تنوع ژنتیکی جمعیت‌های جغرافیایی کرم ساقه خوار اروپایی ذرت *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lep.: Crambidae) در ایران با استفاده ازنشانگرهای ریزماهواره

نیر احتشام نیا[1]، جبرائیل رزمجو[2]، بهرام ناصری[2] و نادر گل محمدزاده خیابان[3]

۱-دانشجوی دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی.

۲-به ترتیب استاد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی.

۳-استادیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل، اردبیل.

*مسئول مکاتبه nehtesham@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۹

چکیده

کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت *Ostrinia nubilalis* Hübner یکی از آفات مهم زراعی است که تقریبا در تمام مناطق ایران یافت می‌شود. به‌منظور بررسی تنوع جغرافیایی آفت، لاروهای آن از استان‌های اردبیل، گلستان، کردستان، آذربایجان‌شرقی و سیستان و بلوچستان طی سال‌های ۹۱ و ۹۲ جمع‌آوری شدند. در بررسی تنوع جغرافیایی، تعداد جایگاه‌های چندشکل ۱۰ عدد و درصد چندشکلی ۱۰۰ درصد تعیین شد. این نشانگرها در مجموع ۳۷ باند چند شکل در محدوده‌ی ۵۰ تا ۹۰۰ جفت باز با میانگین ۳/۷ نوار به ازای هر نشانگر تولید کردند. تعداد نوارها به ازای هر نشانگر از ۲ تا ٦ نوار متغیر بود. تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های جغرافیایی کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت، معنی‌دار و تنوع ژنتیکی درون جمعیتی و بین جمعیتی بر اساس ضریب تشابه نی، به‌ترتیب ۸۰/۸ درصدو ۱۹/۲ درصد برآورد گردید. بیشترین و کمترین میزان تنوع ژنی و تعداد جایگاه‌های چندشکل به‌ترتیب مربوط به جمعیت-های گرگان ۰/۲۷۷، ۹ و ایرانشهر ۰/۱۰٤، ٦ بودند. بیشترین و کمترین میزان هتروزیگوسیتی به‌ترتیب مربوط به نشانگر Os-N3 و Os-N10 به میزان ۰/۷٤۸ و ۰/۲۰۳ بود. شباهت ژنتیکی جمعیت‌های جغرافیایی مورد بررسی بین ۳۸ درصد تا ۸۲ درصد مشاهده شد. بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی به ترتیب بین جمعیت‌های سنندج - گرگان و مغان - شبستر ۰/۹۱۷و ۰/۱۹۸ مشاهده گردید. براساس تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA جمعیت‌های مغان و شبستر در یک خوشه و گرگان، سنندج و ایرانشهر در یک خوشه مجزا قرار گرفتند. برای آزمون همبستگی فواصل ژنتیکی و جغرافیایی جمعیت‌ها، از آزمون منتل استفاده شد که همبستگی پایین و منفی ($P<0/243$ و $r = -0/174$) را بین فاصله‌ی ژنتیکی و فاصله‌ی جغرافیایی نشان داد. بنابراین مطابقتی با افزایش فاصله‌ی جغرافیایی محل‌های نمونه-برداری، با فاصله ژنتیکی آن‌ها بر اساس نشانگرهای SSR مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع جغرافیایی، جریان ژنی، *Ostrinia nubilalis* ، ریزماهواره.

مقدمه

کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lep.: Crambidae) آفتی چند خوار است که در اکثر نقاط جهان وجود دارد. بیش از ۲۰۰ گونه میزبان راسته و دارای ترجیح میزبانی نسبت به ذرت، برنج و گندم است و لاروهای آن از قسمت‌های مختلف گیاه نظیر برگ، ساقه و بویژه بلال تغذیه و خسارت می‌زند. این آفت به اغلب سموم مختلف کشاورزی مقاومت نشان داده است (توماس و همکاران ۲۰۰۳). بررسی تنوع جغرافیایی در جمعیت‌های طبیعی موجودات یکی از مباحث قابل توجه و با اهمیت در اکولوژی به حساب می‌آید. استفاده موثر از نتایج داده-

های حاصل از بررسی اختلافات بین جمعیت‌های جغرافیایی در برنامه مدیریت این آفت از اهمیت خاصی برخوردار است. داشتن آگاهی علمی کامل و درست از خصوصیات جمعیت‌های نواحی مختلف این آفت در بکارگیری روش‌های کنترل مانند کاربرد ارقام مقاوم و روش‌های کنترل بیولژیک حائز اهمیت فراوان می‌باشد. درک ساختار ژنتیکی این آفت می‌تواند از نقطه نظر کاهش مصرف سموم، مدیریت مقاومت، ساختار جمعیتی، مهاجرت و جریان ژنی موثر باشد. وجود تنوع در کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت به‌واسطه عوامل مختلفی مانند انتخاب طبیعی، اثر متقابل حشره- گیاه و غیریکنواختی محیطی محتمل است. از طرف دیگر مطالعه جنبه‌های مولکولی جمعیت‌های جغرافیایی و نتایج حاصل از آن از مهم‌ترین عوامل جهت استفاده در بررسی‌های آتی مربوط به این آفت از نظر بیولوژیکی، اکولوژیکی، دشمنان طبیعی و نیز مهاجرت می‌باشد (صلواتیان۱۳۷۰، اسماعیلی و همکاران ۱۳۸۱، لنیاد و همکاران ۲۰۰٦). تاثیر عوامل اکولوژیکی در گونه‌زایی مورد تاکید قرار گرفته است (شیلتوزن ۲۰۰۰). مکانیسم‌هایی مانند ایزوله شدن آمیزش، اختلاف در فرومون‌های جنسی ماده (مارتل و همکاران ۲۰۰۳، بنتمپ و همکاران ۲۰۰٤، پلوزلور ۲۰۰٤) و عوامل ناشناخته دیگر که موجب اختلال در جفت‌گیری (پلوزلور و همکاران ۲۰۰۷)، زمان ظهور حشرات کامل (پنسارد و همکاران ۲۰۰٤، مالاسا و همکاران۲۰۰۵، ورگلگت ۲۰۰۹) و انتخاب میزبان جهت تخمریزی توسط حشرات ماده (بتنود و همکاران ۲۰۰۵) می-شوند، منجر به ایجاد تنوع ژنتیکی در کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت می‌گردد. کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت بومی اروپا و غرب آسیا بوده و پس از ورود به شمال آمریکا و گذر از تنگنای ژنتیکی، سطح وسیعی از قاره آمریکا را اشغال نمود واز طرفی اکوتیپ‌های سیم-پاتریک از نظر کاربرد فرومون‌های جنسی و تعداد نسل‌ها با هم اختلاف زیادی نشان دادند (شوور ۱۹۹۳، وییا ۲۰۰۱). در مورد برخی گونه‌ها ثابت شده است که اختلاف بین جمعیت‌ها بیشتر از درون جمعیت‌ها می باشد (کلارک ۲۰۰۷ و رودریک ۱۹۹٦) هرچند در بعضی دیگر نیز اختلاف بین جمعیت‌ها کمتر از درون جمعیت‌ها است (کوتس و هلمیچ ۲۰۰۳ جان و همکاران ۲۰۰٤ تیمرمن و همکاران ۲۰۰۷).

افزایش فاصله جغرافیایی بین جمعیتها اغلب منجر به نوعی کاهش جریان ژنی در آنها می شود(مایر ۱۹۹۱). در بیشتر گونه ها اغلب با افزایش فاصله جغرافیایی بین و جمعیت‌ها، کاهش تبادل ژن میان آنها رخ می‌دهد (منکن و راجمان ۱۹۹٦). از طرف دیگر، در برخی آفات نیز که توانایی بیشتری در زمینه انتشارفضائی دارند تنوع بین جمعیتها کاهش می یابد (رایت ۱۹٦۹و میل و آلندورف ۱۹۹٦).

منابع ایجاد شباهت‌ها در بین جمعیت‌ها ممکن است شرایط آب و هوائی، محیط زیست مشابه، جریان ژنی در میان آنها و نیز نقل و انتقالات باشد بطوریکه برای مثال در مورد کرم گلو گاه انار تا حدودی در ایجاد شباهتها نقش داشته است (مظفریان همکاران ۱۳۸٤).

ریزماهواره‌ها اغلب دارای چند شکلی بالا، پراکندگی وسیع در ژنوم موجودات پیشرفته، سیستم چندالی بیشتر غیرعملکردی، تک لوکوس و دارای توارث همبارز بوده و در ژنوم به‌صورت تصادفی و به‌وفور یافت می‌شوند. مزایائی از قبیل امکان چندترکیبی، امتیازدهی آسان، دقیق، قابلیت خودکار شدن و همچنین مقدار بسیار اندک DNA، امکان کاربرد موثر آن‌ها در مطالعات اکولوژیکی، فیلوژنتیکی و ژنتیک جمعیت را فراهم نموده است. الگوهای نواری حاصل از این نشانگرها، قابل بررسی به صورت مکان و آلل‌های آن هستند. به‌همین دلیل تفکیک افراد هتروزیگوت از هموزیگوت امکان‌پذیر است (بی‌همتا و همکاران۱۳۸۸ گارسیا و همکاران ۲۰۰٤). ناحیه DNA میتوکندریایی بررسی دو جمعیت کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت از کشورهای مصر و مجارستان که از روی میزبان ذرت جمع‌آوری شده بود که ممکن است به دلیل گسترش جمعیت، از جمعیت اولیه با اندازه کوچک بوده باشد

(کستلی۲۰۰۵). در ۱۵ جمعیت جمع آوری شده از مناطق مختلف آمریکای شمالی، بررسی بر روی ژن-های ناحیه سیتوکروم اکسیداز یک و دو DNA[1] میتوکندریایی، انجام گرفت و ۱۵ هاپلوتیپ گزارش شد. آنها همچنین طی بررسی ۱٤۱٤ نمونه با تکنیک PCR-RFLP در همان ۱۵ ناحیه، اختلافات معنی‌داری در فراوانی هاپلوتیپ‌ها بین مناطق میانه غربی و آتلانتیک همانند جمعیت‌های تک‌نسلی و دو نسلی مینوسوتا پیدا نمودند (کت و هلمیچ ۲۰۰۳). بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های جمعیت‌های کرم ساقه خوار اروپایی ذرت در نبراسکا با نشانگر RAPD[2] نشان داد که تعدد نسل-ها در یک سال باعث تنوع ژنتیکی این آفت گردیده و جمعیت‌های یک نسل در سال ۳۵٪، دو نسل ٤۵٪، سه نسل ۲۰٪ از کل جمعیت را شامل می‌شوند (سالدانها و همکاران ۲۰۰۰).

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کرم ساقه خوار اروپایی ذرت در ۱۸ زیر جمعیت در ایالات متحده با نشانگر AFLP[3] مورد مطالعه و تنوع درون جمعیتی بسیار معنی‌داری نسبت به تنوع بین جمعیتی مشاهده شد (کروم و همکاران ۲۰۰۸). هدف اصلی این تحقیق، بررسی تنوع جمعیت‌های جغرافیایی کرم ساقه خوار اروپایی ذرت از نظر مولکولی به‌منظور تعیین ساختار این جمعیت‌ها می باشد که در نهایت زمینه را برای اجرای سایر مطالعات کاربردی فراهم خواهد نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

لاروهای سنین مختلف از نسل دوم کرم ساقه خوار اروپایی از میزبان ذرت علوفه‌ای رقم ۷۰٤ سینگل گراس در سالهای ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲، از استان‌های گلستان، آذربایجان‌شرقی، اردبیل، کردستان و سیستان و بلوچستان جهت مطالعات مولکولی جمع‌آوری شدند. تعداد ۳۰ عدد از لاروهای سنین مختلف از هر منطقه جهت آزمایش‌های مولکولی انتخاب و تا استخراج DNA، در فریزر (دمای ۸۰- درجه‌ی سلسیوس) نگهداری شدند.

استخراج DNA و PCR

استخراج **DNA** از لاروهای کرم ساقه خوار اروپایی ذرت، به‌روش زایمرمن و همکاران (۲۰۰۰) انجام گرفت. جهت مشاهده کیفیت **DNA** استخراجی، از ژل آگارز ۸ درصد و فلئورومتر استفاده شد. غلظت**DNA** نمونه‌های استخراج شده با آب مقطر استریل به ۲۰ تا ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر تبدیل شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه ترموسایکلر بیومترا انجام گردید. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ژل متافور ۳ درصد تفکیک شد. ده نشانگر ریزماهواره Os-N1، Os-N2، OS-N3، Os-N4، Os-N5، Os-N6، Os-N7، Os-N8، Os-N9 و Os-N10 بر روی پنج جمعیت جمع‌آوری شده از میزبان ذرت جهت مطالعات مولکولی از نظر تنوع درون جمعیتی و برون جمعیتی مورد بررسی قرارگرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

اندازه باندهای بدست آمده از روی نشانگر شاخص (Lader) به اندازه ۵۰bp (ساخت Roche آلمان) تعیین و ژنوتیپ هر فرد در هر جایگاه مستقیما از روی ژل به دست آمد. فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی به روش شمارش مستقیم تعیین گردید. فراوانی آللی، تعداد آلل در هر جایگاه ژنی، تعداد آلل موثر، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده[4] (نسبت افراد هتروزیگوت در یک جایگاه ژنی به کل نمونه‌ها) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار[5] (تعداد افرادی که باید بر اساس فراوانی آللی هتروزیگوت باشند) با استفاده از نرم افزار Popgene 3.2 محاسبه گردید. برای تعیین

[1]Cytochrome oxidase I,II.
[2]Random Amplified Polymorphism DNA.
[3]Amplified Fragments Length Polymorphism.
[4]Observed heterozygosity.
[5]Expected heterozygosity.

میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی، بر اساس مدل آللی بی‌نهایت FST و مدل جهش پله‌ای RST با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) بسته نرم افزاری Arlequin 3.0 مورد استفاده قرار گرفت (اکسوفیر و همکاران ۲۰۰۵).

جدول۱- اطلاعات مربوط به مناطق نمونه‌برداری کرم ساقه خوار اروپایی ذرت.

منطقه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا	زمان نمونه برداری
شبستر	٤٥°٤٢'E	٣٨°١٨'N	١٤٠٠	٩١/٥/١٠
ایرانشهر	٦٠°٦٩'E	٢٧°٢٠'N	٥٩١	٩١/٨/٢٥
مغان	٤٧°٤٨'E	٣٩°٣٩'N	٤٥	٩١/٤/٢٠
گرگان	٥٤°٤٨'E	٣٦°٨٣'N	١٥٥	٩١/٤/١٥
سنندج	٤٦°٩٩'E	٣٥°٣١'N	١٤٦٣	٩٢/٤/٣٠

جدول ۲- خصوصیات جایگاه‌های ژنی به کار برده شده در مطالعه‌ی کرم ساقه خوار اروپایی ذرت.

آغازگرها	توالی(/۳- /۵)	تیپ تکرار	اندازه
Os-N1	F: GGGCCCAAAAGATAAGGAGA R: CGCACTTAGATTGAGCGAGA	AA(GA), AG	١٣١-١٥٣
Os-N2	F: ACTTTTGGCCAAGTGTCCTG R: CGTAGTTGTGACGCTTGGTG	$(TC)_{29}$	١٤٧-٢٧٣
OS-N3	F:ATGTGCAACAGGGAGAGCTT R: GCGACTGTAGTAGGGGAGCA	$(TC)_6$	١٦١-٢٧٥
Os-N4	F: ACGAGCTTTATCCGACGTGT R: AGGCCTGAGGAGCAGCAGT	$[G (C/T)T]_{16}ACA[G(C/T)T]_{13}$	١٢٣-١٣٢
Os-N5	F: AAATGGCGTACGAGACGAAC R: ACTGTTGCATGTGAGGGTGA	$(GCA)_2GCC(GCA)4GCC(GCA)_3$ GCC[(G/A)CA}10TCAGGC $[A(G/A)C]_{10}AGAT(GCA)_3$	٢٢١-٢٢٤
Os-N6	F: GGCAGCTATGGAGGCTAAGA R: CTGGCCCTGCATCTGTTG	$(GCA)_{22}$	١٤٨-١٦٦
Os-N7	F: CTACGAGCCGCACTTGTACC R: CGTGAGAAGCGTCCTACCT	$(AGC)_2ACC(AGC)_7$	١٦٥-١٨٦
Os-N8	F: CCACAATCCTGCTCTGTAAAA R: AGGAGCAGCAGTTCCTCA	[G(T/C)T]24	٢٠٨-٢٢٩
Os-N9	F: ATCTGTTGCTGCAGGTGCT R: CAGCAGATACCGCACCAG	[G(C/T)T]	١٢٨-١٥٣
Os-N10	F: GTGCATCACCACCTGCTGT R: GCCTACATCAACCAGGCTGT	$(GA)_3(GCT)_6$	١٧٠-٢١٥

تعیین مقادیر فاصله و شباهت ژنتیکی با استفاده از شاخص تنوع ژنتیکی نی[1] و تعیین فیلوژنوگرافی بین جمعیت‌ها با استفاده از روش UPGMA با استفاده از نرم افزار NTSYS 1.8 صورت گرفت. برای آزمون همبستگی فواصل ژنتیکی و جغرافیایی جمعیت‌های مورد بررسی، از آزمون منتل استفاده شد.

نتایج و بحث

[1]Nei's Genetic Diversity Index.

نتایج حاصل از چرخه‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که تمامی جایگاه‌ها به خوبی تکثیر یافتند. بیشترین تعداد آلل مربوط به نشانگر Os-N2 و کمترین آن مربوط به نشانگرOs-N10 بود. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مربوط به نشانگر Os-N7 و کمترین آن مربوط به نشانگرهای Os-N10 بود بیشترین میزان تنوع ژنی و تعداد جایگاه‌های چند شکل مربوط به جمعیت گرگان و کمترین آن مربوط به جمعیت ایرانشهر بود (جدول ۳).

برای تفکیک تغییرات مولکولی کل به تنوع بین و درون جمعیت‌ها، از تجزیه واریانس مولکولی استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی برای جمعیت‌های جغرافیایی در جدول ٤ آمده است. تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های جغرافیایی کرم ساقه خوار ذرت معنی‌دار بود. براساس نتایج حاصل، ۱۹/۲ درصد از کل تنوع ژنتیکی توسط تغییرات بین جمعیت‌ها و ۸۰/۸ درصد توسط تنوع درون جمعیت‌ها ایجاد شد. علت پایین بودن تنوع ژنتیکی بین و بالا بودن تنوع درون جمعیت‌های کرم ساقه خوار اروپایی ذرت را می‌توان ناشی از مهاجرت‌های طولانی افراد جمعیت‌ها دانست. احتمالا به‌دلیل مهاجرت، افراد جمعیت‌های مختلف در یک منطقه با یکدیگر جفت‌گیری نموده و تبادلات ژنتیکی بین آن‌ها صورت گرفته است. به‌عبارت دیگر تلاقی‌های بین جمعیت‌ها، اغلب تصادفی بوده و تلاقی‌های درون جمعیتی بیشتری صورت گرفته است و همین امر سبب افزایش تنوع ژنتیکی درون نسبت به بین جمعیت‌ها شده است.

براساس داده‌های جدول ٥، بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی به‌ترتیب مربوط به جمعیت‌های گرگان – سنندج (۰/۹۱۷) و شبستر – مغان (۰/۱۹۸) بود. جمعیت‌های مناطق شبستر ومغان تقریبا دارای اقلیم نسبتا" مشابه و فواصل کمی نسبت به هم بوده و دارای جمعیت‌های نزدیک به هم از نظر ژنتیکی هستند. پایین بودن فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها نیز نتایج تجزیه واریانس مولکولی کمی تنوع بین جمعیت‌ها را تأئید می‌نماید.

گروه‌بندی جمعیت‌های مختلف جغرافیایی کرم ساقه خوار اروپایی ذرت با استفاده از داده‌های مولکولی حاصل از تجزیه نشانگرهای SSR درشکل ۱ نشان داده شده است. برش دندروگرام در حداکثر فاصله بین گروه‌ها، جمعیت‌های جغرافیایی را به دو گروه اصلی منتسب کرد. به‌طوری‌که جمعیت‌های مغان و شبستر در گروه اول و جمعیت سنندج، گرگان و ایرانشهر در گروه دوم قرار گرفتند. با توجه به فصل کشت ذرت در ایرانشهر که در نیمه دوم سال صورت می‌گیرد در این شرایط، از نظر خصوصیات اقلیمی مشابهت بیشتری به منطقه گرگان داشته و هر دو منطقه از دمای بالاتری نسبت به سایر مناطق برخوردارند.

جدول ۳- پارامترهای تنوع ژنی جمعیت‌های مورد مطالعه کرم ساقه خوار اروپایی ذرت.

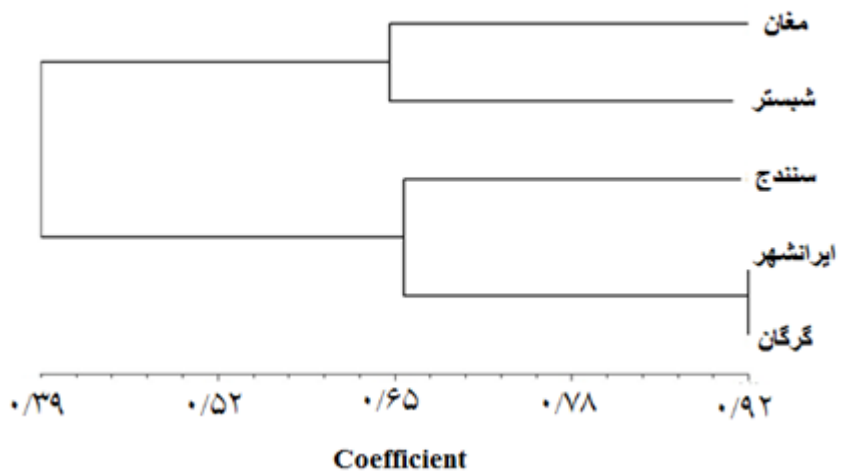
منطقه	اندازه	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	تعداد جایگاه‌های چند شکل	تنوع ژنی
شبستر	٤٦	۰/۲٦۱	۰/۲٦۹	۸	۰/۲٦۳
ایرانشهر	۲٦	۰/۱۳۱	۰/۱۰۷	٦	۰/۱۰٤
مغان	۳۰	۰/۲۷۳	۰/۲۷۸	۸	۰/۲٦۲
گرگان	٤۲	۰/۲۷۷	۰/۲۸۹	۹	۰/۲۸۳
سنندج	٤۲	۰/۲٦۷	۰/۱۰۷	۸	۰/۲۷۳

جدول ٤- تجزیه واریانس مولکولی برای پنج جمعیت جغرافیایی مورد مطالعه کرم ساقه خوار اروپایی ذرت.

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات انحرافات	واریانس	درصد تبیین واریانس کل
بین جمعیتی	٤	١٤٥٦/٧	٢٤/٤	١٩/٢
درون جمعیتی	١٥٣	٤٢٥٦/٨	٢٧/٨	٨٠/٨

جدول ۵- ماتریس فاصله ژنتیکی جمعیت‌های جغرافیایی کرم ساقه خوار اروپایی ذرت براساس ضریب نئی.

	مغان	شبستر	سنندج	گرگان	ایرانشهر
مغان	۰/۰۰۰				
شبستر	۰/۱۹۸	۰/۰۰۰			
سنندج	۰/۳۳۱	۰/۵۵۱	۰/۰۰۰		
گرگان	۰/۹۰۰	۰/۷٦۷	۰/۹۱۷	۰/۰۰۰	
ایرانشهر	۰/٦٤٨	۰/۵۵۵	۰/۷۷۳	۰/۳۷۲	۰/۰۰۰



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی پنج جمعیت کرم ساقه خوار اروپایی ذرت براساس داده‌های **SSR**.

نتایج بررسی، همبستگی پایین و منفی را بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی نشان داد (۰/۲۷۳ >Pو ۰/۱۸۹- = r). بدین ترتیب مطابقتی با افزایش فاصله جغرافیایی محل‌های نمونه برداری جمعیت‌ها، با فاصله ژنتیکی آن‌ها بر اساس نشانگرهای SSR وجود نداشت. به نظر می‌رسد وجود اختلاف بین جمعیت‌های جغرافیایی بر اساس نوع آفت که رفتارهای متفاوتی نیز می‌توانند داشته باشند متفاوت است چرا که نتایج مظفریان و همکاران در سال ١٣٨٤ بر روی اختلاف چهار جمعیت جغرافیایی کرم گلوگاه انار از ایران، ارتباط بین فواصل مورفولژیک و جغرافیایی را معنی-دار گزارش نمودند که منطبق با نتایج تحقیق حاضر نمی‌باشد هرچند محققین ذکر شده از ریخت سنجی هندسی در مقایسات استفاده نموده و ممکن است در صورت استفاده از نشانگرهای ریزماهواره نتایج متفاوتی بدست آورند. از طرفی در مورد آفاتی که دامنه میزبانی کمتری دارند بدلیل عدم تاثیر میزبانهای مختلف میزان تنوع ژنی تا حدودی کمتر است.

بورگوت و همکاران نیز در سال ۲۰۰۰ درجه بالایی از جریان ژنی در کرم ساقه خوار اروپایی ذرت از نواحی شمالی (تک نسلی) و جنوبی (دونسلی) فرانسه با استفاده از نشانگرهای چندشکل آلوزایمی گزارش و عمده دلیل آن را مهاجرت دانسته اند. نتایج تحقیقات کروم و همکاران درسال ۲۰۰۸ بر روی ۱۸ جمعیت

جغرافیایی کرم ساقه خوار اروپایی ذرت از نواحی غربی امریکا با نشانگر RAPD اختلاف ژنتیکی کمی را بین جمعیت‌ها و از طرفی همبستگی پایین بین فواصل جغرافیایی و ژنتیکی نشان داد که با نتایج کوت و همکاران در سال ۲۰۰٤ بر روی همین آفت مشابه است و بیانگر جریان ژنی بالا بین جمعیت‌ها است و عمده علت آن را مهاجرت می‌دانند از طرف دیگر، نتایج شوور و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان می‌دهد که کرم ساقه خوار اروپایی ذرت قادر است سالانه ۳۲ کیلومتر شعاع پراکنش خود را افزایش دهد.

گل‌محمد زاده خیابان و همکاران در سال ۲۰۱۰ ضمن مطالعه تنوع ژنتیکی پنج جمعیت جغرافیایی کرم‌غوزه‌ی پنبه *H. armigera* از ایران، با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، همبستگی معنی‌داری بین فواصل ژنتیکی و فواصل جغرافیایی مشاهده نگردند. این نتایج با یافته‌های ما مبنی بر وجود جریان ژنی بالا مطابقت دارد.

با مقایسه بین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظاردر تمامی جایگاه‌های مورد مطالعه می‌توان دریافت که در بسیاری از جایگاه‌ها تفاوت قابل ملاحظه ای بین این دو مقدار مشاهده می‌شود. هتروزیگوسیتی بالای جایگاه‌های مورد مطالعه حاکی از حفظ تنوع بالای درون جمعیتی است. کم بودن تنوع بین جمعیتی و شاخص‌های تمایز نشان‌دهنده وجود جریان ژنی بالا در بین جمعیت‌ها می‌باشد. نتایج نیز وجود جریان ژنی بالایی را در جایگاه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. در نهایت می‌توان گفت این مطالعه بار دیگر کارآمدی ریزماهواره‌ها را به عنوان نشانگر برگزیده برای مطالعات جمعیتی تایید می‌نماید.

منابع

اسماعیلی م، میرکریمی ا و آزمایش‌فرد پ، ۱۳۸۱. حشره‌شناسی کشاورزی. انتشارات دانشگاه تهران.

بی‌همتا م ر، ناصریان ب و زمانی م ج، ۱۳۸۸ . نشانگرهای مولکولی در ژنتیک گیاهی و بیوتکنولوژی. انتشارات دانشگاه تهران.

صلواتیان م، ۱۳۷۰. لزوم شناسایی عوامل موثر محیط در مبارزه با آفات گیاهان زراعی. انتشارات سازمان ترویج کشاورزی.

Bethenod MT, Thomas Y, Rousset F, Frerot B, Pelozuelol L, Genestier G and Bourguet D, 2005. Genetic isolation between two sympatric host plant races of the European corn borer., *Ostrinia nubilalis*. II: Assortative mating and host-plant preference for oviposition. Heredity 94: 264–270.

Bontemps A, Bourguet D, Pelozuelo L, Bethenod MT and Ponsard S, 2004. Managing the evolution of *Bacillus thuringiensis* resistance in natural populations of the European corn borer, *Ostrina nubilalis:* host plant, host race and phenotype of adult males at aggregation sites. Proceedings of the Royal Society of London (B) 271: 2179–2185.

Bourguet D, Bethenod MT, Pasteur N, Viard F, 2000. Gene flow in European corn borer Ostrinia nubilalis: implications for the sustain ability of transgenic insecticidal maize. Proceedings of the Royal Society of London Series B 267: 117-122

Clark PL, Molina-Ochoa J, Martinelli S, Skoda SR, Isenhour DJ, Lee DJ, Krumm JT, Foster JE, 2007. Population variation of the fall armyworm, Spodoptera frugiperda, in the Western Hemisphere Journal of Insect Science 7.5: available online at http://insectscience.org/7.05.

Coates BS and Hellmich RL, 2003. Two sex-linked microsatellite loci show geographic variance among North American *Ostrinia nubilalis*. Journal of Insect Science 2: 29.

Coates BS, Sumerfored DV, Hellmich RL. 2004. Geographic and voltinism differentiation among North American Ostrinia nubilalis (European corn borer) mitochondrial cytochrome c oxidase haplo- types. Journal of Insect Science 4: 35 available online at ht- tp://insectscience.org

Excoffier L, Laval G and Schneider S, 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolution Bioinformatics 1:47-50.

Juan A, Crespo MB, Cowan RS, Lexer C, Fay MF, 2004. Patterns of variability and gene flow in Medicago citrina, and endangered en- demic of islands in the western Mediterranean, as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). Molecular Ecology13: 2679-2690.

Garcia AF, Benchimol L, Barosa AM, Geraldi IO, Souza CL and Souza AP, 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP, and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbreed lines. Genetics and Molecular Biology 27: 4.

Gol mohammad zade-Khiaban N, Hejazi MS, Haddad Irani Nejad K and Mohammadi SA, 2010. Genetic variability of geographical populations of the bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lep.: Noctuidae), in West and Northwest in Iran. Munis Entomology & Zoology 5 (2): 670–676.

Keszthelyi S, 2005. Comparison on DNA patterns of different ecotypes of European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hübner) in Hungary. Acta Biologica Hungarica 56: 75–81.

Krumm JT, Hunt TE, Skoda SR, Hein GL, Lee DJ and Clark PL, 2008. Genetic variability of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, suggests gene flow between populations in the Midwestern United States. Journal of Insect Sciences 8 (72): 1–12.

Leniaud L, Audiot P, Bourguet D, Frerot B, Genestier G, Lee SF, Malausa T, LePallec AH, Souqual MC and Ponsard S, 2006. Genetic structure of European and Mediterranean maize borer populations on several wild and cultivated host plants. Entomologia Experimentalis Applicata 120: 51–62.

Malausa T, Bethenod MT, Bontemps A, Bourguet .D, Cornuet JM and Pondard S, 2005. Assortative mating in sympatric host races of the European corn borer. Science 308: 258-260.

Mayr E and Ashlock PD, 1991. Principle Systematic Zoology, McGraw-Hill,Inc.475pp

Menken SBJ and Raijmann LEL, 1996. Biochemical Systematics: principles and perspectives for pest management, The Ecology of Agricultural Pests. PP. In: Symondson W.O. C. and Liddell J. E. (eds.), Published by Chapman & Hall, London,

Mills LS and Allendorf FW, 1996. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. Conserv. Biol., 10:1509-1518.

Nei M, 1973. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583–590.

Pelozuelo L, Malosse C, Genestier G, Gueneg H and Frerot B, 2004. Host plant specialization in pheromone strains of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* in France. Journal of Chemical Ecology 30: 335–352.

Pelozuelo L, Meusnier S, Audiot P, Bourguet D and Ponsard S, 2007. Assortative mating between European corn borer pheromone races: beyond assortative meeting. Plos One 2 (6): e555.

Ponsard S, Bethenod MT, Bontemps A, Pelozuelo L, Souqual MC and Bourguet D, 2004. Carbon stable isotopes: a tool for studying the mating, oviposition, and spatial distribution of races of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, among host plants in the field. Canadian Journal of Zoology 82: 1–9.

Roderick GK, 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeograpy, and their uses. Annual Review of Entomology 41: 325-352.

Saldanha LA, 2000. Genetic variation of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Lep.: Crambidae). University of Nebraska – Lincoln.

Schilthuizen M, 2000. Dualism and conflicts in understanding speciation. Bio Essays 22: 1134–1141.

Showers WB, 1993. Diversity and variation of European corn borer populations. In: Evolution of Insect Pests/Patterns of variation .Wiley and Sons Inc. New York, NY. 287–309.

Showers WB, Hellmich RL, Derrick-Robinson ME, Hendrix III WH. 2001. Aggregation and dispersal behavior of marked and released European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) adults. Environmental Entomology 30: 700-710.

Thomas Y, Bethenod MT, Pelozuelo L, Frerot B and Bourguet D, 2003. Genetic isolation between two sympatric host plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner. I. Sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism. Evolution 57: 261–273.

Timmermans MJTN, Ellers J, Mariën J, Verhoef SC, Ferwerda EB and Van Straalen NM, 2005. Genetic structure in Orchesella cincta Collembola): strong subdivision of European populations inferred from mtDNA and AFLP markers. Molecular Ecology 14: 2017-2024.

Via S, 2001. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling growsup. Trend In Ecology & Evolution 16: 381–390.

Vorgelegt V, 2009. The European corn borer *Ostrinia nubilalis*, its susceptibility to the Bt-toxin Cry1F, its pheromone races and its gene flow in Europe in view of an insect resistance management. PhD thesis, Universitäts professor Alan J. Slusarenko.

Wright S, 1969. Evolution and the genetics of populations. Volume 2: The theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago, IL.

Zimmermann M, Wahlberg N and Descimon H, 2000. Phylogeny of *Euphydryas checker* (Lep.: Nymphalidae) spot butterflies based on mitochondrial DNA sequence data. Annual Entomology Society of America 93: 347-55.

Genetic Variability of Geographical Populations of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lep.: Crambidae), by microsatellites in Iran

N Ehtesham Nia[1], J Razmjou[2], B Naseri[3] and N Gol Mohammad Zadeh Khiaban[4]

[1]PhD Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Mohagheghe Ardebili, Iran.
[2]Professor and Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Mohagheghe Ardebili, Iran.
3Assistant Prof., Plant Protection Research Department, Ardabil Agricultural and Natural Resources Research Center ,AREEO, Ardabil, Iran.
*Corresponding author: nehtesham@yahoo.com

Received:27 Apr 2015 Accepted: 26 Feb 2016

Abstract

The European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner, is one of the most important economic pests that could be found in all parts of Iran. In order to study the geographical diversity of this pest, larvae were collected from Ardabil, Golestan, Kordestan, East-Azarbayjan and Sistan-Baluchestan provinces during 2012-2013. Subject to polymerase chain reaction (PCR) using 10 different SSR primers that produced 10 polymorphic bands with 100 percent polymorphism were determined. Genetic diversity analysis of the European corn borer showed significant differences within and among geographical populations and their genetic diversity based on Nei's gene index accounted 19.2 and 80.8 percent, respectively. Maximum and minimum genetic diversity and number of polymorphic loci were in Gorgan population 0.277, 9 and Iranshahr 0.104, 6, respectively. Maximum and minimum heterozygosity were in Os-N3 and Os-N10 markers by 0.748 and 0.203, respectively. Genetic similarity of studied geographical populations observed from 38 to 82 percent. Maximum and minimum genetic distances were observed between Sanandaj - Gorgan and Mogan - Shabstar populations 0.917, 0.198, respectively. Based on UPGMA method Mogan and Shabstar populations settled as unique in one cluster and Gorgan, Sanandaj, Iranshahr populations in another cluster. To test the correlation genetic and geographical populations distances was used Mantel test that indicated low or negative correlation (0.243 P <and r = -0.174) between genetic and geographical distances. Thus, there were no correlation between increasing geographical distance in sampling sites, with their genetic distance based on SSR markers.

Keywords: Geographical diversity, Gen flow, *Ostrinia nubilalis*, Microsatellite.