

الكشف عن بعض المؤشرات الوراثية لمجموعات ذبابة التبغ البيضاء *Bemisia tabaci* (Genn.) في الساحل السوري باستخدام تقنية المكررات البسيطة البينية ISSR

أحمد محمد مهنا* همام شعبان برهوم**

الملخص

تم الكشف عن التنوع الوراثي وبعض المؤشرات الوراثية لمجموعات ذبابة التبغ البيضاء *Bemisia tabaci* ضمن 44 مجتمعاً حشرياً جمعت من الساحل السوري من عوائل مختلفة باستخدام تقنية المكررات البسيطة البينية. استخدم لذلك عشرة بادئات، نجحت ستة منها، وأعطت 105 حزمة مضخمة، بنسبة تعددية شكلية 75.24%، تراوحت نسبة التعددية الشكلية بين 50% للبادئة ISSR-1 و 100% للبادئة ISSR-10. بلغت النسبة المئوية للمواقع المتعددة شكلياً لجميع المجموعات المدروسة (PPB) 53%، وعدد النظائر بكل موقع (N_0) 1.89، والعدد الفعال لهذه النظائر (N_E) 1.41، ومقياس التنوع المورثي (H_E) 0.18. تراوحت نسبة التشابه بين 97.2% للمجموعتين (SyBt23 & SyBt21) و 57% للمجموعتين (SyBt43 & SyBt6). كانت قيمة مؤشر شانون للمجموعات (I) بين 0.129 و 0.226 (SyBt39)، انقسمت شجرة القرابة إلى أربع مجموعات رئيسية، وكان للإرتفاع عن سطح البحر تأثيراً في توزيع المجموعات.

الكلمات المفتاحية: المؤشرات الوراثية، ذبابة التبغ البيضاء، تقنية ISSR، سورية.

* قسم وقاية النبات - كلية الزراعة - جامعة دمشق - كلية الطب البشري- الجامعة السورية الخاصة .SPU

** مركز بحوث ودراسات مكافحة الحيوية - كلية الزراعة- جامعة دمشق.

Detection of some Genetic indicators of *Bemisia tabaci* (Genn.) Populations on Syrian Coast using ISSR-marker

Ahmad M. Mouhanna* Humam S. Barhoum**

Abstract

44 *Bemisia tabaci* populations were collected from various hosts at Syrian coast to detect genetic diversity and indicators using ISSR and ten primers. Six out of them were successful and gave 105 amplification fragments with 75.24% polymorphic percentage. Polymorphism percentage was ranged between 50% (ISSR-1) and 100% (ISSR-10). The rate of polymorphic loci (PPB) for all studied populations was 53%, the number of alleles per locus (N_0) was 1.89, the effective number of alleles (N_E) was 1.41, and the genetic diversity (H_E) was 0.18. The genetic similarity ranged between 97.2% (SyBt23 & SyBt21) and 57% (SyBt43 & SyBt6). Shannon's index (I) of populations was 0.129 (SyBt30) and 0.272 (SyBt39). The phylogenetic tree was divided into four main groups, and it turns out that the heights of sea level were affected on the distribution of populations.

Key words: Genetic diversity indices, *B. tabaci*, ISSR, Syria.

* Dept. of Plant Protection - Faculty of Agriculture - Damascus University. & Faculty of Medicine – Syrian Privat University SPU

** Biological Control Studies & Research Center - Damascus University.

المقدمة:

تعد ذبابة التبغ البيضاء *Bemisia tabaci* Genn. أحد أهم الآفات في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية (Byrne و Bellows، 1991)، حيث تهاجم مدى عائلي واسع من محاصيل الخضار والألياف والزينة (Cahill وزملاؤه، 1996)، كما تعد واحدة من 100 آفة غازية على مستوى العالم تبعاً للإتحاد الدولي للحفاظ على الطبيعة ومواردها International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) (<http://www.issg.org>) (Boykin وزملاؤه، 2007). كُشف عن البنية الوراثية المعقدة للذبابة البيضاء لأول مرة في منتصف خمسينيات القرن الماضي عندما وجد صعوبة في التمييز المورفولوجي بين مجتمعاتها حيث تنقسم إلى أكثر من 1000 مجتمعٍ اعتمداً على الصفات البيولوجية والعديد من الاختلافات السلوكية، والكيميائية، والوراثية (Naranjo و Stansly، 2010)، كالتقدرة على نقلها للفيروسات النباتية (Markham وزملاؤه، 1996)، والاختلاف في معدل، وسرعة التطور (Wang و Tsai، 1996)، وقدرتها على التكيف مع العائل وإحداثها لتغيرات فيزيولوجية محددة عند بعض العوائل (Bedford وزملاؤه، 1994)، وقد حدد للنوع *B.tabaci* إحدى عشرة مجموعة وراثية تضم 24 نوعاً مميزاً Distinct Species و 33 طرزاً حيويًا Biotype (Dinsdale وزملاؤه، 2010; De Barro وزملاؤه، 2011; Tay وزملاؤه، 2011; Boykin وزملاؤه، 2012). سُجلت عالمياً على أكثر من 600 نوع نباتي (Martin وزملاؤه، 2000). عُرفت ذبابة التبغ البيضاء في سورية لأول مرة من قبل Poyrelongue عام 1966 (الحريري، 1972)، وسجل لها ثمانية أجيال في الساحل السوري ولوحظ انتشارها من مستوى سطح البحر حتى ارتفاع 1250 م، وبلغ مداها العائلي محلياً 86 نوعاً نباتياً تتبع لـ 30 فصيلةً نباتيةً في منطقة الساحل السوري (عبود، 2007) مسببةً خسائر كبيرة للعديد من المحاصيل. هدف هذا البحث إلى معرفة مدى التنوع الوراثي

لمجتمعات ذبابة التبغ البيضاء المنتشرة في الساحل السوري باستخدام تقنية المكررات البسيطة البينية (ISSR) Inter Simple Sequence Repeats والتي تعد مؤشراً جزيئياً ذو كفاءة جيدة إلى حد ما في كشف هذه التباينات (Moreno وزملاؤه، 1998)، إضافة لحساب بعض مؤشرات التنوع الوراثي التي تسهل وتوضح مدى تأثير التوزيع الجغرافي أو العائل النباتي أو البيئات الزراعية في التنوع الوراثي لهذه المجتمعات. الأمر الذي يساعد على زيادة إدراك أهمية التنوع الوراثي لهذه الحشرة في الساحل السوري وعلاقته مع العوامل البيئية، كما يمهّد لإجراء دراسات مستقبلية أكثر دقة تحدد ماهي هذه المجتمعات وراثياً وما هي الطرز الوراثية المنتشرة في الساحل السوري.

مواد البحث وطرائقه:

جمع حشرات ذبابة التبغ البيضاء:

جمعت البالغات والعداري من طرطوس وبانياس وجبله واللاذقية في الفترة الواقعة ما بين شهري أيار/مايو - آب/أغسطس خلال العام 2014، أخذت 44 عينة حشرية من ذبابة التبغ البيضاء المنتشرة على أنواع نباتية مزروعة وبرية مختلفة والتي تعد الأكثر انتشاراً في الساحل السوري، وذلك بدءاً من مستوى سطح البحر وحتى ارتفاع 1100 م. تم تصنيف العينات على أنها ذبابة التبغ البيضاء *B.tabaci*، بالفحص المجهرى لطور العذراء حيث حدد الجنس اعتماداً على مفتاح التصنيف الموضوع من قبل Martin وزملاؤه (2000)، حفظت العينات في أنابيب (1.5 ملم) تحتوي على كحول إيثيلي تركيزه 90% وفي درجة حرارة -20°س. (الجدول 1).

الجدول(1): المواقع والعوائل النباتية التي جمعت منها العينات في الساحل السوري

عام 2014.

العينة	العائل النباتي	الارتفاع التقريبي عن سطح البحر/م	الموقع	المدينة
SyBt1	بطاطا	50	البيسط	اللاذقية
SyBt2	خيار	89	بوقا	
SyBt3	بندورة	78	البصة	
SyBt4	فاصولياء	100	ضهر الشير	
SyBt5	ام كلثوم	80	بوقا	
SyBt6	كوسا	50	البيسط	
SyBt7	خيار	100	الهنادي	
SyBt8	بندورة	130	مشقينا	
SyBt9	خيار	500	دياش	
SyBt10	بندورة	500	جوية برغال	
SyBt11	خيار	750	اليابسة	
SyBt12	بندورة	800	بكراما	
SyBt13	خيار	240	خرية السناسل	بانياس
SyBt14	قتاء	273	بارمايا	
SyBt15	بندورة	142	البيضاء	
SyBt16	فاصولياء	175	الروضة	
SyBt17	قتاء	30	المدخل الجنوبي	
SyBt18	فليفلة	100	حريصون	
SyBt19	فاصولياء	70	المحطة	
SyBt20	بطاطا	105	الحويز	حلب
SyBt21	باننجان	81	سيانو	
SyBt22	بطاطا حلوة	485	عين الشرقية	
SyBt23	لوبياء	30	بسيسين	
SyBt24	بندورة	391	سريبيون	
SyBt25	حلية	28	صنوبر	
SyBt26	بندورة	155	كلماخو	
SyBt27	تبغ	52	سلورين	
SyBt28	تبغ	541	حمام القراحلة	
SyBt29	بامياء	160	بارمايا	طرطوس
SyBt30	كوسا	120	البصيرة	
SyBt31	خيار	80	المنطار	
SyBt32	فليفلة	100	تل سنون	

SyBt33	بندورة	100	الدبوسية
SyBt34	خيار	50	ميعار شاكر
SyBt35	تبغ	100	الحميدية
SyBt36	فاصولياء	200	تل سنون
SyBt37	كوسا	350	تلكلخ
SyBt38	فايفلة	550	دريكيش
SyBt39	تبغ	800	برمانه المشايخ
SyBt40	فاصولياء	1100	قدموس
SyBt41	بانجان	1100	الشعرة
SyBt42	كوسا	380	صافيتا
SyBt43	قرنبيط	536	الشيخ بدر
SyBt44	ملفوف	550	دريكيش

استخلاص الحمض النووي وتفاعل البلمرة التسلسلي:

أُخذت 20 حشرة كاملة من كل عينة، وغسلت بالماء المقطر، واتبعت مراحل الاستخلاص الموصى بها من قبل De Barro و Driver (1997). قدرت كمية ونقاوة DNA باستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) عند طول موجة 260 و 280 نانومتر. ضبط تركيز DNA ليصبح 10 نانوغرام/ميكروليتر، وحددت نوعية الـ DNA في كل عينة بترحيل 5 ميكروليتر DNA من كل عينة على هلامة الأجاروز تركيز 0.7%. حفظت العينات عند 20°س لحين الاستخدام.

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في حجم قدره 25 ميكروليتر باستخدام Master mix (Promega) واستخدم عشرة بادئات (الجدول 2)، صُنعت في شركة VBC Biotech. استخدم المدور الحراري peqSTAR 96 Universal Gradient بعد أن تمت برمجته وفق ما يلي: 94°س لمدة خمس دقائق، ثم 35 دورة تحت الشروط التالية: 94°س لمدة دقيقة واحدة و 50°س لمدة 1.5 دقيقة و 72°س لمدة دقيقتين. أنهى التفاعل عند درجة حرارة 72°س لمدة خمس دقائق (Dong وزملاؤه، 2008). فصلت نواتج عملية التضخيم على هلامة الأجاروز

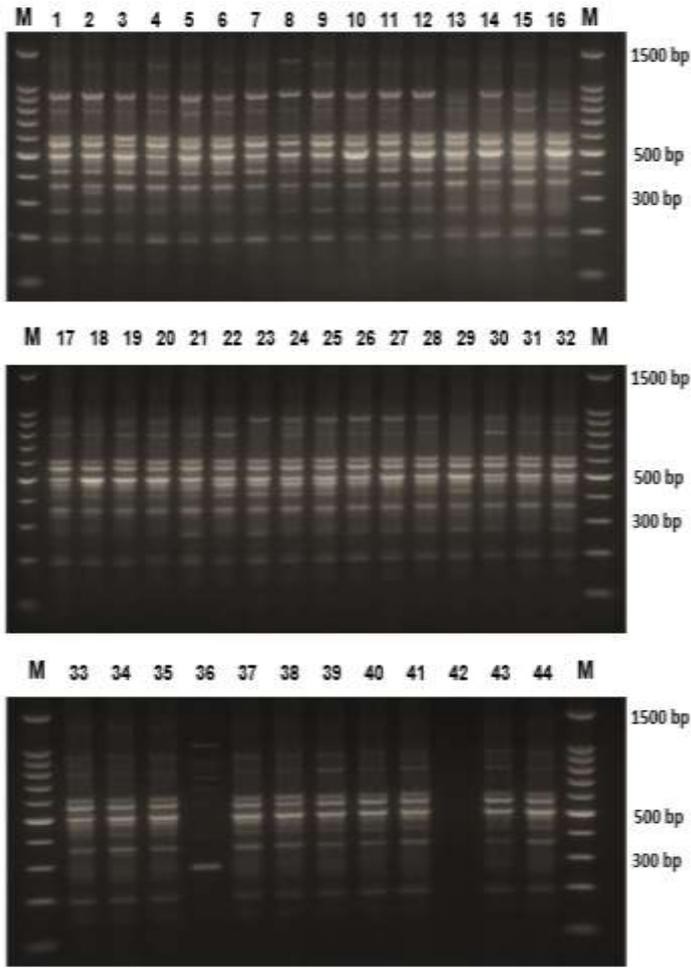
1.5% والتي تحوي بروميد الإيثيديوم EtBr. في محلول رحلان TBE X1. وثقت النتائج بتصوير الهلامية باستخدام الأشعة فوق البنفسجية. استخدم مؤشر معياري للـ DNA معروف الوزن الجزيئي مؤلف من 11 قطعة (G3161 .cat Promega).

التحليل الإحصائي:

حللت النتائج باستخدام برنامج POPGEN32، حيث أُشير لوجود الحزمة 1 وغيابها 0، أعتد على مصفوفة التشابه (Matrix Similarity) (معامل Nei's coefficient (Nei، 1973) لإجراء التحليل العنقودي ولرسم مخطوطه. وحسبت بعض مؤشرات التنوع الوراثي للمجتمعات المدروسة كعدد المواقع متعددة الأشكال N_p Number of polymorphic loci، والنسبة المئوية للمواقع متعددة الأشكال PPB Percentage of polymorphic loci حيث يظهران مدى التنوع والتغير ضمن جينوم المجتمع الحشري، أما العدد الفعال للنظائر بكل موقع Effective number of alleles per locus N_E ، وعدد النظائر الملاحظة بكل موقع Observed number of alleles per locus N_0 يكملان المعلومات حول مدى التغير ضمن الجينوم وعدد النظائر المتوقعة بكل موقع. حسب مقياس التنوع المورثي H_E Nie's gene diversity، بالإضافة لمؤشر شانون المعلوماتي Shannon's index الذي يتميز بعدم الحساسية تجاه التحيز في البيانات الناتجة عن تقانة ISSR والذي يمكن أن يظهر من خلال عدم قدرة هذه التقانة على تحديد الأفراد متباينة اللواقح Heterozygous، واستخدم لذلك برنامج PopGene (Yeh وزملاؤه، 1997). استخدم برنامج XLSTAT إصدار 2014 (Addinosoft، 2014) لحساب مدى التباين بين مجموعات التحليل العنقودي ومدى تأثير العائل النباتي في التباينات الوراثية.

النتائج:**التعددية الشكلية:**

نجحت ستة بادئات فقط بالالتحام في موقع أو أكثر من جينوم مجتمعات ذبابة التبغ البيضاء المدروسة، وبلغ العدد الكلي للحزم المضخمة 105 حزمة، منها 79 حزمة متعددة شكلياً، بنسبة تعددية شكلية وصلت إلى 75.24%. تراوح عدد الحزم الناتجة عن التحام كل بادئ بين 13-22 حزمة، وبلغ متوسط عدد الحزم المتعددة شكلياً 13.17 حزمة لكل بادئ. أما بالنسبة للتعددية الشكلية فبلغت 100% عند البادئ ISSR-10 الذي أعطى 20 حزمة، بينما لم تتجاوز نسبة التعددية الشكلية 50% عند البادئ ISSR-1 الذي أعطى 16 حزمة (جدول 2). يبين شكل (1) عدد الحزم المضخمة الناتجة عن التحام البادئ ISSR-10 بأكثر من موقع على جينوم المجتمعات المدروسة، والذي أعطى 20 حزمة بنسبة تعددية شكلية 100%. يبين الجدول (2) البادئات المستخدمة وعدد الحزم المضخمة والمتعددة شكلياً.



الشكل(1): نتائج التحام البادئة ISSR-10 على هلامة الآغاروز 1.5%.
M: مؤشر معياري للـ DNA.

الجدول (2): البادئات المستخدمة وعدد الحزم المضخمة والمتعددة شكلياً.

رمز البادئ	التتابع النيكلوتيدي	الحزم المضخمة	الحزم المتعددة شكلياً	التعددية الشكلية %	المرجع
ISSR-1	(GACAC) ₃	16	8	50	Perring
ISSR-2	(GACA) ₄	13	10	76.92	وزملاؤه، 1993
ISSR-3	(ATG) ₆	0	0	0	Muthusamy وزملاؤه، 2008
ISSR-4	(TCC) ₅	13	8	61.53	Perring وزملاؤه، 1993
ISSR-5	(ACAC) ₄ C	0	0	0	Muthusamy وزملاؤه، 2008
ISSR-6	(AGG) ₅	22	17	77.27	Perring وزملاؤه، 1993
ISSR-7	(ACAC) ₄ G	0	0	0	Muthusamy
ISSR-8	(TGTG) ₄ A	0	0	0	وزملاؤه، 2008
ISSR-9	(ACTG) ₄	21	18	85.71	Perring وزملاؤه، 1993
ISSR-10	5' AGAGGTGGG CAGGTG 3'	20	20	100	Gong وزملاؤه، 2001
المجموع		105	79	75.24	
			13.17		

التحليل العنقودي:

حلت نواتج مكررات التسلسلات البسيطة البينية ISSR-PCR عنقودياً اعتماداً على مصفوفة التشابه (Similarity Matrix) لمعامل Nie's coefficient، فانقسمت شجرة القرابة (شكل 2) إلى أربعة مجموعات رئيسية، ضمت المجموعة الرئيسية الأولى G1 أحد عشر مجتمعاً حشرياً بنسبة 25% من المجتمعات المدروسة بلغ التباين فيما بينها 10.927، أما متوسط نسبة التشابه ومعامل شانون فبلغ 74.8% و 1.768 على التوالي، في حين شملت كل من المجموعتين الثانية G2 والرابعة G4 مجتمعاً حشرياً واحداً هما SyBt41

و SyBt20 على التوالي بنسبة 2% لكل مجموعة، أما المجموعة الثالثة G3 فضمت بقية المجتمعات الحشرية المدروسة مشكلة ما نسبته 71% من المجتمعات المدروسة ووصل التباين الى 12.475، ومتوسط نسبة تشابه ومؤشر شانون 82.4% و 5.3 على التوالي. (جدول 3).

الجدول (3): مجموعات التحليل العنقودي والنسبة المئوية لكل مجموعة.

مؤشر شانون /	التباين ضمن الفئة	متوسط نسبة التشابه	نسبة المجموعة %	رمز المجتمع الحشري	المجموعات
1.768	10.927	74.8	25	SyBt (9,10,11, 12,28,38,39,40, 41,43,44)	G1
-	-	-	2	SyBt(42)	G2
5.3	12.475	82.4	~71	SyBt (1,2,3,4,5,7,8, 13,14,15,16,17, 18,19,20,21,22, 23,24,25,26, 27,29,30,31,32, 33,34,35,36,37)	G3
-	-	-	2	SyBt(6)	G4
			100		المجموع

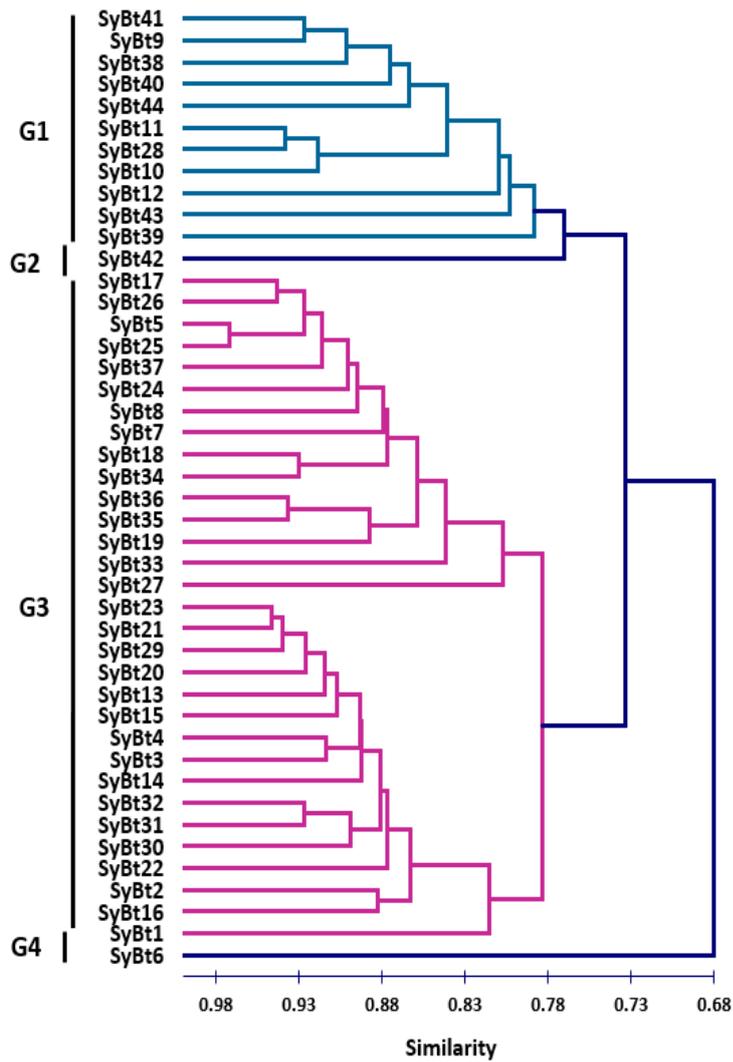
المؤشرات الوراثية:

العلاقات الوراثية بين المجتمعات المدروسة والعائل النباتي وتأثير موقع الزراعة والارتفاع عن سطح البحر:

تبين عند دراسة العلاقات الوراثية بين المجتمعات الحشرية المدروسة أن نسبة التشابه تراوحت ما بين 97.2% للمجتمعين (SyBt23 & SyBt21) و 57% للمجتمعين (SyBt43 & SyBt6). كما لم يكن هناك أي ارتباط بين المجموعات الرئيسية الأربعة سواءً من حيث التوزيع الجغرافي أو البيئات الزراعية (زراعة

محمية، حقلية)، حيث ضمت كل من المجموعة الرئيسية الأولى والثالثة مجتمعات حشرية جمعت من طرطوس وبانياس وجبله واللاذقية سواء من داخل البيوت المحمية أو خارجها، في حين تبين أن الأثر الأكبر في توزيع المجتمعات كان مقدار الارتفاع عن سطح البحر وذلك استناداً لبرنامج XLSTA (الشكل 2) حيث لوحظ ان المجموعة الرئيسية الثالثة G3 ضمت المجتمعات الحشرية التي جمعت من على نباتات وجدت على ارتفاعات تراوحت بين (500-1100 م)، في حين ضمت المجموعة الرئيسية الأولى G1 المجتمعات الحشرية التي جمعت من على نباتات وجدت على ارتفاعات تراوحت بين (28-485 م).

درست مؤشرات التنوع الوراثي لكل مجتمع حشري مدروس على حدة، الأمر الذي ساعد في معرفة مدى تأثير العائل النباتي، حيث تراوح مؤشر شانون (I) بين 0.129 (SyBt30) و0.226 (SyBt39)، كما تبين أن مقياس التنوع المورثي (H_E) تراوح بين 0.105 (SyBt43) و0.272 (SyBt1) وهذا يشير إلى وجود تأثير للعائل النباتي في التنوع الوراثي لهذه المجتمعات (الجدول 4).



الشكل(2): التحليل العنقودي لمجموعات حشرة ذبابة التبغ البيضاء *B. tabaci* في الساحل السوري عام 2014.

الجدول(4): مؤشرات التنوع الوراثي لمجتمعات ذبابة التبغ البيضاء *B tabaci* في الساحل السوري عام 2014.

H_E	I	N_e	N_o	$PPB(\%)$	N_p	Pop.
0.272	0.162	1.708	1.553	0.644	85	SyBt1
0.196	0.147	1.441	1.808	0.553	73	SyBt2
0.232	0.154	1.558	1.671	0.598	79	SyBt3
0.190	0.145	1.424	1.833	0.545	72	SyBt4
0.178	0.172	1.391	1.886	0.530	70	SyBt5
0.207	0.180	1.477	1.760	0.568	75	SyBt6
0.207	0.180	1.477	1.760	0.568	75	SyBt7
0.167	0.169	1.361	1.941	0.515	68	SyBt8
0.132	0.197	1.272	2.164	0.462	61	SyBt9
0.178	0.214	1.391	1.886	0.530	70	SyBt10
0.147	0.203	1.307	2.063	0.485	64	SyBt11
0.110	0.187	1.219	2.357	0.424	56	SyBt12
0.173	0.141	1.376	1.913	0.523	69	SyBt13
0.207	0.149	1.477	1.760	0.568	75	SyBt14
0.184	0.144	1.407	1.859	0.538	71	SyBt15
0.190	0.145	1.424	1.833	0.545	72	SyBt16
0.178	0.172	1.391	1.886	0.530	70	SyBt17
0.152	0.164	1.320	2.031	0.492	65	SyBt18
0.162	0.168	1.347	1.970	0.508	67	SyBt19
0.201	0.148	1.458	1.784	0.561	74	SyBt20
0.201	0.148	1.458	1.784	0.561	74	SyBt21
0.226	0.153	1.537	1.692	0.591	78	SyBt22
0.214	0.151	1.496	1.737	0.576	76	SyBt23
0.142	0.161	1.295	2.095	0.477	63	SyBt24
0.201	0.179	1.458	1.784	0.561	74	SyBt25
0.190	0.176	1.424	1.833	0.545	72	SyBt26
0.178	0.172	1.391	1.886	0.530	70	SyBt27
0.157	0.207	1.333	2.000	0.500	66	SyBt28
0.207	0.149	1.477	1.760	0.568	75	SyBt29
0.132	0.130	1.272	2.164	0.462	61	SyBt30

0.162	0.138	1.347	1.970	0.508	67	SyBt31
0.173	0.141	1.376	1.913	0.523	69	SyBt32
0.245	0.189	1.604	1.630	0.614	81	SyBt33
0.147	0.163	1.307	2.063	0.485	64	SyBt34
0.196	0.177	1.441	1.808	0.553	73	SyBt35
0.178	0.172	1.391	1.886	0.530	70	SyBt36
0.190	0.176	1.424	1.833	0.545	72	SyBt37
0.157	0.207	1.333	2.000	0.500	66	SyBt38
0.220	0.226	1.516	1.714	0.583	77	SyBt39
0.167	0.210	1.361	1.941	0.515	68	SyBt40
0.137	0.199	1.283	2.129	0.470	62	SyBt41
0.214	0.225	1.496	1.737	0.576	76	SyBt42
0.105	0.185	1.210	2.400	0.417	55	SyBt43
0.196	0.219	1.441	1.808	0.553	73	SyBt44
0.18	0.17	1.41	1.89	0.53	70.3	

N_p = المواقع المتعددة الأشكال، $PPB\%$ = النسبة المئوية للمواقع المتعددة الأشكال، N_0 = عدد النظائر الملاحظة بكل موقع، N_E = العدد الفعال للنظائر لكل موقع، I = مؤشر شانون المعلوماتي، H_E = مقياس التنوع المورثي.

المناقشة:

أجريت العديد من الأبحاث بهدف دراسة التنوع الوراثي لذبابة التبغ البيضاء والتميز بين طرزها الحيوية، وذلك باستخدام العديد من المؤشرات الجزيئية منها، تقنية Enzyme electrophoresis (Prabhaker وزملاؤه، 1987)، والتضخيم العشوائي لـ DNA المتعدد شكلياً Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) (Gawel و Bartlett، 1993؛ Hameed وزملاؤه، 2012)، و Restriction fragment length polymorphisms (RFLP) (Abdullahi وزملاؤه، 2004)، ومكررات التسلسل البسيطة البينية Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) (Dong وزملاؤه، 2008)،

و(Cervera) Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs) وزملاؤه، 2000) و (De Barro) Simple Sequence Repeats (SSRs) وزملاؤه، 2003; Roditakis و Tsagkarakou، 2003)، والفاصل الداخلي المستنسخ (De Barro) Internal Transcribed Spacer (ITS) وزملاؤه، 2000)، والتحليل الجزيئي لأنزيم السيتوكروم أوكسيداز الميتوكوندري (Dinsdale) Mitochondrial Cytochrome C Oxidase I (mtCO1) وزملاؤه، 2010). تعد تقنية مكررات التسلسل البسيطة البينية ISSR واحدة من المؤشرات الجزيئية الهامة في الكشف عن التنوع الوراثي (Noormohammadi وزملاؤه، 2013; Hadian وزملاؤه، 2014; Mei وزملاؤه، 2014; Kumal وزملاؤه، 2012)، استخدم في هذه الدراسة تقنية ISSR على 44 مجتمعاً من ذبابة التبغ البيضاء جمعت من مناطق وارتفاعات مختلفة بدءاً من سطح البحر وحتى ارتفاع 1100 متراً لدراسة تنوعها الوراثي ومدى ارتباط هذه المجتمعات بعوائلها وبيئاتها الزراعية. بينت هذه الدراسة وجود تباينات وراثية بين مجتمعات ذبابة التبغ البيضاء المنتشرة في الساحل السوري. انقسمت شجرة القرابة استناداً إلى ارتفاع المناطق التي جمعت منها المجتمعات عن مستوى سطح البحر حيث لوحظ ان المجموعة الرئيسية الثالثة G3 ضمت مجتمعات حشرية جمعت من مناطق تراوح ارتفاعها بين (500-1100 م) مشكلة ما نسبته 71% من المجتمعات المدروسة وتباين قدره 12.475 ومؤشر شانون 5.3، في حين ضمت المجموعة الرئيسية الأولى G1 المجتمعات الحشرية التي جمعت من ارتفاعات تراوحت بين (28-485 م) بنسبة 25% من المجتمعات المدروسة حيث بلغ التباين فيما بينها 10.927، ومعامل شانون 1.768. في دراسات سابقة باستخدام تقنية RAPD على مجتمعات ذبابة التبغ البيضاء لم يكن هناك أي تأثير للارتفاع عن سطح البحر في حين كان للبيئات الزراعية (محمية، حقلية،

جبلية) دوراً واضحاً (مهنا وزملاؤه، 2014; برهوم، 2013) وقد يعود ذلك إلى إجراء عملية استخلاص DNA من الحشرات المجموعة مباشرة دون إجراء عملية التربية لعدة أجيال على نباتات الباذنجان المنيعه للإصابة بالفيروس كما تم سابقاً عند تطبيق تقانة الـ RAPD بهدف التخلص من الفيروسات التابعة للجنس Begomovirus ذات الحمض النووي DNA والتي من الممكن أن تؤثر على دقة النتائج على اعتبار أن جينوم هذه الفيروسات يندمج مع المادة الوراثية لحشرة ذبابة التبغ البيضاء ومن الممكن أن ينتقل معها من جيل لآخر (Ghanim وزملاؤه، 1998). أما مؤشر شانون فتراوحت قيمته بين 2.483-2.771. أشار Perring (2001) أن نسبة التشابه بين مجتمعات الطراز الواحد تكون بين 80-100%، أما Dong وزملاؤه (2008) فقد وجدوا أن نسبة التشابه بين الطرازين B و Q باستخدام تقنية ISSR تراوحت بين 45-79%. استناداً إلى نسبة التباين ومعامل شانون يمكن القول أن للزراعات دون ارتفاع 500 م عن مستوى سطح البحر تأثيراً واضحاً في التباينات الوراثية لمجتمعات ذبابة التبغ البيضاء وهذا يتفق مع Brown (2000) حيث أن التباينات الوراثية تكون أكبر بين البيئات المختلفة ومع ما أوضحه Shah وزملاؤه (2008) حيث أن التباينات الوراثية تكون أكبر بين المجتمعات في المناطق المفتوحة من تلك المجتمعات المحصورة ضمن مناطق ضيقة أو معزولة.

لقد بينت تقانة ISSR-PCR كفاءة جيدة في كشف التباينات الوراثية بين مجتمعات ذبابة التبغ البيضاء، وتوزعها تبعاً لارتفاعها عن سطح البحر. ويجري حالياً دراسة بعض المؤشرات الوراثية الأخرى التي تسمح لنا بتقويم فاعلية كلا التقانتين (RAPD و ISSR) كمعلومات التعددية الشكلية Polymorphism (PIC) information content والتي تفيد في تقدير أهمية الحزم الناتجة عن البادئ، ومؤشر التقانة Marker index (MI) ومؤشر النسبة التعددية الشكلية

الفاعلة Effective multiplex ratio (EMR) الذين يسهمان في تقدير كفاءة البادئ المستخدم، (Kumar وزملاؤه، 2003) الأمر الذي يسهل فيما بعد استخدام تقنيات ذات فعالية وكفاءة عالية تعتمد على تحديد تسلسل وتتابع النكليوتيدات ضمن مناطق معينة من Mitochondrial DNA (mtDNA) (De Barro وزملاؤه، 2000; Dinsdale وزملاؤه، 2010) و ribosomal DNA (rDNA) (Frohlich وزملاؤه، 1999).

علاقات الارتباط بين العوامل المدروسة:

لم يكن هناك أي ارتباط بين توزيع المجتمعات المدروسة (العينات) ضمن شجرة القرابة من حيث التوزيع الجغرافي. وقد تبين أن للعائل النباتي تأثيراً طفيفاً في التنوع الوراثي لذبابة التبغ البيضاء في الساحل السوري وذلك من خلال قيم مؤشر شانون التي تراوحت بين 0.130 (SyBt30) و 0.226 (SyBt39) ومقياس التنوع الوراثي الذي تراوح بين 0.105 و 0.272 (الجدول 4). في حين تبين أن الأثر الأكبر في توزيع المجتمعات كان مقدار الارتفاع عن سطح البحر (الشكل 2) حيث لوحظ أن المجموعة الرئيسية الثالثة G3 ضمت المجتمعات الحشرية التي جمعت من على نباتات وجدت على ارتفاعات تراوحت بين (500-1100 م)، في حين ضمت المجموعة الرئيسية الأولى G1 المجتمعات الحشرية التي جمعت من على نباتات وجدت على ارتفاعات تراوحت بين (28-485 م)، وعلى ضوء نتائج هذا البحث يمكن القول بوجود أكثر من طراز حيوي ضمن منطقة الساحل السوري، وهذا يتفق أيضاً مع ما بينه Fujiie وزملاؤه (2009) وبرهوم (2013) ومهنا وزملاؤه (2014) من انتشار أربع طرز حيوية في سورية وهي الطراز B و Q و non-B و M.

References:

- **Abdullahi, I., G.I. Atiri, G. Thottappilly and S. Winter. 2004.** Discrimination of cassava-associated *Bemisia tabaci* in Africa from polyphagous populations, by PCR-RFLP of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. *Journal of Applied Entomology*. 128: 81-87.
- **Addinsoft. 2014.** XLSTAT 2014: Data analysis and statistics software for Microsoft Excel. Addinsoft, Paris, France.
- **Bedford, I.D., R.W. Briddon, P. Jones, N. Alkaff and P.G. Markham. 1994.** Differentiation of three whitefly transmitted geminiviruses from the Republic of Yemen. *European Journal of Plant Pathology*. 100: 243-257.
- **Boykin, L.M., K.F. Armstrong, L. Kubatko, P. De Barro. 2012.** Species delimitation and global biosecurity. *Evol Bioinf*. 8: 1-37.
- **Boykin, L.M., R.G. Shatters, R.C. Rosell, C.L. McKenzie, R.A. Bagnall, P.De Barro, and D.R. Frohlich. 2007.** Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44: 1306-1319.
- **Brown, J. K. 2000.** Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector begomovirus complexes. *Virus Research*. 71: 233-260.
- **Byrne, D.N. and T.S. Bellows. 1991.** Whitefly biology. *Annu. Rev. entomol*. 36: 431-457.
- **Cahill, M., I. Denholm, G. Ross, K. Gorman and D. Johnston. 1996.** Relationship between bioassay data and the simulated field performance of insecticides against susceptible and resistant adult *Bemisia tabaci*. *Bulletin of Entomological Research*. 86: 109-116.
- **Cervera, M.T., J.A. Cabezas, B. Simon, J.M. Martinez-Zapater, F. Beitia and J.L. Cenis. 2000.** Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. *Bulletin of Entomological Research*. 90: 391-396.
- **De Barro P.J. and F. Driver. 1997.** Use of RAPD-PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci*

- (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). Australian journal of entomology. 36: 149-152.
- **De Barro, P.J., F. Driver, J.W. Trueman and J. Curran. 2000.** Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. Molecular Phylogenetics and Evolution. 16: 29–36.
 - **De Barro, P.J., K.D. Scott, G.C. Graham, C.L. Lange and M.K. Schutze. 2003.** Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. Molecular Ecology Notes. 3: 40–43.
 - **De Barro, P.J., S.S. Liu, L.M. Boykin and A.B. Dinsdale. 2011.** *Bemisia tabaci*: A statement of species status. Annual Review of Entomology. 56: 1-19.
 - **Dinsdale, A., L. Cook, C. riginos, Y.M. Buckley and P. De Barro. 2010.** Refined Global Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to Identify Species Level Genetic Boundaries. Annals of the Entomological Society of America, 2, 196-208.
 - **Dong, C., F. Wan, B. Xu, Q. Wu and Y. Zhang. 2008.** Comparative Analysis of Population Genetic Structure in *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotypes B and Q Based on ISSR Marker. Agricultural Sciences in China. 11: 1348-1354.
 - **Frohlich, D.R., I.I. Torres-Jerez, I.D. Bedford, P.G. Markham and J.K. Brown. 1999.** A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. Molecular Ecology. 8: 1683–1691.
 - **Fujiie, A., A.M.S. Omar, A.B. Sawas, A. Abbas, M.A. Hadi, E.A. Sawas, A.S.U. Barakat and K.T. Natsuaki. 2009.** Geographic distribution of *Bemisia tabaci* biotypes collected from autumn-cultured potato fields in Syria. International Society for Southcast Asian Agricultural Sciences. 15: 1-9.
 - **Gawel, N.J. and A.C. Bartlett. 1993.** Characterization of differences between whiteflies using RAPD. Insect Molecular Biology. 2: 33–38.
 - **Ghanim, M., S. Morin, M. Zeidan and H. Czosnek. 1998.** Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector the whitefly *Bemisia tabaci*. Virology. 240:295–303.

- **Gong, P., X.X., Zhang, X.W. Yang and X.F. Chen. 2001.** Microsatellite DNA polymorphism in different forms of the cotton aphid. *Acta Entomologica Sinica*, 4, 416-421. (in Chinese).
- **Hadian, J., S. Raeisi, F. Nadjafi and A. Khadivi-Khub. 2014.** DNA typing and genetic relations among populations of *Kelussia odoratissima* using ISSR and SRAP markers. *Plant Syst Evol.* 300:1525-32.
- **Hameed S., S. Hameed, M. Sadia, S.A. Malik. 2012.** Genetic diversity analysis of *Bemisia tabaci* populations in Pakistan using RAPD markers. *Electronic Journal of Biotechnology.* (15):6.
- **Kumar, P., K. Singh, Y. Vikal, L.S. Randhawa and G.S. Chahal. 2003.** Genetic diversity studies of elite cotton germplasm lines using RAPD markers and morphological characteristics. *Indian. J. Genet.* 63: 5-10.
- **Kumla, S., S. Doolgindachbaporn, R. Sudmoon and N. Sattayasai. 2012.** Genetic variation, population structure and identification of yellow catfish, *Mystus nemurus* (C&V) in Thailand using RAPD, ISSR and SCAR marker. *Mol Biol Rep.* 39: 5201-10.
- **Markham, P., J.D. Bedford, S. Liu, D.F. Frolich, R. Rossel and J.K. Brown. 1996.** The transmission of geminiviruses by biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius). In: Gerling, D., Mayer, R.T. (Eds.), *Bemisia: 1995 Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management.* Intercept. UK. 69-76.
- **Martin, J.H., D. Mifsud and C. Rapisarda. 2000.** The Whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and Mediterranean Basin. *Bulletin of Entomological Research.* 90: 407-448.
- **Mei, Z., L. Yang, M.A. Khan, M. Yang, C. Wei, W. Yang and et al. 2014.** Genotyping of *Ganoderma* species by improved random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Biochem Syst Ecol.* 56:40-8.
- **Moreno, S., J.P. Martin and J.M. Ortiz. 1998.** Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica.* 101: 117-125.
- **Muthusamy, S., S. Kanagarajan and S. Ponnusamy. 2008.** Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing

- genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. *Electronic Journal of Biotechnology*. 11(3).
- **Nei, M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70(3): 321-323.
 - **Noormohammadi, Z., F.Y. Hasheminejad-Ahangarani, M. Sheidai, A.S. Ghasemzadeh-Baraki and O. Alishah. 2013.** Genetic diversity analysis in Opal cotton hybrids based on SSR, ISSR, and RAPD markers. *Genet Mol Res*. 12: 256–69.
 - **Perring, T. M., A.D. Cooper, R.J. Rodriguez, C.A. Farrar and T.S. Bellows. 1993.** Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science*, 259, 74–77.
 - **Perring, T.M. 2001.** The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection*. 20: 725–737.
 - **Prabhaker, N., D.L. Coudriet and D.E. Meyerdirk. 1987.** Discrimination of whitefly species (Homoptera: Aleyrodidae) by electrophoresis of nonspecific esterases. *Journal of Applied Entomology*. 103: 447–451.
 - **Shah, A., D.Z. Li, L.M. Gao, H.T. Li and M. Moller. 2008.** Genetic diversity within and among populations of endangered species *Taxus fuana* (Taxaceae) from Pakistan and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 183–193.
 - **Stansly, P.A. and S.E. Naranjo. 2010.** Introduction: *Bemisia*, Bionomic and Anagement of a Global Peast.545.
 - **Tay, W.T., G.A. Evans, L.M. Boykin, P.J. De Barro. 2011.** Will the Real *Bemisia tabaci* Please Stand Up. *PLoS ONE*. 7(11): 1-5.
 - **Tsagkarakou, A. and N. Roidakis. 2003.** Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Molecular Ecology Notes*. 3: 196–198.
 - **Tsai, H. and K. Wang. 1996.** Development and reproduction of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on five host plants. *Environmental Entomology*. 25: 810-816.
 - **Yeh, F.C., R.C. Yang, T. Boyle, Z.H. Ye and J.X. Mao. 1997.** PopGene, the User Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada*.