

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

عمار احمد سلطان القرعة غولي

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Chrysomya*

*bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم

البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

عمار احمد سلطان القرعة غولي

قسم علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى - ديالى - العراق

### الخلاصة

استعمل في هذه الدراسة تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR للكشف عن العلاقة الوراثية بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Chrysomya bezziana* من شمال العراق محافظة السليمانية ووسط العراق محافظة ديالى وجنوب العراق محافظة ميسان . ان الظروف البيئية مثل درجات الحرارة والرطوبة النسبية وكمية الامطار السنوية كانت مختلفة في شمال ووسط وجنوب العراق ، بالاضافة الى ان شمال العراق يبعد عن جنوب العراق بمسافة تقدر بحوالي 1000 كم ويبعد عن وسط العراق بمسافة تقدر بحوالي 500 كم او اقل ، وكذلك هنالك بعض الجبال والانهار التي تفصل شمال العراق عن وسطه وجنوبه ، ان كل من الظروف البيئية وبعد المسافات بين مناطق الدراسة الثلاثة تعمل كحواجز جغرافية تمنع من تدفق الجينات بين المجتمعات السكانية الثلاثة للذبابة الحلزونية . استخدم في هذه الدراسة سبعة بوادئ عشوائية وادوات وبرامجيات التحليل الوراثي للمجتمعات السكانية لحساب النسبة المئوية لكفاءة كل بادئ والنسبة المئوية للمقدرة التمييزية لكل بادئ بالاضافة الى تحليل الهوية الوراثية لكل مجتمع سكاني . اظهرت النتائج ان البوادئ العشوائية رقم 3 ، 4 و 6 اعطت اعلى عدد من الحزم ذات التعددية الشكلية وهو 7 حزمة وكذلك اعطت اعلى نسبة مئوية لكفاءة البادئ وهي 20 و اعلى نسبة مئوية للمقدرة التمييزية وهي 21.2 بينما اعطى البادئ رقم 2 اقل عدد من الحزم ذات التعددية الشكلية وهو 2 وايضا اعطى اقل نسبة مئوية لكفاءة البادئ وهي 5.71 و اقل نسبة مئوية للمقدرة التمييزية وهي 6.06 . و عند المقارنة بين المجتمعات السكانية الثلاثة لذبابة الدودة الحلزونية *Ch. bezziana* من خلال الهوية الوراثية لوحظ ان الذبابة الحلزونية من شمال العراق قريبة وراثيا من الذبابة الحلزونية من وسط العراق اذ بلغت درجة التقارب الوراثي 0.111 بينما الذبابة الحلزونية من جنوب العراق بعيدة وراثيا عن الذبابة الحلزونية من شمال العراق اذا بلغت درجة التقارب الوراثي

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

عمار احمد سلطان القرّة غولي

0.264 بينما كانت قريبة وراثيا من الذبابة الحلزونية من وسط العراق اذ بلغت درجة التقارب الوراثي 0.127 ، هنالك انخفاض واضح في مستوى الهوية الوراثية بين المجتمعات السكانية الثلاثة وهذا يشير الى حقيقة ان الظروف البيئية كانت بمثابة حاجز امام تدفق الجينات بين المجتمعات السكانية الثلاثة للذبابة الحلزونية .  
الكلمات المفتاحية : ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم ، تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي ، شمال ، وسط وجنوب العراق .

## Genetic variation among three population for Old World Screwworm *Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) in Northern, Middle and Southern of Iraq by using RAPD-PCR technique

Ammar Ahmed Sultan AL-Qeraqouly

Biology dept. - Collage of education for pure science - Diyala University - Diyala-Iraq

[ammar.mohamed@puresci.uodiyala.edu.iq](mailto:ammar.mohamed@puresci.uodiyala.edu.iq)

Received: 2 November 2016

Accepted: 28 November 2016

### Abstract

Randomly amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction RAPD-PCR technique was used in this study to investigate genetic relationship among three populations of Old World Screwworm *Chrysomya bezziana* from Northern, Middle and Southern Iraq. Environmental conditions such as temperature, relative humidity and the amount of annual rainfall to be different in the northern, Middle and Southern Iraq , In addition to the northern of Iraq away from the southern a distance of 1,000 km and away from the middle distance of approximately 500 km or less, as well as there are some mountains and rivers separating northern Iraq from the middle and south , these environmental conditions act as geographical barriers to gen flow among the three population. We have used in this study seven primers and Tools For Population Genetic Analysis (TFPGA) software was used to calculate percentage efficiency of each primer and percentage of discriminatory ability of each primer , In addition to Nei's genetic identity. The results showed that the primers No. 3 , 4 and 6 gives The highest number of polymorphism

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

عمار احمد سلطان القرعة غولي

and highest of percentage efficiency and percentage of discriminatory ability which is 7, 20 and 21.2 respectively ., While primer No. 2 gave The lowest of polymorphism and percentage efficiency and percentage of discriminatory ability which is 2 , 5.71 and 6.06 respectively ., When comparing among three population through genetic identity observed that *Ch.bezziana* of northern Iraq close genetically to *Ch.bezziana* of middle Iraq, the degree of genetic convergence is 0.111. While *Ch.bezziana* of northern Iraq far from the genetically *Ch.bezziana* from southern Iraq, the degree of genetic convergence is 0.264 . While they are close genetically to *Ch.bezziana* of middle Iraq the degree of genetic convergence is 0.127 . which reveals that there is a low level of genetic identity reflecting the fact that the environmental conditions appear to act as a barrier to gene flow among these populations.

**Key words :** *Chrysomya bezziana* , RAPD-PCR , Southern , Middle , Northern Iraq

### المقدمة

النبر Myiasis حالة مرضية تنسب عن تطفل يرقات بعض أنواع حشرات ثنائية الأجنحة Diptera على الأنسجة الحية مؤدياً بذلك إلى مشاكل طبية وبيطرية خطيرة وخسائر اقتصادية جسيمة في الثروة الحيوانية (Zumt, 1965). تتميز الإصابة بذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم بوجود اعداد متفاوتة من اليرقات في جسم الحيوان المصاب حيث تخترق هذه اليرقات الجلد وتعمل تجاوبف داخل انسجة منطقة الاصابة محدثة تخثرات وارتشاح سوائل مصلية بنية اللون مع تهتك شديد في انسجة الجروح جاسم، (1998). ومن الممكن ايجاز التأثيرات المرضية لهذه الحشرة في الحيوانات المصابة كما يلي :

1- التأثير الكلومي Traumatic effect : ويحدث بسبب تمزق انسجة بالكلايب الموجودة في مقدمة اليرقة مما يؤدي الى تهتك تلك الانسجة وخروج السوائل المصلية منها بصورة مستمرة .

2- التأثير المهيج Irritant effect : ويحدث بسبب الحركة الثاقبة لليرقة عن طريق الاشواك المتواجدة في جسمها ، محدثة حالة هياج قوي للحيوان اذ لوحظ قيام الحيوانات بحك مكان الاصابة بأي شيء صلب قريب منها محاولة التخلص منها ، في الوقت الذي ادت الاصابة في الاذن في الكلاب الى الانتحار برمي انفسهم في الانهر القريبة ( العاني ، 1998 ) .

3- التأثير السمي Toxic effect : يحدث بسبب افرازات اليرقة للفضلات اذ يؤدي ذلك الى قتل موضعي للانسجة الحية المصابة وتجذب الرائحة الناتجة من الفضلات اعداد اخرى من الذباب لتضع بيوضها على الجرح مؤدية الى تفاقم الجرح واتساع الاصابة (العاني ، 1998) .

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

عمار احمد سلطان القرعة غولي

4- التلوث الثانوي Secondary contamination : ويحدث بسبب اصابة الجرح بالبكتيريا والفطريات وغيرها من الجراثيم مما يؤدي الى تكوين الصديد وقد يؤدي بعد ذلك الى تجرثم الدم مما يؤدي الى هلاك الحيوان وهذا اكده رشيد ( 1998 ) . كما تمكن Humphrey et al. (1980) من عزل بكتيريا سالبة لصبغة كرام *proteus mirabilis* من جروح مصابة ببرقات ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم . ان الجروح ليست هي المدخل الاساسي لحدوث الاصابة بذبابة الدودة الحلزونية وانما قد تحدث الاصابة طبيعية في فتحات الجسم المختلفة من المجاري التنفسية ، العين ، الاذن ، الفم ، الفتحات التناسلية وفتحة الشرج كذلك الجروح الناتجة من عمليات الولادة العسرة او في الحبل السري للحيوانات حديثة الولادة (Hall , 1997) (Hall and Beesley , 1990) ; ويمكن للجروح الصغيرة الناجمة من عضه القراد ان تكون مدخلاً لأصابه الحيوان بهذه الافة (Ahrenst et al. , 1977; Allen , 1951) لذلك يجب اتخاذ الاجراءات اللازمة للوقاية والسيطرة ولتكن معالجة الجروح هي الخطوة الاولى في طريق السيطرة . من أهم أنواع الذباب المسبب للنير ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم Old World Screw – worm fly وتسمى علمياً *Chrysomya bezziana* (Villeneuve) وهي من الطفيليات الاجبارية obligate parasites التي تصيب الحيوانات ذات الدم الحار وكذلك الانسان (Humphrey et al. , 1980) سجلت أولى حالات النير بهذه الافة في العراق في شهر ايلول عام 1996 من قبل الهيئة العامة للبيطرة / وزارة الزراعة اذ كانت الحالة إصابة بقرة من منطقة الشيخ حمد / التاجي / بغداد وشخصت من قبل متحف التاريخ الطبيعي العراقي وأكد التشخيص من قبل المتحف البريطاني ( Abdul – Rassul et al., 1996 ) . ثم توسعت حالات الإصابة شرقاً فسجلت في محافظة ديالى وصولاً الى منطقة خانقين قرب الحدود الايرانية وجنوباً في الفرات الاوسط (بابل ، كربلاء ، النجف ، القادسية ، المثنى ) ثم سجلت غربا في ( الانبار ، صلاح الدين ) فضلاً عن تسجيل حالات اصابه فردية في المحافظات الجنوبية ( ذي قار ، البصرة ، ميسان ) (العزي ، 2000) ان نجاح تقنية اطلاق الحشرات العقيمة Release method(SIRM) Sterile insert في استئصال ذبابة الدودة الحلزونية للعام الجديد New World Screw – worm fly *Cochliomyia hominivorax* في جزيرة كوراكو (baumhover et al. , 1955) . أعقبها النجاحات التي حققتها هذه التقنية في استئصال هذه الافة من الولايات المتحدة الأمريكية والمكسيك والعديد من مناطق أمريكا اللاتينية ( Spradbery , 1994 ). وأخيراً من ليبيا (Lindquist et al. , 1992) جعل هذه التقنية مرشحة للاستخدام في السيطرة على ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم . وان استخدام هذه التقنية يتطلب انجاز العديد من الدراسات منها دراسة التغيرات الوراثية الخلوية وذلك لكون المادة الوراثية تعتبر أساسية لتطور الكائنات الحية. كما وان دراسة التغيرات الوراثية توفر معلومات اساسية حول تطابق السلالات أي السلالة المنتجة مختبراً والسلالة البرية المراد مكافحتها. كما ان التحاليل المتعلقة بالتغيرات الوراثية للأنواع تسهم في تكوين علاقة وراثية بين الانواع مثلاً هذه الدراسات تعطي معلومات اضافية عن اصل وتركيب الهيئة الوراثية للأنواع التابعة لجنس واحد ( Todorova and Iakova , 1978 ).

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل أنزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

عمار احمد سلطان القرعة غولي

وتهدف الدراسة الحالية إلى استخدام تقنية أنزيم تفاعل البلمرة المتسلسل العشوائي لمعرفة نسبة التقارب الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية للعالم القديم من شمال ووسط وجنوب العراق وهذا بدوره يعتبر من متطلبات تطبيق تقنية الحشرات العقيمة للقضاء على هذه الآفة مستقبلاً .

### المواد وطرائق العمل

تم اجراء هذا البحث في مختبر التحليلات الوراثية الجزيئية التابع الى قسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى . جمعت 30 حشرة بالغة للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال ووسط وجنوب العراق وبواقع 10 حشرات من كل منطقة وتم حفظها في كحول الايثانول وبتركيز 70 % لغرض استخلاص الدنا ، تم استخلاص الدنا من الحشرات المجموعة من كل منطقة باستعمال الكت Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Protocol والمجهز من قبل شركة Bioneer company / Korea بعد ذلك تم قياس نقاوة الدنا المستخلص من خلال تخفيف العينة بإضافة 495 مايكروليتر من الماء المقطر إلى 5 مايكروليتر من دنا العينة وقراءة امتصاص العينة للأشعة فوق البنفسجية بجهاز Spectrophotometer الذي يستعمل لقياس الكثافة الضوئية ( O.D ) عند الطولين الموجيين 260 ، 280 نانوميتر وتطبيق القانون الآتي :

تركيز الدنا ( mg/ml ) = مقدار الامتصاصية عند الطول الموجي 260 لمل واحد من العينة x مقلوب التخفيف x 50 ، أما النقاوة = الامتصاصية عند الطول الموجي 260 / الامتصاصية عند الطول الموجي 280 ، هذه النسبة هي إحدى المؤشرات الدالة على كفاءة الاستخلاص ومدى تلوث الحامض النووي بالبروتين وكانت نقاوة الدنا المستخلص تتراوح بين 1.8 – 2 ، وبعد ذلك تم حفظ الدنا المستخلص في درجة حرارة  $20^{\circ}\text{C}$  - لحين الاستعمال (Maniatis *et al.*, 1982) .

استعمل في هذا البحث سبعة بوادئ عشوائية تم تصميم التسلسل النيوكليوتيدي لها من قبل شركة Bioneer كما موضحة في جدول (1) ، تم اعداد خليط التفاعل في درجة حرارة 4 م ° وكان المجموع الكلي للخليط 20µl ويتكون من 5 µl من AccuPower® PCR PreMix والذي يتكون من Top DNA polymeras 1U , d NTP 250µM , Tris-HCl 10m M , KCl 30m M , MgCl<sub>2</sub> 1.5m M و 4µl من البادئ بتركيز 10 picomoles و 5µl من دنا العينة و 6µl ماء مقطر منزوع الايونات . وبعد ذلك تم وضع خليط التفاعل لكل عينة في جهاز MULTIGENE OPTIMAX thermal cyler وبرمجته على وفق البرنامج الموضح في جدول (1) . بعد انتهاء وقت التفاعل تم ترحيل خليط التفاعل لكل عينة على هلام الاكاروز بتركيز 1 % (Sambrook *et al.*, 1989) ، وبعد انتهاء عملية الترحيل تم تصوير الهلام بواسطة جهاز Biovis Gel Documentation System وتم الكشف عن الحزم لكل بادئ وتحديد الوزن الجزيئي لكل حزمة باستعمال برنامج Biovis V4 1D gel analysis software وهذا البرنامج يعمل على اساس ظهور او عدم ظهور

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

عمار احمد سلطان القرعة غولي

الحزمة لكل عينة ومن كل منطقة من مناطق جمع الحشرة ، وكذلك استعمل في هذا البحث ادوات التحليل الوراثي للمجموعة السكانية (Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) Software (Miller , 1997) وهذه الادوات استخدمت لحساب Nei's (1972) لتحديد الهوية الوراثية لكل مجموعة سكانية ، وتم حساب النسبة المئوية لكفاءة كل بادئ من خلال المعادلة الآتية :

(العدد الكلي لحزم البادئ / العدد الكلي لحزم كل البادئات)  $\times 100$  . اما حساب النسبة المئوية للمقدرة التمييزية لكل بادئ

فتم من خلال المعادلة : (عدد الحزم المتباينة للبادئ / عدد الحزم المتباينة لكل البادئات)  $\times 100$

. (Grudman *et al.*,1995)

جدول (1) تسلسلات البوادئ العشوائية المستخدمة في البحث مع ظروف التفاعل

Primer	Nucleotide sequence (5-3)	Amplification Profile	Reference
1	CCAGCCGAAC	Initial denaturation at 94c° for 5 min ( 1 cycle ) , 45 cycles of denaturation at 94c° for 1 min annealing at 36C tor I min , extension at 72c° for 2 min and a final extension at 72c° for 7 min ( 1 cycle )	Infante- Malachias <i>et al</i> (1999)
2	GACTAGGTGG		
3	GGGACGTTGG		
4	AGGGTCGTTTC		
5	TGCGTGCTTG		
6	GTCCCACGA		
7	TGATCCCTGG		

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

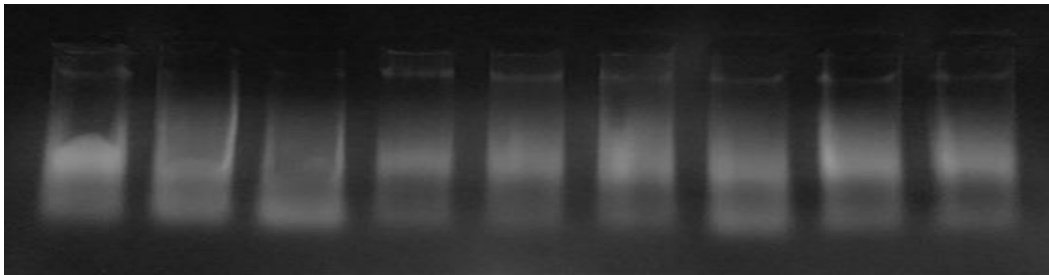
*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

عمار احمد سلطان القرعة غولي

### النتائج

N1	N2	N3	M1	M2	M3	S1	S2	S3
----	----	----	----	----	----	----	----	----

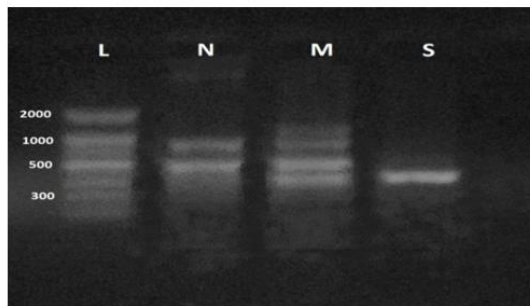


صورة (1) نواتج الدنا المعزول من ذكور واناث الذبابة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* المجموعة من شمال ووسط وجنوب العراق والمرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1 % وفرق جهد 100 فولت ولمدة ساعة ونصف والمصور تحت الاشعة فوق البنفسجية UV بعد التصبغ بصبغة برومايد الاثيديوم

N1, N2, N3 Samples of *Chrysomya bezziana* from North Iraq

M1, M2, M3 Samples of *Chrysomya bezziana* from Medial Iraq

S1, S2, S3 Samples of *Chrysomya bezziana* from South Iraq



L.	M.W	N	M	S
1	990	1	1	0
2	500	1	1	0
3	430	0	0	1
4	407	0	1	0

صورة (2) نماذج حزم تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR المستمدة من البادئ الاول 5'' CCAGCCGAAC 3'' والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1 % وفرق جهد كهربائي 100 فولت لمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد التصبغ بصبغة برومايد الاثيديوم .

L: Ladder DNA (100 – 200 bp), N: *Chrysomya bezziana* from North Iraq, M: *Chrysomya bezziana* from Medial Iraq, S: *Chrysomya bezziana* from South Iraq.

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

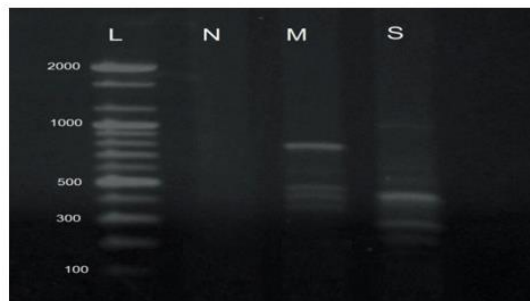
عمار احمد سلطان القرعة غولي



L.	M.W	N	M	S
1	710	1	0	0
2	475	1	0	0

صورة (3) نماذج حزم تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR المستمدة من البادئ الثاني "5' GACTAGGTGG 3" والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1 % وفرق جهد كهربائي 100 فولت لمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد التصبغ بصبغة برومايد الاثيديوم .

L: Ladder DNA (100 – 200 bp), N: *Chrysomya bezziana* from North Iraq, M: *Chrysomya bezziana* from Medial Iraq, S: *Chrysomya bezziana* from South Iraq.



L.	M.W	N	M	S
1	1000	0	0	1
2	795	0	1	0
3	498	0	1	0
4	704	0	1	0
5	345	0	1	0
6	297	0	0	1
7	200	0	0	1

صورة (4) نماذج حزم تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR المستمدة من البادئ الثالث "5' GGGACGTTGG 3" والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1 % وفرق جهد كهربائي 100 فولت لمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد التصبغ بصبغة برومايد الاثيديوم .

L: Ladder DNA (100 – 200 bp), N: *Chrysomya bezziana* from North Iraq, M: *Chrysomya bezziana* from Medial Iraq, S: *Chrysomya bezziana* from South Iraq.

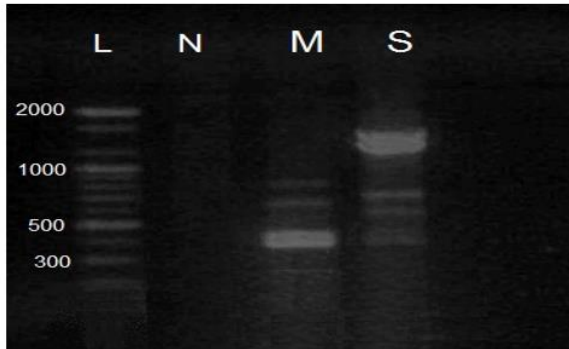


التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

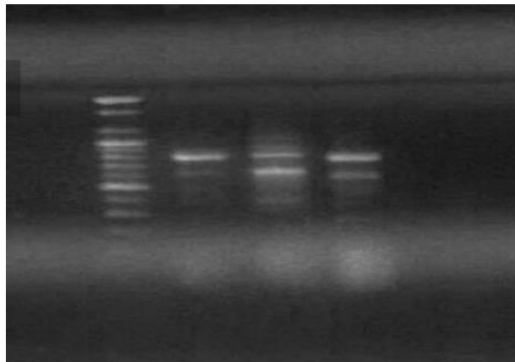
عمار احمد سلطان القرعة غولي



L.	M.W	N	M	S
1	1590	0	0	1
2	1300	0	0	1
3	850	0	1	0
4	710	0	0	1
5	960	0	1	0
6	595	0	1	0
7	410	0	1	0

صورة (5) نماذج حزم تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR المستمدة من البادئ الرابع 5'' 3'' AGGGTCGTTT والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1 % وفرق جهد كهربائي 100 فولت لمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد التصبغ بصبغة برومايد الاثيديوم .

L: Ladder DNA (100 – 200 bp), N: *Chrysomya bezziana* from North Iraq, M: *Chrysomya bezziana* from Medial Iraq, S: *Chrysomya bezziana* from South Iraq.



L.	M.W	N	M	S
1	800	1	1	1
2	660	1	1	0
3	600	0	0	1
4	365	0	1	0

صورة (6) نماذج حزم تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR المستمدة من البادئ الخامس 5'' TGC GTGCTTG 3'' والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1 % وفرق جهد كهربائي 100 فولت لمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد التصبغ بصبغة برومايد الاثيديوم .

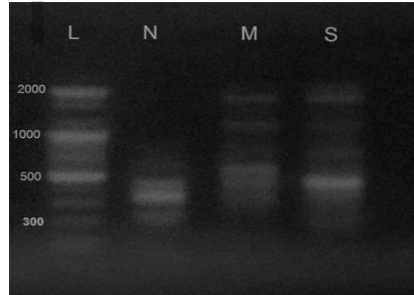
L: Ladder DNA (100 – 200 bp), N: *Chrysomya bezziana* from North Iraq, M: *Chrysomya bezziana* from Medial Iraq, S: *Chrysomya bezziana* from South Iraq.

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

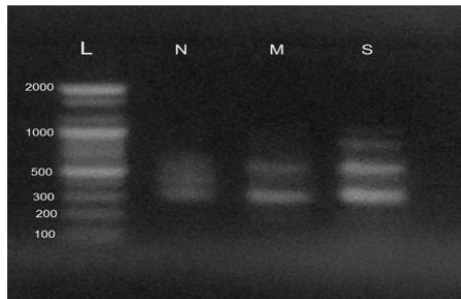
عمار احمد سلطان القرعة غولي



L.	M.W	N	M	S
1	1959	0	1	1
2	1200	0	1	1
3	760	0	0	1
4	570	0	1	0
5	497	1	0	1
6	416	1	0	0
7	300	1	0	0

صورة (7) نماذج حزم تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR المستمدة من البادئ السادس  
3" GTCCCGACGA 5" والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1 % وفرق جهد كهربائي 100 فولت لمدة ساعة  
ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد التصبغ بصبغة برومايد الاثيديوم .

L: Ladder DNA (100 – 200 bp), N: *Chrysomya bezziana* from North Iraq, M: *Chrysomya bezziana* from Medial Iraq, S: *Chrysomya bezziana* from South Iraq.



L.	M.W	N	M	S
1	1000	0	0	1
2	910	0	1	1
3	516	0	1	1
4	300	1	1	1

صورة (8) نماذج حزم تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR المستمدة من البادئ السابع 5"  
3" TGATCCCTGG والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1 % وفرق جهد كهربائي 100 فولت لمدة ساعة  
ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد التصبغ بصبغة برومايد الاثيديوم .

L: Ladder DNA (100 – 200 bp), N: *Chrysomya bezziana* from North Iraq, M: *Chrysomya bezziana* from Medial Iraq, S: *Chrysomya bezziana* from South Iraq.

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

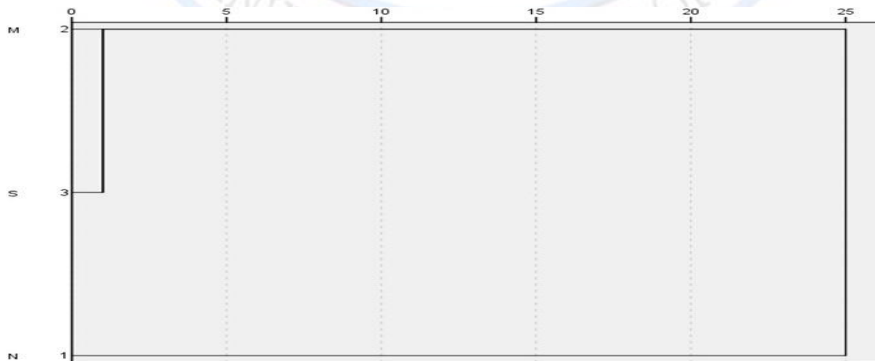
عمار احمد سلطان القرعة غولي

جدول (2) المقارنة بين البوادي المستخدمة من ناحية العدد الكلي للحزم وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية والاوزان الجزيئية والنسبة المئوية لكفاءة البادئ والنسبة المئوية للمقدرة التمييزية لكل بادئ بين ثلاث مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* في العراق .

النسبة المئوية للمقدرة التمييزية	النسبة المئوية لكفاءة البادئ	الاوزان الجزيئية	عدد الحزم ذات التعددية الشكلية	العدد الكلي للحزم	رقم البادئ
12.12	11.42	990 – 407	4	4	1
6.06	5.71	710 – 475	2	2	2
21.2	20	1000 – 200	7	7	3
21.2	20	1590 – 410	7	7	4
9.09	11.42	800 – 365	3	4	5
21.2	20	1959 – 300	7	7	6
9.09	11.42	1000 - 300	3	4	7

جدول (3) الهوية الوراثية على اساس المقارنة بين انماط حزم البوادي العشوائية المستخدمة في البحث لثلاث مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال ، وسط وجنوب العراق .

	<i>Ch.bezziana</i> (N)	<i>Ch.bezziana</i> (M)	<i>Ch.bezziana</i> (S)
<i>Ch.bezziana</i> (N)	0.00		
<i>Ch.bezziana</i> (M)	0.111	0.00	
<i>Ch.bezziana</i> (S)	0.264	0.127	0.00



شكل (1) مخطط Dendogram يمثل التقارب الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من شمال ، وسط وجنوب العراق .

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

عمار احمد سلطان القرعة غولي

### المناقشة

تعد تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR من الطرق الاكثر فعالية في تحليل التعددية الشكلية بين مجموعة متنوعة من الكائنات الحية (Skoda *et al.*, 2013 ; Bajpai and Tewari , 2010 ; Malviya *et al.* , 2010 and Chandra *et al.*, 2011). ان هذه التقنية يستخدم فيها بوادئ عشوائية وهذه البوادئ بدورها ترتبط في مواقع متعددة على جينوم الكائن الحي وتعطي انماط مختلفة من الحزم ، وهذه الانماط المختلفة من الحزم المنتجة بهذه التقنية هي سمة مميزة للحامض النووي DNA (Williams *et al.*, 1990). ان ظهور او غياب الحزم من تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل بعد الترحيل على هلام الاكاروز هو تشخيص مواقع ارتباط البادئ او عدم ارتباطها على الحامض النووي الجينومي للكائن الحي وبالتالي يمكن ان تستخدم المؤشرات الجزيئية العشوائية في توصيف وتقييم العلاقات الوراثية بين الكائنات الحية (Williams and Bartel , 1995). ان من مميزات تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR انها قليلة التكلفة وتحتاج الى كمية قليلة من الحامض النووي للدنا للكائن الحي ولا تحتاج الى اي معرفة مسبقة لتسلسل الحامض النووي للكائن ولها القدرة على تحديد المئات من المؤشرات الجيدة في وقت قصير (Hardrys *et al.*, 1992). تبين النتائج في جدول 2 ان البوادئ العشوائية رقم 3 ، 4 و 6 اعطت اعلى عدد من الحزم ذات التعددية الشكلية وهو 7 حزمة وكذلك اعطت اعلى نسبة مئوية لكفاءة البادئ وهي 20 و اعلى نسبة مئوية للمقدرة التمييزية وهي 21.2 وكما هو واضح في الصور 3 ، 4 و 6 بينما اعطى البادئ رقم 2 اقل عدد من الحزم ذات التعددية الشكلية وهو 2 وايضا اعطى اقل نسبة مئوية لكفاءة البادئ وهي 5.71 و اقل نسبة مئوية للمقدرة التمييزية وهي 6.06 وكما هو واضح في صورة 2 ، واعطت البوادئ 1 ، 5 و 7 حزم ذات تعددية شكلية متساوية تقريبا وهي 4 ، 3 و 3 على التوالي وكذلك اعطت نسبة مئوية لكفاءة البادئ متساوية وهي 11.42 والنسبة المئوية للمقدرة التمييزية هي 12.2 ، 12.2 و 9.09 على التوالي وكما هو واضح في الصور 1 ، 5 و 7. وعند المقارنة بين المجتمعات السكانية الثلاثة للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* من خلال الهوية الوراثية وكما هو واضح في جدول 3 ان الذبابة الحلزونية من شمال العراق قريبة وراثيا من الذبابة الحلزونية من وسط العراق اذ بلغت درجة التقارب الوراثي 0.111 بينما الذبابة الحلزونية من جنوب العراق بعيدة وراثيا عن الذبابة الحلزونية من شمال العراق اذ بلغت درجة التقارب الوراثي 0.264 بينما كانت قريبة وراثيا من الذبابة الحلزونية من وسط العراق اذ بلغت درجة التقارب الوراثي 0.127 وهذا واضح جدا في شكل 1 ، ان سبب عدم التجانس بين المجتمعات السكانية الثلاثة للذبابة الحلزونية *Ch.bezziana* قد يرجع الى حقيقة هو ان مواقع ارتباط البادئ العشوائي بقالب الدنا للحشرة يمتلك معدل طفرات عالي وبالتالي هذا يؤدي الى اعطاء تعددية شكلية كبيرة مقارنة مع المؤشرات الجزيئية الاخرى (Santons *et al.*, 2011). ان المناطق المختلفة من الجينوم للحشرة تتطور بمعدلات مختلفة والنسخة المفردة من الجينات تمتلك معدلات استبدال منخفضة نسبيا لان بعض التغيرات في التسلسل المشفر ربما قد يسبب تأثير شديد على البروتين المشفر المنتج . مع ذلك ان التغيرات في الحامض النووي الدنا المتكرر على ما يبدو لا يؤدي الى هذه النتائج وبالتالي فان تعدد الاشكال في هذه المناطق هو اكبر مقارنة مع

التغاير الوراثي بين ثلاثة مجتمعات سكانية لذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم

*Chrysomya bezziana* (Diptera: Caliphoridae) في شمال ، ووسط وجنوب العراق باستعمال تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل العشوائي RAPD-PCR

عمار احمد سلطان القرّة غولي

المناطق المشفرة (Li and Graur , 1991) . ان قيم الهوية الوراثية بين المجتمعات السكانية الثلاثة للذبابة الحلزونية كانت منخفضة وهذا ربما يعزى الى ان مناطق الدراسة التي شملت الحشرة كانت مفصولة فيما بينها بعدد من العوائق منها الجبال والانهار وبعد المسافات وهذا يؤدي بدوره الى منع تدفق الجينات فيما بينها (Srivastava , 2009) . ان التنوع الوراثي يعتمد على الاستيطان والمضائف والضعف الانجابية اذا كانت الانواع موزعة على مجموعة كبيرة متنوعة من الظروف البيئية ستكون وراثيا متغايرة مشججا مقارنة مع الانواع الموزعة على ظروف بيئية مقيدة (Narang , 1980 ; Santos , 2003) . ان ظهور التنوع او التباين في الذباب يعد ضروري لمساعدة الحشرة للبقاء على قيد الحياة والاستجابة بنجاح للضغوط البيئية (Sharma , et al., 2009).

### الاستنتاجات

تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي RAPD-PCR هي مؤشرات تشخيصية قوية ثابتة او متعددة الاشكال لتشخيص الاجناس وكذلك بين الانواع داخل الجنس الواحد ويمكن ايضا ان تستعمل لتوضيح العلاقة الوراثية بين الاجناس وبين الانواع التابعة للجنس الواحد وتستعمل ايضا لتوضيح علاقة النسب والتطور للاجناس والانواع ، وفي هذه الدراسة اظهرت نتائج تحليل تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل العشوائي بان المجتمع السكاني للذبابة الحلزونية من شمال العراق قريب وراثيا من المجتمع السكاني للذبابة الحلزونية من وسط العراق وبعيد عن المجتمع السكاني للذبابة الحلزونية من جنوب العراق والمجتمع السكاني للذبابة الحلزونية من وسط العراق قريب وراثيا من المجتمع السكاني للذبابة الحلزونية من جنوب العراق وهذا واضح جدا من الهوية الوراثية للمجتمعات السكانية الثلاثة .

### المصادر

1. العاني ، منتصر عمر .(1997). ذبابة الدودة الحلزونية من نوع *Chrysomya bezziana* في العراق وبائيتها وتهديدها للثروة الحيوانية في المشرق العربي. مجلة الزراعة والتنمية في الوطن العربي ، العدد الاول الصفحات 24 – 29 .
2. العزي ، محمد عبد جعفر . (2000) . وبائية ومكافحة ذبابة الدودة الحلزونية للعالم القديم *Ch.bezziana* . ورشة العمل القطرية الاولى في مجال مكافحة الحويوة للآفات الزراعية ، منطقة الطاقة الذرية العراقية . الصفحات 1 – 7 .
3. جاسم ، فاضل عباس . ( 1998 ) . الاصابة بذبابة الدودة الحلزونية في العراق . تقرير خاص بالهيئة العامة للبيطرة .
4. رشيد ، رؤوف عزيز . ( 1998 ) . ذبابة الدودة الحلزونية *chrysomya bezziana* وتأثيرها على الحيوان . منظمة الاغذية والزراعة للأمم المتحدة . مكتب تنسيق المحافظات الشمالية ، العراق .

5. Abdul – Rassoul, M.S, Ali, H.A. and Jassim, F.A. (1996). Notes on *chrysomya bezziana* (villeneuve) (Diptera: Calliphoridae), First recorded from Iraq, Bull. Iraq Nat His Mus, 8(4): 113 – 115.
6. Ahrens , E.H, Gladney , W.J, Whorter, G.M. and Deer , J.A. (1977). Prevention of screw – worm in festation in cattle by controlling gulf coast tick with slow release insecticide devices ,J.Econ. Entomol. 70:581-585.
7. Allen , G.W. ( 1951 ). The screw-worm menace . Alabama conservation , 22:11-16 cited in Agricultural Zoology Reviews ( Evans.K.ed ) 1994. 6:62.
8. Baumhover , A.H ,Graham , A.J, Bitter ,B.A, Hopkins. D.E , New , W.D ; Dudley , F.H. and Bushland , R.C. ( 1955 ). Screw-worm control through release of sterilized flies J. Econ Entomol , 48:462-467.
9. Bajpai , N. and Tewari, R.R.(2010). Genetic characterization of sarcophagi flies by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction ( RAPD-PCR ) Natl. Acad. Sci. 33:103-106.
10. Chandra, G.; Saxena, A. and Barat, A.(2010). Genetic diversity of two riverine populations of *Eutropiichthys vacha* (Hamilton, 1822) using RAPD markers and implications for its Conservation. J. Cell Mol. Biol., 8(2), 77-85.
11. Grudmann , H.; Schneider , C.; Hartung, D.; Daschner, F. D. and Pith, T. L. (1995). Discriminatory power of three DNA typing techniques for *P. aeruginosn* . J .clin . microbial. 3:528-532
12. Hall , M.J.R. (1997). Traumatic myiasis of sheep in Europe : a review parasitology , 39: 409-412.
13. Hall, M.J.R. and Beesley, W.N.(1990). The new world screw-worm fly in North Africa. Outlooks , 1(2):34-37 .
14. Hadrys , H. Balick , M. and Schierwater , B.(1992). Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol. Ecol.,1, 55-63.

15. Humphrey , J , D , Spradbery , J.P and Tozer , R.S. ( 1980 ). *Chrysomya bezziana*: Pathology of old world screw-worm fly in festation in cattle. *Exp. Parasitol* , 49:381-397.
16. Infante-Malachias, M.E.V.; Yotoko, K.S. and Azeredo-Espin, A.M.L.(1999). Random Amplified Polymorphic DNA of screwworm fly Populations (Diptera: Calliphoridae), from South-east of Brazil and North of Argentina. *Genome* 42: 772-779.
17. Li, W.H. and Graur, D.(1991). *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
18. Lindquist , D.A. Abusowa, M. and Hall , M.J.R. (1992). The new world screw-worm fly in Libya : A review of the its introduction and eradication. *Med. Vet. Entomol* , 6:2-8.
19. Malviya, S.; Bajpai, N. and Tewari, R.R.(2011). Genetic Relatedness among three populations of housefly, *Musca domestica* L. using RAPD - PCR marker. *Int. J. Pharm. BioSci.*, 2(4), 198-204.
20. Miller, M. N.(1997). *Tools for population genetic analysis (TFPGA)*. Department of Biological Sciences - Box 5640 , Northern Arizona University , Flagstaff, AZ 86011-5640 .
21. Narang, S.(1980). Genetic variability in natural populations, evidence in support of the selectionists view. *Experientia*. 36: 50-51.
22. Nei, M.(1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106: 283-292.
23. Santos, J.M.M.; Fraga, E.C.; Maia, J.F. and Tadei, W.P.(2011). Genetic Diversity in Dengue Mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Amazon Region : Comparative Analysis with Isozymes and RAPD Loci. *Open Trop. Med. J.*, 4, 11-20.
24. Santos, J.M.M.; Rodriguez, G.A.D.; Maia, J.F. and Tadei, W.P.(2005). Variability and genetic differentiation among *Anopheles(Ano) intermedius* Chagas, 1908 and *Anopheles(Ano) mattogrossensis* Lutz and Neiva, 1911(Diptera: Culicidae ) from the Brazilian Amazon. *Mem Inst.Oswaldo. Cruz.*, 100, 631-637.

25. Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T.(1989). Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 6.3-6.34. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
26. Scarpassa, V.M. and Hamada, N.(2003). Isozyme variation in four species of the Simulium perflavum species group (Diptera: Simuliidae) from the Brazilian Amazon. Genet. And Mol. Biol. 26: 39-46 .
27. Sharma, A.K.; Mendki, M.J.; Tikar, S.N.; Chandel, K.; Sukumaran, D. ; Parashar, B.D.; Vijay Veer, O.P.; Agarwal and Shri Prakash.(2009). Genetic variability in the geographical populations of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from India based on random amplified polymorphic DNA analysis. Acta tropica 112: 71-76.
28. Skoda, S.R.; Figarola, J.L.; Pornkulwat, S. and Foster, J.E.(2013). Inter- and intra-specific identification of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, using random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. J. Insect Sci., 13(76), 1-15.
29. Srivastava, S.(2009). Genetic variation in *Musca* (Diptera: Muscidae). D.Phil. Thesis, University of Allahabad, Allahabad, India .
30. Spradbery , J.P. (1976a). Daily oviposition activity and its adaptive significance in the screw-worm fly , *Chrysomya bezziana* (Diptera : Calliphoridae). J. Aust. Ent. Soc, 18:63-66.
31. Todorva , J.G and Lakaova , M. (1978). Kargological analysis of *Helianthus salicifolius* A. Deitr . The nucleus , 21(1) : 60-64.
32. Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.(1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.
33. Williams, K.P. and Bartel, D.P.(1995). PCR product with strands of unequal length. Nucleic Acids Res., 23(20), 4220-4221.
34. Zumpt , F.(1965) Myiasis in man and animals in the old world , London , Butter worths.