

التنوع الوراثي لحشرة حافرة أوراق البندورة/الطماطم باستخدام تقنية التضخيم العشوائي المتعدد الأشكال للحمض النووي

فاتح خطيب¹، عبد الناصر تريسي¹، زياد العيسى² ومصطفى البوحسيني³

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سورية، البريد الإلكتروني: khatib_fateh@yahoo.com؛ n_trissi@yahoo.com

(2) مؤسسة إكثار البذار، مخبر زراعة الأنسجة، حلب، سورية؛

(3) المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، ص ب 6299، الرباط، المغرب

المخلص

خطيب، فاتح، عبد الناصر تريسي، زياد العيسى ومصطفى البوحسيني. 2017. التنوع الوراثي لحشرة حافرة أوراق البندورة باستخدام تقنية التضخيم العشوائي المتعدد الأشكال للحمض النووي. مجلة وقاية النبات العربية، 35(2): 49-57.

تعد حشرة حافرة أوراق البندورة/الطماطم (*Tuta absoluta* (Meyrick) من الآفات الحشرية الغازية التي دخلت سورية مؤخراً واستطاعت التكيف والاستيطان فيها. هدفت هذه الدراسة إلى التحقق من التنوع الوراثي لحشرة حافرة أوراق البندورة في منطقتين هما عفرين والسفيرة. تم استخلاص الحمض النووي الريبي المنزوع الأوكسيجين (DNA) بطريقة CTAB من يرقة واحدة من كل عينة ثم اختبرت نوعيته ونقاوته وتركيزه. استخدمت تقنية التضخيم العشوائي المتعدد الأشكال للحمض النووي الريبي المنزوع الأوكسيجين (RAPD) (DNA) التي تعتمد على التفاعل المتسلسل للبوليميراز Polymerase chain reaction (PCR) وذلك باستخدام 24 بادئة عشوائية. فصلت نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي على هلامه أغاروز تركيز 1.5% وحللت النتائج لحساب المؤشرات الخاصة بالمؤشر الجزيئي ومصنوفة التشابه ورسم شجرة القرابة. استطاعت 5 من البادئات المستخدمة الكشف عن التعدد الشكلي بين عينات حافرة أوراق البندورة، وقد كان أفضلها المؤشر الجزيئي OPS-11 حيث بلغت قوة تباين المؤشر $PIC = 0.44$. أظهرت نتائج اختبار PCR-RAPD وجود تباين وراثي كبير بين العينات المدروسة، حيث لم تتجاوز نسبة التشابه بين معظم الأفراد 0.40، في حين بلغ مجال التشابه بين العينات 0.10-0.91. استطاع المؤشر الوراثي OPP-16 الكشف عن وجود موقع وراثي وحيد بطول 300 زوج نيوكليوتيدي عند العينة التي جمعت من الدفيئة البلاستيكية. أخيراً توزعت العينات في شجرة القرابة dendogram ضمن أربعة عناقيد I، II، III و IV وذلك تبعاً لمنطقة أو موقع الجمع، بينما لم يكن هناك ارتباط مع الأجزاء النباتية التي جمعت منها الحشرة.

كلمات مفتاحية: حافرة أوراق البندورة، مؤشر جزيئي، طرز وراثية للحشرة، DNA.

المقدمة

في مختلف المناطق السورية، حيث تمتلك هذه الحشرة المقدرة على الطيران لعدة كيلومترات. تنتقل الحشرة محمولة بالرياح أو من خلال حركة الشحن بين المناطق المختلفة (17)، والتي باتت تشكل تهديداً لإنتاج البندورة في أماكن زراعتها لذا كان من الضروري معرفة التنوع الوراثي وتركيبية مجتمعات هذه الآفة للمساعدة في إيجاد استراتيجيات فعالة تدرج ضمن المكافحة المتكاملة. يعد مستوى التنوع الوراثي لمجتمعات الأنواع الغازية عاملاً محدداً لبقائها وتكيفها (11). يمكن تفسير وصول الحشرة وانتشارها في منطقة ما من خلال فرضيتين مع الأخذ بعين الاعتبار تأثيراتها المتوقعة في التنوع الوراثي:

- الفرضية الأولى: حدوث عملية انتقال للحشرة من مجتمعاتها الأصلية حيث تعزى العديد من عمليات دخول الآفات لهذه الطريقة (10)؛ وفي هذه الحالة تكون مجتمعات الحشرة قليلة

تصاب نباتات البندورة/الطماطم (*Lycopersicon esculentum* L.) بالعديد من الإجهادات الأحيائية واللاأحيائية التي تؤدي لتدني المحصول كماً ونوعاً. تنصدر حشرة حافرة أوراق البندورة/الطماطم (*Tuta absoluta* (Meyrick) قائمة الآفات الحشرية التي تصيب هذا المحصول في بلدان حوض البحر المتوسط محدثة خسائر اقتصادية تصل 100% في بعض الحالات (1، 7، 9، 13). منذ التسجيل الأول للحشرة في سورية في منطقة جوسية الخراب (محافظة حمص) لوحظ الانتشار السريع لهذه الآفة في أماكن زراعة البندورة

90%، وحفظت في الثلاجة لحين استخدامها في استخلاص المادة الوراثية.

استخلاص المادة الوراثية

تم استخلاص المادة الوراثية من العينات وفق الطريقة المقترحة سابقاً (5)، مع إجراء تعديل بطريقة طحن العينات؛ حيث سحقنا العينات في كمية صغيرة من الرمل النهري المعقم. أضيفت كمية 700 ميكروليتر من محلول الاستخلاص [2% CTAB، 20 mM EDTA، 0.1 M Trise-HCl، 1.4 M NaCl، pH 8.0] المسخن بشكل مسبق عند حرارة 65 °س. حضنت العينات في حمام مائي عند 65 °س لمدة 45 دقيقة مع التقليب كل 15 دقيقة، ثم أضيفت كمية 500 ميكروليتر من مزيج كلوروفورم: ايزوميل الكحول (1:24) إلى الأنابيب وخلطت المكونات برفق لمدة دقيقة واحدة. فصلت المكونات بالطرد المركزي عند سرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق. نقلت كمية 600 ميكروليتر من الرائق إلى أنابيب جديدة معقمة ثم أضيف إليها كمية 500 ميكروليتر من مزيج الكلوروفورم ويزوميل الكحول (1:24). كررت عملية إضافة مزيج الكلوروفورم والتقليب مرة ثانية. نقلت كمية 500 ميكروليتر من الرائق إلى أنابيب جديدة، ثم أضيف إليها 700 ميكروليتر من كحول الايزوبروبانول البارد (-20 °س)، ثم مزجت المكونات بالتقليب لمدة 10 دقائق.

وتفتقد إلى التنوع الوراثي وذلك بناءً على فترة ومدى عملية الدخول المحدودة (15).

- الفرضية الثانية: هي الدخول المتعدد من مجتمعات مختلفة وبالتالي إذا كانت كل عملية دخول تحتوي على جزء من تنوع وراثي يعود لمنطقة الانتشار الأصلية لمجتمع الآفة، فإن هذا الخليط من مجتمعات الآفة يمكن أن يحوي مستوى عال من التنوع الوراثي (8).

تم استخدام العديد من المؤشرات الجزيئية لدراسة التنوع الوراثي لهذه الآفة، حيث استخدم مؤشر AFLP لدراسة التنوع الوراثي لمجتمعات الحشرة في البرازيل وأمكن بنتيجة الدراسة تقسيم مجتمعات الحشرة إلى مجموعتين تبعاً لمقاومتها للمبيدات (14). كما استخدمت مؤشرات مجبن المصورات الحيوية/الميتوكوندريا والريبوزومات لدراسة التنوع الوراثي لمجتمعات الحشرة في إسبانيا، الموطن الأصلي لها وفي دول حوض المتوسط (4)، وكذلك في صربيا والهرسك (6). أما في تونس فقد استخدمت تقنية RAPD (2)، وتحليل المواقع الوراثية للتتابع الدقيقة microsatellite loci في دراسة التنوع الوراثي لهذه الحشرة (3).

مواد البحث وطرقه

جمع العينات

جمعت العينات من خلال الجولات الحقلية لعدة مواقع في منطقة عفرين والسفيرة (جدول 1). وضعت العينات في أنابيب تحوي كحول

Table 1. Collection sites of tomato leaf miner insects.

جدول 1. مواقع جمع عينات حشرة حافرة أوراق البندورة/الطمطم.

الجزء النباتي plant part	طور الحشرة Insect stage	Area	المنطقة	الموقع	رقم العينة Sample number
Fruits الثمار	Larva	Sfireh	السفيرة	أبو جرين	1
Leaves الأوراق	Larva	Efrine	عفرين	عين الحجر	2
Leaves الأوراق	Larva	Sfireh	السفيرة	السفيرة	3
fruits الثمار	Larva	Efrine	عفرين	المستورة	4
Leaves الأوراق	Larva	Efrine/Ginderis	عفرين/ جنديرس	المحمدية	5
Leaves الأوراق	Larva	Efrine (Plastic house)	عفرين (بيت بلاستيكي)	عفرين	6
Leaves الأوراق	Larva	Efrine/Rajo	عفرين/ راجو	سوركة	7
Trap مصيدة	Adult	Efrine	عفرين	عفرين	8
Trap مصيدة	Adult	Efrine	عفرين	عفرين	9
Trap مصيدة	Adult	Efrine	عفرين	تل الطويل	10
Trap مصيدة	Adult	Efrine	عفرين	عفرين	11
Trap مصيدة	Adult	Efrine	عفرين	عفرين	12

تحليل الحمض النووي (DNA) متعدد الأشكال والمضخم عشوائياً

البادئات

يعتمد هذا الاختبار على التفاعل المتسلسل للبوليميراز PCR وذلك باستخدام بادئات عشوائية قصيرة يتكون كل منها من 10 نكليوتيدات. استخدم في هذا الاختبار 24 بادئة عشوائية على عدد محدود من العينات (جدول 2)، ثم طبقت البادئات التي أعطت تعدداً شكلياً على جميع العينات.

جدول 2. تسلسل البادئات العشوائية المستخدمة في دراسة التنوع الوراثي لحافرة أوراق البندورة/الطماطم.

Table 2. Random primer sequences used for studying genetic diversity of tomato leaf miner

الرقم No.	رمز البادئة Primer code	التتابع النكليوتيدي للبادئة Primer sequence
1	OPA-03	5'- AGTCAGCCAC -3'
2	OPA-08	5'- GTGACGTAGG -3'
3	OPB-07	5'- GGTGACGCAG -3'
4	OPB-10	5'- CTGCTGGGAC -3'
5	OPE-01	5'- CCAAGGTCC -3'
6	OPE-04	5'- GTGACATGCC -3'
7	OPF-10	5'- GGAAGCTTGG-3'
8	OPH-20	5'- GGGAGACATC -3'
9	OPK-11	5'- AATGCCCCAG -3'
10	OPL-10	5'- TGGGAGATGG -3'
11	OPL-15	5'- AAGAGAGGGG -3'
12	AP4	5'- TCACGCTGCA -3'
13	OPP-16	5'- CCAAGCTGCC-3'
14	OPS-11	5'- AGTCGGGTGG-3'
15	P784	5'-GCGGAAATAG -3'
16	P785	5'-CCGCAGCCAA- 3'
17	P786	5'-GCGATCCCCA -3'
18	P787	5'-GCGATCCCCA -3'
19	P788	5'-AACGCGCAAC -3'
20	P789	5'-AGCCA8GTTTC -3'
21	P790	5'-GTCAACGAAG -3'
22	P791	5'-GAG ACTCCCC -3'
23	792	5'-GGTACTCCCC- 3'
24	793	5'-GACCGACCCA- 3'

تحضير مزيج التفاعل

حضر مزيج التفاعل في حجم نهائي 30 ميكروليتر، حيث احتوى المزيج لكل عينة على 3 ميكروليتر DNA (50 نانوغرام/ميكروليتر)، 3 ميكروليتر من المحلول المنظم للتفاعل (10x PCR buffer + 15 mM MgCl₂)، 3 ميكروليتر من النيوكليوتيدات الأربعة dNTP's (تركيز 2 ميلي مولر لكل منها)، 2 ميكروليتر من البادئة العشوائية (تركيز 10 ميكرومولر)، وحدة إنزيمية واحدة (0.2 ميكروليتر من أنزيم البلمرة DNA Taq polymerase 5U/μl)، 18.8 ميكروليتر ماء مقطر منزوع الشوارد لإكمال الحجم. تمت عملية التدوير

فصلت المكونات بالطرد المركزي عند سرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق. تم التخلص من الرائق وغُسل الراسب بكمية 700 ميكروليتر من الكحول الإيثيلي تركيز 70% للتخلص من بقايا الملح المرتبطة مع الـ DNA. ثم أهمل الكحول وجفف الراسب عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة أو ضمن مفرغة لمدة 10 دقائق. أذيب الراسب في كمية 100 ميكروليتر من المحلول المنظم 1xTE (10 mM Trise-HCl، 1 mM EDTA، 8.0 pH) يحوي 100 ميكروغرام/مل إنزيم RNase. حضنت العينات عند 37 °س لمدة 30 دقيقة ثم حفظت في التلاجة عند -20 °س.

قياس تركيز الـ DNA

تم قياس تركيز الـ DNA باستخدام المطياف الضوئي عند طول موجة 260 نانومتر، وتركيز البروتين عند طول موجة 280 نانومتر، ثم حسبت نقاوة الـ DNA المستخلص من خلال نسبة القراءتين 280/260، حيث تتراوح في العينات النقية بين 1.8-2.0 (12).

أجريت عملية القياس بإضافة كمية 5 ميكروليتر من الـ DNA المستخلص إلى 95 ميكروليتر من المحلول المنظم 1xTE (عامل التخفيف 20)، خلطت بشكل جيد على الرجاج ثم نقلت إلى خلية القياس cuvette ومن ثم أخذت قراءات التركيز (نانوغرام/ميكروليتر) والنسبة 280/260 التي تشير إلى النقاوة.

اختبار نوعية الـ DNA بالرحلان الكهربائي

اختبرت نوعية الـ DNA والتأكد من سلامته من حيث حجم القطع الناتجة وذلك بوساطة الرحلان الكهربائي في هلامه أغاروز (agarose gel) تركيز 1%؛ حيث تظهر جزيئات الحمض النووي ذات الوزن الجزيئي الكبير على هلامه الأغاروز كعصابات/حزم (Bands) واضحة أعلى الهلامه.

حملت كمية 12 ميكروليتر مزيج مكون من 5 ميكروليتر DNA + 5 ميكروليتر ماء معقم منزوع الشوارد + 2 ميكروليتر محلول تحميل منظم 6x loading dye buffer. تمت عملية الرحلان في المحلول المنظم 1xTBE لمدة ساعة واحدة عند فرق كمون 50 فولت. وضعت الهلامه بمحلول بروميد الأيثيديوم تركيز 0.5 ميكروغرام/مل، ثم ظهرت الهلامه تحت الأشعة فوق البنفسجية في جهاز توثيق الهلام، والنقطت صورة رقمية للهلامه لتحليلها.

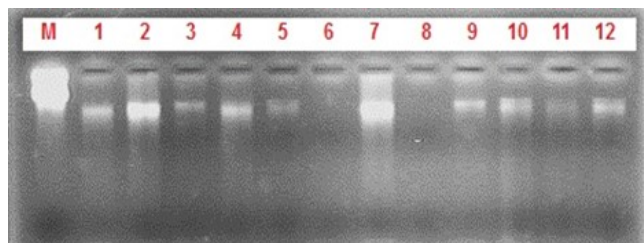
كما بينت نتائج حساب النسبة 280/260 أن النقاوة كانت مقبولة نسبياً في معظم العينات حيث تراوحت بين 1.5-1.7، في حين كانت النسبة 1.2 و 1.4 في العينات 9، 11 و 12 مما قد يؤثر في كفاءة التفاعل المتسلسل للبوليميراز لذلك استخدمت هذه العينات الأخيرة في الاختبار الأولي لمعرفة كفاءة البادئات في إظهار التعدد الشكلي عند الحشرة (جدول 3).

جدول 3. تركيز الـ DNA المستخلص من يرقات حافرة أوراق البندورة/الطماطم ونقاوته حسب قراءة المطياف الضوئي.

Table 3. DNA concentrations and purity in tomato leaf miner extracts.

النسبة 280/260 260/280 ratio	التركيز نانوغرام/ميكرو لتر Concentration (ng/μl)	العينة Sample
1.6	96.4	1
1.7	205.8	2
1.4	63.5	3
1.7	151.4	4
1.5	63.8	5
1.7	68.5	6
1.6	116.7	7
1.7	10.3	8
1.2	38.2	9
1.5	45.1	10
1.4	39.2	11
1.4	31.7	12

عند اختبار نوعية الـ DNA على هلام أغاروز تركيز 1%، أظهرت النتائج الحصول على نوعية DNA سليمة ذات وزن جزيئي عالي وخالية من التقطيع، حيث ظهر الـ DNA على شكل حزمة واحدة أعلى المسارات في الهلامة. كما كانت العينات خالية من الحمض النووي الريبي RNA نتيجة استخدام الأنزيم RNase أثناء عملية الاستخلاص.



شكل 1. اختبار نوعية الـ DNA بالرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز تركيز 1%. M: سلم المؤشر القياسي لأمدا (100 نانوغرام)، المسارات 1-12: عينات حشرة حافرة أوراق البندورة/الطماطم.

Figure 1. Test of DNA quality by electrophoresis on 1% agarose gel. M: Lambda molecular marker ladder (100 ng), Lanes 1-12= samples of tomato leaf miner.

الحراري في جهاز من نوع أبندورف (Eppendorf Mastercycler, Germany) وذلك بعملية فصل أولي عند حرارة 94 °س لمدة 5 دقائق ولدورة واحدة، ثم فصل ثانوي عند حرارة 94 °س لمدة دقيقة واحدة، التحام البادئات عند 35 °س لمدة دقيقة واحدة، والامتداد عند 72 °س لمدة دقيقتين. كررت المراحل الثلاث السابقة 40 دورة. وأخيراً مرحلة الامتداد النهائي عند 72 °س لمدة 10 دقائق لدورة واحدة، والتخزين عند 4 °س.

فصل نواتج التفاعل المتسلسل للبوليميراز وتحليل النتائج

بعد انتهاء التفاعل، أضيفت كمية 6 ميكرو لتر من محلول التحميل (6x loading dye buffer) إلى ناتج المكثرة، ثم حُمِلت كمية 10 ميكرو لتر منه على هلامة أغاروز 1.5% ومن ثم تلوين الـ DNA ببروميد الإثيديوم وتظهيره تحت الأشعة فوق البنفسجية في جهاز توثيق الهلام. تمت مقارنة حجوم القطع الناتجة عند أي عملية رحلان كهربائي مع سلم قياس للوزن الجزيئي 100 زوج نكليوتيدي.

أخذت صورة رقمية للهلامة، وتمت قراءة النتائج وفق النظام الثنائي، حيث أُعطي الرقم 1 في حال وجود الموقع الوراثي 0 في حال غيابه. حللت النتائج باستخدام برنامج التحليل Palaeontological Statistics (PAST), ver. 1.90 ورسمت شجرة القرابة وحسبت نسب التشابه بين العينات باستخدام معامل جاكارد Jaccard coefficient.

تم حساب قوة المؤشر الجزيئي Polymorphic information content (PIC) من العلاقة:

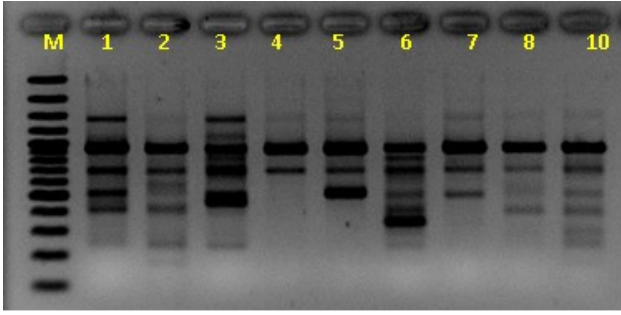
$$PIC = 1 - \sum nP^2/n-1$$

حيث أن: n: عدد الأفراد؛ P²: مربع تردد الحزم الموجودة والغائبة؛ كما تم حساب قيمة مؤشر البادئة RAPD primer index (RPI) بإضافة قيم الـ PIC لكل المؤشرات التي تمت مكائرتها بواسطة نفس البادئة.

النتائج

تركيز ونوعية الـ DNA

مكنت نتائج استخلاص الـ DNA من الحصول على تراكيز كافية من الـ DNA من اليرقات المدروسة، حيث تراوح تركيز الـ DNA بين 39-256 نانوغرام/ميكرو لتر، وذلك وفق قراءة جهاز المطياف الضوئي.



شكل 2. مكثرة الـ DNA الجينومي عند طرز وراثية مختلفة من حافرة أوراق البندورة/الطماطم باستخدام المؤشر الجزيئي OPP-16. M: مؤشر قياسي للوزن الجزيئي 100 زوج نيوكليوتيدي. المسارات 1-10: الطرز الوراثية المدروسة من حافرة أوراق البندورة/الطماطم.

Figure 2. Amplification of Genomic DNA for different genotypes of tomato leaf miner using OPP-16 RAPD marker.

مصفوفة التشابه

استخدمت مصفوفة التشابه لتحديد مستوى القرابة بين العينات المدروسة. تراوح التقويم الزوجي pairwise للتشابه بين 0.10 و 0.91. أظهرت العينات تبايناً وراثياً كبيراً فيما بينها حيث كانت نسبة التشابه أقل من 0.40 عند 80% من العينات المدروسة، ووصلت في أدنى حد لها 0.10 بين العينتين Tut4 و Tut6 في حين بلغت نسبة التشابه أعلى قيمها (0.91) بين العينتين Tut4 و Tut5 (جدول 5).

تحليل العقدة

تم إنشاء شجرة القرابة بواسطة تحليل UPGMA باستخدام قيم التشابه الوراثية بين العينات المدروسة وذلك لإظهار العلاقة الوراثية فيما بينها.

أظهر التحليل العنقودي وجود اختلافات وراثية معنوية بين الطرز التسعة من حافرة أوراق البندورة التي تمت دراستها حيث تراوح معامل التشابه similarity coefficient وفق معامل جاكارد Jaccard ما بين 0.10 و 0.91.

توزعت الطرز عند معامل تشابه similarity coefficient 0.42 ضمن أربعة عناقيد رئيسية: I، II، III و IV. ضم العنقود I ثلاثة طرز هي Tut7، Tut8 و Tut10 وقد تم جمعها من منطقة عفرين. بينما ضم العنقود II ثلاث عينات هي Tut1، Tut2 و Tut3 وقد تم جمعها من منطقة السفيرة ماعدا الطراز Tut2 الذي جمع من عين الحجر في عفرين. أما العنقود III فقد ضم طرازين فقط هما Tut4 و Tut5 وكلاهما جمع من عفرين. أخيراً احتوى العنقود IV على طراز واحد هو Tut6 وقد تم جمعه من دفيئة بلاستيكية في منطقة عفرين (شكل 3).

انتخاب البادئات

تم في هذه الدراسة اختبار 24 بادئة عشوائية باستخدام تقنية RAPD التي تعتمد على التفاعل المتسلسل للبوليميراز، وذلك للكشف عن التعدد الشكلي لحشرة حافرة أوراق البندورة. وأظهرت نتائج المكثرة قدرة 11 بادئة على إظهار التعدد الشكلي بين العينات المدروسة. أعطت ستة بادئات (P-293، A-03، A-08، B-10، E-04، OPF-07) نتائج على بعض العينات في حين لم تكن مقروءة على عينات أخرى، بينما أعطت خمس بادئات أخرى (OPF-10، P-292، OPP-16، AP4، OPS-11) تعدداً شكلياً واضحاً بين اليرقات المجموعة من 9 مواقع.

تحليل التعدد الشكلي للـ DNA عند حافرة أوراق البندورة/الطماطم

عدد الأليلات وحجمها

تم الحصول على 45 حزمة/عصابة باستخدام 5 بادئات عشوائية، وذلك بمعدل تردد 9 حزم/عصابة لكل بادئة. تراوح حجم القطع الناتجة ما بين 200–1700 زوج نيوكليوتيدي. كانت هناك 34 حزمة مشتركة بين فردين على الأقل، بينما كانت هناك 10 حزم ذات تعدد شكلي لكنها وحيدة التردد، وحزمة واحدة أحادية الشكل بطول 300 زوج نيوكليوتيدي تم الحصول عليها عند استخدام البادئة OPP-16 (شكل 2).

كانت البادئات متقاربة من حيث عدد الحزم التي أنتجتها، وكانت أفضلها البادئة AP4 التي أعطت 11 حزمة، في حين أعطت البادئة P-292 أقل عدد وهو 7 حزم.

قوة تباين المؤشر الجزيئي

تعكس قيمة قوة تباين المؤشر الجزيئي (PIC) تنوع الأليل وتردده بين الطرز المدروسة. يمكن تقويم قيمة PIC على أساس أليلاتها وتباين بشكل كبير لكل مواقع RAPD الوراثية المختبرة.

تم تقويم مستوى التعدد الشكلي بين 9 طرز وراثية لحافرة أوراق البندورة من خلال حساب قيمة PIC لكل مواقع RAPD الوراثية.

تراوحت النسبة المئوية للتعدد الشكلي في حدود 87.5–100%، أما قيمة قوة المؤشر الجزيئي PIC فكانت في حدود 0.26–0.44 مع العلم أن القيمة العظمى لهذا المؤشر هي 0.5 عند مؤشرات RAPD و ISSR و AFLP. بلغت قيمة مؤشر البادئات RPI 2.8 للبادئة OPP-16 و 4.62 للبادئة AP4 مما يدل أن البادئة AP4 قد أعطت أفضل النتائج بين البادئات المستخدمة (جدول 4).

جدول 4. التعدد الشكلي الناتج عن استخدام البادئات العشوائية RAPD على عينات من حافرة أوراق البندورة/الطماطم.

Table 4. Results of polymorphic DNA using RAPD markers on tomato leaf miner samples.

مؤشر البادئات RPI	قوة المؤشر PIC	التعدد الشكلي % Polymorphic %	العدد الكلي للحزم Total bands	حزم أحادية الشكل Monomorphic bands	التعدد الشكلي للحزم Polymorphic bands			المؤشر Marker
					الكلي Total	الوحيدة Unique	مشتركة Shared	
2.08	0.26	87.5	8	1	7	3	4	OPP-16
3.96	0.44	100	9	0	9	1	8	OPS-11
3.01	0.43	100	7	0	7	1	6	P-292
4.62	0.42	100	11	0	11	3	8	AP4
4.3	0.43	100	10	0	10	2	8	OPF-10
		97.8	45	1	44	10	34	Total المجموع

PIC= Polymorphic information content, RPI= RAPD primer index

جدول 5. مؤشر التشابه والمسافات الوراثية للأنماط الوراثية لحافرة أوراق البندورة/الطماطم.

Table 5. Similarity and distance indices for tomato leaf miner genotypes.

Tut1	Tut2	Tut3	Tut4	Tut5	Tut6	Tut7	Tut8	Tut10	النمط الوراثي Genotype
								****	Tut10
							****	0.59	Tut8
						****	0.50	0.43	Tut7
					****	0.27	0.25	0.27	Tut6
				****	0.14	0.18	0.15	0.37	Tut5
			****	0.91	0.10	0.14	0.16	0.32	Tut4
		****	0.23	0.27	0.36	0.39	0.32	0.33	Tut3
	****	0.41	0.26	0.32	0.35	0.26	0.24	0.38	Tut2
****	0.53	0.52	0.25	0.30	0.27	0.36	0.29	0.30	Tut1

إن وجود تنوع وراثي كبير عند الحشرة قد ينعكس سلباً على المحصول من خلال قدرتها على التزاوج ونقل الصفات الوراثية فيما بينها، أو قد يقلل من كفاءة طرق المكافحة المتبعة مع هذه الآفة بينما يمكن أن تكون هذه الطرائق أكثر فاعلية عندما تسود طرز وراثية متشابهة.

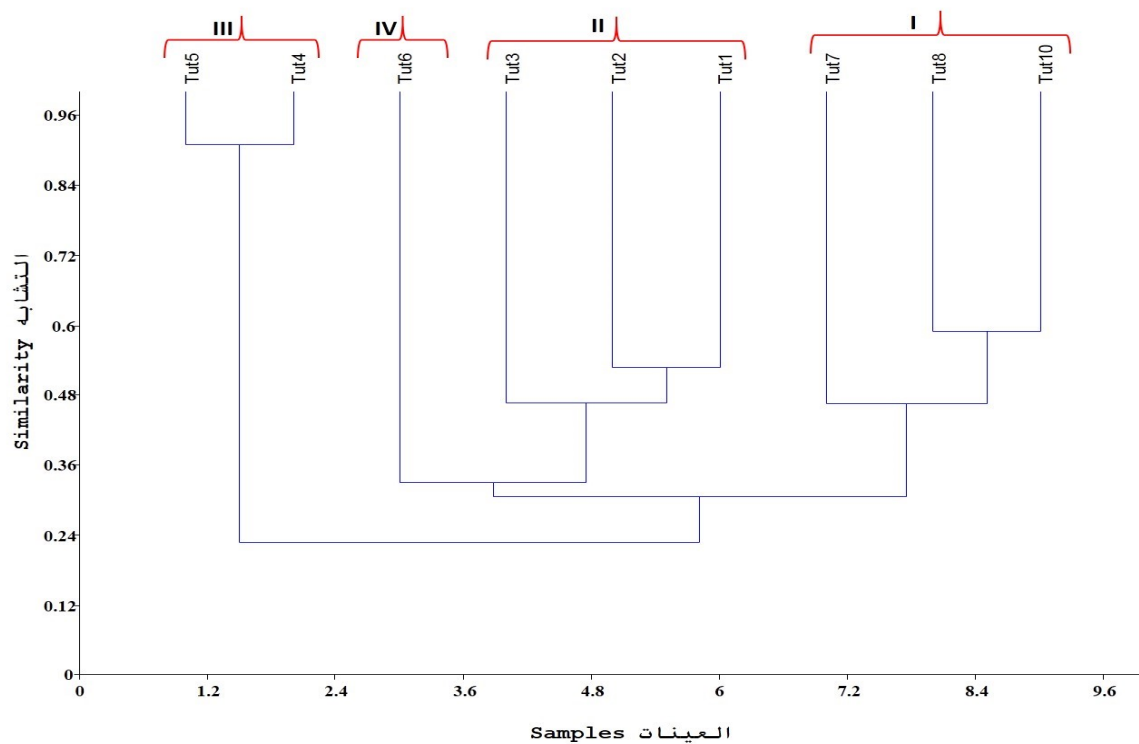
أظهر المؤشر الجزيئي OPP-16 وجود موقع وراثي وحيد unique بطول 300 زوج نكليوتيدي عند الطراز Tut6، وهي عينة جمعت من بيت زجاجي بالمقارنة مع باقي العينات الأمر الذي أظهر تبايناً وراثياً كبيراً بينها وبين باقي العينات حيث بلغت نسبة التشابه في حدها الأدنى 0.10 بينها وبين العينة Tut4 الأمر الذي يستدعي دراسة لمجتمع الآفة بين الزراعة في الأرض المفتوحة والزراعة المحمية وظروف كل منهما وبخاصة فيما يتعلق بالمكافحة أو غيرها من الممارسات الزراعية أو الطرز المظهرية السائدة سواء للحشرة أو النبات للكشف عن منشأ هذه التباينات على عدد أكبر من العينات.

تم تأكيد نتائج شجرة القرابة بواسطة تحليل المكونات الأساسية PCA، وقد استطاعت المؤشرات الجزيئية تفسير 41.6% من الاختلافات بين العينات المدروسة، كما توزعت العينات ضمن أربع مجموعات (شكل 4).

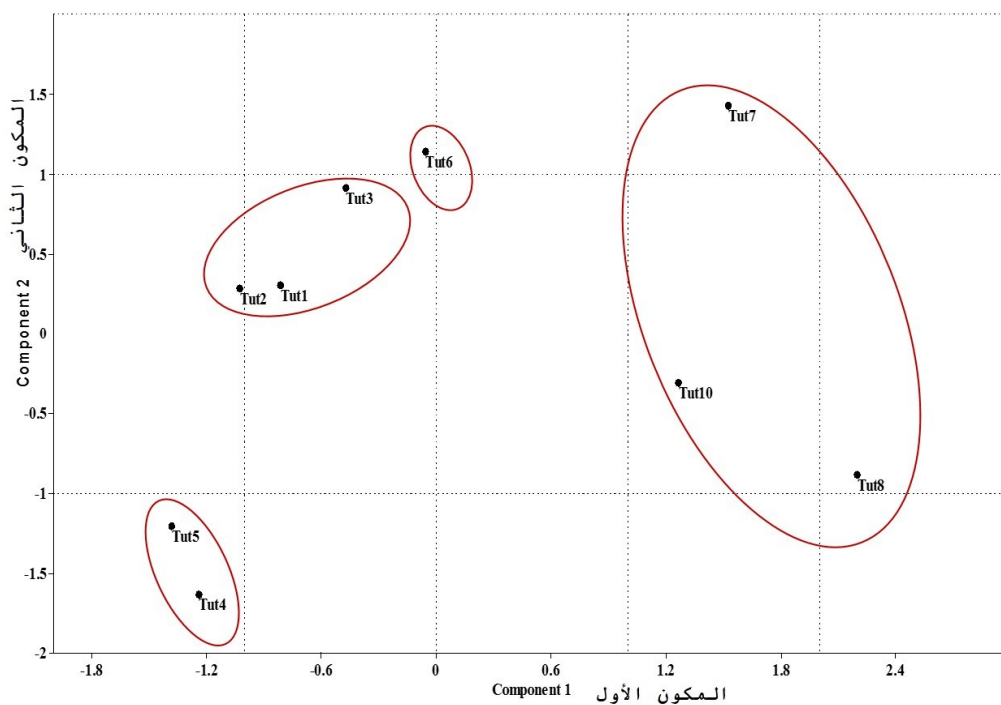
المناقشة

أظهر مؤشر الـ RAPD وجود تباين وراثي كبير بين العينات المدروسة من حافرة أوراق البندورة التي جمعت من منطقتي السفيرة وعفرين شمال حلب حيث لم تتجاوز نسبة التشابه عند معظم العينات 0.40، وقد كان المؤشر AP4 هو الأفضل في الكشف عن الاختلافات.

توزعت العينات عند مستوى تشابه 0.42 ضمن أربعة عناقيد I، II، III و IV؛ وذلك تبعاً لمنطقة الجمع. تم أيضاً الكشف عن وجود اختلافات وراثية بين الطرز المدروسة. قد تعزى هذه التباينات إلى دخول الحشرة من مصادر مختلفة ووجود خلط وراثي فيما بينها الأمر الذي يستدعي مقارنتها مع الطرز السائدة في البلدان المختلفة.



شكل 3. شجرة القرابة بين الأنماط الوراثية لحافرة أوراق البندورة/الطماطم حسب معامل جاكارد.
Figure 3. Dendrogram for tomato leaf miner genotypes according to Jaccard coefficient.



شكل 4. تحليل المكونات الأساسي PCA للأنماط الوراثية لحافرة أوراق البندورة/الطماطم.
Figure 4. Principal Component Analysis (PCA) for tomato leaf miner genotypes.

كما استخدمت المؤشرات الجزيئية في تعريف الحشرة وذلك من خلال مكائفة وتسلسل النكليوتيدات في المورثة COI ثم مطابقتها مع قاعدة البيانات في البنك الوراثي GenBank تحت رقمي الإدخال JN417242 و JN417243 حيث أظهرت النتائج تطابقاً بنسبة 100% بين العينات التي جمعت من صربيا (16) وتلك التي جمعت من بلدان أخرى وحفظت تحت أرقام إدخال أخرى مثل اسبانيا (GenBank Acc. No. HQ873072-HQ873078)، وتشيلي (HQ87306)، والأرجنتين (HQ873059)، وتركيا (HQ873051)، وإيطاليا (HQ873048, HQ873050) (11).

أخيراً أظهر المؤشر الجزيئي RAPD وجود تباينات وراثية كبيرة بين طرز الحشرة المدروسة، وقد يعود ذلك لدخولها من مناطق مختلفة أو أنها اكتسبت صفات وراثية جديدة، الأمر الذي يستدعي دراستها بشكل أوسع في كل مناطق زراعة البندورة في سورية ضمن الأرض المفتوحة وفي الزراعة المحمية، ومقارنتها مع الطرز السائدة في الدول المجاورة أو المصادر المحتملة للنقل إضافة إلى دراسة تحملها لمبيدات الحشرات المستخدمة في مكافحتها.

استخدم العديد من المؤشرات الجزيئية في دراسة حافرة أوراق البندورة كغيرها من الحشرات الأخرى؛ حيث استخدم مؤشر AFLP لدراسة التنوع الوراثي لمجموعات الحشرة في البرازيل وقد توصلت هذه الدراسة إلى تقسيم مجتمعات الحشرة إلى مجموعتين تبعاً لمقاومتها للمبيدات (14).

استخدم المؤشر الجزيئي RAPD في دراسة التباين الوراثي عند حافرة أوراق البندورة بين ثلاثة مجتمعات من شمال ووسط وجنوب تونس، وقد تبين وجود تباين وراثي كبير ضمن المجتمع الواحد، وعزي ذلك للتكاثر الجنسي وعملية التأسيس/إعادة التآلف recombination التي تنشأ عنه إضافة إلى قصر دورة الحياة وارتفاع الخصوبة. كما لم يسجل الباحث توزعاً للعينات تبعاً لمنطقة الانتشار الجغرافي مما يتوافق مع نتائج دراستنا، وعزي ذلك لوجود عملية انسياب للمورثات gene flow مستمرة بين هذه المجتمعات وهذه تنتج عادة عن قدرة الحشرة على الطيران من منطقة لأخرى أو انتقالها مع المادة النباتية المصابة بواسطة البشر (2).

Abstract

Khatib, F, A.N. Trissi, Z. Aleisa and M. El-Bouhssini. 2017. Genetic diversity of tomato leaf miner using RAPD molecular markers. Arab Journal of Plant Protection, 35(2): 49-57.

Tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) is an important invasive insect, which entered Syria lately and became established. The aim of the present study is to investigate the genetic diversity of tomato leaf miner in two regions; Efrine and Al-Sfireh. Genomic DNA was extracted from one larva per sample using CTAB method with minor modifications. Extracted DNA concentration, purity and integrity was measured. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to study the genetic diversity of tomato leaf miner using 24 random primers in polymerase chain reaction (PCR). PCR products were separated in 1.5% agarose gel to assess the similarity between the samples. Polymorphic DNA fragments were detected by 5 RAPD primers out of 24 tested. Based on the polymorphic information content (PIC), the best results were obtained from the marker OPS-11 with 0.44 calculated value. PCR-RAPD analysis showed high genetic diversity; the similarity ranged between 0.10 and 0.91, but it was less than 0.40 for the majority of samples. Unique locus with 300 bp size was detected using OPP-16 marker in the insect samples collected from the green house. Based on regions or locations from where the leaf miners were collected, insect genotypes were distributed in four clusters: I, II, III and IV with similarity coefficient of 0.42. Clusters obtained were not related to the plant part from which the insects were collected from.

Keywords: Tomato leaf miner, molecular marker, insect genotypes, DNA.

Corresponding author: Fateh Khatib, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Aleppo, Syria, Email: khatib_fateh@yahoo.com

References

1. Alzaidi, S.H. and M.N. Hassan. 2009. *Tuta absoluta* – a serious pest advancing in the Mediterranean region. Role of pheromones in management strategies. International Pest Control, 51: 85-87.
2. Bettaibi, A., M. Mezghani-Khemakhem, D. Bouktila, H. Makni and M. Makni. 2012. Genetic variability of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae), in Tunisia, inferred from RAPD-PCR. Chilean Journal of Agricultural Research, 2: 212-216.
3. Bettaibi, A., M. Mezghani-Khemakhem, Z. Soltani, H. Makni and M. Makni. 2013. Development of

- polymorphic microsatellite loci for the tomato leaf miner, *Tuta Absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal of Genetics, 92: 110-112.
4. Cifuentes, D., R. Chynoweth and P. Bielza. 2011. Genetic study of Mediterranean and South American populations of tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers. Pest Management Science, 67: 1155-1162.
5. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaves tissue. Phytochemical Bulletin, 19:11-15.

6. **Durić, Z., D. Delić, S. Hrnčić and S. Radonjić.** 2014. Distribution and molecular identification of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera, Gelechiidae) populations in Bosnia and Herzegovina and Montenegro. *Polish Journal of Entomology*, 83: 121-129.
7. **EPPO.** 2005. EPPO datasheets on quarantine pests: *Tuta absoluta*. *EPPO Bulletin*, 35: 434-435.
8. **Genton, B.J., J.A. Shykoff and T. Giraud.** 2005. High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology*, 14: 4275-4285.
9. **Germain, J.F., A.I. Lacordaire, C. Cocquempot, J.M. Ramel and E. Oudard.** 2009. Un nouveau ravageur de la tomate en France: *Tuta absoluta*. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 512: 37-41.
10. **Lee, C.E.** 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution*, 17: 386-391.
11. **Sakai, A.K., F.W. Allendorf and J.S. Holt.** 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32: 305-332.
12. **Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
13. **Silva, G.A., M.C. Picanco, L. Bacci, A.L.B. Crespo, J.F. Rosado and R.N.C. Guedes.** 2011. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Management Science*, 67: 913-920.
14. **Suinaga, F.A., V.W.D. Casali, M. Picanco and J. Foster.** 2004. Genetic divergence among tomato leafminer populations based on AFLP analysis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 7: 645-651.
15. **Taylor, A.C., P.E. Cowan, B.L. Fricke, S. Geddes, B.D. Hansen and M. Lam.** 2004. High microsatellite diversity and differential structuring among populations of the introduced common brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*, in New Zealand. *Genetics Research*, 83: 101-111.
16. **Toševski, I., J. Jović, M. Mitrović, T. Cvrković, O. Krstić and S. Krnjajić.** 2011. *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera, Gelechiidae): A New Pest of Tomato in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine*, 26: 197-204.
17. **Van Deventer, P.** 2009. Leaf miner threatens tomato growing in Europe. *Fruit and Vegetal Technology*, 9:10-12.

Received: May 25, 2017; Accepted: July 13, 2017

تاريخ الاستلام: 2017/5/25؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2017/7/13