Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 52, No 1, Spring and Summer 2021 (15-23)
DOI: 10.22059/ijpps.2020.305542.1006948

دانش گیاهپزشکی ایران
دورۀ ۵۲، شمارۀ ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۰ (۲۳ص-۱۵)

شناسایی مولکولی سوسک‌های پوست‌خوار درختان نارون با استفاده از روش خط شناسه گذاری DNA barcoding

سودابه امینی[۱]، جاماسب نوزری[۱*] و رضا حسینی[۲]
۱. گروه گیاه پزشکی-پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ایران
۲. گروه گیاه پزشکی-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 شده اند. 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 منظورکنترل 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 خصوصا در مراحل نابالغ با استفاده از صفات ریخت شناسی دشوار و نیازمند استفاده از روش‌های جدید مولکولی است. در این مطالعه با استفاده از روش مولکولی خط شناسه‌گذاری- 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 سوسک های پوست‌خوار جمع‌آوری شده از روی درختان نارون توالی یابی 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 نمونه ها تا سطح گونه تفکیک شده و توالی دی ان 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 Amini[1], Jamasb Nozari[1] and Reza Hosseini[2]
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 پوست-خوار 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 مستقیما از پوست درختان تغذیه می‌کنند و گروه دوم سوسک‌های آمبروزیا (قارچ خوار) که از میسیلیوم قارچ‌های پروش داده شده توسط سوسکها تغذیه می‌کنند. سوسک های آمبروزیا عامل انتقال قارچ‌های بیماریزا و در نتیجه عامل انتشار و گسترش بیماری‌ها از جمله بیماری مرگ هلندی نارون Dutch elm disease هستند (Roeper *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 ضعیف 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 ۱۳۹۱سه 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 حشراتی 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 ناحیهٔ 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 etal.,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 an 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 هریک از گونه های شناسایی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری سوسک‌های پوست‌خوار

در این مطالعه به منظور جمع‌آوری سوسک‌های پوست-خوار از مناطق مختلف استان‌های گیلان، مازندران،

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 لوله های 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) نمونه‌ها تفکیک شده و به هر کدام شماره شناسایی اختصاص یافت. از هر شماره تعدادی نمونه برای بررسی‌های مولکولی درون تیوب‌های۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده و به فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

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 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 ۱۰۰bp 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 بااستفاده از کیت BigDye Terminator v3.1 Sequencing انجام و توسط دستگاه ABI 3730xl DNA Analyzer مورد خوانش قرار گرفت.

جدول ۱-آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ناحیه ژنی COI

نام پرایمر	توالی
C-1-J-1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC
A2411	GCTAATCATCTAAAAACTTTAATTCCWGTWG

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

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

تجزیه و تحلیل داده های 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 بین المللی اطلاعات داده‌های بیوتکنولوژی(http://ncbinlm.nih.gov/blast)BLAST انجام شد. سپس توالی ژن‌های به دست آمده در نرم افزار GENDOC مرتب و به پروتئین تبدیل شدند. برای اطمینان از صحت تبدیل ژن به پروتئین ترجمه در سایت 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 روشK2 P Kimura] [2 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

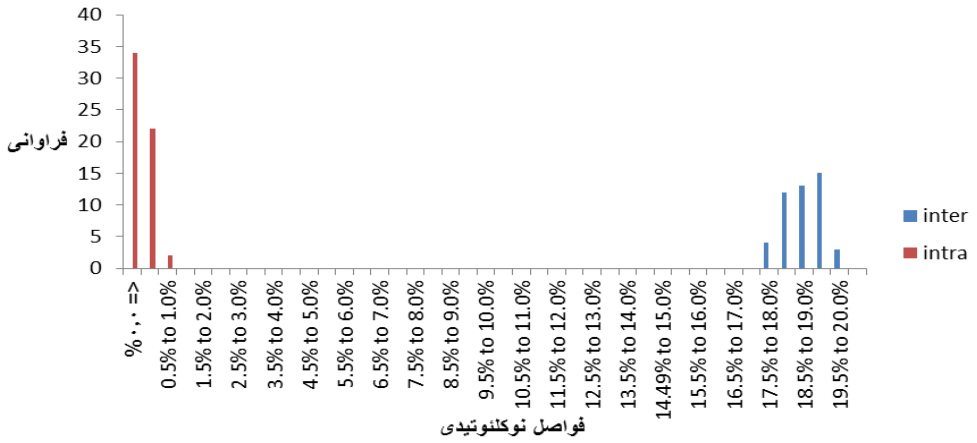
شناسایی ریختی

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. گونه-ها متعلق به جنس *Scolytus* و شامل *Scolytus multistriatus* (Marsham, 1802); *Scolytus kirschii* Skalitzky, 1876 *Scolytus scolytus* (Fabricius, 1775); *Scolytus pygmaeus* (Fabricius1871); *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 یدست 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 توالی-ها 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 ۱۱۴نوکلئوتید متغیر و ۶۸ نوکلئوتید حاوی اطلاعات مفید بودند. نتایج محاسبه نسبت بازهای نوکلوتیدی در بین توالی‌ها نشان داد میانگین نسبت بازهای T:C:A:G برای کل نمونه‌های استفاده شده به ترتیب۳۲/۲، ۲۱/۳، ۳۰/۲ و۱۶/۳ بود. (جدول۳). نتایج فواصل نوکلئوتیدی توالی های بدست امده با استفاده از روش k2P نشان داد فواصل نوکلئوتیدی بین صفر تا 2/5 درصد برای کل گونه ها متغیر بود. میانگین فاصله نوکلئوتیدی درون گونه‌ای ۰/۰۳ درصد و میانگین فاصله بین گونه ای1/9 درصد محاسبه شد(شکل ۱). محدوده‌ی فاصله درون-گونه‌ای بین صفر تا 0/047 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

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 مربوط به هر گونه نیز به صورت مونوفیلیتیک در کلادها با نیای مشترک نمایش داده شدند (شکل۲).



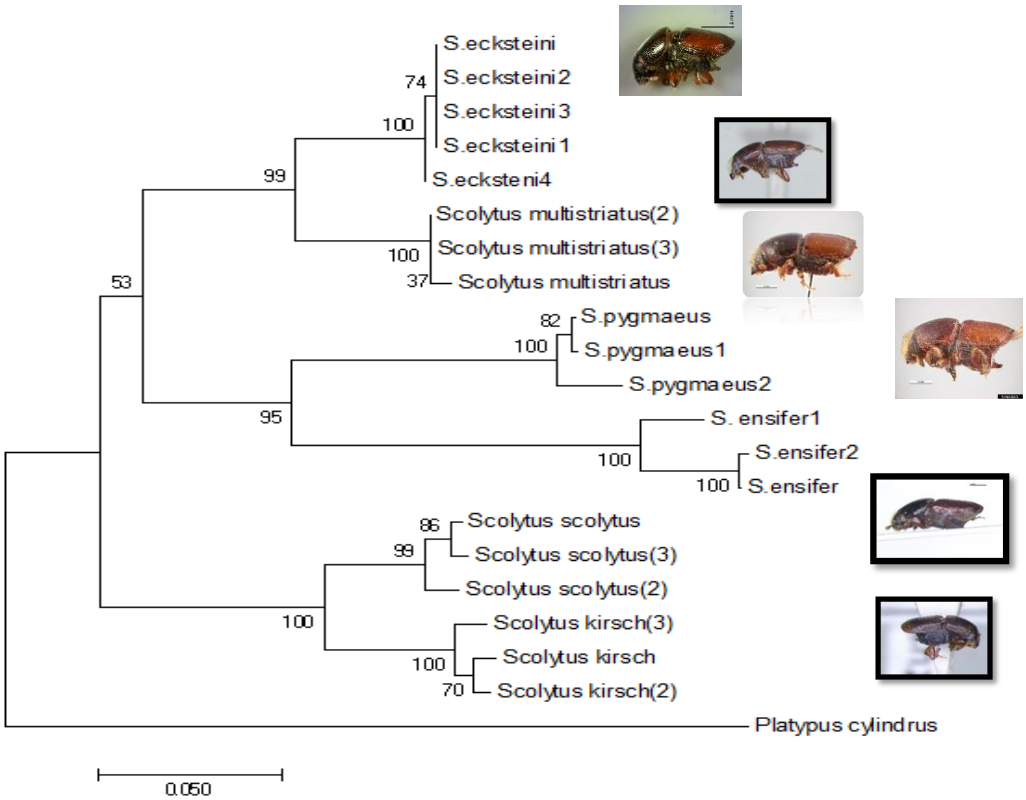
شکل ۱- نمایش هیستوگرام توزیع فواصل نوکلئوتیدی بین و درون گونه¬ای بر اساس مدل P K2. ستون¬های سمت چپ فواصل درون گونه¬ای و ستون¬های سمت راست فواصل بین گونه¬ای را نشان می¬دهد.

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

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

جدول ۴- مقایسه فواصل دوتایی نوکلئوتیدها گونه های سوسک‌های پوست‌خوار درختان نارون

نام گونه	۱	۲	۳	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠	١١	١٢	١٣	١٤	١٥	١٦	١٧	١٨	١٩
Scolytus ecksteini																			
Scolytus ecksteini	0.00																		
Scolytus ecksteini	0.03	0/03																	
Scolytus ecksteini	0/00	0/03	0/03																
Scolytus ecksteini	0/00	0/00	0/03	0/00															
Scolytus pygmaeus	1/94	1/94	1/9	1/94	1/94														
Scolytus pygmaeus	1/98	1/98	1/94	1/98	1/98	0/03													
Scolytus pygmaeus	2/05	2/05	2/01	2/05	2/05	0/22	0/24												
Scoytus ensifer	2/49	2/49	2/45	2/49	2/49	2/17	2/16	2/21											
Scoytus ensifer	2/48	2/48	2/44	2/48	2/48	1/82	1/82	1/86	0/47										
Scoytus ensifer	2/45	2/45	2/41	2/45	2/45	2/2	2/2	2/25	0/03	0/44									
Scolytus multistriatus	0/75	0/75	0/72	0/75	0/75	2/06	2/09	2/2	2/23	2/25	2.19								
Scolytus multistriatus	0/75	0/75	0/72	0/75	0/75	2/06	2/09	2/2	2/23	2/25	2.19	0/00							
Scolytus multistriatus	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						
Scolytus scolytus	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					
Scolytus scolytus	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				
Scolytus scolytus	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			
Scolytus kirschi	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		
Scolytus kirschi	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	
Scolytus kirschi	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



شکل۲ - 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

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 گونه-های 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 بسیارکوچک 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. 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 پروتینی 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 تقریبا ده برابر تفاوت نوکلئوتیدی درون گونه باشد نیز تایید شد. اما به دلیل اینکه گونه-ها متعلق به یک جنس هستند و از روی یک میزبان جمع آوری شدند اختلاف زیادی بین گونه‌ها مشاهده

نشد. 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 گونه‌ها از روی یک گونه میزبان و از یک منطقه در استان گلستان جمع‌آوری شده اند و احتمال می‌رود به همین دلیل تفاوتی بین توالی‌های افراد درون گونه مشاهده نشده است. در مطالعه‌ای کگناتو تفاوت نوکلئوتیدی درون گونه‌ای را در بین گونه‌های سوسک‌های پوست‌خوار جنس *Ips* بین ۰/۸٪ تا ۱/۳ ٪ بیان کرد (Cognato *et al.*,2006) درحالیکه در اتریش فاصله نوکلئوتیدی درون‌گونه‌ای *Ips typographus* که از روی یک گیاه میزبان جمع آوری شدند صفر محاسبه و هیچ اختلاف درون گونه‌ای در گونه‌های 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 می‌دهد 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 گونه‌ها موفق تر عملکرده است (Hebert *et al.*, 2003; Jordal *et al.*, 2013). گونه‌های مختلف جنس *Scolytus* در درخت تبارزایی با بوت استرپ بالا (بیش از ۵۰ درصد) از هم متمایز و به صورت مونوفیلیتیک قرار گرفتند. گونه‌های *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 درون‌گونه‌ای کمی داشتند نیز هرکدام در یک کلاد قرار گرفتند. در مطالعه ای که روی شناسایی مرفولوژیک سوسک های پوست‌خوار درختان نارون انجام شد نتایج نشان داد گونه‌های *Scolytus ecksteini* و *Scolytus ensifer* از نظر ظاهری بسیار بهم نزدیک بودند به طوریکه تفکیک ریختی آنها نیازمند تخصص تاکسونومیست 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 دوگونه 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 می‌شود. در واقع DNA بارکد مانند پلی بین تفاوت‌های موجود و اطلاعات ژنومی ارتباط برقرار می‌کند و یک وسیله قدرتمند برای مطالعات تاکسونومی محسوب می‌شود. (Hajibabaei *et al.*, 2006) . نتایج بدست آمده از این مطالعه علاوه بر اینکه درجهت غنی‌تر شدن اطلاعات کتابخانه بارکد می‌باشد، تاییدی بر کاربردی بودن قطعه دی ان میتوکندری در جهت شناسایی سوسک-های پوست‌خوار در سطح گونه است و نشان می‌دهد توالی‌های بدست آمده به عنوان نشانگر منحصر به فرد گونه های مختلف سوسک‌های 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 تاکسونومیکی آنها تفکیک می‌کند. بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات سوسک‌های پوست‌خواردرخت 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 پوست‌خوار درختان نارون از استان‌های 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

تاکسونومیکی از DNA بارکدینگ برای اولین‌بار 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) 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.

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 cytochromeoxidase 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.