دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ٤٦٦٨-٢٠٠٨
http://jer.iau-arak.ac.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
(علمی- پژوهشی)
جلد ۹، شماره٤، سال ١٣٩٦، (٤٠٠-٣٩٣)

کاربرد نشانگر ملکولی RAPD در بررسی تنوع ژنتیکی کفشدوزک *Hippodamia variegata* (Col.:Coccinellidae) در استان لرستان

مریم هاشمی[1]، فاطمه نبی‌پور[2]، رضا یاری[3]، رضا جعفری[3]*

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی ملکولی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، ایران
۲- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران
۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی و گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، ایران

چکیده

کفشدوزک *Hippodamia variegata* Goeze (Col.:Coccinellidae) یکی از شکارگرهای مهم آفات در کشتزارهای ایران است. این شکارگر همه چیز خوار است و از شته‌ها و پسیل‌ها تغذیه می‌کند. مارکر RAPD نشانگر ژنتیکی مفیدی در بررسی تنوع ژنتیکی و چندشکلی در بین کفشدوزک‌ها می‌باشد. این تحقیق با هدف شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت کفشدوزک *Hippodamia variegata* در ۹ جمعیت طبیعی و ۲ جمعیت پرورش تجاری صورت پذیرفته است. برای بررسی تنوع ژنتیکی از ۸ آغازگر۱۰ نوکلئوتیدی تصادفی (C-15، C-16، C-18، C-19، BE-03، BE-09، B-01، B-06) استفاده گردید. تمامی آغازگرها باندهای واضح و تکرارپذیر ایجاد کردند. از ١٤٧ باند تولید شده ۸۲ باند یعنی۵۵/۷۸٪ باند چند شکل بودند. طول قطعات تکثیر یافته در آغازگرها از ۲۲۵ تا ۲۰۰۰۰ جفت باز متغیر بود. دندروگرام بر اساس ضریب تشابه جاکارد[1] به روش UPGMA[2] رسم گردید. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، بیانگر وجود تفاوت ژنتیکی بالا در بین جمعیت‌های مورد مطالعه در سطح استان لرستان بود. پرایمر BE-09 (باند ۲۸) بالاترین و پرایمر C-16 (باند ۱۳) کمترین تعداد باند را تشکیل دادند. به‌طوری‌که تنها دو جمعیت دورود و خرم‌آباد آن هم با درصد بسیار کم (به‌میزان ۰/۲۸۵ با ضریب جاکارد) نخستین خوشه را تشکیل می‌دادند و سایر خوشه‌ها با درصد تشابه بسیار کم تشکیل شدند که این امر حاکی از مستعد بودن شرایط اکولوژی و جغرافیایی استان لرستان با وجود کوچک بودن سطح استان برای ایجاد و حفظ تنوع ژنتیکی در کفشدوزک‌های استان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Hippodamia variegata*، RAPD، تنوع ژنتیکی، نشانگر ملکولی، کنترل بیولوژیک

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *Nabipor.f@gmail.com*

تاریخ دریافت مقاله: ٩٤/٧/١٢- تاریخ پذیرش مقاله: ٩٥/٧/١١

[1] . Jaccards similarity coefficient
[2] . Unweighted paired group method using aarithmetic average

مقدمه

خانواده کفشدوزک‌ها (Coccinellidae)، یکی از مهم‌ترین مجموعه‌های مفید در اکوسیستم‌های زراعی با کاربردی موثر و عملی در برنامه‌های مبارزه بیولوژیک با آفات گیاهان زراعی، باغی، جنگلی، مرتعی و حتی گلخانه‌ای به شمار می‌رود (Shojaei,1998). کفشدوزک *Hippodamia variegaea* یک گونه پلی‌فاژ با پراکنش جهانی در منطقه اروپا، شمال آسیا و آفریقا (پالئارکتیک) بوده و از آن‌جا به منطقه آمریکای شمالی (نئارکتیک) گسترش پیدا کرده است (Gordon., 1990; Krafsur *et al*., 2002). کفشدوزک *H.variegata* برخلاف بسیاری از کفشدوزک‌ها، تمایل کمی به هم‌خواری دارد از این رو برای پرورشِ انبوه، گونه بسیار مفیدی است (Gibson *et al*, 1992).

این کفشدوزک با داشتن جثه کوچک، قدرت جستجوگری زیاد و توانایی تولید مثلی بالا از موثرترین گونه‌های شکارگر در شرایط گلخانه می‌باشد (Ershova, 1981)، که می‌تواند در مدت زمان کوتاه جمعیت خود را در طبیعت زیاد کند (Kontodimas, 2004). کنترل بیولوژیک می‌تواند در راستای اهداف مدیریت جامع آفات، تاثیر به‌سزایی در حفظ تنوع زیستی، پایداری اکوسیستم و سلامت مواد غذایی داشته باشد. با توجه به گستردگی دامنه پراکنش کفشدوزک در مناطق مختلف کشور حمایت از جمعیت‌های بومی کفشدوزک، وارد سازی، پرورش و رها سازی آن‌ها در مناطقی که وجود ندارد، می‌تواند نقش بسیار مهمی در کاهش استفاده از سموم شیمیایی و تامین اهداف کنترل تلفیقی داشته باشد. کاربرد موفقیت‌آمیز عوامل کنترل بیولوژیک و استقرار مناسب جمعیت‌های آن‌ها در مناطق مختلف نیازمند آگاهی از جنبه‌های مختلف بیولوژیکی این گونه‌ها می‌باشد (Jafari *et al*., 2009).

مارکرهای مولکولی به‌طور مستقیم قادرند پراکندگی و تنوع ژنتیکی را تشخیص دهند. پرایمرهای RAPD کوتاه (معمولا ۱۰ نوکلئوتیدی) هستند و حداقل حاوی ۵۰٪ C+G می‌باشند. نشانگرRAPD دارای مزیت‌های فراوانی نسبت به سایر نشانگرها می‌باشد که از آن جمله می‌توان به مواردی از جمله هزینه کمتر نسبت به بسیاری از تکنیک‌های دیگر، نمونه‌برداری تصادفی از جایگاه‌های ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA جهت طراحی و ساخت پرایمر، امکان بررسی هم‌زمان چندین جایگاه ژنی در ژنوم نمونه‌ها، سرعت نسبتا زیاد برای بررسی تعداد زیادی نمونه، عدم نیاز به کاوشگر، عدم نیاز به مقدار زیاد DNA الگو، امکان بررسی گونه‌های مختلف با پرایمرهای یکسان و مطالعه تعداد زیادی نمونه در مدت کوتاه‌تر نسبت به سایر روش‌های ذکر شده، بررسی ژنتیک جمعیت، فیلوژنتیک، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تعیین پیوستگی با صفات مطلوب، بررسی جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی اشاره کرد (Deluchi, 1974). در بررسی تنوع ژنتیکی، بر روی کفشدوزک *Cryptolaemus montrouzieri* در استان مازندران با استفاده از نشانگر ملکولیRAPD بیشترین تشابه بین نمونه‌های اینسکتاریوم بهشهر و جمعیت جمع‌آوری از چالوس ۷۸ درصد بیان گردید. هم‌چنین کمترین تشابه میان جمعیت‌های تنکابن و فریدونکنار با ٤٧ درصد مشاهده شد (Bamher *et al*., 2013). بر اساس تحقیقاتی که بر روی کفشدوزک *Coccinella undecimpunctata* در کشور مصر صورت گرفت، ضریب تشابه بین کفشدوزک‌ها مورد مطالعه از ٤٠ درصد تا۹۳/۷۵ درصد متغیر بوده است (Haitham *et al*; 2009). بر اساس گزارشات Haubruge و همکاران (2002) بر روی گونه *Coccinella septempunctata* در کشور بلژیک ضریب تشابه بین نمونه‌های مورد مطالعه ۵۸/۹ درصد اعلام گردید.

با در نظر گرفتن اهمیت کفشدوزک‌ها در کنترل بیولوژیک و در مورد تنوع ژنتیکی کفشدوزک‌ها در ایران پژوهش‌های اندکی صورت گرفته انجام تحقیق در این زمینه امری لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق استفاده از نشانگرهای ملکولی به‌منظور ارزیابی و بررسی تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی جمعیت‌های کفشدوزک *Hippodamia variegata* در استان لرستان بوده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۹ جمعیت کفشدوزک *Hippodamia variegata* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان لرستان به‌همراه دو نمونه پرورش تجاری آن استفاده گردید که نمونه‌ها پس از جداسازی تا زمان استخراج DNA در اتانول ۹٦ درصد نگهداری شدند (Chapco *et al.*, 1992).

جدول۱- محل جمع‌آوری و کد نمونه‌های کفشدوزک *Hippodamia variegata*

Table 1- Collecting locations and codes of samples of *Hippodamia variegata*

Standard 2	Standard 1	PolDokhtar	Kuhdasht	Azna	Khorramabad	Dorud	Aligoudarz	Borujerd	Aleshtar	Nurabad
Darhim area	Shirinabad area	Sarab Hammam	foot of the Changiri Mountains	Darreh Takht	Sefid-Kooh	Bisheh Waterfall	Ab Sefid Waterfall	Vanai village	Sarab kahman	Kafraj village
S2	S1	P	K	Az	Kh	Dor	Al	B	Als	N

روش استخراج DNA

استخراج DNA از ۱۱ جمیعیت مذکور با استفاده از کیت استخراج انجام شد. ابتدا شکم یک کفشدوزک با اسکالپل باز و با آب مقطر استریل شستشو داده شد و در انکوباتور خشک گردید، با تیغ جراحی ناحیه شکمی نمونه به شدت خرد شد و در میکروتیوپ ml ۱/۵ قرار داده شد سپس مقدار ٦۰۰ میکرومولار بافر تجزیه‌کننده (A)[1] اضافه شد. در ادامه مقدار ٤۰ میکرومولار پروتئیناز K [2] اضافه کرده و میکروتیوب به‌مدت ۱۵ ثانیه وارونه نگهداشته شد تا کاملا هموژن و یکنواخت گردد. بعد به مدت ۲ ساعت در دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و نمونه‌ها در ۱۲ هزار دور به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی (٦۰۰ میکرومولار) به یک میکروتیوب جدید منتقل و معادل حجم آن از بافر (B)[3] r که حاوی فنل می‌باشد و برای حذف پروتیین به‌کار می‌رود اضافه گردید و چندین‌بار وارونه نگهداشته شد و دوباره نمونه‌ها در ۱۲ هزار دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد فاز رویی به یک لوله جدید منتقل و سپس مقدار ٦۰۰ میکرومولار بافر (C)[4] که حاوی الکل است به آن اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. مجددا نمونه‌ها در ۱۲ هزار دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی دور ریخته شد و مقدار ۲۰۰ میکرومولار بافر شستشو که حاوی الکل ۷۰ درصد است اضافه گردید و چندین‌بار آن‌را وارونه کرده و مجددا نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و فاز بالایی تخلیه شد. لوله‌ها به‌مدت ٥ دقیقه دردمای ٦٥ زیر هود قرار داده شدند تا خشک شوند و نهایتا ۳۰ میکرومولار بافر (E)[5] افزوده و به آرامی وارونه شدند. محلول در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد در یخچال تا زمان انجام PCRنگه‌داری شد همچنین برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۷ درصد استفاده شد (Haitham *et al*., 2009).

[1] Lysis Buffer
[2] Proteinase K
[3] Binding Buffer
[4] Precipitation Buffer
[5] Solvent Buffer

پرایمرهایRAPD[1]

در تحقیق حاضر از ۸ آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی خریداری شده از شرکت ژن فن‌آوران استفاده شد.

جدول۲- لیست نام و توالی آغازگرها

Table 2- list of names and sequences of primers

Name of prime	Sequence
C-۱۵	5′-GACGGATCAG-3′
C-۱۶	5′-CACACTCCAG-3′
C-۱۸	5′-TGAGTGGGTG-3′
C-۱۹	5′-GTTGCCAGCC-3′
BE-۰۳	5′-TGGACTCGGT-3′
BE-۰۹	5′-CCCGCTTTCC-3′
B-۰۱	5′-GTTTCGCTCC-3′
B-۰۶	5′-TGCTCTGCCC-3′

واکنش زنجیره پلیمرازPCR[2]

برای انجام PCR از روش Master mix استفاده شد. با این روش از اتلاف اجزاء واکنش جلوگیری گردیده و دقت عمل افزایش می‌یابد و موارد انتقال مواد کاهش پیدا می‌کند و در نتیجه امکان آلودگی کمتر می‌شود. برای تهیه مخلوط اصلی، حجم کل آن با در نظر گرفتن تعداد نمونه‌ها به علاوه یک واکنش بیشتر (جهت تامین مقادیر اتلاف در هنگام توزیع) محاسبه شد. پس از اضافه کردن هر یک از مواد واکنش، آن‌ها را وارونه کرده تا کاملا مخلوط شوند که این حجم نهایی مخلوط اصلی را تشکیل داد. برای هر نمونه یک میکروتیوب در نظر گرفته شد و به میزان ۲۳ میکرولیتر از مخلوط اصلی و ۲ میکرولیتر از DNAالگو به آن‌ها اضافه گردید. دناتور شدن DNA الگو در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد و به دنبال آن واکنش تکثیر DNA در ۳۹ سیکل به شرح زیر انجام شد. دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۳۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه به‌مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

جدول ۳-مقدار مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر

Table 3- The amount of material required for PCR reaction in 25 µl volume

Compounds	The required amount for a total volume of 25 µl	Concentration
ddH_2O(DW)	17 µl	ــــ
Buffer 10X	2/5 µl	1x
$MgCl_2$	µl۱	2/5mM
dNTP	5 µl۰/	0/2mM
Primer	2 µl	0/8mM
Taq polymerase	4 µl/0	2 U
DNA	2 U	10ng

[1] Random Amplification of Polymorphic DNA
[2] Polymerase chain reaction

جدول ٤: سیکل دمایی PCR

Table 4: Thermal cycle of PCR

Step	Temperature(°C)	Time	Cycle
Initial Denaturation	94	5(min)	1
Denaturation	94	30(Sec)	39
Annealing	36	40(Sec)	
Extension	72	40(Sec)	
Final extension	72	5(min)	

الکتروفورز

جهت آشکارسازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در حجم ۸۰ml استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی نمونه‌ها از رنگ سایبر گرین استفاده گردید.

آنالیز داده‌ها

با محاسبات چشمی اندازه باندها با توجه به اندازه باندهای مارکرDNA محاسبه و در نرم‌افزارExcel وارد شد و حضور یا عدم حضور هر باند برای هر جمعیت به‌صورت ماتریس یک/صفر وارد برنامه MVSP3.0 و NTSYpc 2.02 شده و از آن برای ترسیم درختچه‌های فیلوژنی استفاده گردید. اعتبار سنجی دندروگرام‌ها نیز با کمک نرم‌افزار win Boot صورت پذیرفت.

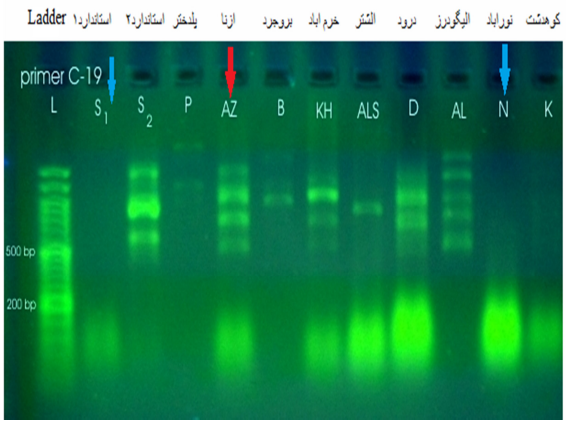
نتایج و بحث

از ۸ آغازگر به کار رفته در این تحقیق، تمامی آغازگرها باندهای قابل کد گذاری ایجاد کردند که در ژل‌های به‌دست آمده باندها در محدوده ۲۲۵ bp تا ۲۰۰۰ bp کد گذاری شدند (شکل ۱). تعداد کل باندهای تکثیر شده توسط کل آغازگرها ١٤٧ عدد به‌دست آمد که شامل ۸۲ باند چندشکل بودند. آغازگر BE-09 با ١٦ باند دارای بیشترین باند چندشکل و آغازگر C-16 با ٤ باند دارای کمترین باند چندشکلی بودند. آغازگر BE-09 که بیشترین تعداد باند چندشکل را نشان داد، می‌تواند برای مطالعه جمعیت *H.variegata* با استفاده از نشانگر ملکولی رپید در سطح وسیع به‌کار گرفته شود.

خوشه‌بندی باندها با روشUPGMA و ضریب جاکارد با استفاده از نرم‌افزار MVSP Ver. 3.0 مورد بررسی قرار گرفتند که در بین نمونه‌های مورد مطالعه تنها دو جمعیت دورود و خرم آباد آن‌هم با درصد بسیار کم ۰/۲۸۵ درصد نخستین خوشه را تشکیل دادند. سایر خوشه‌ها با درصد تشابه بسیار کم تشکیل شدند (شکل ۲). حداکثر شباهت بین دو جمعیت دورود و خرم‌آباد به میزان ۰/۲۸۵ و حداقل شباهت بین خوشه حاوی نمونه استاندارد یک و پلدختر با سایر جمعیت‌ها به میزان ۰/۱۳ مشاهده شد. در رسته‌بندی دو بعدی با روش PCoA شاهد پراکندگی جمعیت‌ها از یکدیگر می‌باشیم. نتایج بیانگر وجود تفاوت ژنتیکی بالا در بین جمعیت‌های مورد مطالعه در سطح استان لرستان بود. این امر حاکی از مستعد بودن شرایط اکولوژی و جغرافیایی استان لرستان با وجود کوچک بودن سطح استان(تقریبا ۲۸ هزار و ۳۰۰ کیلومتر مربع) برای ایجاد و حفظ تنوع ژنتیکی در کفشدوزک‌های این منطقه می‌باشد . این امر لزوم حفظ و صیانت از زیستگاه‌های طبیعی نمونه‌های فوق در استان با توجه به تراکم جمعیت (سیزدهمین استان پر جمعیت کشور معادل ۲/۳ درصد کل جمعیت کشور و تراکم ٦٢ نفر در هر کیلومتر مربع) و هجوم به نقاط زیست این حشره، تاکید دارد.

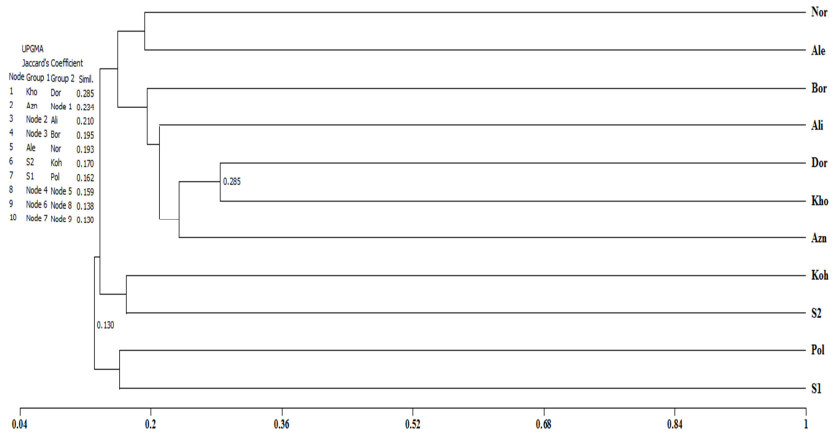
به دلیل عدم وجود اطلاعات در مورد تنوع ژنتیکی این کفشدوزک، امکان مقایسه داده‌ها با دیگر نتایج این گونه وجود ندارد. اما پژوهش صورت گرفته در مورد بررسی تنوع ژنتیکی گونه *Cryptolaemus montrouzieri*، بیشترین تشابه بین نمونه‌های اینسکتاریوم بهشهر و جمعیت جمع‌آوری شده از چالوس با ۰/۷۸ و کمترین تشابه بین جمعیت‌های تنکابن و فریدونکنار با ۰/٤۷ گزارش نمودند (Bamher *et al*., 2013). در بررسی تنوع ژنتیکی کفشدوزک *Coccinella undecimpunctata* از ده منطقه کشور مصر با استفاده از روشRAPD ضریب تشابه بین نمونه‌های DNA کفشدوزک‌ها را ٤۰ درصد تا۹۳/۷۵ درصد گزارش نمودند که درجه بالایی از تنوع ژنتیکی بین کفشدوزک‌های مورد مطالعه می‌باشد (Haitham *et al*; 2009).

در بررسی تنوع ژنتیکی کفشدوزک *Coccinella septempunctata* در کشور بلژیک درجه بالایی از تنوع ژنتیکی بین کفشدوزک مورد مطالعه ارائه و با استفاده از ضریب تشابه Nei & Li و گروه بندی جمعیت‌ها با روشUPGMA میزان تشابه را ۵۸/۹٪ گزارش نمود و نشان داد که نشانگر RAPD روشی مناسب برای بررسی پلی مورفیسم بین جمعیت‌های کفشدوزک‌ها می‌باشد (Haubruge *et al*; 2002) که این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از استفاده از گونه‌های مختلف کفشدوزک، تفاوت در مناطق جغرافیایی، نوع پرایمرهای مورد استفاده یا حتی شرایط آزمایش باشد.



شکل۱: الگوی ژل الکتروفورز RAPD کفشدوزک گونه*H. Variegata* با استفاده از پرایمر C -19

Fig 1- RAPD electrophoresis pattern of H. variegata spp. Using primer C-19



شکل ۲- دندروگرام بر اساس روش UPGMA، ضریبJaccard برای یازده جمعیت کفشدوزک *H.variegata* با استفاده از نرم‌افزار MVSP 3

Fig 2-Dendrogram based on the UPGMA method, the Jaccard coefficient for 11 populations of H.*variegata* using MVSP 3 software

	S1	S2	Pol	Azn	Bor	Kho	Ale	Dor	Ali	Nor	Koh
S1	1.000										
S2	0.094	1.000									
Pol	0.162	0.167	1.000								
Azn	0.129	0.127	0.194	1.000							
Bor	0.102	0.152	0.142	0.193	1.000						
Kho	0.139	0.120	0.128	0.265	0.225	1.000					
Ale	0.159	0.069	0.137	0.154	0.128	0.186	1.000				
Dor	0.127	0.164	0.148	0.204	0.187	0.285	0.181	1.000			
Ali	0.126	0.180	0.116	0.166	0.177	0.203	0.155	0.261	1.000		
Nor	0.121	0.143	0.114	0.123	0.138	0.174	0.193	0.194	0.158	1.000	
Koh	0.116	0.170	0.088	0.111	0.174	0.125	0.134	0.132	0.168	0.126	1.000

شکل ۳- ماتریس تشابه ۱۱ جمعیت مورد مطالعه با استفاده از روش UPGMA و ضریب Jaccard

Fig 3-Similarity matrix of 11 populations studied using UPGMA method and Jaccard coefficient

References

Asghari, F., Sami, M. A., Mahdian, K. 2012. Some biological Characteristics of Hippodamin variegata (Goeza) Reared on Brevicoryne brassicae L. and eggs of Ephestia Kuehniella Zeller. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 1:19-27.

Bamehr, S., Mohammadi Sharif, M., Hadizadeh, A. L., Karimi, G . 2013. Investigation of gentic Diversity of Cryptolaemus montrouzieri in Mazandaran Province Using RAPD Molecular Marker.Third National Conference on Agricultural Biotechnology in Iran

Jafari, R. and Vafaei Shoushtari, R. 2009. Effect of different temperatures on life developmental stages of Hippodamia variegata Goeze (Col., Coccinellidae), feeding on Aphis fabae Scopoli (Hem., Aphididae). Journal of Entomological Researc,1(4);289-297.

Shojaei, M. 1998. Otolgy Insectology, Social Life, Natural Enemies ((Biologic Fight)). Publishing and Printing University of Tehran, 550pp

Krafsur, E. S., Okrycki, J. J. and Nariboli, P. 1996. Gene flow in colonizing Hippodamia variegate ladybird beetle population .Journal of Heredity 87, 41-47

Kontodimas, D. C. and Stathas, G. J. 2005 Phenology ,fecundity and life table parameters of the predator Hippodamia variegate reared on Dysaphis crataegi. Biocontrol **50**, 223-233

Ershova, N. I. 1981.Aphidophagous Coccinellids in covered ground. Zash.Rast. 1:29-30/REV.Appl.Entomol.A 69:6030, 1981

Williams, G. K., Kubelik, R., Livak, J., Rafalski, J. and Tingey, V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers is useful as genetic markers.Nucleic Acide Research, 18:6531-6535.

Wauyh, Rand Powell, W. 1992. Using RAPDmarker for crop improvement Trends in Biotechnology, 10:186-191**.**

Haitham, B. M. B., Dalia A. M. S., Salwa, K. M. and Mohamed, S. S. 2009. First comparative phonetic studies of the polymorphic species of *Coccinellaundecimpunctata*Linnaeus, using morphometric and RAPD approaches in Egypt .Egypt Acad. J .biolog.Sci.,C Physiology& Molecular Biology ,1(1) :1-19.

Haubruge, E.,Vanlerberghe -Masutti, F., Collingon, Pand Francis, F. 2002. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of Genetic variation in population of *Coccinella septempunctata* in Belgium. Med.Fac.Landbouww Univ.Gent, 67/3:557-561.

Chapco, W., Ashton, N. W., Martel, R. K. B. and Antonishyn, N. 1992 . A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers, Genome35:569-574.

Gibson, R. L., Elliott, N. C. and Schaefer, P. 1992. Life history and development of Scymnusfrantalis (Coleoptera: Coccinellidae) on four species of aphid.Journal of Kansas Entomology Society 65,410-415.

Journal of Entomological Research

Volume 9, Issue 4, pages: 393-400

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
http://jer.iau-arak.ac.ir

The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of *Hippodamia variegate* (Col.:Coccinellidae) in Lorestan provinces, Iran

***M. Hashemi*[1], *F. Nabipour*[2*], *R. Yari*[3], *R. Jafari*[3]**

1- Graduated Student of Biology, Faculty of Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran
2- Young Researchers and Elite club, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences and Faculty of Agriculture Science, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

Abstract

Hippodamia variegata is one of the major predators of crop pests which feed an aphids and psyllids. RAPD is a useful genetically marker to determine polymorphism and relationship among LadyBirds species. The aim of this study was to identify and study the genetic diversity of *Hippodamia variegata* Goeze (Col.:Coccinellidae)in 9 natural populations and 2 commercial breeding populations. To investigate the genetic diversity of 8 primers, 10 randomized nucleotides (C-15, C-16, C-18, C-19, BE-03, BE-09, B-01, B-06) were used. All primers created clear and repeated bands. Of the 147 bands produced, 82 bands, 55.78 percent, were polymorphic. The length of amplified fragments by all primers varied from 225 to 2000 base pairs. The dendrogram was calculated based on the Jaccard similarity coefficient by UPGMA method. The results of cluster analysis indicated that there was a high genetic difference among the populations studied in Lorestan province. Primer BE-09 (28 bands) produced the highest and primer C-16(13 bands) produced the lowest number of bands. Two populations Dorud and Kuhdasht formed the first cluster close to 0.28 Jaccard coefficient of using UPGMA method. Other clusters formed a very low percentage of similarity. This shows that the susceptibility of the ecology and geography of the province despite the small size establishes and maintains the genetic diversity in the province of the ladybirds. The results of cluster analysis indicated high genetic differences between populations studied in the Lorestan province.

Keywords: *Hippodamia variegata* ، RAPD-PCR ،genetic variation

* Corresponding Author, E-mail*: abipor.f@gmail.com*
Received:4 Oct. 2015 – Accepted: 2 Oct. 2016