



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

التحليل الوراثي الجزيئي والكمي لنحل العسل
***Apis mellifera* Linnaeus, 1758**
باستعمال ثلاثة
مناطق جينية من دنا الماييتوكوندرية في العراق

رسالة تقدمت بها الطالبة

سارة ثامر محمد الحمداني

الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى كجزء من متطلبات نيل

درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان

بكالوريوس علوم الحياة 2014

باشراف

أ.م. د عمار احمد سلطان القرة غولي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

" وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنِ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْرِشُونَ (68) ثُمَّ كُلِّي مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلًا يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (69)"

صدق الله العظيم

سورة النحل 68، 69.

الإهداء

إلى نبي الهدى والرحمة المبعوث بالكتاب والحكمة
سيدنا محمد (صلى الله عليه وسلم)

إلى من مهد لي الطريق وغرس في نفسي روح التحدي...
والدي الغالي (أمدّه الله بالصحة والعافية)

إلى من غمرتني بحنانها واهدتني أحلى سنين عمرها ...
أمي الغالية (أطال الله في عمرها)

إلى سندي في الحياة ... ورياحين عمري
أخوتي

إلى قدوتي في العلم ونبل الأخلاق ...
أساتذتي

إلى كل الخيرين من أبناء وطني العزيز ... أهدى جهدي

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على نبيه وحبيبه المصطفى محمد (ﷺ) وعلى آله وصحبه أجمعين بعد الاتكال على الله تم إنجاز هذا العمل المتواضع الذي أحمّد الله عليه وادعوه أن يجعله في ميزان حسناتي ليكون شاهداً لي لا عليّ.

بداية يطيب لي أن أتقدم بجزيل الشكر والعرفان إلى أستاذي الفاضل الدكتور **عمار احمد سلطان القرةغولي (رئيس قسم علوم الحياة)** لما أبداه من توجيهات قيمة كانت بحق عوناً ودليلاً لي طيلة إعداد هذه الرسالة.

وأسجل شكري وتقديري إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة و أخص بذلك السيد عميد الكلية المحترم الأستاذ المساعد الدكتور نصيف جاسم محمد لتسهيلهم الكثير من متطلبات البحث وأوجه فائق شكري وتقديري واحترامي لكل من الأستاذ الدكتور رزاق شعلان عكل/مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي/ قسم الحشرات واللافقرات في جامعة بغداد الذي بذل جهوداً عالية لمساعدتي في مجال تشخيص الحشرة ، 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، وشكري وتقديري الى الأستاذ المساعد الدكتور رياض علي عكلي دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا، واتقدم بشكري وامتناني الى السيد علوان المياحي رئيس الجمعية المركزية للنحاليين العراقيين ، كما انتقدّم بالشكر والتقدير الى كافة زملائي وزميلاتي من طلبة الدراسات العليا وأدعو من الله العلي العظيم أن يوفق الجميع واخص منهم أروى علاء ، منتظر علاء ، وحيدر شمر الذين وقفوا بجانبني ، و الذين كانوا عوناً لي في كثير من الصعوبات. ويقف القلم عاجزاً عن التعبير عن شكر ريحانة عمري **والدتي** لما تحملته من المصاعب معي، وشكر خاص الى **والدي العزيز وأخواتي** لدورهم في تشجيعي ودفعي نحو التقدم. واعتذر الى الذين لم يرد ذكرهم داعيةً الرحمن الرحيم لهم بالسعادة والتوفيق.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إقرار المشرف

اشهد أن أعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (التحليل الوراثي الجزيئي والكمي لنحل العسل *Apis mellifera* L. (Linnaeus,1758) باستعمال ثلاثة مناطق جينية من دنا المايكوكوندريا في العراق) التي قدمتها طالبة الماجستير (سارة ثامر محمد حمد الحمداني) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان .

التوقيع:

المشرف: أ.م.د. عمار احمد سلطان

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2018 م

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناء على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الدراسة للمناقشة

التوقيع:

أ.م.د. عمار احمد سلطان

رئيس لجنة الدراسات العليا – رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / 2018 م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة (التحليل الوراثي الجزيئي والكمي لنحل العسل *Apis mellifera* L.(Linnaeus,1758) باستعمال ثلاثة مناطق جينية من دنا الماييتوكوندريا في العراق) التي قدمتها طالبة الماجستير (سارة ثامر محمد حمد الحمداني) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.



التوقيع:

الاسم : أ.د. برهان مصطفى محمد

اللقب العلمي : أستاذ

التاريخ : / / 2018م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (التحليل الوراثي الجزيئي والكمي لنحل العسل *Apis mellifera* L.(Linnaeus,1758) باستعمال ثلاثة مناطق جينية من دنا الماييتوكوندريا في العراق) التي قدمتها طالبة الماجستير (سارة ثامر محمد حمد الحمداني) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة .

التوقيع :

الاسم : م. د. د. رواء عبد الامير علي

اللقب العلمي : مدرس دكتور

التاريخ : / / 2018م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن رئيس وأعضاء لجنة المناقشة نقر بأننا اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ:

(التحليل الوراثي الجزيئي والكمي لنحل العسل *Apis mellifera* L.(Linnaeus,1758) باستعمال ثلاثة مناطق جينية من دنا المايكوكوندريا في العراق)

المقدمة من قبل الطالبة (سارة ثامر محمد حمد الحمداني) وقد ناقشناها في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد انها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة/علم الحيوان وبتقدير ().

التوقيع :

التوقيع :

الاسم : أ.م. د.عمار احمد سلطان

الاسم : أ.م. د. منذر حمزة راضي

التاريخ : / / 2018 م

التاريخ : / / 2018 م

عضوا ومشرفا

عضوا

التوقيع :

التوقيع :

الاسم : أ.م. د. رزاق شعلان عكل

الاسم : م. د. خنساء سلمان فرمان

التاريخ : / / 2018 م

التاريخ : / / 2018 م

رئيس اللجنة

عضوا

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

أ.م. د. نصيف جاسم محمد الخفاجي

عميد كلية التربية للعلوم الصرفة / وكالة

التاريخ : / / 2018 م

الخلاصة

درست العلاقة الوراثية الجزيئية والكمية بين ثلاث مجتمعات لشغالات نحل العسل العراقي *Apis mellifera* L. والتي جمعت عيناتها من بعض مناطق شمال العراق متمثلاً بمحافظة السليمانية ووسطه متمثلاً بمحافظة ديالى وجنوبه متمثلاً بمحافظة البصرة ، إذ جمعت 50 حشرة من شغالات نحل العسل من هذه المناطق لغرض الدراسة ؛ استخدم في هذه الدراسة الطرق الحياتية الجزيئية للكشف عن التنوع الوراثي الجزيئي والكمي الجيني لحشرة نحل العسل في العراق ، إذ عزل ألد DNA من شغالات نحل العسل المجموعة باستخدام عدة الاستخلاص Genomic DNA Mini Kit-Tissue ، بعد ذلك تمّ تضخيم قطعة من DNA الماييتوكونديريا المعزول التي تتألف من الجين DNA 16Sr ، والجين CO1 وND5 باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل وبوجود ثلاثة أزواج من البوادي المتخصصة Specific Primers بواقع زوجين لكل جين وباتجاهين مختلفين أمامي Forward ، وعكسي Reverse ؛ ثم جرى بعد ذلك دراسة التسلسل التتابعي لجزء من جين الماييتوكونديريا COI وND5 المضخم بواسطة اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) ؛ إذ اعتمدت في هذه الدراسة على 6 عينات من هذا النوع للمجتمعات السكانية الثلاثة ، بواقع 2 منها لكل منطقة ، إذ أظهرت النتائج أنّ هناك تنوعاً وراثياً بسيطاً بين عينات الشمال و الوسط من جهة ، وعينات المنطقة الجنوبية من جهة أخرى وهذا التنوع عبارة عن طفرات نقطية Point mutations من نوع الحذف والاستبدال عند مقارنة تسلسل القواعد النتروجينية بين المجموعات السكانية المدروسة ، كذلك تمّ مقارنة العينة المحلية الأكثر تكراراً في تسلسل القواعد النتروجينية للجين COI ، و ND5 مع عینتي بنك الجينات لكل جين، و التي تعود أحداها للخط التطوري الخاص بغرب البحر المتوسط M ، الخط الخاص بإفريقيا A أما الجين الثاني: قورنت تسلسلاته مع عينات بنك الجينات العالمية التي تعود أحداها للخط التطوري الخاص بآسيا ، لشمال البحر الابيض المتوسط C ، وقد وجد عند إجراء المقارنة بين عينة بنك

الجينات الخاصة النوع *A. mellifera mellifera* وعينة الدراسة المحلية التي اختيرت للمقارنة *Apis mellifera* L. ان عدد الطفرات الكلي هو 39 طفرة تتكون من طفرتي حذف و 37 طفرة إستبدال أما النوع *A. mellifera intermissa* فإنّ العدد الكلي للطفرات 9 طفرات تتكون من طفرتي حذف و 7 طفرات استبدال ، أما النوع *A. mellifera syriaca* نلاحظ أنّ عدد الطفرات هو 14 طفرة تتكون من 4 طفرات حذف و 10 طفرات استبدال، و أخيراً عينة 5 *A. mellifera haplotype* فإنّ العدد الكلي للطفرات الحاصلة فيها 42 طفرة تتكون من 35 طفرة حذف، و 7 طفرات استبدال ، وقد استخدم في هذه الدراسة نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه للكشف عن التغيّرات الوراثية الكمية في شكل الجناح الامامي وحجمه بين المجتمعات السكانية لشغالات نحل العسل التي جمعت من بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه ، إذ بلغ معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لشغالة نحل العسل 754.45، 732.25 و 717.42 مايكرون للمجتمعات السكانية من مناطق العراق الثلاثة الشمالية ،الوسطى والجنوبية على التوالي، أما قيمة التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن ، فقد بلغت 358.14، 189.76 و 423.04 للمجتمعات السكانية الثلاثة على التوالي

وأستخدم في هذه الدراسة اختباري F و T لغرض المقارنة بين شغالات نحل العسل للمجتمعات السكانية في المناطق الثلاثة المدروسة لعينات المنطقة الشمالية مع شغالات نحل العسل من عينات المنطقة الوسطى وعينات المنطقة الشمالية مع شغالات نحل العسل للمنطقة الجنوبية وعينات المنطقة الوسطى مع شغالات نحل العسل للمنطقة الجنوبية إذ تشير النتائج الى عدم وجود فروق معنوية بين حشرات المناطق الثلاث في معدل الحجم المركزي للجناح الامامي الأيمن؛ وكذلك لوحظ وجود فروق معنوية بسيطة في تماثل شكل وحجم الجناح الامامي الأيمن لبعض شغالات نحل العسل ، بسبب تأثر الحشرة باختلاف الظروف البيئية في المناطق الثلاثة التي جمعت منها العينات عند استخدام تحليل التباين ANOVA .

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع	التسلسل
الفصل الأول		
1	المقدمة Introduction	1
الفصل الثاني		
3	استعراض المراجع Literature Review	2
3	الموقع التصنيفي لنحل العسل <i>A. mellifera</i> L.	1-2
4	انواع نحل العسل والانتشار العالمي	2-2
6	الاهمية الاقتصادية لنحل العسل <i>A. mellifera</i>	3-2
7	دورة حياة نحل العسل <i>A. mellifera</i> و وصف اطوارها	4-2
8	طرائق تشخيص نحل العسل <i>A. mellifera</i>	5-2
8	التشخيص بالاعتماد على المظهر الخارجي Morphological Identification	1- 5 - 2
10	التشخيص الوراثي الجزيئي لنحل العسل	2-5-2
11	انواع مؤشرات الدنا Types of DNA markers	1-2- 5 -2
11	مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي Molecular Hybridization-Based DNA Markers	A-1-2- 5 -2
12	مؤشرات الدنا المعتمدة على تفاعل سلسلة الدنا (PCR) Polymerase Chain Reaction Based Markers	B-1-2- 5 -2
13	تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل Polyrmerase Chain Reaction	2-2-5-2
14	مؤشرات دنا الماييتوكوندريا mtDNA markers	3-2-5-2
17	الدراسات السابقة المتعلقة بالوراثة الجزيئية لنحل العسل	4-2-5-2
19	التشخيص بالإعتماد على المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه وأنواع المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه	5-2-5-2

21	الدراسات السابقة المتعلقة بإستعمال المقياس الهندسي لشكل الجناح أو تركيبه للمقارنة بين المجتمعات السكانية للحشرات	6-2-5-2
الفصل الثالث		
23	المواد وطرائق العمل Materials and methods	3
23	المواد Materials	1-3
24	محتويات عدة استخلاص ألدنا DNA	1-1-3
25	محتويات عدة تنقية ال DNA من الجل	2-1-3
25	طرائق العمل Methods	2-3
25	جمع العينات	1-2-3
27	الدراسة الوراثية الجزيئية Molecular Genetic Study	2-2-3
27	استخلاص ألد DNA DNA Extraction	1-2-2-3
27	طريقة الاستخلاص	2-2-2-3
29	الترجيل على هلام اللاكاروز Gel Electrophoresis	3-2-2-3
30	تفاعلات Specific-PCR	4-2-2-3
30	استخدام ثلاثة بوادي متخصصة	A-4-2-2-3
31	المحاليل والمواد اللازمة لأجراء التفاعلات	B-4-2-2-3
23	الترجيل الكهربائي	C-4-2-2-3
33	تحليل النتائج Data Analysis	5-2-2-3
33	التسلسل التتابعي للدنا DNA Sequencing	6-2-2-3
35	الدراسة الوراثية الكمية Quantitative Genetic Study	3-2-3
35	تحضير العينات Specimens Processing	1-3-2-3

35	Data Collecting جمع البيانات	2-3-2-3
37	Software البرامجيات	3-3-2-3
الفصل الرابع		
38	Results and Discussion النتائج والمناقشة	4
38	الدراسة الوراثية الجزيئية Molecular genetics Study	1-4
38	DNA Isolation Results نتائج عزل ألدنا	1-1-4
38	نتائج تضخيم الجين 16Sr من دنا الماييتوكوندريا لشغالات نحل العسل <i>A. mellifera</i>	2-1-4
40	نتائج تضخيم الجين COI من دنا الماييتوكوندريا لشغالات نحل العسل <i>A. mellifera</i>	3-1-4
41	نتائج تضخيم الجين ND5 من دنا الماييتوكوندريا لشغالات نحل العسل <i>A. mellifera</i>	4-1-4
43	دراسة التسلسل ألتتابعي للقواعد النتروجينية Studying of Nitrogen Bases	5-1-4
44	المقارنة بين مجتمعات نحل العسل <i>A.mellifera</i> من ناحية الجين CO1	1-5-1-4
48	المقارنة بين مجتمعات نحل العسل <i>A.mellifera</i> مع عينتين من بنك الجينات من ناحية التسلسل التتابعي للجين CO1	2-5-1-4
53	المقارنة بين مجتمعات نحل العسل <i>A.mellifera</i> من ناحية الجين ND5	3-5-1-4
56	المقارنة بين مجتمعات نحل العسل <i>A.mellifera</i> مع عينتين من بنك الجينات من ناحية التسلسل التتابعي للجين ND5	4-5-1-4
61	Quantitative genetic الدراسة الوراثية الكمية study	2-4

61	دراسة التباير الوراثي الكمي في شكل الجناح وحجمه بين ثلاثة مجتمعات سكانية لشغالة نحل العسل A. <i>mellifera</i>	1-2-4
104	الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations	
75	الاستنتاجات Conclusions	
76	التوصيات Recommendations	
المصادر References		
77	أولا : المصادر العربية	
80	ثانيا: المصادر الأجنبية	
94	الملاحق	
A,B	ملخص الرسالة باللغة الانكليزية	

قائمة الجداول

رقم الصفحة	عنوان الجدول	التسلسل
23	المحاليل والمواد الكيميائية والأصل والمنشأ	1
24	محتويات عدة استخلاص الـ DNA	2
25	محتويات عدة تنقية الـ DNA من الجل	3
30	البوادئ المستخدمة وتسلسلاتها	4
31	مكونات خليط التفاعل الرئيس	5
31	ظروف تفاعل لـ Specific – PCRCOI and 16S r DND Gene	6
32	ظروف تفاعل ND5 Specific – PCR	7
46	مقارنة النسبة المئوية لحدوث كل من طفرة الحذف والاستبدال التابعة لنحلة العسل العراقية <i>A . mellifera</i>	8

46	احداثيات ومعدل درجات الحرارة و الرطوبة وكمية الامطار خلال فترة الدراسة	9
51	مقارنة النسبة المئوية لحدوث كل من طفرة الحذف والاستبدال لنحل العسل العراقي <i>Apis mellifera</i> لمناطق شمال ووسط وجنوب العراق مع عينتين من بنك الجينات	10
45	مقارنة النسبة المئوية لحدوث كل من طفرة الحذف والاستبدال التابعة لنحل العسل العراقي <i>A. mellifera</i> بين مناطق شمال ووسط وجنوب العراق	11
59	يبين مقارنة النسبة المئوية لحدوث كل من طفرة الحذف والاستبدال لنحل العسل العراقي <i>Apis mellifera</i> لمناطق شمال ووسط وجنوب العراق مع عينتين من بنك الجينات	12
69	مقارنة الحجم المركزي للجناح الامامي الأيمن بين ثلاث مجتمعات سكانية لشغالة نحل العسل <i>A.mellifera</i> من شمال ، ووسط وجنوب العراق	13
72	مقارنة مسافة مهالانوبز Mahalanobis Distance بين ثلاث مجتمعات سكانية لشغالات نحل العسل من شمال العراق ووسطه وجنوبه	14
74	تحليل التباين ANOVA لتماثل حجم الجناح الأمامي الأيمن بين ثلاث مجتمعات سكانية لشغالات نحل العسل <i>A.mellifera</i> من شمال العراق ووسطه وجنوبه	15
74	تحليل التباين ANOVA لتماثل شكل الجناح الأمامي الأيمن بين ثلاث مجتمعات سكانية لشغالات نحل العسل <i>A.mellifera</i> من شمال العراق ووسطه وجنوبه	16

قائمة الاشكال

رقم الصفحة	عنوان الشكل	التسلسل
4	الخطوط التطورية الأربعة في نحل العسل <i>A. mellifera</i> وتوزعها حول العالم	1
12	مراحل تفاعل ال PCR والتضاعف الأسي لقطعة من ال DNA الاولى	2

16	يوضح الجينات المكونة للدنا الماييتوكونديري لنحل العسل	3
26	خرائط محافظات السلیمانیة - دیالی - البصرة مؤشر عليها مناطق جمع عينات شغالات نحل العسل	4
47	مقارنة رصف Alignment القواعد النتروجينية بين المجتمعات السكانية لنحل العسل لقطعة من الدنا الماييتوكونديري للجين CO1	5
52	مقارنة رصف Alignment القواعد النتروجينية بين المجتمعات السكانية لنحل العسل مع عينتين من بنك الجينات لقطعة من الدنا الماييتوكونديري للجين CO1	6
55	مقارنة رصف Alignment القواعد النتروجينية بين المجتمعات السكانية لنحل العسل لقطعة من الدنا الماييتوكونديري للجين ND5	7
60	مقارنة رصف Alignment القواعد النتروجينية بين المجتمعات السكانية لنحل العسل مع عينين من بنك الجينات لقطعة من الدنا الماييتوكونديري للجين ND5	8
64	معدل احداثيات المعالم للجناح الامامي الايمن من ثلاثة مجتمعات سكانية لشغالة نحل العسل <i>A.mellifera</i> والتي عددها 19 معلم لكل جناح ،	9
66	الشكل الانتشاري لتوزيع شغالات نحل العسل <i>A.mellifera</i> على طول التحليلين العاملين الأول والثاني PCs لإحداثيات فضاء الظل المشتقة من احداثيات المعالم الاصلية لكل جناح والتي عددها 19 معلم	10
68	الحجم المركزي Centroid size للأجنحة الامامية اليمنى لشغالات نحل العسل <i>A.mellifera</i> تبعا للمجتمع السكاني المنتمية له ، إذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 25% والربع 75%	11
69	الحجم المركزي Centroid size للأجنحة الامامية اليمنى لشغالات نحل العسل <i>A.mellifera</i> تبعا للمجتمع السكاني المنتمية له ، إذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 10% والربع 90%	12

72	التحليل التمييزي Discriminant analysis لإحداثيات معالم الاجنحة الامامية اليمنى بين ثلاثة مجتمعات سكانية لشغالات نحل العسل <i>A.mellifera</i> من شمال العراق ووسطه وجنوبه	13
----	--	----

قائمة الصور

رقم الصفحة	عنوان الصورة	التسلسل
36	الجناح الأيمن لشغالات نحل العسل <i>Apis mellifera</i> قوة التكبير 45X	1
38	نواتج الدنا المعزول من شغالات نحل العسل <i>Apis mellifera</i> والتي جمعت من شمال العراق ووسطه وجنوبه	2
39	ناتج تضخيم الجين 16Sr من DNA الماييتوكوندرية لشغالات نحل العسل <i>A. mellifera</i> التي جمعت من شمال العراق ووسطه وجنوبه	3
41	ناتج تضخيم الجين COI من DNA الماييتوكوندرية لشغالات نحل العسل <i>A. mellifera</i> التي جمعت من شمال العراق ووسطه وجنوبه	4
42	ناتج تضخيم الجين ND5 من DNA الماييتوكوندرية لشغالات نحل العسل <i>A. mellifera</i> التي جمعت من شمال العراق ووسطه وجنوبه	5
62	الجناح الامامي الايمن لشغالات نحل العسل <i>A.mellifera</i> من المجتمع السكاني لشمال ووسط وجنوب العراق موضحا عليها احداثيات المعالم والتي عددها 19 معلم ، قوة التكبير 45X	6

قائمة المختصرات

الاختصار	المصطلح الكامل
16 Sr DNA	16S r DND Gene
CO1	Cytochrome Oxidase I
ND5	NADH dehydrogenase subunit 5
Mt DNA	Mitochondrial DNA
MW	Molecular Weight
Bp	base pairs
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Dttp	Deoxy Thymidine Triphosphate
Dctp	Deoxy Cytosine Triphosphate
dATP	Deoxy Adinosine Triphosphate
Dgtp	Deoxy Guanosine Triphosphate
COII	Cytochrome Oxidase II
TBE	Tirs Borat
PCs	Pincepal component analysis
UV	Ultraviolet
MCS	Mean Centroid Size
St.D	Standard Deviation
Va	Variance
A.D	Absolute Differences
NCBI	National Center for Biotechnology Information
MOG	Morphometria Geometrica

COO	Collection of Co Ordinates
TET	Tabla Espacios Tabulacions
PAD	Permutaiones Analysis Discriminante
COV	Coveriance
ASI	Asymmetry of Shape and Size

قائمة الملاحق

رقم الصفحة	عنوان الملحق	التسلسل
96	دليل عدة استخلاص الدنا Genomic DNA Mini Kit (Tissue)	1
100	دليل مكونات خليط التفاعل الرئيس للـ PCR	2
101	أنواع البوادئ المستخدمة في الدراسة	3
103	دليل عدة التنقية pcr DNA Fragments Extraction Gel / Kit	4
107	دليل المؤشر الجزيئي (2000 bp-100bp) DNA ladder	5
108	كتاب تشخيص عينات النحلة العراقية <i>A. mellifera</i>	6

المقدمة Introduction

لقد عرف نحل العسل منذ العصور القديمة كأحد أهم الحشرات الاجتماعية Social bees ، فقد تميزت افراد طائفة نحل العسل بالتعاون وتقسيم اعمال الطائفة فيما بينها اسوة ببقية الحشرات الاجتماعية كالنمل Ants، وبعض أنواع الزنابير Wasps ؛ وإنّ أهم هذه الأعمال هو البحث وتوفير الغذاء للطائفة وتربية الحضنة (سعيد وجرجيس، 2010). وصف الله تعالى في الايتين 68 و 69 من سورة النحل ، وبشكل موجز ودقيق طباع النحل في المسكن والمأكل ، وفوائد منتجاته من الناحية الطبية والتي توصل اليها الباحثون فيما بعد ، ثم لخصّ في الاية 69 و التي تنبه العقل على التأمل في حياة النحل، ومسكنها، وعملها الجماعي ، في غذائها وجمعها للرحيق وفي اهتدائها الى اعشاشها مهما طال الطريق وتعتقد وبذلك احتوت هاتان الأيتان خلاصة ما توصلت اليه الدراسات التي تناولت سلوك النحل على مدى السنوات الماضية (الخولي وعيسى، 1994).

يعدُّ نحل العسل *Apis mellifera* L. من الحشرات ذات الأهمية الاقتصادية في العملية الإنتاجية للكثير من المحاصيل الزراعية والخضرية وأشجار الفاكهة، فهو بالإضافة الى ما ينتجه من عسل، وحبوب لقاح ،وغذاء ملكي وشمع وبروبولس (العكبر) التي لها اهميتها الدوائية والصناعية وتوفير فرص عمل لمجموعة كبيرة من الايدي العاملة (الجوراني وآخرون ، 1990). فهو يساهم وبشكل ملحوظ في زيادة نسبة تلقيح الأزهار، وبهذا فقد تغير المفهوم السائد حول أهمية النحل كحشرة منتجة للعسل والمواد الأخرى إلى حشرة ذات أهمية كبيرة في تحسين مستوى الإنتاج الزراعي كما ونوعا (الشدايده والعبادي، 2012) .

من الحقائق المعروفة إنّ النباتات المزهرة التي توجد في نفس المنطقة تتنافس فيما بينها من حيث قدرتها على جذب الملقحات بعدد زيارات اكبر ونسبة عالية من التلقيح الخلطي وهذا من خصائص النباتات الناجحة (فرج الله و الغامدي ، 2003)؛ وبالإعتماد على المؤشرات المورفولوجية قسم نحل العسل حول العالم إلى أربعة خطوط تطورية عامة Evolutionary lineages ، وهي الخط A الخاص بإفريقيا ، الخط M لغرب البحر المتوسط ، الخط O الخاص بالمنطقة الشرقية والخط C لمنطقة شمال البحر المتوسط (Ozdil، 2009). لم يبق تقسيم هذه الخطوط التطورية معتمداً على المؤشرات المورفولوجية فقط، إذ تم إثبات هذه الخطوط وتقويم الثغرات التي تركتها الدراسة المعتمدة على الصفات الشكلية بواسطة دراسات جزيئية في ما بعد (Dechamp ، 2003) .

نظرا لما تقدم من اهمية نحل العسل من الناحية الاقتصادية ولعدم او قلة وجود دراسات وراثية جزيئية حول التنوع الحيوي لنحل العسل العراقي ومن اي خط تطوري منحدره لذا اقترح موضوع الدراسة ليشمل الجوانب الاتية :-

1- الجانب الوراثي الجزيئي والذي يتركز على استخلاص الدنا الماييتوكوندري من منطقة الصدر
لعينات نحل العسل جمعت من شمال ووسط وجنوب العراق ، ودراسة التنوع الوراثي الجزيئي عن طريق تضخيم ثلاثة جينات من دنا الماييتوكوندريا وهي ND5, CO1, 16Sr DNA مع عمل تسلسل نيوكليوتيدي لهذه الجينات لغرض مطابقتها مع بنك الجينات لمعرفة الخط التطوري للسلالة المحلية

2- الجانب الوراثي الكمي والذي سوف يتركز على دراسة التباير الوراثي الكمي بين عينات المناطق الثلاث، عن طريق استخدام المقياس الهندسي لشكل او حجم الجناح الامامي للكشف عن التنوع الوراثي الكمي بين المجتمعات السكانية الثلاثة للسلالة المحلية .

2 - استعراض المراجع Literature Review

2 - 1 وفقا لـ Michener (2007) وحسن (2008) فان الموقع التصنيفي للنوع *A. mellifera*

كالآتي :-

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Hymenoptera

Suborder: Apocrita

Superfamily: Apoidea

Family: Apidae

Tribe: Apini

Genus: *Apis*

Species: *mellifera* L .

صُنِفَ نحل العسل تحت الاسم العلمي *A. mellifera* من قِبل Linnaeus عام 1758 إشارة إلى النحل الحامل للعسل والذي وجد بصورة طبيعية في أوروبا وأفريقيا وغرب آسيا، (Miguel وآخرون، 2011). إذ إنّ خبراء التصنيف صنفوا نحل العسل *A. mellifera* إلى عائلة كبيرة وهي Apidae (Winston، 1987). واهم ما يميز به أفرادها على المستوى البيئي والمرفولوجي هو غذاؤها يتكون من الرحيق وحبوب اللقاح و تحور اجزاء الفم الى النموذج الماضغ اللاعق لارتشاف الرحيق ومضغ حبوب اللقاح وتحورت ارجلها الخلفية لجمع حبوب اللقاح وذلك لوجود تراكيب يطلق عليها سلة حبوب اللقاح pollen basket بشكل شعيرات كثيفة متفرعة، (الصائغ ومصطفى ، 2003)، وايضا صنف العلماء النحل الى 11 عائلة ، و 700 جنسا يضم النحل عموما عشرون ألف نوع 20000 أو أكثر، قُسمت إلى مجموعتين رئيسيتين وهي ، مجموعة النحل ذات اللسان القصير، وهي مجموعة تتميز بكونها بدائية، ومجموعة أخرى تدعى ذات اللسان الطويل

وهي المجموعة الأكثر تطوراً؛ والنوع *A. mellifera* الذي نقوم بدراسته هو أحد أنواع المجموعة ذات اللسان الطويل. (Graham, 2003).

2-2 أنواع نحل العسل والانتشار العالمي

ان مناطق التوزيع الاصلي لهذا النوع تتضمن مناطق الجنوب والغرب من اسيا واوروبا وافريقيا وحاليا يوجد 26 ألف نوع من انواع النحل والمعترف بها رسميا استنادا الى الشكل الخارجي (Smith و Sheppard, 2000) وعلى أساس الشكل المظهري والسلالة ضمن *A. mellifera* تم تجميعها في ثلاثة فروع تطورية رئيسة وهذا ما اكدته الدراسات الاولى على مستوى دنا المايكوكوندريا حيث اكدت وجود ثلاثة خطوط تطورية وهي A الخط الخاص بافريقيا ، و C الخط الخاص بمنطقة شمال البحر المتوسط ،والخط M الخط الخاص لغرب البحر المتوسط (Frank وآخرون ، 2000)، بالإضافة لهذه الخطوط التطورية الثلاثة يوجد خط رابع وهو O تنتمي له سلالة اخرى من نحل العسل وفقا لما جاء في دراسات للحامض النووي المايكوكوندري في وقت لاحق ويمثل الشكل 1 الخطوط التطورية الأربعة لنحل العسل وتوزعها حول العالم (البراقى و آخرون ، 2009)، و لم يبق تقسيم هذه الخطوط التطورية معتمداً على المؤشرات المورفولوجية فقط ، إذ تم إثبات هذه الخطوط وتقويم الثغرات التي تركتها الدراسة المعتمدة على الصفات الشكلية بواسطة دراسات جزيئية في ما بعد، (Dechamp, 2003).



شكل (1) الخطوط التطورية الأربعة في نحل العسل *A. mellifera* وتوزعها حول العالم ، (البراقى و آخرون ، 2009) .

وتم تقسيم هذه الأنواع الأربعة تبعا لحجم الأفراد ومكان تواجده او طول الجناح الأمامي كالآتي:-

1- النحل الصغير (القزم) *A. florea*

يعتبر من أصغر أنواع النحل المعروفة حجما واقدرها على تحمل درجات الحرارة العالية والتي تصل أحيانا إلى 50م°، وهو يعيش في الهند وماليزيا وتايلاند واندونيسيا. وهو يتصف بأللفة مع الانسان ، لذا نادرا ما يهاجم الإنسان؛ حيث لا يستطيع دفع آلة اللسع في الجلد (Whitehead و Shaw، 2007) وسجل هذا النوع في العراق من قبل Glaiim (1992) في محافظة ديالى .

2- النحل الكبير (العماق) *A. dorsata*

وهو نحل كبير الحجم يعيش بمستعمرات كبيرة في العراء وهذا النوع شرس الطباع نشط جداً في جمع الرحيق، ولسعات العاملة أكثر ألماً من لسعات عاملة النحل الغربي يتواجد النحل العماق بجنوب آسيا في بلاد الهند وماليزيا وسيلان والصين واندونيسيا (أبو شاور، 2003).

3- النحل الشرقي (الهندي) *A. indica*

يحتل النحل الشرقي المركز الوسط من حيث حجم أفراده ، فهو يقع بين النحل العماق والنحل الصغير، و يسكن تجاويف الأشجار والفجوات ، (الآغا، 2005) .

4- النحل الغربي (العاسل) *A. mellifera*

وتعني كلمة *mellifera* النحل الناقل للعسل ويطلق عليه أيضا اسم *mellifeca* وتعني النحل الصانع للعسل و يعد الاسم الأول هو الأكثر شيوعا. وهذا النوع وكما هو معروف يحتل المرتبة الأولى في إنتاج العسل تجارياً حيث أظهر تفوقاً كبيراً على النحل الشرقي من حيث الاستقرار في خلاياه التي لا يرحل عنها؛ (الآغا، 2005). كما ان هذا النوع قابل للإيواء في الخلايا

التي يصنعها الإنسان، وكننتيجة لانتشاره طبيعياً ونقله من قبل الإنسان إلى مناطق جغرافية وبيئات مختلفة (أبو النجا وآخرون ، 2008) .

أما حسب اللون فيقسم النحل بصورة خاصة إلى ثلاث مجموعات هي النحل الأسود والنحل الأصفر والنحل السنجابي، وهناك علاقة وثيقة جداً بين ألوان النحل والمناخ فالنحل الذي يعيش في المناطق المعتدلة ذات الشمس المشرقة يكون لونه افتح من النحل الذي يعيش في المناطق الباردة كثيرة الغيوم (Beekman، 2004).

2-3 الأهمية الاقتصادية لنحل العسل *A. mellifera*

يعدُّ نشاط تربية نحل العسل من أحد المجالات التي يمكن أن تسهم بشكل واسع وكبير في تنمية الحركة الاقتصادية والاجتماعية ، وذلك من خلال ما تسهم به من منتجات فضلاً عن خلق فرص للعمل ، ويعد هذا النشاط من الأنشطة التي لا تحتاج الى اساليب تكنولوجية متقدمة ولا تتطلب مهارات ، أو خبرات ، أو رؤس اموال كبيرة (عودة، 2013) . إنّ الغاية من تربية نحل العسل اليوم ، لاتقتصر فقط على انتاج العسل والشمع ،وانما أصبح المجال مفتوحاً أمام الكثير من المربين ، لإنتاج الملكات والطرود ، واعدادها للبيع اضافة الى إنتاج الغذاء الملكي وسم النحل، وحبوب الطلع ، واستخدام طوائف نحل العسل في تلقيح الازهار وخاصة في بساتين الفاكهة (Dubecke وآخرون ، 2011) .

هناك مجالات عديدة وفوائد اقتصادية لتربية النحل واهمها زيادة الانتاج الزراعي والمحافظة على التنوع الحيوي كذلك يقوم بإجراء التلقيح الخلطي بين الازهار حيث تبلغ نسبة مساهمته في التلقيح الخلطي 75%، ولهذا يعتبر نحل العسل مساهماً كبيراً وفعالاً في المحافظة على التنوع الحيوي (الانصاري، 2007) ؛ كما ويعدُّ النحل مؤشراً بيئياً يجب حمايته حيث أنّ البيئة والنحل لا يفترقان ، فالنحلة حشرة اجتماعية تتكاثر وتزدهر بشكل جيد في الظروف المناخية الجيدة والخالية من الملوثات ، ويقوم النحل ايضاً بإنتاج العسل . والعسل هو رحيق الازهار بعد أن تقوم شغالات

النحل بتجهيزه ، وهضمه ليتحول الى عسل ناضج وتقوم بخزنه في الاقراص الشمعية (مكيس والجندي ، 2005)

بالاضافة الى هذه الفوائد ينتج عن تربية النحل منتجات أخرى عديدة مهمة وهي ذات قيمة اقتصادية عالية منها الغذاء الملكي الذي يعدّ منشطاً ومقوياً للجسم ، يفيد بشكل عام في تنشيط الغدد الجنسية sex glands وعلاج الضعف الجنسي و يفيد في علاج البروستات وانقطاع الطمث المبكر (النجار، 2010 ؛ Laidlaw و Eckert ، 2005) ؛ و العكبر هي مادة راتنجية صمغية تجمعها شغالات نحل العسل من قلف الأشجار وبراعمها من حبوب اللقاح، ومن براعم بعض النباتات تستخدمها الشغالات في سد الثقوب وأيضاً في لصق أجزاء الخلية ببعضها وتعدّ مادة العكبر ذات فائدة دوائية كبيرة لأنها تحتوي على فيتامينات كثيرة (الحارثي، 2002). ولها عدد من الفوائد طبية من اهمها (Stevens ، 2005) لها فعالية مضادة للجراثيم Antimicrobial ، ومضادة للفيروسات Antiviral ، ومضادة للفطريات Antifungal ، ومضادة للالتهاب ، ومضادة للسرطان Anticancer و يعمل في علاج تسوس الأسنان، و معالجة قرحة المعدة، و التهاب القولون، و التهاب المثانة، و التهاب الكليتين، و التهاب غدة البروستات و في تقليل الجروح أفضل من الأدوية الكيميائية الأخرى كدواء السلفادايازين (ياسين، 2011).

2-4 دورة حياة نحل العسل *A. mellifera* و وصف اطوارها

تمر النحلة سواء كانت ملكة ، أو شغالة أو يعسوب بمراحل تطور كاملة وهي 4 أطوار واضحة، ففي البداية تكون في طور البيضة ، ثم طور اليرقة وتتحول اليرقة إلى طور العذراء وأخيراً تخرج من الحضنة وقد أصبحت حشرة كاملة.

1- دور البيضة Egg stage

اما ان يكون مخصب ينتج إناث (شغالات ، ملكات)، أو أن يكون غير مخصب ينتج عنه الذكور ويكون لون البيوض أبيض وذات طول حوالي ملليمتر واحد اسطوانية مقوسة قليلاً في شكل ثمرة الموز (اللواتي والحجرية، 2011).

2- دور اليرقة Larval stage

تخرج اليرقات بعد ثلاثة أيام من وضع البيض يفقس وينتج عنه يرقة، وتنمو لفترة خمسة أيام حتى تتحول بعدها وتتطور اليرقات إلى عذارى، فالملكة يستمر بتغذيتها الغذاء الملكي طوال حياتها التي تبلغ أربع إلى سبع سنوات مقابل ستة أسابيع لحياة العاملة، وكذلك يسمى أحياناً بلبن النحل Bees Milk تشبيهاً له باللبن الذي تفرزه غدد الحيوانات الثديية لإرضاع صغارها (النجار، 2010).

3- دور العذراء Pupa stage

بعد اليوم الخامس لليرقة تتحول إلى عذراء، وتتحول أجهزة اليرقة المختلفة إلى أجهزة الحشرة الكاملة، وتتراوح فترة طور العذراء بين 7 - 8 أيام للشغالة والذكر و أربعة أيام للملكة (Root ، 2006).

4- الدور الكامل Imago stage

بعد اكتمال دور العذراء تشق الحشرة الكاملة الغطاء وذلك بقرض أجزاء منه وتخرج وتكون ضعيفة، ما تلبث أن تشتد خصوصاً بعد أن تأخذ لعقة من العسل و تعتبر هذه الحشرات حسب التصنيف العلمي أنها حشرات كاملة التطور ،أي أنها تمر في أربعة ادوار خلال حياتها

2-5 طرائق تشخيص نحلة العسل *A . mellifera*

2-5-1 التشخيص بالاعتماد على المظهر الخارجي Morphological Identification

أظهرت العديد من الدراسات التي أجريت على نحلة العسل التي تنطوي على الخصائص المظهرية ان هناك تأثيراً قوياً للبيئة في الانواع نفسها ولقد استخدمت عدة طرق أو اساليب في قياس الخصائص المورفولوجية لعاملات وملكات نحل العسل، وقد تطورت هذه الأساليب عندما استخدم المجهر وبرامج الكمبيوتر (Mazeed، 2004)

2-1-5-2 الملكة The Queen :

وهي أنثى كاملة التكوين الجنسي أيّ ان لها مبايض تكون قادرة على إنتاج البيض ووظيفتها الأساس هي وضع البيض ، اما أهم مميزاتها تكون بطنها طويلة وأجنحتها قصيرة نسبياً بالنسبة لجسمها ولا تتجاوز حلقات البطن ، يختلف لون الملكة باختلاف سلالتها، وكذلك لكل ملكة آلة لسع مقوسة ذات أسنان دقيقة تستخدم فقط في لسع مثيلاتها من الملكات؛ ومن الملاحظ أن الملكات تبقى محتفظة بآلة اللسع عند اللسع بعكس الشغالات التي تفقدها وتفسير ذلك هو أن آلة اللسع عند الشغالات تكون من السهولة ادخالها في الجسم ومن الصعب إخراجها في حين أن آلة اللسع عند الملكة تكون من السهل ادخالها وإخراجها من الجسم (Butler، 2002) .

2-1-5-2 الشغالات Workers:

إنّ الشغالات إناث أعضاؤها التناسلية غير مكتملة التكوين الجنسي (المبايض ضامرة)، أي اناث عقيمت وكذلك هي أصغر أفراد الطائفة حجماً ولكنها تمثل الأكثرية في الخلية؛ وتتميز الشغالات بأجنحتها القوية والطويلة التي تساعد على الطيران، كذلك الأرجل الخلفية لها مزودة بسلال لجمع حبوب اللقاح ، والبطن مزودة بـ 8 غدد على جانبي البطن التي تقوم بإفراز الشمع لبناء الأقراص الشمعية، وتتميز الشغالات بوجود آلة اللسع في نهاية بطنها ، إذ تستخدمها للدفاع عن نفسها وعن خليتها؛ وللشغالات غددة خاصة في رأسها تقوم بإفراز الغذاء الملكي (اللواتي والحجرية، 2011)

2-1-5-3 الذكور The Drone :

يتميز الذكر عن الشغالة بكبر حجمه وضخامته ولكنه أقل طولاً من الملكة ومؤخرته عريضة يغطيها شعر كثيف ، وأجنحة الذكر كبيرة وعند طيران الذكور تحدث طنيناً مميزاً؛ وعيون الذكر بارزة والخرطوم قصير لا يصلح لجمع الرحيق ، كما أنّ الشغالات تتخلص من الذكور في فترة قلة الأزهار عن طريق لسعها وإخراجها أو عن طريق منعها من دخول الخلية وبالتالي لا تستطيع الذكور إطعام نفسه (حلو وآخرون، 2001).

2 - 5 - 2 التشخيص الوراثي الجزيئي لنحل العسل

Molecular genetic identification for *A. mellifera*

ان لعلم الوراثة الجزيئية اهمية كبيرة في مجال وراثة الحشرات حيث أنه يوفر بيانات ضرورية لتطوير التشخيص الوراثي الجزيئي والتي يمكن استخدامها لتحديد الأنواع المختلفة ؛ لأنّ التشخيص المظهري Morphological Identification يصعب فيه الاحتفاظ بعينات الحشرات لمدة زمنية ؛ وبالتالي فإنّ تشخيص وتصنيف الحشرات وراثياً يعدّ الافضل والاكثر استخداماً في مختبرات وراثة الحشرات (Trout وآخرون، 2010) .

يمكن أن يجري التشخيص الوراثي الجزيئي للحشرات بإستخدام بيانات تسلسل الحامض النووي DNA للكشف عن المجتمعات السكانية ووصف انواع من الحشرات وصفاً جغرافياً دقيقاً ، وقد استخدمت الدراسات الجينية المبنية على التشخيص الجزيئي للحشرات في مجال تقديرات التدفق الجيني والانتشار فضلاً عن أنه يساعد في تحديد أعداد المجتمع السكاني للحشرة المستوطنة والوافدة وتقسيمها الى فئات معينة (Austin وآخرون، 2006) ؛

ومن تلك الدراسات التي تعرف وتعرف مؤشرات الدنا DNA Markers على انها احدى انواع المؤشرات الوراثية بأنها تتابعات من الدنا يمكن الاستدلال بها على موقع معين من

الكروموسوم أو الجينوم تستعمل لدراسة العلاقات الوراثية بين الأفراد وإيجاد البصمة الوراثية لكونها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثية المخزونة فيه (King و Stansfield، 1990)

2-5-2 أنواع مؤشرات الدنا Types of DNA Markers

لقد صنفّت هذه المؤشرات حديثاً إلى نوعين أساسيين اعتماداً على نوع التقنية المستعملة في إيجادها والكشف عنها وهي :

2-5-2-1 A مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي

Molecular Hybridization-Based DNA Markers

لقد ظهرت أولى مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي بعد استثمار الباحثين لانجازين علميين كبيرين في بناء أول تقنية أطلق عليها تباين أطوال قطع التقييد (RFLP) وتعرف على أنها توارث الاختلافات في مواقع القطع الأنزيمي الذي يتسبب في ظهور أطوال مختلفة من قطع الدنا على هلام الاكاروز.

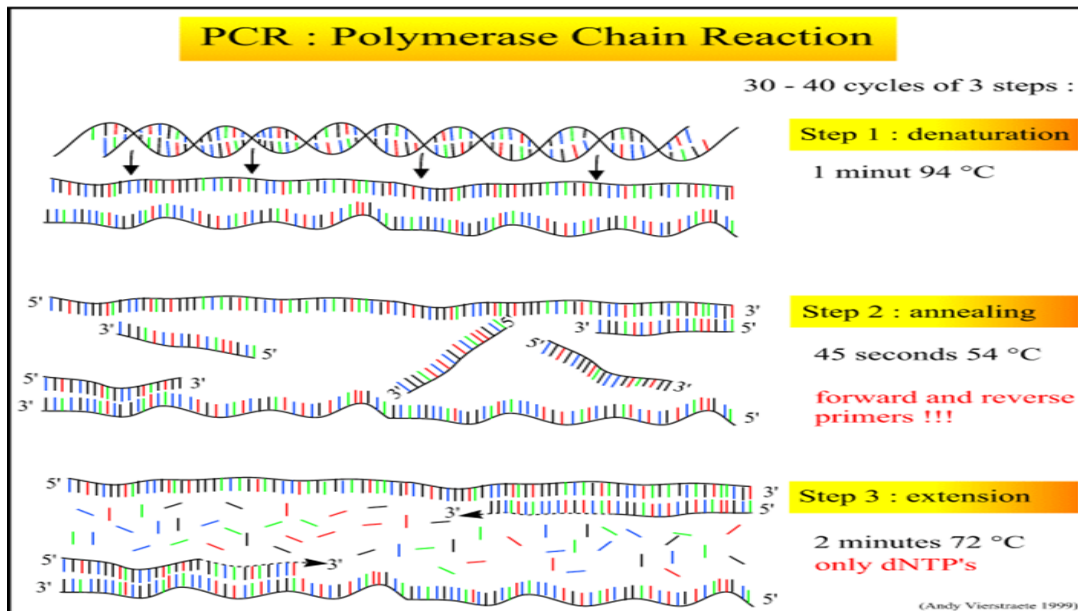
إن منهجية RFLP تعتمد على الاختلافات في طرز التقطيع الذي يحدث بسبب طفرة نيوكليوتيدية واحدة عن موقع القطع، أو بوساطة القطع المضافة، أو المحذوفة، أو المستبدلة عن تلك المواقع مما يؤدي إلى تباين أطوال القطع الناتجة (Jubrael وآخرون، 2005) وبوجود المجس Prop معلم بمواد مشعة أو مواد كيميائية يمكن التعرف على القطع المتباينة بإرتباط المجس مع التسلسل المكمل (Meudth و Clarke، 2007) ولها أهمية في مجالات عديدة منها تحسين أنواع من النباتات مثل بناء الخرائط الوراثية للبطاطا والذرة وفي مجال التشخيص المبكر لجنس نخيل التمر كذلك التشخيص الوراثي لأصناف من النخيل (الخطيب، 2000).

إذ إنّ التقنيات المعتمدة على التهجين الجزيئي بشكل عام تحتاج الى كثير من الوقت والجهد والكلفة فضلاً عن كميات كبيرة من الدنا DNA وبنقاوة عالية جداً وذو كلفة عالية وتتطلب استخدام المواد المشعة (جبرائيل، 2001).

2-5-1-2 B مؤشرات الدنا المعتمدة على تفاعل سلسلة الدنا (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) Based Markers

أحدث اكتشاف تفاعل الـ PCR من قبل (Mullis وآخرون، 1983) أكبر ثورة في مجال التقانات الحديثة للبايولوجيا الجزيئية في ثمانينات القرن الماضي والذي كان سبباً في منحه جائزة نوبل عام 1993 حيث يتمتع هذا التفاعل بالقوة والحساسية العالية الشديدة . وفكرة هذا التفاعل بسيطة تتلخص بالتركيب والتصنيع المتكرر وبشكل مستمر لقطعة محددة من الدنا لينتج في النهاية كمية كبيرة من الدنا وحيدة السلسلة ابتداءً من كمية قليلة جداً من الدنا المدروس ومشابه له ويعتمد هذا التفاعل على وجود بادئة وهي قطعة من الدنا معروفة التسلسل النيوكليوتيدي تلتصق بالمنطقة المحيطة بالدنا المدروس ومن خلال تكرار عمليات الـ Denaturation (فصل سلاسل الدنا المزدوجة وتحويلها الى سلاسل مفردة عن طريق تحطيم الروابط الهيدروجينية بتأثير الحرارة المرتفعة) ، ثم Annealing (التحام البادئات بالمناطق المحيطة بالدنا المدروس) ، ثم الـ Extension (تركيب سلسلة دنا جديدة) سيؤدي الى تركيب دنا جديد وذلك ضمن تضاعف اسي (amplification) كما في شكل 2 (معلا وعلي، 2009).



شكل (2) مراحل تفاعل ال PCR والتضاعف الاسي لقطعة من ال DNA الاولى (معلا وعلي، 2009)

وتعدُّ هذه العملية محاكاة لما يحدث في الطبيعة في جميع الكائنات الحية والتي تتضاعف مادتها الوراثية أثناء الانقسام فالفاعل بسيط ومحتوياته موجودة منذ قدم الحياة قبل أن ينفذها Mullis خارج الجسم الحي ، كما وتعد تقنية ال PCR الأكثر انتشاراً واستخداماً في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع دول العالم والأساس الذي تعتمد عليه معظم الدراسات العلمية البحثية فيها ، ويتمتع تفاعل ال PCR بميزاتٍ عديدةٍ إذا ما قورنت بالمؤشرات القائمة على مبدأ التهجين منها: (Sridhar، 2006) تحتاج الى كمية قليلة من الدنا ولا تحتاج الى استخدام المواد المشعة ولا تحتاج الى تجهيزات مخبرية كبيرة ومتقدمة و لا تحتاج الى معرفة مسبقة لل DNA وذلك في معظم التقنيات المشتقة و الدقة والخصوصية والحساسية العالية في الكشف عن قطعة دنا معينة ضمن آلاف من القطع لذلك أصبحت لا يمكن الاستغناء عنها في دراسات الوراثة الجزيئية

2-2-5-2 تقنية تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

أحدثت تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل ال PCR ثورة كبيرة في علم البيولوجيا الجزيئية ، إذ مكّنت العلماء من الحصول على نسخ كبيرة من ال DNA مختبرياً في وقت قصير وبكفاءة عالية جداً ويعتبر العالم كاري موليس Kary Mullis أول من استخدم هذه التقنية في العام 1983 ، وتمّ نشرها لأول مرة في العام 1985 ومنذ ذلك الحين ولازال الكثير من الباحثين والعلماء يجرون العديد من التعديلات على تلك التقنية بالإعتماد على التقنية الأم التي استخدمها كاري موليس لأول مرة، وتعدُّ هذه التقنية حساسة ويمكن أن تكون عالية التخصص في جزء معين من الدنا (التركي، 2010).

ويوجد نوعان من ال PCR النوع العادي وهو الذي يقوم بمضاعفة جزء من الدنا الى الآلاف من النسخ من تسلسلات الحامض النووي ولكن هذا النوع يأخذ الوقت الكافي الذي يحدده الجهاز. أما النوع الثاني: وهو ال RT- PCR. (Real Time PCR). فيكون مبدأ العمل فيه نفس مبدأ عمل

النوع الاول ولكن الخلاف الوحيد فيه يكون جهاز الـ PCR مرتبط بالكمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدأ التفاعل، وكذلك الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحامض النووي DNA ويكون الاعتماد على ذلك وجود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك، وهذا يوفر على الباحثين الوقت لتحديد الجين المطلوب ، أو عدم وجوده وكمية الجين دون الوصول إلى نهاية الدورات الحرارية المحددة (Bustin ; 2003 ، Stirlin و Bartlett، 2002). ويمكن بهذه الطريقة اكثر أو تضخم جزء من DNA أو جينات محددة بعد عزلها عن طرق ظهور حزم مميزة على هلام الاكاروز (Kirvar وآخرون ، 2000 ؛ Mas-Coma وآخرون ، 2005) شهدت السنوات الاخيرة تطور هائل في التقانات الجزيئية ؛ بسبب الحاجة الملحة الى تقنية تتصف بالحساسية والخصوصية العالية أما اهم الأسباب التي ساهمت في انتشار تقنية الـ PCR على نطاق واسع وفي جميع التخصصات العلمية الحيوية فهي إنها لا تعتمد على النظام الحيوي في داخل الخلية وكذلك السيطرة على كمية الـ DNA من خلال التحكم بمقدار تلك الكمية و سرعة الإنتاج ، إذ أنها تقنية تستخدم بكثرة في مجال علم الحياة الجزيئي لمضاعفة و تضخيم نسخ عديدة من الحامض النووي DNA بشكل نسخ إنزيمي خارج الجسم الحي في المختبر لإجراء التجارب والفحوصات والابحاث العلمية المختبرية المختلفة (James و Peter، 2000) .

3-2-5-2 مؤشرات دنا الماييتوكوندرية Mitochondrial DNA Marker

أن التسلسلات الفريدة من نوعها من الحمض النووي توجد في الماييتوكوندرية والتي تم استخدامها ليس فقط لتصنيف الأنواع، ولكن أيضا لدراسة الحيوانات والطيور، والهجرة البشرية وكذلك في وسائل التشخيص والتحليل الجنائية (Gray وآخرون ، 1999) ؛ وهناك مجالات اخرى مهمة التي اعتمدت فيها مؤشرات دنا الماييتوكوندرية بشكل كبير هو مجال الوراثة السكانية Population genetics ، التصنيف أو التقسيمات الجزيئية Molecular Systematics بحيث كل دراسة

جزيئية للأنواع الحيوانية خاصة بدنا الماييتوكونديريا تكون معتمدة بشكل كبير على النمط الفردي Haplotyping للنوع في كل مرحلة ، لذلك فإن جين الميتوكونديريا COI استخدم في الوقت الحاضر كأداة موحدة للتشخيص والتصنيف الجزيئي Molecular Taxonomy في معظم الدراسات الجزيئية (Ratnasingham و Hebert، 2007)

يتكون الدنا الماييتوكونديري في الحيوانات من جينين من الحامض النووي الريبوزي rRNA و 22 جين من جينات الرنا الناقل tRNA و 13 من الجينات المشفرة للبروتين والتي تشفر عن الوحدات الثانوية Subunits للأنزيمات المشتركة في نقل الألكترونات أثناء تصنيع جزيئات الطاقة ATP (Moritz وآخرون، 1987) ؛ يتميز DNA الماييتوكونديريا والذي يعرف اختصاراً بـ mtDNA بان بصمته الوراثية تستخدم في الدراسات التصنيفية ودراسة هجرة الكائنات الحية وفي البحوث التشخيصية Diagnostics والأدلة الجنائية Forensics و إنّ الدنا الماييتوكونديري في الحشرات يحتوي على 37 مورثة تكون مسؤولة عن الوظائف الأساسية التي تقوم بها الماييتوكونديريا (Lopez ، 1994).

ويمثل الدنا الماييتوكونديري نسبة قليلة جداً من حجم الجينوم الكامل ، وبالرغم من ذلك فقد كان الى حد كبير يمثل المؤشر الجزيئي الوراثي المعروف من قبل العلماء والباحثين في مجال دراسة التنوع الجزيئي للحيوانات على مدى العقود الثلاثة الماضية (Avisé وآخرون ، 1987) ؛ و كما أنّ للدنا الماييتوكونديري مناطق تتطور بشكل سريع مقارنة مع الحامض النووي لدنا النواة ولهذا فائدة بوجه خاص لفهم علاقات النشوء والتطور بين الأنواع ،

لذلك دراسة العديد من الباحثين ليتوصلوا الى معرفة العلاقات بين الانواع من الناحية الوراثية ، أو من ناحية التركيبية السكانية للحشرات لمختلف الرتب الحشرية ، كالدراسات التي أجريت على الزنبور الطفيلي *Muscidifurax* spp. من رتبة غشائية الاجنحة Hymenoptera ، وذلك لإيجاد تنوعات الدنا الماييتوكونديري (Taylor وآخرون ، 1997) وكذلك كما قام

شكل (3) يوضح الجينات المكونة للدنا الماييتوكونديري لنحلة العسل *A. mellifera* (Crozier) و Crozier (1993)

2-5-2-4 الدراسات السابقة المتعلقة بالوراثة الجزيئية لنحل العسل

Molecular genetic studies of *Apis mellifera*

قام Ozdil وآخرون (2012) بدراسة وراثية جزيئية لإيجاد التركيب الوراثي لثلاث جينات مختلفة من دنا الماييتوكونديريا لمعرفة تأثير التوزيع الجغرافي واختلاف المناطق في حدوث التغيرات الوراثي لتسلسل الجينات في DNA الماييتوكونديريا mtDNA لقارتي أوروبا وآسيا من خلال تحليل النشوء والتطور لأصل الحشرة وهذه الجينات 16S , COI , ND5 من نحل العسل التركي *Apis mellifera anatolica* لعينات جمعت من مناطق مختلفة من مركز الاناضول؛ ولدراسة الجينات المذكورة أخذت 15 عينة من شغالات نحل العسل لعشرة مناطق مختلفة ، وبعد إجراء التضخيم بواسطة الـ PCR وبمقارنة تسلسلات الدنا لهذه العينات مع بنك الجينات وجد ان 85% من العينات المجموعة عائدة للنوع الاول وهو يعود الى الخط التطوري (A) العائد لجنوب و وسط افريقيا .

وفي دراسة أخرى قام البراقي وآخرون (2009) بأخذ عينات من بعض محافظات سوريا المختلفة ودرست ثلاثة مواقع على الـ DNA الخاص بهذه العينات متمثلة بالمنطقة الواقعة بين جيني الأوكسيديز 1 و 2 (CoI - CoII) ، وجين الساييتوكروم ب (Cyt B) ، والمنطقة الخاصة بالجين المشفر للـ VD6 ، إذ قاموا بإجراء استخلاص الدنا وترحيله على هلام ألكاروز وإجراء تسلسل للأنماط الأحادية المسجلة في سلالة النحل السوري ، *Apis mellifera syriaca* إذ أظهرت عينات النحل السوري ثلاثة أنواع من الأنماط الشكلية Polymorphisms هي النمط Q و PQ و PQQ إن النمط الأول Q هو نمط خاص بالخط التطوري C في حين أن النمطين الثاني PQ ، والثالث PQQ خاصين بالخط التطوري A ، و بالتالي فإنّ النحل السوري يعود إلى الخطين التطوريين A الخاص بالمنطقة الإفريقية و الخط C لمنطقة شمال البحر المتوسط ، من ناحية أخرى

اجرى كل من Crozier و Crozier (1993) عددا من الدراسات الوراثية الجزيئية على نحل العسل، حيث بيّنوا أنّ التسلسل الكامل لدنا الماييتوكوندرى لنحل العسل *Apis mellifera* هو 16.343 bp من التسلسلات الطويلة ، وايضا إنّ الشفرة Codon لتسلسلات البروتين في نحل العسل تشفر لتسلسلات مشابهة في ذبابة الفاكهة ولكن عكس الشفرة Anticodons تكون مختلفة في كلا الحشرتين ؛ وايضا بين Ozdil و Ilhan (2012) إنّ التغيرات أو الاختلاف في تسلسلات الحامض النووي الماييتوكوندرى يمكن أن يستخدم في ايجاد العلاقات التطورية بين سلالات نحل العسل والاستدلال عليها ، في هذه الدراسة قام الباحثان بالكشف عن الجين ND5 من دنا الماييتوكوندرى ، وذلك بإخذ 93 عينة من نحل العسل اخذت من مجموعات سكانية مختلفة إذ كان لهذه الدراسة الفضل في توسيع المعرفة حول جين الـ ND5 كونها تعد أول دراسة عملت على تحليل شامل لتسلسل المنطقة ND5 لـ mtDNA في نحل العسل التركي ؛ كما بين Nedic وآخرون (2009) الخصائص الوراثية الجزيئية لنحل العسل في صربيا بالتعرف على تسلسل المنطقة الجينية COII-COI من الحامض النووي الماييتوكوندرى لنحل العسل لاربعة مناطق في صربيا ، وأجريت عمليات تحليل لتسلسل الحمض النووي الماييتوكوندرى في نحل العسل الصربي ؛ ومن الدراسات الأخرى في مجال الوراثة الجزيئية لنحل العسل هي الدراسة التي اجراها Alattal وآخرون (2014) في المملكة العربية السعودية ، التي اثبتت أنّ المؤشرات الوراثية والمرفولوجية هي أدوات قوية وشائعة في التعرف والتمييز بين الخصائص العامة لسلالات نحل العسل في المملكة العربية السعودية بعد إجراء تحليل تسلسل للمنطقة COII-COI من mtDNA لنحل العسل إذ اظهر تحليل التسلسل إنّ جميع النسخ المتنوعة تنتمي الى الخط التطوري O وقريبة جدا الى سلالة النحل السوري في بنك الجينات NCBI ومع ذلك وجد اثنين من النسخ المتنوعة تنتمي الي الخط التطوري A بالرغم من عدم وجود بيانات وراثية مجهزة مسبقا في بنك الجينات في السعودية واليمن وعمان لاغراض المقارنة مع نتائج البحث وهذا التنوع الوراثي العالي في المنطقة COII-

mtDNA COI يشير الى الاختلافات المرفولوجية الواضحة في سلالات نحل العسل في المملكة العربية السعودية الذي يمثل اكثر من سلالة نحل عسل متميزة في شبه الجزيرة .

و لقد أجرى Barr (2009) دراسات تحليل التسلسلات التتابعية للقواعد النتروجينية في عينات مختبرية من جامعة بنسلفانيا في الولايات المتحدة لذبابه فاكهة البحر المتوسط لكل من الجينات ND4 و ND5 و COI من الدنا المايكروكوندري ، إذ أكد أهمية هذه الطريقة في استكشاف التغيرات الوراثية واعتبرها أكثر فعالية من طريقة PCR-RFLP

2-5-2-5 التشخيص بالأعتماد على المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه

The identification depending on the geometricmorphometric of wing
لقد استخدم شكل الجناح للحشرات في العديد من الدراسات لوصف الاختلافات بين الانواع والسكان وذلك بإستخدام تركيب الحجم و الشكل الهندسي للجناح morphometrics (Sendaydiego وآخرون، 2013) .

إنّ المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه Geometric Morphometric هو العلم الذي يهتم بدراسة التحليل الكمي لشكل وحجم جميع الكائنات الحية وخاصة تحليل سجلها الاحفوري وتأثير التغيرات المتطورة والحديثة على هيئة الشكل وكذلك الأختلافات التي توجد بين كل العوامل البيئية من جهة وشكل الكائن الحي من جهة أخرى ، وأيضا القياس الهندسي المضهري يعرف بأنه مجموعة من طرائق التحليلات للمتغيرات من إحداثيات المعالم التي تصف التكوين الشكلي للكائنات الحية من فضاء الشكل والذي يتحقق بواسطة مجموعة من التقنيات الجبرية المختصة (Gomeh وآخرون ، 2016).

أن فإنّ استخدام المقياس الهندسي يشير و بشكل واضح الى التحليل الكمي لأنواع الكائنات الحية وهو مفهوم يشمل الشكل و الحجم المتري معا ، وكذلك له اهمية كبيرة في دراسة تغايرات الشكل الناتجة عن تأثير عوامل البيئة فضلاً عن استخدامه في تقدير المؤشرات الكمية وقياس الصفات التطورية مثل المقياس الهندسي الوراثي الذي يقيس تطور الجنين ، وقد يستخدم في مثل هذا النوع من الدراسات للعديد من المقاييس منها المقياس الهندسي التقليدي وهو نوع من المقاييس الهندسية الذي يقوم بتحليل الطول والعرض والنسب والزوايا (Marcus، 1990) . إذ أنّ بيانات الشكل المظهري بصورة عامة هي قياسات للحجم ، ولكن من عيوب استخدام قياسات الحجم هو ترابط معظم الأعضاء الى حد كبير ونتيجة لذلك فإنّ عدد المتغيرات المستقلة يكون قليلاً جداً على الرغم من القيام بالعديد من القياسات (Shakumbila، 2014) ، ومن المقاييس الاخرى وهو المعتمد على المخطط وهو من المقاييس المتفوقة بدرجة كبيرة على المقاييس الهندسية التقليدية الأخرى ، كذلك فإنّه يعدّ البديل الجزيئي الذي يكون مفيد في الدراسات الخاصة بوصف، أو تمثيل الأنواع في المجتمعات السكانية للكائنات الحية الأخرى (Bookstein، 1991؛ Rohlf و Marcus، 1993؛ Bookstein ، 1997؛ Adams وآخرون، 2004) . ومن الأمثلة على استخدام هذا النوع من المقاييس الهندسية هو استخدامه في دراسة التباين المظهري لبعض الأنواع من النحل المرتبطة ارتباطاً وثيقاً والعائدة الى أجناس قبيلة النحل *Euglossine bees* (Roubik ، 2004) . اما النوع الثاني من المقاييس الهندسية المستخدمة هو المقياس الهندسي المعتمد على التراكب حيث أنّ هذا النوع من المقاييس الهندسية يتم فيها مقارنة الاشكال ، وكذلك كل المعلومات غير الشكلية تزال من جميع معالم الأحداثيات اذ ان الشكل لا يتبدل ولايتغير بعمليات النقل Translation او التقييس Scaling او الدوران Rotation (Walker ، 2000) اما النوع الاخير من المقاييس وهو المستخدم في هذه الدراسة فهو المقياس الهندسي المعتمد على المعالم Landmarks-Based Geometric Morphometric وهو نوع من المقاييس الهندسية التي

تعتمد على عملية جمع المعلومات المكانية من الاحداثيات أو النقاط ، إذ أنّ هذه النقاط أو المعالم تكون بمثابة اماكن متشابهة ، وتشريحية ، و مستقلة في كل الافراد التي يجري عليها التحليل كما هو الحال في تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة في جناح اي حشرة إذ أنّ هذه التقاطعات تمثل جميع المعالم أو النقاط التي قد وضعت عليها إذ أنّ هذه النقاط تكون متشابهة في جميع النقاط المدروسة (Singleton وآخرون، 2011) .

2-5-2 الدراسات السابقة المتعلقة بإستعمال المقياس الهندسي لشكل الجناح و تركيبه للمقارنة بين المجتمعات السكانية للحشرات

استخدم المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه Geometric Morphometric في المقارنة بين المجتمعات السكانية لأي نوع من أنواع الحشرات التي يتم جمع عيناتها من مناطق جغرافية متعددة وهي دراسات قليلة جدا ، وقد أجريت العديد من الدراسات والأبحاث العلمية العالمية في مجال استخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه للعديد من الأنواع المختلفة من الحشرات ، ومنها الدراسة التي قام بها Oleksa و Tofilsk (2015). وذلك بإستعمال المقياس الهندسي Geometric Morphometric لتعرق الجناح ، إذ أجريت هذه الدراسة على سلالتين من نحل العسل للكشف عن السلالة النقية والسلالة الهجينة بإستخدام شكل الجناح ، حيث اظهرت هذه الدراسة نقاوة احدى السلالتين وهذا يكشف مدى اهمية المقياس الهندسي للكشف عن السلالات النقية والهجينة العائدة لنحلة العسل ، وكذلك أجريت دراسة بيولوجية حديثة وموسعة من قبل Francoy وآخرون (2012) حول أستخدم نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه في التمييز بالطرق المظهرية بين أنواع من النحل ينتمي لجنس النحل المسمى في مناطق تواجد بقبيلة النحل كبير الرأس (Apidae: Hymenoptera) لعدد من المناطق الأستوائية ،اذ توصلوا الى ان هناك تباينات واضحة بين أنواع هذه الحشرة من خلال التقدير الإحصائي لمعدلات التشخيص

الصحيح للأنواع بالإعتماد على شكل الجناح فقط والذي قد يعدُّ أداة تصنيفية بديلة تدل على تطابق أنواع هذه النحلة ؛ وقام Francoy وآخرون (2006).

بمقارنة شكل الجناح بين ثلاث من المجتمعات السكانية لنحلة العسل *A. mellifera* ، لعينات جمعت من أفريقيا، وإيطاليا ، وألمانيا وذلك بإستعمال تقنية Geometric Morphometric حيث لاحظوا وجود تباين ما بين هذه المجتمعات السكانية الثلاثة ، كما أجرى Jhonson وآخرون (2013) دراسة في هذا المجال على أجنحة حشرات اليعسوب الكبير Dragonfly Wings توصلوا من خلالها الى نجاح تطبيق تقنية المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه ، وعندما قاموا بجمع البيانات وتحليلها احصائياً اكدوا على أنّ هذه العينات تعود لنفس النوع ، لأنّ الجناح يكون مسطحاً والتقاطعات بين العروق الطولية والمستعرضة فيه تكون واضحة للعيان عند تثبيت المعالم Landmarks عليها؛ كما قام Sultan (2014) بدراسة على تباينات لشكل الجناح الامامي الايمن وحجمه لعينات شغالات نحل العسل التي جمعها من محافظة بغداد، وديالى، ، وتوصلوا من خلال النتائج الى عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين محافظتي بغداد وديالى في حجم وشكل الجناح أي أنّ عينات هذه المنطقتين متطابقة ؛ ومن الدراسات المهمة الأخرى في هذا المجال هي التي قام بها Dujardin وآخرون (2010) . إذ درسوا تأثير التباينات المناخية على شكل الجناح وحجمه للمجتمعات السكانية للنوع بعوضة *Aedes aegypti* في تايلند حيث استخدم المقياس الهندسي لشكل الجناح فلاحظوا وجود اختلاف في الحجم المركزي لجناح العينات الداخلة في الدراسة باختلاف اشهر السنة .

إنّ الغرض الرئيس من أي دراسة حول إستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه هو أنّ شكل الجناح يشمل التباينات الكمية الكافية لإستخدامها كمؤشر يمكن من خلاله لتمييز بين الوحدات التصنيفية العاملة في مجال دراسة الوراثة الكمية للكائنات الحية، فضلاً عن ذلك فإن شكل

الجناح هو مؤشر كمي فعّال للتمييز بين الأنواع المختلفة لجنس اي حشرة كما هو الحال بالنسبة لجنس ذبابة الفاكهة *Drosophila* (Moraes وآخرون، 2004؛ Bubliy وآخرون، 2008).

3 – المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3 – 1 المواد Materials

جدول (1) يوضح الأجهزة و المحاليل والمواد الكيميائية 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	مجهز للطاقة Power Supply	4
Denver instrument – Germany	ميزان كهربائي حساس Sensitive Electronic Balance	5
Boeco –Eufor	جهاز VI plus Vortex	6
Mummer-Germany	حمام مائي Water bath	7
Vision – Korea	Hot plate magnetic Stirrer	8
Diocom – The U. K	كابينة الأشعة فوق البنفسجية UV Cabinet	9
Geneaid – Taiwan	أنابيب أبند روف Eppendorf Tubes	10
Bio Basic – Canada	Tips	11
Dragonmed – Germany	Micropipettes	12
Passed electrical – The U . K	جهاز تصوير الجل Gel Documentation	13
Taiwan	مجهر رقمي Digital Microscope	14
LG- Korea	حاسبة Desktop	15
Labnet Edison NJ – U.S.A	جهاز البلمرة الحراري PCR (Thermal Black)	16
Sail brand - China	شرائح زجاجية Slides	17
Pakistan	طقم تشريح Dissecting Set	18
U.A.E	شريط ورق لاصق	19
Germany	دورق زجاجي مدرج Approx .500 ml	20
Germany	أنابيب زجاجية مدرجة مختلفة الأحجام	21

Safe Pack – U.S.A	Medical Gloves قفازات طبية	22
Plastilap – China	أقداح بلاستيكية ذات أغطية 100ml	23
Kardelen – Turkey	Medical Cotton قطن طبي	24
Syria	ورق (سيليفون)	25
Bio Basic INC – Canada	Micro tip short 10.01	26
Bio Basic INC – Canada	Tip rackc sterile BT 222- RS100-1000ul	27
Bio Basic INC – Canada	Eppendrof tube sterile 1.5 ml	28
Bio Basic INC – Canada	PCR rack tube	29
Bio Basic INC Canada	Rack Eppendrof 100 sample	30
Geneaid –Taiwan	Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Gs100 Prep	31
Geneaid –Taiwan	Gel / PCR Fragments Extraction Kit	32
Bio Basic INC – Canada	Agarose	33
Bio Basic – Canada	TBE – Buffer (10x)	34
Bioneer – Korea	(100 – 2000 bp) Ladder DNA (Marker)	35
Bioneer – Korea	Accupower PCR premix	36
Bioneer – Korea	Distilled water ماء مقطر 100%	37
Bioneer – Korea	Ethidium bromide	38
Bioneer – Korea	Loading dye صبغة تحميل	39
Bioneer – Korea	Specific primers بوائى متخصصة	40
Iraq	Absolute ethanol alcohol	41

3 - 1 - 1 محتويات عدة استخلاص ألد DNA .

جدول (2) يوضح محتويات Genomic DNA Mini kit (Tissue) والأصل والمنشأ .

ت	المحتويات	الأصل أو المنشأ
1	GST Buffer 200 ml	Geneaid – Taiwan
2	Proteinase K 20 ml	Geneaid – Taiwan
3	GSB Buffer 200 ml add Ethanol 200ml	Geneaid – Taiwan

Geneaid – Taiwan	W1 Buffer 400 ml	4
Geneaid – Taiwan	Wash Buffer 600ml	5
Geneaid – Taiwan	Elution Buffer 50 ml	6
Bio Basic INC- Canada	Micro pestle	7
Geneaid – Taiwan	GD Columns	8
Bio Basic INC- Canada	Collection tubes	9

3-1-2 محتويات عدة تنقية الـ DNA من الجل

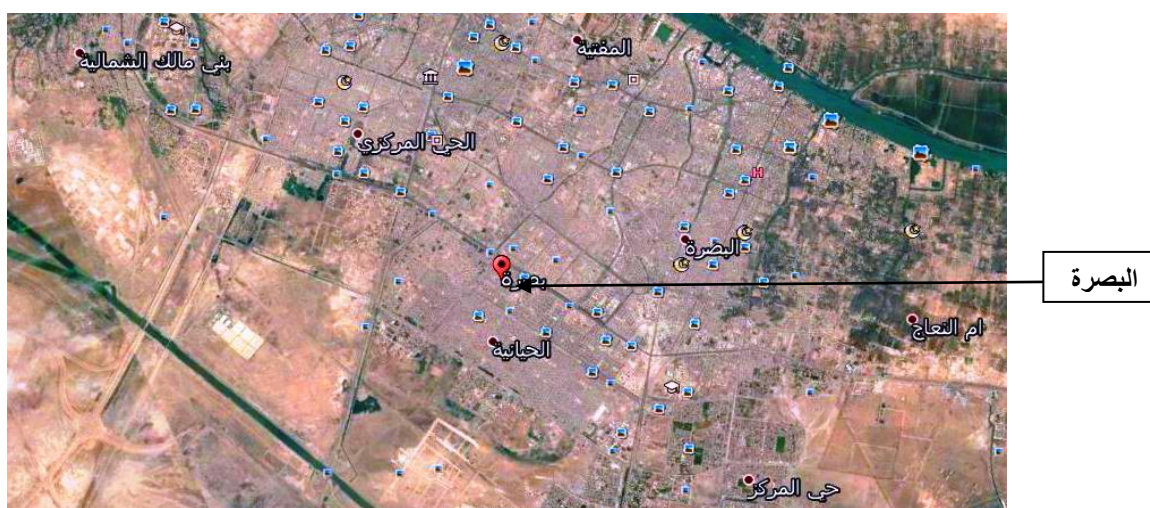
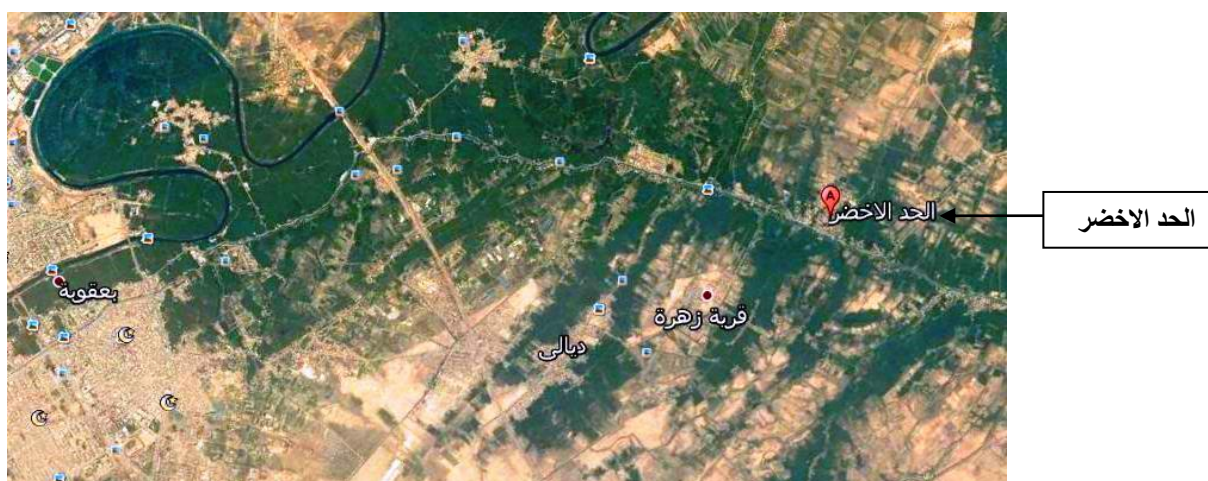
جدول (3) يوضح محتويات عدة التنقية Gel / PCR Fragments Extraction Kit
Protocol التي جهزتها شركة Bionner

ت	المحتويات	الأصل أو المنشأ
1	DF Buffer 500µl	Geneaid – Taiwan
2	W1 Buffer 400µl	Geneaid – Taiwan
3	Wash Buffer 600µl	Geneaid – Taiwan
4	Elution Buffer 40µl	Geneaid – Taiwan
5	DF Column	Geneaid – Taiwan

3-2 طرائق العمل Methods

3-2-1 جمع العينات

جمعت شغالات نحل العسل من عدد من المناحل العائدة لمناطق الجمع، اذ جمعت من الشمال السليمانية قضاء رانيا كنموذج عن المنطقة الشمالية ، محافظة ديالى ناحية الحد الاخضر ممثلا عن المجتمع السكاني للمنطقة الوسطى ومن محافظة البصرة المركز ممثلا عن عينات المنطقة الجنوبية كما موضح في شكل (4) وبواقع 50 عينة من كل منطقة وذلك خلال الفترة الزمنية 2016 /9/1 الى 2016/10 /1 وبعدها ارسلت العينات الى مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي جامعة بغداد لغرض التشخيص ، حيث اثبت التشخيص إنّ العينات المجموعة هي نحل العسل الغربي *A. mellifera* وهو المطلوب دراسته.



شكل (4) مناطق جمع عينات نحل العسل للمناطق الثلاث

(عن: WWW.googleearth.com)

3-2-2 Molecular Genetic Study الدراسة الوراثية الجزيئية

3-2-2-1 DNA Extraction استخلاص أَل DNA

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

3-2-2-2 طريقة الاستخلاص

1- أخذت المنطقة الصدرية فقط من الحشرة ووضعت في أنبوبة ابندروف حجمها 1.5 ml .

2 -أضيف 200 مايكروليتر من GST Buffer الى الأنبوبة التي تحتوي على المنطقة

الصدرية للحشرة، وسحقت الحشرة جيداً باستخدام Micropisstel .

3- بعد سحق المنطقة الصدرية الحشرة جيداً أُضيف إليها 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 $60^{\circ}C$ لمدة 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 أُستخرجت الأنبوبة من الجهاز وسحب السائل منها فقط ، ثم

وضع في أنبوبة ابندروف جديدة بواسطة أَل Micropipette وتركب الأنبوبة القديمة .

6- أضيف 200 مايكروليتر من GSB Buffer الى الأنبوبة الجديدة وترج لمدة 10 ثواني مع

اضافة 200 مايكروليتر من الكحول المطلق لترسيب أَل 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 الإنتهاء من عملية الطرد المركزي ، تمَّ إخراج الأنبوبة واخذ منها الفلتر فقط ووضع في أنبوبة GD Column جديدة .

9- أُضيف 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 الإنتهاء من عملية الطرد المركزي تمَّ التخلص من السائل الذي يتجمع أسفل فلتر الترشيح داخل الانبوبة ، بعد ذلك أُضيف 600 مايكروليتر من Wash Buffer إليها ووضعت في جهاز الطرد المركزي مرة أخرى بسرعة 14000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة وبعدها تتم اعادتها في جهاز الطرد المركزي ولمدة 3 دقائق لغرض التجفيف .

11- بعد انتهاء عملية التجفيف اخذ فلتر الترشيح فقط ووضع في انبوبة ابندروف جديدة .

12 - حضر 50 مايكروليتر من Elution Buffer لكل عينة ووضعها في أنبوبة الابندروف ، و تمّ توضع في حمام مائي ، إذ نضيف 50 مايكروليتر من Elution Buffer الى أنبوبة الابندروف الحاوية على فلتر الترشيح وتترك لمدة 3 دقائق ، وبعد ذلك وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000/ دورة الدقيقة ولمدة دقيقة واحدة فقط .

13 - إخراج الأنبوبة من الجهاز بعد الانتهاء من عملية الطرد المركزي ، إذ لوحظ ترسب ألد DNA فيها بشكل مادة جيلاتينية عديمة اللون، بعد ذلك اجري الترحيل الكهربائي لـ DNA

المستخلص على هلام الاكاروز للتأكد من وجوده الدنا المستخلص، بعد ذلك يحفظ في الثلاجة في درجة حرارة -4 م° لحين استخدامه في تضخيم الجينات المستخدمة في هذه الدراسة .

3-2-2-3 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 انبوبة زجاجية مدرجة 500 مل، بعد ذلك أكمل الحجم بإضافة 50 مل من محلول TBE Buffer 10 X بواسطة أنبوبة زجاجية حجمها 50 مل.

3 - اخذ 100 مل من الخليط بواسطة أنبوبة زجاجية مدرجة ؛ وأضيف الى الدورق الزجاجي الذي يحتوي على الأكاروز، ثم وضع الدورق بالمحتويات بعد رجه باليد لمدة 10 ثواني على جهاز الأذابة آل Hot Plate Stirrer بدرجة حرارة 100م°، إذ غطت فوهة الدورق بورق السيليفون لمنع التبخر أثناء التسخين واستمرت عملية اذابة الجل الى أن أصبح السائل صافي جدا بدون فقاعات .

4 - ترك الهلام المذاب ليبرد الى درجة حرارة من 40-50 م° بعد ذلك أضيف الى الدورق 5 مايكروليتر من صبغة Ethidium bromide ، ثم حضر الحوض المعد لصب الهلام تلاه سكب الهلام 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 أن تصلب الهلام تم رفع المشط منه ، ثم رفع الهلام من حوض الصب برفق وعناية تامة ووضع في حوض جهاز الترحيل الكهربائي الذي تم غمره بمحلول TBE بقوة 1 X .

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 الهلام 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 الهلام .

11- رفع الهلام بعناية من حوض جهاز الترحيل الكهربائي ووضع على جهاز الأشعة فوق

البنفسجية U.V لمشاهدة حزم أل- DNA وتقدير حجمها بعد اطفاء الاضاءة لمشاهدة توهج الحزم

بشكل أفضل (الصالح، 2007) .

3-2-2-4 تفاعلات أنزيم البلمرة المتسلسل المتخصص Specific - PCR

طبقت هذه التقنية باتباع الخطوات الاتية :

3-2-2-4 A- استخدام ثلاثة بواى متخصصة وهي

(ND5 Gene، COI Gene ،16 Sr DND Gene) تقوم بترتيب القواعد النتروجينية

بتسلسل محدد و التي صنعتها شركة Bioneer – Korea

جدول (4) يبين البواى المستخدمة في الدراسة وتسلسلاتها

No	Primer Name	Primer Sequences	Band size
1	16 Sr DND Gene	"F- 5"- CAACATCGAGGTCGCAAACATC-3 "R- 5"-GTACCTTTT GTATCAGGGTTGA-3	950 bp
2	COI Gene	"F- 5"-GATTACTTCCTC CCTCATTA-3 "R- 5"-AATCTGGATAGTCTGAATAA-3	1000 bp
3	ND5 Gene	"F- 5"-TCGAAATGAATAGGATACAG-3 "R- 5"- GGTGAGATGGTTTAGGATT-3	800bp

3-2-2-4 B- طريقة العمل :

جدول (5) يبين مكونات خليط التفاعل الرئيس

Final Concentration	Volume for 1 Tube	Materials Concentration Manufacturer
-----	6 µL	D. Water
X1	5 µL	Acc power PCR PrmiX
Pmol10	2 µL	Primer – F (10 PMol)
Pmol10	2 µL	Primer – R (10 Pmol)
	15 µL	Total reaction Volume

2 - وزع الخليط على 9 أنابيب معقمة حجمها 0.5 مل ومؤشر عليها بحسب عينات المناطق

الثلاث المراد دراستها وبواقع 15 مل من الخليط لكل أنبوبة .

3 - أضيف 5 مل من ألد DNA لكل عينة في الأنبوبة المخصصة لها و وزع خليط التفاعل

على الأنابيب قبل إضافة ألد DNA لتجنب التلوث .

4- وضعت الأنابيب في جهاز البلمرة الحراري Thermo cycler وأجريت الخطوات كما في

الجدول 6 و 7 .

جدول (6) يوضح ظروف تفاعل PCR – Specific – Gene DND 16S r and COI

استناد الى. (Ozdil وآخرون (2012) و Bouga وآخرون (2005).

NO	Step	Temperature °c	Time
1	Initial Denaturation	94	4 min
2	Denaturtion	94	1 min
3	Primer Annealing	55	1 min
4	Primer Extension	72	2 min
5	Final Extension	72	15min
	No, of cycles (2- 4)	35	

جدول (7) يوضح ظروف تفاعل PCR – Specific – ND5 استنادا الى Ozdil وآخرون

(2012)

NO	Step	Temperature °c	Time
1	Initial Denaturation	94	4 min
2	Denaturtion	94	1 min
3	Primer Annealing	50	1 min
4	Primer Extension	72	2 min
5	Final Extension	72	15 min
	No, of cycles (2- 4)	35	

3-2-2-4 C الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis لخليط تفاعل آل PCR

- 1 - حضر الهلام باضافة 1غم من هلام الاكاروز بعد قياسه بميزان كهربائي حساس الى 100 مل من TBE Buffer بقوة 1X في ورق زجاجي مدرج حجمه 500 مل ،ثم وضع على جهاز التسخين Hotplate stirrer ووضع غطاء من ورق السليكون على فوهة الدورق لمنع التبخر وبدرجة حرارة 100 م ° الى حين اكتمال الإذابة وصفاء الخليط الى درجة عالية جداً يتم التخلص من المواد غير الذائبة ، و أي فقاعات فيه ثم يترك ليبرد الى درجة حرارة من 40 م ° - 50 م °
- 2- أضيف 5 مل من صبغة Ethidium bromide الى الهلام الموجودة في الدورق الزجاجي مع الرج المباشر للمكونات ولمدة عشرة ثواني .
- 3- تهيئة حوض صب الهلام وذلك بوضع المشط فيه قبل سكب الهلام لعمل حفر توضع فيها العينات .
- 4- سكب الهلام 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 TBE Buffer 10X الى 450 مل من الماء المقطر .

6 - رفع المشط من الهلام بعد تصلبه في قالب الصب برفق ثم نقل الهلام بعناية تامة ورفق الى حوض جهاز الترحيل الكهربائي .

7 - وضع DNA Ladder في الحفرة الأولى والأخيرة من الهلام بحجم 7 مل لغرض المقارنة، ثم حملت 7 مل من كل عينة في بقية الحفر أي كل عينة في حفرة وبحسب التسلسل والترقيم المعطى لكل واحدة منها .

8 - وصلت أقطاب التيار الكهربائي بجهاز الترحيل وجهاز بقوة 100 فولت ولمدة 90 دقيقة، وبعد اكتمال الوقت المحدد لعملية الترحيل تم رفع الهلام برفق من جهاز الترحيل ووضع على سطح جهاز تصوير الهلام Gel documentation لغرض التصوير والتأكد من وجود حزم الجينات المضخمة .

5-2-2-3 تحليل النتائج Data Analysis

حُسب الوزن الجزيئي MW باستعمال برامج الحاسوب ، وهو برنامج كشف صور الحزم الناتجة من تفاعل الـ PCR ومقارنتها بالحجم المعروف لحزم مؤشر الدنا DNA Ladder الذي يشمل 13 حزمة من 100 الى 2000bp .

6-2-2-3 التسلسل التتابعي للدنا DNA Sequencing

تجري عمليات التنقية لنتائج تفاعل الـ PCR المحتوي على الجين المطلوب دراسته وذلك حسب عدة التنقية (Gel / PCR Fragments Extraction Kit Protocol) التي جهزتها شركة Bionner .

طريقة العمل

1 - قطع 300mg من الهلام لنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR والذي يحتوي على الحزم العائدة للجينين COI و ND5 ثم وضع في انبوبة ابندروف 1.5 مل .

2 - أضيف 500 مل من DF Buffer إلى الأنبوبة المحتوية على الهلام وبعد ذلك وضعت الأنبوبة في جهاز الرجاء Vortex لكي يذوب الهلام تماما .

3 - وضعت الأنبوبة بعد ذلك في حمام مائي وبدرجة حرارة 60 ° م ولمدة 15 دقيقة .

4 - بعد الانتهاء من التحضين نقلت محتويات الأنبوبة الى انبوبة DF Column وهذه الأنبوبة تحتوي على فلتر حجمه 2مل وموجود ضمن محتويات العدة الدقيقة .

5 - بعد ذلك وضعت انبوبة DF Column في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 14000 في الدقيقة ولمدة نصف دقيقة .

6 - بعد الانتهاء من عملية الطرد المركزي اخذ الفلتر ووضعه في انبوبة DF Column جديدة واضيف اليها 400 مل من محلول W1 Buffer ، ومن ثم عمل طرد مركزي لها وبسرعة 14000 دورة في الدقيقة ولمدة نصف دقيقة .

7 - تركت انبوبة DF Column واخذ الفلتر منها ووضع في انبوبة DF Column جديدة واضيف اليها 600 مل من Wash Buffer ، وتركت الأنبوبة لمدة دقيقة واحدة وبعد ذلك عمل لها طرد مركزي وبسرعة 14000 دورة في الدقيقة ولمدة ثلاثة دقائق .

8 - تركت انبوبة DF Column واخذ الفلتر منها ووضع في انبوبة ابندروف واضيف اليها 50مل من Elution Buffer وتركت الأنبوبة لمدة خمس دقائق وبعد ذلك عمل لها طرد مركزي وبسرعة 14000 دورة في الدقيقة ولمدة دقيقتين وفي هذه المرحلة حصل على دنا نقي لكلا الجينين COI و ND5 ؛ و عند الانتهاء من عملية تنقية ناتج تفاعل البلمرة التسلسلي المحتوي على الجين المطلوب ايجاد تسلسل القواعد النتروجينية له ارسلت عينات الدنا الى شركة Bioneer في كوريا الشمالية وذلك لعمل التسلسل التتابعي للقواعد النتروجينية للجين COI و ND5 .

3-2-3 Quantitative Genetic Study الدراسة الوراثية الكمية

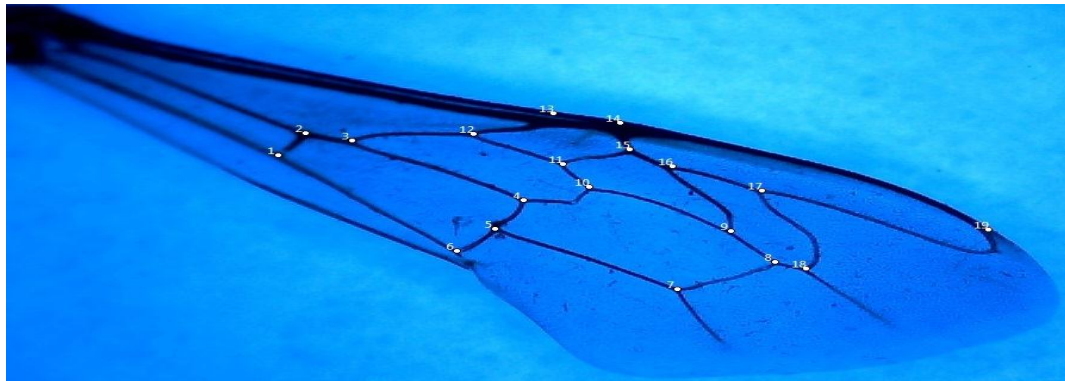
3-2-3-1 Specimens Processing تحضير العينات

لقد استخدم في هذه الدراسة 15 جناح امامي ايمن لشغالات نحلة العسل والتي جمعت من مناطق الدراسة الثلاثة وذلك لغرض دراسة التبايرات الوراثية الكمية في شكل وحجم جناح الحشرة في هذه المناطق والتميز بين المجتمعات السكانية للحشرة بشكل واضح بإستعمال نظام المقياس الهندسي للشكل المظهري للجناح Geometric Morphometric ، إذ اتبعت طريقة القرةغولي (2013) في تحضير الشرائح الزجاجية للأجنحة ، إذ تم عزل 15 نحلة من كل منطقة وتركزت بدون تغذية لأجل هلاكها وجفافها بشكل جيد ، بعد ذلك تمّ نزع الجناح الامامي 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 ، وكتب اسم المنطقة التي جمعت منها العينة على طرفي الشريحة لكل نموذج ، بعد الانتهاء من تحضير الشرائح الزجاجية كافة صورت بشكل واضح بواسطة مجهر رقمي Digital Microscope والذي ربط مع جهاز الحاسوب laptop مزودة بكاميرا رقمية قوة تكبيرها 45 X ميكا بكسل والمدعم بلاشعة فوق البنفسجية UV ، إذ صورت كافة أجنحة العينات المجموعة من المناطق الجغرافية المختلفة والمتمثلة في شمال ، وسط وجنوب العراق .

3-2-3-2 جمع البيانات Data Collecting

بعد الانتهاء من عملية تصوير الأجنحة لشغالات نحل العسل ، جمعت بيانات كل صورة على حدة بإستعمال 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 الصورة (3) ، إذ

تمّ استخدام هذه النقاط لكي نستطيع التمييز بين المجتمعات السكانية العائدة لنفس الجنس والنوع (Sultan, 2015)، استعمل في هذه الدراسة 19 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، إذ أنّ الاتصالات بين المعالم المحددة على كل جناح أعطت لنا أشكالاً مضلعة تستخدم في كثير من التحليلات، وشملت المقارنة بين شكل الجناح وحجمه لكل عينة في الدراسة لغرض الكشف عن التباين ما بين المجتمعات السكانية المختلفة لعينات النحل المدروسة، كذلك لتوضيح التباين أيضاً ضمن المجموعة السكانية الواحدة، وبعد الانتهاء من وضع أرقام الاحداثيات لكل عينة من عينات الأجنحة نقلت الى وحدة TET الموجودة ضمن البرنامج أيضاً، وهي وحدة خاصة بدمج بيانات النماذج مع بعضها البعض لكي تتم المقارنة بين المجتمعات السكانية الثلاثة لهذا النوع من النحل ومعرفة مدى التماثل والتباين بينها، بعد ذلك نقلت البيانات الى وحدة MOG وهذه الوحدة توجد ضمن البرنامج وفي هذه الدراسة تمّ الاعتماد على الحجم المركزي للجناح الامامي الأيمن للمقارنة بين المجتمعات السكانية لمناطق الدراسة، والحجم المركزي للجناح Centriod Size هو مقدار متساوي القياس من الجناح يتمّ حسابه من الجذر التربيعي لمجموع مربعات المسافات بين مركز المضلع وكل معلم من المعالم التي ثبتت على الجناح بشكل واضح ودقيق جداً (Macleod, 2009).



صورة (1) يوضح الجناح الامامي الأيمن لشغالة نحل العسل *A. mellifera* قوة التكبير (30X)

توضح الصورة (1) الجناح الامامي الأيمن لشغالة نحل العسل والنقاط هي معالم Landmarks وهي نقاط تشريحية وضعت على تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة ونهايات العروق الطولية .

3-2-3 البرمجيات Software

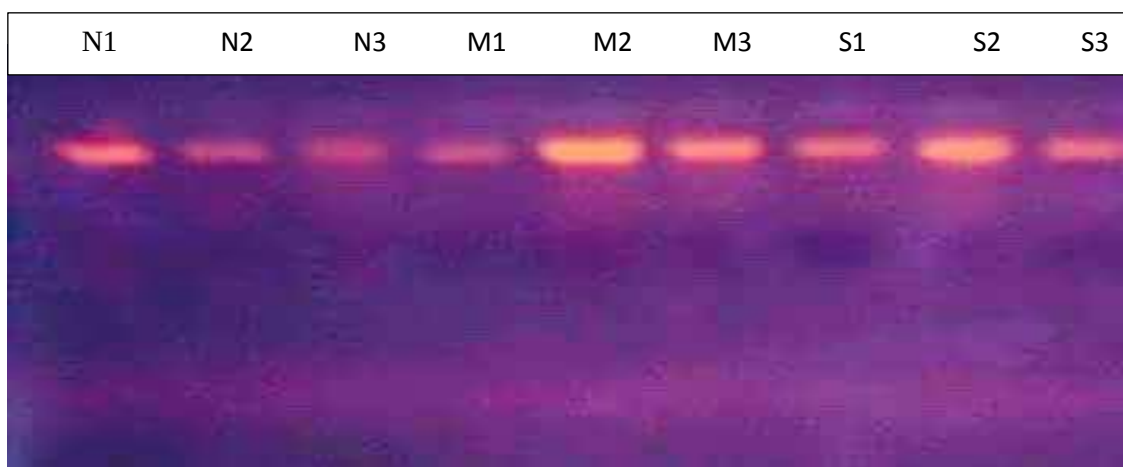
إنّ جميع البيانات التي تمّ الحصول عليها هي من وحدة COO وذلك بعد تثبيت المعالم على كل جناح ، و تشمل هذه البيانات كل من الحجم المركزي Centriod Size، أمّا البيانات الأخرى المتبقية فهي بيانات التحليل للمركبات الأساسية Principle Component Analysis والتي تمّ الحصول عليها من وحدة MOG ، أمّا بيانات التي تخصّ التحليل التمييزي Discriminate Analysis فقد تمّ الحصول عليها من وحدة PAD ، وايضاً بيانات تحليل التباين للحجم المركزي حصل عليها من وحدة COV ، وبيانات التماثل لشكل الجناح تمّ الحصول عليها من وحدة ASI . إن كل من الوحدات المذكورة توجد ضمن البرنامج الخاص بالجانب الوراثي الكمي و الجاهز وهو CLIC وهذا البرنامج يكون متاح على الموقع الالكتروني العالمي [www.mpl.ird.morphometrics//http](http://www.mpl.ird.morphometrics/) ، ولقد تمّ استخدامه في عمل تحليل لبيانات هذه الدراسة وهو التحليل العاملي للمركبات الأساسية Principle Analysis وذلك للكشف عن التباين Variation بين المجتمعات السكانية الثلاثة لنحلة العسل *A. mellifera*، فضلاً 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 .

4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4- الدراسة الوراثية الجزيئية Molecular genetic study

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

تبين صورة (2) نتائج عزل الدنا DNA من شغالات نحل العسل *A. mellifera* والتي جمعت من شمال العراق ، ووسطه ، وجنوبه ، بنقاوة عالية نسبياً ، إذا تراوحت نقاوة الدنا المعزول من العينات الشمال ، والوسط، والجنوب من 1.8 الى 2 نانومتر؛ وهذه النقاوة هي المطلوبة في تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل PCR، وتشابه هذه الطريقة بإستخلاص الدنا الطريقة التي اتبعها التميمي (2016) ، إذ استخدم في دراسته الطرق الجزيئية للكشف عن التنوع الوراثي الجيني في ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Chrysomya bezziana* إذ قام بعزل ألد DNA من ذكور وإناث الحشرة بإستخدام نفس عدة الاستخلاص إذا تراوحت نقاوة الدنا المعزول من العينات من 1.8 الى 2 نانومتر .



صورة (2) نواتج الدنا المعزول من شغالات نحل العسل *A. mellifera* والمرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1 % وفرق جهد 100 فولت ولمدة 90 دقيقة والمصور تحت الأشعة فوق البنفسجية UV بعد التصيبغ بصبغة برومايد الآثيديوم .

N1 , N2 , N3: North population of *A.mellifera* from Iraq

M1, M2 , M3: Middle population of *A.mellifera* from Iraq

S1 , S2 , S3 :South population of *A.mellifera* from Iraq

4-1-2 نتائج تضخيم الجين من 16Sr DNA الماييتوكوندرية لشغالات نحل العسل *A. mellifera*

تبين الصورة (3) ناتج تضخيم الجين 16Sr DNA من الماييتوكوندرية لشغالات نحل العسل *A. mellifera* التي جمعت من بعض المناطق وقد اظهرت نتائج التحليل أنّ الوزن الجزيئي للحزم الناتجة من عملية الترحيل الكهربائي لناتج تضخيم جين الماييتوكوندرية 16Sr DNA لشغالات نحل العسل *A. mellifera* هو 950bp زوجاً قاعدياً ، وهذا يدلّ على أنّها تعود لأصل جغرافي واحد بالرغم من أنّها جمعت من مناطق مختلفة ، حيث أنّ البعد الجغرافي بين هذه المناطق يصل إلى مئات الكيلومترات بالإضافة إلى اختلاف الظروف البيئية بينها ؛ وهذه النتائج تتفق مع نتائج الدراسة الوراثية الكمية التي درست تغاير شكل الجناح وحجمه باستخدام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح واتفقت نتيجة الترحيل الكهربائي للوزن الجزيئي لجين 16Sr DNA مع إحدى الدراسات العالمية التي التي قام بها Bouga وآخرون (2005) ؛ حيث اظهرت نتيجة التضخيم 964bp و 548 bp و كان الهدف من دراسته هو معرفة التركيب الجيني وعلاقات النشوء والتطور بين 6 مجموعات من نحل العسل إذ استندت الدراسة على ثلاث جينات 16Sr DNA ، COI و ND5 وذلك بعد أخذ العينات من مناطق مختلفة من اليونان وقبرص وباستخدام تقنية RFLP-PCR ، أي باستخدام سبعة أنواع من الإنزيمات القاطعة Sau3A I, Ssp I, Dra I, Hinc II, EcoR I, Pst, Alu I ، حيث تمّ الكشف على سبعة أنواع من النسخ المتنوعة المختلفة وتمكين أنماط التشخيص من تمييز *A. m. macedonica* عن بقية السكان.

L	N1	N2	M1	M2	S1	S2	L
---	----	----	----	----	----	----	---



صورة (3) ناتج تضخيم الجين DNA 16Sr من الماييتوكوندريا لشغالات نحل العسل

L:Ladder DNA 100–2000bp

A. mellifera

3-1-4 نتائج تضخيم الجين COI من DNA الماييتوكوندريا لشغالات نحل العسل

A. mellifera

توضح الصورة (4) ناتج تضخيم الجين COI من DNA الماييتوكوندريا لشغالات نحل العسل

A. mellifera التي جمعت من بعض مناطق شمال العراق، ووسطه، وجنوبه ، وقد اظهرت نتائج

التحليل أنّ الوزن الجزيئي للحزم الناتجة من عملية الترحيل الكهربائي لناتج تضخيم جين

المايتوكوندريا COI للشغالات هو 1000bp زوجاً قاعدياً ، ويتفق ناتج الترحيل مع عدد من

الدراسات العالمية التي أجريت في نفس المجال ولنفس جين دنا الماييتوكوندريا لشغالات هذا النوع

من نحل العسل *A. mellifera* الـ COI ؛ غلى سبيل المثال الدراسة التي أجراها البراقي و

آخرون ، (2009). الذي قام بدراسة ثلاثة مواقع من الـ DNA حيث كان أحد الجينات التي درسها

هو جين دنا الماييتوكوندريا الـ COI واستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ، إذ كانت النتائج التي

توصلوا اليها عند دراسة هذا الجين لهذه الحشرة يعود الى الخط التطوري C الذي يمثل نوع منطقة

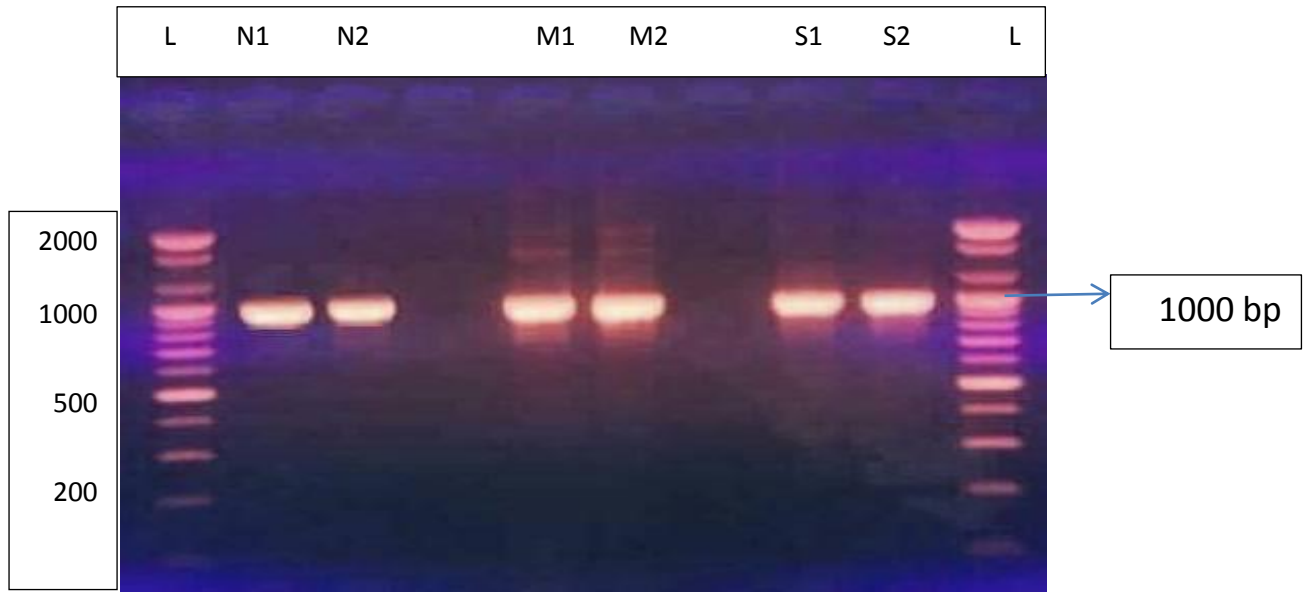
شمال البحر المتوسط ، ومن الدراسات الاخرى هي التي قام بها Alattal وآخرون (2014) في

المملكة العربية السعودية ، حيث استخدم تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل و إجراء تسلسل تتابعي

للمنطقة COI-COII من mt DNA ، حيث أظهرت نتائج تحليل التسلسل إنّ جميع النسخ

المتنوعة تنتمي الى الخط التطوري O ؛ ومن الدراسات الأخرى المشابهة تلك التي اجراها

Ozdil وآخرون (2012)، حيث إذ قام بدراسة ثلاث جينات من دنا الماييتوكوندرية 16SrDNA، COI و ND5، إذ درس 15 مجتمع مختلف لشغالات نحل العسل في تركيا باستخدام تقنية RFLP واستخدم فيها 18 نوع من إنزيمات التقيد وبعد إجراء عملية التضخيم بواسطة الـ PCR للجين المذكور، و إجراء التسلسل التتابعي ومقارنة التسلسلات الناتجة مع تسلسلات بنك الجينات وجد 6 من النسخ المتنوعة وأخيراً الدراسة التي قام بها Magnus و Szalanski (2010) على المنطقة الجينية (CoI - CoII) لـ DNA الماييتوكوندرية إذ أنها تظهر دقة عالية من التنوع الجيني، لعينات اخذت من مناطق وسط وجنوب الولايات المتحدة إذ استعمل 469 عينة من 14 دولة لمعرفة تسلسل الـ DNA حيث وجد أربعة من السلالات mitotypes من الشرق الأوسط (O).



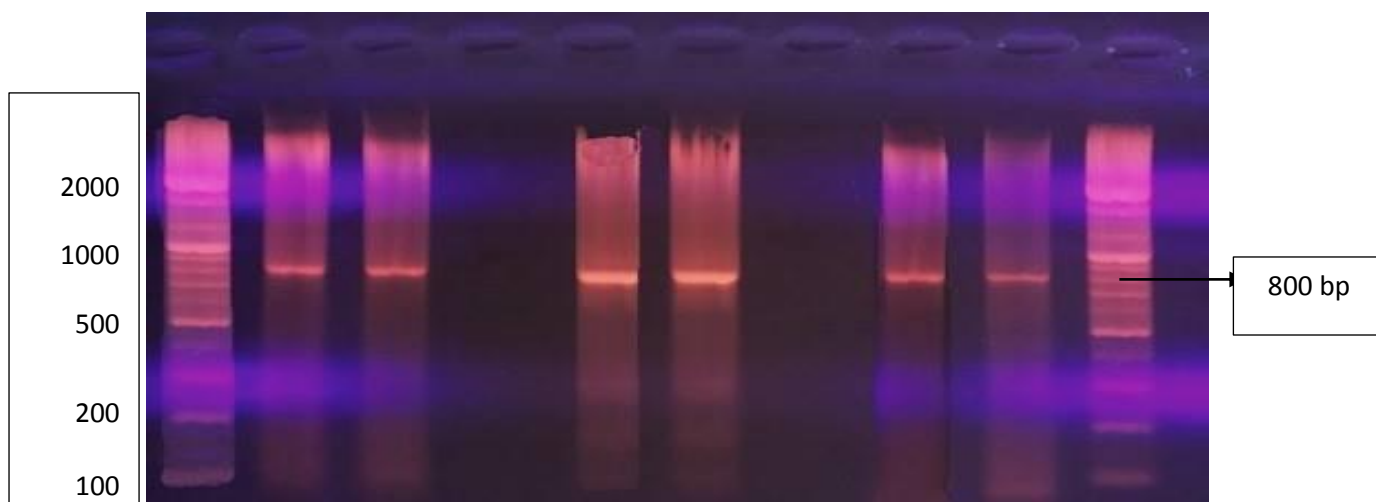
صورة (4) ناتج تضخيم الجين COI من DNA الماييتوكوندرية لشغالات نحل العسل *Apis mellifera*

4-1-4 نتائج تضخيم الجين ND5 من DNA الماييتوكوندرية لشغالات نحل العسل *Apis mellifera*

تبين الصورة (5) ناتج تضخيم الجين ND5 من DNA الماييتوكوندريا لشغالات نحل العسل *A. mellifera* التي جمعت من بعض مناطق شمال العراق، ووسطه ، وجنوبه، وقد اظهرت نتائج التحليل إنَّ الوزن الجزيئي للحزم الناتجة من عملية الترحيل الكهربائي لناتج تضخيم جين الماييتوكوندريا ND5 لشغالات نحل العسل *A. mellifera* هو 800bp زوجاً قاعدياً عند مطابقته مع الوزن الجزيئي الذي صمم على اساسه البادئ الخاص بهذا الجين بواسطة مؤشر الوزن الجزيئي Ladder DNA 100-2000bp ، وتتفق نتائج الدراسة الحالية الدراسة مع عدد من الدراسات العالمية التي أُجريت في هذا المجال ولنفس جين DNA الماييتوكوندريا لنحل العسل وهو جين ND5 ، إذ قام Ozdil و Ilhan (2012) بدراسة جين الماييتوكوندريا ND5. 93 عينة من شغالات نحل العسل من مناطق متفرقة من الاناضول ، وبعد قيامه بعمل تسلسل نيوكلوتيدي تمَّ العثور على 6 مواقع متغيرة كان متوسط المسافة الجينية بنسبة 0.3 % لجين الـ ND5 ، كما تعدُّ هذه الدراسة الاولى التي تمَّ من خلالها التعرف على التسلسل النيوكلوتيدي لجين الـ ND5 لنحل العسل في تركيا.

وفي دراسة أُخرى قام Jlyasov وآخرون (2011) على نحل العسل في روسيا، فبعدُ عملية تضخيم الدنا المستخلص بجهاز PCR قام بعمل تسلسل تتابعي للعينات المضخمة ومقارنتها مع عينات بنك الجينات إذ لاحظ وجود الخطوط التطورية الاربعة ، وايضا قام Ivanova وآخرون (2010) بدراسة ثلاث جينات تعود لدنا الماييتوكوندريا وهي COI، 16S rDNA و ND5 للكشف عن التباير الوراثي لنحلة العسل في بلغاريا ، إذ استخدم 9 مواقع مختلفة من بلغاريا ، واستعمل 4 من الانزيمات القاطعة وهي (MDH، ME، ALP and EST) لاتمام تفاعل PCR- RFLP

L	N1	N2	M1	M2	S1	S2	L
---	----	----	----	----	----	----	---



صورة (5) ناتج تضخيم الجين ND5 من DNA الماييتوكونديريا لشغالات نحل العسل
A. mellifera

4-1-5 دراسة التسلسل التتابعي للقواعد النيتروجينية

Studying of Nitrogen Bases Sequencing

تم إجراء دراسة التسلسل التتابعي للقواعد النيتروجينية لـ 18 عينة من نحلة العسل *A. mellifera* جمعت من مناطق العراق الثلاثة ، وقد استخدمت الطريقة المطولة في دراسة تسلسل القواعد النيتروجينية الجين ND5 و CO1 الموجود في دنا الماييتوكونديريا ، بالرغم من أنها تعد ذات تكلفة مادية عالية جدا الا انها تعطي نتائج دقيقة جداً بالإضافة إلى أنها تمتاز بأن لها القدرة على الكشف عن اي تسلسل تتابعي حدث فيه تغيير او طفرة حتى لو كان ذلك التغيير قد حدث في قاعدة نيتروجينية واحدة فقط دون الاعتماد في الحصول على نتائج جاهزة ، وبعد الاطلاع على ما نشر من تسلسلات القواعد النيتروجينية في البحوث والدراسات العالمية وكذلك ما نشر منها في موقع بنك الجينات العالمي الموجود في المركز الوطني لمعلومات التقانة الأحيائية الأمريكي NCBI على الانترنت كي يتم إكمال عملية المقارنة ، أو المطابقة بين نتائج دراسة التسلسل النيوكلوتيدي للعينات المدروسة وما يماثلها من عينات لنفس النوع المدروس ، بحيث لا توجد أي اختلافات بينهما على مستوى النوع وعينات المطابقة هذه توجد في بنك الجينات ، وقد

تمّ إستخراج تسلسل القواعد النتروجينية باستخدام البرنامج الجاهز لتحليل نتائج التسلسل التتابعي لقواعد الجينات والمسمى Bioedit ، ولأنّ دراسة تسلسل القواعد النتروجينية بواسطة الجهاز قد تكون في بعض الأحيان غير واضحة لدرجة كافية لذلك يتمّ أحياناً ترك جزء من التسلسل النيوكلوتيدي لطرفي المنطقة الجينية المدروسة ، إذ يتمّ قراءة ونشر جميع التسلسلات الواضحة جداً والمميزة منها فقط لتفادي حدوث أي خطأ مهما كان بسيطاً وكذلك للحصول على نتائج دقيقة جداً قدر الأمكان .

1-4-1-5 المقارنة بين مجتمعات نحل العسل *A.mellifera* من ناحية التسلسل التتابعي للجين CO1

تمّ مقارنة التسلسل التتابعي للمنطقة الجينية CO1 الموجودة في دنا الماييتوكونديريا ، والمجموعة من شمال ووسط وجنوب العراق ، ولكي نقوم بإجراء 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 *A.mellifera.N* وعينة الوسط *A.mellifera.M* ، وعينة الجنوب *A.mellifera.S* ، ويمثل شكل 5 والجدول 8 مقارنة نتائج التسلسل التتابعي بين عينات المناطق الثلاث المدروسة في تسلسل القواعد النتروجينية لجزء من الجين CO1 ، والذي طوله في الاصل 1000bp زوجاً قاعدياً ، إذ ترك بعضاً من تسلسلاته النيوكلوتيدية في طرفه الأيسر ، لأنها كانت مشوشة وغير واضحة المعالم بدرجة كافية ، إذ اخذت التسلسلات الواضحة والمميزة له بدأً من الموقع 1 الى الموقع 500 للمحافظة على دقة النتائج علاوة على تجنب الوقوع في أي خطأ ، وقد تمّ فيه توضيح نتائج التسلسل التتابعي لعينات من بعض مناطق العراق الثلاثة على التوالي اذ تبين أنّ عدد الطفرات لعينات المنطقة الشمالية من الموقع 1 الى الموقع 500 هي 117 طفرة جميعها طفرات استبدال ، أما لعينات المنطقة الوسطى فعدد

الطفرات بلغ 35 طفرة منها 21 طفرة حذف و 14 طفرة استبدال ، واخيراً لعينات المنطقة الجنوبية فعدد الطفرات 32 طفرة منها 24 طفرة حذف و 8 طفرة استبدال ، ونتيجة لمقارنة عينة الشمال مع عينة الجنوب خلال هذا العدد من الطفرات في المواقع النيوكليوتيدية لوحظ وجود تباعد كبير في هذا الجين وذلك لزيادة عدد المواقع النيوكليوتيدية المستخدمة للمقارنة بين العينتين إذ وجد أنّ عدد الطفرات في عينة الشمال عددها اكبر من ناحية العدد إذ بلغ عددها 117 طفرة استبدال فقط ، أمّا عينة الجنوب 32 طفرة منها 24 حذف و 8 طفرة الاستبدال ، وقد يعود السبب في ذلك الى وجود تباعد كبير بين عينة الشمال والجنوب من حيث بعد المسافة الجغرافية بينهما والاختلاف الكبير في العوامل البيئية والظروف المناخية والمتمثلة بدرجة الحرارة والرطوبة النسبية ومعدل سقوط الامطار بين المنطقتين عموماً بالإضافة الى ذلك ؛ فقد يعود السبب أيضاً الى أنّ النوع أو العينات المدروسة لا تعود الى اصل جغرافي واحد أي أنّها سلالات هجينة وليست نقية، أمّا بالنسبة لطفرات الحذف والإستبدال عند مقارنة عددها ومواقع حدوثها بين منطقتي الوسط والجنوب ، فقد تقاربت النتائج كثيراً إذ أنّ عدد الطفرات لعينة الوسط 34 طفرة ، اما عينة الجنوب فحصل فيها 32 طفرة كما موضح في جدول 12 يبين مقارنة النسبة المئوية لحدوث كل نوع من الطفرات .

ان اجراء المقارنة بين عينات المناطق الثلاثة لتوضيح ومعرفة التغيرات الوراثي بينها وبالتالي الوصول الى الاسباب التي أدت لحدوث هذا التغيرات سواء كانت هذه الاسباب طبيعية ، أو مصطنعة من خلال زيادة اعداد المواقع التي بواسطتها تمت المقارنة بين مناطق الدراسة ، والمذكورة في أعلاه ، إذ أنّ إرتفاع عدد طفرات الاستبدال في عينة الشمال يرجع الى أسباب عديدة و أهمها وجود عدد كبير من الحواجز الطبيعية في المنطقة الشمالية والتي تمنع تدفق الجينات بين المجتمعات السكانية الثلاث لنحلة العسل مقارنة مع منطقتي الوسط والجنوب، فضلاً عن إختلاف الظروف البيئية فيها كإنخفاض درجة الحرارة والرطوبة النسبية والامطار اذ اخذت هذه البيانات من الهيئة العامة للأنواء الجوية والرصد الزلزالي كما مبين في جدول (9)، وقد وجد أنّ السبب المباشر

لهذا الاختلاف بين المناطق الثلاثة هو بعد المسافة بينهما إذ أنَّها تصل المسافة بين الجنوب والوسط الى 450 كم في حين أنَّ المسافة بين منطقتي الشمال والوسط لاتتجاوز 280 كم .

ومن الدراسات المشابهة التي أُجريت على المنطقة الجينية COI-COI للدنا الماييتوكوندرى و هي التي قام بها Rahimi (2015) ، إذ كان الهدف من دراسته هو معرفة التنوع الوراثي لسكان نحل العسل في جنوب إيران إذ جمعت شغالات نحل العسل من 6 مقاطعات مختلفة واستخدم تقنية PCR-RFLP بوجود الإنزيمات القاطعة Dra I تبين أنَّ نحل العسل في جنوب ايران ينتمي الى الخط التطوري C ، والنتيجة الاخرى التي تمَّ الحصول عليها لنفس الدراسة غياب التنوع الوراثي بين العينات المجموعة من جنوب ايران ؛ وكذلك الدراسة التي قام بها Nedric وآخرون (2009) للمنطقة الجينية COI-COI لدنا الماييتوكوندرى، إذ اخذت شغالات نحل العسل من اربعة مناطق مختلفة جغرافياً في صربيا وبعد اجراء عملية استخلاص الدنا الماييتوكوندرى وتضخيمه بواسطة ال PCR أظهرت نتائج التحليل المقارن الذي أُجري مع عينات من بنك الجينات وجود ارتفاعاً كبيراً في درجة التشابه تصل الى 99.4% .

جدول (8) يبين مقارنة النسبة المئوية لحدوث كل من طفرة الحذف والاستبدال التابعة لنحل العسل العراقي *A. mellifera* بين مناطق شمال ووسط وجنوب العراق .

اسم المنطقة	نوع الطفرة	عدد الطفرات	المجموع الكلي لكل تسلسل	النسبة المئوية لحدوث كل نوع من الطفرات %
N	حذف	0	500	0
	استبدال	117		23.4
M	حذف	21	500	4.2
	استبدال	14		2.3
S	حذف	24	500	4.8
	استبدال	8		1.6

(N *A. mellifera* من شمال العراق ، M *A. mellifera* من وسط العراق ، S *A. mellifera* من جنوب العراق)

جدول (9) يوضح احداثيات ومعدل درجات الحرارة و الرطوبة وكمية الامطار خلال فترة الدراسة

اسم المنطقة و الاحداثيات	معدل درجة الحرارة السنوية	معدل الرطوبة السنوية	معدل كمية الامطار السنوية
شمال العراق /السليمانية 45° 18' 38" E 34° 34 55 " N	30.23°C	%44.75	26.62cm
وسط العراق /ديالى 44° 38' 37" E 33° 44' 41" N	31.15°C	%43.33	20.29cm
جنوب العراق /البصرة 47° 49' 9" E 30° 29' 39" N	34.88°C	%37.33	5.06cm

4-1-5-2 المقارنة بين مجتمعات نحلة العسل *A.mellifera* للمجتمعات السكانية الثلاث مع

عينتين من بنك الجينات من ناحية التسلسل التتابعي للجين CO1

أجريت مقارنة التسلسل التتابعي للمنطقة الجينية CO1 الموجودة في دنا المايكوندريا mt DNA

لشغالة نحل العسل العراقية مع عينتين من بنك الجينات ، إذ بلغ طول التسلسل التتابعي المميز

والواضح لهذا الجين في هذه الدراسة حوالي 600bp زوجاً قاعدياً ، ولكي نقوم بإجراء المقارنة بين

تسلسلات عينات المجتمعات السكانية للمناطق المختارة وكذلك إجراء عملية مطابقة مع العينات

العالمية الموجودة في بنك الجينات ، ويمثل الشكل 6 مقارنة نتائج التسلسل التتابعي بين عينات

المناطق الثلاثة المدروسة وعينات بنك الجينات في تسلسل القواعد النتروجينية لجزء من الجين

CO1 والذي طوله في الاصل 1000 bp زوجاً قاعدياً ، ونظراً لأنه لا توجد دراسات سابقة حول

دراسة التسلسل التتابعي للمنطقة الجينية COI الموجودة في الدنا المايكوندري mt DNA لنحلة

العسل العراقية ، ولأنّ هذه الدراسة تعد الاولى من نوعها على المستوى المحلي لذلك استخدمت

عينتان من بنك الجينات للجين COI من دنا المايكوندريا لشغالة نحل العسل والتي وجدت في

نتائج احدى الدراسات العالمية المنشورة والمسجلة في بنك الجينات العالمي

بالتسلسل KJ396189.1 الذي تعود الى نحل العسل *A.mellifera* isolate ، والعينة الثانيةKM458618.2 التي تعود الى نحل العسل *A.mellifera intermissa* عام 2016 ؛ و عند

تتبع عينة بنك الجينات KJ396189.1 من الموقع 1 الى الموقع 600 نلاحظ ان عدد الطفرات

الكلي هو 39 طفرة تتكون من طفرتي حذف 37 استبدال ، أما عينة بنك الجينات

KM458618.2 فإنّ العدد الكلي للطفرات الحاصلة فيها 9 طفرات تتكون من طفرتي حذف و7

طفرات استبدال ، وبإجراء المقارنة بين عينة بنك الجينات KJ396189.1 مع عينات المنطقة

الشمالية من الموقع 1 الى الموقع 300 نلاحظ حدوث تطابق بين العينتين ، ما عدا بعض

المواقع التي تضمنت حدوث عدد من طفرات الحذف والاستبدال في عينة بنك الجينات وعددها 4

طفرات واحدة هي طفرة حذف وثلاث طفرات استبدال ، أما عينات المنطقة الشمالية فحدث فيها 20 طفرة منها 4 طفرات حذف و 16 طفرة استبدال ، وعند اكمال المقارنة بين العينتين من الموقع 300 الى الموقع 600 نلاحظ حدوث 34 طفرة استبدال وطفرة حذف واحدة في الموقع 586 ، أما عينات المنطقة الشمالية فنلاحظ حدوث 166 طفرة بينها 20 طفرة حذف و 146 طفرة استبدال ، وعند مقارنة عينة بنك الجينات KJ396189.1 مع عينات المنطقة الوسطى من الموقع 1 الى الموقع 300 نلاحظ إن عينة عينات المنطقة الوسطى عدد الطفرات 4 منها 3 طفرات استبدال وواحدة حذف ، وبإكمال المقارنة من الموقع 300 الى الموقع 600 نلاحظ عينة عينات المنطقة الوسطى حدث فيها 12 طفرة استبدال وبإنهاء مقارنة عينة بنك الجينات KJ396189.1 مع عينات المنطقة الجنوبية من الموقع 1 الى الموقع 300 نلاحظ عينة عينات المنطقة الجنوبية حدث فيها 4 طفرات 3 استبدال وواحدة طفرة حذف حدثت في الموقع 263 ، وعند اكمال المقارنة من الموقع 300 الى الموقع 600 لنفس العينتين تبين أن عدد الطفرات عينات المنطقة الجنوبية هو 134 طفرة منها 124 طفرة حذف و 7 طفرات استبدال .

أما عند مقارنة عينة بنك الجينات الثانية KM458618.2 مع عينات المنطقة الشمالية ، و الوسطى ، و الجنوبية من الموقع 1 الى الموقع 600 ، نلاحظ أن العدد الكلي للطفرات الحاصلة فيها 9 طفرات تتكون من طفرتي حذف و 7 طفرات إستبدال، فعند إجراء المقارنة بين عينة KM458618.2 وعينات المنطقة الشمالية من الموقع 1 الى الموقع 300 نلاحظ حدوث تطابق شبه تام بين العينتين المذكورتين عدا حدوث 4 طفرات في عينة KM458618.2 منها 3 طفرات استبدال وطفرة حذف واحدة ، أما عينات المنطقة الشمالية ايضا حدث فيها 20 طفرة منها 16 طفرة استبدال و 4 طفرات حذف ، وبإكمال المقارنة من الموقع 300 الى الموقع 600 لنفس العينتين نلاحظ حدوث 5 طفرات في عينة KM458618.2 منها 4 طفرات استبدال، وطفرة حذف واحدة اما عينات المنطقة الشمالية نلاحظ حدوث 166 طفرة بينها

20 طفرة حذف ، و 146 طفرة استبدال ، وبمقارنة عينة KM458618.2 مع عينات المنطقة الوسطى من الموقع 1 الى الموقع 300 نلاحظ أنّ عدد الطفرات في عينة المنطقة الوسطى 4 منها 3 طفرات استبدال وواحدة حذف وبإكمال المقارنة الى نهاية الموقع 600 لنفس العينتين المذكورتين نلاحظ أنّ عينات المنطقة الوسطى حدث فيها 12 طفرة استبدال ، واخيرا وبمقارنة عينة KM458618.2 من الموقع 1 الى الموقع 300 مع عينات المنطقة الجنوبية نلاحظ حدوث 4 طفرات 3 منها استبدال وطفرة واحدة حذف عينات المنطقة الجنوبية وبإكمال المقارنة الى نهاية الموقع 600 لنفس العينتين نلاحظ عدد الطفرات 134 طفرة منها 124 طفرة حذف، و 7 طفرات استبدال .

كما موضح في جدول (10) إنّ النتائج التي توصلت إليها هذه الدراسة في مجال دراسة التسلسل التتابعي للجين COI في دنا الماييتوكوندريا mt DNA لشغالة نحل العسل تتفق بشكل كبير جدا مع ما جاء في الدراسة التي قام بها Ilyasov وآخرون (2016) والتي تم من خلال 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 KJ396189.1 و KM458618.2 ، فضلاً عن أنّ الباحثين قد توصلوا في تلك الدراسة الى أنّ هناك تنوعاً وراثياً وجينياً بين المجتمعات السكانية المنفصلة جغرافياً لشغالة نحل العسل ؛ 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 فإنّ نتائج هذه الدراسة تتفق ايضا مع العديد من الدراسات السابقة التي أُجريت للتمييز بين المجتمعات السكانية لأنواع مختلفة من الحشرات التي تنتمي لرتبة غشائية الاجنحة Hymenopte من خلال دراسة التسلسل التتابعي لجين الماييتوكوندريا COI فيها ومن الدراسات الاخرى التي تتفق مع هذه الدراسة هي التي قام بها Alattal وآخرون (2014) حول دراسة

الطفرات التي تحدث في المنطقة الجينية CO1 حيث اظهر تحليل التسلسل ان جميع النسخ المتنوعة تنتمي الى الخط التطوري (O) وقريبة جدا الى سلالة النحل السوري ، وذلك بعدما قارن تسلسلات عيناته مع عينات بنك الجينات

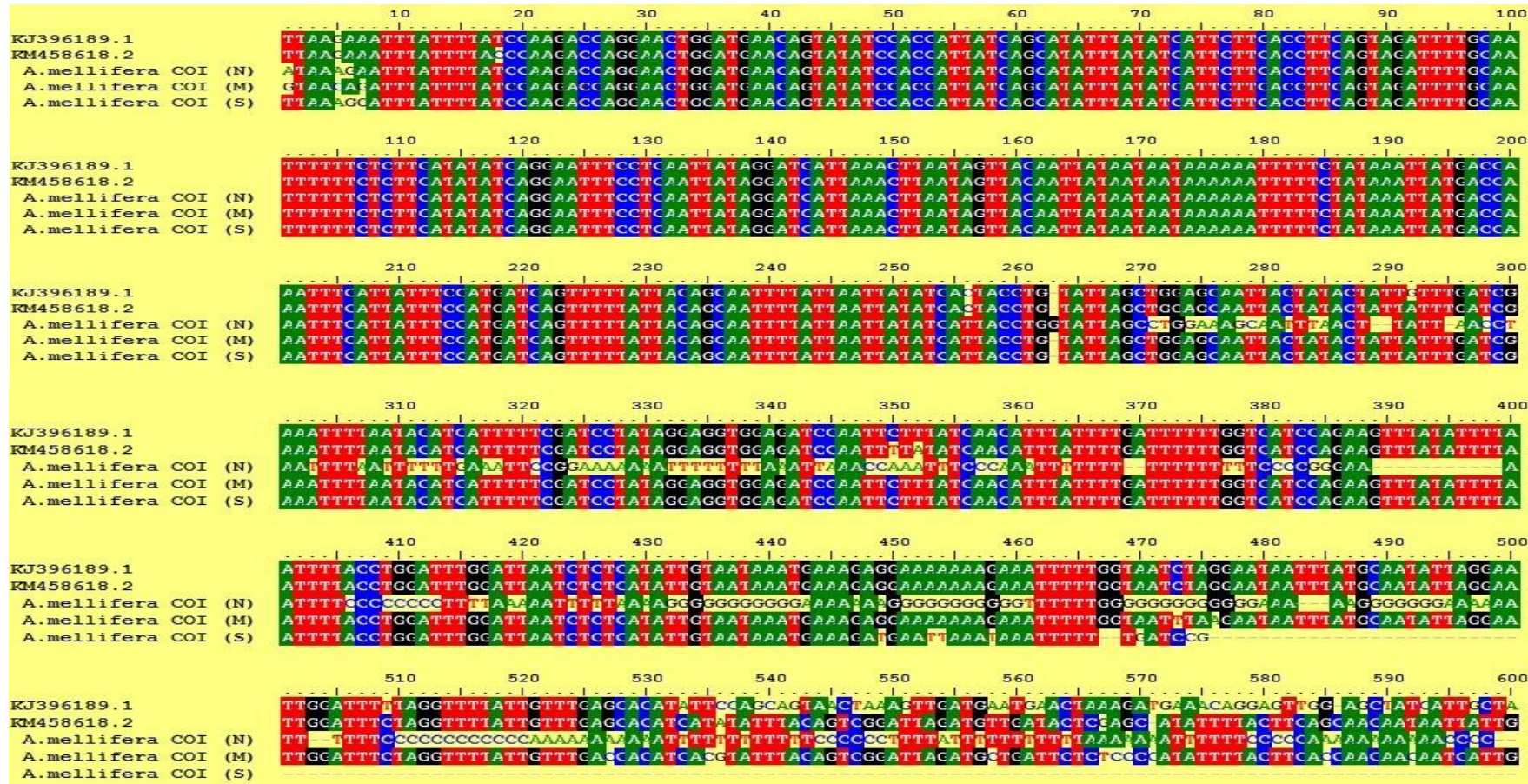
جدول (10) مقارنة النسب المئوية لحدوث كل من طفرة الحذف والاستبدال لنحلة العسل العراقية . A mellifera لمناطق شمال ووسط وجنوب العراق مع النسب المئوية لحدوث طفرات الحذف والاستبدال لعينتين من بنك الجينات وهما A.mellifera mellifera isolate وA. mellifera intermissa

اسم المنطقة	نوع الطفرة	عدد الطفرات	المجموع الكلي لكل تسلسل	النسبة المئوية لحدوث كل طفرة %
KJ396189.1	حذف	2	600	0.33
	استبدال	37		6.16
KM458618.2	حذف	2	600	0.33
	استبدال	7		1.16
N	حذف	24	600	4
	استبدال	162		27
M	حذف	1	600	0.16
	استبدال	15		2.5
S	حذف	125	600	20.83
	استبدال	10		1.66

وبحساب نسبة التطابق بين عينة بنك الجينات الاولى KJ396189.1 مع عينات المناطق الثلاثة (S,M,N) وجد ان عينة الوسط هي الاكثر تطابق مع عينة بنك الجينات ، إذ كانت نسبة التطابق بينهما 90%

$$\text{نسبة التطابق بين KJ396189.1 و M} = \frac{\text{عدد القواعد المتطابقة بين KJ396189.1 و M}}{\text{المجموع الكلي للقواعد}} * 100$$

$$90.83\% = 100 * \frac{545}{600}$$



شكل (6) مقارنة رصف القواعد النتروجينية بين المجتمعات السكانية لنحلة العسل العراقية مع عينتين من بنك الجينات لقطعة من ألدنا المايوتوكوندرى

للجين CO1 وهما *Apis mellifera mellifera* isolate و *Apis mellifera intermissa*

(نحل العسل من شمال العراق : *A. mellifera* (N) ، نحل العسل من وسط العراق : *A. mellifera* (M) ، نحل العسل من جنوب العراق : *A. mellifera* (S))

4-1-3-5 المقارنة بين مجتمعات نحل العسل *A.mellifera* للمجتمعات الثلاثة من ناحية

التسلسل التتابعي للجين ND5

تمّ مقارنة التسلسل التتابعي للجين ND5 الموجود في دنا الماييتوكوندريا mt DNA بين ثلاث مجتمعات سكانية لنحل العسل في الشمال ، والوسط ، والجنوب ، إذ تحتاج عملية المقارنة بين تسلسلات عينات المجتمعات السكانية للمناطق المختارة خلال الدراسة الى إعطاء عينة الشمال الرمز *A.mellifera. N* ، وعينة الوسط *A.mellifera.M* وعينة الجنوب *A.mellifera.S*، ويمثل الشكل (7) مقارنة نتائج التسلسل التتابعي بين عينات المناطق الثلاثة المدروسة في تسلسل القواعد النتروجينية لجزء من الجين ND5 والذي طوله في الاصل 800 bp زوجاً قاعدياً ، إذ أخذت التسلسلات الواضحة والمميزة له بدأ من الموقع 1 الى الموقع 470 للمحافظة على دقة النتائج علاوة على تجنب الوقوع في أي خطأ ، وقد تمّ فيه توضيح نتائج التسلسل التتابعي لعينات من بعض مناطق العراق الثلاثة على التوالي ، إذ تبين أنّ عدد الطفرات لعينات المنطقة الشمالية من الموقع 1 الى الموقع 470 هي 61 طفرة منها 21 طفرة حذف و 40 طفرة استبدال ، أما عينات المنطقة الوسطى فعدد الطفرات بلغ 95 طفرة منها 12 طفرة حذف، و 83 طفرة استبدال ، واخيرا عينات المنطقة الجنوبية فعدد الطفرات 57 طفرة منها 8 طفرة حذف، و 49 طفرة استبدال ونلاحظ حدوث تطابق لعينات منطقة الشمال والجنوب من الموقع 1 الى الموقع 66 وايضا نلاحظ حدوث تطابق تام ولجميع العينات من الموقع 290 الى 429، ويمكن الاستنتاج أن هناك تباعد وراثياً بين المجتمعات السكانية لنحلة العسل في المنطقتين الشمالية والوسطى، والوسطى والجنوب ، لأنّه وجد أنّ عدد طفرات الحذف والاستبدال في المنطقة الشمالية هو 60 منها 21 طفرة حذف و 39 طفرة استبدال اما منطقة الوسط فعدد الطفرات 95 طفرة منها 12 طفرة حذف و 83 طفرة استبدال ، كما موضح في الجدول 11 ، وقد يعود ذلك بالدرجة الأولى الى بعد

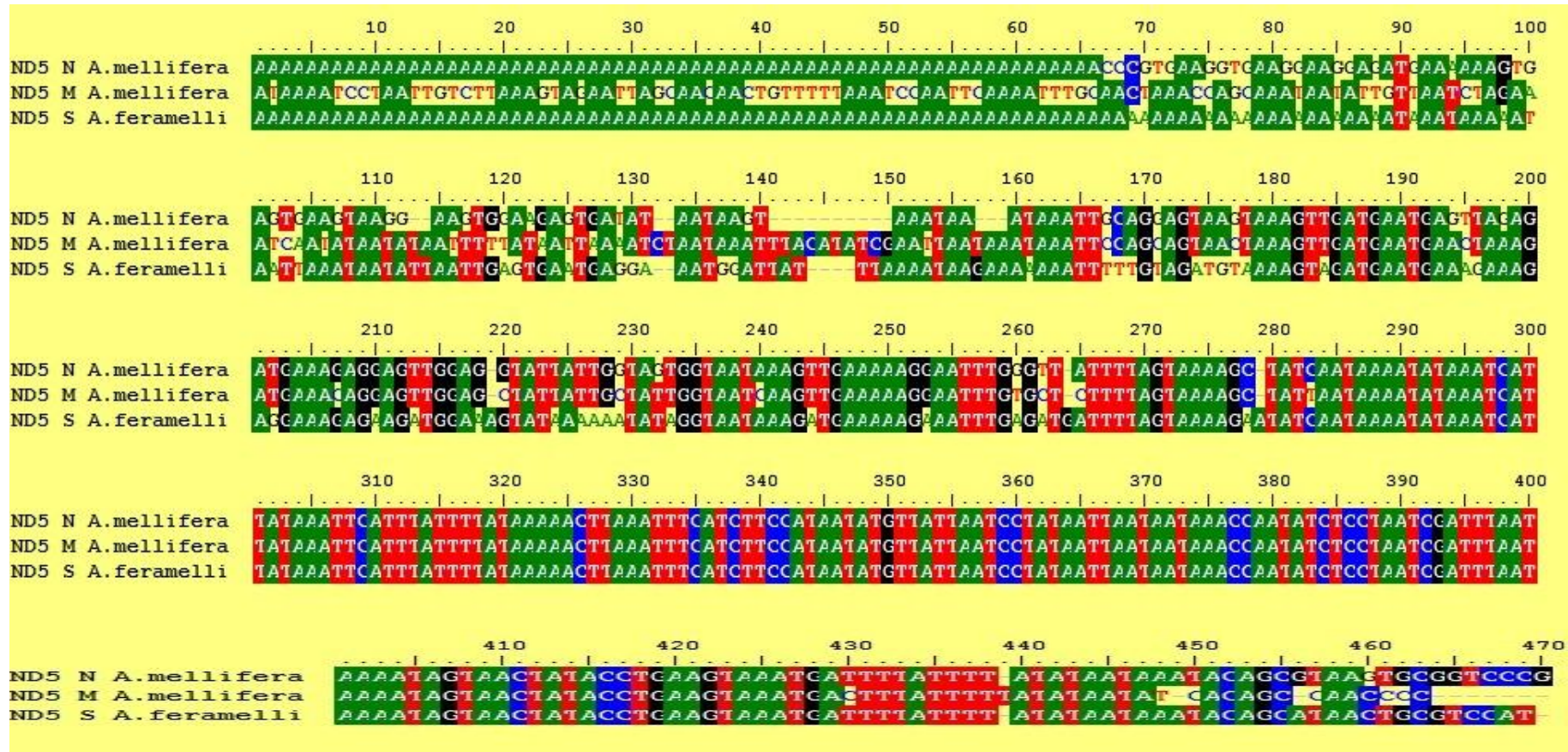
المسافة بين منطقتي الشمال والوسط من جهة والمنطقة الجنوبية من جهة أخرى ، إذ قام Martimianakis وآخرون (2011) بإجراء دراسة على نحل العسل وبالتحديد على الجين الماييتوكوندريري COI ، ND5 إذ درس المجتمع السكاني لنحل العسل في مناطق مختلفة من ألبانيا ، بلغاريا ، قبرص، اليونان، إيطاليا، سلوفينيا، تركيا، إلى جنب من سلالة نحل العسل محسنة وراثياً باستخدام تحليل تسلسل منطقتين من الميتوكوندريريا، ND5 و COI ، وكان الهدف من هذه الدراسة هو دراسة علاقات النشوء والتطور بين هذه المجموعات من النحل، والتحقق من وجود تدفق الجينات ، إذ تم الكشف عن ثمانية من النسخ المتنوعة المختلفة لـ ND5 ، وتعد هذه هي المرة الأولى التي تم الحصول على تسلسل لجزء من الجين ND5 على مستوى سكان نحل العسل لمناطق الدراسة المذكورة .

جدول (11) يبين مقارنة النسبة المئوية لحدوث كل من طفرة الحذف والاستبدال التابعة لنحل

العسل العراقي *A. mellifera* بين المناطق الثلاث

اسم المنطقة	نوع الطفرة	عدد الطفرات	المجموع الكلي لكل تسلسل	النسبة المئوية لكل نوع من الطفرات %
N	حذف	21	470	4
	استبدال	40		9
M	حذف	12	470	3
	استبدال	83		18
S	حذف	8	470	2
	استبدال	49		10

(نحل العسل من شمال العراق : *A. mellifera* N ، نحل العسل من وسط العراق : *A. mellifera* M ، نحل العسل من جنوب العراق : *A. mellifera* S)



شكل (7) مقارنة رصف القواعد النتروجينية بين المجتمعات السكانية لنحلة العسل لقطعة من ألدنا المايكوتوندي للجين ND5 لشغالة نحل العسل للمناطق الثلاث

(نحل العسل من شمال العراق : *N A.mellifera* ، نحل العسل من وسط العراق : *M A.mellifera* ، نحل العسل من جنوب العراق : *S A.mellifera*)

4-5-1-4 المقارنة بين مجتمعات نحل العسل *A.mellifera* الثلاث مع عينتين من بنك الجينات من ناحية التسلسل التتابعي للجين ND5

اجريت مقارنة التسلسل التتابعي للمنطقة الجينية ND5 الموجودة في دنا الماييتوكوندريا mt DNA لشغالة نحل العسل العراقية مع عينتين من بنك الجينات، ولكي نقوم بإجراء المقارنة بين تسلسلات عينات المجتمعات السكانية للمناطق المختارة مع عينات بنك الجينات ، ويمثل شكل 8 وجدول 12 مقارنة نتائج التسلسل التتابعي بين عينات المناطق الثلاثة المدروسة في تسلسل القواعد النتروجينية لجزء من الجين ND5 والذي طوله في الاصل 800bp زوجاً قاعدياً مع عينتين من بنك الجينات ، وتعدُّ هذه الدراسة الاولى من نوعها على المستوى المحلي لذلك استخدمت عينتان لجين الماييتوكوندريا لشغالة نحل العسل والتي وجدت في نتائج احدى الدراسات العالمية المنشورة والمسجلة في بنك الجينات العالمي بالتسلسل JN410837.1 عام 2012 و KP163643.1 عام 2016 حيث اخذت التسلسلات الواضحة والمميزة له بدءاً من الموقع 1 الى الموقع 500 للمحافظة على دقة النتائج علاوة على تجنب الوقوع في اي خطأ ، لكي نقوم بتحديد اي خط تطوري ينتمي الى نحل العسل العراقي من الخطوط التطورية العالمية الاربعة ، ويتتبع تسلسل عينة بنك الجينات الاولى من الموقع 1 الى الموقع 500 نلاحظ أنَّ عدد الطفرات الكلي هو 14 طفرة تتكون من 4 طفرات حذف و 10 طفرات استبدال اما عينة بنك الجينات الثانية 1 فإنَّ العدد الكلي للطفرات الحاصلة فيها 42 طفرة تتكون من 35 طفرة حذف، و 7 طفرات استبدال ،

اما مقارنة عينة بنك الجينات الاولى مع عينات المنطقة الشمالية من الموقع 1 الى الموقع 250 نلاحظ أنَّ عدد طفرات الحذف لعينة بنك الجينات الاولى 2 طفرة أما عدد طفرات الاستبدال هو 2 طفرة استبدال أما عدد طفرات الحذف لعينات المنطقة الشمالية لنفس الموقع هو 18 طفرة حذف أما طفرات الاستبدال فهي 90 طفرة ، أما عند اجراء المقارنة لنفس العينتين لكن

من الموقع 250 الى نهاية الموقع 500 ، فإنّ عدد الطفرات لعينة بنك الجينات الاولى هو 2 طفرة حذف و 8 طفرة استبدال اما عينات المنطقة الشمالية فان عدد طفرات الحذف 34 طفرة أما طفرات الاستبدال فوجد 13 طفرة وبذلك فإنّ مجموع عدد الطفرات الكلي لعينة المنطقة الشمالية من الموقع 1 الى الموقع 500 هو 155 منها 52 طفرة حذف، و 103 طفرة استبدال ، أما المقارنة الثانية لعينة بنك الجينات هي مقارنة عينة بنك الجينات الاولى مع عينات المنطقة الوسطى من الموقع 1 إلى الموقع 250، فإنّ عدد طفرات هو 4 منها طفرة حذف واحدة و 3 طفرات استبدال ، إماً بإنهاء المقارنة الى الموقع 500 فإنّ عدد طفراتها هو 47 منها 40 طفرة حذف، و 7 طفرات استبدال ، أما المقارنة الأخيرة فهي بين عينة بنك الجينات الاولى مع عينات المنطقة الجنوبية من الموقع 1 الى الموقع 250، فإنّ عدد طفرات الحذف هو 6 طفرات ، اما طفرات الاستبدال فهي 104 طفرة وبإكمال المقارنة الى الموقع 500 فإنّ عدد طفرات الحذف لعينة عينة بنك الجينات الاولى هو 2 طفرة يقابلها 32 طفرة حذف لعينة المنطقة الجنوبية أما طفرات الاستبدال فهو 8 طفرات يقابلها في عينة المنطقة الجنوبية 13 طفرة .

أما عينة بنك الجينات الثانية عينة بنك الجينات الثانية فإنّ العدد الكلي لعدد الطفرات الحاصلة فيها هو 42 طفرة منها 35 طفرة حذف و 7 طفرات استبدال ، والان نقوم بإجراء مقارنة لعينة عينة بنك الجينات الثانية مع التسلسل التتابعي لعينات النحل للمجتمعات الثلاثة فالمقارنة الاولى من الموقع 1 الى الموقع 250 فإنّ عدد طفرات الحذف لعينة عينة بنك الجينات الثانية هو 2 أما طفرات الاستبدال فهو 2 طفرة ، وأما عينة المنطقة الشمالية فان عدد طفرات الحذف فيها 18 طفرة اما طفرات الاستبدال فهي 90 طفرة أما عند المقارنة الى نهاية الموقع 500 فإنّ عدد طفرات الحذف لعينة بنك الجينات الثانية 3 طفرات أما طفرات الاستبدال 5 طفرات ؛ أما عينة المنطقة الشمالية فإنّ عدد طفرات الحذف 34، و أما طفرات الاستبدال فهي 13 طفرة ، إنّ مقارنة

عينة بنك الجينات الثانية مع عينة منطقة الوسط من الموقع 1 الى الموقع 250 فإنّ عدد الطفرات لعينة منطقة الوسط طفرة حذف واحدة و 3 طفرات استبدال وبإكمال المقارنة الى نهاية الموقع 500 لنفس العينتين المذكورة فإنّ عدد طفرات الحذف هو 40 طفرة ، وعدد طفرات الاستبدال فهو 7 طفرات.

وأخيراً بإكمال آخر مقارنة لعينة بنك الجينات الثانية مع عينة منطقة الوسط من الموقع 1 الى الموقع 250 فإنّ العدد الكلي لطفرات عينة الوسط هو 110 منها 6 طفرات حذف و 104 طفرة استبدال ، وعند اكمال المقارنة الى نهاية الموقع 500 فإنّ عدد طفرات الحذف لعينة الجنوب 32 طفرة مقارنة مع طفرات الاستبدال فهي 13 طفرة كما موضح في جدول 15، ممّا تقدم من عمليات مقارنة لتسلسلات من دنا الماييتوكونديريا لعينات النحل العائدة لثلاث مجتمعات سكانية مختلفة لـ جينين COI و ND5 لدنا الماييتوكونديريا مع عينتين من بنك الجينات لكل جين وهي KM458618.1، KJ396189.1 للجين COI ، KP163643.1 و JN410837.1 للجين ND5 ، إذ وجد أنّ نحل العسل العراقي يكون جامع للخطوط التطورية الاربعة وهي الخط M الخاص لغرب البحر المتوسط *A. mellifera mellifera* ، الخط A الخاص بإفريقيا *A. Mellifera intermissa* ، الخط O الخاص بالمنطقة الشرقية *A. Mellifera syriaca* وذلك حسب Ilyasov وآخرون (2016) وأخيراً الخط C لمنطقة شمال البحر المتوسط *A.mellifera haplotype 5* وذلك حسب ما اكده ، Ozdil وآخرون (2012).

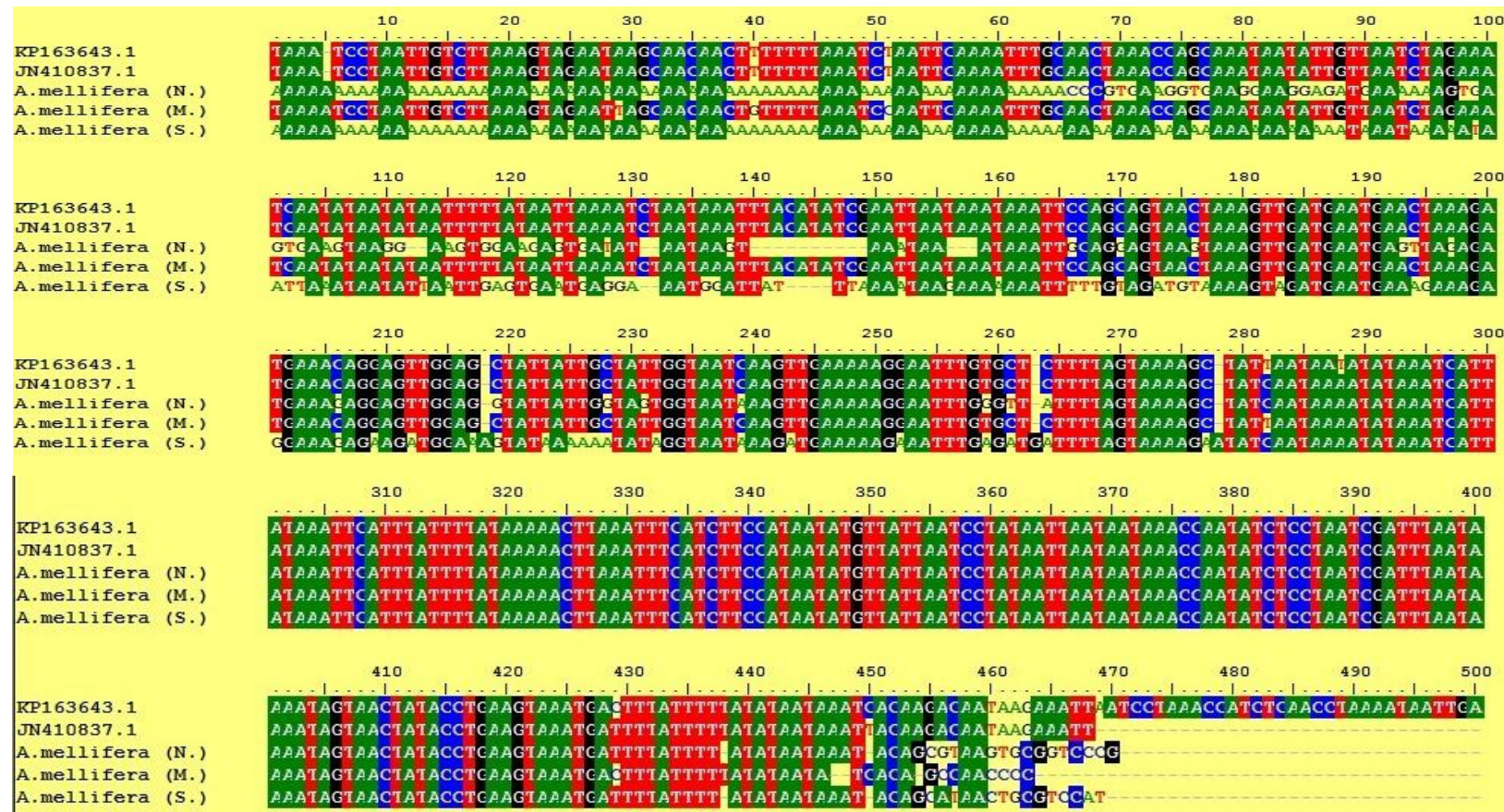
جدول (12) يبين مقارنة النسبة المئوية لحدوث كل من طفرة الحذف والاستبدال لنحل العسل العراقي *A. mellifera* مع النسب المئوية لحدوث طفرات الحذف والاستبدال لعينتين من بنك الجينات وهما الشرقية *A. mellifera syriaca* و *A. mellifera* haplotype

اسم المنطقة	نوع الطفرة	عدد الطفرات	المجموع الكلي للتسلسل	النسبة المئوية لحدوث كل طفرة %
KP163643.1	حذف	4	500	0.8
	استبدال	10		2
JN410837.1	حذف	35	500	7
	استبدال	7		1.4
N	حذف	52	500	10
	استبدال	103		21
M	حذف	41	500	8
	استبدال	10		2
S	حذف	38	500	8
	استبدال	117		23

نسبة التطابق بين عينة KP163643.1 و M = $100 * \frac{\text{عدد القواعد المتطابقة بين KP163643.1 و M}}{\text{المجموع الكلي للقواعد}}$

$$90\% = 100 * \frac{446}{500}$$

بعد تطبيق المعادلة اتضح إنَّ العينات المجموعة من الوسط هي الأكثر تطابقاً مع عينات بنك الجينات وربما يرجع ذلك الى استقرار الظروف البيئية في مناطق الوسط مقارنة مع مناطق الشمال والجنوب، إذ بلغت درجات الحرارة 31.15°C، ومعدل الامطار 43.33 cm، والرطوبة النسبية 20.29% خلال فترة جمع العينات .



شكل (8) مقارنة رصف القواعد النتروجينية بين المجتمعات السكانية لنحل العسل مع عينين من بنك الجينات لقطعة من ألدنا المايكروندري للجين ND5 اذ تمثل KP163643.1 و JN410837.1 عينات بنك الجينات لشغالة نحل العسل المجموعة من المناطق الثلاث .

(نحل العسل من شمال العراق : *A. mellifera* N ، نحل العسل من وسط العراق : *A. mellifera* M ، نحل العسل من جنوب العراق : *A. mellifera* S)

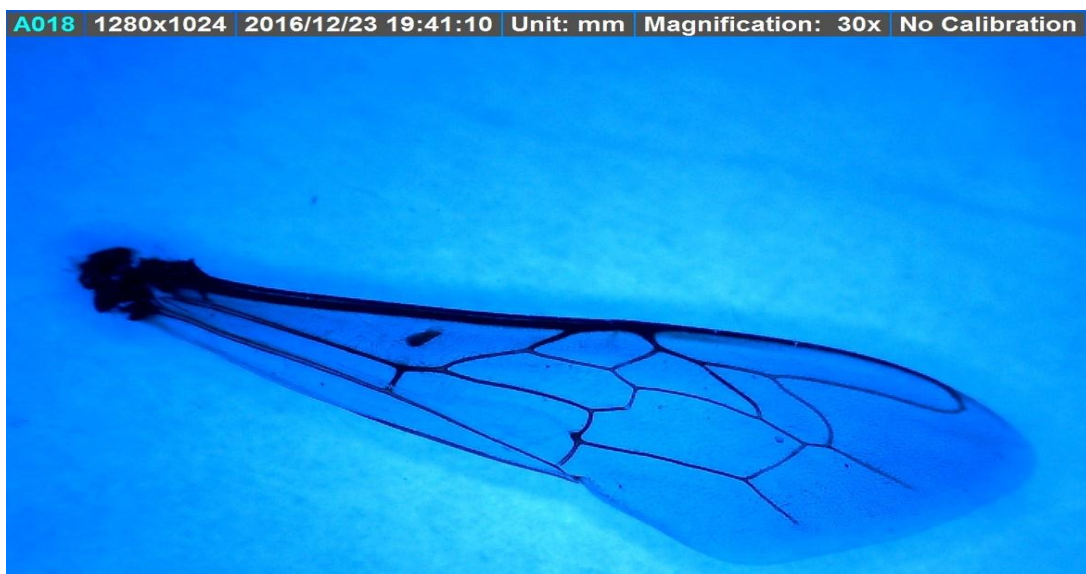
4 - 2 الدراسة الوراثية الكمية Quantitative genetic study

4 - 2 - 1 دراسة التباير الوراثي الكمي في شكل الجناح وحجمه بين ثلاثة مجتمعات سكانية

لشغالات نحل العسل *A. mellifera* بإستعمال المقياس الهندسي للشكل المظهري للجناح

Geometric Morphometric of Wing

درس تحديد التباير الوراثي الكمي لشكل وحجم الجناح الايمن لشغالات نحل العسل للعينات المجموعة من بعض مناطق شمال العراق ووسطه وجنوبه ، وذلك بإستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه ، اذ توضح صورة 6 الجناح الامامي الأيمن لاحدى عينات الماخوذة من المجتمع السكاني لشمال و وسط و جنوب العراق مثبت عليها أحداثيات المعالم بين تقاطعات العروق الطولية مع العروق المستعرضة ، ونهايات العروق الطولية و بإستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه تمّ الكشف عن التباير الوراثي الكمي بين المجتمعات السكانية للمناطق الثلاثة المدروسة بإختلاف أماكن تواجدها أعتامدا على شكل الجناح وحجمه ، إذ تمت المقارنة خلال هذه الدراسة بين شغالات نحل العسل بين المجتمعات السكانية الثلاثة بواسطة تحليل المركبات الاساسية Principal Component Analysis ، وايضا أجريت عملية مقارنة بين العينات العائدة للمجتمع السكاني الواحد في كل منطقة من المناطق الثلاثة المدروسة بواسطة التحليل التمييزي Discriminant Analysis و بالإعتماد على الحجم المركزي للجناح ؛ ومن الدراسات المشابهة و التي قام بها Depto وآخرون (2006) ، إذ قارن شكل الجناح وتركيبه بين ثلاثة مجتمعات سكانية تعود لنحلة العسل والتي جمعت عيناتها من افريقيا والمانيا وايطاليا وذلك بإستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل وتركيب الجناح ؛ حيث توصلوا الى أنّ هناك تبايراً كبيراً بين المجتمعات السكانية لنحل العسل في تلك البلدان ؛ وفي دراسة اخرى قام Shaibi وآخرون (2009)، بجمع عينات من شغالات نحل العسل من 11 مستعمرة لأربعة من المناطق الحديثة في ليبيا إذ كانت النتيجة اختلاف عينات النحل فيما بينها بشكل كبير.

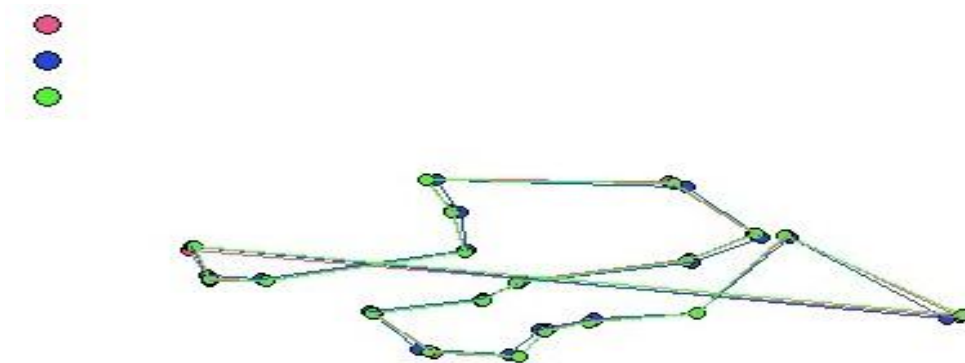


صورة (6) الجناح الامامي الايمن لشغالة نحل العسل *A.mellifera* من المجتمع السكاني لشمال و وسط و جنوب العراق ، قوة التكبير 30 X.

يوضح الشكل (9) معدل أحداثيات المعالم لـ 45 جناحاً امامي ايمن لشغالات نحل العسل ، إذ يمثل اللون الوردي معدل أحداثيات المعالم لـ 15 جناحاً امامي أيمن لشغالات نحل العسل من شمال العراق / السليمانية، واللون الازرق يمثل معدل أحداثيات المعالم لـ 15 جناحاً امامي أيمن لشغالات وسط العراق / ديالى ، اما اللون الأخضر فيمثل أحداثيات المعالم لـ 15 جناحاً امامي ايمن لشغالات التي جمعت من جنوب العراق / البصرة ، وعند إجراء المقارنة بين الأجنحة باستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه عن طريق وحدة MOG التي توجد ضمن محتويات البرنامج الجاهز وعند إجراء المقارنة بين الأجنحة الامامية اليمنى لعينات المناطق الثلاثة باستخدام نظام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح بواسطة وحدة MOG وكما هو موضح في الشكل اعلاه نلاحظ أنّ اجنحة شغالات نحل العسل ولمناطق الشمال والوسط متطابقة بدرجة كبيرة في معظم المعالم المؤشرة بإستثناء المعالم المرقمة 7 ، 13 تكون فيها غير متطابقة وايضا تكون أجنحة عينات الشمال غير متطابقة مع اجنحة عينات الجنوب في المواقع 1،7،13، 19 واخيرا اجنحة عينات الوسط تكون غير مطابقة لاجنحة عينات الجنوب في معظم المواقع وقد يعود الى عدة أسباب منها كمية الغذاء واختلاف الظروف البيئية في المناطق التي جمعت منها عينات الدراسة ، اذ بلغت درجة الحرارة لمنطقة الشمال 30.23°C ، والرطوبة 44.75%، ومعدل الامطار 26.62cm، أما منطقة الوسط فبلغت درجة الحرارة 31.15°C والرطوبة 43.33% ومعدل الامطار 20.29cm، في حين ان درجة حرارتي منطقة الجنوبية 34.88°C والرطوبة النسبية هي 37.33%، ومعدل الامطار 5.06cm .

إن نتائج الدراسة الحالية تتفق بنسبة كبيرة جدا مع نتائج الدراسة السابقة التي قام بها Sultan (2016) ، بدراسته على الشكل الهندسي لشكل الجناح وتركيبه لعينات نحل العسل التي جمعها من محافظة بغداد وديالى ، باعتمادها على الجناح الامامي الايمن و اظهرت النتائج عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين محافظتي بغداد وديالى في حجم وشكل الجناح ، 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 النحل (*Euglossa* (Latreille) والتي تنتمي الى رتبة غشائية الاجنحة Hymenoptera عائلة النحل Apidae والتي جمعت عيناتها من بلدان بنما والأكوادور بإستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه المعتمد على المخطط Outline-based morphometric ، إذ استطاع الباحث تمييز خمسة أنواع مختلفة من تلك الحشرة وهذه الأنواع هي *E.orellana*, *E.flammea*, *E.imperialis* ، *E.ignita*, *E.chalybeata* ، إذ وجدوا من خلال التحليل الأحصائي تغيراً واضحاً بين هذه الأنواع من خلال عدم تطابق بعض احداثيات المعالم المثبتة على أجنحة الحشرة وذكروا إنَّ السبب في ذلك التغير هو وجود الحواجز الطبيعية والإنعزال الجغرافي بين المجتمعات السكانية للحشرة في البلدان التي جمعت منها العينات فضلاً عن إختلاف الظروف البيئية لأماكن تواجد الحشرة في تلك البلدان .

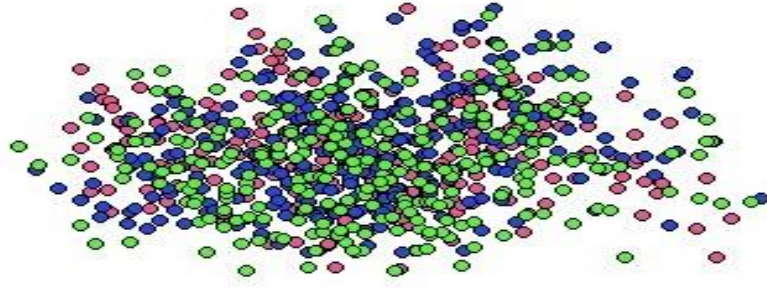


$$X = 0.373 - 0.478 \text{ ، } Y = 0.128 - 0.153$$

شكل (9) معدل احداثيات المعالم للجناح الامامي الايمن من ثلاثة مجتمعات سكانية لشغالة نحل العسل *A.mellifera* ، تشير النقاط الوردية والزرقاء والخضراء في الشكل الى المجتمعات السكانية للحشرة من الشمال والوسط والجنوب على التوالي

يوضح شكل(10) طريقة توزيع شغالات نحل العسل *A.mellifera* التي تم جمع عيناتها من بعض مناطق العراق الثلاثة وذلك عن طريق تحليل المركبات الأساسية لأحداثيات المعالم المثبتة على الأجنحة اليمنى ، إذ نلاحظ من طريقة توزيع العينات كما هو موضح في الشكل إنّ العينات القريبة من بعضها البعض وهي عينات المناطق الثلاث هي التي تعود لأصل جغرافي واحد ، و في نفس الوقت يوجد تغاير في شكل وحجم الجناح في العينات البعيدة عن بعضها البعض وكما هو موضح أيضا في الشكل ؛ ومن الدراسات العالمية العديدة في مجال إستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وتركيبه لدراسة تغاير شكل جناح الحشرات وحجمه باختلاف مناطق تواجدها هي التي أجراها Oleksa و Tofilski (2016) في ايران بإستخدام نظام المقياس الهندسي لدراسة التغاير في شكل وحجم جناح نحلة العسل *A. mellifera* ودراسة تأثير إختلاف العوامل البيئية في تطورها ، حيث تمّ تحليل البيانات في تلك الدراسة بالإعتماد على البرامج الجاهزة التي تحلل بيانات المعالم وتحولها الى أرقام مقارنة للنتائج المطلوبة بنسبة كبيرة جدا، ومنها البرنامج الجاهز لتحليل أحداثيات المعالم الموضوعة على أجنحة أنواع من الحشرات والذي يمكن من خلاله تحليل الأشكال الكبيرة جدا من الحزم الأحصائية في مخطط التشتت Scatte plot لعينات الحشرات المدروسة مثل حزم Rohlf الأحصائية (Claude، 2008) ، وان السبب في تغاير شكل جناح الحشرة وحجمه أعلاه هو إختلاف الظروف البيئية في المناطق التي جمعت منها عينات تلك الحشرة

15
15
15



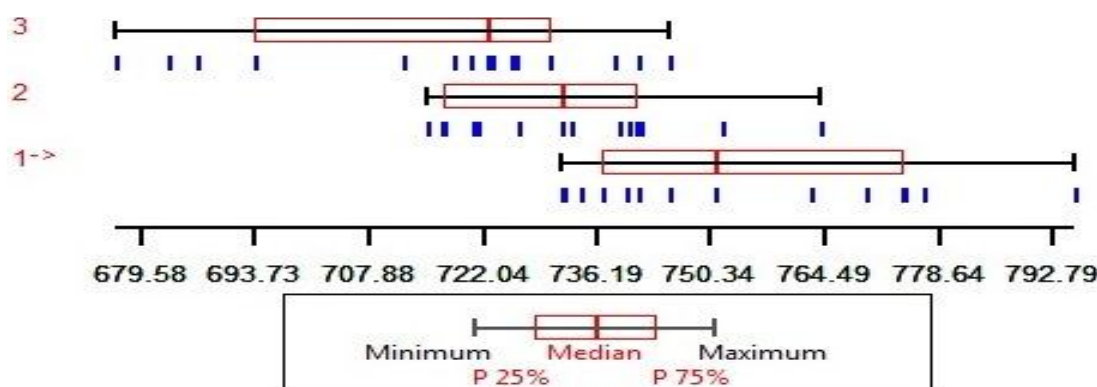
$$X = \text{من } -0.373 \text{ الى } 0.478 , Y = \text{من } -0.128 \text{ الى } 0.153$$

شكل(10) الشكل الانتشاري لتوزيع شغالة نحل العسل *A.mellifera* على طول التحليلين العاملين الاول والثاني PCs لإحداثيات فضاء الظل المشتقة من احداثيات المعالم الاصلية لكل جناح (الالوان الوردي والازرق والاخضر في الشكل تشير الى المجتمعات السكانية للحشرة من شمال ووسط وجنوب العراق على التوالي) .

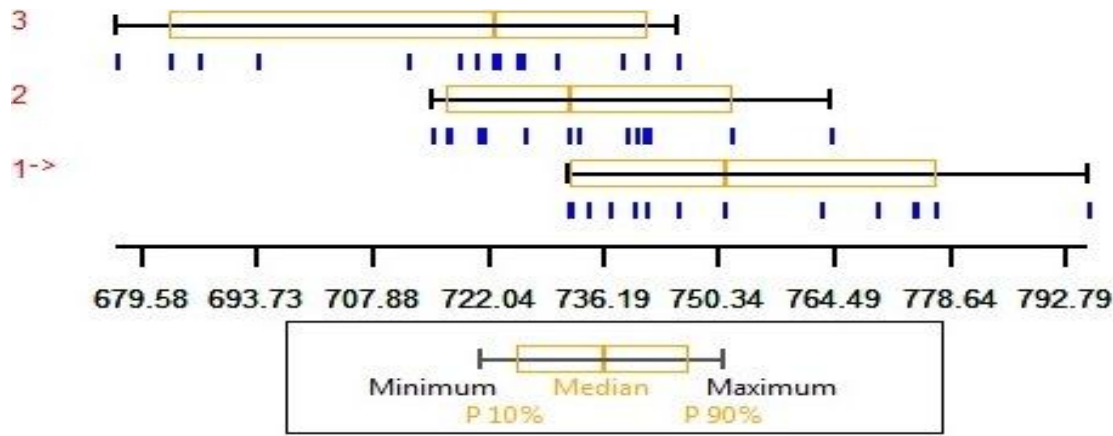
يوضح الشكل(11) نتائج تحليل التباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن لشغالة نحل العسل *A.mellifera* ، إذ يمثل كل صندوق كما هو موضح في الشكل 12 المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 25 % والربع 75 % ، وتمثل الخطوط الزرقاء اللون التي توجد أسفل كل صندوق والأجنحة الامامية اليمنى للعينات الداخلة في الدراسة، إذ نلاحظ من الشكلين (11،12) وجود تباين بسيط في الحجم المركزي للجناح الامامي الايمن لشغالة نحل العسل *A.mellifera* باختلاف المناطق التي جمعت منها العينات ؛ كما يوضح الشكل (12) نتائج تحليل التباين في الحجم المركزي لجناح شغالات نحل العسل التي جمعت من بعض مناطق العراق الثلاثة ، ولكن في هذا الشكل كانت المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 10 % والربع 90 % ، نلاحظ أيضا من هذا الشكل عدم وجود تباين في الحجم المركزي للجناح الأيمن لشغالة نحل العسل باختلاف المناطق التي جمعت منها عينات هذه الحشرة، إذ وصل معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لشغالة نحل العسل وكما موضح في جدول(13) هو 754.45 ، 732.25 و 717.42 مايكرون للمجتمعات السكانية الثلاثة الشمالية ، الوسطى ، والجنوبية وعلى التوالي ، أما قيمة التباين في

الحجم المركزي للجناح الأيمن فقد بلغت 358.14، 189.76 و 423.04 للمجتمعات السكانية الثلاثة المذكورة ، تم في هذه الدراسة استخدام اختباري F و T لغرض المقارنة بين شغالات نحل العسل للمجتمعات السكانية في المناطق الثلاثة المدروسة بالنسبة لمعدل الحجم المركزي للجناح الامامي الأيمن في تلك العينات، وعند مقارنة شغالات نحل العسل لعينات المنطقة الشمالية مع شغالات نحل العسل من عينات المنطقة الوسطى في معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن وجد أنّ قيمة $F=1.89$ ، وقيمة $P=0.24$ في حين أنّ قيمة $T=3.67$ ، وقيمة $P=0.00$ ، أمّا قيمة الاختلاف المطلقة AD فقد وجد أنّها تساوي 22.21 ، إذ لا توجد هناك فروق معنوية بين شغالات نحل العسل للمنطقة الشمالية و المنطقة الوسطى ، أمّا عند مقارنة شغالات نحل العسل لعينات المنطقة الشمالية مع عينات المنطقة الجنوبية نجد أنّ قيمة $F=1.18$ ، وقيمة $P=0.76$ بينما كانت قيمة $T=5.13$ ، وقيمة $P=1.94$ وقيمة الاختلاف المطلقة A.D تساوي 37.03 ، إذ تشير النتائج الى عدم وجود فروق معنوية بين حشرات هاتين المنطقتين في معدل الحجم المركزي للجناح الامامي الأيمن، وعند مقارنة عينات المنطقة الوسطى مع عينات المنطقة الجنوبية تبين أنّ قيمة $F=2.23$ وقيمة $P=0.15$ ، بينما بلغت قيمة $T=2.32$ ، وقيمة $P=0.03$ اما قيمة الاختلاف المطلقة فكانت تساوي 14.82، اي عدم وجود فروق معنوية أيضا بين هاتين المنطقتين في معدل الحجم المركزي للجناح الامامي الأيمن ، ويتضح لنا ممّا سبق أنّ شغالات نحل العسل A. *mellifera* التي جمعت عيناتها من مناطق العراق الثلاثة الشمال، والوسط ، والجنوب الى وجود اختلاف في معدل الحجم المركزي للجناح ، ولكن احصائياً لا توجد فروق معنوية بين المجتمعات السكانية الثلاثة، وهذا يتفق مع ما جاء في نتائج الدراسة الوراثية الجزيئية ، وهناك العديد من الدراسات العالمية حول استخدام نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه في تمييز المجتمعات السكانية المختلفة للحشرات ومنها الدراسة التي ، و قام بها Dujardin وآخرون (2010)، حول استخدام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح لدراسة التباين الوراثي الكمي بين المجتمعات

السكانية ، إذ درسوا تأثير التغيرات المناخية على شكل الجناح وحجمه للمجتمعات السكانية للنوع *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) في تايلند، وذلك بإستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح فلاحظوا وجود إختلاف في الحجم المركزي لجناح العينات الداخلة في الدراسة بإختلاف اشهر السنة، و ذكروا بأنّ السبب في ذلك يعود الى إختلاف الظروف البيئية بين المناطق الثلاثة التي جمعت منها عينات تلك الحشرة كمعدلات درجة الحرارة، كمية الأمطار السنوية، والرطوبة النسبية؛ في تلك المناطق ومن الدراسات الأخرى في هذا المجال الدراسة التي أجراها Murat وآخرون (2007)، من التمييز بين نوعين من النحل وهما *Sibricobombus varticococus* and *Sibricobombus niveatus* رتبة غشائية الأجنحة Hymenoptera ،وعائلة النحل Apidae ، وإنّ من الصعوبة التمييز بين هذين النوعين عن طريق الشكل الظاهري ولكن استطاع هؤلاء الباحثين من التمييز بين هذين النوعين عند استعمالهم المقياس الهندسي لشكل الجناح والمعتمد على المعالم إذ لاحظوا وجود تغاير واضح في شكل الجناح



شكل (11) الحجم المركزي للأجنحة الامامية اليمنى لشغالة نحل العسل *A.mellifera* تبعاً للمجتمع السكاني المنتمية له ، (إذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 25% والربع 75% ، الخطوط الزرقاء تحت كل صندوق تمثل الاجنحة ، الارقام 1 ، 2 و 3 في الشكل تمثل المجتمعات السكانية للحشرة من شمال ووسط وجنوب العراق على التوالي)



شكل (12) الحجم المركزي للأجنحة الامامية اليمنى لشغالة نحل العسل *A. mellifera* تبعاً للمجتمع السكاني المنتمية له ، (إذ يمثل كل صندوق في الشكل المجموعة الوسطية موزعة بين الربع 10% والربع 90% ، الخطوط الزرقاء تحت كل صندوق تمثل الأجنحة ، الأرقام 1 ، 2 ، و 3 في الشكل تمثل المجتمعات السكانية للحشرة من شمال ووسط وجنوب العراق على التوالي).

جدول (13) مقارنة الحجم المركزي للجناح الامامي الايمن بين ثلاث مجتمعات سكانية لشغالة نحل العسل *A. mellifera* من شمال ووسط وجنوب العراق .

Group	M.CS	St.D	Va.	F.	P	T	P	A.D
N	754.45	18.92	358.14	N-M 1.89	N-M 0.24	N-M 3.67	N-M 0.00	N-M 22.21
M	732.25	13.78	189.76	N-S 1.18	N-S 0.76	N-S 5.13	N-S 1-94	N-S 37.03
S	717.42	20.57	423.04	M-S 2.23	M-S 0.15	M-S 2.32	M-S 0.03	M-S 14.82

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 : Absolut Differences الاختلافات المطلقة

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

يوضح الشكل (13) التحليل التمييزي للمجتمعات السكانية التابعة لشغالات نحل العسل

A. mellifera لعينات المناطق الثلاثة ، إذ يستخدم هذا النوع من التحليل للمقارنة بين الأفراد

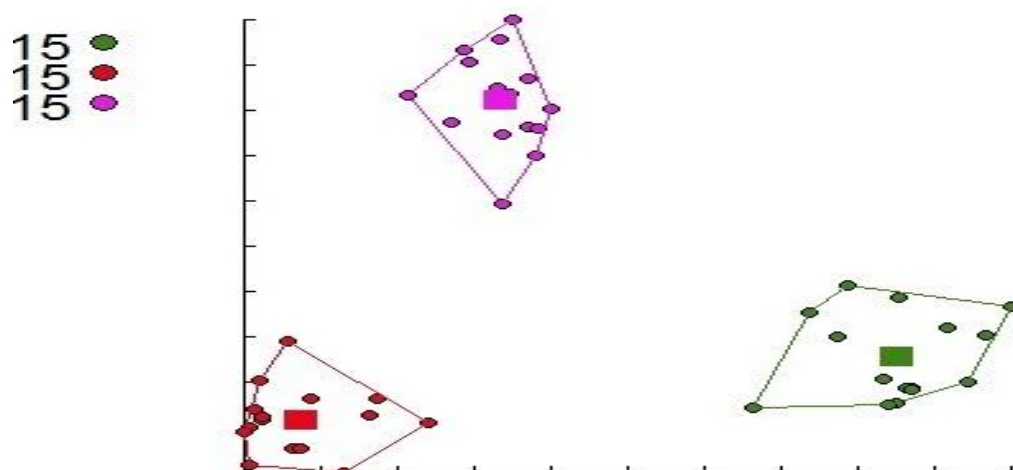
داخل المجموعة السكانية الواحدة ، وقد كان المجموع الكلي لعدد الأجنحة الامامية اليمنى

المستخدمة في هذا التحليل هو 45 جناحاً أيمن، 15 منها لشغالة نحل العسل للمنطقة الشمالية، والمؤشرة باللون الأخضر و15 جناحاً أخرى لشغالات نحل العسل للمنطقة الوسطى والمؤشرة باللون الاحمر ، أما اللون البنفسجي فيمثل الـ 15 جناحاً الأخيرة من المجموع الكلي لعدد الأجنحة لشغالات نحل العسل المنطقة الجنوبية .

وقد أظهرت نتائج التحليل التمييزي إنّ معدل الحجم المركزي للجناح الامامي الأيمن لشغالات نحل العسل المنطقة الشمالية هو 754.45، و إنّ معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لشغالات نحل العسل المنطقة الوسطى هو 732.25 في حين كان معدل الحجم المركزي للجناح الأيمن لشغالات نحل العسل المنطقة الجنوبية هو 717.42، وأظهرت هذه النتائج أيضاً في الجدول (14) إنّ مسافة مهالانوبز Mahalanobis distance بين الحجم المركزي لأجنحة الامامية اليمنى لشغالات نحل العسل من المنطقة الشمالية ، والحجم المركزي لأجنحة الامامية اليمنى لشغالات نحل العسل من المنطقة الوسطى هي 10.91، ومسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي للأجنحة الامامية اليمنى لشغالات نحل العسل من المنطقة الشمالية ، والحجم المركزي للأجنحة الامامية اليمنى لشغالات نحل العسل من المنطقة الجنوبية هي 9.44، في حين أظهرت النتائج أيضاً مسافة مهالانوبز بين الحجم المركزي لأجنحة الامامية اليمنى لشغالات نحل العسل من المنطقة الوسطى والحجم المركزي لأجنحة شغالات نحل العسل من المنطقة الجنوبية هي 8.45، قد يرجع سبب التباين بين هذه المجتمعات الى إختلاف الظروف البيئية، والمتمثلة بدرجات الحرارة ومعدلات سقوط الأمطار السنوية ، فضلاً عن معدلات الرطوبة النسبية بين تلك المجتمعات أولاً وبعد المسافة الجغرافية بين مناطق الدراسة الثلاثة التي جمعت منها عينات الحشرة والتي تساوي مئات الكيلو مترات .

إنّ هذا النوع من الدراسات الوراثية الكمية التي يستخدم فيها نظام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه في العراق تكون محدودة وقليلة جداً وتعدّ هذه الدراسة واحدة منها إذ أنّ هذه

الدراسة هي الأولى على مستوى العراق التي تدرس الصفات الوراثية الكمية لشغالات نحل العسل العراقي *A. mellifera* لغرض التمييز ما بين المجتمعات السكانية لها في مناطق العراق الثلاثة باستخدام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح Geometric Morphometric ، اذ قام Sultan (2016) بأجراء دراسة لعينات من شغالات نحل العسل جمعت من محافظة بغداد و وديالى، باستخدام المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه ، إذ أظهر إن معدل الحجم المركزي لأحداثيات المعالم المثبتة على الأجنحة اليمنى لـ 30 شغالة من نحل العسل هو 764.34 و 768.92 لمحافظتي بغداد و وديالى على التوالي وبالاستناد على معدل الحجم المركزي بين العينات أظهرت نتائج تلك الدراسة عدم وجود اي فروق معنوية للمناطق المذكورة ؛ وإن سبب عدم وجود فروق معنوية بين المنطقتين المدروسة هو تشابه الظروف البيئية لكلا المنطقتين ، إذ تعتبر هذه المناطق هي من مناطق الوسط في العراق ، إذ بلغ متوسط درجة الحرارة في بغداد 32.99 م° ، أما معدل الامطار 160.5 ملم؛ أما بالنسبة لديالى فمتوسط درجة الحرارة هو 33.63 م° ، وإن معدل الامطار بلغ 190.8 ملم ؛ أما بالنسبة للدراسات العالمية فهناك عدد كبير منها حول هذا الموضوع ، ومنها الدراسة التي قام بها Barour وآخرون (2011) في شمال الجزائر على شغالات نحل العسل للتعرف على التنوع البايولوجي لنحلة العسل *A. mellifera intermissa* في هذه المناطق إذ استخدم طرق المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح ، إذ قام بجمع 3400 عينة من شغالات نحل العسل من المناحل المستأجرة في جميع الاجزاء الشمالية من الجزائر وظهرت النتائج عند استخدام اختبارات تحليل التباين ANOVAs وجود فروق معنوية عالية بين المناطق الشمالية الرئيسية الثلاث المدروسة وتشمل الاختلافات في الغالب الشكل؛ في حين أن مساهمة الحجم تكون ضعيفة عموماً داخل المناطق وهذه الاختلافات قد تكون بسبب اختلاف الظروف البيئية بين المناطق، أو نتيجة للتدخلات البشرية ، أو نتيجة للتدفق الجيني بين سكان نحل العسل .



شكل (13) التحليل التمييزي Discriminant analysis لإحداثيات معالم الأجنحة الامامية اليمنى بين ثلاثة مجتمعات سكانية لشغالة نحل العسل [A.mellifera] النقاط الخضراء ، الحمراء والبنفسجية تمثل عينات الحشرة من شمال ووسط وجنوب العراق على التوالي ، المربع الاخضر ، الاحمر والبنفسجي يمثل معدل الحجم المركزي للأجنحة الامامية اليمنى للمجتمعات السكانية للحشرة من شمال ووسط وجنوب العراق وهو 754.45 ، 732.25 و 717.42 على التوالي].

جدول (14) مقارنة مسافة مهالانوبيز Mahalanobis Distance بين ثلاثة مجتمعات سكانية لشغالة نحل العسل من شمال العراق ووسطه وجنوبه .

Group	A.mellifera (N)	A.mellifera (M)	A.mellifera (S)
A.mellifera (N)	0.00		
A.mellifera (M)	10.91	0.00	
A.mellifera (S)	9.44	8.45	0.00

(N) A.mellifera شغالة نحل العسل من شمال العراق ، (M) A.mellifera شغالة نحل العسل

من وسط العراق ، (S) A.mellifera شغالة نحل العسل من جنوب العراق

ويوضح الجدولين (15،16) تحليل التباين ANOVA لحجم وشكل الجناح الامامي الأيمن

لشغالات نحل العسل للمجتمعات السكانية الثلاثة ، إذ تمّ مقارنة حجم الجناح الأيمن لشغالات

نحل العسل بواسطة إستخدام وحدة ASI التي توجد ضمن مكونات البرنامج الجاهز وبواسطة هذه

الوحدة نتمكن من معرفة إذا كان هناك تباين في شكل وحجم الجناح بين المجتمعات السكانية أم لا، وقد أظهرت نتائج تحليل التباين لتمامات حجم الجناح الأيمن لشغالات نحل العسل كما هو واضح في الجدولين أعلاه وجود فروق معنوية بسيطة جدا في حجم الجناح بين المجتمعات السكانية الثلاثة المختلفة ؛ و وجد تباين بسيط جدا في تمامات شكل الجناح لتلك المجتمعات، أما سبب هذا التباين البسيط جدا قد يعود الى تأثير نحل العسل بالظروف البيئية في المناطق التي جمعت منها العينات ، وفي دراسة مشابهة قام Rahimi وآخرون (2017)، باستخدام المقياس الهندسي لشكل وحجم الجناح على سكان نحل العسل في إيران ، إذ كان الهدف من دراسته هو تمييز علاقة النشوء، والتطور بين النشوء والتطور لسكان نحل العسل في إيران، إذ استخدم في دراسته 14 تحليل مختلف للمقياس الهندسي على 2250 شغلة نحل العسل لـ 20 مجموعة سكانية اختيرت من 20 محافظة مختلفة ، وعند استخدام تحليل التباين المتداخل بين مناطق الدراسة أظهرت النتائج وجود فروق ذات دلالة احصائية لتحليل المقياس الهندسي لجميع المحافظات ؛ بسبب تأثير الحشرة باختلاف الظروف البيئية للمناطق التي جمعت منها العينات عند استخدام تحليل التباين؛ وفي دراسة أخرى قام بها Ibrahim وآخرون (2017) ، شملت المقياس الهندسي لجميع أجزاء نحلة العسل ، ومنها طول وعرض الجناح الامامي والخلفي لنحلة العسل في الهند اذ قام بجمع العينات من اربعة مناطق ذات مناخ زراعي مختلف خلال عام 2012، وكشفت النتائج عن وجود فروق معنوية ذات دلالة احصائية لطول الجناح الامامي والخلفي، وعرض الجناح الخلفي بين مناطق الدراسة الاربعة مع عدم وجود فروق معنوية ذات دلالة احصائية لعرض الجناح الامامي بين مناطق الدراسة ، وان هذا الاختلاف يكون بسبب العديد من العوامل مثل التباين الجغرافي و وجود أجناس مختلفة الى جانب ذلك، فإنّ عينات النحل تمّ جمعها خلال مواسم مختلفة حتى في نفس المكان أيضا ولها تأثير ملحوظ على القياسات الهندسية لأجزاء جسم نحل العسل.

جدول (15) تحليل التباين ANOVA لتماثل حجم الجناح الامامي الايمن بين ثلاثة مجتمعات

سكانية لشغالة نحل العسل *A. mellifera* .

Source	SS	Df	MS	F	Signification
Modal	0.0008	5	0.000157	1.38	0.26
Individual	0.0006	2	0.000300	2.64	0.09
Side	0.0000	1	0.000034	0.30	0.57
Side*I	0.0001	2	0.000074	0.65	0.35
Residue	0.0041	36	0.000114		

جدول (16) تحليل التباين ANOVA لتماثل شكل الجناح الامامي الايمن بين ثلاثة مجتمعات

سكانية لشغالة نحل العسل *A. mellifera* .

Source	SS	Df	MS	F	Signification
Modal	0.0039	170	0.000023	0.89	0.83
Individual	0.0020	68	0.000030	1.16	0.18
Side	0.0007	34	0.000022	0.84	0.73
Side*I	0.0011	68	0.000017	0.65	0.99
Residue	0.0316	1224	0.000026		

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

1- اظهرت النتائج إنَّ الوزن الجزيئي للحزم الناتجة من عملية الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين الماييتوكوندرية COI ، 16Sr DNA و ND5 لشغالات نحل العسل هو 950b ، 1000 bp ، 800 bp على التوالي

2- لوحظ وجود تنوع وراثي جزيئي على شكل طفرات نقطية من نوع الحذف والاستبدال ما بين المجتمعات السكانية الثلاث لشغالة نحل العسل عند تضخيم ثلاث جينات من دنا الماييتوكوندرية وهي COI ، 16Sr DNA و ND5 بواسطة جهاز الـ PCR ، ومن ثم عمل تسلسل نيوكليوتيدي للجينين COI و ND5

3- وجود تغاير وراثي كمي بسيط في تماثل شكل وحجم الجناح الامامي الايمن بين المجتمعات السكانية الثلاثة لشغالات نحل العسل عند استعمال المقياس الهندسي لشكل الجناح وحجمه.

4 - نحل العسل العراقي *A. mellifera* Iraq هجين وليس نقي اي انه منحدر من اربعة خطوط تطويرية وهي A ، M ، C و O و اثبت هذا بمقارنة التسلسل التتابعي للعينات المدروسة مع عينتين لبنك الجينات لكل من جين COI و ND5

التوصيات Recommendations

1- تعزيز الجهود البحثية العلمية التي تسلط الضوء على استخدام التقنيات الجزيئية الحديثة ويمكن تحقيق ذلك من خلال زيادة الأنشطة البحثية ، على ان يتم التركيز على الحشرات والانواع الاخرى ذات التأثير الضار طبيا واقتصاديا ولا سيما للانواع الدخيلة التي فيها مشاكل تشخيص بالاعتماد على الصفات المظهرية لها.

2- التوسع في الدراسات الأحيائية الجزيئية ، وذلك بدراسة مناطق اخرى للدنا المايكروندريا والدنا النووي أما بالطريقة نفسها، أو بإستخدام تقنيات جزيئية اخرى وهي RAPD ، AFLP ، SSR ، ISSR و Real time PCR .

3- عمل دراسة وراثية خلوية وتحديد عدد الكروموسومات لكل مجموعة سكانية ، ومن ثم تصنيف كروموسوماتها اعتمادا على موقع السنترومير ودليل القطعة المركزية ومقارنتها مع المجموعة السكانية الاخرى

اولا. المصادر العربية :

أبو النجا، احمد محمود؛ فتحي، حسن محمد؛ الصيرفي، هالة كامل ومندوة، دينا. (2008). تأثير استخدام مصادد حبوب اللقاح على كميات الحضنة وحبوب اللقاح المخزونة في طوائف نحل العسل- قسم الحشرات الاقتصادية- كلية الزراعة/ جامعة المنصورة. جمهورية مصر العربية.

أبو شاور، أحمد. (2003). موسوعة تربية النحل. دار أسامة للنشر والتوزيع، عمان، الأردن.

أبو عيانة، رمزي عبد الرحيم والمزين، جمال علي. (2009). منتجات نحل العسل غذاء ودواء. إبداع للإعلام والنشر، القاهرة، جمهورية مصر العربية.

الآغا، أمل محمد. (2005). النحل والعسل. دار الرضوان، حلب، سوريا.

الأنصاري، أسامة محمد نجيب. (2007). موسوعة النحل في إنتاج العسل وتلقيح المحاصيل. منشأة المعارف، الإسكندرية، جمهورية مصر العربية.

البراقى ، محمد علي وكارنوي ، ليونيل والبراقى خالد ، (2009) . التحليل الوراثي لنحلة العسل السورية *Apis mellifera Syriaca* ودراسة تنوعها الحيوي باستخدام معلمات جزيئية متخصصة ، المؤتمر السادس للنحالين العرب ، السعودية ، 9-1 .

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 .

التميمي ، حسين محمد بريس. (2016). دراسة العلاقة الوراثية الجزيئية والكمية بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذباب الدودة الحلزونية للعالم القديم ،رسالة ماجستير ، كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى ،العراق .

- جبرائيل، جلادت محمد صالح .(2001). التوصيف الوراثي لعدد من أصناف نخيل التمر *Phoenix dactylifera* في العراق باستخدام مؤشرات أَل RAPD ،مجلة أباء للأبحاث الزراعية .المجلد - 11 ،العدد (1) .الصفحة: 138-148.
- جرجيس، سالم جميل وسعيد ، مهدي مجمد صالح .(2010). تأثير درجة الحرارة وقوة الطائفة على سروح نحل العسل (*Apis mellifera L* (Apidae-Hymenoptera).مجلة زراعة الرافدين . المجلد (28)العدد(2)
- الجوراني، رضا صكب.؛ خضير، غفوري ياس.؛ إبراهيم، عزالدين حسن وياسين، عبد العزيز إبراهيم . 1990 . الحشرات النافعة. دار الحكمة، بغداد.
- الحارثي، سيف الدين شحاذة . (2002) . تغذية نحل العسل، مديرية الإرشاد والإعلام الزراعي، القسم الفني، الأردن.
- حلو ، عبد حنان؛ فيح، ظاهر ومعلا، جمال . (2001). مملكة نحل العسل. دار الغد الجديد، المنصورة، جمهورية مصر العربية .
- الخطيب ، تمارا عدنان .(2000).استخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة ألدنا RAPD في التمييز لجنس وأصناف نخيل التمر *Phoenix dactylifera* في العراق . رسالة ماجستير ، كلية العلوم/ جامعة بغداد - العراق .
- الخولي ، عبد المنعم سليمان علي وعيسى ،إبراهيم سليمان . (1994).نحل العسل دراسة عن السلوك والانتاج ورعاية المناحل .الدار العربية للنشر والتوزيع
- الشدايده، احمد نوري والعبادي، امل عبد الله والعطيات، مازن احمد(2012)، معرفة المستهلكين في إقليم وسط الاردن بمنتجات نحل العسل وعلاقتها ببعض العوامل، مجلة الإسكندرية .

- الصائغ، مزاحم أيوب عبد الله ومصطفى، عبد الرحيم عمر. (2003). المدخل الى تربية النحل الارشاد الزراعي ، مطبعة الزراعة، الطبعة الاولى.
- عودة ، حياة كاظم.(2013). اقتصاديات تربية نحل العسل في مدينة الديوانية.مجلة الفرات للعلوم الزراعية ،5(3):316-323
- فرج الله و الغامدي . (2003) . دراسة بعض صفات نحل العسل ، الندوة الدولية
- 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 .
- اللواتي ، حسن بن طالب والحجرية ، سها بنت حمود.(2011). تربية نحل العسل،المديرية العامة للبحوث الزراعية والحيوانية ، دائرة الإعلام التنموي، سلطنة عمان .
- معلا ، محمد و علي ، نزار مير . (2009) .تقييم بعض الطرز الوراثية من الاقماح السورية (السداسية والرباعية) باستخدام معلمات بيوكيميائية وجزيئية مختلفة ،جامعة تشرين ، سورية .
- مكيس ، خليل مكيس والجندي ،عبد الكريم .(2005).النحل ودودة القز .مطبوعات جامعة تشرين .اللاذقية .سورية
- النجار، زغلول راغب محمد. (2010). الحيوان. جار المعرفة للطباعة والنشر. بيروت، لبنان.
- ياسين، إبراهيم حسن (2011). التحري عن تأثير البروبوليس العراقي المنتج من نحل العسل في بعض الجراثيم المعزولة من حالات مرضية للإنسان. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة تكريت.

ثانيا . المصادر الأجنبية :

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 .

Alattal , Y.; Alsharhl, M., Alghamdl, A., AlfaIfy ,S., Migdadi, H., Ansari, M., (2014). Characterization of the native honey bee subspecies in Saudi Arabia using the mtDNA COI-COII intergenic region and morphometric characteristics.- Bull of Insec, 67 (1): 31-37.

Alvarez, J.; Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., and Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: A review. Mediterranean J of Nutr and Meta, 3(1), 15–23.

Avise , J.C.; Arnold, J. and Ball, R. M .(1987). Intraspecific Phylogeography the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic . Eco. and syst , 18: 489-522.

Ballard, J. W. O. and Kreitman, M.(1995).Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker?. Trends Eco. Evol., 10 : 485-488.

Barour, C.; Tahar, A and Baylac, M. (2011) Forewing shapevariation in Algerian honey bee populations of *Apis mellifera* intermissa(Buttel-Reepen, 1906) (Hyme-noptera: Apidae): a landmark-based geometric morphometrics analysis. Afr. Ento.19,11–22.

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

Beekman, M.; Sumpter, D.J.T.; Seraphides, N. and Ratnieks, F.L.W. (2004). Comparing foraging behavior of small and Honeybee colonies by decoding waggle dances made by foragers. *Functional Eco.* Vol. 18(6), pp:829-830.

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. Lmage Anal.*1,225-243 .

Bouga , M.; Harizanis, P.C.; Kiliass,G. and Alahiotis,S.(2005). Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR – RFLP analysis of three mtDNA segments1, *Apido* 36 , 335–344.

Brand, M. D. (1997) . Regulation analysis of energy metabolism, *J. Exp. Bilo.* 200(2): 193-202.

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 .

Buter, G.G. (1999). *The Honey bee an Introduction to her sense physiology and Behavior.* 9th ed. Clarendon Press, Oxford, England.pp:88- 89.

Butler, C. (2002). *The world of the honey bee.* Collins. London.pp:190-192.

- Cevallos, V. E. and Nation, J. L.**(2004). Chromosome of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tphritidae). Flo. Ento., 87 (3): 361-364
- Chandra, S. B. C.; VIK, J. L. and kapatral, V.**(2006). Comparative insect mitochondrial genomes: Differences despite conserved genomes synten. African J. Bio.,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.
- Claude, J.**(2008). Morphometrics with R . Springer, New York . 243PP.
- Crozier, R. H. and Crozier, Y. C.** (1993). The Mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis mellifera* Complete Sequence and Genome Organizatio. Gen. Soc. of Ame . 133: 97-117
- Dechamp N.**(2003). Diversite génétique de l'abeille (*Apis mellifera* L.): différenciation des populations, structure et fonctionnement d'une population.
- Depto, H. K.; Collins, E. and Woods, R.**(2006).Study the genetic variability of quantitative between different populations of *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae).Apido.,Spr.,24(3): 304-312 .
- Deseyn, J. and Billen, J.** (2005). Age dependent morphology and ultra structure of Honeybees. Apido, Vol. (36), pp:49-57.

Dubecke, A. Beckh ,G. and Lullmann, C. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in honey and bee pollen. Food Additives & contaminants Part:A 28(3): 348-358.

Dujardin, J. P. ; Ya-umphan , P. ; Phumala-Morales, N. and Vargas, R. E. M. (2010) . Climate associated size and shape in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations from Thailand. Infection, Gen. and Evo. 10: 580-585.

Eckert, J.E. and Shaw, F.R. (2005). Bee keeping. Macmillan Co., New York, U.S.A.pp:66-69.

Franck, P.; Garnery, L.; Solignac, M.; and Cornuet, J.M .(1998). The origin of west European subspecies of honeybees *Apis mellifera*: New insights from microsatellite and mitochondrial data. Evolution, 52(4): 1119-1134.

Franck, P.; Garnery, L.; Solignac, M.; and Cornuet, J-M . (2000). Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. Apido. , 31 ,167-180

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). Apido., ,43(6) : 609-617 .

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 Apido. 37: 91-9

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). *J. of Med. Ento.*, 42:7-18.

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

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.

Gomeh ,H.; Rafie,J.N.;and Modaber,M .(2016). Comparison of standard and geometric morphometric methods for discrimination of honey bees populations *Apis mellifera L.* in Iran. *J. of Ento. and Zoo.St.* ; 4(1): 47-53

Graham, J. M.(2003). *The Hive and the Honey Bee*. 6th ed. Dadant and Sons. USA. 1970

Gregory, T.R. (2005). Synergy between sequence and size in large-scale genomics. *Nat. Rev. Genet.* 6, 699– 708. (doi:10.1038/nrg1674)

Grzimek, B. (1997). *Animal Life Encyclopedia Vol.(2) Insects.* Vonn Nostroud Reinhold Co., Lon. and N. Y. pp:145-148.

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.

HariIzanis, P. and Bouga , M.(2003). Genetic structure of the bee from crete island (Greece). Laboratory of Sericiculture - Apiculture, Agricultural University of Athens, 75, Iera Odos, 118 55, Athens, GREECE.

Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L.and DeWaard, J. R .(2003). Biological identifications through DNA barcodes, Proc. R. Soc. B , vol. 270 (pg. 313- 321).

Hebert, P.D.N. and Gregory, T.R.(2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. Syst Biol, 54(5):852-859.

Ibrahim,M.M.; Chandel, Y.S and Anil.(2017). Morphometrics of *Apis mellifera* after Five Decades of its Introduction in North-Western Himalayan Region of India. Pakistan J. Zool., vol. 49(4).

Ilyasov ,R.A.; Kutuev,I.A.; Petukhov ,A.V.; Poskryakov ,A.V. and Nikolenko ,A.G.(2011). Phylogenetic relationships of dark European honeybees *Apis mellifera* L. from the Russian ural and west European populations , J. of Api.Sc. , Vol. 55 No. 1.

Ilyasov,R.A.;Poskryakov,A.V. and Nikolenko,A.G.(2016). Seven Genes of Mitochondrial Genome Enabling Differentiation of Honeybee Subspecies *Apis mellifera* . Russ. J.of Gene tics, Vol. 52, No. 10, pp. 1062–1070.

- Ivanova,E.N.; Petrov,P.; Boug,M.; emmanouel,N.G.; Tunca,R.I. and Kenc ,M.(2010).** Genetic variation in honey Bee *Apis mellifera* L. populations from Bulgaria , J of Api. S. , Vol. 54 No. 2.
- 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.
- Kalendar, R.; Grob T., Regina M., Suoniemi A. and S chulman A.H.** (1999). IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theor. Appl. Genet98: 704-711
- Kandemir, I.** (2003) Beekeeping experience and developments in Turkey and in Northern Cyprus, Am. Bee J. 143, 464–467.
- 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.
- Kimura, M.** (1983). The Neutral Theory of Molecular Evolution. CambridgeUniversity Press, UK, p36 7
- Kirvar, E.; Ilhan, T.; Katzer, F.; Hooshmand – Rad, P.; Zweggarth, E.; Gerstenberg, C.; Phipps, P. and Brown, C. G.** (2000). Detection of *Theileria annulata* in cattle and vector ticks by PCR using the Tams 1 gene sequences. Parasitol., 120: 245 – 254

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.

Laidlaw, H.H. and Eckert, J.E. (2005).Queen rearing. Dadant and Sons, Hamilton, U.S.A.pp:87-89.

Lipscomb, D.; Platnick, N. and Wheeler, Q.(2003). The intellectual content of taxonomy: A comment on DNA taxonomy, Trends Ecol. Evol. , vol. 18 (pg. 65-68)

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.

Macleod, N.(2009).Who is Procrustes and what has he done with my data ? Palaeontol. Assoc. News, 70 :21-36.

Magnus , R. and Szanski , A . (2010) . Genetic Evidence of Hony Bees of middle Eastern lineage in the United states

Mallet, J. and Willmott, K.(2003) . Taxonomy: Renaissance or Tower of Babel?, Trends Ecol. Evol. , , vol. 18 (pg. 57-59)

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. Bookstin. Ann. Arbor MI, The Uni. of Mich. Mus. of Zoo., 77-122.

- Martimianakis, S.; Klossa-Kilia, E. Bouga, M. and Kiliass, G.** (2011). Phylogenetic relationships of Greek *Apis mellifera* subspecies based on sequencing of mtDNA segments (COI and ND5). J. of Api. (1): 42–50
- Mas-Coma, S., Esteban, J. G. and Bargues, M. D.** (1999). Epidemiology of human fascioliasis: A review and proposed new classification. Bull World Health Organ., 77: 340-346 .
- Mazeed, AMM** (2004). Microtaxonomy of honey bees *Apis mellifera* in Egypt using wing venation pattern. Bulletin of Faculty of Agriculture of Cairo University, 55(2): 273-284
- 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.
- Michener, C.D.** (2007). The bees of the world. 2nd ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, Maryland, USA.
- Michener, C.D. and Grimaldi, D.A.**(1988). The oldest fossil bee: Apoid history, evolutionary stasis, and antiquity of social behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85: 6424–6426.
- Miguel, I.; Baylac, M.; Iriondo, M.; Manzano, C.; Garnery, L. and Estonba, A.** (2011) Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. – Apidologie 42: 150- 161 .

- 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.
- Moritz, C.; Dowling, T. E. and Brown, W. M.** (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA, relevance of population biology and systematics .Ann.Rev.Ecol.Syst., 18(12):269-292.
- Morse, R.A. and Associate editor Kim Flottum.** (1970). The ABC & XYZ of Bee Culture. 40th ed. The A.I. Root Co. Medina, Ohio.
- 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) . Landmark based Geometric Morphometric analysis of win shape *Sibiricobombus vogot* (Hymenoptera: Apidae) . Ann. Soc. Entomol. Fr. (n. s.) , 43(1) : 95-102
- NedIc,N.; StanisavljevIc,L.; MladenovIc,M.;and StanIsavl jevIc, J** .(2009) . Molecular characterization of the honeybee *Apis mellifera carnica* in serbia , Arch. Biol. Sci., Belgrade, 61 (4), 587-598.
- Oleksa, A. and Tofilski ,A.**(2015). Wing geometric morphometrics and microsatellite analysis provide similar discrimination of honey bee subspecies. Apidologie 46:49–60
- Oumran, M.Y.** Morphoethologie race standard of Syrian hony Bees *Apis millifera* Syriaca. Agricultural Uni. Plovdiv, Bulgaria Sceintific Work. Vol. XLIX. 2004. 13-15 p

Ozdil F.; Fakhri, B. Meydan, H. Yildiz, MA. Hall, HG.(2009). Mitochondrial DNA variation in the CoxI–CoxII intergenic region among Turkish and Iranian honey bees (*Apis mellifera L.*). Biochem Genet.47: 717–21 .

Ozdil,F and ILhan,F.(2012). Genetic Divergence of Turkish *Apis mellifera* Subspecies Based on Sequencing of ND5 Mitochondrial Segment. Sociobiology Vol. 59, No. 1, 2012

Ozdil,F;Aytakin,I;Ilan,F and Boztepe, S.(2012). Genetic variation in Turkish honeybees *Apis mellifera anatoliaca* , *A. m. caucasica* , *A. m. meda* (Hymenoptera: Apidae) inferred from RFLP analysis of three mtDNA regions (16S rDNA-COI- ND5). Eur.J.Eutomol.109:161_167.

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.

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.

Pont-Kingdom, G.; Vassort ,C. G.; Warrior, R. and Okimoto, R. (2000).Mitochondrial DNA of *Hydra attenuata* (Cnidaria): A sequence that includes an end of one linear molecule and the genes for I-rRNA ,tRNA (f-met), tRNA (trp), COII and ATPase 8. J. Mol. Evol. 51(4):404-415.

Powell, J. (2001). Bee live. 12th ed. Collins. London

Rahimi , A . (2015). Study of the genetic diversity of Iranin honey bee population , 16 (2) : P54 -59

- Rahimi ,A; Mirmoayedi,A; Kahrizi ,D; Zarei,L; Jamali,S.**(2017) . Morphometric diversity and phylogenetic relationships among Iranian honey bee (*Apis mellifera meda* Skorikow, 1829) populations using morphological characters. *Sociobiology* 64(1): 33-41
- Ratnasingham, S.; Hebert, P.D.** (2007).BOLD: The Barcode of Life Data. May 1;7(3):355-364.
- Ribbands, C.R.** (2001). The behavior and social life of Honeybees. Bee res. Assoc., London.
- Ridout, C.J. and Donini P.** (1999). Use of AFLP in cereals research. *Trends Plant Sci.* 4: 76-79.
- Rohlf, F. J. and Marcus, L. F.**(1993). A revolution in morphometrics. *Trends Ecology. Evolution*, 8 :129-132.
- Root, A.I.** (2006). ABC and XYZ of Bee culture. 15th ed. A.I. Root Co., Medina Ohio.
- Rothenbuhler, W.C.** 1968. Honey Bees of the World. 31-41. in Graham, J.M. eds. 2003. The Hive and the Honey Bee.6th ed. Dadant and Sons. U.S.A. 1970
- Rotijan, R.D.; Calderone, N.W. and seeley, T.D.** (2002). How a Honeybee colony mustered additional laper for task of Pollen foraging. *Apidologie*, Vol.(33), pp:367-373.
- 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
- uttner, F.** (1988). Honey Bees of the World. 31-41. in Graham, J.M. eds 2003. The hive and the honey bee.6th ed. Dadant and Sons. U.S.A. 1970.
- Sendaydiego , J .P.; Torres ,M.A.J .; and Demayo , C.G;.**(2013). Describing Wing Geometry of Aedes Aegypti Using Landmark-Based Geometric Morphometrics . International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, Vol. 3, No. 4, July
- Shaibi, T.,Fuchs, S. and Moritz, R.F.A.** (2009). Morphological study of Honeybees (Apis mellifera) from Libya. Apidologie,40,97–105.
- 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.; Bunger, A.; Huttel, B. and Kal, G.** (1994). Expending the repertoire of molecular markers for resistance breeding in chickpea. P: 175-198. Proceeding symptom on application of DNA fingerprinting for crop improvement (S. M. Udupa F. Weigand, eds.). 11-12 April, Aleppo, Syria. ICARD Aleppo. Syria
- Sheppard, W. S. and Srnith, D. R..**(2000). Identification of African derived bees in the Americas: a survey of methods. Ann. Entomol. Soc. Am. 93: 159-176.

- 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
- Soller. M. and Beckmann J.S.** (1983). Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet* . 67: 25-33.
- 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.
- Sridhar, R. P. N.**(2006). Polymerase Chain Reaction (PCR) technique Application. www.microrao.com.
- Stevens, C.** (2005). Your bees are what you feed them. <http://www.Honetbee.com.ae/Library/ca.htm>. Subspecies. This article is published with open access at Springerlink.com DOI:
- Tarpy, D.R. and Dreller, F.** (2000). Perception of the pollen need by foragers in a honey bee colony. *Anim. Behav.* Vol.(59), pp: 91-96.
- Tautz, D.; Arctander, P. Minelli, A.; Thomas, R. H. and Vogler A. P.** (2003). A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 18:70
- Taylor, D. R.; Peterson, R. D. H.; Szalanski, A. L. and Peterson, J. J.** (1997) . Mitochondrial DNA variation among *Muscidifurax spp.* (Hymenoptera: Pteromolidae) Pupal Parasitoids of filth flies (Diptera) . *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 90(6): 814-824
- Van Den Berg, A. J.; Van Den Worm, E.; Van Ufford, H. C.; Halkes, S.B.; Hoekstra, M. J. and Beukelman, C. J.** (2008). An in vitro examination of the antioxidant and antiinflammatory properties of

buckwheat honey. Journal of Wound Care, 17(4) 172–4, 176–8.

Walker, A. R.(2000).The ability of Geometric Morphometric methods to estimate a known covariance matrix . Systematic Biology ,49(4):686-696.

Warrior , R. and Gall , J. (1985) . The mitochondrial DAN of *Hydra attenuate* and *Hydra littoralis* Consists of two linear molecules . Arch , Sci . Genva , 38(3) : 439-445 .

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 .

Whitehead, H. S. B. and Shaw, F. R. (2007). Honeybees And their Management. D. Van Nostrand Company, INC, London, England.

Will K. W.and Rubinoff. D. (2004) . Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification, Cladistics , vol. 20 (pg. 47-55) .

Winston, M.L. (1987). The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, MA

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.

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

Zewail, A.(2002).Science and technology in the Twenty-First century.
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 .

ملحق (1)

دليل عدة استخلاص ألدنا Genomic DNA Mini Kit (Tissue)

gSYNC™ DNA Extraction Kit Quick Protocol

For research use only

Catalogue Number

GS004, GS100, GS300

Instruction Manual Download

When using this product for the first time, or if you are unfamiliar with the procedure, please scan the QR code and download the complete instruction manual.

Geneaid



Instruction Manual Download

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 it 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.

Tissue, FFPE, Insect and Sperm Protocol Procedure

1A. Tissue Sample 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. 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).

1B. FFPE Sample Preparation

Cut up to 25 mg sections of FFPE and transfer to a 1.5 ml microcentrifuge tube. Using a sterile blade is recommended. Add 1 ml of xylene then mix by shaking vigorously. Incubate at room temperature for approximately 10 minutes (shake occasionally during incubation). Centrifuge at 14-16,000 x g for 3 minutes then remove the supernatant. Add 1 ml of absolute ethanol to wash the sample pellet and mix by inverting. Centrifuge at 14-16,000 x g for 3 minutes then remove the supernatant. Open the tube and incubate at 37°C for 15 minutes to evaporate ethanol residue. 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. 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).

1C. Insect Sample Preparation

Transfer up to 50 mg of insect tissue to a mortar. Add liquid nitrogen to the mortar and grind the tissue thoroughly using a pestle. Refill the mortar occasionally with liquid nitrogen to keep the sample frozen. Transfer the tissue powder to a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 200 µl of GST Buffer and 20 µl of Proteinase K then vortex thoroughly. Incubate at 60°C for 1-3 hours or until the sample lysate becomes clear. During incubation, invert the tube occasionally and 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).

1D. Sperm Sample Preparation

Add RNase-free water to DTT powder (see the bottle label for volume) then vortex to dissolve. Spin down the solution. The solution should be stored at -20°C. Transfer 900 µl of Sperm Lysis Buffer into a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 80 µl of DTT solution and 20 µl of Proteinase K immediately before use. Mix well by vortex.

NOTE: Sperm Lysis Buffer and DTT can be purchased directly from Geneaid.

Add 100 µl of sperm and 100 µl of fresh prepared Sperm Lysis Buffer (containing DTT and proteinase K) into a new 1.5 ml microcentrifuge tube, mix by vortex then incubate at 60°C for 1 hour to dissolve the sample. During incubation, invert the tube occasionally and 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** and 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.

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 **GS Column in a 2 ml Collection Tube**. Transfer all of the mixture (including any insoluble precipitate) to the GS Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 1 minute. Following centrifugation, if the mixture did not flow through the GS Column membrane, increase the centrifuge time until it passes completely. Discard the 2 ml Collection Tube containing the flow-through then transfer the GS 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 **GS Column**. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube. Add **600 µl of Wash Buffer (make sure absolute ethanol was added)** to the GS Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube. Centrifuge again for 3 minutes at 14-16,000 x g to dry the column matrix.

5. DNA Elution

Transfer the dried GS Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **100 µl of pre-heated Elution Buffer**, TE Buffer or water 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 purified DNA.

Hair Protocol Procedure

1. Cell Lysis

Cut off a **0.5-1 cm piece** from at least **10 hair bulbs**, including **follicle cells** and transfer to a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **200 µl of GST Buffer** and **20 µl of Proteinase K (making sure the hair is completely submerged)** and mix by shaking. Incubate at 60°C for 30 minutes to lyse the sample. During incubation, shake the tube every 5 minutes and transfer the required volume of Elution Buffer (200 µl/sample) to a 1.5 ml microcentrifuge tube and heat to 60°C (for Step 4 DNA Elution). Add **200 µl of GSB Buffer** and mix vigorously. Incubate at 60°C for 20 minutes. During incubation, shake the tube every 5 minutes.

Optional RNA Removal Step

For RNA-free gDNA, following GSB Buffer addition and 60°C incubation, 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.

Following incubation, centrifuge for 5 minutes at 3,000 x g then transfer the supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube.

2. 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 **GS Column in a 2 ml Collection Tube**. Transfer all of the mixture (including any insoluble precipitate) to the GS Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 1 minute. Following centrifugation, if the mixture did not flow through the GS Column membrane, increase the centrifuge time until it passes completely. Discard the 2 ml Collection Tube containing the flow-through then transfer the GS 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.



3. Wash

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

4. Elution

Transfer the dried GS Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **100 µl of pre-heated Elution Buffer**, TE Buffer or water 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 purified DNA.

Blood, Cultured Cell, Amniotic Fluid Protocol Procedure

1A. Blood Sample Preparation

Transfer up to **200 µl of whole blood, serum, plasma, buffy coat or body fluids to a 1.5 ml microcentrifuge tube**. Adjust the volume to 200 µl with PBS. Add **20 µl of Proteinase K** then mix by pipetting. Incubate at 60°C for 5 minutes.

1B. Cultured Cell Sample Preparation

Trypsinize adherent cells prior to harvesting. Transfer **cells (up to 1 x 10⁷)** to a 1.5 ml microcentrifuge tube then centrifuge for 5 minutes at 300 x g. Discard the supernatant then resuspend cells in **200 µl of PBS** by pipette. Add **20 µl of Proteinase K** then mix by pipetting. Incubate at 60°C for 5 minutes.

1C. Amniotic Fluid Sample Preparation

Transfer up to **15 ml of amniotic fluid** to a 15 ml centrifuge tube. Centrifuge for 3 minutes at 14-16,000 x g then discard the supernatant. Add **200 µl of GST Buffer** to resuspend the pellet and transfer the mixture to a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **10 µl of Proteinase K** and shake vigorously. Incubate at 60°C for 30 minutes. During incubation, invert the tube every 5 minutes.

2. Cell Lysis

Add **200 µl of GSB Buffer** then mix by shaking vigorously. For blood and cell samples, incubate at 60°C for 5 minutes, inverting the tube every 2 minutes. For amniotic fluid samples, incubate at 60°C for at least 20 minutes, inverting the tube every 5 minutes. During incubation, transfer required volume of Elution Buffer (200µl/sample) to a 1.5 ml microcentrifuge tube and heat to 60°C (for Step 5 DNA Elution).

Optional RNA Removal Step

For RNA-free gDNA, following GSB Buffer addition and 60°C incubation, 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.

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 **GS Column in a 2 ml Collection Tube**. Transfer all of the mixture (including any insoluble precipitate) to the GS Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 1 minute. Following centrifugation, if the mixture did not flow through the GS Column membrane, increase the centrifuge time until it passes completely. Discard the 2 ml Collection Tube containing the flow-through then transfer the GS 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 GS Column**. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube. Add **600 µl of Wash Buffer (make sure absolute ethanol was added)** to the GS Column. Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. Place the GS Column back in the 2 ml Collection Tube. Centrifuge again for 3 minutes at 14-16,000 x g to dry the column matrix.

5. Elution

Transfer the dried GS Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add **100 µl of pre-heated Elution Buffer**, TE Buffer or water 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 purified DNA.

Kit Components

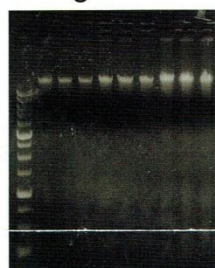
Geneaid

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
GS Columns	4	100	300
2 ml Collection Tubes	8	200	600

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.

The gSYNC™ DNA Extraction Kit Functional Test Data



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figure 1. Genomic DNA from 50, 100 and 200 µl whole blood samples was extracted using the gSYNC™ DNA Extraction Kit. 10 µl from 100 µl eluates of purified genomic DNA was analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel.

1-3 = 50 µl whole blood sample

4-6 = 100 µl whole blood sample

7-9 = 200 µl whole blood sample

M = Geneaid 1 Kb DNA Ladder

Volume	Yield	260/280
50 µl	1.54 µg	1.85
100 µl	2.70 µg	1.87
200 µl	5.56 µg	1.90

Troubleshooting

Improper sample homogenization.

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. Fresh blood is recommended. However, frozen or blood treated with anticoagulants can also be used. Increased storage length decreases DNA yield. If using nucleated blood (e.g. bird or fish) use up to 10 µl then adjust volume to 200 µl with PBS. Hair samples should be completely submerged in GST Buffer and Proteinase K.

Incomplete buffer preparation.

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. 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.

Incorrect DNA elution step.

Ensure that Elution Buffer, TE or water is added into the **CENTER** of the GS Column matrix and is completely absorbed. Use pre-heated Elution Buffer, TE, or water (60-70°C). If 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. Elute twice to increase the DNA recovery.

Residual ethanol contamination.

Following the Wash step, dry the GS Column with additional centrifugation at 14-16,000 x g for 5 minutes to ensure the GS Column membrane is completely dry.

Clogged column.

Use the recommended amount of starting material or separate into multiple tubes. Add additional Proteinase K and extend the incubation time in the Lysis step. Following the Lysis step, centrifuge for 2 minutes at 14-16,000 x g to remove sample debris. Transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube and proceed with the DNA Binding step. If precipitate formed at the DNA Binding step reduce the sample material. Following ethanol addition, break up any precipitate as much as possible prior to loading GS Column.

ملحق (2)

دليل مكونات خليط التفاعل الرئيسي للـ PCR

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

AccuPower® PCR PreMix

Bioneer Corporation
8-11, Munmyeong-ro
Daejeon-gu, Daejeon 305-220
Republic of Korea
Tel: (Korea) 1588-9788
(International) +82-42-930-8777
Fax: +82-42-930-8600
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1620 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501 USA
Tel: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0382
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer Trade(Shanghai) Co., Ltd.
806 Room, Building 2, No.599 Jinyun
Road, Zhoupu Town, Pudong New District,
Shanghai, China
Tel: +86-21-5080-0969/1191/1661
Fax: +86-21-5080-1620
E-mail: salescn@bioneer.com

Bioneer R&D Center
9-702, Korea Bio Park Bldg. 700,
Daewangang-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.

	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
	50 µl	K-2016	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
	50 µl	K-2017	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
	50 µl	K-2011	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
0.5ml Tube	10 µl	K-2260-1	0.5 ml thin-wall tubes with attached cap / 100 tubes
	10 µl	K-2260-2	thin-wall 96-well flat plate
	10 µl	K-2260-3	thin-wall 96-well full-skirted plate
	10 µl	K-2260-4	thin-wall 96-well semi-skirted plate
	20 µl	K-2260-5	thin-wall 96-well full-skirted plate
	20 µl	K-2260-6	thin-wall 96-well semi-skirted plate
384-well	5 µl	K-2080-1	thin-wall 384-well full-skirted plate
	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
Mix		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



BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

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

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangangyo-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. Almusaib_160926

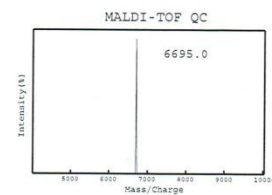
Order No.: 10013877

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

SARA 16S r DND Gene F

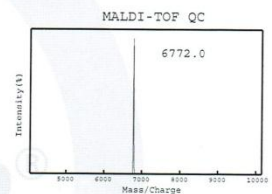
CAA CAT CGA GGT CGC AAA CAT C

Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	13.8 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	22mer	Molecular Weight	6697.3 g/mole
Tm	59.5 C	Volume for 100 pmoles/ul	138.4 ul

**SARA 16S r DND Gene R**

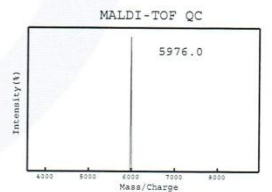
GTA CCT TTT GTA TCA GGG TTG A

Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	14.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	40.9 %
Length	22mer	Molecular Weight	6771.3 g/mole
Tm	54.8 C	Volume for 100 pmoles/ul	141.2 ul

**SARA COI Gene F**

GAT TAC TTC CTC CCT CAT TA

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	11.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	40.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	5977.8 g/mole
Tm	50.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	110.6 ul



5-multiplex 가능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 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: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, 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
Korea Bio Park BLDG #B-702
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. Almusaib_160926

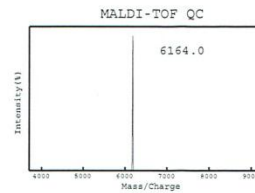
Order No.: 10013877

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

SARA COI Gene R

AAT CTG GAT AGT CTG AAT AA

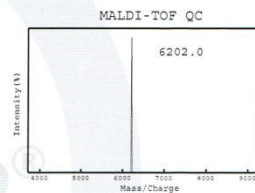
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.5 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	30.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6163.9 g/mole
Tm	47.1 C	Volume for	95.3 ul
		100 pmoles/ul	



SARA ND5 Gene F

TCG AAA TGA ATA GGA TAC AG

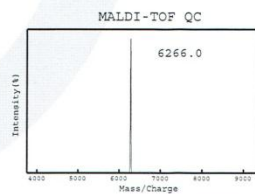
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.3 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	35.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6198.0 g/mole
Tm	48.8 C	Volume for	93.2 ul
		100 pmoles/ul	



SARA ND5 Gene R

GGT TGA GAT GGT TTA GGA TT

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.9 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	40.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6258.0 g/mole
Tm	51.6 C	Volume for	99.2 ul
		100 pmoles/ul	



124

5-multiplex 기능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



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

(4) ملحق

دليل عدة تنقية ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل Gel/ pcr DNA Fragments Extraction Kit

Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit

*For research use only***Sample:** up to 300 mg of agarose gel, up to 100 µl of PCR products**Fragment Size:** 70 bp – 20 kb**Recovery:** up to 95%**Format:** spin column**Operation Time:** 20 minutes (gel extraction), 10 minutes (PCR cleanup)**Elution Volume:** 20-50 µl**Storage:** dry at room temperature (15-25°C) for at least 1 year without showing any reduction in performance

Geneaid



ISO 9001:2008 QMS

Introduction

The Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit was designed to recover or concentrate DNA fragments (70 bp-20 kb) from agarose gel, PCR, or other enzymatic reactions in one convenient product. Chaotropic salt is used to dissolve agarose gel and denature enzymes. DNA fragments in chaotropic salt are bound by the glass fiber matrix of the spin column (1). Contaminants are removed with a Wash Buffer (containing ethanol) and the purified DNA fragments are eluted by a low salt Elution Buffer or TE. Salts, enzymes and unincorporated nucleotides can be effectively removed from the reaction mixture, without phenol extraction or alcohol precipitation. Typically, recoveries are up to 90% for Gel Extraction and up to 95% for PCR Clean Up. The eluted DNA is ready for use in PCR, Fluorescent or Radioactive Sequencing, Restriction Enzyme Digestion, DNA Labeling and Ligation.

Quality Control

The quality of the Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit is tested on a lot-to-lot basis by isolating DNA fragments of various sizes from either aqueous solutions or agarose gel. The purified DNA is analyzed by electrophoresis.

Kit Contents

Component	DF004	DF100	DF300
DF Buffer	3 ml	80 ml	240 ml
W1 Buffer	2 ml	45 ml	130 ml
Wash Buffer* (Add Ethanol)	1 ml (4 ml)	25 ml (100 ml)	50 ml + 25 ml (200 ml) (100 ml)
Elution Buffer	1 ml	6 ml	30 ml
DF Columns	4	100	300
2 ml Collection Tubes	4	100	300

*Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to Wash Buffer prior to initial use.

Order Information

Post Reaction DNA Purification		
Product	Package Size	Cat. Number
Geneaid™ Gel Extraction Kit	100/300 preps	DFG100/300
Geneaid™ PCR Cleanup Kit	100/300 preps	DFC100/300
Geneaid™ Gel/PCR Kit	100/300 preps	DFH100/300
Geneaid™ DNA Cleanup Maxi Kit	10/25 preps	DFM010/025
Small DNA Fragments Extraction Kit	100/300 preps	DF101/301
Presto™ Max Gel/PCR Kit (Large DNA Fragments)	100/300 preps	DFL100/300
Presto™ 96 Well PCR Cleanup Kit	4/10 x 96 preps	96DFH04/10
Presto™ PCR Cleanup Kit 96 Well Binding Plate	10 plates	96DBP01
DNA Pure Kit	100/300 preps	DP100/300
G-25 Gel Filtration Desalting Column	50 rxns	CG025
G-50 Gel Filtration Dye Terminator Removal Column	50 rxns	CG050
G-5-Well G-50 Gel Filtration Plate	4/10 x 96 rxns	CGP04/10
Gel Extraction Tool	25 pcs	GXT025

Caution

DF Buffer contains guanidine thiocyanate. During operation, always wear a lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

References

(1) Vogelstein, B., and Gillespie, D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615

Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit Functional Test Data

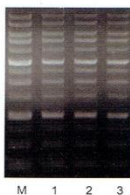


Figure 1. Gel slice DNA fragments ranging from 250 bp-10 kb were extracted using the Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (total 1.0 µg, 3 replicates). The purified DNA from a 50 µl eluate was analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel. M (Control) = Geneaid 1 Kb DNA Ladder

Test	DNA Conc.	260/280	Total DNA	Recovery
Control	---	---	1000 ng	---
Test-1	17.5 ng/µl	1.83	875 ng	87.5%
Test-2	16.4 ng/µl	1.84	820 ng	82%
Test-3	17.2 ng/µl	1.83	860 ng	86%

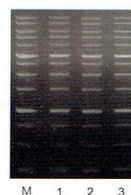


Figure 2. PCR product DNA fragments ranging from 250 bp-10 kb were extracted using the Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (total 1.1 µg, 3 replicates). The purified DNA from a 50 µl eluate was confirmed by spectrophotometer and analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel. M (Control) = Geneaid 1 Kb DNA Ladder

Test	DNA Conc.	260/280	Total DNA	Recovery
Control	---	---	1100 ng	---
Test-1	20.8 ng/µl	1.85	1040 ng	95%
Test-2	20.3 ng/µl	1.84	1015 ng	92%
Test-3	19.6 ng/µl	1.84	980 ng	89%

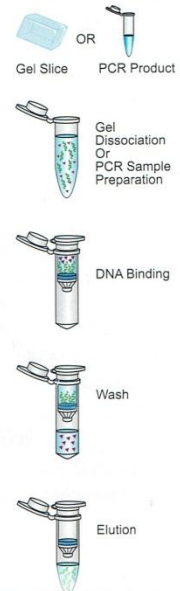
Gel Extraction Protocol

IMPORTANT BEFORE USE!

- Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to Wash Buffer prior to initial use
- Additional Requirements: absolute ethanol, microcentrifuge tubes

Gel Dissociation	• Excise the agarose gel slice containing relevant DNA fragments. • Remove any extra agarose to minimize the size of the gel slice - NOTE: Using TAE buffer for gel formation is recommended for optimal DNA recovery. • Transfer up to 300 mg of the gel slice to a 1.5 ml microcentrifuge tube. • Add 500 µl of DF Buffer to the sample and mix by vortex. • Incubate at 55-60°C for 10-15 minutes to ensure the gel slice has been completely dissolved. - NOTE: During incubation, invert the tube every 2-3 minutes. • Cool the dissolved sample mixture to room temperature. • Place the DF Column in a 2 ml Collection Tube.
Step 1 DNA Binding	• Transfer 800 µl of the sample mixture to the DF Column. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds. • Discard the flow-through and place the DF Column back in the 2 ml Collection Tube. - NOTE: If the sample mixture is more than 800 µl, repeat the DNA Binding step. • Add 400 µl of W1 Buffer into the DF Column.
Step 2 Wash	• Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. • Place the DF Column back in the 2 ml Collection Tube. • Add 600 µl of Wash Buffer (make sure ethanol was added) into the DF Column. • Let stand for 1 minute at room temperature. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. • Place the DF Column back in the 2 ml Collection Tube. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 3 minutes to dry the column matrix.
Step 3 DNA Elution	• Transfer the dried DF Column to a new 1.5 ml microcentrifuge tube. • Add 20-50 µl of Elution Buffer or TE into the CENTER of the column matrix. • Let stand for at least 2 minutes to ensure the Elution Buffer is completely absorbed. • Centrifuge for 2 minutes at 14-16,000 x g to elute the purified DNA. - NOTE: Using pre-heated Elution Buffer (60°C) is recommended for eluting DNA fragments >8kb.

Quick Protocol



Gel Extraction For Sequencing Protocol

IMPORTANT BEFORE USE!

- Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to Wash Buffer prior to initial use
- Additional Requirements: absolute ethanol, microcentrifuge tubes
- We recommend using the Gel Extraction For Sequencing Protocol as Guanidinium Chloride, a component of W1 Buffer, may interfere with sequencing reactions

Gel Dissociation	• Excise the agarose gel slice containing relevant DNA fragments. • Remove any extra agarose to minimize the size of the gel slice - NOTE: Using TAE buffer for gel formation is recommended for optimal DNA recovery. • Transfer up to 300 mg of the gel slice to a 1.5 ml microcentrifuge tube. • Add 500 µl of DF Buffer to the sample and mix by vortex. • Incubate at 55-60°C for 10-15 minutes to ensure the gel slice has been completely dissolved. - NOTE: During incubation, invert the tube every 2-3 minutes. • Cool the dissolved sample mixture to room temperature. • Place the DF Column in a 2 ml Collection Tube.
Step 1 DNA Binding	• Transfer 800 µl of the sample mixture to the DF Column. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds. • Discard the flow-through and place the DF Column back in the 2 ml Collection Tube. - NOTE: If the sample mixture is more than 800 µl, repeat the DNA Binding Step. • Add 600 µl of Wash Buffer (make sure ethanol was added) into the DF Column and let stand for 1 minute.
Step 2 Wash	• Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. • Place the DF Column back in the 2 ml Collection Tube. • Add 600 µl of Wash Buffer (make sure ethanol was added) into the DF Column and let stand for 1 minute. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds then discard the flow-through. • Place the DF Column back in the 2 ml Collection Tube. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 3 minutes to dry the column matrix.
Step 3 DNA Elution	• Transfer the dried DF Column to a new 1.5 ml microcentrifuge tube. • Add 20-50 µl of Elution Buffer or TE into the CENTER of the column matrix. • Let stand for at least 2 minutes to ensure the Elution Buffer is completely absorbed. • Centrifuge for 2 minutes at 14-16,000 x g to elute the purified DNA. - NOTE: Using pre-heated Elution Buffer (60°C) is recommended for eluting DNA fragments >8kb.

PCR Clean Up Protocol

IMPORTANT BEFORE USE!

- Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to Wash Buffer prior to initial use
- Additional Requirements: absolute ethanol, microcentrifuge tubes

Sample Prep.	• Transfer up to 100 µl of reaction product to a 1.5 microcentrifuge tube. • Add 5 volumes of DF Buffer to 1 volume of the sample and mix by vortex.
Step 1 DNA Binding	• Place a DF Column in a 2 ml Collection Tube. • Transfer the sample mixture to the DF Column. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds. • Discard the flow-through then place the DF Column back in the 2 ml Collection Tube.
Step 2 Wash	• Add 600 µl of Wash Buffer (make sure ethanol was added) into the CENTER of the DF Column. • Let stand for 1 minute at room temperature. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds. • Discard the flow-through and place the DF Column back in the 2 ml Collection Tube. • Centrifuge for 3 minutes at 14-16,000 x g to dry the column matrix.
Step 3 DNA Elution	• Transfer the dried DF Column to a new 1.5 ml microcentrifuge tube. • Add 20-50 µl of Elution Buffer or TE into the CENTER of the column matrix. • Let stand for at least 2 minutes to ensure the Elution Buffer is completely absorbed. • Centrifuge for 2 minutes at 14-16,000 x g to elute the purified DNA.

NOTE: Using pre-heated Elution Buffer (60°C) is recommended for eluting DNA fragments >8kb.

Troubleshooting

Problem	Possible Reasons/Solution
Low Yield	Gel slice did not dissolve completely • The Gel slice was too big. If using more than 300 mg of gel slice, separate it into multiple tubes. • Raise the incubation temperature to 60°C and extend the incubation time.
	Incorrect DNA Elution Step • Ensure that the Elution Buffer is completely absorbed after being added to the center of the DF Column.
	Incomplete DNA Elution • If the DNA fragments are larger than 8 kb, use pre-heated Elution Buffer (60-70°C) in the Elution Step to improve the elution efficiency.
Eluted DNA doesn't perform well in downstream applications	Residual ethanol contamination • Following the Wash Step, dry the DF Column with additional centrifugation at 14-16,000 x g for 5 minutes or incubate at 60°C for 5 minutes.
	DNA was denatured (a smaller band appeared on gel analysis) • Incubate the eluted DNA at 95°C for 2 minutes, and then cool down slowly to re-anneal the denatured DNA.
Low A260/A230	• In the wash step, repeat the 600 µl of Wash Buffer addition and let stand for 1 minute.

Related DNA Extraction Products

Plasmid DNA Purification		
Product	Package Size	Catalogue Number
Presto™ Mini Plasmid Kit	100/300 preps	PDH100/300
Presto™ Midi Plasmid Kit	25 preps	PIF025
Presto™ Midi Plasmid Kit (Endotoxin Free)	25 preps	PIFE25
High-Speed Plasmid Mini Kit (10-50 Kb)	100/300 preps	PDL100/300
High-Speed Plasmid Advance Kit (50-100 ml)	25 preps	PA025
Geneaid™ Plasmid Mini Kit	40/100 preps	PAE040/100
Geneaid™ Plasmid Midi Kit	25 preps	PI025
Geneaid™ Plasmid Midi Kit (Endotoxin Free)	25 preps	PIE25
Presto™ Plasmid DNA Concentration Kit	250/500/1000 preps	PC0250/500/1000
Geneaid™ Plasmid Maxi Kit	10/25 preps	PM010/25
Geneaid™ Plasmid Maxi Kit (Endotoxin Free)	10/25 preps	PME10/25
Presto™ 96 Well Plasmid Kit	4/10 x 96 preps	96PDV04/10, 96PDC04/10
Presto™ Plasmid 96 Well Binding Plate	10 plates	96PBP01
Presto™ Plasmid 96 Well Filter Plate	10 plates	96PFP01
Post Reaction DNA Purification		
Product	Package Size	Catalogue Number
GeneFlow™ Gel Extraction Kit	100/300 preps	DFG100/300
GeneFlow™ PCR Cleanup Kit	100/300 preps	DFC100/300
GeneFlow™ Gel/PCR Kit	100/300 preps	DFH100/300
GeneFlow™ DNA Cleanup Maxi Kit	10/25 preps	DFM010/025
Small DNA Fragments Extraction Kit	100/300 preps	DF101/301
Presto™ Max Gel/PCR Kit (Large DNA Fragments)	100/300 preps	DFL100/300
Presto™ 96 Well PCR Cleanup Kit	4/10 x 96 preps	96DFH04/10
Presto™ PCR Cleanup Kit 96 Well Binding Plate	10 plates	96DBP01
DNA Pure Kit	100/300 preps	DP100/300
G-25 Gel Filtration Desalting Column	50 rxns	CG025
G-50 Gel Filtration Dye Terminator Removal Column	50 rxns	CG050
96-Well G-50 Gel Filtration Plate	4/10 x 96 rxns	CGP04/10
Gel Extraction Tool	25 pcs	GXT025
Genomic DNA Extraction and Purification		
Product	Package Size	Catalogue Number
Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell)	100/300 preps	GB100/300
Genomic DNA Midi Kit (Blood/Cultured Cell)	25 preps	GDI25
Genomic DNA Maxi Kit (Blood/Cultured Cell)	10/25 preps	GDM10/25
Genomic DNA Mini Kit (Tissue)	50/100/300 preps	GT050/100/300
gSYNC™ DNA Extraction Kit	100/300 preps	GS100/300
Genomic DNA Mini Kit (Plant)	100 preps	GP100
Genomic DNA Maxi Kit (Plant)	10/25 preps	GPM10/25
Geneaid™ DNA Isolation Kit (Blood)	100/1,000 rxns	GB100/01K(+)
Geneaid™ DNA Isolation Kit (Bacteria)	300/3,000 rxns	GEE300/03K(+)
Geneaid™ DNA Isolation Kit (Tissue)	150/1,500 rxns	GET150/1.5K(+)
Geneaid™ DNA Isolation Kit (Cultured Cell)	150/1,500 rxns	GEC150/1.5K(+)
GENEzol™ DNA Reagent Plant	100/200 rxns	GR100/200
Presto™ Mini gDNA Yeast Kit	100/300 preps	GBY100/300
Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit	100/300 preps	GBB100/101/300/301
Geneius™ Micro DNA Extraction Kit	100/300 preps	GMB100/300
Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit	100/300 preps	GSK100/300
DNA RNA Purification		
Product	Package Size	Catalogue Number
Presto™ DNA RNA Extraction Kit	50/100 preps	DR050/100

For additional product information please visit www.geneaid.com. Thank you!



(5) ملحق

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

BIONEER
Innovation • Value • Discovery**100 bp DNA Ladder** DNA Molecular Weight Markers

Bioneer Corporation
8-11, Munpyeongseo-ro
Daedeok-gu, Daejeon 305-220
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: orderusa@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 μ l

[Concentration]
135 ng/ μ l



Consult
Instruction For
Use



RUO Research Use
Only



REF Catalog
Number



LOT Batch code



USE BY



Temperature
Limitation



Contains sufficient
for (n) tests



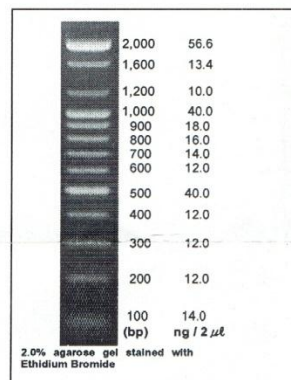
Caution, consult
accompanying
documents

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 μ l/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 μ l
D-1020	25/100 bp Mixed DNA Ladder, 250 μ l
D-1030	100 bp DNA Ladder, 250 μ l
D-1035	100 bp Plus DNA Ladder, 500 μ l
D-1040	1 Kb DNA Ladder, 500 μ l
D-1050	Lambda DNA / Hind III Markers, 100 μ g
D-1060	Lambda DNA / EcoR I Markers, 100 μ g
D-1070	Lambda DNA / EcoR I + Hind III Markers, 100 μ g
D-2510	Lambda DNA, 250 μ g
D-1030-1	AccuLadder 100bp 320 μ l x 2
D-1040-1	AccuLadder 1Kb 500 μ l x 2

ملحق (6)

كتاب تشخيص عينات نحلة العراقية *A. mellifera*

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 : ٩٨٦
التاريخ : ٢٠١٦ / ١٠ / ٣

إلى / جامعة ديالى / كلية التربية للعلوم الصرفة
الدراسات العليا
م / تشخيص حشرات

تحية طيبة :

إشارة الى كتابكم ذي العدد 2810 والمؤرخ في 2016 / 9 / 19 والخاص بتسهيل مهمة طالبة الدراسات العليا / ماجستير / سارة ثامر محمد / علم الحيوان / كلية التربية للعلوم الصرفة . فقد تم إجراء اللازم من قبلنا وحسب التقرير المرفق طياً .

مع التقدير

المرفقات :
تقرير التشخيص

أ.م.د. عامر متعب حسين
مدير المركز
٢٠١٦ / ١٠ / ٣

جامعة بغداد
مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي
باب المصفاة

نسخة منه إلى :
مكتب السيد المدير
قسم الحشرات واللافقرات - تقريركم المرقم 402 في 2016 / 10 / 3
الملف 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: 2016 / 10 / 3

Date

الرقم : 402

قسم الحشرات واللافقريات

م / تشخيص حشرات

إن الحشرات المرسلة لنا من قبل طالبة الدراسات العليا / ماجستير / سارة ثامر محمد /
تخصص علم الحيوان / كلية التربية للعلوم الصرفة . قد تم تشخيصها وكالاتي :

Apis mellifera Linnaeus
(Hymenoptera ; Apidae)

تم التشخيص من قبل الاستاذ المساعد الدكتور رزاق شعلان عكل والاستاذ المساعد الدكتورة هناء
هانى الصفار



الدكتورة هناء هانى الصفار
رئيس قسم الحشرات واللافقريات

Abstract

Molecular and quantitative genetic relationships have studied among three communities For Iraqi honey bee *A. mellifera* L., which there Samples were collected from the northern regions of Iraq represented in the province of Sulaymaniyah and its middle region represented by the province of Diyala and southern region, represented by the province of Basra, 50 insect of honey bee *A. mellifera* L. were collected from the said regions for the purpose of studying; Partial life methods were used in this study to discover the molecular genetic diversity and quantitative genetic for the honey bees in Iraq.

DNA was isolated from honey bee by using extraction kit; genomic DNA, Mini Kit-Tissue. Then, piece of DNA isolated mitochondria has been inflated, consisted from gene DNA 16Sr and gene CO1 and ND5 by using Polymerization reaction technique by the existing of three pairs of specific primers as couple for each gene with two opposite directions; forward and reverse. After that a Sequential Sequence Study was conducted upon a part of gene mitochondria ND5 and COI by the test of PCR; Six samples of population communities, two of them for each region, thus the result shows that there is genetically simple variation among northern, middle and Samples of the southern region on the other hand and this variation is a point mutations of delete and replace when comparing the sequence of nitrogen bases among the studied population groups, also the most frequency local sample was compared in gene sequence of nitrogen bases COI and ND5 with two samples of bank gene for each one which was belongs to Evolutionary Line for the Western Mediterranean M, special line of Africa A, the second gene; we can say that it was compared with international gene bank that belongs to evolutionary line for Asia of North Mediterranean Sea . when comparing the sample of *A.mellifera mellifera*

with local study sample *A. mellifera* L., it was found that the total number of mutation is 9, 2 of them delete and 7 replace ones, the type of *A. mellifera* syriaca we noticed that the number of mutation is 14, 4 delete and 10 replace. Finally sample 5 *A.mellifera* haplotype , we see that the total number of its mutation is 42 consists from 35 delete and 7 replace. Engineering scale system was used to discover the quantitative genetic changes in the shape and size of forward wing among population communities of honey bees which was collected from different areas in Iraq. So , The rate of the central size of the right wing is 754.45, 732.25, 717.42 micron to the population communities of northern, middle and southern areas in Iraq, whereas the value of variation in the central size of right wing is 358.14, 189.76, 423.04 for the population communities.

Tests of F, T were used to compare between the honey bees of population communities in the three studied regions of northern region samples and honey bees of middle area sample and southern area samples and it was noticed that there is no any significant differences among the insects of three areas in the rate of the central size of the right wing and there is a significant differences in the size and shape of right wing to some of honey bees due to the environmental differences in the three said areas which was collected the samples from it while using the Analysis of variance ANOVA.

Ministry of Higher Education and scientific Research

Diyala University

College of Education pure science

Department of Biology



**Molecular and Quantitative Genetic
Analysis for Honey Bee *Apis mellifera*
Linnaeus, 1758 by Using Three Genetic
Regions of mt DNA in Iraq**

A thesis by

Sara Thamer Mohammed AL-Hamadany

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
Bachelor of Biology 2014

Supervisor

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

A.D 2017

A.H 1438

