

شناسایی مولکولی سوسک‌های پوست‌خوار درختان نارون با استفاده از روش خط‌شناسه‌گذاری DNA barcoding

سودابه امینی^۱، جاماسب نوزری^{۱*} و رضا حسینی^۲

۱. گروه گیاه‌پزشکی-پرديس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ایران

۲. گروه گیاه‌پزشکی-دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۷/۲۱)

چکیده

سوسک‌های پوست‌خوار به عنوان یکی از مهم‌ترین آفات درختان جنگلی و فضای سبز به درختان ضعیف حمله و باعث نابودی آنها می‌شوند. درختان نارون نیز به عنوان یکی از مهم‌ترین میزبان‌های سوسک‌های پوست‌خوار شناخته شده‌اند. این گروه از سوسک‌ها با تغذیه از آوندهای آبکش و چوبی درختان نارون و همچنین انتقال قارچ بیماری‌زای عامل بیماری مرگ هلندی نارون، باعث ضعیف شدن و در نهایت نابودی درختان نارون می‌شوند. به منظور کنترل و پیشگیری از افزایش خسارت و شیوع بیماری مرگ هلندی نارون شناسایی گونه‌های سوسک‌های پوست‌خوار به عنوان اولین و مهم‌ترین قدم در مدیریت آنها اهمیت دارد. گونه‌های سوسک‌های پوست‌خوار از نظر ظاهری بسیار به هم شبیه هستند و شناسایی دقیق آنها خصوصاً در مراحل نابالغ با استفاده از صفات ریخت‌شناسی دشوار و نیازمند استفاده از روش‌های جدید مولکولی است. در این مطالعه با استفاده از روش مولکولی خط‌شناسه‌گذاری-دی ان ای بارکدینگ توالی با طول ۵۸۰ جفت باز از ژن سیتوکروم اکسیداز زیرواحد یک (COI) با استفاده از جفت پرایمر S1718 و A2411 برای شش گونه از سوسک‌های پوست‌خوار جمع‌آوری شده از روی درختان نارون توالی‌یابی شدند. توالی‌های بدست آمده توسط نرم‌افزار MEGA ver.0.7 تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد میانگین تفاوت نوکلئوتیدی بین گونه ۱/۹ درصد و بسیار بیشتر از تفاوت نوکلئوتیدی درون گونه‌ای ۰/۰۳ است که مطابق با قانون بارکد می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد نمونه‌ها تا سطح گونه تفکیک شده و توالی دی ان ای بارکد می‌تواند به عنوان ابزار قابل اعتماد برای شناسایی و تفکیک سوسک‌های پوست‌خوار درختان نارون استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: سوسک‌های پوست‌خوار، سیتوکروم اکسیداز یک، دی ان ای بارکدینگ، نارون.

identification of elm bark beetles through DNA barcoding

Sudabe Amini¹, Jamasb Nozari¹ and Reza Hosseini²

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

2. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: July 28, 2020 - Accepted: October 12, 2020)

ABSTRACT

Bark beetles as one of the most important pest group attacked to weak trees in forests and urban trees. *Ulmus minor* considers as an important host plant for bark beetles. This group of beetles feed on Phloem and transmit the pathogen of Dutch elm disease that cause high damage in *Ulmus* trees. The first and the most important step in preventing damage and management is accurate identification of bark beetles. Because of small size and similarity in morphological characters of bark beetles, identification of this group is difficult and time consuming. In this study a DNA-based method barcoding was used to identify six bark beetles species that collected on *Ulmus minor* through sequencing 580bp of cytochrome oxidase one genome by using A2411 and C-N-J1718 universal primers. Obtained sequences were analyzed by MEGA ver.0 software. The results Confirmed that the mean of interspecies nucleotide variation is 1.9% more than intraspecific variation 0.03% which confirmed DNA barcoding rule. The result showed that specimen identified in species level which proved DNA barcoding as a reliable tool to identify *Ulmus* bark beetles species.

Key words: Bark beetle, Cytochrome oxidase I, DNA barcoding, *Ulmus minor*

* Corresponding author E-mail: nozari@ut.ac.ir

مقدمه

سوسک‌های پوست‌خوار متعلق به زیرخانواده Scolytinae (Col: Curculionidae) با بیش از ۶۰۰۰ گونه شناسایی شده در دنیا، از مهم‌ترین آفات درختان جنگلی و فضای سبز به شمار می‌روند (Lawrence & Newton, 1995; Jordal et al., 2000; Bright, 2014). سوسک‌های پوست‌خوار اغلب به درختان ضعیف و تحت تنش حمله کرده و با تغذیه و قطع شیره آوندی منجر به از بین رفتن درختان می‌شوند (Grégoire and Evans, 2004). سوسک‌های این زیرخانواده از نظر تغذیه به دو گروه تقسیم می‌شوند، گروه اول سوسک‌های پوست‌خوار که مستقیماً از پوست درختان تغذیه می‌کنند و گروه دوم سوسک‌های آمبروزیا (قارچ‌خوار) که از میسیلیوم قارچ‌های پرورش داده شده توسط سوسکها تغذیه می‌کنند. سوسک‌های آمبروزیا عامل انتقال قارچ‌های بیماریزا و در نتیجه عامل انتشار و گسترش بیماری‌ها از جمله بیماری مرگ هلندی نارون Dutch elm disease هستند (Roepert et al., 1980). درخت نارون متعلق به خانواده Ulmaceae به عنوان یکی از مهم‌ترین میزبان‌های سوسک‌های پوست‌خوار شناخته شده است. درختان نارون در فضای سبز شهری، جنگل‌ها و تنوع زیستی اهمیت بسیار زیادی دارند. سوسک‌های پوست‌خوار سبب اختلال در جریان شیره گیاهی درختان نارون شده و صدمات شدیدی به درختان وارد می‌آورند که در نهایت موجب ضعف شدن و مرگ آنها می‌گردند. بنابراین شناسایی سوسک‌های پوست‌خوار به منظور مدیریت بیماری در درختان نارون امری ضروری است. بر اساس مطالعات انجام شده روی سوسک‌های پوست‌خوار درختان نارون استان گیلان در سال ۱۳۹۱ سه گونه سوسک پوست‌خوار *Scolytus pygmaeus*، *Scolytus ensifer* و *Scolytus ecksteini* شناسایی شدند (امینی و حسینی، ۱۳۹۱). سوسک‌های پوست‌خوار درختان نارون دارای بدنی کوچک به اندازه کمتر از ۱۰ میلیمتر هستند که از نظر ظاهری شباهت بسیار زیادی بهم دارند. بدلیل شباهت ریختی این گروه از سوسک‌ها شناسایی دقیق آنها دشوار است. همچنین به دلیل ناقل بودن بیماری، شناسایی آنها در مراحل اولیه لاروی بسیار حائز اهمیت می‌باشد که با استفاده از صفات ریختی امری بسیار دشوار و تاحدودی غیرممکن است. بنابراین شناسایی سوسک

های پوست‌خوار نیازمند توسعه یک روش سریع و قابل اطمینان جهت شناسایی دقیق این گونه‌ها است. شناسایی مولکولی گونه‌ها به طور گسترده‌تری در مطالعات اکولوژیکی و تشخیصی، به ویژه در رابطه با حشرات که شناسایی ریخت شناسی آنها سخت و وقت‌گیر است استفاده می‌شود (Saccagii et al., 2008). با توجه به مطالعات انجام شده بررسی توالی DNA میتوکندریایی برای تشخیص در سطح گونه کاربرد دارند، از جمله تکنیک‌های مورد استفاده در شناسایی مولکولی حشرات، DNA بارکدینگ است که بر پایه یک قطعه کوتاه استاندارد متشکل از ۵۰۰-۶۵۰ bp از ناحیه ۵ ژن سیتوکروم اکسیداز زیرواحد یک، DNA میتوکندری بوده که شناسایی و تشخیص نمونه را تا سطح گونه امکان‌پذیر کرده است (Caterino et al., 2000; Hebert et al., 2003). به دلیل اهمیت اقتصادی بالای سوسک‌های پوست‌خوار مطالعات مولکولی بسیاری در دنیا روی این گروه از سوسک‌ها انجام شده است که با استفاده از نشانگرهای مختلف مولکولی موفق به شناسایی و تفکیک گونه‌های سوسک‌های پوست‌خوار شده اند (Johnson et al., 2008; Stauffer et al., 1997; Kelley et al., 1999; Cognato & Sperling, 2000; Cognato & Sun, 2007; Jordal and Kambstad, 2014). درحالی‌که در ایران مطالعات مولکولی به ندرت و به صورت موردی روی این گروه سوسک‌ها انجام گرفته است. در مطالعه‌ای دو گونه *Scolytus ensifer* و *Scolytus ecksteini* از سوسک‌های پوست‌خوار نارون شناسایی و به دلیل شباهت ریختی زیاد با استفاده از طراحی پرایمر اختصاصی تفکیک شدند (Amini & Hosseini, 2016). هدف از انجام این مطالعه شناسایی سوسک‌های پوست‌خوار درختان نارون، ارزیابی عملکرد نشانگر دی ان ای بارکدینگ (سیتوکروم اکسیداز یک میتوکندری) در تفکیک گونه‌های سوسک‌های پوست‌خوار نارون و در نهایت اختصاص بارکد منحصر به فرد برای هر یک از گونه‌های شناسایی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری سوسک‌های پوست‌خوار

در این مطالعه به منظور جمع‌آوری سوسک‌های پوست‌خوار از مناطق مختلف استان‌های گیلان، مازندران،

مقایسه آن‌ها، از دستگاه اسپکتروفتومتر Eppendorf Biophotometer استفاده شد. غلظت نمونه DNA بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر با طول موج ۲۶۰ نانومتر نمایش داده و ثبت شد. برای تکثیر بخشی از ناحیه ژنی سیتوکروم اکسیداز یک، از آغازگرهای عمومی S1718، A2411 استفاده شد (جدول یک)؛ (Simon et al., 1994; Normark et al., 1999). واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری و با دستگاه مدل BIONEER و طبق برنامه دمایی تنظیم شده انجام شد (جدول ۲). به منظور بررسی محصولات PCR و اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده و همچنین تعیین کیفیت و کمیت محصول بدست آمده، محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۴ درصد الکتروفورز انجام شد. جهت مقایسه قطعه DNA تکثیر شده از DNA Ladder با اندازه ۱۰۰ bp استفاده شد. الکتروفورز به مدت ۳۵ تا ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ و شدت جریان ۸۰ میلی آمپر انجام شد. پس از آن ژل بارگزاری شده توسط دستگاه ژل داک (UVITEC) مشاهده و عکس‌برداری شد. نمونه‌های با باندهای قوی و فاقد باندهای غیر اختصاصی و شکستگی برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شدند. مرحله توالی‌یابی با استفاده از کیت BigDye Terminator v3.1 Sequencing انجام و توسط دستگاه ABI 3730xl DNA Analyzer مورد خوانش قرار گرفت.

گلستان و البرز نمونه‌برداری از روی درختان نارون انجام شد. با توجه به اهمیت شناسایی میزبان (درختان نارون)، روش نمونه برداری به صورت مشاهده مستقیم و با استفاده از چاقو و قلم‌مو از زیر پوست درختان خسارت دیده انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی الکل ۹۶ درصد، با برچسبی شامل اطلاعات لازم از جمله تاریخ جمع‌آوری، محل جمع‌آوری و گیاه میزبان به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور شناسایی ریختی، نمونه‌ها در آزمایشگاه زیر بینوکولار OLYMPUS مدل SZX-ILLK200 مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس خصوصیات ریختی و با استفاده از کلید شناسایی مربوطه (Pffefer, 1995; Amini & Hosseini, 2012) تفکیک شده و به هر کدام شماره شناسایی اختصاص یافت. از هر شماره تعدادی نمونه برای بررسی‌های مولکولی درون تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده و به فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

به منظور استخراج DNA از هر گونه ۶ نمونه انتخاب و استخراج از قسمت پای حشرات با استفاده از روش Chelex انجام شد (حسینی، ۱۳۹۰). تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش‌های مختلف و

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ناحیه ژنی COI

توالی	نام پرایمر
C-1-J-1718 A2411	GGAGGATTGGAAAATTGATTAGTTCC GCTAATCATCTAAAACTTTAATTCCWGTWG

جدول ۲- برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر بخشی از ناحیه ژنی COI

مرحله	دما	زمان
1	94°C	2 min
2	94°C	1 min
3	52°C	45 sec
4	72°C	1 min
5	Go to 2	34 cycle
6	72°C	5 min
7	End	

تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی

توالی‌های بدست آمده توسط برنامه Finch Tv (<http://www.geopiza.com/products/finchtv.html>) خوانده شده و برای هر گونه به طور جداگانه با استفاده از کروماتوگرام مربوط به هر توالی به طور چشمی ویرایش شدند. پس از ویرایش مشابهت‌یابی توالی‌ها در وب سایت مرکز بین‌المللی اطلاعات داده‌های بیوتکنولوژی (BLAST) (<http://ncbinlm.nih.gov/blast>) انجام شد. سپس توالی‌های بدست آمده در نرم افزار GENDOC مرتب و به پروتئین تبدیل شدند. برای اطمینان از صحت تبدیل ژن به پروتئین ترجمه در https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/ نیز انجام شد. مرتب‌سازی و هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها توسط نرم‌افزار MEGA ver.06 انجام شد. فواصل نوکلئوتیدی دوتایی با استفاده از روش [Kimura K2 P parameter, 1980] محاسبه شد. با استفاده از نرم افزار Species identifier ver. 8 فاصله بین گونه و درون گونه مشخص شد. درخت بر اساس روش Neighbour joining با استفاده از برنامه MEGA ver.0.7 رسم گردید (Tamura et al., 2011). گونه *Platypus cylindus* نیز به گروه خارجی در نظر گرفته شد که در قسمت ریشه درخت تبارزایی قرار گرفت.

نتایج

شناسایی ریختی

در این مطالعه تعداد ۵۸ نمونه از روی درختان نارون جمع‌آوری شدند که پس از شناسایی ریختی تعداد ۶ گونه از سوسک‌های پوست‌خوار شناسایی شدند. گونه‌ها متعلق به جنس *Scolytus* و شامل *Scolytus multistriatus* (Marsham, 1802); *Scolytus kirschii* Skalitzky, 1876 *Scolytus scolytus* (Fabricius, 1775); *Scolytus pygmaeus* (Fabricius 1871); *Scolytus ecksteini* Butovitsch, 1929 و *Scolytus ensifer* eichhoff, 1881 بودند.

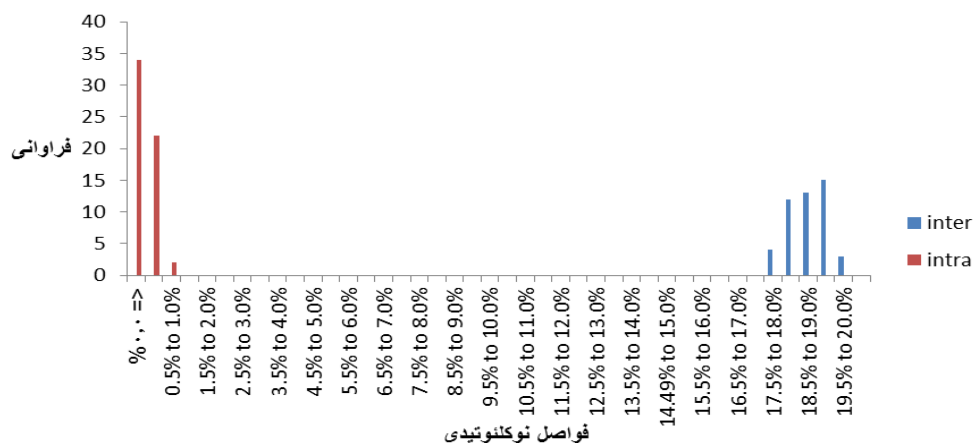
شناسایی مولکولی

پس از استخراج DNA میانگین غلظت DNA بدست

آمده مقدار ۱۶۴/۸ ng/ml و کیفیت آن با نسبت OD260 به OD280 ۱/۸ نشان داده شد. تعداد ۲۵ عدد توالی مربوط به ۶ گونه سوسک پوست‌خوار در این مطالعه بدست آمد. قطعه‌ای از ژنوم میتوکندریایی مربوط به ابتدای ناحیه سیتوکروم اکسیداز یک به طول ۵۸۰ جفت باز برای گونه‌های شناسایی شده با موفقیت تکثیر شد. در مرحله ویرایش، برخی از توالی‌ها که در کروماتوگرام دارای دو پیک در یک ناحیه و یا تعداد زیادی از بازهای ناخوانا بودند به دلیل کیفیت پایین خوانش، حذف شدند. نتایج بررسی میزان مشابهت توالی‌های بدست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) با استفاده از بلاست شباهت بالای ۹۰٪ را نشان داد به طوریکه بالاترین شباهت ۹۸ درصد و مربوط به گونه *Scolytus pygmaeus* بود. توالی گونه *Scolytus ecksteini* نیز برای اولین بار در بانک ژن به ثبت رسید (جدول ۳). توالی‌های مربوط به گونه *Scolytus scolytus* به دلیل کیفیت پایین توالی بدست آمده از بانک ژن دریافت و با سایر توالی‌ها مقایسه شد. پس از هم‌ردیفی توالی‌ها تعداد ۴۲۰ جفت باز هم‌ردیف شدند که از این تعداد ۲۳۸ نوکلئوتید حفاظت شده ۱۱۴ نوکلئوتید متغیر و ۶۸ نوکلئوتید حاوی اطلاعات مفید بودند. نتایج محاسبه نسبت بازهای نوکلئوتیدی در بین توالی‌ها نشان داد میانگین نسبت بازهای T:C:A:G برای کل نمونه‌های استفاده شده به ترتیب ۳۲/۲، ۲۱/۳، ۳۰/۲ و ۱۶/۳ بود. (جدول ۳). نتایج فواصل نوکلئوتیدی توالی‌های بدست آمده با استفاده از روش k2P نشان داد فواصل نوکلئوتیدی بین صفر تا ۲/۵ درصد برای کل گونه‌ها متغیر بود. میانگین فاصله نوکلئوتیدی درون گونه‌ای ۰/۰۳ درصد و میانگین فاصله بین گونه‌ای ۱/۹ درصد محاسبه شد (شکل ۱). محدوده‌ی فاصله درون-گونه‌ای بین صفر تا ۰/۰۴۷ درصد بود که بیشترین فاصله نوکلئوتیدی در افراد گونه *Scolytus ensifer* و کمترین فاصله مربوط به افراد گونه‌های *Scolytus ecksteini* مشاهده شد که هیچ اختلاف ژنتیکی را نشان ندادند. در بررسی روابط بین گونه‌ها از طریق درخت تبارزایی که بر اساس روش NJ انجام گرفت، در

مربوط به هر گونه نیز به صورت مونوفیلیتیک در کلادها با نیای مشترک نمایش داده شدند (شکل ۲).

تبارنمای بازسازی شده گونه‌ها هر کدام به درستی در شش کلاد به صورت مجزا قرار گرفتند و با بوت استرپ بالای ۸۰ از هم تفکیک شدند. نمونه‌های



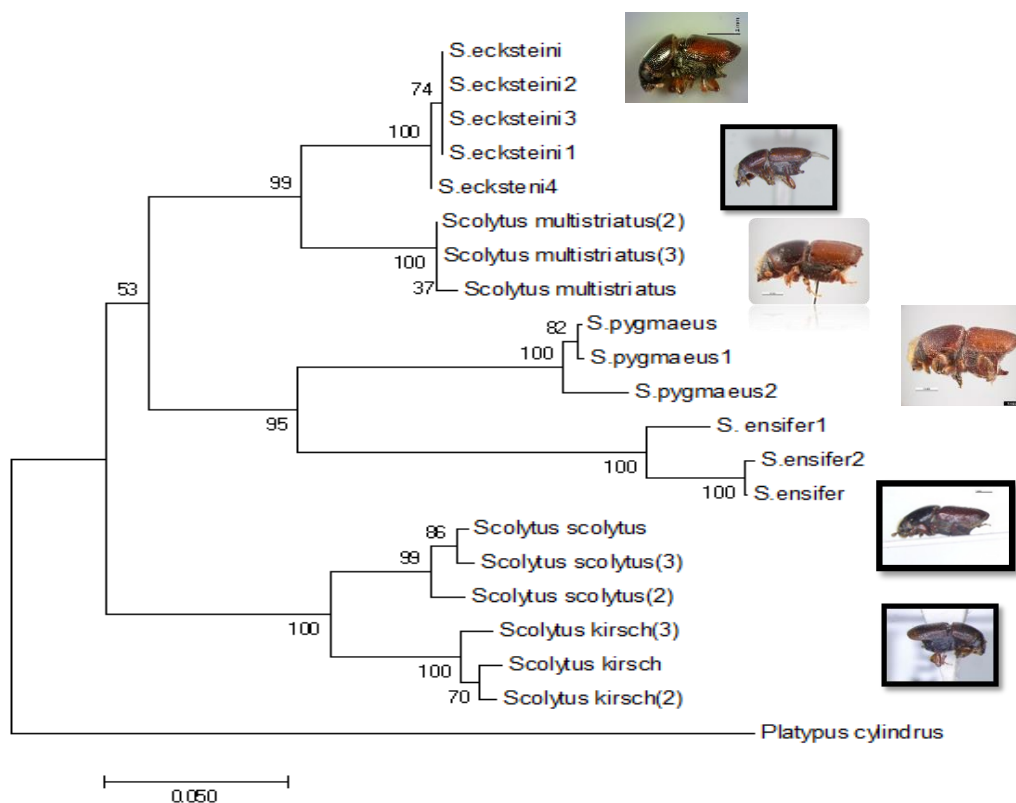
شکل ۱- نمایش هیستوگرام توزیع فواصل نوکلئوتیدی بین و درون گونه‌ای بر اساس مدل P K2. ستون‌های سمت چپ فواصل درون گونه‌ای و ستون‌های سمت راست فواصل بین گونه‌ای را نشان می‌دهد.

جدول ۳- تعداد و نسبت نوکلئوتیدها و درصد GC و AT توالی‌های بدست آمده

نام گونه	شماره دسترسی	AT%	GC%
<i>Scolytus pygmaeus</i>	JX089346	63/9	36/2
<i>Scolytus ensifer</i>	JX913804	63/9	36/1
<i>Scolytus multistriatus</i>	MG594266	63/8	36/2
<i>Scolytus ecksteini</i>	JX416909	65/4	34/6
<i>Scolytus kirschi</i>	MF593052	65/5	34/4
<i>Scolytus scolytus</i>	HQ883678	65/4	33/9

جدول ۴- مقایسه فواصل دوتایی نوکلئوتیدها گونه‌های سوسک‌های پوست‌خوار درختان نارون

نام گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	
<i>Scolytus ecksteini</i>																				
<i>Scolytus ecksteini</i>	0/00																			
<i>Scolytus ecksteini</i>	0/03	0/03																		
<i>Scolytus ecksteini</i>	0/00	0/03	0/03																	
<i>Scolytus ecksteini</i>	0/00	0/00	0/03	0/00																
<i>Scolytus pygmaeus</i>	1/94	1/94	1/9	1/94	1/94															
<i>Scolytus pygmaeus</i>	1/98	1/98	1/94	1/98	1/98	0/03														
<i>Scolytus pygmaeus</i>	2/05	2/05	2/01	2/05	2/05	0/22	0/24													
<i>Scolytus ensifer</i>	2/49	2/49	2/45	2/49	2/49	2/17	2/16	2/21												
<i>Scolytus ensifer</i>	2/48	2/48	2/44	2/48	2/48	1/82	1/82	1/86	0/47											
<i>Scolytus ensifer</i>	2/45	2/45	2/41	2/45	2/45	2/2	2/2	2/25	0/03	0/44										
<i>Scolytus multistriatus</i>	0/75	0/75	0/72	0/75	0/75	2/06	2/09	2/2	2/23	2/25	2/19									
<i>Scolytus multistriatus</i>	0/75	0/75	0/72	0/75	0/75	2/06	2/09	2/2	2/23	2/25	2/19	0/00								
<i>Scolytus multistriatus</i>	0/81	0/81	0/78	0/81	0/81	2/13	2/17	2/28	2/31	2/33	2/27	0/05	0/05							
<i>Scolytus scolytus</i>	1/94	1/94	1/9	1/94	1/94	2/38	2/34	2/51	2/51	2/42	2/53	1/94	1/94	1/97						
<i>Scolytus scolytus</i>	1/97	1/97	1/94	1/97	1/97	2/26	2/22	2/38	2/34	2/22	2/33	1/84	1/87	1/90	0/19					
<i>Scolytus scolytus</i>	1/98	1/98	1/94	1/98	1/98	2/42	2/38	2/55	2/57	2/38	2/57	1/98	1/98	1/98	0/8	0/22				
<i>Scolytus kirschi</i>	2/02	2/02	1/98	2/2	2/02	2/44	2/40	2/59	2/64	2/38	2/60	2/05	2/05	2/08	0/7	0/85	0/7			
<i>Scolytus kirschi</i>	1/99	1/99	1/95	1/99	1/99	2/44	2/40	2/6	2/64	2/38	2/60	2/02	2/02	2/05	0/7	0/79	0/7	0/11		
<i>Scolytus kirschi</i>	1/91	1/91	1/87	1/91	1/91	2/37	2/33	2/52	2/6	2/42	2/56	2/01	2/01	2/04	0/82	0/97	0/82	0/16	0/22	



شکل ۲ - درخت تبارزایی بر اساس روش Neighbour Joining و مدل K2 P با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ. عدد زیر نمودار نشان دهنده مقیاس درخت و میزان تغییرات توالی ها در طول شاخه ها است.

بحث

است. بنابراین روش های مولکولی تشخیصی دی ان ای بارکدینگ به عنوان روش تکمیلی سریع و دقیق در این مطالعه برای شناسایی سوسک‌های پوست‌خوار استفاده شد. با توجه به اطلاعات توالی‌های بدست آمده پس از بلاست و نشان دادن میزان شباهت بالا که تاییدی بر شناسایی ریختی در سطح گونه است و همچنین ایجاد توالی‌های پروتئینی صحیح بدون کدون توقف، این اطمینان حاصل شد که پرایمرهای استفاده شده ژن ناحیه مورد نظر را با موفقیت تکثیر کرده و پدیده NUMTS و یا هتروپلاسمی در این توالی‌ها اتفاق نیفتاده است. با توجه به اینکه فواصل نوکلئوتیدی در مبحث دی ان ای بارکدینگ جهت تفکیک گونه‌ها اهمیت زیادی دارد، نتایج فواصل نوکلئوتیدی بین گونه‌ها در این مطالعه که بر اساس قانون بارکد بایستی تقریباً ده برابر تفاوت نوکلئوتیدی درون گونه باشد نیز تایید شد. اما به دلیل اینکه گونه‌ها متعلق به یک جنس هستند و از روی یک میزبان جمع آوری شدند اختلاف زیادی بین گونه‌ها مشاهده

شناسایی حشرات به توجه به جثه ریز و شباهت بالای آنها با استفاده از روش های ریخت شناسی امری دشوار و وقت گیر است. امروزه استفاده از روش های مدرن مولکولی و توالی یابی ناحیه ژنی برای شناسایی این گروه از حشرات کاربردی وسیع دارد. در این مطالعه تعداد ۶ گونه سوسک پوست‌خوار از روی درختان نارون *Ulmus minor* شناسایی شده که گونه‌های شناسایی شده سوسک‌های پوست‌خوار متعلق به جنس *Scolytus* هستند که از نظر ظاهری بسیار بهم شبیه بوده و تنها از روی یک یا دو مشخصه در قسمت بندهای شکمی از هم تفکیک می‌شوند (Amini & Hosseini, 2012). از آنجاییکه تفکیک ریختی نمونه های بسیار کوچک تا سطح گونه وقت‌گیر و دشوار بوده و همچنین با توجه به اینکه سوسک‌های درختان نارون آمبروزیا و ناقل قارچ های بیماریزا هستند، شناسایی مراحل لاروی اهمیت بسیاری در مدیریت آنها دارند و از طریق شناسایی ریختی غیر ممکن

است (امینی و حسینی، ۱۳۹۱) همچنین برای تفکیک این دو گونه با توجه به اختلافات نوکلئوتیدی، پرایمرهای اختصاصی طراحی شد (Amini & Hosseini, 2014). در مطالعه حاضر نیز دو گونه مذکور با اختلاف بین گونه ۲،۴ درصد از هم متمایز شدند. نتایج این بررسی نشان داد توالی های بدست آمده با درصد اطمینان بالا به خوبی نمونه ها را در سطح گونه شناسایی و تفکیک کردند. در حال حاضر DNA بارکدینگ یک روش شناسایی استاندارد برای موجودات مختلف است که از آن به طور گسترده در تحقیقات تاکسونومی و رده بندی استفاده می شود. در واقع DNA بارکد مانند پلی بین تفاوت های موجود و اطلاعات ژنومی ارتباط برقرار می کند و یک وسیله قدرتمند برای مطالعات تاکسونومی محسوب می شود. (Hajibabaei et al., 2006). نتایج بدست آمده از این مطالعه علاوه بر اینکه درجهت غنی تر شدن اطلاعات کتابخانه بارکد می باشد، تاییدی بر کاربردی بودن قطعه دی ان میتوکندری در جهت شناسایی سوسک- های پوست خوار در سطح گونه است و نشان می دهد توالی های بدست آمده به عنوان نشانگر منحصر به فرد گونه های مختلف سوسک های پوست خوار نارون را در هر مرحله ای از رشد و همچنین با هر قطعه ای از بدن آنها با دقت و سرعت بالا مطابق با وضعیت تاکسونومیک آنها تفکیک می کند. بنابراین پیشنهاد می شود در مطالعات سوسک های پوست خوار درخت نارون در صورت ناقص بودن نمونه و عدم وجود اندام مورد نیاز جهت شناسایی ریختی، همچنین در صورت نیاز به شناسایی مراحل نابالغ از جمله لاروی یا شفیره از روش مولکولی دی ان ای بارکدینگ استفاده شود.

نتیجه گیری

در این مطالعه شش گونه از سوسک های پوست خوار درختان نارون از استان های مختلف البرز، گیلان، مازندران و گلستان جمع آوری و شناسایی شدند که تمام گونه های شناسایی شده متعلق به جنس *Scolytus* هستند. با توجه به اندازه کوچک، شباهت زیاد این حشرات و پیچیده بودن آنها از لحاظ

نشده. در ارتباط با اختلاف درون گونه ای افراد یک گونه، درون گونه های *Scolytus ecksteini* و *Scolytus multistriatus* نیز هیچ اختلاف نوکلئوتیدی مشاهده نشد، قابل ذکر است که تمام افراد این گونه ها از روی یک گونه میزبان و از یک منطقه در استان گلستان جمع آوری شده اند و احتمال می رود به همین دلیل تفاوتی بین توالی های افراد درون گونه مشاهده نشده است. در مطالعه ای کگناتو تفاوت نوکلئوتیدی درون گونه ای را در بین گونه های سوسک های پوست خوار جنس *Ips* بین ۰/۸٪ تا ۱/۳٪ بیان کرد (Cognato et al., 2006). در حالی که در اتریش فاصله نوکلئوتیدی درون گونه ای *Ips typographus* که از روی یک گیاه میزبان جمع آوری شدند صفر محاسبه و هیچ اختلاف درون گونه ای در گونه های این جنس مشاهده نشد (Stauffer, 1994). بنابراین طبق مطالعات انجام شده اختلاف میزبانی و اختلاف مکان جغرافیایی روی اختلاف نوکلئوتیدی درون گونه تاثیر دارد (Mopper, 1996). نتایج این مطالعه نشان می دهد فاصله بین افراد درون گونه و بین گونه همپوشانی نداشته و بر اساس مطالعات انجام شده هرچه میزان فاصله ایجاد شده بین فواصل نوکلئوتیدی درون گونه - و بین گونه بیشتر باشد نشان دهنده این است که ابزار دی ان ای بارکدینگ در جداسازی گونه ها موفق تر عمل کرده است (Hebert et al., 2003; Jordal et al., 2013). گونه های مختلف جنس *Scolytus* در درخت تبارزایی با بوت استرپ بالا (بیش از ۵۰ درصد) از هم متمایز و به صورت مونوفیلیتیک قرار گرفتند. گونه های *Scolytus kirschi* و *Scolytus scolytus*. که اختلاف ظاهری کمتری داشته و از نظر ظاهری نیز بهم بسیار نزدیک هستند در کلادهای نزدیک و کنار هم قرار گرفتند. افراد مربوط به یک گونه که اختلاف درون گونه ای کمی داشتند نیز هرکدام در یک کلاد قرار گرفتند. در مطالعه ای که روی شناسایی مرفولوژیک سوسک های پوست خوار درختان نارون انجام شد نتایج نشان داد گونه های *Scolytus ecksteini* و *Scolytus ensifer* از نظر ظاهری بسیار بهم نزدیک بودند به طوریکه تفکیک ریختی آنها نیازمند تخصص تاکسونومیست

از همکاران محترم دکتر محبوبه شریفی (موسسه گیاهپزشکی- گرگان) ، مهندس رسول راحتی (دانشجوی دکتری دانشگاه تهران) و مهندس سعید ابراهیمی (کارشناس ارشد دانشگاه کردستان) برای همکاری در اجرای بخشی از این تحقیق و دکتر Sarah Smith (دانشگاه میشیگان) برای تایید شناسایی ریختی نمونه های سوسک‌های پوست‌خوار کمال تشکر و قدردانی را دارند. این مطالعه با حمایت مالی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران انجام شده است.

تاکسونومیکی از DNA بارکدینگ برای اولین بار در ایران به عنوان روش جدید برای شناسایی این حشرات استفاده شد. لازم به ذکر است که توالی‌های مربوط به گونه *Scolytus ecksteini* برای اولین بار در بانک ژن به ثبت رسیدند. نتایج بدست‌آمده موفقیت این روش را در شناسایی گونه‌ها حتی گونه‌های نزدیک به هم تایید می‌کند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله ضمن تشکر ویژه از دکتر Massimo Faccoli و Isabel Martinez (دانشگاه پادوا-ایتالیا)

REFERENCES

1. Amini, S. & Hosseini, R. (2012). Introduction and morphological identification key for three elm bark beetle species in Guilan province. *Plant Pests Research*. 3, 13-20. (In farsi)
2. Amini, S. & Hosseini, R. (2015). A multiplex polymerase chain reaction based method for rapid identification of two species of the genus *Scolytus* Geoffroy (Col: Curculionidae: Scolytinae) in Iran. *Journal of Entomological and Acarological research*, 48, 51-81.
3. Caterino, M. S., S. Cho & Sperling, F. A. H (2000). The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. *Annual Review of Entomology*. 45: 1-54.
4. Cognato, A.I. & Sun. J.H. (2007). DNA based cladograms augment the discovery of a new *Ips* species from China (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Cladistics*. 23: 539-551.
5. Cognato, A. I. & Sperling, F. A. H. (2000). Phylogeny of *Ips* DeGeer species (Coleoptera: Scolytidae) inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14, 445-460.
6. Gregoire, J.C. & Evans, H.F. (2004) *Damage and control of BAWBILT organisms, an overview*. Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis, 24:19-37.
7. Hajibabaei, M., Janzen, J. M., Burns, D. H., Hallwachs, W. & Hebert, P. D. N. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. In *Proceeding of the National Academy of Science*, 103, 968-971.
8. Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. de Waard. (2003). Biological identification through DNA barcodes. In: *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 270: 313-321.
9. Hosseini, R. (2010) An introduction to the principle of molecular biology techniques (With emphasizing on the study of insects). University of Guilan Press. 232 pp (In Farsi).
10. Jackson, P. L., Straussfogel, D., Lindgren, B. S., Mitchell, S. & Murphy, B. D. (2008). Radar observation and aerial capture of mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopk. (Coleoptera: Scolytidae) in flight above the forest canopy. *Canadian Journal of Forest Research*, 38, 2313-2327.
11. Jordal, B.H., B.B. Normark, & Farrell, B.D. (2000). Evolutionary radiation of an inbreeding haplodiploid beetle lineage, (Curculionidae, Scolytinae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 71: 499-483.
12. Jordal, B. H. & Kambestad, M. (2014). DNA barcoding of bark and ambrosia beetles reveals excessive NUMTs and consistent east-west divergence across Palearctic forests. *Molecular Ecology Resources*, 14: 7-17.
13. Kelley, S. T. & Farrell, B. D. (1998). Is specialization a dead end? The phylogeny of host use in *Dendroctonus* bark beetles (Scolytidae). *Evolution*, 52, 1731-1743.
14. Lawrence, J. F. & Newton, A. F. (1995). Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, note, references and data on family grouped names). In: J., Pakaluk, S. A., Ślipiński, R. A. Crowson. *Biology, Phylogeny and classification of Coleoptera. Paper celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson, Volume 1*, Muzeum i Instytut Zoologii PAN, 2, 778-1006.
15. Moppe, S. (1996). Adaptive genetic structure in phytophagous insect populations. *Trends Ecological Evolution*., 11: 235-238.
16. Pfeffer A. & Knizek, M. (1995). Zentral und westpaläarktische Borken und Kernkäfer (Coleoptera:

- Scolytidae: Platypodidae). *Pro Entomologia*: 310 pp
17. Roeper R.A. L.M. Treeful. K.M. O'Brien. R.A. and Bunce, M.A.(1980). Life history of the ambrosia beetle *Xyleborus* (Coleoptera: Scolytidae) from in vitro culture. *Great Lakes Entomologist* 13: 141–144.
 18. Saccaggi, D. L., Kruger, K. & Pietersen, G. (2008). A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae). *Bulletin of Entomological Research*, 98, 27– 33.
 19. Stauffer, C, Lakatos, F, & Hewitt, G.M. (1999). Phylogeography and postglacial colonization routes of *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae). *Molecular Ecology*. 8: 763–773.
 20. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.