



ISSN: 0067-2904  
GIF: 0.851

## التحري الجزيئي عن الفاييتوبلازما *Candidatus Phytoplasma* على نبات الراسقي *Jasminum sambac* في العراق

نورس عبد الاله صادق الكويتي\*، طارق عبد السادة كريم، درين صفوت جميل

قسم وقاية النباتات، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق

### الخلاصة

اجريت هذه الدراسة بهدف الكشف مظهرياً وجزيئياً عن الفاييتوبلازما المسببة لمرض تفلطح نبات الراسقي. جمعت عينات من نباتات رازقي تظهر عليها اعراض الاصابة بالفايتوبلازما من مشاتل مختلفة من بغداد-العراق. فحصت العينات النباتية المصابة مجهرياً وذلك عن طريق عمل مقاطع يدوية للفروع المصابة وتصبيغها بصبغة Deines وتحميلها على شرائح زجاجية. فحصت النماذج جزيئياً بواسطة polymerase chain reaction (PCR) للكشف عن الفاييتوبلازما باستعمال البادئات P1/P7 و SecAfor1/SecArev3 المتخصصة بالجنس 'Candidatus Phytoplasma' ومن ثم ترحيل نواتج PCR على هلام الاكاروز. اظهرت نتائج الفحص المجهرى عن وجود اصابة بالفايتوبلازما في انسجة نبات الراسقي من خلال تصبغ اللحاء باللون الازرق الغامق. كما اكدت نتائج الفحص الجزيئي عن اصابة الانسجة المفحوصة بالفايتوبلازما من خلال تضاعف المنطقة الجينية المستهدفة بزوج البادئ SecAfor1/SecArev3 والمتمثلة بـ DNA ذو الوزن الجزيئي 830 زوج قاعدي. في حين لم يتمكن زوج البادئ P1/P7 من الكشف عن الفاييتوبلازما جزيئياً في الانسجة المصابة. تعد هذه الدراسة هي الاولى من نوعها للكشف عن المسببات المرضية الفاييتوبلازمية جزيئياً على نبات الراسقي في بغداد-العراق.

## A Molecular Investigation of Phytoplasma (*Candidatus Phytoplasma*) Infecting Arabic Jasmine (*Jasminum sambac*) in Iraq

N. A. S. Al-Kuwaiti\*, T.A. Kareem, D. S. Jameel

Plant Protection Department, College of Agriculture, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

### Abstract

This study was conducted to investigate phytoplasma causing a virescence disease on Arabic jasmine *Jasminum sambac* based on microscopy and molecular approaches. Samples were collected from symptomatic Arabic jasmine plants grown in nurseries in Baghdad-Iraq. Specimens from infected plants were prepared and Dienes stained for light microscopy examination. Phytoplasma were detected in infected plants by polymerase chain reaction (PCR) using P1/P7 and SecAfor1/SecArev3 *Candidatus Phytoplasma* specific primer sets. Light microscopy test showed symptomatic Arabic jasmine plants were phytoplasms infected when phloem tissues were stained with a dark blue color. PCR test confirmed the symptomatic plants were phytoplasms infected when SecAfor1/SecArev3 primers could detect phytoplasms in tested samples. This primer set amplified the 830 bp DNA fragments of secA gene within phytoplasma genome from infected Arabic jasmine samples. Whereas, P1/P7 primer sets could not detect phytoplasms in tested samples. This study is the first molecular confirmation of the phytoplasma disease on Arabic jasmine in Baghdad-Iraq.

**Keywords:** Witches broom, CTAB, Arabic jasmine, Genome.

\*Email: nawras\_alkuwaiti@yahoo.com

**المقدمة:**

الراسقي *Jasminum sambac* (L.) Aiton او الياسمين العربي *Arabian jasmine* من نباتات الزينة المهمة واسعة الانتشار في العديد من دول العالم بضمنها العراق ويعود الى عائلة الزيتون *Oleaceae* كما تدخل ازهاره في صناعة العطور والنكهات المضافة الى الشاي، ويعتقد ان منشأه الاصلي هو جبال الهملايا وبوتان والمناطق المجاورة للهند [1، 2].

تعد الفايوتوبلازما من المسببات المرضية المهمة اذ تصيب اكثر من 300 عائل نباتي مسببة لها خسائر اقتصادية في جميع انحاء العالم [3، 4]. الفايوتوبلازما كائنات بدائية النواة ووحيدة الخلية وعديمة الجدار ولا يمكن تمييزها على الاوساط الغذائية الصناعية ويقتصر نموها على نسيج اللحاء داخل النبات [4، 5]. وتعود الفايوتوبلازما الى صف *Mollicutes* في حين وضعت في عام 2004 ضمن مرتبة تصنيفية جديدة هي '*Candidatus Phytoplasma*' [3، 4، 6]. تظهر على النباتات المصابة بالفايوتوبلازما اعراض تورق الازهار وتفتح السيقان وقصر السلاميات مما يعطي للنبات مظهراً شبيهاً بمكنسة الساحرة [3]. في العراق، ظهرت اصابات الفايوتوبلازما على عدة انواع نباتية مهمة اقتصادياً مثل الطماطه والبطاطا والسهم علاوة على نبات الراسقي [7، 8]. استعملت العديد من طرائق تشخيص الفايوتوبلازما بضمنها التصبغ بصبغة دينس (*Dienes's stain*) للكشف عن الفايوتوبلازما وتعيين موقعها في انسجة النباتات المصابة مجهرياً [3، 4، 9].

استعمل اختبار تفاعل البوليمريز المتسلسل (PCR) على نطاق واسع مؤخراً في الكشف عن الفايوتوبلازما باستعمال بوادئ عامة ومتخصصة [5] استهدفت مناطق جينية متعددة من ضمنها *S16 rRNA* و *23S rRNA* من DNA الريبوسومي للفايوتوبلازما [10] والجين *secA* [11]. شخضت العديد من الامراض التي تسببها الفايوتوبلازما على محاصيل مختلفة اعتماداً على الطرائق المجهرية والجزيئية فقد سجل [12] الفايوتوبلازما المرافقة لمرض مكنسة الساحرة على الباقلاء في مصر اعتماداً على تصبغ المقاطع اليدوية بصبغة دينس والمجهر الالكتروني وتقنية PCR باستعمال بوادئ متخصصة بجيني الفايوتوبلازما *S16 - rRNA S23*. كما شخضت الفايوتوبلازما المرافقة لمرض البرعم الكبير على الطماطه في ايران اعتماداً على الفحوصات ذاتها [13]. اعتمدت اربعة بوادئ صممت من منطقة *rRNA 16S* والتصبغ بصبغة دينس لتشخيص الفايوتوبلازما المرافقة لمرض التخطيط الاصفر على النخيل في مصر [14].

اجريت دراسات جزيئية محدودة على الامراض التي تسببها الفايوتوبلازما على نبات الراسقي اذ اقتصر على تشخيص مرضي مكنسة الساحرة [15] و تقزم واصفرار الرز [1]. اما في العراق لقد اجريت دراسات تشخيصية على الفايوتوبلازما ولكنها اقتصر على اختبارات الامراضية والفحص المجهرى والمصلي ولم تتضمن دراستها جزيئياً [7، 8]. ظهرت مؤخراً وبصورة واسعة اعراض تشوهات شبيهة بتلك التي تسببها الفايوتوبلازما على العديد من نباتات الراسقي المزروعة في المشاتل والحدائق العامة في محافظة بغداد-العراق لذا وضعت هذه الدراسة بهدف تشخيص الفايوتوبلازما على نبات الراسقي بوساطة الفحص المظهري والجزيئي لتأكيد تشخيص المسبب المرضي وتمييزه عن المسببات المرضية الاخرى.

**مواد وطرائق العمل:****جمع وتهيئة العينات النباتية:**

جمعت عينات من نباتات الراسقي تظهر عليها اعراض الاصابة بالفايوتوبلازما من مشاتل مختلفة في بغداد ووضعت في اكياس بلاستيكية بعد تعليمها ثم حفظت بدرجة حرارة 4 سيليزية لحين الفحص في مختبر ابحاث الامراض التابع لقسم وقاية النبات في كلية الزراعة بجامعة بغداد.

**الفحص بالمجهر الضوئي:**

اتبعت طريقة [9] لتصبغ المقاطع المصابة لنبات الراسقي بصبغة دينس مع اجراء بعض التحوير عليها وكالاتي: حضرت مقاطع عرضية يدوية للأفرع المصابة بوساطة شفرة حادة و غمرت المقاطع النباتية لمدة عشر دقائق في محلول صبغة دينس بتركيز 10% ( تم تحضيرها باذابة 2.5 غم من صبغة المثل الزرقاء *methylene blue* ، 1.25 غم صبغة الازور *Azur II* ، 10 غم مالتوز *maltose*، 0.25 غم كاربونات الصوديوم  $Na_2CO_3$  في 100 مل ماء مقطر). بعدها غسلت المقاطع بالماء المقطر لمدة 10-15 دقيقة لإزالة الصبغة الزائدة ومن ثم حملت المقاطع النباتية على شرائح زجاجية لغرض الفحص بوساطة المجهر الضوئي.

## الفحص الجزيئي:

## أولاً: استخلاص الحامض النووي:

استخلص الحامض النووي الكلي للفائتوبلازما وفق [16] اذ قطعت العينات النباتية الى اجزاء صغيرة ثم سحقته العينات النباتية في النيتروجين السائل في هاون خزفي. نقلت كل عينة مسحوقة بصورة منفصلة الى انابيب بلاستيكية سعة 1.5 مل. وضع ما يقارب 0.15 غم من العينة النباتية المسحوقة في انابيب سعة 1.5 مل واضيف اليها 800 مايكروليتر محلول دارئ cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) والذي سخن مسبقاً الى درجة 60 سيليزية والمؤلف من 2% وزن/حجم من مادة CTAB، 1.4 مولاري كلوريد الصوديوم NaCl، 20 ملي مولاري اثيلين ثنائي الامين رباعي حامض الخليك EDTA، 100 ملي مولاري Tris-HCl مضافاً اليه 2% حجم/حجم من مادة 2-mercaptoethanol. ثم تم تحضين الانابيب الحاوية على المستخلص في حمام مائي هزاز لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 60 سيليزية. تم تبريد المستخلص بدرجة حرارة الغرفة ومن ثم اضيف اليه 3/2 من الحجم الكلي محلول chloroform-isoamylalcohol (بنسبة 24/1) ثم رجت الانابيب الحاوية على المزيج باستعمال جهاز المازج الكهربائي. نقلت الانابيب الحاوية على المزيج الى جهاز طرد مركزي ثم اجري انتباز على سرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة ثمان دقائق. جمع الطور المائي لكل عينة بصورة منفصلة بواسطة ماصة دقيقة ونقل الى انابيب سعة 1.5 مل اضيف اليه حجم مكافئ من مادة isopropanol المبردة بدرجة حرارة -20 سيليزية ومزج بلطف عن طريق قلب الانابيب واعادتها عدة مرات. تم حفظ المزيج لمدة 15 دقيقة على درجة -20 سيليزية ثم اجري عليه انتباز على سرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة عشر دقائق باستعمال جهاز طرد مركزي مبرد. اهمل الجزء السائل وتم غسل الراسب عن طريق اضافة ايثانول مبرد بدرجة -20 بتركيز 70% وقلب واعادة الانابيب عدة مرات ومن ثم ترك الراسب ليحفظ في الهواء. اذيب الراسب في 100 مل ماء معقم عالي النقاوة ثم حفظ على درجة -20 سيليزية.

## ثانياً: الفحص باستعمال تقنية تفاعل انزيم البوليميريز المتسلسل PCR:

استعمل مستخلص الحامض النووي الكلي المنقى من الخطوة السابقة كقالب لتفاعل PCR، والبادئان:

P7 (5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3') و P1 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3')

اللدان يستهدفان المنطقتين الجينية S23-S16 الواقعتين ضمن DNA الفائتوبلازما [10] والبادئان:

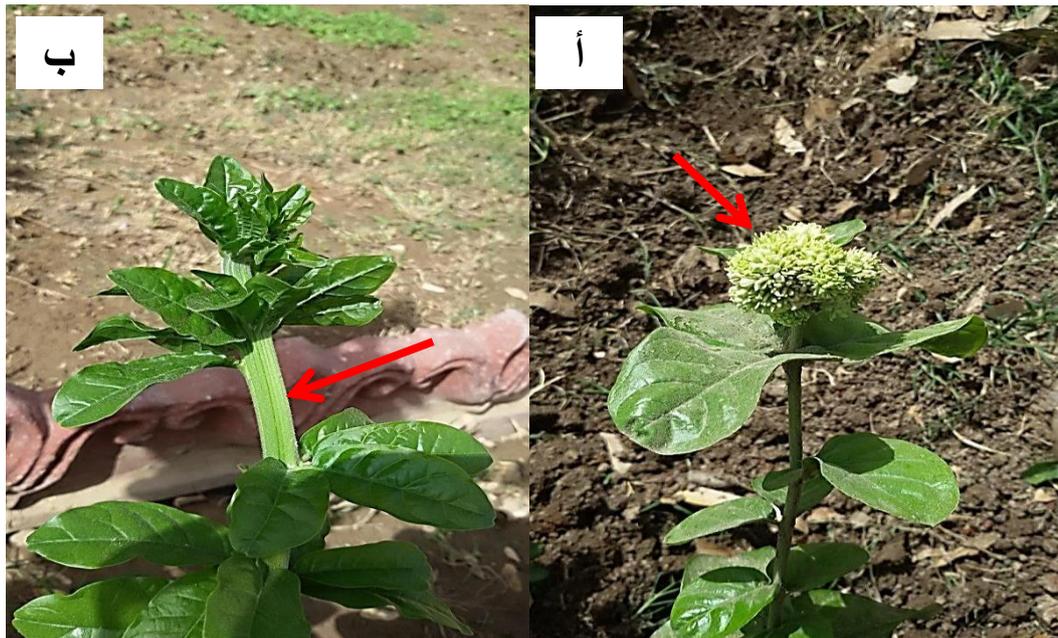
SecAfor1 (5'-GARATGAAAAGTGGGAAAG-3') و (5'-GTTTTTR CAGTTCCTGTTCATNCC-3')

SecArev3 اللذان يستهدفان الجين *secA* في DNA الفائتوبلازما [11]. حضر مزيج تفاعل PCR بإضافة 1 مايكروليتر من الحامض النووي المستخلص و 1 مايكروليتر من كل بادئ (بتركيز 10 بيكومول) الى 12.5 مايكروليتر من مزيج تفاعل PCR المجهز مسبقاً Master Mix PCR من شركة Promega، USA (U50/مل Taq DNA polymerase، 400 مايكرومول من كل من القواعد الاربعة dNTPs، 3 ملي مولاري كلوريد المغنيسيوم MgCl<sub>2</sub>) ثم اكمل الحجم الى 25 مايكروليتر وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة. اتبعت خطوات تضاعف تقنية PCR في جهاز الدور الحراري من نوع MyCycler من شركة BIORAD، USA وبظروف تفاعل مخصصة للبادئين P1/P7 وفقاً ل [16]: دقيقتان لدورة تفريق اشربة DNA الاولية على درجة 94 سيليزية و 35 دورة تتضمن دقيقة واحدة لدورة تفريق اشربة DNA على درجة 94 سيليزية و دقيقتان لدورة ربط البوائى على درجة 55 سيليزية و ثلاث دقائق لدورة الاستطالة على درجة 72 سيليزية، ودورة واحدة للاستطالة النهائية لمدة عشر دقائق على درجة 72 سيليزية. اما ظروف تفاعل البادئين SecAfor1/SecArev3 اتبعت وفقاً ل [11]: دقيقتان لدورة تفريق اشربة DNA الاولية على درجة 94 سيليزية، 35 دورة تتضمن 30 ثانية لدورة تفريق اشربة DNA على درجة 94 سيليزية، دقيقة واحدة لدورة ربط البوائى على درجة 53 سيليزية، دقيقة وثلاثين ثانية لدورة الاستطالة على درجة 72 سيليزية، ودورة واحدة للاستطالة النهائية لمدة خمسة عشر دقيقة على درجة 72 سيليزية. استعملت تقنية الترحيل الكهربائي للكشف عن DNA الناتج من PCR اذ مزجت 5 مايكروليتر من محلول DNA الناتج مع 2 مايكروليتر من صبغة التخميل blue/orange من شركة Promega، USA و اضيفت الى حفر لوح الهلام 1% المحضر من اذابة 1 غم اكاروز حرارياً في 100 مل من محلول دارئ الترحيل تريس- بوريد TBE بتركيز 1 X والمؤلف من 90 ملي مولاري Tris-borate و 2 ملي مولاري EDTA اس هيدروجيني 8 ثم اضيف اليه 3 مايكروليتر بروميد الاثيديوم (EtBr) ethidium bromide بتركيز 0.5 مايكروغرام/ مل عند درجة حرارة 45 سيليزية. تم ترحيل DNA الناتج من

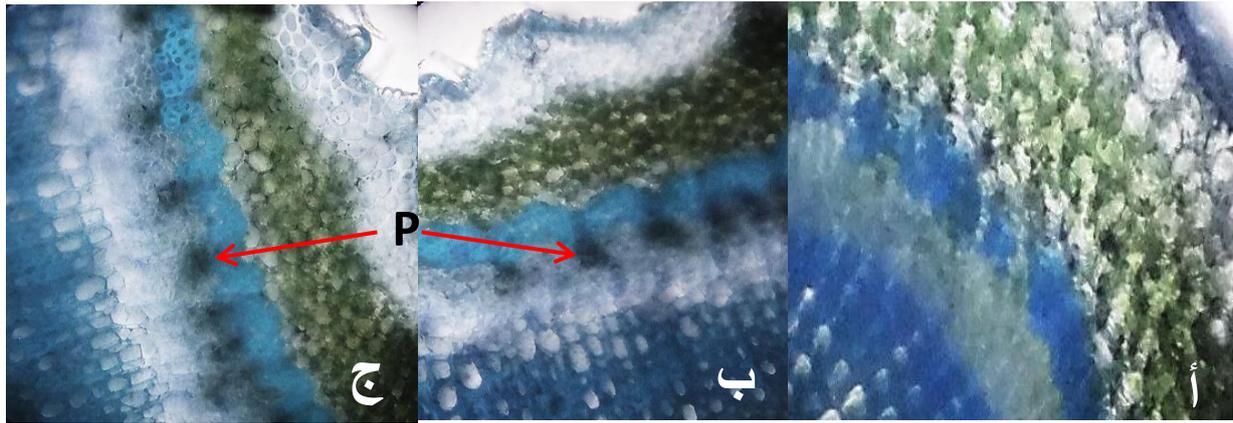
PCR لمدة 30 دقيقة على 125 ملي امبير. تم تطوير الهلام باستعمال جهاز الاشعة فوق البنفسجية والتصوير بجهاز توثيق الهلام Major science gel documentation system من شركة Major science، USA.

### النتائج والمناقشة:

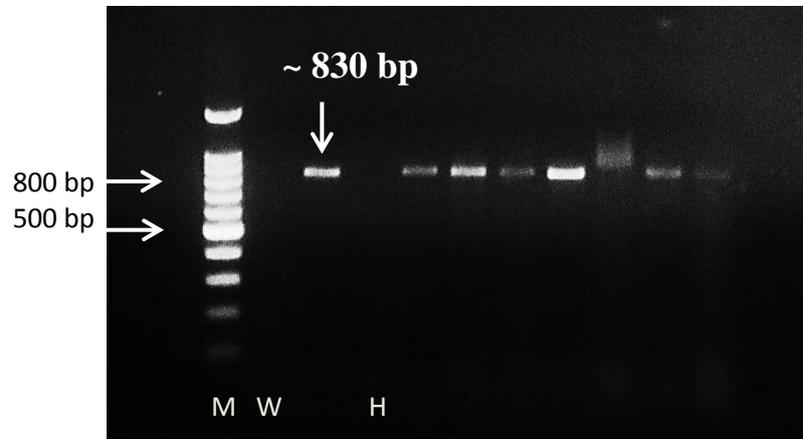
اجريت هذه الدراسة بهدف الكشف عن السبب المرضي لمرض تفلطح نباتات الراسقي في مشاتل مختلفة في محافظة بغداد في عام 2014-2015. وظهرت الاعراض المرضية بتفطح الساق وقصر السلاميات وتقارب الافرع وتجمعها في القمة علاوة على تورق الازهار شكل-1. وتمثلت هذه الاعراض المرضية على نباتات الراسقي تلك التي تسببها الاصابة بالفايوتوبلازما [3، 15]. اظهر الفحص المجهرى لمقاطع أنسجة نباتات الراسقي المصابة وجود مناطق غير منتظمة تتلون باللون الازرق الغامق في نسيج اللحاء وعدم ظهور هذه المساحات في لحاء الانسجة النباتية السليمة شكل-2 مما يدل على اصابة اللحاء بالفايوتوبلازما اذ ان صبغة دينس تعد صبغة تمييزية للفايوتوبلازما وتصيب الفايوتوبلازما فقط ولا تصيب خلايا اللحاء التي تظهر بلون شفاف في حالة خلوها من الفايوتوبلازما [9] وهذه النتيجة اتفقت مع العديد من المصادر [4، 7، 13، 14، 17]. اظهرت نتائج الفحص الجزيئي باستعمال تقنية PCR و زوج البادئين SecAfor1 و SecArev3 تفاعلاً موجباً مع عينات نباتات الراسقي المصابة اذ تم الحصول على قطعة DNA المتضاعفة بالحجم المتوقع 830 زوج قاعدي شكل-3 والذي يمثل المنطقة الجينية *secA* من جينوم الفايوتوبلازما مما يؤكد اصابة نباتات الراسقي بالفايوتوبلازما ويعد هذا الزوج من البوادئ المتخصصة في تشخيص الفايوتوبلازما 'Candidatus phytoplasma' وتصنيفها الى تحت مجاميع [11، 16]. وفي المقابل لم يتمكن زوج البادئين P1/P7 المستعمل من تشخيص الفايوتوبلازما في النماذج المصابة نفسها عندما لم يتم الحصول على اي قطع DNA عند تحليل نواتج PCR بالترجيل الكهربائي على هلام الاكاروز ولم تطابق هذه النتيجة النتائج التي حصل عليها [15] عندما تمكن من تشخيص الفايوتوبلازما المسببة لمرض مكنسة الساحرة على الراسقي في عمان بوساطة هذين البادئين وفي حين طبقت هذه النتيجة النتائج التي حصل عليها من عدم تشخيص مرض مكنسة الساحرة على الراسقي باستعمال هذين البادئين في الهند من قبل [1] مما يشير الى ان زوج البادئين P1/P7 قد لا يستهدف كل التغيرات في المنطقتين الجينية S23-S16 الواقعتين ضمن DNA الريبوسومية للفايوتوبلازما واذا ان فقدانه للتطابق قد يعود الى انه صمم اعتماداً على عدد قليل من تسلسلات القواعد النيتروجينية للفايوتوبلازما لقلة قاعدة البيانات للتسلسلات المتوفرة آنذاك عامي 1991 و 1994 قياساً بالوقت الحالي [3] وهذا ما تم تأكيده من ان بعض البوادئ قد تتفاعل ايجابياً او سلبياً مع العينات المصابة او السليمة [18] وتعد هذه الدراسة هي الاولى من نوعها لتشخيص الفايوتوبلازما التي تصيب الراسقي في العراق اعتماداً على الفحص الجزيئي ومن خلال هذه الدراسة التشخيصية نتأكد ان اصابة نباتات الراسقي في بغداد العراق هي بسبب الفايوتوبلازما 'Candidatus phytoplasma'.



شكل 1- اعراض الفايوتوبلازما على نبات الراسقي المتمثلة (أ) تورق الازهار (ب) باعراض تفلطح الساق



شكل 2- الفحص المجهرى لمقاطع عرضي في ساق نبات الراسقي (أ) نسيج نبات الراسقي السليم (ب ، ج) انسجة نبات الراسقي المصابة بالفايوتيلازما مصبغة بصبغة دينس المصابة بالفايوتيلازما P



شكل 3- لوح هلام الاكاروز يوضح فيه قطع DNA ذوات الوزن الجزيئي يقارب 830 زوج قاعدي بعد التصبيغ بـ EtBr والمنتجة بواسطة PCR وزوج البادئين SecAfor1/SecArev3: W عينة ماء فقط، H: عينة راسقي سليمة ، M: DNA القياسي 100 زوج قاعدي من شركة Promega، USA

#### المصادر

1. Rao, M. G.P. and Khurana, S.M. 2015. Rice yellow dwarf phytoplasma (16Sr XIB subgroup) infecting Jasminum sambac in India. *Phytoparasitica* 43: 77-80. DOI 10.1007/s12600-014-0425-2.
2. Younis, A., Mehdi, A. and Riaz, A. 2011 Supercritical carbon dioxide extraction and gas chromatography analysis of Jasminum sambac essential oil. *Pakistan Journal of Botany* 43:163-168.
3. Bertaccini, A. and Duduk, B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48:355-378
4. Musetti, R. and Favali, M.A. 2006. Microscopy Techniques Applied to the Study of Phytoplasma Diseases: Traditional and Innovative Methods. In Méndez-Vilas A. and Labajos-Broncano L. (eds). *Current Issues on Multidisciplinary Microscopy Research and Education FORMATEX Microscopy Book Series (No. 2)* Formatex, Badajoz, Spain.
5. Delič D. 2012. Polymerase Chain Reaction for Phytoplasmas Detection. In Dr Patricia Hernandez-Rodriguez (ed.). *Polymerase Chain Reaction*. ISBN: 978-953-51-0612-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/polymerase-chain-reaction-for-phytoplasmasdetection>.
6. Anonymous. 2014. *Candidatus* Phytoplasma palmae\_CPHST Pest data sheet [http://scaps.ceris.purdue.edu/webfm\\_send1910](http://scaps.ceris.purdue.edu/webfm_send1910).

7. Al-Fadhil, F.H.K. **1997**. Detection of phytoplasmas in some weeds and its relationship with the phytoplasmas of other crops. Ph.D. Thesis. Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
8. Al-Hadithy, U. N. I. 2002. Integrated control of sesame (*Sesamum indicum* L.) phyllody caused by phytoplasma. M.Sc. Thesis. Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
9. Musetti, R. **2013**. Dienes staining and light microscopy for phytoplasma visualization. *Methods of Molecular Biology*. 938: 109-133.
10. Smart, C.D, Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L. J., Harrison N.A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E. and Kirkpatrick, B. C. **1996** Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environmental Microbiology*. 62:2988.
11. Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Harrison, N. and Dickinson, M. **2008**. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma' . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 1826–1837. DOI 10.1099/ij.s.0.65668-0.
12. Hamed, A.H., El Attar, A. K. and El-Banna, O-H. M. **2014**. First record of a phytoplasma associated with faba bean (*Vicia faba* L.) witches'-broom in Egypt. *International Journal of Virology*. 10: 129-135 DOI: 10.3923/ijv.2014.129.135.
13. Moslemkhani, C., Razavi, V., Sadeghi, L., Mobasser, S., Khelgati bana and Shahbazi, R. **2014**. Characterization of phytoplasmas associated with tomato big bud disease, using single-tube nested PCR. *Journal of Crop Protection*. 3: 573-580.
14. Ammar, M. I, Amer, M. A. and Rashed, M. F. **2005**. Detection of Phytoplasma Associated with Yellow Streak Disease of Date Palms (*Phoenix dactylifera* L.) in Egypt. *Egyptian Journal of Virology*. 2:74-86.
15. Al-Zadjali, A. D., Natsuaki, T. and Okuda, S. **2007**. Detection, Identification and Molecular Characterization of a Phytoplasma Associated with Arabian Jasmine (*Jasminum sambac* L.) Witches' Broom in Oman. *Journal of Phytopathology*. 155:211-219. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2007.01219.x
16. Nejat, N., Sijam, K., Abdullah, S. N. A., Vadamalai, G. and Dickinson, M. **2010**. Molecular characterization of an aster yellows phytoplasma associated with proliferation of periwinkle in Malaysia. *African Journal of Biotechnology*. 9,pp: 2305-2315. DOI: 10.5897/AJB09.1944.
17. Das, A.K. and Mitra, D.K. **2004**. Detection of brinjal little leaf phytoplasma in situ by light and fluorescence microscopy. *Indian Phytopathology*. 57:242-244.
18. Fránová, J. **2011**. Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology*. 64: S287-S288, ISSN 1721-8861.