تحقیقات آفات گیاهی
۲۴- ۱۵: (۳) ۴- ۱۳۹۳

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های مختلف کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) در استان مازندران با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

سمانه بامهر[۱]، محمود محمدی شریف[۲]*، علیرضا هادیزاده[۲] و جواد کریمی[۳]

۱ و ۲ به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره شناسی و استادیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
۳، استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۰)

چکیده

کاربرد موفقیت آمیز عوامل کنترل بیولوژیک و استقرار مناسب جمعیت‌های آن‌ها در مناطق مختلف نیازمند آگاهی از جنبه‌های مختلف زیستی این گونه‌ها است. کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri* موثرترین دشمن طبیعی شپشک‌های آردآلود در باغ‌های مرکبات و چایکاری‌های استان مازندران است. هدف این تحقیق توصیف تنوع ژنتیکی این گونه با استفاده از نشانگر RAPD در هشت جمعیت طبیعی و دو جمعیت پرورش تجارتی آن بود. در آزمایش‌ها از ۲۲ آغازگر ده نوکلئوتیدی RAPDاستفاده شد. پس از بهینه سازی شرایط واکنش PCR (دمای اتصال $^{\circ}C$ ۳۸ بمدت یک دقیقه) و انجام آزمایش‌ها روی تمام جمعیت‌ها، محصولات با استفاده از ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شدند. این آغازگرها در مجموع ۴۳۴ نوار قابل امتیازدهی تولید کردند که ۳۳۴ نوار (۷۶/۹ درصد) چند شکلی نشان دادند. شباهت ژنتیکی میان جمعیت‌ها از ۰/۴۸ (جمعیت های تنکابن و فریدونکنار) تا ۰/۷۸ (جمعیت های چالوس و اینسکتاریوم بهشهر) متغیر بود. در نتیجه گروه‌بندی جمعیت‌ها با روش UPGMA و با استفاده از نرم افزار NTSYS-PC، جمعیت‌های مورد بررسی در دو گروه دسته‌بندی شدند. در گروه اول جمعیت‌های بابلسر، رامسر، ساری، تنکابن، چالوس و نمونه‌ی انسکتاریوم بهشهر قرار داشته و گروه دوم شامل جمعیت‌های جمع-آوری شده از شهرهای قائمشهر، سوادکوه و فریدون‌کنار به همراه نمونه‌ی انسکتاریوم بابل بود. بر مبنای ضریب تفکیک دندروگرام حاصل، جمعیت‌های مورد مطالعه تمایز متوسطی داشتند.

کلید واژه: ساختار ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی، کنترل زیستی، استان مازندران

*نویسنده مسئول : msharif1353@yahoo.com

مقدمه

کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant یک شکارگر چندخوار است که برای کنترل شپشک‌های آردآلود استفاده می‌شود. این گونه مفید، بومی استرالیا بوده و از طریق کالیفرنیا به اکثر مناطق جهان منتقل شده است (Babu and Azam, 1987). شپشک‌های آردآلود از آفات مهم مرکبات، درختان میوه، درختچه‌های زینتی و چایکاری‌های استان‌های شمالی و سایر مناطق کشور هستند. این کفشدوزک برای کنترل زیستی شپشک-های آردآلود اولین بار در سال ۱۳۴۵ از کشور اسپانیا وارد ایران شد. این گونه در تمام مراحل زندگی خود شکارچی بوده و به دلیل قدرت تحرک بالا و تغذیه زیاد، در کنترل میزبان‌های خود بسیار موثر عمل می‌کند (Esmaili *et al*., 2008).

کاربرد موفقیت آمیز عوامل کنترل بیولوژیک در مناطق مختلف نیازمند آگاهی از جنبه‌های مختلف زیستی آن‌ها همچون ساختار و پویایی جمعیت، نحوه زمستان-گذرانی، تولیدمثل، نسبت جنسی و ترجیح میزبانی است (Macdonald and Loxdale, 2004). آگاهی داشتن از تنوع جمعیتی آفات هدف و عوامل کنترل بیولوژیک آن‌ها به موفقیت بیشتر برنامه‌های کنترل بیولوژیک کمک می‌نماید. صرف نظر از مطالعات جمعیتی، شناسایی درست آفات هدف و عوامل کنترل بیولوژیک آن‌ها نیز برای بهبود کارایی این عوامل ضروری است. از طرف دیگر، تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های دشمنان طبیعی می‌تواند در شناسایی نژاد مناسب برای برنامه‌های کنترل بیولوژیک در یک منطقه جغرافیایی خاص مفید باشد (Rijesh *et al*., 2012). علاوه بر این مشخص کردن تنوع مولکولی در جمعیت‌های متعلق به نواحی جغرافیایی مختلف یکی از جنبه‌های مهم در مطالعات جمعیتی و مدیریتی آفات و دشمنان طبیعی آن‌هاست. از جمله عواملی که در این تنوع نقش دارند می‌توان به جریان ژنی، تمایز زمان استقرار در هر منطقه و تفاوت میزبان‌های مورد تغذیه در هر ناحیه جغرافیایی اشاره کرد (Yenagi *et al*., 2012). در سال-های اخیر نشانگرهای ملکولی توانسته‌اند برای بسیاری از این شاخص‌های زیستی توصیف مناسبی ارائه نمایند. نشانگرهای ملکولی، برای بررسی تنوع جمعیتی گونه‌های حشرات مناطق مختلف شاخص‌هایی دقیق و مؤثر بوده‌اند (Macdonald and Loxdale, 2004). از نشانگرهای مولکولی رایج برای تعیین تنوع ژنتیکی حشرات، نشانگر RAPD یک روش سریع، ساده و مقرون به صرفه برای ارزیابی جمعیت‌ها فراهم می‌کند (Gadelhak and Enan, 2005). این شیوه کارایی قابل قبولی برای آشکار نمودن تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها دارد.

هدف این تحقیق، توصیف تنوع ژنتیکی جمعیت-های کفشدوزک *C. montrouzieri* و بررسی کارایی نشانگر مولکولی RAPD در تفکیک و گروه‌بندی جمعیت‌های آن در مناطق مختلف استان مازندران بود. از آنجا که این گونه، هم در اکوسیستم‌های زراعی و هم باغی کاربرد دارد، شناسایی تفاوت مولکولی و امکان ارتباط دادن آن با ویژگی‌هایی همچون کارایی شکارگری، پایداری زیستی، امکان تحمل شرایط نامساعد و سایر عوامل مرتبط با کاربرد عملی آن، داده‌هایی کاربردی در اختیار محققین قرار می‌دهد. همچنین این گونه سال‌هاست که در انسکتاریوم پرورش داده شده و در اختیار کشاورزان قرار می‌گیرد، از اینرو مطالعه تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌های طبیعی و پرورشی می‌تواند در تحقیقات مرتبط با کاهش احتمالی کارایی دشمنان طبیعی در نتیجه پرورش طولانی مدت، قابل استفاده باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

هشت جمعیت کفشدورک *C. montrouzieri* در تابستان ۱۳۹۰ از باغ‌های مرکبات شهرستان‌های استان ماندران جمع‌آوری شدند (جدول ۱). علاوه بر آن از دو جمعیت پرورش یافته در انسکتاریوم از شهرهای بابل و بهشهر نیز استفاده شد. کفشدوزک‌ها همراه با شپشک‌های آردآلود از باغ‌های مرکبات شهرهای مختلف جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به

آزمایشگاه جداسازی شده و تا زمان استخراج DNA در دمای ۴۰°C- و یا در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شدند.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به محل‌های جمع‌آوری نمونه‌های کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri*

Table 1. Information on the collection areas of *Cryptolaemus montrouzieri*

Location	Latitude (N)	Longitude (E)	Altitude (m)
Babolsar	36°40′N	52°40′E	-14
Tonekabon	36°48′59″N	50°52′26″E	-20
Chaloos	36°39′18″N	51°25′13″E	0
Sari	36°33′48″N	53°03′36″E	132
Savadkooh	36°05′N	52°55′E	238
Gaemshahr	36°27′47″N	52°51′36″E	51.2
Freydunkenar	36°41′11″N	52°31′21″E	-13
Ramsar	36°54′11″N	50°39′30″E	-21

استخراج DNA

شیوه‌های مختلفی برای استخراج DNA آزمایش و بهترین روش استخراج، توصیف و بهینه سازی شد. روش عمومی زیر بر مبنای شیوه salt-out برای مراحل عملی استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت (Sambrook and Russell, 2001).

یک عدد لارو کفشدوزک داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفته و پس از افزودن ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (شامل Tris ۵۰ میلی مولار، EDTA ۲۰ میلی مولار، NaCl ۴۰۰ میلی مولار و SDS ۵ درصد (۸ : pH))، محتویات درون میکروتیوب به‌طور کامل له شد. سپس دو میکرولیتر مرکاپتواتانول به مخلوط حاصل افزوده و به مدت یک ساعت داخل بن ماری در دمای ۶۵°C قرار گرفت. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم پنج مولار به آن افزوده و با ورتکس، محتویات درون لوله بخوبی مخلوط شد. نمونه در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فاز مایع بالای تیوب با استفاده از پیپت به آرامی برداشته شده و به تیوب جدیدی منتقل شد. هم حجم با میزان نمونه به آن ایزوپروپانول افزوده و دوباره با همان دور سانتریفوژ شد. پلت ایجاد شده با اتانول ۷۰ درصد دو بار شستشو و خشک شد. در پایان به DNA داخل هر لوله، بافر TE افزوده و تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

واکنش PCR نشانگر RAPD

در این مطالعه از ۲۲ آغازگر تصادفی ده نوکلئوتیدی استفاده شد Operon Technologies Inc., Alameda, (CA) (جدول ۲). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. نسبت هر یک از اجزاء مورد استفاده به‌ترتیب زیر بود: ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X)، یک میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM) و ۰/۲ میکرولیتر Taq پلی مراز (۵U/µl) همه ساخت شرکت سیناژن، ۲ میکرولیتر DNA الگو (۲۰ ng/µl) و ۲ میکرولیتر از آغازگر (۱۰ µM). شرایط واکنش PCR برای ۴۵ سیکل شامل: واسرشته سازی در ۹۴ °C به‌مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در ۳۸ °C بمدت ۶۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ °C به‌مدت ۶۰ ثانیه در نظر گرفته شد. در این واکنش واسرشت اولیه در

دمای $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۵ دقیقه و گسترش نهایی در دمای $^{\circ}C$ ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در پایان به منظور بارگذاری محصول PCR، مقدار ۸ میکرولیتر از محصول واکنش به همراه ۲ میکرولیتر از محلول رنگی (Dye) مخلوط شده و در چاهک های ژل آگارز ۲ درصد قرار داده شد. سپس به مدت یک ساعت و سی دقیقه با ولتاژ ۷۰ ولت الکتروفورز انجام و سپس ژل به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم-بروماید (۱۰ ppm) قرار گرفت. جهت رویت باند ها و عکس برداری از دستگاه ژل داک (GEL LOGIC 200) استفاده شد.

جدول۲- توالی نوکلئوتیدی ۲۲ آغازگر RAPD مورد استفاده

Table 2. Nucleotide sequence of 22 used RAPD Primers

آغازگرها Primers	توالی Sequence 5'→3'	آغازگرها Primers	توالی Sequence 5'→3'
OPA01	CAGGCCCTTC	OPB01	GTTTCGCTCC
OPA02	TGCCGAGCTG	OPB02	TGATCCCTGG
OPA03	AGTCAGCCAC	OPB03	CATCCCCCTG
OPA04	AATCGGGCTG	OPB04	GGACTGGAGT
OPA05	AGGGGTCTTG	OPB05	TGCGCCCTTC
OPA06	GGTCCCTGAC	OPB06	TGCTCTGCCC
OPA07	GAAACGGGTG	OPB07	GGTGACGCAG
OPA08	GTGACGTAGG	OPB08	GTCCACACGG
OPA09	GGGTAACGCC	OPB09	TGGGGGACTC
OPA10	GTGATCGCAG	OPB10	CTGCTGGGAC
OPW01	CTCAGTGTCC	OPW02	ACCCCGCCAA

تجزیه و تحلیل داده‌ها

الگوی نوارهای ایجاد شده از طریق امتیازدهی به قالب دو تایی تبدیل شد. در این قالب به وجود و عدم وجود باند در الکتروفورز، به‌ترتیب امتیاز ۱ و ۰ داده شد. نواری به عنوان چند شکل در نظر گرفته شد که در یک یا چند جمعیت وجود داشته و در سایر جمعیت‌ها تولید نشده باشد. در مورد هر جمعیت واکنش اولیه روی سه تا پنج فرد انجام شد. در تجزیه تحلیل نهایی از الگویی استفاده شده که بهترین تکثیر انجام شده بود. داده‌های دو تایی (۱ و ۰) در نرم افزار Microsoft office Excel ثبت شده و در تجزیه تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده ضریب تشابه دایس (Dice, 1945) محاسبه و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA توسط نرم-افزار NTSYS-pc انجام شده و دندروگرام مربوطه رسم شد (Rohlf, 1998). شاخص تنوع ژنتیکی نی[1] و شاخص اطلاعاتی شانون[2] به‌وسیله نرم افزار PopGene (Ver.1.32) محاسبه شد.

نتایج و بحث

ارزیابی تعداد نوارهای حاصل از PCR آغازگرهای RAPD

از بین آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق بجز دو آغازگر OPB02 و OPB09 دیگر آغازگرها نوارهای قابل امتیازدهی ایجاد کردند. با استفاده از این آغازگرها در مجموع تعداد ۴۳۴ نوار قابل امتیازدهی با میانگین ۲۱/۷ نوار برای هر آغازگر بدست آمد. تعداد نوارهای بدست آمده

1- Nei's genetic diversity index
2- Shanon information index

برای هر آغازگر از ۶ (OPA06) تا ۴۰ (OPA07) متغیر بود. از مجموع نوارهای بدست آمده تعداد ۳۳۴ نوار یعنی ۷۶/۹ ٪ نوارهای تشکیل شده چند شکل بودند. به طور متوسط هر آغازگر ۱۶/۷ نوار چند شکل تولید کرد (شکل ۱).

میزان چند شکلی در کاربرد نشانگر RAPD بسته به گونه مورد مطالعه، تعداد آغازگر و بخصوص تنوع جمعیت‌های جمع‌آوری شده، بسیار متغیر است. از این رو همیشه نمی‌توان همبستگی مثبتی بین تعداد آغازگر مورد استفاده و باندهای چند شکل برقرار نمود. کاربرد ۲۰ آغازگر برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۲ جمعیت گونه‌ای دیگر از کفشدوزک‌ها یعنی *Coccinella septempunctata* تعداد ۱۰۰ نوار چند شکل ایجاد نمود. در واقع هر آغازگر ۵ نوار چند شکل تولید کرد (Haubruge *et al*., 2002). همچنین با استفاده از ۹ آغازگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی پنج جمعیت کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* تنها ۵۸ نوار به‌دست آمد که در بین آن‌ها ۲۶ نوار چند شکل بودند، یعنی به‌طور متوسط ۱/۴ باند به ازای هر آغازگر تولید شد (Yenagi *et al*., 2012). در بررسی تنوع ژنتیکی هفت جمعیت سرخرطومی حنایی خرما، *Rhynchophorus ferrugineus* با استفاده از تنها شش آغازگر ۲۱۶ نوار تولید شد. از بین این-ها، ۱۱۱ نوار چند شکل بودند که به‌طور متوسط به ازای هر آغازگر ۱۸/۵ نوار چند شکل ایجاد شد (Gadelhak and Enan, 2005). در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ جمعیت شته *Macrosiphum euphorbiae* ۱۱۳ قطعه چند شکل با استفاده از پنج آغازگر تولید شد (Raboudi *et al*., 2011). به همین ترتیب ۵۲ قطعه چند شکل در بررسی تنوع ژنتیکی چهار جمعیت پشه *Aedes aegypti* با استفاده از پنج آغازگر تولید شد (Santos *et al*., 2011). در مورد میزان نوارهای چند شکل باید تعداد جمعیت آزمایش شده نیز مورد توجه قرار گیرد. از دیدگاه نظری با محاسبه تعداد باند چند شکل به ازای هر جمعیت می‌توان مقایسه بهتری فراهم کرد.

فاصله ژنتیکی و گروه‌بندی جمعیت‌ها

شباهت ژنوتیپی جمعیت‌ها بر اساس نمره‌دهی صفر و یک بر اساس ضریب شباهت دایس از ۰/۴۸تا ۰/۷۸ متغیر بود (جدول ۳). متوسط شباهت ژنتیکی دو جمعیت آزمایشگاهی با جمعیت‌های طبیعی ۰/۶۳ به‌دست آمد. بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های انسکتاریوم بهشهر و جمعیت جمع آوری شده از چالوس و بیشترین اختلاف نیز میان جمعیت‌های تنکابن و فریدونکنار مشاهده شد. میزان شباهت نمونه‌های پرورش یافته در دو انسکتاریوم شهرهای بابل و بهشهر ۰/۶۹ به‌دست آمد. بیشترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های طبیعی، ۰/۷۵ بود. این شباهت بین دو جمعیت نزدیک به هم از نظر جغرافیایی یعنی تنکابن و چالوس ثبت شد. دو جمعیت جمع‌آوری شده از بابلسر و رامسر با وجود فاصله زیاد از یکدیگر، ضریب شباهتی برابر با ۰/۷۵ داشتند. با وجودی که شباهت بین دو جمعیت پرورشی کمتر از شباهت آن‌ها با جمعیت های طبیعی بود اما مقایسه دو به دوی جمعیت‌ها نشان داد که نمی توان با قطعیت این تنوع ژنتیکی نسبی را به تغییرات ناشی از پرورش مداوم آزمایشگاهی ربط داد.

فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف حشرات بسته به تمایز جغرافیایی و پیشینه زیستی هر گونه بسیار متغیر است. تشابه ژنتیکی ۱۲جمعیت کفشدورک *C. septempunctata* متعلق به نواحی جغرافیایی مختلف کشور بلژیک بین ۰/۵۸ تا ۰/۸۷ (Haubruge *et al*., 2002)، هفت جمعیت سرخرطومی حنایی خرما، *R. ferrugineus* در کشور امارات متحده عربی بین ۰/۳۸ تا ۰/۹۴ (Gadelhak and Enan, 2005)، جمعیت‌های پشه *A. aegypti* متعلق به چهار منطقه با فاصله ۱۰ تا ۲۰ کیلومتر از یکدیگر در شهر مانائوس، مرکز ایالت آمازون در برزیل بین ۰/۹۸۴ تا ۰/۹۸۸ (Santos *et al*., 2011) و پنج جمعیت کرم غوزه پنبه، *H. armigera* در یکی از استان‌های جنوب غربی هند بین ۰/۷۴ تا ۱/۰۰ بود (Yenagi *et al*., 2012).

در گروه‌بندی جمعیت‌ها با روش UPGMA، آن‌ها به دو گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۲). در گروه اول جمعیت-های بابلسر، رامسر، ساری، تنکابن، چالوس و نمونه‌ی انسکتاریوم بهشهر قرار داشته و گروه دوم شامل جمعیت-های جمع‌آوری شده از شهرهای قائمشهر، سوادکوه فریدونکنار به همراه نمونه‌ی انسکتاریوم بابل بود. گروه اول خود به دو زیرگروه تقسیم شده و جمعیت‌های بابلسر و رامسر با ضریب ۰/۷۵ در شاخه مجزایی از دیگر افراد این گروه قرار گرفتند. در مورد گروه دوم می‌توان گفت افراد این گروه تقریبا از لحاظ منطقه جغرافیایی شباهت بیشتری با هم داشته و از نظر جغرافیایی فاصله کمتری دارند. یکی از دلایل تشابه ژنتیکی بالا (تنوع ژنتیکی پایین) احتمالا می-تواند ناشی از همپوشانی زیاد این جمعیت‌ها در استان باشد که در نتیجه ی جریان ژنی در بین جمعیت‌ها حاصل شده است.

گونه *C. montrouzieri* در سال ۱۳۴۵ توسط انستیتوی بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی از اسپانیا وارد شده‌است (Behdad, 1984). بنابراین از دلایل پایین بودن اختلاف ژنتیکی میان جمعیت‌های گونه *C. montrouzieri* در استان مازندران می‌توان به غیر بومی بودن این گونه و کوتاه بودن مدت استقرار آن در ایران اشاره کرد. از طرفی قرار داشتن جمعیت‌ها در محدوده جغرافیایی یک استان و وجود مسافت‌های کوتاه بین شهرهای مختلف دلیل دیگری بر شباهت بین این جمعیت‌ها می باشد. این حشره مفید در مناطقی که دارای زمستان‌های سرد باشد نمی‌تواند در محیط آزاد به زندگی خود ادامه دهد. در سواحل دریای خزر به ویژه در سالهایی که زمستان به نسبت سرد باشد قسمت عمده‌ای از افراد این گونه که در طبیعت رهاشده‌اند از بین می روند. به همین دلیل این گونه در زمستان‌ها در اینسکتاریوم‌ها نگهداری و پرورش داده می‌شوند تا در بهار در مناطق آلوده رها سازی شوند (Esmaili *et al.*, 2008). بنابراین از عوامل دیگر این شباهت‌ها می‌توان به دخالت انسان در تکثیر و رهاسازی مصنوعی این گونه در سطح باغ‌های مرکبات استان اشاره کرد که باعث شده این جمعیت‌ها در تبادل ژنی باشند و در نهایت این مسئله موجب بالا بودن جریان ژنی و شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌ها شود. از آنجا که دو جمعیت پرورشی در دو گروه مجزا قرار گرفتند، احتمال می‌رود که این تفاوت با تنوع جمعیت‌های اولیه مورد استفاده برای پرورش مرتبط باشد. این جمعیت‌ها غالبا از همان شهرهای اطراف جمع‌آوری می شوند و گروه بندی جمعیت‌ها با روش UPGMA (شکل ۲) نشان داد که این دو جمعیت آزمایشگاهی بیشتر از آن‌که به یکدیگر شبیه باشند به جمعیت‌های جمع‌آوری شده از شهرهای نزدیک به آن‌ها شبیه هستند. از طرف دیگر براورد شاخص‌های میانگین تعداد آلل مشاهده شده (Na) و تعداد آلل موثر (Ne) برای کل آغازگرها و همچنین ضریب تنوع نی (H) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) (جدول ۴) نشان داد که تنوع ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی بیش از دو جمعیت پرورش یافته است. کاهش تنوع ژنتیکی حشرات پرورش یافته در شرایط آزمایشگاهی یکی از مواردی است که در پرورش متوالی دشمنان طبیعی به آن توجه می‌شود (Macdonald and Loxdale, 2004)، از این رو انتظار می‌رود که جمعیت‌های پرورش یافته کفشدوزک *C. montrouzieri* تنوع ژنتیکی کمتری نسبت به جمعیت‌های طبیعی آن نشان دهند. اما باید توجه نمود که تعداد افراد و جمعیت مورد بررسی از دو گروه متفاوت بود (هشت جمعیت طبیعی نسبت به دو جمعیت پرورشی) که این موضوع می‌تواند نتایج را تحت تاثیر قرار دهد. این احتمال در مورد تفاوت تنوع ژنتیکی دو گروه شته های بی بال و بالدار گونه *Aphis gossypii* نیز مورد توجه قرار گرفته است (Kheyrollahi *et al.*, 2013). علاوه بر این گستردگی مکان‌های نمونه‌برداری بطور آشکاری نتایج را تحت تاثیر قرار می‌دهد. جمعیت-های طبیعی از گستره‌ای از شرق تا غرب استان مازندران، دارای ارتفاع از سطح دریا و دمای تا حدودی متفاوت جمع‌آوری شده بودند. گر چه نمونه‌برداری، روی گونه‌های مختلف مرکبات انجام شده بود و در نواحی غربی مازندران این حشره مفید بیشتر در چایکاری‌ها کاربرد دارد، اما تفاوت میزبان گیاهی مورد تغذیه یک آفت، بیشتر تنوع

پارازیتوئیدها را تحت تاثیر قرار داده و نمی‌توان ارتباطی معنی‌دار بین تنوع ژنتیکی شکارگرها و میزبان‌های گیاهی برقرار نمود(Macdonald and Loxdale, 2004).

کاربرد نشانگر RAPD روشی راحت و سریع برای بررسی تنوع ژنتیکی فرآهم می کند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، تنوع ژنتیکی مشاهده شده را نمی‌توان به توزیع جغرافیایی مربوط دانست، به عبارت دیگر جمعیت‌های جمع‌آوری شده از مناطق غربی استان از نمونه های شرق استان بطور کامل قابل تفکیک ژنتیکی نبودند. همچنین با استفاده از این نشانگرها جمعیت‌های طبیعی و پرورش‌های تجارتی تفاوت قابل تحلیلی نشان ندادند. با توجه به سابقه حدود ۵۰ ساله‌ی استقرار این گونه در باغ‌های مرکبات و چای‌کاری‌های استان مازندران و همچنین جمع‌آوری، پرورش و رهاسازی مکرر آن‌ها، تمایز ژنتیکی ملموسی بین نمونه‌های طبیعی و آزمایشگاهی قابل ردیابی نبود. البته در صورتی که پژوهش‌های تکمیلی، با هدف بررسی کارایی شکارگری هر یک از جمعیت‌ها، بتواند ارتباط معنی‌داری با گروه‌بندی‌های ژنتیکی برقرار کند، می‌توان در مورد احتمال زوال کارایی جمعیت‌های آزمایشگاهی در نتیجه‌ی پرورش مکرر و کاهش تنوع ژنتیکی، قضاوت نمود.

جدول ۳- ماتریس تشابه ژنتیکی جمعیت‌های کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri* بر اساس ضریب تشابه دایس

Table 3. Genetic similarity matrix of *Cryptolaemus montrouzieri* populations based on Dice similarity coefficient

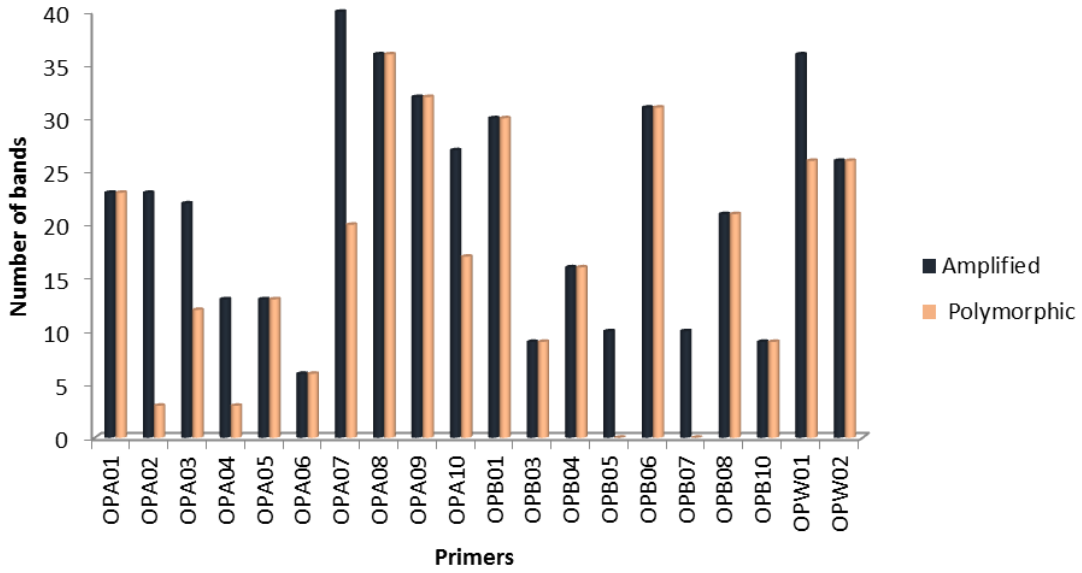
	Babolsar	Ramsar	Sari	Gaemshahr	Tonekabon	Freydunkenar	Chaloos	Savadkooh	Ins.1 (Behshahr)	Ins.2 (Babol)
Babolsar	1.00									
Ramsar	0.75	1.00								
Sari	0.70	0.67	1.00							
Gaemshahr	0.64	0.57	0.60	1.00						
Tonekabon	0.68	0.62	0.68	0.58	1.00					
Freydunkenar	0.59	0.50	0.57	0.65	0.48	1.00				
Chaloos	0.73	0.72	0.74	0.58	0.75	0.57	1.00			
Savadkooh	0.63	0.59	0.60	0.66	0.58	0.64	0.60	1.00		
Ins.1 (Behshahr)	0.65	0.72	0.72	0.59	0.74	0.52	0.78	0.61	1.00	
Ins.2 (Babol)	0.55	0.51	0.60	0.62	0.62	0.63	0.60	0.64	0.69	1.00

جدول ۴- پارامترهای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های طبیعی و پرورشی کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri*

Table 4. Parameters of genetic diversity in natural and reared populations of *Cryptolaemus montrouzieri*

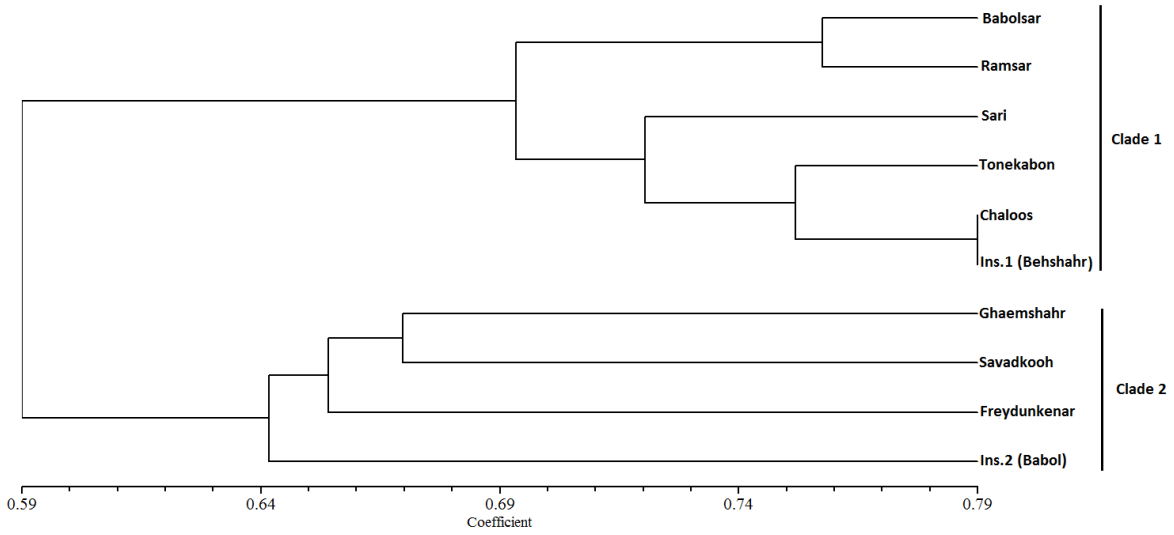
Groups	**Na***	**Na**	**H**	**I**
Reared	1.55	1.55	0.275	0.3812
Natural	1.95	1.7114	0.3953	0.5725
Average	1.75	1.6307	0.33515	0.47685

* Na: Observed number of alleles, Ne: Effective number of alleles, H: Nei's index, I: Shanon's index



شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR تکثیر شده توسط آغازگرهای RAPD روی کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri*

Figure 1. Electrophoresis results of the generated PCR products by RAPD markers against *Cryptolaemus montrouzieri*



شکل۲- دندروگرام ده جمعیت کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri* با استفاده از آغازگرهای RAPD

Figure 2. Dendrogram of the ten *Cryptolaemus montrouzieri* populations using RAPD primers

References

Babu, T. R. and Azam, K. M. 1987. Biology of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coccinellidae: coleopteran) in relation with temperature. **Entomophaga** 32: 381-386.

Behdad, A. 1984. Pests of fruit crops in Iran. Neshat Publication of Esfahan.

Esmaili, M., Mirkarimi, A. A. and Azmayesh Fard, P. 2008. Agricultural entomology (9th ed.). Tehran University Press.(In Farsi).

Haubruge, E., Vanlerberghe-Masutti, F., Collignon, P. and Francis, F. 2002. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of *Coccinella septempunctata* in Belgium. **Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol We**. 67: 557-561.

Gadelhak, G. G. and Enan, M. R. 2005. Genetic diversity among populations of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae), determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR). **International Journal of Agriculture and Biology** 3: 395-399.

Kheyrollahi, Z., Hosseini, R., Aghajanzadeh, S. and Golein, B. 2013. Genetic variation of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) in eastern Guilan and western Mazandaran provinces (Iran). **Plant Pest Research** 3: 11-19. (In Farsi).

Macdonald, C. and Loxdale, H. D. 2004. Molecular markers to study population structure and dynamics in beneficial insects (predators and parasitoids). **International Journal of Pest Management** 50: 215-224.

Raboudi, F., Makni, H. and Makni, M. 2011. Genetic diversity of potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae* populations in Tunisia detected by RAPD. **African Entomology** 19: 133-140.

Rijesh, K., Ravikumar, P., Hegde, R., Joseph, A., Jalali, S. K. and Kush, A. 2012. Genetic diversity estimates in *Trichogramma* populations from sugarcane cropping systems in India. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences** 25: 68-71.

Rohlf, J. F. 1998. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.0 user guide. Applied Biostatistics Inc, Setauket, New York 11733-2870.

Sambrook, J, and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Santos, J. M. M. D. S., Elmary, C. F., Juracy, F. M. and Wanderli, P. T. 2011. Genetic diversity in dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from amazon region: Comparative analysis with isozymes and RAPD loci. **The Open Tropical Medicine Journal** 4:11-20.

Yenagi, B. S., Patil, V. C., Biradar, D. P. and Khadi, B. M. 2012. Molecular diversity of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* Hübner) using RAPD markers. **Middle East Journal of Scientific Research** 11: 61-65.

Plant Pests Research
2014- 4 (3): 15-24

Genetic diversity of mealybug ladybird, *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) populations in Mazandaran province by RAPD marker

S. Bamehr [1], M. Mohammadi Sharif[2]*, A. Hadizadeh[2] and J. Karimi[3]
1, 2. Former Msc., Student of Agricultural Entomology and Assistant Professors, Department of Plant Protection, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, 3.Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: July 11, 2013- Accepted: May 10, 2014)

Abstract

Information on the various biotic aspects of biological control agents is basic need for their successful application and appropriate establishment of their populations. *Cryptolaemus montrouzieri* is the major natural enemy of mealybugs in citrus orchards and tea plantation of Mazandaran Province. The objective of this research was to describe the genetic diversity of eight natural and two commercial reared populations of this biological control agent by using RAPD marker. Twenty two 10-mer primers were used for the assays. After optimizing the PCR conditions (annealing temperature at 38 °C for one minute) and conducting the experiments on all populations, the PCR products were electrophoresed in a 2% agarose gel. The primers generated a total of 434 score-able bands, of which 334 (76.9%) displayed polymorphism. Genetic similarity of the populations ranged from 0.48 (between Tonekabon and Freydunkenar populations) to 0.78 (Chalus and Behshahr insectarium populations). The populations were clustered into two distinct clades by UPGMA method using NTSYS-pc software. Babolsar, Sari, Ramsar, Tonekabon, Chaluos and one reared (Behshahr insectarium) populations were classified in one clade and Ghaemshahr, Savadkooh, Freydunkenar and another reared (Babol insectarium) populations were clustered in a different clade. A moderate differentiation was resulted amongst the populations based on dendrogram coefficient.

Keywords: Genetic structure, molecular markers, biological control, Mazandaran province.

*Corresponding author: msharif1353@yahoo.com