DOI: http://dx.doi.org/10.22092/bcpp.2016.105939

مقاله‌ی کوتاه علمی

گروه‌بندی فیلوژنتیکی برخی جدایه‌های نوکلئوپلی‌هیدروویروس کرم غنچه‌ی توتون (HaNPV) شمال ایران با استفاده از نشانگر RAPD

مرضیه شازده احمدی[1]، هدی عاصمی[1]، زین العابدین شهادتی مقدم[1]، سید افشین سجادی[1]، محمدرضا رضاپناه[2]

۱- مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش

۲- بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

مسئول مکاتبات: مرضیه شازده احمدی، پست الکترونیک: Noshinshazdeahmadi@Yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۴/۲۱ ۳ (۲) ۱۲۳-۱۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۴

چکیده

به‌منظور غربال و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های نوکلئوپلی‌هدروویروس جمع‌آوری شده از کرم غنچه توتون از برخی مزارع توتون استان‌های مازندران و گلستان، از بین ۱۰ آغازگر RAPD ده جفت بازی ساخت شرکت Operon به‌طور تصادفی ، دو جفت آغازگر OPM-03 و OPM-16 که بیشترین چندشکلی را در بین جدایه‌ها نشان دادند، انتخاب شدند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار PyElph و به‌روش UPGMA انجام و درخت فیلوژنی و جدول فواصل ژنتیکی رسم شد. تجزیه‌ی خوشه‌ای داده‌های مولکولی توانست جدایه‌ها را در فاصله‌ی ژنتیکی ۲۰ به‌پنج گروه مجزا تقسیم بندی کند و می‌تواند در غربال جدایه‌های نوکلئوپلی هدروویروس به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک در کنترل کرم غنچه‌ی توتون، کرم قوزه‌ی پنبه، کرم میوه‌خوار گوجه‌فرنگی نقش ایفا نماید.

واژه‌های کلیدی: نوکلئوپلی‌هدروویروس، کرم غنچه‌ی توتون، روابط فیلوژنتیکی، نشانگر RAPD

مقدمه

با عنایت به‌اهمیت نوکلئوپلی‌هدروویروس یا ویروس چندوجهی هسته‌ای (HaNPV) در کنترل بیولوژیک کرم غنچه‌ی توتون (Assemi *et al.*, 2012) و ضرورت غربال جدایه‌های برتر، بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های مختلف این ویروس اهمیت می‌یابد. کما این‌که بررسی جمعیت و مطالعه‌ی روابط خویشاوندی جمعیت‌های نواحی مختلف، به‌کنترل بهتر آفات کمک نموده و خود نیازمند دانش دقیق جمعیت شناسی و ترکیب ژنتیکی جمعیت و گونه است (Assemi *et al.*, 2013, Khiaban *et al.*, 2010, Fakurdin *et al.*, 2004 and Getting & McCarthy, 1982). در سال‌های اخیر استفاده از نشانگرهای مولکولی به‌عنوان ابزاری جهت تعیین تنوع ژنتیکی و ارزیابی مکان‌های ژنی مؤثر بر صفات مهم و تهیه ی نقشه پیوستگی ژن‌ها به‌کار می‌روند (Jehle *et al*, 2006). ازجمله نشانگرهای مبتنی بر PCR، نشانگرهای RAPD هستند که جهت تشخیص تنوع و تغییرات بین جمعیت‌ها و گونه‌ها مفید می‌باشند. با استفاده از نشانگر RAPD دستیابی به‌اطلاعات سریع‌تر بوده و در شناسایی ارقام و گونه‌های مختلف گیاهان و آفات، ارتباط ژنتیکی و فیلوژنتیکی آن‌ها کاربرد دارد. در سال ۲۰۰۰، با استفاده از ۱۵ آغازگر RAPD تنوع ژنتیکی ۱۰ جمعیت مختلف HaNPV مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه شش لاین از ده لاین بسیار مشابه بودند و بیش از ۹۰ درصد تشابه ژنتیکی داشتند و بین لاین‌های مختلف ۶۸ درصد چندشکلی دیده شد (Geetha & Rabindra, 2000). ارزیابی مولکولی و بیولوژیک هفت جدایه HaNPV متعلق به‌کشور هندوستان بر روی آفت گوجه فرنگی و پنبه‌با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و آنالیز جداگانه با چهار نوع آنزیم برشی (شامل HindIII، BamHI، PstI و EcoRI)، نشان دهنده‌ی

وجود تنوع ژنتیکی بین این جدایه‌ها بود (Mehrvar *et al.*, 2008). در پی مطالعات (Assemi *et al.*, 2012 & 2013) هدف از این تحقیق، غربال و بررسی اولیه اختلافات جغرافیایی، جایگاه سیستماتیکی و روابط فیلوژنتیکی و خویشاوندی جدایه‌های HaNPV در استان‌های مازندران و گلستان با استفاده از نشانگر RAPD می‌باشد.

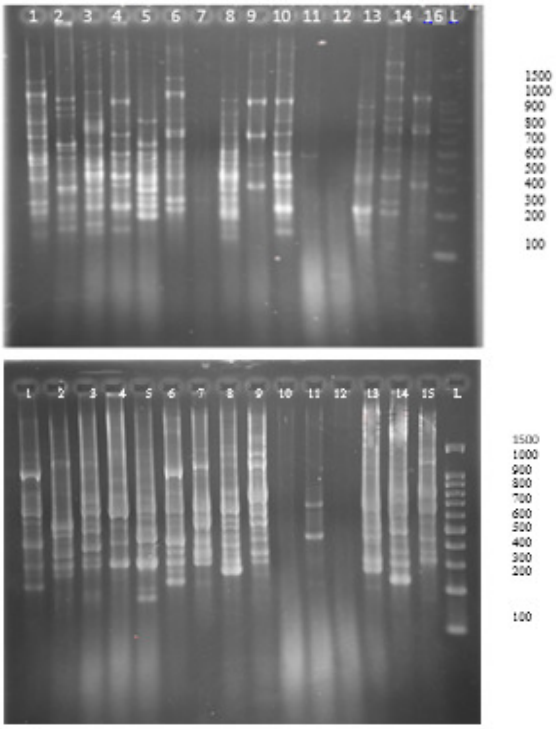
مواد و روش‌ها

دراین تحقیق، به‌منظور جمع‌آوری لاروهای آلوده به HaNPV با علائم شل و آبکی بودن بدن، مرده و آویزان شدن از گل آذین توتون، عملیات نمونه برداری صورت گرفت. نمونه‌ها جهت انجام مراحل بعدی کار به‌آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش منتقل شدند و پس از خالص سازی به‌روش Jehle *et al.* (2006) استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB (با اندکی تغییرات) انجام گرفت. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های HaNPV، از ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD (10bp) تهیه شده از شرکت اپرون، استفاده گردید. پس از آماده‌سازی برای PCR، دمای آنیلینگ آن‌ها با چند نوبت PCR آزمایشی تعیین گردید. در نهایت، بعد از تست اولیه این ۱۰ آغازگر روی DNA جدایه‌های مختلف،از بین آن‌ها دو جفت آغازگر RAPD به‌نام‌های OPM-03 و OPM-16 که بیشترین چندشکلی (پلی مورفیسم) را نشان دادند، انتخاب شدند و بر روی ۱۶ نمونه DNA مربوط به‌جدایه‌های مناطق مختلف جغرافیایی استان‌های مازندران و گلستان، در PCR استفاده شد. در ادامه کار با توجه به‌تصاویر تهیه شده از ژل‌های الکتروفورز محصولات RAPD-PCR به‌وجود یا عدم وجود باندها به‌ترتیب شاخص ۱ و صفر داده شد. این اطلاعات با نرم افزار Excel جمع بندی و سپس تجزیه‌ی کلاستر و آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار PyElph و به‌روش UPGMA انجام گرفت. همچنین جدول محاسبه‌ی فواصل ژنتیکی موجود بین شانزده جدایه‌ی مناطق جغرافیایی مختلف HaNPV نیز با استفاده از نرم افزار PyElph و به‌روش UPGMA رسم گردید.

نتایج

الگوی باندهای حاصل از دو آغازگر تصادفی RAPD روی شانزده جدایه HaNPV متعلق به‌مناطق مختلف استان‌های مازندران و گلستان در شکل نشان داده شده است.

نتایج به‌دست آمده نشان داد که هر دو آغازگر RAPD مورد استفاده نوارهای قابل کدگذاری ایجاد کردند که در مجموع ۸۰ باند قابل امتیازدهی به‌دست آمد که تعداد ۵۷ باند دارای چند شکلی بودند و به‌عبارت دیگر ۷۱ درصد باندهای تشکیل شده چند شکلی نشان دادند.

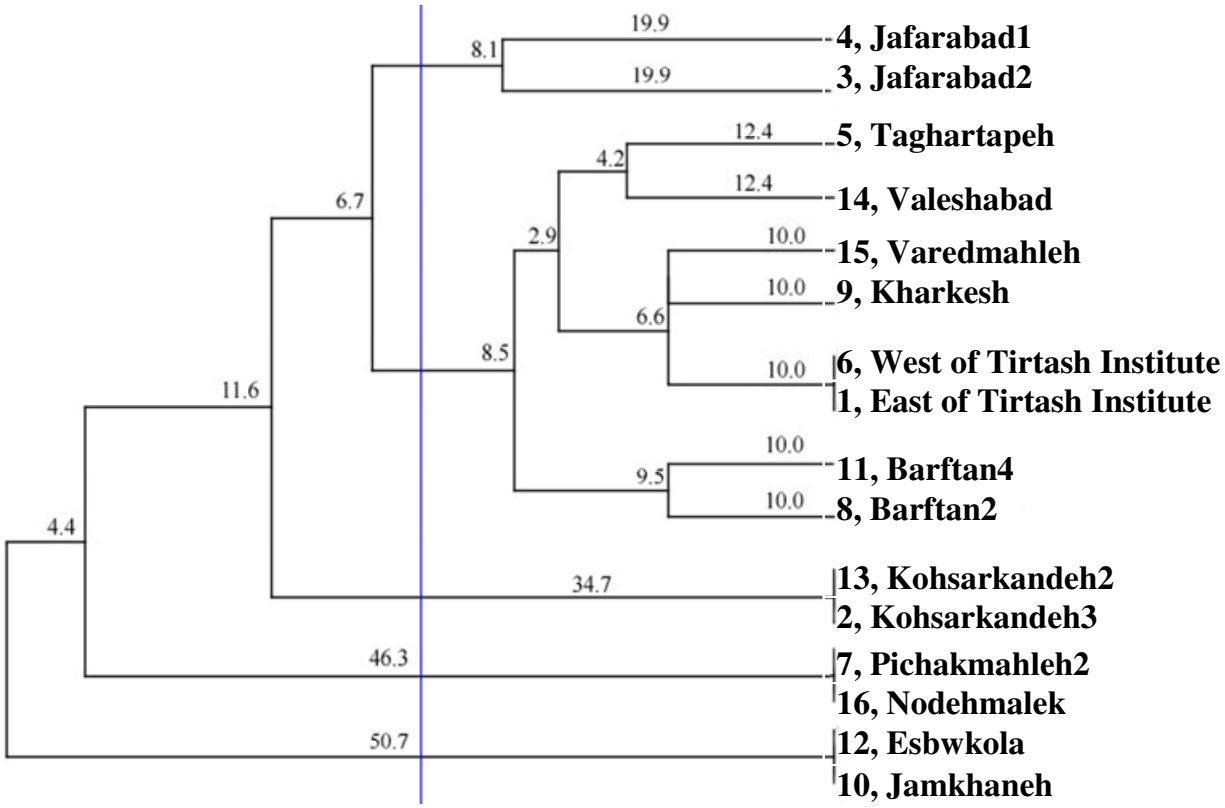


شکل ۱- باندهای حاصل از PCR توسط آغازگر OPM-03 در تصویر اول و باندهای مربوط به آغازگر OPM-16 در تصویر دوم آورده شده است. شماره های ۱ تا ۱۶ مربوط به‌جدایه‌ها بوده و چاهک آخر (L) مربوط به DNA Ladder می‌باشد.

Fig. 1. RAPD electrophoresis bands of HaNPV isolates using primer OPM-03 on 1st and OPM-16 on 2nd gels, Isolates no 1 to 16 related to the isolates and the L well is DNA Ladder.

تعداد قطعات چند شکلی تولید شده با هر آغازگر و در هر جمعیت، ۱۰ تا ۱۵ باند و دامنه‌ی اندازه‌ی قطعات تکثیر شده ۱۰۰bp–۱۵۰۰ بود. نتایج حاصل از رسم این تبارنما (درخت فیلوژنی) در شکل ۲ ارائه شده است.

در دندروگرام فیلوژنی حاصل، خط عمودی جداکننده‌ی گروه‌های مختلف، در فاصله‌ی ژنتیکی ۲۰ در نظر گرفته شد که شامل ۵ گروه ژنتیکی مجزا می‌باشد. در گروه اول، دو جدایه مزرعه ۱ و ۲ جعفرآباد گلستان از نظر مورفولوژیکی و ناحیه‌ی جغرافیایی شباهت بسیار زیادی دارند و در این دندروگرام در مجاور هم در یک گروه ژنتیکی ولی در دو زیر شاخه‌ی فرعی مجزا قرار گرفتند. گروه دوم خود به‌دو زیر شاخه اصلی و پنج زیر شاخه فرعی تقسیم شد و متعلق به جدایه‌های مناطق (تقرتپه گرگان، والش آباد گرگان، مزرعه ۲ و ۴ برفتان، وارد محله‌ی ساری، خارکش ساری، ناحیه‌ی غرب و ناحیه‌ی شرق مرکز تحقیقات توتون تیرتاش) می‌باشد. گروه سوم، زیر شاخه فرعی ندارد و در این گروه جدایه‌های مزرعه ۲ و ۳ کوهسارکنده که از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی و ناحیه‌ی جغرافیایی بسیار مشابه، در این بررسی نیز کاملاً در مجاورت همدیگر در یک شاخه اصلی قرار گرفتند. گروه چهارم، از جدایه‌های پیچک محله و نوده ملک گلستان تشکیل شده است. گروه پنجم، از جدایه‌های اسبوکلا ساری و جامخانه نکا تشکیل شده است. لازم به‌ذکر است که در این بررسی، گروه‌های سوم، چهارم و پنجم زیر شاخه‌ی فرعی ندارند و هر کدام با جدایه‌ی هم گروه خود قرابت ژنتیکی نزدیک داشته و به‌صورت گروه‌های خواهری می‌باشند. همچنین، جدول فواصل و تفاوت‌های ژنتیکی موجود بین شانزده جدایه مختلف NPV استان‌های مازندران و گلستان نیز براساس روش UPGMA رسم گردید (جدول ۱).



شکل ۲– تبارنما (درخت فیلوژنی) شانزده ایزوله HaNPV از استان‌های مازندران و گلستان بر اساس روش UPGMA.

Fig. 2. Dendrogram of 16 HaNPV isolates of Mazandaran & Golestan provinces based on UPGMA method.

جدول۱- فواصل ژنتیکی موجود بین ۱۶ جدایه HaNPV از استان‌های مازندران و گلستان بر اساس روش UPGMA.

Tabel 1. Genetic distances of 16 HaNPV isolates of Mazandaran & Golestan provinces based on UPGMA method.

Isolates	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	*															
2	34.7	*														
3	28	34.7	*													
4	28	34.7	19.9	*												
5	16.6	34.7	28	28	*											
6	6	34.7	28	28	16.6	*										
7	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3	46.3	*									
8	19.5	34.7	28	28	19.5	19.5	46.3	*								
9	10	34.7	28	28	18.8	10	46.3	19.5	*							
10	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	*						
11	19.5	34.7	28	28	19.5	19.5	46.3	10	19.5	50.7	*					
12	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	50.7	0	50.7	*				
13	34.7	0	34.7	34.7	14.7	34.7	46.3	34.7	34.7	50.7	34.7	50.7	*			
14	16.6	34.7	28	28	12.4	16.6	46.3	19.5	16.6	50.7	19.5	50.7	34.7	*		
15	10	34.7	28	28	16.6	10	46.3	19.5	10	50.7	19.5	50.7	34.7	16.6	*	
16	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	*

بحث

پیش‌بینی می‌شد که جدایه‌های متعلق به‌مناطق جغرافیایی نزدیک به‌همدیگر، در یک گروه ژنتیکی و در مجاورت هم در یک خوشه قرار گرفته و کمترین اختلاف ژنتیکی و بیشترین قرابت ژنتیکی با یکدیگر داشته‌باشند و هر چقدرکه جدایه‌ها در خوشه‌های مجزا و دورتر از یکدیگر قرار گرفتند، اختلاف ژنتیکی بیشتری با یکدیگر داشته باشند، اما این مسئله در مورد همه‌ی جدایه‌های ویروس و با این روش بررسی بعضاً و ظاهراً صدق نکرد و تنوع ژنتیکی مشاهده شده در این جدایه‌ها را نمی‌توان کاملاً و با اطمینان به‌توزیع جغرافیایی مربوط دانست. کمااینکه دندروگرام شکل ۲ نشان داد که در گروه دوم، با اینکه جدایه‌ها متعلق به‌مناطق جغرافیایی و ظاهراً دور از یکدیگر و از استان‌های متفاوت هستند ولی با این وجود ملاحظه می‌گردد که این جدایه‌ها در یک گروه ژنتیکی قرار گرفته و قرابت ژنتیکی دارند، که می‌تواند به‌دلیل جهش، مهاجرت و یا انتقال ژن‌ها اتفاق افتاده باشد. دندروگرام نشان می‌دهد که گروه‌های سوم، چهارم و پنجم از نظر ساختار ظاهری و مورفولوژیکی و پراکنش جغرافیایی نیز تشابه‌داشته، از نظر فیلوژنتیکی و خویشاوندی نیز قرابت ژنتیکی با یکدیگر دارند، اما در سه گروه جداگانه قرار گرفته‌اند. همچنین نزدیکی مکان جغرافیایی این جدایه‌ها، وجود یک خزانه ژنی مشترک را محتمل می‌کند. محققان مشخص کرده‌اند که روابط فیلوژنتیکی باکولوویروس‌ها عمدتاً از روابط جغرافیایی آن‌ها منشأ می‌گیرد. همچنین تفاوت‌های اکولوژیکی، آب و هوایی و جغرافیایی از عوامل مهمی هستند که بر استراتژی‌های نمونه برداری تأثیر می‌گذارند. تغییر و تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای معمولاً ارتباط به‌محدوده جغرافیایی نمونه‌ها دارد (Getting & McCarthy, 1982). از طرفی شواهدی از تنوع ژنتیکی که از الگوی توزیع جغرافیایی تبعیت نمی‌کند (Patel *et al*., 2009, Sajjadi *et al*., 2013 and Assemi *et al*., 2013)، پیشنهاد می‌نماید مطالعه‌ی کاملی بر روی جدایه‌های HaNPV به‌منظور بررسی دقیق‌تر تنوع و قرابت ژنتیکی بین آن‌ها انجام شود.

References

Assemi, H., Rezapanah, M., Vafai-Shoushtari, R. & Mehrvar, A. 2012. Modified artificial diet for rearing of tobacco budworm, *Helicoverpa armigera* using the Taguchi method and Derringer's desirability function. Journal of Insect Science, doi: 10.1673/031.012.10001.

Assemi, H., Sajjadi, S.A., Rezapanah, M., Mehrvar, A., Shahadati-Moghadam, Z. & Shazdeh-Ahmadi, N. 2013. Genetic diversity of isolates *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus on tobacco budworm using

PCR-RFLP technique. Full papers of 8th national Biotechnology Congress in Iran and 4th national Biosafety Congress in Iran, Tehran, Iran, 6-8 July 2013.

Fakrudin, B., Prakash, S.H., Krishnareddy, K.B., Vijaykumar, Badari Prasad, P.R., Patil, B.V. & 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. & 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. & Janarthanam, S. (Eds.), Biotechnological Application for Integrated Pest Management. Oxford and IBH Publication Company.

Getting, R.R. & McCarthy, W.J. 1982. Genotypic variation among wild isolates of *Heliothis* spp. nuclear polyhedrosis viruses from different geographical regions. Virology, 117: 242-245.

Jehle, J.A., Lange, M., Wang, H., Zhihong, H., Wang, Y. & 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. & Khaghaninia, S. 2010. Genetic variability of geographical populations of the bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), in west and northwest of Iran. Munis Entomology & Zoology, 5 (2): 670-676.

Mehrvar, A., Rabindra, R.J., Veenakumari, K. & Narabenchi, 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.

Patel, C.S., Jani, J.J., Parekh, V. B., Darji, V. B., & Vaishnav, P. R. 2009. Genetic diversity and differentiation of Helicoverpa armigera nuclear polyhedrosis virus isolates from India. Phytoparasitica, 37(5), 407-413.

Sajjadi, A., Assemi, H. & Rezapanah, M. 2013. Genetic diversity of isolates *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus on tobacco budworm using PCR-RFLP technique. Abstracts of 4th International Participated Entomopathogens and Microbial Control, Artvin, Turkey. 11-14 September 2013. P: 75.

Short Article

Phylogenetic classification of *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus (HaNPV), isolated from Tobacco fields in the north of Iran, using RAPD markers

Marziyeh Shazdehahmadi[1], Hoda Assemi[1], Zenabedin Shahadatimoghadam[1], Afshin Sajjadi[1], Mohammadreza Rezapanah[2]

1. Tobbaco Research and Education Center, Tirtash, Iran

2. Biological Control Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Corresponding Author: Marziyeh Shazdehahmadi, email: Noshinshazdeahmadi@yahoo.com

Received: July 12, 2015 3 (2) 123-128 Accepted: Feb. 13, 2016

Abstract

For screening *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus (HaNPV) isolated from tobacco fileds of Mazandaran and Golestan Provinces in northern Iran, out of 10 Operon RAPD primers (10-mer) that randomly selected, two primers (OPM-03 and OPM-16) which showed the highest polymorphism were selected. Phylogenetic analysis was done using PyElph software and UPGMA method. Then, phylogenetic tree and genetic distances table were drawn. The cluster analysis divides the 16 HaNPV isolates into five distinct groups. Such screening of HaNPV isolates is useful for improving biological control measures against tobacco budworm and cotton bollworm on different crops.

Keywords: *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus, Tobacco budworm, Phylogenetic relationships, RAPD marker