بررسی چند شکلی‌های DNA بین جمعیت‌های سن گندم Eurygaster integriceps put. در ایران با استفاده از روش RAPD - PCR

زریر سعیدی، مرتضی اسماعیلی، سیروس عبدمیشانی،
غلامعباس عبداللّهی و خلیل طالبی

بترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، استادان گروه گیاهپزشکی و زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، پژوهنده مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی و استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۸/۲/۱

خلاصه

برای تعیین چند شکلی‌های DNA در جمعیت‌های سن گندم، Eurygaster intergriceps put. (scutelleridae : Heteroptera) حشرات کامل این گونه از مناطق قادرآباد فارس، مبارکه اصفهان، جیرفت، کرج، ورامین، مشهد، بروجرد، کرمانشاه و مغان جمع آوری شدند. استخراج DNA از حشرات کامل ماده پارازیته نشده با انجام تغییراتی در روش مینی‌پرپ صورت گرفت. برای انجام واکنش PCR، ۲۰ آغازگر بطور تصادفی انتخاب و بر روی نمونه‌ها آزمایش گردید. آغازگرهای UB1 ,UB2 ,UB58 و UB62 تکثیر DNA الگو را به خوبی انجام دادند بنابراین برای تجزیه و تحلیل نهایی مورد استفاده قرار گرفتند. گروه‌بندی نمونه‌ها بر اساس ضریب تشابه Jaccard صورت گرفت. طبق نتایج بدست آمده جمعیت‌های کرج، ورامین، اصفهان و فارس در یک گروه، جمعیت‌های بروجرد و کرمانشاه در یک گروه و جمعیت‌های مغان، جیرفت و مشهد نیز هر کدام در گروههای جداگانه‌ای قرار گرفتند. بیشترین تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های غرب کشور (بروجرد و کرمانشاه) و جنوب شرق کشور (جیرفت) و کمترین تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های اصفهان و فارس دیده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سن گندم و چند شکلی‌های DNA

مقدمه

سن گندم از مهمترین آفات غلات دانه‌ریز در ایران و بسیاری از کشورهای منطقه است و هر ساله میلیاردها ریال صرف مبارزه شیمیایی با آن میشود .از طرفی مصرف حدود یک میلیون لیتر حشره‌کش فنیتریتیون در اکوسیستم‌های کشور علاوه بر صرف مبلغ هنگفتی از بودجه مملکت باعث از بین بردن پارازیت‌ها و پرداتورهای مفید مزارع غلات، طغیان سایر آفات و آلوده‌سازی محیط زیست نیز می‌شود. برای کنترل منطقی سن گندم استفاده از روشهای دیگر مبارزه به خصوص ارقام مقاوم و کنترل بیولوژیک مدنظر می‌باشد. برای دستیابی به این روش‌ها و در نهایت مدیریت کنترل انبوهی جمعیت آفت، گروه‌بندی جمعیت‌های سن گندم که براساس آن بتوان ویژگی‌های رفتاری و بیولوژیکی این گروهها را بررسی نمود، امری ضروری است.

تاکنون گروه‌بندی جمعیت‌های سن گندم فقط براساس خصوصیات ظاهری و اکولوژیکی استوار بوده است. آرنولدی[1] براساس خصوصیات اکولوژیک افراد گونه *E.integriceps* را در

1 - Arnoldi

اتحاد جماهیر شوروی سابق به سه بیوتیپ تقسیم کرد. نخست افرادی که از کوه به مزرعه مهاجرت می‌کنند، دوم آنهایی که بطور دائمی در کوه می‌مانند و سومین گروه نیز مهاجرت نکرده و روی غلات دشتهای مجاور جنگل بسر می‌برند (۲).

بریانت سوا[1] براساس اندازه‌های مطلق و نسبی نوزده خصوصیت مرفولوژیک، جمعیت‌های گونه *E.integriceps* در مناطق تاجیکستان، آذربایجان، خارکف و کریمه را به سه گروه اکوتیپ مناطق مرتفع، اکوتیپ مناطق پست و اکوتیپ مهاجر تقسیم نمود (۲).

استفاده از نشانگرهای ژنتیکی[2] برای مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های حشرات و گروه‌بندی آنها از سال ۱۹۵۰ آغاز شده است. استفاده از allozyme به دلیل سطح پائین چند شکلی‌های مشاهده شده در بسیاری از گروههای حشرات، محدودیت دارد (۴ و ۱۱). استفاده از روش RFLP[3] به دلیل نیاز به مقدار زیاد DNA ژنومی، طولانی بودن زمان انجام آزمایش، هزینه زیاد و خطرات ناشی از استفادهٔ مواد رادیواکتیو نیز محدودیت دارد (۱). روشهایی که بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[4] (PCR) هستند به علت نیاز داشتن به اطلاعات کافی در مورد DNA هدف، در حشرات که معمولاً اطلاعات قبلی کمی درباره توالی DNA آنها وجود دارد، کاربرد چندانی ندارند.

روش RAPD - PCR که اولین بار توسط دو گروه تحقیقاتی مستقلاً و بطور همزمان ابداع گردید (ویلیامز و همکاران در شرکت دوپونت[5] و ولش و همکاران در مؤسسه تحقیقات زیست‌شناسی کالیفرنیا) به خاطر ویژگیهایی از قبیل نیاز نداشتن به اطلاعات قبلی در زمینه بیوشیمی و بیولوژی مولکولی گونه‌های مورد مطالعه و همچنین سرعت و سهولت آن نقش مهمی در مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های حشرات دارد. از این روش برای مطالعات ژنتیکی در حشرات مختلف نظیر ملخ‌ها (۸)، شته‌ها (۵ و ۷)، زنبورهای پارازیتوئید (۱۲)، کفشدوزکها (۱۵)، سوسک‌های پوستخوار Ips grandicollis (۱۰) و بیدکلم Plutella xylostella (۱۱) استفاده شده است.

در این مقاله استفاده از روش RAPD - PCR را برای بررسی چندشکلی‌های DNA بین جمعیت‌های سن گندم در ایران شرح داده می‌شود.

مواد و روشها

جمعیت‌های مورد مطالعه: حشرات کامل سن گندم از مناطق قادرآباد فارس، مبارکه اصفهان، جیرفت، کرج، ورامین، مشهد، بروجرد لرستان، کرمانشاه و مغان به صورت تصادفی جمع‌آوری شدند. بجز دو جمعیت آخر (کرمانشاه و مغان) بقیه نمونه‌ها به صورت زنده جمع‌آوری و تا زمان استخراج DNA در ۲۰°C - نگهداری شدند. ولی در مورد نمونه‌های مغان و کرمانشاه استخراج DNA از حشرات مرده صورت گرفت.

جداسازی DNA: استخراج DNA از حشرات کامل ماده پارازیته نشده صورت گرفت. بدین منظور حشرات کامل در هاون چینی با ۳۵۰ میکرولیتر بافر استخراج کننده (۱۰۰ میلی‌مول تریس[6] با pH = ۸، ۵۰ میلی‌مول EDTA با pH = ۸، ۵۰۰ میلی‌مول کلرورسدیم، ۱/۲۵٪ SDS، ۲۰ میلی‌مول بی سولفات سدیم) در حضور مقدار کمی سلیس شسته شده با اسید، له شدند و به یک لوله میکروفیوژ[7] منتقل و هاون چینی با ۳۵۰ میکرولیتر بافر استخراج کننده، شسته شد. به هر یک از لوله‌ها ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنزیم پروتئیاز K[8] اضافه کرده و به مدت ۱۵ - ۱۲ ساعت در دمای ۳۷°C نگهداری شدند لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه وارد آب گرم (۶۵°C) شدند سپس به هر لوله ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مول افزوده و آنها را تکان داده و به مدت ۱۵ دقیقه در صفر درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر فنل/کلروفرم اضافه نموده و پس از تکان دادن لوله‌ها، به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ صورت گرفت. مایع رویی به یک لوله جدید منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل افزوده و به مدت ۲ دقیقه به حال خود گذاشته شد. برای توده شدن DNA، ۵ دقیقه سانتریفوژ صورت گرفت مایع درون لوله خالی شد و DNA چسبیده به جدار باقی ماند. DNA را با اتانول ۷۰٪ شسته و پس از خشک شدن در ۱۰۰ میکرولیتر TE (۱۰ میلی‌مول تریس، ۱/. میلی‌مول

1 - Briant Soa
2 - Genetic marker
3 - Restriction Fragment Length Polymorphism
4 - Polymerase Chain Reaction
5 - Dupont
6 - Tris
7 - Microfuge
8 - Proteinase K

EDTA) حل گردید.

غلظت DNA نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر[1] در طول ۲۶۰ نانومتر تعیین گردید.

دستورالعمل‌های RAPD: مخلوط واکنش (۲۵ میکرولیتر) شامل ۱۲/۹ میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده استریل، ۲/۵ میکرولیتر بافر X۱۰، ۲ میکرولیتر dNTP (۱/۲۵ میلی‌مول برای هر یک)، ۱/۹ میکرولیتر کلرور منیزیم (۲۵ میلی‌مول)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر (۱۰ میکرومول)، ۲/. میکرولیتر Taq DNA Polymerase (۵ واحد در میکرومول) و ۵ میکرولیتر DNA (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر) بود. مخلوط با ۴۰ میکرولیتر روغن معدنی پوشانده شد. تکثیر DNA در میکروتیوب‌های[2] ۵۰۰ میکرولیتری انجام گرفت. آنها را در ترموسیکلر[3] پرکین المر/ستوس[4]، قرار داده و چرخه دمایی زیر به آن داده شد.

۹۴°C	۲ دقیقه	
۹۲°C	۱ دقیقه	۴۵ چرخه
۳۵°C	۱ دقیقه	۴۵ چرخه
۷۲°C	۱ دقیقه	۴۵ چرخه
۳۵°C	۱ دقیقه	
۷۲°C	۵ دقیقه	

فرآورده‌های تکثیر شده بر روی ژل آکریل‌آمید ۶ درصد تزریق شدند و الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۲۰۰ ولت صورت گرفت. سپس ژلها در اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و در زیر نور ماوراء بنفش باندها مشاهده گردیدند.

آغازگرهای مورد استفاده: ۲۰ آغازگر به طور تصادفی انتخاب و بر روی نمونه‌ها آزمایش شد، آغازگرهای مورد استفاده از دانشگاه بریتیش کلمبیا، کانادا خریداری شدند. توالی بازی این آغازگرها در جدول ۱ آمده است.

گروه‌بندی نمونه‌ها: برای گروه‌بندی نمونه‌ها ابتدا اندازه حرکت نسبی هر یک از باندها از محل چاهکها اندازه‌گیری شد و سپس کدگذاری با اعداد صفر و یک انجام گرفت (صفر = باند وجود ندارد، یک = باند وجود دارد).

تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه Jaccard صورت گرفت.

$$Srt = a/(a+b+c)$$

Srt = ضریب تشابه بین دو فرد r و t

a = صفت مشترک بین دو فرد r و t (صفتی که در هر دو کد یک را دارد).

a + b + c = تعداد کل صفات مورد اندازه‌گیری در هر دو فرد به جز صفاتی که در هر دو کد صفر را داراست.

جدول ۱ - توالی بازی ۲۰ آغازگر مورد استفاده در آزمایش PAPD

آغازگر	توالی بازی 5´ ____ 3´
UB_1	CCT GGG CTTC
UB_2	CCT GGG CTTG
UB_3	CCT GGG CTTA
UB_4	CCT GGG CTGG
UB_5	CCT GGG TTCC
UB_6	CCT GGG CCTA
UB_{10}	GGG GGG ATTA
UB_{27}	TTT GGG GGGA
UB_{38}	CCG GGG AAAA
UB_{50}	TTC CCC GCGA
UB_{54}	GTC CCA GAGC
UB_{55}	TCC CTC GTGC
UB_{58}	TTC CCG GAGC
UB_{60}	TTG GCC GAGC
UB_{62}	TTC CCC GTCG
UB_{63}	TTC CCC GCCC
UB_{81}	GAG CAC GGGG
UB_{83}	GGG CTC GTGG
UB_{90}	GGG GGT TAGG
UB_{100}	ATC GGG TCCG

1 - Spectrophotometer
2 - Microtube
3 - Thermocycler
4 - Perkin - Elmer / Cetus

نتایج و بحث

از ۲۰ آغازگری که به طور تصادفی انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفت تعدادی نتوانستند باعث تکثیر DNA الگو شوند، و تعدادی دیگر باندهای ضعیف و غیر مشخص ایجاد نمودند. ولی آغازگرهای UB58, UB2, UB1 و UB62 تکثیر DNA الگو را به خوبی انجام دادند. بنابراین برای بررسی چند شکلی‌های DNA بین جمعیت‌های سن گندم مورد استفاده قرار دادیم. الگوهای باندی به دست آمده توسط این آغازگرها در شکل ۱ نمایش داده شده است.

تجزیه خوشه‌ای[1] را براساس ضریب تشابه Jaccard صورت گرفت و ضرایب تشابه بدست آمده بین جمعیت‌ها در جدولهای ۲ و ۳ آمده است. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA[2] در شکل‌های ۲ و ۳ نمایش داده شده است. محور تشابه در نقاط مختلف برش داده شد و بهترین برش در شکل ۲ ناحیه ۳۱/ ≥ S ≥ ۲۳/ و در شکل ۳ ناحیه ۳/ ≥ S ≥ ۲۲/

جدول ۲ - ضرایب تشابه بدست آمده بین جمعیت‌های مختلف سن گندم. محاسبه شده از الگوهای باندی آغازگرهای UB58, UB2, UUB1, B62 و

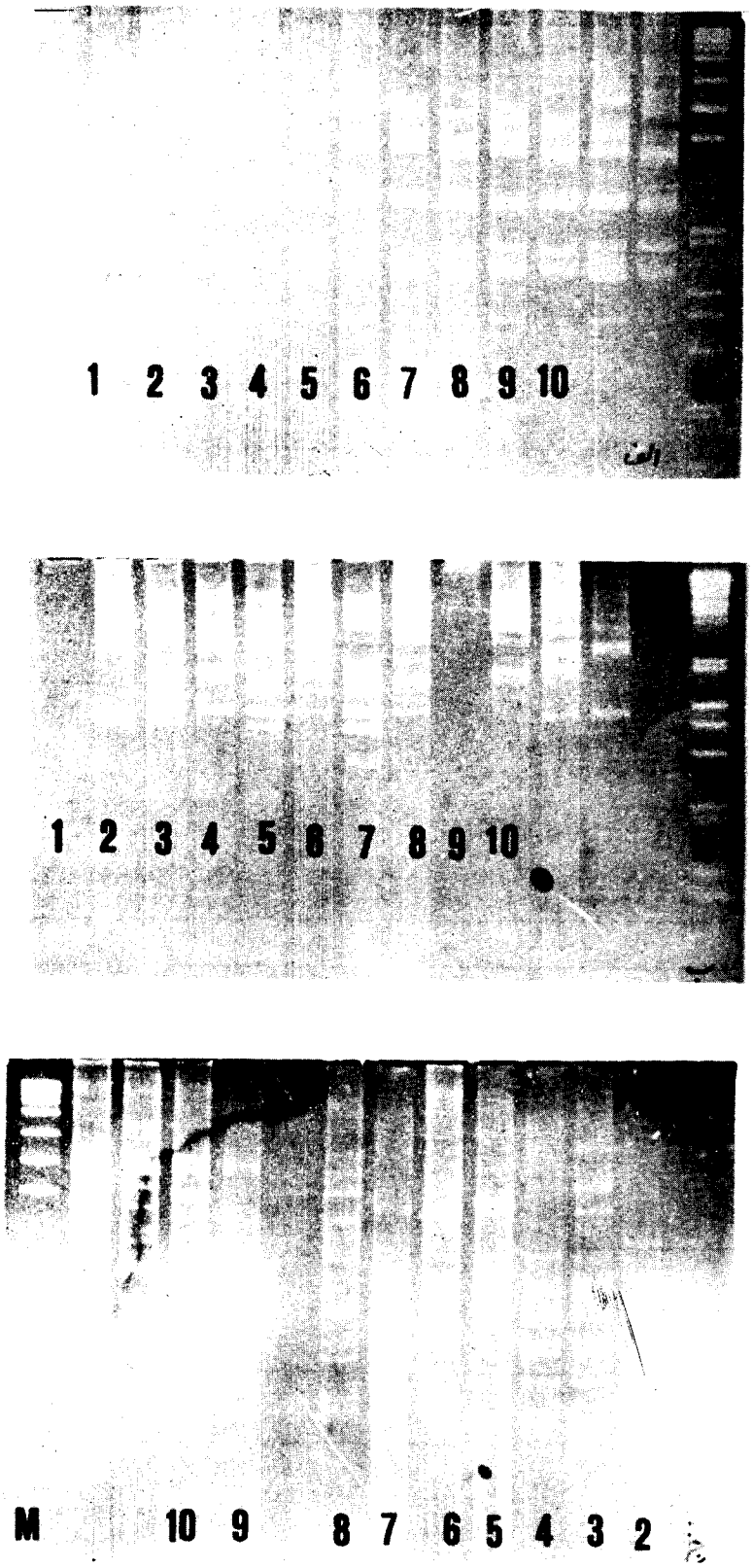
	جیرفت	فارس	اصفهان	کرج	ورامین	مشهد	بروجرد	مغان
جیرفت	۱/۰۰							
فارس	۰/۰۷	۱/۰۰						
اصفهان	۰/۱۵	۰/۴۳	۱/۰۰					
کرج	۰/۱۱	۰/۲۹	۰/۴۲	۱/۰۰				
ورامین	۰/۱۳	۰/۲۹	۰/۳۰	۰/۳۲	۱/۰۰			
مشهد	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۲۲	۰/۱۸	۱/۰۰		
بروجرد	۰/۰۶	۰/۱۵	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۱۹	۰/۱۹	۱/۰۰	
مغان	۰/۱۷	۰/۲۰	۰/۲۷	۰/۲۴	۰/۱۶	۰/۱۵	۰/۰۷	۱/۰۰

جدول ۳ - ضرایب تشابه بدست آمده بین جمعیت‌های مختلف سن گندم. محاسبه شده از الگوهای باندی آغازگرهای UB58, UB2, UB62

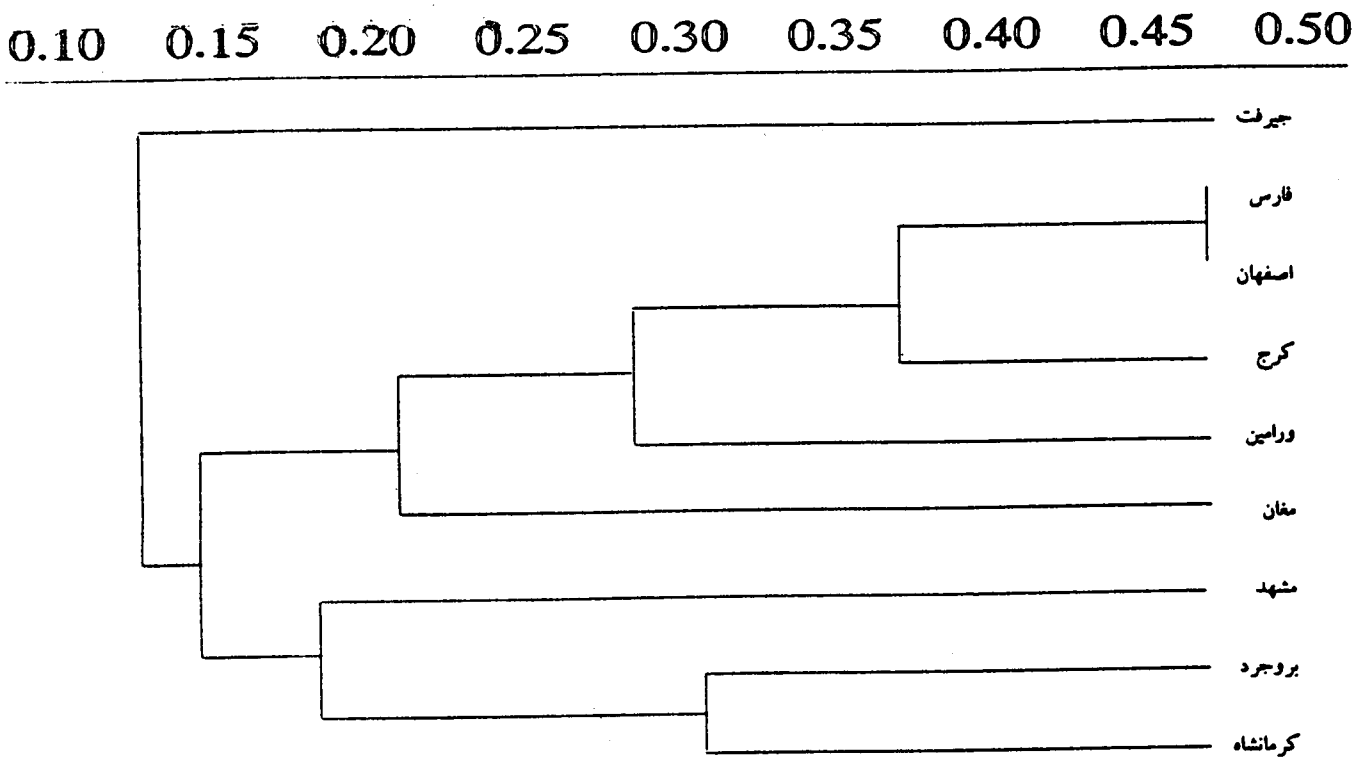
	جیرفت	فارس	اصفهان	کرج	ورامین	مشهد	بروجرد	کرمانشاه	مغان
جیرفت	۱/۰۰								
فارس	۰/۱۰	۱/۰۰							
اصفهان	۰/۱۷	۰/۵۰	۱/۰۰						
کرج	۰/۱۶	۰/۲۸	۰/۵۰	۱/۰۰					
ورامین	۰/۲۰	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۲۹	۱/۰۰				
مشهد	۰/۱۹	۰/۱۷	۰/۱۶	۰/۱۵	۰/۱۵	۱/۰۰			
بروجرد	۰/۰۹	۰/۱۳	۰/۱۶	۰/۱۲	۰/۱۵	۰/۱۸	۱/۰۰		
کرمانشاه	۰/۰۸	۰/۲۹	۰/۲۵	۰/۲۰	۰/۱۷	۰/۲۳	۰/۳۳	۱/۰۰	
مغان	۰/۲	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۲۶	۰/۱۹	۰/۱۵	۰/۱۰	۰/۱۷	۱/۰۰

1 - Cluster analysis

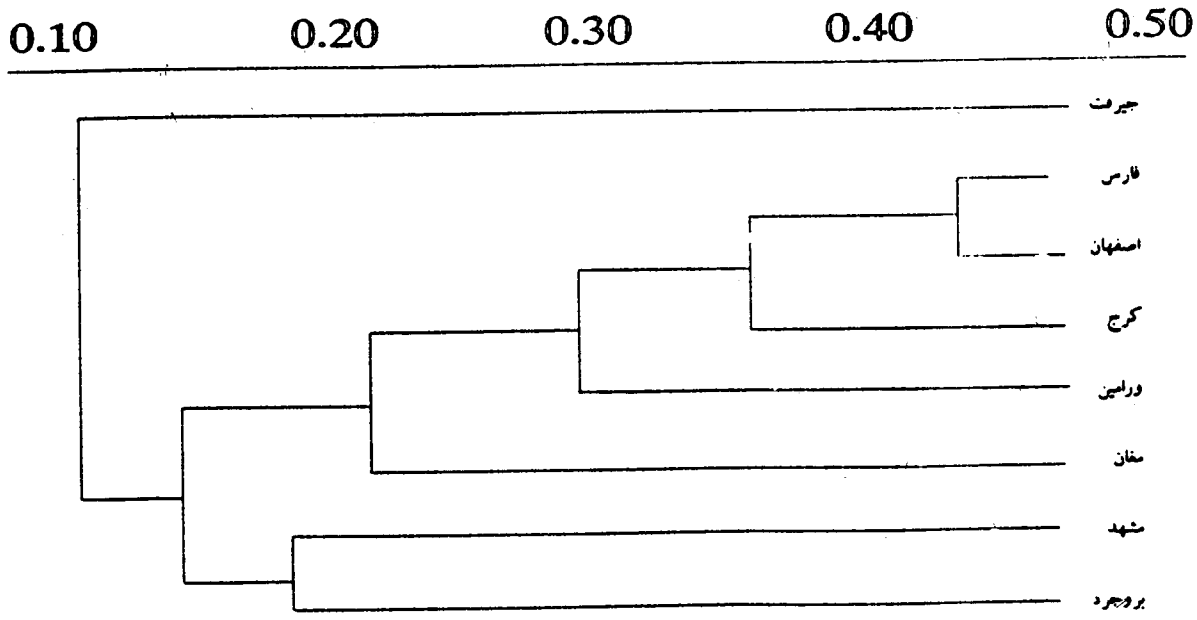
2 - Unweighted paired group method using arithmeti average



شکل ۱ ـ الگوی باندی بدست آمده براساس آغازگرهای (الف) UB58، (ب) UB1 و (ج) UB2. ام = نشانگر، شماره ۱ = E. maura از گرگان و شماره‌های ۲ تا ۱۰ بترتیب نمونه‌های E. integriceps از مناطق جیرفت، فارس، اصفهان، کرج، ورامین، مشهد، بروجرد، کرمانشاه و مغان می‌باشند.



شکل ۲ - دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مربوط به آغازگرهای UB58, UB2 و UB62



شکل ۳ - دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مربوط به آغازگرهای UB2, UB1, UB58 و UB62

تشخیص داده شد که در هر دو حالت پنج گروه به شرح زیر وجود خواهد داشت.

گروه اول: جمعیت جیرفت.

گروه دوم: شامل جمعیت‌های فارس،اصفهان، کرج و ورامین است که در این گروه، زیر گروه فارس و اصفهان بیشترین شباهت را بایکدیگر دارند.

گروه سوم: جمعیت مغان.

گروه چهارم: جمعیت مشهد.

گروه پنجم: شامل جمعیت‌های کرمانشاه و بروجرد.

طبق نتایج بدست آمده بیشترین تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های غرب کشور (کرمانشاه و بروجرد) با جمعیت جنوب شرق کشور (جیرفت) دیده می‌شود و کمترین تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های اصفهان و فارس دیده می‌شود و می‌توان چنین گفت که جمعیت‌هایی که در مناطق جغرافیایی و اکولوژیکی متفاوتی هستند و در گروههای جداگانه و جمعیت‌هایی که تحت تأثیر فشار محیطی مشابهی در یک گروه قرار گرفته‌اند.

می‌توان چنین بیان نمود که گسترش سطح انتشار سن گندم در کشور ما با ویژگیهای جغرافیایی و اقلیمی متفاوت باعث شده است که در اثر ایزولاسیون جغرافیایی و عدم امکان اختلاط جمعیت‌ها گروههای متفاوتی بوجود آید که این گروهها به احتمال زیاد از لحاظ خصوصیات میکرومرفولوژیک، فیزیولوژیک، بیولوژیک و رفتاری با یکدیگر اختلاف دارند. لذا تاکتیکهای خاص کنترل جمعیت آفت از جمله بکار بردن ارقام مقاوم گندم، کنترل بیولوژیک و ... نمی‌توانند به یک اندازه بر روی این جمعیت‌ها مفید واقع شوند، لذا شناسایی این گروهها در کاربرد تکنیک‌های مبارزه از اهمیت زیادی برخوردار است.

بررسی‌های انجام شده در این مقاله این امکان را بوجود آورده است که با سرعت بیشتری تاکتیک‌های خاص کنترل آفت را بر روی پنج گروه بدست آمده بررسی کرده و براساس آن مدیریت کنترل انبوهی جمعیت آفت را در مناطق مختلف برنامه‌ریزی نمود.

از بررسی انجام شده برای گروه‌بندی جمعیت‌های سن گندم در ایران چنین برداشت می‌شود که روش RAPD - PCR به همراه روشهای آماری چند متغیره مثل تجزیه خوشه‌ای، پتانسیل قابل توجهی جهت بررسی روابط خویشاوندی، تکاملی، تنوع ژنتیکی و جغرافیایی حشرات دارد. برای مثال در گروههای دوم و پنجم جمعیت‌هایی در کنار هم قرار گرفته‌اند که منشأ جغرافیایی یکسانی دارند.

بطور خلاصه روش RAPD - PCR به دلیل داشتن ویژگیهای زیر می‌تواند نقش مهمی در مطالعات ژنتیکی حشرات داشته باشد.

- پتانسیل قابل توجهی جهت تشخیص سریع چند شکلی‌های DNA دارد. بلاک و همکاران (۵) روشی را پیشنهاد کردند که قادر است اطلاعات ژنتیکی شته‌ها را در مدتی کمتر از ۲۴ ساعت جستجو کند. همچنین کوگناتو و همکاران (۱۰) بیان داشتند که روش RAPD - PCR برای تشخیص سریع گونه‌های sibling خصوصاً در جمعیت‌های Sympatry بسیار مفید است.
- در مقایسه با روش RFLP ارزانتر است و به دلیل عدم استفاده از مواد رادیواکتیو خطر کمتری دارد (۱۶ و ۱۷).
- نیاز به مقدار بسیار اندکی DNA الگو دارد، بنابراین اهمیت بسیار زیادی در سیستماتیک نمونه‌های موزه (۱۳) و حشرات با جثه خیلی ریز نظیر Microhymenoptera دارد (۱۱).
- برخلاف PCR نیاز به اطلاعات قبلی در زمینه بیوشیمی و بیولوژی مولکولی گونه‌های مورد مطالعه ندارد و آغازگرها بدون توجه به ژنومی که انگشت‌نگاری می‌شود انتخاب می‌شوند (۱۶).

در مقابل، روش RAPD - PCR دارای اشکالات زیر نیز هست:

- نشانگرهای RAPD قادر به تشخیص هموزیگوت‌ها از هتروزیگوتها نیستند (۱۷)، بنابراین در مطالعه آزمایشگاهی رقابت بین دو نژاد (مثلاً کفشدوزکها یا سایر پارازیت‌ها و پرداتورها) بهتر است دو نژاد به طور قطعی مجزا از هم داشته باشیم.
- اشکال دیگر RAPD عدم تکرارپذیری برخی از باندهاست.

با توجه به مطالعه بحث شده می‌توان چنین بیان کرد که روش PARD - PCR به دلیل ویژگیهای خاصی که دارد، در مطالعات ژنتیکی حشرات که معمولاً اطلاعات قبلی کمی در مورد بیوشیمی و بیولوژیکی مولکولی آنها وجود دارد نقش بسیار مهمی دارد. از این روش تاکنون در بسیاری از مطالعات ژنتیکی بندپایان خصوصاً کنه‌ها و راسته‌های مختلف حشرات استفاده شده است.

سپاسگزاری

از شورای پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر تأمین اعتبار این تحقیق و از همکاری گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱ - عبد میشانی، س. ۱۳۷۴. استفاده از تکنیک PCR به عنوان مارکر DNA در براسیکا. مجله علوم کشاورزی ایران. ۲۶ (۱) :۵۵ - ۶۰.

۲ - محقق نیشابوری، ج. ۱۳۷۰. بازنگری سیستماتیک و بیولوژیک در گونه‌های جنس Eurygaster در ایران. دانشگاه تهران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. ۱۴۰ صفحه.

3 - Abdmishani, C. 1993. RAPD protecol for wheat and barley . Qualset Lab UC - Davis. 3 pp.

4 - Anonymous. 1993. DNA miniprep isolation for RAPD (modified from dellaporta). Qualset Lab UC - Davis. 2 pp.

5 - Black, I. V., N. M. Duteau, G. J. Puterka, J. R. Nechols, & J. M. Pettorini. 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chin reaction to detect DNA polymorphisms in Aphids. Bull. Entomol. Res. 82:151-159.

6 - Bogdanowics, S. M., W. E. Wallner, J. Bell, T. M. Odell, & R. G. Harrison. 1993. Asian gypsy moth (Lepidoptera:Lymanteriidae) in north America: Evidence from molecular data. Ann. Entomol. Soc. Am. 86:710-715.

7 - Cenis, J. L., P. Perza, & A. Ferers. 1993. Identification of Aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. Ann. Entomol. Soc. Am. 86:545-550.

8 - Chapco, W. N., W. Ashton, R. K. B. Martel, & N. Antonishyn. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. Genome. 35:569-570.

9 - Chatfield, C., & A. J. Collins. 1995. Introduction to multivariate analysis. Chapman and Hall Publicatin. London- 246pp.

10 - Cognato, A. I., S. O. Regers, & S. A. Teale. 1995. Species diagnosis and phylogeny of the *Ips grandicollis* group (Coleoptera: Scolytidae) using random amplified polymorphic DNA. Ann. Entomol. Soc. Am. 88:397-405.

11 - Heckel, D. G., L. J. Gahan, B. E. Tabashnik, & M. W. Johnson. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA differences between strains of diamond back moth susceptible or resistant to Baccillus thuringiensis. Ann. Entomol. Soc. Am. 88:531-537.

12 - Landry, B. S., L. Dextraze, & G. Bovin. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assesment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. Genome: 36:580-587.

13 - Pfeir, T. A., L. M. Humbel, M. Ring, & T. A. Grigliatti. 1995. Characterization of gypsy moth population and related species using a nuclear DNA marker. Canadian Entomol. 127:49-58.

14 - Phillips, A. J., & C. Simon. 1995. Simple, efficient and nondestructive DNA extraction protocol for arthropods. Ann. Entomol. Soc. Am. 88:281-283.

15 - Reohrdanz, R. L., & R. V. Flanders. 1993. Detection of DNA polymorphisms in predatory Coccinellids using polymerase chain reaction and arbitrary primers (RAPD - PCR). Entomophaga. 38:497-491.

16 - Waugh, R., & W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvment. Trends in Biotech. 10:186-190.

17 - Welsh, J., & M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.

18 - Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, & S. C. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

Detection of DNA Polymorphisms Between Populations of *Eurygaster Integriceps Put.* In Iran using RAPD - PCR

Z. SAEEDI, M. ESMAILI, C. ABD-MISHANI, GH. ABDOLLAHI AND KH. TALEBI

Former Graduate Student, Professors of Agriculture, University of Tehran, Plant Pests and Diseases Research Institute and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran.

Accepted Apr. 21, 1999

SUMMARY

To identify DNA polymorphisms in Sunn pest populations in different regions of IRAN, non parasitized adult females were collected from Fars, Esfahan, Jiroft, Karadj, Varamin, Mashhad, Boroojerd, Kermanshah and Moghan. DNA was extracted by miniprep method. In this study twenty primers were selected at random and tested on each sample. For analysis of data primers: UBI, UB2, UB58 and UB62 were selected. These primers amplified template DNA satisfactorily. Grouping was done based on Jaccard's similarity coefficient. These analyses indicated that populations of Karadj, Varamin, Esfahan and Fars stand in one group and populations of Boroojerd and Kermanshah are in another group, while populations of Moghan, Jiroft and Mashhad go to separate groups. The most genetical differences could be identified in populations of Kermanshah and Boroojerd versus population of Jiroft and the least genetical differences could be identified between Fars and Esfahan populations.

Keywords: Sunn Pest & DNA Polymorphisms.