

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های جغرافیایی کرم ساقه خوار اروپایی ذرت

Ostrinia nubilalis Hübner (Lep.: Crambidae) در ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

نیر احتشام نیا^۱، جبرائیل رزمجو^۲، بهرام ناصری^۲ و نادر گل محمدزاده خیابان^۳

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 پذیرش: ۹۴/۱۲/۹

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۷

چکیده

کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت *Ostrinia nubilalis* Hübner یکی از آفات مهم زراعی است که تقریباً در تمام مناطق ایران یافت می‌شود. به‌منظور بررسی تنوع جغرافیایی آفت، لاروهای آن از استان‌های اردبیل، گلستان، کردستان، آذربایجان شرقی 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 ۶ 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 درصد و ۱۹/۲ درصد برآورد گردید. بیشترین و کمترین میزان تنوع ژنی و تعداد جایگاه‌های چندشکل به‌ترتیب مربوط به جمعیت‌های گرگان ۰/۲۷۷، ۹ و ایرانشهر ۰/۱۰۴، ۶ بودند. بیشترین و کمترین میزان هتروزیگوسیتی به‌ترتیب مربوط به نشانگر Os-N10 و Os-N3 به میزان ۰/۷۴۸ و ۰/۲۰۳ بود. شباهت ژنتیکی جمعیت‌های جغرافیایی مورد بررسی بین ۲۸ درصد تا ۸۲ درصد مشاهده شد. بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی به ترتیب بین جمعیت‌های سنندج - گرگان و مغان - شبستر ۰/۹۱۷ و 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 مندل استفاده شد که همبستگی پایین و منفی ($r = -0.174$ و $P < 0.0243$) 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*، ریزماهوره.

مقدمه

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-

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

اختلاف بین جمعیت‌ها بیشتر از درون جمعیت‌ها می‌باشد (کلارک ۲۰۰۷ و رودریک ۱۹۹۶) هرچند در بعضی دیگر نیز اختلاف بین جمعیت‌ها کمتر از درون جمعیت‌ها است (کوتس و هلمیچ ۲۰۰۳ جان و همکاران ۲۰۰۴ تیمرمن و همکاران ۲۰۰۷).

افزایش فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌ها اغلب منجر به نوعی کاهش جریان ژنی در آنها می‌شود (مایر ۱۹۹۱). در بیشتر گونه‌ها اغلب با افزایش فاصله جغرافیایی بین و جمعیت‌ها، کاهش تبادل ژن میان آنها رخ می‌دهد (منکن و راجمان ۱۹۹۶). از طرف دیگر، در برخی آفات نیز که توانایی بیشتری در زمینه انتشار فضائی دارند تنوع بین جمعیت‌ها کاهش می‌یابد (رایت ۱۹۶۹ و میل و آلدورف ۱۹۹۶).

منابع ایجاد شباهت‌ها در بین جمعیت‌ها ممکن است شرایط آب و هوایی، 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 ۱۳۸۴).

ریزماهواره‌ها اغلب دارای چند شکلی بالا، پراکندگی وسیع در ژنوم موجودات پیشرفته، سیستم چندالللی بیشتر غیر عملکردی، تک لوکوس و دارای توارث همباز بوده و در ژنوم به صورت تصادفی و به‌وفور یافت می‌شوند. مزایائی از قبیل امکان چند ترکیبی، 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 آل‌های آن هستند. به‌همین دلیل تفکیک افراد هتروزیگوت از هموزیگوت امکان‌پذیر است (بی‌همتا و همکاران ۱۳۸۸ گارسیا و همکاران ۲۰۰۴). 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

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 بیولوژیک 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 به واسطه 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 (صلواتیان ۱۳۷۰، اسماعیلی و همکاران ۱۳۸۱، لنیاد و همکاران ۲۰۰۶). تاثیر عوامل اکولوژیکی در گونه‌زایی مورد تاکید قرار گرفته است (شیلتز ۲۰۰۰). مکانیسم‌هایی مانند ایزوله شدن آمیزش، اختلاف در فرمون‌های جنسی ماده (مارتل و همکاران ۲۰۰۳، بنتمپ و همکاران ۲۰۰۴، پلوزلور ۲۰۰۴) و عوامل ناشناخته دیگر که موجب اختلال در جفت‌گیری (پلوزلور و همکاران ۲۰۰۷)، زمان ظهور حشرات کامل (پنسارد و همکاران ۲۰۰۴، مالاسا و همکاران ۲۰۰۵، ورگلگت ۲۰۰۹) و انتخاب میزبان جهت تخم‌ریزی توسط حشرات ماده (بتنود و همکاران ۲۰۰۵) می‌شوند، 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 تنگای ژنتیکی، سطح وسیعی از قاره آمریکا را اشغال نمود و از طرفی اکوتیپ‌های سیم-پاتریک از نظر کاربرد فرمون‌های جنسی و تعداد نسل‌ها با هم اختلاف زیادی نشان دادند (شوور ۱۹۹۳، ویبا ۲۰۰۱). در مورد برخی گونه‌ها ثابت شده است که

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، به روش زایمرن 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 پلیمرز توسط دستگاه ترموسایکلر بیومترا انجام گردید. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

اندازه باندهای بدست آمده از روی نشانگر شاخص (Lader) به اندازه ۵۰ bp (ساخت Roche آلمان) تعیین و ژنوتیپ هر فرد در هر جایگاه مستقیماً از روی ژل به دست آمد. فراوانی‌های ژنوتیپی و آلی به روش شمارش مستقیم تعیین گردید. فراوانی آلی، تعداد آلل در هر جایگاه ژنی، تعداد آلل موثر، میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده^۴ (نسبت افراد هتروزیگوت در یک جایگاه ژنی به کل نمونه‌ها) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار^۵ (تعداد افرادی که باید بر اساس فراوانی آلی هتروزیگوت باشند) با استفاده از نرم افزار Popgene 3.2 محاسبه گردید. برای تعیین

(کستلی ۲۰۰۵). در ۱۵ جمعیت جمع‌آوری شده از مناطق مختلف آمریکای شمالی، بررسی بر روی ژن-های ناحیه سیتوکروم اکسیداز یک و دو^۱ DNA میتوکندریایی، انجام گرفت و ۱۵ هاپلوتیپ گزارش شد. آنها همچنین طی بررسی ۱۴۱۴ 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 اکتوتیپ‌های جمعیت‌های کرم ساقه خوار اروپایی ذرت در نبراسکا با نشانگر^۲ RAPD نشان داد که تعدد نسل-ها در یک سال باعث تنوع ژنتیکی این آفت گردیده و جمعیت‌های یک نسل در سال ۳۵٪، دو نسل ۴۵٪، 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^۳ 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 به منظور تعیین ساختار این جمعیت‌ها می‌باشد 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 ۷۰۴ سینگل گراس در سالهای ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲، از استان‌های گلستان، آذربایجان شرقی، اردبیل، کردستان و سیستان و بلوچستان جهت مطالعات مولکولی جمع‌آوری شدند. تعداد ۲۰ عدد از لاروهای سنین مختلف از هر منطقه

⁴Observed heterozygosity.

⁵Expected heterozygosity.

¹Cytochrome oxidase I,II.

²Random Amplified Polymorphism DNA.

³Amplified Fragments Length Polymorphism.

نرم افزاری Arlequin 3.0 مورد استفاده قرار گرفت (اکسوفیر و همکاران ۲۰۰۵).

میزان تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی، بر اساس مدل آلی بی‌نهایت FST و مدل جهش پله‌ای RST با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) بسته

جدول ۱- اطلاعات مربوط به مناطق نمونه برداری کرم ساقه خوار اروپایی ذرت.

منطقه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا	زمان نمونه برداری
شبستر	۴۵°۴۲'E	۳۸°۱۸'N	۱۴۰۰	۹۱/۵/۱۰
ایران شهر	۶۰°۶۹'E	۲۷°۲۰'N	۵۹۱	۹۱/۸/۲۵
مغان	۴۷°۴۸'E	۳۹°۳۹'N	۴۵	۹۱/۴/۲۰
گرگان	۵۴°۴۸'E	۳۶°۸۳'N	۱۵۵	۹۱/۴/۱۵
سنندج	۴۶°۹۹'E	۳۵°۳۱'N	۱۴۶۳	۹۲/۴/۳۰

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

اندازه	تیپ تکرار	توالی (۳' - ۵')	آغازگرها
۱۳۱-۱۵۳	AA(GA), AG	F: GGGCCCAAAGATAAGGAGA R: CGCACTTAGATTGAGCGAGA	Os-N1
۱۴۷-۲۷۳	(TC) ₂₉	F: ACTTTTGGCCAAGTGTCTCTG R: CGTAGTTGTGACGCTTGGTG	Os-N2
۱۶۱-۲۷۵	(TC) ₆	F: ATGTGCAACAGGGAGAGCTT R: GCGACTGTAGTAGGGGAGCA	Os-N3
۱۲۳-۱۳۲	[G(C/T)T] ₁₆ ACA[G(C/T)T] ₁₃	F: ACGAGCTTTATCCGACGTGT R: AGGCTGAGGAGCAGCAGT	Os-N4
۲۲۱-۲۲۴	(GCA) ₂ GCC(GCA)4GCC(GCA) ₃ GCC[(G/A)CA]10TCAGGC [A(G/A)C] ₁₀ AGAT(GCA) ₃	F: AAATGGCGTACGAGACGAAC R: ACTGTTGCATGTGAGGGTGA	Os-N5
۱۴۸-۱۶۶	(GCA) ₂₂	F: GGCAGCTATGGAGGCTAAGA R: CTGGCCCTGCATCTGTTG	Os-N6
۱۶۵-۱۸۶	(AGC) ₂ ACC(AGC) ₇	F: CTACGAGCCGCACTTGTACC R: CGTGAGAAGCGTCTACCT	Os-N7
۲۰۸-۲۲۹	[G(T/C)T] ₂₄	F: CCACAATCCTGCTCTGTAAAA R: AGGAGCAGCAGTTCCTCA	Os-N8
۱۲۸-۱۵۳	[G(C/T)T]	F: ATCTGTTGCTGCAGGTGCT R: CAGCAGATACCGCACCAG	Os-N9
۱۷۰-۲۱۵	(GA) ₃ (GCT) ₆	F: GTGCATCACCACCTGCTGT R: GCCTACATCAACCAGGCTGT	Os-N10

نرم افزار NTSYS 1.8 صورت گرفت. برای آزمون همبستگی فواصل ژنتیکی و جغرافیایی جمعیت‌های مورد بررسی، از آزمون منتل استفاده شد.

تعیین مقادیر فاصله و شباهت ژنتیکی با استفاده از شاخص تنوع ژنتیکی نی^۱ و تعیین فیلوژنوغرافی بین جمعیت‌ها با استفاده از روش UPGMA با استفاده از

نتایج و بحث

¹Nei's Genetic Diversity Index.

جمعیتی بیشتری صورت گرفته است و همین امر سبب افزایش تنوع ژنتیکی درون نسبت به بین جمعیت ها شده است.

براساس داده های جدول ۵، بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی به ترتیب مربوط به جمعیت های گرگان - سنندج (۰/۹۱۷) و شبستر - مغان (۰/۱۹۸) بود. جمعیت های مناطق شبستر و مغان تقریباً دارای اقلیم نسبتاً مشابه و فواصل کمی نسبت به هم بوده و دارای جمعیت های نزدیک به هم از نظر ژنتیکی هستند. پایین بودن فاصله ژنتیکی بین جمعیت ها نیز نتایج تجزیه واریانس مولکولی کمی تنوع بین جمعیت ها را تأیید می نماید.

گروه بندی جمعیت های مختلف جغرافیایی کرم ساقه خوار اروپایی ذرت با استفاده از داده های مولکولی حاصل از تجزیه نشانگرهای SSR در شکل ۱ نشان داده شده است. برش دندروگرام در حداکثر فاصله بین گروه ها، جمعیت های جغرافیایی را به دو گروه اصلی منتسب کرد. به طوری که جمعیت های 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 می گیرد 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.

نتایج حاصل از چرخه های واکنش زنجیره ای پلیمرز نشان داد که تمامی جایگاه ها به خوبی تکثیر یافتند. بیشترین تعداد آلل مربوط به نشانگر Os-N2 و کمترین آن مربوط به نشانگر Os-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 جایگاه های 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 جمعیت ها، از تجزیه واریانس مولکولی استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی برای جمعیت های جغرافیایی در جدول ۴ آمده است. تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت های جغرافیایی کرم ساقه خوار ذرت معنی دار بود. براساس نتایج حاصل، ۱۹/۲ درصد از کل تنوع ژنتیکی توسط تغییرات بین جمعیت ها و ۸۰/۸ درصد توسط تنوع درون جمعیت ها ایجاد شد. علت پایین بودن تنوع ژنتیکی بین و بالا بودن تنوع درون جمعیت های کرم ساقه خوار اروپایی ذرت را می توان ناشی از مهاجرت های طولانی افراد جمعیت ها دانست. احتمالاً به دلیل مهاجرت، افراد جمعیت های مختلف در یک منطقه با یکدیگر جفت گیری نموده و تبادلات ژنتیکی بین آن ها صورت گرفته است. به عبارت دیگر تلاقی های بین جمعیت ها، اغلب تصادفی بوده و تلاقی های درون

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

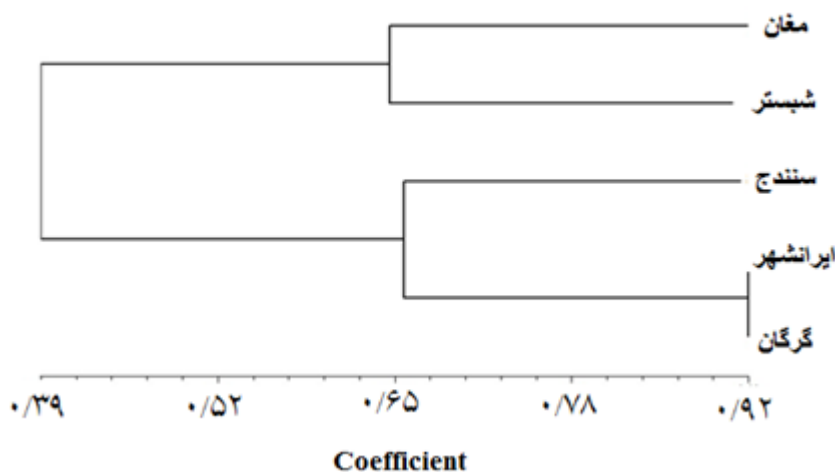
منطقه	اندازه	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	تعداد جایگاه های	تنوع ژنی
				چند شکل	
شبستر	۴۶	۰/۲۶۱	۰/۲۶۹	۸	۰/۲۶۳
ایرانشهر	۲۶	۰/۱۳۱	۰/۱۰۷	۶	۰/۱۰۴
مغان	۳۰	۰/۲۷۳	۰/۲۷۸	۸	۰/۲۶۲
گرگان	۴۲	۰/۲۷۷	۰/۲۸۹	۹	۰/۲۸۳
سنندج	۴۲	۰/۲۶۷	۰/۱۰۷	۸	۰/۲۷۳

جدول ۴- 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	۴	۱۴۵۶/۷	۲۴/۴	۱۹/۲
درون جمعیتی	۱۵۳	۴۲۵۶/۸	۲۷/۸	۸۰/۸

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

مغان	شبستر	سنندج	گرگان	ایران شهر
۰/۰۰۰				
۰/۱۹۸	۰/۰۰۰			
۰/۳۳۱	۰/۵۵۱	۰/۰۰۰		
۰/۹۰۰	۰/۷۶۷	۰/۹۱۷	۰/۰۰۰	
۰/۶۴۸	۰/۵۵۵	۰/۷۷۳	۰/۳۷۲	۰/۰۰۰



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

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 در سال ۲۰۰۸ بر روی ۱۸ جمعیت

نتایج بررسی، همبستگی پایین و منفی را بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی نشان داد (۰/۲۷۳ $P < -0/189$). 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 ۱۳۸۴ بر روی اختلاف چهار جمعیت جغرافیایی کرم گلوگاه انار از ایران، ارتباط بین فواصل مورفولوژیک و جغرافیایی را معنی-دار گزارش نمودند که منطبق با نتایج تحقیق حاضر

این نتایج با یافته‌های ما مبنی بر وجود جریان ژنی بالا مطابقت دارد.

با مقایسه بین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار در 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 ریزماهوره‌ها را به عنوان نشانگر برگزیده برای مطالعات جمعیتی تایید می‌نماید.

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 ۲۰۰۴ 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.

گل محمد زاده خیابان و همکاران در سال ۲۰۱۰ ضمن مطالعه تنوع ژنتیکی پنج جمعیت جغرافیایی کرم غوزه‌ی پنبه *H. armigera* از ایران، با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره، همبستگی معنی‌داری بین فواصل ژنتیکی و فواصل جغرافیایی مشاهده نگردند.

منابع

- اسماعیلی م، میرکریمی ا و آزمایش فرد 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, Pelozuelo 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, *Ostrinia 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, Sumerford 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 <http://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 endemic of islands in the western Mediterranean, as revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* 13: 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 inbred 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 Ponsard 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 Rajjmann 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, phylogeography, 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 grows up. *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 Nia¹, J Razmjou², B Naseri³ and N Gol Mohammad Zadeh Khiaban⁴

¹PhD Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Mohagheghe Ardebili, Iran.

²Professor 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 ($0.243 P < \text{and } r = -0.174$) 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.