

تعیین بیوتیپ‌های سفیدبالک پنبه *Bemisia tabaci* در استان فارس

مریم شهبازی^۱، سید علی اکبر بهجت‌نیا^{۲*}، محمود عالیچی^۳، وحید رومی^۴ و کرامت‌الله ایزدپناه^۵
۱، ۲، ۳ و ۵. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار و استاد، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

۴. استادیار بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۲۵)

چکیده

سفیدبالک پنبه (*Bemisia tabaci*) گونه‌ای مرکب و پیچیده با بیش از ۲۰ بیوتیپ شناخته‌شده در جهان است. به منظور تعیین بیوتیپ‌های این آفت در استان فارس از جمعیت‌های سفیدبالک مزارع پنبه و فلفل در شیراز، کفترک، مهارلو، فسا و خیر استهبان طی سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۹ نمونه‌برداری شد. بر اساس داده‌های آزمون RAPD-PCR الگوی بیشتر نمونه‌های *B. tabaci* با الگوی بیوتیپ B مطابقت داشت. الگوی بیوتیپ Cv نیز مشاهده شد و الگوی دیگری نیز مشاهده گردید که به الگوهای تعریف‌شده برای بیوتیپ‌های B، Q و Cv شباهت نداشت. ترادف نوکلئوتیدی سیتوکروم اکسیداز I میتوکندریایی نشان داد که همه نمونه‌های *B. tabaci* تحت مطالعه در این تحقیق در گروه بیوتیپ B قرار می‌گیرند که به نمونه‌های ایرانی ۹۴/۲ تا ۱۰۰ درصد و به نمونه‌های بیوتیپ‌های دیگر *B. tabaci* موجود در بانک ژن ۸۴/۹ تا ۹۳/۲ درصد شباهت دارند. مطالعات تبارشناسی نشان داد نمونه‌های ایرانی بیوتیپ B در دو زیرگروه جدا از هم و مجزا از نمونه‌های بیوتیپ B دیگر کشورها قرار می‌گیرند. در بین ۱۱ گروه اصلی و ۲۴ زیرگروه ژنتیکی جدید که اخیراً برای *B. tabaci* تعریف شده، نمونه‌های ایرانی *B. tabaci* در گروه آفریقا/ خاورمیانه/ آسیای صغیر و در زیرگروه Middle East/Asia Minor 1 قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: بیوتیپ، مطالعات تبارشناسی، *Bemisia tabaci*، RAPD-PCR *mtCOI*.

مقدمه

سفیدبالک *B. tabaci* گونه‌ای مرکب و پیچیده (complex species) با بیش از ۲۰ بیوتیپ است (Bedford *et al.*, 1994; Dinsdale *et al.*, 2010; De Barro *et al.*, 2011). در اواخر دهه ۱۹۸۰ نژاد قدرتمندی از این حشره در جنوب آمریکا یافت شد که سطح بالایی از مقاومت به حشره‌کش‌ها و توانایی انتقال بگوموویروس‌ها را داشت و می‌توانست علائم برگ نقره‌ای در کدو ایجاد کند. این نژاد که نوعی الگوی الکترومورف خاص را برای آنزیم‌های عمومی استراز نشان می‌داد، با عنوان بیوتیپ B معرفی شد (De Barro *et al.*, 2005). Bellows *et al.* (1994) به این نتیجه رسیدند که بیوتیپ B سفیدبالک

سفیدبالک پنبه، (*Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)، حشره‌ای پلی‌فاژ است که از بیش از ۹۰۰ محصول زراعی و گونه‌های مختلف علف هرز از مناطق گرمسیری جهان گزارش شده و ۱۱۱ گونه ویروس را انتقال می‌دهد که عمده آنها متعلق به جنس *Begomovirus* از تیره *Geminiviridae* اند (Fargette *et al.*, 2006; McAuslane, 2000). سفیدبالک *B. tabaci* را اولین بار Gennadius در یونان و در سال ۱۸۸۹ بر روی پنبه گزارش داد و با نام *Aleurodes tabaci* توصیف کرد (Gerling, 1996).

خیار، کدو، بادمجان و پنبه در منطقه ورامین و با تکنیک Randomly amplified polymorphic DNA- polymerase chain reaction (RAPD-PCR) بررسی شد (Samih & Jalali-Javaran, 2005). Rajaei Shoorcheh *et al.* (2008) بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن زیر واحد شماره ۱ سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی (mitochondrial cytochrome oxidase I, *mtCOI*) سفیدبالک *B. tabaci* در چندین منطقه از ایران شامل یزد، کرمان، خراسان و هرمزگان نشان دادند که بیشتر بیوتیپ‌های موجود در ایران بسیار به بیوتیپ B نزدیک‌اند و جمعیت غالب را در ایران تشکیل می‌دهند. با توجه به گسترش سریع و زیاد بیماری‌های ناشی از بگوموویروس‌ها، از جمله بیماری مهم و اقتصادی پیچیدگی برگ گوجه‌فرنگی در مناطق کشت این محصول در جهان و ایران که با گسترش جهانی بیوتیپ‌های مهاجم *B. tabaci* ناقل ویروس‌های به‌وجودآورنده این بیماری‌ها همراه بوده است، و نیز نبود اطلاعات کافی درباره تنوع ژنتیکی این آفت در برخی مناطق ایران، در این تحقیق تعیین بیوتیپ‌های سفیدبالک *B. tabaci* در استان فارس با استفاده از روش‌های مولکولی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

منبع حشره

نمونه‌های سفیدبالک از مزارع فلفل منطقه کفترک شیراز و مزارع پنبه منطقه مهارلو، شهرستان فسا و منطقه مبارک‌آباد خیر استهبان و گیاه شاه‌پسند درختچه‌ای (*Lantana sp.*) در سطح شهر شیراز جمع‌آوری و در اتانول ۹۵ درصد قرار داده شدند. نمونه‌ها تا زمان استخراج دی‌ان‌ای در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردیدند.

شناسایی گونه سفیدبالک *B. tabaci*

مناسب‌ترین ملاک تشخیص گونه‌های جنس *Bemisia* از جمله *B. tabaci* استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیک پوسته‌های شفیرگی است (Alemansoor, 1992). لذا از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از طریق پوسته شفیرگی و تهیه اسلاید میکروسکوپی با استفاده از کلیدهای شناسایی جنس (Hodges & Evans, 2005)، گونه

B. tabaci متفاوت از بیوتیپ‌های دیگر است. بنابراین آن را یک گونه جدید از جنس *Bemisia* در نظر گرفتند و نام *B. argentifolii* را برای آن انتخاب. اطلاق این نام برای بیوتیپ B در تمام جهان بحث‌برانگیز شد (De Barro & Driver, 1997; De Barro *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2009). از آنجا که اطلاعات بیولوژیک و مولکولی کافی برای حمایت از ایده جداسازی *B. tabaci* و *B. argentifolii* وجود نداشت، گونه اخیر مجدداً با عنوان بیوتیپ B گونه *B. tabaci* محسوب گردید (De Barro *et al.*, 2005). اخیراً در اطلاق کلمه بیوتیپ برای جمعیت‌های متنوع *B. tabaci* شک به‌وجود آمده است، به طوری که در جدیدترین مقاله منتشرشده در این زمینه (De Barro *et al.*, 2011) ادعا شده که استفاده از کلمه بیوتیپ در این زمینه اشتباه و گمراه‌کننده است و مدارک کافی ارائه شده که این آفت از بیوتیپ‌های مختلف تشکیل نشده است، بلکه ترکیبی از ۱۱ گروه اصلی بوده که دربردارنده ترکیبی از ۲۴ گونه تشخیص‌ناپذیر از نظر مورفولوژیک است (De Barro *et al.*, 2011). به علت نبود محدودیت در تعیین بیوتیپ و وجود روش‌های مختلف در این زمینه، تا کنون بیوتیپ‌های متعددی از *B. tabaci* توصیف گردیده‌اند که این تمایز بیشتر بر اساس مارکرهای ژنتیکی بوده است. به‌علاوه، داده‌های بیولوژیک کافی که تفاوت را مشخص کند، وجود ندارد. در حقیقت، به دلایل ذکرشده در دو جمله قبل، «بیوتیپ» واژه جایگزینی برای «یک گروه ژنتیکی» بوده است و پیشنهاد شده که استفاده از واژه بیوتیپ کنار گذاشته شود و تحقیقات مربوط به نحوه تشخیص گونه در *B. tabaci* بر ساختار ژنتیکی ویژه ژن‌های هسته‌ای و نحوه تکامل دی‌ان‌ای میتوکندریایی در *Bemisia* متمرکز شود (De Barro *et al.*, 2011).

سفیدبالک *B. tabaci* از دیرباز در مناطق پنبه‌کاری ایران وجود داشته است. این آفت را اولین بار بشیرالهی در سال ۱۳۲۳ در اطراف کرمان مشاهده و جمع‌آوری کرد، ولی در همان سال‌ها در نقاط پنبه‌خیز فارس و کرمان انتشار داشته است (Alemansoor, 1992). بعد از آن به عنوان یک آفت جدی در نقاط مرکزی و جنوبی ایران قلمداد گردید (Habibi, 1975). در ایران چند شکلی جمعیت‌های سفیدبالک *B. tabaci* روی میزبان‌های گیاهی

PCR به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C نگهداری شد. محصولات PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد آنالیز شد و بر اساس الگوهای ایجادشده، بیوتیپ سفیدبالک *B. tabaci* تعیین گردید.

تکثیر *mtCOI* با استفاده از روش PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری شامل مواد استفاده‌شده در آزمون RAPD-PCR و با استفاده از آغازگرهای C1-J-2195 با ترادف نوکلئوتیدی 5'-TTGATTTTTGGTCATCCAGAAGT-3' و L2-N-3014 با ترادف نوکلئوتیدی 5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3' که قطعه‌ای در حدود ۸۵۰ جفت باز از ژن میتوکندریایی *COI* را تکثیر می‌کنند (Frohlich et al., 1999) هر کدام به غلظت ۰/۴ میکرومولار انجام گرفت. عبارت از یک برنامه یک چرخه‌ای شامل دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه و یک برنامه ۳۵ چرخه‌ای شامل دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۰°C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه بود. پس از آخرین چرخه، مخلوط PCR به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C نگهداری شد. قطعات تکثیرشده با الکتروفورز در آگارز ۱ درصد تجزیه و تحلیل شدند.

همسانه‌سازی (Cloning) و تعیین ترادف نوکلئوتیدی

برای همسانه‌سازی محصول PCR از Ins T/A clone از PCR product cloning kit (Fermentas) استفاده شد. دی‌ان‌ای تکثیرشده بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده در داخل ناقل پلاسمیدی PTZ57R/T قرار داده شد. همسانه‌های به‌دست‌آمده برای تعیین ترادف نوکلئوتیدی با استفاده از آغازگرهای M13 به شرکت Macrogen کشور کره جنوبی فرستاده شدند.

مقایسه ترادف‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده با ترادف ناحیه مشابه دیگر بیوتیپ‌های سفیدبالک پنبه در بانک ژن و ترسیم دندروگرام

ترادف‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده ابتدا با استفاده از برنامه Blast با ترادف‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)

B. tabaci و گونه (Malumphy, unknown published) year شناسایی شد.

استخراج دی‌ان‌ای *B. tabaci*

برای استخراج دی‌ان‌ای ژنومی *B. tabaci* از روش De Barro & Driver (1997) با کمی تغییر استفاده شد. به منظور تهیه دی‌ان‌ای با خلوص بالاتر، یک دور خالص‌سازی با استفاده از فنول-کلروفرم طبق روش Behjatnia et al. (2014) انجام گرفت. دی‌ان‌ای استخراج شده کاملاً در آب مقطر استریل به‌صورت سوسپانسیون درآورده شد. نمونه‌ها سپس در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند تا بعد به عنوان دی‌ان‌ای الگو در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) به‌کار روند. در هر واکنش آزمون PCR از دی‌ان‌ای استخراج‌شده از یک سفیدبالک استفاده شد.

استفاده از روش RAPD-PCR برای تعیین بیوتیپ *B. tabaci*

از روش RAPD-PCR مطابق آنچه توسط Qiu et al. (2009) توضیح داده شد برای تعیین نوع بیوتیپ سفیدبالک *B. tabaci* استفاده شد. از نمونه سفیدبالک گلخانه (*Trialeurodes vaporariorum*) به‌عنوان کنترل در آزمایش RAPD-PCR استفاده شد. در این روش از آغازگر H₁₆ (Qiu et al., 2009) با ترادف نوکلئوتیدی 5'-TCTCAGCTGG-3' آزمون RAPD-PCR در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲ میکرولیتر (۲۰-۱۰ نانوگرم) دی‌ان‌ای الگو استخراج‌شده از *B. tabaci* آغازگر H₁₆ (به غلظت ۱/۲ میکرومولار)، ۲۰۰ میکرومولار از هر یک از چهار داکسی ریبو نوکلئوتید تری‌فسفات، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂ و ۲-۱/۲۵ واحد آنزیم *Taq* دی‌ان‌ای پلیمرز (Fermentas) در بافر مخصوص PCR صورت گرفت. PCR شامل یک برنامه ۱ چرخه‌ای در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه و سپس یک برنامه ۳۹ چرخه‌ای شامل دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، دمای ۴۰°C به مدت ۱/۵ دقیقه و دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه بود. پس از آخرین چرخه، مخلوط

Megalign تعیین گردید و درخت فیلوژنتیکی مربوط به آنها با روش maximum likelihood و با استفاده از نرم افزار MEGA5 ترسیم و تجزیه و تحلیل شد. رس شمار (Accession number)، میزبان و محل جغرافیایی نمونه های ایرانی *B. tabaci* تحت مطالعه در این تحقیق و ترادف های مورد استفاده از بانک ژن در جدول ۱ نشان داده شده است.

مقایسه شدند. پس از تأیید صحت آنها، هم ردیف سازی ترادف نوکلئوتیدی نمونه های ایرانی با استفاده از نرم افزارهای MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011; Hasegawa *et al.*, 1985) و Megalign (نرم افزار DNASTAR) انجام گرفت. همچنین این ترادف ها با یکدیگر و با ترادف نوکلئوتیدی نمونه های موجود در GenBank مقایسه شدند. درصد شباهت آنها با استفاده از نرم افزار

جدول ۱. مشخصات نمونه های *B. tabaci* موجود در بانک ژن که در مقایسه با نمونه های ایرانی این حشره در این مطالعه به کار رفتند.

<i>B. tabaci</i> sample *(host)	Country	Acc. No.	Reference	<i>B. tabaci</i> sample *(host)	Country	Acc. No.	Reference
FSA13 (cotton)	Iran (Fasa)	JN542543	Present study	voucher IMIDA-Su1.4 (cotton)	Sudan	AY827615	De la Rua <i>et al.</i> , 2006
FSA12 (cotton)	Iran (Fasa)	JN559742	Present study	Guadeloupe (NR)	France	AM180064	Tahiri <i>et al.</i> , 2006
FSA2 (cotton)	Iran (Fasa)	JN559743	Present study	Nador (<i>Solanum melongena</i>)	Morocco	AM176570	Tahiri <i>et al.</i> , 2006
FSA3 (cotton)	Iran (Fasa)	JN559744	Present study	Antilles1 (NR)	Netherland	EU760750	Gueguen <i>et al.</i> , 2010
FSA6 (cotton)	Iran (Fasa)	JN559745	Present study	D3 (NR)	Burkina Faso	FJ766420	Gueguen <i>et al.</i> , 2010
FSA8 (cotton)	Iran (Fasa)	JN559746	Present study	B5 (NR)	Burkina Faso	FJ766418	Gueguen <i>et al.</i> , 2010
FSA9 (cotton)	Iran (Fasa)	JN559747	Present study	B18 (NR)	Burkina Faso	FJ766434	Gueguen <i>et al.</i> , 2010
FSA1 (pepper)	Iran (Fasa)	JN559748	Present study	NP3 (NR)	France	EU760740	Gueguen <i>et al.</i> , 2010
KAF10 (pepper)	Iran (Kaftarak)	JN559749	Present study	R1 (NR)	France	EU760743	Gueguen <i>et al.</i> , 2010
KAF4 (pepper)	Iran (Kaftarak)	JN559750	Present study	Ca2 (NR)	Moroco	EU760747	Gueguen <i>et al.</i> , 2010
KAF5 (pepper)	Iran (Kaftarak)	JN559751	Present study	K1 (NR)	Tunisia	EU760736	Gueguen <i>et al.</i> , 2010
KAF (pepper)	Iran (Kaftarak)	JN559752	Present study	1 (NR)	Israel	EU760719	Gueguen <i>et al.</i> , 2010
MOB (cotton)	Iran (Mobarakabad)	JN559753	Present study	Florida (NR)	USA	EF080824	Boykin <i>et al.</i> , 2007
10 (NR)	Iran (Khorasan)	EU547770	Rajaei Shoorcheh <i>et al.</i> , 2008	CLM582-NW (tomato)	USA	HQ877602	McKenzie <i>et al.</i> , 2012
1 (NR)	Iran (Hormozgan)	EU547768	Rajaei Shoorcheh <i>et al.</i> , 2008	CLM278-B (tomato)	USA	FJ188639	McKenzie <i>et al.</i> , 2009
5 (NR)	Iran (Kerman)	EU547769	Rajaei Shoorcheh <i>et al.</i> , 2008	CLM43-B (<i>Verbena</i> sp.)	USA	HQ198702	McKenzie <i>et al.</i> , 2012
15 (NR)	Iran (Yazd)	EU547771	Rajaei Shoorcheh <i>et al.</i> , 2008	CLM60-B (tomato)	USA	HQ198662	McKenzie <i>et al.</i> , 2012
20 (NR)	Iran (kerman)	EU547772	Rajaei Shoorcheh <i>et al.</i> , 2008	CLM89-Q3 (mint)	USA	FJ188507	McKenzie <i>et al.</i> , 2009
MedAmAf_Iran_new2 (NR)	Iran	GU086351	Dinsdale <i>et al.</i> , 2010	pop-variant CLM85-B (poinsettia)	USA	EU427727	Shatters <i>et al.</i> , 2009
MedAmAf_Iran_new5 (NR)	Iran	GU086353	Dinsdale <i>et al.</i> , 2010				
MedAmAf_Iran_new1 (NR)	Iran	GU086350	Dinsdale <i>et al.</i> , 2010	249 (tomato)	Cuba	FN821805	Muniz <i>et al.</i> , 2011
MedAmAf_Iran_new3 (NR)	Iran	GU086352	Dinsdale <i>et al.</i> , 2010	Multan (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Pakistan	AY686094	-
H2-MedAmAf-Sicily-Marina-di-Ragusa(NR)	Italy	GU086341	Dinsdale <i>et al.</i> , 2010	India (cabbage)	India	HQ268812	-
Turkey (cotton)	Turkey	AF342776	Brown & Idris, 2005	40 (eggplant)	China	EU192070	-
Pakistan (cotton)	Pakistan	AF342778	Brown & Idris, 2005	CH-GD01 (cushaw)	China	EF566761	-
biotype B (NR)	India	AF321927	Banks <i>et al.</i> , 2001	Zhengzhou-1 (NR)	China	HM802265	-
clone UgOkNm35 (okra) 12-3b (<i>Gossypium</i> sp.)	Uganda	AY903568	Sseruwagi <i>et al.</i> , 2006	<i>Bemisia atriplex</i> * (NR)	USA	GU086363	Dinsdale <i>et al.</i> , 2010
	India	AJ550175	Delatte <i>et al.</i> , 2005	* <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (<i>Phyllanthus emblica</i>)	India	AF418672	Maruthi <i>et al.</i> , 2004

* NR=Not Recorded (میزبان گزارش نشده است)

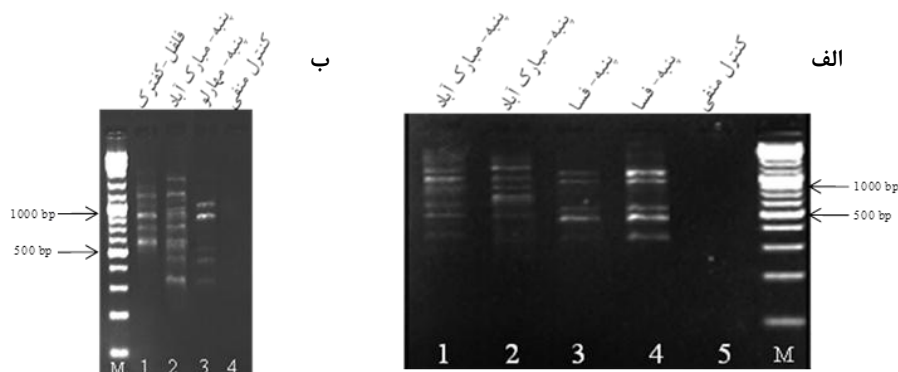
** از گونه های *Bemisia atriplex* و *Trialeurodes vaporariorum* به عنوان outgroup در آنالیزهای فیلوژنتیکی استفاده شد.

نداشتند. جمع‌بندی نوع بیوتیپ‌های *B. tabaci* روی میزبان‌های مختلف مناطق تحت بررسی بر اساس نتایج آزمون RAPD-PCR در جدول ۲ نشان داده شده است. شایان ذکر است که در گونه سفیدبالک گلخانه (*T. vaporariorum*) نسبت به بیوتیپ‌های سفیدبالک *B. tabaci* نقش متفاوتی مشاهده شد (شکل ۲-ب راهک ۱ و ۲). نتایج این آزمایش‌ها نشان می‌دهد که آزمون RAPD-PCR نقش‌های متنوعی از دی‌ان‌ای ایجاد می‌کند که می‌تواند وسیله تشخیص گونه‌ها از یکدیگر (نقش متفاوت *B. tabaci* با سفیدبالک گلخانه) و حتی تمایز بیوتیپ‌های یک گونه گردد؛ به طوری که در این مطالعه و مطالعات مشابه قبلی (De Barro & Driver, 1997; Qiu et al., 2009; Zhang et al., 2007) نقش‌های متنوع ایجاد شده از گونه *B. tabaci* منجر به معرفی بیوتیپ‌هایی غیر از بیوتیپ B گردید. ولی از آنجا که در این روش اتصال آغازگر به رشته قالب در دمای نسبتاً پایینی (۳۵ درجه سلسیوس) صورت می‌گیرد (Black IV & DuTeau, 1997) در این مطالعه دمای اتصال ۴۰ درجه سلسیوس انتخاب شد، و کلاً در این روش قطعات دی‌ان‌ای به‌طور تصادفی تکثیر می‌شوند، تشخیص قطعی نوع بیوتیپ نیاز به روش‌های دقیق‌تری دارد. لذا در این مطالعه با توجه به محدودیت‌های موجود در زمینه تشخیص بیوتیپ، تعدادی از نمونه‌های پنبه و فلفل *B. tabaci* که اولویت بیشتری نسبت به نمونه شاه‌پسند درختچه‌ای داشته‌اند، تکثیر و تعیین ترادف ژن *mtCOI* شدند. مسلماً تعیین بیوتیپ میزبانی *B. tabaci* از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و شایسته است در مطالعات بعدی بررسی گردد.

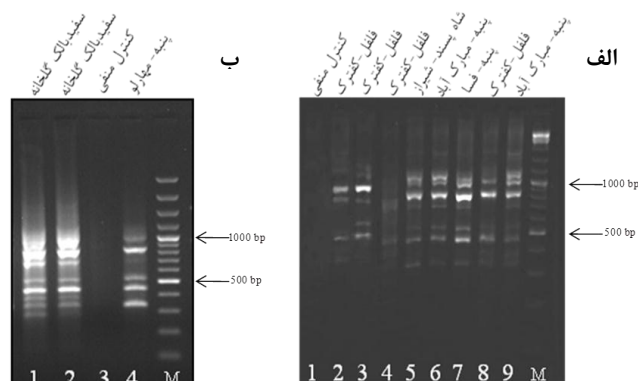
نتایج و بحث

تشخیص بیوتیپ‌های *B. tabaci* با استفاده از RAPD-PCR

گزارش‌های قبلی (De Barro & Driver, 1997; Qiu et al., 2007; Zhang et al., 2009) نشان می‌دهد محصولات RAPD-PCR از بیوتیپ‌های مختلف *B. tabaci* نقش‌های متنوعی را در ژل آگارز بعد از الکتروفورز ایجاد می‌کنند. بر اساس این گزارش‌ها بیوتیپ B تولید سه باند دی‌ان‌ای بین ۲۵۰ و ۶۰۰ جفت باز می‌کند؛ درحالی‌که باندهای دی‌ان‌ای بین ۲۵۰ و ۳۰۰ جفت باز در بیوتیپ Cv وجود ندارد. به‌علاوه، در دو بیوتیپ Cv و Q دو باند مشخص با اندازه‌های حدود ۷۰۰ و ۱۰۰۰ جفت باز تشکیل می‌شود، درحالی‌که بیوتیپ B فقط تولید یک باند دی‌ان‌ای در محدوده ۱۰۰۰ جفت باز می‌کند. با توجه به نقش‌های ایجاد شده که در شکل ۱ و ۲ نمایش داده شده است، به نظر می‌رسد نمونه‌های مربوط به شکل ۱ (الف) راهک ۳ و ۴ و در قسمت (ب) راهک ۳ و در شکل ۲ (الف) راهک‌های ۲، ۳ و ۵-۹ و در قسمت (ب) راهک ۴ مربوط به بیوتیپ B باشند؛ چون سه باند بین ۳۰۰ و ۶۰۰ جفت باز در دی‌ان‌ای‌های تکثیری این نمونه‌ها به‌طور واضح دیده می‌شود. به‌علاوه این نمونه‌ها یک باند قوی و دو باند ضعیف‌تر در محدوده هزار جفت باز دارند. نقش نمونه شکل ۱ (ب) راهک ۱ بیشتر شبیه به نقش بیوتیپ Cv است (بین ۲۵۰ تا ۵۰۰ جفت باز هیچ باند دی‌ان‌ای دیده نشد). نقش‌های ایجاد شده توسط نمونه‌های سفیدبالک مناطق مبارک‌آباد روی میزبان پنبه (شکل ۱ راهک‌های ۱ و ۲ در قسمت الف و راهک ۲ در قسمت ب) به هیچ یک از نقش‌های تعریف شده برای بیوتیپ‌های B، Q و Cv شباهت

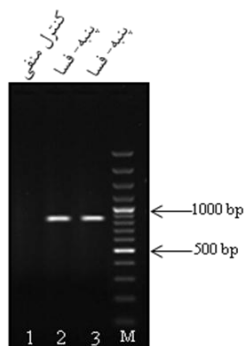


شکل ۱. نقش الکتروفورزی حاصل از RAPD-PCR از نمونه‌های سفیدبالک *B. tabaci*. میزبان و محل جمع‌آوری هر نمونه در بالای چاهک مربوط به آن نشان داده شده است. برای کنترل منفی در PCR از آب استفاده شد. M=100 bp molecular weight marker



شکل ۲: نقش الکتروفورزی حاصل از RAPD-PCR نمونه‌های سفیدبالک *B. tabaci* میزبان و محل جمع‌آوری هر نمونه در بالای چاهک مربوط به آن نشان داده شده است. برای کنترل منفی در PCR از آب استفاده شد. M=100 bp molecular marker

توالی‌های اضافی نمونه‌های تحت مطالعه در این تحقیق و هم‌طول کردن آنها با توالی‌های موجود در بانک ژن، طول قطعات تحت مطالعه در این تحقیق مانند برخی از نمونه‌های ایرانی موجود در بانک ژن به ۶۵۷ نوکلئوتید رسانده شد. میزان یکسانی ترادف این قطعه از نمونه‌های سفیدبالک استان فارس با ترادف قطعه مشابه بیوتیپ B موجود در بانک ژن در سطح نوکلئوتیدی به میزان ۹۴/۲-۱۰۰ درصد تعیین شد، در حالی که میزان یکسانی آنها با قطعه مشابه بیوتیپ‌های دیگر *B. tabaci* در سطح نوکلئوتیدی از ۸۴/۹ تا ۹۳/۲ درصد متغیر بود. نمونه مبارک‌آباد از روی پنبه و دو نمونه Eu547768 و Eu547769 که به ترتیب از گوجه‌فرنگی در استان هرمزگان و خیار در استان کرمان توسط Rajaei Shoorcheh *et al.* (2008) گزارش شده‌اند، ترادف کاملاً یکسانی داشتند (جدول درصد تشابه نشان داده نشده است).



شکل ۳: نقش الکتروفورزی محصول PCR ناحیه *mtCOI* تکثیرشده با جفت آغازگر L2-N-3014 / C1-J-2195 از نمونه‌های سفیدبالک پنبه فسا. برای کنترل منفی در PCR از آب استفاده شد. M= 100 bp molecular marker

جدول ۲: نوع بیوتیپ شناسایی شده *B. tabaci* از میزبان‌های مختلف مناطق تحت بررسی استان فارس با استفاده از روش RAPD-PCR

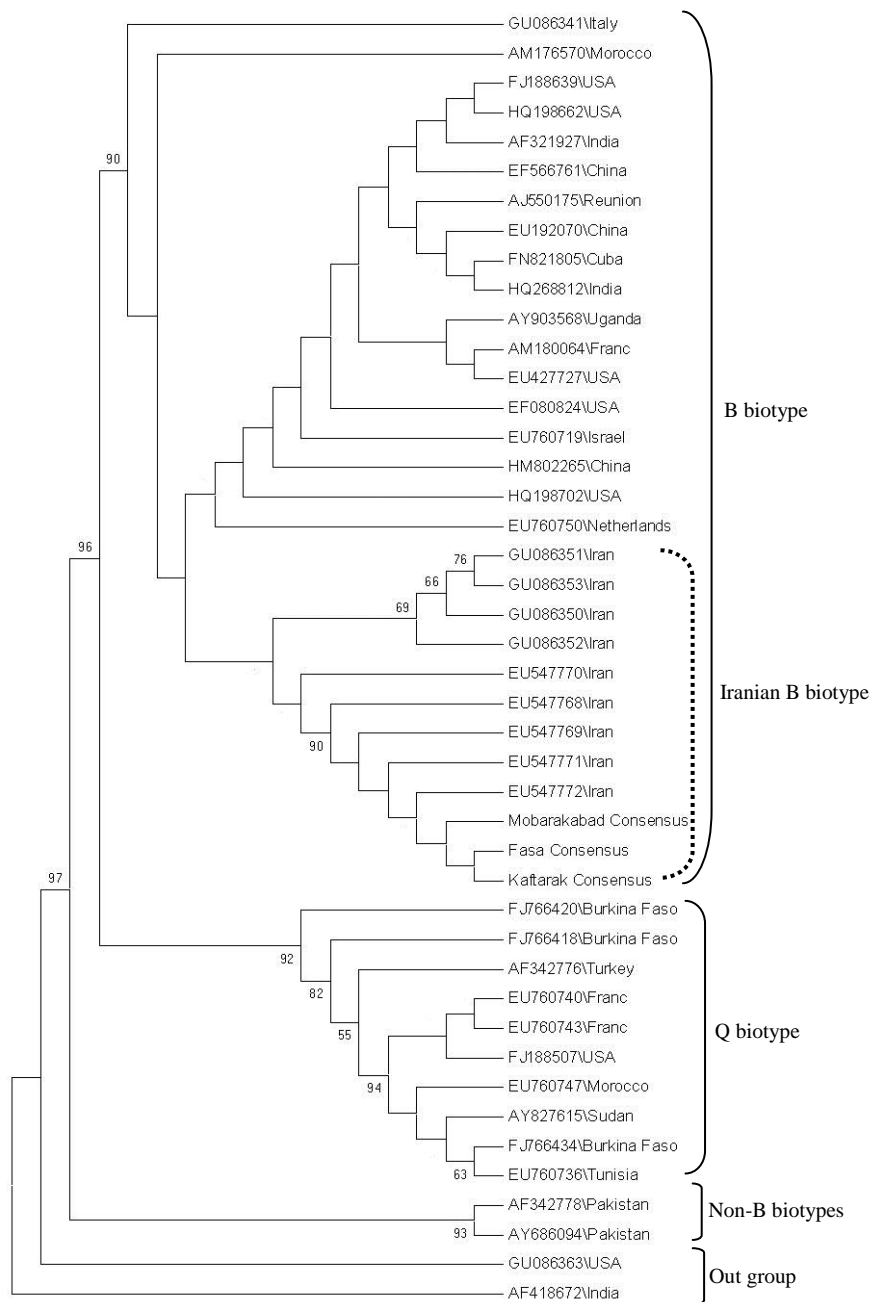
Host-region	Biotype
Cotton-Fasa	B
Cotton-Maharlouq	B
Cotton-Khir	B
Lantana-Shiraz	B
Pepper-Kaftarak	B
Pepper-Kaftarak	Cv
Cotton-Khir	unknown

شناسایی بیوتیپ‌های *B. tabaci* بر اساس تعیین ترادف نوکلئوتیدی ژن *mtCOI*

برای تکثیر *mtCOI* در سفیدبالک *B. tabaci* از جفت آغازگر L2-N-3014/C1-J-2195 در آزمون PCR استفاده شد. با استفاده از این آغازگرها قطعه‌ای به اندازه حدود ۸۵۰ جفت باز در نمونه‌های سفیدبالک جمع‌آوری شده از میزبان‌های پنبه و فلفل از مناطق مختلف استان فارس تکثیر شد. شکل ۳ نقش الکتروفورزی محصول PCR از دو نمونه سفیدبالک جمع‌آوری شده از روی پنبه در فسا را نشان می‌دهد. قطعات تکثیرشده از نمونه‌های مختلف پس از همسانسازی تعیین ترادف شدند. اندازه دقیق قطعه تعیین‌ترادف شده پس از حذف ترادف آغازگرها ۸۲۰ تا ۸۲۱ جفت باز شد. مقایسه ترادف نوکلئوتیدی این قطعه از نمونه‌های ایرانی تحت مطالعه در این تحقیق با یکدیگر و با ترادف نوکلئوتیدی در قطعه مشابه از نمونه‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Blast نشان داد که همه نمونه‌های ایرانی *B. tabaci* در گروه بیوتیپ B قرار می‌گیرند. با توجه به کوتاه‌تر بودن طول ترادف دیگر نمونه‌های ایرانی موجود در بانک ژن، پس از حذف

بیوتیپ‌های B ایران در دو زیرگروه مجزا از نمونه‌های بیوتیپ B کشورهای دیگر قرار گرفتند؛ بدین ترتیب که نمونه‌های سفیدبالک فارس همراه با نمونه‌های گزارش شده از سوی Rajaei Shoorcheh *et al.* (2008) از یزد، خراسان، کرمان و هرمزگان در زیرگروهی مجزا از نمونه‌های ایرانی گزارش شده از سوی Dinsdale *et al.* (2010) قرار گرفتند (شکل ۴).

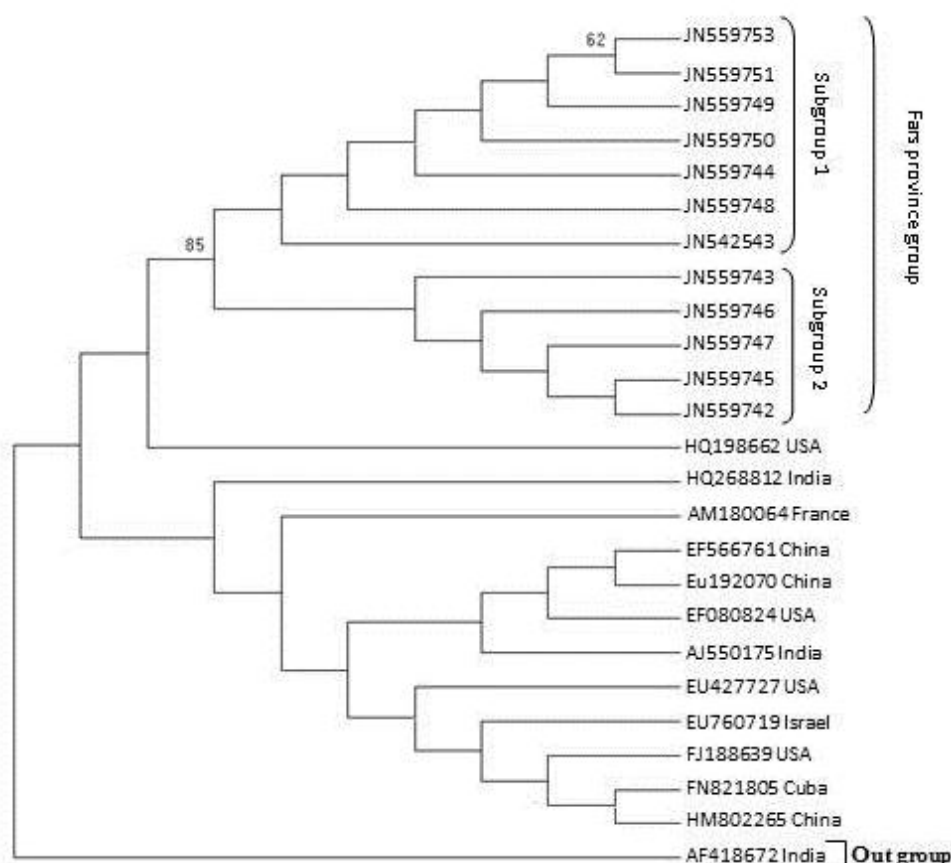
موقعیت تاکسونومیکی بیوتیپ‌های ایرانی *B. tabaci* با آنالیزهای فیلوژنتیکی قطعه ۶۵۷ نوکلئوتیدی به وسیله برنامه MEGA5 دندروگرامی حاوی سه گروه اصلی مطابق با بیوتیپ‌های B، Q و Non-B biotype به دست آمد که در شکل ۴ نشان داده شده است. نمونه‌های سفیدبالک تحت مطالعه در این تحقیق همراه با دیگر نمونه‌های ایرانی در گروه بیوتیپ B قرار گرفتند.



شکل ۴. دندروگرام حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی قطعه ۶۵۷ نوکلئوتیدی *mtCOI* نمونه‌های ایرانی *B. tabaci* با یکدیگر و با نمونه‌های موجود در بانک ژن (جدول ۱) با روش maximum likelihood مدل Hasegawa-Kishino-Yano و با استفاده از نرم‌افزار MEGA5. اعداد کنار شاخه‌ها درصد ارزش Bootstrap در میان ۱۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. مشخصات نمونه‌های *B. tabaci* در جدول ۱ نشان داده شده است.

نمونه‌های بیوتیپ B موجود در بانک ژن قرار می‌گیرند (شایان ذکر است که به علت کوتاه‌تر بودن طول ترادف ۶۵۷ نوکلئوتیدی *mtCOI* دیگر نمونه‌های ایرانی موجود در بانک ژن این نمونه‌ها در این آنالیز به کار نرفتند). نمونه‌های فارس در این آنالیز دو زیرگروه تشکیل دادند. بررسی تفاوت‌های مورفولوژیک و بیولوژیک نمونه‌های این دو زیرگروه در حال انجام است.

وقتی ترادف قطعه ۸۲۱ نوکلئوتیدی نمونه‌های سفیدبالک *B. tabaci* استان فارس با ترادف همین قطعه نمونه‌های بیوتیپ B موجود در بانک ژن با استفاده از برنامه Clustal W نرم‌افزار MEGA5 هم‌ردیف‌سازی و درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش maximum likelihood مدل Hasegawa-Kishino-Yano ترسیم شد (شکل ۵)، مشخص گردید که نمونه‌های فارس در گروهی مجزا نسبت به



شکل ۵. دندروگرام حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی قطعه ۸۲۱ نوکلئوتیدی *mtCOI* نمونه‌های استان فارس *B. tabaci* تحت مطالعه در این تحقیق با نمونه‌های بیوتیپ B موجود در بانک ژن (جدول ۱) با روش maximum likelihood مدل Hasegawa-Kishino-Yano و با استفاده از نرم‌افزار MEGA5. اعداد کنار شاخه‌ها درصد ارزش Bootstrap در میان ۱۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. مشخصات نمونه‌های *B. tabaci* در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتیجه‌گیری کلی

سفیدبالک پنبه (*Bemisia tabaci*) یکی از مهم‌ترین آفات محصولات زراعی و باغبانی است که به صورت مستقیم در نتیجه تغذیه و ترشح عسلک، یا به طور غیرمستقیم با انتقال ویروس به گیاهان خسارت می‌زند. این آفت گونه‌ای پیچیده (complex species) با بیش از ۲۰ بیوتیپ شناخته‌شده در جهان است. در این تحقیق

از دو روش RAPD-PCR و ترادف نوکلئوتیدی *mtCOI* برای تعیین بیوتیپ‌های سفیدبالک *B. tabaci* در استان فارس استفاده شد. بر اساس باندهای تکثیرشده در RAPD-PCR سه نقش متفاوت ایجاد شد که بر اساس اطلاعات منتشرشده در منابع موجود (De Barro & Driver 1997; Qiu *et al.*, 2009; Samih & Jalali-Javaran, 2005; Zhang *et al.*, 2007) بیشتر نمونه‌های

اختلافات بیولوژیکی به‌خصوص در نوع میزبان حشره است، اما همه اختلافات ژنتیکی نمی‌تواند منعکس‌کننده اختلافات بیولوژیک باشد. به همین دلیل، اخیراً در *B. tabaci* اطلاق کلمه بیوتیپ برای جمعیت‌های متنوع *B. tabaci* شک به‌وجود آمده است به‌طوری که در جدیدترین مقاله منتشرشده در این باره (De Barro *et al.*, 2011) ادعا شده که استفاده از کلمه بیوتیپ در این زمینه اشتباه و گمراه‌کننده است و مدارک کافی ارائه‌شده نیز نشان داده است که این آفت، از بیوتیپ‌های مختلف تشکیل نشده است، بلکه ترکیبی از ۱۱ گروه مشخص و تعریف‌شده است که ترکیبی از ۲۴ گونه تشخیص‌ناپذیر از نظر مورفولوژیکی را در بردارند (De Barro *et al.*, 2011).

با توجه به نظریه‌های (De Barro *et al.*, 2011)، و پیشنهاد واژه گروه ژنتیکی نمونه‌های به‌کاررفته در این تحقیق از بین ۱۱ گروه اصلی و ۲۴ زیرگروه سفیدبالک *B. tabaci* به همراه بیوتیپ B₂ از نقاط مختلف جهان در بالاگروه آفریقا/خاورمیانه/ آسیای صغیر (Africa/Middle East/Asia Minor) و زیرگروه Middle East-Asia Minor 1 قرار گرفتند (De Barro *et al.*, 2011). یکی از موضوع‌های جالب مطالعه بازده بیوتیپ‌ها و زیرگروه‌ها در انتقال و اپیدمیولوژی بیماری‌های ویروسی خواهد بود.

B. tabaci تحت مطالعه با نقش بیوتیپ B مطابقت داشت. علاوه بر بیوتیپ B نقش‌های شبیه به نقش‌های بیوتیپ Cv نیز مشاهده شد و نقش دیگری نیز مشاهده گردید که با نقش‌های تعریف‌شده برای بیوتیپ‌های B، Q و Cv شباهت نداشت. درحالی‌که بر اساس تعیین ترادف نوکلئوتیدی *mtCOI* نمونه‌های انتخابی *B. tabaci* تحت بررسی در این مطالعه بیوتیپ B تشخیص داده شدند. طبق گزارش (Shahbazi *et al.*, 2010) نیز همه نمونه‌های ایرانی *B. tabaci* ارسالی به استرالیا بر مبنای نقش ناحیه ITS1 از دی‌ان‌ای ریبوزومی، بیوتیپ B تشخیص داده شدند. بیشتر این نمونه‌ها مربوط به مزارع پنبه در مناطق داراب، جیرفت، بلوچستان، میناب، کاشمر و بوشهر بودند. نتایج این تحقیق روش *mtCOI* را به عنوان دقیق‌ترین روش تعیین بیوتیپ تأیید می‌کنند.

هنوز بحث‌هایی در زمینه گروه‌های ژنتیکی *B. tabaci* وجود دارد. یکی از سؤالاتی که مطرح است، این است که آیا *B. tabaci* یک گونه مرکب (complex species) است، یا ترکیبی از گونه‌ها (a species complex) است. اصولاً کلمه بیوتیپ بیشتر نشان‌دهنده خصوصیات بیولوژیک است، درحالی‌که در ۳۰ سال اخیر معرفی بیوتیپ‌های *B. tabaci* بیشتر بر اساس اختلافات ژنتیکی استوار بوده است. اگرچه بخشی از اطلاعات ژنتیکی وابسته به

REFERENCES

1. Alemansoor, H. (1992). *Distribution, host range, and natural enemies of the sweet potato whitefly, Bemisia tabaci (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) in Fars province*. M. Sc. thesis, Department of Plant Protection, Shiraz University, Iran. 228 pp. (In Farsi).
2. Banks, G. K., Colvin, J., Reddy, R. V. C., Maruthi, M. N., Muniyappa, V., Venkatesh, H. M., Kumar, M. K., Padmaja, A. S., Beitia, F. J. & Seal, S. E. (2001). First report of the *Bemisia tabaci* B biotype in India and an associated Tomato leaf curl virus disease epidemic. *Plant Disease*, 85, 231.
3. Bedford, I.D., Bridon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C. & Markham, P.G. (1994). Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology*, 125, 311-325.
4. Behjatnia, S. A. A., Izadpanah, K., Dry, I. B. & Rezaian, M. A. (2004). Molecular characterization and taxonomic position of the Iranian isolate of tomato leaf curl virus. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 40, 77-94. (In Persian). Abstract in English (17-23).
5. Bellows, T. S., Perring, T. M. Gill, R.J. & Headrick, D. H. (1994). Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 195-206.
6. Black IV, W. C. & DuTeau, N. M. (1997). RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors*. Crampton, J. M., Beard, C. B., and Louis, C. (eds). pp 361-374. Chapman & Hall. London.
7. Boykin, L. M., Shatters, R. G., Rosell, R. C., McKenzie, C. L., Bagnall, R. A., De Barro, P. & Frohlich, D. R. (2007). Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 1306-1319.
8. Brown, J. K. & Idris, A. M. (2005). Genetic Differentiation of Whitefly *Bemisia tabaci* Mitochondrial Cytochrome Oxidase I, and Phylogeographic Concordance with the Coat Protein of the Plant Virus Genus Begomovirus. *Annals of the Entomological Society of America*, 98, 827-837.

9. De Barro, P. J. & Driver, F. (1997). Use of RAPD-PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Australian Journal of Entomology*, 36, 149-152.
10. De Barro, P. J., Driver, F., Truman, J. W. H. & Curran, J. (2000). Phylogenetic relationship of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16, 29-36.
11. De Barro, P. J., Rueman, J. W. H. & Frohlich, D. R. (2005). *Bemisia argentifolii* is a race of *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae): the molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world. *Bulletin of Entomological Research*, 95, 193-203.
12. De Barro, P. J., Liu, S. S., Boykin, L. M. & Dinsdale, A. (2011). *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56, 1-19.
13. De la Rúa, P., Simon, B., Cifuentes, D., Martínez-Mora, C. & Cenis, J. L. (2006). New insights into the mitochondrial phylogeny of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in the Mediterranean Basin. *Journal of Zoological Systematics Evolutionary Research*, 44, 25-33.
14. Delatte, H., Reynaud, B., Granier, M., Thornary, L., Lett, J. M., Goldbach, R. & Peterschmitt, M. A. (2005). New silverleaf-inducing biotype Ms of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), indigenous to the islands of the south west Indian Ocean. *Bulletin of Entomological Research*, 95, 1-7.
15. Dinsdale, A., Cook, L., Riginosi, C., Buckley, Y. M. & De Barro, P. J. (2010). Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Entomological Society of America*, 103, 196-208.
16. Fargette, D., Konate, G., Fauquet, C., Muller, E., Peterschmitt, M. & Thresh, M. (2006). Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 235-60.
17. Frohlich, D.R., Torres-Jerez, I., Bedford, I.D., Markham, P.G. & Brown, J.K. (1999). A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*, 8, 1683-1691.
18. Gerling, D. (1996). Status of *Bemisia tabaci* in the Mediterranean countries: Opportunities for biological control. *Biological Control*, 6, 11-22.
19. Gueguen, G., Vavre, F., Gnankine, O., Peterschmitt, M., Charif, D., Chiel, E., Gottlieb, Y., Ghanim, M., Zchori-Fein, E. & Fleury, F. (2010). Endosymbiont metacommunities, mtDNA diversity and the evolution of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) species complex. *Molecular Ecology*, 19, 4365-4376.
20. Habibi, J. (1975). The cotton whitefly *Bemisia tabaci* Gen.; biology and methods of control. *Applied Entomology and Phytopathology*, 38, 13-36.
21. Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. (1985). Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22, 160-174.
22. Hodges, G. S. & Evans, G. A. (2005). An identification guide to whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of the southeastern United States. *Florida Entomologist*, 88, 518-534.
23. Maruthi, M. N., Colvin, J., Thwaites, R. M., Banks, G.K., Gibson, G. & Seal, S.E. (2004). Reproductive incompatibility and cytochrome oxidase I gene sequence variability amongst host-adapted and geographically separate *Bemisia tabaci* populations (Hemiptera: Aleyrodidae). *Systematic Entomology*, 29, 560-568.
24. Malumphy, C. *Protocol for the diagnosis of quarantine organism Bemisia tabaci (gennadius)* <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/protocols/ECBemisiatabaci.pdf>.
25. McAuslane, H.J. (2000). *Sweetpotato whitefly B biotype of silverleaf whitefly, Bemisia tabaci (Gennadius) or Bemisia argentifolii Bellows and Perring (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae)*. Retrieved April 12, 2011, from: <http://edis.ifas.ufl.edu/in286>.
26. McKenzie, C. L., Hodges, G., Osborne, L. S., Byrne, F. J. & Shatters, R. G. (2009). Distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Florida-investigating the Q invasion. *Journal of Economic Entomology*, 102, 670-676.
27. McKenzie, C. L., Bethke, J. A., Byrne, F. J., Chamberlin, J. R., Dennehy, T. J., Dickey, A. M., Gilrein, D., Hall, P. M., Ludwig, S., Oetting, R. D., Osborne, L. S., Schmale, L. & Shatters, R. G. (2012). Distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Biotypes in North America after the Q Invasion. *Journal of Economic Entomology*, 105, 753-766.
28. Muniz, Y., Granier, M., Caruth, C., Umaharan, P., Marchal, C., Pavis, C., Wicker, E., Martinez, Y. & Peterschmitt, M. (2011). Extensive Settlement of the Invasive MEAM1 population of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in the Caribbean and Rare detection of indigenous populations. *Environmental Entomology*, 40, 989-998.
29. Qiu, B., Chen, Y., Liu, L., Peng, W., Li, X., Ahmed, M. Z., Mathur, V., Du, Y. & Ren, S. (2009). Identification of three major *Bemisia tabaci* biotypes in China based on morphological and DNA polymorphisms. *Progress in Natural Science*, 19, 713-718.
30. Rajaei Shoorcheh, H., Kazemi, B., Manzari, S., Brown, J. K. & Sarafrazi, A. (2008). Genetic variation and mtCOI phylogeny for *Bemisia tabaci* (Hemiptera, Aleyrodidae) indicate that the 'B' biotype predominates in Iran. *Journal of Pest Science*, 81, 199-206.

31. Samih, M. A. & Jalali-Javaran, M. (2005). Detection by RAPD-PCR of polymorphism in populations of *Bemisia tabaci* collected on four host plants from Varamin-Iran. In: *The 4th national biotechnology congress Islamic republic of Iran*. Kerman. Kerman. Iran. 505 pp (In Farsi).
32. Shahbazi, M., Behjatnia, S. A. A., Alich, M., Bananej, K. & Izadpanah, K. (2010). Identification of *Bemisia tabaci* biotypes in Iran based on ITS1 region of ribosomal DNA and DNA polymorphism. In: *19th Iranian Plant Protection Congress*. Tehran.Tehran. Iran. 298pp. (In Farsi).
33. Shatters, R. G., Powell, C. A., Boykin, L. M., Liansheng, H. & McKenzie, C. L. (2009). Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype-specific mitochondrial cytochrome c oxidase I polymerase chain reaction primers. *Journal of Economic Entomology*, 102, 750-758.
34. Sseruwagi, P., Maruthi, M.N., Colvin, J., Rey, M. E. C., Brown, J. K. & Legg, J. P. (2006). Colonization of non-cassava plant species by cassava whiteflies (*Bemisia tabaci*) in Uganda. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119, 145-153.
35. Tahiri, A., Sekkat, A., Bennani, A., Granier, M., Delvare, G. & Peterschmitt, M. (2006). Distribution of tomato-infecting begomoviruses and *Bemisia tabaci* biotypes in Morocco. *Annals of Applied Biology*, 149, 175-186.
36. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
37. Zhang, G. F., Lü, Z. C. & Wan, F. H. (2007). Detection of *Bemisia tabaci* remains in predator guts using a sequence-characterized amplified region marker. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 123, 81-90.