

MOLECULAR DIAGNOSIS OF DIFFERENT ISOLATES OF SEED GALL NEMATODE (ANGUINA TRITICI) IN IRAQ AND IT'S CONTROL

Noor Ebraheem Qassem AL-BADRANY

University of Kirkuk, Iraq

Huda Hazim Wafi AL-TAEE¹

University of Mosul, Iraq

Ali Hamood THANOON

University of Mosul, Iraq

Abstract

This study was conducted on seed galls disease, it's the most important and serious diseases on wheat and barley in Iraq, caused by *Anguina tritici*.

Wheat seed galls were geathering from different areas of Iraq (Tal Afar, Qayyarah, Hawija, Al-Dur, Al-Alam, Mosul, Tilkayf, Baghdad, Erbil) as well as barley seed galls from Ba'shiqah, polymerase chain reaction (PCR) by specific primers was used to confirmed morphological dignostic of wheat seed galls nematodes, while the barley seed gall nematode had been identified for the first time in iraq .

Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) showed up genitic various in wheat and barley seed galls isolatase . There were a 99% similarity in nucleated sequence of ITS gene for isolates with nucleated centre of biotechnology information .

Genetic amutation had been in all isolates and Talafar and Erbil 2 isolates were the highest with 240 nucleotide number replaced the G instide of A.

Keywords: Seed Gall, Nematode, *Anguina Tritici*.

 <http://dx.doi.org/10.47832/2717-8234.12.43>

¹  dr.huda@uomosul.edu.iq, <https://orcid.org/0000-0002-7089-0243>

This article has been scanned by iThenticat No plagiarism detected

Copyright © Published by Minar Journal, www.minarjournal.com
Rimar Academy, Fatih, Istanbul, 34093 Turkey

التشخيص الجزيئي لعزلات مختلفة من نيماتودا ثأليل الحبوب *Anguina tritici* في العراق

نور ابراهيم قاسم البدراني

هدى حازم الطائي

علي حمود حنون

الملخص:

أجريت هذه الدراسة على مرض ثأليل الحبوب وهو من الأمراض المهمة والخطيرة المسجلة على الحنطة والشعير في العراق المتسبب عن نيماتودا *Anguina tritici*.

جمعت عينات ثأليل الحنطة من مناطق مختلفة من العراق (تلعفر، القيارة، الحويجة، الدور، العلم الموصل، تلييف، بغداد، أربيل) فضلاً عن ثأليل الشعير المأخوذة من منطقة بعشيق، تم تأكيد تشخيص النيماتودا المسببة لمرض ثأليل الحبوب لأول مرة في العراق بالنسبة لثأليل الشعير بالتشخيص الجزيئي باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل chain reaction polymerase (PCR) وباستخدام زوج البادئات المتخصص (ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT) (FITS)، RITS (GTTTCCGTAGGTGAACCTGC) للتعرف على جميع عزلات النيماتودا وللمناطق المختلفة. أثبتت النتائج ان جميع العزلات كانت للنيماتودا *A. tritici* وأعطت حزمة بحجم 600 pb وهو الحجم المتوقع الذي تنتجه هذه البادئات، وادخلت عزلات النيماتودا *A. tritici* والمأخوذة من مناطق مختلفة في اختبار التكبير العشوائي المتعدد الأشكال Polymorphic Random Amplified (RAPD) للتعرف على التباين الوراثي في تلك العزلات ومعرفة درجة التقارب بين العزلات المأخوذة من الحنطة وعزلة الشعير.

أثبتت النتائج النيوكليوتيدي Sequencing للحامض النووي للعزلات العشرة المأخوذة من المناطق المختلفة من العراق والعزلات الموجودة في بنك الجينات الدولي (NCBI) ذو الرقم (KT900694.1) وجود تشابه في منطقة الاستنساخ الداخلي (ITS) وبحوالي 99% وحدثت عدة طفرات وراثية بين العزلات المختلفة وأعلىها كان عند S1 المأخوذة من منطقة تلعفر و S9 المأخوذة من أربيل وعند الموقع 240 باستبدال القاعدة النروجينية الكوانين محل القاعدة النروجينية الأدينين.

الكلمات المفتاحية: ثأليل الحبوب، نيماتودا، *Anguina tritici*.

المقدمة

تعد الحنطة *Triticum aestivum* L. المحصول الغذائي الاستراتيجي الأول في العالم والأكثر أهمية من بين محاصيل الحبوب وتكمن هذه الأهمية في الموازنة الجيدة بين البروتينات والكربوهيدرات في حبوبها، وتنتمي إلى عائلة *poaceae* (عبد الحسن وآخرون، 2015 وNaseem، 2015)، وتعد واحدة من أهم محاصيل الحبوب وأكثرها إنتاجية في العالم حيث يعتمد عليها أكثر من ثلث سكان العالم، وهي مصدر أساس للطاقات اليومية التي يحتاجها الانسان والتي تلعب دوراً رئيساً في تحقيق الأمن الغذائي (MahaKadum، 2019). فهي تعد مصدراً لتغذية 35% من سكان العالم، وتحتل المرتبة الأولى بين المحاصيل المزروعة من حيث مساحة الزراعة والإنتاج والطلب (عبدالمالك، 2015 و kurt وآخرون، 2016)، والحنطة محصول ذو قيمة غذائية مهمة بسبب احتوائها على كميات من الدهون والفيتامينات وبعض الاملاح المعدنية والأحماض الأمينية الأساسية التي يحتاجها الانسان في غذائه، فضلاً عن احتوائها على سكريات ومعادن وماء بنسب مختلفة (Tony، 2006 و التميمي، 2013) كما انها تدخل في كثير من الصناعات الغذائية كالخبز، المعكرونة، الحلويات وغيرها (ساهي وآخرون، 2014)، تدخل بقايا نباتات الحنطة من سيقان واوراق في صناعة الأعلاف (جرعتلي، 2017)، ويعد عشب الحنطة مصدراً غير مكلف ومصدر لتوفير جميع العناصر الغذائية والفوائد الطبية اللازمة لصحة الجسم وتجديد شبابه حيث تحتوي الأوراق على العديد من التركيبات الكيميائية مثل البروتينات والفلافونويدات والقلويات والجليكوسيدات والستيرينويدات والصابونين والألياف والمركبات الفينولية، وهو غني بالكوروفيل والمعروف باسم "الدم الأخضر" بسبب محتواه العالي من الكلوروفيل الذي يمثل 70% من مكوناته الكيميائية (Devi Sowjanya وآخرون، 2015).

الحنطة كغذاء أساسي كانت تزرع في بلاد فارس القديمة واليونان ومصر في عصور ما قبل التاريخ ثم انتشرت زراعتها في منطقة الشرق الأوسط التي تمتد من الأردن وفلسطين ولبنان إلى سوريا وتركيا والعراق وإيران (Arzani، 2017). وتشغل الحنطة مكاناً متميزاً بين محاصيل الحبوب المزروعة عالمياً وحسب إحصائيات إيكاردا لعام 2020 فقد بلغت المساحة المزروعة 205 مليون هكتار وبلغ الانتاج العالمي لمحصول الحنطة 760.1 مليون طن لعام 2020 (FAO، 2020).

أما في العراق فقد زرعت منذ قديم الزمان وهو أحد المواطن الأصلية لها، وتكثر زراعة الحنطة في المناطق الشمالية وأقصيتها ومنها نينوى، كركوك، أربيل، دهوك والسليمانية وذلك لتربتها الخصبة وتوفر الأمطار التي تسد متطلبات الزراعة والانتاج الوفير (سرحان، 2011). وبلغت المساحة المزروعة بحدود 8574 ألف دونم ونتاجيتها 6238 الف طن لعام 2020 (مديرية الأحصاء الزراعي، 2020)، وبلا شك ان العراق إحدى البلدان التي تتوفر فيها عوامل نجاح زراعة الحنطة والشعير إلا ان مستوى انتاجهم يبقى دون المطلوب وذلك لعدم الاعتماد على تقنيات زراعية ونظم الإدارة الحديثة في مجالات خدمة المحصول وزيادة الانتاج (Khan، 2010).

يتعرض محصول الحنطة للعديد من الأمراض الفطرية منها مرض تعفن البذور وموت بادرات الحنطة (الموسوي وآخرون، 2017) و الأمراض الفايروسية مثل مرض الموزائيك المخطط في الحنطة (قاسم وفاضل، 2011) و الأمراض البكتيرية مثل مرض لفحة السنابل (مندو وآخرون، 2012) والأمراض النيماتودية ويعد مرض تثأل الحبوب الذي تسببه النيماتودا *Anguina tritici* من الأمراض المهمة والشائعة على هذا المحصول وينتشر المرض في معظم المناطق التي تزرع فيها الحنطة في العالم (مصطفى، 2009)، إذ يؤدي المرض خسائر كبيرة في انتاج الحنطة وتفقد النباتات المصابة أكثر من 50% من الحبوب التي تنتجها (Paruthi وآخرون، 1987).

سجلت هذه النيماتودا في اغلب المحافظات العراقية وازدادت نسبة الإصابة بها إلى 75% في حقول الحنطة (Stephan و Antoon، 1990) و 90% في حقول الشعير (الطائي وآخرون، 1999)، وان اصناف الحنطة أظهرت درجات متفاوتة في حساسيتها للإصابة بنيماتودا التآليل (الجبوري وآخرون، 2010)، وأثبتت الدراسات في العراق وجود 3 سلالات من النيماتودا *A. tritici* هي سلالة الشعير وسلالة الحنطة الناعمة وسلالة الحنطة الخشنة (Stephan و Antoon، 1990).

ونظراً لأهمية هذا المرض وانتشاره في حقول الحنطة والشعير في أغلب مناطق زراعتها وتفاوت أصناف الحنطة المزروعة في درجة حساسيتها للإصابة بالمرض فضلاً عن الخسائر الكبيرة في انتاج هذا المحصول ولما تشكله من خطورة في حقول المزارعين عليه ارتأينا القيام بهذه الدراسة والتي تهدف إلى ما يأتي:

- 1- جمع عينات من مناطق مختلفة من العراق منها:
(تلعفر- القيارة- الحويجة - الدور- العلم- الموصل - تلييف- بغداد- أربيل - بعشيقه).
- 2- تشخيص نيماتودا تآليل الحبوب باستخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية على مستوى الحامض النووي DNA باتباع تفاعل البلمرة المتسلسل PCR (Polymerase Chain Reaction).
- 3- دراسة التباين الوراثي بين العزلات المختلفة لنيماتودا تآليل الحبوب *A. tritici* تبعاً لمناطق جمع العينات وباستخدام التكبير العشوائي المتعدد الأشكال RAPD (Random Amplified polymorphic DNA).
- 4- دراسة التتابع النيوكليوتيدي Sequencing .

المواد وطرائق العمل

- جمع وفحص عينات تآليل الحبوب

جمعت عينات من تآليل الحبوب من مناطق مختلفة من العراق للموسم الزراعي 2019-2020 متمثلة ب (تلعفر، القيارة، الحويجة، الدور، العلم، الموصل، تلييف، بغداد، أربيل، بعشيقه)، وذلك للتعرف على حجم هذه المشكلة في المناطق المختلفة من العراق وكذلك لغرض تشخيص النيماتودا والتعرف عليها بالطرق المورفولوجية والجزيئية

وفحصت العينات في المختبر لمعرفة مدى حيوية النيماتودا داخل التآليل وذلك بنقع التآليل بماء معقم لمدة 10 دقائق ثم رفعت التآليل بملقط ووضعت في زجاجة ساعة وفتحت مع وضع كمية قليلة من ماء مقطر معقم وتم فحصها تحت المجهر الضوئي على قوة تكبير 10x ولوحظ حركة اليافعات بصورة نشطة وبحركة دودية.

- التشخيص الجزيئي لنيماتودا تآليل الحبوب *Anguina tritici*

تم تنفيذ هذه الدراسة في مختبرات التقنيات الاحيائية في شركة جسر المسيب في بغداد حيث جمعت تسعة عينات من تآليل الحنطة من مناطق مختلفة من العراق وعينة واحدة من تآليل الشعير المأخوذة من ناحية بعشيقية في محافظة نينوى الجدول (1) استخدمت لغرض استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين Deoxy ribonucleic acid (DNA) من تآليل الحنطة والشعير المصابة بنيماتودا تآليل الحبوب *Anguina tritici* ومنها إجراء اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) واختبار تفاعل التكبير العشوائي المتعدد الأشكال Random Amplified Polymorphic DNA ((RAPD-PCR وتفاعل التتابع النيوكليوتيدي DNA Sequencing.

الجدول (1) مناطق جمع العينات المستخدمة في الدراسة

رمز العزلة	العائل	منطقة أخذ العينة
S1	الحنطة	تلعفر
S2	الحنطة	القيارة
S3	الحنطة	الحويجة
S4	الحنطة	الدور
S5	الحنطة	العلم
S6	الحنطة	الموصل
S7	الحنطة	تلكيف
S8	الحنطة	بغداد
S9	الحنطة	أربيل
S10	الشعير	بعشيقية

- استخلاص الحامض النووي ال DNA

تم استخلاص الحامض النووي (DNA) من تآليل الحنطة والشعير لنيماتودا تآليل الحبوب، أجري العزل باستخدام Genaid Kit وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة (Geneaid Biotech، تايوان)، وتم التحقق من سلامة الحامض النووي بواسطة الترحيل الكهربائي Electrophoresis Gel لهلام الاكاروز بتركيز 0.8% (وزن / حجم) المضاف له صبغة Ethidium bromide (0.7 مايكروغرام / مل) في محلول Buffer TAE (40 mM Tris-Acetate; 2 mM EDTA، pH 8.3) وبعد تصلبه تم وضعه في جهاز الترحيل الكهربائي الحاوي على محلول الـ 1X TBE (90Mm، 2Mm EDTA) ، وحُقنت عزلات النيماتودا *A. tritici* في هلام الاكاروز بمعدل 5 مايكروليتر لكل فتحة بعد إضافة صبغة 6X Loading dye (Bromophenol Blue 0.25%، Xylene Cyanol 0.25%، Sucrose 40%) ، EDTA (2.5 ml of 0.5 M PH = 8،) واستخدم المعلم الوراثي 1Kb DNA Ladder من الكت (D-1040) التابع لشركة Bioneer الكورية.

أجريت عملية الاستخلاص بعدة خطوات كالآتي:

1- تفكك الأنسجة

غمرت كمية من الثآليل في ماء مقطر معقم وبعد النقع لمدة ربع ساعة فتحت الثآليل داخل الماء من أجل السماح ليافاعات الطور الثاني بالخروج وتمت ازالة اغلفة الحبوب، وبعدها أخذ 100 ملغم من الماء الحاوي على اليافاعات، ثم تجميد العينة بإضافة النتروجين السائل وبعدها تم طحنها ونقلها إلى الأنبوب جهاز الطرد المركزي سعة 1.5 مل.

2- التحلل

أضيف 400 مايكرو لتر من محلول البفر GP1 و 5 مايكرو لتر من RNase A في أنبوب العينة وتم خلطها جيداً بواسطة جهاز الفورتكس، وبعدها تم تحضين العينة عند درجة حرارة 60 م° لمدة 10 دقائق في الحمام المائي واثنا مدة التحضين تم قلب الأنبوب كل 5 دقائق بعدها تم إضافة 100 مايكرو لتر من محلول البفر GP2 وتم الخلط باستخدام جهاز الفورتكس ووضعت العينة على الثلج لمدة 3 دقائق، بعدها نُقلت العينة إلى أنبوب التجميع سعة 2 مل الحاوي على عمود التصفية ووضعت في جهاز الطرد المركزي على سرعة 1000 دورة لمدة دقيقة واحدة، نُقل الراشح إلى أنبوب جديد وأضيف 1.5 مل من محلول البفر GP3 وايزوبروبانول ورجت العينة على جهاز الفورتكس لمدة 5 ثوان.

3- ربط الحامض النووي

تم نقل 700 مايكرو لتر من الخليط إلى الأنبوب الحاوي على عمود (GD) Generator Droplet Column ووضعت في جهاز الطرد المركزي على سرعة (14000-16000 دورة) لمدة دقيقتين وأخذ الرائق ووضع في أنبوب جديد حاوي على عمود GD جديد وتم إضافة الخليط المتبقي في أنبوب حاوي على عمود GD للحصول على الرائق بنفس الطريقة وتمت اضافته مع الرائق السابق، بعدها وضع عمود GD الجديد الحاوي على الرائق مرة أخرى في أنبوب التجميع سعة 2 مل وأضيف 400 مايكرو لتر من محلول البفر W1 إلى الأنبوب ووضع في جهاز الطرد المركزي (14000-16000 دورة) لمدة 30 ثانية بعدها أخذ الرائق ووضع في أنبوب حاوي على عمود GD جديد ووضع مرة أخرى في أنبوب التجميع سعة 2 مل وبعدها تم إضافة 600 مايكرو لتر من محلول بفر الغسل وكذلك أضيف الأيثانول إلى عمود GD ووضع في جهاز الطرد المركزي (14000-16000 دورة) لمدة 30 ثانية، وأخذ الرائق ووضع في أنبوب تجميع سعة 2 مل ووضع في جهاز الطرد المركزي (14000-16000 دورة) لمدة 3 دقائق، بعدها نُقل الرائق إلى أنبوب دقيق 1.5 مل وإضافة 100 مايكرو لتر من محلول البفر المؤقت المسخن مسبقاً على درجة حرارة 60 م° في الحمام المائي وتُرك الأنبوب لمدة 3-5 دقيقة للتأكد من امتصاص البفر المؤقت وبعدها وضع في جهاز الطرد المركزي (14000-16000 دورة) لمدة 30 ثانية، عليه تم الحصول على قالب الحامض النووي النقي DNA Templet.

تم عمل تخفيف لل DNA الناتج من عملية الاستخلاص وقياس تركيزه ونقاوته باستخدام جهاز Nanodrop (Bio Drop µL ITE، UK، co.)، ومن ثم توحيد تراكيز كافة العزلات المستخدمة ضمن التركيز 50 نانو كرام واستخدامه في تفاعلات ال PCR اللاحقة

- تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

- تفاعل Specific-PCR

عُمل التفاعل باستخدام البادئات الخاصة بنيماتودا ثآليل الحبوب *A. tritici* التي بينها الجدول (2) لزوج البادئات المستخدمة في التفاعل ومع صفاته الخاصة وحجم الحزمة المتوقع انتاجها تم اجراء تفاعل ال Specific-PCR باستخدام الكت (K=2012) من الشركة Bioneer الكورية والحاوي على خليط ال (PCR الجاهز)

(PCR-Mix: Top DNA polymerase 1U، Pyrophosphatase and pyrophosphate، dNTP (dATP، dCTP، dGTP، dTTP) 250 µM each، Reaction Buffer with 2 mM MgCl₂ 1X، Stabilizer and tracking dye)

وذلك وفقاً لطريقة العمل الآتية:

- 1- تحضير الأنبوب الحاوي على PCR-MIX سعة 20 مايكروليتر (AccuPower Gold Multiplex PCR Pre (K-2115 Mix tubes 20 µl (K-2116)
- 2- إضافة قالب الـ DNA بتركيز 50 نانوكرام
- 3- إضافة زوج البادئات الأممي والخلفي بتركيز 10 Pmol لكلاً منهما
- 4- تكملة الحجم داخل الأنبوب بالماء المقطر المعقم DW
- 5- مجانسة مكونات الأنبوب بوضعها على جهاز الفورتكس (Bioneer's ExiSpin Vortex) وحتى ذوبانها الكامل وخلطها
- 6- نُقل الأنبوب إلى جهاز الـ PCR وفقاً لظروف التشغيل الآتية:

- | | | |
|-----------------|------|-------------|
| 1- T = 95°C | لمدة | 5 min |
| 2- T = 95°C | لمدة | 1 min |
| 3- T = 50°C | لمدة | 1 min |
| 4- T = 72°C | لمدة | 30 sec |
| 5- Go to step 2 | | 35-40 cycle |
| 6- T = 72°C | لمدة | 3 min |
| 7- Hold 4°C | | |

وبعد انتهاء التفاعل تم فحص نتائج التحليل على جهاز الترحيل الكهربائي ومشاهدتها على جهاز الأشعة فوق البنفسجية Gel Documentation System وعلى طول موجي 365 نانوميتر.

الجدول (2) بعض الصفات الخاصة بالبادئات التي تم استخدامها للكشف عن نيماتودا ثآليل الحبوب

Anguina tritici

اسم البادئ	تسلسل النيكلوتيدات من 5' to 3'	حجم الحزمة (bp)	درجة حرارة الالتحام	رقم العزلة الكورية في البنك الوراثي	العزلة المدروسة
FITS rDNA	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	600	50°C	KT900694.1	<i>Anguina tritici</i>
RITS rDNA	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC				

- تفاعل التكبير العشوائي متعدد الأشكال Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

كوسيلة لتقييم التباين الوراثي لمسبب مرض ثآليل الحبوب *A. tritici* تم اختبار عشر عينات من الـ DNA المعزول من الثآليل لنباتات الحنطة والشعير المصابة ولمناطق مختلفة في العراق حيث أُختبر عدد من البادئات الوراثية العشوائية على العينات العشرة لثآليل الحنطة والشعير، وتم انتخاب خمسة بادئات وراثية عشوائية وهي-OPA

،OPC-4 (CCGCATCTAC) ،OPA-10 (GTGATCGCAG)OPF-15 (CCAGTACTCC) ،11(CAATCGCCGT) ،OPC-8 (TGGACCGGTG) التي تم تجهيزها من شركة Bioneer الكورية وتمثلت مكونات التفاعل بالتركيب الآتية:

PCR buffer	10X
dNTPs	0.2mM
MgCl ₂	25mM
Primer	0.6mM
Taq Polymerase	1 unite
Formide	5%
DNA Templet	50ng
Water	12.6μL
Total	25μL

وفقا للبرنامج الآتي:

1-T=95°C	ولمدة	2min
2-T=95 °C		1min
3-T=36 °C		1min
4- Ramp	تستعمل لرفع الحرارة بالتدرج	0.3 c/sec
5- T=72 °C		2min
6- Go To	Step 2	40Cycle
7- T=72 °C		5min
8- Hold 4 °C		

- تحليل التتابع النيوكليوتيدي DNA Sequencing

أجري تحليل التتابع النيوكليوتيدي DNA Sequencing لجينوم نيماتودا ثأليل الحبوب بهدف تحديد وإثبات هويته حيث تم تحرير نتائج تتابع النيوكليوتيدات لتفاعل PCR لعينات مختلفة ومقارنتها وتحليلها مع التسلسلات المثبتة في قاعدة البيانات المرجعية باستخدام برنامج BioEdit Sequence Alignment Editor وترقيم الاختلافات الملحوظة في كل عينة متسلسلة لتضخيم قطع DNA في تفاعل PCR وكذلك في موضعها المقابل داخل الجينوم المرجعي، يستخدم هذا الجزء الجيني الرايبوسومي بكفاءة في تحديد هوية الكائنات الحية المتعددة بمقارنة تسلسل الحامض النووي (Zhang وآخرون، 2000).

ولتتبع حدوث الطفرات الوراثية في مناطق الاستنساخ الداخلي ITS (Internal Transcribed Spacers) ومقارنتها مع التتابع النيوكليوتيدي في بنك الجينات الوراثي ومن ثم رسم الشجرة الوراثية نمط Cladogram وهي شجرة النشوء والتطور القائمة على القرابة للمتغيرات الجينية لجزء RNA الرايبوسومي لتحديد الموقع الدقيق للتطور لكل عزلة من عزلات *A. tritici*.

- الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA Gel Electrophoresis

إن ناتج تفاعل ال PCR تم تحليله بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1.5% لفصل حزم ال DNA وتم تجهيز الهلام بإضافة الاكاروز إلى محلول ال TBE وتسخينه في جهاز المايكروويف لمدة 2-4 دقائق لحين ذوبان الاكاروز تماماً وتركه حتى يبرد قليلاً ومن ثم إضافة 5 مايكروليتر من صبغة Ethidium bromide وبعد تصلب الهلام تم وضعه في جهاز الترحيل الكهربائي الحاوي على محلول ال TBE 1X، تم إضافة 5 مايكروليتر من صبغة 6X Loading dye لكل أنبوب من انابيب ال PCR الداخلة في التفاعل وخلطها مع ناتج ال PCR بتحريك الانابيب وأخذ 10 مايكروليتر من كل أنبوبة من العزلات المستخدمة ووضعها في فتحات الهلام Well فضلاً عن وضع المعلم الوراثي المدرج كمرجع للمقارنة 100bp وحسب نوع التفاعل في بداية كل هلام، ثم تشغيل جهاز الترحيل الكهربائي على فولتية 100 فولت ولمدة 90 دقيقة و تصوير الهلام بواسطة وحدة Gel Documentation System.

تم تحليل الصور الخاصة بكل بادئ من البادئات الوراثية التي تم اعتمادها بناءً على وجود أو عدم وجود الحزمة بأعطاء رقم 1 اذا كانت موجودة ورقم صفر اذا لم تكن موجودة واعتماداً على معامل Nie's 72 (Nie و Lie، 1979) في تحليل التباين الوراثي وباستخدام المعادلة الآتية:

$$\text{Genetic Distance} = 1 - \left(\frac{2 * N_{xy}}{N_y + N_x} \right)$$

إذ ان: G. D: يمثل البعد الوراثي

N_{xy} : تمثل عدد الحزم المشتركة بين النموذجين x و y التي تمثل النموذجين

N_x : تمثل عدد الحزم الكلية في النموذج x

N_y : عدد الحزم الكلية في النموذج y

وتم ادخال هذه القيم (صفر، 1) في برنامج التحليل (NTSYS) حيث نتج عن التحليل مصفوفة ضمت معاملات التشابه الوراثي بين العينات ومنها تم عمل الشجرة الوراثية Dendrogram للعينات كافة حيث تم تجميعها في مجموعات بناءً على مدى التشابه او التباين الوراثي فيما بينهما وباستخدام

Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean(UPGMA)

وفقاً لطريقة (Sneath و Sokal، 1973)

كما تم حساب النسبة المئوية للتعددية الشكلية للبادئ من خلال المعادلة الآتية:

النسبة المئوية (%) = (التعددية الشكلية لكل بادئ / عدد الحزم المتباينة في البادئ / العدد الكلي لحزم البادئ) ×

100

وحساب النسبة المئوية للقدرة التمييزية لكل بادئ حسب المعادلة الآتية:

القدرة التمييزية لكل بادئ (%) = (عدد الحزم المتباينة للبادئ / عدد الحزم المتباينة لكل البادئات) × 100.

أما النسبة المئوية لكفاءة كل بادئ فتم حسابها حسب المعادلة الآتية:

كفاءة كل بادئ (%) = (العدد الكلي لحزم البادئ / العدد الكلي لحزم كل البادئات) × 100

(Grundmann وآخرون، 1995).

- تسجيل نيماتودا ثأليل الحبوب في بنك الجينات التابع للمركز الوطني لمعلومات التقانات الاحيائية ال

(National Center for Biotechnology Information) NCBI

تم مطابقة تسلسل نيماتودا ثأليل الحبوب مع باقي تسلسلات العزلات للنوع نفسه فضلاً عن الأجناس الأخرى لنيماتودا النبات الموجودة في بنك الجينات NCBI لدول العالم.

النتائج والمناقشة

- التشخيص الجزيئي لنيماتودا ثآليل الحبوب *Anguina tritici*

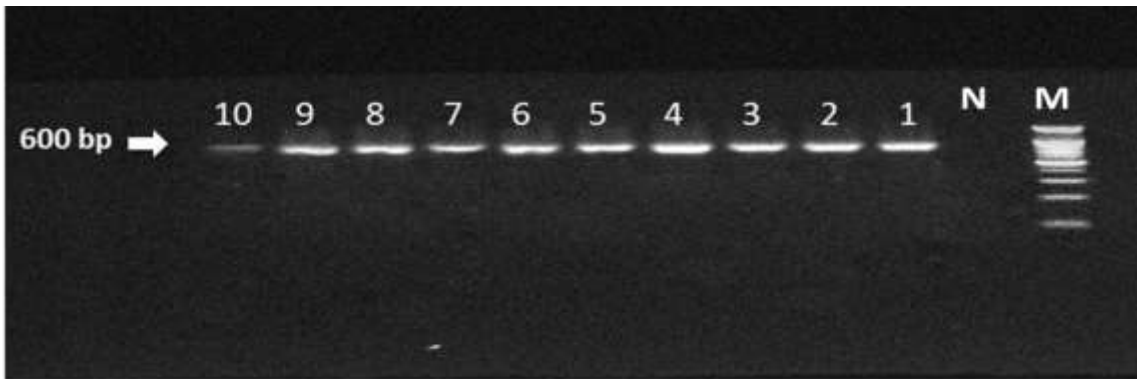
- استخلاص الحامض النووي ال DNA

أظهرت نتائج الفحص بجهاز الطيف الضوئي Spectrophotometer كثافة الحامض النووي المعزول من ثآليل الحنطة والشعير لنيماتودا ثآليل الحبوب ولمناطق مختلفة من العراق، ومن ثم استخدام ال DNA النقي والمخفف لتركيز 50 نانو كرام فيما بعد في تفاعلات ال PCR اللاحقة.

- تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Chain Reaction Polymerase

- تفاعل البلمرة المتسلسل (Specific PCR)

أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Specific لزوج البادئات المتخصص على جهاز الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis باستعمال هلام الاكاروز Agarose بتركيز 1.5% حيث تم ملاحظة الحزم باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية Uv Trans Illumination على طول موجي 365 نانومتر لغرض فحص ناتج التفاعل ظهرت حزم لجميع عزلات نيماتودا ثآليل الحبوب بحجم 600 pb زوج قاعدة وهذا هو الحجم المتوقع الذي ينتجه زوج البادئات المتخصصة كما ذكر في الجدول (2) فضلاً عن عزلة الشعير (عزلة 10) فقد أعطت نفس الناتج ولكن بحدة أقل مما يشير إلى اختلافها عن بقية العزلات المأخوذة من محصول الحنطة (الشكل 9).



Molecular Ladder :M
Negative control :N

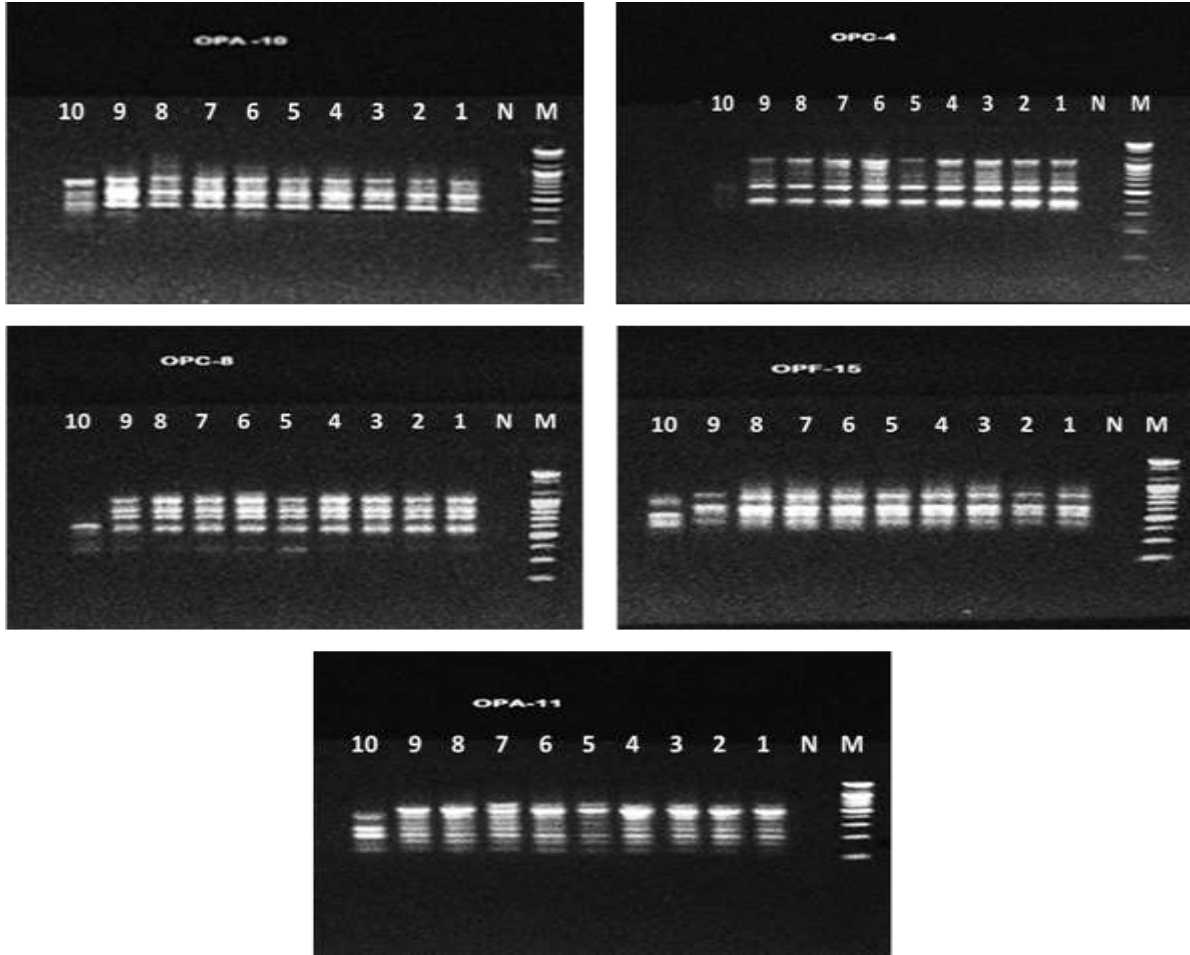
6 = حنطة / الموصل
7 = حنطة / تليف
8 = حنطة / بغداد
9 = حنطة / أربيل
10 = شعير / بعشيقية

1 = حنطة / تلعفر
2 = حنطة / القيارة
3 = حنطة / الحويجة
4 = حنطة / الدور
5 = حنطة / العلم

الشكل (9) ناتج تفاعل Specific PCR لعزلات من نيماتودا ثآليل الحبوب *Anguina tritici* ولمناطق مختلفة في العراق

- تفاعل التكبير العشوائي متعدد الأشكال (RAPD) Random Amplified Polymorphic DNA

تم اجراء تفاعل RAPD-PCR لمعرفة درجة او نسبة التقارب الوراثي بين عشر عزلات من نيماتودا ثآليل الحبوب *Anguina tritici* في مناطق مختلفة من العراق وذلك باستخدام بادئات وراثية عشوائية تم انتخاب خمس منها لإجراء التفاعل (الشكل 10).



Molecular Ladder :M
Negative control :N

حنطة / تلعفر = 1	حنطة / الموصل = 6
حنطة / القياره = 2	حنطة / تلكيف = 7
حنطة / الحويجة = 3	حنطة / بغداد = 8
حنطة / الدور = 4	حنطة / أربيل = 9
حنطة / العلم = 5	شعير / بعشيقة = 10

الشكل (10) البادئات الوراثية العشوائية المستخدمة في تفاعل RAPD PCR

وُحِلَّت نتائج تفاعل الـ RAPD-PCR التي ظهرت في هلام الاكاروز باستخدام برنامج (NTSYS) بعد تحويل النتائج التوصيفية إلى بيانات رقمية بوضع 1 عند وجود حزمة و 0 عند غياب الحزمة (الجدول 3)

الجدول (3): التنوع الشكلي في انماط ال DNA لعزلات نيماتودا تأليل الحبوب *Anguina tritici* باستخدام البادئات الوراثية.

حجم الحزمة Pb	ارقام العزلات										اسم البادئ الوراثي
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	opA-11
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
250	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
175	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
125	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
900	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	opf-15
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
425	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	opc-8
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
275	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	
800	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	opa-10
625	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
525	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
475	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	opc-4
1000	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	

800	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
650	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	
525	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

1: يدل على وجود حزمة 0: يدل على عدم وجود حزمة

ولملاحظة نواتج البادئات من الحزم الكلية والمتباينة ونسب كفاءتها وقدرتها التمييزية فالجدول (4) يوضح العدد الكلي للحزم الناتجة 31 حزمة بواقع 6 حزمة عند البادئ (OPC-8، OPC-4، OPF-15) يقابلها 8 حزمة عند البادئ OPA-11 واقل عدد للحزم كان عند البادئ OPA-10، وان العدد الكلي للحزم المتباينة كان 20 حزمة، ثلاث من هذه البادئات المثبتة في الجدول (OPA-11، OPF-15، OPC-8) كان عدد الحزم المتباينة لهم 5 حزمة في حين اعطى البادئ OPA-10 2 حزمة والبادئ OPC-4 اعطى 3 حزمة، ونلاحظ ايضاً ان النسبة المئوية التعددية الشكلية بلغت 83.33 % عند البادئين OPF-15 و OPC-8، في حين كانت النسبة المئوية التعددية الشكلية 2.5 % عند البادئ OPA-10، وبينت النتائج ان النسبة المئوية لكفاءة كل بادئ كانت 25.80 % للبادئ OPA-11 أما البادئ OPA-10 كانت 16.12 %، ونجد اقصى قدرة تمييزية بلغت 25% مع البادئ OPA-11 و OPF-15 و OPC-8 واقلها قدرة تمييزية 10% عند البادئ OPA-10.

الجدول (4) نواتج البادئات من الحزم الكلية والمتباينة مع نسب كفاءتها وقدرتها التمييزية للعينات المدروسة

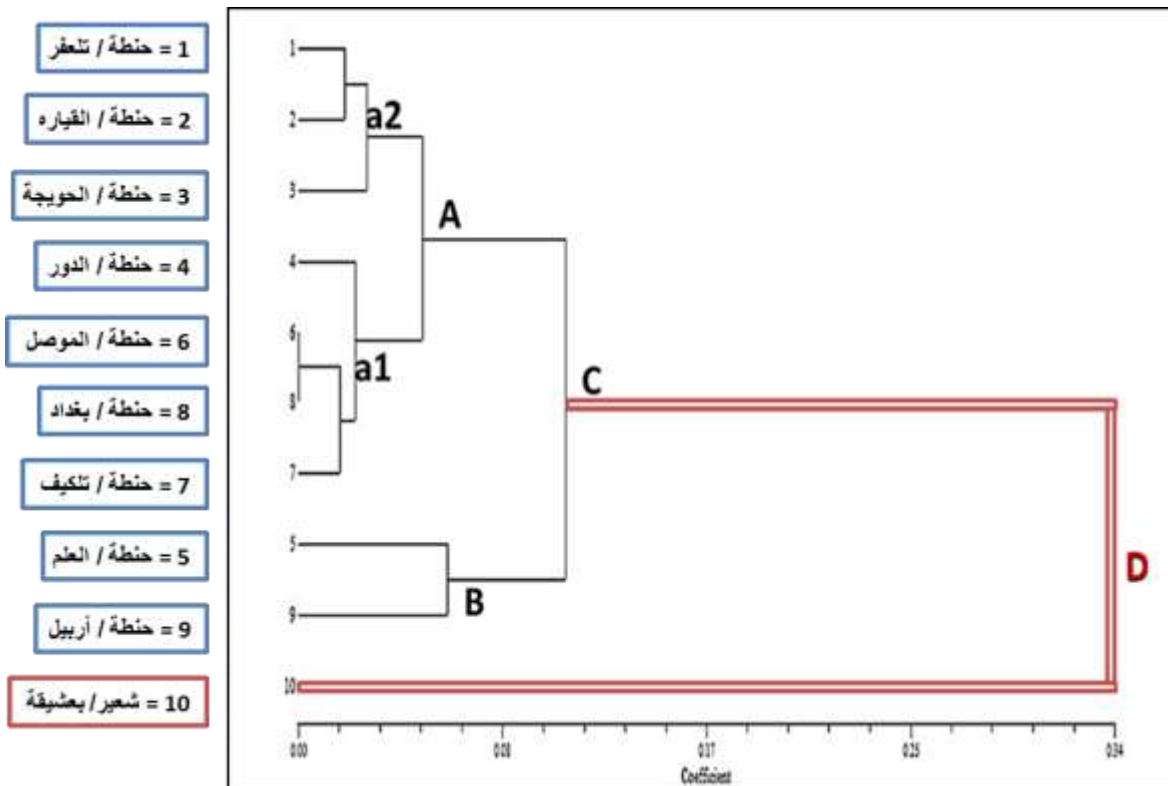
اسم البادئ	العدد الكلي للحزم	عدد الحزم المتباينة	% للتعددية الشكلية للبادئ	% لكفاءة البادئ	% للقدرة التمييزية للبادئ
OPA-11	8	5	62.5	25.8 0645	25
OPF-15	6	5	83.333 33	19.3 5484	25
OPC-8	6	5	83.333 33	19.3 5484	25
OPA-10	5	2	40	16.1 2903	10
OPC-4	6	3	50	19.3 5484	15
	31	20			

وعليه ان كفاءة البادئات (OPA-11 و OPF-15 و OPC-8) حققت أعلى قدرة تمييزية من بقية البادئات وبنسبة 25% حيث يمكن مستقبلاً استخدام هذه البادئات في الحصول على الحزم المشتركة وتحليلها لتصميم بادئات أكثر تخصصاً في التمييز بين العزلات ذات درجة التشابه الكبيرة ومن ثم ايجاد طرق فحص سريعة تضمن استخدام وسائل المكافحة المختلفة بصورة أكثر فعالية وتخصوية حسب نوع النيما تودا المسببة للإصابة والذي سيتم تحديده بسهولة بعد إجراء تفاعل متخصص باستخدام البادئ المضخم للكشف عن هذا النوع بالتحديد.

يلاحظ من الشجرة الوراثية بان العزلات تشكلت في مجموعات تباينت فيما بينها من حيث درجة التباعد (الاختلاف) والتي كانت صفرًا بين العزلتين (6، 8) وتمثلة بعزلي الموصل وبغداد و 34% بين العزلة رقم (10) عزلة الشعير وبقية العزلات الأخرى الشكل (11).

ويمكن ملاحظة بان العزلتين (6، 8) كانتا الاقرب لبعضهما وبنسبة اختلاف 0% مما يوضح عدم وجود أي اختلافات وراثية بين هاتين العزلتين وعند النظر لهاتين العزلتين فانهما يمثلان منطقتين هما بغداد و الموصل حيث من الممكن ان تفسر نتيجة التقارب بينهما والتي تدل على أنهما عزلة واحدة بان العزلة التي اخذت من بغداد كانت بالأصل موجودة في الموصل أو العكس.

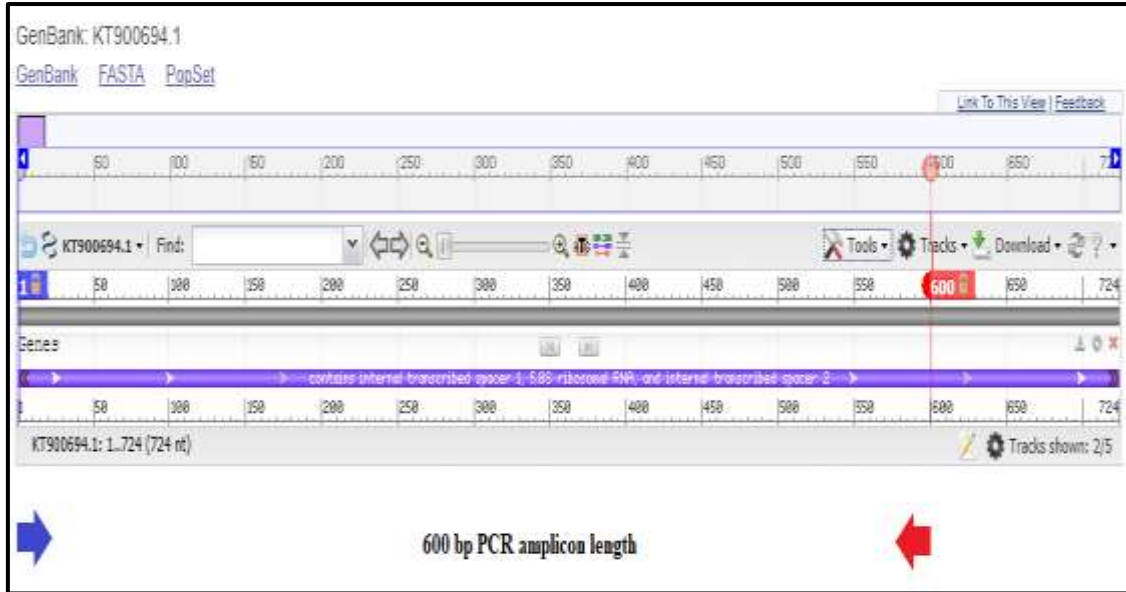
كذلك يلاحظ بان اقرب عزلة لهما كانت عزلة رقم (7) والتي تمثل تلكيف وقد شكلت هذه العزلات مجموعة متقاربة جداً وبنسبة تباعد لا تتجاوز 2% مع العزلة رقم (7) وقد شكلت ايضاً هذه المجموعة درجة تقارب مع عزلة رقم (4) وهي عزلة الدور وبنسبة تباعد اقل من 3% حيث ظهرت هذه العزلات في مجموعة واحدة (a1) شكلت مع العزلات (1، 2، 3) مجموعة أكبر (a2) وبنسبة تباعد لا تتجاوز 6% وسميت بالمجموعة (A) وتشكلت مجموعة أخرى من العزلتين (5، 9) وتمثلت بعزلي العلم وأربيل بدرجة تقارب لا تتجاوز 7% وسميت بالمجموعة (B) والتي كانت درجة التباعد بينها وبين العزلات في المجموعة (A) بنسبة لا تتجاوز 10% حيث شكلت هاتين المجموعتين مجموعة جديدة (C) والتي مثلت اعلى درجة تباعد عن المجموعة (D) والمتمثلة بعزلة واحدة هي العزلة رقم (10) وبنسبة تباعد بلغت 34% وهي اعلى نسبة تباعد تم الحصول عليها من تحليل نتائج تفاعل التكبير العشوائي متعدد الأشكال والتي تؤكد الاختلاف الوراثي بين عزلات الحنطة التي تمثلت بالمجموعة (C) وعزلة الشعير التي تمثلت بمجموعة لوحدها (D) وهو ما يتفق مع الاختلاف في حدة عزلة الشعير عن بقية عزلات الحنطة التي ظهرت في تفاعل PCR-Specific فضلاً عن الاختلافات المورفولوجية التي ظهرت بين هذه العزلة (الشعير) وبقية عزلات الحنطة.



الشكل (11) الشجرة الوراثية الناتجة من تفاعل 10 عزلات من نيماتودا *Anguina tritici* (المأخوذة من مناطق مختلفة من العراق) مع خمسة بادئات وراثية بواسطة تفاعل ال RAPD-PCR

DNA Sequencing التتابع النيوكليوتيدي

أشارت نتائج التتابع النيوكليوتيدي للحامض النووي للعزلات العشرة إلى المواضع الدقيقة لتضخيم PCR، حيث أظهر اختبار كل من العينات العشرة مع تسلسل الحامض النووي للعينات المسجلة في بنك الجينات الدولي NCBI والمجموعة (KT900694.1) وجود التشابه بحوالي 99% بين الحامض النووي للعزلات العشرة لنيماتودا *A. tritici* في منطقة التباعد الداخلي ITS داخل تسلسل الحامض النووي (الشكل 12).



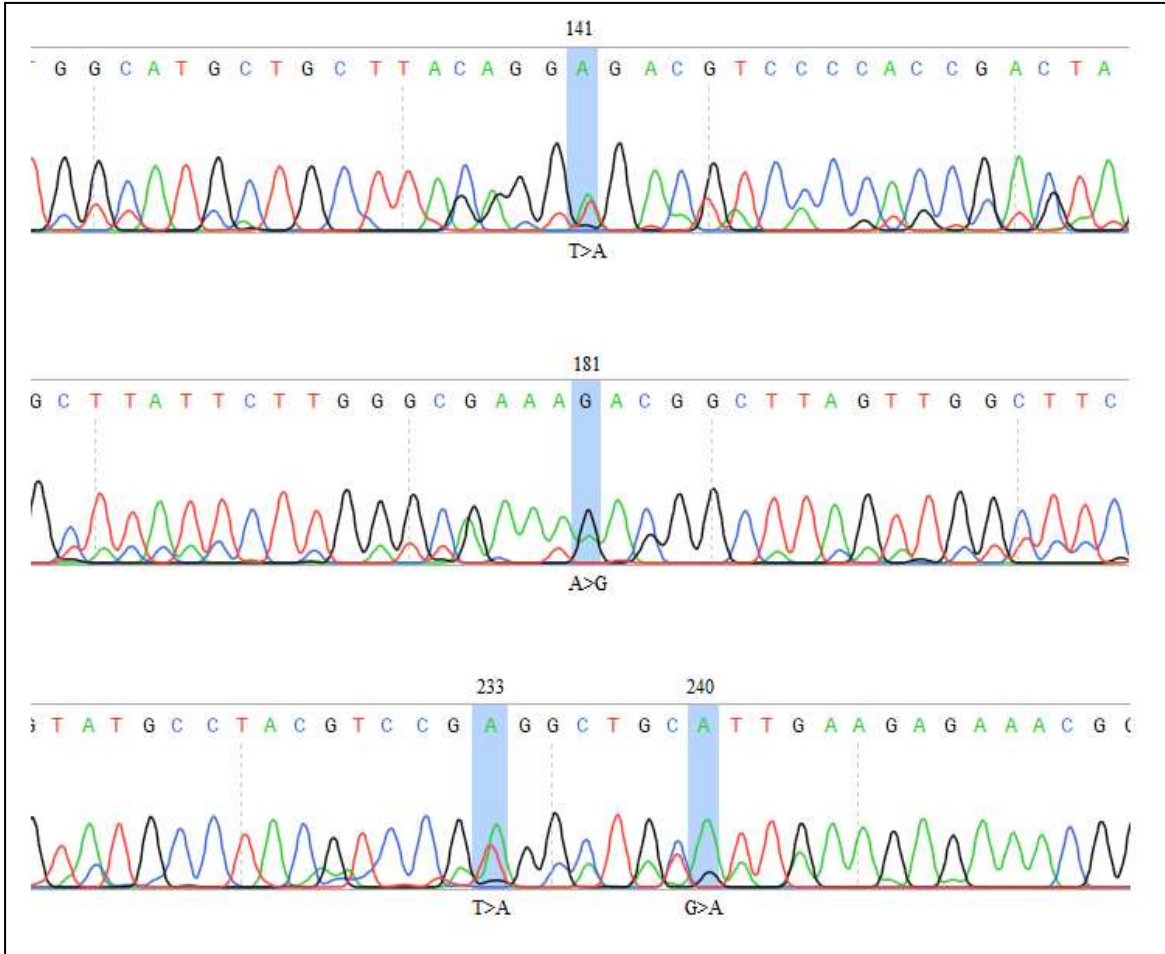
الشكل (12) التتابع النيوكليوتيدي لمناطق الاستنساخ الداخلي (ITS) داخل عزلات *Anguina tritici* DNA بحجم العزلة 600 pb (KT900694.1).

وتم تمديد التتابع النيوكليوتيدي المكبر من 1 إلى 600 من تتابع الحامض النووي المرجعي في بنك الجينات الدولي NCBI للعزلة (KT900694.1) (الجدول 5).

الجدول (5) التتابع النيوكليوتيدي للعزلة (KT900694.1)

Amplicon	Reference locus sequences (5' - 3')	length
n	ITS DNA sequenc es ACCTGCTGCCGATCATTACCGATCAACCTGAAAAGTGGGGGAGGACCT GGCTGGACCTCCTCTGTAGAATGACGACTTCTTCATTCTACAGCCAATAGC TCAAGAGGGTGCCGTGATATTGGCATGCTGCTTACAGGTGACGTCCCCACC GACTAGCAGGCTTATTCTTGGGCGAAAACGGCTTAGTTGGCTTCTAAGTT TCTCTGAGCAGTTGTATGCCTACGTCCGTGGCTGCGTTGAAGAGAAACGGT ACGTGGTCTTCGTGATCGCGAGAATTAATGAGCGCCAGATGTGGTGCCGC CAACAAAACAACCATTTTTGAACTTTTTGAGAAATAACATTTCTAGTCTTAC CGGTGGATCACTCGGTTATAGATCGATGAAGAACGCAGCCAAGTGCAT ATATGGTGTGAACTGCAGATATTTGAAACCAAGAATTCGAATGCACATT GCGCCACTGGATATTTATCCTTTGGCACATCTGGCTCAGGGTCGTAAACAC TAAACGAAAGCTATTCGTTGTTTATGACAGACTCATGGCTACACTAGTTAG GGGGATATCCGCTAGAGTCATGTTTCTGTGAAGTGGTTT	600 bp

تم اكتشاف الطفرات الوراثية في كل من العزلة S1 المأخوذة من منطقة تلعفر والعزلة S9 المأخوذة من منطقة أربيل حيث تم استبدال القاعدة النروجينية الثايمين (T) بالقاعدة النروجينية أدنين (A) عند التسلسل 141 والطفرة الثانية S3 و S4 المأخوذة من منطقتي الحويجة والدور باستبدال القاعدة النروجينية أدنين (A) بالقاعدة النروجينية كوانين (G) عند التسلسل 181 في حين كانت الطفرة الثالثة باستبدال الثايمين (T) بالقاعدة النروجينية أدنين (A) عند الموقع 233 والطفرة الأخيرة كانت عند الموقع 240 باستبدال القاعدة النروجينية كوانين (G) بالقاعدة النروجينية أدنين (A) (الشكل 13)



الشكل (13) المتغيرات الجينية المرصودة لمناطق الاستنساخ الداخلي (ITS) لعزلات *Anguina tritici*

لتلخيص جميع النتائج للطفرات الوراثية المرصودة عند حجم 600 pb من التابع النيوكليوتيدي في منطقة الاستنساخ الداخلي (ITS) لنيماتودا *A. tritici*، الجدول (6) وبالمقارنة مع التابع النيوكليوتيدي في بنك الجينات الدولي NCBI.

الجدول (6) ناتج الطفرات الوراثية المرصودة عند حجم 600 pb لمناطق الاستنساخ الداخلي ITS للعزلة (KT900694.1)

Samp	N	A	Position in	Locu	Variant summary
le No.	ative	llele	the PCR fragment	s	
S1 - S9	T	A	141	ITS	KT900694.1; g.141T>A
S3 and S4	A	G	181	ITS	KT900694.1; g.181A>G
S1 - S9	T	A	233	ITS	KT900694.1; g.233T>A
S1 - S9	G	A	240	ITS	KT900694.1; g.240G>A

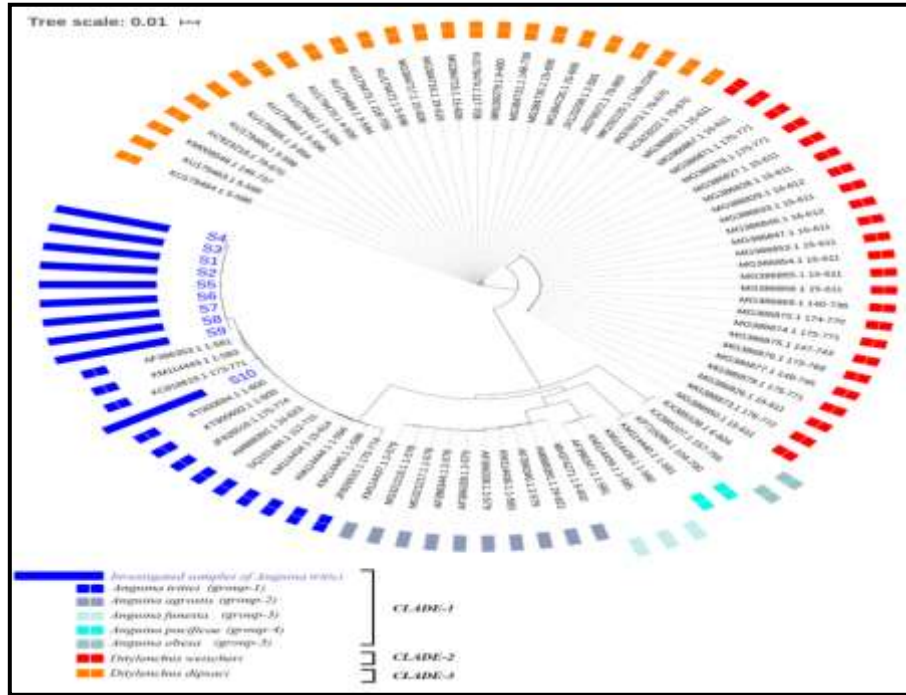
تم إنشاء شجرة وراثية من دمج جميع العينات التي تم فحصها (S1 - S10) جنباً إلى جنب مع التسلسلات المتعلقة بها الشكل (14) وكان العدد الإجمالي لتسلسلات الحامض النووي المتوافقة 78 تسلسلاً ومن ثم فان التسلسلات الإجمالية داخل شجرة النشوء والتطور المنشأة حالياً كانت 88 تسلسلاً حيث تمت محاذاة العزلات التي تم فحصها حالياً جنباً إلى جنب مع تسلسلات أخرى ذات صلة داخل الشجرة في نمط مخطط دائري Cladogram.

تنتمي الكائنات المدمجة داخل الشجرة الشاملة التي تم انشاؤها حالياً إلى العديد من الكائنات الحية، والتي تم توزيعها في العديد من مجموعات النشوء والتطور وكانت أول مجموعة تم التعرف عليها هي مجموعة clade-1، حيث تم دمج خمسة أنواع في جنس واحد من *Anguina spp* ضمن هذه المجموعة، تم تمثيل المجموعة الأكثر هيمنة من خلال عينات S1 - S9 التي تم فحصها من *Anguina tritici*، والتي وقعت ضمن نفس المجموعة الخاصة بالرقم (AF396353.1) والتي تنتمي إلى العزلة الأسترالية من النيما تودا *A. tritici*. ضمن هذه المجموعة وتم ضم العزلة S10 (عزلة الشعير) ما بين العزلتين (KT900694.1_KC818619.1) التي تنتمي وعلى التوالي إلى العزلات الصينية والعراقية من نيما تودا *A. tritici* حيث يُعزى هذا الوضع المحدد لعينة S10 إلى عدم وجود أي اختلاف وراثي يمكن اكتشافه لهذه العينة التي تم فحصها حالياً مقارنة بعزلات S1-S9 لنيما تودا *A. tritici* لذلك فان العزلات التي تم فحصها من نيما تودا *A. tritici* تم وضعها في موقعين مختلفين للتطور داخل نفس المجموعة؛ الأولى تمثلت من قبل بعزلات *A. tritici*، وتمثل الثانية التسلسلات الأقل شيوعاً مع انحراف طفيف تجاه بعض التتابع النيوكليوتيدات للعزلات *A. tritici* الأخرى، في المجموعة الثانية تم دمج عزلات *Anguina agrostis* فقط، مما يدل على ارتباط وثيق للغاية بين العزلة *A. tritici* لهذه النيما تودا مع العزلات في المجموعة 2، وكان لدى المجموعة الأولى أنواع أخرى مرتبطة ارتباطاً وثيقاً من المجاميع (3، 4، 5) والتي مثلتها *Anguina funesta* و *Anguina pacifica* و *Anguina obesa* على التوالي.

لوحظ أيضاً من الشكل نفسه وجود مجموعتين clade-2 و clade-3 تمثلت بالأجناس *Ditylenchus weischeri* و *Ditylenchus dipsaci*، مما يستلزم ارتباطاً نسبياً كبيراً قائماً على ITS بين الأجناس *Anguina spp* و *Ditylenchus weischeri* و *Ditylenchus dipsaci* على التوالي. ان هذه المتغيرات الجينية قد قسمت عينات النيما تودا المسببة للأمراض إلى مجموعات النشوء والتطور المذكورة سابقاً.

تشير النتائج الحالية إلى ان تتابع ITS لل rRNA المرصودة والتي استخدمت لبناء هذه الشجرة قد أعطت تمييزاً فعالاً للتطور بين العزلات العشرة لنيما تودا *Anguina tritici* على مستوى الانواع دون ان تكون مترابطة مع تتابع الأجناس الأخرى.

وعليه ان مناطق الاستنساخ الداخلي للـ rRNA المستخدمة حالياً أثبتت قدرتها على تقسيم انواع *A. tritici* إلى مجموعتين مختلفتين على الرغم من التشابه القريب لتسلسلهما، تمت إضافة قدرة التمييز هذه إلى قدرة الكشف عن الهوية الأصلية القائمة على الحامض النووي الرايبى (rRNA) لمناطق الاستنساخ الداخلي ITS لمثل هذه الشجرة لتحديد الموقع الدقيق للتطور لكل عزلة من عزلات *A. tritici* التي تم فحصها وهذا بدوره اعطى مؤشراً إضافياً على قوة البادئات القائمة على مناطق الاستنساخ الداخلي للحامض النووي الرايبى (rRNA) المستخدمة حالياً في التمييز بين عزلات *A. tritici*.



الشكل (14) شجرة النشوء والتطور لمناطق الاستنساخ الداخلي (ITS) للحامض النووي الرايبى rRNA لعشرة عزلات من *Anagrus tritici*.

- تسجيل نيماتودا ثأليل الحبوب في بنك الجينات التابع للمركز الوطني لمعلومات التقانات الاحيائية

National Center for Biotechnology Information (NCBI)

تم إدراج عزلات الحنطة الشعير الماخوذة من مناطق مختلفة من العراق لأول مرة في بيانات المركز الوطني لمعلومات التقانات الاحيائية حيث تم ترقيم العزلات المستخدمة في الدراسة من قبل بنك الجينات الدولي NCBI وبأرقام بنكية خاصة وكالاتي:

اسم العزلة	رقم العزلة في NCBI
S1	MT675018
S2	MT675019
S3	MT675020
S4	MT675021
S5	MT675022
S6	MT675023
S7	MT675024
S8	MT675025
S9	MT675026
S10	MT675027

المصادر العربية

- التميمي، محمد صلال (2013). استجابة صنفين من الحنطة لرش الحديد والزنك. كلية الزراعة / جامعة القاسم الخضراء، مجلة الفرات للعلوم الزراعية، 5(3):122-130.
- الجبوري، جاسم محمد عزيز و احمد هواس عبدالله الجبوري وعماد خلف خضر القيسي (2010). حساسية بعض أصناف حنطة الخبز لديدان الثآليل (*Anguina tritici* (steinluch) ودراسة الفعل الجيني الذي يسيطر عليها. الدراسات العلمية المجلد، 5 (1):112-121.
- جرعتلي، مجد (2017). صناعة الأعلاف العضوية الغير تقليدية. دراسات وبحوث زراعية، 5.
- ساهي، علي احمد وعلي حسين عبد الكريم وباسم عزيز جبر (2014). تأثير طرق التخمر على محتوى حامض الفايثك في خبز طحين الحنطة. كلية الزراعة / جامعة البصرة. مجلة البصرة للعلوم الزراعية، 27(1):128-142.
- سرحان، صبار مطلق (2011). تطور زراعة المحاصيل الزراعية الاستراتيجية (محصول القمح) في العراق. مجلة كلية الإدارة والأقتصاد، 4: 1-23.
- الطائي، علي كريم محمد وعلي حسين علي ونبيل يحيى الطالب (1999). مسح وانتخاب سلالة من الشعير مقاومة لنيماتودا الثآليل *Anguina tritici* في محافظة نينوى. مجلة زراعة الرافدين، 31: 97-102.
- عبد الحسن، شذى ونجاة حسين زيون وحيدر عبد الرزاق باقر (2015). تأثير مواعيد ومستويات إضافة البوتاسيوم في نمو حنطة الخبز. كلية الزراعة. جامعة بغداد- مجلة العلوم الزراعية العراقية، 46 (4): 528-522.
- عبد المالك، عولمي (2015). تحليل مقاومة القمح الصلب (*Triticum turgidum* var *durum* L.) للإجهادات اللاحيوية في آخر طور النمو. أطروحة دكتوراه، قسم بيولوجيا النبات - كلية علوم الطبيعة والحياة. جامعة فرحات عباس، سطيف.
- قاسم، نبيل عزيز وفاضل يوسف عبو (2011). تسجيل فايروسات جديدة على محصولي الحنطة والشعير في محافظة نينوى. قسم وقاية النبات/ كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل. مجلة ديالى للعلوم الزراعية، 3 (2): 331-344.
- مديرية الإحصاء الزراعي (2020). الجهاز المركزي للإحصاء - العراق، 20.
- مصطفى، صالح عبدالله (2009). دراسة مرض تتألل حبوب الحنطة والشعير المتسبب عن النيماتودا *Anguina tritici* في محافظة أربيل. رسالة ماجستير. قسم وقاية النبات / كلية الزراعة. جامعة مندو، حجازي محمد حسين ومحمود ابو غرة ومحمد موفق يبرق (2012). تقصي انتشار الأمراض البكتيرية على القمح والأعشاب المرافقة في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 30: (192-198).
- الموسوي، محسن عبد علي وعدنان عبد الجليل لهوف وعلا هادي جعفر (2017). عزل وتشخيص مسببات مرض تعفن بذور وموت بادرات الحنطة ومكافحتها باستخدام بعض العوامل الإحيائية والكيميائية. قسم وقاية النبات/ كلية الزراعة/ جامعة كربلاء. مجلة كربلاء للعلوم الزراعية، 4 (1): 112-132.

المصادر الأجنبية

- Arzani, A., and M. Ashraf. (2017). Cultivated ancient wheats (*Triticum* spp.): a potential source of health beneficial food products. *Comprehensive Rev. in Food Sci. and Food Safety*, 16(3), 477-488..
- Devi Sowjanya, K., K. Hariprasath., G. R. Nalini., P. Veenaeesh., and S. Ravichandra., (2015). Wheat grass juice *Triticum aestivum* Linn'a therapeutic tool in pharmaceutical research, an overview. *International J. of Pharmacy and Pharmaceutical Research* , 3(3) , 112-121.

- FAO, (2020). Record global cereal production forecast boosts stock-to-use ratio to a twenty-year high, July, 5 pp.
- Grundmann, H., C. Schneider., D. Hartung., F. D. Daschner., and T. L. Pitt. (1995). Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.*, 33(3): 528-534.
- Khan, M. B., F. Muhammad., H. Mubshar., and S. Ghulam. (2010). Foliar application of micronutrients improves the wheat yield and net economic return. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(6): 953-956.
- KURT, P. P., E. A. Cifci., and K. Yagdi. (2016). Stability performance of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines. *J. Agric. Sci. and Technol.*, 18(2): 553-560.
- Naseem, Z., S. A. Masood., S. Irshad., N. Annum., M. K. Bashir., R. Anum., and H. K. Nazar. (2015). Critical study of gene action and combining ability for varietal development in wheat: An Overview. *Life Sci J*, 12(3): 104-108.
- Nei, M., and W. H. Li. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10): 5269-5273.
- Paruthi, I. J., S. Mohinder., and D. C. Gupta. (1987). Quantitative and qualitative losses in wheat grains due to earcockle and tundu. *Seed Research*, 15(1): 83-86.
- Sneath, P. H., and R. R. Sokal. (1973). Numerical taxonomy. *The Principles and Practice of Numerical Classification*, 2: 39-42.
- Stephan, Z. A., and B. G. Antoon. (1990). Biotypes of earcockle nematode *Anguina tritici* in Iraq. *Current Nematology*, 1(2): 85-88.
- Tony, W. (2006). *Growing Food. A Guide to Food Production*, 333 PP.
- Zhang, Z., S. Schwartz., L. Wagner and W. Miller. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. of Computational Biol.*, 7(1-2): 203-214.