

استخدام تقانة المواقع المحددة (STS) وهضم منتجات الـ PCR بواسطة أنزيمات التحديد (CAPS) لدراسة التنوع الوراثي بين مجتمعات بقعة السونة

لينا علي¹، مصطفى البوحسيني² ومحمد نايف السلتي¹

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سورية، البريد الإلكتروني: lina.7755@gmail.com

(2) المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، الرباط، المغرب

الملخص

علي، لينا، مصطفى البوحسيني ومحمد نايف السلتي. 2016. استخدام تقانة المواقع المحددة (STS) وهضم منتجات الـ PCR بواسطة أنزيمات التحديد (CAPS) لدراسة التنوع الوراثي بين مجتمعات بقعة السونة. مجلة وقاية النبات العربية، 34(1): 62-70.

استخدم في هذا البحث تقانة المواقع المحددة (STS) Sequence Tagged site marker وتقانة هضم منتجات الـ PCR بواسطة استخدام أنزيمات التحديد (CAPS) Cleaved amplified polymorphic sequence لتحديد منشأ ودراسة التنوع الوراثي لمجتمعات بقعة السونة (*Eurygaster integriceps* Put.) وهي 19 مجتمعاً من ست دول (إيران، تركيا، كازاخستان، أوزبكستان، العراق وسورية). حيث تراوحت المسافة الوراثية ما بين 0.319 (بين أنديجان من أوزبكستان ودمشق من سورية) و0.0148 (بين فارمين ومارفداشت في إيران). كان معامل الاختلاف الوراثي (Gst) Genetic differentiation coefficient بين المجتمعات ضمن البلدان صغيراً ما عدا في سورية حيث وصلت قيمته إلى 0.5، ولم يكن هناك ارتباط معنوي بين المسافة الجغرافية والوراثية ($R=0.338$)، وكان معدل الهجرة بين المجتمعات كبيراً ($Nm=2.2014$). وكانت أعلى قيمة للتنوع الوراثي في أوزبكستان وذلك بالاعتماد على تحليل المخطط العنقودي، وقد يكون ذلك دليلاً على أن أصل هذه الحشرة هو من أوزبكستان.

كلمات مفتاحية: التنوع الوراثي، منشأ، تدفق العوامل الوراثية، *Eurygaster integriceps*، DNA، STS، CAPS.

المقدمة

يتطلب طرائق جديدة للمكافحة تؤثر في المجتمعات المختلفة. فدراسة البصمة الوراثية للحشرة تسهم في تحديد صفاتها ومميزاتها، من حيث اختلاف قدرتها على التغذية والتكاثر على عوائل محددة، فبعض الطرز البيئية له مجال عوائل محدد وتوزع محلي، لكن الطرز الأخرى يكون لها مجال عوائل واسع. كما أن وجود عدة طرز بيئية في منطقة واحدة يطرح اعتبارات وراثية مهمة فقد يحل أحد الطرز الحيوية محل آخر ويكون له تأثير وراثي مسبباً حدوث أمراض جديدة (في حالة الحشرات الناقلة للأمراض) وقد يتعايش الطرازان البيئيان مع بعضهما في المنطقة نفسها، ولذلك من المهم أن نقوم مدى التغير الوراثي لفهم العلاقة الوراثية بين الطرز البيئية وقدرتها التنافسية في الحقل (13). وبناء عليه فلقد هدف هذا البحث إلى تحديد منشأ ودراسة التنوع الحيوي لمجتمعات بقعة السونة في بعض دول وسط وغرب آسيا باستخدام تقانة جزيئية.

مواد البحث وطرائقه

المادة الحشرية

تم جمع العينات الحشرية (حشرات كاملة) من عدة مواقع لعدة دول وهي: إيران (خراسان، فارماين، كرمشاه ومارفداشت)، كازاخستان (كازغارت والمعطي)، تركيا (إيدر، كانيكال وكونيا)، أوزبكستان (سمرقند،

يعد القمح المحصول الغذائي الاستراتيجي الأول، ويزرع في معظم المحافظات السورية (7). يتأثر إنتاج القمح بعدد من العوامل الحيوية في مقدمتها بقعة السونة (*Eurygaster integriceps* Put. Hemiptera, Scutelleridae) التي تسبب أضراراً اقتصادية مهمة في بلدان الشرق الأوسط والأدنى، وفي دول الاتحاد السوفيتي سابقاً، حيث تصل الخسائر التي تسببها إلى عشرات الملايين من الدولارات عند انتشارها الواسع (9)، وقد أدى استعمال المبيدات الحشرية بشكل كبير في بعض المناطق إلى الإضرار بمجتمعات الأعداء الحيوية المحلية بالإضافة إلى أضرارها على التوازن البيئي وتكاليف استخدامها المرتفعة، كما تم تسجيل انخفاض فعالية المبيدات الحشرية في السنوات العشر الأخيرة، وذلك بسبب ظهور صفة المقاومة عند بعض السلالات الحشرية (19). لذلك فإننا نحتاج إلى تطوير برنامج إدارة متكاملة للآفة تتكامل فيه عناصر مختلفة تعتمد وبشكل رئيس على مكافحة الحيوية والطرق الزراعية ومنها النباتات المقاومة كما أن المميزات الوراثية يمكن أن تكون مفيدة جداً بهذا المجال. حيث أن وجود مجتمعات الآفة في بيئات متنوعة، مع تكيفات أخرى لظروفها البيئية الجديدة، يمكن أن تقود لمجتمعات مختلفة وراثياً، وهذا

94 °س، 20 ثانية عند 94 °س، دقيقة واحدة عند 55 °س، دقيقة واحدة عند 72 °س، إعادة المراحل ما عدا الأولى لمدة 35 دورة، 7 دقائق عند 72 °س، تم أخذ 3 ميكرولترات من نواتج الـ PCR السابق ومزجت مع 2 ميكرولتز من مادة صبغة العينات. تم ترحيل العينات على جهاز رحلان كهربائي عامودي باستخدام هلامة الأكريلاميد بتركيز 8%، لمدة ساعتين تحت تأثير 250 فولت، وبعد ذلك تم الصبغ بوساطة نترات الفضة حسب المراحل التالية وتبعاً لإرشادات الشركة المصنعة (Promega Co. 1994)، حيث وضعت الصفيحة الزجاجية الصغيرة في محلول التثبيت (ايتانول-حمض الخل) لمدة 5 دقائق على رجاج كهربائي، ثم غسلت بالماء المقطر مرتين، ثم في محلول الصبغ (نترات الفضة) لمدة 10 دقائق على رجاج كهربائي، ثم غسلت بالماء المقطر مرتين، ثم في محلول تطوير الحزم (هدروكسيد الصوديوم-فورم ألدهيد) لمدة 15 دقيقة على رجاج كهربائي، ثم غسلت بالماء المقطر مرتين وأخيراً في محلول إيقاف تطوير الحزم (حمض الخل) لمدة 3 ثواني، ثم غسلت بالماء المقطر مرتين، وتركت لتجف مدة ساعتين ثم صورت الهمالة باستخدام جهاز IMAGE MAX SCANNER.

هضم منتجات الـ PCR بوساطة استخدام أنزيمات التحديد (CAPS) Cleaved amplified polymorphic sequence

تقوم أنزيمات التحديد بهضم الحمض النووي (DNA) عند تتابعات نيكليوتيدية معينة خاصة بكل أنزيم تحديد (12)، وقطعه عند هذا التتابع مهما كان منكرراً على طول شريطي الحمض، وينتج عن ذلك قطع من الحمض النووي مختلفة الأطوال يمكن فصلها اعتماداً على أوزانها الجزيئية بوساطة الرحلان الكهربائي (25). تم تجربة كل من أنزيمي التحديد *TaqI* و *HaeIII*، على نواتج PCR تقانة المواقع المحددة التي تحوي على زوج البادئات EF0-5 و EF2-3 فقط لأنها البادئتان اللتين اعطيتا تباينات، وذلك كما يلي لكل عينة: 1 ميكرولتز من المحلول Restriction Enzyme Buffer 10x، 0.5 ميكروليتر من أنزيم التحديد Restriction 5 unit Enzyme، 5.5 ميكرولتز ماء مقطر ومعقم. 3 ميكرولتز من منتجات PCR الحمض النووي المحضر حسب تقانة المواقع المحددة. توضع الكمية السابقة لكل العينات في أنابيب اختبار صغيرة عند 37 °س لمدة 4-5 ساعات، ثم يضاف 3 ميكروليترات من مادة الصبغ لكل 3 ميكروليترات من العينات السابقة، ويحمل 6 ميكروليترات منها على هلامة أكريلاميد 8% لمدة ساعتين.

التحليل الإحصائي

تم اعتبار أن كل حزمة تمثل موقعاً وراثياً واحداً، وسجل وجود أو عدم وجود حزم الحمض النووي DNA المضخمة إما 1 أو 0. استعمل برنامج Power Marker V3.25 في تحديد قدرة البادئات المستخدمة في

أنديجان، غالورول وجيزاك)، العراق (النجف والديوانية)، وسورية (تل حديا، إعزاز، القامشلي ودمشق)، حيث جمعت العينات من حقل واحد من كل موقع، ونقلت هذه الحشرات حية إلى المختبر ثم جرى تخزينها مباشرة عند -80 °س. تم تمثيل كل موقع بـ 20 حشرة كاملة، باستثناء الموقع أنديجان (17 حشرة)، غالورول (7 حشرات)، المعطي (6 حشرات)، حيث تم استخلاص الـ DNA من العينات الحشرية التي وصلت حية فقط.

عزل الحمض النووي DNA

استخدمت طريقة CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromide) (19) لعزل الحمض النووي DNA من جسم الحشرة، ومقارنة تركيزها مع عينات DNA قياسية (DNA Markers Lambda) باستخدام هلام الأجار 1% ومعاملتها بمادة بروميد الإيثيديوم تركيزه 0.5 ميكروغرام/مل بوساطة جهاز رحلان أفقي، كما استخدم جهاز مقياس الطيف الضوئي عند طول موجة 260 و 280 نانومتر لقياس كمية الحمض النووي DNA.

تقانة المواقع المحددة (STS) Sequence tagged site

يمكن تحويل تقانة الـ AFLP والـ RFLP إلى تقانة أكثر سرعة وفعالية تدعى بتقانة المواقع المحددة (STS) (21). تم توليد تقانة الـ STS بتصميم بوائج لمسابر الـ RFLP المعروفة السلسلة إلى سلسلة قصيرة معروفة والتي تعرف مواقع محددة على الكروموزومات (18). في البداية تم استخدام 20 زوج بادئات في مختبر التقانة الحيوية التابع لإيكاردا (6PDH، LepDecaB -LepDecaA، LEPWG1-ModLEPWG2) -ACT15، cyt C B3 -cyt C C5، G6PDH 209R-56F -18SS22، Tub43 -Tub15، Cal2 -Cal1، ACT113 -mt12Sai، mtCB1-mtCB1L، ITS5-ITS4، 18SA1984 -mtCB2، mtND1A-mtND1، mt16Sar-mt16Sa، mt12Sbi، mt16Sbr-mt16Sb، mtND4-mtND4rev، mtCB2-H -EF15، EF2-3 -EF0-5، ARK7-3 -CK6-5، 284df -22.5drc (EF15). جرت عملية تضخيم أولية للمجين (Genome) باستخدام البادئات السابقة وذلك بتحضير مزيج تضاعف الـ PCR (حجمه 10 ميكروليتر) المكون من: 1 ميكرولتز من البادئة (R+F) 5 بيكومول لكل منهما، 0.05 ميكرولتز من الأسس الأزوتية (5mM) dNTPs، 0.05 ميكرولتز من أنزيم البلمرة (1 U) *Taq*، 1 ميكرولتز من المحلول المنظم One for all Buffer (10X)، 6.5 ميكرولتز ماء مقطر ومعقم و 1.5 ميكرولتز من الـ DNA المخفف، تركيزه 25 نانوغرام/ميكروليتر. أجري التضاعف باستخدام جهاز الـ PCR وفق البرنامج التالي: 2 دقيقة عند

فإذا كانت قيمة Nm أقل من 1 فهذا يعني أن الاختلافات الوراثية موجودة بين المجتمعات المحلية، أما إذا كانت قيمة Nm أكبر من 1 فهذا يعني أن هناك اختلافات وراثية محلية قليلة بين المجتمعات، ويعود سبب الاختلافات إلى نسبة عالية من الهجرة تجاه هذه المجتمعات.

النتائج والمناقشة

نتائج جودة الحمض النووي DNA

تراوحت نسبة إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة 260 نانومتر إلى الإمتصاص عند طول موجة 280 نانومتر بين 1.6 و 2.0 في معظم العينات مما دل على أن نوعية الـ DNA المنتجة جيدة، وظهر تحزم الـ DNA على هلامة الآجار غير مقطعة، وهذا دليل إضافي على أن نوعية DNA كانت جيدة (24).

نتائج البادئات المستخدمة في تحليل التنوع الوراثي

تم اختبار البادئات التي أعطت اختلافات وراثية بين المجتمعات (350 حشرة حيث مُثل كل موقع 20 حشرة) وهي بالنسبة لتقانة المواقع المحددة زوج البادئات EF0-5 و EF2-3 (37 موقع وراثي أو مؤشر)، وزوج البادئات EF15-EF15 (58 موقع وراثي أو مؤشر)، ومن تقانة هضم منتجات الـ PCR بواسطة استخدام أنزيمات التحديد. استخدم زوج البادئات EF0-5 و EF2-3 مع الأنزيم (*HaeIII*) (35 موقع وراثي أو مؤشر)، أما بالنسبة للبادئات الأخرى فلم تظهر أي اختلافات وراثية (جدول 1، الشكلين 1 و 2).

الـ STS و الـ CAPS في الكشف عن الاختلافات الوراثية الموجودة بين العينات. استعمل برنامج POP gene 1.31 لإجراء التحاليل الإحصائية الأخرى (28). حسب معامل البعد الوراثي (Nei's Genetic distance,) (a dissimilarity index) بالاعتماد على الـ 127 موقع لكل المجتمعات بالنسبة لتقانة الـ STS و الـ CAPS، كما رسم مخطط البعد الوراثي للمجتمعات أو المخطط العنقودي (UPGMA Cluster) بالاعتماد على معامل البعد الوراثي (2). واستخدم برنامج POP gene 1.3 لتحليل التنوع الوراثي عن طريق تقدير توزع الاختلاف بين المجتمعات وضمن المجتمعات بين البلدان أو المجموعات (27)، حسب المعادلات التالية:

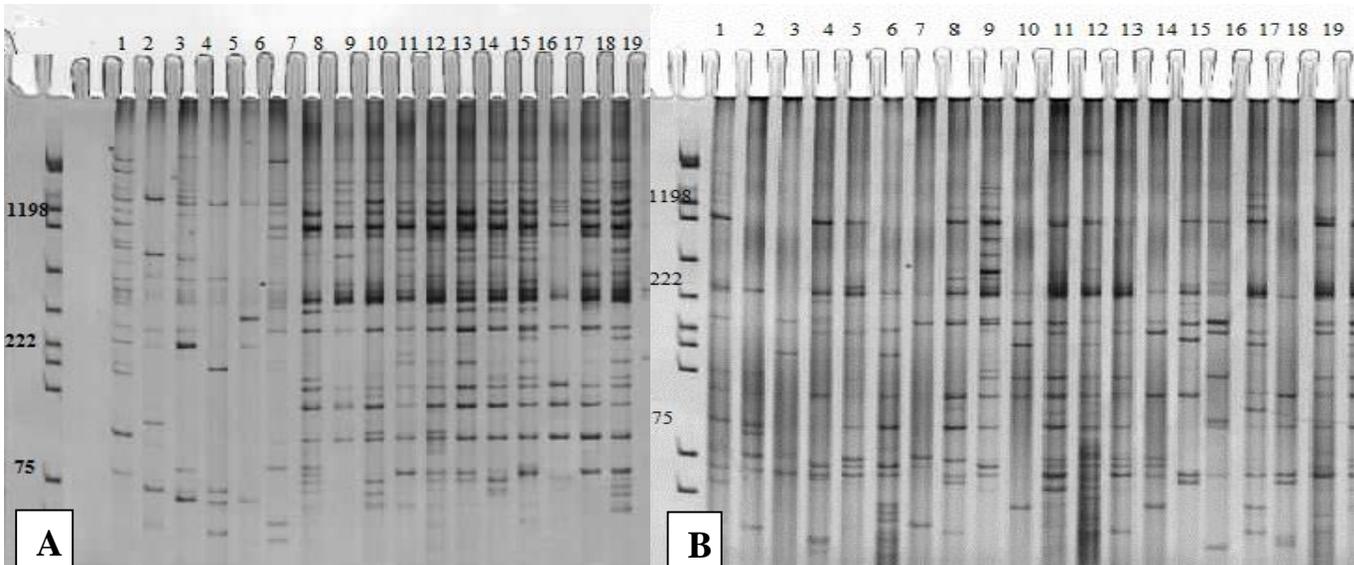
التنوع الوراثي الكلي للمجتمعات (H_t) = التنوع الوراثي ضمن المجتمعات (H_s) + التنوع الوراثي بين المجتمعات (D_{st})

معامل الاختلاف الوراثي (G_{st}) = التنوع الوراثي بين المجتمعات (D_{st}) ÷ التنوع الوراثي الكلي للمجتمعات (H_t)

تتراوح قيم معامل الاختلاف (G_{st}) من 0-1 حيث 0 لا يوجد اختلافات بين المجتمعات و 1 = وجود اختلافات كبيرة بينها (15، 16).

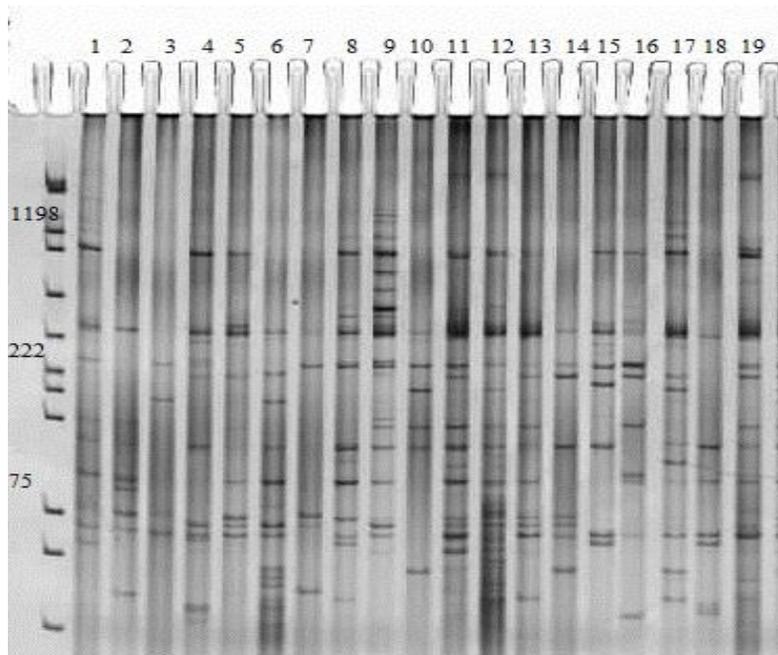
وحسب تدفق الجين بين المجتمعات (Nm) من المعادلة التالية (15):
 $Nm = 0.5 [(1/G_{st}) - 1]$

حيث N = حجم المجتمع، m = نسبة الأفراد المهاجرة ضمن المجتمع، G_{st} = معامل الاختلاف الوراثي



شكل 1. نتائج تحليل عدة مجتمعات حشرية للسونة (حشرة واحدة فقط/مجتمع) باستخدام البادئة EF15-EF15 (A)، والبادئة EF05-EF23 مع أنزيم التحديد (*HaeIII*) (B).

Figure 1. The results of sunn pest populations analysis (one insect/population) using primers EF15-EF15 (A) and EF05-EF23 primers with restriction enzyme *HaeIII*, (B).



شكل 2. نتائج تحليل عدة مجتمعات حشرية للسونة (حشرة واحدة فقط/مجتمع) باستخدام زوج البادئات EF05-EF23. 1= النجف، 2= الديوانية، 3=فارمين، 4= خراسان، 5= مارفداشت، 6= كرمشاه، 7= أنديجان، 8= غالورول، 9= جيزاك، 10= سمرقند، 11= كازغارت، 12= المعطي، 13= كاناكيل، 14= ايدرین، 15= كونيا، 16= تل حدیا، 17= إعزاز، 18= القامشلي، 19= دمشق.

Figure2. The results of sunn pest populations (one insect/population) analysis using primers EF05-EF23. 1= Al-Najaf, 2= AdDewaniyeh, 3= Varamin, 4=Khorasan, 5= Marvadasht, 6= Kermanshah, 7= Andijan, 8= Gallorol, 9= Jizak, 10= Somarkand, 11= Kazgurt, 12= Almaty, 13=Canakkale, 14=Edrine, 15= Konya, 16=Tel-Hadya., 17= Azaz, 18=Kameshly, 19= Damascus.

جدول 1. متوسط عدد قطع (حزم) الحمض النووي في 20 عينة حشرية للمجتمع الواحد، الناتجة من استخدام أزواج البادئات EF2-3/EF0-5 و EF15-EF15 وكذلك هضم منتجات استخدام زوج البادئات EF2-3/EF05 بواسطة انزيم Hae III لعينات الحمض النووي المستخرجة من 19 مجتمع لحشرة السونة جمعت من ستة بلدان.

Table 1. The mean number of nucleic acid bands in 20 insect samples for one population, produced following PCR amplification and using two primer pairs EF2-3/EF0-5 and EF15/EF15 and also products of using the primers pair EF2-3/EF05 followed by digestion with the enzyme Hae III as applied to total nucleic acid preparations extracted from 19 sunn pest populations collected from six countries.

PCR primers used			البيادئات المستخدمة	مواقع مجتمعات الحشرة
EF2-3/EF0-5 + Hae III	EF15-EF15	EF2-3/EF0-5		Location of insect populations
5	25	7		النجف Al-Najaf
6	36	7		الديوانية Al-Dewaniyeh
6	33	8		فارمين Varamin
4	27	4		خراسان Khorasan
17	23	9		مارفداشت Marvadasht
23	20	14		كرمشاه Marvadasht
22	26	22		أنديجان Andijan
18	24	19		غالورول Gallorol
21	24	20		جيزاك Jizak
21	28	24		سمرقند Somarkand
20	28	28		كازغارت Kazgurt
22	23	25		المعطي Almaty
23	30	29		كاناكيل Canakkale
4	26	7		إيدرین Edrine
15	32	21		كونيا Konya
4	28	3		تل حدیا Tel-Hadya
11	26	17		إعزاز Azaz
17	29	16		القامشلي Kameshly
15	36	9		دمشق Damascus

18.11%، وكان عدد المؤشرات الفعالة 1.0703 ± 0.2019 وعدد المؤشرات الملحظة 1.1811 ± 0.3866 (جدول 3).

التنوع الوراثي ضمن المجتمعات بين المجموعات (البلدان)

احتلت أوزبكستان المرتبة الأولى في قيمة التنوع الوراثي الكلي وضمن المجتمعات (22%، 14%)، على التوالي، وكانت أدنى قيمة في العراق (9%، 7%)، على التوالي (جدول 4). وكان معامل الاختلاف الوراثي صغيراً في كل البلدان ما عدا في سورية (0.5) وهذا قد يعود لتنوع الظروف البيئية السورية من حيث درجات الحرارة والهطول المطري وإلى اختلاف العوامل النباتية المزروعة في هذه المناطق وتكيفها مع هذه العوامل. تراوحت نسبة تدفق الجين أو الهجرة من 0.4 في سورية إلى 2.01 في كازاخستان بمتوسط $2.2014 = Nm$ وهذا يتوافق مع سلوك الهجرة العالي الذي يحدث لهذه الحشرة. كما تتأثر هجرة السونة بالرياح، ووجد التأثير نفسه لدى سوسة جوز القطن حيث تنتقل هذه الحشرات من المناطق المصابة إلى المناطق غير المصابة طبيعياً من خلال طيرانها (1). وتسهم هجرة الانسان وانتقال معدات المزارعين وعمليات التبادل التجارية بانتقال مجتمعات هذه الحشرة مع الحبوب والقش (3). كما تتأثر الهجرة بعدد من العوامل: كالانتشار، الاستمرارية في الموطن، مكان موطن الحشرة، ديناميكية انقراض المجتمعات وإعادة مستعمراتها (22). ولقد وجد في إحدى الدراسات على مجتمعات النطاط *Prokelisia sp.* بأن مستويات تدفق الجين لم تتخفص مع المسافة، وكانت العلاقة بين تدفق الجين والمسافة لمنطقتين مختلفتين (سواحل الخليج وسواحل المحيط الأطلسي في أمريكا الشمالية) متشابهتين. وبما أنه ليس هناك دليل على أن العزل الوراثي يزداد مع المسافة الجغرافية، لذلك ليست كل المجموعات الجغرافية معزولة بشكل كاف عن جيرانها ليكون لديها سلاسل DNA فريدة بشكل دقيق (23).

كانت أكبر مسافة وراثية بين أنديجان من أوزبكستان ودمشق من سورية $GD = 0.319$ (جدول 2). وجدت أصغر مسافة وراثية بين فارمين ومارفاداشت من إيران $GD = 0.0148$. وكانت علاقة الارتباط بين المسافة الوراثية والمسافة الجغرافية ضعيفة وغير معنوية $R = 0.338$. وهذا يؤكد ما وجد في دراسة سابقة (19) بأنه لا توجد علاقة بين البعد الجغرافي والمسافات الوراثية لمجتمعات بقة السونة التي تم تحليلها بوساطة تقانة الـRAPD، حيث تطابق مجتمع من سورية وآخر من إيران إلى حد كبير، وهذا يماثل نتائج دراسات أخرى بعدم وجود علاقة بين المسافة الجغرافية والوراثية لحشرات مختلفة (5، 6، 8)، وعلى العكس من ذلك وجدت دراسات أخرى ارتباطاً موجباً بينهما (11، 17). فآلية انتشار وهجرة الحشرات واستمرارها في موقع محدد يؤثر بشكل كبير في الاختلافات بين المجتمعات (20). كما أن المسافة الوراثية يمكن أن تكون عالية أو منخفضة في بعض الأجناس، وقد يظهر هذا الاختلاف بين أفراد الجنس الواحد (14). وهناك أسباب عديدة لهذه الاختلافات مثل طريقة التكاثر، تاريخ النشوء والتطور، انجراف الجين وتأثيرات المنشأ أو لأكثر من سبب من الأسباب السابقة (26).

التنوع الوراثي بين المجتمعات

وجد تنوع وراثي كبير ضمن المجتمعات والبلدان المدروسة، وكانت أعلى قيمة لدى مجتمع سمرقند من أوزبكستان 18%، وأقل قيمة لدى مجتمع تل حديا من سورية 4%. وكان أعلى عدد للمواقع الوراثية المتباينة من الـ127 موقع لدى مجتمع سمرقند 80 بنسبة 62.99%، وكان عدد المؤشرات الفعالة 1.3061 ± 0.3524 وعدد المؤشرات الملحظة 1.6299 ± 0.4847 ، في حين كان أقل عدد في مجتمع تل حديا 23 بنسبة

جدول 2. الاختلافات الوراثية حسب قياسات Nei والعلاقة بين المسافة الوراثية (بالأعلى) والمسافة الجغرافية (بالأسفل) لعينات جمعت من 19 موقعاً جغرافياً مختلفاً.

Table 2. Genetic dissimilarity based on Nei measurements, and the relationship between genetic distance (GD) (upper part) and geographic distance km (lower part) of samples collected from 19 different geographic locations.

الموقع Location	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	0	0.0531	0.0752	0.0576	0.0845	0.1516	0.2318	0.2061	0.1623	0.1129	0.1121	0.0995	0.2020	0.1561	0.1008	0.1183	0.0916	0.2121	0.1424
2	57	0	0.0517	0.0203	0.0695	0.1362	0.2489	0.2253	0.1390	0.0800	0.0954	0.0822	0.1684	0.1445	0.0854	0.0929	0.0889	0.2181	0.0978
3	663	663	0	0.0210	0.0148	0.0826	0.2097	0.1898	0.1175	0.0681	0.0709	0.0569	0.1371	0.1258	0.0598	0.0832	0.0659	0.1868	0.1098
4	435	435	435	0	0.0501	0.1052	0.2293	0.2086	0.1134	0.0550	0.0684	0.0500	0.1274	0.1065	0.0605	0.0745	0.0620	0.1983	0.0856
5	879	879	879	879	0	0.0760	0.2042	0.1937	0.1308	0.0816	0.0820	0.0678	0.1484	0.1055	0.0624	0.0863	0.0752	0.1722	0.1155
6	163	163	163	163	163	0	0.1359	0.1427	0.1194	0.0968	0.1236	0.1250	0.1650	0.1055	0.0645	0.1439	0.1478	0.1325	0.1848
7	2414	2414	2414	2414	2414	2414	0	2182	0.1586	0.1948	0.2396	0.2079	0.1263	0.1203	0.2030	0.2713	0.1258	0.3192	0.3192
8	1766	1766	1766	1766	1766	1766	1766	390	0.1990	0.2003	0.2237	0.2420	0.1520	0.1963	0.1963	0.2604	0.1434	0.3017	0.3017
9	1785	1785	1785	1785	1785	1785	1785	372	20	0.0710	0.0701	0.1394	0.1182	0.0538	0.1342	0.1424	0.1393	0.1804	0.1804
10	1473	1473	1473	1473	1473	1473	1473	57	77	0.0275	0.0275	0.0706	0.1140	0.0740	0.0740	0.0720	0.1631	0.0972	0.0972
11	1890	1890	1890	1890	1890	1890	1890	241	226	293	0	0.0600	0.1225	0.1278	0.0682	0.0552	0.1853	0.1312	0.1312
12	2471	2471	2471	2471	2471	2471	2471	728	708	583	583	0	0.1381	0.1608	0.0474	0.0427	0.2233	0.1082	0.1082
13	2196	2196	2196	2196	2196	2196	2196	3787	3787	3822	3737	4389	0	0.1641	0.1237	0.1398	0.2234	0.1184	0.1184
14	2292	2292	2292	2292	2292	2292	2292	3809	3809	3833	3761	4395	172	0.1532	0.1607	0.1538	0.0900	0.2009	0.2009
15	1473	1473	1473	1473	1473	1473	1473	3183	3183	3237	3128	3815	672	0.772	0.0719	0.0603	0.2132	0.1128	0.1128
16	1007	1007	1007	1007	1007	1007	1007	2746	2746	2821	2686	3404	1190	1286	0	0.0234	0.2274	0.0769	0.0769
17	1042	1042	1042	1042	1042	1042	1042	2739	2739	2809	2680	3391	1162	1250	65	0.2326	0.0975	0.0975	0.0975
18	777	777	777	777	777	777	777	2336	2336	2426	2294	3008	1511	1579	855	396	386	0.2758	0.2758
19	914	914	914	914	914	914	914	2816	2816	2912	2752	3495	1330	1450	687	287	352	556	0

* 1= النجف، 2= الديوانية، 3=فارمين، 4= خراسان، 5= مارفاداشت، 6= كرمشاه، 7= أنديجان، 8= غالورول، 9= جيزالك، 10= سمرقند، 11= كاز غارت، 12= المعطي، 13= كاناكيل، 14= ايدرين، 15= كونيا، 16= تل حديا، 17= إزاز، 18= الغامشلي، 19= دمشق.

* 1= Al-Najaf, 2= Al-Dewaniyeh, 3= Varamin, 4=Khorasan, 5= Marvadasht, 6= Kermanshah, 7= Andijan, 8= Gallorol, 9= Jizak, 10= Somarkand, 11= Kazgurt, 12= Almaty, 13=Canakkale, 14=Edrine, 15= Konya, 16=Tel-Hadya, 17= Azaz, 18=Kameshly, 19= Damascus.

جدول 3. مؤشرات التنوع الوراثي لبقعة السونة في المجتمعات المدروسة: عدد المؤشرات، عدد المواقع الوراثية المتباينة، عدد المؤشرات الملاحظة، عدد المؤشرات الفعالة، ومعامل التنوع الوراثي.

Table 3. Parameters of genetic diversity within sunn pest populations evaluated: number of markers, number of polymorphic loci, observed number of markers, effective number of markers, and gene diversity.

عدد المؤشرات الفعالة ± Effective number of markers ± SD	معامل التنوع الوراثي ± Gene diversity ± SD	عدد المؤشرات الملاحظة ± المعيارية Observed number of markers ± SD	نسبة المواقع المتباينة % Percentage of polymorphic loci %	عدد المواقع الوراثية المتباينة No. of polymorphic loci	اسم المجتمع Name of populations
0.1247±0.0550	0.2186±1.0864	0.426±1.2362	23.62	30	Al-Najaf النجف
0.0927±0.1671	1.1594±0.3167	1.3465±0.4777	34.65	44	Al-Dewaniyeh الديوانية
0.0862±0.1566	1.1422±0.2845	1.3622±0.4825	36.22	46	Khorasan خراسان
0.0740±0.1560	1.1279±0.2895	1.2520±0.4359	25.20	32	Varamin فارمين
0.0774±0.1370	1.1193±0.2446	1.3701±0.4847	37.01	47	Marvadasht مارفداشت
0.0822±0.1505	1.1344±0.2785	1.3858±0.4887	38.58	49	Marvadasht كرمشاه
0.1273±0.1861	1.2189±0.3487	1.4173±0.4951	41.73	53	Andijan أنديجان
0.0931±0.1583	1.1508±0.2814	1.3150±0.4663	31.50	40	Gallorol غالورول
0.1638±0.1971	1.2803±0.3650	1.5197±0.5016	51.97	66	Jizak جيزاك
0.1841±0.1901	1.3061±0.3524	1.6299±0.4847	62.99	80	Somarkand سمرقند
0.1544±0.1722	1.2420±0.2984	1.5433±0.5001	54.33	69	Kazgurt كازغارت
0.0597±0.1258	1.0911±0.2109	1.2205±0.4162	22.05	28	Almaty المعطي
0.1499±0.1832	1.2481±0.3398	1.5512±0.4993	55.12	70	Edrine إدرين
0.1683±0.2131	1.3064±0.4119	1.4803±0.5016	48.03	61	Canakkale كاناكيل
0.0948±0.1423	1.1418±0.2412	1.4567±0.5001	45.67	58	Konya كونيا
0.0438±0.1177	1.0703±0.2019	1.1811±0.3866	18.11	23	Tel-Hadya تل حديا
0.0889±0.1447	1.1388±0.2657	1.4567±0.5001	45.67	58	Azaz إعزاز
0.1092±0.1498	1.1654±0.2616	1.4803±0.5016	48.03	61	Damascus دمشق
0.0980±0.1603	1.1580±0.2829	1.3780±0.4868	37.80	48	Kameshly القامشلي

جدول 4. البنية الوراثية لمجتمعات حشرة السونة التي تمت دراستها: التنوع الوراثي الكلي (Ht)، التنوع الوراثي خلال المجتمعات بين البلدان (Hs)، معامل الاختلاف الوراثي (G_{st})، تقدير نسبة الهجرة في الجيل الواحد (Nm).

Table 4. Analysis of genetic structure of the evaluated sunn pest populations: total gene diversity (H_t), gene diversity within populations (H_s), coefficient of gene differentiation (G_{st}) and estimate of gene flow (Nm).

نسبة الهجرة بالجيل الواحد Estimate of number of migrants per generation (Nm)	معامل الاختلاف الوراثي بين المجتمعات Relative magnitude of gene differentiation among populations (G _{st})	التنوع الوراثي داخل المجتمعات ± الإختلاف المعيارية Gene diversity within populations (H _s) ±SD	التنوع الوراثي الكلي ± الإختلاف المعيارية Total Genetic diversity (H _t) ± SD	نسبة المواقع المتباينة Percentage of polymorphic loci	عدد المواقع المتباينة No. of polymorphic loci	حجم المجتمع (n)	عدد المجتمعات No. of populations	Country	البلد
1.5351	0.2457	0.0738±0.0147	0.0979±0.0270	36.22	46	40	2	Iraq	العراق
1.0331	0.3261	0.0799±0.0124	0.1186±0.0259	64.57	82	80	4	Iran	إيران
0.8175	0.3795	0.1420±0.0178	0.2289±0.0378	78.74	100	64	4	Uzbekistan	أوزبكستان
2.0125	0.199	0.1071±0.0120	0.1337±0.0209	64.57	82	26	2	Kazakhstan	كازاخستان
0.8747	0.3637	0.1377±0.0155	0.2164±0.0345	78.74	100	60	3	Turkey	تركيا
0.4406	0.5316	0.0850±0.0095	0.1814±0.0334	72.44	92	80	4	Syria	سورية
2.2014	0.1851	0.1699±0.0172	0.2085±0.0275	100.0	127	350	19	Overall	المجموع الكلي

نتائج تحليل المخطط العنقودي

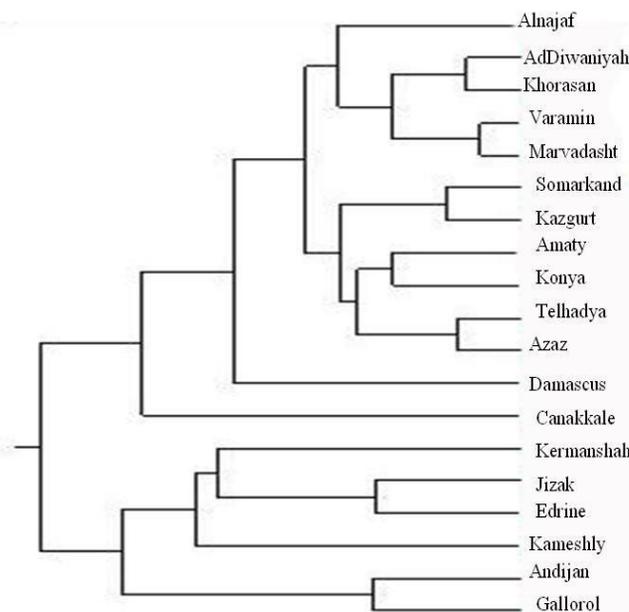
أوضح المخطط العنقودي وجود بعض المجتمعات التي تنتمي لنفس البلد قد وجدت متقاربة من بعضها، كما وجدت أيضاً بعض المجتمعات التي تنتمي لدول مختلفة متقاربة من بعضها، وأمكن تقسيم المخطط العنقودي إلى مخططين عنقوديين رئيسيين (شكل 3):
العنقود الأول، ويتألف من عدة عناقيد ثانوية:

- يحوي على مجتمعين من إيران (فارمين ومارفداشت) متجاورين وموجودين بالقرب من خراسان والديوانية من العراق وهذه المجتمعات الأربعة موجودة بقرب مجتمع النجف من العراق.
- يحوي على مجتمعات كل من تل حديا وإعزاز من سورية، بالقرب من مجتمع من كونيا من تركيا مع المعطي من كازاخستان، بجانب سمرقند من أوزبكستان وكازغارت من كازاخستان.
- يحوي على مجتمع دمشق من سورية.
- يحوي على مجتمع كاناكيل من تركيا.

العنقود الثاني ويتألف من عنقودين ثانويين:

- يحوي على مجتمع إيدر من تركيا مع جيزاك من أوزبكستان، ويوجدان بالقرب من مجتمع كرمشاه من إيران، وهذه المجتمعات موجودة بالقرب من مجتمع القامشلي من سورية.
- يحوي على مجتمعي أنديجان وغالورول من أوزبكستان اللذين يعدان المجتمعين الأكثر بعداً وراثياً في المخطط العنقودي.

احتوى المخطط العنقودي على مجتمعات تعود لأكثر من دولة متقاربة من بعضها ويعود ذلك للعمليات التجارية التي تحدث بين شعوب هذه المناطق حيث يمكن أن تنقل الحشرات الكاملة مع الحبوب والقش، إضافة إلى آلية هجرة بقعة السونة، فلا يوجد ارتباط بين المسافة الوراثية والجغرافية، ونتيجة لارتفاع قيمة التنوع الوراثي في أوزبكستان، يمكن أن يكون ذلك دليلاً على ان الحشرة قد نشأت في هذا البلد (4).



شكل 3 . المخطط العنقودي (UPGMA Cluster) لمجتمعات حشرة السونة المدروسة بالاعتماد على معامل البعد الوراثي.

Figure 3. UPGMA cluster analysis of sunn pest populations studied based on dissimilarity index.

Abstract

Ali, L., M. El-Bouhssini and M.N. Al-Salty. 2016. Using Sequence Tagged Site (STS) marker and Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) to study the genetic variation of sunn pest populations collected from six countries (Iraq, Iran, Uzbekistan, Kazakhstan, Turkey and Syria). *Arab Journal of Plant Protection*, 34(1): 62-70.

The study aimed to identify the origin and genetic variation of sunn pest populations between and within the 19 populations of sunn pest collected from six countries. The genetic distance ranged from 0.319 (between Andijan from Uzbekistan and Damascus from Syria) to 0.0148 (between Varamin and Marvdasht in Iran). Genetic differentiation (G_{st}) was small in all countries, except Syria ($G_{st}=0.5$). There was no significant correlation between genetic distance and geographic distance ($R=0.338$). The rate of gene flow between countries was high ($Nm=2.2014$), indicating high rate of migration between countries. Based on cluster analysis the highest genetic diversity was observed in Uzbekistan, suggesting that this country can be considered as the center of origin for sunn pest.

Keywords: Genetic variation, origin, gene flow, *Eurygaster integriceps*, DNA, STS, CAPS.

Corresponding author: Lina Ali, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Syria, email: lina.7755@gmail.com

References

1. Allen, C.T., W.L. Patton, E.L. Smith and R.E. Newman. 2001. Texas boll weevil eradication update. Proceedings of Belt-wide Cotton Conference, 2: 934-937.
2. Boeger, J.M., S.R. Chen and B.A. McDonald. 1993. Gene flow between geographic populations of *Mycosphaerella graminicola* (Anamorph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. *Phytopathology*, 83: 1148-1154.
3. Bull, E.S., W.R. Briddon, S.W. Sserubombwe, K. Ngugi, G.P. Markham and J. Stanley. 2006. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *Journal of General Virology*, 87: 3053-3065.
4. Bouajila, A., M.A. Abang, S. Haouas, S. Udupa, S. Rezgui, M. Baum and A. Yahyaoui. 2007. Genetic diversity of *Rhynchosporium secalis* in Tunisia as revealed by pathotype, AFLP, and microsatellite analysis. *Mycopathologia*. 163: 281-294.
5. Calderón, I.C., L.P. Dorn, S. Melgar, J.J. Chávez, A. Rodas, R. Rosales and C.M. Monroy. 2004. A Preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Journal of Mediterranean Entomology*, 41: 882-887.
6. Clark, P.L., J. Molina-Ochoa, S. Martinelli, S.R. Skoda, J.D. Isenhour, J.D. Lee, J.D. Krumml, T. Jeffrey and J.E. Foster. 2007. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. *Journal of Insect Science*, 7: 536-2442.
7. F.A.O. 2014. Annual Agricultural Statistical. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, Roma, Italy. (<http://apps.Fao.org/cgi-bin/nphdb.pl=agriculture>).
8. Gujar, T.G., N.R. Khawale and V. Kalia. 2007. Genetic variability of *Helicoverpa armigera* (Hübner) attributable to cadherin gene-specific molecular markers. *Current Science*, 92: 800-804.
9. Hama, N.N., A.Z. Stephan, A.M. Ali and M.L. Aboud. 2007. Sunn Pest status in Iraq. Pages 39-43. In: Sunn Pest management: A Decade of Progress 1994-2004. B.L. Parker, M. Skinner, M. El Bouhssini and S.G. Kumari (eds.). Published by the Arab Society for Plant Protection, Beirut, Lebanon, 433 pp.
10. Javahery, M. 1995. A technical review of sunnpest (Heteroptera: Pentatomidae) with special reference to *Eurygaster integriceps* Puton. FAO, Regional office for the Near East, Cairo, Egypt. 27: 260-272.
11. Kim, S.K. and T.W. Sappington. 2004. Boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) Dispersal in the southern United States: Evidence from Mitochondrial DNA Variation. *Molecular Ecology and Evolution*, 33: 457-470.
12. Konieczny, A. and F. Ausubel. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR based markers. *Plant Journal*. 4: 403-410.
13. Moya, A., P. Guirao, D. Cifuentes, F. Beitia and J.L. Cenis. 2001. Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Molecular Ecology*. 10: 891-897.
14. Mutebi, P.J., F. Tripet, B.J. Alexander and G.C. Lanzaro. 2002. Genetic differentiation among populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Central and South America. *Annals of the Entomological Society of America*, 95: 740-752.
15. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.
16. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 70: 3321-3323.
17. Noireau, F., M. Zegarra, J. Ordoñez, T. Gutierrez and J.P. Dujardin. 1999. Genetic Structure of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) Domestic Populations from Bolivia: Application on Control Interventions. *Mem Insect Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 94: 347-351.
18. Olson, M., L. Hood, C. Cantor and D. Dotstein. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science (Washington, DC)*. 254: 1434-1435.
19. Parker, B.L., M. Skinner, M. Brownbridge and M. El-Bouhssini. 2000. Control of insect pests with entomopathogenic fungi. *Arab Journal of Plant Protection*, 18: 133-138.
20. Peterson, M.A. and R.F. Denno. 1998. Life-history strategies and the genetic structure of phytophagous insect populations. Pages 263-322. In: *Genetic Structure and Local Adaptation in Natural Insect Populations*. S. Mopper and S.Y. Strauss (eds.). Chapman & Hall, New York.
21. Rafalski, J.A. and V.S. Tingey. 1993. Genetic diagnostic in plant breeding; RAPDs, microsatellite and machines. *Genetics*, 9: 275-280.
22. Roderick, G.K. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41: 325-352.
23. Roehrdanz, R.L., D.K. Reed and R.L. Burton. 1993. Use of polymerase chain reaction and arbitrary primers to distinguish laboratory-raised colonies of parasitic Hymenoptera. *Biological Control*, 3: 199-206.
24. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. maniatitis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 pp.

25. **Tragoonrung, S., V. Kanazin, P.M. Hayes and K.T. Blake.** 1992. Sequence tagged site facilitated PCR for barley genome mapping. *Theoretical and Applied Genetics*. 84: 1002-1008.
26. **Yang, S.L. and A.W. Meerow.** 1996. The *Cycaspectinata* (Cycadaceae) complex: genetic structure and gene flow. *International Journal Plant Science*, 157:468-483.
27. **Yeh, F.C. and T.J.B. Boyle.** 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal Botany*. 129: 157.
28. **Yeh, F.C. and T.J.B. Boyle.** 1999. Popgene version 1.31 Microsoft Window-based Freeware for population Genetic Analysis. Department of Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G2H1. 29 pp.

Received: November 3, 2015; Accepted: January 8, 2016

تاريخ الاستلام: 2015/11/3؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2016/1/8