بررسی تنوع ژنتیکی زنجرک چغندر قند (*Circulifer haematoceps*) با نشانگر ISSR

وحید طحان[۱]، محمد زکی عقل[۲]، لیدا فکرت[۲]
۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
V_tahan@yahoo.com

چکیده

به منظور ارزیابی ساختار ژنتیکی ۱۹ جمعیت *Circulifer haematoceps* جمع آوری شده از مزارع چغندر قند از نشانگر ISSR استفاده شد. از مجموع ۶۴۶ باند تکثیر شده با آغازگر pp-ISSR، ۵۵۱ باند دارای چند شکلی بودند. در دندروگرام ترسیم شده جمعیتهای مورد مطالعه به سه زیر جمعیت تقسیم شدند که دارای تنوع ژنی بین ۰/۲۴۳۴ تا ۰/۱۳۴۰ و فاصله ژنتیکی معنی دار بودند. دراین مطالعه برای اولین بار در ایران با استفاده از نشانگر ISSR، ۱۹ جمعیت *C. haematoceps* به ۱۳ ژنوتیپ تفکیک شد.

واژه های کلیدی: *Circulifer haematoceps*، *تنوع ژنتیکی*، ISSR، کرلی تاپ

مقدمه

بیماری کرلی تاپ از بیماریهای ویروسی مهم در چغندر است. این بیماری عمدتا توسط ویروسهای Beet severe curly top virus (BSCTV) و Beet curly top Iran virus (BCTIV) از خانواده Geminiviridae ایجاد میشود و هرساله موجب بروز خسارت چشمگیر در مزارع میشود (۶). هر دو گونه ویروس در مزرعه توسط زنجرکهای *Circulifer haematoceps* و *C. tenellus* بصورت پایا و گردشی منتقل میشوند (۶). دامنه میزبانی ناقلین بسیار وسیع بوده و از گیاهان متعددی تغذیه میکنند. گونه *C. tenellus* از آفات مخرب در آمریکاست و ناقل موثری برای کرلی تاپ و بسیاری از بیماریهای فیتوپلاسمایی است (۵). در ایران و ترکیه علاوه بر *C. tenellus*، گونه *C. haematoceps* نیز به عنوان ناقلی کارامد برای بیماری کرلی تاپ گزارش شده است (۶). در کشورهای مدیترانه نیز زنجرک *Circulifer opacipennis* به عنوان ناقل بیماری گزارش شده است (۱). زنجرک ها از ناقلین مؤثر ویروس های گیاهی هستند و موقعیت ویژه ای را در بین آفات کشاورزی به خود اختصاص داده اند. خانواده *Cicadellidae* نیز بیشترین زنجرک های ناقل ویروس را شامل می شود. از عوامل مؤثر در راندمان انتقال ویروس بوسیله ناقل، میتوان به ژنوتیپ ناقل، مرحله رشد و سن حشره، فیزیولوژی و گونه گیاه، جدایه ویروس و دما اشاره کرد (۴). در مطالعات متعددی نشان داده شده که اکوتیپها یا بیوتیپهای یک گونه، راندمان انتقال متفاوتی برای سویه های مشابه ویروس را دارا هستند (۴،۲). انگشت نگاری DNA یکی از روشهای مفید برای بررسی ژنتیک جمعیت است و با استفاده از نشانگرهای وابسته به SSR یا میکروساتلایتها امکانپذیر است (۳،۱).

از روشهای مختلفی همچون RAPD، ISSR، RAMP و SAMPL میتوان برای مطالعه تنوع ژنتیکی و پلی‌مورفیسم DNA در جمعیتهای زنجرک استفاده کرد که هر یک دارای مزایا و محدودیتهای خاص خود هستند(۳،۲،۱). با توجه به وقوع بیماری کرلی‌تاپ با شدت‌های متفاوت در نقاط مختلف استان خراسان رضوی و تشابه سویه‌های ویروس، تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های زنجرک *C. haematoceps* از نقاط مختلف استان خراسان رضوی بررسی شده است. بررسی نواحی بین توالی‌های ساده تکراری (ISSR) روشی است که به خوبی تنوع

ژنتیکی میان جدایه های یک گونه را نشان میدهد (۲،۱). لذا بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیتهای زنجرک *C. haematoceps* با استفاده از نشانگر ISSR انجام شده است.

مواد و روش ها:

جمع آوری زنجرک از مزارع چغندرقند خراسان رضوی در بهار ۱۳۹۲ انجام و شناسائی انجام شد. شناسائی مرفولوژیک با تعیین ترادف ژن CoI تایید گردید. از ۲۶ جمعیت مختلف زنجرک استخراج DNA با استفاده از CTAB انجام شد (۶). آزمون ISSR به روش De Leo و همکاران انجام شد (۱). هر واکنش ۲۰ میکرولیتری شامل ۵۰ میلی مولار کلرید پتاسیم،۲۰میلی مولار تریس-اسیدکلریدریک pH=۸/۴ ، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیوم، ۰/۲۵ میکرومولار از هر نوکلئوتید، ۰/۲۵ میکرومولارآغازگر ppISSR (CCAG(GT)7) و ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase بود. محصول PCR در ژل آگارز دو درصد حاوی Green viewer الکتروفورز شده و بوسیله دستگاه Gel document عکسبرداری انجام شد. باندهای که بخوبی قابل مشاهده بودند با استفاده از نرم افزار Gel quant براساس حضور (1) یا عدم حضور باند (0) امتیازدهی شده و ماتریس داده ها تشکیل شد. اندازه هر باند نیز بر اساس اندازه باندهای نشانگر مولکولی یک کیلو بازی برای تمام جدایه ها مشخص شد. تنوع ژنتیکی جمعیت بوسیله نرم افزار POPGENE 3.2 آنالیز و پارامترهای مربوطه محاسبه شد. از نرم افزار Phoretix نیز برای رسم دندروگرام براساس تصویر ژل ISSR استفاده شد.

نتایج و بحث:

از مقایسه نتایج ISSR در بین جمعیتهای *C. haematoceps* در مجموع ۳۴ نشانگر پلی مورفیک بدست آمد. آغازگر pp-ISSR مورد استفاده ۶۴۶ باند را تکثیر کرد که بین۳۵۰ تا۱۵۰۰جفت باز طول داشتند. قطعات تکثیرشده توسط آغازگراستفاده شده تکرار پذیر و پلی مورف بودند. این آغازگر در مجموع ۶۴۶ باند راشناسایی کرد که ۵۵۱ باند دارای چند شکلی بودند.

نتایج حاصل از تجزیه وتحلیل الگوهای باندی حاصل از آغازگر pp-ISSR درسطح تشابه ۵۰ درصد جمعیتها را به سه گروه تقسیم کرد (شکل۱). گروه اول ۱۶ درصد جدایه ها را شامل شد و در سایر گروهها بترتیب ۵۸ و ۲۶ درصد نمونه ها قرار گرفتند.

تنوع ژنتیکی براساس درصد جایگاه‌های ژنی پلی مورف از ۳۲/۳۵ تا ۹۴/۱۲ بین سه زیر جمعیت *C. haematoceps* متغیر بود که نشان دهنده تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت است. در جمعیت‌های *C. haematoceps* بررسی شده تنوع ژنی بین ۰/۲۴۳۴ تا ۰/۱۳۴۰ بود (جدول ۱). میزان تنوع ژنتیکی کل (Ht) ۰,۲۴۱ ± ۰,۲۴۲۹ و میانگین تنوع ژنتیکی جمعیت (Hs) ۰,۰۱۳۸ ± ۰,۱۹۴۲ بود. تنوع ژنتیکی برای سه زیر جمعیت *C. haematoceps* با استفاده ازتنوع ژنی Nei و شاخص تنوع شانون نیز محاسبه شد. درصدجایگاههای ژنی پلیمورف (*PPL*)، تعداد آللها (*Na*) و تعداد آلل‌های موثر (*Ne*) در سه زیر جمعیت ذکر شده متفاوت بود (جدول۱). زیر جمعیت دوم *C. haematoceps* بیشترین تنوع ژنتیکی را داشت (*PPL*= ۹۴/۱۲، *H*= ۰/۲۳۴۷، *I*= ۰/۳۸۰۵). فاصله ژنتیکی بین زیر جمعیتها کم و از۰/۱۴۰۳ تا ۰/۰۱۹۴ بود و به عبارت دیگر شباهت ژنتیکی بین آنها بسیار زیاد (از ۰/۸۶۹۱ تا ۰/۹۸۰۸) است. فاصله ژنتیکی زیر جمعیت اول نسبت به دو گروه دیگر به ترتیب ۰/۱۲۲۵ و ۰/۱۴۰۳ بود. این در حالی است که فاصله ژنتیکی زیرگروه دو و سه (۰/۰۱۹۴) کم بود. در زیرجمعیت های زیرگروه دوم نیز فاصله ژنتیکی بین ۰/۰۶۶۳ تا ۰/۰۰۰۹ بود.

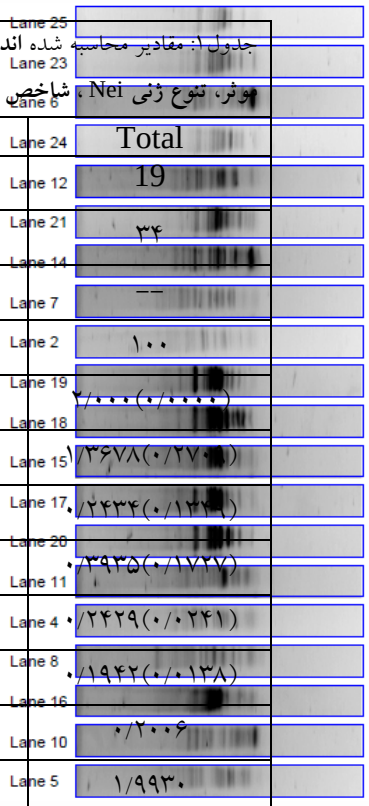
دراین مطالعه برای اولین بار در ایران تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *C. haematoceps* توسط نشانگر ISSR بررسی شد. نشانگر ISSR، ۱۹ جمعیت *C. haematoceps* را به ۱۳ ژنوتیپ تفکیک کرد. با استفاده از نشانگر ISSR نشان داده شد که توالی‌های مشابه توالی‌های تکراری (GT)7 در ژنوم *C. haematoceps* وجود دارد.

همچنین شباهت ژنتیکی بالا بین زیرجمعیت‌های مورد بررسی نشان دهنده وجود جریان ژنی (Nm=۱/۹۹۳۰ و GST= ۰/۲۰۰۶) در بین جمعیت‌های مختلف *C. haematoceps* می‌باشد. تنوع ژنی Nei و شاخص تنوع شانون در زیرجمعیت‌های گروه دو در مقایسه با سایر زیرجمعیت‌ها بیشتر بود. زیرجمعیت‌های گروه دوم چند شکلی بیشتری نسبت به سایر زیرجمعیت‌ها نشان می‌دهند. بنابراین احتمال ظهور زیرجمعیت‌های جدید در این زیر گروه بیشتر است. در دندروگرام ترسیم شده زیرجمعیت‌های این گروه تشکیل سه زیر شاخه را میدهند که نشان‌دهنده تکامل ژنوتیپ‌های جدید در منطقه است. همچنین با توجه به فاصله ژنتیکی زیرجمعیت‌های گروه یک با سایر زیرجمعیت‌های مورد بررسی احتمال دارد که این جمعیت تشکیل بیوتیپی مجزا در جمعیت *C. haematoceps* بدهند لیکن نیازمند تعیین فاکتورهای بیولوژیکی زیرجمعیت‌های این گروه است.

جدول ۱: مقادیر محاسبه شده **اندازه جمعیت، جایگاه های ژنی پلی مورف، درصد جایگاه های ژنی پلی مورف، تعداد آلل ها، تعداد آلل های موثر، تنوع ژنی Nei ، شاخص تنوع شانون**، تنوع ژنتیکی کل و میانگین تنوع ژنتیکی جمعیت در سه زیر **جمعیت** *C. haematoceps*

Parameter	Group1	Group2	Group3	Total
No insect	۳	۱۱	۵	19
No. polym.	۱۱	۳۲	۲۴	۳۴
Polym. ratio	۰/۷۰	۰/۸۴	۰/۸۵	--
PPL	۳۲/۳۵	۹۴/۱۲	۷۰/۵۹	۱۰۰
Na(SD)	۱/۳۲۳۵(۰/۴۷۴۹)	۱/۹۴۱۲(۰/۲۳۸۸)	۱/۷۰۵۹(۰/۴۶۲۵)	۲/۰۰۰۰(۰/۰۰۰۰)
Ne(SD)	۱/۲۲۸۸(۰/۳۳۵۸)	۱/۳۴۹۷(۰/۲۵۷۷)	۱/۳۳۱۷(۰/۲۹۶۵)	۱/۳۶۷۸(۰/۲۷[illegible])
h(SD)	۰/۱۳۴۰(۰/۱۹۶۷)	۰/۲۳۴۷(۰/۱۳۳۸)	۰/۲۱۳۸(۰/۱۶۶۵)	۰/۲۴۳۴(۰/۱۳[illegible])
I(SD)	۰/۱۹۵۶(۰/۲۸۷۲)	۰/۳۸۰۵(۰/۱۷۸۴)	۰/۳۳۴۴(۰/۲۴۳۳)	۰/۳۹۳۵(۰/۱۷۲۷)
Ht(SD)	۰/۱۳۴۰(۰/۰۳۸۷)	۰/۲۳۴۷(۰/۰۱۷۹)	۰/۲۱۳۸(۰/۰۲۷۷)	۰/۲۴۲۹(۰/۰۲۴۱)
Hs(SD)	۰/۱۳۴۰(۰/۰۳۸۷)	۰/۲۳۴۷(۰/۰۱۷۹)	۰/۲۱۳۸(۰/۰۲۷۷)	۰/۱۹۴۲(۰/۰۱۳۸)
Gst	--	--	--	۰/۲۰۰۶
Nm	--	--	--	۱/۹۹۳۰

PPL : درصدجایگاه‌های ژنی پلی‌مورف، *Na*: تعدادآلل‌ها، *Ne*: تعدادآلل‌های موثر، *H*: تنوع ژنی Nei، *I*: شاخص تنوع شانون، Ht: تنوع ژنتیکی کل ، Hs: میانگین تنوع ژنتیکی جمعیت ، *SD*: انحراف معیار.



شکل ۱: دندروگرام ترسیم شده بر اساس تلفیق داده های الگوی باندهای ISSR در در سه زیر **جمعیت** *C. haematoceps*

منابع:

1. De Leon, J.H. , Jones, W.A. (2004). "Detection of DNA Polymorphisms in *Homalodisca coagulate* (Homoptera: Cicadellidae) by Polymerase Chain Reaction-Based DNA Fingerprinting Methods". Ann. Entomol. Soc. Am. 97(3): 574-585

2. De Leon, J.H. , Jones, W.A. , Morgan, D.J.W. (2004). "Population Genetic Structure of *Homalodisca coagulate* (Homoptera: Cicadellidae), the Vector of the Bacterium *Xylella fastidiosa*Causing Pierce's Disease in Grapevines": Ann. Entomol. Soc. Am. 97(4): 809-818

3. Jain S. K., Neekhra B., Pandey D. and Jain K. (2010). "RAPD marker system in insect study: A review" Indian Journal of Biotechnology Vol. 9 , January, pp 7-12
4. Jiu M, Zhou X-P, Tong L, Xu J, Yang X, et al. (2007). "Vector-Virus Mutualism Accelerates Population Increase of an Invasive Whitefly". PLoSONE 2(1): e182.

5. Munyaneza, JE, Crosslin, JM, Upton, JE, Buchman JL. 2010. Incidence of the beet leafhopper-transmitted virescence agent phytoplasma in local populations of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus*, in Washington State. *Journal of Insect Science* 10:18

6. Soleimani, R., Matic, S., Taheri, H., Behjatnia, S. A. A., Vecchiati, M., Izadpanah, K., & Accotto, G. P. (2013) The unconventional geminivirus *Beet curly top Iran virus*: satisfying Koch's postulates and determining vector and host range. Annals of Applied Biology. 162: 174-181

Determination of genetic diversity in *Circulifer haematoceps* populations using ISSR marker

Vahid Tahan[1], Mohammad Zakiaghl[2], Lida Fekrat[2]
1- Ph. D student of Plant Pathology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2- Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
V_tahan@yahoo.com

Abstract
To assess the genetic structure of 19 populations of *Circulifer haematoceps* collected from sugar beet fields, ISSR marker were used. Out of 646 amplified fragments using ppISSR primers 551 bands were polymorphic. *Circulifer haematoceps* individuals were formed three subpopulations with 0.1340 to 0.2434 genetic diversity and significant genetic distance. For the first time in Iran, 19 ecotypes of *Circulifer haematoceps* divided into 13 genotype using ISSR markers.

Key words: *Circulifer haematoceps*, genetic diversity, ISSR, Beet curly top virus.