SCIENCE PRESENTATION SERIES

BY

Dr. Rabab A.A. El-Mergawy

© All rights reserved

المؤتمر القومي لمكافحة آفات النخيل في الوطن العربي

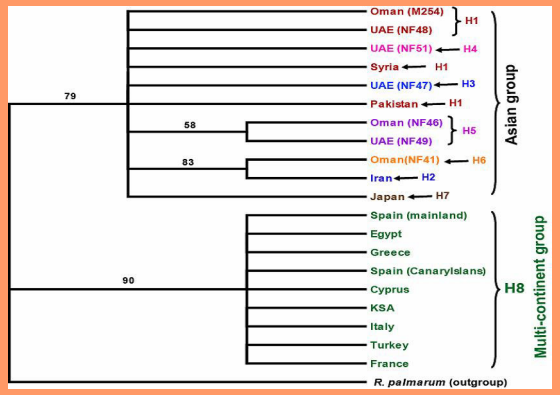
الامارات العربية المتحدة-23-25 سبتمبر

تطبيقات التكنولوجيا الحيوية الجزيئية علي سوسة النخيل الحمراء
(التنوع الوراثي و العلاقات الفيلوجينية)

حصر للدراسات التي تتناول التنوع الوراثي لسوسة النخيل الحمراء و العلاقات الفيلوجينية بين بعضها البعض و بين أنواع أخري من السوس التابعة لجنس الرينكوفورس

مقدمتها

د/ رباب عبد الله عبد العزيز المرجاوي



REFERENCES

Rabab A.A. El-Mergawy (2011). Studies on the molecular diversity and geographical distribution of the invasive species Rhynchophorus ferrugineus. Ph.D. Thesis, Molecular Biology Department, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute (GEBRI), Minoufia University: Egypt p. 126.

Rabab A.A. El-Mergawy (2012). Survey of Genetic variation, Phylogenetic analysis of Red Palm Weevil (RPW) *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in Middle-East and Mediterranean Basin and Phylogenetic Relationships among *Rhynchophorus ferrugineus* and Other Four *Rhynchophorus* Species. 1st Regional Conference on Palm Pests& Diseases management in the Arab Region, Alainm EAU, September 23-25, 2012.

مقدمة

INTRODUCTION

التكنولوجيا الحيوية التقليدية Traditional Biotechnology

استخدام الكائن الحي و منتجاته للحصول علي منتجات صناعية:

#عمليات التخمير
#مضادات حيوية
#لقاحات
#منظفات
#تربية تقليدية للنبات أو الحيوان

تعمل علي مستوي الخلية, النسيج أو الكائن الحي

التكنولوجيا الحيوية الحديثة Modern Biotechnology

مجموعة من الأدوات المتاحة (معلومات, تقنيات, أدوات, أجهزة.....الخ) والتي تشترك في خاصيتين:

#تتعامل مع الكائن الحي نفسه, منتجاته أو مكوناته
#لها تطبيقات عديدة تهدف لتحسين الحياة

كيف تعمل التكنولوجيا الحيوية الحديثة ؟؟؟
How does modern biotechnology work???

الكائن الحي..... خلايا.....مادة وراثية.....جين.....بروتين

الزراعة و العلاقة السلبية بالحشرات

تهدف الزراعة لتوفير غذاء صحي كافي مع عدم الاضرار بالبيئة

من معوقات تحقيق هذا الهدف: الآفات الحشرية

من تطبيقات التكنولوجيا الحيوية الحديثة علي الآفات الحشرية

دراسة التنوع الوراثي

Genetic, Gene , DNA Diversity and or Biodiversity

الخطوات:

الكشف عن التنوع الوراثي:

::::: البيولوجيا الجزيئية:::::: المشخصات الجزيئية

قياس التنوع الوراثي:
:::::الأحصاء:::::

استكشاف نماذج التنوع أو علاقات القرابة الوراثية :
:::::القيلوجينيا:::::

تفسير التنوع:
:::::وراثة عشائر:::::

7

من تطبيقات التكنولوجيا الحيوية الحديثة علي الآفات الحشرية

دراسة التنوع الوراثي

Genetic, Gene , DNA Diversity and or Biodiversity

الكشف عن التنوع الوراثي:

#مشخصات جزيئية تعتمد علي الحامض النووي منقوص الأكسجين

DNA Based Molecular Markers

تنقسم حسب طريقة الكشف لثلاثة طرق:

a. Hybridization التهجين

b. PCR تفاعل البلمرة المتسلسل

c. Sequencing تحديد التتابعات النيوكليوتيدية

8

أهمية دراسة التنوع الوراثي للآفة الحشرية الغازية

تعتبر خطوة أساسية قبل التحقق من الأسس الوراثية لأقلمتها السريعة و بالتالي معرفة أسباب نجاح عملية الغزو.

تعد معرفة وجود تنوع وراثي من عدمه مطلب هام قبل تطوير استراتيجية مكافحة فعالة للآفة .***

النموذج البيولوجي

سوسة النخيل الحمراء

CLASSIFICATION

Red Palm Weevil

Rhynchophorus ferrugineus (Olivier)

Order: Coleoptera

Family: Curculionidae

Subfamily: Dryophthorinae (Rhynchophorinae)

Genus: *Rhynchophorus*

Species: *ferrugineus*

أهمية دراسة الآفة

تهاجم السوسة العديد من أنواع النخيل (17 نوع) مسببة أضرارا اقتصادية.

قدر المعدل المتوسط للإصابة السنوية بسوسة النخيل الحمراء في منطقة الشرق الأوسط بحوالي 1.9.

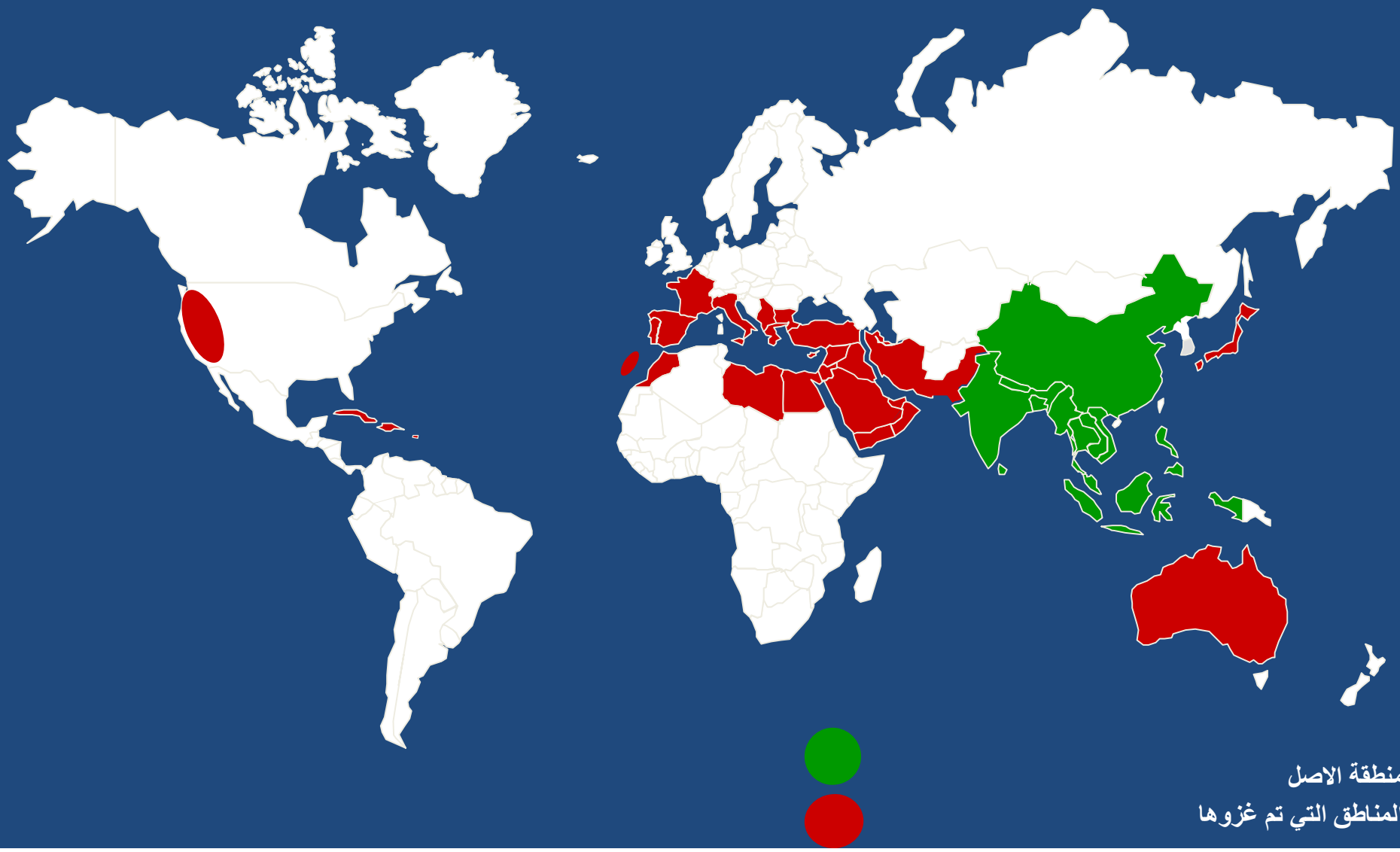
تسببت الإصابة بالسوسة في فقد 90% من النخيل المصاب في شبه الجزيرة العربية .

انخفض الإنتاج في بعض المناطق المصابة من 0.7-10 طن/هكتار.
نظراً للأهمية الاقتصادية لتلك الآفة فمن الأهمية معرفة تاريخ الغزو لها وكذا فهم العلاقات الوراثية بين عشائرها المختلفة.

دورة حياة سوسة النخيل الحمراء -4 أجيال في السنة مدة الجيل حوالي 82 يوم

دورة حياة سوسة النخيل الحمراء
45-298 يوم
من الممكن ملاحظة عدة اجيال متداخلة داخل النخلة المصابة

التوزيع الجغرافي لسوسة النخيل الحمراء



أسباب نجاح، خطورة و صعوبة مقاومة سوسة النخيل الحمراء

تواجد كافة اطورها مختفية داخل النخلة بعيدا عن الظروف الجوية المعاكسة أو الكشف عنها.
#تعدد اجيالها في السنة.
ليس لها بيت شتوي.
قدرتها التكاثرية العالية.
قدرة الانثى على حفظ الاسبرمات وإنتاج بيض حيوي.
قدرتها العالية على الطيران ما يساعدها على الانتشار.

مقاومة سوسة النخيل الحمراء

من الخبرات العملية وجد أنه للسيطرة علي تلك الآفة يجب استخدام كل الطرق الممكنة للمكافحة في تناغم, كل في وقته المناسب فيما يعرف بالمكافحة المتكاملة للآفات

Integrated Pest Management (IPM) و تتضمن طرق وقائية و طرق علاجية.

الموضوع الرئيسي

THE PRINCIPAL SUBJECT

تطبيقات البيوتكنولوجيا الجزيئية علي سوسة النخيل الحمراء

التنوع الوراثي لسوسة النخيل الحمراء و العلاقات الفيلوجينية بين بعضها البعض و بين أنواع أخري من السوس التابعة لجنس الرينكوفورس

تم حصر 10 أبحاث تناولت التنوع الوراثي و التنوع الجغرافي وتاريخ الغزو الوراثي لعشائر جغرافية مختلفة من السوسة تم جمعها من بلاد مختلفة تابعة لمنطقتي الشرق الأوسط و حوض البحر الأبيض المتوسط. تم أيضاً عمل مقارنة وراثية بين سوسة النخيل وأربع أنواع أخرى تابعة لنفس الجنس رينكوفورس.

Abulyazid *et al*. (2002)
Salama and Saker (2002)
Hallett *et al*. (2004)
Gadelhak and Enan (2005)
Al-Ayied *et al*. (2006)
El-Mergawy (2011)
Capdevielle-Dulac *et al*. (2012)

الكشف عن التنوع الوراثي

تم استخدام مشخصات جزيئية مختلفة تعتمد علي الحامض النووي منقوص الأكسجين

DNA Based Markers

*** مشخصات جزيئية تعتمد علي تحديد التتابعات النيوكليوتيدية:

***Sequence- Based Markers

*أجزاء من الجينات الميتوكونديرية

*Mitochondrial DNA markers: CO1 and Cytb genes.

*الدنا الريبوسومي

*rDNA- ITS2.

*** مشخصات جزيئية تعتمد علي تفاعل البلمرة المتسلسل:

***PCR - Electrophoresis Based Markers

*تقنية التضاعف العشوائي (الرابد)

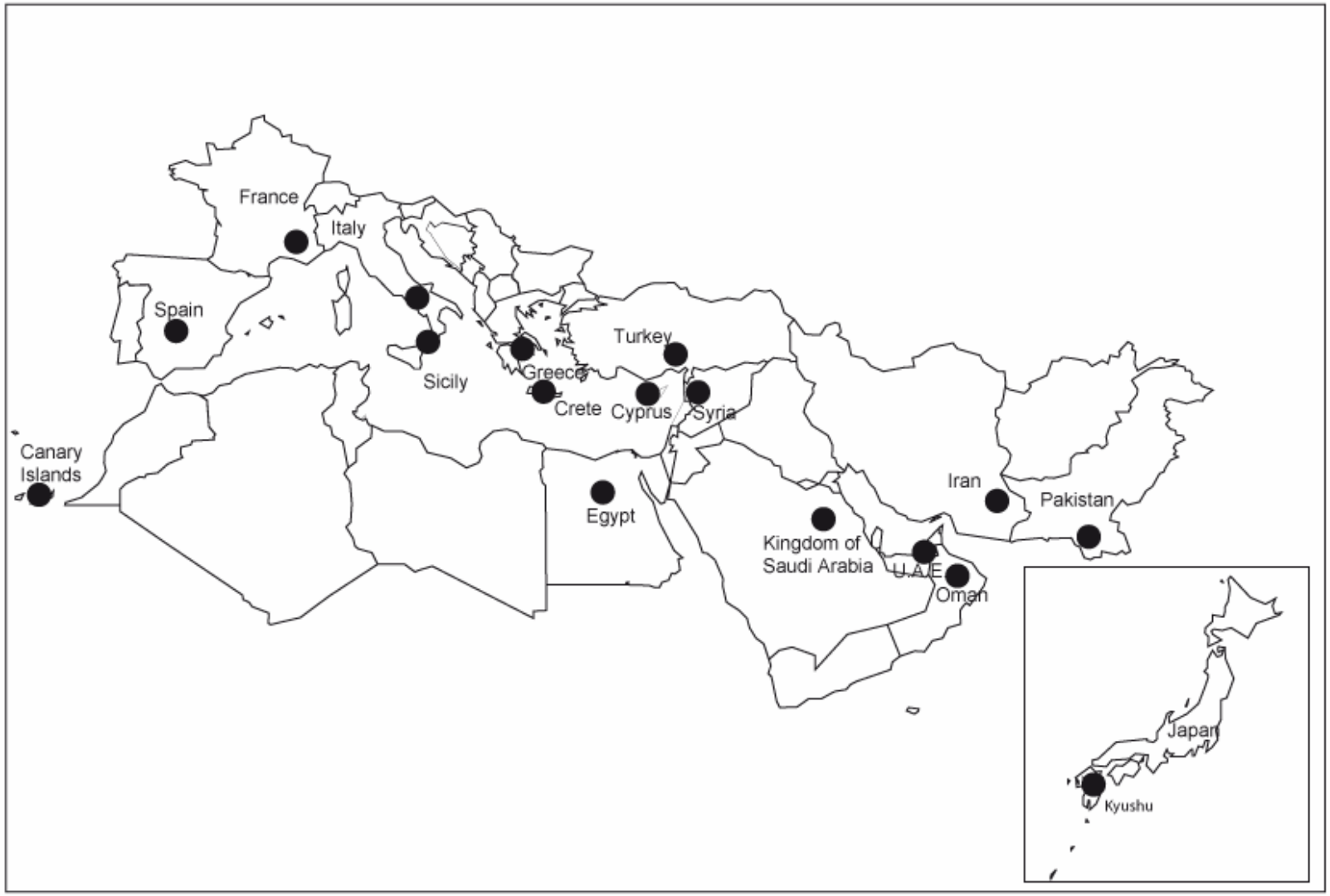
*Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

التنوع الوراثي علي المستوي الميتوكونديري و تاريخ الغزو لعدد من عشائر سوسة النخيل الحمراء من الشرق الأوسط و حوض البحر الأبيض المتوسط

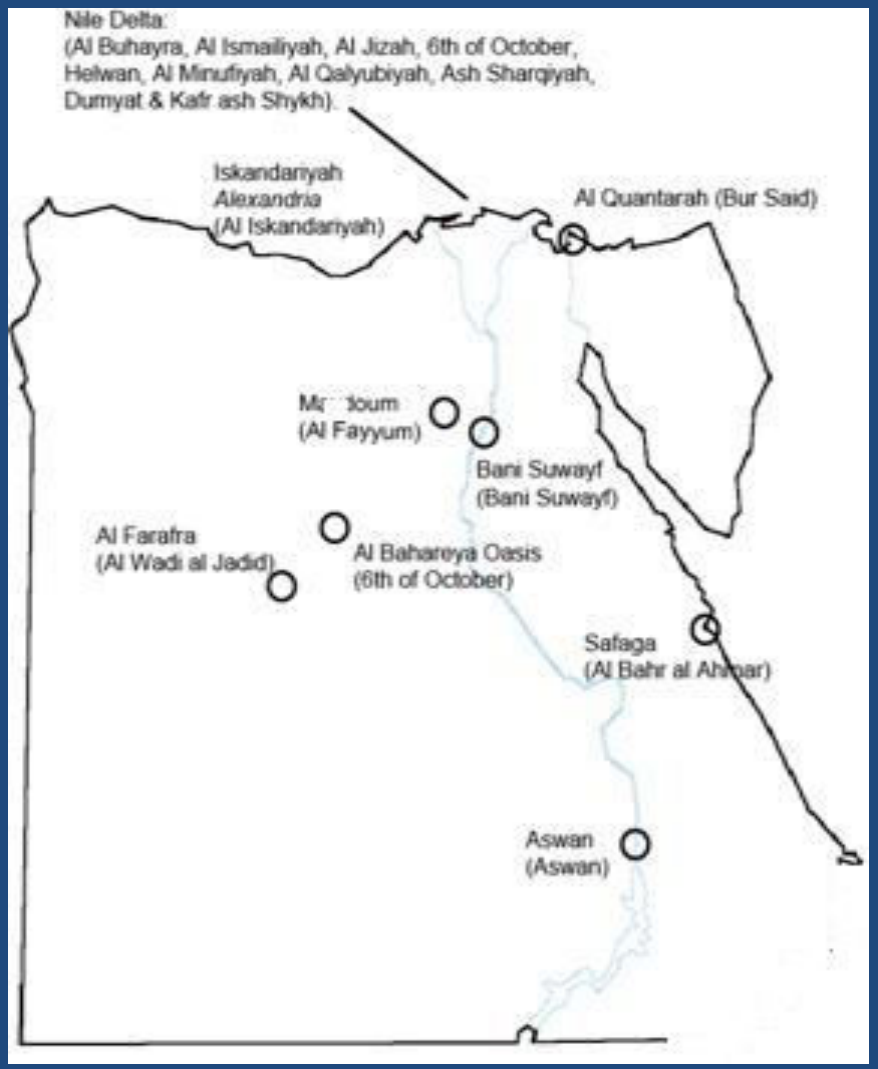
Mitochondrial Genetic Variation and invasion History of Red Palm Weevil (RPW) *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in Middle-East and Mediterranean Basin

(El-Mergawy, 2011)

خريطة جغرافية توضح أماكن جمع عينات سوسة النخيل الحمراء من البلاد المختلفة



خريطة جغرافية توضح أماكن جمع عينات
سوسة النخيل الحمراء
من محافظات مصر المختلفة.
مصدر الأسماء: الوكالة المركزية للتعبئة و الاحصاء:
http://www.citypopulation.de/Egypt.html



21

تم استخدام مشخصات جزيئية تعتمد علي الحامض النووي منقوص الأكسجين

DNA Based Markers

*** مشخصات جزيئية تعتمد علي تحديد التتابعات النيوكليوتيدية:

***Sequence- Based Markers**

*أجزاء من الجينات الميتوكونديرية

***Mitochondrial DNA markers: CO1 and Cytb genes.**

استخراج الجينوم الكلي

تفاعل البلمرة المتسلسل

تنقية نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل

تحديد التتابعات

تحليل التتابعات

حساب مقاييس التنوع المختلفة

تصميم الأشكال الفيلوجينية

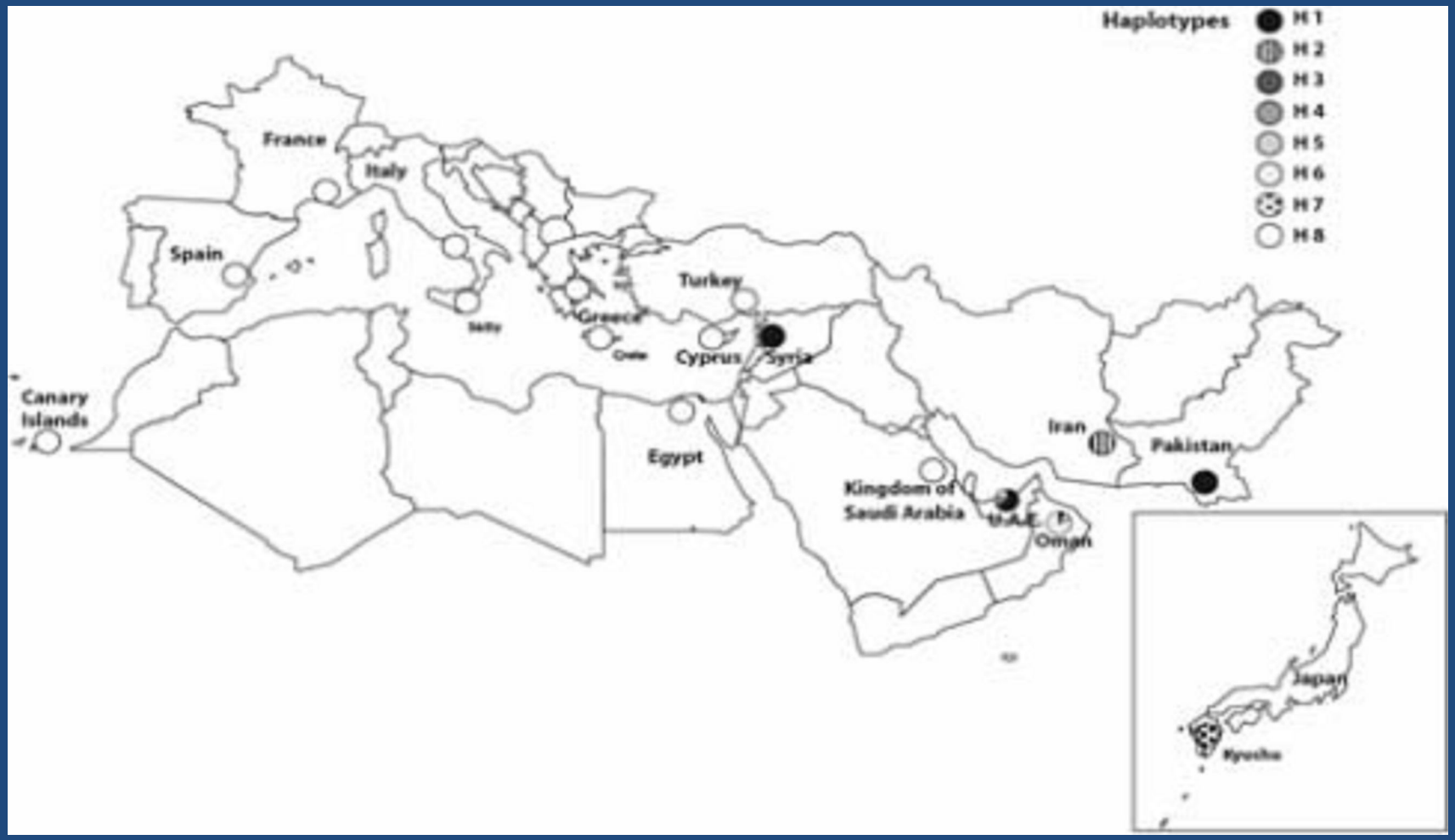
حساب المقاييس الديموجرافية

أهم النتائج	CO1	Cytb
عدد المواقع المتضاعفة	600 bp	550 bp
عدد المواقع المدروسة	546 bp	440 bp
تنوع وراثي بين العشائر	نعم 8 طرز أحادية H1-H8	نعم 3 طرز أحادية HB1-HB3
نوع التنوع	استبدالات نيوكليوتيدية	استبدالات نيوكليوتيدية
المواقع المتغيرة	23 (4.2%)	16 (4.2%)
الطفرات	24	16
الاختلافات الثابتة	1-17	2-15
التنوع الكلي للطرز الأحادي	متوسط	
التنوع النيوكليوتيدي الكلي	ضعيف	
التنوع النيوكليوتيدي بين العشائر	ضعيف	
AT : GC	AT bias حياد اتجاه ا ت	
نسبة التغيرات المتشابهة/المختلفة	انحياز للتغيرات المتشابهة كما	

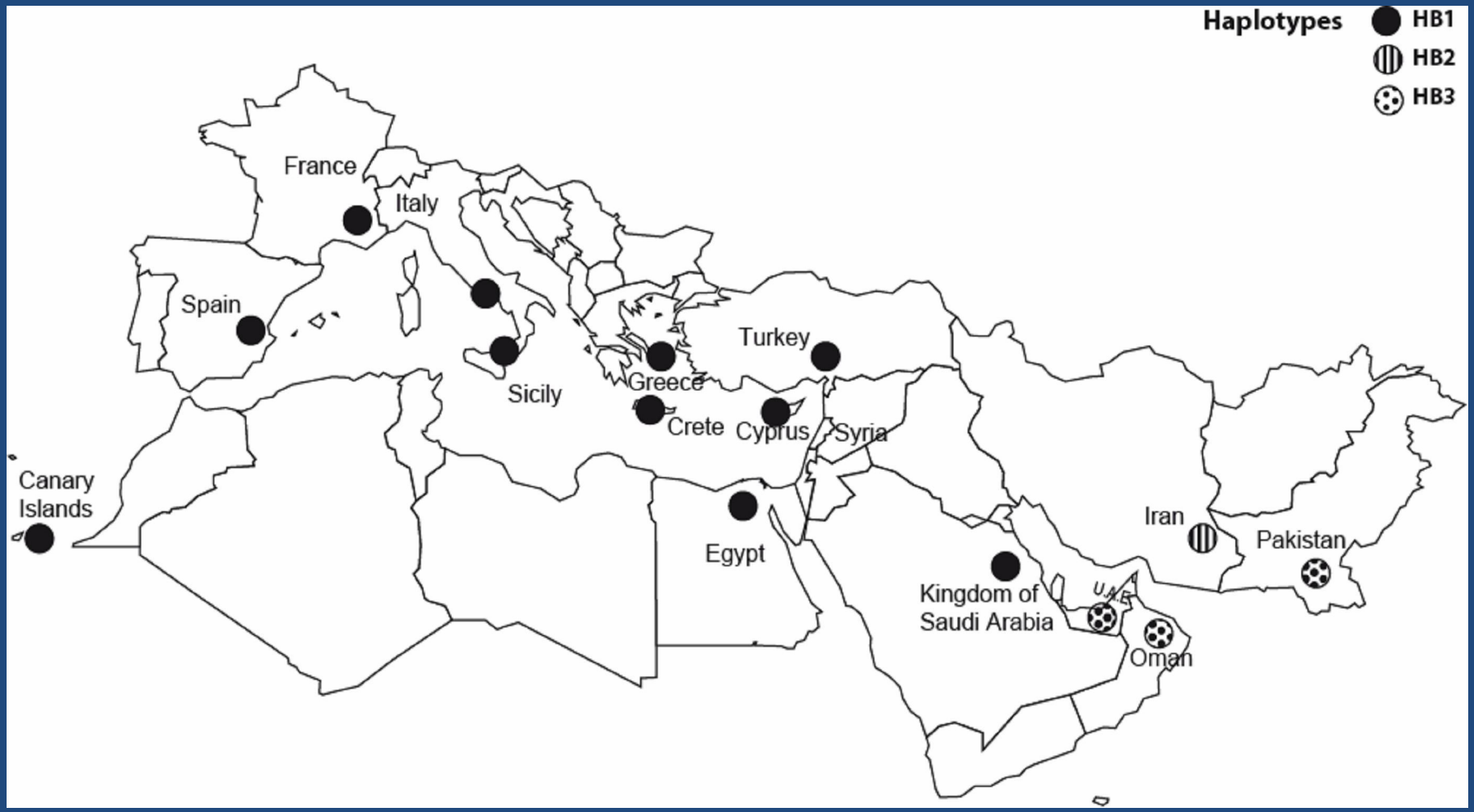
Cytb	CO1	أهم النتائج
لا	نعم UAE: H1,3,4,5 Oman: H1,5,6	تنوع وراثي داخل العشائر
UAE: 1 nt different between each haplotype Oman: 3 nt different between H5 & H6 4 nt different between H1 & H6		مواقع الانعزال
متوسط		تنوع الطرز الأحادي
ضعيف		التنوع النيوكليوتيدي

الانتشار الجغرافي للطرز الأحادية و علاقتها بعدد و طبيعة الادخالات

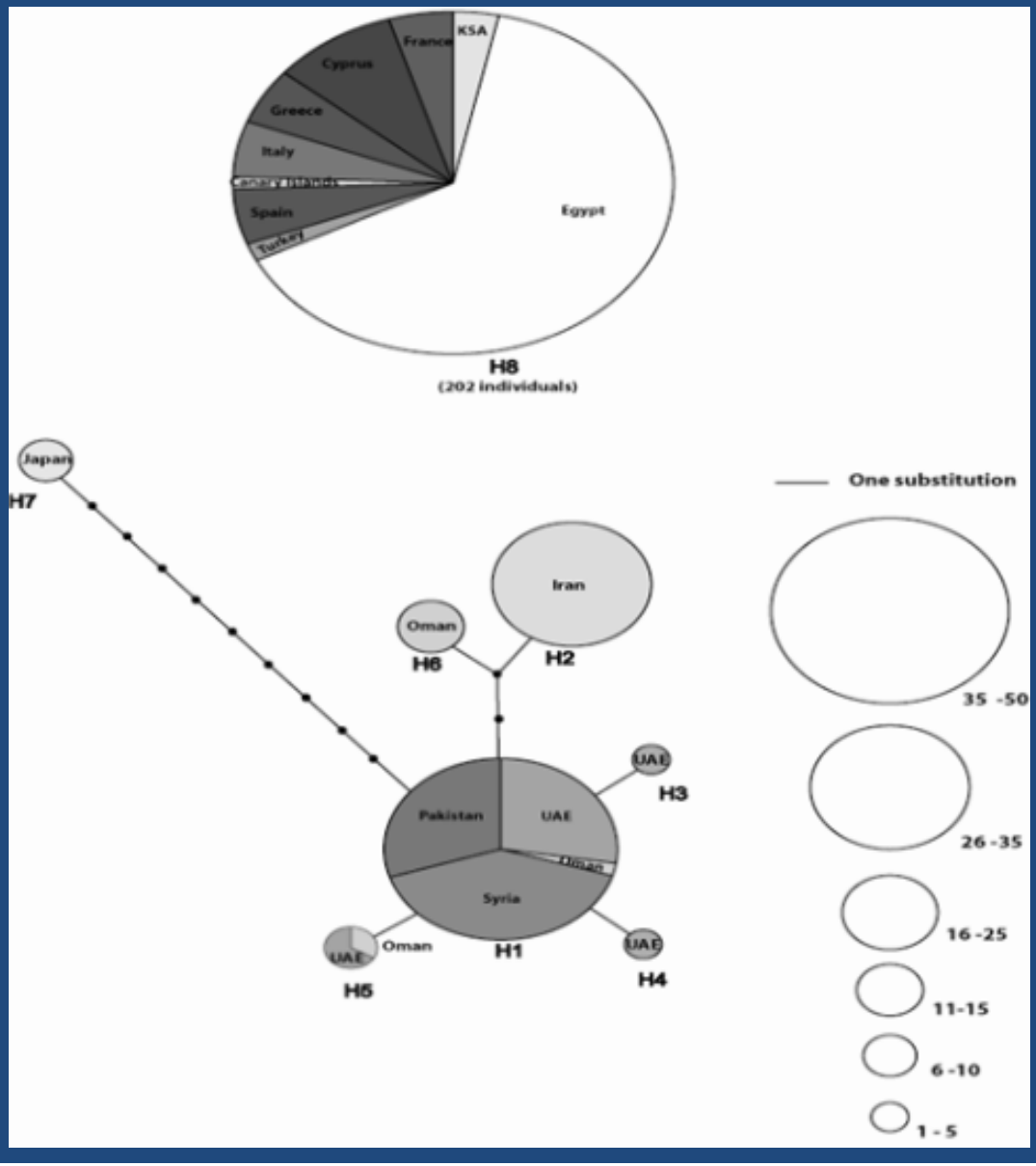
خريطة جغرافية توضح أماكن جمع عينات سوسة النخيل الحمراء و توزيع الطرز الأحادية لجين الكو1المكتشفة.
يوضح كل تظليل طرز أحادي مختلف
CO1: كو1, H1-H8: ط1-ط8



خريطة جغرافية توضح أماكن جمع عينات سوسة النخيل الحمراء و توزيع الطرز الأحادية لجين السيت ب المكتشفة.
يوضح كل تظليل طرز أحادي مختلف
Cytb: سيت ب, HB1-HB3: طب1-طب3



الشبكة الجغرافية (95% بارسيموني) للطرز الأحادية لسوسة النخيل الحمراء.
يوضح حجم كل دائرة عدد العينات. يوضح كل تظليل عينات جغرافية مختلفة.
تمثل الطرز الأحادية المندثرة أو التي لم يتم حصرها. يمثل كل جزء من الخط طفرة نيوكليوتيدية

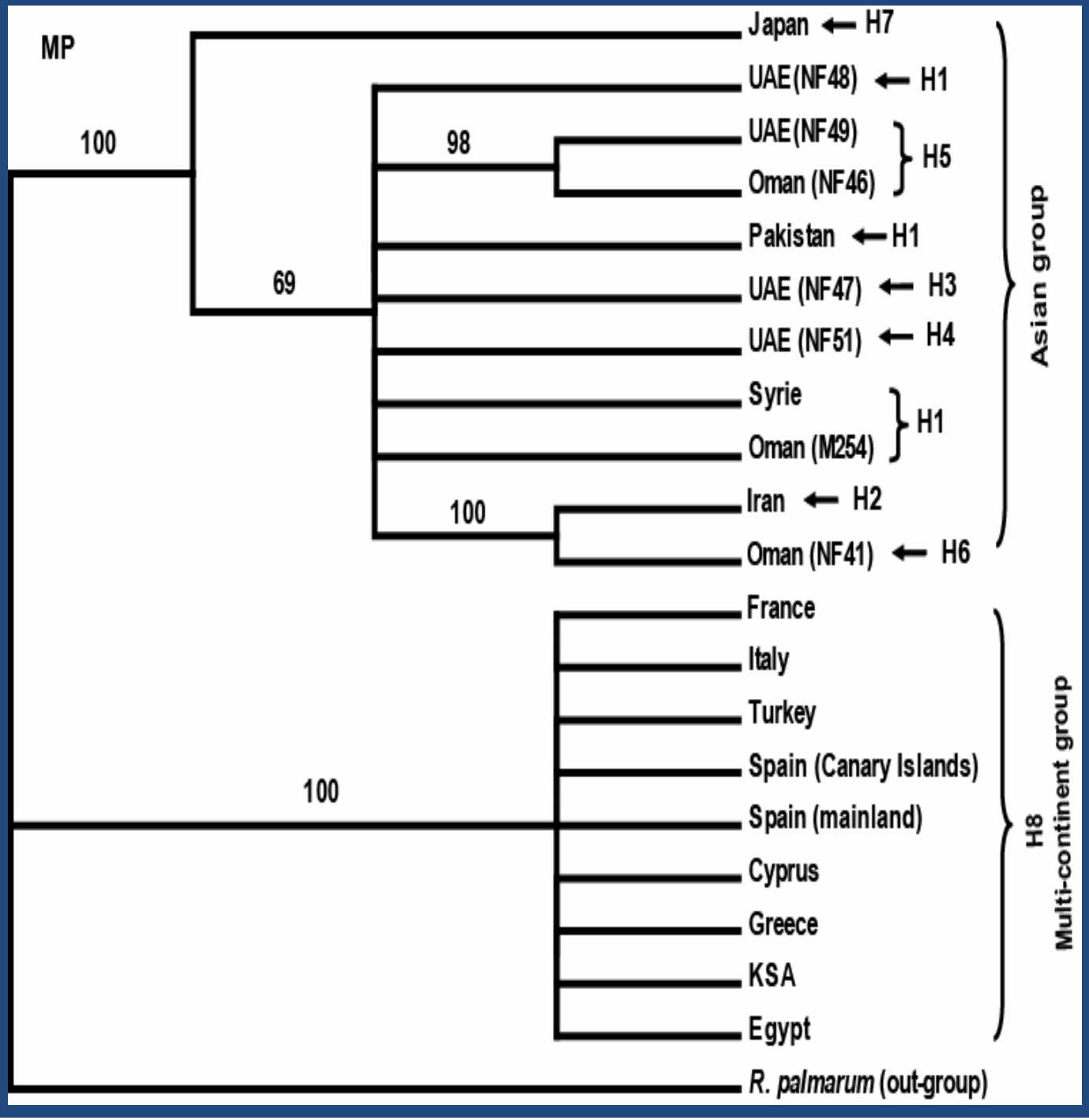


المسافات الوراثية و العلاقات الفيلوجينية بين الطرز الأحادية و بعضها البعض

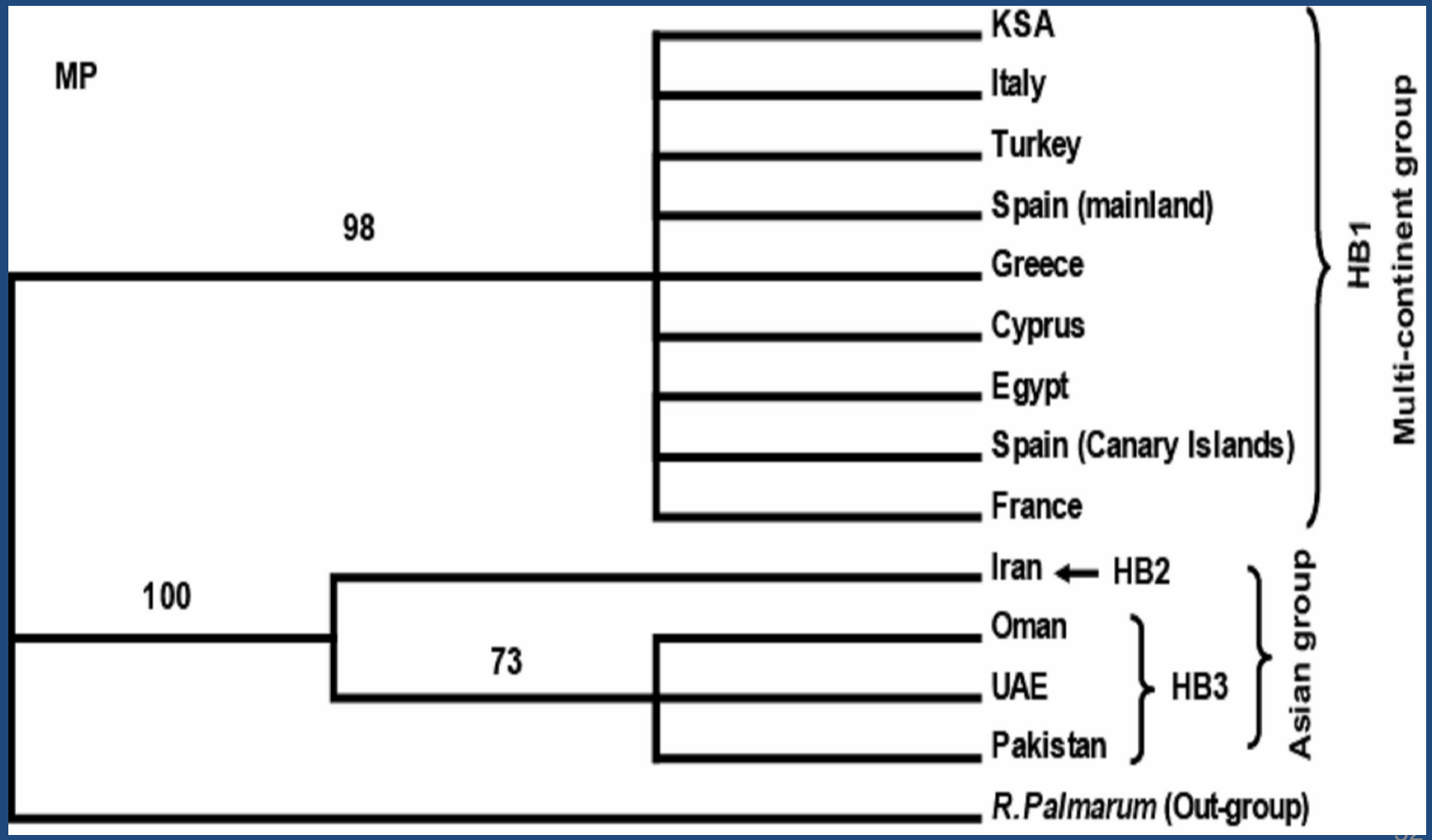
الشجرة الفيلوجينية للطرز الأحادية. توضح الافتراضات الفيلوحينية بين الطرز الأحادية لجين الكو1المكتشفة. يظهر فوق الخطوط قيم التكرارات المدعمة (1000 تكرار).

H1-H8: ط1-ط8

7 parsimonous sites



الشجرة الفيلوجينية للطرز الأحادية. توضح الافتراضات الفيلوحينية بين الطرز الأحادية لجين السيت ب المكتشفة.
يظهر فوق الخطوط قيم التكرارات المدعمة (1000 تكرار)
Cytb: سيت ب , HB1-HB3: طب1-طب3
16 pqrsimonous sites



Demographic analysis		
Parameter	**Value**	**Explanation**
Tajima's parameter D	+	a recent founder event
*F*ST	0.98	signified the absence of gene flow..... Support the bottleneck event
Nm	**0**	signified the absence of gene flow..... Support the bottleneck event

التفسير التطوري و الديموجرافي لتوزيع التنوع الوراثي الحالي

أوضحت قيم التمايز الوراثية, تدفق المورثات و اختبارات تاجيما للحيادية أن عشائر سوسة النخيل الحمراء التي تم دراستها تشعبت وراثيا تحت تأثير الجرف الوراثي خلال العديد من الأحداث التأسيسية.

تناقضات

لم يظهر في السعودية أي من الطرز المكتشفة في الدول المجاورة بل اكتشف بها الطرز الغازي.

لم يظهر في سوريا الطرز الغازي رغم أنها واقعة علي حوض البحر الأبيض المتوسط.

بالرغم من أنه لا يوجد حدود فاصلة بين باكستان و الهند (الأصل الجغرافي المحتمل) إلا أن العينات المجموعة من باكستان لم تظهر تنوع وراثي حيث اكتشف طرز أحادي واحد.

الخلاصة

يقترح من المسافات الوراثية و زمن تشعب التتابعات النيوكليوتيدية بين الطرز الأحادي الغازي التابع للمجموعة متعددة القارات و باقي الطرز الأحادية التابعة للمجموعة الآسيوية, أن سوسة النخيل الحمراء سلكت 3 طرق مختلفة أثناء غزوها من منطقة الأصل إلي الدول التي تم غزوها:

طريق للشرق حيث الطرز الأحادي ط 7 المكتشف في اليابان

طريقان للغرب أحدهما لمنطقة البحر الأبيض المتوسط حيث تم اكتشاف الطرز الأحادي الغازي و الآخر لمنطقة الشرق الأوسط حيث تم اكتشاف 6 طرز أحادية (2 طرز أحادي في حالة سيت ب)

بدوره الطريق الأخير تفرع لطريقين أحدهما حيث ط2 أو طب2 الإيراني و الآخر لباقي الطرز. ترتبط تلك الطرق بأنسال وراثية لكل منهم تاريخ تطوري منفصل.

أوضحت المسافات الوراثية و زمن تشعب التتابعات النيوكليوتيدية بين الطرز الأحادية المختلفة و من الفترة الزمنية التي تم بها الغزو أن الطرز تطورت في منطقة الأصل قبل غزوها للبلاد المختلفة.

يمكن ترتيب الطرز الأحادية من حيث قربها الوراثي من الطرز الأحادي الغازي بحسب المسافات الوراثية و زمن تشعب التتابعات النيوكليوتيدية كالآتي:
ط8.....(ط3&ط5).....ط1.....(ط2,ط4&ط6).....ط7 .كما يمكن ترتيب الطرز الأحادية داخل المجموعة الآسيوية من حيث قربها الوراثي من الطرز الياباني كالآتي: ط7....ط1..... (ط3, ط4&ط5).....ط2.....ط6

35

التنوع الوراثي على المستوى النووي

Genetic Variation Using ITS2-rDNA

(El-Mergawy, 2011)

تم في هذه الدراسة استخدام مشخصات جزيئية تعتمد علي تحديد التتابعات النيوكليوتيدية للحامض النووي منقوص الأكسجين (الدنا) و تتبع الجينوم النووي. تلك المشخصات الجزيئية عبارة عن أجزاء من الحامض النووي منقوص الأكسجين ITS2-rDNAالريبوسومي الغير وظيفي .

لم يكشف إستخدام المشخصات النووية عن وجود تنوع وراثي يرجع لعملية تطور توافقية قوية.

عزل بادئات الميكروستالايت من سوسة النخيل الحمراء

Development of microsatellite markers for the red palm weevil (RPW)

Rhynchophorus ferrugineus

تم عزل 15 ميكروستالايت من الحامض النووي لسوسة النخيل الحمراء.

هناك تجارب للكشف عن التنوع الوراثي باستخدام تلك البادئات.

ا ستخدام تقنية التضاعف العشوائي
Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

نجحت تقنية التضاعف العشوائي (الرابد) في الكشف عن التنوع الوراثي بين أفراد سوسة النخيل الحمراء سواء من منطقة واحدة أو بين عدة مناطق و كذا الكشف عن التنوع الوراثي بين الأشكال المورفولوجية المختلفة. وكذا نجح في الكشف عن علاقات القرابة أو الاختلافات الوراثية بين أشكال الصدر الأولي المختلفة.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

DNA Based Molecular Marker

Detection Methods:

***PCR - Electrophoresis Based Markers

WHY???

***No prior knowledge of DNA sequences is needed.
***Tiny amounts are neede.
***Primers are commercially available.
*** No expertise is neede.
***Simple.
*** Low cost.
*** Relatively quick
*** Useful in differentiating closely related individuals.

***PCR - Electrophoresis Based Markers

DNA + short random primer (10bp) >>>PCR>>> Gel Electrophoresis>>>Binary Matrix>>>Similarity Matrix>>> Genetic Distance>>>Cluster Analysis

تنوع الشكل المورفولوجي لمنطقة الصدر الأول من حيث اللون أو غياب و وجود النقط السوداء عليه و ترتيبها ان وجدت

Prothoracic spots position of *Rhynchophorus ferrugineus* adults collected in Greece

Females

Males

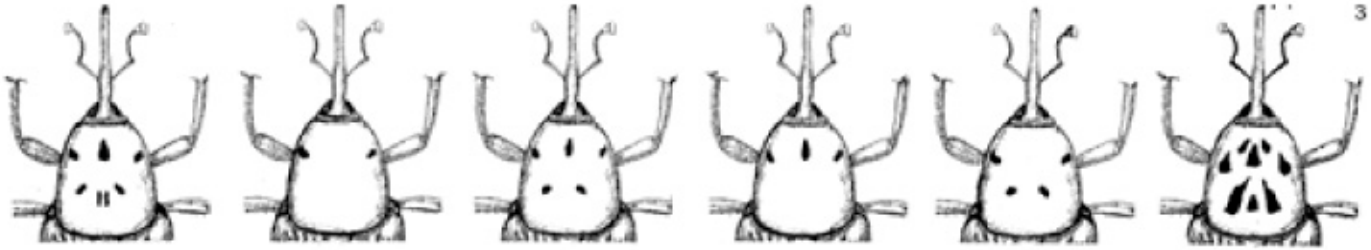
Source: Giota Psirofonia

Dr. Rabab El-Mergawy

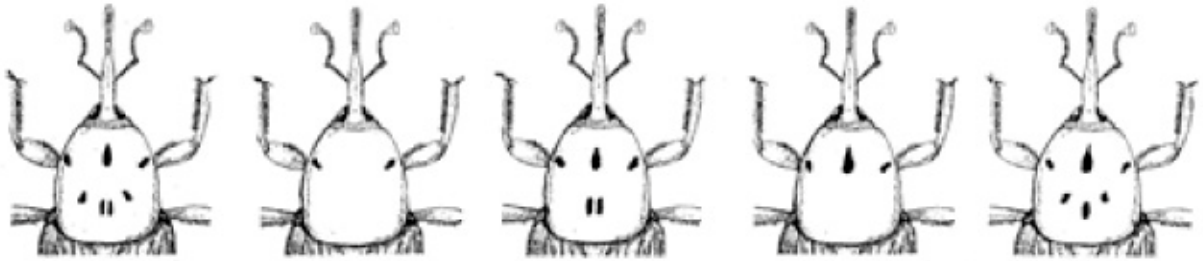
تنوع الشكل المورفولوجي لمنطقة الصدر الأول من حيث اللون أو غياب و وجود النقط السوداء عليه و ترتيبها ان وجدت

Prothoracic spots position of *Rhynchophorus ferrugineus* adults collected in Italy: Sicily (Acireale, Acicastello, Marina di Ragusa) during 2005.06

Females



Males



Source: http://www.redpalmweevil.com/RPWReport/Newsicily.htm

(1)
العلاقة بين 3 أشكال مورفولوجية لثلاثة عينات من مصر
(Salama & Sakr, 2002)

3 Forms

***الشكل الأول خالي من النقاط السوداء

***الشكل الثاني به نقاط مرتبة كشبكة

***الشكل الثالث به نقاط مرتبة في صفين متوازيين, حيث تنقسم النقطة الوسطي للصف الثاني لنصفين.

###Primers

9 primers

###Bands

83 bands, 53 were polymorphic (64%), 0.3-2 kbp

###

***تم الكشف عن تنوع وراثي بينهم.

*** التنوع ثابت.

*** كل شكل مظهري له بروفايل خاص به.

*** وجد أن الشكل الأول أقل قرابة وراثية من الشكلين الآخرين بينما الشكلين الثاني و الثالث أكثر تقاربا لبعضهم البعض.

(2)
العلاقة بين 3 أشكال مورفولوجية ل 18 عينة من السعودية
(Al Ayied *et al*., 2007)

3 Forms

***black without black spots

***الشكل الأول لونه اسود و خالي من النقاط السوداء.

***brown without black spots

***الشكل الثاني لونه بني و خالي من النقاط السوداء.

***brown with black spots

***الشكل الثالث لونه بني و به نقاط سوداء.

Primers

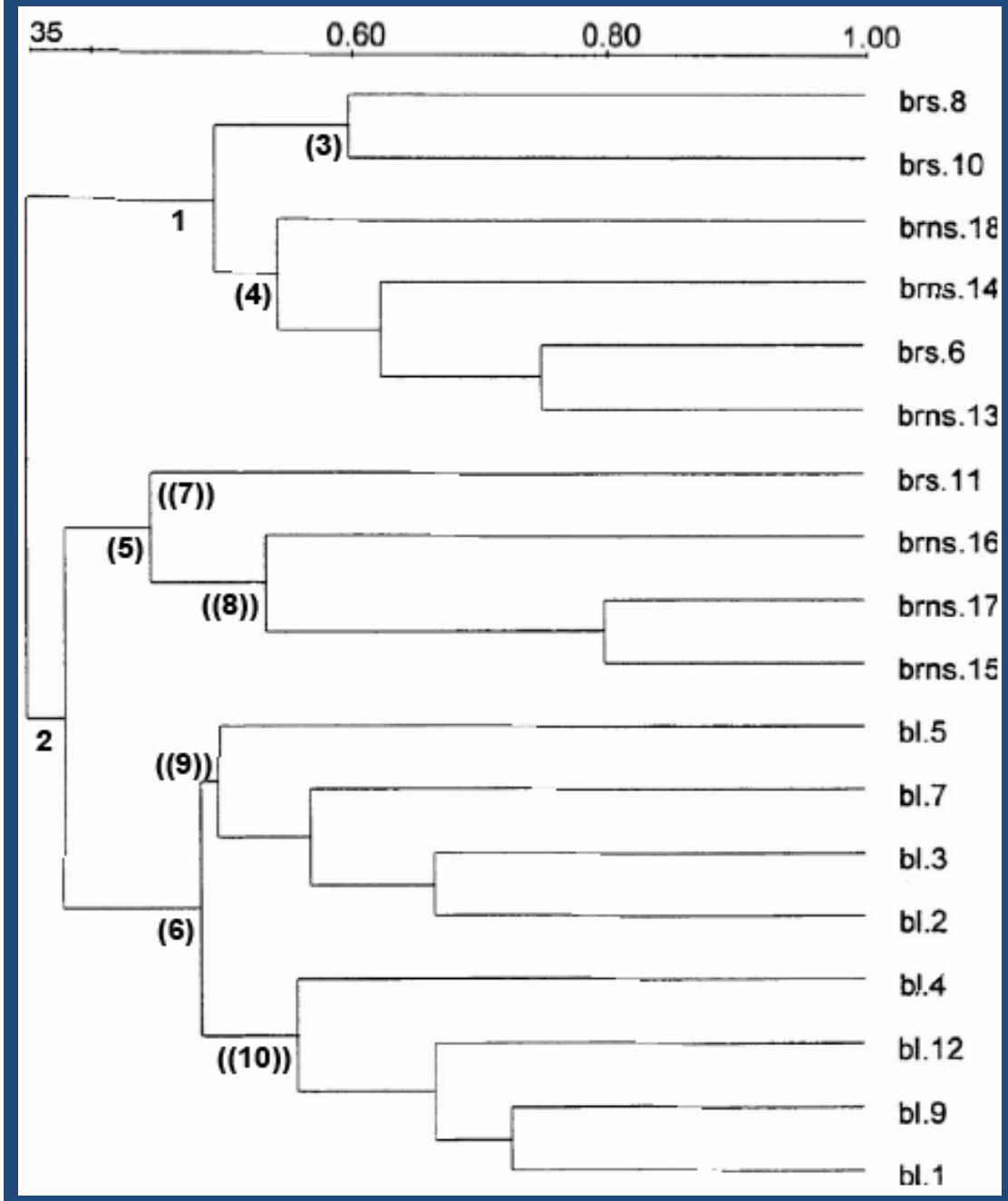
6 primers 10 bp

Bands

Not Mentioned

***تم الكشف عن تنوع وراثي بينهم.

Cluster Analysis



Cluster Analysis

#مجموعتان رئيسيتان
(%35) 2&1
1
##تحت مجموعتان (4&3) (%60)
(3)
بني بنقط سوداء
(4)
بني بدون نقط سوداء + عينة بني بنقط سوداء
2
##تحت مجموعتان (6&5) (%40)
(5)
###تحت مجموعتان ثانويتان
((8&7))(%99)
((7)) عينة بني بنقط سوداء
((8)) بني بدون نقط سوداء
(6)
###تحت مجموعتان ثانويتان
((10&9)) (%50)
اسود

bl: black without black spots <<< brns: brown without black spots>>>brs: brown with black spots

44

التنوع الوراثي بين عشائر سوسة النخيل المختلفة

45

(1)

العلاقة بين 3 أفراد من سوسة النخيل الحمراء من مصر , السعودية و اندونسيا باستخدام 20 بادئ عشوائي

وجد تشابه وراثي بين عينة من سوسة النخيل الحمراء من السعودية و اندونسيا حيث بلغت المسافة الوراثية بينهما 0.7 بينما لم يلاحظ أي تشابه وراثي بين عينات من مصر و أي من عينات السعودية و 1 اندونسيا

(2)
العلاقات بين 7 عينات من سوسة النخيل الحمراء من الامارات العربية المتحدة
(Gadelhak & Enan, 2005)

###Primers

6 primers

###Bands

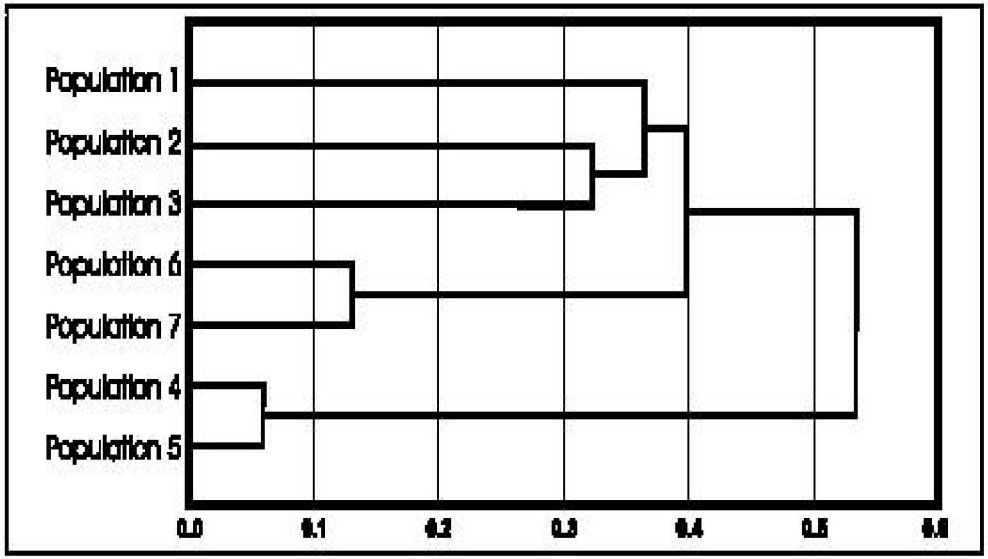
216 bands, 111 were polymorphic (51.4%), 194-1076 kbp

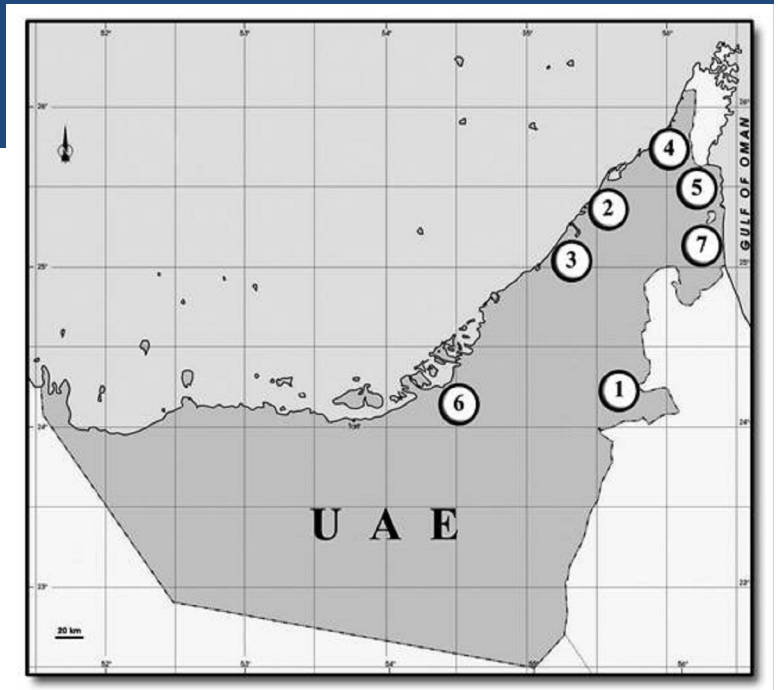
###

تم الكشف عن تنوع وراثي بينهم.
المسافة الوراثية بين العينات من 0.129- 0.617 (38-94% تشابه).
لا علاقة بين المسافات الجغرافية و المسافات الوراثية.

###Cluster Analysis

###Cluster Analysis





بحث 1

R. ferrugineus **(Egypt, KSA & Indonesia),** ***R. cruentatus*** **(Florida-USA) and** ***R. palmarum*** **(Costa Rica).**

تم الكشف عن التنوع الوراثي بين سوسة النخيل الحمراء و الأنواع كورينتيتس, بلمارم و فولنتيرس باستخدام المشخص الجزيئي الكو1 و تقنية التضاعف العشوائي.

بحث 2

R. ferrugineus **and** ***R. vulneratus***

في دراسة أخري باستخدام المشخص الجزيئي الكو1 و تقنية التضاعف العشوائي, تم التأكيد علي أن النوع فولنوريتس هو نفسه سوسة النخيل الحمراء و لكنه تنوع لوني.

بحث 3

تم المقارنة الوراثية بين الطرز الأحادية لسوسة النخيل الحمراء (سميت هنا ط1*-ط8* للتفرقة) و 4 أنواع أخري تابعة لنفس الجنس باستخدام أجزاء من الجين الميتوكونديري سيتوكروم أكسيديز تحت الوحدة 1 (كو1) :

R. palmarum **(Linnaues),** ***R. cruentatus*** **(Fabricius),**

R. phoenicis **(Fabricius) and** ***R. bilineatus*** **(Montrouzier).**

(3)
العلاقات بين 61 عينة من سوسة النخيل الحمراء 13 دولة
(El-Mergawy, 2011)

###Primers

6 primers

###Bands

776 bands, polymorphic (100%), 200-1400 bp

17 unique bands 17مشخص استثنائي

يمكن استخدام المشخصات الاستثنائية علي المستوي التطبيقي للتفرقة بين العشائر الجغرافية المختلفة.

###

تم الكشف عن تنوع وراثي بينهم.

#متوسط المسافات الوراثية بين العشائر

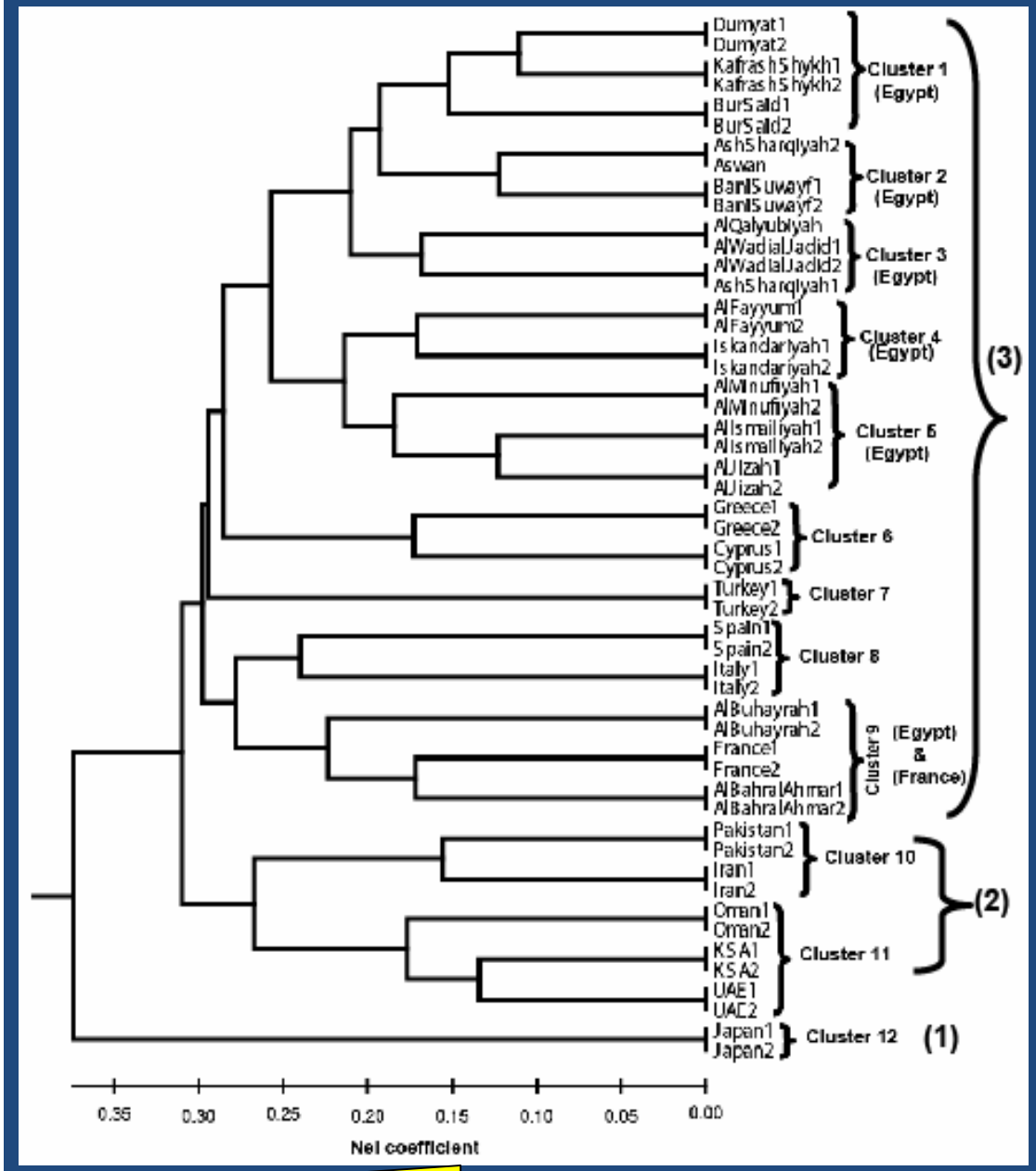
0.8-0.3 --- 20-70% تشابه

#المسافات الوراثية بين الأفراد من1-0.421

#وجود علاقة طردية بين المسافات الوراثية و الجغرافية

###Cluster Analysis

###Cluster Analysis I



قسمت الأفراد المختبرة إلى 3 مجموعات كبيرة-12 تحت مجموعة

1

#أفراد من سوسة النخيل الحمراء من اليابان (تحت مجموعة 12)

2

#أفراد من سوسة النخيل الحمراء من المنطقة العربية (الإمارات, السعودية و عمان) (تحت مجموعة 11) و إيران و باكستان (تحت مجموعة 12)

3

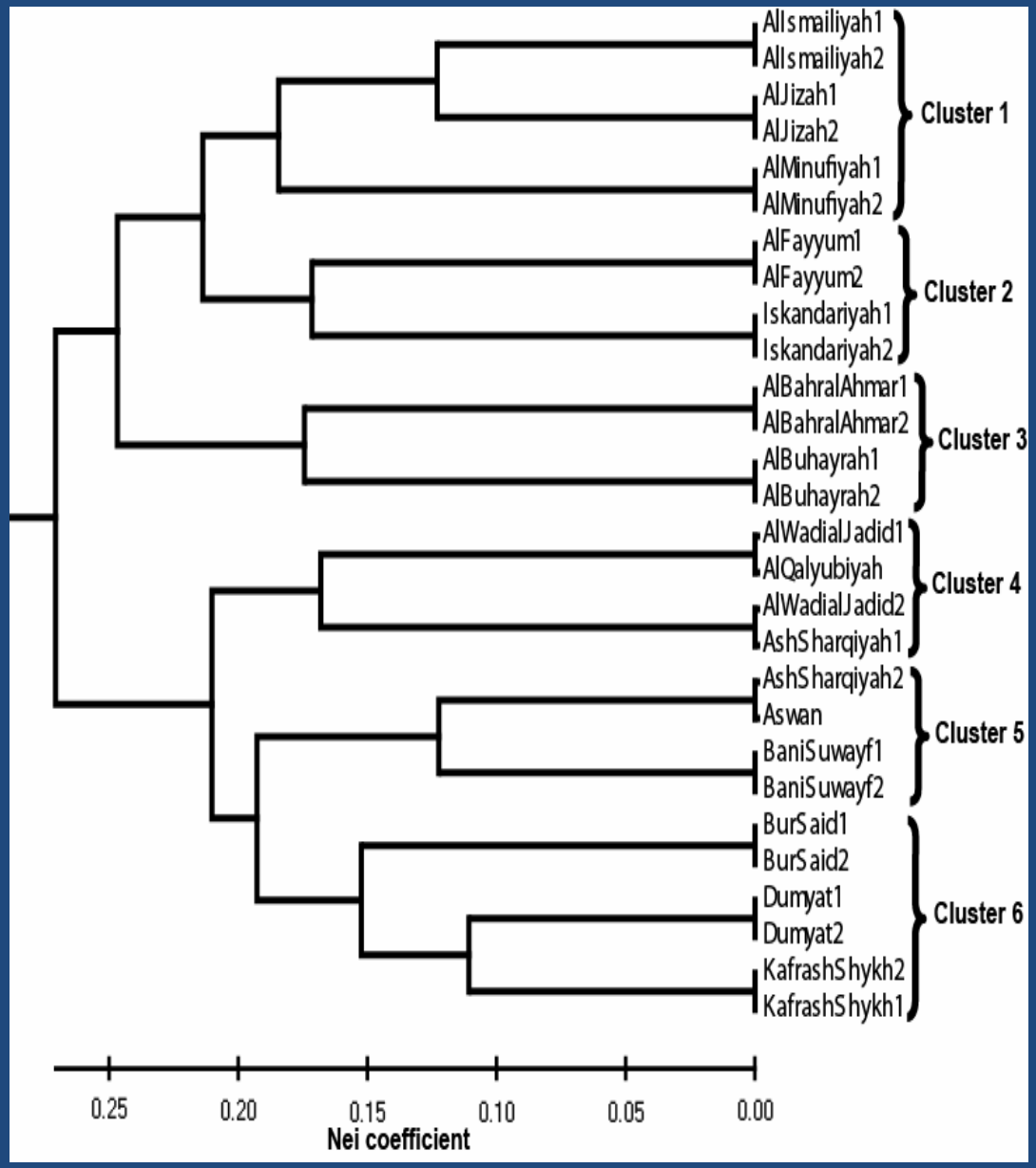
#أفراد من سوسة النخيل الحمراء من مصر (6تحت مجموعة: 1,2,3,4,5,9) و الدول الأوروبية التابعة لمنطقة البحر الأبيض المتوسط (تحت مجموعة: 6,7,8)

يرجع مصدر سوسة النخيل الحمراء التي تم دراستها الي منطقتين جغرافيتين مختلفتين هما:

(1) مصدر سوسة النخيل الحمراء من مصر و الدول الأوروبية التابعة لمنطقة البحر الأبيض المتوسط .

(2) مصدر سوسة النخيل الحمراء من المنطقة العربية (الامارات, السعودية و عمان).

###Cluster Analysis II



لا ترتبط كل الأفراد في تحت المجموعات المصرية بالبعد الجغرافي في تجمعها, حيث وجد أن بعض الأفراد التي تتبع محافظات بعيدة جغرافيا تتجمع معا في تحت مجموعة واجدة كما يلي:

أفراد من محافظات الشرقية, بني سويف و أسوان (تحت مجموعة 2).

أفراد من محافظات الشرقية, القليوبية و الوادي الجديد (تحت مجموعة 3) .

أفراد من الإسكندرية و الفيوم (تحت مجموعة4) .

يتوقع ان العشائر المشتقة من أصول مختلفة تكون أكثر تنوعا :العينات المصرية أظهرت تنوعا حيث تجمعت في 6 مجموعات ممكن تكون من دول مختلفة أو ادخال وحيد يحوي العديد من الأشكال الوراثية.

المقارنة بين سوسة النخيل الحمراء و بعض الأنواع الأخرى التابعة لجنس الرينكوفورس

Genetic Comparison

among

Rhynchophorus ferrugineus and

Other *Rhynchophorus* Species

(El-Mergawy, 2011)

species of *Rhynchophorus* genus

تم حصر 9 أنواع من سوس النخيل التابع لجنس الرينكوفورس

4 أنواع من العالم الجديد

R. palmarum **(Linnaues)**
R. cruentatus **(Fabricius),**
R. ritcheri **(Wattanapongsiri)**
R. quadrangulus **(Queden)**

نوع واحد أفريقي

R. phoenicis **(Fabricius)**

4 أنواع اسيوية

R. ferrugineus **(Olivier)**
R. bilineatus **(Montrouzier)**
R. distinctus **(Wattanapongsiri)**
R. lobatus **(Ritsema)**

54

تم استخدام مشخصات جزيئية مختلفة تعتمد علي الحامض النووي منقوص الأكسجين

DNA Based Markers

*** مشخصات جزيئية تعتمد علي تحديد التتابعات النيوكليوتيدية:

***Sequence- Based Markers**

*أجزاء من الجين الميتوكونديري

***Mitochondrial DNA markers: CO1.**

*** مشخصات جزيئية تعتمد علي تفاعل البلمرة المتسلسل:

***PCR - Electrophoresis Based Markers**

*تقنية التضاعف العشوائي (الرابد)

***Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).**

استخراج الجينوم الكلي

تفاعل البلمرة المتسلسل

تنقية نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل

تحديد التتابعات

تحليل التتابعات

حساب مقاييس التنوع المختلفة

تصميم الأشكال الفيلوجينية

بحث 3

R. phoenicis

R. cruentatus

R. ferrugineus

R. bilineatus

R. palmarum

56

نتائج تحليل تتابعات الكوا لعينات من سوسة النخيل الحمراء و أنواع أخري لجنس الرينكوفورس

المقاييس المختلفة	النتائج و تفسيرها
عدد المواقع المتضاعفة Amplified sites	1263 قاعدة مزدوجة 1263 bp
عدد المواقع المدروسة Studied sites	فاعدة مزدوجة735 735 bp
نوع التنوع Type of variation	استبدالات نيوكليوتيدية Nucleotide substitutions
المواقع المتغيرة Variable sites	222 (30.2%) موقع منها 136 مواقع بارسيمونية 86 singleton
عدد الطرز الأحادية لسوسة النخيل الحمراء Number of haplotypes of RPW	طرز أحادية6 سميت ط*1 - ط*4 , ط*6& ط*8 6: H1*-H4* , H6* & H8*
ا ت% (AT %)	66 - 69.8 % حياد اتجاه ا ت كما هو شائع في الجينوم الميتوكونديري للحشرات
ج س% (GC %)	%34-30.2
التغيرات المتشابهة Transitional substitutions	اج, ج ا, ت س & س ت AG, GA, TC & CT
التغيرات المختلفة Transversional substitutions	ا ت, ت ا, اس, س ا, ت ج, ج ت, ج س & س ج AT, TA, AC, CA, TG, GT, GC & CG
نسبة التغيرات المتشابهة/المختلفة Overall transition/transversion ratio (R)	32.488 انحياز للتغيرات المتشابهة كما قي جميع أنواع الجينوم

		R. bilineatus	*R. phoenicis*	*R. Cruentatus*	*R. Palmarum*	
R. ferrugineus (H8*)		79 (0.12%)	98 (0.13%)	101 (0.14%)	102 (0.14%)	المواقع المتغيرة Variable sites
		91	107	112	115	الطفرات Total no. Of mutations
		2.5	3.3	3.4	3.5	زمن التشعب (مليون سنة) Divergence time
R. bilineatus	0.058					المسافات الوراثية Genetic distances
R. phoenicis	0.076	0.084				
R. Cruentatus	0.079	0.083	0.081			
R. Palmarum	0.081	0.095	0.084	0.078		

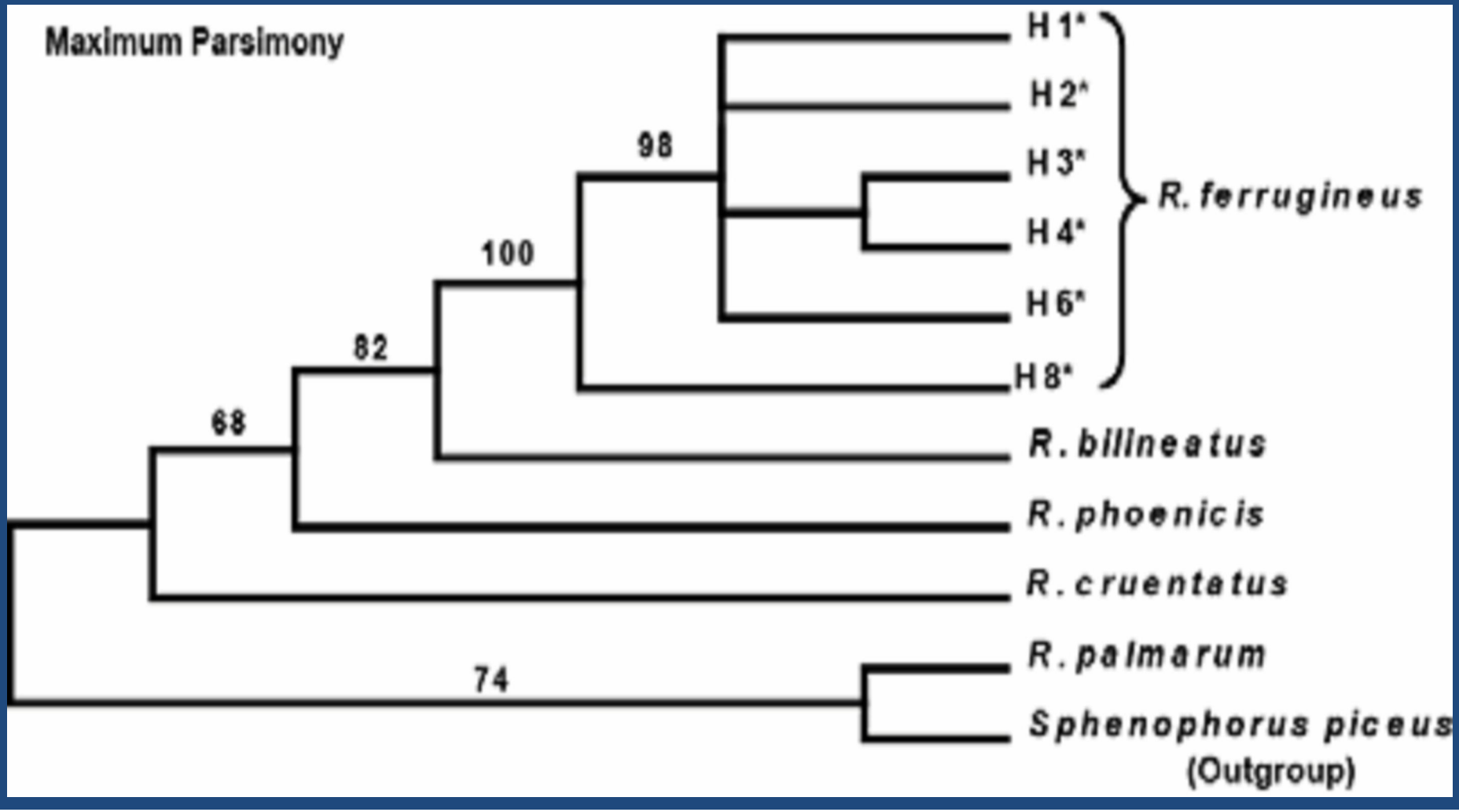
الشجرة الفيلوجينية لأنواع الرينكوفورس توضح الافتراضات الفيلوحينية بين الأنواع المختلفة و الطرز الأحادية لجين الكو1المكتشفة. يظهر فوق الخطوط قيم التكرارات المدعمة (1000 تكرار)

ط1*-ط4*,ط6*,ط8*: H1*-H4*, H6*, H8*

#يمكن ترتيب الطرز الأحادية لسوسة النخيل الحمراء بحسب قربها الوراثي من الأنواع المختلفة كالآتي:

سوسة النخيل الحمراء(ط1*.....ط2*.....ط3*.....ط4*.....ط6*.....ط8*). ....

بلنياتس.....فوينيسيس.....كورينتيتس.....بلمارم).



الاتجاهات المستقبلية

معرفة نتائج استخدام الميكروستالايت و هل يمكنه التفرقة بين عشائر منطقة البحر المتوسط أم لا . للحصول علي عينات من سوسة النخيل الحمراء من منطقة الهند و جنوب شرق آسيا كمناطق أصل محتملة لمعرفة مصدر سوسة النخيل التي غزت مصر و منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط أو الطرز الأحادي الغازي,و معرفة من أي عائل نخيلي أتت.

معرفة حجم الفقد في التنوع الوراثي الناتج عن عملية الانتقال من منطقة الأصل للأماكن الجديدة, حيث يعتقد انه في حالة اذا كان هذا الفقد كبير فان هذا سيؤثر علي مستقبل بقاء السوسة, لكنه يري ان كثيرين غير متفقين معه في هذا الرأي.

هناك دراسات في أوروبا (ايطاليا) لمحاولة عزل و استخدام الميكروستالايت, أيضا هناك أبحاث تجري في كاليفورنيا و لكنه لا يعلم تفاصيلها.

من الصعب إقناع العاملين في مكافحة السوسة بأهمية الأبحاث الأساسية ومنها الوراثة لتحسين عمليات المكافحة.

أهمية دراسات التنوع الوراثي علي المستوي التطبيقي بأنه في حالة الرغبة مثلا في استخدام ممرض حشري كالفطر فانه سيتم استخدام سلالة واحدة للفطر للمكافحة إن لم يكن هناك تنوع وراثي والعكس صحيح.