

## تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف نوکلئوپولی هیدروویروس (HaNPV) در استان‌های

### مازندران و گلستان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD.

#### Genetic diversity among the different isolates of Nucleopolyhedrovirus in Mazandaran and Golestan provinces using RAPD molecular marker

مرضیه شازده احمدی<sup>۱</sup>، هدی عاصمی<sup>۱</sup>، زین العابدین شهادتی مقدم<sup>۱</sup> و سید افشین سجادی<sup>۱</sup>

پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۲۰

دریافت: ۱۳۹۳/۱/۱۷

#### چکیده

کرم غنچه توتون (*Helicoverpa armigera*) یکی از آفات مهم و کلیدی مزارع توتون محسوب می‌شود. ویروس چند وجهی هسته‌ای (Nucleopolyhedrovirus) یکی از عوامل مهم کنترل بیولوژیک علیه کرم غنچه و تعدادی از گونه‌های دیگر می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف نوکلئوپولی هیدروویروس در ۱۶ جمعیت طبیعی استان‌های مازندران و گلستان انجام شد. نمونه‌های کرم غنچه توتون آلوده به ویروس از مزارع توتون در استان‌های مازندران و گلستان جمع‌آوری شدند. خالص‌سازی ویروس و استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد. در آزمون نشانگرهای RAPD ابتدا از ده جفت آغازگر جهت تکثیر DNA ویروس NPV استفاده گردید که از بین آن‌ها دو جفت آغازگر که بیش‌ترین پلی‌مورفیسم را داشتند، انتخاب شدند. این دو جفت آغازگر روی ۱۶ نمونه DNA مربوط به جدایه‌های مناطق جغرافیایی مختلف بررسی شدند. دو جفت آغازگر مورد استفاده همگی نوارهای قابل کدگذاری ایجاد کردند. پس از الکتروفورز محصولات PCR، در مجموع تعداد ۸۷ باند قابل امتیازدهی به دست آمد که از بین آن‌ها، ۷۵ باند (۸۶ درصد) دارای چندشکلی بودند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار PyElph انجام شد. پس از گروه‌بندی جمعیت‌ها با روش UPGMA در فاصله ژنتیکی ۲۰، پنج شاخه اصلی مشاهده شد که این بیانگر وجود تنوع ژنتیکی میان جدایه‌های مورد بررسی بود، ولی این تنوع ژنتیکی با توزیع جغرافیایی جدایه‌ها مطابقت زیادی نداشت. با مبنا قرار دادن نشانگر RAPD جدایه‌هایی از نوکلئوپولی هیدروویروس با بیش‌ترین قرابت ژنتیکی در یک خوشه ژنی قرار گرفتند و بیش‌ترین شباهت را نشان دادند. نتایج ثابت کرد که بین جدایه‌های مطالعه شده تنوع خوبی وجود داشت که جهت برنامه‌های به نژادی و همچنین کنترل بیولوژیک می‌توان از آن‌ها استفاده نمود.

**واژه‌های کلیدی:** کرم غنچه توتون، تنوع ژنتیکی، نشانگر RAPD، ویروس NPV

۱- محققین مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر

نویسنده مسئول مکاتبات: Noshinshazdeahmadi@yahoo.com

## مقدمه

کرم غنچه توتون (*Helicoverpa armigera*) یکی از آفات مهم توتون محسوب می‌شود که علاوه بر توتون به گیاهان دیگر از قبیل پنبه، گوجه فرنگی، یونجه، خشخاش، کنف، شبدر، ذرت، نخود، کنجد، بادمجان، سوژا، لوبیا، ذرت خوشه‌ای، کدو و شاهانه نیز حمله می‌کند (Fakrudin et al., 2004). استفاده بی‌رویه از حشره‌کش‌های شیمیایی در کنترل این آفت علاوه بر آلودگی محیط زیست، منجر به بروز مقاومت آفت مزبور در برابر حشره‌کش‌ها شده است (Mehrvar, 2007). در دهه‌های اخیر جمعیت آفات در مزارع، جنگل و باغات تنها توسط آفت‌کش‌های عمومی کنترل می‌شد اما در حال حاضر آفت‌کش‌های میکروبی و بیولوژیکی، جایگزین مناسبی برای آفت‌کش‌های شیمیایی می‌باشند (Brown, 1982). اولین حشره‌کش ویروسی در سال ۱۹۷۳ از آمریکا با نام تجاری Elcar توسط شرکت Sandoz به ثبت رسید. از سال ۱۹۷۰ تا ۱۹۸۵ بررسی‌ها و پیشرفت‌های زیادی در زمینه بیماری‌شناسی و ژنتیک باکولوویروس‌ها به انجام رسید (Odak et al., 1984). در دهه ۱۹۹۰ علاوه بر بررسی‌های مولکولی بر روی جدایه‌های باکولوویروس، از این ویروس‌ها به عنوان ناقلین ژنی در مهندسی ژنتیک و زیست فناوری استفاده شده است (Wood and Robert, 1991) و اخیراً پیشنهاد شده است که از باکولوویروس‌ها در درمان بیماری‌های ژنتیکی انسان‌ها نیز استفاده گردد (Khiaban et al., 2010). در حال حاضر بیش از ۵۰ نوع عامل کنترل بیولوژیک ویروسی تجاری در دنیا به ثبت رسیده است (Mehrvar et al., 2008). ویروس چندوجهی هسته‌ای کرم غنچه توتون، *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* (HaNPV) از خانواده باکولوویروس‌ها (Baculovirus) بوده و یکی از عوامل مهم کنترل بیولوژیک علیه گونه‌های هلیوتیس و تعدادی از گونه‌های دیگر آفات همانند کرم برگ‌خوار ذرت می‌باشد (Smith and Summers, 1978; Zalucki et al., 1986). اختلافات وسیعی در بیماری‌زایی و کشندگی جدایه‌های جغرافیایی مختلف HaNPV علیه جمعیت‌های طبیعی *Helicoverpa armigera* در جهان گزارش شده است (Battu and Arora, 1996).

تنوع ژنوتیپی نوکلئوپلی هیدروویروس (Nucleopolyhedrovirus) به دو صورت تک نوکلئوکپسیدی (single enveloped NPV (SNPV)) و یا به صورت چند نوکلئوکپسیدی (multiple enveloped NPV (MNPV)) در گونه‌های مختلف هلیوتیس وجود دارد (McIntosh, et. al., 1987). استفاده از آنزیم‌های محدودگر جهت بررسی مشخصات باکولوویروس‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف جمعیت‌های این ویروس فراگیر بوده و به اثبات رسیده است. محققان با استفاده از نشانگرهای مولکولی الگوهای متفاوت طول قطعات ناشی از هضم آنزیمی (Restriction fragment Length Polymorphism (RFLP))، اختلاف جغرافیایی جدایه‌های نوکلئوپلی هیدروویروس و گرانولویروس (GVs) از گونه‌های یک میزبان را مشخص نمودند (Smith and Summers, 1979; Shapiro et al., 1991). مهرور و همکاران (Mehrvar et al., 2008) هفت جدایه ویروس NPV را روی گیاهان گوجه فرنگی و پنبه با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بررسی کرده و پس از تجزیه و تحلیل جداگانه محصول پلیمرز جدایه‌ها با چهار نوع آنزیم برشی EcoRI، PstI، BamHI، HindIII و نوع ژنتیکی بین جدایه‌ها نشان داده شد. همچنین روابط فیلوژنی بین آن‌ها را با استفاده از تجزیه کلاستر نشان دادند. شناسایی درست، آگاهی از وضعیت سیستماتیک و همچنین بررسی تکاملی و ژنتیکی آفات به خصوص در سطح جمعیت‌های یک گونه در به کارگیری روش‌ها و حشره‌کش‌های مناسب برای کنترل آن‌ها اهمیت دارد (Williams and Payne, 1984). چندین روش برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در حشرات وجود دارد که یکی از آن‌ها به کارگیری مارکرهای مولکولی است. مارکرهای DNA، مزایایی نسبت به مارکرهای مورفولوژیکی دارند، پلی مورف هستند و آثار اپی استاتیک و پلیوتروپیک ندارند و تحت تاثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند. بنابر این در جهت افزایش و بالا بردن ذخیره ژرم پلاسما به کار می‌روند. از طرفی، تنوع ژرم پلاسما یکی از نقاط توجه به نژادگران می‌باشد (Rabello et al., 2008). در میان نشانگرهای مولکولی که به طور رایج برای بررسی تنوع ژنتیکی در دسترس هستند، نشانگر رپید یک روش سریع، ساده و موثر را برای ارزیابی جمعیت‌های

حشرات فراهم می‌کند. مارکرهای RAPD (DNA چند شکلی تکثیر شده تصادفی) در جهت آشکارسازی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌های حشرات مورد استفاده فراوان قرار گرفته‌اند (Lou *et al.*, 1998). روش RAPD-PCR یک روش ساده و آسان در جهت شناسایی تنوعات ژنتیکی می‌باشد و دارای مزایای بسیاری است که از آن جمله می‌توان به مواردی همچون به کارگیری مقادیر کم DNA، عدم طراحی پرایمر اختصاصی و شناسایی ژن مورد نظر، آشکارسازی آسان روی ژل آگارز و در نهایت عدم نیاز به آشکارسازی توسط مواد رادیواکتیو اشاره کرد (Rana and Bhat, 2005).

باتو و آرورا (Battu and Arora, 1996) تنوع ژنتیکی و میزان قرابت ژنتیکی بیست گونه از جنس باکولوویروس‌ها را با استفاده از نشانگرهای مولکولی و بیوشیمیایی بررسی کردند که بر اساس نتایج حاصل دوازده جدایه بیش از ۵۰٪ از نظر ژنتیکی از هم دیگر متفاوت بوده و اغلب جدایه‌ها متعلق به یک منطقه جغرافیایی بودند که نشانگر وجود دودمان‌های ژنتیکی مختلف برای جنس باکولوویروس‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی جهان می‌باشد. کریستین و همکاران (Christian *et al.*, 2001) یک روش سریع برای شناسایی و متمایز نمودن جدایه‌های مختلف ویروس NPV ارائه نمودند. آن‌ها چهل جدایه از پانزده منطقه جغرافیایی مختلف را با استفاده از نشانگرهای AFLP بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که پانزده جمعیت مورد بررسی از نظر ژنتیکی متمایز، جریان ژنی بین آن‌ها محدود بوده و به صورت گروه‌های مجزا از هم گروه‌بندی شدند و تنوع ژنی نیز در بین آن‌ها نسبتاً کم بود. اگرچه پیشرفت‌های اخیر در فناوری و اطلاعات مولکولی در اغلب گروه‌های حشرات برای شناسایی و بررسی‌های فیلوژنتیکی آن‌ها و نیز روی کرم غنچه، با استفاده از سایر نشانگرها در سایر نقاط جهان (MacDonald and Loxdale, 2004; Hossein Galal, 2009) در مواردی بررسی شده است، اما بر اساس منابع موجود مطالعات ژنتیکی انجام شده روی گونه‌های مختلف آفات، متأسفانه تاکنون هیچ گونه بررسی ژنتیکی و مولکولی روی ویروس چند وجهی هسته‌ای کرم غنچه توتون (HaNPV) در ایران انجام نشده است. در این پژوهش، برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ویروس NPV روی کرم غنچه توتون در مناطق مختلف استان‌های مازندران و گلستان، از نشانگر مولکولی RAPD استفاده شد. دلیل انتخاب این شیوه پتانسیل بالای آن برای آشکارسازی میزان تنوع ژنتیکی و تعیین فاصله ژنتیکی جدایه‌های مختلف ویروس NPV بود.

### مواد و روش‌ها

در این تحقیق از هشت منطقه آلوده به ویروس NPV در استان مازندران، شامل وارد محله ساری، خارکش ساری، مزرعه ۲ و ۳ کوهسارکنده ساری، اسبوکلا ساری، جامخانه نکا، ناحیه غرب و شرق مرکز تحقیقات توتون تیرتاش و در استان گلستان، از مناطق مزرعه ۱ و ۲ جعفر آباد گرگان، تفرتپه، والش آباد، پیچک محله، نوده ملک، مزرعه ۲ و ۴ برفتان بازدید به عمل آمده و نمونه‌برداری صورت گرفت. لاروهای کرم غنچه توتون آلوده به ویروس NPV، از ۱۶ منطقه جغرافیایی مختلف در استان‌های مازندران و گلستان جمع‌آوری گردیدند (شکل ۱). شانزده جدایه جمع‌آوری شده، جهت انجام مراحل بعدی کار به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش منتقل شدند و تا زمان استخراج DNA در فریزر با دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

**خالص‌سازی ویروس NPV:** بعد از انتقال لاروهای آلوده به ویروس NPV به آزمایشگاه، ابتدا خالص‌سازی ویروس NPV از پیکره لاروهای آلوده به روش (Mehrvar *et al.*, 2008) انجام شد. برای این منظور، ابتدا لاروهای آلوده به ویروس NPV در هاون چینی له شدند و چند قطره آب مقطر به آن اضافه گردید. سپس سوسپانسیون تهیه شده از پارچه متقال ظریف عبور داده شد و سوسپانسیون صاف شده به مدت ۳ دقیقه و دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و مایع رویی موجود در هر میکروتیوب جمع‌آوری گردید. محلول رویی به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد (تا کاملاً بافت لاروی و اندام ویروس جدا شوند) و در نهایت، قسمت رسوب ته هر میکروتیوب که محتوی پلی هدرال‌های ویروس

بود را نگهداری و به آن ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید و پس از ورتکس، سوسپانسیون خالص‌سازی شده ویروس NPV به دست آمد.

**استخراج DNA ژنومی:** جهت استخراج DNA ژنومی از جدایه‌های مختلف HaNPV از روش CTAB (با اندکی تغییرات) استفاده شد. برای هر جدایه HaNPV ابتدا ۵۰۰  $\mu$ l بافر CTAB (مخصوص حشرات)، (بافر CTAB به حجم ۱۰۰ ml شامل: ۱/۲۱ گرم از Tris-Hcl، ۸/۱۸ گرم از Nacl، ۰/۷۴ گرم از EDTA، ۲ گرم از پودر CTAB، ۱۰۰ ml آب مقطر می‌باشد). بافر CTAB با ۲  $\mu$ l مرکاپتواتانول داخل یک میکروتیوب ریخته شد و آن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری (دمای  $65^{\circ}\text{C}$ ) قرار داده شدند. به مخلوط قبلی، ۵۰۰  $\mu$ l سوسپانسیون خالص‌سازی شده لاروی همان میکروتیوب ریخته شد و آن‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در بن ماری (با دمای  $65^{\circ}\text{C}$ ) قرار داده شدند. به مخلوط قبلی ۵۰۰  $\mu$ l کلروفرم- ایزوآمیل الکل اضافه شد و میکروتیوب‌ها به آرامی تکان داده شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. فاز رویی را برداشته و به تیوب جدید منتقل شده و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. تیوب‌ها به مدت یک شب در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$ - قرار داده شده و سپس ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و به رسوب حاصله ۴۰۰  $\mu$ l اتانول ۷۰٪ اضافه شد و تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند، اتانول آن‌ها خالی شد و دوباره مقدار ۴۰۰  $\mu$ l اتانول ۷۰٪ به آن‌ها اضافه شد، تیوب‌ها مجدداً سانتریفیوژ شده و رسوب‌های به دست آمده در ۲۰  $\mu$ l بافر TE حل شدند و تا زمان انجام مراحل بعدی در  $20^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شدند. ارزیابی کمیت و غلظت DNA استخراجی، از روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر perkin-Elmer مدل EZ-201 صورت گرفت.

برای تعیین کمیت DNA از فرمول زیر، نیز استفاده شد:

$$\text{غلظت DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD260} \times 50 \times \text{میزان رقت}$$

پس از محاسبه غلظت DNA برای هر نمونه، برای انجام آزمایش‌های RAPD-PCR، از کلیه نمونه‌های DNA استخراجی، غلظت‌های یکسان ۲۵ ng/ $\mu$ l تهیه و در دمای  $20^{\circ}\text{C}$ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Rana and Bhat, 2005). برای ارزیابی کیفیت DNA، نمونه‌های DNA ژنومی استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، در ولتاژ ۷۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند. سپس، از ژل‌ها توسط دستگاه ژل داک عکس‌برداری به عمل آمد و کیفیت باندهای DNA استخراج شده بررسی شد.



شکل ۱- لارو کرم غنچه توتون آلوده به NPV در سمت راست و لارو سالم در سمت چپ

Fig. 1. Tobacco bud worm larvae infected NPV at the right and healthy larvae at the left

**آغازگرهای RAPD:** در آزمون نشانگرهای RAPD ابتدا از ده آغازگر RAPD (10bp) که از کیت شرکت اپرون تهیه شده بود، استفاده شد. پس از آماده سازی برای PCR، دمای اتصال پرایمرها با چند نوبت PCR آزمایشی تعیین گردید. در نهایت، بعد از بررسی این آغازگرهای RAPD مورد نظر روی DNAهای مختلف، دو پرایمر RAPD به نامهای OPM-03 و OPM-16 که بیشترین پلی مورفیسم (چند شکلی) را داشتند، بر اساس وضوح و تکرارپذیری بیش تر انتخاب شدند (جدول ۱). این دو پرایمر RAPD روی ۱۶ نمونه DNA استخراج شده از جدایه های مناطق جغرافیایی مختلف، آزمایش شدند و در نهایت، واکنش PCR این ۱۶ نمونه با استفاده از این دو جفت پرایمر RAPD انتخاب شده انجام شد.

جدول ۱- نام پرایمرهای RAPD انتخاب شده

Table 1. Name of selected RAPD primers

توالی	نام پرایمر
GGGGGATGAG	OPM-03
GTAACCAGCC	OPM-16

**واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR):** جهت انجام واکنش RAPD-PCR از میکروتیوب های ۰/۲ میلی لیتری استفاده شد و حجم نهایی هر واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل (۱۲/۵ میکرولیتر PCR master mix، ۱/۵ میکرولیتر DNA ژنومی ویروس، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ μM و ۹/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر) در نظر گرفته شد. نمونه ها در دستگاه ترموسایکلر مدل ساخت شرکت BIO RAD جهت انجام واکنش PCR قرار گرفتند. برنامه زمانی جهت انجام واکنش RAPD-PCR شامل: (مرحله واسرشته سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۴ چرخه مشتمل بر مرحله واسرشته سازی ثانویه به مدت یک دقیقه با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و در پایان نیز مرحله بسط نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه) بود. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۸ درصد بارگذاری شده و در بافر TBE 1X الکتروفورز شدند. برای تعیین اندازه باندها از سایز مارکر 100 bp (Gene Ruler, fermentas) استفاده شد. ژل به مدت ۱۵ دقیقه با محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. پس از شستشوی ژل با آب مقطر، عکس برداری از ژل توسط دستگاه ثبت ژل مدل ساخت شرکت BIO RAD در زیر نور ماورا بنفش انجام شد.

**تجزیه و تحلیل داده های مولکولی:** تصاویر تهیه شده از ژل های الکتروفورز محصولات RAPD-PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بررسی داده های RAPD از نظر حضور (نمره یک) یا عدم حضور (نمره صفر) باندها به وسیله بازخوانی مقادیر کامپیوتری ژل ها در برنامه Photocapt Mw انجام شد. این اطلاعات با نرم افزار Excel جمع بندی شده و سپس، تجزیه و تحلیل کلاستر و آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار PyElph و به روش UPGMA انجام شد. همچنین جدول محاسبه فواصل ژنتیکی موجود بین شانزده جدایه مناطق جغرافیایی مختلف ویروس HaNPV بر اساس روش UPGMA رسم گردید.

## نتایج و بحث

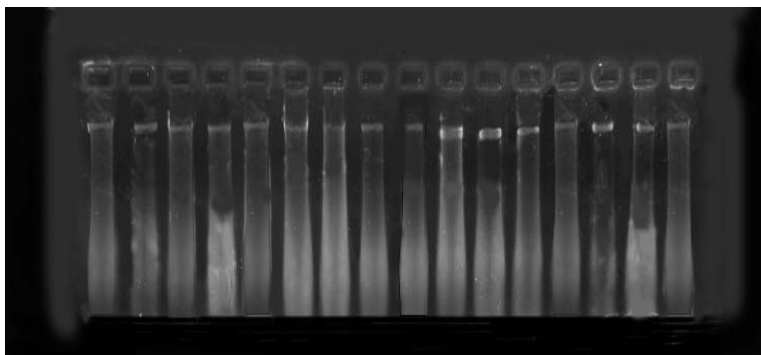
مشخصات نمونه های جمع آوری شده از لاروهای *Helicoverpa armigera* آلوده به ویروس NPV در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- نمونه‌های لاروهای *Helicoverpa armigera* آلوده به ویروس NPV جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران و گلستان  
Table 2. S of *Helicoverpa armigera* NPV Virus Larvae collected in this research of Mazandaran & Golestan provinces.

شماره : Sample No.	منطقه جمع‌آوری Collection site	مشخصات جغرافیایی Geographical characteristics
1	East of Tirtash center ناحیه شرق مرکز تحقیقات تیرتاش	36° 43'19/71"N 53°43'38/65"E
2	Farm 3 of Kohsarkande Sari مزرعه ۳ کوهسار کنده ساری	36°35'48/2"N 53°18'57" E
3	Farm 2 of Jafarabad مزرعه ۲ جعفرآباد	36° 51'36/8"N 54°40'18/3"E
4	Farm 1 of Jafarabad مزرعه ۱ جعفرآباد	36° 51'50/7"N 54°40'2/3"E
5	Taghartapeh تقرتپه	36° 51'21/1"N 54°38'56/2"E
6	West of Tirtash research center ناحیه غرب مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش	36° 43'22/13"N 53°43'38/54"E
7	Pichakmahalleh پیچک محله	36° 55'21/6"N 54°49'36/7 "E
8	Farm 2 of Baraftan مزرعه ۲ برافتان	36° 54'3/4"N 54°48'20/2"E
9	Kharkesh Sari خارکش ساری	36° 32'3/1"N 53°10'10/4"E
10	Jamkhaneh Neka جامخانه نکا	36° 37'25/3"N 53°14'53/5"E
11	Farm 4 of Baraftan مزرعه ۴ برافتان	36° 54'15/7"N 54°48'26/3"E
12	Esbokola Sari اسبوکلا ساری	36° 32'51"N 53°11'43/5 "E
13	Farm 2 of Kohsarkandeh مزرعه ۲ کوهسارکنده	36° 33'57"N 53°19'40/2 "E
14	Valeshabad Gorgan والش آباد گرگان	36° 50'45/6"N 54°37'8/6"E
15	Varedmahaleh Sari وارد محله ساری	36° 29'33/6"N 53°8'52/2"E
16	Nodehmalek نوده ملک	36° 52'36"N 53°48'21/7 "E

## کمیت و کیفیت DNA

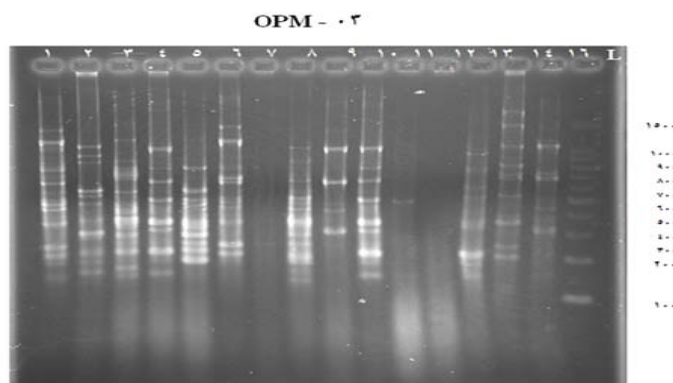
جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر برای DNAهای مختلف از ۰.۴۰۲ تا ۰.۴۱۶. متغیر بود. این عدد برای ۲۸۰ نانومتر نیز از ۰.۲۰۵ تا ۰.۲۱۸. بود. غلظت DNAها بر اساس جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر از ۱۸۱۰ تا ۱۸۷۰ نانوگرم در میکرولیتر به دست آمد. نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نیز از ۱/۷۱ تا ۱/۹۵ متغیر بود که نشان دهنده کیفیت مناسب DNAها بود. حضور تک باند شفاف با وزن مولکولی بالا، نشان دهنده DNA سالم و تجزیه نشده تلقی گردید (شکل ۲).



شکل ۲- نمایی از DNAهای استخراج شده جدایه‌های مختلف HaNPV روی ژل آگارز ۸ درصد  
Fig. 2. View of DNA extracted from different HaNPV isolates on 0.8 % agarose gel

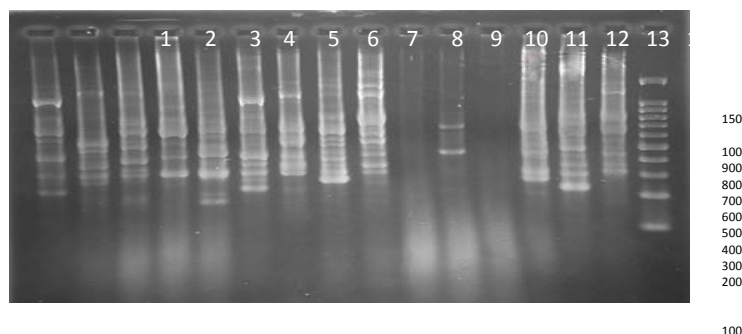
## تعیین دمای اتصال آغازگرها و انتخاب آغازگرهای مناسب

در بررسی دمای اتصال آغازگرها، دمای اتصال مناسب ۳۸ °C به دست آمد. بعد از آزمون ده پرایمر RAPD روی DNAهای مختلف، دو پرایمر RAPD به نام‌های OPM-03 و OPM-16 بیش‌ترین پلی مورفیسم (چند شکلی) را نشان داده و نوارهای قابل کدگذاری ایجاد کردند و انتخاب شدند (شکل ۲). این دو آغازگر تصادفی RAPD بر روی ۱۶ نمونه DNA از مناطق جغرافیایی مختلف آزمون شدند و مورد تکثیر PCR قرار گرفتند. الگوهای باندهای مربوط به واکنش RAPD-PCR هر آغازگر در شکل‌های (۳ و ۴) نشان داده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که دو آغازگر تصادفی مورد استفاده منجر به تکثیر ۸۷ لوکوس قابل نمره‌گذاری شدند که در بین آن‌ها ۷۵ لوکوس (۸۶٪ لوکوس‌ها) در تمام توده‌ها چند شکلی خوبی را نشان داد، به عبارت دیگر ۸۶ درصد باندهای تشکیل شده چندشکل بودند.



شکل ۳- پروفایل الکتروفورز RAPD جدایه‌های ویروس NPV جمع آوری شده از مناطق مختلف با استفاده از پرایمر OPM-03  
Fig. 3. RAPD electrophoresis profiles of NPV virus isolated collected from different regions using primer(OPM- 03)

چاهک‌های ۱ تا ۱۵ مربوط به جدایه های HaNPV از مناطق جغرافیایی مختلف در استان‌های مازندران و گلستان می‌باشد. چاهک L نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی ساخت شرکت فرمنتاز.



شکل ۴- باندهای حاصل از PCR توسط پرایمر (OPM-16) RAPD (OPM-16)  
 Fig. 4. The bands of RAPD-PCR using primer(OPM- 16)

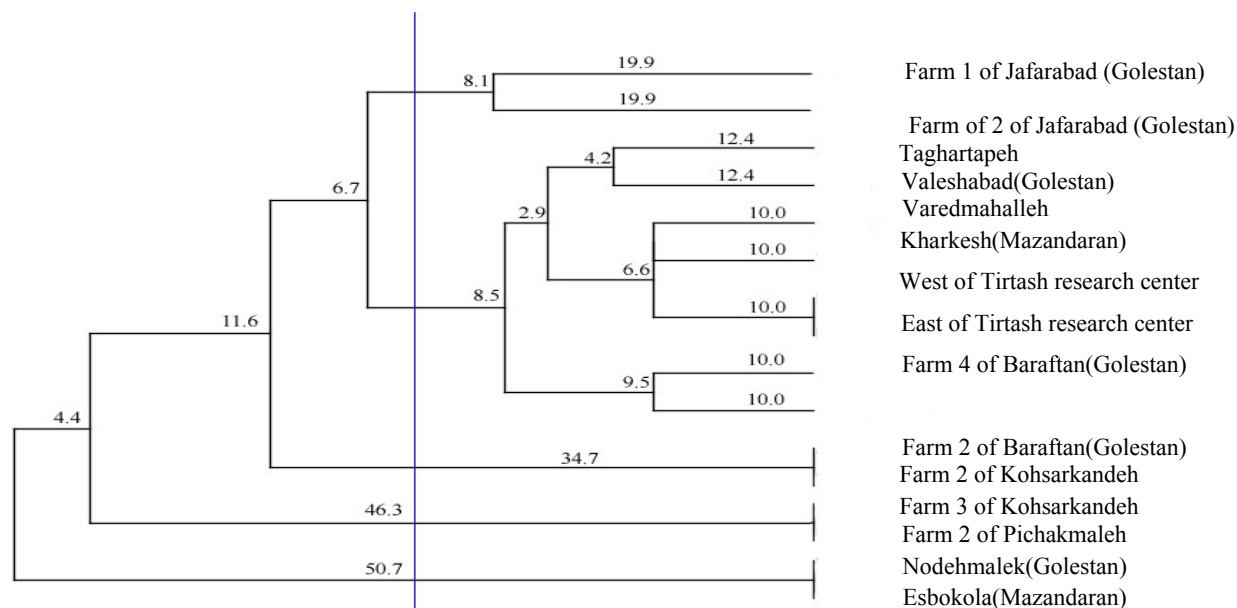
چاهک‌های ۱ تا ۱۵ مربوط به جدایه های HaNPV از مناطق جغرافیایی مختلف در استان‌های مازندران و گلستان می‌باشد. چاهک L نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی ساخت شرکت فرمتاز.

### تجزیه کلاستر و رسم درخت فیلوژنی

با گروه‌بندی جمعیت‌ها با روش UPGMA با استفاده از نرم افزار PyElph پنج شاخه اصلی مشاهده شد (شکل ۵). در این تبارنما (دندروگرام)، خط عمودی جداکننده گروه‌های مختلف، در فاصله ژنتیکی ۲۰ در نظر گرفته شد (لازم به ذکر است که فاصله ۲۰ به صورت تجربی فرض شد). خط عمودی، نشان دهنده وجود پنج گروه ژنتیکی مجزا در جدایه‌های مختلف HaNPV مورد بررسی بود. همه این گروه‌ها یا ضریب اطمینان ۱۰۰ درصد از یک دیگر تفکیک شدند. بر همین اساس، جدایه‌های NPV بر اساس اختلافات ژنتیکی آن‌ها گروه‌بندی شدند. در این درخت فیلوژنی، پنج گروه مجزا و مهم تشکیل شد. گروه اول، شامل جدایه‌های مزرعه ۱ و ۲ جعفرآباد گرگان بود. گروه دوم، از جدایه‌های مناطق تقریباً گرگان-والش آباد گرگان- مزرعه ۲ و ۴ برفتان- وارد محله ساری- خارکش ساری- ناحیه غرب و ناحیه شرق مرکز تحقیقات توتون تیرتاش تشکیل شده بود. گروه سوم، از جدایه‌های مزرعه ۲ و ۳ کوهسار کنده، گروه چهارم، شامل جدایه‌های پیچک محله و نوده ملک بوده و گروه پنجم، از جدایه‌های اسبوکلا ساری و جامخانه نکا تشکیل شده بود. در گروه دوم، با این که جدایه‌ها متعلق به مناطق جغرافیایی دور از یک دیگر بودند، ولی در یک گروه ژنتیکی قرار گرفتند. این امر نشان می‌دهد با این که برخی جدایه‌ها از مناطق جغرافیایی مختلف هستند، ولی از نظر ژنتیکی با یکدیگر قرابت ژنتیکی دارند و در یک گروه ژنتیکی قرار گرفتند که می‌تواند به دلیل جهش، مهاجرت و یا انتقال ژن‌ها اتفاق افتاده باشد (Serrano *et al.*, 2004). در ضریب تشابه ۲۰ درصد پنج شاخه اصلی مشاهده شد که این شاخه‌ها نیز هر کدام به چند زیرشاخه تقسیم شدند که این بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا میان جدایه‌های مختلف می‌باشد (شکل ۵). وجود تنوع بالا در میان جدایه‌ها، با نتایج محققان دیگر تا حدودی مطابقت داشت (Battu and Arora, 1996). روش RAPD یک ابزار سریع و راحت برای بررسی تنوع ژنتیکی فراهم می‌کند. با توجه به نتایج به دست آمده، تنوع ژنتیکی مشاهده شده را نمی‌توان فقط با توزیع جغرافیایی جدایه‌های مورد بررسی مرتبط دانست، به عبارت دیگر جدایه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران و گلستان و حتی در بعضی از نمونه‌ها، جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق غربی استان از نمونه‌های شرق استان قابل تفکیک ژنتیکی نبودند.

بر اساس نتایج شکل ۵۶، اختلاف ژنتیکی زیر ۲۰ با توجه به دندروگرام حاصل، اختلاف غیر معنی‌دار فرض شد، یعنی در این محدوده جدایه‌ها با هم دیگر اختلاف ژنتیکی چندانی نداشته که بیانگر جدا نبودن جمعیت‌های مورد مطالعه از یک دیگر و تبادل ژنتیکی زیاد بین آن‌ها می‌باشد. بر همین اساس، جدایه‌هایی که دارای اختلافات بالای ۲۰ هستند، از نظر ژنتیکی با همدیگر اختلاف بیش‌تری دارند.





شکل ۵- تبارنما (درخت فیلوژنی) رسم شده بر اساس روش UPGMA مربوط به شانزده جدایه Nucleopolyhedrovirus (HaNPV) به دست آمده از لاروهای *Helicoverpa armigera* جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران و گلستان

Fig. 5. Phylogenetic tree based on UPGMA of sixteen isolates of Nucleopolyhedrovirus (HaNPV) obtained from *Helicoverpa armigera* larva collected from Mazandaran and Golestan Provinces

نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر RAPD قادر به تفکیک و جداسازی جمعیت‌ها و جدایه‌های مختلف ویروس HaNPV بوده و ابزار مفیدی در جهت تعیین خویشاوندی و تفکیک بهتر این جدایه‌ها می‌باشد. همچنین، جدول فواصل و تفاوت ژنتیکی موجود بین شانزده جدایه مختلف HaNPV استان‌های مازندران و گلستان نیز بر اساس روش UPGMA تعیین گردید (جدول ۳). نتایج این تحقیق، نشان داد که تقریباً اکثر جدایه‌های HaNPV مورد بررسی از مناطق جغرافیایی نزدیک به یک دیگر، از نظر ژنتیکی نیز در یک گروه درخت فیلوژنی قرار می‌گیرند و با یک دیگر قرابت ژنتیکی بیشتری دارند. همچنین تنوع ژنتیکی مشاهده شده را نمی‌توان کاملاً به توزیع جغرافیایی مربوط دانست، به طوری که در بعضی از جدایه‌هایی که مربوط به مناطق جغرافیایی دورتر از یک دیگر بودند، نیز قرابت ژنتیکی مشاهده شد. همچنین نتایج این تحقیق، نشان داد که نشانگر RAPD قادر به تفکیک و جداسازی جمعیت‌ها و جدایه‌های مختلف می‌باشد و ابزار مفیدی در جهت تعیین خویشاوندی و تفکیک بهتر ایزوله‌های مختلف ویروس HaNPV محسوب می‌شود، به طوری که شناسایی ایزوله‌های مناطق جغرافیایی مختلف را از نظر ژنتیکی تسهیل می‌کند (Geetha and Rabindra, 2000). در مجموع نتایج این تحقیق، نشان‌دهنده کارایی نشانگرهای مولکولی در تعیین قرابت و خویشاوندی و روابط فیلوژنتیکی ایزوله‌ها و جدایه‌های مختلف ویروس HaNPV می‌باشد.

جدول ۳- فواصل ژنتیکی تعیین شده بر اساس روش UPGMA مربوط به شانزده جدایه *Nucleopolyhedrovirus* (HaNPV) به دست آمده از لاروهای *Helicoverpa armigera* جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران و گلستان

Tale 3. Genetic distermined by UPGMA method related to siteen isolates of Nucleopolyhedrovirus (HaNPV) oobtained from *Helicoverpa armigera* larva collected from Mazandaran and Golestan provinces

Isolate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
NPV1	*															
NPV2	34.7	*														
NPV3	28	34.7	*													
NPV4	28	34.7	19.9	*												
NPV5	16.6	34.7	28	28	*											
NPV6	6	34.7	28	28	16.6	*										
NPV7	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3	*									
NPV8	19.5	34.7	28	28	19.5	19.5	46.3	*								
NPV9	10	34.7	28	28	18.8	10	46.3	19.5	*							
NPV10	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	*						
NPV11	19.5	34.7	28	28	19.5	19.5	46.3	10	19.5	50.7	*					
NPV12	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	0	50.7	*				
NPV13	34.7	0	34.7	34.7	34.7	34.7	34.7	34.7	34.7	50.7	34.7	50.7	*			
NPV14	16.6	34.7	28	28	12.4	16.6	46.3	19.5	16.6	50.7	19.5	50.7	34.7	*		
NPV15	10	34.7	28	28	16.6	10	46.3	19.5	10	50.7	19.5	50.7	34.7	16.6	*	
NPV16	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3	0	46.3	46.3	50.7	46.3	50.7	46.3	46.3	46.3	*

### سپاسگزاری

از مسئولین مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش برای فراهم کردن امکانات اجرای آزمایش‌های این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

### References

- Battu, G.S. and Arora, R. 1996.** Genetic Diversity of Baculoviruses-Implications Biotechnological Perspective in Chemical Ecology of Insects. Oxford and IBH Publication Company, Pvt. Ltd., New Delhi.2(4), India.
- Brown, D. A. 1982.** Two naturally occurring nuclear polyhedrosis virus variants of *Neodiprion sertifer* Geoffr.(Hymenoptera: Dipriionidae). Applied Environmental Microbiology 43: 65-69.
- Christian, P.D., Gibb, N., Kasprzak, A.B. and Richards, A. 2001.** A rapid method for the identification and differentiation of *Helicoverpa nucleopolyhedrovirus* (NPV Baculoviridae) isolated from the environment. Journal of Virology Methods 96: 51-65.
- Fakrudin, B., Prakash, S. H., Krishnareddy, K. B., Vijaykumar, Badari Prasad, P. R., Patil, B. V. and Kuruvinashetti, M. S. 2004.** Genetic variation of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) of South Indian cotton ecosystem using RAPD markers. Current Science 87: 1654-1659.

- Geetha, N. and Rabindra, J. 2000.** Genetic variability and comparative virulence of some geographic isolates of nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* Hübner. pp. 65-80. In: Ignacimuthu, S., Sen, A. and Janarthanam, S. (eds.) Biotechnological application for integrated pest management. Oxford and IBH Publication Company, New Delhi, India.
- Getting, R. R. and McCarthy, W. J. 1982.** Genotypic variation among wild isolates of *Heliothis* spp. nuclear polyhedrosis viruses from different geographical regions. *Virology* 117: 242-245.
- Hossein Galal, F. 2009.** Universal primer for early and rapid detection of nucleopolyhedroviruses of multiple species using polymerase chain reaction. *Physiology & Molecular Biology. Egypt. Academical Journal Biology Science*, 1(1): 57-64.
- Jehle, J.A., Lange, M., Wang, H., Zhihong, H., Wang, Y. and Hauschild, R. 2006.** Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology.*, 346:180-193
- Khiaban, N. G. M. Z., Hejazi, M. S., Irani-Nejad, K. H., Mohammadi, S. A. and Khaghaninia, S. 2010.** Genetic variability of geographical populations of the bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), in west and northwest of Iran. *Munis Entomology and Zoology* 5 (2): 670-676.
- Lou, K. F., Weiss, M., Bruckner, P. L., Morrill, W. L., Talbert, L. E. and Martin, J. M. 1998.** RAPD variation within and among geographic population of wheat stem sawfly (*Cephus cinctus* Norton). *Journal of Heredity* 89: 329-35.
- MacDonald, C. and Loxdale, H. D. 2004.** Molecular markers to study population structure and dynamics in beneficial insect (Predators and parasitoids). *International Journal of Pest Management* 50: 215-224.
- McIntosh, A. H. and Ignoffo, C. M. 1983.** Restriction endonuclease analysis patterns of three baculovirus isolated from species of *Heliothis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 41:27-32.
- McIntosh, A. H., Rice, W. C. and Ignoffo, C. M. 1987.** Genotypic Variants in Wild Type Populations of Baculoviruses. PP. 305-325. In: Maramorosch, K. (ed.) *Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture*. Academic Press, San Diego, USA.
- Mehrvar, A. 2007.** Studies on the optimization of persistence and activity enhancement of nuclear polyhedrosis virus against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Thesis submitted to the University of Agricultural Science, Bangalore, India. 268 pp.
- Mehrvar, A., Rabindra, R.J., Veenakumari, K. and Narabench, G.B. 2008.** Molecular and biological characteristics of some geographic isolates of Nucleopolyhedroviruses of *Helicoverpa armigera* (Lep.; Noctuidae). *Journal of Entomological Society of Iran* 28(1): 39-60.
- Nagaraju, J. and Goldsmith, M.R. 2002.** Silkworm genomics-progress and prospects. *Current Science* 83: 415-425.
- Nagaraju, J., Reddy, K.D., Nagaraja, G.M. and Sethurman, B.N. 2001.** Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity* 86: 588-579
- Odak, S. K., Srivastava, D. K., Misra, V. K. and Nema, K. K. 1984.** Preliminary studies on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus on *Heliothis armigera* host in the laboratory and in pot experiments. *Legume Research* 5: 13-17.
- Rabello, A., Queiroz, P., Simoes, K. and Hiragi, C. 2008.** Diversity analysis of *Bemisia tabaci* biotypes: RAPD, PCR-RFLP and Sequencing of the ITS1 rDNA region. *Genetics and Molecular Biology* 31(2):
- Rana, M.K. and Bhat, K.V. 2005.** RAPD markers for genetic diversity study among Indian cotton cultivars. *Current Science* 88: 1961-1982.
- Serrano, G.M., Egito, A.A., Mcmanuc, C. and Marianta, D.S. 2004.** Genetic diversity and line structure of Brazilian native bovine breeds. *Pesq. Agropec. bras. Brazilia.* 39: 543-549.
- Shapiro, M., Fuxa, J. R., Braymer, H.D. and Pashley, D.P. 1991.** DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 96-105.
- Smith, D.B. and Summers, M. D. 1978.** Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology* 89: 517-527.
- Smith, D.B. and Summers, M.D. 1979.** Restriction maps of five *Autographa californica* MNPV DNA with endonuclease SmaI, BamHI, XhoI and ECOR I. *Journal of Virology* 30: 828-838.
- Williams, C. F. and Payne, C. 1984.** The susceptibility of *Heliothis armigera* larvae of three nuclear polyhedrosis viruses. *Annals of Applied Biology* 104: 405-412.
- Wood, H.A. and Robert, R.G. 1991.** Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annual Review of Microbiology* 45: 69-87.

**Zalucki, M. P., Darglish, G., Firempong, S. and Twine, P. 1986.** The biology and ecology of *Heliothis armigera* (hubner) and *H. punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Austrialian. What do we know? Austrialian Journal of Zoology 34: 779-814.