه يرقات الذبابة الحلزونية التي تسمى في طور اليرقي الأول Bionatophage والتي تتغذى على الأنسجة الحية الأساسية والثانوية ومنها الأنسجة العصبية، يعرف التدويد على انه غزو يرقات ثنائية الأجنحة لأنسجة الانسان والحيوان ، وداء التدويد يشمل أنواع عديدة مثل تدويد العين Ophthalmomyiasis و داء التدويد الأذني الحاد الذي يطلق عليه مصطلح Otomyiasis و أيضا البلعومي Nasopharyngeal والجلدي Cutaneous وتدويد المهبل Vaginal وتدويد الشرج Anal والتدويد المعوي الذي يطلق عليه Intestinal Myiasis (Lagace-Wiens وآخرون، 2008)، تنتشر الأصابة بالتدويد في معظم دول العالم الثالث بالإضافة الى بعض دول العالم المتقدم لأن يرقات ذبابة الدودة الحلزونية طفيلي خارجي يعيش

متطفل بشكل اجباري على السوائل الجسمية للأنسجة الحية للإنسان والحيوان وبخاصة عند توافر الظروف الملائمة للأصابة كانهدام الرعاية الصحية والعمل المستمر في المناطق الملوثة خلال فصول السنة الحارة وعدم الاهتمام بالنظافة الشخصية والنوم في العراء وخاصة في المناطق الموبوءة (Soleimani وآخرون، 2009)، يضم جنس *Chrysomya* عدد من الأنواع المعروفة تصل الى حوالي 10 أنواع ولكن نوع واحد فقط هو الذي يسبب التدويد اجباريا للإنسان والحيوان وهو *Ch. bezziana* والتي تعد من ناحية الأهمية الطبية أهم تلك الأنواع اذ ان تواجدها وانتشارها الى حد كبير في المناطق الأستوائية وشبه الأستوائية ذات المناخ الحار والرطب بينما تكون حساسة وأقل انتشارا في المناطق ذات المناخ البارد الجاف لمدة طويلة جدا (Sutherst وآخرون، 1989)، تبدأ الأصابة بهذا المرض في الحيوانات عندما تفقس البيوض التي تضعها الاناث على حافات الجروح، اذ تعمل اليرقات انفاقا في الجسم تبدا من منطقة الجرح بشكل غير متساوي من خلال تمزيق الجلد من قبل يرقات الطور الأول والتجمع في فجوة صغيرة يبلغ حجمها من 5-10 ملم لتصل الى اجهزة الجسم الحساسة وخاصة الجهاز العصبي بما في ذلك الدماغ بافرازها مواد سامة بشكل سائل يحول الأنسجة الحية الى مواد سهلة الأمتصاص والتي تعمل على حصول نمو سريع جدا لليرقات حتى تصل الى نهاية الطور اليرقي الثالث (Tsuda وآخرون، 2007)، ان نمو ونضج يرقات ذبابة الدودة الحلزونية المتواجدة في جروح الحيوان سوف يؤدي الى زيادة مساحة الجرح حتى تصل الى 20 سم وبالتالي يؤدي ذلك الى سيولة النسيج بسبب تمزق الأوعية الدموية وتقيح النسيج، اذ تخرج منه رائحة نتنة جدا (Spradbery، 1991).

ومن اعراض التدويد في الحيوانات بحسب ما جاء في دراسة Al-Helfi (2008).
أولاً: تهيج يحدث عند الحيوان نتيجة للحركة المستمرة لليرقات في الأنفاق التي تعملها داخل الجروح مع حمى وافراز تقيحات ذات رائحة نتنة جدا تدفع الحيوان الى تعمد الاحتكاك مع اي جسم صلب .
ثانياً: موت موضعي للأنسجة جسم الحيوان بسبب زيادة أمتصاص كريات الدم البيض وانخفاض حاد في نسبة الدم نتيجة الأصابة بفقر الدم Anemia وزيادة في نسبة الكلوبين Globuline .

ثالثاً: انخفاض كبير وواضح للعيان في وزن الحيوان المصاب فضلا عن ان حركة الحيوان تصبح شبه معدومة وخاصة في نهاية الطور اليرقي الثالث من دورة حياة الحشرة .

رابعاً: موت الحيوان في حالة الأهمال وتأخير المعالجة السريعة للأصابة وذلك لأن اليرقات الناضجة في جسم الحيوان دمرت الجهاز العصبي المركزي للحيوان المصاب .

وقد ذكر Al-Helfi (2001) ان هناك حالات أصابة كثيرة بداء التدويد في محافظة البصرة جنوب العراق سببتها بعض أنواع الحشرات من رتبة ثنائية الأجنحة للحيوانات في عدد من مناطق

المحافظة ، حيث سجلت فيها أول حالة إصابة بيرقات ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم لحيوان الجاموس في أهوار المحافظة ، وقد شخصت عينات ليرقات ذبابة الدودة الحلزونية في محافظة البصرة من قبل متحف التاريخ الطبيعى البريطانى الذى أكد على انها تشبه الذبابة الحلزونية المتواجدة في افريقيا واسيا (Hall ، 2002)، يتم علاج الحيوانات في المراحل الأولى من الإصابة وخاصة في طور اليرقي الأول والثاني بأستخدام العديد من العقاقير الطبية ومنها مسحوق Negasunt مع محلول 18% Lodine وعدد من المضادات الحيوية المعروفة فضلا عن استخدام حقن الهيدروكورتيزون كمسكن آلام (Al-Izzi وآخرون، 1999)، أما اذا كان عدد اليرقات غير قليل تستخدم في العلاج مواد ومركبات متنوعة اتضح انها مواد فعالة في المعالجة تؤدي الى انسداد الجرح وبالتالي تسبب الاختناق لليرقات تدفعها للخروج الى سطح الجرح ليتم ازالتها والتخلص منها نهائيا مثل الفازلين والبروفين السائل وشمع العسل وطلاء الأظافر والزيت الثقيل الذي يلقى في وسط الجرح الموجود في جسم الحيوان (Bologna وآخرون، 2008)، وقد ذكر Al-Ani وآخرون (2014) ان أجمالي حالات الإصابة بذبابة الدودة الحلزونية للعام القديم في العراق حتى عام 2007 هو 120789 منه 22 حالة إصابة في الانسان، وقد ساعد مرض الحمى القلاعية وكذلك الإصابة بالقراد بين الحيوانات في انتشار حالات الإصابة بذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم وعلى نطاق واسع في معظم محافظات العراق (Al-Helfi، 2008)، وقد أجريت العديد من الدراسات الأحصائية لمعرفة الأهمية الطبية لها بلغة الأرقام من خلال تأثيرها على بعض أنواع حيوانات التربية ومنها الدراسة التي أجراها Hall وآخرون (2009) لتوضيح ذلك التأثير في بعض بلدان الشرق الأوسط ومنها ايران، العراق، المملكة العربية السعودية وعمان، اذ توصلت تلك الدراسة الى ان النسبة المئوية للإصابة بيرقات هذا النوع من الذباب في هذه البلدان كانت على النحو التالي: كانت نسبة الإصابة بداء التدويد البشري Myiasis human الذي تسببه يرقات الذبابة الحلزونية للعالم القديم مقارنة بعدد الحالات التي سببتها باقي أنواع الذباب في ايران 61.2% ، العراق 61% ، العربية السعودية بنسبة وصلت الى 97.1% واخيرا سلطنة عمان 73.6% ، اما النسبة المئوية لأعداد حيوانات التربية والداجنة المصابة بيرقات الذبابة الحلزونية التي أظهرتها هذه الدراسة في تلك البلدان فكانت في العراق بنسبة 45% ، ايران 42% ، العربية السعودية 29% اما سلطنة عمان فكانت نسبة الإصابة فيها حوالي 40% ، اما من ناحية الأهمية الطبية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم من حيث تأثيرها على حياة الانسان فانها تتمثل في احدى حالات الإصابة بالتدويد البشري (Dasilva وآخرون، 2005) ، حالات التدويد في الانسان هو إصابة نادرة يمكن ان تحدث في اي منطقة من العالم ولكن حدوثه يكون اكثر شيوعا في المناطق ذات المناخ الحار والرطب ، اذ انه يمكن ان يصيب الأنسجة الحية للأعضاء البشرية التي تكون عرضة لوضع البيوض ونمو وتطور اليرقات التي تعيش على بقايا الأنسجة الميتة والسوائل الجسمية ويتوافر لها المكان المناسب والظروف

الملائمة والمثالية للعيش والتطور والنمو خلال الدور اليرقي (Rossi- Schneider وآخرون، 2007 ; Shinohara وآخرون، 2004)، إذ إن اليرقات يمكنها أن تهاجم وتدمر الأجزاء الرئيسة للعين في الإنسان مثل الملتحمة والعدسة مسببة التهاب الملتحمة وقرحة القرنية وتدمير العدسة والجفون ومدور العين وأتلافها لأنها تتغذى على جميع الأنسجة والسوائل الجسمية المحيطة بها (Tsuda وآخرون، 2007)، إن الهجرة والتنقل بين البلدان تعد من أهم الأسباب التي تؤدي إلى انتقال الإصابة بمرض التدويد البشري وخاصة تدويد العين (Ophthalmomyiasis) (Langan وآخرون، 2004)، وقد تم الإبلاغ عن حالتين من حالات الإصابة بالتدويد البشري لبطانة العين في إيران الأولى لأمرأة تبلغ من العمر 70 عاماً، إذ وجدت اليرقات في عينيها تحت الشبكية، أما الحالة الثانية فكانت لصبي يبلغ من العمر 12 عاماً إذ توغلت اليرقات من الجهة الأمامية للعين بشكل سريع جداً ووصلت إلى نهاية كرة العين بعد مرور ثلاثة أيام من الإصابة (Farahvash وآخرون، 1998 ; Sharifipour وFegghi، 2008)، إن تدويد العين الذي تسببه ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم هو أهم وأخطر أنواع التدويد التي اكتشفت في إيران إذ تم الإبلاغ عن حالات إصابة كثيرة به بعد العام 2008 ومنها حالة إصابة امرأة مسنة تبلغ من العمر 90 عاماً وجد عندها تمزق في العين إذ تدفقت منه المئات من يرقات الذبابة الحلزونية (Khataminia وآخرون، 2011)، إن الإصابة بالتدويد البشري هي حالة نادرة وغير مالوفة ولكن قد تحدث مع تفشي المرض في حيوانات التربية والحيوانات الداجنة مثل الكلاب والخنازير والماشية في المناطق الريفية التي تتواجد فيها تلك الحيوانات (Goddard، 2003)، أكثر حالات الإصابة بالتدويد البشري الذي تسببه ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* تحدث بين كبار السن والأشخاص المصابين بالعاهات المزمنة والمتخلفين عقلياً (Kersten وآخرون، 1986)، وقد ذكر في دراسة أجراها Janovy وآخرون (2012) أنه فضلاً عن حالات الإصابة بالتدويد في العين فقد تم تشخيص حالات إصابة بالتدويد في الفم Oral Myiasis تؤدي إلى تدمير أنسجة اللثة مع أورام والتهابات حادة فيها، أما طرق علاج الإصابة بداء النغف البشري الذي يسببه هذا النوع من الذباب فهو استخدام العقاقير الطبية المختلفة الأنواع ومنها عقار إيفرمكتين الذي استخدم لعلاج حالات الإصابة بتدويد العين كعلاج مساعد بالرغم من عدم وجود أدلة واضحة على ذلك (Lagce-Weins وآخرون، 2008)، إن عقار إيفرمكتين أستخدم في علاج تدويد العين نتيجة الإصابة بذبابة *Dermatobia hominis* وخاصة عند ارتفاع درجة الحرارة (Wakamatus و Pierre-Filho، 2006)، بالرغم من عدم وجود طرق فعالة للوقاية المطلقة من الإصابة بمرض التدويد في الإنسان والحيوان ولكن يمكن الوقاية منه عن طريق الاهتمام بالنظافة الشخصية الكافية والرعاية التامة للمصابين وعلاج الجروح مهما كانت بسيطة والمتابعة والالتزام بإرشادات وتوجيهات المستشفيات البيطرية في كل منطقة لعلاج الحيوانات المصابة كافة (Khataminia وآخرون، 2011).

3:2 دورة حياة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم ووصف ادوارها The life cycle of the Old World Screwworm fly , *Chrysomya bezziana* and Description of stage .

تضع انثى ذبابة النوع *Chrysomya bezziana* بيوضها بشكل كتل مسطحة ومرتبطة بانتظام على حافات الجروح التي تحدث في جسم الحيوان مثل جروح قص القرون وجز الصوف وكذلك تضعها على الأغشية المخاطية الموجودة في فتحات الجسم الطبيعية كالأنف والفم والعين والأذن والمهبل وعند مؤخرة الحيوان كون هذا المكان رطباً وملوثاً ببول الحيوان وبرازه (سيف، 2006)، ومكان السرة عند الحيوانات حديثة الولادة يعد من الأماكن المفضلة من قبل الحشرة البالغة لوضع البيوض فيه (www.aghnam.com.Sa) ، تضع الأنثى بعد مرور 5 أيام من حدوث عملية التزاوج بين الكاملات من 150-200 بيضة في وقت واحد على حافات الجروح والأغشية المخاطية للثدييات الحية ومنها الإنسان لتفقس هذا البيوض بعد مرور 24 ساعة، اذ يبدأ الطور اليرقي الأول بخروج اليرقات الصغيرة التي تغزو أنسجة المضيف أو العائل Host عن طريق التعلق بهذه الأنسجة بواسطة كلاليب Hooks توجد في مقدمة رأس اليرقة لتبدأ بامتصاص السوائل الجسمية (Janovy وآخرون، 2012)، وتكون اليرقة في الطور الأول ذات لون أبيض ويبلغ طولها حوالي 1.5 ملم، أما الطور اليرقي الثاني والثالث يكون طول اليرقة فيهما 4-9 و 18 ملم وعلى التوالي والجسم مجزء الى حلقات أو قطع Segments (Walker، 1994)، تعيش اليرقة في الأنسجة الحية للحيوان أو الإنسان لمدة زمنية تتراوح بين 3-4 أيام وعند انتهاء الطور اليرقي الثالث حيث يكتمل نمو اليرقة وتصبح ناضجة تماماً، بعد ذلك تسقط من الجرح وتترك الأنسجة بحثاً عن مكان مناسب لتتغذى فيه ، ولكن بعض اليرقات الناضجة تموت في الأنسجة نتيجة التنافس على الغذاء مع بعضها البعض (Cook و Zumla ، 2009)، وقد ذكر الطويل (2005) في الوصف المظهري للأدوار التي تمر بها دورة حياة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم انها تمر بأربعة ادوار اساسية هي (البيضة – اليرقة (بثلاث أطوار) – العذراء- الكاملة) كما هو واضح في الصور (1) حيث يسمى هذا النوع من التحول عن طريق هذه الأدوار بالتحول الكامل Complementary Metamorphosis وفيما يأتي وصف كامل للأدوار التي تمر بها دورة حياة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم :

أولاً: البيض Eggs

بيض الذبابة الحلزونية أسطواناني الشكل لونه أبيض ناصع يتراوح طوله تقريباً بين 1.22-1.29 ملم وعرضه يتراوح بين 0.24-0.28 ملم (علي، 2000) .

ثانيا: اليرقات Larvae

تمر اليرقات بثلاثة أطوار خلال مدة نموها لتصل الى مرحلة النضوج الكامل والجسم في هذا الطور يتكون من 12 حلقة (ثلاثة صدرية وثمانية بطنية) حيث ان الحلقة الصدرية الرابعة تكون متحركة لأنها تحيط بفتحة الفم، ويحتوي الجسم على 5 ثغور تنفسية واضحة Cavite Respiratory ومفتوحة بشكل يشبه أصابع الكف والتي لها أهمية كبيرة في تشخيص الحشرة (مولود ، 2001)، وفيما يأتي شرح مفصل للأطوار الثلاثة التي يتكون منها الدور اليرقي في دورة حياة الذبابة :

الطور اليرقي الأول: اليرقات في هذا الطور تكون ذات لون أبيض حليبي يتراوح طولها تقريبا بين 1.1-2.4 ملم وعرضها بين 0.21-0.42 ملم ويحتوي الرأس على أشواك دقيقة متجهة الى الخلف، اما الحلقات الصدرية فانها تحتوي على حزمة من أشواك دقيقة احادية النهاية متجهة للخلف أيضا، الفتحات التنفسية الخلفية لليرقة تكون صغيرة جدا ومتقاربة مع بعضها بشدة لكل منها شقان تنفسيان بيضوي الشكل يبدوان مندمجان معا (Walker ، 1994).

الطور اليرقي الثاني : في هذا الطور يكون لون اليرقات ابيض مصفر وطولها يتراوح تقريبا بين 3.7-4.7 ملم وعرضها 1.1-1.6 ملم، يحتوي كل جانب من الحلقة الصدرية لأجسامها على فتحات تنفسية أمامية في قممها يتراوح عددها بين 4-5 بشكل تراكيب أصبعية طويلة ،اما الفتحات التنفسية الخلفية لها فانها تكون دائرية الشكل والمسافة بينها قليلة جدا (الطويل ، 2005) .

الطور اليرقي الثالث: تكون اليرقات فيه ذات لون وردي فاتح بعد اكتمال نموها ،اما طولها فيتراوح بين 10.3-16.2 ملم وعرضها يتراوح بين 1.9-3.4 ملم حيث تحتوي الحلقات الصدرية والبطنية الرأسية لها على أشواك دقيقة احادية النهاية متجهة الى الخلف والفتحات التنفسية الأمامية لها تكون صفراء اللون عددها خمس فتحات بشكل الكف ،اما الفتحات الخلفية فانها دائرية الشكل وعريضة أو واسعة (الطويل ، 2005) .

ثالثا: العذارى Pupa

عذارى ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم برميلية الشكل نهايتها الخلفية مستديرة الشكل والنهاية الأمامية بيضوية ذات لون أحمر – أحمر بني داكن جدا للعائل الذي تتواجد فيه ، تسقط على الأرض لتبحث لها عن مكان مناسب تختفي فيه لغرض التعذر يكون بعيدا عن الضوء مثل اماكن الرعي أو حظائر الأغنام والأبقار ، اذ تستقر في طبقات التربة أو المخلفات الحيوانية المتراكمة في هذه الحظائر وبعمق 2-4 سم عن سطح التربة، اذ تتعذر خلال 24 ساعة، ان للظروف البيئية ومنها عوامل المناخ تأثيرا كبيرا على تواجد وانتشار و حدوث الإصابة بهذه الحشرة وخاصة في دور

العذراء اذ تبين انها تموت في فصل الصيف عندما ترتفع درجة الحرارة أكثر من 40 درجة مئوية ورطوبة نسبية أقل من الأعتيادية اي عندما تكون أقل من 50 % عما هو عليه في الأيام الأعتيادية (Cook و Zumla ، 2009).

رابعاً: الحشرة الكاملة Imago Insect

الدور الكامل لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم تكون فيه ذات لون أخضر أو أخضر مزرق داكن والوجه برتقالي فاتح اللون والرأس يحتوي على عيون مركبة حمراء اللون متقاربة في الذكر كما هو واضح في الصورة (2-B) ولا توجد بينها مسافة فاصلة ،اما في الانثى فتكون العيون متباعدة قليلاً وتوجد بينها مسافة فاصلة (العزي ،2005)، كما هو واضح في الصورة (2-A)، وقد ذكر Razmjou وآخرون (2007) انه في دور الحشرة الكاملة تصبح الذكور ناضجة جنسيا بعد 24 ساعة من مغادرتها لدور العذراء بينما تستغرق الاناث حوالي 6-7 ايام لتصبح ناضجة جنسياً أو بشكل تام . اوضحت العديد من الدراسات الميدانية والتي أجريت في المجالين النظري والعملي لدورة حياة هذا النوع من الذباب ومنها الدراسة التي اجراها Khataminia وآخرون (2011) ان الطقس الأستوائي الذي تكون فيه درجة الحرارة 29 درجة سيليزية او 84.2 فهرنهايت فان دورة الحياة برمتها سوف تستمر 24 يوما ،اما اذا انخفضت درجة الحرارة أكثر بحيث يصبح الجو أكثر برودة اي أقل من 22 درجة سيليزية او 71.6 فهرنهايت فان دورة حياة الحشرة سوف تكون طويلة جداً وقد تستغرق من 2-3 اشهر، كما اوضحت الدراسة أيضا ان أفضل وقت لوضع البيوض من قبل اناث الحشرة البالغة خلال دورة الحياة هو الأيام التي تتراوح فيها درجة الحرارة بين 29-37 درجة مئوية كما ان الرطوبة النسبية المثلى أيضا تتراوح احيانا بين 70-80 % .



صورة (1) دورة حياة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana*

A - أنثى



B - ذكر



الصورة (2) طور الحشرة الكاملة لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana*

قوة التكبير x10

نقلا عن : www.irshadvetsu.com/blog/2015/06/crys

2-5 تربية ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (*Chrysomya bezziana* Vill.)

مختبريا

تعد تربية الحشرات مختبريا من الخطوات الأساسية والمهمة جدا في مجال الدراسات والأبحاث العلمية وهذا يتطلب توفير أعداد كبيرة جدا من الحشرات من خلال توفير الأدوات والمستلزمات الضرورية لتربيتها فضلا عن السيطرة على الظروف البيئية كدرجة الحرارة والرطوبة النسبية وهما من أهم الظروف المناخية التي تؤثر في عملية تربية أي نوع من أنواع الحشرات في المختبر ومنها ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* والتي ابتداءً العمل بتربيتها في العراق بأعداد كبيرة في مختبر الحشرات التابع لمنظمة الطاقة الذرية العراقية عام 1997، إذ تم إنتاج أكثر من 60 جيلا للحشرة بواقع 14 ألف حشرة بالغة لكل جيل، فضلا عن أن خطوة التربية سبق أن جرت في عدد من البلدان مثل المختبرات الأسترالية في غينيا الجديدة ومختبر الحيوان العالمي المتطور الذي أنشأ في ماليزيا خصيصا لتربية الذبابة الحلزونية (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 2005)، ونتيجة للخسائر الاقتصادية الكبيرة التي تسببها ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (*Ch. bezziana* Vill.) في الثروة الحيوانية للكثير من بلدان العالم الثالث والمتحضر على حد سواء لذا أصبح من الضروري جدا أن يتم تربية وإنتاج أعداد كبيرة جدا تصل إلى ملايين من هذه الحشرة مختبريا والقيام بإجراء البحوث والدراسات الميدانية والمختبرية عليها كدراسات الوراثة الجزيئية لغرض مكافحتها وراثيا باستخدام تقنية الحشرات العقيمة Sterile Insect Technique وهذا ما حصل فعلا عام 1954 في أمريكا لمكافحة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم الحديث عندما تم إطلاق 160 ذكر عقيم لكل كيلو متر مربع خلال أسبوع بحيث نجح البرنامج في القضاء على الحشرة نهائيا وبالتالي أثبتت تقنية الحشرات العقيمة فعاليتها وقدرتها العالية في استئصال هذه الآفة الحشرية نهائيا (منظمة الأغذية والزراعة/FAO، 1992)، وقامت الجواري (2000) بأعداد وجبات غذائية مختلفة بشكل أوساط غذائية اصطناعية قدمت للكاملات خلال فترة حياتها من اليوم الأول إلى نهاية التجربة عند دراسة تأثير العوامل البيئية على حياتها، إذ وجدت أن الغذاء المكون من قطن طبي مشبع بالمحلول السكري 10% ومسحوق السكر والعسل فضلا عن لحم البقر المفروم والمغطى بطبقة من الدم المتخثر هو الأفضل لكل من الذكور والإناث وخاصة الإناث لتحفيزها على وضع البيوض فيه، وقد أوضحت السراي (2002) طريقة تربية هذا النوع في المختبر والمواد الغذائية المطلوبة والظروف المختبرية الملائمة لتربيتها لمعرفة مدى تأثير أشعة كاما على أدوار العذراء والكاملة في الحصول على ذكور عقيمة تستخدم في تطبيق تقنية الحشرات العقيمة، ولأجل ذلك يتم الاعتماد بشكل أساسي عند جمع يرقات الطور الثالث المكتملة النمو للحشرة من حيوانات الحقل المصابة بدلا من اصطيادها بواسطة المصائد، لأن طريقة الصيد غير فعالة في الحصول على العدد المناسب والمطلوب من الذباب لغرض التربية، كما أن الحصول على عمر تكاثري ملائم

لتكوين مستعمرة يكون صعبا جدا عن طريق الأصطياد العشوائي للكمالات (علي، 2000) ، لقد اثبتت دراسات عديدة في مجال تربية الذبابة الحلزونية مختبريا ان كل 100 الف يرقة تستهلك 68 كيلو غرام لحم مفروم و5 غالونات دم و10 غالونات ماء وبشكل سريع جدا (العزي، 2005) ، وقد استطاع الطويل وجماعته (2006) تربية الحشرة مختبريا حتى الجيل السابع والثلاثون تحت ظروف بيئية مسيطر عليها من درجة حرارة ورطوبة نسبية، ان اقامة مباني لتربية ذبابة الدودة الحلزونية يعتمد بالأساس على الهدف من كمية الإنتاج المطلوب سواء كان هذا الانتاج على نطاق ريادي Pilot Scale أو الإنتاج الكمي Mass Production وفي كلا الحالتين فان تربية الحشرة تعتمد بدرجة كبيرة على الأيدي العاملة اذا كانت هذه المراحل اعتيادية، اما اذا كانت متطورة وحديثة فانها لا تحتاج ألا لعدد قليل جدا من اليد العاملة المتخصصة علميا وبشكل دقيق جدا في هذا المجال (العزي وآخرون، 1999)، وقد اكد Spradbery وآخرون (1995) ان تربية الذبابة الحلزونية مختبريا تتطلب أولا سحب كتل البيوض الملقى من قبل اناث هذه الحشرة على حافات الجروح التي يتم احداثها في الحيوانات الحية لمعرفة نسبة الفقس وتحديد خصوبة اناث الحشرة، وتستخدم جروح الحيوانات الحية في الأبقار و الأغنام في برامج استئصال الحشرة عند استخدام تقنية الحشرات العقيمة بالأشعاع لغرض تربية اليرقات الناتجة عن فقس كتل البيوض الملقى وتشخيص الكمالات منها (Krafsur و Lindquist، 1996)، ان النجاح الكبير الذي حققه استخدام تقنية الحشرات العقيمة والذي جعلها مشجعة وفعالة بشكل كبير جدا ضد ذبابة الدودة الحلزونية للعالم الحديث *Cochliomya hominivorax* خلال ثلاثة أجيال من دورة الحياة دفع بالكثير من دول العالم الى استخدامها في مكافحة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* عن طريق تربية الملايين من أفراد هذه الحشرة مختبريا بحيث تكون من نفس السلالة البرية لغرض تطبيق برامج تلك التقنية بشكل سهل ودقيق جدا (Spradbery وآخرون، 1999)، وقد نجح العزاوي وآخرون (2006) في تربية كل من ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم وذبابة ثمار القرعيات مختبريا للمقارنة بين النوعين من حيث تأثير اشعة كاما على قابلية الطيران لكليهما وبالتالي إمكانية تطبيق تقنية الحشرات العقيمة لأستئصال هذين النوعين والقضاء عليهما نهائيا .

2-6 طرائق مكافحة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

Control Methods of *Chrysomya bezziana*

عندما ظهرت ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم في العراق سنة 1996 بادرت المنظمة العربية للتنمية الزراعية وبالتعاون مع دول المنطقة المجاورة للعراق وبتمويل من المؤسسات الدولية في تبني مشروع مكافحة هذه الآفة واستئصالها من منطقة الشرق الأوسط نهائيا باتخاذ العديد من الإجراءات الوقائية اللازمة لمكافحتها والعمل على التقليل من انتشارها والأضرار التي تسببها من

خلال توفير الاحتياجات اللازمة كالمعدات والمبيدات المختلفة الأنواع من مناشا عالمية عديدة وكذلك الاستعداد ووضع الخطط لازالت تأثيرها وخطورتها عن طريق استخدام تقنية مكافحة الوراثة أو تسمى تقنية الحشرات العقيمة (SIT) باعتبارها إحدى الطرق الحديثة والفعالة في مكافحة الآفات الضارة (www.alhadeeqa.com) ، اما اهم طرائق مكافحتها فهي :

1-6-2 مكافحة الكيميائية Chemical Control

وهي استخدام مواد كيميائية أو استخدام مبيدات كيميائية مختلفة الأنواع تؤثر على الجهازين العصبي والتنفسي للحشرة معا في كل مرحلة من مراحل دورة الحياة وفي فترة زمنية محددة ، درس Spradbery وآخرون (1983) كفاءة وفعالية 13 نوع من مبيدات الحلم Acaricide حيث قيمت كفاءتها بأستئصال هذا النوع من الذباب وازالتها ميدانيا، وقد أدى استخدام عدة أنواع منها الى ارتفاع نسبة هلاك يرقات الحشرة، من جهة أخرى وجد أيضا ان هناك أنواعا من هذه المبيدات لا تؤثر على يرقات الحشرة بل ينتج عند استخدامها بكثرة تطور ونمو جيد لهذه اليرقات خلال دورة الحياة مثل المركب الكيميائي المعروف Coumaphos ، ووجد في دراسة أخرى ضمن هذا المجال وهي الدراسة التي أجراها Seaman وآخرون (1987) ان نسبة التسمم عند استخدام المركب الكيميائي Ivermectin في مكافحة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم 6% والتي تؤدي الى موت الحيوان بعد فترة قصيرة من استخدامه لا تتجاوز اليوم الواحد أو اليومين كأقصى حد لأنه يؤثر بشكل مباشر وسريع جدا على الجهاز العصبي المركزي للحيوان، وقد أضيفت بعض المواد الكيميائية ذات التأثير السمي المتعادل مع المركب الكيميائي Ivermectin المستخلص من فطريات Actinomycetes لغرض ازالة نسبة التسمم الناتجة عن استخدامه بحيث لا يؤثر على أجهزة جسم الحيوان في أثناء المكافحة (Spradbery و Vanniasingham، 1998)، ومن المركبات الكيميائية المستخدمة في الوقت الحاضر في عملية المكافحة لهذه الآفة المركب الكيميائي المعروف باسم Deltadip والذي يستخدم بكثرة من قبل مربى الأغنام والأبقار لمكافحة الحشرات الضارة الأخرى الى جانب مكافحة الذبابة الحلزونية مثل القراد والبعوض والحلم والبرغوث وغيرها عن طريق رش حظائر التربية به أو تغطيس الأغنام بعد أضافته الى ،حواض مملوءة بالماء أو رش مكان الإصابة بالمبيد بعد التأكد من وجود اليرقات في الجرح ،اذ وجد ان له تأثيرا عاليا جدا على الجهاز التنفسي للحشرة بدرجة كبيرة تدفع اليرقات الى ترك مكان الإصابة بينما تلك التي تبقى في الداخل فانها تموت وذلك لأنه يدمر الجهاز التنفسي لها نهائياً (Wyss، 2003)، وهناك العديد من الشروط التي يجب توافرها في المبيد الذي يستخدم في مكافحة النوع *Ch. bezziana* والتي وضعتها المنظمة العربية للتنمية الزراعية (2000) وهذه الشروط هي :

أولاً: المبيد الكيميائي يجب ان يكون ذا فعالية سمية عالية على كل ادوار حياة الذبابة وبالمقابل ليس له أي تأثير يذكر على المضيف والانسان ولا يسبب أي تلوث بيئي ضار .

ثانياً: ان يكون المبيد الكيميائي سهل الاستخدام والتطبيق الميداني .

ثالثاً: عند استخدام طريقة الرش يجب ان يكون المبيد متخصصا في مكافحة حشرات معينة ولا يؤثر على الحشرات الأخرى النافعة للانسان .

رابعاً: يجب ان يبقى مفعول المبيد لفترة من الوقت في داخل الجرح وبخاصة في الدور اليرقي لكي لاتحدث أي اصابات جديدة في نفس الجرح .

خامساً: عدم استخدام المبيد الذي يبقى تأثيره لفترة زمنية طويلة على المضيف لكي لا يؤثر على الانسان عن طريق السلسلة الغذائية Food Chain .

وبما أن تكاليف مكافحة الكيميائية عالية جدا بالإضافة لكونها ذات تأثيرات سمية متباينة الفعالية على البيئة والانسان والحيوان لذلك توصل المختصون في هذا المجال الى ان استخدام تقنية الحشرات العقيمة هي الطريقة الأمثل لمكافحة هذا النوع من الذباب ومنع انتشار الأصابة به والحد من تأثيره نهائيا في جميع المناطق والأماكن الموبوءة بها (Mahon و Tweddle، 2000) .

2-6-2 مكافحة الوراثة Genetics Control

1-2-6-2 تقنية الحشرات العقيمة Sterile Insect Technique .

تعد تقنية الحشرات العقيمة تقنية سهلة ومهمة جدا في السيطرة على الآفات الضارة ومنها ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم كون الحشرات عموما تتعرض في مرحلة من مراحل دورة حياتها الى الأشعة المؤينة وبخاصة الأشعة المنبعثة من النظائر المشعة Isotope مثل الكوبلت -60 والسييزيوم -137 بحيث يؤدي هذا التعرض المباشر والقوي الى نشوء أو أستحداث طفرات سائدة مميتة Dominant Lethal Mutations في الأمشاج الذكرية والانثوية للحشرة (الطويل، 2000)، وعندما يحدث التزاوج بين حشرات السلالة المختبرية المعرضة للأشعاع والتي يتم إطلاقها الى الحقل مع حشرات السلالة الطبيعية الموجودة في المنطقة المراد مكافحتها وراثيا يكون بشكل متبادل اي ذكور عقيمة مع اناث طبيعية مرة وذكور طبيعية مع اناث عقيمة مرة أخرى بحيث تحصل عملية الأخصاب للبويضة في الاناث ولكن حدوث الطفرات السائدة المميتة يؤدي الى فشل عملية تكوين الجنين في البويضة المخصبة وبالتالي هلاكه، ولهذا السبب يمكن عد مكافحة الوراثة وتطبيق البرامج الخاصة بأستخدام هذه تقنية كموانع للحمل في الحشرات وكذلك عدت من أفضل طرق مكافحة الآفات (Mahon، 2002)، لاحظ عالم الحشرات Knipling السلوك الجنسي لاناث وذكور ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* وتوصل الى ان الذكر يستطيع ان يلقيح

أكثر من أنثى، بينما الأنثى تتزاوج مرة واحدة فقط خلال حياتها وبعد نجاحه في تربية هذه الحشرة مختبرياً أثبت أنه يمكن القضاء على عشيرة سكانية محددة منها حيث أجرى تجربة في هذا المجال في منطقة معينة تتواجد فيها أعداد كبيرة من الذبابة الحلزونية بأطلاق أعداد من الذكور المعرضة للأشعاع بعمر 5-6 أيام وبمعدل 38 ذكر عقيم لكل كيلو متر مربع واحد وفي كل أسبوع ولثلاثة شهور وقد لاحظ أن 80% من البيوض الموضوعة من قبل إناث هذه الحشرة لم يفقس في جروح الحيوانات (Vargas-Teran ، 2002)، أن المكافحة باستخدام تقنية الحشرات العقيمة أدت إلى إبادة العشيرة السكانية لذبابة الدودة الحلزونية في الولايات المتحدة الأمريكية لمدة 13 عام وفي عام 1975 تم القضاء عليها نهائياً في بورتريكو وعام 1991 في المكسيك كذلك تم تطبيق برامج مكافحة ذبابة الدودة الحلزونية في دول أمريكا اللاتينية وحقت نتائج كبيرة جداً ومذهلة (Mahon، 2001) ، أما في العراق ودول الخليج العربي لاتزال الدراسات والأبحاث مستمرة لغرض القضاء على هذه الآفة نهائياً حيث أنشئت مختبرات في العراق لتربية الحشرة كمياً منذ عام 1997 لأجراء الدراسات البيولوجية والبيئية وكذلك دراسة تأثير أشعة كاما عليها وخاصة تجارب العقم لازالة عشائرها السكانية واستئصالها وراثياً تحت الظروف الحقلية بالتعاون مع الوكالة الدولية للطاقة الذرية IAEA (العزي وآخرون، 1999) .

2-2-6-2 شروط تطبيق تقنية الحشرات العقيمة

في عام 1964 وضع العالم Knippling شروطاً عديدة يجب الأخذ بها أو توفرها عند تطبيق تقنية الحشرات العقيمة لاستئصال تأثير ذبابة الدودة الحلزونية وإزالتها نهائياً وهذه الشروط يمكن إيجازها بما يأتي :

أولاً: يجب أن لا تؤثر الجرعة الإشعاعية المستخدمة في تعقيم الحشرة سلبياً في قدرتها على الطيران والانتشار والتزاوج والمنافسة .

ثانياً: إمكانية تربية هذه الحشرة مختبرياً بتكاليف مادية مقبولة .

ثالثاً: توافر معلومات كافية عن حياتية وبيئة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم .

رابعاً: توافر معلومات كافية ودقيقة جداً عن الكثافة السكانية لهذه الحشرة طوال أشهر السنة مع ملاحظة التذبذب في أعدادها .

خامساً: يجب أن لا تزيد تكاليف استخدام هذه التقنية عن تكاليف استخدام طرق المكافحة الأخرى .

سادساً: يجب أن لا تسبب الحشرات المعقمة المطلقة أضراراً للإنسان والحيوان والبيئة التي تطلق فيها .

سابعاً: يجب استخدام وتطبيق هذه التقنية لمكافحة الحشرات التي تسبب أضراراً اقتصادية كبيرة بعد تحديد الضرر بشكل دقيق جداً .

ثامناً: يجب ان تكون نسبة الحشرات التي يتم تربيتها وتعرضها للأشعة المؤينة في المختبر الى الحشرات الطبيعية بالحقل بنسبة لا تقل عن 1:9 وكلما زادت هذه النسبة زادت نسبة نجاح تطبيق هذه التقنية (Al-Izzi، 2002)، يتضح مما تقدم ان استخدام تقنية الحشرات العقيمة لمكافحة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم أصبح ضرورة ملحة ومهمة جدا في ضوء النتائج التي حققتها في استئصال ذبابة الدودة الحلزونية للعالم الحديث *Cochliomyia hominivorax* في ليبيا عام 1994، اذ تم اصطياد حوالي 280000 من الذباب البري العائد لهذا الجنس حصرا وعلى هذا الأساس تم تحديد أعداد الذباب العقيم الذي يتم إطلاقه (Cunningham وآخرون، 1992)، علما انه في هذا النوع من مكافحة لهذه الحشرة يتم تلوين الحشرات البالغة التي جرى تعقيمها بالأشعة في المختبر عن طريق تلوين العذارى بصبغة فسفورية اذ تتلون الكاملات بعد ذلك ويمكن تمييز الحشرات المعلمة عن الطبيعية فيما بعد باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (Mahon، 2001).

3-6-2 مكافحة الاحيائية Biological Control .

تعد مكافحة الأحيائية للقضاء أو السيطرة على انواع الآفات الحشرية من أقدم الطرق المستخدمة، اذ ان الوثائق التي تؤكد استخدامها لأول مرة قد جاءت من الصين واليمن ثم انتقلت الى بلدان أخرى (الطويل والجبوري، 2004)، وقد ذكر Rechcigl وRechcigl (2000) انه في عام 1988 بدأ التطبيق العملي الفعلي لتقنية مكافحة الأحيائية عندما اختيرت أعداء حيوية بشكل دقيق في استراليا وصدرت الى ولاية كاليفورنيا لغرض السيطرة والقضاء على حشرة البق الدقيقي في بساتين الولاية، وقد أكد كل من Ahmed وآخرون (1985) ومحسن (2001) ان معظم الأعداء الحيوية التي اكتشفت كانت أشباه متطفلات Parasitoids وخاصة متطفل حشرة التين *Baracon hebtor* (Hymenoptera: Baraconidae) الذي وصف لأول مرة في امريكا من قبل العالم Say في عام 1936 والذي يتواجد طيلة أيام السنة لان له مدى تحمل واسع لدرجات الحرارة المختلفة، ولم تشر أي من البحوث السابقة في مجال مكافحة الأحيائية الى أسماء ما تم تدوينه من مفترسات او أعداء حيوية كالمتطفلات أو الأحياء الدقيقة على ذبابة النوع *Ch.bezziana*، اذ ان استخدام هذه التقنية لتقويم عملها مع هذه الحشرة من قبل القائمين على هذا النوع من مكافحة لم يتم بعد وخاصة بعد نجاح تقنية الحشرات العقيمة في مكافحة هذه الحشرة واستئصالها نهائيا من بعض البلدان، عموما فان تقنية مكافحة الأحيائية لها أهمية واضحة وكبيرة جدا كونها تحافظ على الأعداء الطبيعيين سواء كانت مفترسات أم متطفلات فضلا عن انها أقل كلفة واكثر امانا، اذ انها طبيعية وليس لها اي خطورة تذكر على الانسان كما انها لا تحتاج الى يد عاملة (حميد، 2002)، وقد ذكر حميد والطويل (1999) ان عناصر مكافحة الأحيائية تتكون من ثلاث مجموعات هي المفترسات Predators وأشباه الطفيليات Parasitoids والكائنات الحية الدقيقة الممرضة كأشكال من البكتريا والفطريات،

ان الدراسة اللازمة لتطبيق اي برنامج مكافحة احيائية تتطلب ثلاث خطوات أساسية ومهمة في نجاح هذه العملية وهي عمل تربية (Insectary stock (Mass Production للأعداء الطبيعية والتكثيف Colonization فضلا عن إجراء او عمل اي دراسات للتأكد من نجاح عملية مكافحة لأي نوع من أنواع الآفات الحشرية (الطويل والجبوري، 2004) .

7-2 طرائق تشخيص ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم Identification methods of Old World Screwworm fly

1-7-2 التشخيص بالاعتماد على المظهر الخارجي Morphological Identification

اعتمد تشخيص هذا النوع من الذباب عن طريق تحديد الصفات المظهرية لها بشكل كبير جدا منذ اكتشافها لأول مرة من قبل العالم الايطالي Villeneuve عام 1914 ولحد الان، بالرغم من اكتشاف طرق حديثة ودقيقة في مجال التشخيص مثل طريقة التشخيص الوراثي الخلوي Cytogenetic Idenification والتشخيص الجزيئي Molecular Idenification مع التطوير والتعديل المستمر على هذه التقنيات (Paul و Bernhard، 2000)، وهناك العديد من الدراسات والابحاث الخاصة بتشخيص ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم ، فقد ذكر علي (2000) ان لون وجه الذبابة الحلزونية هو برتقالي فاتح و الرأس يضم زوجين من العيون المركبة Compound Eyes بيضوية الشكل لونها احمر وفيها عديسات الجزء العلوي اكبر قليلا من عديسات الجزء السفلي علما انه لا يوجد فاصل بين الجزئين فضلا عن ذلك فان المسافة بين العينين في الذكور تكون ضيقة جدا وتكاد تكون شبه معدومة بينما تكون هذه المسافة في الإناث واسعة، ومن الصفات المظهرية للذبابة الحلزونية للعالم القديم المعتمدة في التشخيص المظهري هو تخطيط الجبهة الذي يكون مميزا وبشكل واضح جدا في الإناث عن غيرها من اناث الأنواع الأخرى العائدة لجنس الـ *Chrysomya*، اما شويكات الجبهة فتكون مختلفة الأطوال وعددها يتراوح بين 13-15 اذ تكون طويلة وسميكة ومتقاطعة مع بعضها البعض والراس يحتوي على قرون الاستشعار التي تكون من النوع الأريستي Aristate ، اما أجزاء فم ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم فهي من النوع الاسفنجي الماص Sponging sucking type mouth (Spradbery، 1991) ، يغطي الجزء العلوي لعرق الجناح صفا متناسقا من الشعيرات، اما الحشفة الخلفية العليا للجناح فلونها أبيض فضي شمعي مغطى بشعيرات زغبية بيضاء، الفتحة التنفسية الأمامية للحشرات الكاملة بيضوية الشكل ذات لون أحمر داكن الى أسود بينما الفتحات التنفسية الخلفية تكون ايضا بيضوية الشكل ذات لون أسود تحيطها شعيرات طويلة صفراء اللون، وآلة وضع البيض في اناث الذبابة توجد في النهاية الخلفية للجسم وتعد من الصفات التشخيصية المميزة للإناث عن الذكور اذ تكون واضحة جدا (Akbarzadeh وآخرون، 2015) .

2-7-2 التشخيص الوراثي الجزيئي لذبابة *Molecular genetic identification* for *Ch.bezziana*

ان علم الوراثة الجزيئية في مجال وراثة الحشرات يوفر بيانات مهمة وضرورية لتطوير مفاتيح التشخيص الجزيئي والتي يمكن استخدامها لتحديد الأنواع المختلفة لأن التشخيص المظهري Morphological Identification يصعب فيه الاحتفاظ بعينات الحشرات لفترة طويلة وبالتالي فان تشخيص وتصنيف الحشرات وراثيا يعد الافضل والاكثر استخداما في مختبرات وراثة الحشرات (Trout وآخرون، 2010) ، ويمكن ان يجري التشخيص الوراثي الجزيئي للحشرات باستخدام بيانات تسلسل الحامض النووي DNA للكشف عن المجتمعات السكانية ووصف انواع من الحشرات وصفا جغرافيا دقيقا، وقد استخدمت الدراسات الجينية المبنية على التشخيص الجزيئي للحشرات في مجال تقديرات التدفق الجيني والانتشار فضلا عن انه يساعد في تحديد اعداد المجتمع السكاني للحشرة المستوطنة والوافدة وتقسيمها الى فئات معينة كذلك لهذه الدراسات دور في تنفيذ برامج ادارة ومكافحة الآفات الحشرية (Austin وآخرون، 2006)، وفي منتصف عقد التسعينات من القرن الماضي وفرت المواد والأدوات المناسبة للتحليل الجزيئي لمادة الـ DNA التي تسيطر على صفات الكائن الحي وبالتالي ادى ذلك الى تطور كبير بالنسبة للمؤشرات الجزيئية الوراثة ومنها مؤشرات الدنا DNA Markers التي تعرف بانها تتابعات من الـ DNA يمكن الاستدلال بها على موقع محدد على الجينوم أو الكروموسوم والتي تستخدم في دراسة العلاقات الوراثة بين الأفراد وايجاد البصمة الوراثة لهم كونها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثة المخزونة فيهم بشكل دقيق جدا يمكن الباحثين من المقارن بين هؤلاء الأفراد (Weising وآخرون، 1988؛ Wiegand وآخرون، 1993؛ Yang وآخرون، 1996)، وهذه الاختلافات العديدة تنتج من الحذف Deletion أو الإدخال Insertion أو تنتج هذه الاختلافات عن اعادة الترتيب Rearrangement للنيوكليوتيدات في جينات الأفراد المدروسة لأي سبب كان كالطفرات الوراثة ولهذا السبب استخدمت في دراسات عديدة ومهمة في المجال الوراثي كدراسة التصنيف الجزيئي Molecular Taxonomy والدراسات التطورية Evolutionary Studies وأعداد الخرائط الوراثة Genetic Mapping كما أنها أصبحت من الأدوات المهمة جدا في دراسة التنوع الوراثي Genetic Diversity بحيث لا يوجد بديل عنها في تطور الخطط المناسبة لحفظ الأنواع (Sharma وآخرون، 1994)، أما أهم الخصائص والمميزات التي تمتاز بها مؤشرات الـ DNA فهي :

- 1 : تمتاز بالاستقرارية بعكس المؤشرات المظهرية Morphological Markers التي تتأثر كثير بالظروف البيئية .
- 2 : تظهر التباين الذي يحدث على مستوى الـ DNA مباشرة .

- 3 : تمتاز بالشمولية حيث أنها افضل بكثير من المؤشرات المعتمدة على تحليل المحتوى البروتيني للكائن الحي باعتمادها على مادة الـ DNA الموجودة في الكائنات الحية جميعها وبشكل متساوي .
- 4 : تمتاز بقدرتها العالية جدا على الكشف عن عدد كبير من التغيرات لذلك فهي قادرة على أيجاد الاختلاف مهما كان قليلا بين الأفراد فضلا عن قدرتها في تتبع التغيرات الوراثية خلال الأجيال المتلاحقة لأنها تستند الى قوانين مندل الوراثية (Caetano-Anolles و Gresshoff، 1997) .

2-7-2 أنواع مؤشرات الدنا Types of DNA markers

أن التطور السريع جدا في مجال علم الوراثة الجزيئي أدى الى اكتشاف أنواع من مؤشرات الدنا والتي قسمت بعد أكتشافها مباشرة على نوعين رئيسيين بالأعتماد على نوع التقنية المستخدمة في ايجاد هذه المؤشرات والكشف عنها وهذه الأنواع هي :

2-7-2-1-1: مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي DNA markers based on molecular hybridization

ظهرت اولى مؤشرات الـ DNA التي تعتمد على التهجين الجزيئي مباشرة بعد استغلال العلماء والباحثين لحدثين علميين مهمين جدا اولهما اكتشاف وصمة سوزن Southern Blotting عام 1975 والثاني هو اكتشاف انزيمات التقيد Restriction Enzymes عام 1986 بحيث استغل هذان الحدثين بشكل كبير في بناء اول تقنية سميت بتقنية الـ RFLP او ما تسمى بتقنية تباين اطوال قطع التقيد Restriction Fragments Length Polymorphism التي عرفت بانها توارث الاختلافات في مواقع القطع الانزيمي الذي يؤدي الى ظهور اطوال مختلفة من قطع الـ DNA على هلام الاكاروز، ويعتمد عمل تقنية الـ RFLP على الاختلافات في انماط التقطيع التي تحصل نتيجة طفرة نيوكليوتيدية عن مكان القطع أو عن طريق القطعة المحذوفة أو المضافة أو المستبدلة بشكل كامل (Jubrael وآخرون، 2005) ، وقد استخدمت مؤشرات الـ DNA التي تعتمد على التهجين الجزيئي في مجالات عديدة منها تحسين أنواع من النباتات مثل بناء الخرائط الوراثية للبطاطة والذرة وفي مجال التشخيص المبكر لجنس نخيل التمر كذلك التشخيص الوراثي لأصناف من النخيل (الخطيب، 2000)، لقد أدى تطور هذه التقنية الى تطبيق تقنية الـ DNA-Microarray وتقنية الـ DNA-Chip والتي هي عبارة عن قطع زجاجية صغيرة بمساحة لا تتجاوز عدة سنتيمترات مربعة تحتوي على 10000 موقع وتثبت على تلك المواقع تسلسلات جينات معينة اونيوكليوتيدات مصطنعة فمثلا التهجين الجزيئي مع الـ DNA العائد لنسيج معين يظهر انواع عديدة من الجينات الفعالة منها (Zaid وآخرون، 1999)، ان الأهمية الكبيرة لتقنية الـ RFLP تكمن في امكانية الكشف عن اعداد هائلة من المواقع في وقت قصير، اذا فان التقنيات المعتمدة على التهجين الجزيئي بشكل عام تحتاج

الى كثير من الوقت والجهد والكلفة فضلا عن كميات كبيرة من الـ DNA وبنقاوة عالية جدا (جبرائيل، 2001).

2-1-2-7-2: مؤشرات الدنا المعتمدة على تفاعل سلسلة الدنا (PCR)

تم وصف التفاعل المتضاعف لسلسلة DNA وتوضيحه عام 1987 لأول مرة من قبل العالم كاري موليس وأساس عمل هذه التقنية وكما هو موضح في الشكل (1) هو مضاعفة قطعة معينة من الـ DNA وعمل أجزاء عديدة ومختلفة من الحامض النووي وفق تسلسل نكلوتيدي معين بوجود بادئات Primers مرتبطة بتسلسل مكمل لها على شريط الـ DNA القالب وذلك بسبب تضاعف المادة الوراثية للكائنات الحية في اثناء الانقسام (Kainz، 2000)، وتعد تقنية الـ PCR الأكثر انتشارا واستخداما في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع دول العالم والأساس الذي تعتمد عليه معظم الدراسات العلمية البحثية فيها (Sridhar، 2006)، وهناك أنواع عديدة لهذه المؤشرات وهي :

أولا: مؤشرات الـ DNA التي تستهدف عدة مواقع على الجينوم وتشمل :

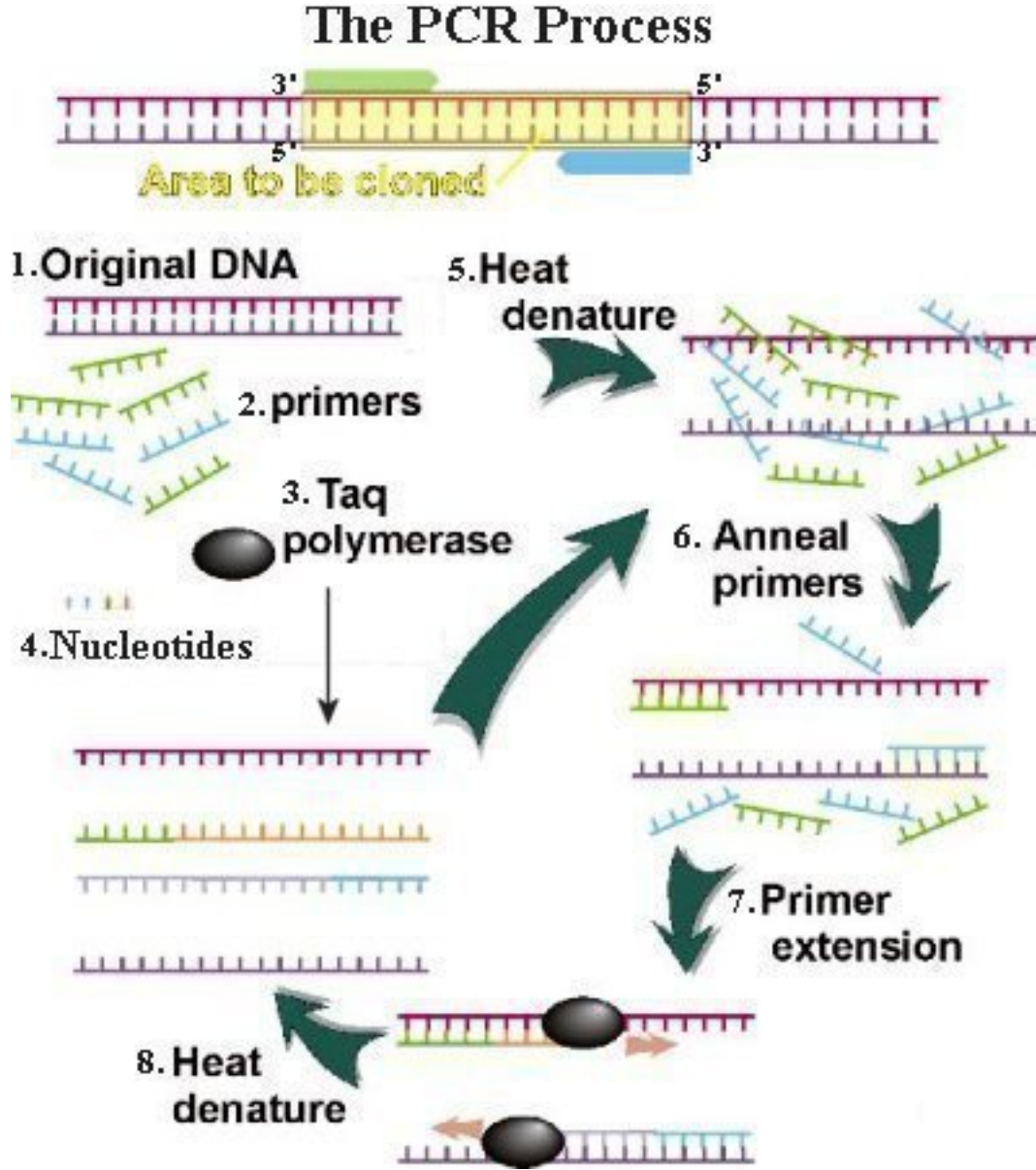
1: مؤشرات تستخدم بادئات عشوائية تماما مثل مؤشرات لصق النواتج المتضاعفة المتعددة العشوائية Multiple Arbitrary Amplicon Profiling ويشمل هذا النوع بدوره أنواع عديدة مثل مؤشرات التفاعل العشوائي متعدد الأشكال لسلسلة الدنا (RAPD-PCR) DNA والتفاعل العشوائي لتسلسل الدنا (AP-PCR Williams وآخرون، 1990).

2 : مؤشرات تستخدم بادئات شبه عشوائية مثل مؤشرات تباين اطوال قطع الدنا المتضاعفة AFLP (Meudth و Clark، 2007).

3 : مؤشرات تستخدم بادئات متخصصة كمواقع موزعة داخل الجينوم مثل السايتوكروم اوكسديس II لدنا الماييتوكوندريا (COII-mtDNA) وكذلك سايتوكروم اوكسديس I لدنا الماييتوكوندريا (COI-mtDNA) (Garros وآخرون، 2005a).

ثانيا: المؤشرات التي تستهدف مواقع محدد معروفة التسلسل ومن الامثلة الواضحة على هذا النوع من المؤشرات هي Alpha-Amylase Gene Analysis (Karp وآخرون، 1997)، وقد ذكر Mourad وآخرون (2010) ان القيام بعملية تضخيم أو مضاعفة قطعة معينة من الـ DNA يتطلب فك شريطي الدنا عن بعضهما وتكوين شريط جديد باستخدام أنزيم بلمرة الدنا Polymerase DNA، اذ يرتبط الشريط المتكون الجديد مع الشريط القديم وبالتالي يصبح لدينا جزيئان من الحامض النووي DNA بدلا من جزئ واحد فقط، لقد أدى التطور العلمي والتقني في مجال تصنيع الأجهزة والمستلزمات المختبرية في العالم الى انتاج جهاز ذاتي التشغيل يضاعف جزيئات الـ DNA والذي يستخدم حاليا في معظم مختبرات البحوث العلمية وفي اثناء عمل هذا الجهاز ترتفع

درجة الحرارة لغرض فك التفاف الشريطين ثم تتخفض بعد ذلك بالتدريج لكي تتم عملية بناء الشريط الجديد وربطه مع الشريط القديم (الصالح، 2007) .



شكل (1)

عملية تضاعف قطع الـ DNA بواسطة تقنية الـ P C R

نقلا عن : <http://www.dna art online use primer>

2-2-7-2 تقنية تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

أحدثت تقنية تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل الـ PCR ثورة كبيرة في علم البيولوجيا الجزيئية ، اذ مكنت العلماء من الحصول على نسخ كبيرة من الـ DNA مختبريا في وقت قصير وبكفاءة عالية جدا ويعتبر العالم كاري موليس Kary Mullis اول من استخدم هذه التقنية في العام 1982 ، وتم نشرها لأول مرة في العام 1985 ومنذ ذلك الحين ولازال الكثير من الباحثين والعلماء يجرون العديد من التعديلات على تلك التقنية بالأعتماد على التقنية الأم التي استخدمها كاري موليس لأول مرة، وتعد هذه التقنية حساسة ويمكن ان تكون عالية التخصص في جرم معين من الـ DNA (التركي، 2010)، اما اهم الأسباب التي ساهمت في انتشار تقنية الـ PCR على نطاق واسع وفي جميع التخصصات العلمية الحيوية فهي :

- 1: انها لا تعتمد على النظام الحيوي في داخل الخلية وكذلك السيطرة على كمية الـ DNA من خلال التحكم بمقدار تلك الكمية .
- 2: سرعة الإنتاج ، اذ انها تقنية تستخدم بكثرة في مجال علم الحياة الجزيئي لمضاعفة و تضخيم نسخ عديدة من الحامض النووي DNA بشكل نسخ أنزيمي خارج الجسم الحي في المختبر لأجراء التجارب والفحوصات والابحاث العلمية المختبرية المختلفة (Peter و James ، 2000)، وقد استخدمت في الماضي فحوصات مختبرية متممة ولكن في السنوات الأولى من القرن الواحد والعشرين بدا علم الوراثة الجزيئية يأخذ تطورا كبيرا في مجال المتابعة والدراسة في مجال الجينومات البشرية Humans Genomics بحيث كان لتقنية PCR دور مميز ومهم في هذا التطور لانها اعتبرت بوابة الكثير من التطورات المتسارعة والحديثة في مجال التكنولوجيا الحيوية Biotechnology. (Zewail ، 2002) ، اما اهم مراحل أنزيم التفاعل المتسلسل الـ PCR في كل دورة من دورات تضاعف الـ DNA فهي :

1-2-2-7-2 مرحلة المسخ (التفكك) Denaturation Stage

وهي المرحلة الأولى الأساسية والمهمة من التفاعل والتي يتم فيها تحضير قالب الدنا المزدوج Double Strand للعمليات التالية التي تتم بواسطة أنزيمي فك الحلزنة وهما DNA helicase وأنزيم Topoisomerase ويكون ارتباط الشريطين بواسطة الأواصر الهيدروجينية ،بالأضافة الى ذلك فان لدرجة الحرارة العالية الدور الأساسي في فك ارتباط الشريطين وتحدث هذه المرحلة برفع درجة حرارة محلول التفاعل الذي يحتوي على قالب الدنا من 94-98 درجة سيليزية بحيث يبدأ شريط الـ DNA بالانقسام على شريطين منفصلين عن بعضهما خلال مدة زمنية محددة تتراوح بين 9-1 دقائق، وللحصول على شريط مفرد يتكون قالب لبناء قطعة جديدة مكمل للـ شريط القديم أثناء التفاعل (Chen و Janes ، 2002) .

2-2-2-7-2 مرحلة إرتباط البادئ Primer Annealing Stage

وهي المرحلة الثانية بعد مرحلة المسخ (التفكك) حيث يتم فيها ارتباط البادئ بالتسلسل النيوكليوتيدي الهدف في تفاعل تحديد هذا التسلسل بحيث يتم تضاعف نسخ الحامض النووي في السلسلتين معاً، ويرتبط في هذه المرحلة أيضاً بتسلسل معين في سلسلة الـ DNA المقابل له وبالقواعد النتروجينية الملائمة له بحيث يتم ذلك الارتباط بواسطة الأواصر الفوسفاتية ثنائية الأستر التي تربط بين نيوكليوتيدات البادئ ونيوكليوتيدات السلسلة الهدف، تتم هذه المرحلة من التفاعل بدرجة حرارة أقل من مرحلة المسخ السابقة بحيث تتراوح فيها بين 50-65 درجة سيليزية في وقت قصير جداً لا يتجاوز الخمس ثواني في الدورة الواحدة (كبهوار، 2007)، وتعتمد درجة الحرارة وطول المدة الزمنية في هذه المرحلة على عوامل عديدة منها تركيز وطول البادئ ونسبة احتوائه على القواعد النتروجينية (الكوانين G والسايروسين C) أما درجة حرارة البادئ فإنها تحسب من خلال استخدام المعادلة الحسابية الملائمة لطول البادئ في استخراج درجة الحرارة الحقيقية لتفكك 50% منه ، والمعادلة هي بالشكل التالي درجة حرارة الإذابة Temperature Meliting = (عدد قواعد T+A) X 2 م + (عدد قواعد G+C) X 4 م وهذه المعادلة تستخدم بشكل أساسي للبادئات Primers ذات التسلسلات القصيرة الأقل من 20 نيوكليوتيدة (Wu وآخرون، 1991).

3-2-2-7-2 مرحلة الاستطالة Extension Stage

هذه المرحلة هي الثالثة والأخيرة من تفاعل الـ PCR والتي يتم فيها إضافة القواعد النتروجينية منقوصة الأوكسجين dNTPs من الطرف 3 إلى الطرف 5 للبادئ Primer في منطقة ارتباطه ب قالب الدنا بحيث تنتج شريط DNA مكمل لذلك القالب بواسطة أنزيم البلمرة (كبهوار، 2007)، تحدث هذه المرحلة في درجة حرارة تتراوح بين 75-80 درجة سيليزية وهي الدرجة الحرارية الملائمة لعمل أنزيم DNA Polymerase في بناء شريط الحامض النووي الـ DNA الجديد (Zador، 2011)، تعتمد الكمية المنتجة من الحامض النووي DNA في مراحل تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل على عدد دورات الجهاز، ان عدد الدورات المستخدمة في تفاعل الـ PCR تبلغ 40 دورة كافية للحصول على نسخ مناسبة للـ DNA الهدف بحيث يمكن رؤيتها عند الكشف عنها باستخدام هلام الاكاروز، كما ان فعالية الأنزيم تقل بعد ذلك العدد من الدورات علماً أن عدد الدورات التفاعل تعتمد بشكل أساسي على تركيز الـ DNA الهدف وطول البادئ والزمن الذي تستغرقه كل دورة (أبو الجدايل، 2014). اما اهم متطلبات تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR والتي تؤدي الى على أكمل وجه في جميع الدراسات والبحوث فيمكن أيجازها بما يأتي :

3-2-7-2 أنزيم البلمرة DNA Polymerase

يعد أنزيم البلمرة واحد من المكونات الأساسية والمهمة في تفاعلات الـ PCR اذ تعتمد تلك التفاعلات على قدرة هذا الأنزيم على البناء وبالتالي مضاعفة تسلسلات نيوكليوتيدية محددة من الدنا قالب DNA Template المكمل لتسلسلات البادئ ، لذلك فان الأهتمام بتطوير نوعية وكفاءة هذا الأنزيم حظي باهتمام العلماء والباحثين في هذا المجال وقد بدا العمل بتقنية الـ PCR مع أنزيم البلمرة Fragment Klenow المستخلص من بكتريا القولون *E.coli* وهو النوع DNA Polymerase I ، الا أن هذا الأنزيم وجد أنه يفقد القدرة والفعالية على البناء بمجرد تعرضه لدرجة الحرارة العالية المطلوبة لمسح شريط الدنا مما يجعل عمله يتوقف اذا لم يتم اضافة كميات اخرى منه في كل دورة من دورات التفاعل، الأمر الذي دفع بعض الباحثين الى التفكير بانتاج انزيم بديل له وهو الأنزيم Polymerase Taq الثابت حراريا والمعزول من البكتريا المحبة للحرارة *Thermus aquaticus* التي تستوطن ينابيع المياه الحارة (الصالح، 2007) ، اذ وجد ان له القدرة والفعالية على الاستمرار بدرجة حرارة 95 درجة مئوية وبناء قطع من الدنا اطول من الأنزيم السابق، اما درجة فعاليته فتتراوح بين 70-80 درجة مئوية وله نشاط خاص في بناء النيوكليوتيدات يتراوح بين 35-100 نيوكليوتيدة في الثانية لكل جزيئة انزيم حيث يضيف القواعد عند النهاية 3-OH (Mourad وآخرون، 2010)، وتتألف جزيئة انزيم البلمرة هذا من سلسلة مفردة من الببتيد المتعدد Polypeptide Chain الذي يبلغ وزنه الجزيئي 95 كيلو دالتون لذلك عرفت الوحدة الانزيمية One Unit على أنها كمية الأنزيم اللازمة لسحب 10 نانومول من التركيب الكلي للنيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات dNTPs من خليط التفاعل وتحويلها الى الدنا قالب القابل للترسيب خلال 30 ثانية وبدرجة حرارة 75 مئوية تحت ظروف التفاعل المثلى (أبو الجدايل، 2014) .

4-2-7-2 البادئ The Primer

وهو تسلسل من القواعد النروجينية على شريط قصير من الـ DNA يتراوح طوله بين 20-25 نيوكليوتيدة و المكمل لجزء الـ DNA المراد تضخيمه من الحامض النووي ويكون على نوعين هما امامي Forward كما في البادئ (CCGAATGGGATGC) ، وخلفي Reverse كما في البادئ (GGCTTACCCTACG) (التركي، 2010) ، و يعرف البادئ ايضا بأنه قطعة صغيرة من الدنا DNA والرنا RNA ترتبط بقالب شريط الدنا المفرد الشريط عند النهاية 3- المحتوية على مجموعة الهيدروكسيل OH الضرورية لبدأ عمل أنزيم بلمرة الدنا ، وهناك عدة أنواع من البوادئ التي تختلف في طبيعتها باختلاف نوع المؤشرات فقد تكون ذات تسلسلات عامة Universal يمكن استخدامها مع جينوم الكائنات الحية كافة وقد تكون هذه البادئات مصممة بشكل خاص لتتعرف على موقع متخصص وموزع بشكل عشوائي داخل الجينوم (Albert و Fenyo، 1990) ، وقد يصمم

البادئ بوجود تسلسل معين في تركيبه كتلك البوادي المستخدمة في تحليلات تقنية الـ AFLP (أبوالجدايل، 2014) ، لذلك عندما يتم تصميم البوادي يجب التعرف على القواعد النتروجينية في المنطقة المجاورة لجزء الدنا المراد تضخيمه لكي يتم تصميم البادئ الملائم فضلا عن ان الطرف الآخر للجزء المراد تضخيمه يحتاج الى بادئ آخر ، اذ ان التضاعف يوجد بالتحديد في جزء الـ DNA الواقع الذي يقع بين البادئين (القرةغولي، 2013) ، أما أهم النيوكليوتيدات التي يجب ان نوفرها في الأنبوبة التي يتم فيها تضاعف الدنا في اثناء تفاعل الـ PCR والتي يتم بناء الأشرطة الجديدة منها فهي:

1:Deoxy Thymidine Triphosphate (dTTP)

2:Deoxy Cytosine Triphosphate (dCTP)

3:Deoxy Adenosine Triphosphate (dATP)

4:Deoxy Guanosine Triphosphate (dGTP)

(كبهوار، 2007) .

5-2-7-2 Buffer Solution : المحلول المنظم

وهو المحلول الذي يحافظ على قيمة رقمه الهيدروجيني PH من التغيرات الناتجة عن اضافة حامض أو قاعدة اليه أو عند تخفيف المحلول الى درجة معينة ، ويقوم هذا المحلول بتنظيم عمل انزيم البلمرة والمحافظة على نشاطه لذلك فقد اصبح هناك انواع عديدة من هذا المحلول بحسب نوع الانزيم المستخدم ، وتختلف معظم المحاليل المنظمة من حيث المكونات الاساسية لها مثل كلوريد المغنسيوم $MgCl_2$ بتركيز 50 ملي مولر وكلوريد البوتاسيوم KCl_2 بتركيز 1.5 ملي مولر والترس الحامضي Tris-HCL بتركيز 100 ملي مولر، اما الرقم الهيدروجيني PH للمحلول المنظم فانه يساوي 8.3 فضلا عن 0.1% حجم/وزن من الجلاتين ليصبح المحلول بقوة X10 ويتم تخفيفه اثناء تحضير التفاعل الى X1 (Coen و Kramer، 2001) ، ومن الأمور المهمة التي يجب ملاحظتها في عمل المحلول المنظم هو ان تركيز الأملاح التي توجد ضمن مكوناته تؤثر على قدرة التحام البادئ بالدنا القالب DNA Template فضلا عن انه يؤثر بشكل كبير جدا على درجة حرارة تفكك الـ DNA في التفاعل الرئيس في اثناء عملية المسخ (التفكك) Denaturation (Chen و Janes ، 2002 ; Roux ، 2009).

6-2-7-2 مؤشرات دنا المايوتوكوندرى Mitochondrial DNA Markers

تمتلك المايوتوكوندرى مادتها الوراثية الخاصة بها والمستقلة عن DNA النواة ،اذ انها تكون قادرة على صنع بروتيناتها الخاصة بها نتيجة وجود جسيمات ريبية ضمن مادتها الأساسية وبالتالي يمكنها القيام بعملية الأستنساخ Transcription والترجمة Translation لجينات الـ DNA المشفر بدقة عالية (Becker وآخرون، 1996)، ويتميز DNA المايوتوكوندرى بانه جزء صغير وحلقي يوجد في المادة الأساسية Matrix وهناك نسخ عديدة منه في الخلية الواحدة ويبلغ طوله عند الانسان حوالي 16.500 bp (Zhang و Hewitt، 1996)، ويحتوي الدنا المايوتوكوندرى mtDNA في الحشرات على 37 مورثة مسؤلة عن الوظائف الاساسية التي تقوم بها المايوتوكوندرى اذ تؤمن 13 مورثة منها التعليمات الخاصة لصنع الأنزيمات التي تدخل في تفاعلات الفسفرة التأكسدية بينما تزود المورثات الباقية التعليمات اللازمة لصنع الانماط المختلفة من الـ RNA الناقل tRNAs والـ RNA الريبوزي (الرايبوسومي) rRNAs (Lopez، 1994)، يستخدم DNA المايوتوكوندرى وبصمته الوراثية في الدراسات التصنيفية والبحوث المستخدمة في مجال التشخيص الوراثي للكائنات الحية والأدلة الجنائية Forensic (Chandra وآخرون، 2006) ، وقد أكد العديد من الباحثين ومنهم Boore و Brown (1998) ان جينوم المايوتوكوندرى Mitochondrial genome هو أهم وأكثر المؤشرات الوراثية الغنية بالمعلومات الوراثية الخاصة بجميع الكائنات الحية، وقد كان أول اكتشاف لدنا المايوتوكوندرى mtDNA كمؤشر جزيئي ذو فائدة كبيرة في الكثير من المجالات الحياتية والعلمية اواخر عام 1970 الى ان جاء في الأونة الأخيرة اختراع تفاعل البلمرة المتسلسل PCR كرد فعل للتكنولوجيا الحديثة (Saiki وآخرون، 1985)، ان الاستخدام المستمر لدنا المايوتوكوندرى في تفاعل البلمرة المتسلسل عزز ووضح الكثير من الدراسات التطورية Evolutionary Studies واكتشاف تسلسل يشبه المايوتوكوندرى في الجينوم النووي للكثير من الحيوانات، في نفس الوقت الذي كان فيه تسلسل النواة له أهمية بالغة كاداة جزيئية تجمع بين الدراسات الجينية المختلفة كدراسة النشوء والتطور للمجتمعات السكانية المتنوعة بشكل مفصل (Zhang و Hewitt، 1996) ، وقد أكد Powell (1994) انه في العقدين الماضيين من القرن العشرين كان لأكتشاف أثنين من الأبتكارات العلمية الحديثة وهما اكتشاف تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل والجمع بينها وبين مؤشرات دنا المايوتوكوندرى mtDNA mrkers تأثير كبير على الدراسات الجينية الجزيئية للسكان وبخاصة أنها تؤثر في البيولوجيا التطورية للحيوان، ان الخصائص والمميزات التي يمتلكها دنا المايوتوكوندرى mtDNA مع استخدام تقنية الـ PCR مكنت علماء الأحياء من دراسة المجتمعات السكانية لأي نوع من أنواع الحيوانات الأبتدائية وضمن الحيوانات متعددة الخلايا حقيقية النواة Metazoa دراسة جزيئية فعالة (Avise وآخرون، 1987 ; Ballard و Kreitman، 1995)، يمثل الدنا

الميتوكونديري mtDNA نسبة قليلة جدا من حجم الجينوم ، مع ذلك فقد كان الى حد بعيد يمثل المؤشر الجزيئي الوراثي الأكثر معرفة واستخداما من قبل العلماء والباحثين في مجال دراسة التنوع الجزيئي للحيوانات على مدى العقود الثلاثة الماضية (Avisé وآخرون ، 1987)، ومن المجالات الأخرى المهمة التي اعتمدت فيها مؤشرات دنا الميتوكونديريا بكثرة هو مجال الوراثة السكانية Population genetics التصنيف او التقسيمات الجزيئية Molecular Systematics بحيث كل دراسة جزيئية لأنواع الحيوانات خاصة بدنا الميتوكونديريا تكون معتمدة بشكل كبير على النمط الفردي Haplotyping للنوع في كل مرحلة لذلك فان جين الميتوكونديريا COI أستخدم في الوقت الحاضر كاداة موحدة للتشخيص والتصنيف الجزيئي Molecular Taxonomy في معظم الدراسات الجزيئية (Ratnasingham و Hebert ، 2007)، اما اهم المميزات التي يمتلكها الدنا الميتوكونديري mtDNA والتي لفتت أنظار العلماء و الباحثين واهتمامهم في علم الوراثة الجزيئية وجعلت مؤشرات دنا الميتوكونديريا ذات أهمية كبيرة جدا في مجال الدراسات التطورية Evolutionary Studies وبحسب ما أكد عليها (Zhang و Hewitt ، 1996)، فهي :

- 1: حجم الجينوم يكون صغير جدا وتركيبه الحامض بسيطة ومنظمة .
- 2: يوجد في كل مكان من جسم الكائن الحي وفي جميع الحيوانات تقريبا .
- 3: عدد نسخ الحامض تكون كبيرة جدا وبالتالي من السهل عزله او استخلاصه .
- 4: يوجد النمط الفردي الفعال في تسلسل الحامض النووي DNA .
- 5: يكون انتقال الجينات الوراثية فيه عن طريق الأم عدا بعض الاستثناءات القليلة أو النادرة .
- 6: الغشاء الخارجي وتطور مناطق الميتوكونديريا وببطء حركة الـ DNA فيها يسمح للبواقي اتمام دراسات النشوء والتطور على اعلى المستويات التصنيفية المختلفة للكائنات الحية .
- 7: عدم وجود اعادة ترتيب للأنترونات في تسلسل الدنا غير المشفر Non-coding DNA في الميتوكونديريا، وقد ذكر Zhang و Hewitt (1996) أيضا في نفس الدراسة أعلاه ان هناك صعوبات عامة وخاصة في استخدام دنا الميتوكونديريا mtDNA كمؤشر جزيئي وهذه الصعوبات ناتجة عن عدة أسباب يمكن ايجازها بما يلي :

- 1: انتقال الصفات الوراثية عن طريق الأم فقط .
 - 2: طول تسلسل الحامض النووي غير متساوي والنسيج الذي يوجد فيه يكون غروي القوام .
 - 3: التغيرات الجزيئية فيه غير ثابتة على مدار الساعة .
 - 4: تشابه التسلسل النكلوتيدي للنواة والميتوكونديريا .
- ان من اهم الأسباب التي دعت العلماء والباحثين كافة لأعتماد دنا الميتوكونديريا كمؤشر جزيئي معروف جيدا هو سهولة تضخيم الجينات الموجودة فيه وهي (COI, COII, CBI, CB3) لأنه يظهر

نسختها متعددة من الجينات في الخلية فضلا عن حفظ محتوى جينات الماييتوكوندريا في الحيوانات والأنثرونات تكون فيه مزدوجة والمناطق بين الجينات Intergenic Regions تكون قصيرة جدا وواضحة (Gissi و Pesole، 2008)، أما بالنسبة لعائلة الذباب المعدني Calliphoridae فقد أجريت دراسات جزيئية عديدة على دنا النواة ودنا الماييتوكوندريا في بعض البلدان لمعرفة نشوء وتطور واصل الأنواع التي تنتمي إليها ومعرفة مدى التقارب والتباعد الوراثي بين أفراد النوع الواحد الذي يعود لنفس الجنس ومنها الدراسة التي قام بها Ready وآخرون (2009) لدراسة التغيرات الوراثية الجزيئية بين المجتمعات السكانية المختلفة لذباب الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* في عدد كبير من دول الشرق الأوسط باستخدام مؤشرات دنا النواة ودنا الماييتوكوندريا (CBI, CB3, EF1)، إذ ثبت أن استخدام هذه المؤشرات أعطى بيانات توضح بدقة التغيرات والعلاقة الوراثية بين أنواع الجنس الواحد في الحشرات، أن استخدام مؤشرات دنا الماييتوكوندريا وخاصة المؤشر (CBI) أدى إلى معرفة التغيرات الوراثية الجزيئية بين أنواع الذباب الحلزونية داخل وخارج مكان الدراسة التي أجريت في اندونيسيا وجزيرة Island القريبة منها والتي قام بأجرائها Esseghir وآخرون (2000).

7-2-7-2 طريقة التسلسل التتابعي Sequencing Method .

تعد الطريقة التي يتم من خلالها إيجاد التسلسل التتابعي للدنا DNA من أدوات التحليل الوراثي المهمة جدا والتي تستخدم في البحوث الوراثية الجزيئية المتقدمة، إذ ثبت أنها من أهم العوامل المساعدة في نجاح تلك البحوث لأنها تعطي تفسيراً علمياً لنتائج حدوث أي ظاهرة على مستوى القواعد النيتروجينية بشكل واضح ودقيق جدا فضلا عن أنها توفر معلومات واضحة لمعرفة تطور الجينات في الماييتوكوندريا (Pons وآخرون، 2006)، وقد عرف Olsivk وآخرون (1993) التسلسل التتابعي للدنا بأنه عملية تحديد ترتيب دقيق للنوكليوتيدات داخل الحامض النووي الـ DNA، إذ يستخدم هذا التسلسل بشكل واسع في كثير من الأبحاث البيولوجية والطبية والتشخيص الطبي فضلا عن استخدامه في علم الأحياء الجزيئي وعلم الفيروسات، لقد أصبح التسلسل التتابعي للـ DNA أسهل وأسرع من حيث الحجم بحيث استخدم لتحديد تسلسل الجينات المفرد وراثيا في المناطق الكبيرة (Pettersson وآخرون، 2009)، أن معرفة التسلسل التتابعي للدنا DNA وفهمه يساعد بشكل كبير في الحصول على معلومات أو بيانات دقيقة عن المراتب التصنيفية للحشرات كافة في وقت واحد كذلك فإن استخدام طريقة التسلسل التتابعي للدنا DNA تظهر العديد من الفروق بين أفراد النوع الواحد والأنواع المختلفة من الحشرات مما يساعد في دراسة هذه الأنواع بسهولة تامة (Sperling وآخرون، 1994)، وقد ذكر جواد (2012) أن الباحثين استطاعوا في عام 2000 الانتهاء من إيجاد التسلسل التتابعي لجينوم ذبابة الفاكهة وبحلول عام 2002 اكتمل تحليل جينوم

البعوض الناقل الأكبر للملاريا وهذا دليل على ان ايجاد التسلسل التتابعي للجينوم زاد من قابلية العلماء والباحثين على تشخيص الجينات المفيدة للاستخدام في التحوير الوراثي للحشرات ذات الأهمية الاقتصادية أيضا، وقد درس Barr وآخرون (2012) التسلسل التتابعي للجين COII من دنا الميتوكوندريا mtDNA الذي بلغ طوله 650bp في ثلاثة أنواع معينة من جنس ذبابة الفاكهة *Ceratitis* (Macle, 1829) التي جمعت عيناتها من افريقيا وخصوصا من غينيا حيث وجدوا تشابها كبيرا وتاما في حالة استخدام هذا الجين بين *C.caetrata* و *C.capitata* (Wiedemann) ولكن عندما تمت مقارنة احد هذين النوعين وهو *C.capitata* مع النوع *C.cosyra* (Munro) بالاستناد الى طريقة PCR-RFLP توصلوا الى ان النتائج الأتية من أيجاد التسلسلات التتابعية ملائمة كثيرا للتحليل الوراثي الكمي في النوع الواحد وكذلك بين الانواع التابعة لجنس *C.capitata* وقد ذكر Singh وآخرون (2011) في دراسة التسلسل التتابعي للدنا في عائلة الذباب الأزرق Calliphoridae ومنها جنس الذبابة الحلزونية *Ch.megacephala* (Fab.) و *Ch.rufifacies* (Macquart) انه من مجموع 64 تسلسلا نيوكلوتيديا لخمس وعشرين جنسا تنتمي الى تلك العائلة التي شملتها الدراسة تم تضخيم اربع جينات احدها لدنا الميتوكوندريا mtDNA وهو الجين COI الذي كان عدد القواعد له 1435bp والجينات الثلاثة الباقية لدنا النواة ومنها الجين CPS، اذ تم التضخيم باستخدام بادئات متخصصة Specific Primers ونظام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Protocol، اذ وجد ان تسلسل الجينات لها مطابق لما موجود في بنك الجينات بالنسبة لعينة الذبابة الحلزونية للعالم القديم التي تحمل التسلسل العالمي في بنك الجينات وهو (AF295548.a)، ومن الدراسات والأبحاث الجزيئية التي تم فيها استخدام طريقة التسلسل التتابعي للدنا هي دراسة التنوع الجيني Haplotype لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* والتي قام بأجرائها Hall وآخرون (2009) في كل من العراق وايران وعمان والمملكة العربية السعودية والتي اكدوا فيها ان التسلسل في ازواج القواعد النتروجينية الخمسة لهذه الحشرة تكون متشابهة عند مطابقتها مع بنك الجينات عدا اربعة مواقع Loci في الجين Cytochrome b(CB) الذي اخذ من دنا الميتوكوندريا نتيجة لحدوث طفرات حذف Deletion واستبدال Insertion بين القواعد في شجرة التقارب لهذا النوع من الذباب، ان غياب التنوع الجيني في الحامض النووي الميتوكوندري mtDNA لذبابة الدودة الحلزونية المتواجدة في بعض البلدان ومنها أندونيسيا والعديد من الدول الأفريقية أكتشف عن طريق دراسة تسلسل الحامض النووي DNA لهذه الحشرة في تلك البلدان وبالتالي أعطت تلك الدراسة دليلا قاطعا على ان نقل الماشية وشحنها له علاقة بانتشار هذا النوع في الأماكن التي تنقل اليها تلك الحيوانات (Rajapaksa و Spradbery، 1989 ; Spradbery، 2001).

2-7-2-8 الدراسات السابقة المتعلقة بالوراثة الجزيئية لذبابة الدودة الحلزونية

Molecular genetic studies of the Old World Screwworm fly

نظرا لعدم وجود دراسات سابقة في مجال الوراثة الجزيئية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* في العراق لذا تعد هذه الدراسة هي الأولى من نوعها في العراق باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR للمقارنة بين المجتمعات السكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم في العراق التي تم جمع عينات منها من بعض مناطق شمال ووسط وجنوب العراق لمعرفة مدى التنوع الوراثي بينها في مناطق الدراسة الثلاثة، وحتى يتمكن من تطبيق تقنية الحشرات العقيمة Sterile Insect Technique لمكافحة هذه الافة الحشرية والحد من خطورتها بهذه التقنية، وقد تم اجراء بعض الدراسات الوراثية الجزيئية في هذا المجال من قبل عدد من الباحثين في بعض البلدان باستخدام تقنية الـ PCR فقد قام Hall وآخرون (2001) باجراء دراسة وراثية جزيئية لجينات هذا النوع من الذباب لمعرفة تأثير العامل الجغرافي في حدوث التغيرات الوراثية لتسلسل الجينات في DNA الماييتوكوندرية mtDNA لقارتي افريقيا واسيا من خلال تحليل النشوء والتطور لأصل الحشرة في ثلاثة ازواج من القواعد النتروجينية الموجودة في شريط دنا الماييتوكوندرية والذي يبلغ طوله 270bp، اذ تم في تلك الدراسة استخدام جين Cytochrom b وخلصت الدراسة الى ان نسبة التغيرات الوراثية بينها والتي تراكمت خلال الـ 10000 سنة الماضية (عصر الهولوسين) لنشوء وتطور هذه الأنواع تتراوح بين 1.8-2.5% ، وبما ان دنا الماييتوكوندرية mtDNA يظهر التغيرات أو الاختلافات بين الجينات البشرية التي اتضح عند دراستها جزيئيا في هذه الحشرة ان نسبتها تساوي حوالي 2.3% لكل مليون سنة (Brower، 1994) ومن الدراسات الأخرى في مجال الوراثة الجزيئية للذبابة الحلزونية الدراسة الشاملة والموسعة التي أجراها Ready وآخرون (2009) والتي كانت تهدف الى معرفة العلاقة الوراثية الجزيئية بين عدد كبير من المجتمعات السكانية المختلفة و المنفصلة جغرافيا في قارتي اسيا وافريقيا من خلال اخذ عدد كبير من عينات هذه الحشرة واستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل، وقد تم في هذه الدراسة تمييز جينين لنواة الذبابة الحلزونية وهما EF.1gene 401bp (Ji و Danforth، 1998 ; Essegir وآخرون، 2000) ،والجين White gene 617 bp فضلا عن جينين من الماييتوكوندرية وهما CBI,761bp و CB3,338bp ، وقد تم في بعض الدراسات الوراثية الجزيئية الحديثة اجراء أختبارات وراثية جديدة على أنواع مختلفة من الحشرات ومنها الذبابة الحلزونية للعالم القديم لمعرفة الاختلافات المؤثرة بين جينات دنا الماييتوكوندرية mtDNA حيث ركزت مجموعات الدارسة في هذا المجال من الوراثة الجزيئية للمجتمعات السكانية على مناطق محددة ومنفصلة جغرافيا في الشرق الأوسط مثل عمان وايران والعراق في الخليج العربي بالإضافة الى جزر اندونيسيا في جنوب شرق اسيا

والتي تتواجد فيها ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم بكثافة سكانية مرتفعة، ولأن وتأثير الذبابة الحلزونية فيها يسبب خسائر اقتصادية كبيرة جدا (Al-Izzi وآخرون ، 1999 ; Wardhana وآخرون ، 2003) ، ان علم الوراثة الجزيئية للمجتمعات السكانية هو العلم الذي يساعد في معرفة وفهم التداخلات والعلاقات بين أنواع الكائنات الحية ومنها الحشرات لذلك فانه يساعد بشكل كبير في نجاح تطبيق تقنية الحشرات العقيمة SIT لمكافحة أنواع مختلفة وضارة من الآفات الحشرية (Spradbery ، 1994) ، ان تصميم البوادي التي تعد اساس عمل تقنية الـPCR في الدراسة الوراثية الجزيئية لذبابة الدودة الحلزونية يعتمد على تسلسل القواعد النروجينية وعدد المواقع في شريط دنا النواة والميتوكوندريا لكل جنين في الطرف 3- (Hall وآخرون، 2001)، وقد أجريت دراسة حديثة عن التنوع الجيني الجزيئي لذبابة النوع *Ch.bezziana* في بعض بلدان الخليج العربي كالعراق وعمان والمملكة العربية السعودية بالإضافة الى ايران باستخدام احد جينات دنا الميتوكوندريا mtDNA وهو الجين Cytochrome b(CB) لأيجاد الاختلاف والتغاير في أزواج القواعد النروجينية، وقد أظهرت الدراسة وجود أختلاف أربع نسخ من الجينات المتنوعة والمختلفة للمناطق المدروسة (Hall وآخرون ، 2009) ، وقد ذكر Ready وآخرون (2009) عند إجراء الدراسة الوراثية الجزيئية على الذبابة الحلزونية للعالم القديم باستخدام الجين CB3 338bp في منطقة الخليج العربي وايران ان هناك خمسة ازواج من القواعد النروجينية المختلفة ثلاثة مسجلة سابقا في منطقة الخليج، كما سجلت حالتين من التغاير الوراثي الجزيئي لجين الميتوكوندريا CB3-bezz17 والجين CB3-bezz19 في العراق والسعودية، وكذلك تم أيضا في نفس الدراسة التعرف على التسلسلات القصيرة لجين الميتوكوندريا CB3 279bp ومنها التغاير أو التنوع بين الجين CB3-bezz1012 والجين CB3-bezz1013 (Knips ، 2004) .

3-7-2 التشخيص بالاعتماد على المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه

The identification depending on the geometric morphometric of wing

يعرف المقياس الهندسي للشكل والتركيب Geometric Morphometric بانه العلم الذي يهتم بدراسة التحليل الكمي لشكل وحجم جميع الكائنات الحية وخاصة تحليل سجلها الاحفوري وتأثير التغايرات المتطورة والحديثة على هيئة الشكل وكذلك الأختلافات التي توجد بين كل العوامل البيئية من جهة وشكل الكائن الحي من جهة أخرى، بالإضافة الى ذلك فان هذا العلم يستخدم أيضا في الدراسات الوراثية الكمية ومنها دراسة التغاير الوراثي الكمي بين المجتمعات السكانية المنفصلة جغرافيا والتي تعود لأنواع من الحشرات تنتمي لنفس الجنس وكذلك دراسة العلاقات التطورية بين الكائنات الحية ،اذن فان الهدف الأساسي من استخدام المقياس الهندسي للشكل والتركيب هو الاختبار

الأحصائي لعدد من الفرضيات الخاصة بالعوامل المؤثرة على شكل الكائن الحي (Marcus ، 1990)، كذلك يمكن تعريف المقياس الهندسي للشكل والحجم بأنه دراسة كمية بيولوجية للتباين والتغاير في الأشكال الأحيائية وغير الأحيائية Biotic and abiotic forms وهذا دليل على أن دراسة الوراثة الكمية تقدم الكثير من الدقة المطلوبة في الوصف والمقارنة بين الأشكال بالاعتماد على تأثير العامل الجغرافي كذلك فإن تطبيق تقنية المقياس الهندسي لها أهمية كبيرة في مجال الأبحاث التي تعتمد على المقارنة بين الأشكال التي تعود لنفس النوع والمنفصلة جغرافيا وكذلك دراسة انماط النمو للأحياء المتغيرة باستمرار Heterochrony (Macleod ، 2002)، أن عمل المقياس الهندسي يقوم أساسا على تحليل البيانات الخاصة بالشكل الهندسي (الشكل والحجم) باستخدام المعالم Landmarks أو المخطط البياني القائم بدقة عالية جدا (Bookstein ، 1991 ؛ Rohlf و Marcus ، 1993)، وقد ذكر Silveira وآخرون (2006) أن واحدة من أكبر المشاكل التي تواجه الباحثين هي عدم وجود المتخصصين في مجال التصنيف لتشخيص العينات، وهذا الوضع بدأ ينحسر تدريجيا عن طريق تطوير مفاتيح الصور الفوتوغرافية والتي يحتمل استخدامها من قبل غير المتخصصين في مجال التصنيف (Nemesio ، 2010)، وبالتزامن مع استخدام مثل هكذا أساليب في التشخيص وأيجاد التغاير استخدمت في الوقت الحاضر أدوات أخرى قريبة ومعروفة وتعطي نتائج دقيقة و تفل إلى حد كبير من إعباء العمل للقائمين في مجال التصنيف وهي استخدام الصفات الكمية الطويلة Quantitative traits long في تشخيص أنواع الحشرات ومن هذه الصفات شكل وتركيب الجناح وهذا يتطلب استخدام تقنية المقياس الهندسي (Ruttner وآخرون ، 1978 ؛ Ruttner ، 1988 ؛ Francoy وآخرون ، 2006 ، 2008 ، 2009 ؛ Tofilski ؛ Bloch ، 2008) ، إذن فإن استخدام المقياس الهندسي يشير بشكل واضح إلى التحليل الكمي لأنواع الكائنات الحية وهو مفهوم يشمل الحجم المترى والشكل معا ، إذ يتم من خلال استخدامه إجراء التحليلات الكمية المظهرية على هذه الكائنات وهو مهم أيضا في تحليل السجل الأحفوري لها وتحليل تأثير الطفرات الوراثية على شكل الأنواع وكذلك له أهمية كبيرة في دراسة تغايرات الشكل الناتجة عن تأثير عوامل البيئة فضلا عن استخدامه في تقدير المؤشرات الكمية وقياس الصفات التطورية مثل المقياس الهندسي الوراثي الذي يقيس تطور الجنين .

2-1-3-7-2 أنواع المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه

2-1-3-7-2 المقياس الهندسي التقليدي Traditional Geometric Morphometric

يقوم هذا النوع من المقياس الهندسي بتحليل الطول والعرض والنسب والزوايا (Marcus، 1990) وبصورة عامة فان بيانات الشكل المظهري Morphometrics التقليدية هي قياسات للحجم، ان من عيوب استخدام قياسات الحجم هو ترابط معظم الأعضاء الى حد كبير ونتيجة لذلك فان عدد المتغيرات المستقلة يكون قليلا جدا على الرغم من القيام بالعديد من القياسات على سبيل المثال فان طول عظم الساق يختلف عن طول عظم الفخذ كذلك الأختلاف بين طول عظم الزند وعظم العضد وحتى قياسات الرأس ايضا، مع ذلك فان البيانات المورفولوجية التقليدية ذات اهمية كبيرة سواء كانت مطلقة او نسبية كما هو الحال في دراسة النمو والحجم نظريا مثل كتلة الجسم والأطراف ومساحة المقطع العرضي والطول فضلا عن عدد من الدراسات الوظيفية الشكلية بالرغم من ذلك فان هذا النوع من القياسات يحتوي على العدد القليل من المعلومات الخاصة بالتوزيع المكاني للمتغيرات الشكلية في جميع اجسام الكائنات الحية، ان لهذه القياسات فائدة كبيرة في تحديد التغيرات التي تطرأ على جسم الانسان نتيجة لتأثير بعض الملوثات ومن الأمثلة على المؤشرات المستخدمة مع هذا النوع من القياسات المؤشر الكبدي ومؤشر عوامل الحالة لأعضاء جسم الانسان والحيوان (على حدا سواء) (Shakumbila، 2014).

2-1-3-7-2 المقياس الهندسي المعتمد على المعالم Landmarks-Based Geometric Morphometric

يعتمد هذا النوع من المقياس الهندسي على جمع المعلومات المكانية الآتية من الاحداثيات أو النقاط، اذ ان المعالم تكون بمثابة اماكن تشريحية مستقلة ومتشابهة في كل الافراد التي يجري عليها التحليل كما هو الحال في تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة في جناح اي حشرة وهذه التقاطعات تمثل جميع المعالم او النقاط التي وضعت عليها وتعد هذه النقاط متشابهة في جميع النقاط المدروسة فضلا عن ذلك فان الأبحاث والدراسات في مجال الوراثة الكمية التي تستخدم هذا النوع من المقياس تحتوي على بيانات تقليدية ثنائية الابعاد 2D ولكن نتيجة للتطور التكنولوجي والتقني في مجال التصوير أصبحت تلك الدراسات تمتلك بيانات ثلاثية الابعاد 3D ذات درجة عالية من الوضوح والتي أصبح استخدامها بشكل واسع جدا حتى مع اصغر التراكيب كالأسنان وغيرها من التراكيب المختلفة (Singleton وآخرون، 2011)، ان عملية توفير وصف شامل وموسع وواضح لأي شكل من خلال أيجاد معالم معينة تكون صعبة جدا لأن عينات الحفريات لايمكن العمل بها كونها تتلف بسهولة تامة وذلك لان كل المعالم يجب ان تكون موجودة في جميع عينات الدراسة

وبالرغم من ان احداثيات المعالم تكون مفقودة أحيانا لكن يمكن تقدير بيانات كل فرد او اعطاء تخمينات لكل البيانات تكون مقاربة جدا وملائمة وواقعية نوعا ما لتلك البيانات التي توضع بشكل دقيق وواضح على تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة في صور الاجنحة بعد اتمام عملية تصويرها بواسطة مجهر رقمي مخصص لذلك، ان الأحداثيات أو المعالم Landmarks التي يعتمد عليها هذا النوع من المقياس الهندسي يمكن ان تصنف الى ثلاثة أنواع أساسية: الأول منها يسمى المعالم محلية الموقع أو يسمى في بعض الأحيان الهياكل المغلقة أو النقطة القريبة كما هو الحال في تقاطع العروق الطولية مع العروق المستعرضة في أجنحة الحشرات والمحاطة بالأنسجة من جميع الجوانب ،اما نوع المعالم الثاني فهو مختلف تماما عن النوع الأول ويسمى بالنقاط البعيدة عن الأحداثيات او المعالم ،اذ تكون كل نقطة منه بعيدة عن الأخرى كما هو الحال في نهايات العروق الطولية لجناح اي حشرة ،اما النوع الثالث فانه وسط بين نوعي المعالم الأول والثاني ،اذ يشمل هذا النوع من المعالم نقاط معينة مثل قمة الهيكل أو الموقع الأقرب أو الى أبعد حدود التقوس وتعرف معالم هذا النوع في أحيانا معينة بانها معالم محلية الموقع غير أنها لا تحاط بالأنسجة من جميع الجوانب وهذه علامة مميز لها (Bookstein، 1991)، وقد وجد نوع آخر من المعالم يضاف الى الأنواع الثلاثة السابقة الذكر يسمى شبه المعالم Semilandmarks وهو عبارة عن احداثيات أونقاط توجد على طول المنحني حيث ان هذا المكان العشوائي للنقاط يزودنا بمعلومات أو بيانات مهمة عن التقوس الذي يوجد في الشكل ثنائي الأبعاد 2D (Zelditch وآخرون، 2008)، أو بيانات متعددة ودقيقة عن الشكل ثلاثي الأبعاد 3D (Mitteroecker و Bookstein، 2008) .

3-1-3-7-2 المقياس الهندسي المعتمد على التراكب Procruste-Based

Geometric Morphometric

هذا النوع من المقياس الهندسي يتم فيه مقارنة الاشكال وكذلك إزالة كل المعلومات غير الشكلية من جميع معالم الأحداثيات حيث ان الشكل لا يتغير ولايبدل بعمليات النقل Translation او التقييس Scaling او الدوران Rotation (Kendall، 1977) ، وهناك طرق عديدة ومتنوعة لفصل هذه العمليات ومن تلك الطرق هو تثبيت نقطتين لأحداثيات مختلفة هي (0.0) و (0.1) وهذه تمثل الخط الأساس ،اذ تنتقل جميع الأشكال الى نفس الموقع وبعده تثبت نقطتين للأحداثيات وهما (0.0) والنقطة (0.1) ،اما الخطوة الثانية فيتم فيها أدراج جميع الأشكال على امتداد خط الأساس،اما عملية الدوران فتتم في الخطوة الثالثة اذ يتم تدوير جميع الاشكال بصورة تامة وميسرة وواضحة (Bookstein، 1991) ، وقد اكد معظم الباحثين على ان الطريقة الملائمة والبديلة لفصل العمليات الثلاثة اعلاه هي طريقة التراكب Procrustes Superimposition وخلال هذه الطريقة يتم نقل مركز الأشكال الى النقطة (0.0) حيث ان المركز X هو المعدل العام لاحداثيات X للمعالم ومركز

Y هو المعدل العام أيضا للاحداثيات Y لمعالم جميع الأفراد، وبعد ذلك تدرج جميع الأشكال بانسيابية تامة الى وحدة الحجم المركزي، ويمكن اعطاء تعريف دقيق و مبسط للحجم المركزي بانه الجذر التربيعي للمجموع الكلي لمربعات المسافات التي تعود لكل معلم، وقد تبين ان التحليلات التي تتم بطريقة التراكب تواجه عدد من التحديات واحدى هذه التحديات هو استخدام هذه الطريقة معيار المربعات الأقل للحصول على عملية التدوير المثالي وبالتالي فان التباين الذي يوجد في اي معلم مفرد يكون موجودا أيضا في المعالم الأخرى وهذا يسمى بالتأثير Pinocchio ومن الطرق الأخرى المستخدمة في التراكب هي التراكب الذي يأخذ عينة للتغاير في المعالم المثبتة على الأجنحة (Rohlf و Slice ، 1990 ، Walker ، 2000) .

4-1-3-7-2 Otuline-Based Geometric المقياس الهندسي المعتمد على المخطط Morphometric .

يعد هذا النوع من المقياس الهندسي أداة قوية وفعالة في تحليل الشكل وذلك لعدة أسباب منها كونه متفوقا بدرجة كبيرة على المقاييس الهندسية التقليدية الأخرى (Bookstein ، 1991 ، Rohlf و Marcus، 1993؛ Bookstein ، 1997 ، Adams وآخرون، 2004) ، فضلا عن كل ذلك فانه البديل الجزيئي المفيد لدراسة أو وصف أو تمثيل الأنواع في المجتمعات السكانية للكائنات الحية، ومن الأمثلة على استخدام هذا النوع من المقياس هو استخدامه في دراسة التباين المظهري لأنواع من النحل المرتبطة ارتباطا وثيقا والعائدة الى أجناس قبيلة النحل *Euglossine bees* (Roubik ، 2004) ، وقد أستخدمت الكثير من الطرق في حساب كمية المخطط التي توجد ضمن هذا النوع من المقياس الهندسي ومنها الطرق القديمة مثل تطابق المنحنى متعدد الحدود (Rogers ، 1982) ، والطرق الأخرى هي تحليل كمي ودقيق لجميع المركبات الأساسية (Glassburn، 1995) ، اما أهم الطرق الحديثة التي تستخدم الآن في هذا المجال فهي مفهوم التحليل التناسبي فضلا عن مفهوم اخر وهو التحليل الأهلجي الشكل (Singleton وآخرون، 2011)، عن طريق استخدام اليد او المخططات البيانية المتتالية في الحاسوب، وعند إجراء استعراض للمفهومين في حساب كمية المخطط فقد وجد ان التحليل التناسبي للشكل يحتوي على عدد مناسب من أشباه المعالم في أوقات متساوية لمخطط الشكل (Ferson وآخرون ، 1985) ، بينما المفهوم الأهلجي هو مجموع الحد الأدنى لعدد المعالم من الأهلج الذي يجب ان يمثل الشكل (Schmittbuhl وآخرون ، 2007)، وقد وجد ان للمفهومين عددا من العيوب الواضحة للعيان وأهمها قابلية الطريقتين وحساسيتها على أحداث تغيير واضح في اي مخطط فضلا عن مقدرتهما على مقارنة النقاط والمعالم المتشابهة وكلا الطريقتين تحتاج الى وجود نقطة بداية تكون مكافئة لتنظيم كل عينة وهذه أحيانا تعد مصدرا للخطأ، والسبب في ذلك هو انه ليس جميع المتغيرات قيم مستقلة، ومن نقاط القوة في هاتين الطريقتين هو

أمكانية تطبيقها على المنحنيات المعقدة دون الرجوع الى تعريف نقاط تقاطع المركز حيث يؤدي ذلك الى أزاحة تأثير مكان الجسم بالاضافة الى جعل عملية التدوير سهلة جدا (Haines و Crampton، 2000)، وقد وجهت العديد من الانتقادات لطرق القياس التي تعتمد على المخطط كونها تترك التشابه في اي دراسة تستخدم فيها كما هو الحال في قدرتها على المقارنة بين مادة معينة تسمى Scapula و أي مادة أخرى (Zeldiach وآخرون، 1995)، اذ ان هذه المقارنة لايمكن ان تتم اذا حددت البيانات في احداثيات متشابهة بيولوجيا .

2-7-3-4 الدراسات السابقة المتعلقة باستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه في المقارنة بين المجتمعات السكانية المختلفة للحشرات

من خلال مراجعة المصادر المختلفة كالأبحاث والدراسات العلمية المحلية العديدة في مجال الوراثة الكمية للحشرات تبين ان الدراسات السابقة حول استخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه Geometric Morphometric للمقارنة بين المجتمعات السكانية لأي نوع من أنواع الحشرات التي يتم جمع عيناتها من مناطق جغرافية متعددة هي دراسات قليلة جدا ، وقد أجريت العديد من الدراسات والأبحاث العلمية العالمية في مجال استخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه لأنواع مختلفة من الحشرات ومنها الدراسة التي قام بها Jhonson وآخرون (2013) على أجنحة حشرة اليعسوب Dragonfly Wings التي توصل من خلالها الى نجاح تطبيق تقنية المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه وعند جمع البيانات وتحليلها احصائيا اكد على ان هذه العينات تعود لنفس النوع لأن الجناح يكون مسطحا والتقاطعات بين العروق الطولية والمستعرضة فيه تكون واضحة للعيان عند تثبيت المعالم Landmarks عليها، و تم استخدام تحليل المقياس الهندسي لشكل الأجنحة وتركيبها في دراسة التباين الوراثي بين اثنين من المجتمعات السكانية لحشرة عث التفاح *Scythris obscurella* رتبة حرشفية الأجنحة Lepidoptera عائلة Scythrididae من ناحية تأثير العوامل الجغرافية والأختلاف بين الأنواع العائدة لنفس الجنس من قبل كل من الباحثان Passerin و Roggero (2005) اذ أجريت الدراسة في منطقة جبال ووديان مجاورة للبحر في احدى المدن الأسبانية لمجموعة مكونة من 10 أنواع تعود لنفس جنس الحشرة، وقد تم في تلك الدراسة فحص التباين في الجناح الأيمن لكل عينة وخاص الأختلاف في شكل مقدمة الجناح وكانت النتيجة تشير الى ان التباين في شكل كل جناح مرتبط بالتباين الكلي في حجم جناح الحشرة، وقد قام Depto وآخرون (2006) بمقارنة شكل الجناح وتركيبه بين ثلاثة مجتمعات سكانية لنحلة العسل والتي جمعت عيناتها من افريقيا والمانيا وايطاليا وذلك باستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل وتركيب الجناح حيث توصلوا الى ان هناك تباين كبير بين المجتمعات السكانية لهذه الحشرة في تلك البلدان، كما درس Jorian وآخرون (2012) الأختلاف في شكل وحجم الجناح لعدد من

المجتمعات السكانية لذبابة الرمل *Phlebotomus papatasi* author name التي تنتمي الى (Diptera: Psychodidae) والتي جمعت عيناتها من شمال وجنوب جبال الأطلس في المغرب حيث اكدوا ان هناك فروق معنوية احصائية في شكل وتركيب الجناح بين المجتمعات السكانية التي تضم هذه الحشرة ، ومن الدراسات الأخرى والمهمة أيضا في هذا المجال الدراسة الأولية التي قام بها Hall وآخرون (2014) لتحديد التباين الوراثي في شكل الجناح وتركيبه بين المجتمعات السكانية لذبابة النوع *Ch.bezziana* (Diptera:Calliphoridae) عن طريق استخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه وبالأستفادة من نماذج أجنحة هذه الحشرة التي توجد في متحف التاريخ الطبيعي البريطاني في لندن والمثبتة على شرائح زجاجية Slides ،اذ توصلوا الى وجود تباين كبير في شكل الأجنحة وتركيبها عند المقارنة بين اثنين من المجتمعات السكانية المنفصلة جغرافيا لهذه الحشرة ، فضلا عن ذلك فانهم استنتجوا انه يمكن الاعتماد على بعض التباينات الطفيفة في التمييز بين المجتمعات السكانية ضمن النوع الواحد اذ ان هذه التباينات تكون ذات فائدة كبيرة في المقارنة عن طريق قياس أجنحة الذباب، اما اذا كانت الاختلافات بين الأنواع المدروسة غير موجودة لان التباينات غير واضحة للعيان عندها يتم الاعتماد على قياس زاوية انحناء جناح الحشرة، وقد ذكر Vasquez و Liria (2012) انه من حيث المبدأ لا يوجد فرق واضح بشكل جيد بين أجنحة الذكور والاناث مع ذلك يمكن التمييز بين اثنين من أنواع جنس *Chrysomya* في حالة استخدام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح في مجال دراسة الوراثة الكمية لهذه الحشرة،اما الدراسة التي قام بها Lyra وآخرون (2009) لأيجاد التباين بين نوعين من أنواع ذبابة الدودة الحلزونية للعالم الحديث وهما *Cochliomyia hominivorax* author name والنوع *Cochliomyia macellaria* أظهرت ان هناك فروقا معنوية احصائية في شكل الجناح وحجمه بالرغم من التشابه الكبير في الشكل المظهري بين ذكور واناث هذه الأنواع والذي كان أكثر وضوحا في النوع الثاني لهذه الحشرة، كما درس Henry وآخرون (2010) الشكل الظاهري للجناح الأيمن في البعوضة *Aedes aegypti* (Linn.) التي جمعت عيناتها من ثلاث ولايات أمريكية هي كولومبيا وفلوريدا وجزر هاواي فضلا عن مدينة بانكوك في تايلاند بأستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه فتوصلوا الى ان هناك اختلافا كبيرا وواضحا في الحجم المركزي للجناح في الذكور والاناث معا وبحسب كل منطقة من المناطق التي جمعت منها عينات هذه الحشرة، وكذلك أجريت دراسة بيولوجية موسعة وحديثة من قبل Francoy وآخرون (2012) حول أستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه المعتمد على المخطط Outline-Based Geometric Morphometric في التمييز بالطرق المظهرية بين أنواع من النحل ينتمي لجنس النحل المسمى في مناطق تواجده بقبيلة النحل كبير الرأس (Hymenoptera:Apidae,Euglossini) لعدد من المناطق الأستوائية،اذ توصلوا الى ان هناك تباينا واضحا بين أنواع هذه الحشرة من خلال التقدير

الأحصائي لمعدلات التشخيص الصحيح للأنواع بالاعتماد على شكل الجناح فقط والذي قد يعد أداة تصنيفية بديلة تدل على تطابق أنواع هذه النحلة ،ان الاستنتاج الرئيس من أي دراسة حول استخدام المقياس الهندسي لشكل وتركيب الجناح هو ان شكل الجناح يشمل التغيرات الكمية الكافية لأستخدامها كمؤشر للتمييز بين الوحدات التصنيفية العاملة في مجال دراسة الوراثة الكمية للكائنات الحية، فضلا عن ذلك فأن شكل الجناح هو مؤشر كمي فعال للتمييز بين الأنواع المختلفة لجنس اي حشرة كما هو الحال بالنسبة لجنس ذبابة الخل *Drosophila* (Moraes وآخرون ،2004 ; Bubliي وآخرون ،2008) .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3 – المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3 – 1 المواد Materials

3 – 1-1 الأجهزة والمواد المستخدمة في هذه الدراسة

جدول (1) الأجهزة والمواد المستخدمة والشركات المصنعة والمنشأ

الشركات المصنعة أو المنشأ Company and origin	اسم الجهاز Apparatus Name	ت
Arcelik – Turkey	ثلاجة Deep freeze	1
Labnet – The U. S. A	جهاز ترحيل كهربائي Gel Electrophoresis	2
TUV-Germany	جهاز طرد مركزي دقيق Microcentrifuge	3
ECM-Germany	مجهر للطاقة Power Supply	4
Denver instrument – Germany	ميزان كهربائي حساس Sensitive Electronic Balance	5
Boeco –Eufor	جهاز Vortex VI plus	6
ECM-Germany	مقياس الكثافة الضوئية Spectrophotometer	7
Mummer-Germany	حمام مائي Water bath	8
Vision – Korea	Hot plate magnetic Stirrer	9
Diocom – The U. K	كابينة الأشعة فوق البنفسجية UV Cabinet	10
Geneaid – Taiwan	أنابيب أبند روف Eppendrof Tubes	11
Bio Basic – Canada	Tips	12
Dragonmed – Germany	Micropipettes	13
Passed electrical – The U . K	جهاز تصوير الجل Gel Documentation	14
Novex Germany	مجهر تشريح Dissection Microscope	15
Novel – Germany	مجهر مركب Compound Microscope	16
Taiwan	مجهر رقمي Digital Microscope	17
LG- Korea	حاسبة Desktop	18
Labnet Edison NJ – U.S.A	جهاز البلمرة الحراري (Thermal Black) PCR	19

الشركات المصنعة أو المنشأ Company and origin	اسم الجهاز Apparatus Name	ت
Sail brand - China	شرائح زجاجية Slides	20
Pakistan	طقم تشريح Dissecting Set	21
U.A.E	شريط ورق لاصق (G2100) bandage paper	22
Germany	دورق زجاجي مدرج Approx .500 ml	23
Germany	أنابيب زجاجية مدرجة مختلفة الأحجام Cytoglas.500ml,100ml , 50ml	24
Ideen Welt –China	جهاز لقياس الحرارة والرطوبة Outdoor Thermometer	25
Barfab – Iran	مبردة كونيبرا	26
Plastilap – China	إطباق بتري Petri Dishes	27
Plastilap – China	أقداح بلاستيكية ذات أغطية 100 ml	28
Safe Pack – U.S.A	قفازات طبية Medical Gloves	29
Turkey	قنينة بلاستيكية شفافة لجمع العينات 1000.g	30
Iraq	صناديق زجاجية ذات هيكل مصنوع من الألمنيوم (50 x 50 x 50) سم	31
Iraq	نشارة خشب Mulch Wood	32
Kardelen – Turkey	قطن طبي Medical Cotton	33
Turkey	منضدة خشبية ذات هيكل حديدي (100 × 180) سم ²	34
Spartan – Jordan	مرشة ماء بلاستيكية شفافة (760 . ml)	35
Spartan – Jordan	قنينة ماء بلاستيكية شفافة (200 . ml)	36
QG – Qatar	حقن طبية Medical Injection 10 . ml	37
Syria	ورق (سيليفون)	38
Bio Basic INC – Canada	Micro tip short 10.01	39

الشركات المصنعة أو المنشأ Company and origin	اسم الجهاز Apparatus Name	ت
Bio Basic INC – Canada	Tip rackc sterile BT 222- RS100-1000ul	40
Bio Basic INC – Canada	Eppendrof tube sterile 1.5 ml (100)	41
Bio Basic INC – Canada	PCR rack tube	42
Bio Basic INC Canada	Rack Eppendrof 100 sample	43

3 – 1 – 2 المحاليل والمواد الكيميائية المستخدمة في هذه الدراسة

جدول (2) المحاليل والمواد الكيميائية والأصل والمنشأ

الأصل أو المنشأ	المحاليل والمواد الكيميائية	ت
Geneaid – Taiwan	Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Gs100 Prep	1
Bio Basic INC – Canada	Agarose AB 0013 50 mg	2
Bio Basic – Canada	TBE A0026 10 x1L	3
Bioneer – Korea	100 bp DNA Ladder D- 1030 250 ul	4
Bioneer – Korea	PCR Premix K-2012 0.2 ml / 20 ul rxns / 96 tube	5
Bioneer – Korea	D.D water	6
Bio Basic – Canada	Ethidium bromide solution Do 177 . 5 ml	7
Bio Basic INC – Canada	Loading dye صبغة تحميل	8
Kuwait	Distilled water 100% ماء مقطر	9
Bioneer – Korea	Specific primers بوادي متخصصة	10

ت	المحاليل والمواد الكيميائية	الأصل أو المنشأ
11	محلول سكري (10 %) Sugar solution	Iraq
12	محلول ايثيلي Ethyl Alcohol (96 %)	Iraq

3-1-3 محتويات عدة استخلاص الـ DNA .

جدول (3) محتويات Genomic DNA Mini kit (Tissue) والأصل والمنشأ

ت	المحتويات	الأصل أو المنشأ
1	GST Buffer 30 ml	Geneaid – Taiwan
2	GSB Buffer 40 ml	Geneaid – Taiwan
3	Wash Buffer 25ml Add 100 ml Ethanol	Geneaid – Taiwan
4	W1 Buffer 45 ml	Geneaid – Taiwan
5	Elution Buffer 30 ml	Geneaid – Taiwan
6	Proteinase K	Geneaid – Taiwan
7	Micro pestle	Bio Basic INC-Canada
8	أنابيب جيديكولومن GD Column	Geneaid – Taiwan
9	10.200 ul filter tip natural sterile FT 266-RNS	Bio Basic INC-Canada

2-3 طرائق العمل Methods

1-2-3 تربية النوع *Chrysomya bezziana*

تم الحصول على الأدوار غير الكاملة للحشرة (الطور اليرقي الثالث مكتمل النمو) من حيوانات المزرعة المصابة بهذه الحشرة في بعض مناطق شمال ووسط وجنوب العراق والمؤشرة في الشكلين (2) و (3) بواقع (50) عينة لكل منطقة، لأجل تربيتها تحت ظروف بيئية مسيطر عليها تتلائم مع نمو وتطور كل دور من ادوار الحياة في غرفة أبعادها 4x5 م² مزودة بمفرغة هواء وكذلك تحتوي على جهاز تبريد نوع كونفيرا Barfab للتحكم بدرجة الحرارة والرطوبة وأيضا تحتوي على نافذة 2x2 م² ومصابيح اضاءة Ziside 220-240V عدد 2 ومنضدة خشبية (100X180) سم ذات هيكل حديدي توضع عليها أقفاص التربية بالإضافة الى جهاز Outdoor

Thermometer لقياس درجة الحرارة والرطوبة النسبية داخل أقفاص التربية وخارجها لغرض اكمال المتطلبات اللازمة للتربية ، حيث تم تجهيز الغرفة وكما يلي :-

صنعت أقفاص من الزجاج العضوي الشفاف (برسييلكس) بسمك 1.5 ملم ذات أبعاد 50X50X50 سم³ مكعب مفتوحة من الأعلى ومغطاة بقطعة من قماش ألتول الأبيض الشفاف جدا للسماح بدخول الهواء، وقد حور وجه واحد من كل قفص لعمل ذراع من قماش المللم الأبيض السميك جدا بطول 40 سم وبقطر 16 سم لغرض ادخال واخراج الوسط الغذائي والمواد الأخرى من والى داخل أقفاص التربية، ثبتت الأقفاص داخل هيكل من الألمنيوم ذي أبعاد 51X51X51 سم³ مكعب وفقا لما جاء في (الجواري، 2000) ، بعد أجراء العديد من التحويرات عليها، وضعت داخل كل قفص كمية من نشارة الخشب لغرض تعذر اليرقات كاملة النمو فيها بارتفاع 2 سم (ألعزي، 2005)، ونقلت الأقفاص الى غرفة التربية تحت درجة حرارة 37 م° ورطوبة نسبية من 70-80 % ،اذ وضعت اليرقات الناضجة والكاملة النمو التي جمعت من مناطق العراق الثلاث الشمال والوسط والجنوب في الأقفاص وحسب القفص المخصص لكل منطقة ،اذ سجل اسم المنطقة لكل قفص من الأقفاص الثلاثة ،ويكون لون اليرقات في هذا الطور ورديا فاتحا والرأس ذو لون اسود لأنها ناضجة ومكتملة النمو (Zumpt، 1965) ،استخدمت أطباق بتري دائرية الشكل بقطر 12 سم وعمق 3 سم وضع واحد منها في كل قفص من أقفاص التربية اذ وضع داخل هذه الأطباق الوسط الغذائي المعد لتغذية الكاملات وبكمية تصل الى حوالي 250 غم .

- مكونات الوسط الغذائي هي .

أولا: لحم بقر أو غنم مفروم 40% .

ثانيا: دم بقر أو غنم سائل 15% . (يتم الحصول عليه من محلات الجزارة بشكل يومي) .

ثالثا: فورمالين 0.3 % .

رابعا: ماء مقطر 44.7 % .

خامسا: مادة مانعة للتخثر EDTA 10 غم .

حضر الوسط الغذائي بخلط هذه المواد في أناء زجاجي دائري الشكل بقطر 25 سم ،بعد ذلك حفظ في الثلاجة طيلة فترة تعذر الحشرة وخلال هذه الفترة تم رش نشارة الخشب داخل الأقفاص بالماء باستخدام مرشة ماء بلاستيكية صغيرة حجمها 760 مل لتر والتحكم بدرجة حرارة الغرفة والأقفاص وجعلها تتراوح من 25-28 درجة مئوية والرطوبة النسبية تتراوح بين 70-80 % لتقليل مدة التعذر ، وبعد انتهاء مدة تعذر اليرقات الناضجة والتي تستمر من 5-7 أيام تخرج الحشرات الكاملة ويقدم لها في أول يوم خروجها وجبة غذائية مكونة من الوسط الغذائي الذي تم أعداده والحوالي على نسبة عالية من البروتين مع 100 غم من مسحوق السكر (بلورات) ومحلول سكري 10% والذي يحضر بأضافة 10 غم من مسحوق السكر الى 100 مل لتر ماء مقطر تم قياسه بحقنة طبية حجمها 10 مل

لتر توضع جميع المكونات أعلاه كلا على حدة في أطباق بتري بقطر 10 سم وعمق 3 سم يحتوي الطبقة الذي يوضع فيه المحلول السكري على قطن طبي معقم ليشتبع فيه المحلول بنسبة عالية جدا (السراي، 2002) ، بعد ذلك تقوم اناث الجيل الأول البالغة بوضع البيض المخصب في الوسط الغذائي المقدم لها في أطباق بتري بعد 5 أيام من خروجها و حدوث التزاوج حيث تحدث عملية الوضع خلال فترة الظلام أو في قت الغروب ليفقس البيض بعد مرور فترة زمنية محددة تتراوح بين 7-14 ساعة من وضعه من قبل الاناث ونتيجة لذلك يصعب الكشف عن كتل البويض والطور أليرقى الأول للحشرة (ألغزي، 2005) ، يتم تبديل الوسط الغذائي كل 24 ساعة مع مراعاة الحفاظ على البيض وكذلك اليرقات في الطور الأول والثاني لأنها تكون داخل الوسط الغذائي المقدم للبالغات في تلك الأطوار من دورة حياة الحشرة حيث تتغذى على السوائل الموجودة في ذلك الوسط وعند التبديل تم سحب اليرقات باستخدام ملقط طبي، نقلت اليرقات الصغيرة في نهاية الطور أليرقى الثاني من كل قفص من الأقفاص الثلاث الى أقفاص تربية جديدة يمثل كل واحد منها منطقة من المناطق المراد دراستها لغرض اكمال تربية الجيل الثاني لها ، علاوة على ذلك لأجل تمييز الحشرات الكاملة للجيل الأول عن كاملات الجيل الثاني ولمنع حدوث انفجار سكاني في المستعمرات وكذلك لزيادة نسبة السيطرة على الظروف البيئية المحيطة بها، استمرت عملية تقديم الوسط الغذائي مع زيادة فترة تبديله الى 48 ساعة مع التأكيد على سحب اليرقات بواسطة الملقط الطبي بعناية ورفق حفاظا عليها، تترك يرقات الطور الثالث مكتملة النمو الوسط الغذائي لتبحث عن مكان مناسب لها في نشارة الخشب أو تحت الأطباق للأختفاء فيه من اجل التعذر يكون بعيدا عن الضوء (Abdul-Rassoul وآخرون، 1996)، وكما هو واضح في الصورة (3) فان عذارى ذبابة الدودة الحلزونية للعالم



صورة (3)

طور العذارى لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (Vill.) *Ch.bezziana* قوة التكبير x10



صورة (4)

طور الحشرة الكاملة لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (*Ch. bezziana* (Vill.))

قوة التكبير x10

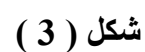
القديم في هذا الدور تكون برميلية الشكل النهائية الأمامية لها بيضوية و الخلفية مستديرة خلال فترة التعذر التي تستمر من 5-7 أيام (Spradbery، 1991) ، تم رش النشارة بالماء مرة ثانية كما في الجيل الأول لغرض زيادة نسبة الرطوبة داخل الأقفاص وكذلك المحافظة على درجة حرارة الأقفاص بحيث تكون متساوية مع درجة الحرارة في غرفة التربية ، قدم الوسط الغذائي بعد خروج كاملات الجيل الثاني في اليوم الأول وكررت الخطوات السابقة لعملية تربية الحشرة عند تربية يرقات الجيل الثالث ولكل منطقة من المناطق الثلاث المراد دراستها في وقت واحد مع مراعاة نقل اليرقات الى أقفاص تربية جديدة في نهاية الطور اليرقي الثاني واكمال تربيتها الى أن تصل الى دور البلوغ كما في الصورة (4) لهذا الجيل بحيث أصبح لدينا تسعة أقفاص لتربية الحشرة تمثل كل ثلاثة منها منطقة من مناطق العراق ولثلاثة أجيال من دورة حياة الذبابة ، وهكذا تستمر عملية أدامة المستعمرات السكانية للحشرة لغاية نهاية الجيل الثالث من دورة الحياة وذلك بتقديم وسط غذائي جديد (Al-Izzi وآخرون، 1999) .



شكل (2)

خارطة العراق

نقلا عن: www.iraqnaa.com



خرائط محافظات السليمانية – ديالى – ميسان مؤشر عليها مناطق جمع عينات الذبابة الحلزونية
نقلا عن : www.iraqnaa.com

3-3 الدراسة الوراثية الجزيئية Molecular Genetic Study**1-3-3 استخلاص ألد DNA DNA Extraction**

تمت عملية الاستخلاص وفقا لطريقة Genomic DNA Mini Kit Tissue Protocol .

2-3-3 محاليل الاستخلاص Buffers used in DNA Extraction

GST Buffer 200 μ L

Proteinase K 20 μ L

GSB Buffer 200 μ L

Absolute Ethanol 200 μ L

W1 Buffer 400 μ L

Wash Buffer 600 μ L

Elution Buffer 50 μ L

3-3-3 طريقة الاستخلاص (أجريت طريقة الاستخلاص مع مراعاة ارتداء ارتداء

الصدرية المختبرية،قفازات الأصابع، الكمادات طبية) وكالاتي :-

- 1: أخذت الحشرة بالدور الكامل ووضعت في أنبوبة ابندروف حجمها 1.5 مل.
- 2: أضيف 200 مايكروليتر من GST Buffer الى الأنبوبة التي تحتوي على الحشرة، وسحقت الحشرة جيدا باستخدام ألد Micropisstel .
- 3: بعد سحق الحشرة جيدا أضيف أليها 20 مايكروليتر من Proteinase K داخل الأنبوبة ثم وضعت هذه الأنبوبة في جهاز الرج Vortex لمزج وملابسة المكونات فيها ولمدة 30 ثانية ،بعد ذلك تحضن الأنبوبة في حمام مائي بدرجة حرارة 60 درجة C^o ولمدة 30 دقيقة مع الرج المستمر للأنبوبة كل 5 دقائق طيلة فترة التحضين .
- 4: بعد الانتهاء من عملية التحضين وضعت الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة في الدقيقة ولمدة دقيقتين .
- 5: بعد انتهاء عملية الطرد المركزي أستخرجت الأنبوبة من الجهاز وسحب السائل منها فقط ، ثم وضع في أنبوبة ابندروف جديدة بواسطة ألد Micropipette وتركت الأنبوبة القديمة .
- 6: أضيف 200 مايكروليتر من GSB Buffer الى الأنبوبة الجديدة وترج لمدة 10 ثواني لترسيب ألد DNA .

- 7: بعد ذلك نقلت المكونات الى أنبوبة GD Column حجمها 2 مل تحتوي على فلتر ترشيح وأعيدت عملية الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة فقط .
- 8: بعد الانتهاء من عملية الطرد المركزي تم أخراج الأنبوبة واخذ منها الفلتر فقط ووضع في أنبوبة GD Column جديدة .
- 9: أضيف 400 مايكروليتر من W1 Buffer الى الأنبوبة ومن ثم وضعت بمحتوياتها في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة فقط .
- 10: بعد الانتهاء من عملية الطرد المركزي تم التخلص من السائل الذي يتجمع أسفل فلتر الترشيح داخل الأنبوبة بعد ذلك أضيف 600 مايكروليتر من Wash Buffer إليها ووضعت في جهاز الطرد المركزي مرة أخرى بسرعة 14000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقتين لغرض التجفيف .
- 11: بعد انتهاء عملية التجفيف يتم التخلص من أنبوبة GD Column واخذ فلتر الترشيح فقط ووضع في أنبوبة ابندروف جديدة .
- 12: أضيف 50 مايكروليتر من Elution Buffer الى أنبوبة الابندروف الحاوية على فلتر الترشيح وبعد ذلك وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000 دورة / الدقيقة ولمدة دقيقة واحدة فقط .
- 13: أخراج الأنبوبة من الجهاز بعد الانتهاء من عملية الطرد المركزي ،اذ لوحظ ترسب الـ DNA فيها بشكل مادة جيلاتينية عديمة اللون، بعد ذلك تم إجراء الترحيل الكهربائي لـ DNA المستخلص على هلام الاكاروز للتأكد من وجوده فيها، بعد ذلك يحفظ في الثلاجة لحين استخدامه في تضخيم الجينات المستخدمة في هذه الدراسة .

4-3-3 تقدير نوعية الـ DNA المستخلص DNA Quality Extraction

قدرة نوعية الـ DNA من خلال ترحيل 9 عينات لكل منطقة 3 لكل جيل، وبواقع ذكر واحد و2 اناث من كل مستعمرة من مستعمرات التربية على هلام الأكاروز وبحسب ما جاء في (القرةغولي ، 2013) ، وقد كانت نقاوة الـ DNA في جميع العينات تتراوح بين 1.8-2 نانومتر.

A-5-3-3 المحاليل المستخدمة:

- 1: محلول TBE Buffer حضر هذا المحلول من :
(0.89M Tris-borate, 0.88M Boric acid, 20mM EDTA, PH 0.8)
كما حضر محلول TBE بقوة X10 وفقا للتراكيز التالية :
- 2: محلول التحميل Loading Buffer بقوة X10 والذي حضر من مزج المواد التالية:

0.25gm promphenol Blue in 50ml D.W, 30ml Glycerol) وأكمل الحجم لغاية 100 مل بإضافة الماء المقطر والمعقم .

3: صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide .

حضرت هذه الصبغة من اضافة 1gm من بروميد الاثيديوم الى 100 مل ماء مقطر في قنينة زجاجية معقمة وبدرجة حرارة 5 م° ، يجب الحذر عند استخدام هذه المادة لأنها مسرطنة لذا يجب ارتداء القفازات الطبية عند استخدامها في أثناء إجراء عملية الترحيل الكهربائي للكشف عن ألد DNA (القرةغولي، 2013) .

B-5-3-3 الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز Gel Electrophoresis

- 1- حضر الهلام بوزن 1 غم من الأكاروز بواسطة ميزان كهربائي حساس ودقيق ثم وضعت الكمية الموزونة في دورق زجاجي مدرج حجمه 500 مل يحتوي على كبسولة صلبة Stirrer لغرض مزج وملابسة المكونات أثناء التسخين .
- 2 - أضيف 450 مل من الماء المقطر الى أنبوبة زجاجية مدرجة 500 مل ثم أكمل الحجم بإضافة 50 مل من محلول X 10 TBE Buffer بواسطة أنبوبة زجاجية حجمها 50 مل .
- 3 - اخذ من الخليط 100 مل بواسطة أنبوبة زجاجية مدرجة ، واضيف الى الدورق الزجاجي الذي يحتوي على الأكاروز ثم وضع الدورق بالمحتويات بعد رجه باليد لمدة 10 ثواني على جهاز الأذبابة ألد Hot Plate Stirrer بدرجة حرارة 100م° ، اذ غطت فوهة الدورق بورق السيليفون لمنع التبخر أثناء التسخين واستمرت عملية اذابة الجل الى أن أصبح السائل صافي جدا وبدون فقاعات .
- 4 - ترك الجل المذاب ليبرد الى درجة حرارة من 40-50م° بعد ذلك أضيف الى الدورق 5 مايكروليتر من صبغة Ethidium bromide ، ثم حضر الحوض المعد لصبب الجل تلاه سكب الجل المذاب برفق وعناية تامة وبشكل مستمر لمنع حدوث أي فقاعات وترك لكي يتصلب بعد وضع مشط بلاستيكي في الحوض لعمل حفر في الهلام لكي توضع فيها العينات .
- 5 - بعد ان تصلب الجل تم رفع المشط منه ثم رفع الجل من حوض الصب برفق وعناية تامة ووضع في حوض جهاز الترحيل الكهربائي الذي تم غمره بمحلول TBE بقوة X 1 .
- 6 - وضع 2 مايكروليتر من صبغة التحميل على ورق السيليفون لكل عينة ثم مزج مع 5 مايكروليتر من DNA كل عينة .
- 7 - وضعت العينات بشكلها النهائي في الحفر الموجودة في الجل ويراعى في ذلك عدم خروج العينة خارج سطح الحفرة .
- 8- وصلت أقطاب جهاز الترحيل الكهربائي وجهاز بقدره 100 فولت .

- 9 - تم توقيت جهاز الترحيل الكهربائي لمدة 50 دقيقة .
- 10 - أوقف الترحيل عند انتهاء الوقت المحدد له ووصول الصبغة الزرقاء الى نهاية الجل .
- 11- رفع الجل بعناية من حوض جهاز الترحيل الكهربائي ووضع على جهاز الأشعة فوق البنفسجية U.V لمشاهدة حزم أـ DNA وتقدير حجمها بعد اطفاء الاضاءة لمشاهدة توهج الحزم بشكل أفضل (الصالح، 2007) .

3 – 3 – 6 تفاعلات أنزيم البلمرة المتسلسل – Specific

طبقت هذه التقنية بتباع الخطوات الاتية :

- 3-3-6-1 استخدام ثلاثة بوادئ متخصصة وهي : (CBI، White gene و EF.1gene) تقوم بترتيب القواعد النتروجينية بتسلسل محدد و التي صنعتها شركة Bioneer – Korea
- جدول (4) البوادئ المستخدمة وتسلسلاتها

NO	Primer Name	Primer Sequences	Band size
1	EF . 1gene	EF- F05 (CCT GGA CAT CGT GA T TTC AT) EF- F06 (TTA CCT TCA GCG TTA CCT TC)	401bp
2	White gene	WEC – F21 (GTT TGT GGC GTA GCC TAT CC) WEC- R12 (AAT GTC ACT CTA CCY TCG GC)	617bp
3	cytochrome b	CB1 –SE (TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC) PDR-WR04(ATT TCA CGC TCA TTA ACT)	761bp

3 – 3 – 2 المحاليل والمواد اللازمة لأجراء التفاعلات :

والتي تتألف من Master Mix والذي يتكون من :

Taq DNA Polymerase 2.5 U/ μ L

dNTPs 250 μ L

Tris – HCL 10 μ L

KCL 30 μ L

MgCl₂ 1.5 μ L

3 – 3 – 3 طريقة العمل :

1- حضر خليط التفاعل الرئيس Master Mix بإضافة المكونات الآتية في أنبوبة معقمة وكما في الجدول أدناه :

جدول (5) يبين مكونات خليط التفاعل الرئيس

Final Concentration	Volume for 1 Tube	Materials Concentration Manufacturer
-----	7 μ L	D. Water
1X	5 μ L	Acc power PCR PrmiX
10 Pmol	1.5 μ L	Primer – F (10 PMpol)
10 Pmol	1.5 μ L	Primer – R (10 Pmol)
	15 μ L	Total reaction Volume

ومزجت هذه المكونات بواسطة أنبوبة ماصة زجاجية دقيقة وذلك بسحبها عدة مرات ثم وضعت في جهاز الرج أـ Vortex لمزج المكونات مع بعضها جيداً .

2 - وزع الخليط على 9 أنابيب معقمة حجمها 0.5 مل ومعلمة بحسب عينات المناطق الثلاث المراد دراستها وبواقع 15 μ L من الخليط لكل أنبوبة .

3 - أضيف 5 μ L من أـ DNA لكل عينة في الأنبوبة المخصصة لها ووزع خليط التفاعل على الأنابيب قبل إضافة أـ DNA لتجنب التلوث .

4- وضعت الأنابيب في جهاز البلمرة الحراري Thermo cycler وأجريت الخطوات كما في الجدولين 6 و 7 .

جدول (6) ظروف تفاعل PCR – EF.1 gene and White gene Specific استنادا الى Testa وآخرون (2002) .

NO	Step	Temperature	Time
1	Initial Denaturation	94C°	5min
2	Denaturtion	94C°	1Min
3	Primer Annealing	48C°	1Min
4	Primer Extension	72 C°	1Min
5	No, of cycles (2- 4)	35	
	Final Extension	72C°	10Min

جدول (7) ظروف تفاعل PCR – CBI Specific استنادا الى Testa وآخرون (2002) .

NO	Step	Temperature	Time
1	Initial Denaturation	94C°	5Min
2	Denaturation	94C°	1Min
3	Primer annealing	42C°	1Min
4	Primer Extension	72C°	1Min
5	No . of cycles (2-4)	35	
	Final Extension	72C°	10Min

3-3-6 الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis لخليط تفاعل الـ PCR

1 - حضر الهلام باضافة 1غم من جل الاكاروز بعد قياسه بميزان كهربائي حساس الى 100 مل من TBE Buffer بقوة 1X في ورق زجاجي مدرج حجمه 500.ml، ثم وضع على جهاز التسخين Hotplate stirrer ووضع غطاء من ورق السليكون على فوهة الدورق لمنع التبخر وبدرجة حرارة 100 م ° الى حين اكتمال الاذابة وشفاء الخليط الى درجة عالية جداً بحيث لا توجد أي مواد غير ذائبة و أي فقاعات فيه ثم يترك ليبرد الى درجة حرارة من 40 م ° - 50 م ° .

2- أضيف 5 µL من صبغة Ethidium bromide الى الهلام الموجودة في الدورق الزجاجي مع الرج المباشر للمكونات ولمدة عشرة ثواني .

3 - تهيئة حوض صب الجل وذلك بوضع المشط فيه قبل سكب الجل لعمل حفر توضع فيها العينات

- 4 - سكب الجل في الحوض برفق وبصورة مستمرة لمنع حدوث أي فقاعات وتركه حتى يتصلب لفترة غير معينة من الوقت .
- 5 - غمر حوض جهاز الترحيل الكهربائي بكمية من محلول TBE Buffer بقوة 1X المحضر من اضافة 50 مل من محلول 10X TBE Buffer الى 450 مل من الماء المقطر .
- 6 - رفع المشط من الجل بعد تصلبه في قالب الصب برفق ثم نقل الجل بعناية تامة ورفق الى حوض جهاز الترحيل الكهربائي .
- 7 - وضع DNA Ladder في الحفرة الأولى والأخيرة من الجل بحجم $7 \mu\text{L}$ لغرض المقارنة ثم حملت العينات في بقية الحفر أي كل عينة في حفرة وبحسب التسلسل والترقيم المعطى لكل واحدة منها .
- 8 - وصلت أقطاب التيار الكهربائي بجهاز الترحيل وجهاز بقدر 100 فولت ولمدة 90 دقيقة، وبعد اكتمال الوقت المحدد لعملية الترحيل تم رفع الهلام برفق من جهاز الترحيل ووضع على سطح جهاز تصوير الجل Gel documentation لغرض التصوير والتأكد من وجود حزم الجينات المضخمة

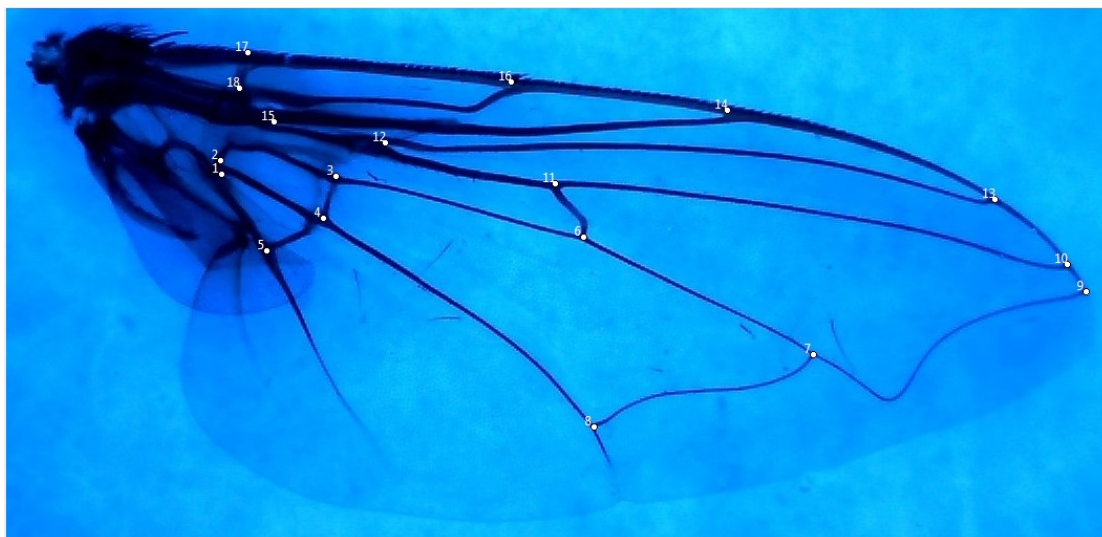
4-3 الدراسة الوراثية الكمية Quantitative Genetic Study

1-4-3 تحضير العينات Specimens Processing

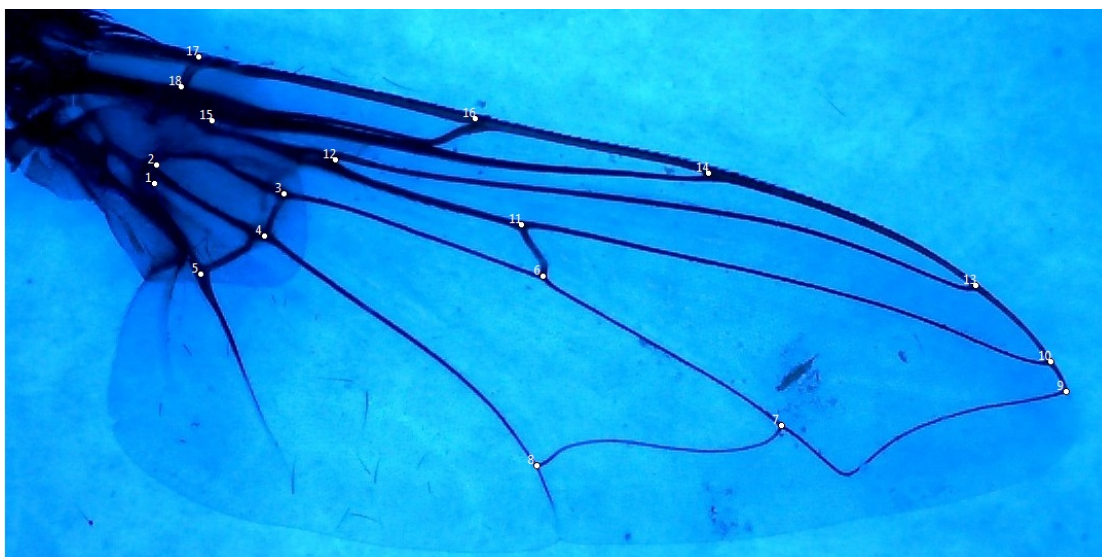
استخدم في هذه الدراسة 15 جناح أيمن للذكور و15 جناح أيمن للاناث للأجيال الثلاثة للذبابة والتي جمعت من مناطق الدراسة الثلاثة: الشمال / السليمانية، الوسط/ ديالى والجنوب / ميسان لغرض دراسة التغيرات الوراثية الكمية في شكل وحجم جناح الحشرة في هذه المناطق والتمييز بين المجتمعات السكانية للحشرة بشكل واضح باستعمال نظام المقياس الهندسي للشكل المظهري للجناح Geometric Morphometric، حيث اتبعت طريقة القرعة غولي (2013) في تحضير الشرائح الزجاجية للأجنحة، اذ تم عزل 15 ذكر و15 أنثى لكل جيل في أقفاص بلاستيكية شفافة ذات أغشية محكمة وتركت بدون تغذية لأجل هلاكها وجفافها بشكل جيد ، بعد ذلك تم نزع الجناح الأيمن لكل حشرة بواسطة ملقط تشريح دقيق وبناية تامة جدا حفاظا على الجناح من التكسر، بعد ذلك وضع الجناح بين شريحتين زجاجيتين وربطت حافتا الشريحتين بقوة بواسطة شريط ورقي لاصق نوع G2100 ، كتبت المعلومات الخاصة لكل نموذج والتي شملت: جنس الحشرة، مناطق الجمع، رقم الجيل الذي ينتمي إليه النموذج على طرفي الشريحة ، بعد الانتهاء من تحضير الشرائح الزجاجية كافة صورت بشكل واضح بواسطة مجهر رقمي Digital Microscope والذي ربط مع حاسبة منضدية Desktop مزودة بكاميرا رقمية قوة تكبيرها 1.3 ميكابكسل ومزودة بأشعة فوق البنفسجية UV ، اذ صورت أجنحة الذكور و الاناث المدروسة .

2-4-3 جمع البيانات Data Collecting

بعد الانتهاء من تصوير الأجنحة ، جمعت بيانات كل صورة على حدة باستعمال البرنامج الجاهز Collecting Landmarks for Identification and Characterization والخاص بالتحليلات الهندسية للأجنحة والبيانات التي جمعت عن صور الأجنحة بشكل معالم Landmarks وهي نقاط تشريحية وضعت على تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة ونهايات العروق الطولية كما هو موضح في الصورتان 9 و 10 ، اذ تستخدم هذه النقاط للتمييز بين المجتمعات السكانية العائدة لنفس الجنس والنوع (Bookstein، 1991)، استعمل في هذه الدراسة 18 معلم من النوع الأول وهي تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة وقد وضعت نقاط مرقمة بين هذه التقاطعات عن طريق وحدة COO الموجودة ضمن البرنامج وهي وحدة خاصة بوضع معالم الاحداثيات، أن الاتصالات بين المعالم المحددة والتي تم وضعها على كل جناح أعطت لنا أشكالاً مضلعة تستخدم في كثير من التحليلات ، شملت المقارنة بين شكل الجناح وحجمه لكل عينة في الدراسة لغرض الكشف عن التباين ما بين المجتمعات السكانية المختلفة لعينات الذباب المدروس ، كذلك لتوضيح التباين أيضا ضمن المجموعة السكانية الواحدة وبعد الانتهاء من وضع أرقام الاحداثيات لكل عينة من عينات الأجنحة نقلت الى وحدة TET الموجودة ضمن البرنامج أيضا وهي وحدة خاصة بدمج بيانات النماذج مع بعضها البعض لكي تتم المقارنة بين المجتمعات السكانية الثلاثة للذبابة ومعرفة مدى التماثل والتباين بينها، بعد ذلك نقلت البيانات الى وحدة MOG وهذه الوحدة توجد ضمن البرنامج وعن طريقها تجري عدة عمليات هي الترجمة Translation والقياس Scaling والدوران Rotation ، وبعد هذه العمليات الثلاثة التي يجب تطبيقها على احداثيات المعالم لكي نحصل على الحجم المركزي Centriod Size لكل جناح والاعوجاج الجزئي Partial Warp والاعوجاج النسبي Relative Warp وكذلك تباينات الشكل لكل جناح ، وفي هذه الدراسة تم الاعتماد على الحجم المركزي للجناح الأيمن للمقارنة بين المجتمعات السكانية لمناطق الدراسة، والحجم المركزي للجناح Centriod Size هو مقدار متساوي القياس من الجناح يتم حسابه من الجذر التربيعي لمجموع مربعات المسافات بين مركز المضلع وكل معلم من المعالم التي ثبتت على الجناح بشكل واضح ودقيق جدا (Macleod، 2009) .



صورة (5) الجناح الأيمن لذكر الذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* قوة التكبير x45



صورة (6) الجناح الأيمن لأنثى الذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* قوة التكبير x45

3-4-3 البرامجيات Software

ثبتت المعالم على الجناح وجميعها تم الحصول عليها من وحدة COO ،تشمل هذه البيانات الحجم المركزي Centriod Size ،الاعوجاج الجزئي Partial Warp فضلا عن الاعوجاج النسبي Relative Warp ،أما البيانات الأخرى فهي بيانات التحليل للمركبات الأساسية Principle Component Analysis التي حصل عليها من وحدة MOG ،أما بيانات التحليل التمييزي Discriminate Analysis فقد تم الحصول عليها من وحدة PAD ،كذلك بيانات تحليل التباين للحجم المركزي حصل عليها من وحدة COV وبيانات التماثل لشكل الجناح تم الحصول عليها من وحدة ASI ، أن كل الوحدات المذكورة توجد ضمن البرنامج الجاهز والخاص بالجانب الوراثي الكمي وهو Collecting Landmarks for Identification and Characterization وهذا البرنامج متاح على الموقع الإلكتروني العالمي <http://www.mpl.ird.morphometrics> ، وقد استخدم في تحليل بيانات هذه الدراسة التحليل العنقودي للمركبات الأساسية Principle Analysis في الكشف عن التباين Variation بين المجتمعات السكانية الثلاثة للذبابة، فضلا عن استخدام التحليل التمييزي Discriminate Analysis في الكشف عن التباين بين أفراد المجموعة السكانية الواحدة لهذه الحشرة وهذان التحليلان موجودان في البرنامج الجاهز الذي استخدم في هذه الدراسة .

الفصل الرابع

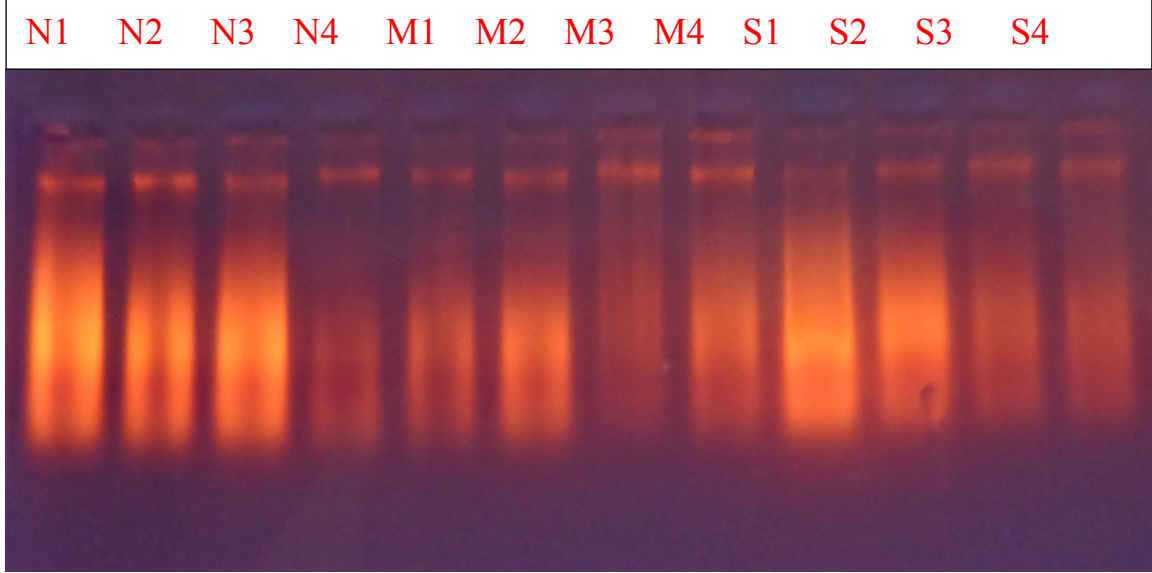
النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4- الدراسة الوراثية الجزيئية Molecular genetic study

1-1-4 نتائج عزل الدنا : DNA Isolation Results



صورة (7) نواتج الدنا المعزول من ذكور ذبابة *Ch.bezziana* وأناثها والتي جمعت من شمال العراق ووسطه وجنوبه والمرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1 % وفرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة والمصور تحت الأشعة فوق البنفسجية UV بعد التصبغ بصبغة برومايد الآثيديوم .

N1 , N2 : Male of North

N3 , N4 : Female of North

M1 . M2 : Male of Medial

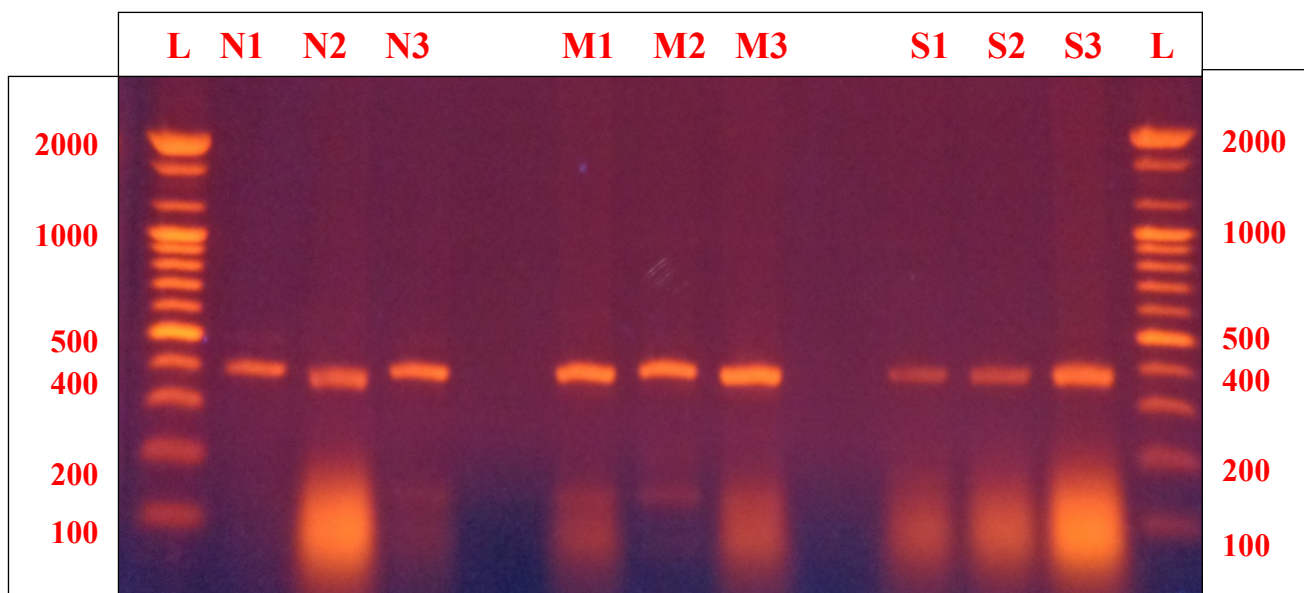
M3 , M4 : Female of Medial

S1 , S2 : Male of South

S3 , S4 : Female of South

تبين الصورة (7) نتائج عزل الدنا DNA من ذكور وإناث الذبابة *Ch.bezziana* والتي جمعت من شمال العراق ووسطه وجنوبه ، بنقاوة عالية نسبياً ، إذ تراوحت نقاوة الدنا المعزول من كل عينات الشمال والوسط والجنوب من 1.8 الى 2 نانومتر وهذه النقاوة هي المطلوبة في تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR.

4-1-2 نتائج تضخيم الجين *Elongation Factor-1. Gene* من DNA النواة للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* المجموعة من شمال العراق ووسطه وجنوبه :



صورة (8) ناتج تضخيم الجين *Elongation Factor-1. Gene* من DNA النواة لذكور الذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* وأناثها التي جمعت من شمال العراق ووسطه وجنوبه والمرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1% و فرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة والمصور تحت الأشعة فوق البنفسجية UV بعد التصبغ بصبغة برومايد الأثديوم .

L : Ladder DNA 100 – 2000bp

N1 , N2 , N3 : Samples of *Ch.bezziana* from North region of Iraq

M1 , M2 , M3 : Samples of *Ch.bezziana* from Medial region of Iraq

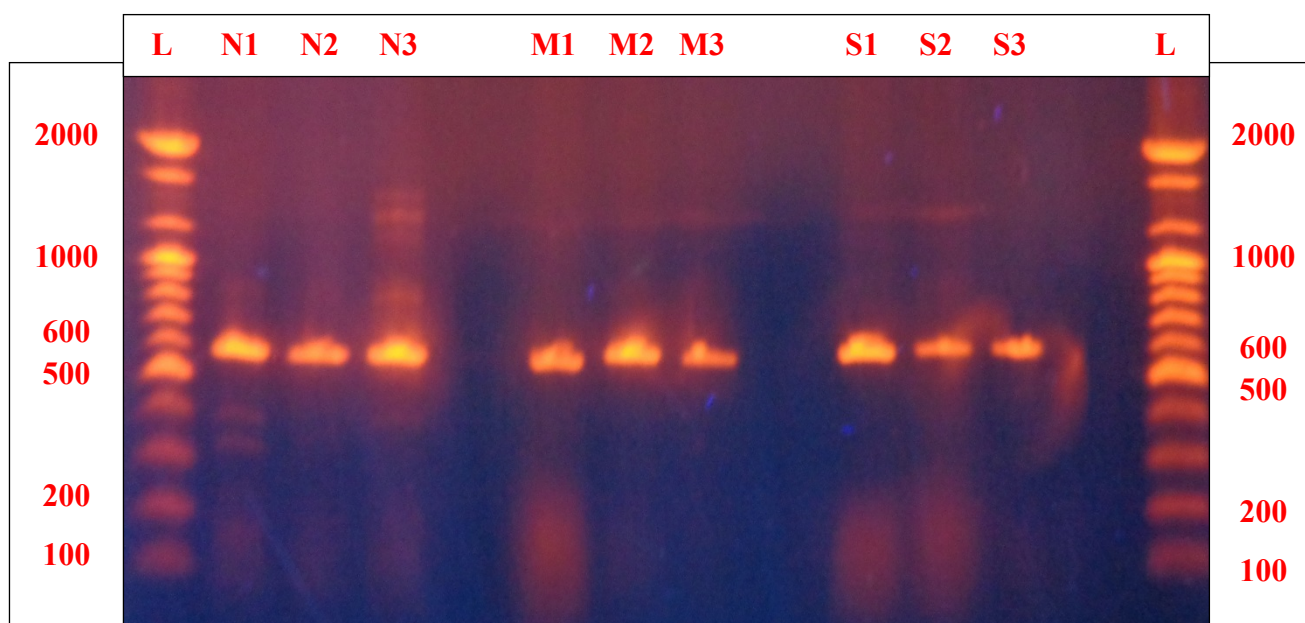
S1 , S2 , S3 : Samples of *Ch.bezziana* from South region of Iraq

تبين الصورة (8) ناتج تضخيم الجين *EF-1.gene* من DNA النواة لذكور واناث ذبابة *Ch.bezziana*(Vill.) التي جمعت من بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه، وقد اظهرت نتائج التحليل ان الوزن الجزيئي للحزم الناتجة من عملية الترحيل الكهربائي لناتج تضخيم جين النواة *EF-1.gene* لذكور هذه الحشرة واناثها هو 401bp زوجا قاعديا وهذا يدل على انها تعود لأصل جغرافي واحد بالرغم من انها جمعت من أجزاء العراق الثلاثة الشمال/السليمانية والوسط/ديالى والجنوب/ميسان ،اذ ان البعد الجغرافي بين هذه المناطق يصل الى مئات الكيلومترات بالإضافة الى اختلاف الظروف البيئية بينها وهذه النتائج تتفق مع نتائج الدراسة الوراثية الكمية التي درست تباين شكل الجناح وحجمه باستخدام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح ،اذ اظهرت النتائج عدم وجود

فروق معنوية، علاوة على وجود تقارب كبير بين العينات وخاصة عينات الشمال والوسط مع وجود تغاير قليل مع عينات الجنوب وقد يعود ذلك الى أسباب عديدة منها الانعزال الجغرافي واختلاف الظروف البيئية كارتفاع معدل درجات الحرارة ومعدل الرطوبة النسبية السنوي وكذلك معدل كمية الأمطار السنوية مقارنة بالمنطقتين الشمالية والوسطى وهذا يتفق ايضا مع الدراسة التي اجريت من قبل Wells و Singh (2013) والتي اشار فيها الباحثان من خلال دراسة التصنيف الجزيئي لعائلة الذباب الأزرق Calliphoridae والقيام بتضخيم ثلاثة من جينات النواة ومنها الجين EF-1.gene بالإضافة الى احدى جينات الماييتوكوندريا وهو الجين COI الى علاقة النشوء والتطور بين أنواع الأجناس التابعة لتلك العائلة ومنها الأنواع التابعة لجنس الـ *Chrysomya* وتوصل الباحثان الى ان هناك تقاربا وراثيا بين هذه الأنواع وخاصة التقارب الوراثي الكبير بين النوع *Ch.bezziana* ونوع اخر وهو *Ch.megacephala* وان هذه الأنواع منحدره من اصل واحد في شجرة التقارب التي تمكنوا من رسمها لعموم عائلة الذباب الأزرق بعد دراسة التسلسل التتابعي لجينات النواة الثلاثة ومنها الجين EF-1.gene وتتابعات دنا الماييتوكوندريا mtDNA Sequences للمنطقة الجينية 28sRNA, COI باستخدام تقنية الـ PCR ، ومن خلال مطابقة نتائج الدراسة مع التسلسلات المسجلة سابقا في بنك الجينات والعائدة لأنواع عائلة Calliphoridae وأستنتجوا أيضا أن أنواع جنس الذبابة الحلزونية ترجع الى تحت عائلة *Chrysomyinae* التي تعود أنواعها الى أصل واحد ، كما تهدف الدراسة التي قام بها Ready وآخرون (2009) لمعرفة التغيرات الوراثي بين عدد كبير من المجتمعات السكانية لذبابة النوع *Ch.bezziana* عن طريق استغلال الانعزال الجغرافي بين هذه المجتمعات لاثبات ان العينات التي اخذت من هذه المجتمعات جميعها تعود الى نفس الأصل الجغرافي بواسطة تمييز اكثر من جين يوجد في دنا الماييتوكوندريا mtDNA ومنها الجين CBI الذي يبلغ وزنه الجزيئي 715bp زوجا قاعديا لعينات اخذت من مناطق كثيرمختلفة ومنعزلة جغرافيا تضم العديد من المجتمعات السكانية العائدة لهذا النوع بالإضافة الى تمييز ودراسة اثنين من المواقع على نواة نفس المجتمعات يوجد فيها بدرجة عالية جين عامل الأستطالة EF-1.gene والذي يبلغ وزنه الجزيئي 401bp زوجا قاعديا (Danforth و Ji ، 1998 ؛ Esseghir وآخرون ، 2000)، وبدرجة أقل الجين White gene الذي يبلغ وزنه الجزيئي 617bp زوجا قاعديا (Bennett و Frommer ، 1997 ؛ Gomulski وآخرون ، 2001) لأختبار أي أنواع جديدة أو لمعرفة الاختلافات الجينية غير الواضحة على أمتداد الساييتوبلازم والتي تؤثر على DNA الماييتوكوندريا ، وقد توصل الباحثون في تلك الدراسة ومن خلال متابعة تسلسل القواعد النتروجينية لجينات الماييتوكوندريا وجينات النواة المذكورة أعلاه ان الأليل السائد (bezz-EF01) وجد في عينات كل من العراق وايران وماليزيا واندونيسيا ، اما اليلات هذا الجين الاقل تكرر مثل الاليل (bezz-EF02) فكانت محدودة جغرافيا وعثر عليها في عينات ايران فقط بينما الأليل (bezz-EF03) وجد في عينات

العراق واندونيسيا فقط اما بالنسبة للأليلين (bezz-EF04 and bezz-EF05) فقد وجدوا في عينات العراق فقط ونتيجة لذلك توصل الباحثون في هذا الدراسة ان المجتمعات السكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* عند اجراء تحليل نتائج دراسة جين النواة EF-1.gene في العراق هي الأكثر تنوعا حيث ظهر وجود أربع اليلات من مجموع أربع عينات أخذت من العراق بالمقارنة مع العينات التي جمعت من البلدان الاخرى، كما تمكن الباحثون أيضا من رسم شجرة التقارب لأفراد النوع الواحد للمجتمعات السكانية المنفصل جغرافيا والتي أخذت منها العينات معتمدين على تتابع القواعد النروجينية للمنطقة الجينية CBI و 28sDNA الموجودة في دنا الماييتوكوندريا MtDNA لهذه الذبابة .

4-1-3 نتائج تضخيم الجين White gene من DNA النواة للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* والتي جمعت من بعض مناطق شمال ووسط وجنوب العراق :



صورة (9) ناتج تضخيم الجين White gene من DNA النواة لذكور وأناث الذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* التي جمعت من بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه والمرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1% و فرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة والمصور تحت الأشعة فوق البنفسجية UV بعد التصبغ بصبغة برومايد الأثيديوم .

L : Ladder DNA 100 – 2000bp

N1 , N2 , N3 : Samples of *Ch.bezziana* from North region of Iraq

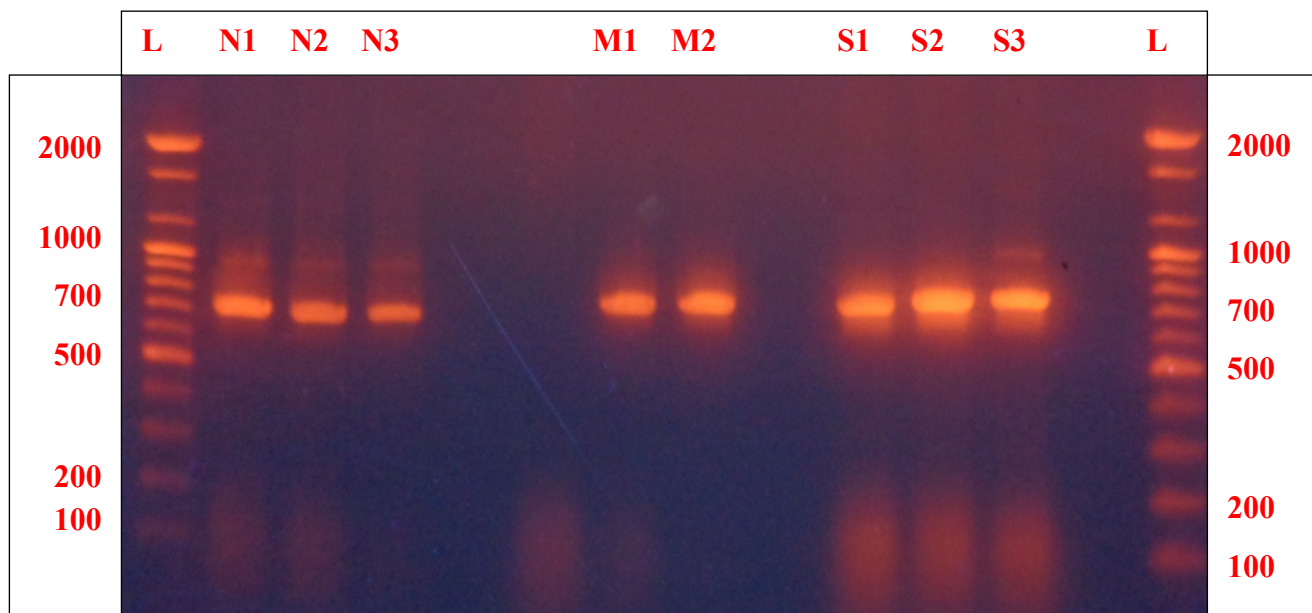
M1 , M2 , M3 : Samples of *Ch.bezziana* from Medial region of Iraq

S1 , S2 , S3 : Samples of *Ch.bezziana* from South region of Iraq

توضح الصورة (9) ناتج تضخيم الجين White gene الموجود في DNA النواة لذكور واناث ذبابة النوع *Ch.bezziana* التي جمعت عيناتها من بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه لأجيال الحشرة الاول والثاني والثالث في تلك المناطق والمرحلة على هلام الاكاروز بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis بتركيز 1% و فرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة والمصور تحت الأشعة فوق البنفسجية UV بعد إجراء التصبغ بصبغة برمايد الأثيديوم وبعد اكمال عملية الترحيل بآنتهاء الوقت المحدد لها أظهرت النتائج ان الوزن الجزيئي للحزم الناتجة من عملية الترحيل الكهربائي لناتج تضخيم هذا الجين باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل يبلغ 617bp زوجا قاعديا وهذا يتفق مع ما جاء في الدراسة الوراثية الكمية لنفس عينات الحشرة التي جمعت من بعض مناطق العراق الثلاثة ، ويتفق أيضا مع عدد من الدراسات العالمية التي أجريت في هذا المجال ولنفس جين DNA نواة هذه الحشرة الـ White gene ومنها الدراسة التي أجراها Ready وآخرون (2009) على جينات DNA النواة و DNA المايكوكوندريا لذبابة الدودة الحلزونية ومنها هذا الجين باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ،اذ كانت النتائج التي توصلوا اليها عند دراسة هذا الجين الموجود في DNA هذه الحشرة تشير الى أن 9 من مواقع النيوكليوتيدات الـ 577 لهذا الجين مطابقة لجميع الجينات المرادفة لها في بنك الجينات وهذا يتفق ايضا مع دراسات أخرى أجريت في هذا المجال وخصوصا دراسة تحليل تتابعات DNA النواة للجين White gene عند مطابقة تسلسلات 192 حامض اميني في دنا بعوضة الملاريا جنس *Anopheles* (Besansky وآخرون ، 1995)، وذبابة الخل التي تنتمي الى جنس *Drosophila melanogaster* Meigen (Davison وآخرون ، 1985) ، وذبابة الفاكهة جنس *Drosophila simulans* Sturtevant (Kirby و Stephan ، 1995) ، وذبابة النوع *Ch.albiceps* (Garcia وآخرون ، 1996)، اذ ان جميع تلك الدراسات توصل فيها الباحثون الى ان تتابعات الأحماض الأمينية للذبابة الحلزونية للعالم القديم أقل اختلافا وخاصة بعد مطابقتها مع تتابعات الأحماض الأمينية لجنس *Lucilia.cuprina* التي تنتمي لنفس العائلة ،اذ كان الاختلاف في ثلاثة فقط من تتابعات الأحماض الأمينية لها.عموما فان هناك سبع اليلات مميزة للجين White gene في DNA الذبابة الحلزونية للعالم القديم وهي تمتد من الأليل (bezz-white01) الى (bezz-white08) حسب الدراسة التي قام بها Ready وآخرون (2009) حيث ظهر التنوع الجيني بشكل واضح في جميع عينات الدراسة بعد تحليل نتائج تضخيم الجين أعلاه لعينات الحشرة المجموعة من بلدان الخليج وبعض بلدان اسيا وافريقيا ان الوزن الجزيئي لجين دنا نواة ذبابة الدودة الحلزونية White gene هو 577bp زوجا قاعديا وان الأليل bezz-white01 وجد في جميع عينات الدراسة التي جمعت من بلدان الخليج العربي وماليزيا واندونيسيا ولكنه غير سائد في العينات المجموعة من ايران ،اما الأليل bezz-white05 لهذا الجين فهو متوافر على نطاق

واسع في عينات العراق وايران وقد ظهر ذلك واضحا بعد رسم شجرة التقارب لـ 25 عينة تعود لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم في تلك البلدان .

4-1-4 نتائج تضخيم الجين Cytochrome b من DNA الماييتوكوندريا للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* المجموعة من شمال العراق ووسطه وجنوبه:



صورة (10) ناتج تضخيم الجين Cytochrome b من DNA النواة لذكور وأناث الذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* التي جمعت من بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه والمرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1% و فرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة والمصور تحت الأشعة فوق البنفسجية UV بعد التصبغ بصبغة برومايد الأثيديوم .

L : Ladder DNA 100 – 2000bp

N1 , N2 , N3 : Samples of *Ch.bezziana* from North region of Iraq

M1 , M2 , M3 : Samples of *Ch.bezziana* from Medial region of Iraq

S1 , S2 , S3 : Samples of *Ch.bezziana* from South region of Iraq

توضح الصورة (10) ناتج تضخيم الجين Cytochrome b من DNA الماييتوكوندريا mtDNA لذكور وأناث ذبابة *Ch.bezziana* لعينات المناطق الثلاثة من العراق والمرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1% و فرق جهد كهربائي 100 فولت 90 دقيقة والذي تم تصويره تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد إجراء التصبغ بصبغة برومايد الأثيديوم وبعد اكتمال الوقت المحدد لعملية الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز اظهرت النتائج ان الوزن الجزيئي لحزم الجين CBI هو 761bp زوجا قاعديا عند مطابقته مع الوزن الجزيئي الذي صمم على اساسه البادئ الخاص بهذا الجين بواسطة مؤشر الوزن الجزيئي Ladder DNA 100-2000bp ، وهذا مطابق لجميع نتائج الدراسات الوراثية الجزيئية السابقة لذبابة هذا النوع لدراسة الجين ذاته ، اذ قام Hall وآخرون (2009) بدراسة التنوع الوراثي

الجيني في المجتمعات السكانية المختلفة لذبابة *Ch.bezziana* المسببة لداء التذويد في العراق والمملكة العربية السعودية وعمان فضلا عن ايران للوصول الى تقارب وراثي جيني بين عينات المجتمعات السكانية لهذه الحشرة في تلك البلدان وبالتالي امكانية تطبيق تقنية الحشرات العقيمة للقضاء على هذه الآفة فيها من خلال تضخيم الجين CB الموجود في دنا الماييتوكوندرية باستخدام تقنية الـ PCR ودراسة التسلسل التتابعي النيوكليوتيدي لهذا الجين باستخدام بادئات متخصصة Specific primers (5-3TATGTACTACCATGAGGACAAATATC) CB1-SE و (5-3 ATTCACGCTCATTAAT) PDR-WR04 ، وقد تم استخدام البروتوكولات المتبعة من قبل Ready وآخرون (2009) وكذلك استخدموا البرنامج الأمريكي المنظم للتعديل اليدوي والخاص بشفرات الجينات (Crop,Ann Arbor,MI,U.S.A) مع تسلسلات جينية جاهزة توجد في صناعة البرامجيات الخاصة بهذا المجال من الدراسات الوراثية الجزيئية لدنا الماييتوكوندرية لتحليل التنوع الجيني في جينات الماييتوكوندرية للمجتمعات السكانية المنعزلة جغرافيا للذبابة الحلزونية وبخاصة الجين CB-bezz.NN (Swofford, 2002) ، وقد أستنتج الباحثون من الدراسة المذكورة في أعلاه ان التنوع الجيني لهذه الحشرة في جين دنا الماييتوكوندرية CB للنماذج المجموعة من العراق ، ايران ، السعودية وعمان يوجد في خمس نسخ متنوعة لهذا الجين وهي على التوالي من CB-bezz01 الى CB-bezz05 سجلت سابقا في بنك الجينات وهي تختلف عن بعضها البعض في واحد او اثنين من مواقع النيوكليوتيدات عن طريق فحص 715 موقع لنيوكليوتيدات هذا الجين وقد تم ايضا التأكد من علاقة النسب والتطور بين النسخ الخمسة المتنوعة لهذا الجين جنبا الى جنب مع التنوع في الجين السادس CB-bezz06 الذي تم عزله في تلك الدراسة والذي سبق وان تم تسجيله في العراق (Ready وآخرون ، 2009)، ان التسلسل التتابعي النيوكليوتيدي لجين دنا الماييتوكوندرية Cytochrome b(CB3) أقصر من 279 موقع (Hall وآخرون ، 2001) ، وتشير شجرة التقارب الوراثي لأنواع جنس الـ *Chrysomya* التي رسمها Ready وآخرون (2009) المتعلقة بدراسة الجين (CBI) لذبابة الحلزونية للعالم القديم وجود تنوع جيني بين ستة من الجينات التي توجد في دنا الماييتوكوندرية mtDNA وهذه الجينات هي CB-bezz01,CB-bezz02,CB-bezz03,CB-bezz04,CB-bezz017,CB-bezz019 ،اذ وجدوا ان هناك تقاربا وراثيا كبيرا بين العينات المجموعة لكل من العراق وايران والسعودية في عدد من نسخ هذا الجين عند دراسة المنطقتين الحينيتين CBI و CB3 في دنا الماييتوكوندرية mtDNA لذكور ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم واناثها .

4-1-5 دراسة التسلسل التتابعي للقواعد النيتروجينية Studying of Nitrogen Bases Sequencing

تم إجراء دراسة التسلسل التتابعي للقواعد النيتروجينية لـ 18 عينة من ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم جمعت من مناطق العراق الثلاثة ، وقد استخدمت الطريقة المطولة في دراسة تسلسل القواعد لعينات من الجين White gene الموجود في DNA النواة وعينات من الجين Cytochrome b الموجود في DNA الماييتوكوندريا، بالرغم من أنها تعد ذات تكلفة مادية عالية جدا ولكنها تعطي نتائج دقيقة جدا بالإضافة الى انها تمتاز بأن لها القدرة على الكشف عن اي تسلسل تتابعي حدث فيه تغيير (طفرة Mutation) حتى لو كان ذلك التغيير قد حدث في قاعدة نيتروجينية واحدة فقط دون الاعتماد على الحصول نتائج جاهزة ، وبعد الاطلاع على ما نشر من تسلسلات القواعد النيتروجينية في البحوث والدراسات العالمية وكذلك ما نشر منها في موقع بنك الجينات العالمي Gene Bank الموجود في المركز الوطني لمعلومات التقنية الأحيائية الأمريكي NCBI على الانترنت وعن طريق الرابط <http://www.ncbi.nlm.gov>: وذلك لكي يتم اكمال عملية المقارنة أو المطابقة بين نتائج دراسة التسلسل النيوكلوتيدي للعينات المدروسة وما يماثلها من عينات لنفس النوع المدروس ونوع آخر مطابق له ينتمي لنفس الجنس Genus ، بحيث لا توجد أي اختلافات بينهما على مستوى النوع وعينات المطابقة هذه توجد في بنك الجينات ، وقد أستخدم قسم من نتائج دراسة التسلسل التتابعي للبادئ WEC-F21 و WEC-F12 لعمل التسلسل التتابعي لجزء من جين DNA النواة White gene الذي بلغ طول قطعه عند استخدام البادئ الخاص به 617bp زوجا قاعديا، كما أستخدم أيضا قسم من نتائج دراسة التسلسل التتابعي الخاص بالبادئ الآخر وهو CBI-SE و DR-WR04 لعمل التسلسل التتابعي لجزء من الجين CBI الموجود في DNA الماييتوكوندريا والذي كان طول قطعه عند استخدام هذا البادئ 761bp زوجا قاعديا ، وقد تم أستخراج تسلسل القواعد النيتروجينية بأستخدام البرنامج الجاهز لتحليل نتائج التسلسل التتابعي لقواعد الجينات والمسمى Bioedit ، ولأن دراسة تسلسل القواعد النيتروجينية بواسطة الجهاز قد تكون في بعض الأحيان غير واضحة لدرجة كافية لذلك يتم أحيانا ترك جزء من التسلسل النيوكلوتيدي لطرفي المنطقة الجينية المدروسة ، اذ يتم قراءة ونشر جميع التسلسلات الواضحة جدا والمميزة منها فقط لتفادي حدوث اي خطأ مهما كان بسيطا وكذلك للحصول على نتائج دقيقة جدا قدر الأمكان .

1-5-1-4 المقارنة بين مجتمعات الذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* المجموعة من شمال العراق ووسطه وجنوبه من ناحية التسلسل التتابعي للجين White gene

أجريت دراسة لمقارنة التسلسل التتابعي للمنطقة الجينية White gene الموجودة في DNA النواة والتي تم أستخراج تسلسلها النيوكلوتيدي من عينات الحشرة ، ولغرض إجراء المقارنة بين تسلسلات عينات المجتمعات السكانية للمناطق المختارة خلال الدراسة وكذلك إجراء عملية مطابقة مع العينات العالمية الموجودة في بنك الجينات لذلك أعطيت عينة الشمال الرمز Ch.b.N وعينة الوسط Ch.b.M وعينة الجنوب Ch.b.S ، ويمثل الشكل (4) مقارنة نتائج التسلسل التتابعي بين عينات المناطق الثلاثة المدروسة في تسلسل القواعد النتروجينية لجزء من الجين White gene والذي طوله في الاصل 617bp زوجا قاعديا ، اذ ترك بعضا من تسلسلاته النيوكلوتيدية في طرفه الأيمن لانها كانت مشوشة وغير واضحة المعالم بدرجة كافية ، حيث اخذت التسلسلات الواضحة والمميزة له بدا من الموقع 1 الى الموقع 526 للمحافظة على دقة النتائج علاوة على تجنب الوقوع في اي خطأ حتى لو كان في قاعدة نتروجينية واحدة فقط ، وقد تم فيه توضيح نتائج التسلسل التتابعي لعينات من بعض مناطق العراق الثلاثة على التوالي ، وعند إجراء مقارنة للتسلسل النيوكلوتيدي بين عينة الشمال وعينة الوسط من الموقع 1 الى الموقع 100 وجد ان هناك تقاربا كبيرا بينهما في التغيير الذي حدث للتسلسل النيوكلوتيدي لكلاهما والمتمثل بالطفرات النقطية Point Mutations من النوع الحذف والاستبدال في نيوكلوتيدات المواقع لهذا التسلسل وبخاصة طفرات الاستبدال التي حدث القسم الاكبر منها في نفس المواقع للعينتين اذ بلغ عددها 29 طفرة استبدال وهذه المواقع هي 4 ، 8 ، 9 ، 12 ، 13 ، 14 ، 15 ، 16 ، 18 ، 24 ، 26 ، 38 ، 39 ، 40 ، 43 ، 46 ، 49 ، 50 ، 51 ، 52 ، 54 ، 59 ، 67 ، 72 ، 74 ، 77 ، 78 ، 85 ، 90 فضلا عن ذلك فقد لوحظ وجود طفرات حذف في عينة منطقة الشمال وعينة منطقة الوسط في نفس المواقع وبشكل متتالي ضمن التسلسل النيوكلوتيدي لهما وهذه المواقع هي 1،2،30،31،32،64،65،79،80،81 ، وعند مقارنة عينة منطقة الشمال Ch.b.N مع عينة منطقة الجنوب Ch.b.S وجد ان هناك تباعدا كبيرا جدا بينهما في عدد الطفرات ومواقع حدوثها ضمن التسلسل النيوكلوتيدي للمنطقتين ، اذ ان طفرات الحذف في عينة الجنوب وجدت في موقعين فقط وهما 81 و 80 بينما كان عددها أكثر من ذلك في عينة الشمال اذ وصل الى 17 طفرة حذف وجدت في المواقع 1 ، 2 ، 3 ، 30 ، 31 ، 32 ، 55 ، 56 ، 57 ، 64 ، 65 ، 79 ، 80 ، 81 ، 82 ، 96 ، 97 ، اما بالنسبة لطفرات الاستبدال عند مقارنة عددها ومواقع حدوثها بين المنطقتين فقد اختلفت النتائج كثيرا ، اذ وجد ان عددها في عينة الجنوب يفوق عددها في عينة الشمال بنسبة كبيرة جدا ، اذ ان عددها وصل الى حوالي 44 طفرة بينما لم يتجاوز عددها في عينة الشمال الى 34 طفرة ضمن التسلسل التتابعي لها وفي مواقع مختلفة

ومتباعدة عن مواقع حدوثها في التسلسل النيوكلوتيدي لعينة الجنوب، وهذا دليل على ان ارتفاع عدد طفرات الحذف في عينة الشمال يرجع الى أسباب عديدة و أهمها وجود عدد كبير من الحواجز الطبيعية في المنطقة الشمالية مثل الأنهار والجبال والغابات والتي تمنع تدفق الجينات الى المناطق البعيدة عنها مقارنة مع منطقتي الوسط والجنوب، فضلا عن أختلاف الظروف البيئية فيها كإنخفاض درجة الحرارة والرطوبة النسبية ، اما بالنسبة لارتفاع عدد طفرات الاستبدال في عينة الجنوب عند مقارنتها بعينة الشمال، نعتقد بأن السبب الأساسي لذلك هو وجود نسبة من الأشعاعات التي خلفتها الحروب والتي تركزت بشكل كبير في منطقة الجنوب مما هي عليه في منطقتي الشمال والوسط ، وعند مقارنة عينة الوسط Ch.b.M مع عينة الجنوب Ch.b.S وجد ان هناك أختلافا وتباعدا كبيرا جدا بينهما، اذ ان عدد طفرات الحذف في عينة الوسط كان في 12 موقعا بينما كان في عينة الجنوب في موقعين فقط وكما ذكر في اعلاه ، وعند إجراء مقارنة للتسلسل النيوكلوتيدي لهما من ناحية عدد ومواقع طفرات الاستبدال بين المنطقتين فقد وجد ان عددها في عينة الجنوب اكثر مما هو عليه في عينة الوسط وهذا يماثل نتيجة المقارنة بينها وبين عينة الشمال من ناحية هذا النوع من الطفرات وقد وجد ان السبب المباشر لهذا لاختلاف بين المنطقتين هو بعد المسافة بينهما كما ذكر سابقا في هذه الدراسة اذ انها تصل الى 450 كم في حين ان المسافة بين منطقتي الشمال والوسط لا تتجاوز 280 كم ، كذلك تم اجراء المقارنة بين عينات المناطق الثلاث لتوضيح ومعرفة التغيرات الوراثي بينها وبالتالي الوصول الى الاسباب التي ادت لحدوث هذا التغير سواء كانت هذه الاسباب طبيعية أو مصطنعة من خلال زيادة اعداد المواقع التي بواسطتها تمت المقارنة بين مناطق الدراسة الثلاث والمذكورة في أعلاه ، اذ قورن التسلسل لمواقع النيوكلوتيدات من الموقع 100 الى الموقع 300 ووجد ان التغير الذي يحدث في تلك المواقع كان كبيرا جدا في عينات الشمال والوسط بينما أنخفض بشكل كبير جدا في عينة الجنوب مما هو عليه في التسلسلات النيوكلوتيدية الأولية لعينات المناطق الثلاثة خلال هذه الدراسة، وقد يعود السبب في ذلك الى وجود تقارب كبير بين عينة الشمال والوسط من حيث قرب المسافة الجغرافية بينهما كما ذكر أعلاه والتشابه الكبير في العوامل البيئية والظروف المناخية والمتمثلة بدرجة الحرارة والرطوبة النسبية ومعدل سقوط الامطار بين المنطقتين عموما بالإضافة الى ذلك فقد يعود السبب أيضا الى ان النوع أو العينات المدروسة تعود الى منشأ جغرافي واحد Geographical race ، كما وجد عند اجراء المقارنة بين عينة الشمال وعينة الوسط ان عدد طفرات الحذف انخفض بشكل كبير جدا في المنطقتين بالرغم من زيادة عدد المواقع التي تمت المقارنة بينها فقد كان عدده في عينة الشمال 27 طفرة وفي عينة الوسط 20 طفرة حيث ازدادت درجة التقارب بين المنطقتين في هذا النوع من الطفرات من ناحية حدوثها في نفس مواقع النيوكلوتيدات للمنطقتين وهذه المواقع هي 112، 113، 211، 212، 220، 233، 246، 284، 285، 296 و 297 ، اما بالنسبة لطفرات الاستبدال بين هاتين المنطقتين فقد لوحظ انها قلت بشكل

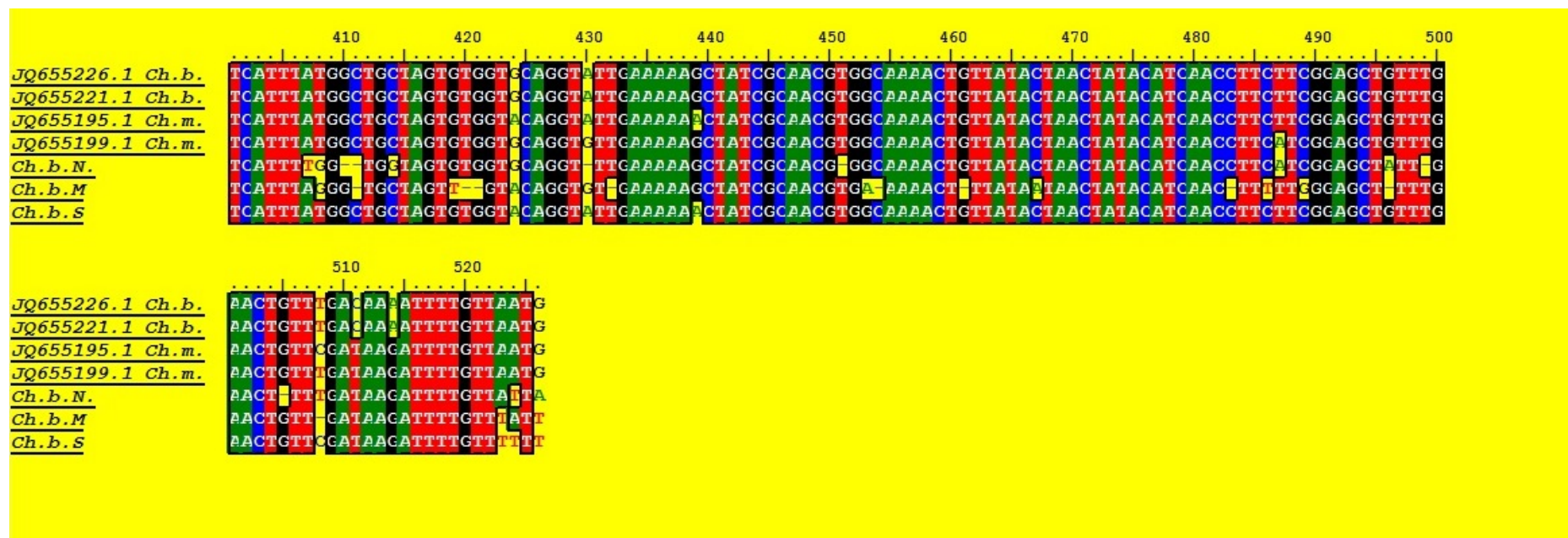
كبير في عينة الشمال اذ اصبح عددها 27 اي انها تساوت من حيث العدد مع طفرات الحذف وازداد عددها في عينة الوسط حيث اصبح العدد 43 طفرة حدثت في مواقع مختلفة تماما عما هي عليه في عينة الشمال باستثناء 4 مواقع مشتركة بينهما حدث فيها هذا النوع من الطفرات وهي 101، 102، 103 و 105 ، وعند مقارنة عينة الشمال مع عينة الجنوب خلال هذا العدد من المواقع النيوكليوتيدية لوحظ وجود تباعد كبير اعلى مما في المقارنة السابقة للتسلسلات الأولية في هذا الجين وذلك لزيادة عدد المواقع النيوكلوتيدية المستخدمة للمقارنة بين العينتين اذ وجد ان طفرات الحذف والاستبدال في عينة الشمال متساوية من ناحية العدد اذ بلغ عددها 54 طفرة لكلا النوعين بواقع 27 طفرة حذف ونفس العدد بالنسبة لطفرة الاستبدال اما في عينة الجنوب فكان هناك اختلافا كبيرا بين الحذف والاستبدال وهو ان طفرات الحذف حدثت في موقعين فقط وهما 296 و 285 اي وجدت في نهاية التسلسلات المستخدمة للمقارنة بين المناطق الثلاث اما طفرات الاستبدال في عينة هذه المنطقة فان عددها أصبح كبيرا حيث بلغ حوالي 41 طفرة في 200 موقع نيوكليوتيدي اي بزيادة كبيرة جدا عن عينة الشمال وصلت الى 14 طفرة استبدال والسبب في ذلك ربما يرجع الى استخدام المبيدات الكيميائية بنسبة كبيرة جدا في منطقة الجنوب في السنوات الاخيرة اضافة الى استقرار هذه المنطقة من العراق امنيا اكثر مما هو عليه في منطقتي الشمال والوسط وبالتالي سهل كثيرا حركة فرق مكافحة الذبابة الحلزونية للعالم القديم التابعة للمستشفيات البيطرية في المحافظات الجنوبية ، اما عند مقارنة عينة الوسط مع عينة الجنوب في 200 موقع وجد ان عينات الوسط Ch.b.M حدث فيها تغيير كبير بالنسبة للتسلسل النيوكليوتيدي بشكل طفرات حذف واستبدال اذ اصبح عدد طفرات الحذف فيها حوالي 20 طفرة اما طفرات الاستبدال فقد بلغت حوالي 43 طفرة وتوزعت على مواقع مختلفة من التسلسل النيوكليوتيدي لهذه المنطقة اما عينات الجنوب Ch.b.S فقد تضائل عدد طفرات الحذف الى اثنان فقط ، اما طفرات الاستبدال فيها فقد كان عددها متقارب في الـ 200 موقع المستخدمة للمقارنة بين عینتي المنطقتين اذ وصل عددها الى حوالي 41 طفرة استبدال بفارق بسيط عن عينة الوسط وهو 2 طفرة فقط ، اي ان المنطقتين متساوية تقريبا في هذا النوع من الطفرات ولهذا العدد الكبير من المواقع النيوكليوتيدية ، ان التقارب الوراثي الكبير بين تسلسلات القواعد النيتروجينية لعينات هذا النوع في المناطق الثلاثة والذي تم ملاحظته عند إجراء المقارنة بين هذه العينات من الموقع 1 الى الموقع 300 وخاصة التقارب الكبير جدا بين منطقتي الشمال والوسط فضلا عن الاسباب التي ذكرت في اثناء المقارنة وجد ايضا ان السيطرة على الظروف البيئية اثناء تربية الحشرة بحيث كانت درجة الحرارة والرطوبة النسبية في جميع أقفاص التربية متساوية الى نهاية الجيل الثالث كان من الاسباب التي أدت الى ظهور التقارب بين عينات المناطق الثلاثة ، وعند إجراء المقارنة بين عينة الشمال Ch.b.N وعينة الوسط Ch.b.M في التسلسل النيوكليوتيدي من الموقع 300 الى الموقع 526 وهو نهاية التسلسل التتابعي الواضح الذي تم اخذه لغرض المقارنة بين عينات

مناطق العراق الثلاثة لجين DNA النواة White gene وجد ان التغيير الحاصل في التسلسل النيوكليوتيدي بشكل طفرات نقطية من نوع الحذف والاستبدال للمنطقتين قد انخفض الى حد كبير جدا في العينتين بالرغم من زيادة عدد المواقع التي تمت فيها المقارنة بين العينات اكثر مما هو عليه في المقارنة السابقة والمذكورة أعلاه ،اذ بلغ عدد طفرات الحذف في عينة الشمال 16 طفرة ،اما طفرات الاستبدال فكان عددها 18 طفرة بينما كان عدد الطفرات في عينة الوسط اعلى من ذلك العدد بقليل فلم يتجاوز عدد طفرات الحذف 17 طفرة والاستبدال 21 وهذا العدد قليل جدا مقارنة بالتسلسلات الأولية لهذه المنطقة ، وكذلك لوحظ ايضا عدم وجود اي مواقع مشتركة حدث فيها تغيير او اي نوع من الطفرات النقطية في هذا التسلسل للمنطقتين كما حدث سابقا في التسلسلات الأولية اما بالنسبة لعينة الجنوب Ch.b.S عند مقارنة تسلسلها النيوكليوتيدي في هذه المواقع مع تسلسل عيني الشمال والوسط وعلى التوالي نجد ان هناك اختلافا كبيرا جدا من ناحية حدوث الطفرات النقطية في تسلسلها النيوكليوتيدي ،اذ ان طفرات الحذف اختلفت ولم يعد لها وجود باستثناء موقعين اثنين فقط في هذا العدد الكبير من مواقع النيوكليوتيدات وهذان الموقعين هما 396 و 315 ،بينما كان عدد طفرات الاستبدال في تسلسل هذه المنطقة فقد وجد انه اقل بكثير مما هو عليه في منطقتي الشمال والوسط اذ بلغ عددها 13 طفرة وهذا العدد يمثل ما نسبته 13% من المجموع الكلي لعدد طفرات الحذف التي حدثت في التسلسل المتتابعي لهذه المنطقة من ناحية الجين White gene ، وتعد هذه النسبة قليلة جدا اذا ما قورنت بنسبة هذا النوع من الطفرات لمنطقتي الشمال والوسط كلا على حدة وهذا يضاف الى الادلة التي بينت ان منطقة الجنوب بعيدة جدا عن منطقتي الشمال والوسط في العراق عند دراسة التسلسل المتابعي للجين white gene الموجود في DNA الذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* للأسباب التي ذكرت اعلاه اثناء اجراء المقارنة بين عينات الشمال والوسط والجنوب ، ونظرا لان الدراسات العالمية السابقة حول دراسة التسلسل المتابعي للمنطقة الجينية white gene الموجودة في DNA نواة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم قليلة جدا ومحدودة ، ولان هذه الدراسة تعد الاولى من نوعها على المستوى المحلي لذلك استخدمت عينتان لجين نواة الذبابة الحلزونية للعالم القديم white gene والتي وجدت في نتائج احدى الدراسات العالمية المنشورة والمسجلة في بنك الجينات العالمي بالتسلسل JQ655221.1Ch.bezz و JQ655226.1Ch.bezz عام 2009 وأستخدمت عينتان لنفس الجنس Genus الذي تنتمي اليه ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم مثل ذبابة التدويد الثانوي *Chrysomya megacephala* والتي تاخذ التسلسلات العالمية المثبتة في بنك الجينات العالمي وهي التسلسل JQ655195.1Ch.mega والتسلسل JQ655199.1Ch.mega لغرض مقارنة التسلسل المتابعي لعينات النوعين مع واحدة من من عينات الذبابة الحلزونية للعالم القديم لمناطق العراق الثلاثة المدروسة الشمال والوسط والجنوب من ناحية التسلسل المتابعي لجزء من جين النواة white gene ، ولكي يتم دراسة التنوع الوراثي لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم في بعض

مناطق العراق الثلاثة أعلاه تم اختيار إحدى عينات هذه المناطق الأكثر تكراراً في تسلسل القواعد النتروجينية وهي عينة منطقة الجنوب Ch.b.S ، وعند إجراء المقارنة بين هذه العينة وعينة بنك الجينات الثانية العائدة للذبابة الحلزونية للعالم القديم التي تحمل التسلسل JQ655221.1Ch.bezz وكما هو واضح في الشكل (4) وجد أن هناك تطابقاً كبيراً جداً بينهما يتراوح بين 84-89% في التغيرات الوراثية والتنوع الجيني وفي عدد الطفرات النقطية Point Mutations ومواقع النيوكليوتيدات التي تحدث فيها هذه الطفرات في التسلسل التتابعي لكلا العينتين، ووجد أيضاً أن الفرق ما بين عينة الذبابة الحلزونية للعالم القديم التي تم اختيارها للمقارنة وعينة بنك الجينات الثانية العائدة لنفس النوع Species من ناحية عدد طفرات الحذف قليل جداً إذ بلغ حوالي 6 طفرات فقط إذ كان عددها في عينة المقارنة هو 6 فقط وجدت في المواقع 315،396،296،81،258،80، بينما بلغ عددها في عينة بنك الجينات العائدة للذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم 12 طفرة وجدت في المواقع 1،30،31،32،38،65،112،145،146،168،176 و211، أما الفرق في عدد طفرات الاستبدال بين العينتين هو 6 فقط حيث كان عددها في عينة المقارنة 97 وفي عينة بنك الجينات 91 على طول التسلسل النيوكليوتيدي للجين white gene الذي بلغ طوله في هذه الدراسة 526bp زوجاً قاعدياً، وقد وجد أيضاً خلال المقارنة بينهما أن معظم الاستبدال يحدث في نفس مواقع النيوكليوتيدات للتسلسل التتابعي في العينتين وهذه المواقع هي (2، 3، 8، 12، 14، 15، 16، 18، 24، 26، 39، 40، 43، 44، 46، 49، 50، 51، 52، 54، 55، 56، 57، 58، 59، 62، 67، 72، 77، 78، 79، 80، 85، 96، 101، 102، 104، 111، 117، 121، 125، 132، 133، 136، 139، 140، 141، 151، 182، 186، 193، 196، 197، 231، 232، 244، 283، 284، 348، 391، 394، 424 و430 وعند مقارنة عينة هذه الدراسة وهي العينة Ch.b.S مع العينة الأولى من عينات بنك الجينات العالمي العائدة للنوع Ch. megacephala وهي العينة التي تحمل التسلسل JQ655195.1Ch.mega وجد أن هناك استبدالاً في 45 قاعدة نتروجينية موزعة على طول التسلسل النيوكليوتيدي في المواقع الآتية : 20، 21، 30، 31، 41، 60، 72، 73، 80، 81، 92، 93، 95، 112، 133، 134، 145، 152، 154، 165، 168، 169، 176، 182، 187، 188، 191، 205، 206، 211، 220، 224، 230، 233، 296، 303، 305، 315، 334، 344، 348، 387، 523، 524، 526 ما بين النوع Ch.megacephala و Ch.bezzina وذلك لأنهما نوعين مختلفين ، أن النتائج التي توصلت إليها هذه الدراسة في مجال دراسة التسلسل التتابعي للجين White gene في DNA نواة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم تتفق بشكل كبير جداً مع ما جاء في الدراسة التي قام بها Ready وآخرون (2009) والتي تم من خلالها نتائجها تسجيل العديد من التسلسلات الجديدة العائدة لهذه الحشرة عالمياً في بنك الجينات ومنها العينات التي استخدمت للمقارنة مع عينات هذه الدراسة وهما

العينتان اللتان تحملان التسلسل JQ655226.1Ch.bezz. و JQ655221.1Ch.bezz. ، فضلا عن ان الباحثين توصلوا في تلك الدراسة الى ان هناك تنوعا وراثيا وجينيا بين المجتمعات السكانية المنفصلة جغرافيا للذبابة الحلزونية للعالم القديم في اسيا و افريقيا بسبب وجود الحواجز الطبيعية كالأنهار والبحار ومستويات الارتفاع المختلفة للجبال التي تفصل بين تلك المجتمعات وبالتالي تمنع هذه الحواجز من تدفق الجينات بين حشرات هذه المناطق ، وكذلك فان نتائج هذه الدراسة تتفق ايضا مع العديد من الدراسات السابقة التي اجريت للتمييز بين المجتمعات السكانية لأنواع مختلفة من الحشرات التي تنتمي لرتبة ثنائية الأجنحة Diptera من خلال دراسة التسلسل التتابعي لجين النواة White gene فيها ومنها الدراسة التي قام بها Susna وآخرون (1999) حول دراسة الطفرات التي تحدث في المنطقة الجينية white gene لجنس ذبابة الخل *Drosophila melanogaster* التي تؤثر في انتقال الصفات الوراثية المحددة للون العين في هذه الحشرة ، حيث استنتجوا ان هناك تغييرا في التسلسل النيوكليوتيدي لهذه الحشرة بشكل طفرات نقطية من نوع الاستبدال وخاصة في مواقع القاعدة النتروجينية الكوانين G لجزء من التسلسل النيوكليوتيدي لنتاج تضخيم قطعة من الجين white gene التي بلغ طولها 575bp زوجا قاعديا والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 0.9% وبأستخدام تقنية الـ PCR ، كذلك وجدوا ان التغيير الحاصل في التسلسل النيوكليوتيدي يؤثر بدرجة كبيرة جدا على تحديد لون العين سواء كان أحمر أو أبيض أو بني وبنسب متفاوتة لهذه الألوان من خلال الاستبدال في مواقع النيوكليوتيدات للتسلسل التتابعي لتلك الحشرة . ان كل ما توصلت اليه الدراسة الحالية من نتائج في هذا المجال والذي أدى الى اكتشاف تسلسلات جديدة لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم سوف يسجل في بنك الجينات ليضاف الى التسلسلات المسجلة سابقا في بنك الجينات العالمي لغرض توثيقها .

Figure 1 displays a multiple sequence alignment of the 5' region of the 18S rDNA gene. The alignment is shown in four blocks, each representing 100 positions (1-100, 110-200, 210-300, and 310-400). The sequences are color-coded: A (green), C (blue), G (red), and T (black). The alignment shows high conservation across the four accessions, with some minor variations in the 310-400 region.



شكل (4) مقارنة رصف Alignment القواعد النتروجينية بين المجتمعات السكانية للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* لقطعة من DNA النواة تشمل جزءا من الجين White gene، حيث أن الأرقام التسلسلية JQ655226.1 و JQ655221.1 تمثل عينتا بنك الجينات العائدة للنوع *Ch.bezziana*، أما JQ655195.1 و JQ655199.1 فأنها تمثل الأرقام التسلسلية لعينتا بنك الجينات العائدة للنوع *Ch.megacephala*، أما الرموز *Ch.b.N.* ، *Ch.b.M.* و *Ch.b.S.* فأنها تمثل عينات النوع *Ch.bezziana* التي جمعت من بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي .

4-1-5-2 المقارنة بين مجتمعات الذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* المجموعة من شمال العراق ووسطه وجنوبه من ناحية التسلسل التتابعي للجين Cytochrome b

أجريت دراسة التسلسل التتابعي للجين (CB) Cytochrome b الموجود في DNA الماييتوكوندريا للذبابة النوع *Ch.bezziana* والتي جمعت عيناتها من مناطق الدراسة ، اذ بلغ طول التسلسل التتابعي المميز والواضح لهذا الجين في هذه الدراسة حوالي 556bp زوجا قاعديا ، وذلك لتمييز التغيرات الوراثي الجزيئي والتنوع الجيني بين المجتمعات السكانية الثلاثة لهذه الحشرة في المناطق الثلاثة ، ولغرض إجراء الدراسة بين هذه المجتمعات من خلال مقارنة التسلسل النيوكليوتيدي لـ 9 عينات بواقع ثلاث عينات لكل مجتمع من المجتمعات السكانية للحشرة في كل منطقة أولا ومع عينات بنك الجينات العالمي ثانيا ، أعطيت عينات منطقة الشمال الرموز Ch.b.N1 ، Ch.b.N2 ، Ch.b.N3 وأعطيت عينات منطقة الوسط الرموز Ch.b.M1 ، Ch.b.M2 ، Ch.b.M3 ومنطقة الجنوب الرموز Ch.b.S1 ، Ch.b.S2 ، Ch.b.S3 ، وعند إجراء المقارنة بين عينات المناطق الثلاثة من ناحية التسلسل النيوكليوتيدي لها في المواقع من 1 الى 200 وجد ان هناك تغييرا في التسلسل التتابعي لها وهذا التغير أو الاختلاف كان بشكل طفرات نقطية Point Mutations من نوع الحذف والاستبدال ، اذ بلغ المجموع الكلي لها في جميع عينات مناطق الدراسة الثلاثة حوالي 203 طفرة حذف و 459 طفرة أستبدال توزعت على طول التسلسل النيوكليوتيدي لهذه العينات في مواقع النيوكليوتيدات من 1-200 وكما هو واضح في الشكل (5) والذي يمثل مقارنة نتائج التسلسل التتابعي بين عينات بعض مناطق العراق الثلاثة المدروسة في تسلسل القواعد النيتروجينية لجزء من جين دنا الماييتوكوندريا mtDNA للذبابة خلال هذه الدراسة والذي بلغ طوله في الأصل 761bp زوجا قاعديا ، اذ تم فيه توضيح نتائج عينات المناطق الثلاثة المدروسة ، فقد وجد اثناء المقارنة بين تسلسلات النيوكليوتيدات لعينات المناطق المدروسة ان طفرات الحذف حدثت في الموقع 1 لعينتي المنطقة الجنوبية فقط وهما S3 و S2 ، كما لوحظ ان طفرات الحذف في المواقع 122، 133، 139، 155، 156، 166 وجدت في جميع عينات الشمال N1، N2، N3 وفي واحدة فقط من عينات الجنوب وهي S3 ، كذلك وجد ان الحذف في الموقعين 112 و 111 ظهر في جميع عينات المناطق الثلاثة، كما لوحظ أيضا طفرات حذف في المواقع 15 و 16 لعينات الشمال N1 و N3 وجميع عينات الوسط M1، M2، M3 وعينات الجنوب S3 و S2 ، كذلك وجد ان طفرات الحذف في الموقعين 6 و 7 ظهرت في عينة واحدة فقط وهي عينة الشمال N1 ، وقد وجد ان هناك حذف في الموقع 143 لعينات الشمال N1 و N2 وجميع عينات الوسط M1، M2، M3 وعينات الجنوب S2 و S3 ، كما أوضحت النتائج ان أكبر عدد من طفرات الحذف في التسلسل النيوكليوتيدي من الموقع 1 الى الموقع 200 حدث في عينات المنطقة الجنوبية اذ بلغ عددها 81 طفرة ، في حين ان أقل عدد لهذا النوع من الطفرات وجد في عينات المنطقة

الوسطى حيث وصل الى 52 طفرة ويمكن اعتبار ذلك دليلا على أن هناك تقاربا وراثيا كبيرا بين المجتمعات السكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم في المنطقتين الشمالية والوسطى، لأنه وجد ان الفرق في عدد طفرات الحذف بين المنطقتين في أثناء المقارنة لهذا العدد من المواقع قليل جدا مقارنة مع عينات المنطقة الجنوبية والتي بلغ عددها 18 طفرة، بينما وصل الفرق بينها وبين عينات الجنوب الى حوالي 29 طفرة، وقد يعود ذلك بالدرجة الأولى الى بعد المسافة بين منطقتي الشمال والوسط من جهة والمنطقة الجنوبية من جهة اخرى أو قد يعود السبب الى ان أصل النوع الذي ظهر في الجنوب مختلف عن النوع الذي سجل في الشمال والوسط أختلافا جغرافيا Geographical race فضلا عن وجود حواجز طبيعية بين هذه المناطق تمنع تدفق الجينات بينها، اما بخصوص التغيرات في التسلسل التتابعي بشكل طفرات نقطية من نوع الاستبدال بين تسلسلات جين الحشرة لعينات مناطق الدراسة الثلاث فانه عند اجراء المقارنة بين التسلسلات النيوكليوتيدية لها من الموقع 1 الى الموقع 200 أيضا لوحظ ان هناك استبدالاً في عدد كبير جداً من المواقع وخاص في تسلسلات عينات المنطقة الجنوبية، اذ وجد ان هناك استبدالاً في 181 قاعدة نيتروجينية موزعة على طول التسلسل النيوكليوتيدي في 200 موقع، في حين ان الاستبدال لعينات الشمال وجد في 70 قاعدة نيتروجينية وكذلك وجد في 52 قاعدة لعينات المنطقة الوسطى، وقد لوحظ أن عدد من الطفرات النقطية من نوع الاستبدال في عينات المناطق الثلاثة ضمن التسلسل التتابعي لهذا العدد من المواقع قد حدث بشكل مشترك بينها في نفس المواقع النيوكليوتيدية لتسلسلات هذه المناطق وهذه المواقع 5، 19، 32، 43، 45، 105، 157، 168، 169، 170، 174، 178، كما لوحظ أيضا ان استبدالاً قد حدث في المواقع 1 و 2 لجميع عينات الشمال وعينة واحدة فقط للمنطقة الوسطى M3، في حين لم يظهر الاستبدال بالنسبة لهذه المواقع في اي من عينات الجنوب وكذلك لوحظت طفرات استبدال في المواقع النكلوتيدية 34 و 37 لجميع عينات الشمال والوسط وعينتان فقط من المنطقة الجنوبية وهما S3 و S2 وبأستمرار عملية المقارنة بين عينات مناطق الدراسة الثلاثة للمواقع النكلوتيدية من 1-200 لوحظ ان هناك تطابقا كبيرا بين عينات منطقتي الشمال والوسط من ناحية حدوث الاستبدال في نفس المواقع لكلا المنطقتين، بينما كان هناك أختلافا واضحا في المواقع التي حدثت فيها هذه الطفرات لعينات المنطقة الجنوبية، وقد يرجع ذلك كما ذكرنا سابقا في بداية دراسة التسلسل التتابعي للمناطق الثلاثة الى العديد من الأسباب وأهمها وجود الحواجز الطبيعية اذ ان معظم أجزاء المنطقة الشمالية وشمال المنطقة الوسطى هي مناطق جبلية او مناطق تلال ذات مستويات ارتفاع مختلفة تمنع تدفق الجينات بين مجتمعات هذه الحشرة وكذلك وجود الأنهار والغطاء النباتي الكثيف والبعد الجغرافي واختلاف الظروف البيئية، ان وجود هذه الأسباب مجتمعة ادى الى التقارب والتشابه الكبير بين عينات المنطقتين الشمالية والوسطى كما جعلتها بعيدا من ناحية التنوع الوراثي والجيني عن المنطقة الجنوبية وهذا ما تشير له النتائج الأولية لهذه الدراسة، عموما فقد لوحظت طفرات استبدالاً في المواقع 56، 57، 92، 172، 196 لعينات

الجنوب فقط ،اذ لم تلاحظ في اي من عينات الشمال والوسط بالنسبة لهذه المواقع ، ووجد ان هناك استبدالاً في المواقع النيوكليوتيدية 13،14 و18 في جميع عينات المنطقة الوسطى وعينة الشمال N1 ، بينما لم يكن لها وجود في اي من عينات الجنوب بالنسبة لهذه المواقع ، كما ان المقارنة بين تسلسل عينات المناطق في هذه الدراسة لمواقع النيوكليوتيدات من 1-200 قد بين لنا ان أقل عدد من الطفرات النقطية من نوع الاستبدال على مستوى أجيال الحشرة الثلاثة في جميع مناطق هذه الدراسة كان في عينة الشمال N3 التي تمثل الجيل الثالث للذبابة، حيث بلغ عدد طفرات الاستبدال في ذلك الجيل 33 طفرة وهو أقل عدد مقارنة مع اجيال الحشرة الأخرى في نفس المنطقة والمنطقتين الوسطى والجنوبية ، والسبب في ذلك هو السيطرة الكاملة بنسبة 100% على الظروف البيئية كدرجة الحرارة والرطوبة أثناء تربية الحشرة منذ بداية الجيل الثاني وحتى نهاية التجربة ، وعند اكمال دراسة التسلسل التتابعي للذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم بالنسبة لجين DNA الماييتوكوندرى mtDNA وهو الجين Cytochrome b(CB) في مواقع التسلسل النيوكليوتيدي من 200-556 وهو نهاية التسلسل التتابعي المميز والمدرّوس لهذا الجين في المناطق الثلاثة،اي تمت المقارنة هذه المرة بين العينات بزيادة عدد المواقع النيوكليوتيدية المستخدمة في هذه المقارنة الى 356 موقع ضمن التسلسل النيوكليوتيدي لعينات المناطق المدروسة كي يتسنى لنا مقارنة جميع عينات الدراسة مع عينتي بنك الجينات التي تمثل الأولى منها النوع *Ch.bezziana* والتي تحمل رقم التسلسل العالمي JQ655221.1Ch.bezz والعينة الثانية تمثل النوع *Ch.megacephala* والتي تحمل الرقم التسلسلي العالمي في بنك الجينات JQ655204.1Ch.mega ، وقد وجد في بداية المقارنة ان التغيير في التسلسل التتابعي المتمثل بالطفرات النقطية من نوع الحذف والاستبدال لجميع العينات كان مقارباً لما هو عليه في المقارنة الأولية لتسلسلات عينات مناطق الدراسة الثلاثة أو اقل من حيث عدد ومواقع النيوكليوتيدات التي تحدث فيها بالرغم من ان عدد المواقع التي تمت من خلالها المقارنة اصبح اكثر مما في المقارنة الأولى، وهذا دليل على ان السيطرة على الظروف البيئية اي ان هذه الظروف تكون متساوية في جميع المستعمرات السكانية للحشرة تؤدي الى حدوث تغيير أقل في التسلسل النيوكليوتيدي للعينات وخاصة ضمن عينات الجيل الثالث للدراسة الحالية ، فقد بلغ العدد الكلي لطفرات الحذف في تسلسل جميع العينات 241 طفرة على طول تسلسل 356 موقع توزعت بالشكل التالي : 93 طفرة في تسلسل عينات الشمال و68 في عينات الوسط و80 في عينات الجنوب ، اما طفرات الاستبدال فقد وصل عددها الى 352 بواقع 109 في عينات الشمال و130 لعينات الوسط و113 لعينات الجنوب ، وقد لوحظ في هذه المقارنة حدوث طفرات الاستبدال في بعض المواقع النيوكليوتيدية وبشكل متتالي وهذه المواقع هي 228، 229، 230، 231، 232، 233، 234، 312، 313، 314، 348، 349، 350 و351 لعينات المنطقة الشمالية N2، N3، اما بالنسبة لعينات الجنوب فقد وجد الاستبدال فيها بشكل متتالي في المواقع 328، 229، 230، 231، 313، 314، 315، 316 و317 للعينات S3

S2، ووجدت أيضا طفرات حذف في مواقع التسلسل النكلوتيدي 215، 225، 226، 242، 254، 260، 266، 274، 424، 441 و 462 لعينات الشمال كافة وعينة الوسط M1، كما لوحظ الحذف في المواقع 359، 367 و 373 لجميع عينات الشمال وعينة الوسط M1 وعينات المنطقة الجنوبية S3 و S2، وقد وجد ان هناك طفرات حذف في الموقعين 286 و 205 لعينات الشمال N1 و N2 وعينات الوسط كافة، كما لوحظت طفرات الحذف أيضا في التسلسل النكلوتيدي لعينات المنطقة الشمالية N1 و N2 وعينات الجنوب S3 و S2 عند المواقع 350، 404 و 529، ومن الملاحظات المهمة في أثناء إجراء هذه المقارنة لهذا العدد من المواقع النيوكلوتيدية هو ان أقل عدد من طفرات الحذف بين عينات المناطق الثلاثة كان في عينة الجنوب S1 اذ لم يحدث في تسلسلها غير طفرة واحدة فقط في الموقع 213، اما بالنسبة للتغير في التسلسل التتابعي لعينات مناطق الدراسة الثلاثة بخصوص الطفرات النقطية من نوع الاستبدال للمواقع النيوكلوتيدية من الموقع 200 الى الموقع 556 فقد وجد هذا النوع من الطفرات للمواقع 217، 218، 228، 229 و 238 لجميع عينات المنطقة الشمالية وعينات منطقة الوسط وعينة واحدة فقط في منطقة الجنوب والمتمثلة بـ S1، كما لوحظت طفرات استبدال في مواقع التسلسل النيوكلوتيدي 313، 314، 364، 370، 418، 454، 469 و 526 لعينتي الشمال N1 و N2 وجميع عينات الوسط وعينة واحدة فقط لمنطقة الجنوب وهي S1 وقد وجد أيضا استبدالاً في الموقع 283 لعينة الشمال N1 وعينات الوسط كما وجدت طفرة استبدال نقطية في الموقع 538 لتسلسلات عينات المنطقة الشمالية وعينتان من المنطقة الوسطى هما M3 و M1 وعينة S1 فقط للمنطقة الجنوبية، كذلك أشارت النتائج الى حدوث طفرات استبدال في ثلاثة من مواقع التسلسل النيوكلوتيدي لجميع عينات الدراسة اي بشكل مشترك بين عينات المناطق الثلاثة كافة وهذه المواقع هي 202، 397 و 544، ان حدوث هذا الكم الهائل من الطفرات النقطية وخاصة في عينات المنطقة الشمالية خلال التسلسل النيوكلوتيدي من الموقع 200 الى الموقع 556 يعود سببه الى احتمالية استخدام أنواع مختلفة من المبيدات الكيماوية لمكافحة هذه الذبابة فضلا عن الأسباب التي ذكرت في أكثر من مرة خلال هذه المقارنة، وعند إجراء المقارنة بين عينات ذبابة *Ch.bezziana* مع عينتين من بنك الجينات أحدهما تعود لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم والتي تحمل التسلسل العالمي JQ655221.1 *Ch.bezz* والعينة الثانية التي تعود الى نوع آخر من نفس الجنس تحمل التسلسل العالمي في بنك الجينات JQ655204.1 *Ch.mega* والمتمثلة بالنوع *Ch.megacephala*، اذ جرت المقارنة بينها وبين عينات الدراسة لمعرفة نسبة التطابق بينهما من خلال اختيار إحدى عينات الدراسة الأكثر تشابها مع العينات العالمية أي الأقرب إليها من ناحية حدوث تغيير في التسلسل النيوكلوتيدي والمتمثل بالطفرات النقطية من نوع الاستبدال فقط وذلك لعدم وجود حذف في تسلسل عينات بنك الجينات لجين دنا المايكوكوندريا mtDNA (CB) المستخدم في هذه المقارن، ان العينة التي تم اختيارها من عينات مناطق الدراسة الثلاثة هي العينة التي تمثل الجيل الثالث للمنطقة الوسطى

من العراق M3 كونها الأكثر تكرارا في تسلسل القواعد النتروجينية من ناحية التسلسل النيوكلوتيدي لعينتي بنك الجينات العالمي، ففي بداية المقارنة لوحظ ان مجموع الطفرات النقطية من نوع الاستبدال في تسلسل عينة بنك الجينات الأولى JQ655221.1Ch.b قد بلغ عددها حوالي 125 طفرة وفي تسلسل عينة بنك الجينات الثانية JQ655204.1Ch.mega بلغ عددها حوالي 118 طفرة استبدال بينما بلغ عددها في عينة الدراسة M3 التي أختيرت لغرض المقارنة مع العينات العالمية حوالي 116 طفرة، وعند المقارنة بين العينات الثلاثة وجد ان هناك استبدالاً في 82 قاعدة نتروجينية موزعة على طول التسلسل النيوكلوتيدي في المواقع الآتية :

3، 7، 9، 10، 13، 15، 16، 20، 22، 24، 40، 49، 50، 55، 61، 65، 66، 68، 75، 83

، 91، 92، 96، 97، 102، 104، 106، 110، 111، 112، 118، 133، 141، 143، 153، 156، 176، 180، 181، 183، 184، 204، 215، 242، 260، 266، 277، 283، 286، 287، 294، 295، 296، 297، 316، 326، 327، 345، 346، 357، 359، 372، 373، 395، 408، 409، 410، 424، 441، 445، 454، 462، 463، 475، 512، 520، 524، 535، 539، 553، 554، 556 ، اما من ناحية التشابه في المواقع التي يحدث فيها الاستبدال اي في نفس التسلسل للعينات الثلاثة، فقد وجد ان عدد طفرات الاستبدال التي تحدث في نفس المواقع كان 65 طفرة بين عينة المقارنة M3 والعينة JQ655221.1Ch.bezz بينما كان عددها بين عينة المقارنة والعينة JQ655204.1Ch.mega حوالي 67 طفرة اي ان عينة المقارنة M3 أقرب وأكثر تشابها الى عينة الذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* من عينة النوع *Ch.megacephala* ، اذن فان نسبة التطابق بين العينة الأولى لبنك الجينات وعينة المقارنة M3 هي 84% وبينها وبين العينة العالمية الثانية هي 81% عند دراسة نتائج التسلسل التتابعي للجين Cytocrome b (CB) الموجود في DNA المايكوبلازما mtDNA لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم ، وهذا يتفق مع الدراسة التي قام بها Hall وآخرون (2009) حول التنوع الجيني والوراثي بين أربع مجتمعات سكانية منفصلة جغرافيا لهذه النوع في كل من العراق وايران والعربية السعودية وسلطنة عمان والتي توصلوا فيها الى ان هناك تنوع جيني في 4 مواقع على طول التسلسل النيوكلوتيدي للجين CB الذي كان طوله 650bp زوجا قاعديا عند مقارنة النتائج مع عينات بنك الجينات العالمية وهذه المواقع هي 284، 509، 637 و 646 ، وان نسبة التطابق بين عينات المناطق الأربعة وعينات بنك الجينات العالمي والتي استخدمت للمقارنة CB.bezz01 ، CB.bezz02 ، CB.bezz04، CB.bezz17، CB.bezz19 قد بلغت الـ 89% وان جميع عينات المجتمعات السكانية للذبابة متقاربة جدا عند مطابقة تسلسلها النيوكلوتيدي مع تسلسل عينة بنك الجينات CB.bezz01 (Ready وآخرون، 2009)، ان نتائج دراستنا هذه تتفق ايضا مع نتائج الدراسة التي أجراها Chong وآخرون (2014) لتحليل نتائج تضخيم المنطقتين الجينيتين في دنا المايكوبلازما

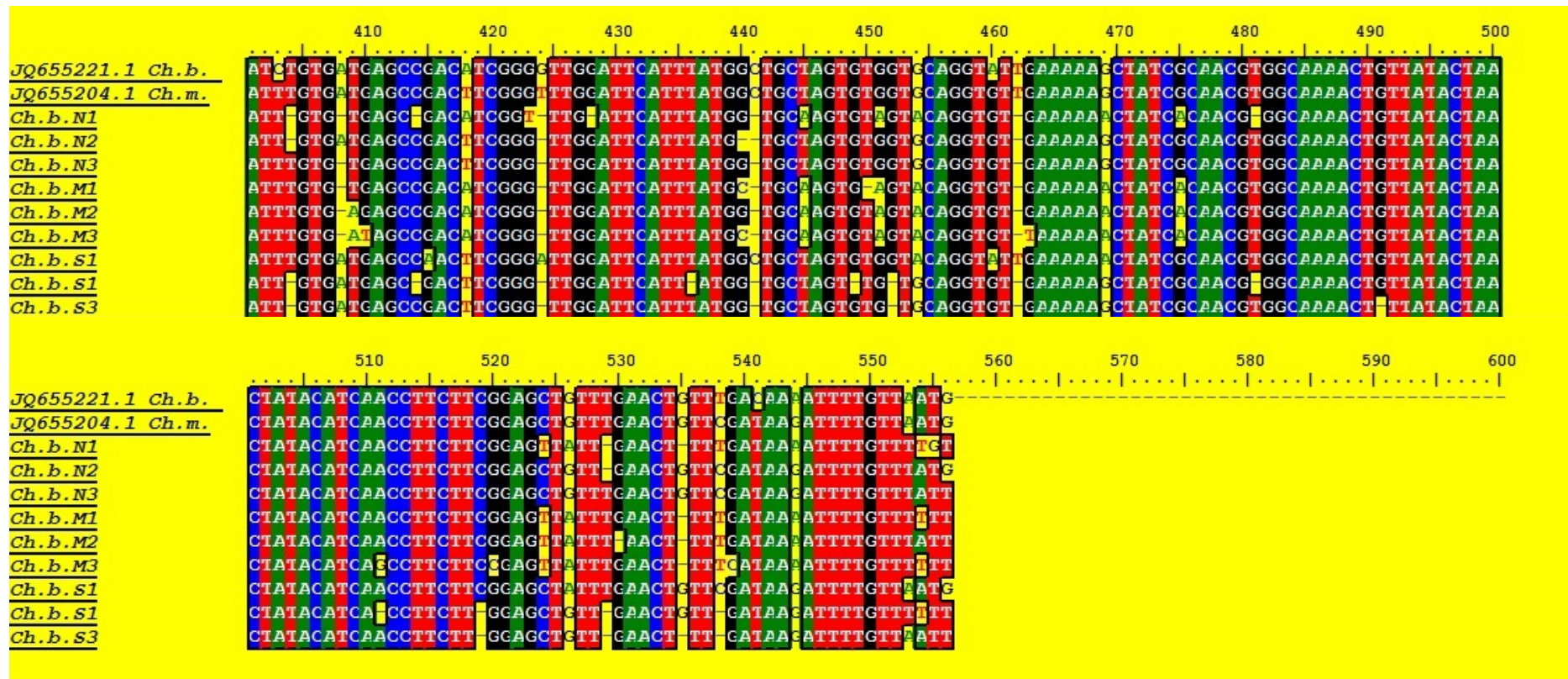
mtDNA وهما COI و COII للذبابة النوع *Ch.megacephala* المجموعة عيناتها من خمسة مناطق جغرافية مختلفة في ماليزيا هي بينانغ وسيلانغور وباهانج وجوهر وصباح ، اذ كان طول التسلسل التتابعي لتلك الدراسة والنتائج عن ترانصف نيوكلووتيدات عينات الحشرة في المناطق الخمسة هو 1240bp زوجا قاعديا للجين COI و 1140bp زوجا قاعديا للجين COII ، اذ تم ايداع جميع التسلسلات الناتجة عن تلك الدراسة في بنك الجينات تحت ارقام الاضافة التي امتدت من التسلسل JX027548 الى التسلسل JX027581 ، وقد أستنتجوا ان انتظام التسلسلات المتعددة للتتابعات النيوكلووتيدية في الجين COI والجين COII لعينات الذبابة *Ch.megacephala* الـ 34 في تلك الدراسة أظهر التسلسل النيوكلووتيدي في اثنين من المواقع وهما الموقع 952 والموقع 1120 ، وتوصلوا أيضا الى حدوث أستبدال انتقالي بين القواعد النتروجينية في كلا الموقعين حيث تم أستبدال السايروسين C مع الثايمين T واستبدال الكوانين G مع الادنين A على التوالي،بالأضافة الى أنهم لاحظوا تقاربا بين منطقتي بينانغ وسيلانغور من ناحية تعدد طفرات الأستبدال فيهم مما يجعل هاتين المنطقتين أكثر مناطق الدراسة الخمسة من ناحية التنوع الوراثي والجيني للمنطقتين الجينيتين COI و COII ، ومن الدراسات العالمية الأخرى التي اتفقت نتائج دراستنا هذه مع نتائجها من ناحية جينات دنا المايوتوكوندرية mtDNA هي الدراسة التي قام بها Lessinger وآخرون (2000) حول دراسة الجينوم الأساسي للمايوتوكوندرية في ذبابة الدودة الحلزونية للعالم الحديث *Cochliomyia hominivorax* بعد تصميم التسلسل الكامل لجينوم المايوتوكوندرية فيها وكذلك تحديد طول هذا الجينوم الذي بلغ 16022bp زوجا قاعديا وهذا يتوافق بشكل نموذجي مع الدنا المايوتوكونديري mtDNA في جميع الحشرات التي تنتمي لرتيبة ذات القرون القصيرة Brachycera ، وقد وجد في تلك الدراسة ان الحامض الأميني الثانوي السيرين هو شفرة البدء لتكوين البروتين بالنسبة للمنطقة الجينية COI ولكنه غير تام في شفرات الأنهاء بالنسبة للجين COII ، كما أستنتج الباحثون خلال تلك الدراسة ومن خلال نسبة التطابق بين مواقع النيوكلووتيدات للجينات NADH4 و NADH5 الموجودة في DNA المايوتوكوندرية لذبابة الدودة الحلزونية والتطور لأسلاف هذه الحشرة ان جميع الأنواع العائدة للجنس *Cochliomyia* تعود لاصل واحد والتي تنتمي الى تحت عويلة الذباب الازرق calypteratae والتي بدورها تنتمي الى رتيبة قصيرات القرون Brachycera ، علما ان جميع ما توصلوا اليه عند دراسة التسلسل التتابعي لهذه الحشرة استند بالدرجة الأساس الى وجود عدد كبير من الطفرات النقطية في التسلسل النيوكلووتيدي لجيني المايوتوكوندرية COI و COII لهذه الحشرة من نوع الأستبدال والحذف، علما ان تلك الدراسة ناقشت كيفية تحديد وتشخيص مواقع النيوكلووتيدات على جينوم المايوتوكوندرية باستخدام تقنية تباين اطوال قطع الدنا الـ RFLP والتي تعتمد في عملها على انزيمات القطع بوجود المعلم او المؤشر Probe ، ان التسلسل التتابعي الأكثر شيوعا حاليا هو تسلسل وحدات الجين COI وهذا يعكس حقيقة واحدة وهي ان هذا الجين قد اصبح واحد من

المؤشرات الجزيئية الأكثر استخداما في الدراسات التطورية لعلم الحشرات التطبيقي (Zhang و Hewitt ، 1996)، ان المحتوى الجيني للبروتين المشفر في جينوم الماييتوكوندريا للذبابة الحلزونية للعالم الحديث *Co.hominivorax* يحتوي على 13 جين بينما عثر بالمقابل في الجينوم الأساسي للمنطقة غير المشفرة في هذه الحشرة على 22 جين للحامض النووي الناقل tRNA و اثنين للحامض النووي الرايبوسومي rRNA على نحو محدد في منطقة السيطرة Contral region للدنا الماييتوكونديري mtDNA الموجود بين جينات الحامض النووي الناقل tRNA والرايبوسومي rRNA تحت الوحدة الصغرى 12s والذي كان حجمه الأصلي 1175bp زوجا قاعديا (Lessinger وآخرون، 2000) ومن الدراسات العالمية الأخرى حول التسلسل التتابعي لجين الماييتوكونديري Cytochrome b (CB) بشكل يتفق مع ما جاء في دراستنا هذه الدراسة التي قام بها Ready وآخرون (2009) لتمييز أو معرفة التغيرات الوراثية الجزيئية بين عدد كبير من المجتمعات السكانية للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* في قارتي آسيا وأفريقيا باستخدام تقنية الـ PCR وبوجود نوعين من البودائ المتخصصة بالاتجاه الامامي Forward والمعاكس Reverse ، اذ كان حجم قطعة الجين CB المستخدمة في تلك الدراسة 761bp وقد استنتجوا في تلك الدراسة ان هناك تنوعا وراثيا جينيا في تسع تسلسلات نيوكلوتيدية فقط لهذا الجين عند مقارنة تسلسل عينات تلك الدراسة التي جمعت من عدد كبير من بلدان آسيا وأفريقيا مع تسلسل العينات العالمية في بنك الجينات ، اذ ذكروا ان التسلسلات التي ظهر فيها تنوع وراثي كبير امتدت من التسلسل CB3-bezz1001 الى CB3-bezz1009 وهذا التنوع الجيني ناتج عن وجود تغير في بعض مواقع التسلسل النيوكلوتيدي بشكل طفرات نقطية من نوع الاستبدال والحذف وذلك لأن العينات جمعت من مناطق منفصلة جغرافيا اي توجد بينها حواجز طبيعية كثيرة كالجبال والبحار والأنهار التي تمنع تدفق الجينات فضلا عن بعد المسافة الجغرافية واختلاف الظروف البيئية بين البلدان التي شملتها تلك الدراسة ، اما البلدان التي وجد تقارب وراثي بين عيناتها وعينات بنك الجينات فكانت نسبة التطابق بينها تتراوح بين 76-96% حيث تمكن الباحثون في تلك الدراسة من رسم شجرة التقارب الوراثي التي اثبتت ان عينات الحشرة تعود الى اصل واحد وانحدرت من باقي أنواع جنس الـ *Chrysomya* ، ومن المعروف حاليا ان التسلسل الكامل للحامض النووي الماييتوكونديري mtDNA يوجد فقط في احد عشر نوعا من المفصليات Arthropoda بما فيها سداسية الأرجل Hexapoda (Flook وآخرون ، 1995 ؛ Lewis وآخرون ، 1995 ؛ Spanos وآخرون ، 2000) وصنف القشريات Crustacea (Crease ، 1999)، ان المعلومات الوراثية الجينية في بنك الجينات عن الأنواع التي تنتمي الى تحت قسم Calypterate والتي تنتمي اليها بعض انواع ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم تشير الى وجود تطابق تام جدا مع ست مناطق رئيسية لجينوم الماييتوكونديري Mitochondrial genome بما فيها التسلسلات الجزيئية لجينات الوحدات الثانوية المشفرة

للمنطقتين الجينيتين COI و COII وكذلك وحدات الرنا الرايبوسومي rRNA الصغيرة 12s والكبيرة 16s في جين دنا المايكوكوندريا Cytochrome b(CB) ، بالإضافة الى تسلسلات منطقة السيطرة بين تلك الجينات، أستندت الدراسة الحالية للتسلسل التتابعي النيوكلوتيدي لذباب الدودة الحلزونية للعالم القديم من ناحية الجين Cytochrome b(CB) الى الدراسات العالمية التي ذكرناها أعلاه من خلال مقارنة نتائجها مع نتائج تلك الدراسات لكي نبين مدى تطابق هذه النتائج مع نتائج دراسة التسلسل التتابعي لهذه الحشرة فيما يخص جين النواة White gene وكذلك مع نتائج الدراسة الوراثية الكمية وبالتالي يمكن ان نوصي بتطبيق تقنية الحشرات العقيمة (SIT) للقضاء أو السيطرة على المخاطر الطبية والبيطرية للذبابة في العراق وفي حالة عدم وجود تغاير وراثي كبير وواضح بين عينات مناطق الدراسة الثلاثة الشمال والوسط والجنوب وهذا ما أثبتته نتائج الدراسة الحالية .

[illegible]

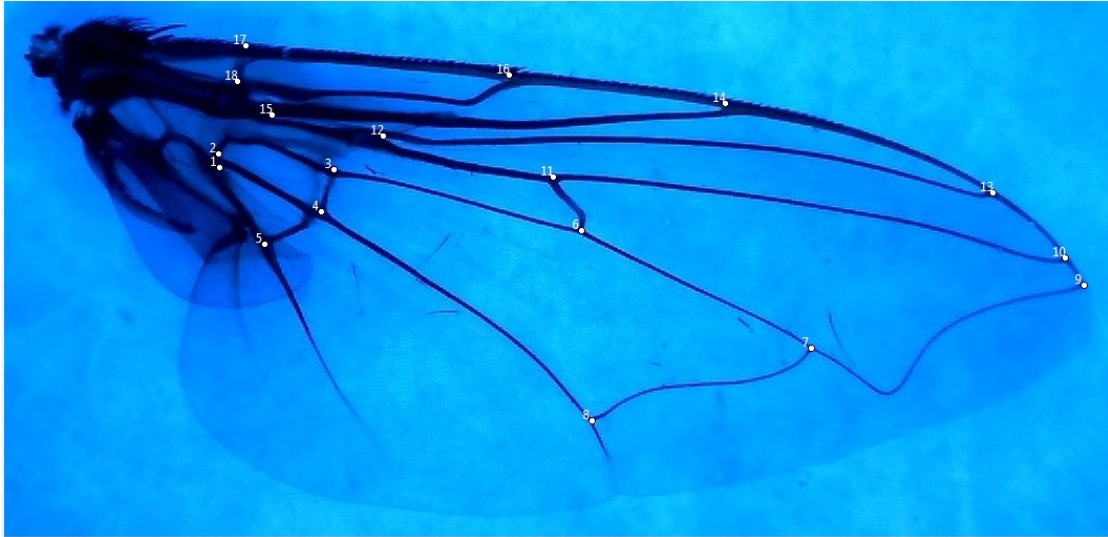
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
<i>JQ655221.1 Ch.b.</i>	TTCAAGCCACTGTACGCAATGCCACGTTCAATGACCCCA	AAAAAATACAAAGAGTGAATCAA	TTATACAGATTIATCATTGGGIAAATCTCAAAA							
<i>JQ655204.1 Ch.m.</i>	TTCAAGCCACTGTGCGCAATGCCACGTTCTATGACCCCA	AAAAAATACAAAGAGTGAATCAA	TTATACAGATTIATCATTGGGIAAATCTCAAAA							
<i>Ch.b.N1</i>	TTCAAGCCACTGTG	GGTTGCCAC	TTCAATGACCCCA	AAAAAATACAA	GAGTGAATCAA	TTATACAGATTIATCATTGGGIAAATCTCAAAA				
<i>Ch.b.N2</i>	TCCAAGCCACTGTG	CGCTGCCAC	TTTTATGACCA	AAAAAATACAA	GGTGAATCAA	TTATACAGATTIATCATGGGIAAATCTCAAAA				
<i>Ch.b.N3</i>	TCCAAGCCACTGTG	GGCTGCCAC	TTCTAGACCCCA	AAAAAATACAA	AGGTGAATCAA	TTATACAGATTIATCATGGGIAAATCTCAAAA				
<i>Ch.b.M1</i>	TTCAAGCCACTGTG	GCTATGCCAC	TTCAATGACCCCA	AAAAAATACAA	GAGTGAATCAA	TTATACAGATTIATCATGGGIAAATCTCAAAA				
<i>Ch.b.M2</i>	TTCAAGCCACTGTG	GCTATGCCAC	TTCAATGACCCCA	AAAAAATACAA	GAGTGAATCAA	TTATACAGATTIATCATGGGIAAATCTCAAAA				
<i>Ch.b.M3</i>	TTCAAGCCACTGTG	CTATGCCAC	TTCAATGACCCCA	AAAAAATACAA	GAGTGAATCAA	TTATACAGATTIATCATGGGIAAATCTCAAAA				
<i>Ch.b.S1</i>	TCCAAGCCACTGTG	GCGCAATGCCAC	TTCTATGACCCCA	AAAAAATACAA	GAGTGAATCAA	TTATACAGATTIATCATGGGIAAATCTCAAAA				
<i>Ch.b.S1</i>	TCCAAGCCA	TGGG	CCTGCCAC	TTCTTACCCCA	AAAAAATACAA	GGTGAATCAA	TTATACAGATTIATCATGGGIAAATCTCAAAA			
<i>Ch.b.S3</i>	TCCAAGCCA	TGTG	GCTGCCAC	TTCTAGACCCCA	AAAAAATACAA	GAGTGAATCAA	TTATACAGATTIATCATGGGIAAATCTCAAAA			
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
<i>JQ655221.1 Ch.b.</i>	IACIATTAATAGGCGTTCCGACGTTTAAAGGTCTCTCAGGTGGT	CAGAGAAAACGTTIAGCCTTGCTTCGGAAGCTCTAACAGATCCACCTTTATTG								
<i>JQ655204.1 Ch.m.</i>	IACIATTAATAGGAGTTCCGACGTTTAAAGGTCTCTCAGGTGGT	CAGAGAAAACGTTIAGCCTTGCTTCGGAAGCTCTAACAGATCCACCTTTATTG								
<i>Ch.b.N1</i>	IACIATTAATAGGTA	CCGACGTTTAAAGGTCTCTCAG	TGGT	CAGAGAAAACGTTIAGCCTTGCTTC	GAAGCTCTAACAGATCCACCTTTATTG					
<i>Ch.b.N2</i>	IACIATTAATAGGTA	TCCGACGTTTAAAGGTCTCTCAG	TGGT	CAGAGAAAACGTTIAGCCTTGCTTC	GAAGCTCTAACAGATCCACCTTTATTG					
<i>Ch.b.N3</i>	IACIATTAATAGGTA	TCCGACGTTTAAAGGTCTCTCAG	TGGT	CAGAGAAAACGTTIAGCCTTGCTTC	GAAGCTCTAACAGATCCACCTTTATTG					
<i>Ch.b.M1</i>	IACIATTAATAGGTA	CCGACGTTTAAAGGTCTCTCAG	TGGT	CAGAGAAAACGTTIAGCCTTGCTTC	GAAGCTCTAACAGATCCACCTTTATTG					
<i>Ch.b.M2</i>	IACIATTAATAGGTA	CCGACGTTTAAAGGTCTCTCAG	TGGT	CAGAGAAAACGTTIAGCCTTGCTTC	GAAGCTCTAACAGATCCACCTTTATTG					
<i>Ch.b.M3</i>	IACIATTAATAGGTTA	CCGACGTTTAAAGGTCTCTCAG	TGGT	CAGAGAAAACGTTIAGCCTTGCTTC	GAAGCTCTAACAGATCCACCTTTATTG					
<i>Ch.b.S1</i>	IACIATTAATAGGAGTTCCGACGTTTAAAGGTCTCTCAG	TGGT	CAGAGAAAACGTTIAGCCTTGCTTC	GAAGCTCTAACAGATCCACCTTTATTG						
<i>Ch.b.S1</i>	IACIATTAATAGGTA	TCCGACGTTTAAAGGTCTCTCAG	TGGT	CAGAGAAAACGTTIAGCCTTGCTTC	GAAGCTCTAACAGATCCACCTTTATTG					
<i>Ch.b.S3</i>	IACIATTAATAGGTA	TCCGACGTTTAAAGGTCTCTCAG	TGGT	CAGAGAAAACGTTIAGCCTTGCTTC	GAAGCTCTAACAGATCCACCTTTATTG					



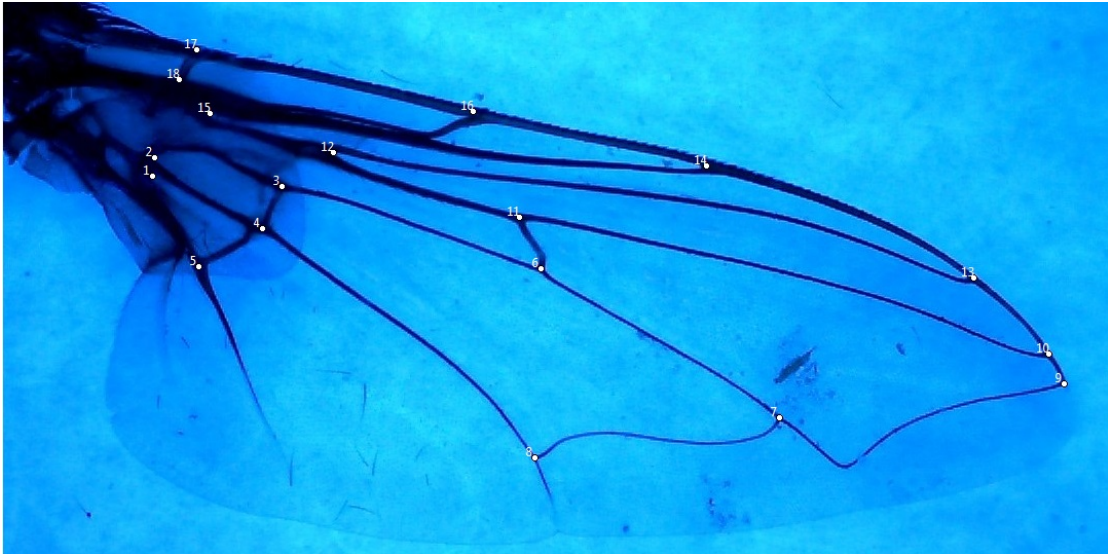
شكل (5) مقارنة رصف Alignment القواعد النتروجينية بين المجتمعات السكانية للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* لقطعة من الدنا المايكوندري تشمل جزءا من الجين Cytochrom b، JQ655204.1 و JQ655221.1 تمثل عينتي بنك الجينات وهما *Ch. bezziana* و *Ch. megacephala* [N1, N2, N3 و M1, M2, M3 و S1, S2, S3 تمثل عينات *Ch. bezziana* المجموعة من شمال العراق ووسطه وجنوبه وعلى التوالي] .

2-4 الدراسة الوراثية الكمية Quantitative genetic study

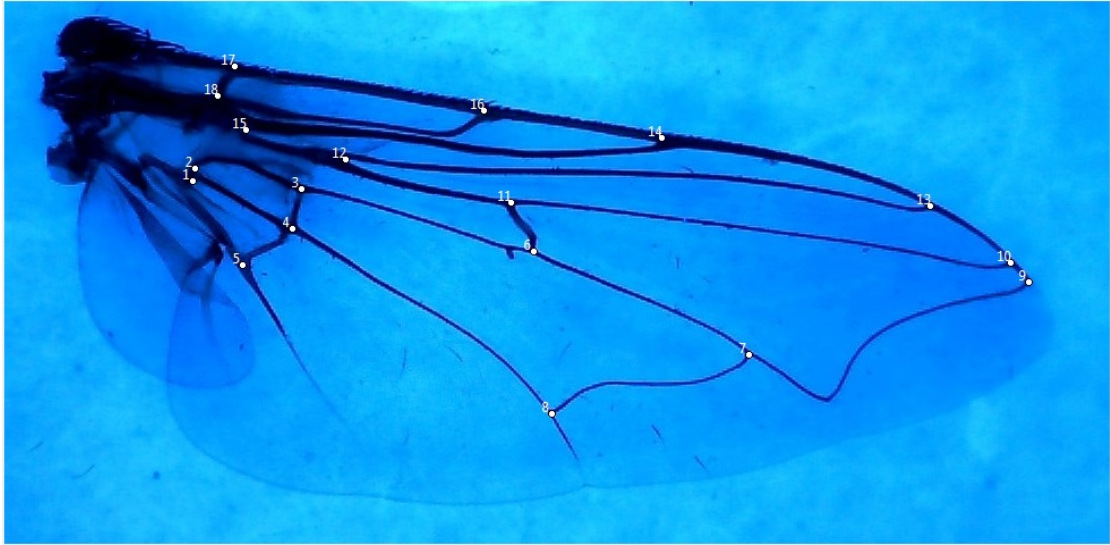
1-2-4 دراسة التباير الوراثي الكمي لشكل الجناح وحجمه لذكور الجيل الأول والثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Chrysomya bezziana* والتي جمعت عيناتها من بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه بأستعمال المقياس الهندسي للشكل المظهري للجناح : Geometric Morphometric of Wing



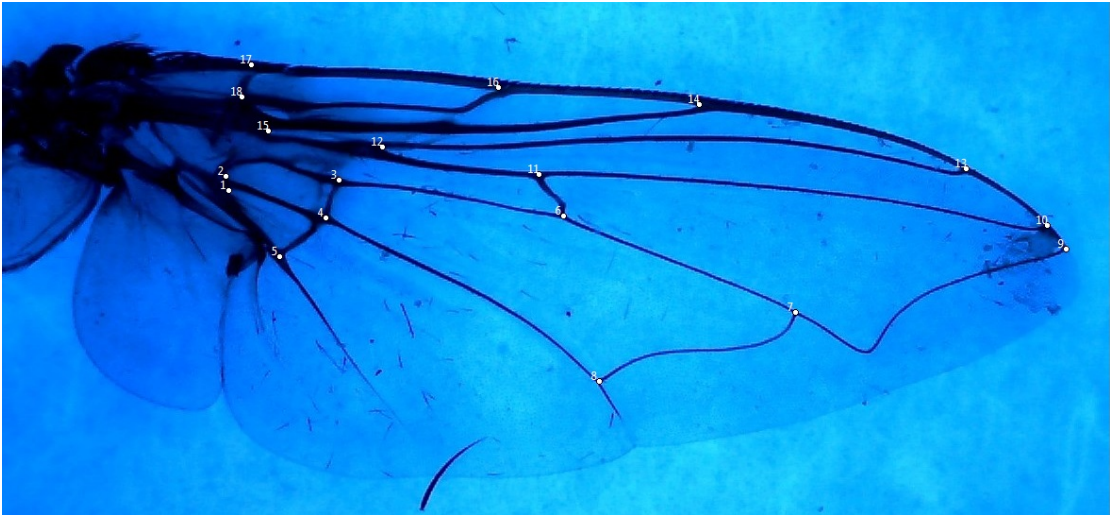
صورة (11) الجناح الأيمن لذكر الذبابة الحلزونية *C.bezziana* من المجتمع السكاني شمال العراق موضحا عليها احداثيات المعالم والتي عددها 18 معلم ، قوة التكبير X45



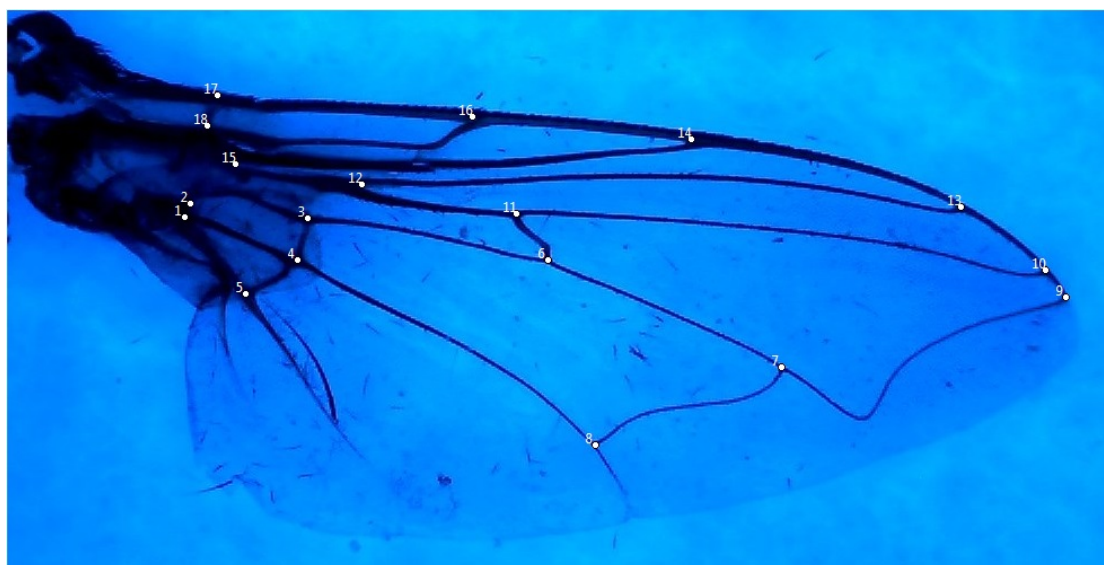
صورة (12) الجناح الايمن لأنثى الذبابة الحلزونية *C.bezziana* من المجتمع السكاني شمال العراق موضحا عليها احداثيات المعالم والتي عددها 18 معلم ، قوة التكبير X45



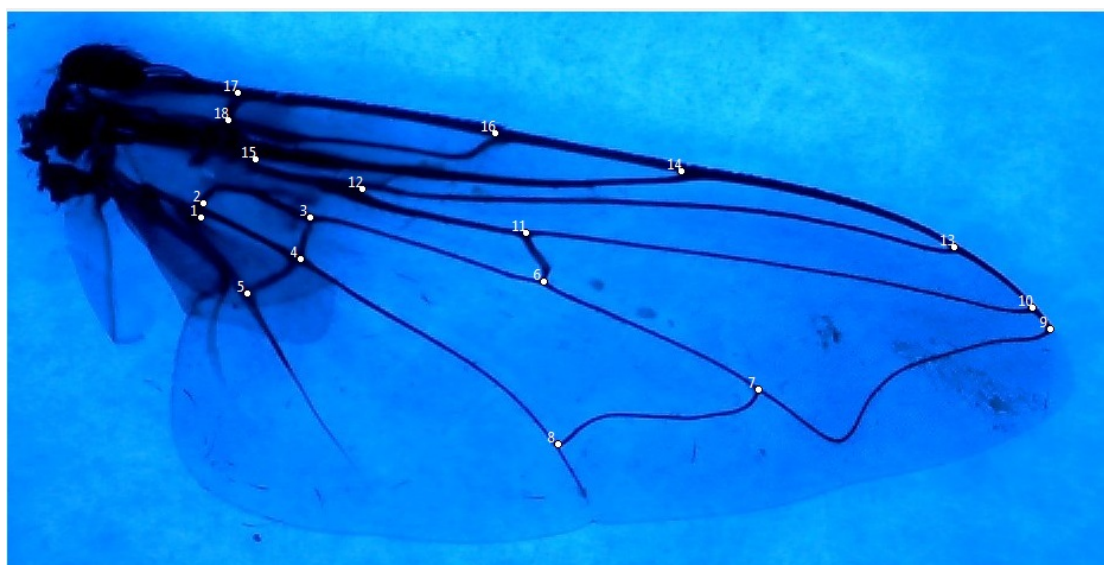
صورة (13) الجناح الأيمن لذكر الذبابة الحلزونية *C. bezziana* من المجتمع السكاني وسط العراق موضحا عليها احداثيات المعالم والتي عددها 18 معلم ، قوة التكبير X45



صورة (14) الجناح الأيمن لأنثى الذبابة الحلزونية *C. bezziana* من المجتمع السكاني وسط العراق موضحا عليها احداثيات المعالم والتي عددها 18 معلم ، قوة التكبير X45

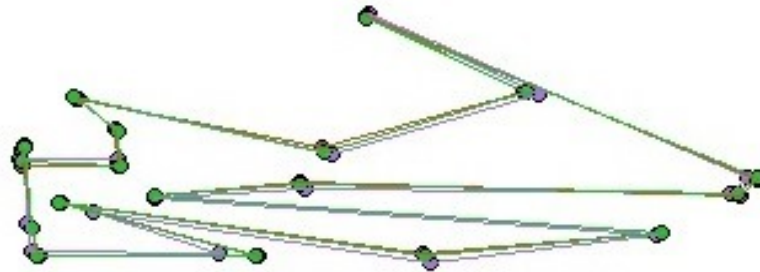


صورة (15) الجناح الأيمن لذكر الذبابة الحلزونية *C.bezziana* من المجتمع السكاني جنوب العراق موضحا عليها احداثيات المعالم والتي عددها 18 معلم ، قوة التكبير X45



صورة (16) الجناح الأيمن لأنثى الذبابة الحلزونية *C.bezziana* من المجتمع السكاني جنوب العراق موضحا عليها احداثيات المعالم والتي عددها 18 معلم ، قوة التكبير X45

تم دراسة التغيرات الوراثية الكمية لشكل وحجم الجناح في ذكور وإناث الجيل الأول والثالث لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم للعينات المدروسة من بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه ، وذلك باستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه ، إذ إن هذا النظام يعتمد بالدرجة الأساس على تثبيت أحداثيات للمعالم Landmark coordinate بين تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة لجناح الحشرة وبواسطة تلك المعالم يتم حساب الحجم المركزي لكل جناح ، إن الحجم المركزي للجناح Centriod Size يعرف على أنه مقدار متساوي القياس يتم حسابه من الجذر التربيعي لمجموع مربعات المسافة التي تقع بين مركز المضلع وكل معلم من المعالم التي تثبت على الجناح (Bookestein، 1991) ، علماً إن هذه الدراسة تعد الأولى من نوعها في العراق إذ تم فيها استخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه في الكشف عن التغيرات الوراثية بين المجتمعات السكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم ، وهذه الدراسة تأتي استكمالاً للدراسة الحالية الخاصة بالوراثية الجزيئية لهذه الذبابة ، إذ أن الغرض الأساسي من إجراء هاتين الدراستين هو معرفة أن هذا النوع الذي جمعت عيناته من بعض مناطق العراق تعود لأصل واحد لاتفصله حدود جغرافية وبالتالي يمكن تطبيق تقنية الحشرات العقيمة للسيطرة على هذه الآفة ، بدلاً من الاستمرار في استخدام المبيدات الكيميائية لما لها من تأثيرات خطيرة جداً على النظام البيئي ، فضلاً عن أنها مكلفة جداً لدول العالم وخاصة بلدان العالم الثالث وكذلك قلت فعالية تلك المبيدات في السيطرة الكاملة على الآفات الحشرية ومنها هذا النوع من الذباب (الطويل ، 2005)، وتوضح الصورتان (15 و 16) الجناح الأيمن للذكور ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم وإناثها على التوالي والمجموعة عيناتها من شمال العراق/السليمانية مثبت عليها أحداثيات المعالم بين تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة ونهايات العروق الطولية، وتمثل الصورتان (17 و 18) الجناح الأيمن للذكور والإناث على التوالي و التي جمعت من وسط العراق/ ديالى مثبت عليها أحداثيات المعالم بين تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة ونهايات العروق الطولية ، بينما تمثل الصورتان (19 و 20) الجناح الأيمن للذكور والإناث على التوالي والتي جمعت من جنوب العراق/ ميسان كذلك مثبت عليها أحداثيات المعالم بين تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة ونهايات العروق الطولية، إذ تم عن طريق استخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه والكشف عن التغيرات الوراثية الكمية بين المجتمعات السكانية للمناطق الثلاثة المدروسة باختلاف أماكن تواجدها اعتماداً على شكل الجناح وحجمه ، إذ تمت المقارنة خلال هذه الدراسة بين الذكور والإناث للمجتمعات السكانية الثلاثة بواسطة تحليل المركبات الأساسية Principal Component Analysis ، حيث أجريت المقارنة أيضاً بين عينات المجتمع السكاني الواحد في كل منطقة من مناطق الدراسة الثلاثة بواسطة التحليل التمييزي Discriminant Analysis وبالأعتماد على الحجم المركزي للجناح .



$$X = \text{من } -0.239 \text{ الى } 0.445 , Y = \text{من } -0.086 \text{ الى } 0.158$$

شكل (6) معدل احداثيات المعالم للجناح الأيمن من ثلاثة مجتمعات سكانية لذكور الجيل الأول للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* والتي عددها 18 معلم لكل جناح ، يمثل اللون البنفسجي واللون الجوزي واللون الأخضر المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي .



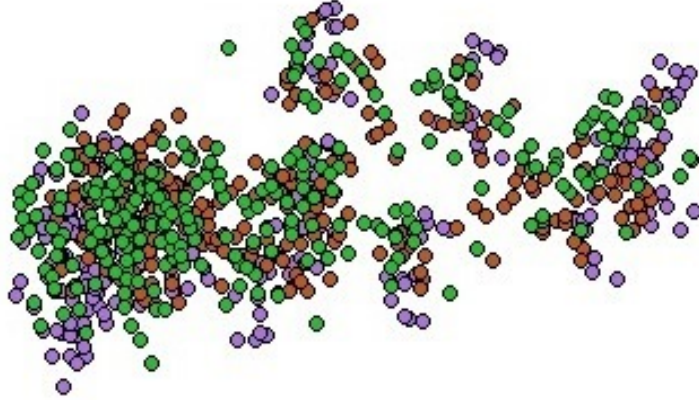
$$X = \text{من } -0.237 \text{ الى } 0.445 , Y = \text{من } -0.084 \text{ الى } 0.157$$

شكل (7) معدل احداثيات المعالم للجناح الأيمن من ثلاثة مجتمعات سكانية لذكور الجيل الثالث للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* والتي عددها 18 معلما لكل جناح ، يمثل اللون الجوزي والأخضر والأسود المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي .

يوضح الشكل (6) معدل أحداثيات المعالم لـ 45 جناحا ايمن لذكور الجيل الأول لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم، اذ يمثل اللون البنفسجي معدل أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا أيمن لذكور الذباب من شمال العراق/السليمانية، واللون الجوزي يمثل معدل أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا أيمن لذكور وسط العراق/ديالى، اما اللون الأخضر فيمثل أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا ايمن لذكور جمعت من جنوب العراق/ميسان، وعند إجراء المقارنة بين الأجنحة باستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه عن طريق وحدة MOG التي توجد ضمن محتويات البرنامج الجاهز المتاح على الموقع الإلكتروني العالمي [p:http://www.mpl.ird.morphometrics](http://www.mpl.ird.morphometrics) وكما هو موضح في الشكل اعلاه نلاحظ ان اجنحة ذكور الجيل الأول للذبابة ولمناطق العراق الثلاثة متطابقة بدرجة كبيرة في معظم المعالم المؤشرة باستثناء المعالم المرقمة 8، 10، 11، 15 و 16 فلم يتم بينها تطابق تام لجميع أجنحة الذكور للمجتمعات السكانية الثلاثة، كما يوضح الشكل (7) معدل أحداثيات المعالم لـ 45 جناحا ايمن لذكور الجيل الثالث لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم، اذ يمثل اللون الجوزي معدل أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا أيمن لذكور الذباب من شمال العراق/ محافظة السليمانية، ويمثل اللون الأخضر معدل أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا أيمن للذكور من وسط العراق/محافظة ديالى، في حين يمثل اللون الأسود أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا أيمن للذكور من جنوب العراق/ محافظة ميسان، وعند إجراء المقارنة بين الأجنحة اليمنى لعينات المناطق الثلاثة باستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح بواسطة وحدة MOG، نلاحظ ان الجناح الأيمن لذكور الجيل الثالث لحشرات مناطق العراق الثلاثة متطابقة بشكل تام في معظم المعالم المؤشرة باستثناء المعالم المرقمة 7، 8 و 16 والتي لم يحدث بينها تطابق تام بالنسبة لحشرات منطقتي الشمال والجنوب، بينما حدث تطابق تام بين الأجنحة اليمنى للجيل الثالث في حشرات الشمال والأجنحة اليمنى لحشرات الوسط، ان التغيرات في تطابق المعالم المثبتة على اجنحة حشرات المناطق الثلاث الشمال والوسط والجنوب ربما يعود الى عدة أسباب منها كمية الغذاء واختلاف الظروف البيئية في المناطق التي جمعت منها عينات الدراسة، اذ بلغ معدل درجات الحرارة السنوية للعام 2015 والعام 2016 في مناطق العراق الثلاثة الشمال/السليمانية والوسط/ديالى والجنوب/ميسان 20.2°C ، 23.04°C و 26.08°C على التوالي، بينما بلغ معدل كمية الأمطار السنوية للعامين المذكورين أعلاه في المناطق الثلاثة على التوالي 42.132cm ، 49.103cm و 33.058cm ، اما معدل الرطوبة النسبية للمناطق الثلاث في العامين المذكورين أيضا فقد بلغ 39.23% ، 42.16% و 42.41% على التوالي وبالتحديد في المناطق التي جمعت منها عينات الحشرة في تلك المحافظات، حيث تم تحديد مواقع الجمع بواسطة جهاز تحديد المواقع الـ GPS، اذ كانت أحداثيات مناطق الدراسة الثلاثة المسجلة على النحو التالي، محافظة السليمانية ($34^{\circ} 34' 55.99'' \text{N}$ $45^{\circ} 18' 38.47'' \text{E}$)، محافظة

ديالى (33° 53' 01.39 N 44° 50' 54 . 42" E) ومحافظة ميسان (32° 02' 09.08" N 46° 52' 39.05"E)، ان نتائج هذه الدراسة تتفق بنسبة كبيرة جدا مع نتائج الدراسة الأولية التي قام بها Hall وآخرون (2014) حول استخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه لتحديد المجتمعات السكانية لذباب الدودة الحلزونية للعالم القديم من خلال المقارنة بين الأجنحة اليمنى لـ 22 حشرة معلقة بواسطة دبابيس صغيرة على لوح في المتحف الوطني البريطاني في لندن و22 جناحا ايمن تعود لنفس نوع الحشرة والتي جمعت عيناتها بشكل يرقات ناضجة أو مكتملة النمو من جروح الحيوانات المصابة بهذه الحشرة في بعض مناطق قارة أفريقيا ليتم تربيتها في المختبر وبعدها تقارن عند وصولها الى دور الكاملات مع عينات المتحف ، حيث تم التعرف في تلك الدراسة على الصفات المظهرية التشخيصية والتي سبق وان وصفها Hall (2008) في دراسة أخرى لنفس نوع الذبابة ، وقد لاحظ الباحثون في الدراسة أعلاه عدم تطابق بعض المعالم المثبتة على الجناح الأيمن لعينات حشرة المتحف وعينات الحشرة التي تم تربيتها في المختبر والتي جمعت عيناتها من بعض البلدان الأفريقية، فقد ذكروا ان عدم التطابق التام بين العينات سببه الأساسي تأثير الظروف البيئية في البلدان التي جمعت منها عينات الحشرة، ان تأثير الظروف البيئية على التغير في شكل الجناح وحجمه للجيلين الأول والثالث للذبابة خلال هذه الدراسة أتضح من خلال تأثير تلك الظروف على التغير في عينات الجيل الثالث فقط، فقد لاحظنا في الجيل الأول ان تطابق المعالم لم يكن بشكل كامل كما يتضح في الشكل (6) بينما في الجيل الثالث اصبح هناك تطابق بشكل تام تقريبا كما هو موضح في الشكل (7) والسبب في ذلك هو ان عينات الحشرة المجموعة من بعض مناطق العراق الثلاثة لم تكن تأقلمت بعد مع الظروف المختبرية حيث ان السيطرة على الظروف البيئية في المختبر أثناء تربية الحشرة في الجيل الأول أقل مما هي عليه في الجيل الثالث الذي شهد السيطرة التامة على الظروف البيئية بنسبة عالية جدا في جميع المجتمعات السكانية للحشرة لذلك تأقلمت جميع حشرات مناطق الدراسة الثلاثة وبالتالي كان هناك تطابق تام تقريبا بين المعالم المثبتة على الأجنحة اليمنى للحشرات في هذا الجيل، بينما لم يكن التطابق تاما بين الأجنحة اليمنى لذكور الجيل الأول من الحشرة للمناطق الثلاثة المدروسة .

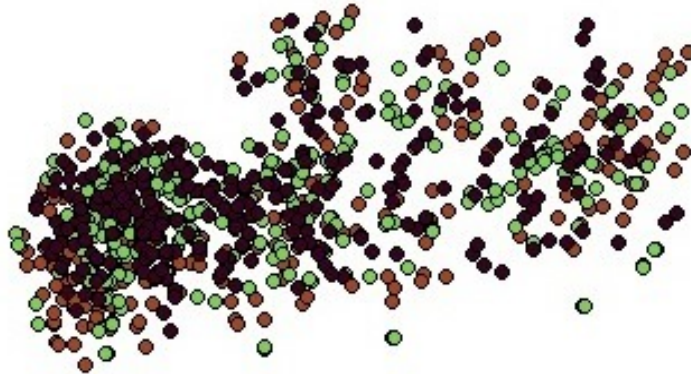
15 ●
15 ●
15 ●



$Y = -373.448$ إلى 165.552 ، $X = -379.448$ إلى 613.552

شكل (8) الشكل الانتشاري لتوزيع ذكور الجيل الأول للذبابة الحلزونية *Ch. bezziana* على طول التحليلين العاملين الأول والثاني PCs لأحداثيات فضاء الظل المشتقة من أحداثيات المعالم الأصلية لكل جناح والتي عددها 18 معلما (اللون البنفسجي ، الجوزي والأخضر يمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي) .

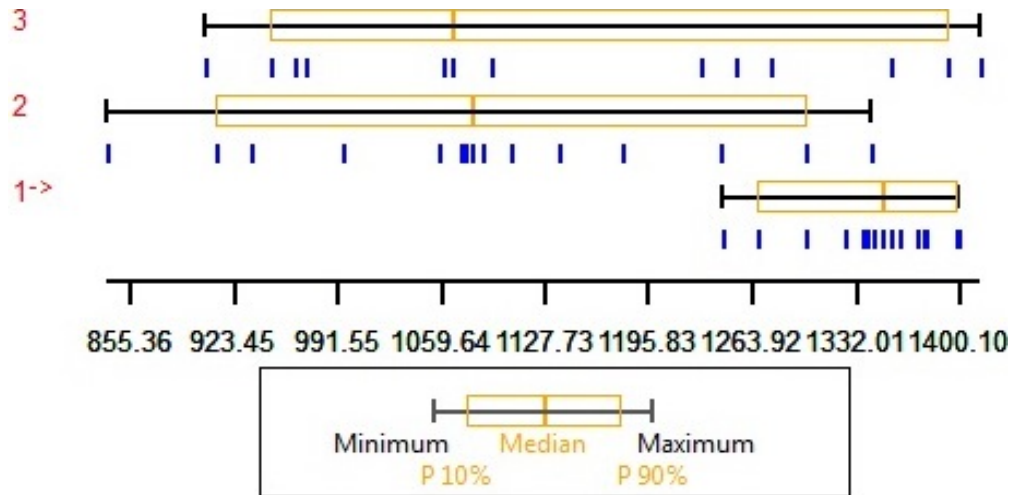
15 ●
15 ●
15 ●



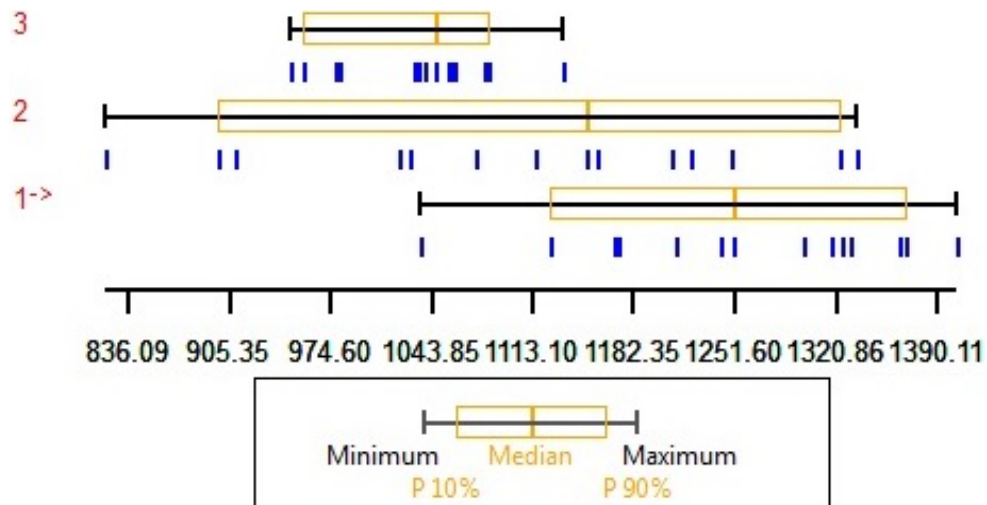
$Y = -368.236$ إلى 143.764 ، $X = -373.236$ إلى 611.764

شكل (9) الشكل الانتشاري لتوزيع ذكور الجيل الثالث للذبابة الحلزونية *Ch. bezziana* على طول التحليلين العاملين الأول والثاني PCs لأحداثيات فضاء الظل المشتقة من أحداثيات المعالم الأصلية لكل جناح والتي عددها 18 معلما (اللون الجوزي ، الأخضر والأسود يمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي) .

يوضح الشكل (8) طريقة توزيع ذكور *Ch.bezziana* التي عيناتها من بعض مناطق العراق الثلاثة وذلك عن طريق تحليل المركبات الأساسية لأحداثيات المعالم المثبتة على الأجنحة اليمنى بين تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة ونهايات العروق الطولية هي 18 معلم لكل جناح، اذ تمثل النقاط باللون البنفسجي عينات الشمال والنقاط ذات اللون الجوزي تمثل عينات الوسط ، بينما النقاط المؤشرة باللون الأخضر المنطقة الجنوبية، كما يوضح الشكل (9) طريقة توزيع ذكور الجيل الثالث للذبابة الحلزونية للعالم القديم التي جمعت من بعض مناطق العراق الثلاثة المذكورة في أعلاه وذلك عن طريق استخدام تحليل المركبات الأساسية لأحداثيات المعالم التي ثبتت على الأجنحة اليمنى للحشرات بين تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة ونهايات العروق الطولية والمتمثلة بـ 18 معلماً، اذ يمثل اللون الجوزي عينات الشمال ويمثل اللون الأخضر عينات الوسط ، اما اللون الأسود فيمثل عينات المنطقة الجنوبية، نلاحظ من طريقة توزيع العينات كما هو موضح في الشكلين أعلاه ان العينات القريبة من بعضها البعض في كلا الجيلين الأول والثالث تعود لأصل جغرافي واحد ، في نفس الوقت يوجد تباين في شكل وحجم الجناح في العينات البعيدة عن بعضها البعض وكما هو موضح أيضاً في الشكل أعلاه، ان سبب التباين الحاصل في شكل وحجم أجنحة عينات المناطق الثلاثة المدروسة والبعيدة عن بعضها البعض قد يعود الى اختلاف الظروف البيئية العراقية الثلاثة التي جمعت منها عينات الحشرة والتي تؤثر أيضاً على حجم الحشرة، ومن الدراسات العالمية العديدة في مجال استخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه لدراسة تباين شكل جناح الحشرات وحجمه باختلاف مناطق تواجدها، الدراسة التي أجراها Casper وآخرون (2010) باستخدام نظام المقياس الهندسي لدراسة التباين في شكل وحجم جناح الفراشة (*Parage.aegeria* (Linn.) وتأثير اختلاف العوامل البيئية في تطورها، اذ تم تحليل البيانات في تلك الدراسة بالأعتماد على البرامج الجاهزة التي تحلل بيانات المعالم وتحولها الى أرقام مقاربة للنتائج المطلوبة بنسبة كبيرة جداً ومنها البرنامج الجاهز لتحليل أحداثيات المعالم الموضوعية على أجنحة أنواع من الحشرات وهذا البرنامج متاح على الموقع الإلكتروني <http://www.life.bio.sunysb.edu/morh/> والذي يمكن من خلاله تحليل الأشكال الكبيرة جداً من الحزم الأحصائية في مخطط التشتت Scatteplot لعينات الحشرات المدروسة مثل حزم Rohlf الأحصائية (Claude ، 2008)، وقد توصل الباحثون في تلك الدراسة الى ان هناك تبايناً في 4 عينات من مجموع 8 عينات لعدد من المجتمعات السكانية المدروسة ، كما هو الحال في هذه الدراسة ذكروا ان سبب التباين في شكل جناح الحشرة وحجمه أعلاه هو اختلاف الظروف البيئية في المناطق التي جمعت منها عينات تلك الحشرة كذلك وجدوا ان هناك تقارباً في بعض العينات وتباعداً في عينات أخرى بعد تحليل المركبات الأساسية لأحداثيات المعالم المثبتة على أجنحة الفراشة بين تقاطع العروق الطولية مع العروق المستعرضة ونهايات العروق الطولية .



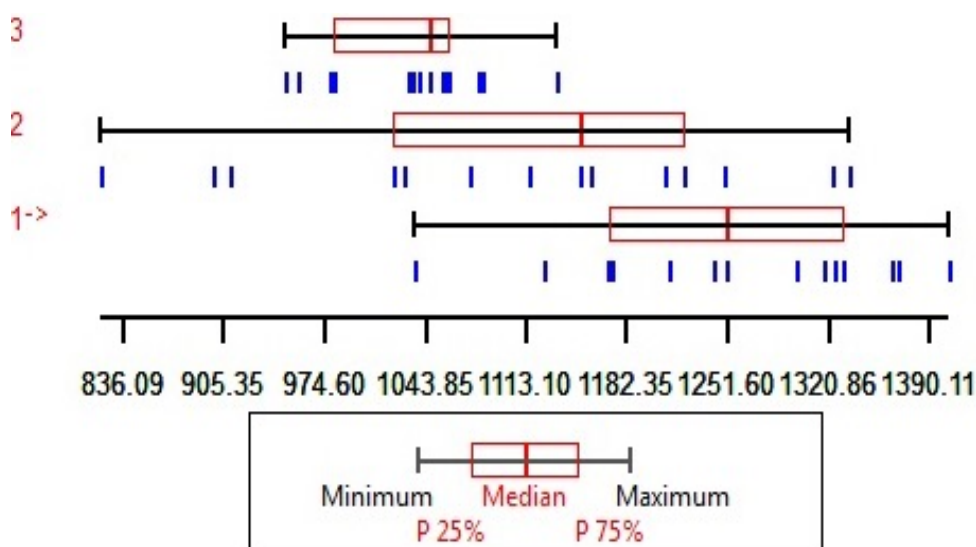
شكل (10) الحجم المركزي Centriod size للأجنحة اليمنى لذكور الجيل الأول للذبابة الحلزونية *Ch. bezziana* تبعا للمجتمع السكاني المنتميه له ، اذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 10% الى الربع 90% ، الخطوط الزرقاء تحت كل صندوق تمثل الأجنحة ، الارقام 1 ، 2 و 3 في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي .



شكل (11) الحجم المركزي Centriod size للأجنحة اليمنى لذكور الجيل الثالث للذبابة الحلزونية *Ch. bezziana* تبعا للمجتمع السكاني المنتميه له ، اذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 10% و الربع 90% ، الخطوط الزرقاء تحت كل صندوق تمثل الأجنحة ، الارقام 1 ، 2 و 3 في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي .



شكل (12) الحجم المركزي Centriod size للأجنحة اليمنى لذكور الجيل الأول للذبابة الحلزونية *Ch. bezziana* تبعا للمجتمع السكاني المنتميه له ، اذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 25% و الربع 75% ، الخطوط الزرقاء تحت كل صندوق تمثل الأجنحة ، الأرقام 1 ، 2 و 3 في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي .



شكل (13) الحجم المركزي Centriod size للأجنحة اليمنى لذكور الجيل الثالث للذبابة الحلزونية *Ch. bezziana* تبعا للمجتمع السكاني المنتميه له ، اذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 25% و الربع 75% ، الخطوط الزرقاء تحت كل صندوق تمثل الأجنحة ، الأرقام 1 ، 2 و 3 في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي .

جدول (8) مقارنة الحجم المركزي للجناح الأيمن بين ذكور الجيل الأول لثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال ووسط وجنوب العراق .

Group	M.CS	St.D	Va.	F	P	T	P	A.D
N	1332.8	42.4	1793.2	N-M = 9.7	N-M = 0.00	N-M = 6.7	N-M = 2.8	N-M = 239.7
M	1093.2	131.8	17370.5	N-S = 15.2	N-S = 8.3	N-S = 4.6	N-S = 8.9	N-S = 201.4
S	1131.4	165.3	27324.4	M-S = 1.6	M-S = 0.41	M-S = 0.7	M-S = 0.5	M-S = 38.2

جدول (9) مقارنة الحجم المركزي للجناح الأيمن بين ذكور الجيل الثالث لثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال ووسط وجنوب العراق .

Group	M.CS	St.D	Va.	F	P	T	P	A.D
N	1246.5	98.9	9781.4	N-M = 2.2	N-M = 0.14	N-M = 2.8	N-M = 0.01	N-M = 130.1
M	1116.4	147.7	21808.2	N-S = 4.2	N-S = 0.01	N-S = 7.2	N-S = 7.1	N-S = 205.6
S	1040.8	48.4	2337.8	M-S = 9.3	M-S = 0.00	M-S = 1.9	M-S = 0.1	M-S = 75.6

M.CS : Mean centroid size : معدل الحجم المركزي للأجنحة

St.D : Standard Deviation : الانحراف القياسي

Va. : Variance : التباين

F : قيمة F المحسوبة

P: Probability : الاحتمالية

T : قيمة T المحسوبة

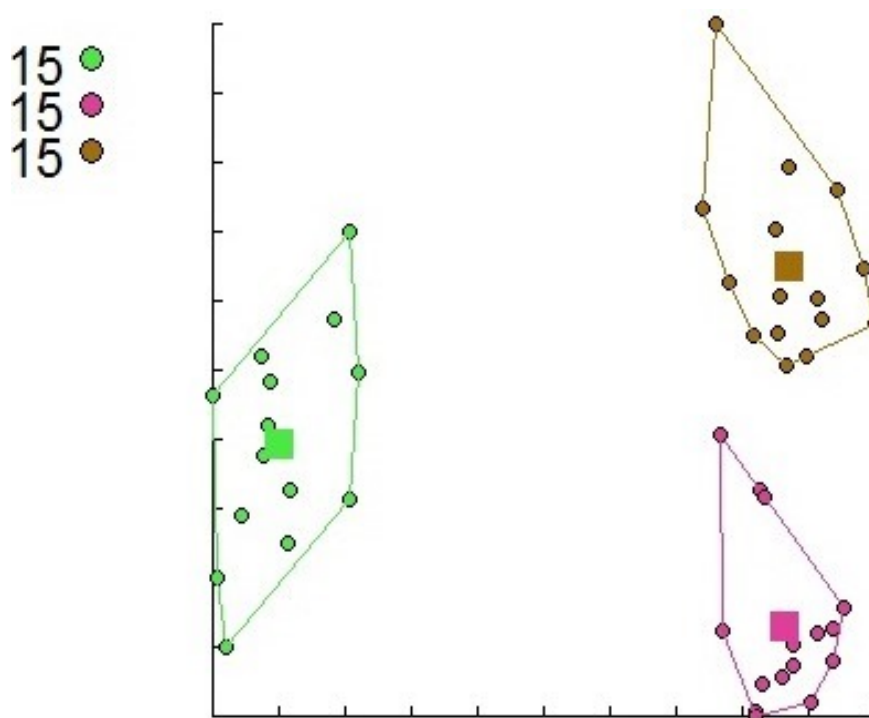
A.D : Absolute Differences : الاختلافات المطلقة

N : North ، شمال العراق ، M : Medial ، وسط العراق ، S : South ، جنوب العراق

يوضح الشكل (10) نتائج تحليل التباين في الحجم المركزي Centriod Size للجناح الأيمن لذكور الجيل الأول النوع *Ch.bezziana* لعينات جمعت من بعض مناطق العراق الثلاثة الشمال/السليمانية، الوسط/ديالى، الجنوب/ميسان، بينما يوضح الشكل (11) نتائج تحليل التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور الجيل الثالث لها من بعض مناطق العراق الثلاثة المذكورة أعلاه، اذ يمثل كل صندوق كما هو موضح في الشكلين أعلاه المجموعة الوسطية موزعة بين الربيع 10 والربيع 90 ، وتمثل الخطوط الزرقاء اللون التي توجد أسفل كل صندوق الأجنحة اليمنى للعينات الداخلة في الدراسة، ونلاحظ من الشكلين المذكورين في أعلاه وجود تباين بسيط في الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور الجيل الأول والثالث لذباب الدودة الحلزونية للعالم القديم باختلاف المناطق التي جمعت منها العينات ، يوضح الشكل (12) نتائج تحليل التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور الجيل الأول لهذه الذبابة التي جمعت من بعض مناطق العراق الثلاثة ، ولكن في هذا الشكل كانت المجموعة الوسطية موزعة بين الربيع 25 والربيع 75 ،بينما يوضح الشكل (13) نتائج تحليل التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور الجيل الثالث لها ألا أنه في هذا الشكل أيضا كانت المجموعة الوسطية موزعة بين الربيع 25 والربيع 75 ، نلاحظ أيضا من هذين الشكلين وجود تباين بسيط في الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور الجيل الأول والثالث للذبابة باختلاف المناطق التي جمعت منها عينات هذه الحشرة، حيث وصل معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور الجيل الأول وكما موضح في الجدول (8) 1332.8، 1093.2 و 1131.4 مايكرون للمجتمعات السكانية في مناطق العراق الثلاثة الشمالية، الوسطى والجنوبية وعلى التوالي، اما قيمة التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن فقد بلغت 1793.2، 17370.56 و 27324.4 للمجتمعات السكانية في مناطق الدراسة الثلاثة المذكورة في أعلاه، وقد تم في هذه الدراسة استخدام اختباري F و T لغرض المقارنة بين حشرات المجتمعات السكانية في المناطق الثلاثة المدروسة بالنسبة لمعدل الحجم المركزي للجناح الأيمن في تلك العينات، وعند مقارنة ذكور الجيل الأول لعينات المنطقة الشمالية مع ذكور الجيل الأول لها من عينات المنطقة الوسطى في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن وجد ان قيمة $F=9.7$ وقيمة $P=0.00$ في حين ان قيمة $T=6.7$ وقيمة $P=2.8$ ، اما قيمة الاختلاف المطلقة AD فقد وجد أنها تساوي 239.7 ، اذ لا توجد هناك فروق معنوية كبيرة بين حشرات المنطقة الشمالية وحشرات المنطقة الوسطى ، اما عند مقارنة ذكور الجيل الأول للذبابة لعينات المنطقة الشمالية مع ذكور الجيل الأول لعينات المنطقة الجنوبية نجد ان قيمة $F=15.2$ وقيمة $P=8.3$ بينما كانت قيمة $T=4.6$ وقيمة $P=8.9$ وقيمة الاختلاف المطلقة A.D تساوي 201.4 ، اذ تشير النتائج الى عدم وجود فروق معنوية بين حشرات هاتين المنطقتين في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن، وعند مقارنة ذكور الجيل الأول لعينات المنطقة الوسطى مع ذكور الجيل الأول لعينات المنطقة الجنوبية تبين ان قيمة $F=1.6$ وقيمة $P=0.41$ ، بينما بلغت قيمة $T=0.7$ وقيمة $P=0.5$ اما قيمة الاختلاف المطلقة فكانت تساوي

38.2 ،اي عدم وجود فروق معنوية أيضا بين هاتين المنطقتين في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن ، ويتضح لنا مما سبق ان ذكور الذبابة *Ch.bezziana* التي جمعت عيناتها من مناطق العراق الثلاثة الشمال والوسط والجنوب تعود لأصل جغرافي واحد Geographical race وهذا يتفق مع ما جاء في نتائج الدراسة الوراثية الجزيئية، اما بخصوص ذكور الجيل الثالث فقد وضع الجدول (9) ان معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور حشرات المنطقة الشمالية والوسطى والجنوبية 1246.5، 1116.4 و 1040.8 على التوالي، اما قيم التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور المجتمعات السكانية الثلاث المذكورة في أعلاه فكانت تساوي 9781.4، 21808.2 و 2337.8 على التوالي، وقد أستخدم في هذا الجيل أيضا كما في الجيل الأول اختباري F و T للمقارنة بين ذكور الجيل الثالث لحشرات مناطق الدراسة الثلاثة الشمال والوسط والجنوب في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن، وعند إجراء المقارنة بين ذكور المنطقة الشمالية وذكور المنطقة الوسطى كانت قيمة $F=2.2$ وقيمة $P=0.14$ ، بينما كانت قيمة $T=2.8$ وقيمة $P=0.01$ ، اما قيمة الاختلاف المطلقة A.D فقد بلغت 130.1، ويتضح من ذلك انه لا توجد فروق معنوية بين ذكور حشرات منطقتي الشمال والوسط ، اما عند إجراء المقارنة بين ذكور حشرات المنطقة الشمالية وذكور حشرات المنطقة الجنوبية فإن قيمة $F=4.2$ وقيمة $P=0.01$ ، في حين ان قيمة $T=7.2$ وقيمة $P=7.1$ ، وقيمة الاختلاف المطلقة كانت 205.6، أن هذه النتائج تبين عدم وجود فروق معنوية بين ذكور حشرات المنطقة الشمالية والمنطقة الجنوبية ، اما عند إجراء المقارنة بين عينات ذكور المنطقة الوسطى وذكور المنطقة الجنوبية وجد ان قيمة $F=9.3$ وقيمة $P=0.00$ ، في حين كانت قيمة $T=1.9$ وقيمة $P=0.1$ ، أن مقدار قيمة الاختلاف المطلقة تساوي 75.6 ، يتضح هنا من هذه النتائج عدم وجود فروق معنوية أيضا بين ذكور الجيل الثالث للذبابة الحلزونية للعالم القديم المجموعة عيناتها من بعض مناطق العراق الثلاثة في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن، وهذا دليل آخر على أنها تعود الى أصل جغرافي واحد وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الوراثية الجزيئية للحشرة، ان استخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه يعد من الأدوات ذات الأهمية البالغة لمعرفة وفهم التغيرات الوراثي الكمي بين المجتمعات السكانية للحشرات باختلاف المناطق التي تتواجد فيها ، وقد كان هناك العديد من الدراسات العالمية حول استخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه في تمييز المجتمعات السكانية المختلفة للحشرات ومنها الدراسة التي قام بها Zahiri وآخرون (2006) حول استخدام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح لدراسة التغيرات الوراثي الكمي بين المجتمعات السكانية لحشرة عثة حفار ساق الأرز (*Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera:Crambidae) في شمال ايران ،اذ قام الباحثون بأستخدام 15 معلما وضعت على تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة للأجنحة الأمامية وكذلك أستخدموا 10 معالم وضعت أيضا على تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة للأجنحة الخلفية من الحشرة ،اذ تم في تلك الدراسة إجراء

تحليل متعدد المتغيرات لتحديد التغيرات الوراثي الكمي في 6 من المجتمعات السكانية لتلك الحشرة بمقاربة البيانات على مستوى أحداثيات المعالم وبأستخدام المقياس الهندسي الرياضي في مجال حساب بيانات التغيرات في الشكل ونقل تلك البيانات من المجال المضلل في المقياس الهندسي الى المجال الخطي لجميع صور الأجنحة التي كان عددها 311 صورة للأجنحة الأمامية و319 للأجنحة الخلفية من الحشرة ، وقد أظهر التحليل أعلاه وجود فروق معنوية كبير جدا في شكل وحجم الجناح ومعدل الحجم المركزي للجناح بين المجتمعات السكانية للحشرة في محافظة كيلان ومازندران وباقي المحافظات الشمالية الأيرانية التي جمعت منها عينات الحشرة ، حيث عزوا الباحثون أن وجود هذه الفروق يعود الى بعد المسافة الجغرافية بين المحافظات المذكورة في أعلاه وأختلاف الظروف البيئية بين المجتمعات السكانية الستة، ومن الدراسات الأخرى في هذا المجال الدراسة التي أجراها Murat وآخرون (2007) والتي تمكنوا خلالها من التمييز بين نوعين من النحل وهما *Sibricobombus varticococus* والنوع *Sibricobombus niveatus* اذ ينتمي النوعين الى رتبة عسائية الأجنحة Hymenoptera عائلة النحل Apidae بأستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه المعتمد على المعالم وقد لاحظوا في تلك الدراسة وجود تغير واضح في شكل الجناح الأيمن لكلا النوعين ، اذ ذكروا ان السبب في ذلك يعود الى أختلاف الظروف البيئية لمناطق تواجد النوعين وبالتالي أدى هذا الأختلاف الى وجود فرق معنوي في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن فيهما، كذلك قام Francoy وآخرون (2006) بدراسة التغيرات الوراثي الكمي بين المجتمعات السكانية لنحلة العسل التي جمعت عيناتها من ثلاث مناطق منفصلة جغرافيا وهي ايطاليا و ولاية كارنيولان الأمريكية وجنوب أفريقيا وبعد اجراء المقارنة بين المجتمعات السكانية الثلاث للحشرة وجدوا أختلافا في شكل وحجم الجناح ومعدل الحجم المركزي للجناح الأيمن بينها ، اذ ذكروا ان السبب في ذلك يعود الى أختلاف الظروف البيئية بين المناطق الثلاثة التي جمعت منها عينات تلك الحشرة كمعدلات درجة الحرارة و كمية الأمطار السنوية والرطوبة النسبية في تلك المناطق .



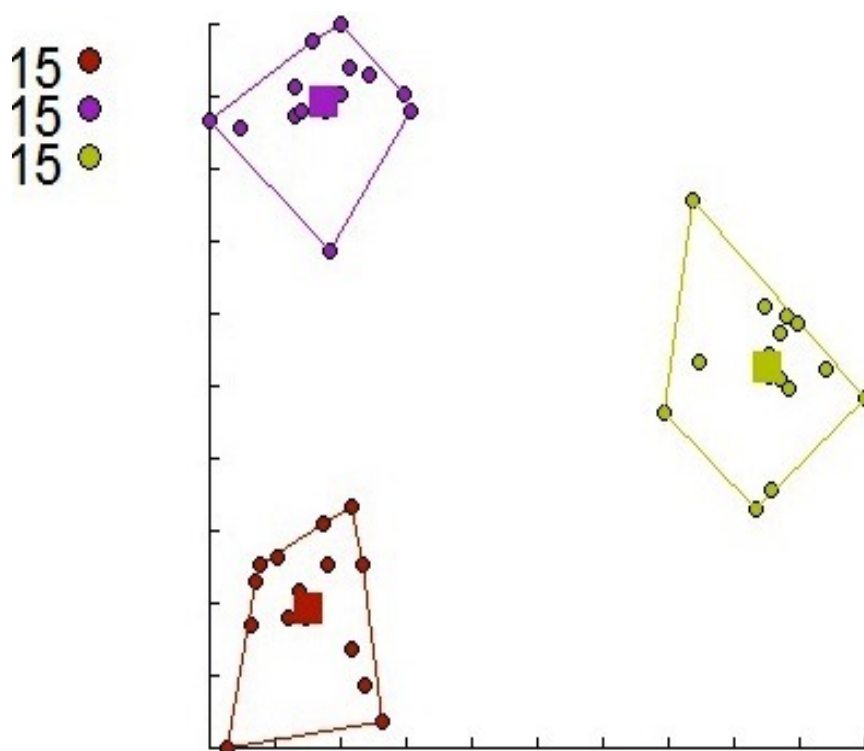
4.447 الى 2.859- = Y(Factor II) ، 5.589 الى 8.783- = X(Factor I)

شكل (14) التحليل التمييزي Discriminant analysis لأحداثيات معالم الأجنحة اليمنى لذكور الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه [النقاط الخضراء ، الوردية والجوزية في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي ، المربع الأخضر ، الوردي والجوزي يمثل معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن للمجتمعات السكانية من شمال العراق ووسطه وجنوبه والذي هو 1332.8 ، 1093.2 ، 1131.4 على التوالي] .

جدول (10) مقارنة مسافات مهالانوبز Mahalanobis Distances لذكور الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

	<i>Ch.bezziana</i> (N)	<i>Ch.bezziana</i> (M)	<i>Ch.bezziana</i> (S)
<i>Ch.bezziana</i> (N)	0.00		
<i>Ch.bezziana</i> (M)	11.09	0.00	
<i>Ch.bezziana</i> (S)	11.20	3.79	0.00

[*Ch. bezziana* (N) : الذبابة الحلزونية من شمال العراق ، *Ch.bezziana* (M) ، الذبابة الحلزونية من وسط العراق ، *Ch.bezziana* (S) ، الذبابة الحلزونية من جنوب العراق]



5.124 الى 5.950 = Y(Factor II) ، 7.836 الى 5.055 = X(Factor I)

شكل (15) التحليل التمييزي Discriminant analysis لأحداثيات معالم الأجنحة اليمنى لذكور الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه [النقاط الجوزية ، البنفسجية والصفراء في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي ، المربع الجوزي ، البنفسجي والأصفر يمثل معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن للمجتمعات السكانية من شمال العراق ووسطه وجنوبه والذي هو 1246.5 ، 1116.4 ، 1040.8 على التوالي] .

جدول (11) مقارنة مسافات مهالانوبز Mahalanobis Distances لذكور الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

	<i>Ch.bezziana</i> (N)	<i>Ch.bezziana</i> (M)	<i>Ch.bezziana</i> (S)
<i>Ch.bezziana</i> (N)	0.00		
<i>Ch.bezziana</i> (M)	7.74	0.00	
<i>Ch.bezziana</i> (S)	9.74	9.62	0.00

[*Ch.bezziana* (N) : الذبابة الحلزونية من شمال العراق ، *Ch.bezziana* (M) ، الذبابة الحلزونية من وسط العراق ، *Ch.bezziana* (S) ، الذبابة الحلزونية من جنوب العراق]

جدول (12) تحليل التباين ANOVA لتماثل حجم الجناح الأيمن في ذكور الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

Source	SS	DF	MS	F	Signification
Modal	0.0000	3	0.000013	0.19	0.91
Individual	0.0000	1	0.000015	0.20	0.66
Side	0.0000	1	0.000000	0.00	0.86
Side•i	0.0000	1	0.000025	0.35	0.56
Residue	0.0023	32	0.000072		

جدول (13) تحليل التباين ANOVA لتماثل شكل الجناح الأيمن في ذكور الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

Source	SS	DF	MS	F	Signification
Modal	0.0105	96	0.000110	0.86	0.83
Individual	0.0068	32	0.000211	1.65	0.04
Side	0.0022	32	0.000069	0.54	0.98
Side•i	0.0016	32	0.000049	0.38	0.99
Residue	0.1313	1024	0.000128		

جدول (14) تحليل التباين ANOVA لتماثل حجم الجناح الأيمن في ذكور الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

Source	SS	DF	MS	F	Signification
Modal	0.0002	3	0.000062	1.08	0.4
Individual	0.0001	1	0.000127	2.20	0.15
Side	0.0000	1	0.000001	0.01	0.92
Side•i	0.0001	1	0.000059	1.02	0.32
Residue	0.0018	32	0.000058		

جدول (15) تحليل التباين ANOVA لتمامثل شكل الجناح الأيمن في ذكور الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

Source	SS	DF	MS	F	Signification
Modal	0.0014	96	0.000014	0.65	0.99
Individual	0.0004	32	0.000011	0.51	0.99
Side	0.0004	32	0.000014	0.62	0.95
Side•i	0.0006	32	0.000018	0.82	0.76
Residue	0.0226	1024	0.000022		

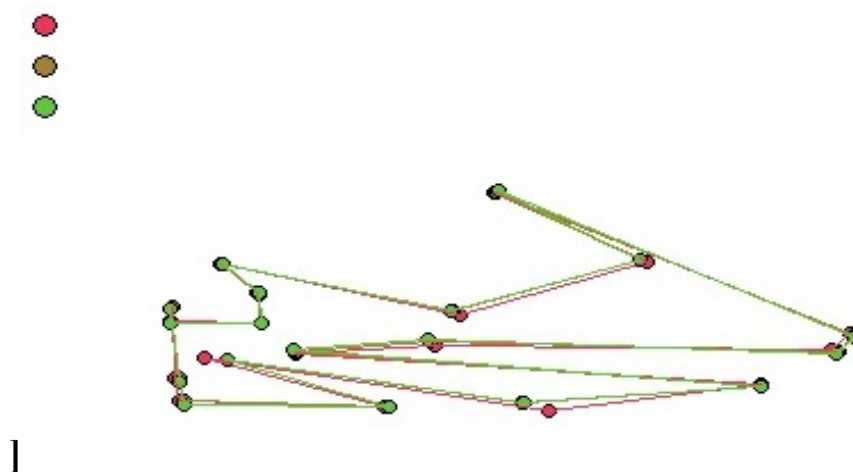
يوضح الشكل (14) التحليل التمييزي للمجتمعات السكانية لذكور الجيل الأول لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Chrysomya bezziana* لعينات المناطق الثلاثة ،اذ يستخدم هذا النوع من التحاليل للمقارنة بين الأفراد داخل المجموعة السكانية الواحدة ، وقد كان المجموع الكلي لعدد الأجنحة اليمنى المستخدمة في هذا التحليل هو 45 جناحا ايمن، 15 منها لذكور المنطقة الشمالية والمؤشرة باللون الأخضر و 15 جناحا أخرى لذكور حشرات المنطقة الوسطى والمؤشرة باللون الوردي ،اما اللون الجوزي فيمثل الـ 15 جناحا الأخيرة من المجموع الكلي لعدد الأجنحة العائدة لذكور حشرات المنطقة الجنوبية ، وقد أظهرت نتائج التحليل التمييزي ان معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور حشرات المنطقة الشمالية هو 1332.8 و ان معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور حشرات المنطقة الوسطى هو 1093.2 في حين كان معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن في ذكور حشرات المنطقة الجنوبية هو 1131.4, وأظهرت هذه النتائج أيضا في (الجدول 10) ان مسافة مهالانوبز Mahalanobis distance بين الحجم المركزي لأجنحة ذكور حشرات المنطقة الشمالية والحجم المركزي لأجنحة ذكور حشرات المنطقة الوسطى هي 11.09 ، ومسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي لأجنحة ذكور حشرات المنطقة الشمالية والحجم المركزي لأجنحة ذكور حشرات المنطقة الجنوبية هي 11.20 ، في حين أظهرت النتائج ايضا مسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي لأجنحة ذكور حشرات المنطقة الوسطى والحجم المركزي لأجنحة ذكور حشرات المنطقة الجنوبية هي 3.79 ، وعند إعادة التصنيف بالاعتماد على النسبة المئوية لذكور الجيل الأول لعينات من بعض مناطق العراق الثلاثة الشمالية والوسطى والجنوبية بأستخدام وحدة PAD المتوفرة ضمن محتويات البرنامج الإحصائي الجاهز وأعتمادا على تطابق الأجنحة لعينات مناطق الدراسة المذكورة ، فأن نسبة التصنيف في عينات المنطقة الشمالية كانت 70% وفي عينات المنطقة الوسطى 83% ،اما في عينات المنطقة الجنوبية فقد كانت تساوي 97% ،أي ان التباين في شكل الجناح الأيمن وحجمه في عينات المنطقة الشمالية أقل مما هو عليه في نماذج المنطقتين الوسطى والجنوبية ، وعند إعادة التصنيف لذكور حشرات الجيل الأول في المجتمعات السكانية المدروسة بالاعتماد على تطابق الأجنحة وعلى

مسافة مهالانوبز ، اذ كانت النسبة المئوية للتصنيف في هذه المجتمعات هي 67% تقريبا اي ان 30 فردا من المجموع الكلي الذي يبلغ 45 جناحا متطابق 100% للمجتمعات السكانية الثلاثة للحشرة ، قد يرجع سبب التباين بين هذه المجتمعات الى اختلاف الظروف البيئية والمتمثلة بدرجات الحرارة ومعدلات سقوط الأمطار السنوية ، فضلا عن معدلات الرطوبة النسبية بين تلك المجتمعات أولا وبعد المسافة الجغرافية بين مناطق الدراسة الثلاثة التي جمعت منها عينات الحشرة والتي تساوي مئات الكيلو مترات ثانيا، ويوضح الشكل (15) التحليل التمييزي Discriminant analysis للمجتمعات السكانية لذكور الجيل الثالث لذباب الدودة الحلزونية للعالم القديم لعينات مناطق الدراسة الثلاثة ، حيث كان العدد الكلي للأجنحة المدروسة هو 45 جناحا أيمن، 15 جناحا لكل منطقة ، حيث أشرت نماذج المنطقة الشمالية باللون الجوزي و أجنحة ذكور المنطقة الوسطى باللون البنفسجي ، بينما يمثل اللون الأصفر ذكور المنطقة الجنوبية ، اذ أظهرت نتائج التحليل التمييزي ان معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور ذباب المنطقة الشمالية هو 1246.5 ، كما معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لذكور حشرات المنطقة الوسطى 1116.4 ، اما معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لحشرات المنطقة الجنوبية فهو 1040.8 ، وقد أظهرت النتائج أيضا في (الجدول 11) ان مسافة مهالانوبز Mahalanobis Distances بين الحجم المركزي لأجنحة ذكور المنطق الشمالية و ذكور المنطقة الوسطى هي 7.74 ومسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي لأجنحة ذكور المنطقة الشمالية وأجنحة ذكور المنطقة الجنوبية هي 9.74 ، اما مسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي لأجنحة ذكور المنطقة الوسطى وذكور المنطقة الجنوبية فهي 9.62 ، وعند إعادة التصنيف بالاعتماد على النسبة المئوية لذكور الجيل الثالث للذبابة لعينات المناطق المختارة خلال هذه الدراسة باستخدام وحدة PAD التي توجد ضمن مكونات البرنامج الجاهز واعتمادا على تطابق الأجنحة للعينات الداخلة في هذه الدراسة ، وجد ان نسبة التصنيف في عينات المنطقة الشمالية هي 35% وفي المنطقة الوسطى هي 89% ، بينما في عينات المنطقة الجنوبية كانت 79% ، وعند إعادة التصنيف مرة أخرى لاستخراج نسبة موحدة بين المجتمعات السكانية الثلاثة وجد ان تلك النسبة تساوي 68% أي ان 31 جناحا أيمن من 45 كانت متطابقة 100% ، ونلاحظ من كل ذلك ان التباين في شكل الجناح وحجمه لذكور الجيل الثالث في المجتمعات السكانية الثلاثة لازال موجودا أيضا الآن النسبة قليلة جدا وهذا يعني ان المجتمعات السكانية الثلاثة لازالت متأثرة باختلاف الظروف البيئية في المناطق التي جمعت منها العينات، ان الدراسات الوراثية الكمية التي تستخدم نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه في العراق معدودة وقلية جدا وتعد هذه الدراسة واحدة منها حيث ان هذه الدراسة هي الأولى من نوعها في العراق التي تدرس الصفات الوراثية الكمية للذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* لغرض تمييز المجتمعات السكانية لها في مناطق العراق الثلاثة باستخدام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح Geometric Morphometric ، اما على المستوى العالمي فقد كان هناك العديد من

الدراسات المماثلة للدراسة الحالية ومنها الدراسة التي قام بها Ricardo وآخرون (2009) والتي تضمنت أجراء المقارنة بين عدد من المجتمعات السكانية المختلفة لحشرة البق المسبب لمرض الشاكاس *Triatoma infestans* (Klug) والتي تنتمي الى رتبة نصفية الأجنحة Hemiptera عائلة البق الفتاك Reduviidae لعينات جمعت من مناطق مختلفة شمال غرب الأرجنتين باستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه ، حيث أظهر التحليل التمييزي لأحداثيات المعالم المثبتة على الأجنحة اليمنى لـ 308 من ذكور تلك الحشرة وجود تغاير قليل في حجم الأجنحة ضمن المجتمع السكاني الواحد ، كما أظهر تحليل التباين لتلك الدراسة أيضا عدم وجود تطابق تام بين اثنين من المجتمعات السكانية لعينات جمعت من نفس المنطقة ، اذ لاحظ الباحثون ان هناك تغييرا بين العينات التي جمعت من حظائر الماعز وتلك التي جمعت من حظائر الخنازير وذكروا ان السبب في ذلك يعود لاختلاف المضائف التي تقضي فيها الحشرة قسما من دورة حياتها فيها وتوصلوا الى عدم وجود تطابق تام بين أحداثيات المعالم لأجنحة الحشرات في المناطق التي جمعت منها اي ان هناك نوعا ثانويا Subspecies من الحشرة أدى الى أختلاف الحجم المركزي للجناح الأيمن وبالتالي عدم وجود تطابق تام بينها، وبما ان معدل الحجم المركزي لأجنحة ذكور الجيل الأول والجيل الثالث لعينات مناطق الدراسة الحالية الثلاث متطابق بنسبة كبيرة جدا فهذا يعني ان الحشرات في هذه الدراسة تعود لسلالة واحد، ونتائج هذه الدراسة تتفق مع نتائج الدراسة الوراثية الجزيئية التي وضحت ان تتابعات القواعد النتروجينية لجين DNA النواة White gene وجين DNA المايكوكوندريا mtDNA (CB) لعينات مناطق العراق الثلاثة متماثلة بالرغم من وجود عدد كبير من الطفرات النقطية من نوع الحذف والاستبدال في التسلسل النكلوتيدي لها ، ويوضح الجدولين (12 و 13) تحليل التباين ANOVA لحجم الجناح الأيمن في ذكور الجيل الأول و الثالث وعلى التوالي لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم للمجتمعات السكانية الثلاثة ، اذ تم مقارنة حجم الجناح الأيمن لذكور الجيل الأول والثالث بواسطة استخدام وحدة ASI التي توجد ضمن مكونات البرنامج الجاهز وبواسطة هذه الوحدة نتمكن من معرفة اذا كان هناك تغاير في شكل وحجم الجناح بين المجتمعات السكانية أم لا، وقد أظهرت نتائج تحليل التباين لتمائل حجم الجناح الأيمن لذكور الجيل الأول كما هو واضح في الجدولين أعلاه عدم فروق معنوية في حجم الجناح بين المجتمعات السكانية الثلاثة المختلفة ، وفي هذا الجيل وجد تغاير بسيط جدا في تماثل شكل الجناح لتلك المجتمعات، اذ وجد ان نسبة التماثل في شكل الجناح وحجمه هي 75% وهذه النسبة الكبيرة من التماثل تعني ان ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم في هذا الجيل والتي جمعت عيناتها من مناطق العراق الثلاثة الشمال والوسط والجنوب تعود لسلالة واحدة ،اما سبب هذا التغاير البسيط جدا قد يعود الى تأثر الذبابة بالظروف البيئية في المناطق التي جمعت منها العينات ، كما يبين كل من الجدولين (14 و 15) تحليل التباين لتمائل شكل وحجم الجناح الأيمن لذكور الجيل الثالث لهذه الذبابة وعلى التوالي ، وقد تم مقارنة شكل الجناح الأيمن وحجمه لذكور

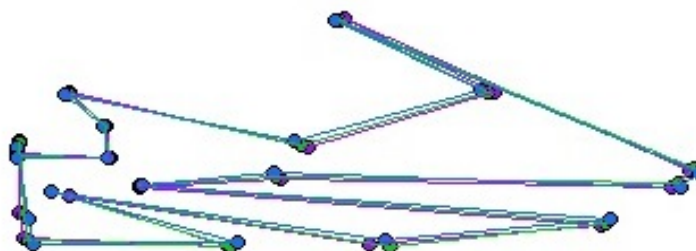
الجيل الثالث بين المجتمعات السكانية الثلاثة باستخدام وحدة ASI الموجودة ضمن محتويات البرنامج الجاهز كما ذكرنا على الموقع الإلكتروني المذكور سابقا ، وعن طريق هذه الوحدة نستطيع ان نعرف اذا كان هناك تغير في شكل الجناح وحجمه بين ذكور المجتمعات السكانية الثلاثة ، وقد أظهرت نتائج التحليل عدم وجود فروق معنوية كبيرة في شكل وحجم الجناح الأيمن للذكور في مناطق الدراسة الثلاثة ، اذ وجد ان النسبة المئوية لتمثيل شكل وحجم الجناح لذكور الجيل الثالث هي 75% أيضا وكما هي عليه في ذكور الجيل الأول فان هذه النسبة تعني ان ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم والتي جمعت من مناطق العراق المختلفة تعود لأصل جغرافي واحد Geographical race وان التغيرات البسيطة الذي ظهر عند تحليل التباين ANOVA سببه ان الحشرة مازالت متأثرة بالظروف البيئية في الأماكن التي جمعت منها العينات .

4-2-2 دراسة التغيرات الوراثية الكمية لشكل الجناح وحجمه لأنثى الجيل الأول والثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Chrysomya bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه بأستعمال نظام المقياس الهندسي للشكل المظهري للجناح : Geometric Morphometric of Wing



$$X = -0.237 \text{ الى } 0.444 , Y = -0.086 \text{ الى } 0.158$$

شكل (16) معدل أحداثيات المعالم للجناح الأيمن من ثلاثة مجتمعات سكانية لأنثى الجيل الأول للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* والتي عددها 18 معلما لكل جناح [يمثل اللون الوردي واللون الجوزي واللون الأخضر المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي] .



$$X = -0.237 \text{ الى } 0.445 ، Y = -0.086 \text{ الى } 0.161$$

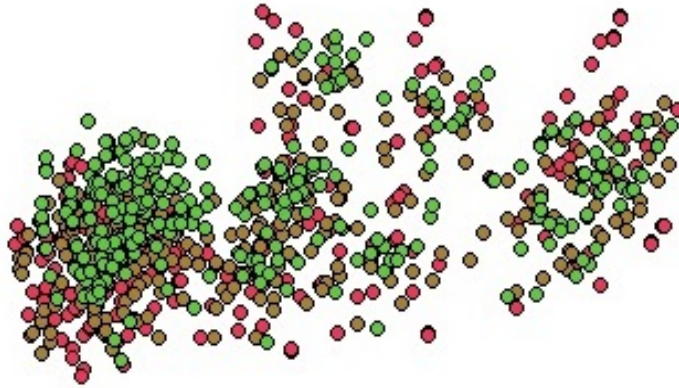
شكل (17) معدل أحداثيات المعالم للجناح الأيمن من ثلاثة مجتمعات سكانية لأناث الجيل الثالث للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* والتي عددها 18 معلم لكل جناح [يمثل اللون البنفسجي واللون الأخضر واللون الأزرق المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي] .

يوضح الشكل (16) معدل أحداثيات المعالم لـ 45 جناحا أيمن لأناث الجيل الأول لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (*Ch.bezziana*(Vill.) وعددها 18 معلما لكل جناح ، اذ يمثل اللون الوردي أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا أيمن لأناث حشرات المنطقة الشمالية/السليمانية ويمثل اللون الجوزي أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا أيمن لأناث حشرات المنطقة الوسطى/ديالى بينما يمثل اللون الأخضر أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا أيمن لأناث حشرات المنطقة الجنوبية/ميسان ، وعند إجراء عملية تطابق الأجنحة باستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه عن طريق وحدة MOG المتوفرة ضمن مكونات البرنامج الأحصائي الجاهز والذي يوجد على الموقع الإلكتروني أو الرابط <http://www.mpl.ird.morphometrics> وكما هو موضح في الشكل أعلاه ، اذ نلاحظ ان الأجنحة اليمنى لأناث الجيل الأول للمجتمعات الثلاثة أعلاه متطابقة في معظم أحداثيات المعالم المثبتة على الأجنحة في هذه الدراسة عدا المعالم 4،6،11،12 و16 والتي لم يحدث فيها تطابق تام، لأن التطابق التام حدث بالنسبة لهذه المعالم بين أجنحة أناث الذباب للمنطقتين الشمالية والوسطى فقط ، وهذا يدل على ان هناك تقاربا كبيرا جدا بين أناث الجيل الأول للعينات التي جمعت من المنطقة الشمالية و المنطقة الوسطى حيث كان التطابق بين جميع المعالم لكلا المنطقتين بشكل تام 100% ، بينما كانت نسبة التطابق بين أجنحة عينات المنطقة الجنوبية من جهة وأجنحة عينات المنطقتين الشمالية والوسطى من جهة اخرى هي 72% وقد يعود السبب الى بعد المسافة الجغرافية بين تلك المنطقة التي تبلغ مئات الكيلومترات و منطقتي الشمال والوسط مقارنة بالمسافة بين هاتين المنطقتين ، وببين الشكل (17) معدل أحداثيات المعالم لـ 45 جناحا أيمن لأناث الجيل الثالث لذبابة الدودة

الحلزونية للعالم القديم، حيث يمثل اللون البنفسجي معدل أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا أيمن لأناث ذباب المنطقة الشمالية في حين يمثل اللون الأخضر معدل أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا أيمن لأناث ذباب منطقة الوسط ، أما اللون الأزرق فيمثل معدل أحداثيات المعالم لـ 15 جناحا أيمن لأناث ذباب المنطقة الجنوبية ، وعندما أجريت المقارنة بين الأجنحة اليمنى عينات الجيل الثالث لذباب الدودة الحلزونية للعالم القديم لعينات مناطق العراق الثلاثة المذكورة في أعلاه بأستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه وبواسطة وحدة MOG الموجودة ضمن مكونات البرنامج الجاهز ، نلاحظ ان الأجنحة اليمنى لأناث الجيل الثالث في ذباب الدودة الحلزونية للعالم القديم لمناطق الدراسة الثلاثة متطابقة في معظم أحداثيات المعالم بأستثناء المعلمين 6 و 12 اذ لم يحدث بينهما تطابق تام ، وقد يعود سبب عدم التطابق في هذين المعلمين للمجتمعات السكانية الثلاثة للحشرة الى الاختلاف في الظروف البيئية والمتمثلة بدرجات الحرارة والرطوبة النسبية ومعدل كمية الأمطار السنوية في المناطق التي جمعت منها الحشرة، اذ بلغ معدل درجات الحرارة السنوية لمناطق الدراسة الثلاثة الشمال والوسط والجنوب 20.2°C ، 23.4°C و 26.8°C على التوالي ومعدلات كمية الأمطار السنوية في مناطق الدراسة الثلاثة كانت تساوي 49.103cm ، 42.132cm و 33.058cm على التوالي ، أما معدلات الرطوبة النسبية في مناطق الدراسة الثلاثة فقد بلغت حوالي 39.23% ، 42.16% و 42.41% وعلى التوالي في مناطق جمع العينات بعد تحديد وتسجيل مواقع الجمع بواسطة جهاز تحديد المواقع الـ GPS وعلى النحو التالي محافظة/ السليمانية ($34^{\circ} 34' 55.99'' \text{N}$) ، $44^{\circ} 50' 54.42'' \text{E}$) ، محافظة/ ديالى ($33^{\circ} 53' 01.39'' \text{N}$) ، $45^{\circ} 18' 38.47'' \text{E}$) ، محافظة/ ميسان ($32^{\circ} 02' 09.08'' \text{N}$) ، $46^{\circ} 52' 39.05'' \text{E}$) ، ان نتائج هذه الدراسة تتفق بشكل كبير مع نتائج الدراسة التي أجراها Moraes وآخرون (2010) حول دراسة التغيرات الوراثي المظهري في بعوضة (*Culex quinquefasciatus* (Say) والتي جمعت عيناتها من ثلاثة بلدان في قارة أمريكا الجنوبية وهي البرازيل والأرجنتين والبيرو بأستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه ، حيث توصل الباحثون في تلك الدراسة الى عدم تطابق بعض أحداثيات المعالم بين المجتمعات السكانية للبعوضة التي أجريت عليها الدراسة فضلا عن ذلك فقد وجدوا أيضا أختلافا بسيطا في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن للعينات المدروسة في المناطق التي جمعت منها ، والسبب في ذلك التغيرات أو الاختلاف البسيط هو تأثير الحشرة بالظروف البيئية المختلفة في مناطق الدراسة ، ومن الدراسات الأخرى التي أجريت في هذا المجال الدراسة التي قام بها Francoy وآخرون (2012) حول دراسة التغيرات الوراثي المظهري بين أنواع عديدة من جنس النحلة (*Euglossa* (Latreille) والتي تنتمي الى رتبة غشائية الاجنحة Hymenoptera عائلة النحل Apidae والتي جمعت عيناتها من بلدان بنما والأكوادور بأستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه المعتمد على المخطط Outline-based morphometric ، حيث استطاع الباحث المذكور

في أعلاه وجماعته في تلك الدراسة تمييز خمسة أنواع مختلفة من تلك الحشرة وهذه الأنواع هي *E.imperialis*, *E.orellana*, *E.flammea*, *E.ignita*, *E.chalybeata*، اذ وجدوا تغييرا واضحا بين هذه الأنواع من خلال عدم تطابق بعض أحداثيات المعالم المثبتة على أجنحة الحشرة وذكروا ان سبب ذلك التغيرات هو وجود الحواجز الطبيعية والأنعزال الجغرافي بين المجتمعات السكانية للحشرة في البلدان التي جمعت منها العينات فضلا عن أختلاف الظروف البيئية لأماكن تواجد الحشرة في تلك البلدان .

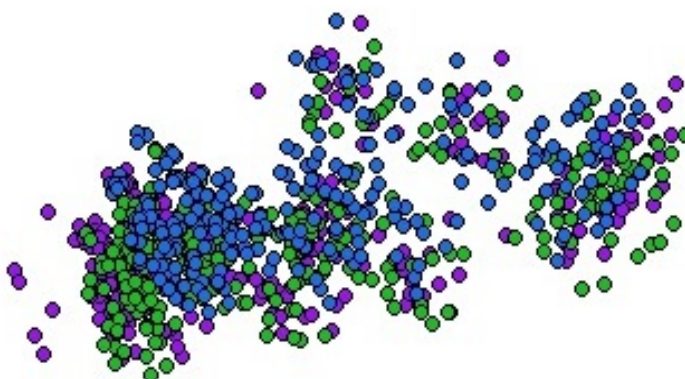
15 ●
15 ●
15 ●



X = من -372.906 الى 612.094 ، Y = من -341.906 الى 189.094

شكل (18) الشكل الانتشاري لتوزيع أناث الجيل الأول للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* على طول التحليلين العاملين الأول والثاني PCs لأحداثيات فضاء الظل المشتقة من أحداثيات المعالم الأصلية لكل جناح والتي عددها 18 معلما [اللون الأحمر ، الجوزي والأخضر يمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي] .

15 ●
15 ●
15 ●

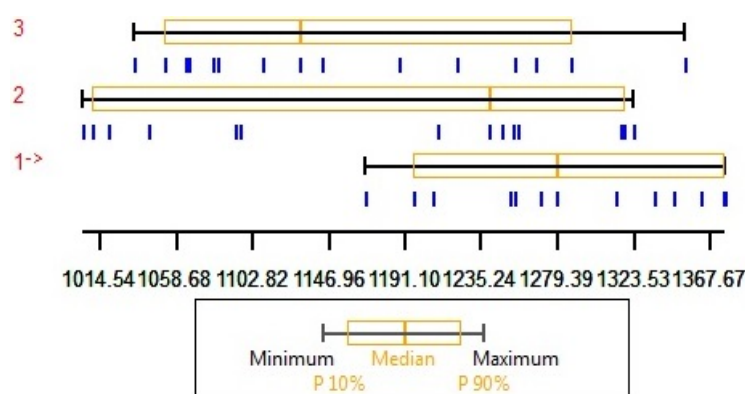


$X = -464.798$ الى 617.202 ، $Y = -370.798$ الى 179.202

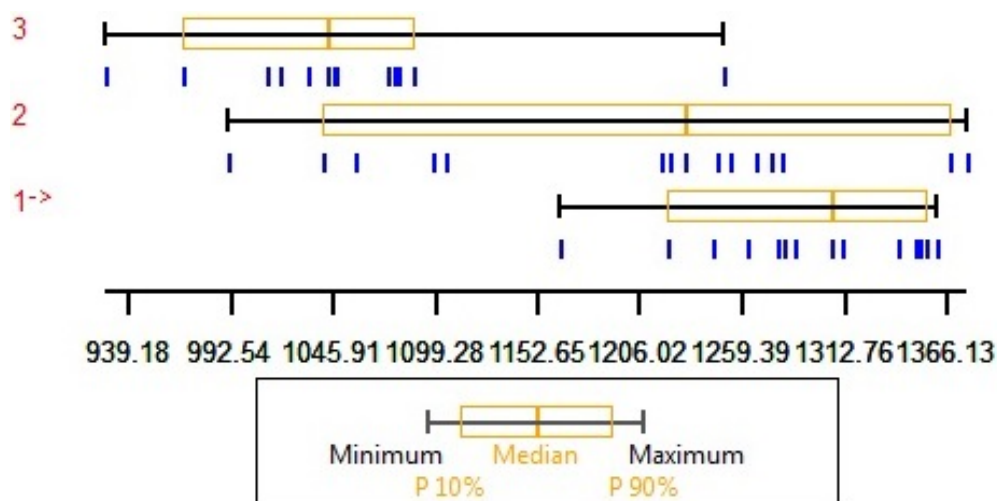
شكل (19) الشكل الانتشاري لتوزيع أنثى الجيل الثالث للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* على طول التحليلين العاملين الأول والثاني PCs لأحداثيات فضاء الظل المشتقة من أحداثيات المعالم الأصلية لكل جناح والتي عددها 18 معلم [اللون البنفسجي ، الأخضر والأزرق يمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي] .

يوضح الشكل (18) طريقة توزيع أنثى الجيل الأول للذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Chrysomya bezziana* (Vill.) المجموعة عيناتها من مناطق العراق الثلاثة ، وذلك باستخدام تحليل المركبات الأساسية لأحداثيات المعالم والتي ثبتت على الأجنحة اليمنى بين تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة ونهايات العروق الطولية والتي عددها 18 معلما لكل جناح ، اذ تمثل النقاط ذات اللون الأحمر معالم أجنحة حشرات المنطقة الشمالية وتمثل النقاط ذات اللون الجوزي معالم أجنحة حشرات المنطقة الوسطى ، اما النقاط ذات اللون الأخضر فانها تمثل معالم أجنحة حشرات المنطقة الجنوبية، ويوضح الشكل (19) طريقة توزيع أنثى الجيل الثالث لعينات المناطق الثلاثة المذكورة في أعلاه وذلك باستخدام تحليل المركبات الأساسية لأحداثيات المعالم التي عددها 18 معلما والمثبتة على تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة ونهايات العروق الطولية للجناح الايمن كما في انثى الجيل الأول لهذه الحشرة ، اذ تمثل النقاط ذات اللون البنفسجي أحداثيات المعالم لأجنحة عينات المنطقة الشمالية وتمثل النقاط ذات اللون الأخضر أحداثيات المعالم لأجنحة المنطقة الوسطى ، في حين ان النقاط ذات اللون الأزرق تمثل أحداثيات المعالم لأجنحة عينات منطقة الجنوب ، وقد لاحظنا من الطريقة التي تم فيها توزيع أجنحة أفراد الجيل الأول ان أنثى الذبابة لعينات المناطق الثلاثة المذكورة في أعلاه متقاربة جدا من بعضها البعض في الشكل (18) ، كذلك نلاحظ من طريقة توزيع أفراد الجيل الثالث ان أنثى الذبابة لعينات المنطقة الشمالية متطابقة بشكل تام مع أنثى المنطقة الوسطى وكذلك قريبة جدا من أنثى المنطقة الجنوبية في الشكل (19) ، ان

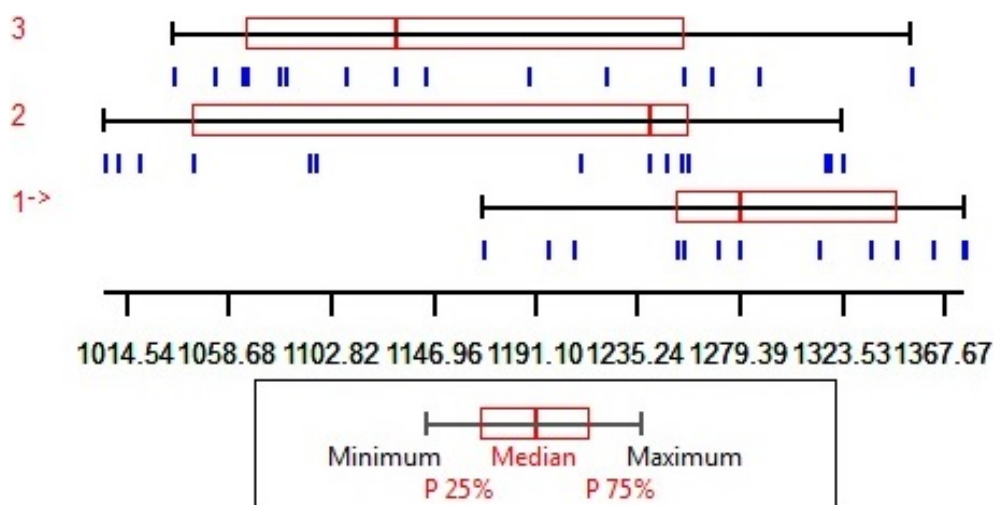
الأفراد القريبة من بعضها البعض في كلا الجيلين الأول والثالث متطابقة أيضا وهذا يعني بشكل واضح ان هذه الحشرات تعود لأصل جغرافي واحد ولكن يوجد تغير في شكل وحجم الجناح بالنسبة للأفراد البعيدة عن بعضها البعض كما هو واضح في الشكلين أعلاه ، ان سبب هذا التغير في شكل وحجم جناح هذه الأفراد البعيدة لحشرات مناطق الدراسة الثالث قد يرجع الى اختلاف الظروف البيئية في تلك المناطق التي جمعت منها عينات الحشرة ، ومن الدراسات العالمية في هذا المجال الدراسة الموسعة التي قام بها Prudhomme وآخرون (2012) والتي شملت دراسة التغيرات الكمية الوراثي في شكل وحجم الجناح للمجتمعات السكانية المختلفة لذبابة الرمل جنس *Phlebotomus papatasi* والتي تنتمي الى رتبة ثنائية الأجنحة Diptera عائلة ذباب الرمل Phychodidae لعينات جمعت من شمال وجنوب سلاسل جبال الأطلس في المغرب حيث تمكنت الدراسة أعلاه من مقارنة ذكور وأناث الحشرة المجموعة عيناتها من شمال جبال الأطلس مع تلك التي جمعت عيناتها من جنوب جبال الأطلس باستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه ، وقد توصل الباحثون فيها الى ان هناك تغييرا في شكل وحجم الجناح بين المجتمعين السكانيين لتلك الحشرة ، وقد قاموا أيضا بتحليل المركبات الأساسية لأحداثيات المعالم المثبتة على الأجنحة اليمنى بين تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة وكذلك نهايات العروق الطولية وقد وجد في الدراسة أعلاه أيضا عندما تم توزيع العينات وانتشارها كما هو الحال في الدراسة الحالية تقاربا كبيرا في العديد من العينات المدروسة وتباعدة في عينات أخرى منها ، وقد يعود السبب في هذا التغير الى الاختلاف في درجات الحرارة ومعدلات الرطوبة النسبية فضلا عن كمية سقوط الأمطار السنوية في المنطقتين .



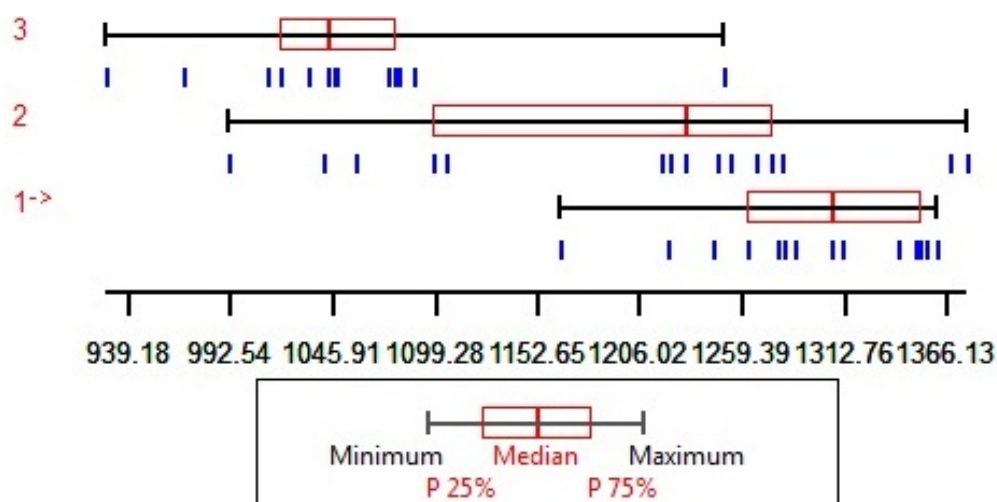
شكل (20) الحجم المركزي Centriod size للأجنحة اليمنى لأناث الجيل الأول للذبابة الحلزونية *Ch. bezziana* تبعا للمجتمع السكاني المنتمي له [] اذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 10% الى الربع 90% ، الخطوط الزرقاء تحت كل صندوق تمثل الأجنحة ، الارقام 1 ، 2 و 3 في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي] .



شكل (21) الحجم المركزي Centriod size للأجنحة اليمنى لأنثى الجيل الثالث للذبابة الحلزونية *Ch. bezziana* تبعا للمجتمع السكاني المنتميه له [] اذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 10% الى الربع 90% ، الخطوط الزرقاء تحت كل صندوق تمثل الأجنحة ، الأرقام 1 ، 2 و 3 في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي [] .



شكل (22) الحجم المركزي Centriod size للأجنحة اليمنى لأنثى الجيل الأول للذبابة الحلزونية *Ch. bezziana* تبعا للمجتمع السكاني المنتميه له [] اذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 25% و الربع 75% ، الخطوط الزرقاء تحت كل صندوق تمثل الأجنحة ، الأرقام 1 ، 2 و 3 في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي [] .



شكل (23) الحجم المركزي Centriod size للأجنحة اليمنى لأنثى الجيل الثالث للذبابة الحلزونية *Ch. bezziana* تبعا للمجتمع السكاني المنتميه له [] اذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 25% و الربع 75% ، الخطوط الزرقاء تحت كل صندوق تمثل الأجنحة ، الأرقام 1 ، 2 و 3 في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي [] .

جدول (16) مقارنة الحجم المركزي للجناح الأيمن بين أنثى الجيل الأول لثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch. bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

Group	M.CS	St.D	Va.	F	P	T	P	A.D
N	1284.3	63.7	4058.9	N-M = 3.2	N-M = 0.03	N-M = 3.1	N-M = 0.00	N-M = 104.51
M	1179.6	113.9	12962.1	N-S = 2.2	N-S = 0.15	N-S = 4.3	N-S = 0.00	N-S = 126.3
S	1157.9	94.9	9006.8	M-S = 1.4	M-S = 0.50	M-S = 0.6	M-S = 0.6	M-S = 21.74

جدول (17) مقارنة الحجم المركزي للجناح الأيمن بين أنثى الجيل الثالث لثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

Group	M.CS	St.D	Va.	F	P	T	P	A.D
N	1290.9	54.9	3014.4	N-M = 4.1	N-M = 0.01	N-M = 2.8	N-M = 0.00	N-M = 91.07
M	1199.9	110.7	12316.2	N-S = 1.5	N-S = 0.5	N-S = 10.6	N-S = 2.5	N-S = 236.61
S	1054.4	66.6	4439.3	M-S = 2.8	M-S = 0.1	M-S = 4.4	M-S = 0.00	M-S = 145.54

M.CS : Mean centroid size : معدل الحجم المركزي للأجنحة

St.D : Standard Deviation : الانحراف القياسي

Va. : Variance : التباين

F : قيمة F المحسوبة

P: Probability : الاحتمالية

T : قيمة T المحسوبة

A.D : Absolute Differences : الاختلافات المطلقة

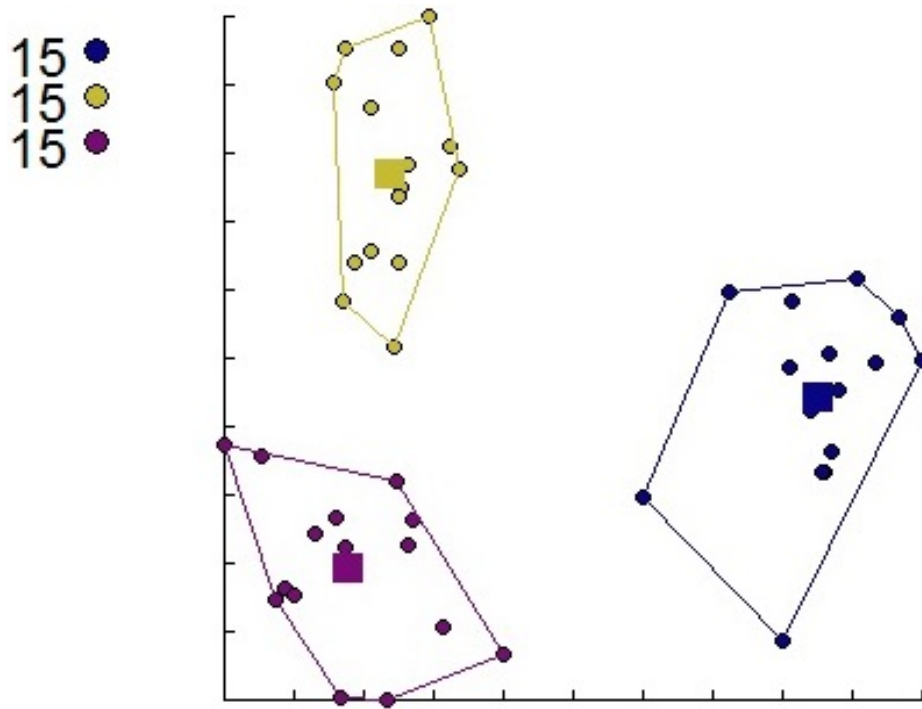
N : North ، شمال العراق ، M : Medial ، وسط العراق ، S : South ، جنوب العراق

يوضح الشكل (20) نتائج تحليل التباين في الحجم المركزي Centroid Size للجناح الأيمن لأنثى الجيل الأول للذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* التي جمعت عيناتها من شمال العراق ووسطه وجنوبه، كما يبين الشكل (21) نتائج تحليل التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن لأنثى الجيل الثالث للذبابة التي جمعت من المناطق الثلاثة المذكورة في أعلاه، إذ يمثل كل صندوق كما هو موضح في الشكلين في أعلاه المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 10 والربع 90، وتمثل الخطوط الزرقاء التي توجد أسفل كل صندوق أجنحة العينات الداخلة في الدراسة ونلاحظ من الشكلين في أعلاه وجود تباين قليل في الحجم المركزي للجناح الأيمن لأنثى الجيل الأول والثالث للذبابة باختلاف مناطق جمع العينات، ويوضح الشكل (22) نتائج تحليل التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن لأنثى الجيل الأول للذبابة في مناطق العراق الثلاثة المذكورة أعلاه، إلا أن المجموعة الوسطية هنا كانت موزعة بين الربع 25 والربع 75، يشير الشكل (23) إلى نتائج تحليل التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن لأنثى الجيل الثالث للذبابة المدروسة في بعض مناطق العراق، ولكن

المجموعة الوسطية هنا كانت موزعة بين الربيع 25 والربيع 75 ، وقد لاحظنا أيضا وجود تغير قليل جدا في الحجم المركزي للجناح الأيمن لأنثى الجيل الأول والثالث بين المجتمعات السكانية الثلاثة بأختلاف المناطق التي جمعت منها، اذ بلغ معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لأنثى الجيل الأول في (الجدول 16): 1284.3، 1179.6 و 1157.9 للمجتمعات السكانية الثلاث للذبابة والمتمثلة بعينات المنطقة الشمالية، الوسطى و المنطقة الجنوبية على التوالي ، اما مقدار التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن فكان 4058.9، 12962.1 و 9006.8 للمجتمعات السكانية الثلاث المذكورة في أعلاه وعلى التوالي ، وقد استخدم في هذه الدراسة اختباري F و T للمقارنة بين المجتمعات السكانية لمناطق الدراسة في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن، وعند إجراء المقارنة بين أنثى الجيل الأول للذبابة التي جمعت عيناتها من المنطقة الشمالية وأنثى الجيل الأول التي جمعت عيناتها من المنطقة الوسطى في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن فان قيمة $F=3.2$ وقيمة $P=0.03$ ، اما قيمة $T=3.1$ وقيمة $P=0.00$ ، اما قيمة الأختلاف المطلقة A.D فوجد انها تساوي 104.51 اذ لا توجد فروق معنوية بين حشرات منطقتي الشمال والوسط ،بينما عند مقارنة أنثى الجيل الأول للذبابة التي جمعت عيناتها من المنطقة الشمالية مع أنثى الجيل الأول للذبابة التي جمعت عيناتها من المنطقة الجنوبية كانت قيمة $F=2.2$ وقيمة $P=0.15$ ، في حين ان قيمة $T=4.3$ وقيمة $P=0.00$ ، اما بالنسبة لقيمة الاختلاف المطلقة A.D فكانت تساوي 126.3 ، اذ توجد فروق معنوية قليلة جدا بين حشرات هاتين المنطقتين في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن، وعند مقارنة أنثى الجيل الأول للذبابة التي جمعت عيناتها من المنطقة الوسطى مع أنثى الجيل الأول للذبابة التي جمعت عيناتها من المنطقة الجنوبية كانت قيمة $F=1.4$ بينما قيمة $P=0.50$ ، اما قيمة $T=0.6$ وقيمة $P=0.6$ في حين كانت قيمة الأختلاف المطلقة A.D تساوي 21.74 ، اذ لا توجد فروق معنوية بين حشرات هاتين المنطقتين في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن، وهذا يعني ان عينات أنثى الذبابة التي جمعت من مناطق العراق الثلاثة في هذا الجيل تعود الى أصل جغرافي واحد، وهذا يتفق بشكل كبير مع نتائج الدراسة الوراثية الجزيئية ، اما بخصوص انثى الجيل الثالث فقد كان معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن في أنثى حشرات مناطق الدراسة الثلاثة الشمالية والوسطى والجنوبية في (الجدول 17) : 1290.9 ، 1199.9 و 1054.4 على التوالي ، اما قيم التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن في حشرات مناطق الدراسة الثلاثة المذكورة في أعلاه فكانت تساوي 3014.4، 12316.2 و 4439.3 ، وكما هو الحال في الجيل الأول فقد استخدم اختباري F و T للمقارنة أيضا بين أنثى الجيل الثالث للذبابة في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن، وعند مقارنة أنثى ذبابة المنطقة الشمالية مع أنثى ذباب المنطقة الوسطى كانت قيمة $F=4.1$ وقيمة $P=0.01$ اما قيمة $T=2.8$ وقيمة $P=0.00$ ، في حين كانت قيمة الأختلاف المطلقة A.D تساوي 91.07 ، اذ لا توجد فروق معنوية بين أنثى ذبابة المنطقة الشمالية وأنثى ذبابة المنطقة الوسطى ، اما عند مقارنة أنثى المنطقة الشمالية مع أنثى المنطقة الجنوبية كانت

قيمة $F=1.5$ وقيمة $P=0.5$ ، بينما كانت قيمة $T=10.6$ وقيمة $P=2.5$ ، في حين ان قيمة الاختلاف المطلقة A.D تساوي 236.6 ، اذ توجد فروق معنوية قليلة جدا بين أنث حشرات منطقتي الشمال والجنوب، وعند إجراء المقارنة بين أنث المنطقة الوسطى مع أنث المنطقة الجنوبية كانت قيمة $F=2.8$ وقيمة $P=0.1$ ، بينما كانت قيمة $T=4.4$ وقيمة $P=0.00$ ، اما قيمة الاختلاف المطلقة A.D فقد كانت تساوي 145.54 ، ولوحظ وجود فروق معنوية بسيطة جدا بين أنث الجيل الثالث لحشرات المنطقتين الوسطى والجنوبية ، هذا يعني ان هناك تقاربا وراثيا كبيرا بين أنث الجيل الثالث لمنطقتي الشمال والوسط ، بينما كانت أنث الجيل الثالث في المنطقة الجنوبية بعيدة نوعا ما عن أنث حشرات هاتين المنطقتين لأن هناك فروقا معنوية قليلة وجدت بينها وبين حشرات المنطقتين الشمالية والوسطى ، وقد يعود السبب في ذلك الى ان المنطقتين الشمالية والوسطى قريبتين من بعضهما من حيث الموقع الجغرافي ، اذ تبلغ المسافة الجغرافية بينهما حوالي 280 كم، بينما تبلغ المسافة بين منطقتي الشمال والجنوب حوالي 730 كم ، في حين ان المسافة بين منطقتي الوسط والجنوب هي 450 كم ، ومن الأسباب الأخرى أيضا وجود الحواجز الطبيعية بين مناطق الدراسة الثلاثة والمذكورة في أعلاه مثل الأنهار والبساتين والجبال والمرتفعات وخاصة في المنطقة الشمالية كذلك فان الاختلاف في الظروف البيئية من درجة الحرارة والرطوبة النسبية وكمية سقوط الأمطار بين المنطقتين الشمالية والوسطى يكون قليلا جدا وحيانا ينعدم في بعض أشهر السنة أي تكون الظروف البيئية للمنطقتين متشابهة كثيرا بينما يكون الاختلاف كبيرا في الظروف البيئية المذكورة في أعلاه للمنطقتين مع المنطقة الجنوبية كبيرا جدا وطيلة فصول السنة ، وبالرغم من وجود الفروق المعنوية البسيطة جدا في بعض القيم بين أنث الجيل الثالث للمجتمعات السكانية للحشرة في مناطق الدراسة الثلاثة الا أن هناك تقاربا في قيم أخرى ومنها معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن ، بمعنى آخر أن أنث ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم التي جمعت عيناتها من بعض مناطق العراق تعود لمنشأ أو أصل جغرافي Geographical race واحد لاتصله حدود جغرافية ، وتتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج الدراسة الوراثية الجزيئية التي طبقت على الحشرة ، اما على المستوى العالمي فهناك العيد من الدراسات الشاملة والموسعة في هذا المجال ومنها الدراسة التي قام بأجرائها كل من Kitthawee و Rungsri (2011) حول استخدام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح الأيمن في تحديد التغيرات الوراثي الكمي بين المجتمعات السكانية للحشرات التي ترجع لنفس النوع لعينات جمعت من مناطق جغرافية مختلفة ، كما هو الحال في حشرة ذبابة الفاكهة جنس *Bactrocera tau* (Walker) والتي تتغذى على نوع واحد من الفاكهة في تايلند حيث أستطاع الباحثان المذكوران في أعلاه أكتشاف سلالتين غير ظاهرتين وتمييزهما من جنس تلك الحشرة وهما *B.tau A* و *B.tau C* وبعد ان أجرى الباحثان المقارنة بين النوعين أعلاه بأستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح الأيمن وحجمه وجدوا ان حجم جناح النوع C أكبر من حجم جناح النوع A ، وكذلك وجدوا ان الحجم

المركزي للجناح في الأنثى أكبر من الحجم المركزي للجناح في الذكور بسبب اختلاف تطابق أحداثيات المعالم المثبتة على الجناح الأيمن للحشرة ، وقد فسر الباحثان أعلاه هذا الاختلاف في شكل الجناح وحجمه للنوعين المكتشفين هو اختلاف الظروف البيئية كدرجة الحرارة التي تؤثر بصورة مباشرة على شكل الجناح وحجمه من خلال تأثيرها الكبير على وظائف الأعضاء وعمليات التطور ، أما تأثيرها غير المباشر فيكون عن طريق اختلاف كمية الغذاء في مكان تواجد الحشرة .



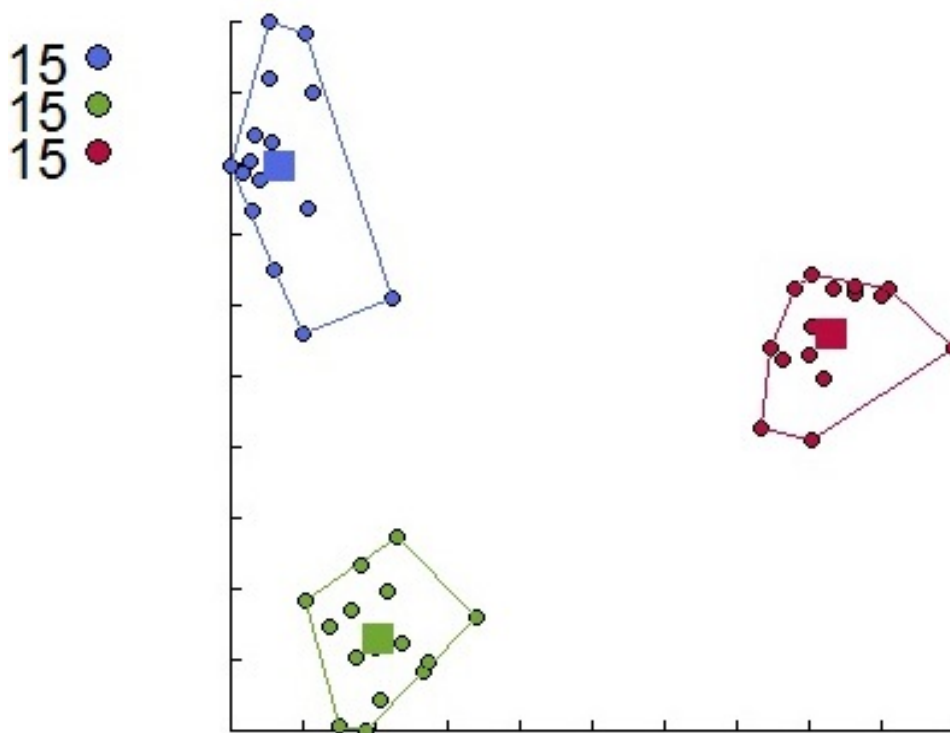
$Y(\text{Factor II}) = \text{من } -3.475 \text{ إلى } 3.934$ ، $X(\text{Factor I}) = \text{من } -4.676 \text{ إلى } 6.421$

شكل (24) التحليل التمييزي Discriminant analysis لأحداثيات معالم الأجنحة اليمنى لأنثى الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه [النقاط الزرقاء ، الصفراء والبنفسجية في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي ، المربع الأزرق ، الأصفر والبنفسجي يمثل معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن للمجتمعات السكانية من شمال العراق ووسطه وجنوبه والذي هو 1284.3 ، 1179.6 ، 1157.9 على التوالي] .

جدول (18) مقارنة مسافات مهالاتوبز Mahalanobis Distances لأناث الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

	<i>Ch.bezziana</i> (N)	<i>Ch.bezziana</i> (M)	<i>Ch.bezziana</i> (S)
<i>Ch.bezziana</i> (N)	0.00		
<i>Ch.bezziana</i> (M)	7.20	0.00	
<i>Ch.bezziana</i> (S)	7.67	4.33	0.00

Ch.bezziana (N): عينات المنطقة الشمالية ، *Ch.bezziana* (M) : عينات المنطقة الوسطى و *Ch.bezziana* (S) : تمثل عينات المنطقة الجنوبية .



5.254 الى -5.148 = Y(Factor II) ، 10.245 الى -5.941 = X(Factor I)

شكل (25) التحليل التمييزي Discriminant analysis لأحداثيات معالم الأجنحة اليمنى لأناث الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه [النقاط الرصاصية ، الخضراء والحمراء في الشكل تمثل المجتمعات السكانية لشمال العراق ووسطه وجنوبه على التوالي ، المربع الرصاصي ، الاحمر والاخضر يمثل معدل الحجم المركزي للجناح الايمن للمجتمعات السكانية من شمال العراق ووسطه وجنوبه والذي هو 1054.4 ، 1199.9 ، 1290.9 على التوالي] .

جدول (19) مقارنة مسافات مهالانوبز Mahalanobis Distances لأناث الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

	<i>Ch.bezziana</i> (N)	<i>Ch.bezziana</i> (M)	<i>Ch.bezziana</i> (S)
<i>Ch.bezziana</i> (N)	0.00		
<i>Ch.bezziana</i> (M)	7.27	0.00	
<i>Ch.bezziana</i> (S)	12.55	11.05	0.00

Ch.bezziana (N): عينات المنطقة الشمالية ، *Ch.bezziana* (M) : عينات المنطقة الوسطى و *Ch.bezziana* (S) : تمثل عينات المنطقة الجنوبية .

جدول (20) تحليل التباين ANOVA لتماثل حجم الجناح الأيمن في أناث الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

Source	SS	DF	MS	F	Signification
Modal	0.0003	3	0.000095	1.28	0.29
Individual	0.0002	1	0.000176	2.38	0.13
Side	0.0001	1	0.000089	1.20	0.28
Side•i	0.0000	1	0.000018	0.25	0.62
Residue	0.0024	32	0.000074		

جدول (21) تحليل التباين ANOVA لتماثل شكل الجناح الأيمن في أناث الجيل الأول بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

Source	SS	DF	MS	F	Signification
Modal	0.0227	96	0.000236	1.06	0.34
Individual	0.0097	32	0.000305	1.36	0.09
Side	0.0071	32	0.000221	0.99	0.49
Side•i	0.0059	32	0.000184	0.82	0.75
Residue	0.2291	1024	0.000224		

جدول (22) تحليل التباين ANOVA لتماثل حجم الجناح الأيمن في أناث الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

Source	SS	DF	MS	F	Signification
Modal	0.0002	3	0.000051	1.23	0.13
Individual	0.0001	1	0.000144	3.45	0.07
Side	0.0000	1	0.000002	0.04	0.83
Side•i	0.0000	1	0.000008	0.20	0.66
Residue	0.0013	32	0.000042		

جدول (23) تحليل التباين ANOVA لتماثل شكل الجناح الأيمن في أناث الجيل الثالث بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

Source	SS	DF	MS	F	Signification
Modal	0.0009	96	0.000010	0.50	1.00
Individual	0.0004	32	0.000012	0.61	0.96
Side	0.0003	32	0.000011	0.55	0.98
Side•i	0.0002	32	0.000007	0.35	0.99
Residue	0.0199	1024	0.000019		

يوضح الشكل (24) التحليل التمييزي لأحداثيات معالم الأجنحة اليمنى لأناث الجيل الأول في المجتمعات السكانية للذبابة الحلزونية للعالم القديم التي جمعت عيناتها من مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه ، ويستخدم هذا التحليل كما ذكرنا سابقا لغرض المقارنة بين أفراد المجموعة السكانية الواحدة ، إذ كان المجموع الكلي لعدد الأجنحة في هذا التحليل هو 45 جناحا أيمن ، 15 جناحا لكل منطقة من مناطق الدراسة ، إذ أن اللون الأزرق يمثل عينات المنطقة الشمالية وكما هو موضح في الشكل أعلاه واللون الأصفر يمثل عينات المنطقة الوسطى في حين أن اللون البنفسجي يمثل أناث المنطقة الجنوبية ، وقد أظهرت نتائج التحليل التمييزي أن معدل الحجم المركزي Centroid Size للجناح الأيمن لأناث حشرات المنطقة الشمالية هو 1284.3 ومعدل الحجم المركزي لأناث حشرات المنطقة الوسطى هو 1179.6 ، أما معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لأناث حشرات المنطقة الجنوبية فهو 1157.9 ، ويلاحظ من الشكل أعلاه أن الأجنحة اليمنى لحشرات المنطقة الشمالية بعيدة عن أجنحة حشرات المنطقتين الوسطى والجنوبية وقد يرجع سبب ذلك إلى بعد المسافة الجغرافية بين المناطق الثلاثة وخاصة بين المنطقتين الشمالية والجنوبية بالإضافة إلى اختلاف التضاريس في المنطقة الشمالية مما هي عليه في المنطقتين الوسطى والجنوبية وهذه التضاريس تكون بشكل حواجز طبيعية تمنع تدفق الجينات إلى المناطق الأخرى، وكذلك

أظهرت النتائج وكما هو موضح في الجدول (18) ان مسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي لأجنحة أنث حشرات المنطقة الشمالية والحجم المركزي لأجنحة أنث حشرات المنطقة الوسطى هي 7.20 ومسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي لأجنحة أنث حشرات المنطقة الشمالية والحجم المركزي لأجنحة أنث حشرات المنطقة الجنوبية هي 7.67 ، في حين أظهرت النتائج أيضا ان مسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي لأجنحة أنث حشرات المنطقة الوسطى والجنوبية هي 4.33 ، وعند إعادة عملية التصنيف بالأعتماد على النسبة المئوية لأنث حشرات الجيل الأول للذبابة في عينات المناطق الثلاثة بأستخدام وحدة PAD التي توجد في البرنامج الجاهز وأعتمادا على تطابق الأجنحة، كانت نسبة التصنيف في حشرات المنطقة الشمالية 78% وفي حشرات المنطقة الوسطى 50% وفي حشرات المنطقة الجنوبية 40% اي ان التباين في شكل الجناح الايمن وحجمه لحشرات المنطقة الجنوبية أقل مما هو عليه في منطقتي الشمال والوسط ، وعند إعادة تصنيف أنث الجيل الأول للمناطق الثلاث المدروسة بالأعتماد على تطابق الأجنحة ومسافة مهالانوبز تبين ان نسبة التصنيف فيها هي 64% ، أي ان 29 فردا من مجموع 45 متطابقة بشكل تام للمجتمعات السكانية في مناطق الدراسة الثلاثة المذكورة أعلاه ، ان السبب الأساسي في التباين البسيط بين المجتمعات السكانية للحشرة في مناطق شمال ووسط وجنوب العراق قد يعود الى الاختلاف في الظروف البيئية والمتمثلة بدرجة الحرارة والرطوبة النسبية وكمية الأمطار في المناطق التي جمعت منها عينات الحشرة، ويوضح الشكل (25) التحليل التمييزي لأحداثيات معالم الأجنحة اليمنى لأنث الجيل الثالث للمجتمعات السكانية لذبابة الدودة الحلزونية والتي جمعت عيناتها من مناطق العراق الثلاثة، اذ كان العدد الكلي للأجنحة المستخدمة في الدراسة 45 جناحا أيمن ، 15 جناحا منطقة ، المنطقة الشمالية مؤشرة باللون الرصاصي والمنطقة الوسطى باللون الأخضر ، اما المنطقة الجنوبية فمؤشرة باللون الأحمر ، وقد أظهرت نتائج التحليل التمييزي ان معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لأنث المنطقة الشمالية هو 1290.9 ومعدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لأنث ذباب المنطقة الوسطى هو 1199.9، اما معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لأنث ذباب المنطقة الجنوبية فهو 1054.4 ، ولوحظ في الشكل أعلاه وجود تقارب كبير بين عينات المنطقة الشمالية وعينات المنطقة الوسطى وهذا يدل على وجود تطابق الى حد قريب جدا بين أجنحة الذباب في المنطقتين، وقد أظهرت النتائج أيضا في (الجدول 19) ان مسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي لأجنحة أنث المنطقة الشمالية والحجم المركزي لأجنحة أنث المنطقة الوسطى هي 7.27 ، ومسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي لأجنحة أنث المنطقة الشمالية و الحجم المركزي لأجنحة أنث المنطقة الجنوبية هي 12.55 ، بينما كانت مسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي لأجنحة أنث المنطقة الوسطى والحجم المركزي لأجنحة أنث المنطقة الجنوبية 11.05، في حين أن إعادة التصنيف كنسبة مئوية لأنث الجيل الثالث للذبابة في المناطق المدروسة بأستخدام وحدة PAD الموجودة ضمن مكونات البرنامج الجاهز بالإضافة

الى الاعتمادا على تطابق الأجنحة للأفراد الداخلة في الدراسة كانت نسبة التصنيف في أنثى عينات المنطقة الشمالية هي 80% وفي أنثى عينات المنطقة الوسطى 30% ، في حين كانت أنثى عينات المنطقة الجنوبية 90% ، وعند إعادة عملية التصنيف في المجتمعات السكانية الثلاثة لها فإن نسبة التصنيف كانت 64% أي أن 29 فردا من مجموع 45 فردا متطابقة بشكل تام ، ونلاحظ ان التغيرات في شكل وحجم الجناح لأنثى الجيل الثالث للذبابة لم ينتهي في هذا الجيل ولكن أصبح أقل مما هو عليه في الجيل الأول وقد يعود السبب في ذلك الى زيادة نسبة السيطرة على الظروف البيئية أثناء تربية الحشرة مختبريا ، فضلا عن ذلك فإن الحشرة لازالت متأثرة في هذا الجيل باختلاف الظروف البيئية في المناطق التي جمعت منها العينات ، ولاتوجد دراسات سابقة في العراق حول استخدام تقنية المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح في دراسة التغيرات الوراثي الكمي لشكل وحجم جناح ذبابة الدودة الحلزونية ، وكما ذكرنا سابقا فإن هذه الدراسة تعد الأولى من نوعها في العراق ، في حين أن هناك دراسات عالمية مماثلة لهذا النوع وخاصة على الحشرات التي تعود الى رتبة ثنائية الاجنحة Diptera ، عائلة الذباب المعدني Calliphoridae التي تنتمي لها ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم ومن بين تلك الدراسات هي الدراسة التي قام بها كل من Vasquez وLiria (2012) والتي تضمنت مقارنة لشكل وحجم الجناح لنوعين من الذباب يعودان لنفس الجنس والعائلة والرتبة وهما *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya megacephala* لعينات جمعت من مناطق جغرافية مختلفة في فنزويلا وذلك باستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح اذ وجد الباحثان أعلاه بعد تحليل المركبات الأساسية أختلافا كبيرا في حجم الجناح لكلا النوعين ، اذ ان حجم الجناح للذبابة *Ch.megacephala* أكبر من حجم الجناح لذبابة النوع *Ch.albiceps* وكذلك وجدوا فروقا معنوية ذات دلالة احصائية بين النوعين وذكروا ان السبب في ذلك الاختلاف هو تأثير تلك الأنواع من الذباب بالظروف البيئية في أماكن تواجدها وخاصة درجة الحرارة الشهرية التي تؤثر بشكل مباشر على تواجد ووفرة النوعين المذكورين أعلاه ،بالأضافة الى عامل الرطوبة النسبية والمنافسة على الغذاء ضمن النوع الواحد ، ان المقياس الهندسي هو أداة مثالية في تحديد الأنواع التابعة لرتبة ثنائية الأجنحة كونه طريقة احصائية سهلة التطبيق استخدمت بشكل كبير في تحديد أنواع من جنس الـ *Chrysomya* (2010 وآخرون، Lyra) ، ان تطابق معظم أحداثيات المعالم المثبتة على الأجنحة اليمنى لأنثى الجيلين الأول والثالث للمجتمعات السكانية الثلاث لذبابة النوع *Ch.bezziana* ، في الدراسة الحالية يبين لنا ان هذه الحشرات تعود لسلالة واحدة بالرغم من وجود تغير بسيط جدا لبعض الأفراد الداخلة في هذه الدراسة نتيجة لاختلاف الظروف البيئية في المناطق الثلاثة التي جمعت منها العينات ، وتتفق نتائج هذه الدراسة مع نتائج الدراسة الوراثية الجزيئية التي اتضح فيها ان الوزن الجزيئي للحزم الناتجة من تضخيم الجين Elongation Factor-1.gene الموجود في DNA النواة هو 401bp والوزن الجزيئي للحزم الناتجة من تضخيم الجين White

gene الموجود في DNA النواة أيضا هو 617bp وكذلك الوزن الجزيئي للحزم الناتجة من تضخيم الجين (Cytochrome b(CB) الموجود في DNA الماييتوكوندريا mtDNA هو 761bp لجميع العينات الداخلة في الدراسة ، ويوضح كل من الجدولان 20 و 21 تحليل التباين لتماثل حجم الجناح الأيمن في أناث الجيلين الأول والثالث وعلى التوالي للذبابة في المجتمعات السكانية الثلاثة ، في حين ان الجدولين 22 و 23 يمثلان نتائج تحليل التباين لتماثل شكل الجناح الأيمن في أناث الجيلين الأول والثالث وعلى التوالي لعينات مناطق العراق الثلاثة ، اذ تم مقارنة شكل الجناح الأيمن لأناث الجيل الأول والثالث بواسطة استخدام وحدة ASI الموجودة ضمن مكونات البرنامج الجاهز وعن طريق هذه الوحدة يمكن معرفة ما اذا كان هناك تغاير في شكل وحجم الجناح الأيمن للحشرات ، وقد اظهرت نتائج تحليل التباين ANOVA لتماثل شكل و حجم الجناح الأيمن لأناث الجيل الأول وكما هو موضح في الجدولين 20 و 21 وجود فروق معنوية قليلة جدا في حجم الجناح بين المجتمعات السكانية الثلاثة للذبابة الحلزونية للعالم القديم وهذا يعني انها تعود لسلالة واحدة ، كما أظهرت نتائج تحليل التباين لتماثل حجم وشكل الجناح الأيمن لأناث الجيل الثالث وكما هو موضح في الجدولين 22 و 23 عدم وجود فروق معنوية في حجم وشكل الجناح الأيمن بين المجتمعات السكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم المجموعة عيناتها من مناطق العراق الثلاث المذكورة في أعلاه ، وهذا يعني ان هذه الذبابة تعود الى أصل جغرافي واحد بالرغم من وجود بعض الفروق المعنوية القليلة جدا في أجنحة اناث الجيل الأول لها والسبب في ذلك يعود لتأثر العينات المجموعة بالظروف البيئية بنسبة كبيرة في المناطق التي جمعت منها، وهناك دراسات عالمية متعددة حول هذا الموضوع ومنها الدراسة التي أجراها Saelee وآخرون (2006) لتمييز الأجناس العائدة لذبابة الخل *Drosophila melanogaster* لعينات جمعت من عدة مجتمعات سكانية في أفريقيا وأسيا حيث تمكن الباحثون المذكورون في أعلاه من تحديد الكثير من أنواع تلك الحشرة كما لاحظوا باستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح الظاهري وجود تغاير بين الأفراد في المجتمعات السكانية للحشرة في القارتين وذكروا ان سبب ذلك التغاير يرجع الى أختلاف الظروف البيئية من درجة الحرارة والرطوبة النسبية وكمية الأمطار في الأماكن التي جمعت منها الحشرة ، واخيرا فأن نتائج هذه الدراسة تتفق مع نتائج الدراسة الوراثية الجزيئية التي طبقت على نفس الحشرة لتحديد التغاير الوراثي الجزيئي والكمي فيها من خلال نتائجها النهائية التي أثبتت ان عينات الدراسة تعود لأصل جغرافي واحد ولمناطق الدراسة الثلاثة وكذلك أعطت الدراستان نتيجة واحدة وهي وجود تقارب كبير جدا بين عينات الدراسة .

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

5- الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

1-5 الاستنتاجات Conclusions

1 - وجود تنوع وراثي جزئي بسيط بشكل طفرات نقطية Point Mutations من نوع الحذف والاستبدال في بعض القواعد النروجينية للعينات العائدة للنوع *Ch.bezziana* والتي جمعت من بعض مناطق العراق الثلاثة المنطقة الشمالية/السليمانية، المنطقة الوسطى/ديالى والمنطقة الجنوبية/ميسان عند دراسة التسلسل ألتابعي لجزء من جين دنا النواة White gene وجزء من جين ألدنا المايكوكوندري mtDNA وهو أألجين CB .

2- وجود تنوع وراثي كمي بسيط في شكل الجناح وحجمه لبعض ذكور واناث الجيلين الأول والثالث بين المجتمعات السكانية الثلاثة لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم والتي جمعت من بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه .

3- لوحظ وجود تشابه كبير جدا بين المجتمعات السكانية للذبابة الحلزونية في شمال العراق ووسطه من ناحية التسلسل النيوكلوتيدي للجزء من أألجين White gene وجزء من أألجين CB .

4- لوحظ وجود اختلاف وراثي جزئي وكمي بسيط بين المجتمعات السكانية للذبابة الحلزونية للعالم القديم في شمال العراق وجنوبه لكلا الدراستين الجزيئية والكمي .

5- وجد أن السيطرة على الظروف البيئية مثل درجة الحرارة والرطوبة النسبية أثناء تربية الذبابة مختبريا يؤدي الى انخفاض نسبة التغاير الوراثي الجزيئي والكمي بين حشرات المجتمعات السكانية الثلاثة في الجيلين الثاني والثالث لذكور ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* واناثها .

6- لوحظ وجود هذا النوع من الذباب لأول مرة في المنطقة الشمالية وبالتحديد في منطقة كلار التابعة لمحافظة السليمانية ، حيث لم تشخص سابقا أي حالة اصابة بهذا النوع من قبل مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي/جامعة بغداد في هذه المنطقة .

2-5 التوصيات Recommendations .

1- القيام بدراسة وراثية جزيئية موسعة وشاملة لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* من خلال دراسة التسلسل ألتتابعي للجينات الأخرى الموجودة في DNA النواة على أن يتم جمع عيناتها من محافظات أخرى تعود لمناطق العراق المختلفة وذلك باستخدام تقنية تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل أل PCR لأن تلك التقنية تعطي نتائج دقيقة 100% .

2- القيام بأجراء دراسات وراثية جزيئية على مناطق أخرى في ألدنا المايتوكوندرى mtDNA أما بنفس الطريقة أو باستخدام تقنيات مختلفة مثل ISSR, AFLP, RFLP, RAPD .

3 – أجراء دراسة وراثية خلوية على هذه الذبابة وعلى المستوى الكروموسومي والمقارنة بين المجتمعات السكانية الثلاثة من ناحية طول وتصنيف الكروموسومات وموقع السنترومير لها .

4 – أجراء مقارنة وراثية جزيئية وكمية واسعة وشاملة بين هذه الذبابة وبين أنواع أخرى قريبة الصلة وهي *Ch.megacebhala* و *Ch.albiceps* والتي تسبب مرض التدويد أيضا باستخدام نفس الجينات وكذلك استخدام تقنية المقياس الهندسي لمعرفة مدى تقاربها وراثيا مع الذبابة الحلزونية للعالم القديم .

5- القيام بدراسة تغاير شكل الجناح الأيمن وحجمه وباستخدام تقنية المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه على أنواع أخرى من الذباب التابعة لنفس الجنس الذي تنتمي له ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch. bezziana* في العراق .

6- استخدام تقنية الحشرات العقيمة (SIT) Sterile Insect Technique من قبل المستشفيات البيطرية التابعة للشركة العامة للبيطرة في المنطقة الشمالية ، الوسطى والجنوبية لغرض مكافحتها حيث أن هذا النوع المدروس وللمجتمعات السكانية الثلاثة لا يوجد بينها تغاير وراثي جزيئي وكمي كبير ولا توجد بينها فروق معنوية كبيرة ، ولأنها في المجتمعات السكانية الثلاثة تعود لأصل جغرافي واحد Geographical race كما أثبتت نتائج الدراستين الوراثة الجزيئية والكمية .

المصادر

References

أولاً. المصادر العربية :

- أبو الجدايل ، رحيم عبد السلام .(2014). التقانات الحيوية – البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية . دمشق ، سوريا . ص : 1-22 .
- التركي ، رنا عبد العزيز عبد الله .(2010). تفاعل البلمرة التسلسلي Polymerase Chain Reaction (PCR) . وحدة الأبحاث الوراثية، المختبر المركزي، جامعة الملك سعود ، الرياض ، المملكة العربية السعودية . ص : 1-21 .
- الجواري ، سولاف عبد خضير .(2000). دراسة تأثير بعض العوامل البيئية في حياة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم . رسالة ماجستير، كلية التربية للبنات / جامعة بغداد – العراق .
- الخطيب ، تمارا عدنان .(2000). استخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة ألدنا RAPD في التمييز لجنس وأصناف نخيل التمر *Phoenix dactyfera* في العراق . رسالة ماجستير ، كلية العلوم/ جامعة بغداد – العراق .
- السراي ، ميسون حسن مشجل .(2002). تأثير أشعة كاما على بعض المقاييس الحياتية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (*Chrysomya bezziana* Vill.) . رسالة ماجستير، كلية التربية للبنات – جامعة بغداد ، العراق .
- الصالح ، عبد العزيز عبد الرحمن .(2007). البصمة الوراثية، سلسلة الكتب العلمية الثقافية ، كلية العلوم، جامعة بغداد ، العراق. ص: 147-150 .
- الطويل، أياد احمد .(2005). الصفات التشخيصية والحياتية لكل دور من ادوار ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم ، الدورة التدريبية الاقليمية الثانية في مجال استقصاء وتشخيص ومكافحة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم . المنظمة العربية للتنمية الزراعية، عمان – المملكة الأردنية الهاشمية 2005 / 4 / 22-17 .
- الطويل ، أياد احمد .(2000). استخدام التقنيات الوراثية في مكافحة الافات الزراعية ، ورشة العمل القطرية الأولى في مجال مكافحة الحويبة للآفات الزراعية . منظمة الطاقة الذرية العراقية، بغداد 2000/11/26-25 . (تقرير) .
- الطويل، أياد احمد والجبوري، ابراهيم جدوع .(2004). حشرات عث التمر والسيطرة عليها بأستعمال عناصر مكافحة المتكاملة . وزارة العلوم والتكنولوجيا / دائرة البحوث الزراعية وتكنولوجيا الغذاء ، مجلة البحوث الزراعية ، 8 (4) : 1-4 .

الطويل، أياد احمد ، راشد ، ميسون جاسم و الأسدي ، حسن سعيد .(2006). دراسات وراثية و خلوية وحياتية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم المعرضة لأشعة كما. VIII طبعة النواة للسلالتين المختبرية والحقلية ، المجلة العراقية للتقنيات الحيوية، 5(1): 38 - 49 .

العاني، منتصر عمر .(1997). ذبابة الدودة الحلزونية *Chrysomya bezziana* في العراق وبائيتها وتهديدها للثروة الحيوانية في المشرق العربي . مجلة الزراعة العراقية ، 4 (7): 24-29 .

ألعزي، محمد عبد جعفر .(2005). دورة حياة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم والظروف البيئية الملائمة لتربيتها ، الدورة التدريبية الاقليمية الثانية في مجال استقصاء وتشخيص ومكافحة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم ، المنظمة العربية للتنمية الزراعية، عمان- المملكة الأردنية الهاشمية ، 17-22 / 4 / 2005 .

ألعزي ، محمد عبد جعفر ،الطويل،أياد احمد وجاسم،فاضل عباس .(1999). وبائية وتربية ذبابة الدودة الحلزونية الآسيوية في العراق . مجلة الزراعة العراقية، 4 (7): 153-160 .

العزاوي ، بدر ، برخي ، جورج سيمون و البهادلي ، ليلي جبار.(2006). مقارنة تأثير أشعة كما على قابلية طيران كل من ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (*Chrysomya bezziana* Vill.) وذبابة ثمار القرعيات (*Dacus ciliatus* Loew) . مجلة ديالى الزراعية ، مجلد (22)،العدد 22 : 1-10 .

العنسي ، محمد حفظ الله علي .(2012). دراسة وبائية عن انتشار ذبابة الدودة الحلزونية في الحيوان والانسان في اليمن . رسالة ماجستير، كلية الزراعة والطب البيطري ، جامعة ذمار، اليمن .

ألعوني ،السيد الصديق .(2005).التوزيع الجغرافي لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم واستخدام الحاسوب للتنبؤ بانتشار الآفة وتحديد المخاطر على الدول العربية، الدورة التدريبية الاقليمية الثانية في مجال استقصاء وتشخيص ومكافحة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم .عمان – المملكة الأردنية الهاشمية 17-22 / 4 / 2005 .

القرة غولي ، عمار احمد سلطان .(2013).دراسة وراثية ووراثية خلوية لثلاث مجتمعات سكانية لذبابة ثمار القرعيات (*Dacus ciliatus* Loew)(Diptera:Tephritidae) ، أطروحة دكتوراه ، كلية التربية – جامعة تكريت ، العراق .

المنظمة العربية للتنمية الزراعية ، جامعة الدول العربية .(2000). دليل حول ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (*Chrysomya bezziana* Vill.) ، ص 85 .

- المنظمة العربية للتنمية الزراعية. (2005). الدورة التدريبية الاقليمية الثانية في مجال استقصاء وتشخيص ومكافحة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم ، عمان – المملكة الأردنية الهاشمية من 17-22 / 4 / 2005 .
- جبرائيل، جلادت محمد صالح .(2001). التوصيف الوراثي لعدد من أصناف نخيل التمر *Phoenix dactylifera* في العراق باستخدام مؤشرات ألد RAPD ،مجلة أباء للأبحاث الزراعية .المجلد - 11 ،العدد (1) .الصفحة: 138-148.
- جواد ، مهدي محمد .(2012).دراسة تصنيفية مظهرية ووراثية على حشرة ذبابة البحر المتوسط *Ceratitis capitata* (Wiedemann 1824) (Diptera : Tephritidae) في بعض من محافظات وسط العراق . أطروحة دكتوراه، كلية التربية للعلوم الصرفة/ ابن الهيثم ، جامعة بغداد ، العراق .
- حميد ، اسعد علوان .(2002).دراسة مختبرية وحقلية لاستعمال متطفل عث التين في حشري عث التين ودودة جوز القطن الشوكية . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة – جامعة بغداد ، العراق .
- حميد ، اسعد علوان والطويل ، أياد احمد .(1999).المكافحة الاحيائية للحشرات الاقتصادية . المجلة العراقية للعلوم ، 40 (3): 23-24 .
- سليط ،علي محمد ، الصفار ، زهير يونس والعراقي ، رياض احمد .(1984).المرشد الى علم الحشرات الطبية . مطبعة جامعة الموصل، العراق: 259-260 .
- سيف ، حمد محمد . (2006) . ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم المسببة للتدويد الإجباري Obligate myiasis Screwworm fly في دول الخليج العربي . منتديات أغنام، أبو ظبي، الإمارات العربية المتحدة .
- شيمان ، ر. ف .(1987).الحشرات – التركيب والوظيفة .الدار العربية للنشر والتوزيع ، الجزء الثاني، ص: 143-150 .
- علي ، حيدر بدري .(2000).تشخيص وتصنيف الأدوار غير الكاملة والدور الكامل للذبابة الحلزونية للعالم القديم *Chrysomya bezziana*(Vill.) (Diptera : Calliphoridae) وقربيباتها في بغداد ، رسالة ماجستير، كلية العلوم/جامعة بغداد ، العراق .
- كبهوار ، محمد كامل .(2007). مبدأ تحديد تسلسل ألدنا DNA . مجلة التشخيص المخبري ، المجلد 4 (5): 1-6 .

- محسن ، ألاء عبد الحسن .(2001). مكافحة حشرة عث التين بأستعمال متطفل عثة التين وأشعة
كأما . رسالة ماجستير ، كلية التربية للبنات / جامعة بغداد ، العراق .
- مولود، نبيل عبد القادر .(2001). دراسة تصنيفية لحشرات عائلة الذباب الأزرق المعدني
(Diptera:Calliphoridae) في وسط العراق . أطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة/ جامعة بغداد
، العراق .
- منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة/FAO .(1992). استئصال ذبابة الدودة الحلزونية للعالم
القديم . برنامج منظمة الأغذية والزراعة لمواجهة حالة الطوارئ في شمال أفريقيا ، ص 192 .

ثانيا . المصادر الأجنبية :

- Abdul-Rassoul**, M. S.; Ali, H. A. and Jassim, F. A .(1996). Nots on *Chrysomya bezziana* (Vill.),(Diptera : Calliphoridae),First record from Iraq .Bull.Iraq Nat .Hist. Mu. , 8(4): 113-115.
- Abul-Hab**, J. K. and Kessal, S.(1998). Filth flies vectors of filth diseases in Baghdad area, Iraq .J. Comm .Med. ,11(1):10-13.
- Adams**, D. C.; Rohlf, F. J. and Slice, D. E.(2004).Geometrics: ten years of progress following the revolution. Ital. J. Zool. , 17 : 5-16 .
- Ahmed** ,M .S .H.; A-Maliky ,S .K.; Al-Taweel ,A .A.; Jabo ,N.F. and Al-Hakkak, Z.S.(1985). Stored prod.Res.,21(2):65-68 .
- Akbarzadeh**, K.; Wallman, J.F.; Sulakova, H. and Szpila, K. (2015). Species identification of middle Eastern blowflies (Diptera:Calliphoridae) of forensic importance .Parasitology Research ,114(4):1463-1472 .
- Aklilv**, E.(2011). Ectoparasites of Veterinary importance ,Veterinary University Malaysia – Kelantan faculty of veterinary medicine , Malaysia, :1-59 .
- Al-Ani**, M.; Al-Helfi, M. A. A. and Al-Jassim, K. B.(2014).The last position of Old World Screwworm in Iraq. Basrah Journal veterinary Research,1(1):274-283 .
- Albert**, J. and Fenyo, E. M .(1990). Sample sensitive, and specific detection of human immune deficiency virus type 1 in clinical specimens by Polymerase Chain Reaction with nested primers . j . Clin Microbial. 28: 1560-1564 .
- Al-Helfi**, M. A.M.(2001). Taxonomical Ecological studies on the medical insect(Order:Diptera) caused myiasis in Basrah province, with amention on to Its control. 2(1):21-24.
- Al-Helfi**, M. A. M .(2008). *Chrsomya bezziana* in dogs threat Basrah province south of Iraq . Basrah Journal Veterinary research.7(1):26-27 .

- Al-Izzi**, M. A.; Al-Tweel, A. A. and Jassim, F. A .(1999). Epidemiology Screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Vill.) , (Diptera:Calliphoridae). Iraqi. J. Agric, 4(8): 153-160 .
- Al-Izzi**, M. A. J.(2002).Work by the Arab organization for Agricultural Development to control the Old World screwworm fly , proceedings of the Screwworm fly Emergency preparedness conference, Canberra,12-15 November 2001, 187-193 .
- Al-Taweel** ,A.A.; Al-Izzi, M.M.J. and Jassim, F. A.(2000).Incidence of Old World Screwworm fly ,*Chrysomya bezziana* in Iraq .Area wide control of fruit flies and Other Insect pests. Edited by Tan K. H.; Penerbit University Sains ,Malaysia, Penang,101-105 .
- Austin**, J.W.; Szalanski, A. L.; Ghayourfar, R.; Kence, A. and Cold R. E.(2006). Phylogeny an genetic variation of reticulitermes (Isoptera:Rhinotermitidae) From western Mediterranean and middle East . Sociobiology ,47:873-890 .
- Avise** , J.C.; Arnold, J. and Ball, R. M .(1987). Intraspecific Phylogeography the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic . Annual Review of Ecology and systematic , 18: 489-522 .
- Barr**, N. B.; Islam, M. S.; De Meyer, M. and Mccpherson, B. A . (2012). Mitochondrial identification of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) using DNA sequences of the COI barcode region. Ann. Entomology . Soc. Am.,105(2):339-350 .
- Ballard**, J. W. O. and Kreitman, M.(1995).Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker?. Trends Ecol. Evol., 10 : 485-488.
- Becker**, W. M.; Reece, J. B. and peinie, M. F.(1996). The world of the cell. California: Benjamin-Cummings publishing . 8 : 72-74.
- Bennett**,C. L.and Frommer, M.(1997).The white gene of the tephritid fruit fly *Bactrocera tryoni* is Characterized by a long untranslated 5 Lader and a 12-kb first intron. Insect molecular Biology. 6 : 343-356.
- Bernhard**, M. and Paul, J. H.(2000). Morphology and terminology of adult Diptera (Other than terminalia). In: Laszol Papp, Bela Dravas contributions to a Manual of palaeartic Diptera. Volume 1: General and Applied Dipteraology. Buda pest, Science. Herald: 22-51.

- Besansky**, N. J.; Bedell, J. A.; Mukabayire, O.; Hilfiker, D. and Collins, F. H.(1995). Cloning and Characterization of the white gene from *Anopheles gambiae*. Insect molecular Biology,4 :217-231 .
- Blood**, D. C. and Radositits, O. M.(1989).Veterinary medicine, 7th Ed. Baillire Tindal London , 1075-1077 .
- Bologia**, J.L; Jorizzo, J.L. and Rapini, R.P.(2008). Dermatology. 2and Ed. Vol2.st. Louis : Mosby Elsevier.1301PP.
- Bloch**, G.; Francoy, T. M.; Wachtel, I.; Panitz-Cohen, N.; Fuchs, S. and Mazar, A.(2010).Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees proc. Natl. Acad. Science. USA. 107 : 11240-11244.
- Bookstein**, F. L.(1991). Morphometric Tools for Landmark Data: Geometric and Biology. Cambridge University press, Cambridge, 435PP .
- Bookstein**, F. L.(1997). Landmark methods for from without landmarks: Localizing group differences in outline shape. Med. Limage Anal.1,225-243 .
- Boore**, J. L. and Brown, W. M.(1998). Big trees little genomes: Mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. Current opinion in genetics and development, 8(6):668-674.
- Borrer**, D. J.; Triplehorn, C. A. and Johnson, N. F.(1989). An introduction to the study of insects. 6th Ed. Saunders College publishing, Philadelphia, 875PP.
- Bouyer**, J.; Ravel, S.; Dujardin, J. P.; De meeus, T.; Vial, L.; Thevenon ,S.; Guerrini, L.; Sidibe, I. and Solano, P.(2007). Population structuring of *Glossina palpalis* gambiensis (Diptera:Glossinidae)according to landscape fragmentation in the Mouhoun River, Burkina Faso. J. Med. Entomology, 44 :788-795.
- Brower**, A. V. Z .(1994). Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American,91: 6491-6495 .

- Bubliy, O. A.; Tcheslavaskaia, K. S.; Kulikov, A. M.; Lazebny, O. E. and Mitrofanov, V. G.**(2008).Variation of wing shape in the *Drosophila virilis* species group (Diptera:Drosophilidae). J. Zool. Syst. Evol. Res.,46 :38-47 .
- Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P. M.**(1997).DNA markers protocols-Applications and Overview. Wiley-less, Inc . 374.PP
- Cason, R. and Greeing, W. A.**(2009). An Economic Evolution of possible Austuralian policies to meet thereat of an Exotic pest-The screwworm fly, *Chrysomya bezziana*. Proceedings of the 2nd International symposium on veterinary Epidemiology and Economics : 463-470.
- Casper. J. B.; Gibbs, M.; Dongen, S. V.; Merkx, and Dysky, H. V.** (2010).The use of Geometric Morphometrics in studying Butterfly wings in an Evolutionary Ecological context. Morphometrics for Non morphometricians, Lecture Notes in Earth sciences 124.Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Chapter,12 : 272-287 .
- Cevallos, V. E. and Nation, J. L.**(2004). Chromosome of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tphritidae). Florida Entomologist, 87 (3): 361-364 .
- Chandra, S. B. C.; VIK, J. L. and kapatral, V.**(2006). Comparative insect mitochondrial genomes: Differences despite conserved genomes synteny. African J. Biotech.,5(14): 1308-1318 .
- Chen, B. Y. and Janes, H. W.**(2002). PCR cloning protocols. In: Methods in molecular Biology, Vol. 129, and 2nd. Ed. Human press Inc. Tomato, NJ. 423PP.
- Chong, Y. V.; Chua, T. H. and Song, B. K.**(2014).Genetic variations of *Chrysomya megacephala* populations in Malaysia (Diptera:Calliphoridae) . Advances in Entomology. 2(1): 49-56.
- Claude, J.**(2008). Morphometrics with R . Springer, New York . 243PP.
- Cook, G. C. and Zumla, A. l.**(2009).Mansons Tropical Diseases. Saunders, Philadelphia. 12 : 63-67.
- Crease, T. J.**(1999).The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea).Genetics, 233: 89-99 .

- Cunningham**, E. P.; Abusowa, M.; Lindquist, D. A.; Sidahmed, A. E. and Vargas-Teran, M.(1992).Le programme de Eradication de la Lucilie Bouchere d afrique du Nord. Revu et de Medicine veterinary des pays tropical, 45, 115-118 .
- Danforth**, B. N. and Ji, S.(1998).Elongation factor-1.a occurs as two copies in bee: implications for phylogenetic analysis of EF-1a sequences in insects. Molecular Biology and Evolution,15 :225-235 .
- Dasilva**, BB.; Borges, US. and Pimentel, ICC.(2005).Human vaginal myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* . Int JGynecol obstet, 89 :152-53.
- Davison**, D.; Chapman, C. H.; Wedeen, C. and Bingham, P. M. (1985).Genetic and physical studies of a portion of the white locus participating in transcriptional regulation and in synapsis –dependent interactions in *Drosophila* tissues. Genetics,110,479-494 .
- Depto**, H. K.; Collins, E. and Woods, R.(2006).Study the genetic variability of quantitative between different populations of *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae).Apidologie, SpringerVerlag,24(3): 304-312 .
- Esseghir**, S.; Ready, P. D. and Ben-Ismail, R.(2000). Speciation of *Phlebotomus* Sand flies of the subgenus *Larroussius* coincided with the late Miocene - Pliocene aridification of the Mediterranean sub region. Biological. Journal of the Linnean Society,70: 189-219.
- Farahvash**, M. S. and Aalami, H . Z .(1998). Bilateral Ophthalmomyiasis interna posterior: report of a case with severe visual loss. Arch. Iran Med., 2 : 38-41.
- Ferson**, S.; Rohlf, F. J. and Koehn, R. K.(1985). Measuring shape variation of Two-Dimensional Outlines Systematic Zoology, 34(1):59-68.
- Flook**, P. K.; Rowell, C. H. F. and Gellissen, G.(1995).The sequence organization, and evolution of the *Locussta migratoria* mitochondrial genome. J. Mol. Evol., 41:282-941.
- Francoy**, T. M.; Prado, P. P. R.; Goncalves, L. S.; Costa, L. D. and De Jong, D.(2006).Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types. Apidologie.37:9197.

- Francoy**, T. M.; Wittmann, D.; Drauschke, M.; Muller, S.; Steinhage, V.; Bezerra-Laure, M. A. F.; De Jong, D. and Goncalves, I. S. (2008). Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie*. 39: 207-214.
- Francoy**, T. M.; Silva, R. A. O.; Nunes-Silva, P.; Menezes, C. and Imperatriz-Fonseca, V. L.(2009). Gender identification in five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphology. *Gen. Mol. Res.*, 8 :207-214.
- Francoy**, T. M.; Franco, F. F. and Roubi, D.(2012). Integrated landmark and Outline-based morphometric methods efficiently distinguish species of *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie*, Springer Verlages ,43(6) : 609-617.
- Garcia**, R. L.; Perkins, H. D. and Howells, A. J.(1996).The structure sequence and developmental pattern of expression of the white gene in the blowfly *Lucilia cuprina*. *Insect Molecular Biology*, 6 :251-260.
- Garros**, C.; Harbach, R. E. and Manguin, S .(2005). Systematic and biogeographically Amplification of the phylogenetic relationships between members of the Funestus and Minimus groups of *Anopheles* (Diptera:Culicidae).*Journal of Medical Entomology*,42:7-18.
- Gissi**, C.; Iannelli, F. and Pesole, G.(2008).Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101 :301-320.
- Glassburn, T. A.(1995).A new Paleontological technique describing temporal shape variation in Miocene bivalves. *Paleontology*,38: 133-151.
- Gomez-Palacio**, A.; Jaramillo-O, N.; Caro-Rino, H.; Diaz, S.; Monteiro, F. A.; Perez, R.; Panzera, F. and Triana, O. (2012) . Morphometric and molecular evidence of intraspecific biogeographical differentiation of *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae: Rhodniini) from Colombia and Panama. *Infect. Genet. Evol.*, 12 :1975-1983.
- Goddard**, J.(2003).Physicians guide to arthropods of medical importance. CRC press LLC, Florida , 43 :213-216.

- Gomulski**, L. M.; Pitts, R. J. and Costa, S.(2001).Genomic organization of the white locus of the Mediteranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Genetics ,157 :1245-1255.
- Hall**, M. J. R.(2002).New World Screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) and Old World screwworm (*Chrysomya bezziana*). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). Vol.1,5th edn, PP : 370-379.
- Hall**, M. J. R.(2008).New World screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) and Old World screwworm (*Chrysomya bezziana*) . Chapter2.1.10.In:OIE Biological Standards Commisson (ed) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), vol 1, Sixth edn. OiE, World Organization for Animal Health, Paris, France , PP: 265-275.
- Hall**, M. J. R.; Edge, W.; Testa, J. M.; Adams, Z. J. O. and Ready, P. D.(2001).Old World Screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, occurs as two geographical races. Medical and Veterinary Entomology, 15 : 393-402.
- Hall**, M. J. R.; Macleod. N. and Wardhana, A. H.(2014).Use of wing morphometric to identify populations of the Old World Screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae):A preliminary study of the utility of museum specimens. Acta Tropica , G Model Actrop-3330, 7PP.
- Hall**, M. J. R.; Wardhana, A. H.; Shahhosseini, G.; Adams, Z. J. O. and Ready , P. D.(2009).Genetic diversity of populations of Old World Screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, causing traumatic myiasis of livestock in the Gulf region and implications for control by sterile insect technique. Medical and Veterinary Entomology, 23 (1): 51-58.
- Haines**, A. J. and Crampton, J. S.(2000).Improvements to the method of foukier shape analysis as applied in Morphometric studies .Paleontology , 34(4): 765-783.
- Henry**, A.; Thongsripong , P.; Fonseca-Gonzales, I.; Jaramillo-Ocampo, N. and Dujardin, J.(2010).Wing shape of dengue vector from around the world . Infection, Genetics and Evolution, 10: 207-214.

- James, L.;** Alexander, D.; Vmp, M. and Dacp. M.(2006). Zoonosis Update by Screwworms. JAVMA , 228 (3): 357-367.
- Janovy, J.;** Schmidt, G. D. and Roberts, L. S.(2012).Foundations of Parasitology: Ninth Edition. McGraw-Hill, Chicago, 13(2): 112-117.
- Johnson, L.;** Mantle, B. L.; Gardner, J. L. and Backwell, P. R. Y. (2013). Morphometric measurements of dragonfly wing: The accuracy of pinned ,scanned and detached measurement methods. Zookeys. 276 :77-84.
- Jorian, P.;** Fihz, G.; Nil, R.; Fouad, Q.; Souad, A . B.; Ann-Laure, B. ; Denis, S. and Bulent, A.(2012).Wing size and shape variation of *Phlebotomus Papatasi* (Diptera: Psychodidae) Populations from South and North Slopes of the Atlas Mountains in Morocco. Journal of Vector Ecology, 37(1): 137-147.
- Jubrael, J. M. S.;** Udpa, S. M. and Baum, M.(2005).Assessment of AFLP-based genetic relationships among date Palm (*Phoenix dactylifera L.*) Varieties of Iraq. Amer. Soc Hort. Sci., 130(3): 442-447.
- Karp, A.;** Edwards, K. J.; Bruford, M.; Vosman. B.; Morgante, M.; Sebery, O.; Kremer, A.; Boursot, P.; Arctander, P.; Tautz, D. and Hewitt, G. M.(1997).Molecular Technologies for biodiversity evolution : Opportune mites and Challenges. Nature Biotech.,15:625-628.
- Kahn, C. M. and Line, S.**(2010).Editors the Merck veterinary manual. 10th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co. *Chrysomya bezziana* :296-821.
- Kainz, P.**(2000). The PCR plateau phase-towards an understanding of its limitation. Biochim. Biophys. Acta, 1494(1-2): 7-23.
- Kendall, D. G.**(1977).The diffusion of shape. Advances in Applied probability, 9(3):428-430.
- Kersten, R. C.;** Shoukrey, N. M. and Tabbara, K. F.(1986).Orbital myiasis. Ophthalmology, 93 :1228-1232.
- Khataminia, G.;** Aghajanzadeh, R.; Vazirianzadeh, B. and Rahdar, M .(2011). Orbital myiasis. J Ophthalmic Vis Rese., 6(3): 199-203.

- Kitthawee, S. and Rungsri, N.**(2011).Differentiation in wing shape in the *Bactrocera tau* (Walker) complex on a single fruit fly species of Thailand. Science Asia, 37: 308- 313.
- Kirby, D. A. and Stephan, W.**(1995).Haplotype test reveals departure from neutrality in a segment of the white gene of *Drosophila melanogaster* . Genetics, 141 :1483-1490.
- Knips, V.**(2004).Review of the Livestock Sector in the Horn of Africa (IGAF Countries).Report Prepared for the Livestock Information, Sector Analysis and policy Branch of the food and Agriculture Organization of the United Nations, PP.ii, 39.FAO, Rome, Italy.
- Kloft, W. J.; Noll, G. G. and Kloft, E. S.**(2001). Durch Transitbefall bewirkte Einsschleppung von *Chrysomya bezziana* (Vill) (Diptera: Calliphoridae) in neue geographische Regionen Mitteilungen Deutschen Gesellschaft fur Allgemeine und Angewandte Entomology, 3 : 151-154.
- Krafsur, E. S. and Lindquist, D. A.**(1996).Did the Sterile Insect Technique or Weather Eradicate Screwworm (Diptera: Calliphoridae) from Libya . J. Med. Entomology, 33(6):877-887.
- Kramer, M. F. and Coen, D. M.**(2001). Enzymatic amplification of DNA by PCR: Standard procedures and Optimization. Curr. Protocol . Toxicol. Appendix, 3 :1-14.
- Kumarasinghe, S. P. W.; Karunaweera, N.D. and Ihalamulla, R. L .** (2000). A study of cutaneous myiasis in Sri Lanka. Int. J. Dermatol , 39: 689-694.
- Kwong, A.; Yiu, W. K.; Chow, L. W. and Wong, S.**(2007). *Chrysomya bezzina*: A rare infestation of the breast. Breast J., 13:297-301.
- Lagace-Wiens, PR.; Dookeran, R.; Skinner, S.; Leicht, R.; Colwell, DD.; and Galloway, TD.**(2008).Human Ophthalmomyiasis interan caused by *Hypoderma tarandi*, Northern Canada. Emerg. Infect. Dis. , 14:64-66.
- Langan, S. M.; Dervan, P. and Oloughlin, S.**(2004).A moving Scalp nodule in a returning traveler. Br. J. Dermatol., 151(6):1270.

- Lessinger**, A. C.; Junqueira, A. C. M.; Lemos, T.A.; Kemper, E. L.; da Silva, F. R.; Vettore, P. A. and Azeredo-Espin, A. M. L. (2000) . The mitochondrial genome of the primary Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae). Insect molecular Biology., 9(5) :521-529.
- Lewis**, D. L.; Farr, C. L. and Kaguni, L. S.(1995). *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: Completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. Insect Molecular Biology, 4: 263-278.
- Lopez**, J. V.(1994). Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat, J. Mol. Evol., 39 :174-190.
- Lyra**, M. L.; Hatadani, L. M.; de Azeredo-Espin, A. M. L. and Klaczko, L. B. (2009).Wing morphometry as a tool for correct identification of primary and secondary Screwworm fly. Bull. Entomology.Res.,100 : 19-26.
- Lyra**, M.L.; Hatadani, L. M.; de Azeredo-Espin, A. M. L. and Klaczko, L. B. (2010).Wing Morphometry as a tool for correct identification of primary and secondary New world Screwworm fly. Bull. Entomology. Rese., 100:19-26.
- Macleod**, N.(2002).Geometric Morphometric and geological shape-Classification System. Earth-Science Reviews,59:27-47.
- Macleod**, N.(2009).Who is Procrustes and what has he done with my data ? Palaeontol. Assoc. News, 70 :21-36.
- Mahon**, R. J.(2001).The Malaysian Trial in control and Eradication of Old World Screwworm Fly. Proceedings: International Conference on Control of Old World Screwworm fly in some Countries of the Middle East. AOAD Bahrain, 132-135.
- Mahon**, R. J.(2002).A trial of the sterile insect technique release method against the Old World Screwworm fly in Malaysia. In proceedings of the International Conference on Control of Old World Screwworm Fly in some Countries of the Middle East, 163-168.

- Marcus, L. F.**(1990).Chapter 4. Traditional Morphometrics. In Proceeding of the Michigan Morphometric Workshop. Special publication No.2. F. J. Rohlf and F. L. Bookstein. Ann. Arbor MI, The University of Michigan Museum of Zoology, 77-122.
- Meudth, T.R. and Clarke,M.S.**(2007). Almost forgotten or latest practice AFLP applications, analysis and advances. Trends in plant Science, 12 (3) : 106-117.
- Mitteroecker, P. and Bookstein, F. L.**(2008).The Evolutionary role of modularity and integration in the hominoid cranium-Evolution. 62(4):943-958.
- Mombeni, E. G.; Mombeni, M. G.; Khalaj, M.; Garavand, M. M.; Rezaei, A. A.; Lahijanzadeh, A.; Kenarkohi, M.; Mola, S. A. and Hossein, S. K.**(2014).Management and Control of an outbreak of fatal traumatic myiasis duet *Chrysomya bezziana* in a herd of Persian Fallow Deer (*Dama dama mesopotamica*). J. veterinary Science Technology, 5(1):100-157.
- Moraes, E. M.; Spressola, V. L.; Prado, P. R. R.; Costa, L. F. and Sene, F. M .** (2004).Divergence in wing morphology among sibling species of the *Drosophila buzzatii* cluster. J. Zoology. Syst. Evolution. Res., 42 :154-158.
- Moraes, A.; Morator, C.; Suesdek, L. and Marrelli, M. T.** (2010).Genetic-Morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and Laplata, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 150(5): 672-676.
- Mourad, S. N.; Ghina Al-Eater, A. and Raghid, A.**(2010).Basic recombinant technique for working DNA. Institute for Genetic Engineering, Ecology and Health(IGEEH) Karlsruhe, Germany postal, Address: Veering four Gentechnik, Okologie and Gesundeit (VGOG) e. v., Haid-Und-Neu-Str. 7, 76131 Karlsruhe, Germany First edition Augus.
- Murat, A.; Trezon, M.; Rasmont, P. and Cagatay, N.**(2007).Landmrk based Geometric Morphometric analysis of wing shape *Sibiricobombus vogot* (Hymenoptera: Apidae).Ann.Soc. Entomology. Fr.(n.s),43(1):95-102.

- Navidpour**, S. H.; Hoghooghi-Rad, N.; Goodrazi, H. and Pooladgar, A. R. (1996). Outbreak of *Chrysomya bezziana* in Khoozestan Province, Iran. Veterinary Record. 139(9):217.
- Nemesio**, A.(2010). The orchid-bee fauna (Himenoptera: Apidae) of a forest remnant in northeastern Brazil, with new geographic records and an identification key to the known species of the Atlantic Forest of northeastern Brazil. Zootaxa, 2656 :5-66.
- Olsvik**, O.; Wahlberg, J.; Petterson, B.; Uhlen, M.; Popovic, T.; Wachsmuth, I. K. and Fields, P. I.(1993). Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholera* 01 strains. J.Clin. Microbiology, 31(1): 22-25.
- Peter**, C. M. and James, H. B.(2000). Central biotechnology. Published by wood head Publishing limited Abington Hall, Abington Cambridge CB 1-6 AH England.
- Pettersson**, E.; Lundeberg, J. and Ahmadian, A.(2009). Generations of Sequencing technologies. Genomics, 93(2): 105-111.
- Pons**, J.; Barraclough, T. G.; Gomez-Zurita, J.; Caradoso, A.; Duran, D. P.; Hazell, S.; Kamoun, S.; Sumlin, W.D. and Vogler, A. P. (2006). Sequence-Based species delimitation for DNA Taxonomy of under scribed Insect. Syst. Biol., 55(4):595-609.
- Powell**, J. R .(1994). Molecular techniques in population genetics: A brief history, in Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications (Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P. and Desalle, R., eds), Birkhauser, PP : 131-156 .
- Prudhomme**, J.; Guny, F., Rahola, N.; Ouanaimi, F.; Guernaoui, S.; Boumezzough, A.; Banuls, A.; Sereno, D. and Alten, B.(2012). Wing size and shape variation of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) Populations from the South and North slopes of the Atlas Mountains in Morocco. J. Vector Ecology, 37(1): 137-147.
- Rajapaksa**, N. and Spradbery, J. P.(1989). Occurrence of the Old World Screwworm fly, *Chrysomya bezziana* on livestock vessels and Commercial aircraft. Australian Veterinary Journal. 66(3): 94-96.

- Raposo, A. A.; Schettini, A. P. and Massone, H .(2012).**Concurrent primary and secondary myiasis on basal cell carcinoma. *An. Bars. Dermatology*, 87(2):292-295.
- Ratnasingham, S. and Hebert, P. D.(2007). Bold: The Barcode of Life Data System Ecology Notes, (7) :355-364. (<http://www.barcodinglife.org>).Molecular.
- Razmjou, H.; Mowlavi, G. H.; Nateghpour, M.; Solaymani, M. and Kia, E. B.(2007).**Ophthalmomyiasis causedby flesh fly (Diptera: Sarcophagidae) in a Patient with eye malignancy in Iran. *Iran J. Arthropoda-Borne Dis.*,1(2) :53-56.
- Ready, P. D.; Testa, J. M.; Wardhana, A.; Al-Izzi, M. A. J.; Khalag, M. and Hall, M. J. R.(2009).**Phylogeography and recent emergency of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(1-1) : 43-50.
- Rechcigel, J. E. and Rechcigel, N. A.(2000).**Insect Pest Management, Techniques for environmental protection. CRS Press. Boca Raton, 392PP.
- Ricardo, E.; Uriel, K.; Jena, D.; Pierre, Schacter-Broide. and Judith, G.A.(2009).** Temporal Variation of wing size and shape of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Populations from Northwestern Argentina using geometric morphometric.Pubmed. Topics by science . gov., 62:156-163.
- Robio, C.; Ladron de Guevara, C.; Martin, M. A.; Campos, L.; Quesada, A. and Casado, M.(2006).** Cutaneous myiasis over tumor-lesions: presentation of three cases. *Actas Dermosifiliogr* . Spanish. 97(1):39-42.
- Rogers, N.(1982).**A description of the generating curve of bivalves with straight hinges. *Paleontology*, 25: 109-117.
- Roggero, A. and Passerin, P.(2005).**Geometric Morphometric analysis of wings variation between two populations of the *Scythris obscurella* (Lepidoptera: Scythrididae) species- group: geographic or interspecific differences . *SHILAP Revata.Lepid.*, 33(130):101-112.

- Rohlf**, F. J. and Slice, D.(1990).Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition landmarks. *Systematic Zoology*. 39 (1): 40-59.
- Rohlf**, F. J. and Marcus, L. F.(1993). A revolution in morphometrics. *Trends Ecology. Evolution*, 8 :129-132.
- Rosati**, J. Y. and Vanlaerhoven, S. L.(2006). New record of *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Canada: Predicted Range Expansion and potential Effects on native species. *The Canadian Entomologist*, 670- 677.
- Rossi-Schneider**, T.; Cherubini, K.; Yurgel, L.S.; Salum, F.and Figureueiredo, M. A.(2007). Oral myiasis: a case report. *J Oral Science*, 49(1): 85-88.
- Roubik**, D. W.(2004).Sibling species of *Glossura* and *Glossuropoda* in the Amazon region (Hemiptera; Apidae; Egulossini). *J. Kans. Entomology. Soc.*, 77:235-253.
- Roux**, K. H.(2009).Optimization and Troubleshooting in PCR. Springer Harb. Protocol. 54: 1086-1101.
- Ruttner**, F.(1988).Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer Verlag, Berlin, 14:182-193.
- Ruttner**, F.; Tassencourt, L.and Louveaux, J.(1978).Biometrcal-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 9:363-381.
- Saelee**, M. R.; Pavlinov, I. Y. and Lynch, J. M.(2006).Using Geometric Morphomwtric of wing to study genetic variation between the types of *Bctrocera tau* (Walker) in Thailand. *Science Asia*, 21: 270-276.
- Saiki**, R. K.; Gelfand, G. H.; Stoffel, S.; Scharf, S.; J.; Higuchi, R.; Horn, G. J.; Mulls, K, B. and Erlish, H. A.(1985).Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia . *Science*, 230 :1350-1354.
- Schmittbuhl**, M.; Rieger, J; Leminor, J. M; Schaaf, A.; Guy, F. (2007).Variations of the mandibular shape in extant hominoids: Generic, Specific, and sub specific quantification using elliptical fourier analysis in lateral view . *American Journal of physical Anthropology*,132(1):119-131.

- Seaman**, J. T.; Eagleson, J. S.; Garrigan, M. J. and Webb, R. F. (1987). Avermectin BI Toxicity in a head of Murray Grey Cattle. J. Aust. Vet., 64(9): 284.
- Shakumbila**, L. M.(2014).Life history of a basal bird: Morphometrics of Early Cretaceous Confucius ornis . Biology Letters, 4(6):719-723.
- Sharifipour**, F. and **Fegghi**, M.(2008).Anterior ophthalmomyiasis interna: an ophthalmic emergency. Arch Ophthalmology. 126: 1466-1467.
- Sharma**, P. C.; Winter, P.; Bunker, A.; Huttel, B. and Kal, G. (1994). Expanding the repertoire of molecular markers for resistance breeding in chickpea. P: 175-198. Proceeding symposium on application of DNA fingerprinting for crop improvement (S. M. Udupa F. Weigand, eds.) . 11-12 April 1994, Aleppo, Syria. ICARD Aleppo. Syria.
- Shinohara**, E. H.; Martini, M. Z.; Oliveira Neto, H. G. and Takahashi, A.(2004). Oral myiasis treated with ivermectin: case report. Braz Dent. J; 15: 79-81.
- Siddig**, A.; Al-Jowary, S.; Al-Izzi, M.; Hopkins, J.; Hall, M. J. R. and Slingenbergh, J.(2005).The seasonality of Old World screwworm fly (*Chrysomya bezziana*) in the Mesopotamia valley in Iraq. Medical and Veterinary Entomology, 19: 140-150.
- Silveira**, F. A.; Pinheiro-Machado, C.; Alves- dos-Santos, I.; Kleinert , A. M. P. and Imperatriz-Fonseca, V. L.(2006).Taxonomic constraints for the conservation and sustainable use of wild pollinators-the Brazilian wild bees. In: Kevan, P. Imperatriz-Fonseca, V. L.(eds.) Pollinating Bees. The conservation link between agriculture and nature. 2nd Edition, PP: 47-56.
- Singh**, B.; Kurahashi, H. and Wells, J. D.(2011). Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) is monophyletic: a molecular systematic analysis. Syst. Entomology, 36: 415-420.
- Singleton**, M.; Rosenberger, A . L.; Robinso, C.; and Neill, O. R. (2011). Allometric and metameric shape variation in pan mandibular analysis. Anatomical Record, 294(2): 322-334 .
- Smith**, H. A.; Jones, T. C. and Hant, R. C.(2001). Veterinary Pathology Text book Lea and Febiger Philadelphia, PP: 811.

- Solano**, P.; Rocque, S.; de la Cuisance, D.; Geoffroy, B.; Meeus, T.; de Cuny, G. and Duvallet, G.(1999). Intraspecific variability in natural populations of *Glossina palpalis* gambiensis from West Africa, revealed by genetic and morphometric analysis. Med. Veterinary Entomology, 13: 401-407.
- Soleimani** A. M.; Nasirian, H.; Nazemi Gheshmi, A. M. and Yaghoobi Ershadi, M. R.(2009).Human Extensive Head Skin Myiasis. Iran J. Publ. Health., 38(1): 134-138.
- Spanos**, L.; Koutroumbas, G.; Kotsyfakis, M. and Louis, C. (2000). The mitochondrial genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Insect Molecular Biology. 9: 139-144.
- Sperling**, F. A. H.; Anderson, G. S. and Hickey, D. A.(1994). A DNA-Based Approach to the identification of insect species used for Postmortem interval Estimation. Science Direct, 39(3): 418- 427.
- Spradbery**, J. P.; Pound, A. A.; Robb, J. R. and Tozer, R. S .(1983) . Sterilization of the screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Vill.) (Diptera: Calliphoridae) by Gamma radiation. J.Aust. Entomology. Soc., 22: 319-324.
- Spradbery**, J. P.(1991).A Manual for the diagnosis of Screwworm fly, department of primary industries and Energy. Canberra, Australia, 64 PP.
- Spradbery**, J. P.(1992).Studies on the prepupal and puparial stage of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Vill.) (Diptera: Calliphoridae) CSIRO Division of Entomology technical report, pap. No. 29 :1-24.
- Spradbery**, J. P.(1994).Screwworm fly, a tale of two species. Agr. Zoology Rev., 6: 1-62.
- Spradbery**, J. P.(2001).The screwworm fly problem: a background briefing. Proceedings of the screwworm fly Emergency Preparedness Conference, Canberra, 12-15 November 2001,PP. 33-41. Department of Agriculture, Fisheriesand Forestry, Canberra, ACT.
- Spradbery**, J. P.; Mahon, R. J.; Morton, R. and Tozer, R. S. (1995). Dispersal of Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Vill). Med. and Veterinary. Entomology, 9: 161-168.

- Spradbery**, J. P. and Vanniasingham, J.(1998). Malaysia. Veterinary J., 7: 28.
- Spradbery**, J.P.; Tozer, R. S.; Robb, J. M. and Cassells, P.(1999).The Screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Vill.) (Diptera: Calliphoridae) in a Sterile Insect release trial in papua New Guinea. Res. Population. Ecology, 31: 353-366.
- Sridhar**, R. P. N.(2006). Polymerase Chain Reaction (PCR) technique Application. www.microrao.com.
- Starr**, J.; Pruett, J. H.; Yunginger, J. W. and Gleich. G.J. (2000) . Myiasis due to hypoderma lineatum infection mimicking the hypereosinoPhilic Syndrome. Mayo Clin. Proc., 75: 755-759.
- Susna**, M.; Mackenzie, M. R.; Brooker, T. R.; Graeme, G. B.; Antony, C. J. and Howells, G. D. E.(1999). Mutations in the white gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine Eye colouration . Biochemical et Biophysical Act (BBA). Biomembranes. Science Direct, 1419(2): 173-185.
- Sutherst**, R. W.; Spradbery, J. P. and Maywald, G. F.(1989). The potential Geographical Distribution of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana* . Med. and Veterinary. Entomology, 3: 273-280.
- Swofford**, D. L.(2002).PAPu*. Phylogenetic analysis using parsimony, Version 4.0b. Smithsonian Institution press, Washington, DC.
- Testa**, J. M.; Montoya-Lerma, J.; Cadena, H.; Oviedo, M. and Ready, P. D. (2002).Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: Mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series Acta Tropica ,84: 205- 218.
- Tofilski**, A.(2008).Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honey bee subspecies. Apidologie , 39 :558-563.
- Tourt**, R. T.; Steelman, C. D.; Szalanski, A. L. and Loftin, K. (2010) .Phylogenetics and population genetics of the louse fly, *Lipoptena Mazamae* from Arkansas, use Medical and Veterinary. Entomology. (in press).

- Tsuda**, S.; Nagaji, J.; Kurose, K.; Miyasato, M.; Sasai, Y. and Yoneda, Y.(2007). Furuncular cutaneous Myiasis caused by dermatobia Hominis Larvae following travel to Brazil. Int. J. Dermatology, 35(2):121-123.
- Tweddle**, N. and Mahon, R. J.(2000).Insurance against in Old World Screwworm fly, Invasion of Australia: in area wide control fruit flies and other Insect pests (Ed. K. H. Tan). Perierbit University. Sains, Malaysia. Penang. PP: 95-99.
- Vargas-Teran**, M.(2002). The New World Screwworm Fly, situation in central and South America(Proc. of the screwworm fly Emergency Preparedness Conf. Canberra, 2001), 182-186.
- Vasquez**, M. and Liria, J.(2012). Geometric Morphometric alar para la identification de *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) de Venezuela. Rev. Bio. Trop., 60: 1249-1258.
- Wakamatus**, T. H. and Pierre-Filho, P. T.(2006).Ophthalmomyiasis externa caused by *Dermatobia hominis*: a successful treatment with oral ivermectin. Eye. London, 20: 1088-1090.
- Walker**, A. R.(1994).Arthropodas of humans and domestic Animals: A guide to preliminary identification. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 85-129.
- Walker**, A. R.(2000).The ability of Geometric Morphometric methods to estimate a known covariance matrix . Systematic Biology ,49(4):686-696.
- Wardhana**, A. H.; Muharsini, S. and Suhardono. (2003).Collection and incidence of myiasis caused by the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, in endemic areas in indonesia. Proceeding of National Seminar for Livestock and veterinary Technology. BALITVET, Bogor, 29-30. September 2003, PP: 235-239.
- Wells**, J. D. and Singh, B.(2013).Molecular Systematic of the Calliphoridae (Diptera:Oestroidae):Evidence from one Mitochondrial and three Nuclear genes. J. Med. Entomology, 50(1): 15-23.

- Weigand**, F.; Baum, M. and Udupa, S.(1993).DNA Molecular Marker techniques. Technical Manual (NO.20). International center for Agricultural Manual Research in Dry areas (ICARDA) Aleppo, Syria, 22(4):118-132.
- Weising**, K.; Winter, P.; Huttel, B. and Khal, G.(1988).Microsatellite Markers for Molecular breeding. Journal of crop protection, 1: 113-143.
- Williams**, J. G. K.; Kubelic, A. R.; Lavk, K. L.; Rafalaski, J. A. and Tingery, S. V.(1990).DNA Polymorphoism amplified by arbitrary primers is useful an genetic marker. Nucleic acid Research, 18: 6531-6535.
- Wu**, D. Y.; Pal, B. K.; Qian, J. and Wallace, R. B.(1991). In: Newton, G. R. and Graham, G. A.(ed.) PCR. Eynsham, Oxon., UK. PP: 24.
- Wyss**, J. H.(2002).Overview of the sterile insect technique in screwworm fly eradication, (Proc. of the screwworm fly Emergency Preparedness conf. Canberra, 176-181.
- Wyss**, J. H.(2003). Screwworm eradication in the America. Area-Wide control of fruit flies and other insect pests. University Sains Malaysia, Penang: 79-86.
- Yang**, w.; Antonio, A.; Deoliveira, A. C.; Godwin, I.; Schertz, K. and Bennetzen, J. L.(1996).Comparison of DNA Markers technologies in Characterizing Plant genome diversity: Variability in chinese sorghums. Crop Science , 36: 1669-1676.
- Zador**, E.(2011). Theoretical course: Basic Biochemical methods and ischemic heart models the polymerase chain reaction(PCR). Supported by: Huro, 0901, 069, 2.3.1, HU-RO-DOCS.
- Zahiri**, R.; Sarafrazi, A.; Salehi, L. and Kunkel, J. G.(2006).A geometric morphometric study on populations of the Rice Borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) in Northern Iran. Zoology in the Middle East, 38: 73-84.
- Zaid**, A.; Hughes, H. G.; Proceddu, E. and Nicolas, F. W. (1999). Glossary of Biotechnology and genetic Engineering. FAO Research and Technology paper 7. Food and Agriculture organization of the united Nations. Rome-Italy. M. 99.

- Zelditch**, M.; Fink, W. L. and Swiderski, D. L.(1995).Morphometrics Homology and phylogenetics-Quantified characters as Synapomorphies. Systematic Biology, 44(2): 179-189.
- Zelditch**, M.; Wood, A. R.; Bonnet, R. M. and Swidercki, D. L. (2008).Modularity of the Rodent mandible: Integrating muscles, Bones and teeth. Evolution and development, 10(6): 756-768.
- Zewail**, A.(2002).Science and technology in the Twenty-First century . I. Science and technology in twenty-first century. 21. Series. 509. 05.
- Zhang**, D. X. and Hewitt, G. M.(1996).Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. TREE, 11 (6) 247-251 .
- Zumpt**, F.(1965). Myiasis in man and animal in old world. Butter worths. London, 267PP

الملاحق

Appendix

ملحق (1)

دليل عدة استخلاص ألدنا (Genomic DNA Mini Kit (Tissue)

Geneaid **Instruction Manual**
Ver. 02.12.14
For Research Use Only

gSYNC™ DNA Extraction Kit

GS004 (4 Preparation Sample Kit)
GS100 (100 Preparation Kit)
GS300 (300 Preparation Kit)

Advantages
Sample: tissue, rodent tails, ear punches, fresh or frozen blood, serum, plasma, buffy coat, body fluids, cultured cells, amniotic fluid, FFPE, hair, insects
Yield: up to 5 µg of gDNA from fresh whole blood samples
Format: genomic DNA spin column
Operation Time: within 20 minutes
Elution Volume: 30-100 µl
Kit Storage: dry at room temperature (15-25°C) for up to 1 year

Table of Contents

Introduction.....	2
Quality Control.....	2
Kit Components.....	2
Safety Measures.....	3
Quick Protocol Diagram.....	3
Solid Tissue, Insect Protocol.....	4
Blood, Plasma, Serum, Buffy Coat and Body Fluids Protocol.....	6
Cultured Cell Protocol.....	7
Amniotic Fluid Protocol.....	9
Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissue Protocol.....	10
Hair Protocol.....	12
Troubleshooting.....	14
Test Data.....	15
Related Products.....	15

Geneaid Biotech Ltd.
Tel: 886 2 26960999 · Fax: 886 2 26960599 · www.geneaid.com · info@geneaid.com

Introduction

The gSYNC™ DNA Extraction Kit is optimized for genomic, mitochondrial and virus DNA purification from whole blood (fresh blood and frozen blood), tissue, formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE), amniotic fluid and insects in one convenient kit. This DNA extraction kit uses Proteinase K and chaotropic salt to lyse cells and degrade protein, allowing DNA to bind to the glass fiber matrix of the spin column. Contaminants are removed using a Wash Buffer and the purified genomic DNA is eluted by a low salt Elution Buffer, TE or water. The entire procedure can be completed within 20 minutes without phenol/chloroform extraction or alcohol precipitation. The purified DNA (approximately 20-30 kb) is suitable for use in PCR or other enzymatic reactions.

Quality Control

The quality of the gSYNC™ DNA Extraction Kit is tested on a lot-to-lot basis by isolating genomic DNA from 200 µl of whole human blood. The purified DNA (5 µg with an A260/A280 ratio of 1.8-2.0) is quantified with a spectrophotometer and analyzed by electrophoresis..

Kit Components

Component	GS004	GS100	GS300
GST Buffer	3 ml	30 ml	75 ml
GSB Buffer	4 ml	40 ml	75 ml
W1 Buffer	2 ml	45 ml	130 ml
Wash Buffer ¹ (Add Ethanol)	1 ml (4 ml)	25 ml (100 ml)	50 ml (200 ml)
Proteinase K ² (Add ddH ₂ O)	1 mg (0.10 ml)	11 mg x 2 (1.10 ml)	65 mg (6.50 ml)
Elution Buffer	1 ml	30 ml	75 ml
GD Columns	4	100	300
2 ml Collection Tubes	8	200	600

¹Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to Wash Buffer then mix by shaking for a few seconds. Check the box on the bottle. Be sure and close the bottle tightly after each use to avoid ethanol evaporation.

²Add ddH₂O to Proteinase K (see the bottle label for volume) then vortex to ensure Proteinase K is completely dissolved. Check the box on the bottle. Once it is dissolved completely, centrifuge for a few seconds to spin the mixture down. For extended periods, the ddH₂O and Proteinase K mixture should be stored at 4°C.

Geneaid Biotech Ltd.

Tel: 886 2 26960999 · Fax: 886 2 26960599 · www.geneaid.com · info@geneaid.com

Geneaid

Page 3



During the procedure, always wear a lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

Quick Protocol Diagram



Sample preparation and Cell lysis



DNA binding



Wash



Elution

Geneaid Biotech Ltd.

Tel: 886 2 26960999 · Fax: 886 2 26960599 · www.geneaid.com · info@geneaid.com

Page 4

Geneaid

gSYNC™ DNA Extraction Kit Protocol

Please read the entire instruction manual prior to starting the Protocol Procedure.

IMPORTANT BEFORE USE!

1. Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to Wash Buffer then mix by shaking for a few seconds. Check the box on the bottle. Be sure and close the bottle tightly after each use to avoid ethanol evaporation.
2. Add ddH₂O pH7.0-8.5 (see the bottle label for volume) to Proteinase K then vortex to ensure Proteinase K is completely dissolved. Check the box on the bottle. Once it is dissolved completely, centrifuge for a few seconds to spin down the mixture. For extended periods, the ddH₂O and Proteinase K mixture should be stored at 4°C. Use only fresh ddH₂O as ambient CO₂ can quickly cause acidification.
3. Prepare Phosphate Buffered Saline (PBS, pH7.2) for blood, serum, plasma, cultured cells and FFPE tissue samples.
4. Prepare Xylene for FFPE tissue samples.
5. Yield and quality of DNA will be higher when fresh samples or samples which have been flash frozen and stored at -20°C or -70°C are used. DNA in FFPE or tissue which has been repeatedly frozen and thawed may be degraded.
6. Optionally prepare RNase A (50 mg/ml) for RNA-free DNA when performing sensitive downstream reactions. However, residual RNA will not affect PCR.

Additional Requirements

1.5 ml microcentrifuge tubes

Solid Tissue and Insects Protocol Procedure

1. Tissue Dissociation

Transfer **up to 25 mg of fresh animal tissue (0.5 cm mouse tail x 2 or 0.5 cm rat tail x 1)** to a 1.5 ml microcentrifuge tube. If the tissue has a higher number of cells (e.g. spleen or liver), reduce the starting material to 10 mg. Add **200 µl of GST Buffer and 20 µl of Proteinase K** then vortex thoroughly. Incubate at 60°C overnight or until the sample lysate becomes clear.

NOTE: Tissue homogenization prior to incubation will facilitate Proteinase K digestion and cell lysis subsequently increasing DNA yield. Inverting the sample occasionally during incubation will also facilitate Proteinase K digestion and cell lysis. Using an auto shaking system is more convenient when incubating samples. During incubation, transfer the required volume of Elution Buffer (200 µl/sample) to a 1.5 ml microcentrifuge tube and heat to 60°C (for Step 5 DNA Elution).

2. Cell Lysis

If insoluble material remains following incubation, centrifuge for 2 minutes at 14-16,000 x g then carefully transfer the supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **200 µl of GSB Buffer** then shake vigorously for 10 seconds.

NOTE: It is essential that the sample and GSB Buffer are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

Optional RNA Removal Step

For RNA-free gDNA, following GSB Buffer addition, add 5 µl of RNase A (50 mg/ml) and mix by shaking vigorously. Incubate at room temperature for 5 minutes to ensure efficient RNA degradation.

Geneaid Biotech Ltd.

Tel: 886 2 26960999 · Fax: 886 2 26960599 · www.geneaid.com · info@geneaid.com

Geneaid

Page 5

3. DNA Binding

Add **200 µl of absolute ethanol** to the sample lysate and mix **IMMEDIATELY** by shaking vigorously for 10 seconds. If precipitate appears, break it up as much as possible with a pipette. Place a **GD Column in a 2 ml Collection Tube**. Transfer all of the mixture (including any insoluble precipitate) to the GD Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 1 minute. Following centrifugation, if the mixture did not flow through the GD Column membrane, increase the centrifuge time until it passes completely. Discard the 2 ml Collection Tube containing the flow-through then transfer the GD Column to a new 2 ml Collection Tube.

NOTE: It is important that the lysate and ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.

4. Wash

Add **400 µl of W1 Buffer to the GD Column**. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GD Column back in the 2 ml Collection Tube. Add **600 µl of Wash Buffer (make sure absolute ethanol was added)** to the GD Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GD Column back in the 2 ml Collection Tube. Centrifuge again for 3 minutes at 14-16,000 x g to dry the column matrix.

NOTE: Additional centrifugation at 14-16,000 x g for 5 minutes or incubation at 60°C for 5 minutes will completely dry the GD Column to avoid any residual ethanol carryover and ensure the most effective downstream applications.

5. Elution

Standard elution volume is 100 µl. If less sample is to be used, reduce the elution volume (30-50 µl) to increase DNA concentration. If higher DNA yield is required, repeat the DNA Elution step to increase DNA recovery and the total elution volume to approximately 200 µl.

Transfer the dried GD Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **100 µl of pre-heated Elution Buffer¹**, TE Buffer² or water³ into the **CENTER** of the column matrix. Let stand for at least 3 minutes to allow Elution Buffer, TE Buffer or water to be completely absorbed. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds to elute the purified DNA.

¹Ensure that Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH8.5 at 25°C) is added into the center of the GD Column matrix and is completely absorbed.

²Using TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) for elution is beneficial as EDTA preserves DNA for long term storage. However, EDTA will affect PCR and other sensitive downstream applications. Ensure that TE is added into the center of the GD Column matrix and is completely absorbed.

³If using water for elution, ensure the water pH is between 7.0 and 8.5. ddH₂O should be fresh as ambient CO₂ can quickly cause acidification. Ensure that water is added into the center of the GD Column matrix and is completely absorbed. DNA Eluted in water should be stored at -20°C to avoid degradation.

Geneaid Biotech Ltd.

Tel: 886 2 26960999 · Fax: 886 2 26960599 · www.geneaid.com · info@geneaid.com

ملحق (2)

دليل مكونات خليط التفاعل الرئيسي للـ PCR

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

AccuPower® PCR PreMix

Bioneer Corporation
8-11, Munpyeong-ro
Daejeon-gu, Daejeon 305-380
Republic of Korea
Tel: (Korea) 1588-0788
(International) +82-42-930-6777
Fax: +82-42-930-6600
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501 USA
Tel: +1 877-264-4300
Fax: +1 510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer Trade(Shanghai) Co., Ltd.
806 Room, Building 2, No.500 Jiajun
Road, Zhoupu Town, Pudong New District,
Shanghai, China
Tel: +86-21-5080-0969/11911651
Fax: +86-21-5080-1620
E-mail: salescn@bioneer.com

Bioneer R&D Center
3-702, Korea Bio Park Bldg., 700,
Daewangpangyo-ro, Bundang-gu,
Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-400,
Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Order
E-mail: order@bioneer.co.kr
URL: www.bioneer.com

AccuPower® PCR PreMix is a new, powerful, and ready-to-use PCR reagent optimized for more accurate PCR amplifications.

Advantages

Speed

Substantial reduction in PCR setup time.

Stability

AccuPower® PCR PreMix is the powerful technology for convenient and easy to perform DNA amplification. It contains DNA polymerase, dNTPs, a tracking dye and reaction buffer in a premixed format, freeze-dried into a pellet. The patented chemical stabilizer of this product enables to maintain the activity of pre mixture for over a month even when stored at room temperature (25°C), over 2 years in the freezer.

Reproducibility and Yield

Batch manufacturing under strict ISO 9001 quality control conditions guarantees reproducibility. Minimal handling during reaction set up provides improved accuracy.

Simplicity

Each product line contains an application specific enzyme in an easy to re-suspended, lyophilized premix of dNTPs, reaction buffer, a tracking dye, and a stabilizer. The premix is ready to use, thus offering virtually no reaction set up time.

Contents

Component	Reaction size	20 µl reaction	50 µl reaction
Top DNA polymerase		1 U	2.5 U
Each: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		250 µM	250 µM
Tris-HCl (pH 9.0)		10 mM	10 mM
KCl		30 mM	30 mM
MgCl ₂		1.5 mM	1.5 mM
Stabilizer and tracking dye			

Experimental Protocol

- Add template DNA and primers to **AccuPower® PCR tube**.

Concentration of template DNA and primer		
	20 µl reaction	50 µl reaction
Template DNA	5 - 50 ng	10 - 100 ng
Primer	5 - 10 pmole	10 - 20 pmole
- Add distilled water to **AccuPower® PCR tubes** to a total volume of 20 µl or 50 µl.
- Dissolve the lyophilized blue pellet by vortexing, and briefly spin down.
- Add mineral oil. (This step is unnecessary when using a thermal cycler with top heating.)
- Perform PCR of samples.
- Load samples on agarose gel without adding a loading-dye mixture, and perform electrophoresis.

Notice to Purchaser

This enzyme is specifically optimized for increasing base incorporation rate by inactivating 5'→3' exonuclease activity. Therefore, this is not recommended to use for Real Time PCR using Taqman® probe.

Trademark

AccuPower is a trademark of Bioneer Corporation.

Ordering Information

Tube type	Reaction	Cat.No.	Description
0.2ml Tube	20 µl	K-2012	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
		K-2016	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
	50 µl	K-2013	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
0.5ml Tube	20 µl	K-2017	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
		K-2011	0.5 ml thin-wall tubes with attached cap / 100 tubes
	50 µl	K-2260-1	thin-wall 96-well flat plate
96-well	10 µl	K-2260-2	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-3	thin-wall 96-well semi-skirted plate
		K-2260-4	thin-wall 96-well flat plate
	20 µl	K-2260-5	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-6	thin-wall 96-well semi-skirted plate
	5 µl	K-2080-1	thin-wall 384-well full-skirted plate
384-well	10 µl	K-2080-2	thin-wall 384-well full-skirted plate
	20 µl	K-2080-3	thin-wall 384-well full-skirted plate
Master Mix		K-2018	1 ml of 2 X Master mix solution
		K-2018-1	10 ml of 2 X Master mix solution

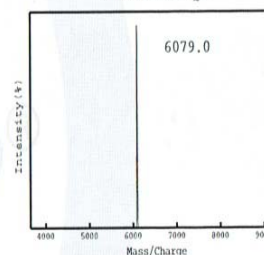
A complete product list appears on our web site at www.bioneer.com.

ملحق (3)

أنواع البوادي المستخدمة في الدراسة

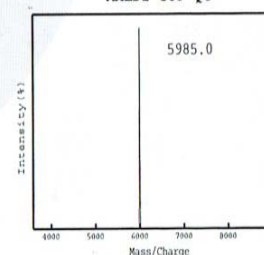
HUSEINEF-F05 (EF-igene) EF-Fos اسم البادير					
CCT	GGA	CAT	CGT	GAT	TTC AT
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP		
Total nmole	10.7 nmole	Modification			
Scale	0.025 umoles	GC content	45.0 %		
Length	20mer	Molecular Weight	6082.9 g/mole		
Tm	51.8 C	Volume for 100 pmoles/ul	107.3 ul		

MALDI-TOF QC



HUSEINEF-F06 EF-F06 جين الزنزة اادل اسم البادير					
TTA	CCT	TCA	GCG	TTA	CCT TC
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP		
Total nmole	11.4 nmole	Modification			
Scale	0.025 umoles	GC content	45.0 %		
Length	20mer	Molecular Weight	5993.8 g/mole		
Tm	48.6 C	Volume for 100 pmoles/ul	113.8 ul		

MALDI-TOF QC



770

NEW

BIONEER's Upgraded Human miRNA Library using miRBase V21

AccuTarget™ Human miRNA Mimics & Inhibitor Library

- Having enhanced efficiency through chemical modification
- Produced in a clean room under strict QC incl. HPLC, Bio-RP and MALDI-TOF
- Highly price-competitive and delivered fast

AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001:2000 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11, Munpyeongseo-ro
Daedeok-gu, Daejeon 34302,
Republic of Korea
Tel: (Korea) 1588-9788
(International) +82-42-930-8521
Fax: +82-42-930-8700
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1301 Marina Village Parkway, Suite 110,
Alameda, CA 94501 USA
Toll free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
8-702, Korea Bio Park Bldg., 700,
Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si,
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Al Musaib Birdge (10-10-2015)

Order No.: 10010185

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

HUSEINWEC-F21 WEC-F21 (white gene) اسم الباس

GTT TGT GGC GTA GCC TAT CC

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.9 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	55.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6114.9 g/mole
Tm	53.5 C	Volume for	109.4 ul
		100 pmoles/ul	

MALDI-TOF QC

Intensity (%)

Mass/Charge

HUSEINWEC-R12 WEC-F12 بين الفواق

AAT GTC ACT CTA CCY TCG GC

Optical Density	4.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	22.1 nmole	Modification	
Scale	0.05 umoles	GC content	52.5 %
Length	20mer	Molecular Weight	6020.3 g/mole
Tm	52.1 C	Volume for	220.7 ul
		100 pmoles/ul	

MALDI-TOF QC

Intensity (%)

Mass/Charge

HUSEINCB1-SE بين اء

TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC

Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	11.3 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	34.6 %
Length	26mer	Molecular Weight	7962.1 g/mole
Tm	50.4 C	Volume for	113.3 ul
		100 pmoles/ul	

MALDI-TOF QC

Intensity (%)

Mass/Charge

NEW

BIONEER's Upgraded Human miRNA Library using miRBase V21

AccuTarget™ Human miRNA Mimics & Inhibitor Library

- Having enhanced efficiency through chemical modification
- Produced in a clean room under strict QC incl. HPLC, Bio-RP and MALDI-TOF
- Highly price-competitive and delivered fast

AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001:2000 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
6-11, Munpyeongseo-ro
Daejeong-gu, Daejeon 34302,
Republic of Korea
Tel: (Korea) 1588-9788
(International) +82-42-930-8521
Fax: +82-42-930-8700
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1301 Marina Village Parkway, Suite 110,
Alameda, CA 94501 USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
8-702, Korea Bio Park Bldg, 700,
Daejeong-gu, Bundang-gu, Seongnam-si,
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Al Musaib Birdge (10-10-2015)

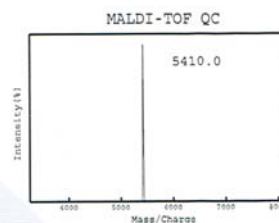
Order No.: 10010185

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

HUSEINPDR-WR04

ATT TCA CGC TCA TTA ACT

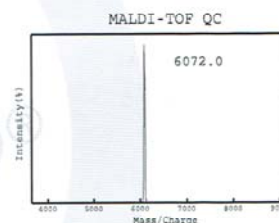
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	11.9 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	33.3 %
Length	18mer	Molecular Weight	5408.5 g/mole
Tm	41.1 C	Volume for	119.3 ul
		100 pmoles/ul	



HUSEINCB3-PDR

CAY ATT CAA CCW GAA TGA TA

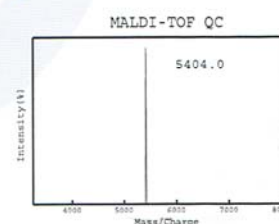
Optical Density	4.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	19.6 nmole	Modification	
Scale	0.05 umoles	GC content	32.5 %
Length	20mer	Molecular Weight	6080.9 g/mole
Tm	43.1 C	Volume for	196.3 ul
		100 pmoles/ul	



HUSEINPDR-WR04

ATT TCA CGC TCA TTA ACT

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	11.9 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	33.3 %
Length	18mer	Molecular Weight	5408.5 g/mole
Tm	41.1 C	Volume for	119.3 ul
		100 pmoles/ul	



NEW

BIONEER's Upgraded Human miRNA Library using miRBase V21

AccuTarget™ Human miRNA Mimics & Inhibitor Library

- Having enhanced efficiency through chemical modification
- Produced in a clean room under strict QC incl. HPLC, Bio-RP and MALDI-TOF
- Highly price-competitive and delivered fast

AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001:2000 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

(4) ملحق

دليل المؤشر الجزيئي DNA ladder (2000 bp -100 bp)

BIONEER
 Innovation • Value • Discovery

100 bp DNA Ladder DNA Molecular Weight Markers

Bioneer Corporation
 8-11, Munpyeongseo-ro
 Daedeok-gu, Daejeon 306-220
 Republic of Korea
 Tel: (Korea) 1588-9788
 (International) + 82-42-930-8777
 Fax: + 82-42-930-8600
 E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
 1301 Marina Village Parkway, Suite 110
 Alameda, CA 94501
 Toll free: + 1-877-264-4300
 Fax: + 1-510-865-0350
 E-mail: order.usa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
 B-702, Korea Bio Park Bldg., 700,
 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu,
 Seongnam-si, Gyeonggi-do, 463-400,
 Republic of Korea
 Tel: + 82-31-628-0500
 Fax: + 82-31-628-0555

Order
 E-mail: order@bioneer.co.kr
 URL: www.bioneer.com

[Cat. No.]
D-1030

[Lot No.]
1501F

[Volume]
250 µl

[Concentration]
135 ng/µl



Consult
 Instruction For
 Use



Research Use
 Only



Catalog
 Number



Batch code



USE BY



Temperature
 Limitation



Contains sufficient
 for (n) tests



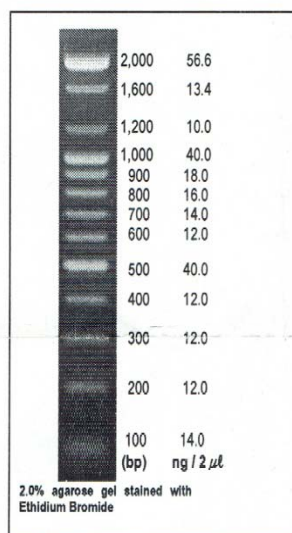
Caution, consult
 accompanying
 documents

Note

For research use only. Not for use in
 diagnostic or therapeutic procedures.

Bioneer shall not in any event be liable
 for incidental or special damage of any
 kind resulting from any use except on
 application(s).

- **Description** : 100 bp DNA Ladder is specially designed for determining the size of double strand DNA from 100 to 2,000 base pairs. The DNA Ladder consists of 13 double strand DNA fragments ranging in sizes from 100 to 1,000 bp in 100 bp increments, and additional fragments of 1,200, 1,600, 2,000 bp. The 500, 1,000 and 2,000 bp bands are two to three times brighter for easy identification
- **Application** : Size confirmation of DNA fragments.


• Features

- ready-to-use
- Recommended Loading :
 1.5 - 2.0 µl/5 mm lane width
- Typical Loading Number of Lanes :
 125 - 166 (5 mm lane width)
- Range (bp) : 100 - 2,000
- Number of Bands: 13

• Storage Buffer

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 1 mM EDTA
- 2.5% Ficoll
- 0.005% Bromphenol Blue
- 0.005% Xylene Cyanol

• Storage Condition

This product is shipped on dry ice and
 should be stored at -20°C until use.

- **Quality control assay** : Agarose gel analysis shows that 13 bands are clearly distinguishable. The 500 bp, 1,000 bp and 2,000 bp band must be more intense than any other band.

• Note

- The DNA ladder can be applied directly onto an agarose gel.
- Do not heat before loading.
- Repeated freezing and thawing should be avoided.

• Ordering Information

[Related BIONEER DNA Molecular Weight Marker Products]

Cat.No.	Products
D-1010	10bp DNA Ladder, 100 µl
D-1020	25/100 bp Mixed DNA Ladder, 250 µl
D-1030	100 bp DNA Ladder, 250 µl
D-1035	100 bp Plus DNA Ladder, 500 µl
D-1040	1 Kb DNA Ladder, 500 µl
D-1050	Lambda DNA / Hind III Markers, 100 µg
D-1060	Lambda DNA / EcoR I Markers, 100 µg
D-1070	Lambda DNA / EcoR I + Hind III Markers, 100 µg
D-2510	Lambda DNA, 250 µg
D-1030-1	AccuLadder 100bp 320 µl x 2
D-1040-1	AccuLadder 1Kb 500 µl x 2

ملحق (5)

كتاب تشخيص عينات ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم (Ch.bezziana (Vill .)

Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Baghdad
Iraq Natural History Research
Center and Museum

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد
مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي

U. O. B. 601
According to Q. S.

NO:
Date:

العدد: ٨٢٦
التاريخ: ٢٠١٥/٩/١٦

« الحشد الشعبي سند ظهير للجيش العراقي الباسل »

إلى / جامعة ديالى / كلية التربية للعلوم الصرفة
الدراسات العليا

م / تشخيص حشرات

تحية طيبة :

اشارة الى كتابكم ذي العدد 2428 والمؤرخ في 14 / 9 / 2015 والخاص بتسهيل
مهمة طالب الدراسات العليا (ماجستير) حسين محمد بريسم / قسم علوم الحياة / تخصص
(علم الحيوان) . فقد تم إجراء اللازم من قبلنا وحسب التقرير المرفق طياً .

مع التقدير

المرفقات :
تقرير التشخيص

أ.م.د. عامر متعب حسين
مدير المركز

٢٠١٥ / ٩ / ١٦

نسخة منه إلى :
مكتب السيد المدير
قسم الحشرات واللافقرات - تقريركم المرقم 353 في 17 / 9 / 2015
الملفة الخاصة

601 التصنيف العالمي لجامعة بغداد وبحسب معايير (Q. S)

بغداد — باب المعظم — مجمع الكليات ص.ب. 59037 هواتف: المدير: 4168361 بدالة: ٤١٦٥٧٩٠
E-mail: info@nhm.uobaghdad.edu.iq , Web site: nhm.uobaghdad.edu.iq

جامعة بغداد _ متحف التاريخ الطبيعي العراقي

UNIVERSITY OF BAGHDAD
Iraq Natural History Museum

Tel: 4168361
4165790



Bab Al - Muadham
Baghdad
Iraq

Our Ref

التاريخ : 2015 / 9 / 17

Date

الرقم : 353

قسم الحشرات واللافقرات

م / تشخيص حشرات

إن الحشرات المرسلة لنا من قبل طالب الدراسات العليا (ماجستير) حسين محمد بريسم /
كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة / تخصص (علم الحيوان) . قد شخصت من قبلنا
و كالاتي :

Chrysomya bezziana Vill .
(Diptera ; Calliphoridae)

تم التشخيص من قبل الأستاذ الدكتور محمد صالح عبد الرسول والأستاذ المساعد الدكتور رزاق
شعلان عكل


الدكتورة هناء هاني الصفار
رئيس قسم الحشرات واللافقرات

ABSTRACT

In this study, the molecular and quantitative genetic relationship among three populations of the old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Vill.) samples collected from some of the Northern, Medial and south Iraq; The samples were taken from these areas for the purpose of rearing laboratory and the study of the practical part the molecular and quantitative fields. It has been used the molecular biology methods for the detection of hereditary genetic diversity in the samples of the *Ch.bezziana* which have been collected from the different regions of Iraq. The DNA has been isolated from males and females of the species above by extraction genomic DNA mini kit tissue, and its purity was ranged from 1.8 to 2nm, for the different populations. amplify the piece of DNA nucleus that has been isolated prew only and consisting the EF-1.gene and White gene, it was also amplified the piece of DNA-Mitochondrial that contains the gene cytochrome b (CB) by a technique Polymerase Chain Reaction(PCR) with the presence of three pairs of specific primers one pair for each gene and in two different forward and Reverse. It was then the sequence was studied belong to the part of the gene-nucleus, white gene has been amplified the PCR which technique amounted to sequence nucleotide clear and distinctive 526bp from the 3 samples of the flies that have been studied, one from each regions. It was found that there is genetic diversity between the samples belong to the regions of the north and middle together on the one hand, and the samples of the south regions on the other; this diversity has looked point as mutations of deletion and substitution types when compared the sequence of nitrogenous bases between the samples that have been collected from different regions of Iraq; also the local samples the most frequently in the sequences of the nitrogen bases were compared with the specimens that belonging to two species, *Ch.bezziana* and the big headed fly, *Ch.megacephala* (Fab.) which were stored in Genbank, these species belong to the same clades: order, family and genus; the last species was selected to compare in current study because they are not previously local studies that dealing with amplify of DNA-nucleus, white gene and the mtDNA, cytochrome b(CB) relating to the OWS fly. Furthermore, the universal studies are very rarely in this field. As well as a comparison of the samples of Genbank with the samples in the current study, which have been collected from the three region of Iraq: North, Middle and South will give very accurate results in distinguishing populations for this fly. It was found when the comparison is made between the sample of the species

Ch.megacephala with, the sample of the southern region local sample in our study (*Ch.bezz.S*) a replacement in 45 nitrogenous base distributed over the sequence length of nucleotide samples studied in this gene, because they are belong to two different species, while the number of mutations replacement with a sample specific Genbank of the old world screwworm fly, much less and that means they are identical and belong to one species. As it found that the convergence between them in relation to convergence the number, locations of mutations and deletions in the sequence replacement nitrogen bases, the ratio was 84-89% .Also, it has been studies the sequence of nitrogenous bases for a portion of the gene Cytochrome b(CB) in the mDNA, which amounted the sequences nucleotides that clear and distinctive was 556bp in length; In this test, the total samples were nine, three samples from each region: Northern, middle and southern of Iraq were used ; it was observed that there is a sample genetic diversity as a point mutations, like as deletion and replacement types in some sites of nitrogenous bases for sequence of nucleotides, especially for the third generation samples that have been collected from the Middle region, which have been selected for this comparison with the specimens or samples that preserved in the Genbank, the first specimen belong to the species of *Ch.bezziana* and the second specimens belong to the species of *Ch.megacephala*. The results showed the third generation samples in the current study are very similar to the first species, while there found a replacement in the 82 nitrogenous bases when compared with the second species, this comparison confirms that samples belong to two different species.Likewise, the results are shown that the ratio of congruence between the third generation belong to the population samples of Middle region and the samples of *Ch.bezziana* and *Ch.megacephala* which found in the Genbank were 84 and 81% respectively, also found the lack of the deletion mutation types in the sequence of the gene CB that taken from the population of samples that collected from the Southern region of Iraq. In this study, the geometric morphometric of the shape and size of the right wing of the males and females belong to the first and third generations among the three populations of the old world screwworm fly in some regions of Iraq, the average of the centroid size of the wing right in the males belong to the first generation of this fly were 1332.8, 1093.2, and 1131.4 microns that collected from the northern, middle and southern regions respectively; while they were for the males of third generation 1246.5, 1116.4 and 1040.8 microns for the regions above respectively. In the females belong to the first generation that collected from Northern, Middle and Southern regions,

the average of centroid size were 1284.3, 1179.6 and 1157.9 microns respectively; whereas in the third generation they were 1290.9, 1199.9 and 1054.4 microns for three regions above respectively. The results of the statistical analysis using a test T and F that found no significant differences in the rate of centroid size males and females that belong to first and third generations between the samples that collected from the different regions above with except there is one significant difference was found in one female that belong to third generation that collected from Southern region of Iraq. Also noted to existence of very few significant differences in average of the centroid size of the right wing for some males and females first and third regions because the samples affected by the environmental conditions in the three regions when using analysis of ANOVA .

Ministry of Higher Education and scientific Research

Diyala University

College of Education pure science

Department of Biology



**The Study of Molecular and Quantitative genetic
relationship between three Populations of the Old
World Screwworm fly, *Chrysomya bezziana*
(Villeneuve,1914) (Diptera : Calliphoridae)
in Iraq**

A thesis

**submitted to the Collage of education for Pure science / Diyala
University in partial fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master in Biology /Zoology Genetic / Insects**

By

Hussein Mohammed prism Al- Tmimi

Bachelor of Biology 2009

Supervisor

Assisst.prof .Dr. Ammar Ahmed Sultan AL-Qeraqouly

A.D2016

A.H 1437