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

أماني جودت شلالو قسم البيولوجيا الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: amannishllalo@yahoo.com

المُلَخَّص

أجريت دراسة الاختلافات الوراثية لحشرة فراشة اللوز الحرشفية *A.crataegi* المجموعة من خمسة عشر منطقة من سورية تنتشر فيها الحشرة، في المنطقة الوسطى والسويداء وجبل الشيخ خلال عام ٢٠٢٣، وذلك بتطبيق تقنيّة ISSR inter-simple sequence repeat، استعمل في التوصيف الجزيئي للذكور ٢٢ بادئ، أعطى منها ١٣ بادئ نتائج تضخيم الـ Deoxyribonucleic acid DNA، واستعمل في التوصيف الجزيئي للإناث ٢٣ بادئ، أعطى منها ١٣ بادئ نتيجة لتضخيم الـ DNA، وقد بلغت التعددية الشكليّة لذكور *A.crataegi* (٩٨,٩٨%)، وسُجلت أعلى درجة قرابة وراثية بين ذكور بقعسم (جبل الشيخ) والمتونة (السويداء)، وبين ذكور بقعسم وعرنة التابعتين لجبل الشيخ، وبالتحليل العنقودي لدرجة القرابة الوراثية تبين أنّ ذكور تل الذرة (حماة) انفصلت في مجموعة منفصلة لوحدها، أما التعدديّة الشكلية للإناث فقد بلغت (١٠٠%)، وسجلت أعلى درجة قرابة وراثية بين إناث العثمانية (حمص) وعرنة (جبل الشيخ)، وبالتحليل العنقودي انفصلت إناث المخرم إلى مجموعة منفصلة لوحدها.

الكلمات المفتاحية: فراشة اللوز الحرشفية، *Aporia crataegi* (L)، الاختلافات الوراثية، سورية.

Genetic differences of black-veined white betterfly *Aporia crataegi* (L) in the areas of its distribution in Syria

Amany Jaudat Shllalo
Department of animal Biology, Faculty of Science-University of Damascus
amannishllalo@yahoo.com

ABSTRACT

The study of genetic differences of *A. crataegi* was conducted from fifteen regions of Syria where the insect is widespread; in the centrai region, Al-Swaida and Jabal Al-Sheikh during 2023, using ISSR inter-simple sequence repeat technique, 22 primers were used for the molecular characterisation of males. Only 13 primers gave DNA Deoxyribonucleic acid amplifying results, and 23 primers were used for the molecular characterisation of females, of which 13 primers gave DNA amplification results. and 23 primers were used for the molecular characterisation of females, of which 13 primers gave DNA amplification results The polymorphism of A. crataegi males reached (98%). The highest degree of genetic relatedness was found between the males of Baqasem (Jabal al-Sheikh) and al-Matuna (Suwayda). Between the males of Baqasem and Arnah of Jabal al-Sheikh, and by cluster analysis of the degree of genetic relatedness, The highest degree of genetic relatedness was recorded between the females of Othmaniya (Homs) and Arnah (Jabal al-Sheikh). By cluster analysis, the females of Makhram were separated into a separate group on their own.

Keywords: *Aporia crataegi* (L), black-veined white betterfly, Genetic differences, Syria

١- المقدمة:

تعّد فراشة اللوز الحرشفية .*Aporia crataegi* L (Lepidoptera– Pieridae) 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 بنهمها 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 [2]. تنشط في ظروف سورية 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 [19]، ومدة الأعمار اليرقية في سورية تختلف باختلاف الظروف المناخية والارتفاع عن سطح البحر[20].

يكون طول اليرقات عند الفقس ١,٤ مم، ويسيطر عليها اللون البني والأصفر، مع وجود طيات عرضيّة 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 [2].

ويبلغ طول العذراء (٢٢– ٢٥) مم وبعرض ٧ مم، وتثبت على أغصان النبات على شكل مجموعات مؤلفة من عدّة عذارى، تبلغ المسافة بين الجناحين منبسطين عند الحشرة الكاملة *A.crataegi* ٦٦–٧٦مم [2].

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 [2].

تعدّ ISSR inter–simple sequence repeat من أهم التقنيات المطبقة في الكشف عن التعدديّة الشكليّة Polymorphism، فهي تتميّز بأنّها ذات كفاءة عاليّة، وبادئاتها متاحة [4]، ولا تتطلب معرفة مسبقة بمجين الكائن المدروس، فالتكرارات البسيطة مثل النكليوتيدات الثنائيّة موجودة في مجينات كل حقيقيات النوى [16]، وهي من التقنيات السريعة والدقيقة في رسم الخرائط الوراثيّة باستعمال كميات قليلة من الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA Deoxyribonucleic acid ، كما أنّها منخفضة التكاليف وتعطي مستويات عاليّة من الاختلافات الوراثيّة بين المجتمعات [23]. وعادة ما يضخم (ISSR) ٢٥– ٥٠ منتجاً في التفاعل الواحد.

إن الفائدة الرئيسة لهذه التقنية هي أنّها لا تتطلب وقتاً طويلاً لبناء المكتبة الوراثية، وهي مناسبة بشكل خاص لدراسات علم الوراثة العرقي وتقييم التنوع الوراثي وتحديد الأصناف [13]. تعطي مؤشرات ISSR عدداً كبيراً من الحزم، ومستوى التعددية الشكلية متوسط إلى عالي، والقدرة على التضخيم متوسطة إلى عالية، والتكاليف منخفضة كما أن جهد تنفيذها منخفض [7].

وتعد طريقة التوصيف الجزيئي مستقلة بيئياً ويمكن استعمالها في تحاليل التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي.

لذا تعدّ الحاجة للمؤشرات الجزيئية للآفات 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 [22]. كما بيّن [5] أهمية استعمال مؤشرات ISSR للتمييز بشكل ناجح بين وضمن أنواع البعوض. وقد استعمل [11] تقنية ISSR لتوصيف *Tospovirus* الذي ينتقل عبر طريق حشرات التربس، وبيّن Philips ورفاقه (٢٠٠٢) أنّ تقنية ISSR أظهرت وجود اختلافاً بين حشرات نبات الفصة *Medicago aethiopoides* الموجودة في فرنسا عن حشرات نفس النوع الموجودة

في هولندا. وكانت نتائج تضخيم ISSR مفيدة لدراسة أنواع (Noctuidae, Lepidoptera) وللدراسة ضمن نفس النوع. واستعملت تقنية ISSR بنجاح في العديد من الدراسات الوراثية على فراشة دودة الحرير *Bombyx mori* (L.) [17]. وطبقت من قبل [9] على بسيلا الأجاص *Cacopsylla pyricola* وأعطت نتائج جيدة. وقد كانت تقنية ISSR الأكثر حساسية عند غربلة طرائق المؤشرات الجزيئية الأربع، وتم استعمال تقنية ISSR على حشرة نطاطا الأوراق (*Homalodisca coagulate*, Cicadellidae, Homoptera) 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 [25].

كما استعملت هذه التقنية في دراسة التنوع الوراثي لدودة لوز القطن الأمريكية *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) حيث جمعت العينات من أقاليم مختلفة من أيران على البندورة، وتمّ استخلاص الـ DNA من اليرقات وأظهرت تقنية ISSR اختلافات وراثية تبعاً لاختلاف المناطق الجغرافية [10].

وتم استعمال ISSR في التوصيف الجزيئي لخمسة أنواع لذبابة Necrophagous وهي أحدى 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 تطبيق طريقة ISSR لتصنيفها وفق مكان تواجدها إلى أربع مجموعات تخصصت كل مجموعة بإصابة المواد المخزونة في مكان محدد (المكاتب، غرف النوم، مستودعات المواد النباتية، مستودعات الطحين) [24].

تناولت عدّة أبحاث سورية استعمال طريقة ISSR في التوصيف الجزيئي للحشرات كالدراسة التي أجراها زغيب (٢٠١٢) لدراسة درجة القرابة الوراثيّة لحشرة حفار ساق اللوزيات ذو

القرون الطويلة (Coleoptera: Cerambycidae) F *Cerambyx dux* في مناطق انتشاره في المنطقة الوسطى والجنوبية من سورية.

٢- هدف البحث:

أظهرت دراسات محلية سابقة [2] وجود اختلافات في الخصوبة واختلافات شكلية واضحة لحشرة *A.crataegi*. فأجريت هذه الدراسة لمعرفة الاختلافات الوراثية بين الذكور والإناث لحشرة فراشة اللوز الحرشفية *A.crataegi* التابعة لمناطق مختلفة من سورية،

٣- مواد وطرائق البحث:

٣-١- موقع الدراسة:

تم جمع بالغات الحشرة المدروسة من الذكور والإناث من سبعة عشر موقعاً تتبع لأربع محافظات في القطر (ريف دمشق، السويداء، حمص، حماة)، تمت عملية الجمع في ذروة نشاط الطيران للحشرة وهو في بداية شهر نيسان عند ذروة الظهيرة باستخدام شبكة الحشرات الطائرة، تم الفصل بين الإناث والذكور اعتماداً على الصفات الشكلية، ووضعت في المجمدة على حرارة −٢٠ C°، يوضح الجدول (1) أماكن أخذ العينات.

الجدول (1). أماكن أخذ عينات *A.crataegi* والإحداثيات الجغرافية للمنطقة:

رقم العينة	المنطقة	المحافظة	الإناث	نمط الأنثى	الذكور	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	السويداء	+	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	حمص	+	B	+	٧٤٥	37°5′E	34°49′N
١٠	المشرفة		+	A	+	٦٣٦	36°51′26″E	34°49′55″ N
١١	عين النسر		+	A	+	٨٧٤	36°55′41″E	34°50′29″ N
١٢	تل شنان		+	A	+	٥٤٢	37°00'18.4 "E	34°41'44.8 "N
١٣	أم العمد		+	A	+	٦٣٤	37°0′35″E	34°48′46″ N
١٤	الجابرية		+	A	+	٥١٢	36°51′21″E	34°47′57″ N
١٥	العثمانية		+	A	+	٦٩٥	37°5′11″E	34°53′3″N
١٦	نوى		-	-	-	٧٨٩	36°59′3″E	34°50′33″ N
١٧	تل الذرة	حماة	+	A	+	٨١٧	36°96′55″E	35°18′26″ N

٣-٢- خطوات البحث:

٣-٢-١- استخلاص الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA: DNA Extraction

أُعطيت 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 [15] مع إجراء بعض التعديلات عليها وفق الخطوات التالية:

- تم عزل الإناث والذكور كلاً على حدة.
- نظفت العينات بمسحها بالماء المقطر والكحول على الوجهين.
- أُزيلت الأجنحة وقرون الاستشعار والأرجل، والبطن واستخدمت فقط عضلات الصدر.

- طحن ٠,٥ غ من كل حشرة (منطقة عضلات الصدر) لذكور وإناث *A. crataegi* ضمن الآزوت السائل في جفنة بورسلان معقمة بالكحول ووضعت في أنابيب Eppendorf سعة ١,٥ مل، وأضيف لها ٧٠٠µL محلول استخلاص SDS المكون من: (200 mM Tris−Hcl pH=8, 250 mM NaCl, 25 mM Na_2−EDTA. pH=8, 0.5% SDS, H2O)، و ٣٥٠ µL أسيتات الصوديوم 3M للأنبوب الواحد، وحركت للمجانسة، ووضعت الأنابيب عند درجة −٢٠ °س لمدة ١٠ دقائق ليتم ترسيب البروتينات واللبتيدات.

– ثفلت الأنابيب بعد التحضين عند سرعة ١٠٠٠٠ rpm مدة خمس دقائق في مثفلة (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 الطافي في أنبوب وأضيف 300µL من الايتانول ٧٠%، وتم التثفيل لمدة ١٠ دقائق عند درجة ٤ °س بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/ الدقيقة.

- أزيلت المادة الطافية بدقة لتجنب أخذ الراسب (DNA)، حلَّت المادة الوراثية DNA المترسب باستعمال محلول TE (Tris, EDTA, PH= 8) ، وأضيف ١٠٠µL من الماء المقطر المعقم وتركت عند حرارة ٤ °س لحين الاستعمال.
- قُدّر DNA الناتج كمياً باستعمال جهاز المطياف الضوئي Ultra Violet Spectrophotometer (Jenway Genova).

حُسبت كمية الحمض النووي DNA من المعادلة التالية [12]

$$\text{تركيز الحمض النووي (ug/ml)} = \frac{\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{(عامل التمديد)} \times 50 \text{ (ug/ml)}}{1000}$$

٣-٢-٢- تضخيم الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA:

أجري تضخيم DNA الناتج من عملية الاستخلاص للعينات المدروسة، حيث كان الحجم النهائي في الأنبوب الواحد ٢٥ µL، متضمنة: Master Mix (Promega) ١٢,٥µL ، 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 (2).

الجدول (2). التسلسل النيكلوتيدي للبادئات المستخدمة بتقنية ISSR للذكور وإناث *A* 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	3	(GA)8CG	52

52	(GA)8T	33	20
52	(CT)8G	34	21
52	(AC)8TCGA	35	22
56	(TC)8C	36	23
٥٢	(CT)10G	٣٧	24
52	(AC)8TT	40	25
56	(AC)8GG	41	26
٥٤	(AC)8AAGG	42	27
52	(TG)8AA	43	28

٣-٢-٣- فصل نواتج تضخيم DNA:

حُدِدَ نجاح التضخيم، بفصل نواتج التضخيم على هلامة الآغاروز ٢% المكونة من (Agarose 2g, TBE 100 ml, 1X) باستعمال جهاز الرحلان الكهربائي Electrophoresis، وأضيفت صبغة 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, H_2O) على pH= 8، 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.

٣-٣- التحليل الاحصائي:

أجري التحليل الإحصائي باستعمال برنامج Popgene 32 الإحصائي. وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV)، ورسمت شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المتزنة (UPGMA) Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging.

٤- النتائج والمناقشة:

٤-١- التوصيف الجزيئي لذكور *A.crataegi* :

٤-١-١- استخلاص الحمض النووي للذكور:

تمّ استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA من ذكور *A.crataegi* ، وتم تحديد سلامته ونقاوته على هلامة الأغاروز ٠,٨% الشكل (١)، 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 (١). هلامة الأغاروز بتركيز ٠,٨% المستخدمة لتحديد سلامة الحمض النووي DNA لذكور *A.crataegi*

تم استعمال ٢٢ بادئ لتحديد درجة القرابة الوراثية بين ذكور المناطق المدروسة، أعطى ١٣ ثلاثة عشر بادئة منها نتائج تضخيم بتطبيق تقنية ISSR، ولم تعطِ 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 المئويّة للتعددية الشكلية Polymophic لدى الذكور (٩٨,٩%)، حيث أعطت جميع البادئات تعدديّة شكليّة بنسبة (١٠٠%) ماعدا البادئة (٣٤) فكانت أقل نسبة للتعدديّة الشكليّة حيث بلغت (٨٥,٧%). الجدول (٣).

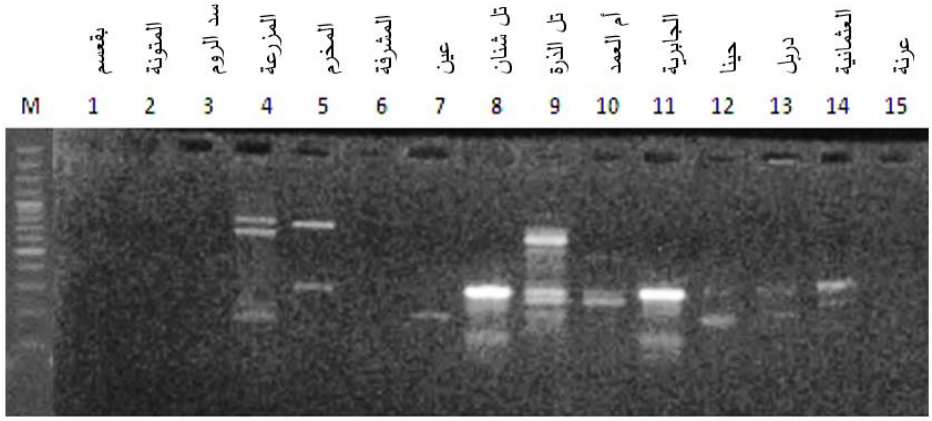
الجدول (٣). عدد الحزم الكليّ لكلّ بادئ وعدد الحزم المتعددة شكلياً والنسبة المئوية للتعددية الشكليّة التي أعطتها عند ذكور *A.crataegi* في مناطق الدراسة

اسم البادئة	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

100	14	14	33
85.70	6	7	34
100	6	6	36
100	12	12	40
100	1	1	41
100	5	5	43
٩٨,٩	97	98	

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 (٢).

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

٤-١-٢- تحديد درجة القرابة الوراثيّة لذكور *A.crataegi* في المناطق المدروسة:

تمت دراسة درجة القرابة الوراثيّة لذكور *A.crataegi* في المناطق المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (Percent Disagrment Value)، حيث يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين العينات المدروسة، تراوح قيم النسب المئويّة لعدم التوافق بالنسبة لبادئات 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 (٤).

جدول (٤). مصفوفة المتوسط العام لنسب عدم التوافق (PDV) الناتجة عن دراسة متوسط التشابه الوراثي لذكور *A.crataegi*

العينة	بقعسم	المتونة	سد الروم	المزرعة	المخرم	المشرفة	عين التنسر	تل شنان	تل الذرة	أم العمد	الجابرية	جبنا	دربل	العثمانية	عرنة
بقعسم	****														
المتونة	٠,١٤٢٣	****													
سد الروم	٠,٢٤١٢	٠,٢٢٨٣	****												
المزرعة	٠,٢٩٤٥	٠,٢٥٤٢	٠,٣٩٥٣	****											
المخرم	٠,٢٩٤٥	٠,٢٥٤٢	٠,٣٣٦٥	٠,٢٦٠٩	****										
المشرفة	٠,٢٢٨٣	٠,٢١٥٥	٠,٣٥٠٩	٠,٣٨٠٣	٠,٣٦٠٣	****									
عين التنسر	٠,٢١٥٥	٠,٢٠٢٩	٠,٢٥٤٢	٠,٢٨٠٩	٠,٢٢٨٣	٠,٢٤١٢	****								
تل شنان	٠,٢٦٧٥	٠,٢٨٠٩	٠,٣٦٥٥	٠,٢٨٠٩	٠,٣٦٥٥	٠,٣٥٠٩	٠,٣٠٢٣	****							
تل الذرة	٠,٤٤١٨	٠,٤٢٦١	٠,٣٣٦٥	٠,٥٢٤٥	٠,٤٥٧٨	٠,٦١٤٧	٠,٤٥٧٨	٠,٥٢٤٥	****						
أم العمد	٠,٢٥٤٣	٠,٢١٥٥	٠,٣٥٠٩	٠,٤١٠٦	٠,٣٨٠٣	٠,٢٥٤٢	٠,٣٥٠٩	٠,٣٥٠٩	٠,٥٠٧٤	****					

الجابرية	٠,٣٠٨ ٣	٠,٢٩٤ ٥	٠,٢٩٤ ٥	٠,٣٨٠ ٣	٠,٤٤١ ٨	٠,٤٢٦ ١	٠,٤٤١ ٨	٠,٢٦٧ ٢	٠,٤٤١ ٨	٠,٣٩٥ ٣	****				
حينا	٠,٢٤١ ٢	٠,٢٥٤ ٢	٠,٢٥٤ ٢	٠,٣٩٥ ٣	٠,٣٣٦ ٥	٠,٤٤١ ٨	٠,٣٠٨ ٣	٠,٣٣٦ ٥	٠,٣٩٥ ٣	٠,٣٥٠ ٩	٠,٣٨٠ ٣	****			
دربل	٠,٢٤١ ٢	٠,٢٥٤ ٢	٠,٤٥٧ ٨	٠,٣٩٥ ٣	٠,٤٢٦ ١	٠,٣٢٢ ٣	٠,٣٣٦ ٥	٠,٣٣٦ ٥	٠,٥٥٩ ٦	٠,٢٩٤ ٥	٠,٣٨٠ ٣	٠,٣٩٥ ٣	****		
العثمانية	٠,٢٢٨٣	٠,١٦٦١	٠,٢٤١٢	٠,٣٢٢٣	٠,٢٦٧٥	٠,٢٥٤٢	٠,٢٤١٢	٠,٢٩٤٥	٠,٣٨٠٣	٠,٢٥٤٢	٠,٣٠٨٣	٠,٢٩٤٥	٠,٣٥٠٩	****	
عرنة	٠,١٤٢٣	٠,١٧٨٢	٠,٢٢٨٣	٠,٣٣٦٥	٠,٢٨٠٩	٠,١٩٠٥	٠,١٥٤٢	٠,٢٥٤٢	٠,٤٢٦١	٠,٢٤١٢	٠,٢٦٧٥	٠,٢٨٠٩	٠,٢٢٨٣	٠,١٩٠٥	****

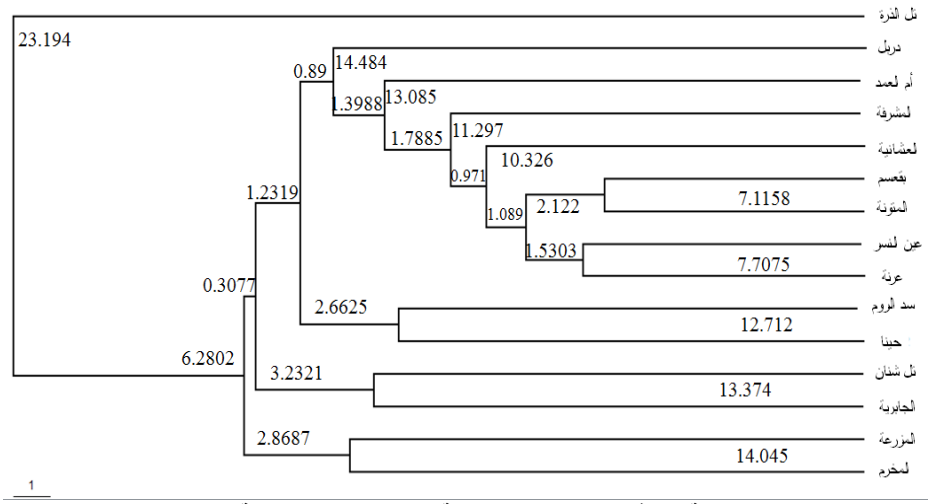
٤-١-٣- التحليل العنقودي لذكور *A.crataegi* في المناطق المدروسة:

أجري التحليل العنقودي لتحديد درجة القرابة الوراثية ورسم شجرة القرابة الوراثيّة بين الذكور ويلاحظ من الشكل (٣) أنّ الذكور قسمت إلى مجموعات عكست درجة القرابة الوراثيّة فيما بينها، تمّ الإشارة للانقسام المجموعة إلى مجموعات أصغر بقوى تعبر عنها.

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) والمخرم (حمص)، أما تحت المجموعة الثانية فانقسمت إلى مجموعة أخرى ضمت ذكور تل شنان وذكور الجابرية التابعتين لمحافظة حمص والقريبتان 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)[٣] مجموعة ثانية فانقسمت إلى (تحت)[٤] مجموعتين، ضمت الأولى ذكور دربل (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 لتنقسم 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 باستعمال برنامج POP GENE32 وبطريقة UPGMA

٤-٢- التوصيف الجزيئي لإناث *A.crataegi* :

٤-٢-١- استخلاص الحمض النووي للإناث:

تمّ استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA من إناث *A.crataegi* وتم تحديد سلامته 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.

الشكل (4). هلامة الأغاروز بتركيز ٠,٨% المستخدمة لتحديد سلامة الحمض النووي DNA إناث *A.crataegi*

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 الريبي 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 Polymophic لدى الإناث (١٠٠%)، حيث أعطت جميع البادئات تعدديّة شكليّة بنسبة (١٠٠%) الجدول (٥).

الجدول (٥). عدد الحزم الكلية لكلّ بادئ وعدد الحزم المتعددة شكلياً والنسبة المئوية للتعدديّة الشكليّة 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
٣٧	9	9	100
٤٠	9	9	100
٤٢	8	8	100
	79	79	100

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،١٤،١)، وهذا يدل على التنوع الوراثي بين الإناث *A.crataegi* المناطق المدروسة والتي كشف عنها بالبادئات المستخدمة.

٤-٢-٢- تحديد درجة القرابة الوراثيّة لإناث *A.crataegi* في المناطق المدروسة:

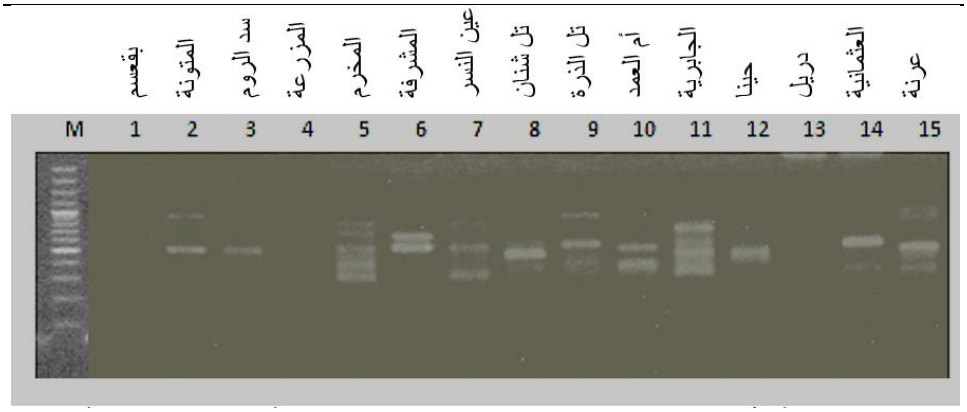
تمت دراسة درجة القرابة الوراثيّة لإناث *A.crataegi* في المناطق المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (Percent Disagrment Value)، حيث يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين العينات المدروسة، تراوحت قيم النسب المئويّة لعدم التوافق بالنسبة لبادئات ISSR بين إناث المناطق المدروسة بين (٠,٠٨١١) بين إناث حمص (العثمانية) وجبل الشيخ (عرنة)، وهذا يدل على درجة قرابة وراثية كبيرة بينهما، و(٠,٦٨٠٢) بين إناث حمص (المخرم) وإناث حمص (عين النسر) وهذا يدل على وجود تباين وراثي كبير بينهما.

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

العينة	بقعسم	المتونة	سد الروم	المزرعة	المخرم	المشرفة	عين النسر	تل شنان	تل الذرة	أم العمد	الجابرية	حينا	دربل	العثمانية	عرنة
بقعسم	****														
المتونة	٠,٢٨٣٤	****													
سد الروم	٠,٣١٨٥	٠,٤١٢٠	****												
المزرعة	٠,١٦٩٤	٠,٣٥٤٨	٠,٣١٨٥	****											

المخرم	المشرفة	عين ال	تل شنان	تل الذرة	أم العمد	الجابرية	حينا	دربل	العثمانية	عرنة
٠,٦٣٠٢	٠,٢٣٢٩	٠,٣٣٦٥	٠,٢٦٦٣	٠,٢٣٢٩	٠,٢٣٢٩	٠,٣١٨٥	٠,١٦٩٤	٠,٣٠٠٨	٠,٢٤٩٥	٠,٣١٨٥
٠,٦٠٦١	٠,٣١٨٥	٠,٤٧٢٦	٠,٤٣١٨	٠,٣٩٢٦	٠,٣٥٤٨	٠,٤٥٢٠	٠,٣٥٤٨	٠,٤٧٢٦	٠,٣٧٣٥	٠,٤١٢٠
٠,٤٣١٨	٠,٣٥٤٨	٠,٢٨٣٤	٠,٣٥٤٨	٠,٣١٨٥	٠,٣١٨٥	٠,٣٧٣٥	٠,٣١٨٥	٠,٣٥٤٨	٠,٣٣٦٥	٠,٣٣٦٥
٠,٦٣٠٢	٠,١٦٩٤	٠,٣٣٦٥	٠,٢٦٦٣	٠,٢٦٦٣	٠,٢٣٢٩	٠,٥١٥٢	٠,٢٠٠٧	٠,٢٣٢٩	٠,٢٤٩٥	٠,٢٤٩٥
****	٠,٦٣٠٢	٠,٦٨٠٢	٠,٥٣٧١	٠,٥٣٧١	٠,٤١٢٠	٠,٥١٥٢	٠,٦٣٠٢	٠,٥٨٢٦	٠,٥١٥٢	٠,٥١٥٢
	****	٠,٤٩٣٧	٠,٣٠٠٨	٠,٣٠٠٨	٠,٣٠٠٨	٠,٥٥٩٦	٠,٢٣٢٩	٠,٢٦٦٣	٠,٢٤٩٥	٠,٢٤٩٥
		****	٠,٣٧٣٥	٠,٣٠٠٨	٠,٣٧٣٥	٠,٣٩٢٦	٠,٣٧٣٥	٠,٤١٢٠	٠,٤٣١٨	٠,٤٣١٨
			****	٠,٣٧٣٥	٠,٢٦٦٣	٠,٤٧٢٦	٠,٢٣٢٩	٠,٣٣٦٥	٠,٣١٨٥	٠,٣٥٤٨
				****	٠,٣٧٣٥	٠,٣١٨٥	٠,٣٣٦٥	٠,٣٧٣٥	٠,٣٥٤٨	٠,٣٥٤٨
					****	٠,٣٩٢٦	٠,٢٠٠٧	٠,٢٦٦٣	٠,٢٤٩٥	٠,٢٨٢٤
						****	٠,٤٣١٨	٠,٥٥٩٦	٠,٤٥٢٠	٠,٤٩٣٧
							****	٠,٢٦٦٣	٠,٢٨٣٤	٠,٣١٨٥
								****	٠,٤٣١٨	٠,٤٧٢٦
									****	٠,٠٨١١
										****

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



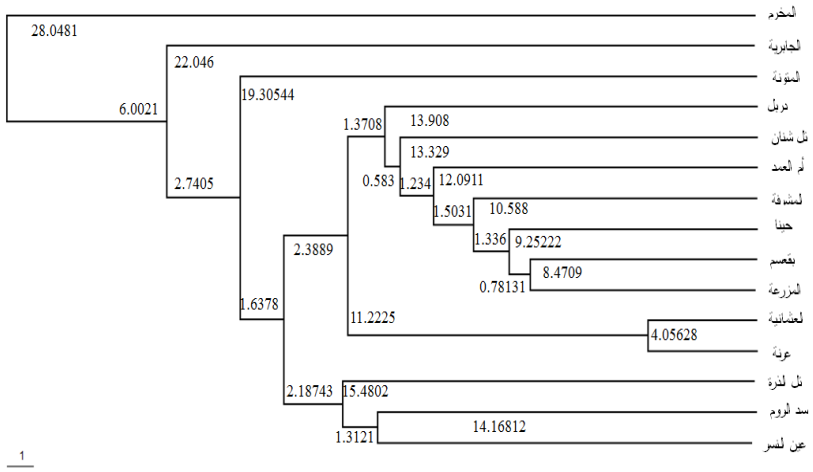
الشكل (٥). هلامة الأغاروز بتركيز ٢% للبادئ ٤٠ لإناث *A.crataegi* في المناطق المدروسة

٤-٢-٣- التحليل العنقودي لإناث *A.crataegi* في المناطق المدروسة:

أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لتحديد درجة القرابة الوراثية ولرسم شجرة القرابة الوراثيّة بين الإناث، ويلاحظ من الشكل (٦) أنّ الإناث قسمت إلى مجموعات عكست درجة القرابة الوراثيّة فيما بينها بناءً على المعلمات الجزيئيّة 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 الأخر، 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 فضمت (تحت)^{٢} مجموعة، ضمت الأولى إناث منطقة المتونة (السويداء)، وانقسمت الثانية إلى (تحت)^{٣} 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 العمد (حمص)، وانقسمت الثاني 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 المزرعة (السويداء).



الشكل (٦). شجرة القرابة بين إناث المناطق المدروسة حسب البيانات الجزيئية باستعمال برنامج POP GENE32 وبطريقة UPGMA

لم يخضع التوزع الوراثي للذكور والإناث للتوزع الجغرافي، حيث تتميز الفراشات *A.crataegi* بأنها فراشات متعددة العوائل فهي تصيب الأشجار التابعة للفصيلة الوردية Rosaceae بالإضافة للفصيلة الصفصافيّة Salicaceae [21]، كما أنها فراشات كبيرة الحجم [8]، وتتميز بقدرتها المتوسطة على الطيران [6]. وتعد من الفراشات المهاجرة التي تنتقل لمسافات طويلة على شكل أسراب في بعض المناطق [18]، 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 أنّ تكون الشتول المنقولة مع التراب وبقايا النبات مصدر أساسي لنقل يرقات *A.crataegi* الساكنة، لأنّ هذه الشتول يتم نقلها وتوزيعها وزراعتها قبل بدء تفتح البراعم،وهذا موافق لما ذكره [3] حيث استعمل تقنية ISSR في التوصيف الجزيئي لحشرة *Athetis lepigone* (Lepidoptera: Noctuidae)، وهي من أفات الذرة المهمة في الصين استعمل ٧ بادئات و١٥ 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.

٥- الاستنتاجات والتوصيات:

أظهرت نتائج التوصيف الجزيئي وجود اختلافات وراثية كبيرة في المنطقة الوسطى في سورية مما يعطي مؤشراً على وجود سلالات جديدة من *A.crataegi*.

مما يستدعي دراسة التسلسل النيكلوتيدي لكامل الجينوم للحشرة بهدف تحديد السلالات المحلية المنتشرة، وتحديد درجة قرابتها مع السلالات الأخرى الموجودة في المناطق المجاورة.

REFERENCES 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، أماني. (٢٠١٠). دراسة بيولوجية فراشة اللوز الحرشفيّة *Aporia crataegi* (L) وأعدائها الحيويّة في وسط وجنوب سورية. جامعة دمشق، (رسالة ماجستير).

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. HIGGINS, L. G., and Riley, N. D. (1970). A Field Guide to the Butterflies of Britain and Europe, Collins, London: 1432-1434.
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
13. 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.
14. 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 aethiopoides* (Hymenoptera: Braconidae) to parasitise Sitona Lepidus (Coleoptera: Curculionidae) New Zealand Journal of Agricultural Research. 45: 295–303.
15. POSPIECH, A., and Neumann, B. (1995). A versatile quick-prep of genomic-DNA from Gram-positive bacteria. Trends in Genetics. 11: 217-218
16. 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.

17. REDDY, K. D., Nagaraju, J., and Abraham, E. G. (1999). Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)- nchored PCR. Heredity 83: 681-687
18. 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).
19. 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.
20. 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.
21. TING, J., and Renxin, H. (2004). Apreliminary investigation of damage in forest by *Aporia crataegi* and *Nymphalis xanthomelas* in Xinjiang. Entomological knowledge. 41 (3) : 238-240.
22. 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.
23. 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.
24. 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

25. 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.