



دراسة الاختلافات الوراثية لحشرة (*Aporia crataegi* (L))

في مناطق انتشارها في سورية

Study of the various differences of the insect *Aporia crataegi* (L) in its spread in Syria

إعداد

أماني جودت شلالو

Amany jaudat shllalo

قسم بيولوجيا الحيوان، كلية العلوم- جامعة دمشق

سلام لاوند

Salam lawnd

كلية الزراعة – جامعة دمشق

Doi: 10.21608/ajwe.2025.421838

٢٠٢٤/٧/١٥

استلام البحث

٢٠٢٤ / ٨ / ١٢

قبول البحث

شلالو، أماني جودت و لاوند، سلام (٢٠٢٥). دراسة الاختلافات الوراثية لحشرة *Aporia crataegi* (L) في مناطق انتشارها في سورية. *المجلة العربية لأخلاقيات المياه*، المؤسسة العربية للتربية والعلوم والآداب، مصر، ٨(٨)، ٤٧ – ٧٤.

<http://ajwe.journals.ekb.eg>

دراسة الاختلافات الوراثية لحشرة *Aporia crataegi* (L) في مناطق انتشارها في سورية

المستخلص:

أجريت دراسة الاختلافات الوراثية لحشرة *A. crataegi* المجموعة من خمسة عشر منطقة من سورية تنتشر فيها الحشرة، في المنطقة الوسطى والسويداء وجبل الشيخ، وذلك بتطبيق تقنية ISSR، استعمل في التوصيف الجزيئي للذكور ٢٢ بادئ، أعطى منها ١٣ بادئ نتائج تضخيم الـ DNA، واستعمل في التوصيف الجزيئي للإناث ٢٣ بادئ، أعطى منها ١٣ بادئ نتيجة لتضخيم الـ DNA، وقد بلغت التعددية الشكلية للذكور *A. crataegi* (٩٨.٩٨%)، وسُجّلت أعلى درجة قرابة وراثية بين ذكور بقعسم (جبل الشيخ) والمتونة (السويداء)، وبين ذكور بقعسم وعرنة التابعتين لجبل الشيخ، وبالتحليل العنقودي لدرجة القرابة الوراثية تبين أن ذكور تل الذرة (حماة) انفصلت في مجموعة منفصلة لوحدها، أما التعددية الشكلية للإناث فقد بلغت (١٠٠%)، وسُجّلت أعلى درجة قرابة وراثية بين إناث العثمانية (حمص) وعرنة (جبل الشيخ)، وبالتحليل العنقودي انفصلت إناث المخرم إلى مجموعة منفصلة لوحدها.

الكلمات المفتاحية: *Aporia crataegi* (L)، اختلافات وراثية، سورية.

Abstract:

A study was conducted on the genetic differences of *A. crataegi*, collected from fifteen regions of Syria where the insect is widespread, in the central region, Suwayda, and Mount Hermon, by applying the ISSR technique. 22 primers were used in the molecular characterization of the males, of which 13 primers yielded Results of DNA amplification. 23 primers were used in the molecular characterization of females, 13 of which were produced as a result of DNA amplification. The polymorphism of *A. crataegi* males reached (98.98%), and the highest degree of genetic relatedness was recorded between Baqasim males. (Jabal al-Sheikh) and al-Matouna (Suwayda), and between the males of Baqasim and Arnah, which belong to Jabal al-Sheikh. By cluster analysis of the degree of genetic relatedness, it was found that the males of Tal al-Qur (Hama) separated into a separate group on their own, while the polymorphism of females reached (100%), and was recorded

The highest degree of genetic kinship is between the females of Al-Uthmaniyah (Homs) and Arnah (Jabal Al-Sheikh), and through cluster analysis, the females of Al-Makhrum were separated into a separate group on their own.

المقدمة:

تعد فراشة اللوز الحرشفية (*Aporia crataegi* L. (Lepidoptera- Pieridae) من العوائل الأساسية المضيئة للمتطفل *C.glomerata*, وهي آفة مهمة على أشجار التفاح واللوز في وسط وجنوب سورية يتمثل الضرر الأكبر في العمر اليرقي الثالث بعد النشاط فتسبب اتلاف البراعم الزهرية والخضرية، وتتميز في العمرين اليرقيين الرابع والخامس بنهما الكبير مسببة تعرية الأشجار، تمضي السكون الخريفي الشتوي على هيئة يرقات عمر ثالث ضمن أعشاش حريرية، يتألف كل عش من ٢-٤ أكياس حريرية بداخلها يرقات العمر الثالث الساكنة متماثلة في سرعة النمو. تنشط في ظروف بلادنا في بداية شهر شباط مع بدء سريان النسغ وانتفاخ البراعم، لها جيل واحد في العام وتمر بخمسة أعمار يرقية، وتتميز بوجود توافق بين الأطوار البيولوجية للحشرة مع المراحل الفينولوجية للعائل النباتي، حيث يترافق نشاط يرقات العمر الثالث وخروجها من السكون مع بدء سريان النسغ في النبات وانتفاخ البراعم، وهذه المرحلة تعدّ مرحلة الضرر الرئيس على الإنتاج وقوة نمو النبات، بسبب تغذية اليرقات على البراعم المنتفخة واطلافها، كما يترافق العمر اليرقي الرابع للحشرة مع مرحلة تفتح البراعم الزهرية وذروة الإزهار، في حين يترافق العمر اليرقي الخامس مع بدء النمو الخضري والعقد الثمري، يرتبط نشاط يرقات العمر الثالث بشكل مباشر مع بدء نشاط العائل، وبشكل غير مباشر مع العوامل البيئية، وهذا يعلل سبب تفاوت نشاط الآفة في الحقل الذي يحتوي على أشجار من أصناف مبكرة الإزهار وأصناف متأخرة الإزهار (Shlalo and Kassis, 2016a)، ومدة الأعمار اليرقية في سورية تختلف باختلاف الظروف المناخية والارتفاع عن سطح البحر (Shlalo and Kassis, 2016b).

يكون طول اليرقات عند الفقس ١.٤ مم، ويسيطر عليها اللون البني والأصفر، مع وجود طيات عرضية وصفائح صدرية وشرجية بلون أسود، ويكون طولها عند الخروج من السكون في العمر اليرقي الثالث ٤ مم، ويبلغ طول اليرقة في نهاية العمر اليرقي الخامس (٣٩-٤٣) مم، يكون الرأس عند اليرقة بلون أسود، مع شعرات قصيرة سوداء، وشعرات طويلة بيضاء (شلالو، ٢٠١٠، Shuanglin, 2001).

ويبلغ طول العذراء (٢٢-٢٥) مم وبعرض ٧ مم، وتكون مربوطة بواسطة حزام حريري حول الخصر، وخطاطيف إلى الوسادة الحريرية التي تنسجها للتعذر، وتثبت

على أغصان النبات على شكل مجموعات مؤلفة من عدّة عذارى، أما الحشرة الكاملة فتبلغ المسافة بين الجناحين منبسطين عند *A. crataegi* ٦٦-٧٦مم (شللو، ٢٠١٠، Shuanglin, 2001).

ومن خلال الدراسة الحقلية لـ *A. crataegi* في المنطقة الجنوبية والوسطى من سورية خلال الأعوام ٢٠٠٦-٢٠١٠، فقد تم التمييز بين نمطين للإناث من خلال الشكل الظاهري. أطلق اسم النمط B على الإناث التي تميزت باللون المصفر، وأطلق اسم النمط A على الإناث باللون المزهر، كما تميز النمط A بالخصوبة المرتفعة عن النمط B وعدد البيض الناضج في الأفرع المبيضية، لم يلاحظ النمط B في المنطقة الجنوبية وبلغت نسبة انتشاره ١٥% من مجمل انتشار الحشرة في المنطقة الشمالية (شللو، ٢٠١٠).

تعدّ ISSR من أهم التقنيات المطبقة فهي تتميز بأنها ذات كفاءة عالية في الكشف عن التعددية الشكلية Polymorphism، وبادئاتها متاحة (De Leon and Walker, 2004)، ولا تتطلب معرفة مسبقة بمجين الكائن المدروس، فالتكرارات البسيطة مثل النكليوتيدات الثنائية موجودة في مجينات كل حقيقيات النوى (Prasad et al., 2005)، وهي من التقنيات السريعة والدقيقة في رسم الخرائط الوراثية باستعمال كميات قليلة من الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA، كما أنّها منخفضة التكاليف وتعطي مستويات عالية من الاختلافات الوراثية بين المجتمعات (Vijayan et al., 2006). وعادة ما يضخم (ISSR) ٢٥-٥٠ منتجاً في التفاعل الواحد.

إن الفائدة الرئيسية لهذه التقنية هي أنّها لا تتطلب وقتاً طويلاً لبناء المكتبة الوراثية، وعلى الرغم من حقيقة كونها تورث كمؤشرات سائدة وأحياناً غير سائدة، إلا أنّها مؤشرات ذات طبيعة عشوائية، فهي مناسبة بشكل خاص لدراسات علم الوراثة العرقي وتقييم التنوع الوراثي وتحديد الأصناف (Nagaraju et al., 2002). ولكون مؤشرات ISSR غزيرة فإنّها تعطي عدداً كبيراً من الحزم، ومستوى التعددية الشكلية متوسط إلى عالي، والقدرة على التضخيم متوسطة إلى عالية، والتكاليف منخفضة كما أن جهد تنفيذها منخفض (Gui et al. 2008).

وتستعمل هذه الطريقة في التوصيف الجزيئي للكائنات الحية، لأن الشكل الخارجي للكائنات الحية يتأثر غالباً بالمؤثرات البيئية فإن الاعتماد على الشكل الخارجي لتصنيف هذه الكائنات لا يكفي، بينما تكون طريقة التوصيف الجزيئي مستقلة بيئياً ويمكن استعمالها في تحاليل التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي.

لذا تعدّ الحاجة للمؤشرات الجزيئية للأفات الحشرية مهمة من أجل دراسة علاقات القرابة الوراثية لتحديد الأنواع القريبة من بعض وكذلك ضمن النوع الواحد، وتخمين تباين قابلية التوريث في الاستقصاء البيئي ووراثة الجماعات (Unruh and

(Woolley, 1999). حيث أظهر (Paplauskienė et al., 2006) أن حزم ISSR أعطت نفس النتائج عندما تمت إعادة التجربة عدة مرات على نفس العينات عندما استعملت هذه التقنية على عينات من سلالات نحل العسل، وإن سلالات نحل العسل هذه انفصلت عن بعضها بشكل مميز حيث كان من الصعب تمييزها بطرائق وراثية أخرى. استعملت مؤشرات DNA في مجال واسع في علم التصنيف. كما بين (Dušinsk et al., 2006) أهمية استعمال مؤشرات ISSR للتمييز بشكل ناجح بين وضمن أنواع البعوض. وقد استعمل (Meena et al., 2005) تقنية ISSR لتوصيف *Tospovirus* الذي ينتقل عبر طريق حشرات التريبس، وبين (Philips et al., 2002) أن تقنية ISSR أظهرت وجود اختلافاً بين حشرات *Medicago aethiopoidea* الموجودة في فرنسا عن حشرات نفس النوع الموجودة في هولندا. وكانت نتائج تضخيم ISSR مفيدة لدراسة أنواع (Noctuids, Lepidoptera) وللدراسة ضمن نفس النوع (Lugue et al., 2002). واستعملت تقنية ISSR بنجاح في العديد من الدراسات الوراثية على فراشة دودة الحرير (*Bombyx mori* (L.)) (Reddy et al., 1999). وطبقت من قبل (Kang et al., 2011) على بسبلا الأجاج *Cacopsylla pyricola* وأعطت نتائج جيدة. وقد كانت تقنية ISSR الأكثر حساسية عند غربلة طرائق المؤشرات الجزيئية الأربعة، وتم استعمال تقنية ISSR على حشرة (Homoptera) (*Homalodisca coagulate*, Cicadellidae) حيث سمحت هذه التقنية بالكشف عن تباين الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA في التكرار البسيط الترادفي SSR من دون الحاجة لعزل وتحديد تسلسل DNA (Zietkiewicz et al., 1994).

كما استعملت هذه التقنية في دراسة التنوع الوراثي لدودة ثمار البندورة *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) حيث جمعت العينات من أقاليم مختلفة من إيران على البندورة، وتم استخلاص الـ DNA من اليرقات وأظهرت تقنية ISSR اختلافات وراثية تبعاً لاختلاف المناطق الجغرافية (Khiaban et al., 2010).

وتم استعمال ISSR في التوصيف الجزيئي لخمسة أنواع لذبابة *Necrophagous* وهي إحدى حشرات الجثث من مناطق مختلفة باستعمال ١٨ بادئ أعطت ١٠٥ حزم واضحة منها ٩٥ حزمة متعددة شكلياً وأظهرت وجود نوع مختلف تماماً عن باقي الأنواع (He et al., 2006).

تعدّ حشرة *Liposcelis bostrychophila badonnel* (Psocoptera: Liposcelididae) من الآفات المهمة التي تصيب المواد المخزنة، وقد أدى استعمال طريقة ISSR لتصنيفها وفق مكان تواجدها إلى أربعة مجموعات

تخصصت كل مجموعة بإصابة المواد المخزونة في مكان محدد (المكاتب، غرف النوم، مستودعات المواد النباتية، مستودعات الطحين) (Wang et al., 2016). تناولت عدّ أبحاث سورية استعمال طريقة ISSR في التوصيف الجزيئي للحشرات كالدراسة التي أجراها زغيب (٢٠١٢) لدراسة درجة القرابة الوراثية بين حشرات *Cerambyx dux F* (Coleoptera: Cerambycidae) في مناطق انتشاره في سورية.

مواد وطرائق العمل:

أجري التوصيف الجزيئي في مخبر البيولوجيا الجزيئية Molecular Biology في كلية الزراعة باستعمال تقنية التكرارات التتابعية البسيطة الداخلية ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) لإجراء البصمة الوراثية لها لكونها ذات تكرارية ومصداقية عالية، كما أنها سهلة التطبيق ويمكن من خلالها دراسة درجة القرابة بين الأنواع الحشرية كما أنها لا تحتاج معرفة مسبقة بالهجن المدروسة وغير مكلفة مقارنة مع غيرها (Zietkiewicz et al., 1994). علاوة على ذلك فقد ثبت نجاحها على عدد كبير من الحشرات والمحاصيل والأشجار المثمرة، هذا وقد أجري التوصيف الجزيئي وفق الخطوات التالية:

١.١. استخلاص الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA: DNA

Extraction

تم استخلاص DNA من عينات *A. crataegi* التي تمّ جمعها من المنطقة الوسطى والجنوبية من سورية الموضحة في الجدول (1) الشكل (١).

الجدول (١). أماكن أخذ عينات *A. crataegi* وعينات *A. glomeratus* والإحداثيات الجغرافية للمنطقة:

رقم العينة	المنطقة	المحافظة	البلد	نقط الإختبار	النوع	الارتفاع عن سطح البحر م	درجة الطول	درجة العرض
١	بقعسم	ريف دمشق	+	A	+	١٥٠٠	35°56'17"E	33°24'19"N
٢	حينا		+	A	+	١٠٨٠	35°56'33"E	33°20'59"N
٣	عرنة		+	A	+	١٩٥٠	35°52'45"E	33°21'58"N
٤	دربل		+	A	+	١٣٢٠	35°54'45"E	33°21'19"N
٥	المتونة	السليمانية	+	A	+	٨٤٨	36°36'11.1"E	32°57'03.4"N
٦	سد الروم		+	A	+	١٤٥٧	36°39'16.6"E	32°43'11.3"N
٧	المزرعة		+	A	+	٦٥١	36°28'29.5"E	32°46'43.6"N
٨	أم الزيتون		-	-	-	٩٠٠	36°36'27.8"E	32°54'13.2"N
٩	المخرم	المنيرة	+	B	+	٧٤٥	37°5'E	34°49'N
١٠	المشرفة		+	A	+	٦٣٦	36°51'26"E	34°49'55"N

دراسة الاختلافات الوراثية لحشرة *Aporia crataegi* (L) في مناطق انتشارها في سورية، امانى شلالو- سلام لاوند

34°50'29"N	36°55'41"E	٨٧٤	+	A	+		عين النسر	١١
34°41'44.8"N	37°00'18.4"E	٥٤٢	+	A	+		تل شنان	١٢
34°48'46"N	37°0'35"E	٦٣٤	+	A	+		أم العمدة	١٣
34°47'57"N	36°51'21"E	٥١٢	+	A	+		الجابرية	١٤
34°53'3"N	37°5'11"E	٦٩٥	+	A	+		العثمانية	١٥
34°50'33"N	36°59'3"E	٧٨٩	-	-	-		نوى	١٦
35°18'26"N	36°96'55"E	٨١٧	+	A	+	حماة	تل الذرة	١٧



الشكل (١) مواقع أخذ العينات الحشرية للتوصيف الجزيئي

أعطيت كلّ عينة رقم محدد مع كتابة كافة المعلومات عن مكان جمع العينة والعائل النباتي وتاريخ جمعها، وحفظت ضمن المجمدة عند حرارة -٢٠°س، لحين الاستخلاص، وتم التوصيف الجزيئي للذكور وإناث *A. crataegi* وفق طريقة (Pospiech and Neumann, 1995) مع إجراء بعض التعديلات عليها وفق الخطوات التالية:

- تم عزل الإناث والذكور كلاً على حدة.
- نظفت العينات بمسحها بالماء المقطر والكحول على الوجهين.
- أزيلت الأجنحة وقرون الاستشعار والأرجل، والبطن.
- طحن ٠.٥ غ من كل حشرة (منطقة عضلات الصدر) لذكور وإناث *A. crataegi* ضمن الأزوت السائل في جفنة بورسلان معقمة بالكحول ووضعت في أنابيب Eppendorf سعة ١.٥ مل، وأضيف لها ٧٠٠ µL محلول استخلاص

SDS المكون من: (250 mM NaCl, 25 mM Tris-Hcl pH=8, 0.5% SDS, H2O, ٣٥٠ μL أسيتات الصوديوم 3M للأنبوب الواحد، وحركت للمجانسة، ووضعت الأنابيب عند درجة -٢٠°س لمدة ١٠ دقائق.

- ثقلت الأنابيب بعد التحضين عند سرعة ١٠٠٠٠ rpm مدة خمس دقائق في مثقلة (Universal 32 R) على حرارة ٤°س، ونُقل السائل الطافي إلى أنابيب جديدة، وأضيف لها الايزوبروبانول بمعدل ١:١ (V/V)، وحفظت على درجة -٢٠°س لمدة ساعة، تمت مجانستها بلطف، وضعت عند درجة حرارة ٤°س لمدة ١٠ دقائق بسرعة ١٠٠٠٠ دورة/دقيقة، ثم وضع السائل الناتج في أنبوب وأضيف 300μL من الايتانول ٧٠%، وتم التثقيب لمدة ١٠ دقائق عند درجة ٤°س بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/الدقيقة.

- أزيلت المادة الطافية بدقة لتجنب أخذ الراسب (DNA)، حُلّت المادة الوراثة DNA باستعمال محلول (TE (Tris, EDTA, PH= 8)، وأضيف ١٠٠ μL من الماء المقطر المعقم وتركت عند حرارة ٤°س لحين الاستعمال.

- قُدِّر DNA الناتج كميًا باستعمال جهاز المطياف الضوئي Ultra Violet Spectrophotometer (Jenway Genova)، الذي يعتمد في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet بموجة طولها 260 نانومتر. تسمح قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانومتر، بحساب تركيز الحمض النووي في العينة، حيث أن الثابت في معادلة حساب التركيز يعادل 50 ميكرو غرام/مل في حالة سلاسل الحمض النووي DNA. إن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر إلى 280 نانومتر تساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي ويجب أن تتراوح هذه النسبة بين (1.8 - 2.0).

- حُسبت كمية الحمض النووي DNA من المعادلة التالية (Maniatis et 1982):

$$(ug/ml) = \frac{OD_{260} \times 50 \text{ (عامل التمديد)} \times 50 \text{ (ug/ml)}}{1000}$$

ثم رحلت نواتج الاستخلاص على هلامة من الأغاروز تركيزها 0.8 % لتحديد نوعية الحمض النووي DNA المستخلص للتأكد من عدم تقطعها حيث يجب أن يظهر الحمض النووي DNA على شكل حزم bands عالية الوزن الجزيئي في هلامة الأغاروز. ومددت عينات الحمض النووي DNA للحصول على تركيز ٤٠ ng/ul لتستعمل في تفاعل التسلسل البوليمرازي.

١.٢. تضخيم الحمض النووي الريبسي منقوص الأوكسجين DNA:
 أُجري تضخيم DNA الناتج من عملية الاستخلاص للعينات المدروسة، حيث كان الحجم النهائي في الأنبوب الواحد ٢٥ μL ، متضمنة: Master Mix (Promega) ١٢.٥ μL ، ماء مقطر معقم ٨.٥ μL ، البادئة المستخدم ٢ μL بتركيز ١٠ μM ، والـ DNA بتركيز 40 ng/ μL . استعمال ٢٨ بادئ في التوصيف الجزيئي الجدول (٢).

الجدول (٢). التسلسل النيكلوتيدي للبادئات المستخدمة بتقنية ISSR للذكور وإناث *A. crataegi* والمتطفل ودرجة الالتحام:

رقم البادئ	اسم البادئ	٣-----٥	درجة الالتحام س
١	16/230	(CA)8A	٥٤
2	2	(GA)8C	52
٣	٤	(AC)8T	٥٢
٤	٦	(GT)4(GA)5	٥٦
5	7	(CA)7AG	54
٦	٨	(CAC7)(AT)3	٥٤
٧	٩	(TC)8GA	٥٦
٨	١٣	(TC)8AG	٥٦
9	14	CCAG(GT)7	56
١٠	١٥	(CA)8G	٥٦
11	16	(TG)8G	54
١٢	17	CCAG(GT)8	56
١٣	١٨	C(CT)4(GT)4G	٥٦
14	20	(TC)7GA	56
15	22	(GA)10	56
16	25	(GA)8TT	56
17	28	(AC)8TT	56
18	30	(GA)10T	56
19	32	(GA)8CG	52
20	33	(GA)8T	52
21	34	(CT)8G	52
22	35	(AC)8TCGA	52
23	36	(TC)8C	56
24	٣٧	(CT)10G	٥٢
25	40	(AC)8TT	52
26	41	(AC)8GG	56
27	42	(AC)8AAGG	٥٤
28	43	(TG)8AA	52

٣. فصل نواتج تضخيم DNA:

حُدِدَ نجاح التضخيم، بفصل نواتج التضخيم على هلامة الأغاروز ٢% المكونة من (Agarose 2g, TBE 100 ml, 1X) باستعمال جهاز الرحلان الكهربائي Electrophoresis، وأضيفت صيغة Ethidium bromide ٥ ميكروليتر بتركيز (50 mg/ml)، ضمن محلول الرحلان (TBE 1X) المكون من: (Tris-base 10.8g/L, Boric acid 5.5 g/L, EDTA 0.93 g/L, H₂O) على pH = 8، حيث يهاجر الحمض النووي DNA خلال هلامة الأغاروز اعتماداً على الوزن الجزيئي إذ ترحل القطع الكبيرة ببطء أكثر من القطع الصغيرة، ليظهر الحمض النووي DNA على شكل حزم على الهلامة، ولا بد من إضافة سلم جزيئي (ladder) يعبر عن الطول الجزيئي 1000 pb إلى الهلامة، وهو عبارة عن محلول تجاري يتألف من قطع الحمض النووي DNA بأطوال معروفة بعد الهجرة.

تصميم التجارب وتحليلها إحصائياً

جمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب قطع DNA بين العينات التي جمعت من المواقع المختلفة على هلامة أغاروز ٢% بعد إجراء الرحلان الكهربائي، حيث أعطي الرقم (١) عند وجود حزمة DNA والرقم (٠) لعدم وجود الحزمة، وقد نظمت الجداول لكل بادئة على حده، وأجري التحليل الإحصائي باستعمال برنامج Popgene 32 الإحصائي. وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) Percent Disagreement Values، ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بينها، حيث أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين الطرز المدروسة، ورسمت شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المتزنة (UPGMA) Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging.

النتائج والمناقشة:

التوصيف الجزيئي ودراسة الاختلافات الوراثية:

١. التوصيف الجزيئي لذكور *A. crataegi*:

تم استخلاص الحمض النووي الريبسي منقوص الأوكسجين DNA من ذكور *A. crataegi*، وتم تحديد نوعيته ونقاوته على هلامة الأغاروز ٠.٨% الشكل (٢)، حيث تراوح تركيز الـ DNA بين ٠.٢٦ إلى ٠.٦٢، ومدد التركيز ليصبح 40 نانوغرام/ميكروليتر في حين تراوحت نقاوة العينات المدروسة بين ١.٧٨ إلى ٢.٠٣.

الشكل (٢). هلامة الأغاروز بتركيز ٠.٨% المستخدمة لتحديد نوعية الحمض النووي DNA لذكور *A. crataegi*

الجدول (٣). تركيز ونقاوة الـ DNA لذكور *A. crataegi*

رقم العينة	مكان العينة لذكور <i>A. crataegi</i>	النقاوة	تركيز DNA (ug/ul)
١	جبل الشيخ (بقعسم)	1.99	0.37
٢	السويداء (المتونة)	1.92	0.39
٣	السويداء (سد الروم)	1.86	0.40
٤	السويداء (المزرعة)	1.96	0.39
٥	حمص (المخرم)	1.82	0.45
٦	حمص (المشرفة)	2	0.34
٧	حمص (عين النسر)	1.88	0.26
٨	حمص (تل شنان)	1.97	0.39
٩	حماة (تل الذرة)	2.01	0.44
١٠	حمص (أم العمدة)	1.87	0.51
١١	حمص (الجابرية)	1.78	0.43
١٢	جبل الشيخ (حينا)	1.91	0.47
١٣	جبل الشيخ (دريل)	1.99	0.38
١٤	حمص (العثمانية)	2.03	0.62
١٥	جبل الشيخ (عرنة)	1.89	0.49

تم استعمال ٢٢ بادئ لتحديد درجة القرابة الوراثية بين ذكور المناطق المدروسة، أعطى ١٣ ثلاثة عشر بادئة منها نتائج تضخيم بتطبيق تقنية ISSR، ولم تعط ٩ تسع بادئات أي تضخيم لقطعة الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA في جميع العينات المدروسة.

كان عدد الحزم الكلية الناتجة عن البادئات الثلاثة عشر ٩٨ حزمة، وقد أعطت البادئة (٣٣) أعلى عدد من الحزم حيث بلغت (١٤) حزمة، وأعطت البادئة (٤١) حزمة واحدة وهي أقل عدد للحزم.

بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية Polymorphic لدى الذكور (٩٨.٩%)، حيث أعطت جميع البادئات تعددية شكلية بنسبة (١٠٠%) ماعدا البادئة (٣٤) فكانت أقل نسبة للتعددية الشكلية حيث بلغت (٨٥.٧%). جدول (٤).

الجدول (٤). عدد الحزم الكلي لكل بادئ وعدد الحزم المتعددة شكلياً والنسبة المئوية للتعددية الشكلية التي أعطتها عند ذكور *A. crataegi* في مناطق الدراسة

اسم البادنة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتعددة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية
2	10	10	100
7	5	5	100
14	8	8	100
16	7	7	100
22	8	8	100
28	4	4	100
32	11	11	100
33	14	14	100
34	7	6	85.70
36	6	6	100
40	12	12	100
41	1	1	100
43	5	5	100
	98	97	٩٨.٩

أعطت جميع البادئات حزماً فريدة والتي تعد كحزم واسمة للعينة المدروسة، فبلغت عدد الحزم الفريدة عند الذكور ٣٧ حزمة موجودة وغائبة، ماعدا البادئة (٤١) لم تعط أي حزمة فريدة، أعطت البادئة (٣٣) أكبر عدد للحزم الفريدة التي بلغت (٧) حزم فريدة موزعة على جميع العينات المدروسة، وحزمة من كل من البادئة (١٤)، (٧)، وحزمتين من البادئة (٣٦)، وثلاثة حزم فريدة من البادئة (٤٣)، وظهرت في العينة (٩) التي تمثل منطقة تل الذرة (حماة) أعلى عدد للحزم الفريدة التي بلغت (٧) حزم فريدة، بينما لم تظهر أي حزم فريدة لدى العينة (١٥) التي تمثل منطقة جبل الشيخ (عرنة)، وهذا يدل على التنوع الوراثي بين ذكور *A. crataegi* المناطق المدروسة والتي كشف عنها بالبادئات المستخدمة الجدول (٥).

الجدول (٥). الحزم الفريدة لكل بادئ على عينات الذكور *A. crataegi* في المناطق المدروسة:

المجموعة	عزنة	العثمانية	دربل	جينا	الجارية	أم العمدة	تل الذرة	تل شنان	عين النسر	المشرفة	المخزم	المزرعة	سد الروم	المتونة	يقسم	المؤلفون
3				1+								+		+		2
1							+1									7
2				+					+							14
1											+					16
3		+								+			+			22
0																28
5						+	+1				+	+				32
7				+				+			+	+				33
2				+		+				+						34
3							+1						+			36
5					+1						+					40
0					+1											41
5					+1	+	+1								+	43

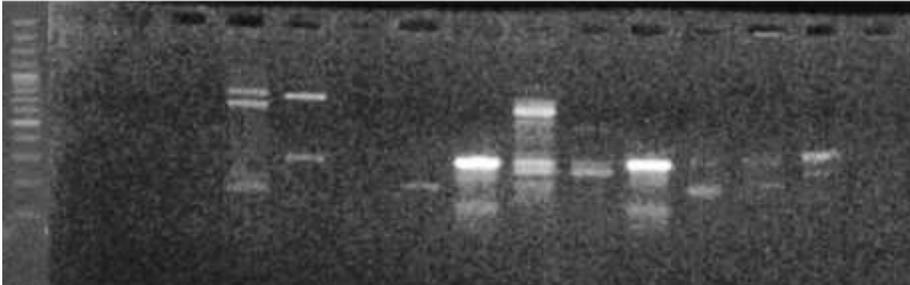
							+1									
3	0	1	3	2	4	3	7	2	1	2	5	3	2	1	1	مج
7																

١٥	١٤	١٣	١٢	١١	١٠	٩	٨	٧	٦	٥	٤	٣	٢	١
عرنة	الشمالية	دريل	حفا	الجارية	أم العمدة	تل الذرة	تل شقان	عين النسر	المشرفة	المخرم	المرزعة	سد الروم	المتزعة	بقعسم

يمثل الشكل (٢) هلامة الأغاروز بتركيز ٢% لذكور *A. crataegi* في المناطق المدروسة للبادئ ٢٢.

الشكل (٢). هلامة الأغاروز بتركيز ٢% للبادئ ٢٢ لذكور *A. crataegi* في المناطق المدروسة

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



١.١.١. تحديد درجة القرابة الوراثية لذكور *A. crataegi* في المناطق المدروسة: تمت دراسة درجة القرابة الوراثية لذكور *A. crataegi* في المناطق المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (Percent Disagrmnt Value)، حيث يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين العينات المدروسة، تراوح قيم النسب المئوية لعدم التوافق بالنسبة للبادئات ISSR بين ذكور المناطق المدروسة بين (٠.١٤٢٣) بين ذكور جبل الشيخ (بقعسم) والسويداء (المتونة)، وبين بقعسم وعرنة التابعتين لجبل الشيخ وهذا يدل على درجة قرابة وراثية كبيرة بينهما، و(٠.٦١٤٧) بين ذكور حماة (تل الذرة) وذكور حمص (المشرفة) وهذا يدل على وجود تباين وراثي كبير بينهما. الجدول (٦).

جدول (٦). مصفوفة المتوسط العام لنسب عدم التوافق (PDV) الناتجة عن دراسة متوسط التشابه الوراثي لذكور *A. crataegi*

عينة	يقسم	المتونة	سد الروم	المزرعة	المخرم	المشرفة	عين النسر	ثل شنان	ثل الذرة	أم العمد	الجابرية	جينا	دربل	العثمانية	عزبة
يقسم	****	٠.١٤٢٣	٠.٢٤١٢	٠.٢٩٤٥	٠.٢٩٤٥	٠.٢٢٨٣	٠.٢١٥٥	٠.٢٦٧٥	٠.٤٤١٨						
المتونة		****	٠.٢٢٨٣	٠.٢٥٤٢	٠.٢٥٤٢	٠.٢١٥٥	٠.٢٠٢٩	٠.٢٨٠٩	٠.٤٢٦١						
سد الروم			****	٠.٣٩٥٣	٠.٣٣٦٥	٠.٣٥٠٩	٠.٢٥٤٢	٠.٣٦٥٥	٠.٣٣٦٥						
المزرعة				****	٠.٢٦٠٩	٠.٣٨٠٣	٠.٢٨٠٩	٠.٢٨٠٩	٠.٥٢٤٥						
المخرم					****	٠.٣٦٠٣	٠.٢٢٨٣	٠.٣٦٥٥	٠.٤٥٧٨						
المشرفة						****	٠.٢٤١٢	٠.٣٥٠٩	٠.٦١٤٧						
عين النسر							****	٠.٣٠٢٣	٠.٤٥٧٨						
ثل شنان								****	٠.٥٢٤٥						
ثل الذرة									****						
أم العمد															
الجابرية															
جينا															
دربل															
العثمانية															
عزبة															

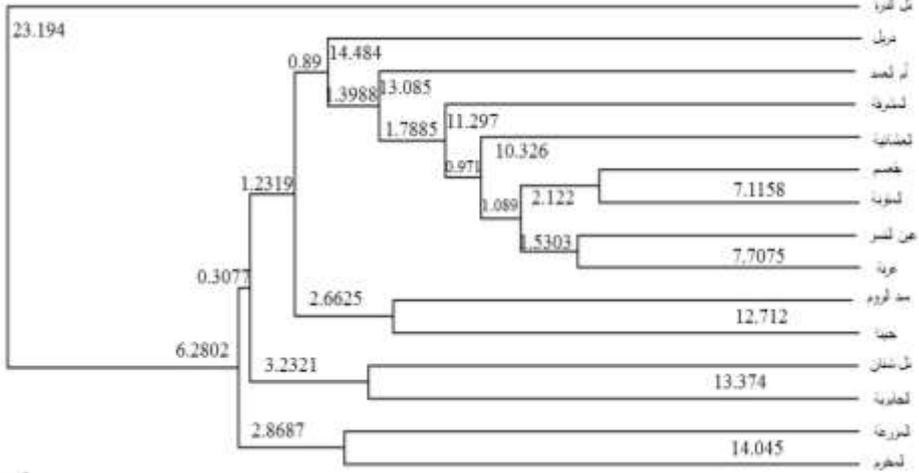
أم العمد	الجابرية	حينا	دربل	العثمانية	عرنة
٣٥٢٠٠	٧٠٣٠٠	١٣٢٠٠	١٣٢٠٠	١٧٨٨٠٠	١١٣١٠٠
٥١٨٠٠	٣٦٢٠٠	٣٥٨٠٠	٣٥٨٠٠	١١١١٠٠	١٧٨١٠٠
٥٥٢٠٠	٣٦٢٠٠	٣٥٨٠٠	١٥٣٠٠	١١٣٢٠٠	١٧٨١٠٠
١٠٣٠٠	٥٧٢٠٠	٥٦٢٠٠	٥٦٢٠٠	١١١١٠٠	٥٤٨٣٠٠
٠٧٨٠٠	١٣٣٠٠	٤٨٣٠٠	٤٨٣٠٠	٥٨٤١٠٠	٦٠٧٨٠٠
٣٥٢٠٠	٤٨٣٠٠	١٣٣٠٠	٤٨٣٠٠	١٣٥٨٠٠	٥٠٦١٠٠
٥٥٢٠٠	١٣٣٠٠	٧٠٣٠٠	٤٨٣٠٠	١١٣٢٠٠	١٣٥١٠٠
٥٥٢٠٠	٨٤٢٠٠	٤٨٣٠٠	٤٨٣٠٠	٥٣٦٨٠٠	١٣٥٨٠٠
٨٠٥٠٠	١٣٣٠٠	٥٦٢٠٠	٦٥٥٠٠	١٠٧٨٠٠	١٤٨٣٠٠
****	٥٦٢٠٠	٥٥٢٠٠	٣٦٢٠٠	١٣٥٨٠٠	١١٣٢٠٠
	****	١٧٢٠٠	١٧٢٠٠	١٧٠٣٠٠	٥٨٤٢٠٠
		****	٥٦٢٠٠	٥٣٦٨٠٠	٦٠٧٢٠٠
			****	٦٠٥١٠٠	١٧٨١٠٠
				****	٥٠٦١٠٠
				****	****

٢.١.١. التحليل العنقودي لذكور *A. crataegi* في المناطق المدروسة:

أجري التحليل العنقودي لتحديد درجة القرابة الوراثية ورسم شجرة القرابة الوراثية بين الذكور ويلاحظ من الشكل (٣) أنّ الذكور قسمت إلى مجموعات عكست درجة القرابة الوراثية فيما بينها.

انقسمت الذكور إلى مجموعتين ضمت المجموعة الأولى الذكور التابعة لمنطقة تل الذرة (حماة) لأنها امتلكت أكبر عدد من الحزم الفريدة والتي بلغت (٧) حزم فريدة، أما المجموعة الثانية فضمت تحت مجموعتين ضمت تحت مجموعة أولى ذكور المزرعة (السويداء) والمخزم (حمص)، أما تحت المجموعة الثانية فانقسمت إلى تحت تحت مجموعة ضمت ذكور تل شنان وذكور الجابرية التابعتين لمحافظة حمص والقرينتان جغرافياً، بينما انقسمت تحت تحت مجموعة ثانية إلى (تحت) ٣ مجموعتين، ضمت الأولى ذكور سد الروم (السويداء) وذكور حينا (جبل الشيخ) التابعتين للمنطقة الجنوبية، أما (تحت) ٢ مجموعة ثانية فانقسمت إلى (تحت) ٤ مجموعتين، ضمت الأولى ذكور دربيل (جبل الشيخ) والثانية انقسمت إلى (تحت) ٥ مجموعتين، ضمت الأولى ذكور أم العمد (حمص) أما الثانية فقد انقسمت إلى (تحت) ٦ مجموعتين، ضمت الأولى ذكور المشرفة والثانية انقسمت إلى (تحت) ٧ مجموعتين، ضمت الأولى ذكور العثمانية والثانية عادت لتتنقسم إلى (تحت) ٨

مجموعتين حيث ضمت الأولى إلى عين النسر (حمص) وعرنة (جبل الشيخ)، أما الثانية فقد ضمت بقعسم (جبل الشيخ) والمتونة (السويداء) التابعتين للمنطقة الجنوبية. وبالتالي لم يخضع التوزع الوراثي لذكور المناطق الجغرافية بل كان هناك تداخل للتوزع الوراثي في المناطق المختلفة.



الشكل (٣). شجرة القرابة بين ذكور المناطق المدروسة حسب البيانات الجزيئية باستخدام برنامج POP GENE32 وبطريقة UPGMA

٢. التوصيف الجزيئي لإنات *A. crataegi*:

تم استخلاص الحمض النووي الريبسي منقوص الأوكسجين DNA من إنات *A. crataegi* وتم تحديد نوعيته ونقاوته على هلامة الأغاروز ٠.٨% الشكل (4)، حيث تراوح تركيز الـ DNA بين ٠.٢٧ إلى ٠.٦٢، ومدد التركيز ليصبح 40 نانوغرام/ميكروليتر، في حين تراوحت نقاوة العينات المدروسة بين ١.٧٨ إلى ٢.٢. جدول (٧)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

الشكل (٤). هلامة الأغاروز بتركيز ٠.٨% المستخدمة لتحديد نوعية الحمض

النووي DNA إنات *A. crataegi*

الجدول (٧). تركيز ونقاوة الـ DNA لإنات *A. crataegi*

رقم العينة	مكان العينة لإنات <i>A. crataegi</i>	النقاوة	تركيز DNA (ug/ul)
١	جبل الشيخ (بقعسم)	١.٩٢	٠.٣٩
٢	السويداء (المتونة)	١.٨٨	٠.٥٠

٠.٤٣	٢.٠٤	السويداء (سد الروم)	٣
٠.٣٦	١.٩٨	السويداء (المزرعة)	٤
٠.٤١	١.٩٧	حمص (المخرم)	٥
٠.٥٥	١.٨٧	حمص (المشرفة)	٦
٠.٥٤	١.٧٨	حمص (عين النسر)	٧
٠.٦٢	١.٩٩	حمص (تل شنان)	٨
٠.٤٤	٢.١	حماة (تل الذرة)	٩
٠.٤٠	١.٩٥	حمص (أم العمدة)	١٠
٠.٢٧	٢.٢	حمص (الجابرية)	١١
٠.٤٣	١.٩٣	جبل الشيخ (حينا)	١٢
٠.٥٣	١.٨٣	جبل الشيخ (دربل)	١٣
٠.٤٢	١.٩٠	حمص (العثمانية)	١٤
٠.٣٧	١.٩٩	جبل الشيخ (عرنة)	١٥

تم استعمال ٢٣ بادئ لتحديد درجة القرابة الوراثية بين الإناث، أعطى منها ١٣ بادئة نتائج تضخيم بتطبيق تقنية ISSR، ولم تعط ١٠ بادئات أي تضخيم لقطعة الحمض النووي الريبسي منقوص الأوكسجين DNA في جميع العينات بالتقنية المستخدمة. كان عدد الحزم الكلية الناتجة عن البادئات الثلاثة عشر (٧٩) حزمة، وقد أعطت البادئة (٣٧-٤٠) أعلى عدد من الحزم حيث بلغت (٩) حزمة، وأعطت البادئات (٢٠-٣٥) حزمة واحدة فقط وهي أقل عدد للحزم. بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية Polymorphic لدى الإناث (١٠٠%)، حيث أعطت جميع البادئات تعددية شكلية بنسبة (١٠٠%).

الجدول (٨). عدد الحزم الكلية لكل بادئ وعدد الحزم المتعددة شكلياً والنسبة المئوية للتعددية الشكلية التي أعطتها عند إناث *A. crataegi* في مناطق الدراسة:

اسم البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتعددة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية
١٥	6	6	100
١٦	6	6	100
١٨	7	7	100
٢٠	1	1	100
٢٢	8	8	100
٣٢	1	1	100
٣٣	8	8	100
٣٤	7	7	100
٣٥	1	1	100
٣٦	8	8	100

100	9	9	37
100	9	9	40
100	8	8	42
100	79	79	

بلغ عدد الحزم الفريدة الكلية عند الإناث ٢٢ حزمة فأعطت جميع البادئات حزم فريدة ماعدا البادئة (٢٠)، أعطت البادئة (٤٢) أكبر عدد للحزم الفريدة التي بلغت (٦) حزم فريدة موزعة على العينات، وظهرت في العينة (٥) التي تمثل منطقة حمص المخرم أعلى عدد للحزم الفريدة التي بلغت (٥) حزم فريدة، حزمة من كل من البادئة (١٦، ٢٢، ٣٢، ٣٣، ٣٤، ٣٥)، وحزمتين من كل من البادئتين (٤٠، ١٥)، بينما لم تظهر أي حزم فريدة لدى العينات (١٤، ١٠، ٤، ١)، وهذا يدل على التنوع الوراثي بين الإناث *A. crataegi* المناطق المدروسة والتي كشف عنها بالبادئات المستخدمة.

الجدول (٩). الحزم الفريدة لكل بادئ على عينات الإناث *A. crataegi* في المناطق المدروسة

المنطقة البادئ	يقسم	المتونة	سد الروم	المزرعة	المخرم	المشرفة	عين النسر	ثل شنن	ثل النزة	أم العمد	الجارية	جنا	تربل	العثمانية	عزبة	مجموع
١٥							+1				+1					٢
١٦					+1											١
٢٠																٠
٢٢												+1				١
٣٢			+1													١
٣٣		+1														١
٣٤													+1			١
٣٥								+1								١
٣٦		+1			+1											٣
٣٧									+1						+1	٣
٤٠					+1	+1										٢

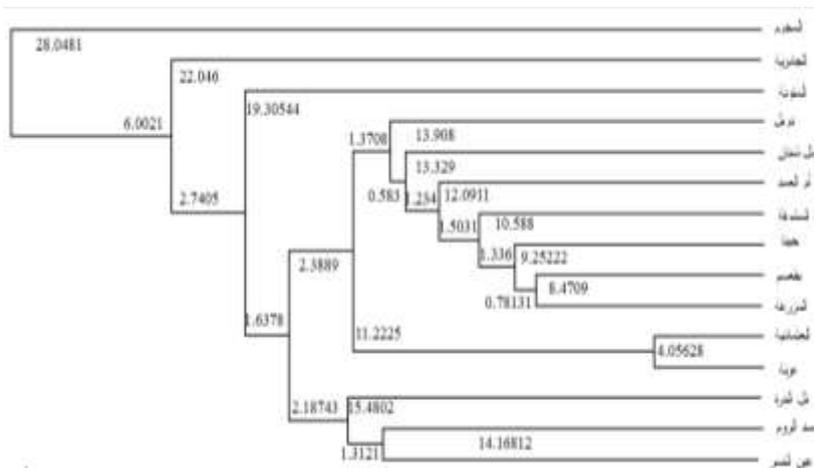
الشكل (٥). هلامة الأغاروز بتركيز ٢% للبادئ ٤٠ لإناث *A. crataegi* في المناطق المدروسة

١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	
بقعسم	المتونة	سد الروم	الغزرة	المخرم	المشرفة	عين	تل شنان	تل الذرة	إم العمدة	الجابرية	حينا	دربل	العثمانية	عرنة

٢.٢.١. التحليل العنقودي لإناث *A. crataegi* في المناطق المدروسة:

أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لتحديد درجة القرابة الوراثية ولرسم شجرة القرابة الوراثية بين الإناث، ويلاحظ من الشكل (6) أن الإناث قسمت إلى مجموعات عكست درجة القرابة الوراثية فيما بينها بناءً على المعلمات الجزيئية التي قامت بتمييز إناث المناطق المدروسة وذلك على المستوى الجزيئي.

انقسمت إناث المناطق المدروسة إلى مجموعتين ضمت المجموعة الأولى إناث منطقة المخرم (حمص) وهي إناث من النمط B وبالتالي فقد انقسم هذا النمط بشكل مستقل عن النمط A المتمثل بالعينات المأخوذة من المناطق الأخرى، كما أنها امتلكت أكبر عدد من الحزم الفريدة التي بلغت (٥) حزم فريدة، أما إناث المجموعة الثانية فقد انقسمت إلى تحت مجموعتين، ضمت الأولى إناث الجابرية (حمص)، أما تحت المجموعة الثانية فضممت (تحت) ١ مجموعة، ضمت الأولى إناث منطقة المتونة (السويداء)، وانقسمت الثانية إلى (تحت) ٢ مجموعتين، انقسمت الأولى إلى (تحت) ٤ مجموعتين، ضمت الأولى إناث تل الذرة (حماة) والثانية انقسمت إلى إناث عين النسر (حمص)، وسد الروم (السويداء)، أما (تحت) ٣ مجموعة الثانية فانقسمت إلى (تحت) ٤ مجموعتين، انقسمت الأولى إلى إناث عرنة (جبل الشيخ) والعثمانية (حمص)، أما الثانية فقد انقسمت إلى (تحت) ٥ مجموعتين ضمت الأولى إناث دربل (جبل الشيخ)، وانقسمت الثانية إلى (تحت) ٦ مجموعتين، ضمت الأولى تل شنان (حمص)، وانقسمت الثانية إلى (تحت) ٧ مجموعتين ضمت الأولى إناث إم العمدة (حمص)، وانقسمت الثانية إلى (تحت) ٨ مجموعتين ضمت الأولى إناث المشرفة (حمص)، وانقسمت الثانية إلى (تحت) ٩ مجموعتين، ضمت الأولى إناث حينا (جبل الشيخ)، وانقسمت الثانية إلى إناث بقعسم (جبل الشيخ)، والثانية المزرة (السويداء).



الشكل (٦). شجرة القرابة بين إناث المناطق المدروسة حسب البيانات الجزيئية

باستعمال برنامج POP GENE32 وبطريقة UPGMA

لم يخضع التوزيع الوراثي للذكور والإناث للتوزيع الجغرافي، حيث تتميز الفراشات *A. crataegi* بأنها فراشات متعددة العوائل فهي تصيب الأشجار التابعة للفصيلة الوردية Rosaceae بالإضافة للفصيلة الصفصافية Salicaceae (Ting and Higgins and Riley, 2004)، كما أنها فراشات كبيرة الحجم (Renxin, 1970)، وتتميز بقدرتها المتوسطة على الطيران (Franzén and Thomas, 1970). وتعد من الفراشات المهاجرة التي تنتقل لمسافات طويلة على شكل أسراب (Sergey and Popov, 1999)، لذا يمكن اعتبار هذه العوامل من العوامل المهمة التي قد تكون سبب لانتشار هذه الفراشة من الشمال إلى الجنوب أو العكس.

كما أن مركز زراعة وتحضير شتول اللوز والتفاح تتم في مشتل المختارية التابع لوزارة الزراعة وبالتالي يرجح أن تكون الشتول المنقولة مع التراب وبقايا النبات مصدر أساسي لنقل يرقات *A. crataegi* الساكنة، لأن هذه الشتول يتم نقلها وتوزيعها وزراعتها قبل بدء تفتح البراعم.

وهذا موافق لما ذكره (Chen et al., 2014) حيث استعمل تقنية ISSR في التوصيف الجزيئي لحشرة *Athetis lepigone* (Lepidoptera: Noctuidae)، وهي من أفات الذرة المهمة في الصين استعمل ٧ بادئات و ١٥ منطقة جغرافية مختلفة أعطت ١٨٣ حزمة منها ١٧٤ حزمة متعددة شكلياً بنسبة

٩٥.٠٨% ولم يكشف التحليل عن وجود علاقة بين التنوع الجيني والقرب الجغرافي، وذكر أنّ النقص في التنوع الوراثي الكبير أو عدم الارتباط مع الموقع الجغرافي يشير إلى احتمال وجود تدفق مرتفع بين المناطق أو توسع الحشرة إلى مناطق جديدة.



المراجع

١. زغيب، ايهاب. (٢٠١٢). دراسة بيولوجية جزيئية لحشرة حفار ساق اللوزيات ذو القرون الطويلة *Cerambyx dux* F. في المنطقة الوسطى والجنوبية من سوريا. جامعة دمشق، (رسالة ماجستير).
٢. شلالو، أمانى. (٢٠١٠). دراسة بيولوجية فراشة اللوز الحرشية *Aporia crataegi* (L) وأعدائها الحيوية في وسط وجنوب سورية. جامعة دمشق، (رسالة ماجستير).
3. Chen, L., and Henry, Y. F. (2010). Behavioral and Electroantennogram Responses of Phorid fly *Pseudacteon tricuspis* (Diptera: Phoridae) to Red Imported Fire Ant *Solenopsis invicta* Odor and Trail Pheromone. *J. Insect Behavior*. 13 (2):110-119.
4. Chen, F., Ahmad, T., Liu, Y., He, K., and Wang, Z., (2014) Analysis of genetic diversity among different geographic populations of *Athetis lepigone* using ISSR molecular markers. *J. Asia-Pacific Entomology*. 17 (4) :793-798.
5. De Leon, J.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(3): 574-585.
6. Dušinsk, R., Kdela, M., Stloukalov, V., and Jedlička, L. (2006). Use of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for discrimination between and within species of blackflies (Diptera: Simuliidae). *Biologia, Bratislava*. 61: 299-304.
7. Franzén, M., and Thomas, R. (2004). Occurrence patterns of butterflies (Rhopalocera) in semi-natural pastures in southeastern Sweden. *J. Nature Conservation*: 12 (2): 121-135.
8. Gui, F. R., Wan, F. H., and Guo, J. Y. (2008). Population genetics of *Ageratina denophora* using intersimple sequence repeat (ISSR) molecular markers in China. *Plant Biosystems*. 142 (2): 255-263.

9. [Higgins, L. G., and Riley, N. D. \(1970\)](#). A Field Guide to the Butterflies of Britain and Europe, Collins, London: 1432-1434.
10. Kang, A.R., Baek, J.Y., Lee, S.H., Cho, Y.S., Kim, W.S., Han, Y.S., and Kim, I. (2011). Geographic homogeneity and high gene flow of the pear psylla, *Cacopsylla pyricola* F. (hemiptera: psyllidae), detected by mitochondrial COI gene and nucle, *Journal Animal cells and systems*. 15(2): 1-9.
11. Khiaban, N.G.M.Z., Hejazi, M.H., Nejad, K.H.I., and Khaghaninia, S. (2010). Genetic variation of geographical population of the Bollworm. *Helicoverpa Armigera* HUBNER (Lepidoptera: Noctuidae), in west and northwest of Iran. *Munis Entomology and Zoology*, 5 (2): 670-676.
12. Meena, R. L., Ramasubramanian, T., Venkatesan, S., and Mohankumar, S. (2005). Molecular characterization of Tospovirus transmitting Thrips populations from India. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 1: 167-172.
13. MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
14. Nagaraju, J., Kathirvel, M., Ramesh, R., Kumar, E., Siddiq, A., and Hasnain, S.E. (2002). Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 5836-5841.
15. Paplauskienė, V., Čeksterytė, V., Pašakinskienė, I., Tamašauskienė, D., and Račys, J. (2006). The use of ISSR method for the assessment of bee genetic diversity. *Biologija*. 3: 16-20.
16. Philips, T. W., Cane, R. P., Mee, J., Chapman, H. M., Hoelmer, K. A., and Coutinot, D. (2002). Intraspecific variation in the ability of *Microctonus aethiopoidea* (Hymenoptera: Braconidae)

- to parasitise *Sitona Lepidus* (Coleoptera: Curculionidae) *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 45: 295–303.
17. Pospiech, A., and Neumann, B. (1995). A versatile quick-prep of genomic-DNA from Gram-positive bacteria. *Trends in Genetics*. 11: 217-218
18. Prasad, M. D., Muthulakshmi, M., Madhu, M., Archak, S., Mita, K., and Negaraju, J. (2005). Survey and analysis of microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: Frequency, distribution, mutation, marker potential and their conservation in heterologous species. *Genetics*. 169: 197- 214.
19. Reddy, K. D., Nagaraju, J., and Abraham, E. G. (1999). Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)- anchored PCR. *Heredity* 83: 681-687
20. Sergey, G., and Popov, A. (1999). Present State of butterfly populations of European threatened species in transcarpathia (SW UKRAINE), Report for VIII European Ecological Congress, (Halkidiki - Greece, September 18-23).
21. Shlalo, A., and Kassis, W. (2016a). Field studies on the black-veined white butterfly, *Aporia crataegi* (L.) infesting almonds in Syria. *Arab Journal of Plant Protection*. 34 (2): 71-81.
22. Shlalo, A., and Kassis, W. (2016b). Biological study of almond butterfly *Aporia crataegi* in central Syria. *Arab Journal of Plant Protection*,. 34(2): 82-94.
23. Shuanglin, J. (2001). Biology of *Aporia crataegi* (L) and its control. *Entomological Knowledge*. 38 (3): 198-199.
24. Ting, J., and Renxin, H. (2004). Preliminary investigation of damage in forest by *Aporia crataegi* and *Nymphalis xanthomelas* in Xinjiang. *Entomological knowledge*. 41 (3) : 238-240.
25. Unruh, T. R., and Woolley, J. B. (1999). Molecular methods in classical biological control, pp. 57- 85. In R. G. Van Driesche and T. S. Bellows, Jr. [eds.], *Biological control*. Chapman & Hall, New York.

26. Vijayan, K., Anuradha, H. J., Nair, C. V., Pradeep, A. R., Awasthia, A. K., Saratchandr, B. S., Rahman, S.A., Singh, K. C., Chakraborti, R., and Raje, S. R. (2006). Genetic diversity and differentiation among populations of the Indian silkworm, *Samia Cynthia ricini*, reversed by ISSR markers. *J. Insect Science*. 6:11-30.
27. Wang, W., Sun, E., Wang, W., Wang, K., Wang, H., and Ge, M., (2016) Effects of habitat fragmentation on genetic diversity and population differentiation of *Liposcelis bostrychophila badonnel* (Psocoptera: Liposcelididae) as revealed by ISSR markers. *J. Stored Products Research*. 68: 80-84.
28. Zietkiewicz, E., A. Rafalski, A., and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 20: 176- 183.