مجلة دجلة • المجلد ٦ ،العدد ٤ (٢٠٢٣)، ص: ٢٣١ ـ ٢٤٧
ISSN: 2222-6583

# التشخيص الجزيئي للمتطفل *Aphidius matricariae* على عائلة منْ الخوخ الأخضر *Myzus persicae (Sulzur)*

**فائز معيد الحدي [١] و محمد شاكر منصور [٢]**

١&٢ قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، العراق

**Fayez.m.hamoud@st.tu.edu.iq**
**Mshmansor@tu.edu.iq**

**الخلاصة :**

أجريت الدراسة في بعض الحقول المصابة بحشرة المنْ *Myzus Persicae* . على نباتات الفجل في منطقة الشرقاط (محافظة صلاح الدين) خلال الفترة ٢٠٢٢-٢٠٢٣ .هدفت الدراسة الى تشخيص المتطفلات ) العدو الحيوي من عائلة . *Aphidius sp* على حشرة المنْ مظهرياً وجزيئياً ، إذ بينت النتائج تطابقاً بلغت نسبته المئوية (٧٣%) لتتابعات الجين – سايتو كروم أوكسديز الوحدة الثانوية -١- للمتطفل من جنس *Aphidius sp* . المعزولة من الأرجنتين و المسجلة بالرقم العالمي ( OM575803.1 ) في حين أظهرت النتائج تطابقاً بلغ (٨٨%) لتتابعات نفس الجين لحشرة منْ الخوخ الأخضر *Myzus Persicae* المعزولة من الهند والمسجلة بالرقم العالمي (MT198912.١) وسجلت الحشرتين العدو الحيوي والمنْ في البنك الوراثي العالمي تحت الرقم (OR475235) للمتطفل من جنس . *Aphidius sp* وحشرة منْ الخوخ الأخضر *M. Persicae* بالرقم العالمي (OR475236) .

**الكلمات المفتاحية :** العدو الحيوي *Aphidius sp* ، منْ الخوخ الأخضر *Myzus Persicae* ، الفجل .

Abstract :

The study was conducted in some fields infected with the aphid Myzus Persicae. On radish plants in the area Al-Sharqat (Salah al-Din Governorate ) during the period 2022-2023. The study aimed to diagnose the parasites), the biological enemy from the family. Aphidius sp on the aphid phenotypically and molecularly, as the results showed a (73%) match to the sequences of the gene - cytochrome oxidase subunit - 1 - of the parasite of the genus Aphidius sp. Aphidius sp, isolated from Argentina and registered with the international number (OM575803.1), while the results showed a match of (88%) to the sequences of the same gene for the green peach insect Myzus Persicae, isolated from India and registered with the international number (MT198912.1). The two insects, the biological enemy and the aphid, were recorded in the bank. The global genetic gene number (OR475235) for the parasite of the genus. Aphidius sp and the green peach aphid M Persicae. With the international number (OR475236) .

Keywords: Vital enemy Aphidius sp, green peach aphid Myzus Persicaees, radish .

مجلة دجلة • المجلد ٦ ،العدد ٤ (٢٠٢٣)، ص: ٢٣١ ـ ٢٤٧
ISSN: 2222-6583

**المقدمة :**

تعد حشرات المنّ من احد أهم الافات الحشرية المهمة اقتصاديا والتي تؤثر تاثيرا سلبيا على غلة المحاصيل وجودتها، و تصيب العديد من المحاصيل الحقلية واشجار الفاكهة ونباتات الزينة لما تسببه هذه الحشرة من أضرار اقتصادية في الأنتاج الزراعي كما ونوعاً وفضلاً عن نقلها للأمراض الفيروسية الخطيرة التي تؤدي الى ضعف النبات المصابة وقلة في أنتاجها ( منصور و محمد ، ٢٠١٦) . ومن هذه الحشرات ذات المدى الواسع هي حشرة منّ الخوخ الأخضر ( *Myzus persicae (Sulzur* وهي من الافات الحشرية ذات الأهمية الأقتصادية في العالم ، وموطنها الأصلي قارة أسيا وتنتشر في معظم دول العالم ، (هادي ،٢٠١٥) ، والتي تعود الى عائلة *Aphididae* ورتبة Hemiptera، يعد هذا النوع من حشرات المنْ منّ الافات المدمرة في كل منّ الحقول والبساتين ( Blackman وEastop ،٢٠١٧) . وتمتاز حشرة منْ الخوخ الأخضر بمداها العائلي الواسع جداً ، إذ تهاجم العديد من الأنواع النباتية التي تزيد عن ٤٠٠ عائل نباتي ، ففي العراق سجلت حشرة *Myzus persicae* أعداد كبيراً على العوائل النباتية ومن هذه العوائل النباتية مثل الخوخ ، الفجل ، البطاطا، السلق ، البرتقال ، الخس ، المديد ، القرنفل ، السمسم ، زهرة الشمس ، الباميا ، الشوندر مسببة خسار أقتصادية جسيمة (العزاوي، ٢٠٢١) .

ذكر Kreuze وأخرون (٢٠٢٠) أن هذه الحشرة تسبب أضرار مباشرة وذلك بتغذيتها وأمتصاصها العصارة النباتية وافرازها للندوة العسلية على الاوراق التي تنمو عليه الفطريات السخامية والعفن الأسود وتتجمع عليها الأتربة مما تعيق عملية التركيب الضوئي وتؤدي الى أصفرار الاوراق وتجعدها وذبولها ، كما تقلل من نمو النبات، حيث تعيش في الجزء السفلي من الأوراق وبالتالي من الصعب ملامسة المبيد لها وقتلها فضلا عما تخلفه من جلود انسلاخ وبراز ، وكذلك تجذب العديد من الحشرات الأخرى مثل النمل والذباب والزنابير، ومن الاضرار الغير المباشرة دورها الكبير في نقل العديد من الفايروسات الخطرة والمهمة اقتصادياً، إذ تقوم بنقل أكثر من ١٢٠ نوعاً من الفايروسات النباتية الخطيرة جداً ، ومما يزيد اضرار حشرات المن بشكل عام انها تعيش على النبات بشكل مستعمرات تضم كل ادوار الحشرة وتتكاثر عذريا معظم أيام السنة، وكذلك قصر دورة حياتها وتعدد اجيالها التي قد تصل الى ٢٠ جيلاْ بالسنة في المنطقة الوسطى من العراق (Dedryver ، ٢٠١٠) .

أشار الموسى (١٩٩٨) ألى الخسائر التي تسببها حشرة *Myzus persicae* على أشجار اللوزيات في العراق بين ٣٥-٥٠% نتيجة إصابتها بحشرة من الخوخ الاخضر ونقلها للأمراض الفايروسية مثل فايروس تقزم الخوخ (PDV) وفايروس موزائيك التفاح (ApMV) و فايروس البقع الشاحبة (ACL) . إذ تتراوح الخسائر في محصول البطاطا في أوغندا نتيجة الأصابة بحشرة منْ الخوخ الاخضر من ٤٠-٨٥ % سنويا (Ebwongu وأخرون، (٢٠٠١) ، كما سببت حشرة من

الخوخ الاخضر خسارة بنسبة ٩٠ % على حاصل البطاطا في ولاية كارناتاكا في الهند (Basavaraju وأخرون ، ٢٠٠٩) .

ذكر Aslan وأخرون (٢٠٠٤) أنّ للأعداء الطبيعية دوراً فعالاً في تنظيم اعداد هذه الحشرات وأبقائها دون مستوى الضرر ومن تلك الأعداء الطبيعية هي المتطفلات الحشرية والتي تعد من احد أهم عناصر المكافحة الإحيائية والأمنة من الناحية البيئية ، توجد العديد من أجناس المتطفلات ومن أهم أجناسها هوه جنس *Aphidius* والذي يضم العديد من أنواع المتطفلات الحشرية التي المستخدمة في طرق المكافحة الحيوية .

كما أشار Murphy وأخرون (٢٠٠٦) الى المتطفلات التابعة إلى جنس *Aphidius* مما لها من تأثير في الحد من أنتشار حشرات المنّ بشكل طبيعي وقد أنتجت العديد من المتطفلات التابعة لهذا الجنس بشكل تجاري ومنْ أهم تلك المتطفلات هو المتطفل *Aphidius matricariae* . وقد أوضح Rakhashani وأخرون (٢٠٠٨) ألى أن المتطفل *Aphidius matricariae* والذي يعود إلى الجنس *Aphidius* ألى عائلة *Aphidiida* ورتبة Hymenoptera أنتشاراً واسعاً وخصوبة عالية وقابلية على أصابة أنواع مختلفة من حشرات المنّ .

وقد سجل منصور (٢٠٠٨) لأول مرة المتطفل *Aphidius matricariae* على أزهار القرنفل بتطفلة على المنْ *Brachycaudus helichrysi Kaltenbach* .

ذكر Bandyan وأخرون ،(٢٠٢١) في دراستهم لمسح حشرات المنْ والدبابير الطفيلية المرتبطة بها من ستة أنواع من المحاصيل المهمة (الفول و البطيخ و الباذنجان و الفلفل الحلو و القمح والذرة الرفيعة) ، تم جمعها في ١٢ موقعًا في مناطق إقليم كردستان العراق ، وتم تسجيل ٨ أنواع من حشرات المنْ والتي يتم تطفلها بواسطة ١١ نوعاً من الطفيليات الأولية التي تنتمي إلى عائلات Braconidae و Aphelinidae .

أكد بشير ولؤي (٢٠١١) الى أن المتطفل هو طفيل متعدد العوائل يمكنه التطفل على ٤٠ نوع من أنواع المن ويفضل بالدرجة الأولى على منّ الخوخْ الأخضر حشرة . نظرا لوجود المتطفلات المرافقة لأفة المنْ في بيئة صلاح الدين وحسب ما أشار اليها ( منصور،٢٠٠٨) ولغرض معرفة المتطفلات المرافقة لها يتوجب علينا مسح وتشخيص الطرق المورفولوجية والوراثية فضلاً عن المحافظة على هذه المتطفلات في بيئتها المدروسة كونها أحد العناصر المهمة للمكافحة الأحيائية ضد حشرة المنْ على عوائلها . وكذلك لأهمية هذا المتطفل في المكافحة الاحيائية . لهذا فقد هدفت هذه الدراسة الى تشخيص الطفيل *Aphidius matricariae* وعائلة حشرة منْ الخوخ الأخضر *Myzus persicae (Sulzur)* .

مجلة دجلة • المجلد ٦ ،العدد ٤ (٢٠٢٣)، ص: ٢٣١ ـ ٢٤٧
ISSN: 2222-6583

**المواد وطرائق العمل :**

**١-طريقة جمع العينات:**

جمعت العديد من حشرات المنْ التي تتواجد على أوراق نباتات الفجل في مناطق مختلفة من الحقول في منطقة أسديرة وسطى – قظاء الشرقاط – محافظة صلاح الدين . وضعت العينات في حاويات بلاستيكية ونلقت ألى مختبر الحشرات التابع إلى قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة تكريت. وسجلت جميع المعلومات عن مكان و تاريخ وطريقة جمع العينات، ثم شخصت العينات الحشرية بأستعمال مجهر تشريحي على قوة تكبير (X٤٠) تشخيصاً مظهرياً من قبل الدكتور محمد شاكر منصور أعتماداً على الصفات المظهرية للحشرات وبعد التأكد منها ، وضعت في انابيب أختبار زجاجية (١×١٠ سم ) تحتوي على محلول كحولي ٧٠% ، وكذلك جمعت المتطفلات بأخذ الأوراق التي تحتوي على ميومياءات حشرات المنْ ووضعت في أطباق بلاستيكية قطرها ١٥سم وارتفاعها ٥ سم وعملت فيها فتحات صغيرة لدخول الهواء وأنتظار عدة أيام لحين البزوغ خروج البالغات ، ثم فحصت تحت المجهر وبعدها وضعت الحشرات في الأطباق البلاستيكية داخل المجمدة –١٥ مْ لغرض قتلها والحفاظ على شكلها الخارجي، ومن ثم وضعت في أنابيب أختبار زجاجية (١سم×١٠ سم) تحتوي على محلول كحولي ٧٠% (علي ، ٢٠٢٠) . وبعدها تم أرسال العينات ألى التشخيص الجزيئي .

**٢- التشخيص للطفيل وعائلة المنْ .**

**٢-١- التشخيص المظهري للحشرات :**

بعد جمع العينات عزلت أعداد من حشرات المنْ ووضعت في انابيب أختبار ١×١٠ سم تحتوي على كحول أثيلي ٧٠% ، وتم أرسلت العينات إلى متحف التاريخ الطبيعي / جامعة بغداد بالكتاب المرقم ((٢١)) كما في الشكل رقم (١) .

مجلة دجلة • المجلد ٦ ،العدد ٤ (٢٠٢٣)، ص: ٢٣١ ـ ٢٤٧
ISSN: 2222-6583

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministry of Higher Education and Scientific Research
جامعة بغداد
University of Baghdad
مركز بحوث و متحف التاريخ الطبيعي
Iraq Natural History Research Center and Museum
قسم الحشرات واللا فقريات
Department of Entomology and Invertebrates

No. : العدد : ٢١
Date: التاريخ : ٣ / ٤ /٢٠٢٣

قسم الحشرات واللافقريات

م / تشخيص نماذج

إن العينات المرسلة لنا من قبل طالب الدراسات العليا/ الماجستير ( فائز معيد حمود ) ، قد تم تشخيصها وكالآتي :

المتطفلات

1- *Praon volucre* (Haliday, 1833)(Hymenoptera, Braconidae )
2- *Aphidius matricariae* Haliday, 1834(Hymenoptera, Braconidae )

المن

-*Aulacorthum solani* (Kaltenbach, 1843)( Hemiptera, Aphididae)

تم التشخيص من قبل :

ا.د. رزاق شعلان عكل ( مركز بحوث ومتحف التاريخ الطبيعي / جامعة بغداد)

ا.د. حيدر بدري علي( قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بغداد)

د. زينب علوان مكاوي

رئيس قسم الحشرات واللافقريات

شكل رقم (١)

**٢-٢- التشخيص الجزيئي للحشرات :**

**٢-٢-١- استخلاص DNA :**

وضعت الافراد البالغة من حشرات المنْ والطفيل والبالغ عددها ٣ حشرات من كل نوع في Microtube حجم ١.٥ مل وطحنها باستخدام Tip محور ذو نهاية مغلقة ، بعدها تم وزن ٢٥ ملغم من عينة الانسجة المطحونة ثم نقلت إلى انبوب ١.٥مل ، استخدمت عدة الاستخلاص extraction

Kit وأضيف ٢٠٠ ميكرولتر من محلول buffer L و ٢٠ ميكرولتر من بروتيز K و ٥ ميكرولتر من محلول Rnase A في انبوب العينة تخلط عن طريق الدوامة بقوة . حضنت عند درجة حرارة ٥٦ م في حمام مائي لمدة ١٠-٣٠ دقيقة ، بعد تحللها اضيفت ٢٠٠ ميكرولتر buffer B في انبوبة مع المزج جيدا ثم حضن الخليط عند ٧٠مْ لمدة ٥ دقيقة ، ونبذت بواسطة جهاز طرد مركزي بسرعة ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٥ دقائق لإزالة جزيئات الانسجة غير المتحللة ، ثم نقلت بعناية من ٣٥٠-٤٠٠ ميكرولتر من المادة إلى انبوبة سعة ١.٥مل ، اضيفت ٢٠٠ ميكرولتر من الايثانول إلى المحلول ومزج جيداً عن طريق قلبه برفق من ٥-٦ مرات ، وضع الخليط بعناية في انبوب تجميع سعة ٢ مل ، ثم نبذت عند ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة ، ثم أضيف ٧٠٠ ميكرولتر من العينة إلى عمود التنقية ضمن عدة الاستخلاص ، ثم نبذت في جهاز الطرد المركزي عند ١٣٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة ، ثم اضيف ٧٠٠ ميكرولتر من bufferWA إلى عمود الدوران ، ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي عند ١٣٠٠٠ دورة دقيقة ولمدة دقيقة واحدة ، وضعت ٣٠-١٠٠ ميكرولتر من bufferCE وحضنت لمدة دقيقة واحدة في درجة حرارة الغرفة ووضعت في جهاز الطرد المركزي عند ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة . حسب طريقة ( Geiser واخرون ٢٠٠٤) .

**٢-٢-٢- الترحيل الكهربائي DNA الجينومي وحسب طريقة ( Keith واخرون ٢٠٠٧)**

بعد استخلاص DNA الجينومي اجري الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز ١.٥% في ١٠٠ مل وكما يلي :

١ حضر هلام الأكاروز بتركيز ١.٥% عن طريق اذابة ١.٥غم من الأكاروز في ١٠٠مل من محلول buffer TBE .

٢ يسخن الأكاروز في حمام مائي ليغلي ثم يترك ليبرد عند درجة حرارة (٤٥-٥٠) مْ .

٣- يسكب هلام في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد اماكن عينات ال DNA .

٤- يسكب الهلام برفق حتى لا يكون فقاعات هواء ويترك لمدة ٣٠ دقيقة حتى يبرد .

٥- يزال المشط Comb بلطف من هلام الأكاروز الصلب .

٦ – بعد اكمال عملية التحميل يتم غمر هلام الأكاروز باستخدام محلول buffer TBE بتركيز ١ % ثم اغلاق غطاء الترحيل وتشغيل المرحلة الأولى بتيار ٦٠ ملي أمبير وفولتية ٤٥ فولت لمدة ١٠ دقائق ثم المرحلة الثانية بتيار ٢٠٠ ملي أمبير وفولتية ١٢٠ فولت لمدة ٤٥ دقيقة.

٧- بعد انتهاء عملية الترحيل فحص الهلام الحاوي على حزم ال DNA اذ اظهرت حزم الحامض النووي DNA الجينومي باستعمال الأشعة فوق البنفسجية (٣٣٦nm) بعد تصبيغها بصبغة

(Intron/Korea) Red safe Nucleic acid . بعد انتهاء مدة الترحيل الكهربائي تم تصوير الحزم الناتجة على هلام الاكاروز باستخدام كاميرا رقمية .

**٢-٢-٣- تضاعف الجين سايتوكروم C اوكسديز (Cox1) باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR**

أستعمل جهاز البلمرة الحراري (٩٧٠٠ Gene Amp (PCR system Applied Biosystem في عملية التضاعف، تم تضاعف الجين Cox1 باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل PCR حسب طريقة (Sambrook واخرون ،١٩٨٩ ) . وأستخدم في تفاعل البلمرة البادئ المتخصص لهذا الجين في الحشرات كما موضح في الجدول رقم (١) .

| البادئ Primer | التتابع النيوكليوتيدي Nucleotide Sequence | درجة الحرارة Tm (°C) | GC (%) | حجم الناتج (زوج) قاعدي Product size (bp) | المرجع Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| أمامي Forward | 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG - 3' | 57 | 54.5 | 720 base pair | Folmer et al.,1994 |
| خلفي Reverse | 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA -3' | 56.6 | 52.4 | | |

**جدول (١) بادئ تتابعات الجين C0X1 المستعمل في التشخيص الجزيئي للحشرات .**

Primers set supplied by IDT Integrated DNA Technologies company, ) . (Canada

كماً أستخدمت العدة نوع Maxime PCR PreMix kit (i-Taq) 20µlrxn (Cat. No. 25025) لغرض أجراء تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم ٢٥ مايكروليتر ويتكون من المواد التالية :

**جدول (٢) المواد وتراكيزها المستخدمة في تفاعل البلمرة .**

| No تسلسل | Components المحتويات | Concentration التراكيز |
|---|---|---|
| ١ | Taq PCR PreMix خليط تفاعل البوليمراز المتسلسل | 5µl |
| ٢ | Forward primer بادئ أمامي | ( 1 µl ) 10 picomols/µl |

| | | |
|---|---|---|
| ٣ | Reverse primer بادئ خلفي | 10 picomols/µl ( 1 µl ) |
| ٤ | DNA | 2µl |
| ٥ | Distill water ماء مقطر | 16 µl |
| ٦ | Final volume الحجم الكلي | 25µl |

تم تنفيذ برنامج التفاعل بأستخدام البرنامج التالي في أتمام عملية التفاعل بأستخدام الدوار الحراري – دورة واحدة لمدة خمس دقايق عند درجة حرارة ٩٤ °س ، ٣٥ دورة تتكون كل منها ٤٥ ثانية عند درجة حرارة ٩٥ °س ،و ٤٥ ثانية عند درجة حرارة ٥٧ °س ، ٤٥ ثانية عند درجة حرارة ٧٢°س ، و دورة واحد الأخيرة لمدة ٧ دقايق عند درجة حرارة ٧٢ °س ،فكان الجدول على النحو التالي :

**الجدول رقم (٣) برنامج اجزاء تفاعل البلمرة**

| No. تسلسل | Phase مرحلة | Tm (°C) درجة الحرارة | Time الوقت | No. of cycle رقم الدورة |
|---|---|---|---|---|
| 1- | Initial Denaturation | 94°C | 5 min. | 1 cycle |
| 2- | Denaturation -2 | 94°C | 45sec | 35 cycle |
| 3- | Annealing | 57°C | 45sec | |
| 4- | Extension-1 | 72°C | 45sec | |
| 5- | Extension -2 | 72°C | 7 min. | 1 cycle |

**٢-٢-٤- الترحيل الكهربائي لناتج PCR :**

تم الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR) التي حضر على هلام الأكاروز بتركيز ٢ % عند ٥ فولت/سم$^{٢}$ ، ١x TBE buffer ، لمدة ١ ساعة ، ثم تم تصوير ناتج التفاعل PCR وبأستخدام عدة التوثيق الموجودة .

**٢-٢-٥-التتابع النيوكليوتيدي والتطابق Sequencing and Sequence Alignment :**

حدد التتابع النيوكلوتيدي للجين المضخم لجين COXI مباشرة بعد الحصول على ناتج تضاعف الجين عن طريق ارسال ال ٢٥ مايكروليتر من ناتج التفاعل (PCR Product ) 100ul بتركيز pmol ١٧.٥ من كل بادئ الى الشركة الكورية Macrogen ، ثم قورنت النتائج من خلال برنامج حاسوبي على شبكة الانترنيت ( أداة بحث موقعية اساسية للتتابع النيوكلوتيدي ) BLAST مع

مجلة دجلة • المجلد ٦ ،العدد ٤ (٢٠٢٣)، ص: ٢٣١ ـ ٢٤٧
ISSN: 2222-6583

قاعدة البينات في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية ( National Center for Biotechnology Information ( NCBI الذي يقوم بأدخال جميع التتابعات النيوكلوتيدية في الحقل BLAST لأجراء التراصف ومقارنة التسلسل والتطابق للتتابع الجيني للحشرتين المراد تشخيصها ومعرفة نوعها وجنسها مع التتابعات في قاعدة البيانات المعروفة والمشخصة مسبقاً.أجريت عملية المحاذاة والتطابق مع السلالات المسجلة في البنك الوراثي العالمي .

**النتائج والمناقشة :**

**١- مسح لحشرات المنْ وتواجدها النسبي على حقول الفجل في قظاء الشرقاط – محافظة صلاح الدين :** أظهرت نتائج اختبار العينات الحشرية التي جلبت من المواقع المزروعة بالفجل و الحشرات التي جلبت من المزرعة الحقلية عن تشخيص نوع من حشرات المنْ وطفيلها شخصت جزيئياً بواسطة التتابع النيوكلوتيدي للجين COXI .

**٢- التشخيص المظهري :**

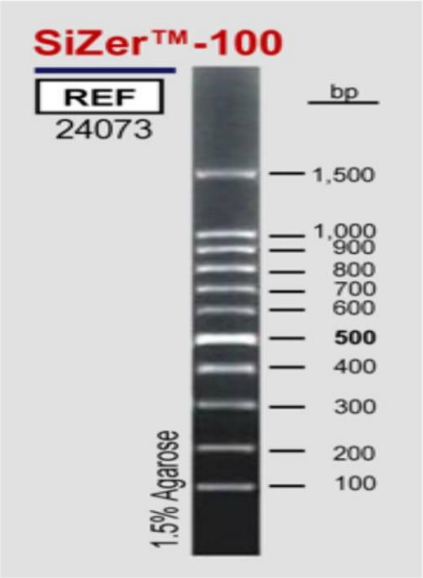
أظهرت نتائج التشخيص المظهري في متحف التاريخ الطبيعي / جامعة بغداد ، أن العدو الحيوي هوه المتطفل نوع *Aphidius matricariae* من جنس *Aphidius* والعائل حشرة منْ الخوخ الأخضر *Myzus persicae (Sulzur)* .

**٣- التشخيص الجزيئي للحشرتين :**

يبين الشكل (٢) الترحيل الكهربائي لل DNA الجينومي للحشرتين موضوعة البحث ويتضح من الشكل وجود حزمة واحدة منفردة لكل حشرة وهذا يدل على دقة استخلاص ال DNA وعدم تحلله ، أما الشكل (٣) يبين الترحيل الكهربائي لنتائج PCR باستخدام البادئ الخاص بالحشرات ويتضح من الشكل وجود حزمة منفردة لكل حشرة بحجم جزيئي ٧٢٠ زوج قاعدي وهو الحجم الجزيئي القياسي الذي يدل على ان نتائج PCR هو تضاعف دقيق للجين COX1 (Folmer et al., 1994 ) إن الحشرتين التي شخصت هوالطفيل *Aphidius matricariae* وحشرة المنْ *Myrus persicae* .

مجلة دجلة • المجلد ٦ ،العدد ٤ (٢٠٢٣)، ص: ٢٣١ ـ ٢٤٧
ISSN: 2222-6583

شكل (٢) الترحيل الكهربائي لجينوم عينات الحشرات ***Aphidius matricariae*** و ***Myrus persicae*** . وبتركيز ١%على هلام الأكاروز بتركيز٥ فولت/سم$^{٢}$ لمدة ٣٠ دقيقة .




شكل (٣) الترحيل الكهربائي لناتج تضخيم جينوم عينات الحشرات ***Aphidius matricariae*** (M.p) و***Myzus persicae*** (Me) وبتركيز ٢ % على هلام الأكاروز لمدة ١ ساعة

**٤- تحليل تتابعات القواعد النيتروجينية :**

أضهرت نتائج تحليل التتابعات النيوكليوتيدية في الجدول رقم (٤) أن هناك تتطابقاً إذ بلغت نسبتة المئوية للطفيل ٧٣% ولحشرة المنْ بلغت النسبة المئوية ٨٨% لتتابعات الجين (سايتوكروم اوكسديز الوحدة الثانوية ١ – في المايتوكوندريا) للحشرات المراد تشخيصها من العراق مع تتابع هذا الجين للحشرات من ناتج تفاعل PCR ، حللت التتابعات التي تم الحصول عليها من الشركة الكورية Macrogen وبأستخدام الموقع العالمي للمركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية National Center Biotechnology Information (NCBI) ضمن النافذة الفرعية Blast ثم اختيرت النافذة الفرعية الثانوية Nucleotide blast اجريت عملية المحاذاة والتطابق مع السلالات المسجلة في البنك الوراثي العالمي (ملف المحاذاة) ثم رسمت الشجرة الوراثية (الملف المرفق) لبيان قرابة الحشرات مع مثيلاتها المسجلة ، وبعدها سجلت عزلة الحشرة العراقية بأسم *Aphidius matricariae* في بنك الجينات العالمي تحت الرقم العالمي OR475235 (التسجيل مرفق) وسجلت الحشرة Myzus persicae تحت الرقم العالمي OR475236 . وتؤدي هذه النتائج بأن نوع حشرة المنْ هوه Myzus persicae و الطفيل بالفعل هوه *Aphidius matricariae* .كما هو مبين في جدول رقم (٤) .

مجلة دجلة • المجلد ٦ ،العدد ٤ (٢٠٢٣)، ص: ٢٣١ ـ ٢٤٧
ISSN: 2222-6583

**جدول (٤)** التشخيص الجزيئي للحشرتين *Aphididae sp* و *Myzus persicae* اعتمادا على النسبة المئوية لتطابق تتابعات الجين cytochrome c oxidase subunit I (COX1) مع بعض سلالات الحشرات المسجلة في البنك الوراثي العالمي .

| ت | نوع وسلالة الحشرة الأعلى تطابقاً | الرقم العالمي | الدولة | نسبة التشابه % | رقم التسجيل العالمي للحشرات المشخصة في الدراسة |
|---|---|---|---|---|---|
| ١ | *Aphididae sp* | **OM575803.1** | الهند | ٨٨ | OR475235 |
| ٢ | *Myzus persicae isolate MP95* | **MT198912.1** | الهند | ٧٣ | OR475236 |

يعد التشخيص الجزيئي بأستخدام بادئ الجين سايتوكروم اوكسديز C الوحدة الثانوية ١ – في المايتوكوندريا من التقنيات الحديثة والدقيقة التي يمكن بواسطتها التشخيص الدقيق للحشرات على مستوى النوع وقد شخصت الدراسات السابقة أنواع كثيرة من الحشرات أعتمادا على هذا الجين .(Asokan et al.,2011; Tyagi et al.,2017; Choudhary et al., 2018)

**Aphidius sp. isolate APHF1 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial**

Query 24 CAGGA-TATTAGGTTTATCAATAAGAATTATTATTCGTATAGAATTA-G--GAATTCCTG 79

Sbjct 30 CAGGATTAATTGGATCATCACTTAGAATTTTAATTCGAATAGAATTAAGACAAATTAAT- 88

Query 80 GTGGATTATTAGAAAATGATCAAATTTATAATAGAATAGTTACAGCTCATGCTTTTGTAA 139

Sbjct 89 -TCAATTATTA-ATAATAATCAATTATATAACGTTATCATTACAATCCATGCATTTATTA 146

Query 140 TAAttttttttATAGTTATACCAATTATTATTGGGGGGTTTGGAAATTGGATAATTCCTT 199

Sbjct 147 TAATTTTCTTTATAACTATACCAATTGTAATTGGAGGATTTGGAAATT GACTAATTCCTA 206
Query 200 TAAAATTAGGGACACCTGGTATAGCCTTTCCCCCGAATAAATAAAAT AAGGATTTGGA-T 258
||| | |||| || | ||| | ||||| ||| ||||||| || || |||| || |
Sbjct 207 TAATAATAGGATGCCCAGACATA-TCATTCCCACGATTAAATAATATTAG-ATTTTGACT 264
Query 259 ATTAAATCCCTCCCTAAATTTAATGATTTTAAGA-AATTTATTAAATATTGGGGGAGGTA 317
|||| ||| || ||| |||| || | |||| | | ||| |||| ||| ||| |
Sbjct 265 ATTACCTCCATCTTTAATAATAATAATCTCAAGACTAATCATT-AATAATGGAACAGGAA 323
Query 318 CTGGATGAACTATTTATCCTCCATTATCT-TCAATTATTGGGCATAATAGAATAACGGTA 376
|||||||||||||||||||||||||||| || ||||| ||||||| || | |||
Sbjct 324 CTGGATGAACTATTTATCCTCCATTATCTAATAA-TATTGCTCATAATAATATTTCTGTA 382
Query 377 GAATTGGCAAATTTTTC-CTTACCTTTAGCTGGGATTTCCTCCATTAAAGGAGTA-TCAA 434
|| || | | ||| || ||| | |||||| || ||||| || ||| ||||| | | ||
Sbjct 383 GATTTAACTATTTTCTCTCTT-CATTTAGCCGGAATTTCTTCTATTTTAGGAGCAATTAA 441
Query 435 TTTTATT 441
||||||
Sbjct 442 CTTTATT 448

شكل رقم (٤) محاذاة التتابع النيوكلوتيدي للجين **cytochrome c oxidase subunit I (COX1)** للحشرة المرادة تشخيصها مع الحشرة الأعلى تطابقاً **Aphidius sp. isolate APHF1** .

***Myzus persicae* isolate APHF2 cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial**

Query 1 ATTTTATATTTGGTATATGATCAGG-ATAATTGGATCATCACTTAGaatcttaattcgtc 59
||||| |||||||||| |||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 47 ATTTTTTATTTGGTATTTGATCAGGTATAATTGGATCATCACTTAGAA TCTTAATTCGTC 106

Query 60 ttgaattaagactaattaattcaattattaataataatcaattatttaatgttattgtta 119
|||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct 107 TTGAATTAAGACAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTTATTGTTA 166

Query 120 CAAGCTC-CTCTTTTATTATAAtttttttAAACAAATACACATGATAATTGG-GGAAT 177
|||  || | ||||||||||||||||||||  ||||| |||  ||  | ||||| ||| |
Sbjct 167 CAAT-TCACGCTTTTATTATAATTTTTTTATAACAA-TACCAATTGTTATTGGTGGATT 224

Query 178 TGGAAATTGGATAAATCCCATTAATATAAGGAGCCCCGGA-ATATGCTTCTCACGATaaa 236
|||||||||| ||| ||| || ||||  ||||   || || ||||  ||| |||||| ||
Sbjct 225 TGGAAATTGGTTAATTCCTAT-AATAATAGGATGTCCTGATATATCTTTCCCACGATTAA 283

Query 237 aaaaCATTAAGAT-CTGAT-A-TACCACCCTCATTAAAAATTATTATTTGTAGGAGGTTA 293
| ||||||| ||| ||||| | ||||||||||||||| ||| || ||||||||    |||
Sbjct 284 ATAACATTA-GATTCTGATTATTACCACCCTCATTAATAATAATAATTTGTAGTTTTTTA 342

Query 294 AATAAAAACAGGAACAGGAACAGGGTGGACTATTTTACCACCCTTATCCAATAACATTGC 353
| ||| ||  |||||||||||||| || |||||||  ||||||||||| ||||| |||||
Sbjct 343 ATTAATAAT-GGAACAGGAACAGGATGAACTATTTACCCACCCTTATCAAATAATATTGC 401

Query 354 ACATAAGAATATTTCAGTTGAATTAACTATTTTTTCATTACATTTAGCAGGAATTTCATC 413
|||||| |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 402 ACATAATAATATTTCAGTTGATTTAACTATTTTTTCATTACATTTAGCAGGAATTTCATC 461

Query 414 AATATTTAGGGGCGCTTTAATTTTATTTGGACAATCTTAAAAATAATACCAAACAATATA 473
||| |||||| ||   ||||||||||||| ||||||||||| ||||||||||||||||||

Sbjct 462 AAT-TTTAGGAGCAA-TTAATTTTATTTGTACAATCTTAAATATAATACCAAACAATATA 519
Query 474 AAATTAAACCAAATCCTTTTATTTCAATGAGAAATTTTAATTACAGCTATTTTATTAATT 533
Sbjct 520 AAATTAAACCAAATCCCTTTATTTCCATGATCAATTTTAATTACAGCTATTTTATTAATT 579
Query 534 TTATCTTTACCTGTTGTAGCAGGGGCTATTACAATATTATTATCTGATCGTCGTTTTTAA 593
Sbjct 580 TTATCTTTACCTGTTCTAGCAGGTGCTATTACAATATTATTAACTGATCGTAATTTA-AA 638
Query 594 TACTTCATTTTTTGACCCAGCAGGGGGAGGTGACCCAACCATGTATCATCATTTATTTTG 653
Sbjct 639 TACTTCATTTTTTGACCCAGCAGGGGGAGGTGACCCAATCTTGTATCAACATTTATTTTG 698
Query 654 ATTTTT 659
Sbjct 699 ATTTTT 704

**شكل رقم (٥) محاذاة التتابع النيوكلوتيدي للجين cytochrome c oxidase subunit I (COX1) للحشرة المرادة تشخيصها مع الحشرة الأعلى تطابقا *Myzus persicae* . isolate APHF2**

**المصادر :**

١- **العزاوي، فاروق محمد هندي** (٢٠٢١). دراسة فاعلية Jasmonic acid و Tannic acid في استحثات مقاومة بعض اصناف نبات البطاطا Solanum tuberosum L. ضد الاصابة بحشرة من الخوخ الاخضر Myzus persicae Sulz. رسالة ماجستير – كلية الزراعة جامعة بغداد ١١٠ ص.

٢- **الموسى ، عبد الله محمد** (١٩٩٨). الفايروسات التي تصيب أشجار اللوزيات في الأردن . مجلة المزارع العربي . العدد (١٢) :١٨-٢١ ص .

٣- **بشير ، عبد النبي و لؤي اصلان** (٢٠١١) . المكافحة الحيوية . الجزء النظري . منشورات جامعة دمشق . مطبعة جامعة دمشق . ٥٧٦ ص .

٤- **بشير ،عبد النبي وكمال ، الأشقر** (٢٠٠٧) المكافحة الحيوية (الجزء النظري).. كلية العلوم. منشورات جامعة دمشق. مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية مطبعة الروضة ٤٨٠ صفحة.

٥- **علي ، شهد عبد الكريم جواد** (٢٠٢٠) . حساسية بعض أصناف الفلفل للإصابة بحشرة منْ القطن *Aphis gossypii* Glover (Aphididae : Hemiptera) ودراسة متبقيات المبيد Imidacloprid على ثمار الفلفل الحلو في الزراعة المحمية . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة – جامعة بغداد . ٩٨ صفحة .

٦- **منصور، محمد شاكر** (٢٠٠٨) . دراسات بيئية وحيوية على المتطفل Aphidius transcaspicus Tele مع الإشارة إلى تأثير التغذية الصناعية وبعض المبيدات والأسمدة في حيويتة . رسالة ماجستير . كلية الزراعة و الغابات ، جامعة الموصل .

٧- **منصور، محمد شاكر و محمد ، جهينة ادريس** (٢٠١٦). دراسة تأثير نوع العائل في القابلية التطفلية للعدو الحيوي Aphidis transcaspicus Tele. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية ،المجلد (١٦)،العدد (٢).

٨- **هادي ، فرات عبد الحمزه** (٢٠١٥) . تأثير الأشعة المايكرونية في حوريات حشرة من الخوخ الأخضر Myzus persicae (Sulzer)(1776) (Homoptera : Aphididae) . مجلة إبن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية ، المجلد (٢٨) ، العدد (١) .

**9- Aslan ,M.M; N. Uygun and P.Stary** (2004). A Survey of Aphid Parasitoids in Kahramanmaras, Turkey (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae; and Hymenoptera: Aphelinidae) Phytoparasitica 32(3):255-263.

**10- Asokan, R., K. B. ; Rebijith, K.B.; S. K. Singh, S.K.;A. S. Sidhu, A.S.; Siddharthan and, S.;P. K. Karanth., P.K**. .٢٠١١. Molecular identification and phylogeny of Bactrocera species (Diptera: Tephritidae), Florida a. Entomologist, . 94;: 1026-1035.

**11- Basavaraju, B. S.; A. K. Chakravarthy; B. Doddabasappa and N. Krishnamurthy** .2009. Yield loss estimation due to major insect and mite pests on potato in Karnataka. Karnataka Journal of Agricultural Sciences. 22(3): 597-600.

**12- Bandyan,S.K., Peters,R.S., Kadir,N.B., Ferrer-Suay,M., and Kirchner,W.H.** (2021). A survey of aphid parasitoids and hyperparasitoids (Hymenoptera) on six crops in the Kurdistan Region of Iraq. Journal of Hymenoptera Research 81: 9–21.

**13- Blackman RL and Eastop VF**.( 2017). Taxonomic issues,. In: van Emden HF, Harrington R, editors. Aphids as Crop Pests. 2nd ed. UK: CAB International;. pp. 1-36 .

**14-Choudhary J.S. .;N. Naaz,N .;M. Lemtur, M.;B. Das, A. K. B.; Singh, A.K.;B. P.-Bhatt ,B.P.and C. S. Prabhakar,C,S.** 2018. Genetic analysis of Bactrocera zonata (Diptera: Tephritidae) populations from India based on coxI and nadl gene sequences". Mitochondrial DNA Part A:
DNA Mapping. Sequencing and Analysis, -29(5):727-736.

**15- Dedryver, C. A.; A. Le Ralec and F. Fabre** .2010. The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. Comptes biologies. 333(6-7): 539-553.

**16-Ebwongu, M.; E. Adipala; S. Kyamanywa ; C.K. Ssekabembe and A.S. Bhagsari** .2001. Influence of Spatial arrangements in maize/Solanum potato intercrops on incidence of potato aphids and leaf hoppers in Uganda. Afr. Crop Sci. J. 9: 175-184.

**17-Folmer, O., ;M. Black, M. ;W. Hoeh, W. ;R. Lutz, R. and R. Vrijenhoek, R.** 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates., Molecular . Markers for . Biology and . Biotechnology,. 3:294-299.

**18-Geiser DM, Jimenez-Gasco MD, Kang SC, Makalowskal, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K .**(2004). FU.S.A.RIUM-ID v. 1.0: A. DNA sequence database for identifying Fusarium. European Journal of Plant Pathology 110:473-479.

**19-Keith A. S., Robert A. S., Jeremy R. d., Jos H., C. Andre, Jean-Marc M.,Gerry L., and Paul D. N. H.** .(2007).Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with Penicillium as a test case. PNAS. 104(10): 3901-3906.

**20- Kreuze, J. F.; J. A. C. Souza-Dias; A. Jeevalatha; A. R. Figueira; J. P. T. Valkonen and R. A. C. Jones** .2020. Viral diseases in potato. In: Campos H., Ortiz O. (eds). The potato crop Springer. 389-430.

**21- Murphy, G.; G. Ferguson and L. Shipp** (2006). Aphids in greenhouse crops fact sheet. 290/621.

**22-Rakhshani A;Z.Tomanovic; P.Stary; A.A.Talebi;N.G.Kavallieratos ;A.A.Zamani and S.Stamenkovic** (2008). Distribution and diversity of wheat aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in Iran. Eur. J. Entomol. 105: 863-870 .

**23- Sambrook, J.; Fritschi, E.F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning, a laboratory manual 3rd (ed.). Cold spring Harbor laboratory press, New York.

**24- Simpson, K. L. S.; G. E. Jackson and J.Grace** .2012. Te response of aphids to plant water stress-the case of Myzus persicae and Brassica oleracea var. capitata Entomologia Experimentalis et Applicata. 142(3): 191-202.

**25- Tyagi, K., ;V. Kumar, V.;D. Singha, D.;K. Chandra, K.;B. A. Laskar, B.A.;S. Kundu, S.;R. Chakraborty, R.and S. Chatterjee, S.** 2017.DNA Barcoding studies on Thrips in India: Cryptic species and species complexes. Scientific . Report., 7: 4898-4911.