بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

دانشکده‌ی علوم زراعی

گروه گیاه‌پزشکی

پایان‌نامه:

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته حشره‌شناسی کشاورزی

عنوان:

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های مختلف پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* (Hom: Psyllidae) در ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی

اساتید راهنما:

دکتر محمود محمدی‌شریف

دکتر علیرضا هادیزاده

استاد مشاور:

دکتر معصومه شایان‌مهر

پژوهشگر:

حمیده نادی

اسفند ۹۲

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات

و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه

متعلق به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری است.

چکیده

پسیل پسته (Homoptera: Psylidae) *Agonoscena pistaciae* از دیر زمان در مناطق پسته‌کاری کشور شیوع داشته و در حال حاضر بیش از سایر آفات پسته خسارت زده و از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف پسیل پسته با استفاده نشانگر RAPD بود. همچنین امکان توالی‌یابی ژن سیتوکروم اکسیداز I نیز از طریق تکثیر این ژن مورد آزمایش قرار گرفت. در آزمون نشانگرRAPD ابتدا از ۲۰ آغازگر ده نوکلئوتیدی (OPB1-10, OPA1-10) با استفاده از DNA یک حشره استفاده شد و در ادامه ۱۰ آغازگری که در مرحله اول تکثیر بهتری داشتند، انتخاب شده و با DNAی استخراج شده از ده حشره مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از DNA یک حشره ۹۸/۹۹٪ از نوارهای تشکیل شده، چند شکل و با استفاده از DNA ده حشره در تکرار اول ۸۸/۷۰٪ و در تکرار دوم ۹۱/۳۸٪ نوارهای تشکیل شده چند شکل بودند. میزان تشابه ژنتیکی میان جمعیت‌ها با استفاده از DNA یک حشره بین ۰/۱۱ تا ۰/۲۹ و با استفاده از DNA ده حشره در هر دو تکرار بین ۰/۲۷ تا ۰/۵۲ متغیر بود. گروه‌بندی جمعیت‌ها به روش UPGMA با استفاده از نرم افزار NTSYS-PC انجام شد. در کاربرد DNA یک حشره دو شاخه اصلی مشاهده شد که جمعیت خراسان‌جنوبی در یک شاخه و بقیه جمعیت‌ها در شاخه‌ای دیگر قرار گرفتند. در استفاده از DNA ده حشره در تکرار اول در سطح تشابه بیشتر از ۵۳٪ همه جمعیت‌ها بجز فارس و کرمان از هم تفکیک شدند و در تکرار دوم در سطح تشابه بیشتر از ۵۲٪ همه جمعیت‌ها از هم تفکیک شدند بجز دو جمعیت استان‌های فارس و اصفهان که بر اساس داده‌های تشابه ژنتیکی بیشترین مشابهت را داشتند. تنوع ژنتیکی مشاهده شده در شیوه RAPD را نمی توان با قطعیت به توزیع جغرافیایی مربوط دانست. در این بررسی ژن COI این گونه فقط در جمعیت استان خراسان‌جنوبی تکثیر شد و طول قطعه‌ی بدست آمده حدود bp ۷۱۰ بود. با توجه به تبارنمای بدست آمده با استفاده از روش Neighbour joining گونه *A. pistaciae* در یک شاخه فیلوژنتیکی جدا از سه گونه دیگر متعلق به همین خانواده (*Euphyllura olivina*، *Cacopsylla pyricola* و *Diaphorin citri*) قرار گرفت.

واژگان کلیدی: پسیل پسته، تنوع ژنتیکی، RAPD و ژن سیتوکروم اکسیداز I

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
مقدمه	۵
فصل اول: بررسی منابع	
۱-۱- ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت	۱۲
۱-۲- ژنتیک جمعیت	۱۳
۱-۳- بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی	۱۵
۱-۴- نشانگرهای مولکولی و انواع آن	۱۵
۱-۴-۱- انواع نشانگرها	۱۶
۱-۴-۱-۱- نشانگرهای مورفولوژیک	۱۶
۱-۴-۱-۲- نشانگرهای پروتئینی	۱۶
۱-۴-۱-۳- نشانگرهای مولکولی	۱۷
۱-۴-۱-۴- نشانگرهای مولکولی غیر مبتنی بر PCR	۱۸
۱-۴-۱-۵- نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR	۱۸
۱-۵- کاربرد نشانگرهای مولکولی در حشره‌شناسی	۱۹
۱-۶- نشانگر مولکولی RAPD	۲۳
۱-۶-۱- معایب شیوه RAPD	۲۵
۱-۶- ۲- کاربرد نشانگر RAPD در مطالعات ژنتیکی حشرات	۲۵
۱- ۶-۳- مروری بر تحقیقات انجام شده در ایران	۲۹
۱-۷- ژنوم میتوکندری	۳۱
۱-۸- ژن سیتوکروم اکسیداز I	۳۲
۱-۸-۱- کاربرد ژن COI در مطالعات ژنتیکی	۳۲
۱-۸-۲- مروری بر تحقیقات انجام شده در ایران	۳۶
۱-۹- تاریخچه پسته	۳۷
۱-۱۰- سابقه کشت در ایران و جهان	۳۹
۱-۱۱- آفات پسته در ایران	۳۹
۱-۱۱-۱- پسیل معمولی پسته	۴۰
۱-۱۱-۲- شکل شناسی	۴۲
۱-۱۱-۳- زیست شناسی	۴۳
۱-۱۲- مشخصات مناطق نمونه‌برداری آفت	۴۴
فصل دوم: مواد و روش ها	
۲-۱- نمونه‌برداری	۴۸
۲-۲- استخراج DNA	۵۰
۲- ۲-۱- استخراج DNA با استفاده از بافر SDS	۵۰
۲- ۲-۲- استخراج با استفاده از بافر CTAB	۵۱

۲-۳- بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۵۲
۲-۴- بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر RAPD ۵۳
۲-۴-۱- واکنش PCR نشانگر RAPD ۵٤
۲-۴-۲- الکتروفورز محصول PCR نشانگر RAPD ۵۵
۲-۴-۳- آنالیز داده‌های RAPD ۵۵
۲-۵- تکثیر ژن COI ۵٦
۲-۵-۱- توالی یابی و آنالیز ژن COI ۵۷

فصل سوم: بحث و نتیجه گیری

۳-۱- نشانگر RAPD ۵۹
۳-۱-۱- نتایج واکنش با استفاده از DNAی یک حشره ۵۹
۳-۱-۲- نتایج واکنش با استفاده از DNAی ده حشره ٦۲
۳-۲- فاصله ژنتیکی میان جمعیت‌ها ٦٦
۳-۲-۱- با استفاده از DNA استخراج شده از یک حشره ٦٦
۳-۲-۲- با استفاده از DNA استخراج شده از ده حشره ٦۷
۳-۳- تجزیه خوشه ای داده‌های RAPD ٦۹
۳-۳-۱- با استفاده از DNAی حاصل از یک فرد ٦۹
۳-۳-۲- با استفاده از DNAی حاصل از ده فرد ۷۰
۳-۴- توالی یابی ژن سیتوکروم اکسیداز ۸۱
۳-۴-۱- ارزیابی توالی ژن COI ۸۱
۳-۴-۲- آنالیز تبارشناسی ناحیه COI ۸۲
پیشنهادات ۸٤

فهرست تصاویر

شکل ۱-۱- حشره کامل پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* ٤۲
شکل ۱-۲- سنین مختلف پورگی پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* ٤۳
شکل ۲-۱ - محل‌های مورد نمونه برداری جمعیت های پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* در ایران ٤۸
شکل ۳-۱- پروفایل الکتروفورز RAPD پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* با استفاده از DNAی نمونه های منفرد و آغازگر OPA05 ٦۰
شکل ۳-۲- پروفایل الکتروفورز RAPD پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* با استفاده از DNAی نمونه های منفرد و آغازگر OPA02 ٦۰
شکل ۳-۳- پروفایل الکتروفورز RAPD پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* با استفاده از DNAی نمونه های منفرد و آغازگر OPA03 ٦۱
شکل ۳-۴- پروفایل الکتروفورز RAPD پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* با استفاده از DNAی نمونه های منفرد و آغازگر OPB010 ٦۱
شکل ۳-۵- تعداد کل نوارهای تکثیر شده و چندشکل توسط هر یک از آغازگرها با استفاده از DNAی تک نمونه ها ٦۲
شکل ۳-۶ - پروفایل الکتروفورز RAPD پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* با استفاده از DNAی ده حشره و آغازگر OPA02 ٦۳
شکل ۳-۷- پروفایل الکتروفورز RAPD پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* با استفاده از DNAی ده حشره و آغازگر OPA01 ٦۳
شکل ۳-۸- پروفایل الکتروفورز RAPD پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* با استفاده از DNAی ده حشره و آغازگر OPB01 ٦٤
شکل ۳-۹- پروفایل الکتروفورز RAPD پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* با استفاده از DNAی ده حشره و آغازگر OPB07 ٦٤
شکل ۳-۱۰- تعداد کل باندهای تکثیر شده و چندشکل توسط هر یک از آغازگرها با استفاده از DNAی ده حشره در تکراراول ٦۵
شکل ۳-۱۱- تعداد کل باندهای تکثیر شده و چندشکل توسط هر یک از آغازگرها با استفاده از DNAی ده حشره در تکرار دوم ٦۵
شکل ۳-۱۲- دندوگرام نه جمعیت *پسیل پسته Agonoscena pistaciae* با استفاده از آغازگر RAPD ٦۹
شکل ۳-۱۳- دندوگرام نه جمعیت *پسیل پسته Agonoscena pistaciae* با استفاده از آغازگر RAPD در تکرار اول ۷۰

شکل ۳-۱۴- دندوگرام نه جمعیت پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* با استفاده از آغازگر RAPD در تکرار دوم ۷۱
شکل ۳- ۱۵- الگوی دو بعدی پراکنش جمعیت‌های مختلف پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* ۷٤
شکل ۳ –۱۶- الگوی سه بعدی پراکنش جمعیت‌های مختلف پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* ۷٤
شکل ۳-۱۷- توالی DNA تکثیر شده با استفاده از نشانگر COI از نمونه‌های پسیل پسته ۸۲
شکل ۳-۱۸- تبارنمای گونه *Agonoscena pistacie* به همراه سه گونه خارجی براساس روش Neighbour joining ۸۳

فهرست جداول

جدول ۲-۱- مختصات مکان‌های نمونه‌برداری ٤۹
جدول ۲-۲- اجزای بافرهای مورد استفاده ٥۳
جدول ۲-۳- آغازگر های RAPD استفاده شده و توالی آنها ٥٤
جدول ۳-۱- درصد تشابه ژنتیکی میان ۹ جمعیت پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* ٦٦
جدول ۳-۲- درصد تشابه ژنتیکی حاصل از ده حشره پسیل پسته در تکرار اول ٦۸
جدول ۳-۳- درصد تشابه ژنتیکی حاصل از ده حشره پسیل پسته در تکرار دوم ٦۸
جدول ۳-۴- تعداد نوارهای چند شکل و درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چند شکل(PIC) نه جمعیت پسیل پسته *Agonoscena Pistaciae* با استفاده از DNAی یک حشره ۷۷
جدول ۳-۵- تعداد نوارهای چند شکل و درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چند شکل(PIC) نه جمعیت پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* با استفاده از DNAی ده حشره (تکرار اول) ۷۸
جدول ۳-۶- تعداد نوارهای چند شکل و درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چند شکل(PIC) نه جمعیت پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* با استفاده از DNAی ده حشره (تکراردوم) ۷۸

مقدمه

حشرات بندپایانی هستند که از نظر تعداد گونه در سلسله جانوری بزرگترین رده را شامل می‌شوند. آنها حدود دو سوم کل گونه‌های جانوری شناخته شده جهان را به خود اختصاص می‌دهند. اندازه کوچک، قدرت تکثیر زیاد و تنوع گونه‌ای بالا، حشرات را در زمره موفق‌ترین موجودات جانوری در اکوسیستم‌های مختلف قرار داده است (میرمویدی، ۱۳۸۵). شناسایی دقیق زیست‌شناسی، اکولوژی، ساختار جمعیتی و ژنتیکی جمعیت‌های مختلف آفات اولین گام برای اتخاذ تصمیمات اساسی برای مبارزه با آفات است. بررسی توزیع جمعیت در نواحی مختلف به کنترل بهتر آفت کمک نموده و خود نیازمند دانش دقیق جمعیت‌شناسی و ترکیب ژنتیکی جمعیت و گونه است. در سالهای اخیر استفاده از نشانگرهای مولکولی توانسته برای بسیاری از شاخص‌های زیستی چون ساختار و پویایی جمعیت، نحوه زمستانگذرانی، تولیدمثل، نسبت‌جنسی و غیره توصیف مناسبی ارائه دهد. همچنین این نشانگرها در رده‌بندی حشرات، شناسایی بیوتیپ‌ها، نژادها، زیرگونه‌ها و غیره نقش موثری ایفا می‌کنند. شناسایی درست، آگاهی از وضعیت سیستماتیکی و همچنین بررسی تکاملی و ژنتیکی آفات بخصوص در سطح جمعیت‌های یک گونه در بکارگیری تاکتیک‌ها و حشره کش‌های مناسب برای کنترل آنها اهمیت دارد. حشرات تاریخچه تکاملی طولانی داشته و زیستگاه‌های متنوع، عادات تغذیه‌ای مختلف و شیوه‌های زندگی گوناگونی دارند. تنوع ژنتیکی ژنوم میتوکندریایی و هسته‌ای به عنوان شاخص‌های ژنتیکی ارزشمند در ارزیابی ژنوم و ساختار جمعیتی و محافظت از ذخایر ژنی گونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. این مطالعات تفاوتهای ژنتیکی احتمالی میان جمعیت‌های درون یک گونه را آشکار می‌کند.

تجزیه و تحلیل ژنتیک جمعیت به آگاهی از پراکندگی آنها، جلوگیری از گسترش مقاومت به حشره‌کش‌ها و همچنین اجرای برنامه‌های کنترل در سطح وسیع، کمک می‌کند. برای رسیدن به این اهداف، وظیفه ژنتیک جمعیت مطالعه و تعیین فراوانی‌های ژنی (آللی) و ژنوتیپی برای تعیین ساختار ژنتیکی یک

جمعیت می‌باشد. ساختار ژنتیکی جمعیت می‌تواند به عنوان تفاوت ژنتیکی کلی در جمعیت‌های نمونه-برداری شده و توزیع آن تفاوت‌ها در داخل و بین جمعیت‌ها، توصیف شود (بلوبین، ۲۰۰۸). ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها ممکن است تحت تاثیر عوامل جغرافیایی جدا کننده (بعد مسافت یا موانع جداکننده) و اکولوژی باشد (عسکری و همکاران، ۱۳۸۹) این عوامل باعث بر هم خوردن تعادل جمعیت و در نتیجه تنوع ژنتیکی می‌شوند. از راهکارهای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در جمعیت استفاده از تکنیک‌های مولکولی است که بیشتر در قالب شیوه‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] انجام می‌شوند. این روش عامل پیشرفت‌های مهم در فهم ما از ژنتیک جمعیت بوده است، موضوعی که شامل شرح روابط ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های یک گونه و سازوکارهای شکل‌دهنده این الگوها می‌شود (بارکر، ۲۰۰۲). تمایلات رایج در کاربرد تکنیک‌های نشانگر DNA در دامنه مطالعه اکولوژی حشرات نشان می‌دهد که DNA میتوکندریایی (mtDNA)، ریزماهوارک‌ها، شیوه‌های RAPD و AFLP به طور موثری به دانسته‌های ما در مورد پایه و اساس ژنتیکی تنوع حشرات کمک می‌کنند (زاییتون و همکاران، ۲۰۰۸). در مورد اغلب گیاهان و جانورانی که در کشاورزی مدرن برای گزینش ویژگی‌های دلخواه به کار می‌روند، در اختیار داشتن سطوح کافی از تنوع ژنتیکی در آن‌ها مهم است.

نشانگرهای مولکولی از رایج‌ترین ابزار مطالعات ژنتیکی محسوب می‌شوند. نشانگرهای مولکولی در زمینه تشخیص گونه‌ها، تبارشناسی، ژنتیک جمعیت، رفتارهای جستجوگری و مقاومت به حشره‌کش‌ها کاربرد دارند (مک‌دونالد و لوکسدال، ۲۰۰۴). نشانگر صفتی است که باعث تمایز یک فرد از فرد دیگر در یک جمعیت می‌شود. شیوه DNA چندشکل تکثیر شده تصادفی[2] روشی است که از مزایای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بهره می‌جوید در عین حال نیازمند اطلاعات اولیه در مورد ردیف بازی DNA مورد نظر نمی‌باشد.

[1] Polymerase Chain Reaction (PCR)
[2] Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

در این روش فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگاروز از هم تفکیک شده و تولید هر باند بیانگر وجود شباهت زیاد بین ردیف بازی آغازگرها و ردیف بازی محل اتصال در ژنوم است. از آنجایی که این نشانگر بسیار چند شکل است می‌تواند برای توضیح دادن روابط گوناگون در سطح درون گونه‌ای استفاده شود. از نشانگر RAPD بیشتر برای بررسی چندشکلی، تهیه نقشه‌های پیوستگی، شناسایی گونه-ها، نژادها، بیوتیپ‌ها و گوناگونی جغرافیایی بعضی از حشرات استفاده می‌شود. یکی از این نشانگرها که امروزه کاربرد فراوانی در مطالعات ژنتیکی یافته است DNA موجود در میتوکندری[1] سلول می‌باشد. فراوانی هاپلوتایپی DNA میتوکندریایی درون گونه‌ای متاثر از رویدادهای مربوط به استقرار و همچنین اندازه جمعیت می‌باشد. فراوانی هاپلوتایپی یکی از پیش نیازهای آگاهی از ساختار ژنتیکی جغرافیایی است. این ساختار ژنتیکی در سازگاری گونه با محیط زیست و میزبان، چگونگی مهاجرت و پدیده تنگنای ژنتیکی[2] موثر است. منظور از تنگنای ژنتیکی، کاهش تنوع ژنتیکی یک گونه در نتیجه کاهش اندازه جمعیت ناشی از حوادث اکولوژیکی است. در مطالعه آفات، این داده‌ها از این نظر اهمیت دارد که می‌توان جمعیت مرجع مربوط به گروهی را که به آفت تبدیل شده‌اند، تشخیص داد. آگاهی از این موضوع در ردیابی و جمع‌آوری دشمن طبیعی سازگار با این جمعیت تبدیل شده به آفت اقتصادی، کمک شایانی می-کند مثلا در مورد یکی از عوامل کنترل طبیعی یعنی پارازیتوئیدها با ردیابی جمعیت مرجع آفت می‌توان اطمینان حاصل کرد که جمعیت دشمن طبیعی جمع‌آوری شده، از تنوع کافی در مراحل تولید انبوه برخوردار است. وجود تنوع کافی در جمعیت پرورشی باعث سازگاری مناسب‌تر و سریع‌تر آن با شرایط محیطی یا میزبان جدید می‌شود (نادل و همکاران، ۲۰۱۲). در یک اکوسیستم تنوع ژنتیکی بین جمعیت-

[1] Mitochondrial DNA
[2] Genetic bottleneck

های جغرافیایی به عوامل زیادی وابسته است که از جمله می‌توان به جریان ژنی و دامنه میزبانی اشاره کرد (یناجی و همکاران، ۲۰۱۲).

DNA میتوکندری به دلیل ویژگی‌هایی همچون قابلیت توارث از یک والد، عدم نوترکیبی[۱]، چندشکلی[۲] گسترده و خالص‌سازی نسبتا آسان، تبدیل به یکی از مفیدترین نشانگرها درآنالیز ژنتیکی جمعیت‌ها و تکامل گونه‌ها شده است (ال فیکی و همکاران، ۲۰۰۶). این ژن زمینه بررسی روابط تکاملی بین جمعیت ها در سطح گونه‌ها و حتی در سطح پایین‌تر از گونه‌ها را نیز فراهم می‌کند. بطوریکه امروزه به فراوانی برای بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای در بسیاری از موجودات به خدمت گرفته شده است (هویت، ۲۰۰۴). ژنهای mtDNA حاوی اطلاعات کدکننده فرایند ATP سازی درون سلول‌ها و همچنین مسئول برگزاری زنجیره تنفس سلولی می‌باشند. زنجیره تنفس سلولی دارای پنج مجموعه آنزیمی است که تعدادی از زیرواحدهای این پنج مجموعه توسط ژنهای میتوکندری رمزگردانی می‌شوند. از جمله می‌توان به مجموعه آنزیمی COX[۳] و مجموعه آنزیمی NADH[۴] اشاره کرد. مجموعه COX شامل آخرین آنزیم-های زنجیره تنفسی میتوکندری است و وظیفه انتقال الکترون از سیتوکروم احیا شده به اکسیژن را به عهده دارد. آنزیم NADH نیز یکی از سه آنزیم انتقال انرژی در زنجیره‌ی انتقال الکترون می‌باشد و وظیفه آن تسریع واکنش انتقال الکترون به کو آنزیم کیو (CoQ)[۵] است (دلوئی و ابراهیمی، ۱۳۸۴).

پسیل پسته *Agonoscena pistaciae* Burckhardt & Lauterer, 1989 (Homoptera: Psyllidae) از دیر زمان در مناطق پسته‌کاری کشور شیوع داشته و در حال حاضر بیش از سایر آفات پسته خسارت زده و از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است. در ایران این حشره به پسته اهلی صدمه می‌زند و خسارت آن

[1] Recombination
[2] Polymorphism
[3] Cytochrome oxidase C
[4] NADH dehydrogenase-Ubiquinone oxidoreductase
[5] Coenzyme Q

بصورت تغذیه پوره‌ها از شیره گیاهی بوده که در برگهای جوان باعث پیچیدگی در لبه برگ می‌شود. پوره ها شیره زیادی تولید می‌کنند که اغلب برگها و شاخه‌ها و حتی سطح خاک زیر درخت را می‌پوشاند. این شیره بصورت دانه‌های مدور و ریز شکری دیده می‌شود. بر اثر حمله آفت، از درختان آلوده مرتب شیره گیاهی با ترشحات حشره‌ای می‌ریزد و از طرفی میوه‌ها ریز بوده و همراه برگها می‌ریزند (بهداد، ۱۳۸۱).

پسیل پسته در حال حاضر به عنوان یکی از آفات مهم درختان پسته در ایران محسوب می‌شود. شرایط آب‌وهوایی و روشهایی که برای کنترل سایر حشرات آفت در باغات پسته اعمال می‌شود سبب طغیان آفت در برخی سالها می شود لذا آگاهی از روش‌های صحیح مدیریتی این آفت موضوعی حائز اهمیت می‌باشد. برای دستیابی به مدیریت موفق هر آفتی، شناخت ویژگی‌های شکل‌شناسی، زیست‌شناسی، رفتارشناسی و بوم‌شناسی بسیار مهم است. در سالهای اخیر استفاده از روشهای مولکولی به عنوان یک ابزار مفید در خدمت علوم مختلف زیست‌شناسی قرار گرفته است. با استفاده از روشهای مولکولی اطلاعات قابل توجهی در زمینه تنوع ژنتیکی، خاستگاه آفت و روابط شجره‌شناسی آن می‌توان به دست آورد (هویت، ۲۰۰۴).

علیرغم گسترش این آفت در نقاط مختلف کشور، تاکنون هیچ بررسی در ارتباط با تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنی جمعیت‌های درون گونه‌ای این آفت صورت نگرفته است. با توجه به گسترش سریع این آفت در باغ‌های پسته سراسر کشور و نیز خسارت شدید، لزوم مطالعه جامع جنبه‌های مختلف تنوع ژنتیکی و تعیین روابط شجره‌شناسی جمعیت‌های آن، ضروری به نظر می‌رسد. سیتوکروم اکسیداز I ، یک زیرواحد ژن COX است که به عنوان نشانگر برای بررسی پدیده تکامل در موجودات استفاده می‌شود. از آنجا که DNA میتوکندریایی چندشکلی بین گونه‌ای شدیدی نشان می‌دهد، استفاده از آن در مطالعات ژنتیک جمعیت، رواج دارد (مک‌دونالد و لوکسدال، ۲۰۰۴). DNA میتوکندریایی به سهولت قابل استخراج بوده و موضوع مطالعات وسیعی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی، شناسایی مولکولی حشرات و غیره بوده است. ژن

سیتوکروم اکسیداز I مسئول سنتز پروتئینی است که در انتقال الکترون و ساختن ATP در زنجیره انتقال الکترون در اندامک میتوکندری نقش دارد.

هدف از پژوهش حاضر بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف پسیل پسته با استفاده نشانگر RAPD و تعیین وابستگی ژنتیکی جمعیت‌های مختلف آن بود. علاوه بر این در صورت امکان تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز I، تنوع جمعیت‌های این گونه بر مبنای توالی این ژن از طریق استخراج تک نمونه‌ها یا استخراج از چند نمونه بررسی خواهد شد.

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت

اهمیت سیستماتیک مولکولی و ژنتیک جمعیت‌ها در این است که باعث می‌شود اصطلاح جمعیت در زیست‌شناسی به جمعیت موضعی محدود شود. بر این اساس تعریف این اصطلاح عبارت است از: مجموعه افرادی که در یک محیط زندگی کرده و قادر به جفتگیری با یکدیگر هستند. در واقع افراد یک جمعیت قادر به تبادل ژن با یکدیگر بوده و هر جفت آنها احتمال یکسانی از نظر آمیزش و تولید مثل دارند (درویشی، ۱۳۸۴).

ویژگی‌های یک جمعیت ممکن است در طی زمان تحول یابد. این جنبه از پویایی جمعیت‌ها مرتبط با مفهوم فیلوژنتیک گونه‌ها بوده و از نظر زمانی به دوره‌ای طولانی اشاره دارد. گاهی از دیدگاه مولکولی منظور از تکامل، تغییر در ساختار ژنتیکی جمعیت‌هاست. این تغییرات ژنتیکی تظاهر فنوتیپی داشته و مطالعه همین تحولات فنوتیپی است که بنیاد اکثر نظریه‌های تکامل را تشکیل داده و طرح فرضیه‌هایی را در مورد گونه‌زایی ممکن ساخته است. مطالعه تغییرات جمعیت‌ها مقدمه‌ای لازم برای درک این نظریه‌ها است (درویشی، ۱۳۸۴).

از دیدگاه تکاملی می‌توان دو نوع تغییرات زیستی را تشخیص داد:

۱- تغییرات گروهی که مربوط به اختلافات بین جمعیت‌های یک گونه می‌شود.

۲- تغییرات فردی که مربوط به اختلافات موجود بین افراد یک جمعیت یک گونه خاص است.

تغییر در فراوانی ژنی و ژنوتیپی یک جمعیت، طی مراحل انتقال ژن‌ها از نسلی به نسل دیگر، ناشی از عوامل مختلفی است. از جمله این عوامل می‌توان به اندازه جمعیت، جهش، مهاجرت، گزینش طبیعی و رانش ژنتیکی اشاره نمود. این عوامل باعث بر هم خوردن تعادل جمعیت و در نتیجه تنوع ژنتیکی می‌شوند (درویشی، ۱۳۸۴).

هر چه تنوع ژنتیکی جمعیت بیشتر باشد در واقع تعداد تیپ‌های ژنتیکی جمعیت بیشتر است. در این صورت آن جمعیت واجد ژنوتیپ‌های مقاوم در برابر تغییرات و تنش‌های محیطی است. مثلا اگر جمعیتی که معمولا در محیط مرطوب ساکن است دارای ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی باشد، این ژنوتیپ‌ها شانس زنده ماندنشان در طی دوره خشکی غیر منتظره محیط بیشتر است. حال آنکه در چنین شرایطی ژنوتیپ-های ویژه هوای مرطوب از بین خواهند رفت. تغییرات ژنوتیپی یک جمعیت ناشی از فرایند جریان ژنی و نوترکیبی است. اما باید توجه داشت که منشا اصلی آنها جهش‌ها هستند. قابلیت ایجاد تنوع این عوامل به اندازه‌ای است که در هر جمعیت دارای تولید مثل جنسی، دو فرد مشابه نمی‌توان یافت. فرایند تکامل جمعیت‌های طبیعی باعث شده که آنها دارای مقادیر بسیاری از این تغییرات ژنتیکی باشند و مطالعات تفاوت‌های فردی نشان داده است که تا چه حد این تصور که تمام افراد هر گونه نسخه‌های یک نوع مشابه‌اند، نادرست است (درویشی، ۱۳۸۴).

تغییرات جغرافیایی به تفاوت بین جمعیت‌های هر گونه اطلاق می‌شود که از نظر مکانی مجزا هستند. هر جمعیتی از یک گونه از نظر ژنتیکی با بقیه جمعیت‌های آن تفاوت دارد و در صورت استفاده از آزمون‌های دقیق، این تفاوت مشخص خواهد شد. درجه تفاوت بین جمعیت‌های مختلف یک گونه از تشابه کامل تا تمایز نسبی در سطح گونه‌ها متغیر است (درویشی، ۱۳۸۴).

۱-۲- ژنتیک جمعیت

آگاهی از تنوع ژنتیکی در حشرات کمک می‌کند که از ساختار ژنتیکی، قابلیت سازگاری جمعیت و برخی ویژگی‌های رفتاری از جمله موفقیت در یافتن منبع غذایی آگاه شویم. علاوه بر این بررسی تنوع ژنتیکی حشرات، پیش از اتخاد یک برنامه مدیریتی موثر امری ضروری است (ال- مرگاوی و همکاران، ۲۰۱۱).

توصیف تنوع طی مدت زیادی بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی صورت می‌گرفت، اما تغییرات مورفولوژیکی محدود بوده و امکان دارد صفات در تمامی مراحل آشکار نباشد یا این صفات تحت تاثیر عوامل محیطی تغییر کنند. امروزه انواع گوناگونی از نشانگرهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی اعمال می‌شود که به عنوان مکمل بیشتر روش‌های سنتی مطرح هستند. ابزارهای مولکولی بخاطر توانایی شان در یافتن گوناگونی در سطح DNA، اطلاعات ارزشمندی در مورد تنوع ژنتیکی فراهم می‌کنند (هاگس و همکاران، ۲۰۰۸).

ژنتیک جمعیت بخشی از علم ژنتیک است که درباره چگونگی به ارث رسیدن ژن‌ها و تغییراتشان در جوامع مختلف موجودات زنده و همچنین عواملی که ممکن است در وضعیت این جوامع تغییر ایجاد کند، بحث می‌کند. در واقع توارث ژن‌ها در سطح جمعیت توسط قوانین وراثت مندلی صورت می‌گیرد، اما مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت به عنوان ژنتیک معروف است. در علم ژنتیک، جمعیت به اجتماع افرادی گفته می‌شود که جامعه مندلی را تشکیل می‌دهند. در جامعه مندلی فرد به کسی اطلاق می‌شود که دارای قدرت آمیزش بوده و بتواند ژن‌ها را از نسلی به نسل دیگر انتقال دهد. بنابراین در این جامعه افراد با یکدیگر دارای قدرت آمیزش مساوی هستند. در نتیجه در یک توده یا خزانه ژنی که مجموعه‌ی کل ژن-های موجود در سلول‌های زایشی افراد جامعه مندلی است، شریک هستند. به زبان ساده‌تر جمعیت از نظر ژنتیکی عبارت است از گروهی از موجودات یک گونه که توانایی جفتگیری و تولید مثل دارند. مطالعه و تعیین فراوانی ژنی (آللی) و ژنوتیپی برای تعیین ساختار ژنتیکی آن از موضوعات مورد بررسی در ژنتیک جمعیت می‌باشد (میرمحمدی میبدی و میرلوحی، ۱۳۸۷).

۱-۳- بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی

از راهکارهای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در جمعیت استفاده از تکنیک‌های مولکولی است. پیشرفت زیست شناسی مولکولی به ویژه معرفی و توسعه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مطالعات ژنومی در موجودات زنده را تا حد زیادی آسان کرده است. این تکنیک تمامی مشکلات قبلی در زیست مولکولی که ناشی از عدم دسترسی به مقادیر زیاد از DNA یکسان بود را برطرف کرد. همچنین هزینه‌ها را کاهش داده و اجازه نمونه‌برداری بیشتر را هم فراهم نموده است (هوی، ۲۰۰۳). به علت کارکردهای مناسب PCR از جمله: تهیه نسخه‌های متعدد از یک ژن و بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در یک قطعه DNA، امروزه شناسایی، طبقه‌بندی و ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از روش‌های مولکولی بسیار آسان و دقیق شده است (امتیازی، ۱۳۸۶). مطالعات تنوع بر پایه PCR با استفاده از آغازگرهای[1] عمومی یا اختصاصی انجام می‌شوند. در این مطالعات بخشی از قطعه DNA تکثیر شده و از آن برای براورد تفاوت‌های افراد یا گونه‌ها استفاده می‌شود.

۱-۴- نشانگرهای مولکولی و انواع آن

هر عاملی که در بین افراد، لاین‌ها، جمعیت‌ها، گونه‌ها، نژادها و یا سویه‌های مختلف به لحاظ ژنتیکی تفاوت داشته و سبب تمایز آنها از یکدیگر گردد، به عنوان نشانگر شناخته می‌شود. به عبارت دیگر تفاوت موجود بین توالی DNA کروموزومی هر موجود زنده که به نتاج آنها منتقل می‌شود، می‌تواند به عنوان نشانه یا نشانگر ژنتیکی به کار گرفته شود. چندشکلی بودن و توارث‌پذیری از جمله شرایط لازم برای یک نشانگر ژنتیکی است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

[1] Primers

۱-۴-۱- انواع نشانگرها

۱-۴-۱-۱- نشانگرهای مورفولوژیک

صفات مورفولوژیک که عمدتا توسط یک ژن کنترل می‌شوند، می‌توانند به عنوان نشانگرهای ژنتیک مورد استفاده قرار گیرند. این نشانگرها شامل انواعی از ژن‌های کنترل کننده صفات فنوتیپی هستند و جزو نخستین نشانگرها به شمار می‌آیند. این نشانگرها از زمانی که محل ژن‌ها برروی کروموزوم مشخص شد، مورد استفاده قرار می‌گرفتند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۱-۴-۱-۲- نشانگرهای پروتئینی

این نشانگرها، پروتئین‌هایی هستند که نتیجه بیان ژن می‌باشند. این‌ها، نشانگرهای مولکولی در سطح پروتئین یا بیوشیمیایی نیز نامیده می‌شوند که از جمله می‌توان به آیزوزایم‌ها[1] و آلوزایم‌ها[2] اشاره نمود. این پروتئین‌ها از طریق الکتروفورز و رنگ آمیزی قابل جداسازی و تشخیص هستند. آیزوزایم‌ها، فرم‌های مولکولی مختلف یک آنزیم هستند که واکنش مشابهی را انجام می‌دهند. آیزوزایم‌ها توسط ژنهایی که در لوکوس‌های مختلف قرار دارند، رمزگردانی می‌شوند. آلوزایم‌ها نیز فرمهای مختلف یک آنزیم هستند اما توسط آلل‌های مختلف موجود در یک لوکوس رمزگردانی می‌شوند. به دلیل محدود بودن روش‌های رنگ-آمیزی پروتئین‌ها، تعداد آیزوزایم‌های قابل ثبت و مشاهده که بتوان از آنها به عنوان نشانگر استفاده نمود، کم بوده و به صد عدد نمی‌رسد. عیب دیگر این نشانگرها محدودیت تنوع ژنتیکی قابل ثبت توسط آیزوزایم هاست (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

[1] Isozymes
[2] Allozymes