

## کاربرد RAPD در مقایسه تنوع جمعیت‌های پسیل معمولی پسته (*Agonoscena pistaciae* Burckhardt & Lauterer) در برخی از مناطق شمالی و جنوبی استان کرمان

ساسان کریمی دارابی<sup>۱\*</sup>، رضا حسینی<sup>۲</sup>، آتوسا فرحپور حقانی<sup>۳</sup> و علی اعلمی<sup>۴</sup>

۱ و ۲. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان. ۳. دانشجوی دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی. ۴. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۲۰ تاریخ پذیرش ۹۲/۱۲/۲۷)

### چکیده

پژوهش جاری با هدف بررسی تفاوت ساختار ژنتیکی جمعیت پسیل معمولی پسته (*Agonoscena pistaciae* Burckhardt & Lauterer) در برخی مناطق پسته‌کاری استان کرمان با مدیریت کنترل شیمیایی متفاوت انجام گرفت. بدین منظور، طی مرداد ماه سال ۱۳۹۱، نمونه‌برداری‌هایی از مناطق مختلف شامل: زنگی آباد و هفت‌باغ کرمان (مناطق با کنترل شیمیایی شدید)، دشتاب بافت (منطقه با کنترل شیمیایی کم) و اسفندقه جیرفت (منطقه بدون کنترل شیمیایی) انجام شد. DNA استخراج شده از نمونه‌ها با استفاده از هشت آغازگر RAPD شامل: OPA-01، OPA-02، OPA-03، OPA-04، OPA-07، OPB-07، OPK-17 و OPO-05 تکثیر شد. پس از بررسی و نمره‌دهی باندهای تشکیل شده، داده‌های حاصل با نرم افزار NTSYS و POPGENE مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بر این اساس، سودمندترین آغازگر، OPA-02 شناخته شد که با میزان ۰/۳۹۵ بیشترین مقدار PIC را ایجاد کرد. نتایج بررسی تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس روش نی (Nei) نیز نشان داد که منطقه با کنترل شیمیایی کم و مناطق با کنترل شیمیایی شدید، با فاصله ژنتیکی ۰/۰۷۱۴ بیشترین فاصله ژنتیکی را دارا هستند و همچنین منطقه با کنترل شیمیایی کم بیشترین تشابه را با منطقه بدون کنترل شیمیایی داشت. دندروگرام مربوطه نیز با استفاده از ضریب تشابه جاکارد بازسازی شد. بر اساس این نتایج، آغازگرهای RAPD استفاده شده توانستند جمعیت مناطق با کنترل شیمیایی شدید را در یک گروه جداگانه نسبت به سایر مناطق قرار دهند. همچنین جمعیت دو منطقه دشتاب و اسفندقه نیز در یک گروه قرار گرفتند. به نظر می‌رسد که نتایج نشان دهنده این موضوع باشند که کنترل شیمیایی شدید در برخی مناطق می‌تواند سبب بروز تفاوت‌های احتمالی در ساختار ژنتیکی جمعیت‌های فعال این آفت در استان شده باشد.

**کلمات کلیدی:** آفات پسته، تنوع ژنتیکی، کنترل شیمیایی، Psyllidae

## مقدمه

پسیل معمولی پسته در حال حاضر مهم‌ترین آفت درختان پسته بوده و در تمام مناطق پسته کاری ایران گسترش دارد (Mehrnejad, 2001; Mehrnejad, 2002). بر اساس گزارش‌های متعدد کنترل این آفت اغلب با استفاده شدید از حشره‌کش‌ها صورت می‌گیرد و این در حالی است که پسیل پسته به دلیل دوره کوتاه زندگی و نرخ تولید مثلی بالای خود ظرفیت بالایی در مقاومت به آفت‌کش‌ها دارد (Mehrnejad, 2002; Jafari Nadoushan, 1998).

خسارت اقتصادی قابل توجه این آفت، باعث استفاده‌ی گسترده از آفت‌کش‌های شیمیایی مختلف و در نتیجه ایجاد اختلالاتی در محیط زیست و روند طبیعی زندگی موجودات شده که از بزرگ‌ترین این مشکلات بوجود آمدن جمعیت‌های مقاوم این آفت نسبت به آفت‌کش‌های به کار برده شده است (Talebi Jahromi *et al.*, 2001). فوزالون<sup>۱</sup> یکی از حشره‌کش‌های مرسوم علیه پسیل پسته در استان کرمان از سال ۱۳۴۱ تا کنون بوده است (Alizadeh *et al.*, 2011). بر طبق گزارش طالبی جهرمی و همکاران (Talebi Jahromi *et al.*, 2001)، بیشترین نسبت مقاومت به‌دست آمده برای حشره‌کش فوزالون مربوط به جمعیت کرمان بوده، و حساس‌ترین منطقه نیز جبال‌بارز بوده است. ولی به دلیل پایین بودن نسبت مقاومت بین مناطق نام برده، وجود مقاومت اثبات نشد. علیزاده (Alizadeh *et al.*, 2011) در تحقیق دیگری بیشترین میزان مقاومت به حشره‌کش فوزالون را در منطقه رفسنجان گزارش کرده است. همچنین منطقه‌ای از شهر بم که در آن کنترل شیمیایی صورت نمی‌گرفته، به عنوان حساس‌ترین قسمت استان گزارش شد. از جمله عواملی که باعث طغیان این آفت شده است، قدرت تولید مثلی بالا و هم‌پوشانی نسل‌های آن است. همچنین به خاطر فشار انتخابی فزاینده‌ای که به واسطه استفاده از حشره‌کش‌ها روی گیاه پسته وارد می‌شود، بعضی از جمعیت‌های این آفت در ایران نسبت به حشره‌کش‌های صنعتی مقاوم شده‌اند (Talebi Jahromi *et al.*, 2001).

سویی دیگر چون آفات مقاوم به آفت‌کش‌ها در نتیجه‌ی ظهور تغییرات ژنتیکی لازم برای گریز از کنترل، ایجاد می‌شوند و جمعیت‌های مقاوم در نتیجه‌ی فشار انتخابی شدید در یک منطقه‌ی گسترده به وجود می‌آیند (Stankiewicz *et al.*, 2001)، در نتیجه یکی از دلایل ایجاد جمعیت‌های مقاوم به یک آفت‌کش، وجود تفاوت بین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های حساس و مقاوم آفت است. بدین ترتیب با در نظر گرفتن گستردگی جمعیت و وسعت مناطق فعالیت پسیل پسته در ایران و به ویژه در استان کرمان وجود تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌های حساس و مقاوم این آفت امری محتمل به شمار می‌آید. همچنین اطلاعات به‌دست آمده از بررسی ساختارهای ژنتیکی می‌تواند به درک بهتر عملکرد ویژه، سازگاری و تغییرات ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌ها کمک نماید (Syamsuardi & Okada, 2002).

به‌منظور بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، روش‌های مختلف انگشت‌نگاری<sup>۲</sup> DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد که یکی از مرسوم‌ترین آن‌ها روش RAPD-PCR می‌باشد (Williams *et al.*, 1990)، که در سال‌های اخیر در تعدادی از مطالعات ساختار جمعیتی و تنوع ژنتیکی جمعیت حشرات مورد استفاده قرار گرفته است (Farahpour Hagani, 2011; Kheyrollahi, 2012; Gallusser *et al.*, 2004). اگرچه روش RAPD<sup>۳</sup> به دلیل عدم تکرارپذیری مورد پرسش قرار گرفته است، برخی محققان اثبات کرده‌اند که در صورت رعایت دقیق روش‌های مناسب تکثیر، این مشکل می‌تواند برطرف شود (Parker *et al.*, 1998). به علاوه این روش دو مزیت کلیدی دارد، اول این که به‌منظور فرایند تکثیر نیاز به مقادیر زیاد DNA نیست و دوم این که به دانش قبلی نسبت به توالی DNA جانور مورد نظر نیازی نیست (Martin *et al.*, 2008). البته سادگی، سرعت، کارآمدی و همچنین پایین‌تر بودن هزینه‌های مورد نیاز برای این نشانگر نسبت به سایر نشانگرها نیز از مزایای دیگر آن است (Kumar and Gurusubramanian, 2011).

<sup>2</sup>. Fingerprint

<sup>3</sup>. Randomly amplified polymorphic DNA

<sup>1</sup>. Phosalone

کرمان که به لحاظ مدیریت کنترل شیمیایی با هم متفاوت هستند، از نظر ژنتیکی ارزیابی و مقایسه شوند.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه برداری

با استناد به آمار و ارقام مربوط به مدیریت کنترل شیمیایی علیه پسیل معمولی پسته سازمان جهاد کشاورزی استان کرمان، شانزده نمونه از آفت پسیل معمولی پسته (*Agonoscena pistaciae*) از مناطق با مدیریت کنترل شیمیایی متفاوت شامل: زنگی آباد کرمان و هفت باغ کرمان (مناطق با کنترل شیمیایی شدید) (هشت نمونه)، دشتاب بافت (منطقه با کنترل شیمیایی کم) (چهار نمونه) و اسفندقه جیرفت (منطقه بدون کنترل شیمیایی) (چهار نمونه) (شکل ۱) در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفتند (مشاهدات و مکاتبات شخصی) (جدول ۳). عملیات نمونه برداری طی مرداد ماه سال ۱۳۹۱ انجام شد. نمونه‌ها از سطح رویی و زیرین برگ‌های درختان پسته اهلی (*Pistacia vera*) توسط قلم‌مو و به روش جارو کشی سطح برگ جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌ها به میکروتیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری منتقل شده و به منظور مطالعات مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند. مشخصات دقیق جغرافیایی مناطق نمونه برداری در جدول ۱ نشان داده شده است.

#### شناسایی پسیل معمولی پسته

پس از انتقال به آزمایشگاه، ژنتیپای نمونه‌های هر منطقه استخراج شده و سپس در محلول هیدروکسید پتاسیم ۱۰٪ شفاف شدند. در مرحله بعد از هر یک از نمونه‌ها در گلیسرین و با حالت و زاویه دید مناسب اسلاید موقت تهیه شد. جهت شناسایی نمونه‌های موجود، از دو کلید شناسایی معتبر "پسیل‌های ایران" (Burckhardt & Lauterer, 1993) و "سیستماتیک و زیست‌شناسی زیر خانواده Rhinocolinae" (Burckhardt & Lauterer, 1989) استفاده شد. به منظور تایید شناسایی‌های انجام شده، از هر جمعیت یک فرد بالغ انتخاب و به همراه تصاویر تهیه شده از نمونه‌ها و اسلایدهای دائم به موسسه گیاه پزشکی کشور ارسال شد.

تحقیقات متعددی روی آفات مختلف به منظور مقایسه جمعیت‌های مقاوم و حساس به آفت‌کش‌ها صورت گرفته است. از جمله بررسی مقاومت جمعیت‌های پسیل آسیایی مرکبات به حشره‌کش‌های مختلف (Tiwari et al., 2011)، بررسی مقاومت پسیل گلابی به دلتامترین<sup>۱</sup> به همراه حالت سینرژست آن با پیرونیل بوتوکساید<sup>۲</sup> (Bue's et al., 1999)، بررسی حساسیت جمعیت‌های مختلف پسیل پسته (*Agonoscena pistaciae*) به آفت‌کش فوزالون (Talebi Jahromi et al., 2001) و بررسی مکانیسم مقاومت به فوزالون در *Agonoscena pistaciae* (Alizadeh et al., 2011). در مطالعه‌ای دیگر سازگاری جمعیت‌های بومی و مهاجم پسیل سیب‌زمینی از جنبه‌های مختلف از جمله مقاومت به آفت‌کش‌ها در آمریکا در سال ۲۰۰۵ بررسی شد که جمعیت مهاجم- مهاجرت کرده از کالیفرنیا به تگزاس- به آفت‌کش‌ها مقاوم‌تر بودند (Liu and Trumble, 2007). از طرف دیگر بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، مثل مطالعه ساختار ژنتیکی نوعی حلزون آبی خوراکی به نام *Haliothis rubra* در سواحل ویکتوریای استرالیا با استفاده از نشانگرهای RAPD، Minisatellite و Microsatellite (Huang et al., 2000)، تجزیه و تحلیل ژنتیکی گیاه *Artemisia capillaris* با نشانگر RAPD (Zain Hasan et al., 2009) و یا بررسی ساختار ژنتیکی گونه‌های درخت بلوط آفریقایی به وسیله نشانگر RAPD و توالی یابی نوکلئوتیدی (Ofori et al., 2001) به روشن شدن میزان تفاوت‌ها و شباهت‌ها در جمعیت‌های مختلف کمک می‌کند. با توجه به اهمیت اقتصادی پسته در استان کرمان و خسارت این آفت، انجام مطالعات ژنتیکی و بررسی وجود تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌های حساس و مقاوم آن امری ضروری به نظر می‌رسد، که می‌تواند اطلاعات مفیدی را برای مطالعات تکمیلی در زمینه‌های فیزیولوژی و مقاومت این حشره در مقابل سموم فراهم آورد، لذا در این پژوهش سعی شده است که جمعیت‌های این آفت در چند منطقه از استان

<sup>1</sup>. Deltamethrin

<sup>2</sup>. Piperonyl butoxide

## استخراج DNA

به دلیل کوچک بودن جثه آفت و کم بودن غلظت DNA مورد نیاز، هر بار برای استخراج DNA از دو نمونه پوره استفاده شد و روش Chelex 100 با اندکی تغییرات مورد استفاده قرار گرفت (Walsh *et al.*, 1991). تغییرات مهم شامل استفاده از ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون Chelex 100 5%، قرار دادن نمونه به مدت ۴-۵ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و نگهداری نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد می‌شود. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و روش اسپکتروفتومتری (Eppendorf Biophotometer- Germany) تعیین و سپس به منظور یکنواخت کردن غلظت DNA، تمامی نمونه‌های استخراج شده به غلظت واحد ۲۵ng/μl رسانده شدند.

## آغازگرهای مورد استفاده جهت RAPD-PCR

با توجه به این‌که از پیش چنین روشی برای مقایسه ساختار ژنتیکی این آفت انجام نشده بود، به منظور انتخاب آغازگر مناسب، ۱۵ عدد از بهترین آغازگرهایی که بیشترین چند شکلی<sup>۱</sup> را نشان داده بودند، انتخاب شدند (Serçe *et al.*, 2007). آغازگرهای لازم در این تحقیق با سفارش شرکت تکاپو زیست و توسط شرکت بایونیر<sup>۲</sup> کره جنوبی ساخته شد. مشخصات توالی این آغازگرها در جدول ۲ نشان داده شده است.

## RAPD-PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش PCR شامل، ۰/۳۳ میکرولیتر (۱۵dNTPs میلی مولار)، ۱/۲۵ میکرولیتر آغازگر (۱۰ میکرومولار)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش (10 X)، ۰/۲ میکرولیتر *Taq* پلیمرز (۵U/μl) (شرکت سیناژن) و ۴ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) از DNA الگو بود.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر<sup>۳</sup> (Eppendorf-Mastercycler-gradient) مطابق برنامه زیر

انجام شد. در ابتدا واسرشته‌سازی اولیه<sup>۴</sup> در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۴۳ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر<sup>۵</sup> به رشته الگو در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و بسط آغازگر<sup>۶</sup> در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، تکرار شد و در نهایت ۵ دقیقه بسط نهایی<sup>۷</sup> در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به انجام رسید.

برای الکتروفورز محصول واکنش PCR، مقدار ۸μl از هر تیوب به همراه ۱μl بافر بارگذاری در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵٪ بارگذاری شدند و در اولین چاهک نیز ۳ میکرولیتر نشانگر اندازه ۱۰۰ bp (Fermentas Gene Ruler 100bp plus) بارگذاری شد. الکتروفورز نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت و ۱۵ دقیقه در ولتاژ ۷۵ ولت انجام شد. به منظور رنگ‌آمیزی ژل و مشاهده باندها از محلول رنگ‌آمیزی فلورسنت (سیناژن DNA safe stain) استفاده شد و پس از اتمام الکتروفورز، باندها زیر نور ماوراء بنفش آشکار سازی شده و از دستگاه GelDoc به منظور عکس‌برداری استفاده شد (شکل ۳).

## تجزیه و تحلیل داده‌ها

از میان باندهای چند شکل حاصل، فقط باندهای مشخص و پر رنگ<sup>۸</sup> امتیاز داده شدند و باندهای کم رنگ<sup>۹</sup> فقط در صورتی امتیاز می‌گرفتند که تکرار پذیری داشته باشند. سپس با روش صفر (فقدان باند) و یک (وجود باند) امتیازدهی انجام شد و نتایج در نرم‌افزار Microsoft office Excel 2010 ثبت شد. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای<sup>۱۰</sup> داده‌ها به کمک روش دورترین همسایه‌ها<sup>۱۱</sup> و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد در نرم افزار NTSYS-pc Version 2.02 Software (Rohlf, 2008) و POPGENE Version 1.32 Software (Yeh *et al.*, 1999) انجام شده و

4. Initial denaturation

5. Annealing

6. Extension

7. Final extension

8. Sharp

9. Faint

10. Cluster analysis

11. COMPLETE Linkage

1. Polymorphism

2. Bioneer

3. Thermocycler

شیمیایی کم دارای ۴ باند قابل تکرار و مناطق با کنترل شیمیایی شدید دارای ۲۵ باند قابل تکرار بودند.

نتایج نشان داد جمعیت مناطق با کنترل شیمیایی شدید دارای میزان هتروزیگوتی ۰/۱۸۷ هستند این در حالی است که جمعیت‌های مناطق بدون کنترل شیمیایی و با کنترل شیمیایی کم، به ترتیب با هتروزیگوتی ۰/۱۶۱ و ۰/۱۳۵ در رتبه بعد قرار گرفتند (شکل ۲). از آنجا که طی بررسی اختلافات بین گونه‌ای و ساختارهای جمعیتی *Anticarsia gemmatalis* (Sosa-Gomez, 2004) منطقه‌ای که بیشترین هتروزیگوتی را داشت به عنوان منطقه دارای بیشترین تنوع ژنی شناخته شد، می‌توان گفت که جمعیت مناطق با کنترل شیمیایی شدید با دارا بودن میزان هتروزیگوتی ۰/۱۸۷ نسبت به دو منطقه دیگر دارای بیشترین مقدار تفاوت ژنومی درون جمعیتی هستند.

این احتمال وجود دارد که در مناطق شمالی استان که کنترل شدید شیمیایی صورت می‌گیرد، شرایط متعادل‌تر و مناسب‌تری از نظروضعیت دمایی، ارتفاع از سطح دریا و ازدیاد گیاه میزبان برای رشد پسپیل معمولی پسته فراهم بوده و هر چه شرایط رشد بهتر باشد، این حشرات با سرعت بیشتری رشد و تکثیر می‌یابند. 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). همچنین فشار انتخابی ناشی از مصرف سموم چه در دزهای بالا و چه در دزهای پایین نیز ممکن است سبب افزایش نرخ جهش در آفت جهت حفظ بقای خود در منطقه شود (Gressel, 2011). بنابراین وجود تفاوت و تنوع ژنی بالاتر در مناطق تحت فشار سموم می‌تواند موید تلاش جمعیت‌ها در مسیر انتخاب و رفع فشار وارده ناشی از کنترل شیمیایی باشد. همچنین ممکن است که ایجاد بیوتیپ‌هایی با خصوصیات بیولوژیکی متفاوت منتج از همین اثرات روی ساختار ژنی باشد.

مقدار PIC<sup>۲</sup> که به عنوان شاخص سودمندی آغازگرها شناخته می‌شود نیز، به صورت متوسط برای هر آغازگر و

دندروگرام مربوطه بازسازی شد. شاخص‌های شباهت برای همه مقایسه‌های جفتی ممکن افراد در داخل و میان جمعیت‌ها با استفاده از روش نی و لی (Nei and Li, 1979) و با استفاده از فرمول (۱) محاسبه شد.

(۱)

$$SI=2NXY/(NX+NY)$$

NXY تعداد باندهای RAPD است که بین افراد X و Y مشترک است، NX و NY نیز تعداد کل باندهایی هستند که به ترتیب در افراد X و Y امتیاز داده شده‌اند. از شاخص تشابه به منظور محاسبه میزان فاصله ژنتیکی و رسم دندروگرام استفاده می‌شود. دندروگرام یک توصیف تصویری از تفاوت‌های موجود در جمعیت‌ها را ارائه می‌دهد (Zain Hasan et al., 2009).

ظرفیت اطلاعات چند شکلی<sup>۱</sup> نیز، که تخمینی از قدرت ایجاد تمایز هر آغازگر با در نظر گرفتن تعداد و فراوانی آلل‌هاست، محاسبه شد. بنابراین آغازگرهایی که تعداد آلل‌های مشخص شده توسط آن‌ها مساوی است به علت متفاوت بودن فراوانی آلل‌ها مقادیر PIC متفاوتی را نشان می‌دهند. PIC هر آغازگر با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شد.

(۲)

$$PIC = 2 \sum p_i q_i$$

در این معادله،  $p_i$  فراوانی وجود نوار در هر جایگاه و  $q_i$  فراوانی عدم وجود نوار در هر جایگاه بود. مقادیر PIC برای هر آغازگر از طریق محاسبه میانگین از مقادیر PIC به دست آمده برای تمامی نوارها یا جایگاه‌های آن آغازگر محاسبه شد (Agrama and Tuinstra, 2004).

## نتایج و بحث

از میان ۱۵ آغازگر اولیه، هشت آغازگر OPA-01، OPA-02، OPA-03، OPA-04، OPA-07، OPB-07، OPK-17 و OPO-05 باندهای قابل قبول ایجاد کردند. آغازگرهای ذکر شده در کل ۷۰ باند ایجاد کردند که منطقه بدون کنترل شیمیایی دارای ۷ باند قابل تکرار، منطقه با کنترل

<sup>۱</sup> . PIC

<sup>۲</sup> . Polymorphic information content

روی فاصله و تشابه ژنتیکی در موجودات مختلف، می‌توان این‌گونه بیان کرد که فاصله ژنتیکی مورد نیاز بین جمعیت‌ها برای ایجاد تمایز ژنتیکی کامل،  $0/1$  و به بالا است (Martín Rosenmeier and Sosa-Gómez, 2004; *et al.*, 2008 Ong'amo *et al.*, 2012; Packer, 1993; Kheyrollahi, 2012). ازین‌رو با توجه به فواصل ژنتیکی به‌دست آمده در این تحقیق، نمی‌توان به صورت کامل جمعیت‌ها را تفکیک شده در نظر گرفت، بلکه می‌توان بدین نحو بیان کرد که جمعیت‌ها در حال فاصله گرفتن از یکدیگر هستند. در مطالعه دیگری که توسط روح‌الهی (Rohollahi, 2013) و به‌وسیله توالی COI روی ساختار ژنتیکی پسیل معمولی پسته در استان کرمان صورت گرفت نیز، ژنوتیپ‌ها یا افراد بعضی جمعیت‌ها در شاخه‌های مجزا قرار گرفته و در شرف فاصله گرفتن ژنتیکی گزارش شدند.

در این تحقیق جهت گروه‌بندی و تمایز ژنوتیپ‌ها از تجزیه خوشه‌ای با روش‌های دورترین همسایه‌ها (COMPLETE Linkage) و UPGMA و ضریب تشابه جاکارد، دایس و ضریب تشابه ساده استفاده شد که بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک  $0/77403$  برای ضریب تشابه جاکارد و روش COMPLETE بدست آمد. کلاستر در ضریب تشابه  $0/12$  برش داده شد و ژنوتیپ‌ها در سه گروه اصلی (C,B,A) گروه‌بندی شدند (شکل ۴). گروه اول (A)، شامل  $43/75$  درصد افراد بود که شامل تمامی ژنوتیپ‌ها از مناطق جنوبی استان و با کنترل شیمیایی کم یا بدون کنترل شیمیایی بود، غیر از یک ژنوتیپ از شمال استان که با ضریب تشابه  $50$  درصد از ژنوتیپ جنوب و با کنترل شیمیایی کم جدا شد. گروه دوم (B) شامل  $25$  درصد ژنوتیپ‌ها و مخلوطی از همه جمعیت‌ها بود. گروه سوم شامل  $31/25$  درصد افراد، و همه آن‌ها از مناطق شمالی استان و با کنترل شیمیایی شدید بودند. با توجه به دندروگرام بازسازی شده، افرادی که تحت تاثیر کنترل شدید شیمیایی بودند تقریباً نسبت به سایر افراد در گروه مجزایی قرار گرفته و همچنین افراد تحت تاثیر کم کنترل شیمیایی و افراد فاقد کنترل شیمیایی، در دسته‌ای مشترک قرار گرفته‌اند. کشت گسترده پسته در استان کرمان، پیوستگی باغ‌ها در بعضی مناطق و

همچنین برای هر جمعیت به صورت جداگانه محاسبه شد. زمانی که ظرفیت اطلاعات چندشکلی در یک نشانگر بیشتر از  $0/5$  باشد نشانه آن است که آن آغازگر حاوی اطلاعات مفید بالایی است و در صورتی که  $0/5 < PIC < 0/25$  باشد حاوی اطلاعات متوسط و در مواردی که  $0/25 < PIC$  باشد حاوی اطلاعات ضعیفی است (Colomba and Gregorini, 2011). بیشترین مقدار PIC با میزان  $0/395$  متعلق به آغازگر OPA-02 بود که بر همین اساس می‌توان آن را سودمندترین آغازگر دانسته که حاوی اطلاعات متوسطی بوده و می‌توان آن را برای ارزیابی‌های مربوط به تنوع این گونه حشره پیشنهاد کرد. در بررسی PIC در ارتباط با جمعیت‌ها، بیشترین مقدار PIC در جمعیت زنگی آباد کرمان به میزان  $0/438$  بود که توسط آغازگر OPA-02 ایجاد شد. در جمعیت هفت‌باغ کرمان بیشترین میزان اطلاعات چند شکلی توسط آغازگر OPA-07 ایجاد شد و مقدار آن  $0/444$  بود. در منطقه اسفندقه جیرفت دو آغازگر OPA-02 و OPA-07 با PIC  $0/344$  بیشترین میزان اطلاعات چند شکلی را ایجاد کردند. در منطقه دشتاب بافت نیز آغازگر OPA-02 با PIC  $0/333$  بیشترین مقدار را داشت. کمترین مقادیر PIC نیز در جمعیت‌های زنگی آباد، هفت‌باغ، اسفندقه و دشتاب به ترتیب توسط آغازگرهای OPA-01، OPA-03، OPK-17 و OPA-01 ایجاد شد (جدول ۴). از آنجایی که شرایط آزمایش برای همه افراد یکی بوده، می‌توان مقادیر مختلف PIC به‌دست آمده برای آغازگرها در هر جمعیت را به تفاوت در ژنوم افراد نسبت داد.

نتایج بررسی تشابه و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس روش نی (Nei, 1978) نشان داد که منطقه با کنترل شیمیایی کم و مناطق با کنترل شیمیایی شدید، با فاصله ژنتیکی  $0/0714$  بیشترین فاصله ژنتیکی را دارا هستند و بر همین اساس نیز کمترین تشابه ژنتیکی را با هم دارند (جدول ۵). همچنین منطقه با کنترل شیمیایی کم بیشترین تشابه را با منطقه بدون کنترل شیمیایی نشان داد (جدول ۵). این شباهت ژنتیکی بالا بین این دو گروه می‌تواند به علت نزدیکی بین مکان‌های جمع آوری نیز باشد. با مرور تحقیقات انجام شده

جمعیت‌ها کوچک بود اما خوشه‌بندی جمعیت‌ها و ژنوتیپ‌ها به نسبت خوب صورت گرفت. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که ساختار ژنتیکی مناطق با کنترل شیمیایی شدید با سایر مناطق متفاوت است و لذا می‌توان استنباط کرد که فشار کنترل شیمیایی در طول زمان تغییراتی در ساختار ژنتیکی آفت مذکور ایجاد کرده است. شباهت بیشتر ساختار ژنتیکی مناطق تحت کنترل شیمیایی اندک با مناطق بدون کنترل شیمیایی نیز این نتیجه را تایید می‌کند. لذا بررسی بیشتر و دقیق‌تر ساختار ژنتیکی و مشخص نمودن تنوع ژنتیکی احتمالی در جمعیت‌های فعال آفت در کشور، می‌تواند 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 شود.

#### سپاسگزاری

نویسندگان تشکر صمیمانه خود را از جناب آقای دکتر شهاب منظری عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، به سبب همکاری در تأیید شناسایی مورفولوژیکی نمونه‌های پسپیل اعلام می‌دارند.

همچنین جابجایی نهال و محصول برداشتی پسته در استان می‌تواند به عنوان عامل ارتباطی بین جمعیت‌های مختلف در نظر گرفته شود که بدین ترتیب وجود ژنوتیپ‌هایی از مناطق با کنترل شدید شیمیایی در کنار سایر مناطق بدون کنترل شیمیایی یا با کنترل کم، قابل توجیه است. با توجه به این‌که نتایج حاصل از تجزیه کلاستر تأیید کننده نتایج تجزیه مولکولی و فواصل ژنتیکی محاسبه شده است و به نحوی نمایانگر تمایز نسبی ژنوتیپ‌های منطقه با کنترل شیمیایی شدید از دو جمعیت دیگر است، به نظر می‌رسد سم‌پاشی به عنوان یک عامل انتخابی سبب بروز تنوع درون جمعیتی و حذف و اضافه ژن‌هایی به جمعیت مناطق با کنترل شیمیایی شدید شده است.

با توجه به اینکه در تعدادی از مطالعات، طبیعت غالب نشانگر RAPD که مانع تشخیص سیستم آللی است و همچنین مشکلات مربوط به نبود تکرارپذیری و حساسیت زیاد آن به آلودگی، به عنوان معایب این روش مطرح می‌شود (Naghavi *et al.*, 2006)، به نظر می‌رسد که روش RAPD توانسته است در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت پسپیل معمولی پسته عملکرد مناسبی داشته باشد. اگرچه اندازه

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری

Table 1. Geographical characteristics of sampling areas

Region / Geographical characteristics	No. of used samples	Altitude (meter)	Latitude	Longitude	Abbreviation
Zangi-abad Kerman	4	1733	56°55'25"	30°24'42"	K <sub>1</sub>
Haft bagh Kerman	4	1777	57°06'56"	30°12'18"	K <sub>2</sub>
Dashtab Baft	4	2020	56°35'47"	28°58'37"	B
Esfandagheh Jiroft	4	1758	57°09'15"	28°39'31"	J

جدول ۲- مشخصات آغازگرها

Table 2. Primers characteristics

No.	Primers	Nucleotide sequence	No. of bands
1	OPA-01	CAGGCCCTTC	12
2	OPA-02	TGCCGAGCTG	4
3	OPA-03	AGTCAGCCAC	4
4	OPA-04	AATCGGGCTG	12
5	OPA-07	GAAACGGGTG	4
6	OPB-07	GGTGACGCAG	6
7	OPK-17	CCCAGCTGTG	16
8	OPO-05	CCCAGTCACT	12

جدول ۳- سطح کنترل شیمیایی علیه پسیل معمولی پسته (اقتباس از آمار و ارقام سازمان جهاد کشاورزی استان کرمان)

Table 3. Chemical control level against common pistachio psylla (Adapted from Agricultural Organization of Kerman province)

No.	City	Pest	Amount of used Pesticide (Liter)	Pesticides	Control level (Acre)
1	Kerman	Common pistachio psylla	410000	Amitraz – Actara - Endosulfan	150000
2	Baft	Common pistachio psylla	750	Amitraz – Confidor	320
3	Shahr-e-babak	Common pistachio psylla	55000	Actara - Confidor - Amitraz - Mospilan	30000
4	Bam	Common pistachio psylla	14000	Amitraz	1200
5	Rafsanjan	Common pistachio psylla	355000	Amitraz - Actara - Mospilan	98000
6	Esfandagheh	Common pistachio psylla	0	-	0

جدول ۴- مقدار PIC محاسبه شده برای هر جمعیت و به تفکیک آغازگرها

Table 4. Calculated PIC values for each population and primer

Population Primer	Dashtab Baft	Esfandagheh Jiroft	Haft bagh Kerman	Zangi-abad Kerman	Mean PIC value for each primer
OPA-01	0.042	0.208	0.250	0.185	0.254
OPA-02	0.333	0.344	0.222	0.438	0.395
OPA-03	0.111	0.111	0.222	0.222	0.260
OPA-04	0.148	0.185	0.222	0.222	0.265
OPA-07	0.281	0.344	0.444	0.281	0.351
OPB-07	0.271	0.333	0.229	0.313	0.303
OPK-17	0.194	0.180	0.111	0.250	0.246
OPO-05	0.094	0.135	0.146	0.259	0.271

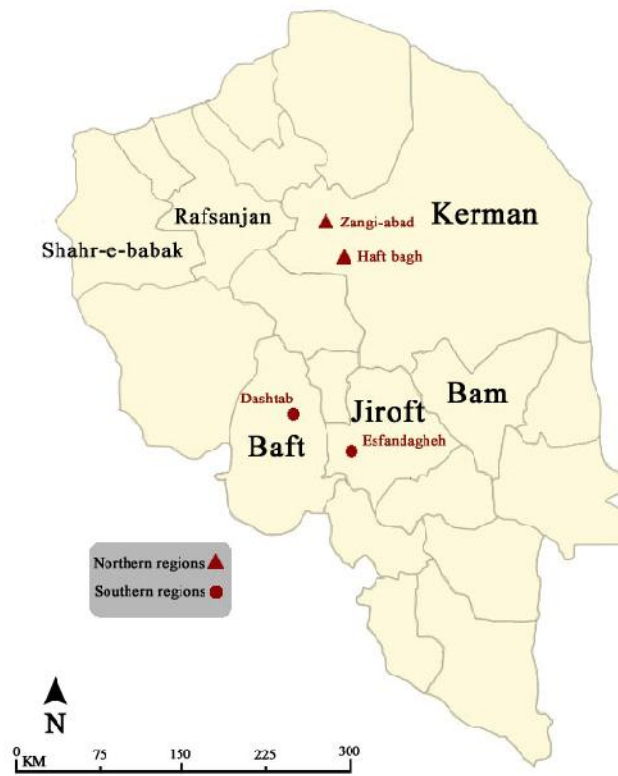


جدول ۵- تشابه و فاصله ژنتیکی گروه‌ها بر اساس شاخص نی بین جمعیت‌های مختلف *Agonoscena pistaciae*

Table 5. Genetic identity and genetic distance according to Nei's index between different populations of *Agonoscena pistaciae*

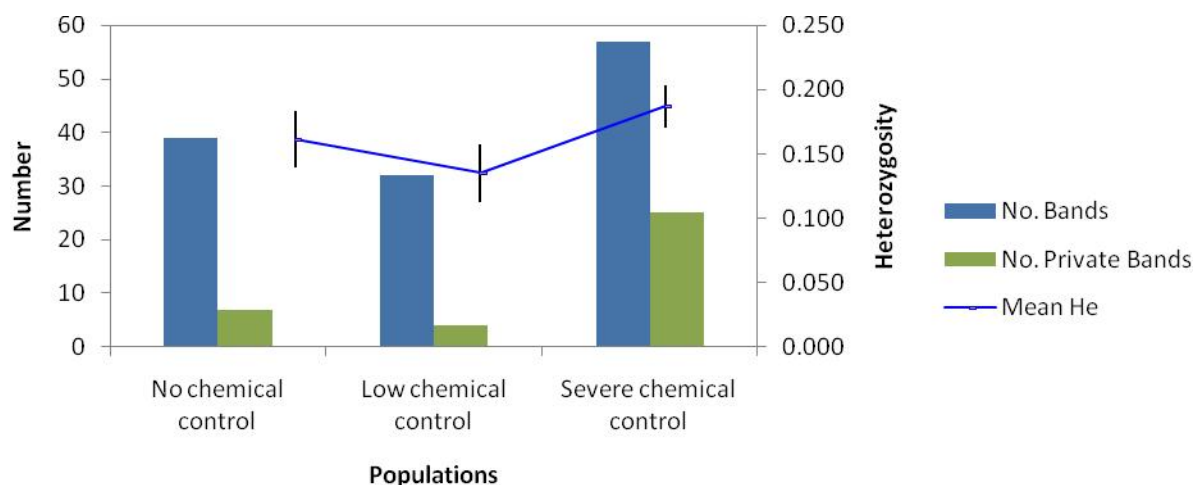
Population ID	No chemical control	Low chemical control	Severe chemical control
No chemical control	***	0.9671	0.9389
Low chemical control	0.0335	***	0.9311
Severe chemical control	0.0631	0.0714	***

اعداد بالای قطر (\*) تشابهات ژنتیکی نی و اعداد پایین قطر (\*) فواصل ژنتیکی نی را نشان می‌دهد.  
Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

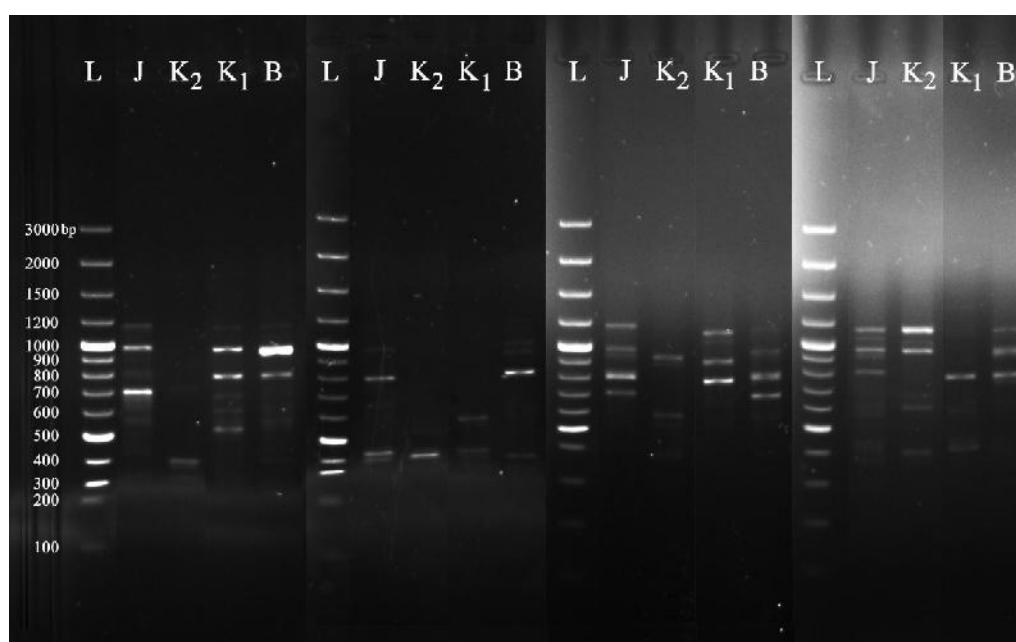


شکل ۱- مناطق نمونه‌برداری (اقتباس از دفتر آمار و اطلاعات استانداری کرمان)

Figure 1. Sampling regions (Adapted from bureau of statistics of Kerman Governor)

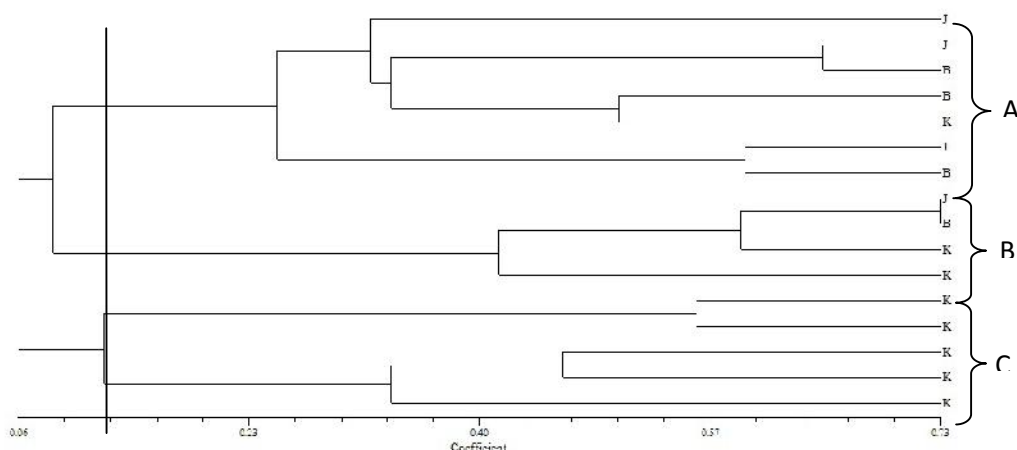


شکل ۲- نمودار میزان هتروزیگوتی و باندهای قابل تکرار در جمعیت‌های *Agonoscyena pistaciae* در مناطق مختلف استان کرمان  
 Figure 2. Chart of Heterozygosity rate and private bands in *Agonoscyena pistaciae*'s populations in different regions of Kerman province



شکل ۳- الگوی نوار بندی حاصل از تکثیر DNA ژنومی پسیل معمولی پسته با استفاده از آغاز گر OPO-05 (L: نشانگر مقیاس J: اسفندقه جیرفت K: هفت‌باغ و زنگی‌آباد کرمان B: دشتاب بافت)

Figure 3. Banding pattern of Common pistachio psylla's genomic DNA by primer OPO-05 (L: Ladder. J: Esfandagheh, Jiroft. K: Haft bagh and Zangi-abad, Kerman. B: Dashtab, Baft)



شکل ۴- دندروگرام به دست آمده برای ۱۶ ژنوتیپ *Agonoscena pistaciae* با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش COMPLETE (J): اسفندقه جیرفت (K: هفت باغ و زنگی آباد کرمان B: دشتاب بافت)

Figure 4. Dendrogram of *Agonoscena pistaciae*'s 16 genotypes, using Jacard similarity index and COMPLETE method (J: Esfandagheh, Jiroft. K: Haft bagh and Zangi-abad, Kerman. B: Dashtab, Baft)

## References

- Agrama, H. and Tuinstra, M.** 2004. Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. *African Journal of Biotechnology* 2(10): 334-340.
- Alizadeh, A., Talebi, KH., Hosseinaveh, V., Ghadamyari, M.** 2011. Metabolic resistance mechanisms to phosalone in the common pistachio psyllid, *Agonoscena pistaciae* (Hom.: psyllidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101: 59-64.
- Bues, R., Boudinhon, L., Toubon, J. F. and Faivre D'Arcier, F.** 1999. Geographic and seasonal variability of resistance to insecticides in *Cacopsylla pyri* L. (Hom., Psyllidae). *Journal of Applied Entomology* 123: 289-297.
- Bureau of statistics of Kerman Governor.** 2012. Statistics: Subdivisions of Kerman province. Retrieved February 1, 2014. From <http://www.amar.kr.ir/uploads/90/ostan.pdf>.
- Burckhardt, D. and Lauterer, P.** 1989. Systematics and biology of the Rhinocolinae (Homoptera: Psylloidea). *Journal of Natural History* 23: 643-712.
- Burckhardt, D. and Lauterer, P.** 1993. The jumping plant lice of Iran (Homoptera, Psylloidea). *Revue Suisse De Zoologie* 100(4): 829-898.
- Colomba, M. S. and Gregorini, A.** 2011. Genetic diversity analysis of the durum wheat *Graziella Ra, Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn. (Poales, Poaceae). *Biodiversity Journal* 2(2): 73-84.
- Farahpour Hagani, A.** 2011. Genetic variation of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) populations with RAPD marker in Guilan and west of Mazandaran provinces. Msc. thesis. University of Guilan. (in Farsi)
- Gallusser, S., Guadagnuolo, R. and Rahier, M.** 2004. Genetic (RAPD) diversity between *Oleria onega agarista* and *Oleria onega* ssp. (Ithomiinae, Nymphalidae, Lepidoptera) in North-Eastern Peru. *Genetica* 121(1): 65-74.
- Gressel, J.** 2011. Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest Management Science* 67: 253-257.
- Huang, B. X., Peakall, R. and Hanna, P. J.** 2000. Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Marine Biology* 136: 207-216.
- Jafari Nadoushan, A.** 1998. Performance evaluation of lacewing *Chrysoperla carnea* as pistachio psylla predator. MSc. Thesis. Tarbiat Modarres University. (in Farsi)

- 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** 268: 1387-1394.
- Kheyrollahi, Z.** 2012. Genetic diversity of *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) by RAPD markers in eastern Guilan and western Mazandaran provinces. MSc. Thesis. University of Guilan. (in Farsi)
- Kumar, N. S. and Gurusubramanian, G.** 2011. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. **Science Vision** 11(3): 116-124.
- Liu, D. and Trumble, J. T.** 2007. Comparative fitness of invasive and native populations of the potato psyllid (*Bactericera cockerelli*). **Entomologia Experimentalis et Applicata** 123: 35-42.
- Martín, C., Parra, T., Clemente-Muñoz, M. and Hernandez-Bermejo, J. E.** 2008. Genetic diversity and structure of the endangered *Betula pendula* subsp. *fontqueri* populations in the south of Spain. **Silva Fennica** 42(4): 487-498.
- Mehrnejad, M. R.** 2001. The current status of the pistachio pests in Iran. **Cahiers Options Méditerranéennes** 56: 315-322.
- Mehrnejad, M. R.** 2002. Bionomics of the common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae*, in Iran. **Acta Horticulturae** 591: 535-539.
- Naghavi, M. R., Ghareyazie, B. and Hosseini Salekdeh, Gh.** 2006. Molecular Markers. (3<sup>rd</sup> ed.). University of Tehran press. pp. 320.
- Nei, M. and Li, W. H.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. **Proceeding of National Academy of Science USA** 7: 5269-5273.
- Ofori, D. A., Swaine, M. D., Leifert, C., Cobbinah, J. R. and Price, A. H.** 2001. Population genetic structure of *Milicia* species characterised by using RAPD and nucleotide sequencing. **Genetic Resources and Crop Evolution** 48: 637-647.
- Ong'amo, G. O., Ru, B. P. L., Campagne, P., Branca, A., Calatayud, P.-A., Capdevielle-Dulac, C. and Silvain, J.-F.** 2012. Genetic Diversity and Population Structure of *Busseola segeta* Bowden (Lepidoptera; Noctuidae): A Case Study of Host Use Diversification in Guineo-Congolian Rainforest Relic Area, Kenya. **Insects** 3(4): 1156-1170.
- Parker, P.G., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C. and Fuerst, P. A.** 1998. What molecules can tell us about populations: choosing a molecular marker. **Ecology** 79: 361-382.
- Rohlf F. J.** 2008. NTSYS pc: Numerical taxonomy system, Ver. 2.20. Exeter publishing, Ltd.: Setauket, NY.
- Rosenmeier, L. and Packer, L.** 1993. A comparison of genetic variation in two sibling species pairs of haplodiploid insects. **Biochemical genetics** 31(3-4): 185-200.
- Rohollahi, S.** 2013. A molecular investigation on genetic diversity of different populations of *Agonoscena pistaciae* in Kerman province. . MSc. Thesis. University of Tehran. (in Farsi)
- Serçe, Ç. U., Kaydan, M., Kilincer, A. and Ertunc, F.** 2007. Investigation of mealybug (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) species from Turkey by RAPD. **Phytoparasitica** 35(3): 232-238.
- Sosa-Gomez, D. R.** 2004. Intraspecific variation and population structure of the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology** 27(3): 378-384.
- Stankiewicz, M., Gadamski, G. and Gawronski, S. W.** 2001. Genetic variation and phylogenetic relationships of triazine-resistant and triazine-susceptible biotypes of *Solanum nigrum* analysis using RAPD marker. **European Weed Research Society** 41: 287-300.
- Syamsuardi and Okada H.** 2002. Genetic diversity and genetic structure of populations of *Ranunculus japonicus* Thunb. (Ranunculaceae). **Plant Species Biology** 17: 59-69.
- Talebi Jahromi, KH., Rahmani Moghaddam, M. and Moharramipour, S.** 2001. Susceptibility of different populations of pistachio psylla "*Agonoscena pistaciae*" to phosalone in Kerman province. **Iran's Agricultural sciences** 32(3): 495-500. (in Farsi)

- Tiwari, S., Mann, R. S., Rogers, M. E. and Stelinski, L. L.** 2011. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science** 67: 1258–1268.
- Walsh, P. S., Metzger D. A. and Higuchi, R.** 1991. "Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material". **BioTechniques** 10(4): 506–513.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18(22): 6531-6535.
- Yeh, F. C., Yang R. C., Boyle T.** 1999. POPGEN version 1.32. Macrosoft windows-based freeware for publication genetic analysis. University of Alberta and the Centre for International Forestry Research, Edmonton. Available at [[www.ulberta.ca/~fyeh](http://www.ulberta.ca/~fyeh)]. Accessed January 14, 2012.
- Zain Hasan, S. M., Shafie, M. B., Shah, R. M.** 2009. Analysis of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) of *Artemisia capillaris* (Wormwood capillary) in East Coast of Peninsular Malaysia. **World Applied Sciences Journal** 6 (7): 976-986.

Plant Pests Research  
2014 – 4(1): 21-34

## Application of RAPD in comparison of diversity of common pistachio psylla (*Agonoscena pistaciae* Burckhardt & Lauterer) populations in some northern and southern regions of Kerman province

S. Karimi\*<sup>1</sup>, R. Hosseini<sup>2</sup>, A. Farahpour<sup>3</sup>, and A. Aalami<sup>4</sup>

1 and 2 Msc. student and Assistant Professor of Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan. 3. Ph.D student of Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, University of Mohaghegh Ardabili. 4. Assistant Professor of University of Guilan. Department of Agronomy and Plant Breeding. Faculty of Agricultural Science, University of Guilan.

(Received: August 11, 2013- Accepted: March 18, 2014)

### Abstract

The current study aimed to investigate the genetic structure of common pistachio psylla (*Agonoscena pistaciae* Burckhardt & Lauterer) populations in some pistachio planting areas in Kerman province with different chemical control management programs. sampling was conducted in different regions including: Zangi-abad Kerman and Haft bagh Kerman (regions with severe chemical control), Dashtab Baft (region with low chemical control) and Esfandagheh Jiroft (region without chemical control) during July-August in 2012. DNA of specimens were extracted with Chelex method and amplified with eight RAPD primers including: OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-07, OPB-07, OPK-17 and OPO-05. After observation and scoring bands patterns, data were analyzed with NTSYS and POPGENE softwares. Accordingly, OPA-02 was found the most useful primer, that created the greatest amount of PIC with the rate of 0.395. The results of similarity and genetic distance between populations based on Nei's method also showed that the low chemical control and the severe chemical control regions with a genetic distance of 0.0714 have the greatest genetic distance and also the region with the low chemical control had the highest similarity with the regions without chemical control. Individuals were clustered using Jacard similarity index. Results indicated that RAPD primers could separate populations with severe chemical control in a group compare to other regions where, population of two regions of Esfandagheh and Dashtab were clustered in the same group. These result showed that heavy chemical control in some regions could probably result in differences among genetic structures of active populations of this pest.

**Key Words:** Chemical control, Genetic variation, Pistachio pests, Psyllidae

\*Corresponding author: [sankarimi2@gmail.com](mailto:sankarimi2@gmail.com)