

مقاله پژوهشی

نشانگرهای ریزماهوره‌ای و کاربرد آن در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بالتوری سبز

*Chrysoperla carnea* (Stephens, 1836) (Neuroptera: Chrysopidae)

فاطمه عبدالاحدی<sup>۱</sup> - علی نقی میرمویدی<sup>۲\*</sup> - صمد جمالی<sup>۳</sup> - لیلا زارعی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۳۰

چکیده

مطالعات کمی روی تنوع و ساختار ژنتیکی دشمنان طبیعی آفت‌ها که به عنوان عوامل کنترل زیستی نیز شناخته می‌شوند، در کشور انجام شده است. این پژوهش با هدف مقایسه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بالتوری سبز *Chrysoperla carnea* انجام شد. جمعیت‌های مختلف از چهارده استان کشور شامل استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اصفهان، کرمان، کرمانشاه، لرستان، مازندران، گیلان، هرمزگان، تهران، کردستان، شیراز، زنجان و همدان جمع‌آوری شدند. این جمعیت‌ها با جمعیت‌های هلندی با استفاده از ۱۰ نشانگر مولکولی ISSR مقایسه شدند. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به جایگاه ژنی UBC-809 به میزان ۸۸/۸۸ درصد و کمترین آن متعلق به جایگاه ژنی UBC-886 به میزان ۳۳/۳۳ درصد بود. کمترین فاصله ژنتیکی جمعیت هلندی با جمعیت‌های مورد مطالعه، مربوط به جمعیت استان گیلان و بیشترین فاصله ژنتیکی با جمعیت استان کرمان بود. میانگین تعداد آلل، برای جمعیت هلندی، گیلان و کرمان به ترتیب معادل، ۶/۹، ۶/۶، ۴/۱ و میانگین تعداد آلل موثر، ۱/۴۸، ۱/۴۱ و ۱/۱۹ بدست آمد. مطالعه حاضر نشان داد که نشانگرهای ISSR در مطالعه تنوع ژنتیکی این حشره کارایی بالایی دارند.

واژه‌های کلیدی: بالتوری سبز، تنوع ژنتیکی، جایگاه ژنی، جمعیت جغرافیایی، ISSR

مقدمه

مورد کنترل بیولوژیکی آفات از قبیل شپشک آردآلود، شته‌ها و زنجرف‌ها صورت گرفته است (۲۳). کتاب‌های متعددی در مورد پرورش و رهاسازی بالتوری‌های سبز به چاپ رسیده که کتاب مربوط به مک ایون و همکاران یکی از بهترین آنها در این زمینه بشمار می‌آید (۱۶) در کشور ایران تا سال ۲۰۰۲ حدود چهل گونه از بالتوری‌های خانواده کریزوپیده شناسایی شده است (۱۸). این شکارگرها به دلایلی، از جمله مقاومت نسبی در برابر برخی آفت‌کش‌ها، امکان تولید انبوه، پراکنش جغرافیایی و دامنه میزبانی در کنترل بیولوژیک مورد توجه قرار گرفته‌اند. فعالیت‌های انسانی بر فراوانی اندازه جمعیت بسیاری از گونه‌ها و پراکنش جغرافیایی آنها اثر گذاشته است. امروزه انتقال، تکثیر مصنوعی و انقراض گونه‌ها به امری معمول تبدیل شده، بنابراین لازم است که اثر این موضوع بر تنوع ژنتیکی و پراکنش افراد در یک جمعیت مورد بررسی قرار گیرد (۷). در نتیجه شناخت ترکیب طبیعی و ساختار ژنتیکی جمعیت گونه‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد (۱۱). جمعیت به مجموعه متنوعی از ژن‌ها گفته می‌شود که عواملی همچون فاصله نسل‌ها، شرایط نامناسب آب و هوایی و از بین رفتن زیستگاه‌ها منجر به کاهش اندازه

بالتوری‌های سبز (*Chrysoperla carnea* (S.)) از خانواده‌ی (Chrysopidae)، راسته‌ی (Neuroptera) و زیرراسته‌ی (Hemerobiiform) می‌باشند. این خانواده دارای زیرخانواده‌های Chrysopinae، Apochrysopinae، Chrysopinae بوده و با داشتن ۸۰ جنس و ۱۲۰۰ گونه در تمام نقاط دنیا انتشار یافته است و تا کنون به عنوان بزرگترین خانواده از این راسته شناسایی شده است (۵ و ۲۳). لاروهای بالتوری سبز بعنوان شکارچی شته‌ها، سفید بالک‌ها، تریپس‌ها و لارو پروانه‌ها کارایی داشته و در بسیاری از کشورها رهاسازی بالتوری‌ها برای کنترل آفات مختلف صورت می‌گیرد (۲۳). در ایالات متحده آمریکا کنترل بیولوژیکی با استفاده از بالتوری سبز در

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، استاد و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه  
(\*) نویسنده مسئول: Email: alimirmoayedi@gmail.com  
۴- استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه

بصورت جارویی روی یونجه، و در طول شب با استفاده از تله‌نوری صورت گرفت. نمونه‌برداری از مزارع یونجه هر منطقه صورت گرفت. در کل ۲۰۰۰ نمونه جمع‌آوری گردید و از هر استان ۲۷ عدد برای مطالعات مولکولی انتخاب گردید. گونه‌های جمع‌آوری شده با تله‌نوری، در اتانول مطلق نگهداری شده و باقی به صورت اتاله و تعدادی به صورت خشک بین پدهای پنبه‌ای دولایه نگهداری شدند. دسترسی به نمونه‌های هلندی که از شهر و دانشگاه واگنینگن هلند بود به تعداد ۵۰ عدد با مساعدت پارک علم و فن‌آوری استان همدان از طریق شرکت تکنو آگرو محقق گردید. که از این تعداد ۲۷ عدد برای مطالعات مولکولی انتخاب شدند.

### استخراج DNA

استخراج DNA نمونه با استفاده از TOP (TOPAZ Inc) General Genomic DNA Purification kit و بر اساس کتابچه‌ی راهنمای آن با اندکی تغییرات صورت گرفت. بعد از این مرحله ارزیابی کمی و کیفیت DNA استخراجی انجام شد. جهت مشاهده کیفیت DNA از ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد.

### واکنش زنجیره‌ی پلی‌مرز ( Polymerase Chain Reaction )

بر اساس مطالعات قبلی انجام شده به منظور بررسی تنوع ژنتیکی تعداد ۱۰ آغازگر انتخاب گردید. نام، توالی، دمای اتصال و سایر خصوصیات تمام آغازگرها در (جدول ۲) آورده شده است. اجزای واکنش زنجیره پلی‌مرز در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد که شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۲ میکرولیتر از دی‌ان‌ای ژنومی (با غلظت ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم (با غلظت ۵۰ میلی‌مول) و ۱/۵ میکرولیتر جایگاه ژنی با غلظت ۱ پیکومول، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۰/۲ میکرولیتر DNTP (با غلظت ۱۰ میلی‌مول) و ۱۶ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. مواد مورد استفاده از شرکت تکاپو زیست تهیه شدند. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر Bio RAD, C 1000™ Thermal Cycler و چرخه‌ها بدین شرح انجام شد. یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد (بسته به نوع آغازگر) به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله بسط به مدت ۱۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۷۰۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. فرآورده‌های زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد در محلول اتیدیوم بروماید یک نانوگرم بر میلی‌لیتر رنگ‌آمیزی شدند (۳).

جمعیت‌های موثر و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی می‌گردد و این موضوع خطر انقراض گونه‌ها را افزایش می‌دهد (۸). از نظر اقتصادی *C. carnea* یکی از مهم‌ترین گونه‌های خانواده کریزوپیدیه محسوب می‌گردد. لذا برنامه‌ریزی و اعمال مدیریت لازم برای حفاظت ذخایر ژنتیکی آن بسیار مهم می‌باشد. صفات مرفومتریکی و مریستیک برای مطالعات اولیه بررسی ساختار ذخایر استفاده می‌شد. با گذشت زمان مارکرهای مولکولی که متأثر از فاکتورهای محیطی نبودند مورد توجه قرار گرفتند. از جمله این مارکرها، مارکرهای DNA ریزماهورهای (Microsatellite) هستند که قادرند پلی‌مورفیسم موجود در جمعیت‌های حشرات را نشان دهند (۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۹، ۲۰، ۲۵ و ۲۸). هم چنین مارکرهای ISSR نیز دز طیف گسترده‌ای از حشرات قادر به تعیین مقدار پلی‌مورفیسم در جمعیت‌های مورد مطالعه بوده است (۶، ۱۰، ۱۲، ۲۶، ۳۰ و ۳۴). گسترش برنامه‌های مدیریتی و انجام فعالیت‌های بازسازی ذخایر بالتوری هنگامی می‌تواند مفید باشد که تنوع ژنتیکی ساختار جمعیت آن گونه به خوبی مورد بررسی قرار گیرد. برای انتخاب جمعیت‌های دهنده ژن در تکثیر مصنوعی در خصوص ساختار جمعیت و در امر بازسازی ذخایر نیاز به اطلاعات ضروری به نظر می‌رسد (۱۱). اهمیت این مطالعه از این واقعیت به خوبی شناخته می‌شود که سازگاری هر جمعیت بستگی به پتانسیل فنوتیپی و اکولوژیکی آن دارد و موفقیت در زمینه کنترل آفات توسط یک عامل بیولوژیک به طور مستقیم به انتخاب جمعیت مناسب بستگی دارد و زمانی ایجاد می‌شود که عوامل فشار محیطی با ظرفیت‌های مربوطه مطابقت داشته باشند. بنابراین دانستن ساختار ژنتیکی آن‌ها در فرآیند انتخاب جمعیت کنترل آفات اهمیت زیادی دارد (۴). تنوع ژنتیکی بستر اساسی تکامل را فراهم می‌کند، با این حال مطالعات کمی تاثیرات تغییرات اقلیمی بر تنوع ژنتیکی جمعیت‌های حشرات مفید را ارزیابی می‌کنند. هدف از این پژوهش بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *C. carnea* در شرایط اقلیمی متفاوت و شناسایی پتانسیل تحقیقات آینده بر نقش بالقوه تنوع ژنتیکی در عملکرد این حشرات مفید است.

### مواد و روش‌ها

#### جمع‌آوری نمونه

در ماه‌های اردیبهشت تا اواخر آبان ماه سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۵ نمونه‌های مورد مطالعه از مناطق مختلفی از استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اصفهان، کرمان، کرمانشاه، لرستان، مازندران، گیلان، هرمزگان، تهران، کردستان، فارس، زنجان و همدان جمع‌آوری شدند (جدول ۱). نمونه‌برداری در طول روز با تور زدن

جدول ۱- مختصات جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری  
Table 1- Sampling localities and their geographical coordinates

Province	City	Latitude	Longitude	Height	Code
استان	شهرستان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع	کد شهر
آذربایجان غربی Western Azerbaijan	Urumia	37.55321585	45.07627659	1348	1
	Bukan	36.51512233	46.20708472	1340	2
	Khoy	38.55179431	44.95974594	1136	3
لرستان Lorestan	Khorramabad	33.48868134	48.35929003	1188	4
	Borujerd	33.89813714	48.7501026	1572	5
	Kuhdasht	33.52941544	47.60903406	1192	6
اصفهان Isfahan	Isfahan	32.67210698	51.67157274	1575	7
	Khansar	33.22605745	50.31752524	2215	8
	Shahreza	32.00734554	51.85222690	1833	9
گیلان Gilan	Rudbar	36.82289358	49.42928867	212	10
	Rasht	37.28079786	49.59250067	3	11
	Astara	38.42208367	48.86927386	24	12
مازندران Mazandaran	Sary	36.56611747	53.05876297	42	13
	Amol	36.46981559	52.35124183	94	14
	Chaloos	36.65428442	51.42130387	29	15
کرمانشاه Kermanshah	Kermanshah	34.32365879	47.07410791	1351	16
	Kangavar	34.50332392	47.96530129	1468	17
	Sarpol-zahab	34.45758373	45.86860067	556	18
همدان Hamedan	Hamedan	34.79881288	48.51516762	1818	19
	Malayer	34.29290641	48.82193253	1748	20
	Kabudarahang	35.20000154	48.71226525	1672	21
آذربایجان شرقی East Azerbaijan	Maragheh	37.38950217	46.23764728	1451	22
	Tabriz	38.07847882	46.30374328	1402	23
	Marand	38.43060508	45.77383802	1331	24
کرمان Kerman	Kerman	30.28451186	57.07261258	1764	25
	Baft	29.23494228	56.59894493	2275	26
	Kuhbanan	31.41029769	56.28292425	1990	27
هرمزگان Hormozgan	Minab	27.14554001	57.07321481	40	28
	BandarAbbas	27.19463488	56.30798292	17	29
	Rudan	27.44130894	57.19104800	196	30
تهران Tehran	Tehran	35° 49'54.15	051° 25'35.00	1862	31
	Varamin	35° 20'51.16	051° 40'48.69	950	32
	Damavand	35° 43'44.11	052° 07'00.70	2233	33
زنجان Zanjan	Zanjan	36° 42'37.00	048° 22'25.99	1546	34
	Soltanieh	36° 26'32.37	048° 46'03.02	1788	35
	Ghydar	36° 01'57.55	048° 37'25.27	1836	36
کردستان Kurdistan	Saghez	36° 10' 22.60	046° 17' 22.05	1775	37
	Maryvan	35° 37' 36.87	046° 17' 18.38	1989	38
	Baneh	35° 55' 43.60	045° 58' 42.11	1561	39
شیراز Shiraz	Shiraz	29° 24' 31.51	051° 36' 53.96	2105	40
	kazeron	29° 36' 54.32	051° 34' 44.82	807	41
	Fasa	28° 59' 19.33	053° 39' 56.47	1563	42

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای محاسبه شاخص‌های ژنتیک جمعیت، شامل: الف) تعداد آل مشاهده شده چندشکل و درصد آن تعادل هاردی-واینبرگ، ب) هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، ج) شاخص شانون، تنوع ژنی (۲۲) و فواصل ژنتیکی از نرم‌افزار POPGENE (۳۶) و برای

انجام تجزیه واریانس مولکولی بین و درون جمعیت‌های مورد مطالعه و تعداد مطلوب خوشه از نرم‌افزار GenAlex 6 استفاده شد (۲۴)، از نرم‌افزار AMOVA (Analysis of molecular variance) برای بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها استفاده گردید.

جدول ۲- جایگاه ژنی‌های نشانگر ISSR استفاده شده در این تحقیق باربوسا و همکاران (۲۰۱۴)

Table 2- The list of ISSR - primers used by us (Barbosa et al., 2014)

نام پرایمر Name of Prime	توالی جایگاه ژنی Sequence (5' → 3')	دمای اتصال Annealing temperature (C°)
UBC-809	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGG-3'	51
UBC-820	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTC-3'	55
UBC-836	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGCA-3'	48
UBC-849	5'-GTGTGTGTGTGTGTGTC-3'	55
UBC-856	5'-ACACACACACACACTA-3	55
UBC-880	5'-GGAGAGGAGAGGAGA-3	48
UBC-886	5'-CTCCTCCTCCTCCTCGT-3'	46
UBC-891	5'-GAGCTCTCTCTCTCTCT-3'	50
UBC-810	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3	48
UBC812	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAA-3	51

## نتایج و بحث

مشاهده شد (جدول ۴). بیشترین دامنه آلی مربوط به همین جایگاه ژنی بود (شکل ۱). بالا بودن فراوانی میانگین تعداد آلل مشاهده شده در این جایگاه ژنی در مطالعات باربوسا و همکاران (۳) نیز گزارش شده است که این موضوع حاکی از چندشکلی بالای این جایگاه ژنی می‌باشد.

نمونه الگوی باندی محصولات ISSR-PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ (آغازگر UBC-809). اعداد در شکل مربوط به مکان‌هایی است که در جدول ۱ شرح داده شده است.

## نتایج حاصل از تجزیه کلاستر براساس نشانگر ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

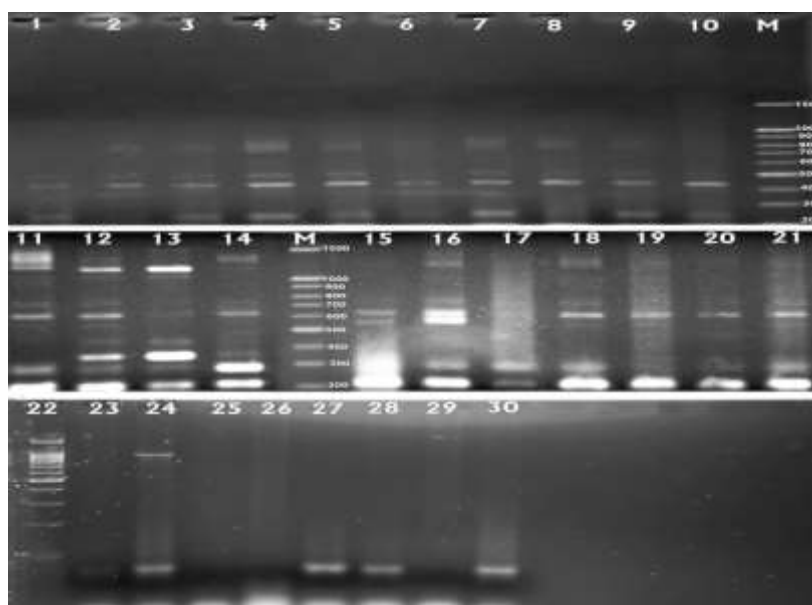
نتایج حاصل از تجزیه کلاستر جمعیت‌های مورد مطالعه براساس ضریب تشابه جاکارد در (شکل ۲) ارایه داده شده است. جمعیت‌های مورد مطالعه در سه گروه قرار گرفتند. جمعیت هلندی به همراه جمعیت استان‌های گیلان، مازندران، خرم‌آباد و آذربایجان شرقی و غربی در گروه اول و جمعیت‌های استان‌های کرمان، سیستان، اصفهان و شیراز در گروه دوم و جمعیت‌های استان‌های همدان، زنجان، کرمانشاه، تهران و کردستان در گروه سوم قرار گرفتند. مقادیر عددی فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها پایین و حاکی از شباهت زیاد جمعیت‌های مورد مطالعه بود. براساس درخت فیلوژنی ترسیم شده با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر ISSR (شکل ۲ و ۳) که جمعیت‌های مورد مطالعه را در سه گروه قرار داد. فواصل ژنتیکی پایین بین جمعیت‌های این جنس نیز توسط ولز (۳۵) و سایر محققین گزارش شده است. ولز چهار گونه از بالتوری‌های سبز جنس *Chrysoperla* را از نظر تنوع در هفده مکان جایگاه قابل تشخیص الکتروفورزی مورد بررسی قرار داد. از اهداف مورد مطالعه می‌توان به بررسی میزان تنوع ژنتیکی بین دو گونه سیبلینگ *C. plorabunda* (F) و *C. johnsoni* (H) و مقایسه این دو گونه با *C. downesi* (S.) را برشمرد. فاصله ژنتیکی نی و راجر در بین کل جمعیت تفاوت

ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده نشان داد که نمونه‌های DNA استخراج شده از کمیت و کیفیت بالایی برخوردار می‌باشند. تعداد کل باندها ۶۴ باند بود که ۴۳ باند چندشکل بودند. دامنه اندازه آلی آغازگرهای مورد بررسی بین ۱۵۰ - ۱۵۰۰ (bp) متغیر بود. دامنه اندازه آلی آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه دارای اختلافاتی نسبت به دامنه آلی گزارش شده در مطالعات باربوسا و همکاران (۳) بوده است. از بین جایگاه ژنی‌های مورد استفاده، ۱۰ جایگاه ژنی الگوی باندی واضح و قابل امتیازدهی تولید کردند. تمام جایگاه ژنی چندشکلی نشان دادند و این موضوع مطلوبیت استفاده از آن‌ها را افزایش می‌دهد. محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) بین ۰/۳۰۲ تا ۰/۶۴۳ متغیر بود که بیشترین آن مربوط به آغازگر UBC-809 و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر UBC-812 بود. با وجود پنج آلل در جایگاه UBC-812 و نه آلل در جایگاه UBC-809 این نتیجه منطقی به نظر می‌رسد (جدول ۳). به طور کلی بالا بودن مقدار محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) نشان دهنده قدرت بالای جایگاه‌ها در تفکیک ژنوتیپ‌ها معادل تنوع ژنتیکی بوده در مطالعه‌ای که باربوسا و همکاران در سال ۲۰۱۴ روی گونه *Chrysoperla externa* (H) (Neuroptera, Chrysopidae) پرایمر مورد استفاده ۴۳ پرایمر باندهای ضعیف، ۲۷ پرایمر باندهای چندشکلی و ۱۶ پرایمر، UBC-809 (AG)8G, UBC-810 (GA)8T, UBC-812 (GA)8A, UBC-817 (CA)8A, UBC-818(CA)8G, UBC-819 (GT)8A, UBC-820 (GT)8C, UBC-828(TG)8A, UBC-836 (AG)8YA, UBC-840 (GA)8YT, UBC-846(CA)8RT, UBC-849 (GT)8YA, UBC-856 (AC)8YA, UBC-880(GGAGA)3, UBC-886 VDV(CT)7, UBC-891 HVH(TG)7 باندهای واضح تری تولید کردند (۳). درصد باندهای چندشکل نیز به طور میانگین ۴۸/۶۷ گزارش شد. از بین جایگاه‌های ژنی مورد استفاده، بیشترین تعداد آلل در سه جمعیت هلندی، گیلان و کرمان در جایگاه ژنی UBC-809

تغییراتی که توسط هریک از این مولفه‌ها نشان داده می‌شود در (جدول ۵) آورده شده است. ۱۰۰ درصد از تغییرات توسط ۱۰ مولفه اول توجیه شدند. مولفه‌ی اول، دوم و سوم به ترتیب ۲۷/۶۸، ۲۰/۵۷ و ۱۳/۰۱ درصد از کل تغییرات را توجیه کردند. این مولفه‌ها به صورت مستقل از یکدیگر، و هر کدام درصدی از تنوع را که توسط مولفه اصلی قبلی توجیه نشده بود، را توجیه کردند.

معنی‌داری نداشت. تجزیه کلاستر براساس روش UPGMA نمونه‌های مورد مطالعه *C. Johnsoni* و *C. Plorabunda* را در دو خوشه مجزا قرار نداد.

برای تعیین نحوه پراکنش نشانگر ISSR آزمون تجزیه به مولفه‌های اصلی انجام گرفت. مقادیر ویژه ماتریس شباهت، درصد تجمعی تغییرات توجیه شده توسط مولفه‌های مستقل و میزان



شکل ۱- نمونه الگوی بانندی محصولات ISSR-PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد (آغازگر UBC-809)

اعداد موجود در شکل مربوط به مکان‌هایی است که در جدول ۱ شرح داده شده است.

Figure 1- The sample of band pattern of ISSR-PCR products on 2% agarose gel (UBC-809 primer)  
The numbers in figure corresponds to locations described in Table 1.

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی چندشکلی در جمعیت‌های مختلف *Chrysoperla carnea* با استفاده از نشانگرهای ISSR

Table 3- Polymorphism in different populations of *Chrysoperla carnea* by use of ISSR primers

نام آغازگر Name of primer	دامنه اندازه آلی مشاهده شده The size range of observed allele	تعداد کل باندها The total number of bands	تعداد باندهای چند-شکل The number of polymorphic bands	محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphic information content (PIC)	درصد چندشکلی Polymorphism Percentage
UBC-809	150-1400	9	8	0.643	88.88
UBC-820	220-1500	8	6	0.615	75
UBC-836	280-1200	7	5	0.572	71.42
UBC-849	300-1500	6	4	0.464	66/66
UBC-856	180-1500	6	4	0.444	66.66
UBC-880	170-1400	7	4	0.521	57/14
UBC-886	300-750	6	2	0.391	33/33
UBC-891	250-1100	5	4	0.320	80
UBC-810	300-700	5	3	0.311	60
UBC-812	210-1000	5	3	0.302	60

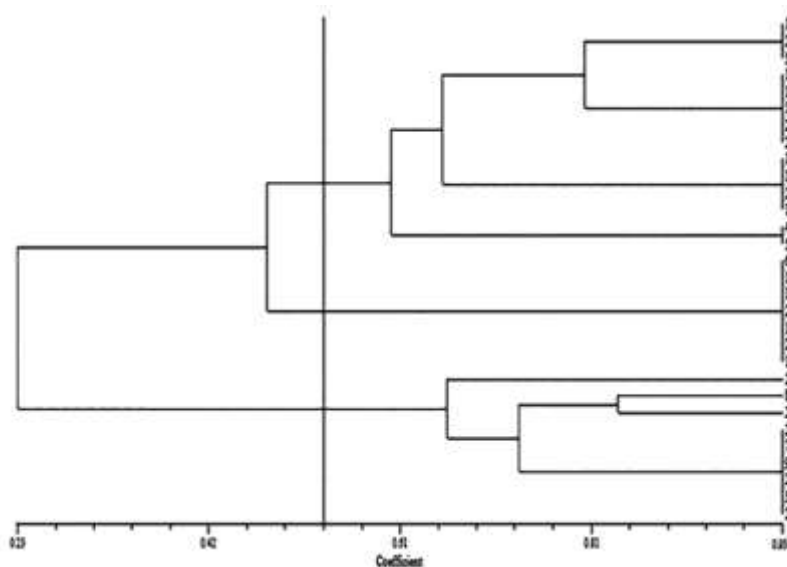
جدول ۴- میانگین تعداد آلل مشاهده شده و موثر آغازگرهای نشانگر ISSR استفاده شده

Table 4- Mean number of observed and effective alleles of ISSR marker primers used

UBC-880	UBC-810	UBC-891	UBC-856	UBC-820	UBC-812	UBC-886	UBC-849	UBC-836	UBC-809	n.o	n.e
5.7	4.9	5.1	5.35	6.4	4.8	5.5	5.4	5.9	6.8	n.o	n.e
1.36	1.28	1.35	1.34	1.41	1.30	1.29	1.35	1.37	1.45	n.e	n.e

n.o: میانگین تعداد آلل مشاهده شده و n.e: میانگین تعداد آلل موثر

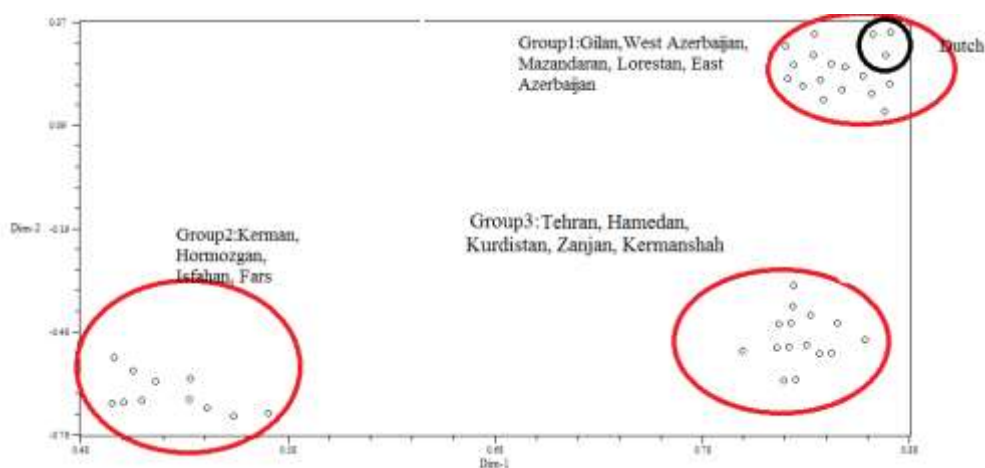
n.o: average number of observed alleles and n.e: average number of effective alleles



شکل ۲- دندروگرام حاصل از نشانگرهای ISSR با استفاده از روش UPGMA و براساس ضریب تشابه جاکارد براساس کدهای تعریف شده در

جدول ۱

Figure 2-Cluster analysis based on UPGMA using Jaccard similarity coefficient. The numbers in figure corresponds to locations described in Table 1



شکل ۳- نمودار پراکنش جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگر ISSR

Figure 3- Distribution chart of studied populations using ISSR marker

جدول ۵- مقادیر ویژه حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی براساس نشانگر ISSR

Table 5- Eigenvalues obtained from principle component analysis based on ISSR primer

مولفه های اصلی Principal components	مقادیر ویژه Eigenvalues	درصد واریانس Variance (%)	واریانس تجمعی Cumulative variance
مولفه اول First component	2.13	27.68	27.68
مولفه دوم Second component	1.30	20.57	48.25

هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، بهترین جایگاه‌زنی جهت بیان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *C. carnea* می‌باشد. در این تحقیق تعادل هاردی-واینبرگ برای تمام جایگاه‌های ژنی، با استفاده از آزمون کای اسکوئر ( $\chi^2$ ) جمعیت‌های مورد مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به فرض  $H_0$  (وجود تعادل در جمعیت) در بین جایگاه‌های ژنی، بیشترین میزان تعادل در جایگاه‌زنی UBC-809 مشاهده گردید. تعدادی از جمعیت‌ها و جایگاه‌ها در تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشته و تعدادی دیگر دارای انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی-واینبرگ بودند. علت انحرافات از تعادل هاردی-واینبرگ را می‌توان ناشی از حضور برخی از عوامل برهم زننده مانند ناکافی بودن تعداد نمونه‌ها، امکان وجود آلل‌های تکثیر نشده، دانست (۲ و ۶). انحراف معنی‌دار از تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت‌های ایرانی نسبت به جمعیت هلندی در تعداد بیشتری از لوکوس‌ها مشاهده شد. مطالعات صورت گرفته بر تنوع ژنتیکی حشرات اطلاعات کاملی از مخازن ژنتیکی و تاثیر از بین رفتن زیست‌گاه‌های بومی در اختیار بشر قرار می‌دهد (۲۷). مطالعه حاضر اولین مطالعه ارزیابی این گونه با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره می‌باشد. نتایج این پژوهش حاکی از کارایی روش ISSR-PCR در بررسی پلی مورفیسم این گونه بود.

با توجه به جایگاه‌های ژنی به ازای جمعیت‌ها، بیشترین میزان شاخص شانون در جایگاه‌زنی UBC-809 جمعیت استان گیلان (۰/۵۳) و کمترین میزان این شاخص در جایگاه‌زنی UBC-812 جمعیت استان کرمان (۰/۰۴) مشاهده گردید. با توجه به وجود نه آلل در جایگاه‌زنی UBC-809 جمعیت استان گیلان و وجود دو آلل در جایگاه‌زنی UBC-812 جمعیت کرمان، وجود بیشترین و کمترین میزان شاخص شانون در این جمعیت‌ها منطقی به نظر می‌رسد. این مقدار برای جمعیت هلندی (۰/۵۸) محاسبه گردید. بیشترین میزان H (تنوع ژنی) در جایگاه‌زنی UBC-809 جمعیت استان گیلان (۰/۳۵) و کمترین مقدار آن در جایگاه‌زنی UBC-812 (۰/۰۰۹) جمعیت استان کرمان مشاهده گردید. این مقدار برای جمعیت هلندی (۰/۳۹) محاسبه گردید. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده ( $H_0$ ) در جایگاه‌زنی UBC-809 جمعیت استان گیلان (۰/۴۹) و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده ( $H_0$ ) مربوط به جایگاه‌زنی UBC-812 جمعیت استان کرمان (۰/۰۳۱) می‌باشد. همچنین، بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار ( $H_e$ ) در جایگاه‌زنی UBC-809 جمعیت استان مازندران (۰/۵۷۹) و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار ( $H_e$ ) در جایگاه‌زنی UBC-886 جمعیت استان هرمزگان (۰/۰۳۴) مشاهده گردید. آغازگر UBC-809 با توجه به وجود ۹ آلل در این جایگاه و بیشترین میزان

جدول ۶- میانگین تعداد آلل مشاهده شده و موثر در جمعیت‌های *Chrysoperla carnea* استان‌های مورد مطالعه

Table 6- Mean number of observed and effective alleles in *Chrysoperla carnea* populations of the studied provinces

اصفهان Esfahan	آذربایجان شرقی E.Azerbaijan	آذربایجان غربی W.Azerbaijan	لرستان Lorestan	کرمان Kerman	گیلان Gilan	کرمانشاه Kermanshah	مازندران Mazandaran	همدان Hamedan	هرمزگان Hormozgan
n.o 4.9	5.6	5.5	6.1	4.1	6.6	5.1	6.3	5.8	4.5
n.e 1.25	1.26	1.27	1.35	1.19	1.41	1.25	1.36	1.26	1.20

n.o: میانگین تعداد آلل مشاهده شده و n.e: میانگین تعداد آلل موثر

n.o: average number of observed alleles and n.e: average number of effective alleles

ادامه جدول ۶- میانگین تعداد آلل مشاهده شده و موثر در جمعیت‌های *Chrysoperla carnea* استان‌های مورد مطالعه

Table 6(continued)- Mean number of observed and effective alleles in *Chrysoperla carnea* populations of the studied provinces

	هلندی Dutch	کردستان Kurdistan	زنجان Zanjan	شیراز Shiraz	تهران Tehran
n.o	6.9	5.3	5.7	5.1	5.4
n.e	1.48	1.24	1.27	1.20	1.23

ژنی، بیشترین میزان تعادل در جایگاه‌های UBC-809 مشاهده گردید. تعدادی از جمعیت‌ها و جایگاه‌ها در تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشته و تعدادی دیگر دارای انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی-واینبرگ بودند. علت انحرافات از تعادل هاردی-واینبرگ را می‌توان ناشی از حضور برخی از عوامل برهم زننده مانند ناکافی بودن نمونه‌ها، امکان وجود آلل‌های تکثیر نشده دانست (۲۹). انحراف معنی‌دار از تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت‌های ایرانی نسبت به جمعیت هلندی در تعداد بیشتری از لوکوس‌ها مشاهده شد. مطالعات صورت گرفته بر تنوع ژنتیکی حشرات اطلاعات کاملی از مخازن ژنتیکی و تاثیر از بین رفتن زیست‌گاه‌های بومی در اختیار بشر قرار می‌دهد (۲۷). مطالعه حاضر اولین مطالعه ارزیابی این گونه با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره می‌باشد. نتایج این پژوهش حاکی از کارایی روش ISSR-PCR در بررسی پلی‌مورفیسم این گونه بود. در مطالعات مختلف برای سایر راسته‌های حشرات نیز از تعدادی از پرایمرهای این تحقیق استفاده شده، که از آن جمله می‌توان به جایگاه ژنی UBC-809 برای راسته‌های پروانه‌ها و سخت بالپوشان توسط سایر محققین (۱، ۲۹ و ۳۱) و UBC-812 و UBC819 برای راسته نیم‌بالان (۳۲) اشاره کرد. در این مطالعه نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های گیلان و مازندران و لرستان مقدار بالاتری از تعداد آلل‌ها و شاخص‌ها را به خود اختصاص دادند. از دلایل این موضوع می‌توان به بالا بودن سطح پوشش گیاهان بومی در این مناطق اشاره کرد (۳). سعی بر آن شد که تمام نمونه‌ها از مزارع یونجه جمع‌آوری شوند تا شرایط تغذیه‌ای تقریباً یکسانی بین نمونه‌ها حاکم باشد. در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع یونجه‌ای که اطراف آن پوشش گیاهی غنی‌تری وجود داشت نسبت به نمونه‌های مزارع قرار گرفته بین زمین‌های کشاورزی که برای مبارزه با آفات گیاهی از سموم کشاورزی استفاده می‌شد تنوع ژنتیکی بالاتری دیده شد. این نتایج با تحقیقات صورت گرفته توسط مورالس و همکاران (۲۰) و نیز مطالعات باربوسا و همکاران (۳) مطابقت داشت آن‌ها عنوان داشتند که چهار گونه از بالتوری‌های سبز در برزیل وجود دارند، که *C. externa* وسیع‌ترین توزیع جغرافیایی را در این کشور دارد. با استفاده از ژن میتوکندری سیتوکروم اکسیداز I به عنوان یک نشانگر مولکولی به بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های جمع‌آوری شده از محیط‌های بومی و اکوسیستم‌های زراعی پرداختند.

در مطالعات مختلف برای سایر راسته‌های حشرات نیز از تعدادی از پرایمرهای این تحقیق استفاده شده، که از آن جمله می‌توان به جایگاه ژنی UBC-809 برای راسته‌های پروانه‌ها و سخت‌بالپوشان (۱، ۲۸ و ۳۱) و UBC-812 و UBC819 برای راسته نیم‌بالان (۳۲) اشاره کرد. در این مطالعه نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های گیلان و مازندران و لرستان مقدار بالاتری از تعداد آلل‌ها و شاخص‌ها را به خود اختصاص دادند. از دلایل این موضوع می‌توان به بالا بودن سطح پوشش گیاهان بومی در این مناطق اشاره کرد (۳).

با توجه به جایگاه‌های ژنی به ازای جمعیت‌ها، بیشترین میزان شاخص شانون در جایگاه‌های ژنی UBC-809 جمعیت استان گیلان (۵۳/۰) و کمترین میزان این شاخص در جایگاه‌های ژنی UBC-812 جمعیت استان کرمان (۰/۰۴) مشاهده گردید. با توجه به وجود نه آلل در جایگاه‌های ژنی UBC-809 جمعیت استان گیلان و وجود دو آلل در جایگاه‌های ژنی UBC-812 جمعیت کرمان، وجود بیشترین و کمترین میزان شاخص شانون در این جمعیت‌ها منطقی به نظر می‌رسد. این مقدار برای جمعیت هلندی (۵۸/۰) محاسبه گردید. بیشترین میزان H (تنوع ژنی) در جایگاه‌های ژنی UBC-809 جمعیت استان گیلان (۳۵/۰) و کمترین مقدار آن در جایگاه‌های ژنی UBC-812 (۰/۰۰۹) جمعیت استان کرمان مشاهده گردید. این مقدار برای جمعیت هلندی (۳۹/۰) محاسبه گردید. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده ( $H_0$ ) در جایگاه‌های ژنی UBC-809 جمعیت استان گیلان (۴۹/۰) و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده ( $H_0$ ) مربوط به جایگاه‌های ژنی UBC-812 جمعیت استان کرمان (۰/۰۳۱) می‌باشد. همچنین، بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار ( $H_e$ ) در جایگاه‌های ژنی UBC-809 جمعیت استان مازندران (۵۷۹/۰) و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار ( $H_e$ ) در جایگاه‌های ژنی UBC-886 جمعیت استان هرمزگان (۰/۰۳۴) مشاهده گردید. آغازگر UBC-809 با توجه به وجود ۹ آلل در این جایگاه و بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، بهترین جایگاه‌های جهت بیان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *C. carnea* می‌باشد. در این تحقیق تعادل هاردی-واینبرگ برای تمام جایگاه‌های ژنی، با استفاده از آزمون کای اسکور ( $\chi^2$ ) جمعیت‌های مورد مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به فرض  $H_0$  (وجود تعادل در جمعیت) در بین جایگاه‌های



بودن میزان هتروزایگوسیتی و تعداد آلل‌های جمعیت‌های ایرانی نسبت به جمعیت هلندی می‌تواند ناشی از پرورش غیر اصولی و نیز پدیده درون‌آمیزی باشد. در مقایسه نتایج هتروزایگوسیتی و تعداد متوسط آلل مشاهده شده این تحقیق با تحقیقاتی که باربوسا و همکاران (۳) انجام دادند. تنوع ژنتیکی کمتری در این تحقیق مشاهده می‌شود. تعدادی از محققان کاهش تعداد آلل و هتروزایگوسیتی ناشی از کاهش اندازه مؤثر جمعیت می‌دانند (۹). کاهش تنوع به مرور زمان می‌تواند باعث کاهش جمعیت‌ها و یا حتی گونه‌ها شود. توانایی جمعیت‌ها در محیط‌های جدید نیز تحت تاثیر این موضوع قرار خواهد گرفت. در جمعیت‌های پرورشی کاهش تنوع ژنتیکی می‌تواند منجر به کاهش و حتی از دست دادن توانایی سازگاری با محیط شود (۲۷). به طور کلی می‌توان گفت که فعالیت‌های انسانی نقش زیادی در تداخل جمعیت‌ها، کاهش تنوع ژنتیکی و تبادل آلل‌ها داشته و شاید بتوان تعداد کم گروه‌ها را به این موضوع نسبت داد. باتوجه به موارد فوق پیشنهاد می‌گردد، این تحقیق بصورت گسترده‌ای با جمع‌آوری نمونه‌هایی از تمامی نواحی کشور و با روش‌های دیگر مولکولی انجام گیرد، تا بتوان بر اساس نتایج بدست آمده و شناسایی جمعیت‌های احتمالی بیشتر، مدیریت اصولی و جداگانه‌ای را برای ذخایر این گونه مهم اعمال نمود.

جمعیت به دست آمده از مناطق بومی نرخ بالاتری از تنوع ژنتیکی را در مقایسه با جمعیت‌های موجود در اکوسیستم‌های زراعی نشان داد. تغییرات جمعیتی در قالب گسترش جمعیت در اکوسیستم‌های کشاورزی مشاهده شد، در حالی که جمعیت‌های موجود در محیط‌های بومی با گذشت زمان پایدار گزارش شدند. دلایل کم بودن تنوع ژنتیکی بین مناطق جغرافیایی عواملی چون جریان ژن، عملکرد انسان، عملکرد باده‌ها، و پتانسیل تولید مثل زیاد *C. externa* عنوان شد. از نتایج بدست آمده استنباط می‌شود که اگر اکوسیستم‌ها، ممکن است در از بین رفتن ساختار موجود در بین جمعیت‌ها حتی در صورت زندگی در اکوسیستم‌های بومی نقش داشته باشند. در مطالعه کنونی ما فاصله ژنتیکی کم بین نمونه‌های جمعیت‌ها نشانگر شباهت زیاد تنوع ژنتیکی استان‌های مورد مطالعه می‌باشد. مقدار کم فاصله ژنتیکی در سایر جنس‌های گونه کریزوپرلا توسط دیگر محققین گزارش شده است (۲۱ و ۳۵). عدم انطباق داده‌های مولکولی و مناطق جغرافیایی در تحقیقات باربوسا و مورالس و همکاران (۳) و (۲۰) نیز گزارش شده است. آن‌ها به بررسی تنوع ژنتیکی دوازده جمعیت *C. externa* در کشور برزیل با استفاده از دو نشانگر مولکولی ژن سیتوکروم اکسیداز I و ISSR پرداختند. هر دو نشانگر سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را نشان دادند. این موضوع ممکن است ناشی از پدیده جریان ژن بالا بین جمعیت‌ها باشد. کم

## منابع

- 1-Abbot P. 2001. Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSR). *Journal of Insect Science* 1(1): 1-8.
- 2-Andrews C.A. 2010. Natural Selection, Genetic Drift, and Gene Flow Do Not Act in Isolation in Natural Population. *Nature Education Knowledge* 3 (10):5, Available at [https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/natural-selection-genetic-drift-and-gene-flow-15186648/#\(visited 15.December2020\)](https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/natural-selection-genetic-drift-and-gene-flow-15186648/#(visited%2015.December2020)).
- 3-Barbosa N.C., Freitas S.D., and Morales A.C. 2014. Distinct genetic structure in populations of *Chrysoperla externa* (Hagen)(Neuroptera, Chrysopidae) shown by genetic markers ISSR and COI gene. *Revista Brasileira de Entomologia* 58(2): 203-211.
- 4-Borba R.D.S., Garcia M.S., Kovaleski A., Oliveira A.C., Zimmer P.D., Castelo Branco J.S., and Malone G. 2005. Genetic dissimilarity of lines of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) through ISSR markers. *Neotropical Entomology* 34(4): 565-569.
- 5-Canard M., McEwen P., New T., and Whittington A. 2001. Natural food and feeding habits of lacewings. *Lacewings in the Crop Environment* 1: 116-129.
- 6- Chatterjee SN., and Mohandas T.P. 2003. Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L., 46(3): 438-47.
- 7- Costa R.I., Souza B., and de Freitas S. 2010. Spatio-Temporal Dynamic of Green Lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) Taxocenosis on Natural Ecosystems. *Neotropical Entomology* 39(4): 470-475.
- 8- Duran C., Appleby N., Edwards D., and Batley J. 2009. Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualisation. *Current Bioinformatics* 4(1): 16-27.
- 9- Fumagalli L., Snoj A., Jesenšek D., Balloux F., Jug T., Duron O., Brossier F., Crivelli A.J., and Berrebi, P. 2002. Extreme genetic differentiation among the remnant populations of marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. *Molecular Ecology* 11(12): 2711-2716.
- 10- Huala L., Paredes M., Salazar L., Elgueta M., and Rebolled R. 2018. Genetic variability in *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae) populations in Chilean *Maytenus boaria* (Celastrales: Celastraceae). *Revista Colombiana de Entomología* 44(2): 260-265
- 11- Hufbauer R.A., and Roderick G.K. 2005. Microevolution in biological control: mechanisms, patterns, and

- processes. *Biological Control* 35(3): 227-239.
- 12- Hundsdoerfer A.K., and Wink M. 2009. Experimental population genetics in insects: inheritance of ISSR-PCR bands in an artificial population. *Zootaxa* 2231(1): 40-46.
- 13- Khidr S.K., Hardy I.C., Zaviezo T., and Mayes S. 2014. Development of microsatellite markers and detection of genetic variation between *Goniozus* wasp populations. *Journal of insect science* (Online), 14, 43. Available at <https://doi.org/10.1093/jis/14.1.43> (visited 8. December 2020).
- 14- Lourenço P., Brito C., Backeljau T., Thierry D., and Ventura M. 2006. Molecular systematics of the *Chrysoperla carnea* group (Neuroptera: Chrysopidae) in Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44(2): 180-184.
- 15- Luque C., Legal L., Staudter H., Gers C., and Wink M. 2002. ISSR (inter simple sequence repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas* 136(3): 251-253.
- 16- McEwen P., New T., and Whittington A.E. 2001. Lacewings in the crop environment. Cambridge university press.
- 17- Miller N., Birley A., Overall A., and Tatchell G. 2003. Population genetic structure of the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius* (L.), in relation to geographic distance, gene flow and host plant usage. *Heredity* 91(3): 217-223.
- 18- Mirmoayedi A. 2002. New records of Neuroptera from Iran. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 48: 197-201.
- 19- Mirmoayedi A., Rashidikhah F., Kahrizi D., Yari K. 2018. Genetic relationship between neuropteran families (Insecta, Neuropterida, Neuroptera) based on cytochrome oxidase sequences.- *Genetika* 50(2): 717-730.
- 20- Morales A.C and Freitas S. 2010. Haplotype characterization of the COI mitochondrial gene in *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) from different environments in Jaboticabal, state of São Paulo, southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 70(4): 1115-1121.
- 21- Morales A., Lavagnini T., and Freitas S. 2013. Loss of genetic variability induced by agroecosystems: *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) as a case study. *Neotropical Entomology* 42(1): 32-38.
- 22- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106(949): 283-292.
- 23- Pappas M., Broufas G., and Koveos D. 2011. Chrysopid predators and their role in biological control. *Journal of Entomology* 8(3): 301-326.
- 24- Peakall R., and Smouse P.E. 2006. Genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6(1): 288-295.
- 25- Rahimi A., Mirmoayedi A., Kahrizi D., Abdolshahi R., Kazemi E., and Yari KH. 2014. Microsatellite genetic diversity of *Apis mellifera meda* skorikov. *Molecular Biology Reports* 41: 7755-7761.
- 26- Rahimi A., Mirmoayedi A., Kahrizi D., Zarei L., and Jamali S. 2016. Genetic diversity of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda* Skorikow, 1829) populations based on ISSR markers. Rahimi et al. *Cellular and Molecular Biology* 62(4): 53-58.
- 27- Reed D.H., Lowe E.H., Briscoe D.A., and Frankham R. 2003. Fitness and adaptation in a novel environment: effect of inbreeding, prior environment, and lineage. *Evolution* 57(8): 1822-1828.
- 28- Roux O., Gevrey M., Arvanitakis L., Gers C., Bordat D., and Legal L. 2007. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43(1): 240-250.
- 29- Royan M., Rahimi G., Esmailkhanian S., Mirhoseini S., and Ansari Z. 2007. A study on the genetic diversity of the *Apis mellifera meda* population in the south coast of the Caspian Sea using microsatellite markers. *Journal of Apicultural Research* 46(4): 236-241.
- 30- Saha D., Ranjan S.K., Mallick C.B., Vidyarthi A.S., and Ramani R. 2011. Genetic diversity in lac resin-secreting insects belonging to *Kerria* spp., as revealed through ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 39(2): 112-120.
- 31- Souza G.A.D., Carvalho M.R.D.O., Martins E.R., Guedes R.N.C., and Oliveira L.O.D. 2008. Genetic diversity estimated through ISSR markers in populations of *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(7): 843-849.
- 32- Taylor S., Downie D., and Paterson I. 2011. Genetic diversity of introduced populations of the water hyacinth biological control agent *Eccritotarsus catarinensis* (Hemiptera: Miridae). *Biological Control* 58(3): 330-336.
- 33- Vaulin O., Zharikov T.Y., Gunderina L., and Zakharov I. 2006. Variability and differentiation of genomic DNA in the *Drosophila melanogaster* populations of Russia and Ukraine. *Drosophila Information Service* 89: 59-62.
- 34- Vianna M.F., Pelizza S., Russo M.L., Toledo A., Mourellos C., and Scorsetti A.C. 2020. ISSR markers to explore entomopathogenic fungi genetic diversity: Implications for biological control of tobacco pests. *Journal of Biosciences* 45, 136. Available at <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00108-4> (visited 7. December 2020)
- 35- Wells M.M. 1994. Small genetic distances among populations of green lacewings of the genus *Chrysoperla* (Neuroptera: Chrysopidae). *Annals of the Entomological Society of America* 87(6): 737-744.
- 36- Yeh F.C. 1999. POPGENE (version 1.3. 1). Microsoft Window-Bases Freeware for Population Genetic Analysis. Available at <http://www.ualberta.ca/~fyeh/> (visited 7. December 2020)



## Use of Microsatellite Markers for Analysis of Genetic Diversity between Populations of Green Lacewings *Chrysoperla carnea* (Neuroptera, Chrysopidae)

F. Abdolahadi<sup>1</sup>- A.N. Mirmoayedi<sup>2\*</sup>- S. Jamali<sup>3</sup>- L. Zarei<sup>4</sup>

Received: 29-12-2020

Accepted: 21-09-2021

**Introduction:** Green lacewings are active predators of Aphids, Psyllids, Mealy bugs. We used ISSR markers with 10 primers to evaluate the genetic polymorphism between populations of *Chrysoperla carnea* collected in 30 cities of 14 provinces of Iran with different climatic conditions and compared them with specimens of a population from Netherlands. Maximum and minimum of polymorphism were calculated successively of 88.88% for UBC-809 and 33.33% for UBC-886 primers. The Dutch specimens had the smallest genetic distance with populations of Guilan province and the largest genetic distance to Kerman province. The mean number of alleles for Dutch, Guilan and Kerman populations were successively 6.9, 6.6 and 4.1 and mean number of effective alleles were successively 1.48, 1.41 and 1.19.

**Materials and Methods:** 2000 specimens of *Chrysoperla carnea* collected from alfa alfa plantations in each of 14 provinces of Iran, 27 specimens sampled from each province besides another 27 specimens of a Dutch population acquired from Hamedan center for Science and technology and DNA extracted using Topaz Inc. kit , ISSR marker with 10 primers used. BioRad<sup>®</sup> thermocycler was used for PCR and PCR end product was electrophoresed in 2% Agarose gel and stained with ethidium bromide. Bands photographed using Gel Doc 2000. Hardy-weinberg's chi square ( $\chi^2$ ) equation was used for evaluate of equilibrium in the number of polymorphic alleles, Shannon and Nei indice for evaluation of heterozygosity, POPGENE for genetic distance , GenAlex 6 for cluster analysis, AMOVA for analysis of inter and intra populations diversity.

**Results and Discussion:** The total number of electrophoresis bands were 64 bands, 43 of them were polymorphic The range of changes of allelic sizes of primers were between 150-1500 bp. Polymorphic information content(PIC) was between 0.302-0.643 the maximum of it belonged to the primer UBC-809 and the minimum belonged to the primer UBC-812 (Table 3). In three populations of Dutch, Guilan and Kerman the maximum of alleles were seen in gene locus of UBC-809 suggesting that it is highly polymorphic, similar findings was found by Barbosa and co-workers. As in Fig (2) the cluster analysis based on use of Jaccard similarity coefficient, the populations clustered in three groups, the Dutch population together with those of Guilan, Mazendaran, Lorestan, East and west Azerbaijan provinces were gathered in the first cluster and populations of Kerman, Sistan and Beluchestan, Isfahan and Fars province were gathered in the second cluster and the populations of Hamedan, Zanzan, Kermanshah, Tehran and Kudistan provinces were in the third cluster. Principal Component analysis was also done, Eigen values, variances percentage and cumulative variances percentages by independent components and the range of variations represented by these components was shown in Table (5). 100% of variations were represented by first ten independent components. The first, second and third components successively represented 27.68, 20.57 and 13.01 percentages of all variations. These components independently from each other represented a percent of genetic diversity, not already known. The maximum of Shannon index was seen in gene locus of UBC-809 was 0.53 in Guilan province and the minimum 0.04 in Kerman province. These data were conceivable because there were nine alleles in gene locus of UBC-809 in population of Guilan province and two alleles in gene locus of UBC-812 in populations of Kerman province, the same index was calculated 0.58 for Dutch population. The maximum and the minimum of Nei's index (H) of gene diversity was calculated 0.35 for gene locus of UBC-809 in Guilan province and 0.009 for gene locus of UBC-812 in Kerman province successively and for Dutch population the index was 0.39. The maximum and minimum of observed heterozygosity (Ho) was 0.49 in gene locus of UBC-809 in Guilan and 0.031 in gene locus of UBC-812 in Kerman province successively. The maximum and minimum of expected heterozygosity

1, 2 and 3- Ph.D. Student of Agricultural Entomology, Professor and Associate Professor Department Plant Protection, Campus of Agriculture and Natural Resources Razi University, Kermanshah, Iran, respectively.

(\*- Corresponding Author Email: alimirmoayedi@gmail.com)

4- Assistant Professor Department Plant Production and Genetic Engineering, Campus of Agriculture and Natural Resources Razi University, Kermanshah, Iran

DOI: 10.22067/JPP.2021.67819.1001

was calculated as 0.579 in gene locus of UBC-809 in Mazendaran province and 0.034 in gene locus of UBC-886 in Hormozgan province successively. Having nine alleles in its gene locus and getting of maximum observed and expected heterozygosity therefore we can consider the UBC-809 primer as the best gene locus to express of gene diversity in all *Chrysoperla carnea* populations studied in our present study. We used  $\chi^2$  of Hardy-Weinberg equilibrium for all alleles studied, and with regard to H0 (Equilibrium in alleles frequency in studied populations) the most well adapted status to Hardy-Weinberg equilibrium was seen in gene loci of UBC-809, some of populations and gene loci did have Hardy-Weinberg equilibrium but others did have significant biases from this equilibrium which should be attributed to inadequate number of samples chosen (sampling errors) in the studied populations and or existence of non-reproducing alleles. Our study on population genetic diversity of *Chrysoperla carnea* showed that ISSR-PCR markers are the best to study the polymorphism of populations of this species, did not study hitherto in Iran. The primers used by us in this study for *Chrysoperla carnea* was equally used for other orders of insects such as Lepidoptera and Coleoptera (UBC-809) and used for order of Hemiptera (UBC-812, UBC-819).

**Conclusion:** More genetic diversity of alleles in populations of *Chrysoperla carnea* collected from non-treated alfalfa plantations than those treated with insecticides. Similar results was obtained in Brazil concerning populations of *Chrysoperla externa*. Our present study on *Chrysoperla carnea* in Iran showed us the similarity between gene frequencies in the studied provinces, similar results was found for other species of *Chrysoperla*. Some authors believe that reduction in heterozygotes alleles in population was caused by a reduction in effective number of alleles in that population. The decrease of allele's diversity could bring about a reduction of populations, even species, as well as the reproduction vigor of populations in a new environment. In insect breeding programs a reduction in genetic diversity has an impact of reduction of fitness or even the loss of fitness in such an environment in which those populations should be released. We propose that our research on heterozygosity of populations of *Chrysoperla carnea* to be continued in more agroecosystems in Iran with a similar or different molecular markers to have more informations about populations genetic diversity and finally to consider a logical management for preserving genetic reservoirs of them.

**Keywords:** *Chrysoperla carnea*, ISSR primers, Geographical populations, Genetic diversity