تحقیقات آفات گیاهی
جلد ۳/شماره ۱/ سال ۱۳۹۲

تنوع ژنتیکی شته جالیز *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) در شرق استان گیلان و غرب استان مازندران

زهره خیرالهی[۱]، رضا حسینی[۲*]، سیروس آقاجانزاده[۳] و بهروز گلعین[۴]
۱و ۲ به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد حشره شناسی، استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۴و ۳، استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۴)

چکیده

شته جالیز *Aphis gossypii* Glover از خانواده Aphididae و راسته Hemiptera آفتی چندین‌خوار و دارای انتشار جهانی است که سبب خسارت به محصولات مهم اقتصادی می‌شود. به منظور بررسی و ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شته جالیز در بعضی از نواحی شمالی ایران از نشانگر مولکولی RAPD استفاده شد. DNA نمونه‌ها از ۳ منطقه در غرب مازندران و ۴ منطقه در شرق استان گیلان استخراج و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۱۸ آغازگر تصادفی تکثیر شد. در این مطالعه، آغازگرهای مورد استفاده ۲۷۵ باند چندشکل و به‌طور متوسط ۱۵/۲۷۷ باند به ازای هر آغازگر، تولید کردند. تشابه و فاصله ژنتیکی محاسبه شده بر اساس شاخص نی (به ترتیب ۰/۸۲۴ و ۰/۱۹۳)، میزان تشابه ژنتیکی بالایی را در بین گروه‌های بال‌دار و بی‌بال نشان داد. علاوه بر این، آنالیز داده‌ها تنوع ژنتیکی درون جمعیتی زیادی را در گروه‌های بی‌بال نسبت به گروه های بال‌دار نشان می‌دهد. با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد، افراد مورد مطالعه در ۵ گروه اصلی گروه بندی شدند و افراد بال‌دار و بی‌بال در گروه‌های مجزایی قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: شته جالیز (پنبه)، میزبان گیاهی، چندشکلی، تنوع ژنتیکی، نشانگر RAPD

*نویسنده مسئول: rhosseini@guilan.ac.ir

مقدمه

تنوع ژنتیکی نتیجه فرایندهای طبیعی، ویژگی‌های گونه و تغییراتی است که با گذشت زمان ممکن است در حشره ایجاد شود. همچنین می‌تواند منعکس کننده تغییرات منطقه-ای گونه‌ها باشد و این‌که چگونه گونه‌ها می‌توانند در یک محیط کوچک و یا بزرگ بر هم اثر بگذارند (Sigurdsson *et al.*, 1999). تنوع ژنتیکی می‌تواند اثرات اکولوژیکی مهمی روی جمعیت‌های حشرات داشته باشد (Hughes *et al.*, 2008). بررسی‌ها نشان داده است جمعیت‌هایی با تنوع ژنتیکی بالاتر نسبت به تغییرات شرایط محیطی پایدارتر هستند (Fuller *et al.*, 1999). بنابراین آگاهی از نوع پراکنش ژنتیکی جمعیت آفات بسیار حائز اهمیت است. با آگاهی از این امر در یک محیط معین، بررسی ویژگی‌های زیست-شناسی، رفتاری، اکولوژیکی و نیز توزیع فضائی حشره تسهیل می‌شود(Hughes *et al.*, 2008).

روش‌های ژنتیک مولکولی بر اساس بررسی DNA، کیفیت و کمیت ساختار ژنتیکی جمعیت‌های حشرات را مشخص می‌کنند (Martinez- Torres *et al.*, 1997; Nicol*et al.*, 1997; Nicol*et al.*, 1998; Eastman *et al.*, 2004). در میان روش‌های مختلف مولکولی، نشانگر RAPD ابزار مفیدی برای تشخیص تنوع ژنتیکی در حشرات (Nicol*et al.*, 1997; Sigurdsson, 1999) به ویژه در شته‌ها می‌باشد زیرا کاربرد این نشانگر ساده بوده و می‌تواند از مناطق زیادی از ژنوم نسخه برداری کند و نیز نیاز به دانستن توالی DNA موجود نیست. علاوه بر این، نشانگرهای RAPD به‌طور معمول سطح بالاتری از تنوع ژنتیکی را در شته‌ها نسبت به نشانگرهایی مانند آلوزیم‌ها نشان داده‌اند (Carvalho *et al.*, 1991; Black *et al.*, 1992; William and Black, 1992; Hales *et al.*, 1997).

شته‌ها حشراتی با دامنه انتشار وسیع هستند و بیشتر آن‌ها از نظر میزبان اختصاصی‌اند (Wool *et al.*, 1995)، اما گونه-هایی که از نظر اقتصادی اهمیت زیادی دارند چندین‌خوار می‌باشند (Vanlerberghe- Masutti and Chavigny, 1998). بسیاری از شته‌ها بر اساس چرخه زندگی‌شان دارای فنوتیپ‌های بال‌دار و بی‌بال می‌باشند (Lushai*et al.*, 1997). شته جالیز از خانواده Aphididae و راسته Hemiptera در ایران ابتدا در سال ۱۳۱۷ توسط افشار گزارش شد (Esmaili,1983). رجبی (Rajabi,1989) پراکنش این شته را در تمام مناطق ایران به خصوص سواحل شمالی کشور (گیلان، مازندران) و شهرستان‌های مرکزی این دو استان و اطراف تهران ذکر کرد. شته جالیز چندین‌خوار بوده و در دنیا یکی از آفات مهم در محصولات جالیزی، باغ-های مرکبات، مزارع پنبه و گلخانه‌ها است که سبب خسارت به محصولات مهم اقتصادی می‌شود، به‌علاوه در انتقال بیماری تریستیزا نیز نقش دارد (Najar-Rodríguez *et al.*, 2009). مطالعه روابط ژنتیکی و خویشاوندی برای شناخت تنوع ژنتیکی این شته به‌منظور مدیریت بهتر آفت و نیز اصلاح نژاد گیاهان میزبان برای بالا بردن سطح مقاومت در گیاه حائز اهمیت است. در ایران با توجه به اهمیت شته‌ی جالیز به دلیل خسارت به محصولات مختلف اعم از جالیزی، مرکبات و محصولات گلخانه‌ای و نیز قابلیت انتقال بیماری تریستیزا (Rajabi,1989)، لازم است ویژگی‌های ژنتیکی آن مطالعه شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد با توجه به دامنه میزبانی وسیع و پراکنش جغرافیایی این حشره در ایران تاکنون هیچ گونه مطالعات ژنتیکی روی این شته انجام نشده است. این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی این شته با استفاده از نشانگر RAPD در مناطقی از غرب استان مازندران و شرق استان گیلان انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های شته از مناطق مختلف غرب استان مازندران و شرق استان گیلان روی برگ میزبان‌های متفاوت و در فصول مختلف سال ۱۳۸۸ جمع‌آوری و بر اساس وجود و فقدان بال به دوگروه بال‌دار و بی‌بال تفکیک شدند (جدول ۱). سپس نمونه ها به داخل تیوب های محتوی الکل اتیلیک ۸۰ درصد منتقل و در فریزر ۲۰- قرارداده شدند.

شناسایی شته جالیز *Aphis gossypii*

جهت شناسایی نمونه‌های جمع‌آوری شده، اسلاید میکروسکوپی با استفاده از روش بلکمن و ایستاپ (Blackman and Eastop, 1985) تهیه شد. به‌منظور شناسایی شته جالیز بیشتر از کلید شناسایی شته‌ها روی میزبان-

های مختلف، و در مواردی از کلید شناسایی شته‌های ایران (Rezvani, 2001) استفاده شد. نمونه‌ها پس از شناسایی توسط متخصص مربوطه (آقاجانزاده) تائید شد.

استخراج DNA الگو

برای استخراج DNA پنج شته از یک کلونی انتخاب شد. استخراج DNA با استفاده از کیت جداسازی (سیناژن- ایران) انجام گرفت. پس از استخراج DNA و قبل از انجام واکنش‌های PCR، جهت بررسی کمیت و کیفیت، DNA به‌دست آمده با اسپکتروفتومتر (نانو دراپ ND1000- آمریکا) در طول موج جذب ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین برای تصدیق و تائید نتایج به‌دست آمده سه میکرولیتر از محلول DNA در ژل آگارز ۰/۸ ٪ الکتروفورز شد. در نهایت به منظور یکنواخت کردن غلظت DNA، تمامی نمونه‌های استخراج شده به یک غلظت واحد ۱۲/۵ng/µl رسانده شدند.

آغازگرهای مورد استفاده جهت RAPD-PCR

برای بررسی چند شکلی قطعات DNA با تکثیر تصادفی (RAPD) از ۱۸ آغازگر استفاده شد. آغازگرهای لازم در این تحقیق از شرکت سیناژن تهیه شد. مشخصات این آغازگرها در جدول ۲ نشان داده شده است.

RAPD-PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط اصلی PCR شامل، ۰/۳ میکرولیتر (۱۰dNTPs میلی مولار)، ۰/۷۵ میکرولیتر آغازگر (۱۰ میکرومولار)، ۰/۴۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار)، ۱/۵ میکرولیتر بافر واکنش(۱۰x) و ۰/۲ میکرولیتر *Taq* DNA پلیمراز (۵ U/µl) (شرکت سیناژن) بود. مواد مورد استفاده در واکنش، در حجم چندین برابر (بسته به تعداد نمونه‌ها) به عنوان مخلوط اصلی تهیه و سپس در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری حاوی ۲ میکرولیتر (۲۵ نانوگرم) از DNA استخراج شده از هر نمونه تقسیم شد.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (MJ Research, PTC-200) مطابق برنامه زیر انجام شد. در ابتدا واسرشته‌سازی اولیه در ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر به رشته الگو در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت ۱۰ دقیقه گسترش نهایی انجام شد. برای مشاهده محصول PCR، مقدار µl ۱۳ از هر واکنش PCR به چاهک‌های ژل الکتروفورز اضافه شد. ژل الکتروفورز از آگارز ۱/۵ ٪ و بافر TBE 0.5X تهیه شده بود. به هر نمونه ۳µl بافر بارگذاری اضافه شد و در اولین و آخرین چاهک ۵ میکرولیتر(Fermentas Ladder 1 Kbp) DNA بارگذاری شد. الکتروفورز نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت و ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۷۵ ولت ادامه یافت. به منظور رنگ- آمیزی ژل و مشاهده باندها از اتیدیوم بروماید استفاده شد و پس از اتمام الکتروفورز ژل، باندها زیر نور ماوراءبنفش با استفاده از دستگاه GelDoc مشاهده و عکس‌برداری شدند.

تجزیه وتحلیل داده‌ها

باندهای چند شکل حاصل با روش صفر (فقدان باند) و یک (وجود باند) امتیازدهی و در نرم‌افزار Microsoft Excel office 2007 ثبت شد. تجزیه وتحلیل خوشه‌ای (Cluster analysis) داده‌ها به کمک روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد در نرم افزار NTSYS-pc و POPGENE انجام و دندروگرام مربوطه ترسیم شد.

نتایج و بحث

سی و شش نمونه شته جالیز (*Aphis gossypii*) از مناطق مختلف در غرب استان مازندران و شرق استان گیلان روی ۱۸ نوع میزبان شناسایی و بر اساس وضعیت بال به دوگروه بی‌بال (M1-M21) و بال‌دار(M22-M36) تفکیک شدند (جدول ۱) و در مطالعات تکمیلی مورد استفاده قرار گرفتند. هجده آغازگر استفاده شده در این تحقیق (جدول ۲)، برای ۲ گروه بالدار و بی‌بال در کل ۲۷۵ باند مختلف ایجاد کردند (جدول ۲) که تمام باندهای تولید شده چند شکل بوده و باندهای مشابه مشاهده نشد. متوسط ایجاد باند برای هرآغازگر۱۵/۲۷۷ بود. از بین ۱۸ آغازگر به کار رفته، بیش‌ترین چند شکلی را آغازگر A19 و کم‌ترین

آغازگر E09 را تولید کردند. در نتیجه جایگاه های تکثیر شده آغازگر A19 بیش‌ترین میزان تنوع بین افراد را نشان دادند.

نتایج بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بر اساس تعداد آلل مشاهده شده (Na)، تعداد آلل موثر (Ne) و تنوع ژنی نی (Nei) (جدول ۳) نشان داد، گروه یک (بی‌بال-M1 M21) که دارای بیش‌ترین میزان آلل مشاهده شده، آلل موثر و تنوع ژنی می‌باشد، بیشترین میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را نشان می‌دهد. همچنین بر اساس معیارهای ذکر شده، کم‌ترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به گروه دو (بالدار M22-M36) است. دلایل مختلفی می‌توانند در نتایج ذکر شده موثر باشند. به عنوان مثال، تعداد افراد مورد بررسی گروه یک نسبت به گروه دوم بیشتر بود و افراد جمع آوری شده بیشتر از مناطق غرب مازندران بودند و از شرق گیلان افراد کمتری جمع‌آوری شد. این احتمال نیز وجود دارد که در غرب مازندران شرایط متعادل‌تر و مناسب‌تری از نظر وضعیت دمایی، ارتفاع از سطح دریا و تعدد میزبان برای رشد شته جالیز فراهم بوده و هر چه شرایط رشد برای شته بهتر باشد، این حشرات با سرعت بیشتری رشد و تکثیر یافته و تعداد نسل بیشتری را تولید می‌نمایند. در نسل‌های متوالی و ممتد پدیده جهش و سایر تغییرات ژنتیکی متداول‌تر بوده که بالطبع تنوع را در بین آن‌ها افزایش می‌دهد (Keller *et al.*, 2001). بنابراین مطالعه و بررسی‌های اکولوژیکی برای توجیه این امر در این زمینه الزامی به نظر می‌رسد. علاوه بر موارد ذکر شده افراد گروه یک نسبت به گروه دوم روی میزبان های متنوع‌تری جمع‌آوری شدند که تنوع میزبانی نیز احتمالاً در تنوع ژنتیکی موثر بوده است. این نتایج مشابه نتایجی است که لوپز و گونزاگا (Lopes and Gonzaga, 2007) برای ارزیابی اثر میزبان‌ها و فاصله جغرافیایی جمعیت‌ها روی تنوع ژنتیکی *Metopolophium dirhodum* با استفاده از نشانگرهای RAPD به‌دست آوردند. آن‌ها دریافتند که بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی همبستگی وجود ندارد. بنابراین آن‌ها پیشنهاد کردند که نوع گیاه میزبان می‌تواند دلیل بهتری برای تفاوت ژنتیکی قابل توجهی که بین جمعیت‌های جمع‌آوری شده روی جودوسر با جمعیت‌های موجود در روی گندم مشاهده شده، باشد. وانلربرگ مسوتی و کاویگنی (Vanlerberghe Masutti and,Chavigny, 1998) در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از شته جالیز با استفاده از نشانگرهای RAPD، به نتیجه مشابهی از چندشکلی درون جمعیتی دست یافتند اما این تنوع ژنتیکی درون جمعیتی، به گیاهان میزبان وابستگی نداشت.

نتایج بررسی تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس روش نی با احتساب اریبی و بدون آن نشان داد که دو گروه بال‌دار و بدون‌بال ۰/۸۲۴ تشابه ژنتیکی و ۰/۱۹۳ فاصله ژنتیکی نسبت به هم داشته‌اند. این شباهت ژنتیکی بالا بین گروه‌ها می‌تواند به علت نزدیکی بین مکان‌های جمع آوری باشد. این نتایج برخلاف گزارشی است که لوشای وهمکاران (Lushai *et al.*, 1997) ارائه نمودند. آن‌ها با استفاده از نشانگر RAPD تنوع ژنتیکی فنوتیپ‌های مختلف دو گونه شته *Rhopalosiphum padi* و *Sitobion avenae* را داخل کلونی‌ها بررسی نمودند، و به تفاوت ژنتیکی زیادی بین فنوتیپ‌های بال‌دار و بی‌بال شته‌های بالغی که تولید مثل غیر جنسی داشتند پی بردند.

در این تحقیق تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد که دارای بیش‌ترین مقدار ضریب همبستگی کوفنتیک (۰/۹۷۲۶۶) بود، انجام شد. کلاستر در ضریب تشابه ۳/۸ برش داده شد و ژنوتیپ‌ها در ۵ گروه اصلی(E,D,C,B,A) گروه‌بندی شدند (شکل۱). گروه اول (A)، شامل ۴۴/۴۴ درصد افراد است که تمامی ژنوتیپ‌ها بی‌بال و بیشتر از مناطق غرب مازندران هستند. گروه دوم که با ضریب تشابه ۳۱ درصد از گروه اول جدا شده است تنها دارای یک ژنوتیپ بی‌بال M10 است. گروه سوم شامل ۴۷/۲۲ درصد افراد، و اکثریت از مناطق شرق گیلان هستند. در این گروه ۸۲/۳۵ درصد ژنوتیپ‌ها بال‌دار و فقط سه ژنوتیپ M19 ، M20 و M21 بی‌بال هستند. با توجه به این- که فواصل جغرافیایی یکی از عوامل مؤثر بر تنوع جمعیت‌ها است (Eastman *et al.*, 2004) می‌توان وجود برخی از ژنوتیپ‌های بی‌بال را داخل گروه‌های بال‌دار توجیه نمود. از آنجا که این سه ژنوتیپ از نظر جغرافیایی در محدوده‌ی مشترکی با سایر افراد موجود در گروه مربوطه هستند، در

نتیجه فاصله‌ی جغرافیایی مشترک باعث تشابه ژنتیکی بالا بین افراد شده است. این تشابه ژنتیکی بالا میان افراد باعث شده است که نشانگرهای مورد استفاده توانایی لازم برای تفکیک این افراد را نداشته باشند. در نتیجه برخی از افراد بی‌بال هم گروه با افراد بال‌دار شدند. گروه چهارم تنها شامل یک ژنوتیپ بال‌دار M23 است که با ضریب تشابه ۲۲ درصد از گروه سوم جدا شده است و گروه پنجم نیز تنها شامل ژنوتیپ بی‌بال M3 است که با ضریب تشابه ۱۳ درصد از ۴ گروه قبلی جدا شده است. با توجه به دندروگرام رسم شده، افراد بال‌دار و بی‌بال در گروه‌های مجزایی قرار گرفته‌اند، بنابراین تجزیه کلاستر تائید کننده نتایج تجزیه مولکولی و تشابه و فواصل ژنتیکی محاسبه شده است. نتایج این بررسی نشان می‌دهد تنوع ژنتیکی شته جالیز در غرب استان مازندران بیشتر از شرق استان گیلان است، همچنین نشانگر RAPD فنوتیپ‌های بال-دار و بی‌بال را از یکدیگر تفکیک و در گروه‌های جداگانه-ای قرار داد. بر اساس نتایج بدست آمده افراد بی‌بال بیش‌ترین تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را نشان دادند. بررسی تنوع ژنتیکی این آفت در کشور، به درک بهتر عملکرد آفت و تغییرات جمعیت و سازگاری آن با شرایط متفاوت کمک نموده و منجر به تحلیل برخی از مشکلات موجود در زمینه کنترل آن می‌شود.

جدول ۱- فنوتیپ‌های شته جالیز *Aphis gossypii*، میزبان گیاهی و محل جمع‌آوری آن‌ها

Table 1. Phenotypes of *Aphis gossypii,* their host-plant and sampling localities

Sampling location	Winged or Wingless -Host	Sampling Code	Sampling location	Winged or Wingless- Host	Sampling Code
Kalachay	Wingless - *Citrus sinensis*	M19	Tonekabon	Wingless - *Zea mays*	M1
Kalachay	Wingless - *Zea mays*	M20	Chalus	Wingless - *Solanumnigrum*	M2
Langarud	Wingless - *Camellia sinensis*	M21	Langarud	Wingless - *Citrus aurantium*	M3
Tonekabon	Winged- *Citrulluslanatus*	M22	Chaboksar	Wingless - *Citrus sinensis*	M4
Tonekabon	Winged - *Cucumismelo*	M23	Langarud	Wingless -*Luffacylindri*	M5
Ramsar	Winged - *Cucumissativus*	M24	Chalus	Wingless - *Cucurbita maxima*	M6
Chaboksar	Winged – *Solanumtuberosum*	M25	Ramsar	Wingless - *Chenopodium foliosum*	M7
Chalus	Winged - *Filipendulaulmaria*	M26	Ramsar	Wingless - *Citrus sinensis*	M8
Ramsar	Winged – *Capsicum annum*	M27	Ramsar	Wingless - *Camellia sinensis*	M9
Chalus	Winged – *Cucumissativus*	M28	Ramsar	Wingless - *Urtica dioica*	M10
Chalus	Winged– *Cucumismelo*	M29	Tonekabon	Wingless - *Cucumissativus*	M11
Chaboksar	Winged – *Eriobotrya japonica*	M30	Tonekabon	Wingless - *Citrus sinensis*	M12
Rudsar	Winged – *Cucumissativus*	M31	Tonekabon	Wingless - *Cucurbita maxima*	M13
Rudsar	Winged -*Luffacylindri*	M32	Chalus	Wingless - *Citrus aurantium*	M14
Kalachay	Winged - *Robiniapseudoacacia*	M33	Chalus	Wingless - *Chaenomeles japonica*	M15
Kalachay	Winged – *Filipendulaulmaria*	M34	Rudsar	Wingless - *Citrus sinensis*	M16
Langarud	Winged – *Cucumissativus*	M35	Rudsar	Wingless - *Robiniapseudoacacia*	M17
Langarud	Winged - *Robiniapseudoacacia*	M36	Kalachay	Wingless - *Cucumissativus*	M18

جدول ۲- توالی، تعداد باندها و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) آغازگرهای مورد مطالعه

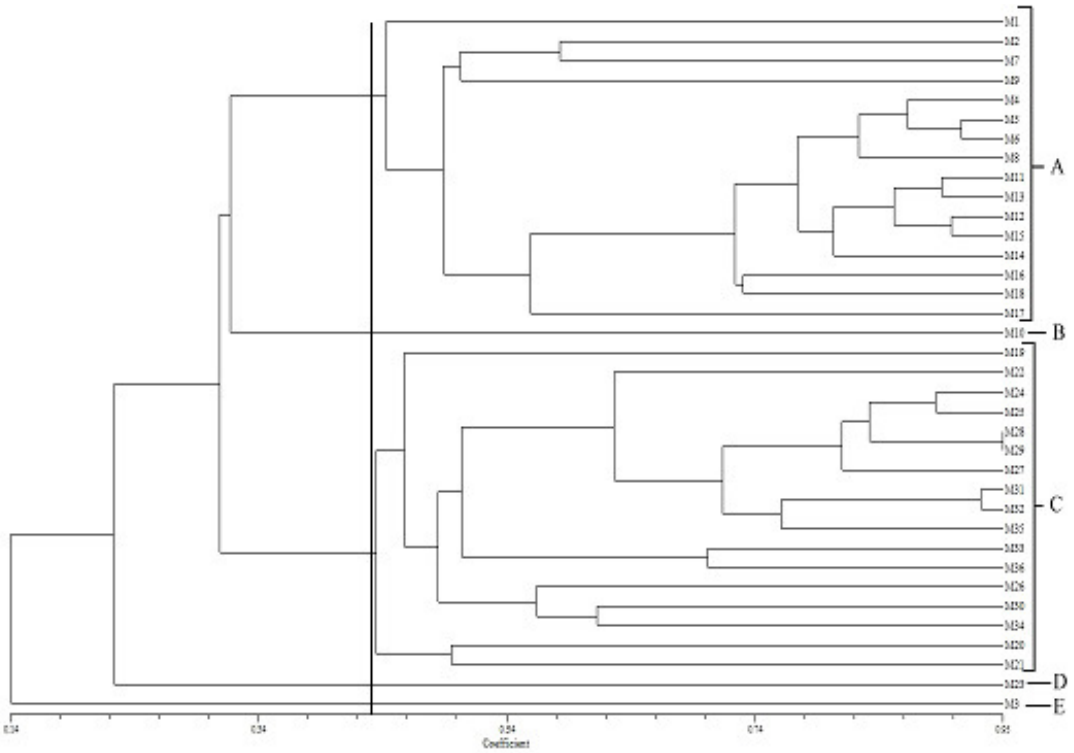
Table 2. Sequences, number of bands and polymorphic information content (PIC) of the primers used in this study

Primer	Primer sequence (5´- 3´)	Number of bands	PIC
OPAA10	TGGTCGGGTG	20	0.28809
OPAD10	AAGAGGCCAG	27	0.358755
OPM10	TCTGGCGCAC	19	0.366354
OPV10	GGACCTGCTG	17	0.320266
OPZ10	CCGACAAACC	25	0.260062
B12	CCTTGACGCA	17	0.274649
E09	CTTCACCCGA	19	0.191464
A04	AATCGGGCTG	17	0.321646
A07	GAAACGGGTG	10	0.290938
A08	GTGACGTAGG	10	0.332039
A19	CAAACGTCGG	12	0.415016
G05	CTGAGACGGA	9	0.338126
G06	GTGCCTAACC	13	0.330939
A12	TCGGCGATAG	15	0.332576
A18	AGGTGACCGT	16	0.34757
M11	GTCCACTGTG	7	0.320483
M14	AGGGTCGTTC	12	0.355667
M18	CACCATCCGT	10	0.317093

جدول۳- میانگین تعداد آلل مشاهده شده (Na)، آلل موثر(Ne) و شاخص نی برای گروه‌ها

Table 3. Average observed number of alleles (Na), effective number of alleles (Ne) and Nei's index for groups

Groups	Na	Ne	Nei's index
1	1.899329	1.452434	0.264614
2	1.828859	1.421882	0.251329
Average	1.864094	1.437158	0.2571795



شکل۱- دندروگرام به‌دست آمده برای ۳۶ ژنوتیپ *Aphis gossypii* با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA

Figure 1. Obtained dendrogram using Jacard similarity index and UPGMA method for 36 genotypes of *Aphis gossypii*

References

Black, W. C., Duteau, N. M., Puterka, G. J., Nechols, J. R. and Pettorini. J. M. 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD- PCR) to detect DNA polymorphism in aphids (Homoptera, Aphididae). **Bulletin of Entomological Research** 82: 151-159.

Blackman, R. L. and Eastop, V.F. 1985. Aphids on the World Crops, An Identification Guide. John Wiley and Sons, Chichester.

Carvalho, G. R., Maclean, N., Wratten, S. D., Carter, R. E. and Thurston, J. P. 1991. Differentiation of aphid clones using DNA fingerprints from individual aphids. **Proceeding of the Royal Society of London *B*** 243: 109-114.

Eastman, C. G., Figueroa, C. C. and Olivares-Donoso, R. 2004. Diet breadth and its relationship with genetic diversity and differentiation: the case of southern beech aphids (Hemiptera: Aphididae). **Bulletin of Entomological Research** 94: 219–227.

Esmaili, M. 1983. Important pest of fruit trees. Sepehr Publication Center, Tehran, 578 pp. (In Farsi).

Fuller, S. J., Chavigny, P., Lapchin, L. and Vanlerberghe-Masutti, F. 1999.Variation in clonal diversity in glasshouse infestations of the aphid, *Aphis gossypii* Glover in southern France. **Molecular Ecology** 8:1867–1877.

Hales, D. F., Tomiuk, J., Wohrmann, K. and Sunnucks, P. 1997. Evolutionary and genetic aspects of aphid biology: a review. **European Journal of Entomology** 94: 1–55.

Keller, L. F., Jeffery, K. J. and Arcese, P. 2001. Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. **Proceedings of the Royal Society of London B** 268: 1387-1394.

Lopes-da-Silva, M. and Gonzaga Esteves Vieira, L. 2007.Analysis of the genetic diversity in *Metopolophium dirhodum* (Walker) (Hemiptera: Aphididae) by RAPD markers. **Revista Brasileira de Entomologia** 51(1): 54-57.

Lushai, G., Loxdale, H. D. and Brookes, C. P. 1997. Genotypic variation among different phenotypes within aphid clones. **Proceedings of Royal Society of London. Series B**, **Biological Sciences** 264: 725–730.

Martinez- Torres, D., Carris, R., Latorre, A., Simon, J. C., Hermoso, A. and Moya, A. 1997.Assessing the nucleotide diversity of three aphid species by RAPD. **Journal of Evolutionary Biology** 10: 459-477.

Najar-Rodríguez, A. J., McGraw, E. A., Mensah, R. K., Pittman, G. W. and Walter, G. H. 2009. The microbial flora of *Aphis gossypii*: Patterns across host plants and geographical space. **Journal of Invertebrate Pathology** 100 (2): 123-126.

Nicol, D., Amstrong, K.F.,Wratten, S. D., Cameron, C. M., Frampton, C. and Fenton, B. 1997. Genetic variation in an introduced aphid pest (*Metopolophium dirhodum*) in New Zealand and relation to individuals from Europe. **Molecular Ecology** 6: 255-265.

Nicol, D., Amstrong, K. F.,Wratten, S. D., Walsh, P. J., Straw, N. A., Cameron, C. M., Lahmann, C. and Frampton, C. M. 1998. Genetic diversity of an introduced pest, the green spruce aphid *Elatobium abietinum* (Hemiptera: Aphididae) in New Zealand and the United Kingdom. **Bulletin of Entomological Research** 88: 537-543.

Rajabi, Gh. 1989. Damaging insects of cold region productive trees of Iran. Vol. 3 (Homoptera). Plant pests and Diseases Research Institute (In Farsi).

Hughes, R. A., Inouye, B. D., Johnson, T.J., Underwood, N. and Vellend, M. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters** 11: 609-623

Rezvani, A. 2001. Key to the aphids (Homoptera: Aphidinea) in Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization (In Farsi).

Sigurdsson, V., Halldorsson, G., Sigurgeirsson, A., Thorsson, E. Th. and Anamthawat-Jonsson, K. 1999. Genetic differentiation of the green spruce (*Elatobium abietinum* Walker), a recent invader to Iceland. **Agricultural and Forest Entomology** 1: 157-163.

Vanlerberghe- Masutti, F. and Chavigny, P. 1998. Host-based genetic differentiation in the aphid *Aphis gossypii* Glover, evidenced from RAPD fingerprints. **Molecular Ecology** 7: 905-9.

William, C. and Black, I. V. 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). **Bulletin of Entomological Research** 82: 151-159.

Wool, D., Hales, D. and Sunnucks, P. 1995. Host-plant relationships of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera, Aphididae) in Australia. **Australian Journal of Entomological** 34: 265-271.

Plant Pests Research
Vol. 3, No. 1, 2013

Genetic variation of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) in eastern Guilan and western Mazandaran provinces (Iran)

Z. Kheyrollahi[1], R. Hosseini[2*], S. Aghajanzadeh[3], B. Golein[4]
1 and 2, Former MSc., Student, and Assistant Professor of Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, 3 and 4, Academic staffs of Iran Citrus Research Institute, Ramsar.

(Received: January 14, 2013- Accepted: April 24, 2013)

Abstract

Aphis gossypii Glover (Hemiptera: Aphididae) is a polyphagus pest worldwide. It causes severe damage to numerous economically important crops. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers were used to evaluate genetic variation among different populations of *Aphis gossypii* in some parts of North of Iran. DNA was extracted from individual aphids collected from (3 regions in western Mazandaran and 4 regions in eastern Guilan provinces, North of Iran) and amplified in PCR reactions using eighteen random primers. Random primers produced 275 polymorphic bands, an average of 15.277 informative markers per primer. Genetic identity and distance obtained using Nei's index (0.824, 0.193 respectively), show a high genetic similarity and a low genetic distance among winged and the wingless groups. Moreover, data analysis revealed a significant genetic diversity within wingless individual aphids rather than winged ones. Individuals were clustered using UPGMA method and Jacard similarity index. They were grouped in five main groups while wingless and winged individuals were distributed in different groups.

Keywords: Cotton aphid, Host-plant, Polymorphism, Genetic variation, RAPD markers

*Corresponding author: rhosseini@guilan.ac.ir