مجلة اتحاد الجامعات العربية
للعلـــوم الزراعيـــة
جامعة عين شمس ، القاهرة
مجلد(19)، عدد (2)، 311-319، 2011

تحديد درجة القرابة الوراثية لحشرة دبور ثمار اللوز *Eurytoma amygdali* End في المنطقة الوسطى والجنوبية من سورية

[22]

روضة سكر غالي[1] - وجيه قسيس[1] - سلام لاوند[2]
1- قسم وقاية النبات - كلية الزراعة - جامعة دمشق – دمشق - سورية
2- قسم المحاصيل - كلية الزراعة - جامعة دمشق – دمشق - سورية

الكلمـــات الدالـــة: اللـــوز، دبـــور ثمـــار اللـــوز، شجرة القرابة الوراثية، ISSR

الموجـز

تعد حشرة دبور ثمار اللوز *Eurytoma amygdali* End من أهم الحشرات التي تصيب شجرة اللوز *Amygdalus sp* في جميع مناطق زراعتها مسببة خسائر كبيرة للمزارعين. تمت دراسة درجة القرابة الوراثية بين حشرات الدبور في خمس مناطق من سورية تنتشر فيها الإصابة بدبور ثمار اللوز وهي المنطقة الوسطى (حمص) والمنطقة الجنوبية (السويداء – القنيطرة) ومنطقة ريف دمشق (بيتيما – دير عطية) باستخدام تقنية ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). لوحظ انفصال إناث الدبور في منطقة حمص عن الإناث في باقي المناطق، كما ولوحظ وجود أعلى درجة قرابة وراثية بين إناث الدبور في منطقتي بيتيما ودير عطية، وإناث منطقتي القنيطرة والسويداء ، بينما توزعت الذكور في مجموعتين المجموعة الأولى ضمت ذكور الدبور في منطقتي حمص والسويداء، والثانية ذكور مناطق بيتيما والقنيطرة ودير عطية.

المقدمة

تعد شجرة اللوز من أهم الأشجار المثمرة محلياً وعالمياً وتنتشر زراعتها في عدد من الدول العربية وتعد سورية وايران وأفغانستان وجنوب ايطاليا وكاليفورنيا من أهم مناطق زراعة اللوز في العالم وبحسب احصائيات **(F.A.O) لعام 2010** فإن سورية تحتل المرتبة الثالثة عالمياً من حيث المساحة المزروعة باللوز ومن حيث الإنتاجية، وحسب إحصائيات وزارة **الزراعة والإصلاح الزراعي (2008)** فقد بلغت المساحة المزروعة باللوز في سورية**(60088)**هكتار، والإنتاج **(82616)** طن وعدد الأشجار **(23462.1)** ألف شجرة. تصاب شجرة اللوز بالعديد من الآفات الحشرية ومن أهمها دبور ثمار اللوز وتنتشر هذه الحشرة في مناطق زراعة اللوز وتحديداً في دول البحر الأبيض المتوسط **(Koveos et al 2002)**، وتأتي أهمية هذه الحشرة من الضرر الذي تحدثه على بذرة اللوز حيث تضع الأنثى البيض داخل ثمار اللوز الخضراء حديثة العقد ويفقس البيض ليعطي اليرقات حيث تبدأ كل يرقة بالتغذي داخل بذرة اللوز **(Duval and Froment,1996)** مؤديةً إلى إتلافها بشكل كامل ولا تبقي منها إلا على غلاف البذرة والذي يعمل على حماية اليرقة، ومع تطور اليرقة يتغير لون الثمرة ليصبح بني مائلاً إلى الأسود وتسمى الثمرة بالمحنطة أو المومياء وتبقى معلقة على الشجرة. تدخل اليرقة طور السكون في سورية اعتباراً من أواخر شهر أغسطس وتستمر في هذا الطور حتى أواخر شهر فبراير من ربيع العام التالي، تبدأ الحشرات الكاملة بالظهور اعتباراً من أواخر مارس حيث تظهر الذكور قبل الإناث بيومين، ويتم التزاوج وتبدأ الأنثى بوضع البيض افرادياً في ثمار اللوز لتعيد دورة الحياة ولها جيل واحد في العام **(روضة غالي،واخرون 2008)**. ونظراً لانتشار زراعة اللوز في مناطق كثيرة من سورية وترافق هذه الزراعة مع

(سلم البحث فى 2 مايو 2011)
(ووفق على البحث فى 4 يونيو 2011)

الإصابة بدبور ثمار اللوز بالإضافة إلى إمكانية إنتشار الإصابة بين المناطق بعدة طرق منها الانتقال بالرياح وكذلك عند الزراعة العشوائية وخاصة بالبذور ، وبالرغم من أن زراعة البذور المصابة لا تعطي نتيجة في الإكثار لأن الجنين فيها يكون غير موجود بسبب تغذي اليرقة عليه إلا أنه وفي كثير من الأحيان تزرع البذور عشوائياً وبدون معرفة مسبقة بأعراض الإصابة ويعتبر الكثير أن لون الثمار الداكن ناتج عن الجفاف الطبيعي للثمرة بعد النضج وكأنها ظاهرة فيسيولوجية لا أكثر، ويجب الإشارة إلى أن بعض اليرقات تستطيع الاستمرار بهذا الطور في الثمار ولعدة سنوات (**Duval and Froment, 1996**)، وبالتالي تعد مصدراً للإصابة، يضاف إلى ذلك إمكانية انتقال الثمار المصابة مع الثمار السليمة مما يؤدي إلى خروج حشرات الدبور في مناطق غير تلك التي وضعت فيها الأمهات البيض، لذلك كان لا بد من إجراء توصيف جزيئي لحشرات الدبور المنتشرة في مناطق زراعة اللوز لمعرفة درجة القرابة الوراثية بينها.

تم تطوير المعلمات الجزيئية Markers للـ DNA لتكون أدوات متاحة أمام الدراسات الوراثية لمجتمعات الكائنات لأنها تساعد في رسم الخرائط الوراثية حيث تساعد في آليات العزل الوراثي (**Narang *et al* 1993**)، (**Karp and Edwards 1997**)، وتستخدم هذه المعلمات بمساعدة تقنية التفاعل التسلسلي البوليميرازي PCR (Polymerase chain reaction) لل DNA ، ومن أهم تقنيات الـ PCR المطبقة تقنية الـ ISSR (Inter simple sequence repeats) حيث تتميز هذه الطريقة بأنها ذات كفاءة عالية بين طرق PCR الأخرى حيث تكشف بدرجة كبيرة عن التعددية الشكلية (**Jesse and Walker 2004**)، وكذلك تعد من التقنيات السريعة وتتطلب كمية قليلة من الحمض النووي DNA، بالإضافة إلى استخدامها في مجال التنوع الوراثي (**Qian *et al* 2007**). لقد توجه الاهتمام وبشكل كبير لطريقة ISSR-PCR لأنها لا تحتاج إلى تكاليف عالية من أجل تضخيم قطعة الحمض النووي DNA ونتائجها ذات تكرارية عالية، لذلك فقد استخدمت لرسم الخريطة الوراثية لدودة الحرير (**Nagaraju *et al* 2002**).

تم الاعتماد في هذه الدراسة على تطبيق تقنية ISSR-PCRل كشف الاختلافات الوراثية بين حشرات دبور ثمار اللوز ذكوراً وإناثاً في خمس مناطق تنتشر فيها زراعة اللوز بشكل رئيسي وتم رسم شجرة القرابة الوراثية بين الإناث والذكور في المناطق المدروسة.

مواد وطرائق البحث

- **الحشرات** : تم جمع المحنطات من حقول مزروعة باللوز من خمس مناطق وهي محافظة حمص- محافظة السويداء – محافظة القنيطرة ، بيتيما ودير عطية وهما تابعتين لمحافظة ريف دمشق. وضعت المحنطات في علب بلاستيكية وتمت مراقبة انبثاق الحشرات الكاملة حيث فصلت الإناث عن الذكور، ووضعت الحشرات في علب بلاستيكية. تم استخلاص الحمض النووي DNA للحشرات المأخوذة من المناطق الخمسة الذكور والإناث كلاً على حدا، وتم الاستخلاص وفق (**Cenis *et al* 1993**) المعدلة.
- **تضخيم الحمض النووي DNA:** تم تضخيم DNA الناتج عن عملية الاستخلاص لذكور وإناث المناطق باستخدام تقنية ISSR وكان الحجم النهائي في أنبوب التضخيم النهائي 25 ميكروليتر تتضمن 12.5 ميكروليتر Master Mix ، 6 ميكروليتر ماء مقطر معقم، 40 نانوغرام DNA و 2 ميكروليتر من البادئ المستخدم (10µM) ، ويبين **الجدول (1)** رمز كل بادئ مستخدم والتسلسل النيكلوتيدي ودرجة حرارة الالتحام.

وضعت الأنابيب في جهاز التدوير الحراري Thermocycler وتمت برمجته في كل مرة حسب درجة حرارة الالتحام للبادئ وتم بعدها فصل نواتج

جدول1. رمز والتسلسل النيكلوتيدي ودرجة حرارة الالتحام للبادئات المستخدمة.

رمز البادئ	التسلسل النكليوتيدي 3´⟸ 5´	درجة حرارة الالتحام م°
1	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50
2	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52
3	CACACACACACACACACAA	50
4	CACACACACACACACAG	52
5	ACACACACACACACACT	50
6	GAGAGAGAGAGAGAGACG	56
9	ACACACACACACACGG	56
10	CTTCA CTTCA CTTCA	42
11	GGAGA GGAGA GGAGA	48
14	CCAGGTGTGTGTGTGTGT	56
15	GTGTGTGTGAGAGAGAGA	50
16	ACACACACACACACATATAT	52
17	KVRTGTGTGTGTGTG	50

التضاعف على جل الآجاروز 2% ضمن محلول الفصل الكهربائي وهو TBE 1X .

(Tris-base,Boric acid,EDTA) مع إضافة معلم متدرج (1Kb Ladder) للكشف عن أحجام الحزم باستخدام جهاز التصوير بالأشعة فوق البنفسجية (UV) **الشكل (1).**

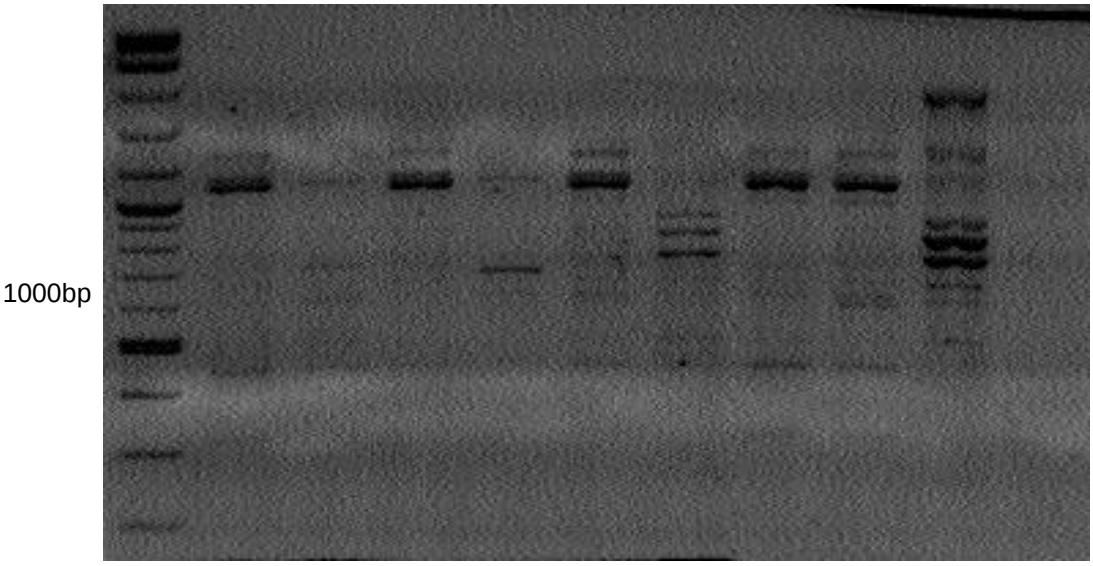
- **التحليل الإحصائي**: تم تحديد درجة الترابط الوراثية بين حشرات المناطق المدروسة اعتماداً على البيانات الجزيئية الناتجة باستخدام البرنامج الإحصائي POPGENE 32 وذلك بعد تحويل البيانات إلى صيغ رقمية بوجود الحزمة أو عدم وجودها (0,1) ورسمت شجرة القرابة الوراثية اعتماداً على هذا البرنامج **الشكلين (3,2)**، ويبين **الجدولين (4،2)** مصفوفة نسب عدم التوافق PDV بتطبيق UPGMA.

النتائج

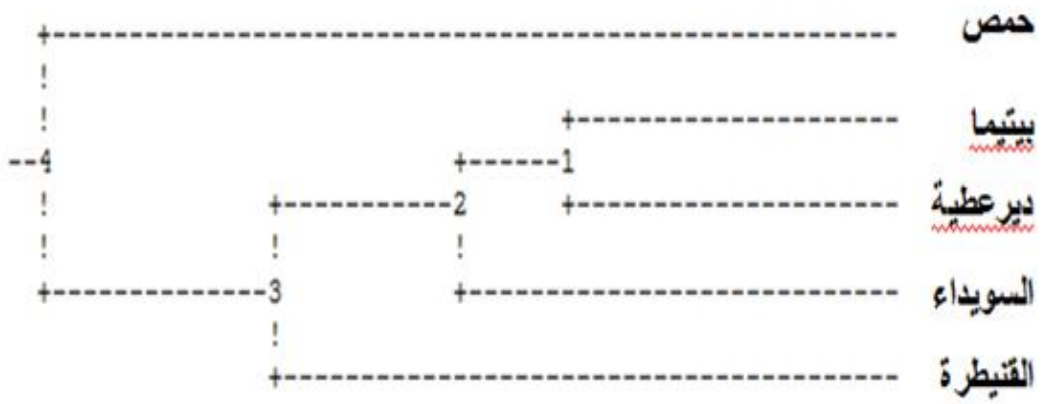
يبين **الشكل (1)** نواتج التضاعف على جل الاجاروز 2% ضمن محلول الفصل الكهربائي حيث M المعلم المتدرج، ومن 1-5 تمثل إناث حمص، بيتيما، القنيطرة، السويداء، دير عطية وعلى الترتيب، و6-10 ذكور حمص، بيتيما، القنيطرة، السويداء، دير عطية على التوالي.

بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة عن البادئات المستخدمة 86 حزمة، أعطى البادئ (1) أعلى عدد للحزم المدروسة (16) حزمة والبادئ (10) أقل عدد من الحزم (حزمة واحدة فقط).

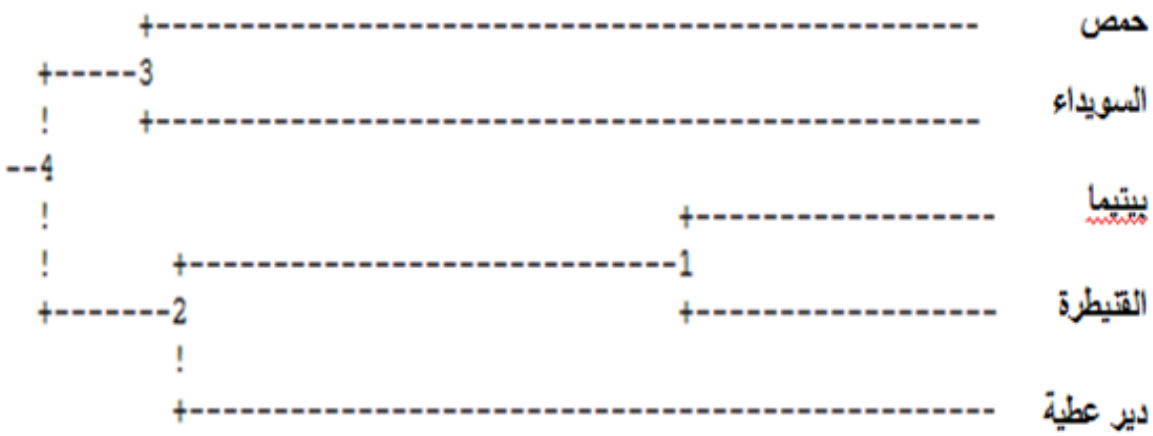
كان عدد الحزم التي أعطت تعددية شكلية عند الإناث 33 حزمة، وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 38.37% وتراوحت قيم النسبة المئوية لعدم التوافق PDV لمعلمات ISSR بالنسبة لإناث المناطق



شكل 1. نواتج التضاعف على جل الأجاروز 2% ضمن محلول الفصل الكهربائي



شكل 2. شجرة القرابة بين إناث المناطق المدروسة حسب البيانات الجزيئية.



شكل 3. شجرة القرابة بين ذكور المناطق المدروسة حسب البيانات الجزيئية.

جدول 2. مصفوفة المتوسط العام لنسب عدم التوافق الناتجة عن دراسة متوسط التشابه الوراثي لإناث المناطق المدروسة

♀	حمص	بيتيما	القنيطرة	السويداء	دير عطية
حمص	0				
بيتيما	0.2955	0			
القنيطرة	0.28	0.2202	0		
السويداء	0.2497	0.1639	0.2348	0	
ديرعطية	0.28	0.1105	0.1503	0.1236	0

جدول 3. البيانات التي تم الحصول عليها باستخدام البادئات من حيث عدد الحزم الكلية وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية بالنسبة للإناث

اسم البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم ذات التعددية الشكلية	النسبة المئوية للتعددية الشكلية
1	16	4	25
2	3	0	0
3	6	1	16.66
4	4	1	25
5	6	1	16.66
6	12	4	33.33
9	8	3	37.5
10	1	1	100
11	6	2	33.33
14	7	6	14.28
15	3	0	0
16	10	8	80
17	4	2	50
المجموع	86	33	38.37

جدول 4. مصفوفة المتوسط العام لنسب عدم التوافق الناتجة عن دراسة متوسط التشابه الوراثي لذكور المناطق المدروسة

♂	حمص	بيتيما	القنيطرة	السويداء	دير عطية
حمص	0				
بيتيما	0.3112	0			
القنيطرة	0.36	0.1105	0		
السويداء	0.2955	0.3112	0.3272	0	
دير عطية	0.3435	0.2955	0.28	0.3435	0

جدول 5. البيانات التي تم الحصول عليها باستخدام البادئات من حيث عدد الحزم الكلية وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية بالنسبة للذكور

اسم البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم ذات التعددية الشكلية	النسبة المئوية للتعددية الشكلية
1	16	13	81.25
2	3	0	0
3	6	3	50
4	4	1	25
5	6	4	66.67
6	12	8	66.67
9	8	1	1.25
10	1	1	100
11	6	2	33.33
14	7	4	54.14
15	3	0	0
16	10	6	60
17	4	1	25
المجموع	86	44	51.16

بين 0.1105 (بين منطقتي بيتيما وديرعطية) و0.2955 (بين منطقتي حمص وبيتيما). يبين **الجدول (3)** البيانات التي تم الحصول عليها من باستخدام البادئات من حيث عدد الحزم الكلية وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية بالنسبة للإناث، كما يبين **الشكل (2)** شجرة القرابة العنقودية للصفات الجزيئية لإناث المناطق المدروسة حيث انقسمت إلى مجموعتين ضمت المجموعة الأولى Cluster-1 إناث حمص فقط، أما المجموعة الثانية Cluster-2 فقد ضمت إناث بيتيما وديرعطية ، وكانت الأقرب في هذه المجموعة، وكذلك إناث القنيطرة والسويداء وهذا يفسر بأن بيتيما، ديرعطية، السويداء والقنيطرة من جنوب سورية، أما حمص فهي من المنطقة الوسطى، بالإضافة إلى أن حركة الإناث بطيئة ولا تنتقل إلى مسافات بعيدة، أي أن انفصلت حسب التوزع الجغرافي للمناطق المدروسة وهذا ما أظهرته أيضاً نسبة التعددية الشكلية والتي بلغت 38.37%.

كان عدد الحزم التي أعطت تعددية شكلية عند الذكور 44 حزمة، وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 51.16% وتراوحت قيم النسبة المئوية لعدم التوافق PDV لمعلمات الـ ISSR بالنسبة لذكور المناطق 0.1105 (بين منطقتي بيتيما والقنيطرة) و0.36 (بين منطقتي حمص والقنيطرة). يبين **الجدول (5)** البيانات التي تم الحصول عليها باستخدام البادئات من حيث عدد الحزم الكلية وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية بالنسبة للذكور، كما **يبين الشكل (3)** شجرة القرابة العنقودية للصفات الجزيئية لذكور المناطق المدروسة حيث انقسمت إلى مجموعتين ضمت المجموعة الأولى Cluster-1 ذكور حمص والسويداء، أما المجموعة الثانية Cluster-2 فقد ضمت ذكور بيتيما والقنيطرة، كما انفردت ذكور ديرعطية ضمن هذه المجموعة، وهذا قد يعود إلى أن حركة الذكور وهجرتها بشكل أسرع بسبب حجمها الصغير، وهذا ما وجد أيضاً من خلال أن التعددية الشكلية أكبر عند الذكور من الإناث والتي بلغت 51.16%.

المراجع

أولاً: المراجع العربية

المجموعة الإحصائية الزراعية السورية (2008). قسم الإحصاء، مديرية الإحصاء والتخطيط، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، دمشق، سوريا.

روضة غالي وقسيس، ووجيه (2008). دراسة بيوفيزيولوجية لدبور ثمار اللوز End *Eurytoma amygdali* (*Hymenoptera - Eurytomidae*) في وسط وجنوب سورية وطرائق مكافحته. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، قسم وقاية النبات، جامعة دمشق، سوريا.

ثانياً: المراجع الأنجليزية

Cenis J.L.; Perez P. and Fereres A. (1993). Identification of aphid (Homoptera: Aphidae) speciies and clones by random amplified polymorphic DNA. **Ann. Entomol. Soc. Am., 86(5): 545-550**.

Duval H. and Froment P. (1996). Ression de Eurytoma amygdali en France et les methodes de lutte possibles. **La Prog J. Appl. Entomol**. **17: 176-182**.

FAO (2010). Agricultural Statistics of the Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Jesse H. and Walker J. (2004). Detection of DNA Polymorphisms in Homalodisca coagulata (Homoptera: Cicadellidae) by Polymerase Chain Reaction- Based DNA Fingerprinting Methods. **Ann. Entomol**. **Soc. Am. 97: 574-585.**

Karp A. and Edwards J. (1997). DNA markers: a global overview. In: Caetano Anolles G. and Gresshoff P.M. [eds.], DNA markers-protocols, applications and overviews**, pp: 1-13.** Wiley, New York**.**

Koveos D.S.; Katsoyannos B.I. and Broufas G.D. (2002). First record of Eurytoma schreini Schreiner in Greece and some observations on its phenology. **Journal of Applied Entomology 126:186-187**.

Nagaraju J.; Kathirvel M.; Subbaiah E.V.; Muthulakshmi M. and Kumar L.D. (2002). ISSR- PCR: a simple and sensitive assay for highthroughput genotyping and genetic mapping. **Molecular and Cellular Probes 16: 67-72.**

Narang S.K.; Tabachnick W.J. and Faust R.M. (1993). Complexities of population genetic structure and implications for biological control programs In. Narang S.K, Barlett A.C. and Faust R.M. [eds.], Applications of Genetic to Arthropods of Biological Control Significance. **pp. 19-52** CRC, Boca Raton, FL.

Qian Z.; Hong D. and Dong Hang Z. (2007). ISSR Molecular Marker and its application in plant researches. **Molecular Plant Breeding 6: 123-129.**