

دراسة التنوع الشكلي والوراثي لمفترس حشرات المَنّ *Hippodamia variegata* (Goeze)

في مناطق مختلفة من سورية باستخدام تقنية SRAP

علاء محمد¹، عبد النبي بشير² وسلام لاوند³

(1) مركز بحوث ودراسات مكافحة الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية؛ (2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية،

سورية، البريد الإلكتروني: Basherofeckey11@gmail.com؛ (3) قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية،

الملخص

محمد، علاء، عبد النبي بشير وسلام لاوند. 2021. دراسة التنوع الشكلي والوراثي لمفترس حشرات المَنّ *Hippodamia variegata* (Goeze) في مناطق مختلفة من سورية باستخدام تقنية SRAP. مجلة وقاية النبات العربية، 39(3): 189-196. <https://doi.org/10.22268/AJPP-39.3.189196>

نُفذت هذه الدراسة بهدف دراسة التنوع الوراثي لأفراد مفترس حشرات المَنّ *Hippodamia variegata* (Goeze) (Coleoptera: Coccinellidae) المتباينة شكلياً في مناطق مختلفة من سورية باستخدام تقنية SRAP (Sequence-related amplified polymorphism). بلغ عدد الحزم المضخمة 101 حزمة؛ منها 99 حزمة متعددة شكلياً بنسبة تعددية شكلية 97.77%، وتراوح عدد الحزم المتعددة شكلياً بين حزمتين عند استخدام زوج البادئات SRAP-12 و 13 حزمة عند استخدام زوج البادئات SRAP-1 بمتوسط 6.6 حزمة لكل زوج من البادئات. أعطى زوجا البادئات SRAP-4 و SRAP-9 أقل نسبة للتعددية الشكلية (83.33%)، بينما أعطت بقية أزواج البادئات أعلى نسبة للتعددية الشكلية بلغت 100%. أظهرت نتائج دراسة درجة القرابة الوراثية لأفراد المفترس *H. variegata* أن أعلى قيمة لمصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق كانت بين عينات دمشق واللاذقية (فيديو)؛ وبين عينات حمص واللاذقية (فيديو) 0.904، بينما كانت أقل قيمة لها بين عينات دمشق والسويداء حيث بلغت 0.271. كما أظهرت شجرة القرابة الوراثية انقسام المجتمعات المدروسة إلى مجموعتين رئيسيتين تبعاً لتوزيعها الجغرافي؛ ضمت المجموعة الأولى العينات المجموعة من دمشق والسويداء وحمص وبمسافة وراثية قدرها 15.51، أما المجموعة الثانية فقد ضمت العينات المجموعة من طرطوس وجبلة (بيت باشوط) واللاذقية (فيديو) وبمسافة وراثية قدرها 11.08. تعد هذه الدراسة الأولى من نوعها في تحديد التنوع الوراثي للمفترس *H. variegata* في سورية.

كلمات مفتاحية: التنوع الشكلي والوراثي، مفترس، *Hippodamia variegata*، SRAP، سورية.

المقدمة

(Rohacek & Barber, 2005؛ Rohacek, 2012؛ Matena, 1995)؛ (Schoenrogge et al., 2006)، حرشغيات الأجنحة (Ji et al., 2005)؛ (Zhang, 2004)، النمل (Higashi & Peeters, 1990)، النحل (Ercan et al., 2012)، ولدى الدعسوقيات (Blehman, 2007)؛ (Zare et al., 2010؛ Michie et al., 2010؛ Jiggins & Tinsley, 2005)؛ (2012).

تعد دراسات التباينات الشكلية من الدراسات المهمة لأنها تبين العلاقة بين العوامل البيئية وتعدد الأشكال للنوع الواحد. ولدراسة التباينات الشكلية لدى الدعسوقيات أهمية كبيرة، وبخاصة في حال الدراسات على تعدد أشكال وألوان الرأس والدرع والأغمد (Blehman, 2007؛ Rogers et al., 1971). إن أفراد الدعسوقيات التي تتميز باللون الداكن (وفرة في الميلانين في الجلد) تكون أكثر مقاومة للظروف البيئية من الأفراد ذات اللون الواضح وبدون لون غامق (قلة في الميلانين) في المناطق الباردة والرطبة. يخترق ضوء الشمس في حال السماء الملبدة بالغيوم أجسام الحشرات وتزيد درجة حرارة جسمها بشكل أسرع، ما يؤدي إلى زيادة نشاط

التباينات الشكلية (Polymorphism) هي من السمات الرئيسية التي تميز الكائنات الحية عن غيرها. إن ظاهرة تعدد الأشكال لدى الحيوانات أدت إلى وجود سمات خاصة بين أفراد النوع الواحد (Caillaud & Losey, 2010)، حيث تساعد ظاهرة تعدد الأشكال لدى أفراد النوع إلى الاختباء من الحيوانات المفترسة والتي تعد صفة محددة للنوع (Petranka et al., 1998؛ Hoekstra & Nachman, 2003)، ويمكن أن تؤدي ظاهرة تعدد الأشكال إلى تنشيط فرصة زيادة أعداد الحيوان عن طريق ضبط حرارة الجسم في الوسط الذي يعيش فيه (Forsman et al., 1999؛ de Jong & Brakefield, 1998). توجد التباينات الشكلية لدى مجموعة كبيرة من الحشرات، منها الرعاشات (Cordero, 1990؛ Andres & Cordero, 1999)، المَنّ (Weber, 1985؛ Tomiuk et al., 1990)، الذباب

تقنية SRAP حيث استخدم 72 زوجاً من البادئات، نجح منها عشرة أزواج، أعطت 175 حزمة مضخمة منها 133 حزمة كانت متعددة شكلياً وبلغت نسبة التعددية الشكلية 76.04%. وأظهرت شجرة القرابة الوراثية ارتباطاً وثيقاً بين التوزع الجغرافي ولون وشكل البقع لبعض أنماط المفترس *H. axyridis* والتي تتوافق مع التصنيف المورفولوجي. ونظراً لقلّة الدراسات على التباينات الشكلية للدعسوقة *H. variegata*، فقد هدف هذا البحث إلى دراسة التنوع الوراثي لأفراد الدعسوقة *H. variegata* المختلفة شكلياً في مناطق مختلفة من سورية باستخدام تقنية SRAP.

مواد البحث وطرائقه

نُفذ البحث في مختبر التقانات الحيوية، قسم المحاصيل الحقلية ومختبر بحوث المفترسات في مركز بحوث ودراسات مكافحة الحيوية (BCRSC) Biological Control Research and Study Center، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

جمع العينات الحشرية

جُمعت الحشرات الكاملة للمفترس *H. variegata* خلال الفترة ما بين أواخر نيسان/أبريل ومنتصف أيار/مايو عام 2015 من خمس محافظات ضمت ستة مواقع هي دمشق (كلية الزراعة، مزرعة أبي جرش)، اللاذقية (مركز فيديو لتربية الأعداء الحيوية)، جبلة (بيت ياشوط)، طرطوس (أرزونة)، حمص (الدرارية) والسويداء (ضهر الجبل) (جدول 1). حُفظت العينات الحشرية التي جمعت بالكحول الإيثيلي 80% ضمن أنابيب سعة 1.5 مل ووضعت في المجمدة عند حرارة -30°س لحين الاستخدام. ويبين شكل 1 التعددية الشكلية لأفراد المفترس *H. variegata* في مناطق الدراسة.

الحشرة وارتفاع كفاءتها التناسلية (Brakefield & Willmer, 1985)؛ (de Jong & Brakefield, 1998). يفسر هذا اختلاف اللون لدى أفراد حشرة أبو العيد *Hippodamia variegata* (Goeze)، حيث يظهر لهذا النوع أفراد تختلف فيما بينها شكلياً، هذا الاختلاف يكون من حيث عدد النقاط، شكل وتصميم النهاية الخلفية للأغمداد. بينت الدراسات التي أُجريت على التعددية الشكلية للدعسوقة *H. variegata* وجود مجموعة متنوعة من الأشكال تختلف عن بعضها البعض، ففي الدراسة التي أُجريت خلال الفترة 1937-2011 بين Honek et al. (2012) وجود 22 شكلاً للدعسوقة في الجزء الأوسط من أوروبا وسلوفاكيا (Honek et al., 2012)، كما سُجلت ظاهرة التباينات الشكلية للدعسوقة *H. variegata* في أوروبا الوسطى، وأمريكا الشمالية، والجزء الأوسط من أفريقيا والهند (Honek, 1985؛ Nedved, 1999). أشار Khormizi et al. (2013) إلى وجود أربعة أشكال للمفترس في مدينة يزد محرز في إيران.

في ظل التطور المتسارع في علم التقانات الحيوية، اكتشفت معايير ومؤشرات أكثر دقة في عملية التوصيف والتصنيف ودراسة التباينات بين وضمن النوع الواحد من جهة وبين الأنواع المختلفة من جهة أخرى، أهمها دراسة التنوع الوراثي باستخدام المعلمات الجزيئية (Molecular Markers). ومن هذه المعلمات تقنية Sequence-related amplified polymorphism (SRAP)، والتي تتميز بقدرتها على مضاعفة المناطق الفاصلة بين مورثات الكائن المستهدف والمناطق المحيطة بها غير المشفرة؛ بالإضافة إلى قدرتها على مضاعفة مورثات محددة تعطي معلومات وراثية أوسع عن الكائن المستهدف عند إجراء التسلسل النيكلوتيدي لها (Yu et al., 2008)، وبعدم الحاجة لتوافر معلومات واسعة عن تسلسل جينوم الكائن الحي (Li et al., 2014). ما زال استخدام تقنية SRAP في مجال دراسة التنوع الوراثي للحشرات في بدايته، وقد قام Li et al. (2009) بدراسة التنوع الوراثي لعشرة أنماط للمفترس *Harmonia axyridis* باستخدام

جدول 1. البيانات الجغرافية لمواقع جمع العينات.

Table 1. Geographical information of the samples collection sites.

رمز العينة Sample code	الارتفاع عن سطح البحر (م) Altitude (m)	خط العرض Latitude	خط الطول Longitude	المحافظة (الموقع) Governorate (Location)
H.v1	726	33°32'28"N	36°19'03"E	دمشق (كلية الزراعة)
H.v2	44	34°41'01"N	36°06'36"E	طرطوس (أرزونة)
H.v3	485	34°41'04"N	36°24'47"E	حمص (الدرارية)
H.v4	113	35°31'20"N	35°53'53"E	اللاذقية (فيديو)
H.v5	556	35°18'59"N	36°07'59"E	جبلة (بيت ياشوط)
H.v6	1558	32°41'54"N	36°40'19"E	السويداء (ضهر الجبل)

تتراوح هذه النسبة في حدود 1.8-2.0. ومن ثم ضُبط تركيز الحمض النووي لكل العينات ليصل لـ 40 نانوغرام/ميكروليتر. وحفظت العينات عند 20°س لحين الاستخدام.

اختُبرت نوعية الحمض النووي DNA بالاعتماد على طريقة الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة أغاروز تركيز 0.8% مضافاً لها مادة Ethidium bromide، التي ترتبط مع الحمض النووي DNA مشكلة معقداً يتوهج إثر تعرضه للأشعة فوق البنفسجية، حيث أن جزيئات الحمض النووي DNA تهجر على هلامة الأغاروز كحزم أو بقع، وتكون عينات الحمض النووي DNA ذات جودة جيدة عند عدم وجود تقطعات فيها.

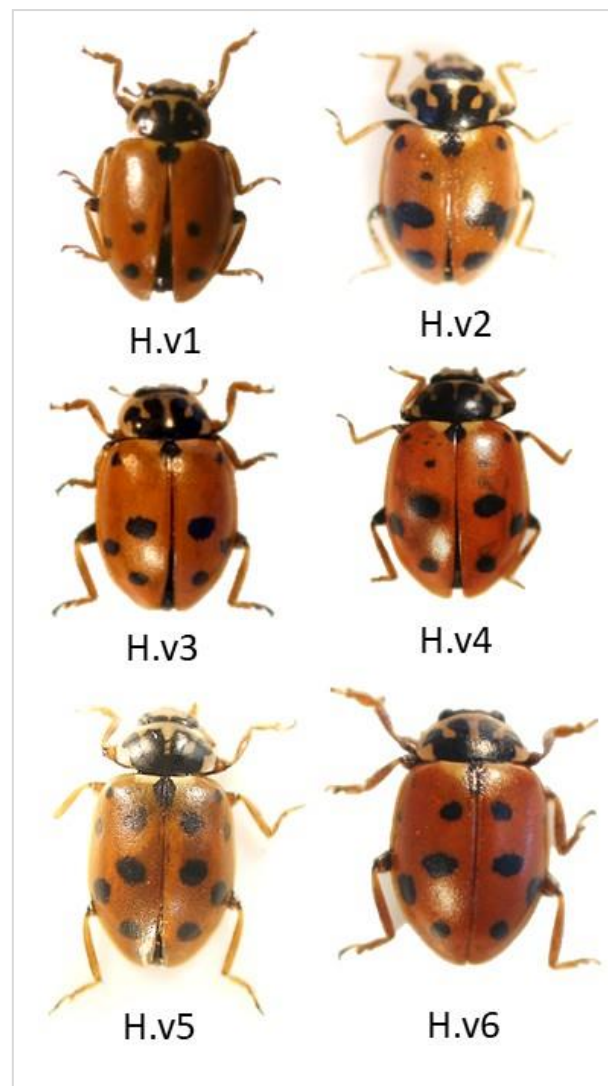
تضخيم الحمض النووي الريبسي منقوص الأكسجين DNA

أجري تضخيم DNA الناتج عن عمليات الاستخلاص للعينات الحشرية المدروسة باستخدام تقنية SRAP باستخدام 19 زوجاً من البادئات (Budak et al., 2004). صممت هذه البادئات من أجل الكشف بدقة عن التباينات الوراثية للمفترس، فكلما زاد طول البادئة كلما كانت أكثر دقة في كشف التباينات الوراثية، والاختلاف بين طول البادئ الأمامي والعكسي يؤدي الى ارتباطه في مناطق محددة على المجين وبالتالي تخصصية أعلى. ويبين جدول 2 التسلسل النيوكليوتيدي للبادئات المستخدمة في الدراسة الجزيئية، كما يبين جدول 3 أزواج البادئات المستخدمة في الدراسة الجزيئية.

جدول 2. التسلسل النيوكليوتيدي للبادئات المستخدمة في الدراسة الجزيئية.

Table 2. Nucleotide sequence of primers used in the molecular study.

البادئات Primers	التسلسل النيوكليوتيدي للبادئ Nucleotide sequence of primer
البادئ الأمامي Forward primer	
Me1	TGA GTC CAA ACC GGAAT
Me2	TGA GTC CAA ACC GGAGC
Me3	TGA GTC CAA ACC GGAAT
Me4	TGA GTC CAA ACC GGACC
Me5	TGA GTC CAA ACC GGAAG
Me6	TGA GTC CAA ACC GGACA
Me7	TGA GTC CAA ACC GGACG
Me8	TGA GTC CAA ACC GGACT
البادئ العكسي Reverse primer	
Me6	GAC TGC GTA CGA ATT GCA
Me7	GAC TGC GTA CGA ATT CAA
Me8	GAC TGC GTA CGA ATT CAC



شكل 1. التعددية الشكلية لأفراد المفترس *H. variegata* في المناطق المختلفة التي نفذت فيها الدراسة في سورية. H.v1= دمشق، H.v2= طرطوس، H.v3= حمص، H.v4= اللاذقية، H.v5= جبلة، H.v6= السويداء.

Figure 2. The polymorphism of *H. variegata* in the different regions investigated in Syria. H.v1= Damascus, H.v2= Tartous, H.v3= Homs, H.v4= Lattakia, H.v5= Jabla, H.v6= Sweida.

استخلاص وتقدير كمية ونوعية الحمض النووي الريبسي منقوص الأكسجين DNA

استُخلص الحمض النووي DNA من 5 حشرات من كل عينة وفق الخطوات الموصى بها سابقاً (Cenis et al., 1993) مع إجراء بعض التعديلات عليها. تم تقدير كمية الحمض النووي DNA في العينات باستخدام جهاز المطياف الضوئي (UV spectrophotometer) حيث تسمح قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانومتراً بحساب تركيز الحمض النووي في العينة، أما النسبة بين قراءة طول الموجتين 280:260 نانومتراً فتساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي، حيث

جدول 3. رموز ودرجة حرارة الالتحام لأزواج البادئات المستخدمة في الدراسة الجزيئية.

Table 3. Codes and annealing temperature of the primer pairs used in the molecular study.

رموز أزواج البادئات Primer pairs codes	أزواج البادئات Primer pairs	درجة حرارة الالتحام (°س) Annealing temperature (°C)
SRAP-1	Em6+Me1	47
SRAP-2	Em6+Me2	50
SRAP-3	Em6+Me3	47
SRAP-4	Em6+Me4	50
SRAP-5	Em6+Me5	49
SRAP-6	Em6+Me6	50
SRAP-7	Em7+Me1	47
SRAP-8	Em7+Me2	47
SRAP-9	Em7+Me3	47
SRAP-10	Em7+Me4	47
SRAP-11	Em7+Me5	47
SRAP-12	Em8+Me1	47
SRAP-13	Em8+Me2	48
SRAP-14	Em8+Me3	47
SRAP-15	Em8+Me4	48
SRAP-16	Em8+Me5	48
SRAP-17	Em8+Me6	48
SRAP-18	Em8+Me7	48
SRAP-19	Em8+Me8	48

فصل نواتج تضخيم DNA

فُصلت نواتج التضخيم على هلامة الآغاروز 2%، والمضاف إليها 5 ميكروليترات من صبغة Ethidium bromide بتركيز 50 مغ/مل باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي، ضمن محلول الرحلان الكهربائي TBE 1X (Tris-base, Boric acid, EDTA, H2O)، مع إضافة سلم معلم متدرج 1KB ليشير لأطوال حزم الـ DNA باستخدام جهاز التصوير بالأشعة فوق البنفسجية.

التحليل الإحصائي

حُللت النتائج باستخدام برنامج POPGEN (1.32) حيث أُشير لوجود حزمة الحمض النووي الواضحة فقط بالرقم 1 وغيابها بالرقم 0 وفق Nei (1978) وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين العينات المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent disagreement values (PDV) وفقاً لـ Nei (1973) وأجري التحليل العنقودي اعتماداً على نتائج المسافة الوراثية بين العينات المدروسة وفقاً لمعادلة Nei (1978)، ورسمت شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير الموزنة Unweighted pair group method with arithmetic averaging (UPGMA) حسب Sneath & Sokal (1973)، كما تم حساب معامل التعددية الشكلية (PIC) والذي يعبر عن مقدرة البادئ على إظهار التباينات بين الصفات المدروسة وفق Mohammadi & Prasanna (2003).

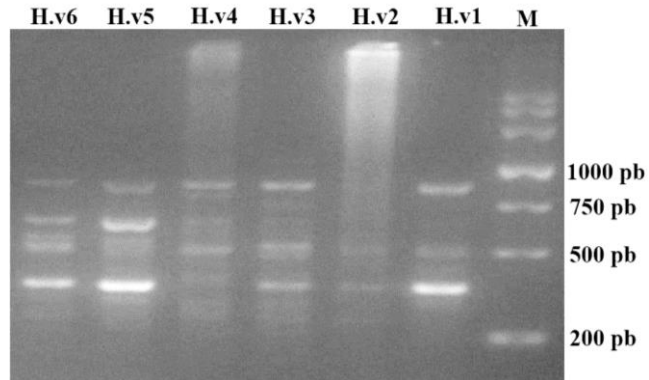
النتائج والمناقشة

التعددية الشكلية Polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية SRAP
أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج الـ PCR للحمض النووي DNA للعينات الحشرية المدروسة أن 15 من أصل 19 زوجاً من البادئات المدروسة أعطت نتائج تضخيم بتطبيق تقنية SRAP، في حين أن أزواج البادئات ذات الرموز SRAP-7، SRAP-8، SRAP-15، SRAP-17 لم تعط أي نتائج تضخيم، حيث أبدت أزواج البادئات الـ 15 فعالية كبيرة في الكشف عن التعددية الشكلية بين العينات الحشرية المدروسة. بلغ العدد الكلي للحزم المتشكلة 101 حزمة منها 99 حزمة متعددة شكلياً Polymorphic وحزمتان وحيدتا التكرارية Monomorphpic، وبنسبة تعددية شكلية بلغت 97.77%. تراوح عدد الحزم ذات التعددية الشكلية بين 2 حزمة مع زوج البادئات SRAP-12 و 13 حزمة كأعلى عدد مع زوج البادئات SRAP-1 بمتوسط بلغ 6.6 حزمة لكل زوج من البادئات. أعطت أزواج البادئات SRAP-4 و SRAP-9 أقل نسبة للتعددية الشكلية 83.33%، بينما أعطت بقية أزواج البادئات أعلى نسبة للتعددية الشكلية بلغت 100% (جدول 4).

أجري تفاعل البلمرة التسلسلي وفق طريقة Li et al. (2014) في حجم نهائي قدره 25 ميكروليتر مكون من 4 ميكروليترات من الـ DNA كقالب (40 نانوغرام/ميكروليتر)، 2 ميكروليتر من البادئ الأمامي (0.5 ميلي مول)، 2 ميكروليتر من البادئ العكسي (0.5 ميلي مول)، 4.5 ميكروليتر من الماء الخالي من أنزيمات Nuclease، 12.5 ميكروليتر من Master Mix (Promega) الذي يضم باقي مكونات تفاعل الـ PCR (MgCl2، dNTPs، Taq-Polymerase).

أجريت عملية التضخيم (Amplification) في جهاز التدوير الحراري (Techne TC - 512, UK)، بإتباع البرنامج الحراري التالي (Budak et al., 2004) وفق الخطوات التالية: دورة واحدة بدرجة حرارة 94°س ولمدة خمس دقائق ليتم انفصال سلسلتي الحمض النووي DNA، ثم يليها 40 دورة كل دورة تتضمن ما يلي: (1) فصل سلسلة DNA المزدوجة (Denaturation) عند حرارة 94°س ولمدة دقيقة واحدة؛ (2) الالتحام (Annealing) عند حرارة 47°س ولمدة دقيقة واحدة؛ (3) الاستطالة (Extension) عند حرارة 72°س ولمدة دقيقة واحدة. يليها استطالة نهائية ودورة واحدة عند حرارة 72°س ولمدة 5 دقائق لإنهاء التفاعل.

حمص واللاذقية (فيديو)، مما يدل على وجود تباين وراثي بينهما. وهذا يعود إلى أن العينات الحشرية قد جمعت من مناطق جغرافية مختلفة. وكان المتوسط العام لقيم عدم التوافق $PVD=0.5$ (جدول 5).



شكل 2. نواتج التضخيم باستخدام زوج البادئات SRAP-6 لعينات المفترس *H. variegata*. M= سلم جزئي، H.v1= دمشق، H.v2= طرطوس، H.v3= حمص، H.v4= اللاذقية، H.v5= جبلة، H.v6= السويداء.

Figure 2. Amplification products using the primers pair SRAP-6 on the predator *H. variegata* samples. M= Markers ladder, H.v1= Damascus, H.v2= Tartous, H.v3= Homs, H.v4= Lattakia, H.v5= Jabla, H.v6= Sweida.

إن ارتفاع النسبة المئوية للتعددية الشكلية (97.77%) يدل على فعالية تقنية SRAP في كشف التباينات الوراثية بين العينات الحشرية المدروسة، كما يُظهر جدول 4 أن قيمة معامل التنوع الوراثي PIC تراوح ما بين 0.296 مع زوج البادئات SRAP-13 و 0.375 مع زوج البادئات SRAP-2 بمتوسط قدره 0.352. حيث يعكس ارتفاع قيمة PIC لدى هذه البادئات، التعددية الشكلية المرتفعة فيها.

ويُظهر شكل 2 صورة هلامية الآغاروز 2% التي توضح التعددية الشكلية باستخدام زوج البادئات SRAP-6 على العينات الحشرية المدروسة.

تحديد درجة القرابة الوراثية بين العينات الحشرية المدروسة

درست درجة القرابة الوراثية لعينات المفترس *H. variegata* المجموعة من مناطق مختلفة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) Percent disagreement values، حيث يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي وازديادها يزيد التباين الوراثي بين العينات المدروسة.

تراوحت قيم النسب المئوية لعدم التوافق PDV بالنسبة لتقنية SRAP بين 0.2719 للعينات المجموعة من منطقتي دمشق والسويداء وهذا يدل على وجود درجة قرابة وراثية عالية بينهما، و 0.9045 للعينات المجموعة من منطقتي دمشق واللاذقية (فيديو)، ومنطقتي

جدول 4. رموز أزواج البادئات المستخدمة، عدد الحزم المضخمة، عدد الحزم المتعددة شكلياً، النسبة المئوية للتعددية الشكلية %، قيمة معامل التعددية الشكلية.

Table 4. The codes of primers used, the number of amplified fragments, the number of polymorphic fragments, polymorphism rate (%), and the value of polymorphism information content (PIC).

معامل التعددية الشكلية Polymorphism Information Content (PIC)	النسبة المئوية للتعددية الشكلية % Polymorphism %	عدد الحزم المتعددة شكلياً Polymorphic fragments	عدد الحزم المضخمة Amplified fragments	رموز أزواج البادئات Primers pairs codes
0.353	100.00	13	13	SRAP-1
0.375	100.00	10	10	SRAP-2
0.353	100.00	8	8	SRAP-3
0.365	83.33	5	6	SRAP-4
0.355	100.00	6	6	SRAP-5
0.370	100.00	5	5	SRAP-6
0.368	83.33	5	6	SRAP-9
0.374	100.00	3	3	SRAP-10
0.365	100.00	6	6	SRAP-11
0.328	100.00	2	2	SRAP-12
0.296	100.00	5	5	SRAP-13
0.370	100.00	5	5	SRAP-14
0.305	100.00	11	11	SRAP-16
0.360	100.00	7	7	SRAP-18
0.341	100.00	8	8	SRAP-19
0.352	97.77	99	101	Total المجموع
		6.6	6.73	Average المتوسط

(Sub-cluster)؛ ضمت تحت المجموعة الأولى العينات المجموعة من منطقتي دمشق والسويداء بمسافة وراثية قدرها 13.59 وكانت الأقرب لبعضها البعض وراثياً، أما تحت المجموعة الثانية فقد ضمت العينات المجموعة من منطقة حمص في مجموعة منفصلة وبمسافة وراثية قدرها 16.82 وكانت الأبعد وراثياً.

أما المجموعة الثانية (Cluster 2) فقد ضمت العينات المجموعة من مناطق طرطوس وجبلة (بيت ياشوط) واللاذقية (فيديو) بمسافة وراثية قدرها 11.08، وانقسمت أيضاً إلى تحت مجموعتين، ضمت تحت المجموعة الأولى العينات المجموعة من منطقتي طرطوس وجبلة في مجموعة منفصلة بمسافة وراثية قدرها 15.18 وكانت الأقرب وراثياً، أما تحت المجموعة الثانية فقد ضمت العينات المجموعة من منطقة اللاذقية (فيديو) في مجموعة منفصلة وبمسافة وراثية قدرها 21.24 وكانت الأبعد وراثياً. وبذلك استطاعت تقنية SRAP تحديد درجة القرابة الوراثية بين العينات المدروسة حسب توزيعها الجغرافي.

سُجلت أعلى درجة قرابة وراثية بين العينات المجموعة من منطقتي دمشق والسويداء (PVD=0.2719)، وتلتها درجة القرابة بين العينات المجموعة من منطقتي طرطوس وجبلة (بيت ياشوط) (PVD=0.3037)، ثم العينات المجموعة من منطقتي دمشق وحمص (جدول 5) (PVD=0.3365).

التحليل العنقودي

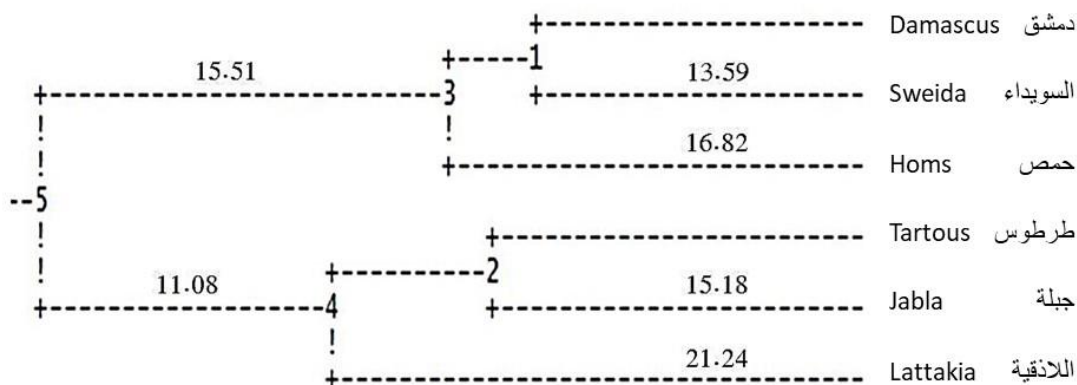
يسمح التحليل العنقودي بتقسيم العينات المدروسة إلى مجموعات تعكس درجة القرابة الوراثية فيما بينها. أُجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها ورسمت شجرة القرابة الوراثية بين العينات المدروسة للمفترس *H. variegata*.

يشير شكل 3 أن شجرة القرابة الوراثية سمحت للعينات المدروسة التوزع في مجموعتين رئيسيتين (Clusters)، ضمت المجموعة الأولى (Cluster 1) العينات المجموعة من مناطق دمشق والسويداء وحمص بمسافة وراثية قدرها 15.51، وانقسمت بدورها إلى تحت مجموعتين

جدول 5. مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PVD) لعينات المفترس الحشرية التي جمعت من مناطق مختلفة في سورية.

Table 5. Matrix of percent disagreement values (PVD) of insect predator samples collected from different regions in Syria.

	دمشق Damascus	السويداء Sweida	حمص Homs	طرطوس Tartous	جبلة Jabla	اللاذقية Lattakia
دمشق Damascus	0					
السويداء Sweida	0.2719	0				
حمص Homs	0.3365	0.3365	0			
طرطوس Tartous	0.5188	0.5188	0.6931	0		
جبلة Jabla	0.5596	0.5596	0.5596	0.3037	0	
اللاذقية Lattakia	0.9045	0.6022	0.9045	0.4796	0.3704	0



شكل 3. شجرة القرابة الوراثية للعينات المدروسة باستخدام تقنية SRAP وفق برنامج (1.32) POPGEN وبطريقة UPGAMA.

Figure 3. Phylogenetic tree for the studied samples using SRAP technique according to UPGMA method by using POPGEN v1.32.

Abstract

Mohamed, A., A.N. Basher and W. Lawand. 2021. Study of Genetic Diversity of the Aphid Predator *Hippodamia variegata* (Goeze) in Different Areas of Syria Using SRAP markers. Arab Journal of Plant Protection, 39(3): 189-196. <https://doi.org/10.22268/AJPP-39.3.189196>

This study was conducted in 2020 at the Laboratory of Biotechnology, Agronomy Department and Research Center for Biological Control Studies, Faculty of Agriculture, Damascus University. This study aimed to determine the genetic diversity of the variegated ladybug aphid predator *Hippodamia variegata* (Goeze) (Coleoptera: Coccinellidae) collected from different regions in Syria using the SRAP technique (Sequence-related Amplified polymorphism). The number of amplified fragments was 101 bands, 99 of which were polymorphic with a polymorphism rate of 97.99%. The number of polymorphic fragments ranged between two bands by using the primers pair SRAP-12 and 13 bands by using the primers pair SRAP-1, with an average of 6.6 bands for each primers pair. The lowest polymorphism rate was 83.33% for primers pairs SRAP-4 and SRAP-9, whereas the highest polymorphism rate was 100% for the rest of the primers pairs. The results obtained on the degree of genetic diversity of the predator's individuals *H. variegata* showed that the highest value for percent disagreement values was 0.904 between samples from Damascus and Latakia (Fedio) and Homs and Latakia (Fedio), whereas the lowest value for percent disagreement values was 0.271 between samples from Damascus and Sweida. The phylogenetic tree showed that the studied populations were divided according to their geographical distribution into two main groups; the first group included samples collected from the regions of Damascus, Sweida, and Homs with a genetic distance of 15.51, whereas the second group included samples collected from the regions of Tartous, Jabla (Beit Yashout), and Lattakia (Fedio) with a genetic distance of 11.08. This is the first study to determine genetic diversity of *H. variegata* in Syria.

Keywords: Genetic diversity, predator, *Hippodamia variegata*, SRAP, Syria.

Affiliation of authors: A. Mohamed¹, A.N. Basher² and W. Lawand³. (1) Research Center for Biological Control Studies, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria; (2) Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria; (3) Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria, Email: Basherofeckey11@gmail.com

References

المراجع

- Andres, J.A. and A. Cordero. 1999. The inheritance of female color morphs in the damselfly *Ceriatagrion tenellum* (Odonata, Coenagrionidae). Heredity, 82: 328-335. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6884930>
- Blehman, A.V. 2007. Variability of pronotum patterns in ladybird beetle *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera, Coccinellidae). Ekological Genetics, 5(2): 25-36. <https://doi.org/10.17816/ecogen5225-36>
- Brakefield, P.M. and P.G. Willmer. 1985. The basis of thermal melanism in the ladybird *Adalia bipunctata*: Differences in reflectance and thermal properties between the morphs. Heredity, 54: 9-14. <https://doi.org/10.1038/hdy.1985.3>
- Budak, H., R.C. Shearman, R.E. Gaussoin and I. Dweikat. 2004. Application of sequence-related amplified polymorphism markers for characterization of turfgrass species. HortScience, 39(5): 955-958. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.5.955>
- Caillaud, M.C. and J.E. Losey. 2010. Genetics of color polymorphism in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Journal of Insect Science, 10(95): 1-13. <https://doi.org/10.1673/031.010.9501>
- Cenis, J.L., P. Perez and A. Fereres. 1993. Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. Annals of the Entomological Society of America, 86(5): 545-550. <https://doi.org/10.1093/aesa/86.5.545>
- Cordero, A. 1990. The inheritance of female polymorphism in the damselfly *Ischnura elegans* (Rambur) (Odonata: Coenagrionidae). Heredity, 64: 341-346. <https://doi.org/10.1038/hdy.1990.42>
- de Jong, P.W. and P.M. Brakefield. 1998. Climate and change in clines for melanism in the two spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Proceedings of the Royal Society of London B. Biological Science, 265(1390): 39-43. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0261>
- Ercan, F.S., S. Oztemiz, S. Ozcan and A. S. Tuncbilek. 2012. Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in two *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species in Turkey. Turkish Journal of Entomology, 36(2): 177-182.
- Forsman, A. 1999. Reproductive life history variation among color morphs of the pygmy grasshopper *Tetrix subulata*. Biological Journal of the Linnean Society, 67(2): 47-261. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01863.x>
- Forsman, A., K. Ringblom, E. Civantos and J. Ahnesjo. 2002. Coevolution of color pattern and thermoregulatory behavior in polymorphic pygmy grasshoppers *Tetrix undulate*. Evolution, 56(2): 349-360. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01345.x>
- Higashi, S. and C.P. Peeters. 1990. Worker polymorphism and nest structure in *Myrmecia brevinoda* Forel (Hymenoptera: Formicidae). Australian Journal of Entomology, 29(4): 327-331. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.1990.tb00371.x>
- Hoekstra, H.E. and M.W. Nachman. 2003. Different genes underlie adaptive melanism in different populations of rock pocket mice. Molecular Ecology, 12(5): 1185-1194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01788.x>
- Honek, A. 1985. Habitat preference of aphidophagous coccinellids (Coleoptera). Entomophaga, 30(3): 253-264. <https://doi.org/10.1007/BF02372226>
- Honek, A., Z. Martinkova, P. Saska and A.F. G. Dixon. 2012. Temporal variation in elytral colour polymorphism in *Hippodamia variegata* (Coleoptera:

- Coccinellidae). *European Journal of Entomology*, 109(3): 389–394.
<https://doi.org/10.14411/eje.2012.050>
- Ji, Y.J., W.U. YC and D.X. Zhang.** 2005. Novel polymorphic microsatellite markers developed in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Science*, 12(5): 331-334.
<https://doi.org/10.1111/j.1005-295X.2005.00040.x>
- Jiggins, F.M. and M.C. Tinsley.** 2005. An ancient mitochondrial polymorphism in *Adalia bipunctata* linked to a sex-ratio-distorting bacterium. *Genetics Society of America*, 171(3): 1115–1124.
<https://doi.org/10.1534/genetics.105.046342>
- Khormizi, A., A.A. pour, A. Beiranvand and H. Pourbehi.** 2013. Polymorphism of *Hippodamia variegata* Goeze (Col.: Coccinellidae) in central region of Iran. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 4(12): 4102-4105.
- Li, Q.Y., S.J. Dong, W.Y. Zhang, R.Q. Lin, C.R. Wang, D.X. Qian, Z.R. Lun, H.Q. Song and X.Q. Zhu.** 2009. Sequence-related amplified polymorphism, an effective molecular approach for studying genetic variation in *Fasciola* spp. of human and animal health significance. *Electrophoresis*, 30(2): 403-409.
<https://doi.org/10.1002/elps.200800411>
- Li, X.Y., J. Li, Z. J. Zhao, F. Yang, Q.W. Fu, H.S. Liu, D.D. Wang, Y.C. Yang and R.Y. Wang.** 2014. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) for studying genetic diversity and population structure of plants and other living organisms: a protocol. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24(5): 1478-1486.
- Matena, J.** 1995. Polymorphism of *Chironomus plumosus* (Diptera: Chironomidae) males from a temperature fish-pond population. *European Journal of Entomology*, 92: 699-703.
- Michie, L.J., F. Mallard, M.E.N. Majerus and F.M. Jiggins.** 2010. Melanic through nature or nurture: genetic polymorphism and phenotypic plasticity in *Harmonia axyridis*. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(8): 1699–1707.
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02043.x>
- Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna.** 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop science*, 43(4): 1235-1248.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1235>
- Nedved, O.** 1999. Host complexes of predaceous ladybeetles (Col., Coccinellidae). *Journal of Applied Entomology*, 123: 73-76.
- Nei, M.** 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12): 3321-3323.
<https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
- Nei, M.** 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3): 583-590.
- Petranka, J.W., A.W. Rushlow and M.E. Hohey.** 1998. Predation by Tadpoles of *Rana sylvatica* on Embryos of *Ambystoma maculatum*: Implications of Ecological Role Reversals by *Rana* (Predator) and *Ambystoma* (Prey). *Herpetologica*, 54(1): 1-13.
<http://www.jstor.org/stable/3893392>
- Rogers, C.E., H.B. Jackson, R.D. Eikenbary and K.J. Starks.** 1971: Sex determination in *Propylea 14-punctata* (Coleoptera: Coccinellidae), an important predator of aphids. *Annals of the Entomological Society of America*, 64(4): 957–959.
<https://doi.org/10.1093/aesa/64.4.957>
- Rohacek, J.** 2012. Wing polymorphism in European species of Sphaeroceridae (Diptera). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 52(2): 535-558.
- Rohacek, J. and K.N. Barber.** 2005. Revision of the new world species of *Stiphrosoma* Czerny (Diptera: Anthomyzidae). *Beiträge zur Entomologie*, 55(1): 1–107.
<https://doi.org/10.21248/contrib.entomol.55.1.1-107>
- Schonrogge, K., M.G. Gardner, G.W. Elmes, E.K.V. Napper, D.J. Simcox, J.C. Wardlaw, J. Breen, B. Barr, J.J. Knapp, J.A. Pickett and J.A. Thomas.** 2006. Host propagation permits extreme local adaptation in a social parasite of ants. *Ecology Letters*, 9(9): 1032–1040.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00957.x>
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal.** 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman. *Systematic Zoology*, 24(2): 263-268. <https://doi.org/10.2307/2412767>
- Tomiuk, J., K. Wohrmann, I. Bohm and J. Stamp.** 1990. Variability of quantitative characters and enzyme loci in rose aphid populations. *Entomologist*, 109(2): 84-92.
- Weber, G.** 1985. On the ecological genetics of *Sitobion avenae* (F.) (Hemiptera, Aphididae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 100(1-5): 100-110.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1985.tb02764.x>
- Yu, M., B. Ma, X. Luo, L. Zheng, X. Xu and Z. Yang.** 2008. Molecular diversity of *Auricularia polytricha* revealed by inter-simple sequence repeat and sequence-related amplified polymorphism markers. *Current Microbiology*, 56(3): 240-245.
<https://doi.org/10.1007/s00284-007-9067-7>
- Zare, M., R. Jafari, L. Dehghan Dehnavi and S. Javan.** 2012. Polymorphism of *Adalia bipunctata* Mulsant (Col.: Coccinellidae) in center of Iran. *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, 1(2): 27-32.
- Zhang, D.X.** 2004. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(10): 507-509.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.020>

Received: April 29, 2021; Accepted: July 28, 2021

تاريخ الاستلام: 2020/4/29؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2021/7/28