فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)

جلد ۵، شماره ۱، سال ۱۳۹۲، (۱۱-۱۹)

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ۴۶۶۸-۲۰۰۸
www.entomologicalresearch.ir

بررسی تنوع ژنتیکی شته خالدار یونجه *Therioaphis trifolii* (Monell) (Hom., Aphididae) با استفاده از روش RAPD-PCR

مریم تکلوزاده[۱]، حاجی محمد تکلوزاده[۲]، اکبر حسینی پور[۲]، علیمراد سرافرازی[۳]*

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه **بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان**
۲- به‌ترتیب استادیار و دانشیار، گروه **گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان**
۳- استادیار، بخش تحقیقات رده‌بندی حشرات، **موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور**

چکیده

یونجه با نام علمی *Medicago sativa* L. یکی از محصولات اصلی و مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای کشور می‌باشد. آفات متعددی از جمله شته به این گیاه خسارت وارد می کنند. یکی از شته‌های مهم شته خالدار است. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی این شته، طی سال‌های زراعی ۸۶ تا ۸۸ نمونه‌برداری از مزارع یونجه استان‌های کرمان، فارس، کهگیلویه و بویر احمد، لرستان، همدان، کرمانشاه، کردستان، آذربایجان‌غربی، مرکزی و اصفهان صورت گرفت. سپس جهت بررسی تنوع ژنتیکی از ۷ آغازگر RAPD استفاده شد. در مجموع از ۸۸ باند دیده شده، ۶۸ باند دارای پلی‌مورفیسم بودند. بیشترین تعداد باند متعلق به آغازگرهای A11 و CO4 بود که میزان پلی‌مورفیسم محاسبه شده برای این دو آغازگر به‌ترتیب ۷۷/۷۸ و ۷۳/۶۸ درصد بود. سپس دندروگرام نمونه‌ها رسم گردید که شامل سه گروه بوده که گروه دوم خود شامل دو زیرگروه است. در این پژوهش بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف از نظر ژنتیکی تفاوت وجود داشت اما ارتباطی بین این تفاوت و اختلاف ارتفاع از سطح دریا و طول و عرض جغرافیایی و موقعیت قرار گرفتن اراضی مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، شته خالدار یونجه، RAPD

مقدمه

یکی از شته‌های مهم مزارع یونجه شته خالدار یونجه است که از گونه‌های مختلف جنس یونجه (*Medicago*)، جنس شبدر (*Trifolium*) و گونه‌هایی از خانواده Fabaceae تغذیه می‌کند. این شته بومی منطقه Palaearctic غربی است و اولین بار در جنوب‌غربی ایالات متحده آمریکا در سال ۱۹۵۴ دیده شد و سپس در سال ۱۹۷۷ از استرالیا گزارش گردید. این

*نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *takalloo_mohammad@mail.uk.ac.ir*
تاریخ دریافت مقاله (۹۰/۳/۳۱) - تاریخ پذیرش مقاله (۹۱/۲/۳۰)

Archive of SID
www.SID.ir

حشره معمولا در نواحی گرم‌تر Anholocyclic و در نواحی سردتر Holocyclic می‌باشد (Sunnucks *et al*.,1997; Trumper & Gyenge, 1998).

شته خالدار یونجه نخستین بار توسط رسولیان در سال ۱۳۶۴ گزارش گردید و تاکنون از استان‌های فارس، اصفهان، تهران، کرمانشاه، همدان، کردستان، آذربایجان‌شرقی، خراسان، سیستان و بلوچستان، کرمان و احتمالا سایر نقاط کشور گزارش شده است (Khanjani, 2005). گیاهان آلوده به جمعیت‌های انبوه این شته، ابتدا به زردی گراییده و سپس به رنگ قهوه‌ای در می‌آیند. افراد این شته توأم با تغذیه شروع به ترشح مواد سمی می‌نمایند که این مواد سبب زردی گیاه می‌شوند (Modarres awal, 1993). شته خالدار یونجه بیضی شکل و به رنگ زرد لیمویی یا سبز رنگ بوده و در سطح پشتی شکم، ۶ ردیف برآمدگی سیاه رنگ منتهی به یک مو وجود دارد. حشرات ماده به دو فرم بالدار و بی‌بال دیده می‌شوند و اندازه آنها ۳/۱-۲ میلی‌متر می‌باشد (Khanjani, 2005).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیوتیپ‌های مختلف حشرات از جمله شته‌ها، تفاوت زیادی از نظر بیولوژیکی مثل تعداد نسل، زمان ظهور، نحوه زمستان‌گذرانی و. و نیز از نظر میزان فعالیت دشمنان طبیعی روی آن‌ها داشته، و حتی از نظر مورفولوژیکی تفاوت‌هایی در آن‌ها مشاهده می‌شود. ژنوم موجودات به‌طور طبیعی دارای تفاوت‌هایی در ردیف بازهای خطی می‌باشند، این تغییرات طبیعی که سبب گوناگونی در افراد یک جمعیت می‌شود، چندشکلی ژنتیکی نام دارد (Ghasempour *et al.*, 2007).

موارد زیادی وجود دارد که شته‌های نزدیک به هم که قبلا در یک گونه طبقه‌بندی می‌شدند با بررسی‌های دقیق ژنتیکی تفاوت آن‌ها آشکار شده و امروزه به‌عنوان گونه‌های مجزا شناخته می‌شوند. دو شته بسیار نزدیک به هم *Myzus nicotianae* (Blackman) و *M. persicae* (Sulzer) که قبلا به‌عنوان یک گونه طبقه‌بندی می‌شدند، از نظر ژنی مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شد که تفاوت‌های آشکاری با هم دارند و لذا امروزه به‌عنوان دو گونه مجزا شناخته می‌شوند (Clements *et al*., 1999). بررسی روی تکامل جنس شته *Uroleucon* بر اساس توالی‌های DNA هسته‌ای و میتوکندریایی انجام و محاسبه دقیق مولکولی بر اساس درجه‌بندی تنوع میتوکندریایی از سایر حشرات نشان داده که *Uroleucon* انشعابی نسبتا جدید است و احتمالا بیش از ۵ تا ۱۰ میلیون سال قدمت ندارد و اگرچه میزبان آن یعنی گیاهان خانواده Asteraceae انتشار وسیعی یافته‌اند اما این شته به‌طور موازی با میزبان خود منتشر نشده است (Moran *et al*., 1999). شیوه‌های جاری کاربرد تکنیک‌های نشانگرهای DNA در بعضی محدوده‌های مطالعات اکولوژیکی حشرات نشان داده که mtDNA و نشانگرهای RAPD, EST, AFLP کمک در خور توجهی به پیشرفت دانش ژنتیکی براساس تنوع حشرات کرده و باعث مشخص شدن جنس‌های مهم حشرات از دیدگاه کشاورزی و پزشکی و نیز موقعیت مکان‌های ژنی در حشرات آفت گردیده است (Behura, 2006).

با استفاده از نشانگر ریزماهواره‌ها جمعیت‌های گوناگون شته روسی گندم مورد بررسی قرار گرفته است. بر این پایه نمونه‌های شته روسی گندم از ۳۸ نقطه کشور جمع‌آوری شده و در هشت جایگاه ریزماهواره‌ای از نظر تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در این مطالعه، جایگاه‌های ریزماهواره‌ای S16, S23, Sm11, Sa4 نوارهای چندشکلی نشان داد. اما، ۴ جایگاه دیگر Sm10, Sm12, S17, S49 فاقد چندشکلی بوده‌اند (Doulati, 2002).

از تکنیک RAPD-PCR برای شناسایی جنس‌ها، گونه‌ها و زیرگونه‌های پارازیتوییدهای شته‌ها استفاده شده است (Cenis *et al*., 1993). آن‌ها شش کلنی از شته سبز هلو *Myzus persicae*، شش کلنی از شته برنج *Ropalosiphum padi* (L.)، چهار کلنی از شته پنبه *Aphis gossypii* (Glover) و از گونه‌های شته سیاه باقلا *A. fabae* (Scopoli)، شته سیاه

Archive of SID

www.SID.ir

یونجه(Koch.) *A.craccivorae* و شته نخود (Harris) *Acyrthosiphon pisum* هر کدام یک کلنی را مطالعه کردند. اختلاف بین گونه‌ای، درون گونه‌ای و درون کلنی مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از سه آغازگر با شماره‌های OPA-02 ,OPA-07, OPA-09 استفاده شد. واکنش با این آغازگرها، باندهای نشان‌دهنده چندشکلی ژنتیکی را در میان گونه‌ها نمایش داده است.

بررسی‌هایی روی سه گونه شته (Borner) *Aphis schneideri*، *A. grossulariae* (Kaltenbach) و *A. triglochinis* (Theobold) انجام شد. در این مطالعه ۱۳ پرایمر برای RAPD-PCR استفاده شدند، اما فقط ۴ پرایمر جواب دادند و توسعه یافتند (Turcinaviciene *et al*., 1999). Chan و همکاران DNA چهار گونه شته *Acyrthosiphon pisum*، *Aphis frangulae* (Kaltenbach)، *Aphis fabae* و (Glover) *Aphis gossypii* را استخراج کرده و با استفاده از تکنیک RAPD-PCR توانستند اختلافات ژنتیکی این گونه‌ها را نشان دهند (Chan *et al*., 1999).

هدف از پژوهش حاضر تعیین تنوع ژنتیکی شته خالدار یونجه در مناطق مختلف جغرافیایی کشور با ارتفاع متفاوت از سطح دریا و نیز شرایط آب و هوایی متفاوت بوده است.

مواد و روش‌ها

طی سال‌های زراعی ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۸ از مناطق عمده یونجه‌کاری ایران نمونه‌برداری صورت گرفت. موقعیت جغرافیایی مناطقی که از آن‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت به وسیله GPS ثبت شد (جدول ۱). نمونه‌های جمع‌آوری شده از روی یونجه‌ها پس از رسیدن به آزمایشگاه درون فریزر ۸۰°C- قرار گرفتند. سپس از نمونه‌هایپ جمع‌آوری شده استخراج DNA صورت گرفت. برای استخراج DNA روش‌های مختلفی تست گردید که در نهایت روش Dellaporta با اندکی تغییرات توسط Komatsuda و همکاران (۱۹۹۸) به عنوان مناسب‌ترین روش تشخیص داده شد و در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. جهت محاسبه و تعیین غلظت DNAهای استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر و از اعداد مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر و از فرمول زیر استفاده گردید:

غلظت DNA (میکرولیتر/نانوگرم) = A260 × ضریب رقّت × ۵۰

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR

در این تحقیق به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی از ۷ آغازگر RAPD استفاده شد. (جدول ۲) ابتدا PCR با دماهای اتصال آغازگر متفاوت بین ۲۶°C تا ۴۰°C آزمایش شد و بهترین جواب با دمای اتصال ۴۰°C به دست آمد. لذا آزمون PCR برای تمامی آغازگرها با این دما انجام شد.

برنامه PCR برای آغازگرهای RAPD یک چرخه اولیه با شرایط دمایی ۹۴، ۴۰ و ۷۲ درجه سلسیوس به‌ترتیب با مدت زمان ۱، ۱ و ۲ دقیقه انجام شد. سپس PCR با ۳۵ چرخه انجام گردید، مدت زمان مرحله بسط نهایی با دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای تمامی آغازگرها ۷ دقیقه در نظر گرفته شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مناطق نمونه‌برداری شده

Table 1- Characteristics of sampling locations

NO.	Code	Host	Date	Locality	Position	Elevation (m)
1	001	Alfalfa	86/07/22	Bardsir-Sirjan	N29 52 14.2 E56 12 01.6	2398
2	003	Alfalfa	86/07/22	Estahban	N29 07 30.2 E54 03 22.5	1757
3	005	Alfalfa	86/07/23	Shiraz-Sepidan	N30 03 14.0 E52 07 07.0	1974
4	008	Alfalfa	86/07/23	Sepidan-Yasooj	N30 22 27.8 E51 47 22.7	2115
5	009	Alfalfa	86/07/23	Yasooj-Gachsaran	N30 28 09.7 E51 29 37.1	1717
6	012	Alfalfa	86/07/25	Khoramabad-Boroojerd	N33 30 20.4 E48 32 07.9	1536
7	013	Alfalfa	86/07/25	Malayer-Hamedan	N34 37 28.5 E48 44 29.7	2033
8	016	Alfalfa	86/07/26	Kermanshah-Sanandaj	N34 54 54.4 E46 55 52.1	1640
9	017	Alfalfa	86/07/27	Mahabad-Oroomieh	N37 23 34.2 E45 15 02.4	1292
10	021	Alfalfa	86/07/29	Delijan	N33 59 39.7 E50 40 10.9	1517
11	025	Alfalfa	86/07/30	Esfahan	N32 42 28.0 E51 51 40.9	1552
12	027	Alfalfa	86/07/31	Anar	N30 51 42.5 E55 16 24.1	1417
13	028	Alfalfa	88/01/20	Bahonar university	N30 18 43.1 E57 03 73.0	1757
14	029	Alfalfa	87/05/10	Koohbanan	N31 21 54.0 E56 16 40.0	1974
15	030	Alfalfa	87/04/15	Khabr	N28 80 49.7 E56 21 72.8	1840

تهیه ژل آگارز و الکتروفورز محصولات

ژل آگارز ۱/۵ درصد تهیه شد، نمونه‌ها پس از آماده سازی درون چاهک‌های ژل بارگذاری شدند و با اتیدیوم بروماید عمل رنگ آمیزی انجام شد و پس از آن از دستگاه Gel document برای عکس‌برداری از ژل استفاده شد. سپس با استفاده از الگوی باندی به‌دست آمده، دندروگرام مرکب از الگوهای باندی تمامی آغازگرها در برنامه NTSYSpc2.0 رسم گردید.

جدول ۲- آغازگرهای RAPD-PCR مورد استفاده

Table 2- RAPD-PCR Primers used in the study

Primer	Sequence 5' → 3'	Total bands	Percentage of polymorphism
CO4	CCG CAT CTA C	19	73.68
X19	TGG CAA GGC A	6	100
X17	GAC ACG GAC C	14	64.29
BAM	ATG GAT CCG C	8	87.5
A07	GAA ACG GGT G	14	85.71
A09	GGG TAA CGC C	9	66.67
A11	CAA TCG CCG T	18	77.78

نتایج و بحث

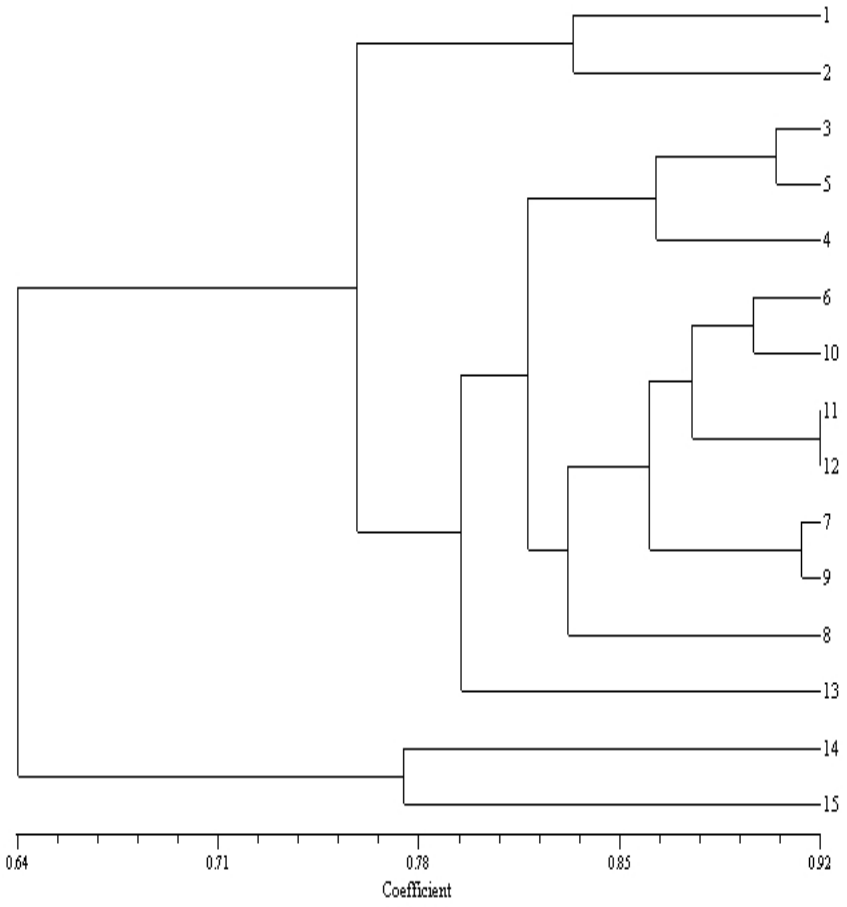
دندروگرام نمونه‌های جمع‌آوری شده از ۱۵ منطقه مختلف کشور در شکل (۱) نشان داده شده است. **این دندروگرام بر اساس الگوهای تکثیری DNAهای استخراج شده از نمونه‌ها با آغازگرهای مختلف (شکل‌های ۲-الف تا ۲-ز)ترسیم شده است.** همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، در فاصله ژنتیکی ۰/۷۶۵ نمونه‌ها در سه گروه قرار گرفته‌اند. گروه اول شامل نمونه‌های جمع‌آوری شده از جاده بردسیر- سیرجان و نمونه‌های استهبان و گروه سوم شامل نمونه‌های کوهبنان و نمونه‌های خبر بودند. گروه دوم نیز مابقی نمونه‌ها را در بر می‌گرفت.

در داخل گروه دوم، زیرگروههایی ایجاد شدند به این ترتیب که در فاصله ژنتیکی ۰/۸۶۲ نمونه‌های جمع‌آوری شده از جاده شیراز- سپیدان با نمونه‌های جمع‌آوری شده از جاده گچساران- یاسوج و نمونه‌های جاده سپیدان- یاسوج در یک گروه، نمونه‌های جاده خرم‌آباد- بروجرد و نمونه‌های دلیجان به همراه نمونه‌های اصفهان و انار که در یک ردیف قرار داشتند، در یک گروه، نمونه‌های جاده ملایر- همدان و نمونه‌های جاده مهاباد- ارومیه در یک گروه، و نمونه های جاده کرمانشاه- سنندج و مزرعه دانشگاه شهید باهنر کرمان به صورت یک فرد تنها قرار گرفتند. بر این اساس هیچ ارتباطی بین

Archive of SID

www.SID.ir

تنوع به‌دست آمده با ارتفاع از سطح دریا و پراکنش جغرافیایی نمونه‌ها و نیز طول و عرض جغرافیایی مناطق جمع‌آوری نمونه وجود نداشت. به‌عنوان مثال اگر چه نمونه‌های جاده خرم‌آباد- بروجرد با نمونه‌های دلیجان که به‌ترتیب از ارتفاع ۱۵۳۶ متری و ارتفاع ۱۵۱۷ متری جمع‌آوری شده بودند در یک گروه قرار گرفتند اما نمونه‌های جاده ملایر- همدان که از ارتفاع ۲۰۳۳ متری از سطح دریا جمع‌آوری شده بودند نیز با نمونه‌های جاده مهاباد- ارومیه که از ارتفاع ۱۲۹۲ متری جمع‌آوری شده بودند در یک گروه قرار گرفتند. در رابطه با مطالعه تنوع ژنتیکی این شته در بررسی‌ها موردی مشاهده نشد، ولی نتایج حاصل از این تحقیق با یافته‌های محققین در مورد حشرات دیگر تا حدود زیادی تطابق داشته است.



شکل ۱- دندروگرام شته‌های *Therioaphis trifolii* جمع‌آوری شده از ۱۵ منطقه ایران (ذکرشده در جدول ۱) براساس تجزیه و تحلیل نقوش حاصل از آغازگرهای RAPD در برنامه NTSYSpc2.0 با روش UPGMA

Fig. 1- Dendrogram of collected specimens of *Therioaphis trifolii* from 15 locations of Iran (mentioned in Table 1) according to analysis of designs obtained from RAPD primers in NTSYSpc 2.0 program by UPGMA method

مقایسه جمعیت‌های شته روسی گندم در کشورهای مختلف که با استفاده از نشانگرهای RAPD انجام شده، تفاوت‌های مشخصی نشان داده است. اما در داخل جمعیت‌های این کشورها به غیر از دو ژنوتیپ در آفریقای جنوبی، تنوع بسیار کم بوده است. در مطالعه واکنش گیاهان میزبان نسبت به جمعیت‌های مذکور تفاوت بیوتیپی معنی‌داری گزارش

www.SID.ir

شده است. در این مطالعه یک جمعیت از قرقیزستان بیشترین قدرت تهاجم را نشان داده است در حالی‌که از ترکیه کمترین میزان خسارت ذکر شده است (Puterka *et al.*, 1993). در بررسی تنوع ژنوتیپی جمعیت‌های شته روسی گندم در ایالات متحده آمریکا، نشانگرهای RAPD تنوعی نشان نداده‌اند. دلیل فقدان تنوع، ورود این شته در سال های اخیر به کشور مذکور اعلام شده است (Shufran *et al.*, 1997). این پژوهشگران همچنین اعلام کرده‌اند که علی‌رغم استفاده از همان آغازگرهایی که Puterka و همکاران (۱۹۹۳) در مطالعه خود استفاده کرده بودند, نوارهای گزارش شده توسط آن‌ها را مشاهده نکردند. ساختار فیلوژنتیکی دو گونه سیبلینگ از سخت پوستان *Mysis salemaai* (Auzijonyte & Vainola) و*M. segerstralei* (Auzijonyte & Vainola) در نواحی مختلفی از دنیا از جمله آلاسکا، سیبری و اسکاندیناوی مورد مطالعه قرار گرفته و مشخص شده است که از نظر ژنتیکی اختلافاتی با هم دارند (Audzijonyte & Vainola, 2006).

پوترکا و همکاران (۱۹۹۲) با استفاده از روش RAPD-PCR توانستند اختلافات ژنتیکی بین شته سبز گندم *Schizaphis graminum* و شته روسی گندم *Diuraphis noxia* (Mordvilko) و شته نخود *Uroleucon ambrosiae* (Thomas) و *Acyrthosiphon pisum* را بررسی کرده و اختلاف ژنتیکی بین این جمعیت‌ها را پیدا کنند. با استفاده از این نشانگرها، بین نمونه‌های شته روسی گندم که از سوریه و آفریقای جنوبی جمع‌آوری شده‌اند، چندشکلی DNA مشاهده شده و وجود دو ژنوتیپ مختلف در بین نمونه‌های آفریقای جنوبی مشخص گردیده است. هم‌چنین در این مطالعه بین بیوتیپ‌های مختلف شته سمی گندم تفاوت مشاهده گردیده است. افزون بر این همبستگی ژنتیکی به‌دست آمده با این روش در بین بیوتیپ‌های مذکور با روابط به‌دست آمده از روش‌های دیگر سازگاری نشان داده است (Puterka *et al.*, 1993).

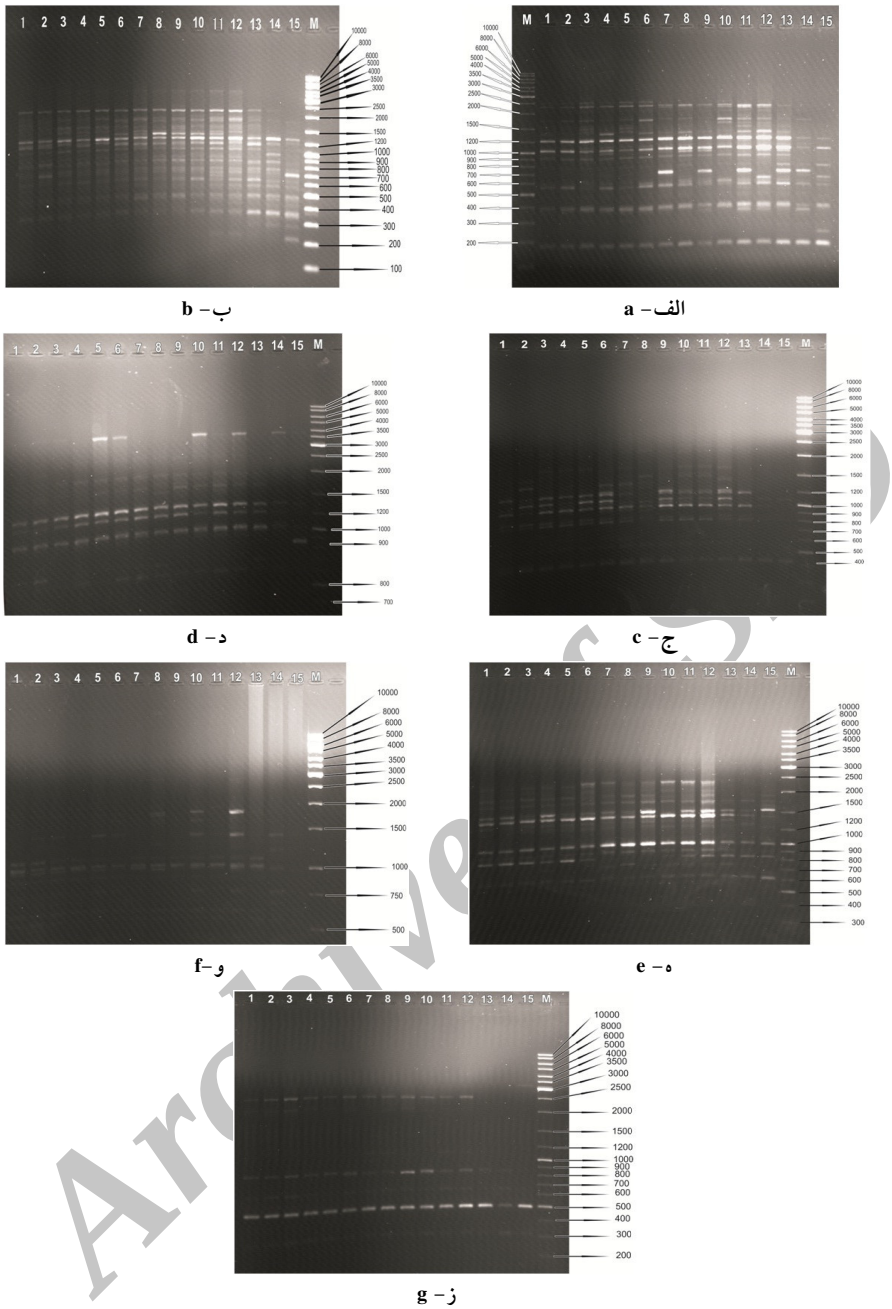
بررسی‌های Turcinaviciene و همکاران روی سه گونه شته *Aphis schneideri* (Borner)، *A. grossulariae* (Kaltenbach) و *A. triglochinis* (Theobald) نشان داد که اختلاف آشکاری بین گونه‌های شته‌های مختلف وجود دارد و نیز واکنش دو آنزیم پلیمراز نشان داد که حتی بین کلنی‌های گونه‌های یکسان اختلاف وجود دارد (Turcinaviciene *et al.*, 1999). در بررسی دیگر، تنوع ژنتیکی شته سرو *Elatobium abietinum*(Walker) با استفاده از روش RAPD در دو کشور انگلستان و زلاندنو با یکدیگر مقایسه شده‌اند. در این بررسی علی‌رغم این‌که در داخل و بین جمعیت‌های جمع‌آوری شده از انگلستان تنوع زیادی مشاهده گردیده، اما در نمونه‌های زلاندنو تنوعی ملاحظه نشده است. فقدان تنوع در این کشور به‌عوامل مختلف از جمله کم بودن تعداد افراد مؤسس و فقدان تولیدمثل جنسی نسبت داده شده است. این پژوهشگران با استفاده از روش PCR ناحیه بین ژنی DNA ریبوزومی نیز این نتیجه را ارایه کرده‌اند (Nichol *et al.*, 1998).

سپاسگزاری

نگارندگان از مسئولین محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان که امکانات لازم جهت انجام این تحقیق را فراهم نمودند، صمیمانه تشکر می‌نمایند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- ژل آگارز نشان‌دهنده الگوی تکثیری DNA استخراج شده از نمونه‌های جمع‌آوری شده، تکثیر شده با آغازگر الف) CO4 ، ب) A11 ، ج) A07 ، د) A09 ، هـ) X17 ، و) X19 ، ز) BAM در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز. M) نشانگر مولکولی bp ۱۰۰۰۰- bp ۲۵۰، ۱) ۰۰۱، ۲) ۰۰۳، ۳) ۰۰۵، ۴) ۰۰۸، ۵) ۰۰۹، ۶) ۰۱۲، ۷) ۰۱۳، ۸) ۰۱۶، ۹) ۰۱۷، ۱۰) ۰۲۱، ۱۱) ۰۲۵، ۱۲) ۰۲۷، ۱۳) ۰۲۸، ۱۴) ۰۲۹، ۱۵) ۰۳۰. (مشخصات نمونه‌ها در جدول ۱ ذکر شده است.)

Fig. 2- Agarose gel showing the replication pattern of DNA extracted from collected samples, reproduced by primers A) CO4, B) A11, C) A07, D) A09, E) X17, F) X19 G) BAM in PCR. M) Molecular marker 250-10000 bp. 1) 001, 2) 003, 3) 005, 4) 008, 5) 009, 6) 012, 7) 013, 8) 016, 9) 017, 10) 021, 11) 025, 12) 027, 13) 028, 14) 029,15) 030.
(Samples characteristics have been mentioned in Table 1)

Archive of SID

www.SID.ir

References

Audzijonyte, A. and Vainola, R. 2006. Phylogeographic analyses of a circumarctic coastal and a boreal lacustrine mysid crustacean, and evidence of fast postglacial mtDNA rates. Molecular Ecology, 15: 3287-3301.

Behura, S. K. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. Molecular Ecology, 15: 3087-3113.

Cenis, J. L., Perza, P. and Feres, A. 1993. Identification of Aphid (Homoptera: Aphididae) species and colonies by RAPD. Annals of the Entomological Society of America, 86(5): 545-550.

Chan, C. K., Petersen, D. J. and Vrain, T. C. 1999. DNA fingerprinting of single aphid embryos by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR). The Canadian Entomologist, 131: 229-230.

Clements, K., Wiegmann, B., Sorenson, C., Smith, C., Neese, P. and Roe, M. 1999. Genetic variation in the *Myzus persicae* complex (Homoptera: Aphididae) evidence for a single species. Annals of the Entomological Society of America, 93: 31-46.

Ghasempour, H. R., Kahrizi, D. and Mehdiah, N. 2007. New Discussions in Biotechnology. Razi University Publication, 273 pp.

Khanjani, M. 2005. Crop pest of Iran. Bu Alisina University Publication, 719 pp.

Komatsuda, T., Nakamura, I., Takaiwa, F. and Oka, S. 1998. Development of STS markers closely linked to the vrs1 locus in barley. Hordeum vulgare, Genome 41: 680- 685.

Modarres awal, M. 1993. Entomology (General. Applied. Faunistic) (lodos) Barsava Publication, 521 pp.

Moran, N., Kaplan, M., Gelsey, M., Murphy, T. and Scholes, E. 1999. Phylogenetics and evolution of the aphid genus *Uroleucon* based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Systematic Entomology, 24: 85-93.

Nichol, D., Armstrong,, K. F., Wratten, S. D., Walsh, P. J., Straw, N. A., Cameron, C. M., Lahman, C. and Frampton, C. M. 1998. Genetic diversity of an introduced pest, the green spruce aphid *Elatobium abietinum* (Homoptera: Aphididae) in NewZealand and United 12- Kingdom. Bulletin of Entomological Research, 88: 537-543.

Puterka, G. J., Black, I. V., Stainer, W. C. and Burton, R. L. 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collection of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia*, inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. Heredity, 70: 604-618.

Shufran, K. A., Burd, J. D. and Webster, J. A. 1997. Biotype status of Russian weat aphid (Homoptera: Aphididae) populations in the United States. Journal of Economic Entomology, 90: 1684-1689.

Sunnucks, P., Driver, F., Brown, W. V., Carver, M., Hales, D. F. and Milne, W. M. 1997. Biological and genetic characterization of morphologically similar *Therioaphis trifolii* (Hemiptera: Aphididae) with different host utilization. Bulletin of Entomological Research, 87: 425-436.

Trumper, E. V. and Gyenge, J. E. 1998. Binomial sampling plans for the spotted alfalfa aphid '*Therioaphis trifolii*' in Argentina. International Journal of Pest Management, 44: 235-238.

Turcinaviciene, J., Suziedelis, K. and Rakauskas, R. 1999. DNA study of the current inhabiting aphid species of the genus *Aphis* L. by means of the Randomly Amplified polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR). Acta Zoologica Lituanicc, 9: 1392-1637.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Entomological Research

Volume 5, Issue 1, pages: 11-19

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
www.entomologicalresearch.ir

Study on genetic variation of *Therioaphis trifolii* using RAPD-PCR method

M. Takalloozadeh[1], H. M. Takalloozadeh[2*], A. Hosseini Pour[2], A. M. Sarafrazi[3]

1- Department Of Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran
2- Respectively Assisstant professor and Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran
3- Assistant Professor, Insects Taxonomy Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

Abstract

Alfalfa (*Medicago Sativa*) is one of the most important forage plants in Iran. Several pests like aphids cause damage to these plants. One of the important aphids is the spotted alfalfa aphid (*Therioaphis trifolii*). In order to study the genetic variation of this pest, samples were taken from alfalfa fields of different provinces of Iran (Kerman, Fars, Kohkiloieyeh, Lorestan, Hamadan, Kermanshah, Kurdistan, West Azerbaijan, Markazi and Esfahan provinces) during 2007-2009. Seven RAPD primers were used in PCR test. At the range of 200-400 bp., 68 bands out of 88 had polymorphism. The primers A11 and CO4 had the highest polymorphisms that were 77.78 and 73.68 percent respectively. The related dendrogram showed 3 clusters and the second cluster had two sub clusters. In this research genetic differences were seen between collected samples from various regions, but no relationship was observed between these differences and altitudes, longitude, and position of the sampling locations.

Key words: Genetic variation, spotted alfalfa aphid, RAPD

Archive of SID

* Corresponding Author, E-mail: *takalloo_mohammad@mail.uk.ac.ir*
Received: 20 Jun. 2011- Accepted: 19 May 2012

www.SID.ir