تشخيص الديدان السلكية التي تصيب درنات البطاطا بأستعمال تقنية PCR.

رضا صكب الجوراني* **فريال حسوني صادق**

* أستاذ مساعد - قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد . redha_aljorany@yahoo.coom .

المستخلص

أجريت دراسة حقلية في وسط العراق للفترة من 2009 – 2012 للكشف وتشخيص أنواع الديدان السلكية التي تعود الى الجنس *Agriotes* spp وتصيب درنات البطاطا وللزراعتين الربيعية والخريفية بأستعمال تقانة التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (Polymerase Chain Reaction PCR) للبالغات واليرقات . أظهرت النتائج عن وجود خمسة أنواع تعود للجنس *Agriotes* تصيب درنات البطاطا وهذه الانواع هي :

Agriotes lineatus (Linnaeus)، *Agriotes brevis* (Candeze).
*Agriotes obscurus (*Linnaeus) ، *Agriotes sputator* (Linnaeus)
Agriotes ustulatus (Schaller).

كذلك وجد تباعد وراثي بين أنواع الديدان السلكية المشخصة والتابعة للجنس *Agriotes* .

الكلمات المفتاحية : *Agriotes* ، RAPD ، ISSR ، الديدان السلكية ، تقانة التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا .

المقدمة

يمتلك محصول البطاطا *Solanum tuberosum* L. الذي يعود للعائلة الباذنجانية Solanaceae دوراً رئيساً في النظام الاقتصادي والغذائي البشري عن طريق تأمين الغذاء المناسب والذي يسهم جنباً الى جنب مع المحاصيل الاستراتيجية الأخرى في تغطية المتطلبات المتزايد للبشر الذين هم في ازدياد سكاني مطرّد مشكلاً ما يصطلح بالانفجار السكاني .

لقد سجل الانتاج العالمي للبطاطا عام 2007 رقما قياسيا وصل الى 325 مليون طن و بنسبة زيادة بلغت 4.5 % عن السنوات العشر التي سبقته وبمساحة مزروعة تزيد عن 20 مليون هكتار ، ويعد الفرد الاوربي من أكبر مستهلكي البطاطا في العالم ، في حين تعد المانيا من اكبر مستهلكي البطاطا لعام 2007 وبمعدل استهلاك 131 كغم / فرد / سنة على التوالي(FAO ،2008) . تتعرض البطاطا للأصابة بعده افات حشرية أهمها: عثة درنات البطاطا *Phthorimaea operculella* (Zell.) وحشرة المن *Aphis* spp والقفاز *Empoasca* spp والذبابة البيضاء *Bemisia tabacii* المعروفة بنقلها للأمراض الفايروسية (العزاوي ،1980) .

كذلك تصاب بخنفساء كولورادو البطاطا *Leptinotarsa decemlineata* (الجوراني والطويل ،2004). وتتعرض البطاطا للأصابة ايضا بحشرات التربة منها الديدان السلكية *Agriotes* spp والدودة القارضة الارضية *Agrotis ipsilon* وحشرة الكاروب *Gryllotalpa gryllotalpa* والتي تعتبر من الافات المهمة الرئيسية على محصول البطاطا في العراق (صادق،2007). تعد الديدان السلكية (Wireworms) من الافات المهمة والخطرة على البطاطا حيث تعد الأنواع التابعة لجنس *Agriotes* من أكثر الأنواع أهمية على محصول البطاطا مثل *A.sputatur* و*A. lineatus* و*A. obscurus* (Vernon و Pats،1997) .

تاريخ استلام البحث 1 / 10 / 2012 .
تاريخ قبول النشر 15 / 4 / 2013 .
البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني

تعيش يرقات الديدان السلكية في التربة وتعد من الافات الخطرة اذ تتغذى على الجذور والبذور لمعظم المحاصيل الزراعية والاعشاب وتعرف بمهاجمتها الشديدة لمحصول البطاطا ويكون ضررها أكبر عند تكرار زراعتها عدة مرات اذ تهاجم اليرقات درنات البطاطا ابتداء من تكونها مرورا بمراحل نموها نضجها المختلفة و تحدث بها انفاقا مختلفة الاعماق مما يؤدي الى انخفاض القيمة التسويقية للمحصول وتصبح مواضع تغذيتها محلات للاصابة بالفطريات والبكتريا (صادق ، 2007) .

ان تشخيص الافة الحشرية يعد الخطوة الاولى في دراسة حياتها وبيئتها وتقدير ضررها ومن ثم مقاومتها ، وتعد دراسة تشخيص الديدان السلكية التقليدية من الدراسات الصعبة وذلك لصعوبة التمييز مظهريا بين الانواع سواء كانت بالغات او يرقات فضلا عن معيشتها تحت سطح التربة ودورة حياتها الطويلة .ان تقانة PCR تمتاز بتفردها بعده مميزات هامة كالدقة والخصوصية والحساسية العالية في الكشف عن قطعة DNA معينة ضمن الاف من القطع لذلك أصبحت التقانة هذه ضرورة لابد منها في دراسات الوراثة الجزيئية ، فضلا عن انها طريقة عمل سهلة نسبيا وسريعة خاصة عند الحاجة لتحليل عينات عديدة . اصبح لهذا التفاعل تطبيقات واسعة منها دراسة التنوع الوراثي وايجاد البصمة الوراثية وكذلك في مجال تربية وتحسين كل من الحيوانات والنباتات الاقتصادية اذ استعملت هذه التقانة لتسهيل نتائج التضريب والتهجين عند محاولة استنباط أصناف جديدة فضلا عن استعمالاتها في التوصيف الوراثي الانواع وايجاد العلاقة الوراثية وتحديد البعد الوراثي بينها . كذلك استخدمت في مجال تحديد الثبات الوراثي للنباتات الناتجة من زراعة الانسجة النباتية . واستعملت ايضا في مجال تشخيص الامراض المختلفة كالامراض الوراثية والوبائية والاصابات الفيروسية للانسان . كما اصبحت من التقانات التي يعتمد عليها في تحديد الابوة الشرعية ومجال التحقيق الجنائي والطب العدلي Forensic medicine .

المواد وطرائق البحث

جمع يرقات وبالغات الديدان السلكية

جمعت بالغات الديدان السلكية (280) بالغة والتابعة لانواع الجنس *Agriotes* spp من حقول كلية الزراعة – ابي غريب للمدة من 1 / 3 / 2010 إلى 1 / 8 / 2010 وذلك باستعمال المصائد الفرمونية (Yatlor F) الخاصة بأصطياد بالغات أنواع الجنس *Agriotes* فضلا عن استعمال تسعة أنواع من الفرمونات الخاصة بجذب أنواع الجنس *Agriotes* والتي تم الحصول عليها من شركة Csalomon التابعة لمعهد وقاية النبات في هنكاريا.

(Plant protection Academy of Science / Budapest / Hungary).

أما اليرقات فقد جمعت من حقل بطاطا زرع لهذا الغرض بمساحة 1 دونم في حقول كلية الزراعة – ابي غريب للموسم الزراعي الربيعي والخريفي 2010 . وذلك من خلال اخذ نماذج اسبوعية ابتداءا من زراعة الدرنات وحتى جني الحاصل وكانت العينة عبارة عن نبات كامل مع ما يحيط به من تربة 30 x 30 x 30 سم (Toba و Turner، 1981) توضع على قطعة من النايلون وتفتت وتفتش بشكل دقيق للتاكد من وجود اليرقات واصابتها للدرنات ، بعد ذلك تجمع اليرقات من الدرنات المصابة بالديدان السلكية ويسجل عددها وتأريخ جمعها ، وتحفظ في الايثانول بتركيز 70% (Lindroth ،2007) لغرض تشخيصها فيما بعد .

استخلاص الدنا Nucleic acid extraction

اعتمدت طريقة Roehrdan وآخرين (2009) باستخلاص الحامض النووي DNA من حشرات الديدان السلكية واستنادا إلى توصيات الشركة المنتجة. (Promega) الولايات المتحدة الامريكية عزل الحامض النووي DNA وفقا لطريقة (CTAB).Cetyl trimethyl ammonium bromide والموصوفة من لدن Schulenburg وآخرين (2001).

قياس كمية الدنا :

اخذ 495 مايكروليتر من (ddH20) ووضع في أنابيب جديدة وأضيف إليها 5 مايكروليتر من المحلول القياسي (DNA stock) . استخدام جهاز الطيف الضوئي Spectrophotometer الذي يعتمد في عمله على قياس كمية الحامض النووي الموجود عن طريق امتصاص الأشعة فوق البنفسجية عند

الطول الموجي 260 نانوميتر لحساب تركيز الحامض النووي في العينة إذ إن كل واحد من الكثافة الضوئية Optical Density(O.D) يقابل(50) ds DNA مايكرو غرام / مل من سلاسل (DNA) المضاعفة dsDNA (double strand DNA) ونحو (40 مايكرو غرام / مل) لل RNA وسلاسل (DNA) المفردة ssDNA (single strand DNA) وحوالي (20 مايكرو غرام / مل) للسلاسل المفردة من قليلات النيوكليوتيدات (Oligonucleotides) مع مراعاة تصفير الجهاز باستخدام (500 مايكروليتر) من (ddH2O) عند بداية كل عينة يتم قياس تركيزها ، إذ إن النسبة بين قراءة الموجة (260 نانوميتر) إلى)(280 نانوميتر) . (OD 260\OD 280) تساعد على تقييم نقاوة الحامض النووي ، وتتراوح هذه النسبة بين (1.8 – 2.0) لل (DNA) النقي اما كمية الدنا فقدرت على وفق المعادلة الآتية :-

$$\text{DNA concentration } (\mu g / \mu l) = \frac{O.D._{260} \times 100 \times 50\ \mu g / ml}{1000}$$

إذ إن (O.D 260) تمثل الكثافة الضوئية لامتصاص الحامض النووي مايكروغرام عند الموجة (260 نانوميتر).100 = معامل التخفيف ، 50 = ثابت ، 1000= لتحويل المليلتر إلى مايكروليتر.إذ حملت كمية من الدنا المستخلص في هلام الاكاروز لتحديد نوعية الدنا المستخلص وللتأكد من عدم تقطيعها إذ يجب إن يظهر الدنا على شكل حزم (Bands) على هلام الاكاروز .

التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction

تم في هذه الدراسة استخدام مؤشرات عدة باستعمال ثمانية أنواع من البادئات primers وفقا للنظام الحراري لكل بادئة من هذه البادئات والتي تم الحصول عليها من شركة **Promega**الامريكية. والجدول (1) يبين أنواع البادئات التي استعملت في هذا البحث . أما المؤشرات التي تم استعمالها فكانت كالآتي:

1 - التضاعف العشوائي لقطع DNA مختلفة الاحجام .Random Amplified Polymorphic RAPD

2- المواقع البسيطة المتكررة Internal Simple Sequence Repeat. ISSR

جدول 1 . البادئات التي استعملت في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا.

البادئة	التتابع النيوكليوتيدي 3 - 5
Lco 1490	GAT TTA AAT TGC CGC GGA
Hco 2198	CAACATCGAGGTCGCAAAC
Agr gen S212	AGATTTACAATGTTATTGTAACAGCA
Agr. bre A215	AAGGTGGAAGAAATCAAAATC TC
Agr.rufS214	GACTTCACTTAGCAGGGATATCT
Agr.rufA217	GGTCTGTTAATAGTATAGTAATTGCC
Agr.SorS213	GGTATTTCTTCTATTCTTGGTGCT
Agr.Sor A 216	AGGGTCTCCTCCCCC C
Agr.lin-proS211	CCCCTTCCCTCT CCC TG
Agr.obs-lin.pro A213	TGCTAAGACAGGTAAGGATAAAAG A
Agr-ust A214	TAAAATTGATGAAATTCCTGC C
Agr.obs S215	GAAATGACCAGATCTACAATGTTATC
Agr.lit.A218	CTGCTGGGTCAAAAAATGAA
Agr-gen-S212	AGATTTACAATGTTATTGTAACAGCA
Agr-bre-spu A215	AAGGTGGAAGAAATCAAAATC TC
Agr-bre-A522	TTG CCC CAG CTA ATA CTG GA

التضاعف العشوائي لقطع ال DNA مختلفة الاحجام

Random Amplified Polymorphic -: RAPD-PCR

أستعملت هذه التقانة لتضاعف قطع DNA التي يصادف أنها ذات تتابع مكمل لتتابع البادئات العشوائية المستخدمة ، وعلى هذا الأساس سميت هذه التقانة بالتضاعف العشوائي لقطع DNA مختلفة الأحجام (Gupta، 2007).

وفي هذه التقانة استعمل عدد من البادئات العشوائية منها البادئ :-

OP-G14 : TTA CCG CCT AAT TCA GCC A

وكان عدد العينات التي استعملت 14 عينة .

اضيفت مكونات PCR لكل انبوبة على وفق التراكيز والتسلسل الآتي .

مكونات مزيج التفاعل (Master Mix)

المكونات	التركيز الأولي / مايكروليتر	التركيز النهائي / مايكروليتر
H2O الماء	5.95	83.3
Buffer بفر	5	70
DNTPs قواعد	2.5	35
Primerالبادى	1.25	17.5
Taq	0.3	4.2
MgCL2كلوريد المغنسيوم	2.5	35
BSA	1.5	21
DNA	6	46
Total. المجموع	25	272

برنامج RAPD-PCR

Timeالوقت	Temp.درجات الحرارة م	Stageالمرحلة
5	95	Pre-Denaturation ما قبل التحطيم
1	94	Denaturation التحطيم
1	47	Annealingالارتباط
2	72	Extention الاستطالة
7	72	Final Extentionالاستطالة النهائية

Iternal Simple Sequence -:ISSR-PCR

هذه التقانة عبارة عن تتابعات قصيرة ومتكررة تقع في مناطق Terminal تمتاز هذه التقانة بانها تنتج قطع DNAمتضاعفة وعالية التغاير (Polymorphic) (Randes وآخرون،2001) .
البادئات الذي تم استخدامها في هذه التقانة كانت :

HB15(F) : CCC GGT AAAA TTA AAA TAT AAA CTT C
HA18(R) :ATT TCT GGT TCT ATT CTT GGT GCT
17899A(F) : GGT CAA CAA ATC AT AAA GAT ATTGG
17878A(R) :GGC ATC TCC TCCC GCC

أما عدد العينات فكانت 9 عينا ت .
أجريت هذه التقانة على وفق الخطوات التالية :-
اضيفت مكونات PCR إلى كل انبوبة على وفق التراكيز والتسلسل الآتي.

مكونات مزيج التفاعل (Master Mix)

المكونات	التركيز الأولي / مايكروليتر	التركيز النهائي / مايكروليتر
H2O الماء	12.54	112.86
Buffer بفر	5	45
DNTPs قواعد	2.5	22.5
Primer البادئ	1	9
Taq	0.16	1.44
MgCL2 كلوريد المغنسيوم	2	18
DNA	1.8	1.8
Total. المجموع	25	210.6

والبرنامج ISSR-PCR program الذي تم استخدامه في هذه التقانة هو :-

Time الوقت	Temp. درجة الحرارة م	Stage المرحلة
3	94	Pre-Denaturation ما قبل التحطيم
1	94	Denaturation التحطيم
1	36	Annealing الارتباط
2	72	Extention الاستطالة
8	72	Final Extention الاستطالة النهائية

وفضلا عمّا ذكر كان هناك خطوات أساسية يجب إتباعها هي :

1- المواد الكيمياوية كلها وعينات DNA تكون موجودة في الثلج .
2- المواد الكيمياوية كلها وعينات إل DNA يجب إن تمزج جيدا قبل الاستخدام .
3- توضع قطرة من زيت معدني Mineral oil إلى العينات قبل وضعها في جهاز ال PCR .

فصل نواتج تفاعلات ال PCR في هلام الاكاروز :

ترحل نواتج تفاعلات PCR في هلام الاكاروز بتركيز 0.8% وبعد انتهاء عملية الترحيل يتم تصبيغ الهلام ببروميد الاثيديوم ، ويوضع الهلام في جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV Transilluminator وتصوير الحزم الناتجة واخذ الصور .

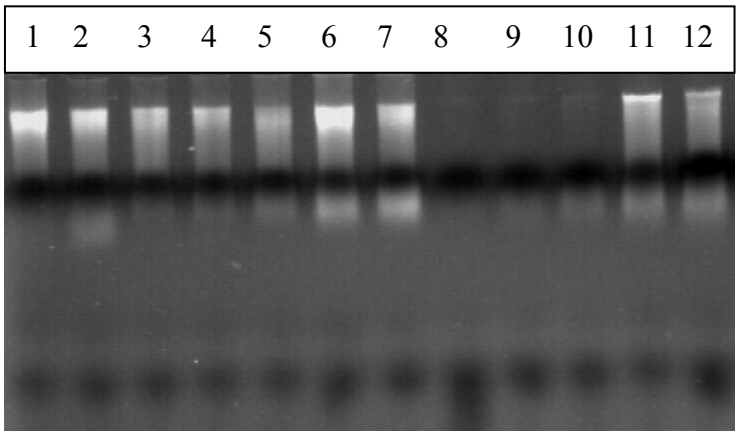
النتائج والمناقشة

نتائج استخلاص الحامض النووي DNA Nucleic acid Extraction

أظهرت نتائج استخلاص الحامض النووي DNA ان طريقة CTAB كانت ناجحة ومميزة لعزل الحامض النووي DNA من بالغات الديدان السلكية لانواع الجنس *Agriotes* ولكنها في الوقت نفسه لم تكن ناجحة بالمستوى نفسه في استخلاص الحامض النووي DNA من اليرقات ، وربما مع بعض التعديلات يمكن ان يتم الاستخلاص بالمستوى نفسه .

كما أوضحت نتائج (صورة1) انه تم الحصول على كمية جيدة من الحامض النووي DNA للعينات الحشرية رقم (1 ،2،3،4،5،6،7،11،12) التي تمثل بالغات الديدان السلكية لأنواع الجنس *Agriotes* بينما كانت كمية الحامض النووي DNA قليلة ليرقات الديدان السلكية لانواع الجنس . وربما يعزى السبب في ذلك الى ان يرقات الديدان السلكية لأنواع الجنس *Agriotes* لم تكن طازجة اذ جمعت هذه

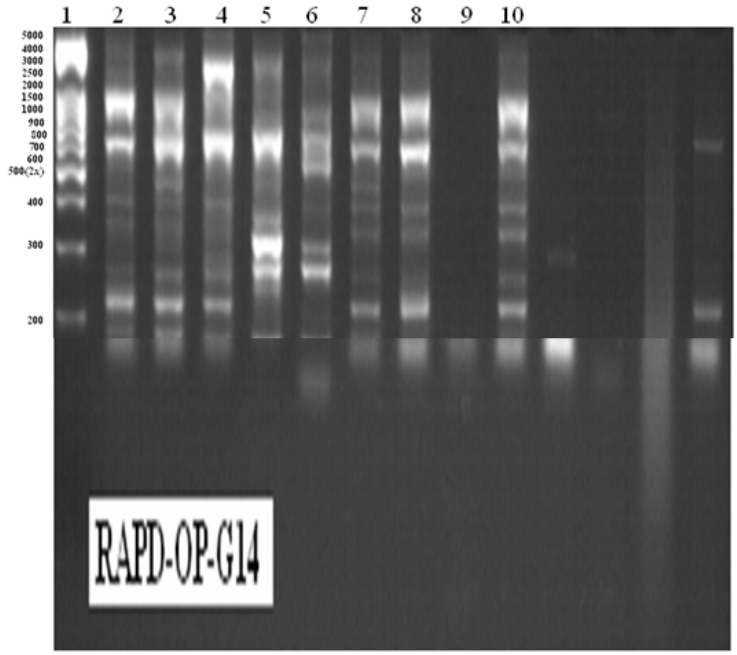
اليرقات قبل مدة وحفظت في الايثانول بتركيز 70%. وهذا يتفق مع ما ذكره Ellis وأخرون (2009) بأنه عند استخدام اليرقات في دراسات التصنيف الجزيئي يكون من الضروري والأفضل استخدام اليرقات الطازجة .



صورة 1. عينات الحامض النووي DNA المستخلصة من الديدان السلكية البالغات مثل العينات رقم (1,2,3,4,5,6,7,11,12) واليرقات تمثل العينات رقم (10 ، 9 ، 8) .

نتائج تقانة RAPD :

إذ أعطت نتائج استخدام تقانة التضاعف العشوائي لقطع DNA مختلفة الاحجام RAPD لتضخيم الحامض النووي التي اجريت باستخدام بادئات عشوائية عدة منها البادئ OPG14 (نوع معين) تغايرات واضحة وبينت نتائج التحليل الوراثي بمؤشرات RAPD وبعد حساب النسبة المئوية للبعد الوراثي بين الانواع المنتخبة وجود تغايرات وراثية فيها . اذ بينت نتائج RAPD (صورة2) اختلافات في عدد الحزم المتضاعفة وأوزانها الجزيئية باختلاف البادئ المستخدم والناتجة من الاختلاف في عدد المواقع المكملة والمقدرة استنادا الى Nei وLei (1979) باستخدام الحاسوب ضمن برنامج TREECON .



صورة2. نواتج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا على هلام الاكاروز تقانة RAPD باستعمال البادىء OPGI 4 المسار Marker (1) ، المسار *A. doscures* (2) ، المسار *A. sputator* (3) ، المسار *A. lineatus* (4) ، المسار (5) *A. ustaltus* ، المسار *A. brevis* (6) ، المسار (7 ، 8 و 10) *A. obscurus* ، المسار (9) larvae .

ثم قدرت النسبة المئوية للبعد الوراثي (Genetic Distance) بين الانواع المدروسة والتي تعتمد على التشابه الوراثي وفقا للمعادلة الاتية :

$$\text{Genetic Distance} = 1-(2xy/nx+ny)\times 100$$

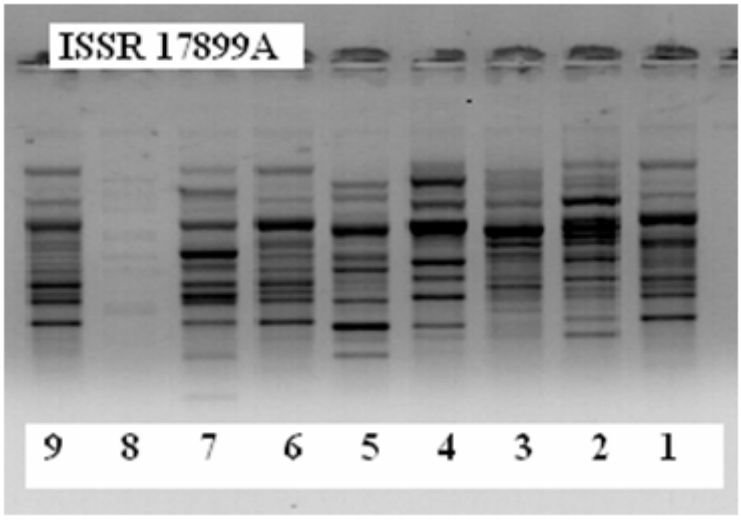
اذ ان : البعد الوراثي = Genetic Distance، Nxy = يمثل عدد الحزم المشتركة بين النموذجين x،y .

Nx = يمثل عدد الحزم الكلية في النموذج x، Ny = يمثل عدد الحزم المشتركة في النموذج y .

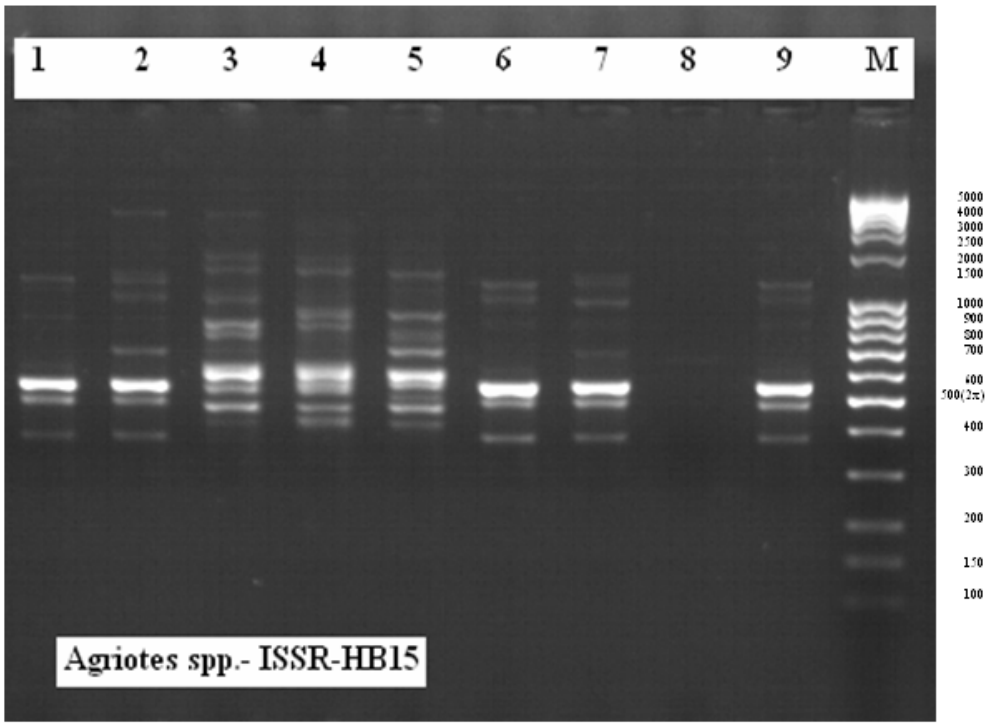
في هذه الدراسة تم استخدام بادئات عشوائية متعددة ولكن بادئاً واحداً هو الذي (OPG14) حقق نتائج جيدة واهملت بقية البادئات الاخرى . وهذا يتفق مع أغلب النتائج المنشورة في هذا المجال و ان العديد من البادئات لم يعط اي نتيجة على الرغم من أعادة استعمالها اكثر من مرة وربما يعود السبب في ذلك الى غياب المواقع المكملة لتسلسلات تلك البادئات العشوائية المستخدمة .

نتائج مؤشرات ISSR :

أكدت نتائج مؤشرات المواقع البسيطة المتكررة ISSR اختلافات في عدد الحزم المتضاعفة باختلاف البادئ المستخدم والناتجة ايضا من الاختلاف في عدد المواقع المكملة لذلك البادئ في مجين كل نوع من الانواع المستخدمة في هذه الدراسة . اذ بينت الدراسة ان استخدام تقانة ISSR مع البادئين HB15 و17899A نتائج واضحة عكس بقية البادئات الاخرى التي تم استعمالها في هذه التقانة ، ويتضح من الصورتين (4) و (5) ان مؤشرات ISSR الوراثية اظهرت تباعدا وراثيا بين انواع الديدان السلكية التابعة الجنس *Agriotes* . وهذا يتفق مع ما ذكره Staudacher وأخرون (2008) الذين وجدوا تغايرات وراثية في الانواع التي تعود الى الجنس نفسه باستعمال تقانة RCR .



صورة 3. نواتج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا على هلام الاكاروز تقانة ISSR مع البادىء A 17899 . المسار (1) Marker ، المسار (2) A. obscurus ، المسار (3) A. lineatus ، المسار (4) A. sputator ، المسار (5) A. ustaltus ، المسار (6) A. brevis ، المسار (7) A. obscurus ، المسار (8) Larva ، المسار (9) A. ustaltus



صورة4. نواتج التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا على هلام الاكاروز تقانة ISSR مع البادىء HB15 . المسار (1) A. ustaltus ، المسار (2) A. ustaltus ، المسار (3) A. lineatus ، المسار (4) A. obscurus ، المسار (5) A. brevis ، المسار (6) A. sputator ، المسار (7) A. sputator ، المسار (8) Larva ، المسار (9) A. sputator.

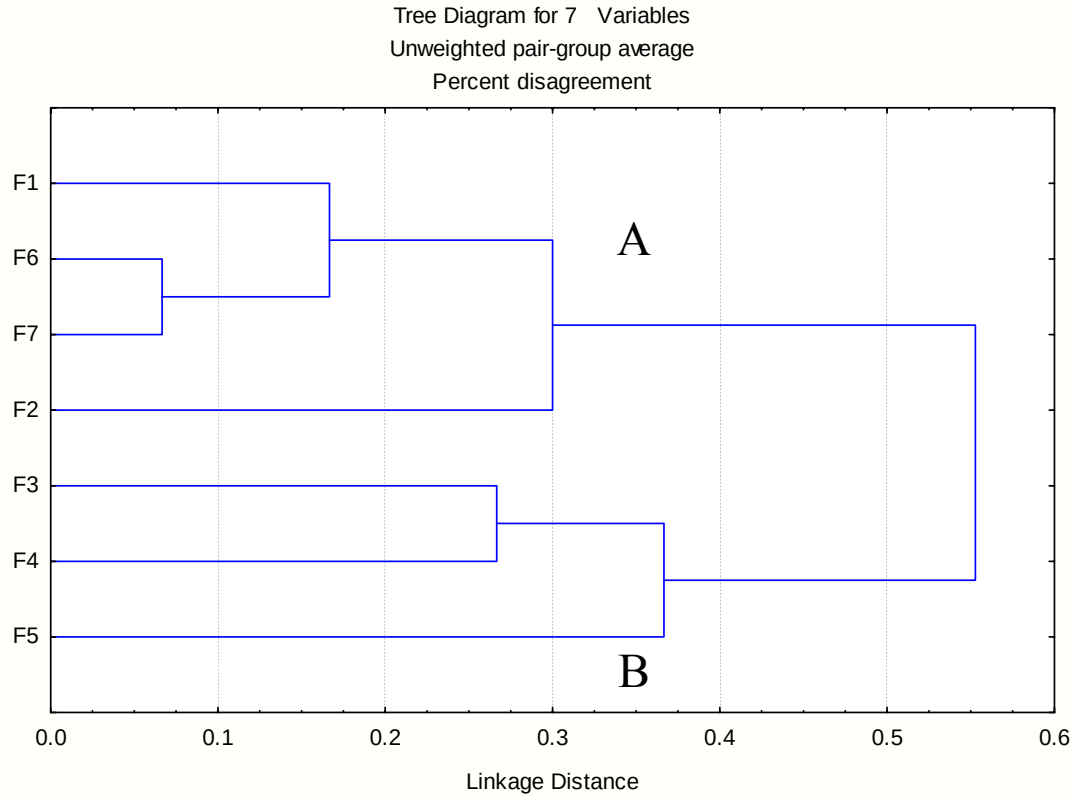
تحليل النتائج الوراثية :

اعتمدت طريقة تحليل نتائج دراسة العلاقة الوراثية على وجود الحزم الناتجة او غيابها من تضاعف قطع معينة من جينوم الانواع المستخدمة وعلى الأوزان الجزيئية لتلك الحزم التي تعتمد على العدد والمواقع المكملة لتسلسلات البادئات على شريط DNA القالب وبعد ادخال البيانات الناتجة في البرنامج المعد خصيصا لهذا الغرض تم أيجاد البعد الوراثي بين الأنواع المدروسة وكما موضح في شكل (1) إذ تشير النتائج التي تم الحصول عليها الى وجود اختلافات بين أنواع الديدان السلكية التابعة للجنس *Agriotes* spp وتم حساب البعد الوراثي بين أنواع الديدان السلكية التابعة للجنس *Agriotes* الجدول (2) استنادا إلى معادلة Nei وLei (1979) . إذ أظهرت النتائج مدى التشابه والاختلاف بين أنواع الديدان السلكية . كما أوضحت أن أعلى نسبة من التشابه التي تقابل أقل بعد وراثي (0.07)) كانت مابين النوعين (F6، F7) إذ شكلا مجموعة صغيرة ، في حين وجدت أقل نسبة من التشابه الوراثي التي تقابل أكبر بعد وراثي (0.63) مابين النوعين (F1، F3) . ومن خلال الجدول نفسه نلحظ النوع (F1) كان أكثر الأنواع بعدا عن بقية الأنواع الأخرى.

جدول 2 . **قيم البعد الوراثي لأنواع الديدان السلكية التابعة للجنس *Agriotes* spp** .

7	6	5	4	3	2	1	variable
0.13	0.20	0.57	0.43	0.57	0.30	0.00	1
0.30	0.30	0.60	0.60	0.47	0.00	0.30	2
0.50	0.57	0.40	0.27	0.00	0.47	0.57	3
0.50	0.57	0.33	0.00	0.27	0.60	0.43	4
0.63	0.63	0.00	0.33	0.40	0.60	0.57	5
0.07	0.00	0.63	0.57	0.57	0.30	0.20	6
0.00	0.07	0.63	0.50	0.50	0.30	0.13	7

يظهر مخطط الشجرة للعلاقة الوراثية Dendogram المعتمد على قيم البعد الوراثي بأستخدام طريقة UPGMA والمنشأ اعتمادا على مؤشرات ISSR بأن أنواع الديدان السلكية قد توزعت في مجموعتين رئيسيتين (A وB). تضمن العنقود (A) ثلاثة أنواع (F1، F6،F7) .بينما تضمن العنقود (B) أربعة أنواع (F2، F3،F4،F5) اذ نجد (F3، F4) وكانتا اكثر قربا من بعضهما . اما (F5، F6 ،F7) فكانت الأكثر قربا من بعضها مقارنة بأنواع المجموعة .
ونستنتج من ذلك ان الدراسة الجزيئية أظهرت احتواء أنواع الديدان السلكية على تنوع وراثي عال. ووجدت النتائج مماثلة لما وجده Staudacher واخرون (2010).



شكل 1. مخطط الشجرة للعلاقات الوراثية بين انواع الديدان السلكية التابعة للجنس *Agriotes* spp اعتمادا على تحليل مؤشرات ISSR .

المصادر

الجوراني ، رضا صكب وسداد الطويل. 2004 . اول تسجيل لخنفساء كولورادو (Leptinotarsa decemla, Neata (Chrysomelidae:Coleoptera على البطاطا في العراق . مجلة العلوم الزراعية العراقية . 35 : (4)105-106

العزاوي ، عبد الله فليح . 1980 . علم الحشرات العام والتطبيقي . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .مؤسسة المعاهد الفنية . مطبعة الزهراء . بغداد . 540 صفحة.

صادق،فريال حسوني . 2007 . دراسة اهمية بعض حشرات التربة في احداث اضرار لدرنات لبطاطا ومكافحتها كيمياويا . رسالة ماجستير . كلية الزراعة . جامعة بغداد . 103 صفحة .

Ellis , J.S R. Blackshow , W. Parker , H. Hicks and M.E.Knight. 2009. Genetic Identification of morphologically cryptic agricultural pests. *Agr* 11, 115 – 121.

FAO . 2008. UN Food and Agriculture Organization http : // faostat FAO .org /sita / 340 / defalt Aspx . Roma 2008 .

Gupta, P. K. 2007. Cytogenetics. Rajjons printers, New Delhi,India, pp 348.

Hinomoto, N.,M. Muraji, S. Noda, T. Shimizu.and K. Kawasaki. 2004. Identification of five Orius species in Japan by multiplex Polymerase chain reaction. *Biological Control* 31 : 276 – 279.

Lindroth, E. 2007. Molecular diagnostics of economically important wireworm species (Coleoptera:Elateridae) in the Midwestern United State. Msc. Thesis. Grauate School. University of Missouri – Columbia. Pp. 60.

Nei, M. and W.H. Lei. 1979. Mathematical model for studying geneticvariation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76 : 5269 – 5273.

Randes, S. A., F. Nuzhat, B. Esha, and V. Anjali. 2001. Gene Tagging with random ampliffed polymorphic DNA (RAPD) Markers for molecular breeding in plants. *Critical Reviews In Plant Sciences*. 20 (3) : 251 – 275.

Roehrdan Z., R.D. Olson, G. Fauske, R. Bourchier, G.,A. Cortilet, andS. Sears. 2009. New DNA markers reveal Presense of Aphthona species (Coleoptera:Chrysomelidae) believed to have failed to established after release into leafy spurge. *Biological Control* 49, 1 – 5.

Schulenburg, G. H. M.J.A. Honcock, J.J. Pagnamenta,E.N.Stoggett,.G.D. Majerus, and G.D.Hurst. 2001. Extermel length and spacer of ladybird beetles (Coleoptera:Coccinellidae). *Mol. Boil. Evol*., 18 (4) : 648 – 660.

Staudacher, K.L. Furlan,. and M.Traugott. 2008. DNA- Based Identification of *Agriotes* wireworms. Innsbruck. Austria.

Staudacher, K.P., Pitter, L., Furlan, P.C. Cate, and M.,Traugott. 2010. PCR – based species identification of *Agriotes* larvae. Bulletin of *Entomological Research* 101 : 201-210.

Toba, H. H., and Turner, J. E. 1981. Seed piece examinations a methode for sampling wireworms on potatoes *J. Econ. Entomol*. 74 : 718 – 720.

Vernon, R. S., and Pats. 1997. Distribution of two European wireworms *Agriotes lineatus* and A. obscurus in British Columbia. *Jour. Entomol. Soci.Brit. Colum*. 94 : 59 – 61.

DIAGNOSTIC OF WIREWORM THAT ATTAK POTATO TUBERS BY USING PCR .

Redha S. AL – Jorany* **Feryal H. Sadik**

*Dept. of Plant Protection - College of Agriculture - University of Baghdad -IRAQ

ABSTRACT

Field studies were carried out in the middle of Iraq during 2009 - 2012 to detect and identify the species of genus *Agriotes* spp that infest Potato tubers (*Solanum tubersum* L.) by using Molecular diagnosis Polymerase Chain Reaction (PCR) for both adults and larvae . The results showed that there are five species of *Agriotes* infest Potato tubers in Spring and Autumn cultivation . These species are :

Agriotes brevis (Candeze) , *Agriotes lineatus*(Linnaeus)

*Agriotes obscurus (*Linnaeus) , *Agriotes sputator*(Linnaeus)

Agriotes ustulatus (Schaller).

A genetic diversity within the species of the genus *Agriotes* was found .

Key words : *Agriotes* , RAPD , ISSR , Wireworms , Elateridea , Polymerase Chain Reaction

Part of Ph.D. Thesis for second author .