ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹٦
صفحه ۳۲۱ - ۳۱۷

مطالعه تنوع ژنتیکی پروانه کرم خراط (*Zeuzera pyrina* L.) در ایران

The Study of Genetic divergent in the Leopard Moth (*Zeuzera pyrina*) in Iran

محمد جواد ارده*[۱]

۱- استادیار، بخش تحقیقات حشره‌شناسی کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

Ardeh MJ*[1]

1- Assistant Professor, Department of Agricultural Entomology, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mjardeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹٦/۲/۳۱)

چکیده

استفاده از نشانگرهای ملکولی می‌تواند تنوع در جمعیت آفات را آشکار نموده و به انتخاب روش‌های مناسب کنترل آن‌ها کمک کند. در تحقیق حاضر تنوع ژنتیکی در کرم خراط (آفت مهم چوب‌خوار گردو) در مناطق مختلف آلوده کشور با استفاده از آغازگرهای منطقه COI و ITS مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌های به‌دست آمده به‌کمک برنامه‌های BioEdit بر هم انطباق داده شده و به‌کمک برنامه PAUP مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در انطباق توالی‌های COI، ٦٥٤ موقعیت برای نوکلئوتیدها مشخص شد که ٤٥٩ موقعیت به‌صورت نقاط با ثبات، ١٤٩ موقعیت غیر اطلاع رسان و ٤٩ موقعیت اطلاع رسان بودند. در حالی در انطباق توالی‌های ITS-1، ٥٠٤ موقعیت برای نوکلئوتیدها مشخص شد که ١٠٨ موقعیت باثبات، ٣٧٨ موقعیت غیر اطلاع رسان و ١٨ موقعیت اطلاع رسان بودند. در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده برای توالی‌های مربوط به ناحیه COI، جمعیت‌های منطقه گناباد، شاهرود، تبریز، کرمان و کرج در کنار هم قرار گرفتند، که نشان دهنده تفاوت کم بین توالی‌های آن‌ها بود. این اختلاف کم برای منطقه ITS-1 نیز با وضوح بیش‌تری به چشم می خورد به‌طوری‌که در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده جمعیت‌های مناطق کرج، شهریار، شاهرود و خراسان، بسیار نزدیک به هم قرار گرفتند، در حالی‌که جمعیت سرایان (استان خراسان جنوبی) و گناباد (خراسان رضوی) که تقریبا هم مرز هستند، بسیار دورتر از هم قرار گرفتند. بر این اساس می‌توان گفت که تفاوت بین جمعیت‌های کرم خراط کمتر تحت تاثیر تغییرات ژنتیکی بوده و سایر شرایط از جمله میزبان نقش پر رنگ‌تری را در این خصوص دارا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی

آفات گردو
کرم خراط
DNA ریبوزومی
DNA میتوکندریایی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.16.8]

کرم خراط (Lep. Cossidae) *Zeuzera pyrina* یکی از آفات چوب‌خوار بوده که خسارت زیادی به درختان میوه به ویژه گردو و سیب وارد می‌سازد. در کشور ما این آفت در مناطقی با ارتفاع کمتر از ۱۵۰۰ متر هر سه سال دو نسل و در مناطق مرتفع تر هر دو سال یک نسل دارد (Radjabi 1986). با تشدید خشک‌سالی در سال‌های اخیر این آفت به باغات کشور خسارت زیادی وارد ساخته است (Radjabi 2001). مطالعه ژئومتریک و مورفومتریک کرم خراط در سه منطقه از استان‌های تهران، مرکزی و مازندران نشان از وجود تغییرات و تنوع در جمعیت‌های مورد بررسی بر روی درختان سیب و گردو داشته است (Nozari 2008). این امر می‌تواند بر نحوه رفتارهای تغذیه‌ای و رجحان میزبانی و رفتارهای تولیدمثلی تاثیرگذار باشد. به‌دلیل احتمال وجود زیر گونه‌هایی از پروانه کرم خراط می‌بایست مطالعات وسیع‌تری صورت گیرد (Nozari 2008). یکی از راه‌هایی که به‌خوبی امکان مشخص کردن تنوع جمعیتی و وجود زیرگونه‌های احتمالی را مشخص می‌کند استفاده از نشانگرهای ملکولی است (Ardeh 2008). منطقه ژنی[1] ITS از جمله نشانگرهای استاندارد برای مطالعه تنوع ملکولی (گونه‌های نزدیک به هم) می‌باشد (Tautz et al. 2003). این منطقه ژنی هم به لحاظ قابل اعتماد بودن و هم به لحاظ پایداری مناسب (در عین دارا بودن تغییرات کافی) برای مطالعات فیلوژنی قابل استفاده می‌باشد (Keller et al. 2010). به‌طوری‌که تجزیه و تحلیل اطلاعات به‌دست آمده از توالی‌های منطقه COI، برای تکمیل مطالعات تبارشناسی در مهره داران استفاده می‌شود (Vences et al. 2005). این درحالی است که در برخی گزارش‌ها عدم امکان تمایز (در نمونه‌های مورد بررسی) به‌دلیل وجود تعداد زیاد تغییرات در این منطقه ژنی نیز بیان شده‌است (Shull et al. 2001). به‌علاوه مطالعه دو گونه (Hammerschmidt) *Cossus redtenbacheri* و (Staudinger) *Cossus insularis* نشان داده که تغییرات مشاهده شده در بین آن‌ها کمتر تحت تاثیر تفاوت‌های ژنتیکی بوده و سایر موارد رفتاری و اکولوژیکی در این تنوع و تفرق نقش پررنگ‌تری دارند (Vergara et al. 2012). از مهم‌ترین راه‌های کنترل این آفت خطرناک که تقریبا در تمام مناطق کشور (به‌خصوص در پی خشکسالی‌های متوالی) توصیه شده، استفاده از فرمون‌های جنسی این آفت و پروانه زنبورمانند (*Synanthedon tipuliformid*) برای شکار انبوه آن می‌باشد. با این وجود قدرت جلب‌کنندگی فرمون‌های جنسی نصب شده متفاوت است. به‌طوری‌که در یک منطقه یک نوع فرمون و در منطقه دیگر فرمون دیگر بیش‌ترین شکار را دارد. بررسی تنوع جمعیت‌های کرم خراط، بر اساس دامنه میزبانی و پراکنش، می‌تواند وجود اختلافات و تفاوت‌ها را آشکارتر سازد. برای این منظور نمونه‌های کرم خراط از استان‌های آذربایجان شرقی، تهران، خراسان رضوی، خراسان جنوبی، کرمان، مرکزی و یزد (حداقل ۱۰ حشره کامل از هر منطقه) جمع‌آوری شد.

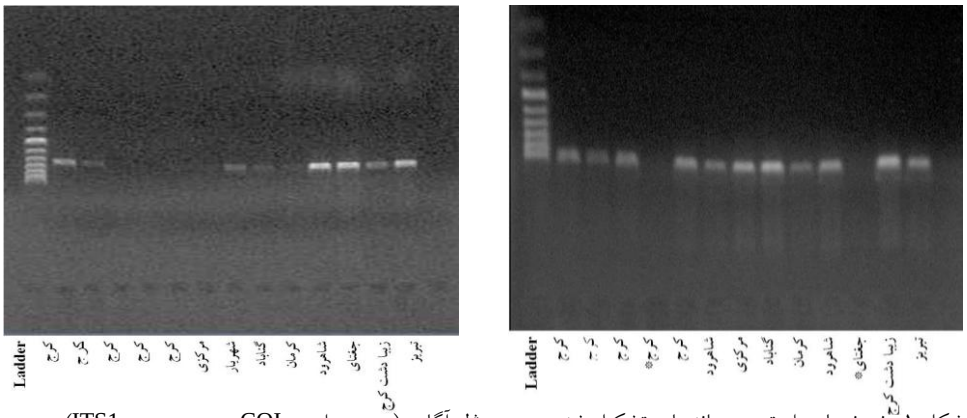
[1] ITS =Internal Transcribed Spacer

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای توالی‌یابی نمونه‌های کرم خراط

آغازگرها	محل اتصال	توالی (۳'- ۵')
ITS-1	Forwards	TTCTTTTCCTCCSCTTAYTRATATGCTTAA
	Reveres	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS-1	Forwards	ATGTGCGTTCRAAATGTCGATGTTCA
	Reveres	TACACACCGCCCGTCGCTACTA
ITS-2	Forwards	TGTGAACTGCAGGACACAT<G>
	Reveres	ATGCTTAAATTTAGGGGG<T>
COI	Forwards	GGTCAACAAATCATAAAGATATTG<G>
	Reveres	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATC<A>

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.16.8]



شکل ۱- نمونه‌هایی از تصویر باندهای تشکیل شده بر روی ژل آگارز (سمت راست COI و سمت چپ ITS1)

پس از استخراج DNA از آغازگرهای ذکر شده در منابع (Vergara et al. 2012; Shull et al. 2001; Lewter et al. 2006) برای تکثیر قسمت‌های ITS و COI در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. در نهایت آغازگرهایی که محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آن‌ها واضح‌ترین باندها را بر روی ژل ایجاد کرده بودند انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

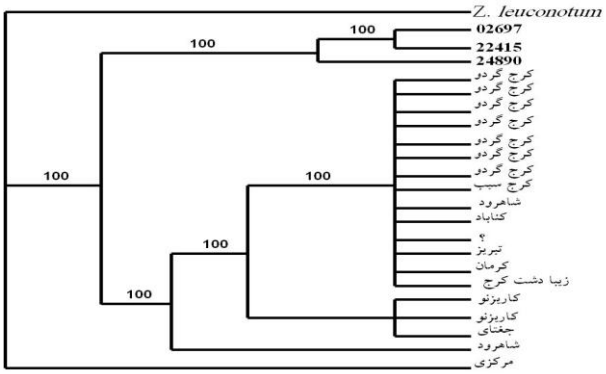
چرخه‌های دمایی شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۳۳ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها به رشته الگو در ۵۹-۵۵ درجه سانتی‌گراد (بسته به دمای ذوب آغازگرها) به مدت ٤۵ ثانیه و مرحله گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه و سرانجام یک چرخه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه بود. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگاروز ۱/۳ درصد الکتروفورز شده و باندهای حاصله به کمک اشعه UV تصویر برداری شد (شکل ۱). برای اطمینان از تکرار پذیر بودن باندهای حاصله، حداقل سه بار برای هر نمونه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکرار شد. سپس قسمت باقی‌مانده محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (بعد از الکتروفورز) برای توالی‌یابی یک‌طرفه، با آغازگر ابتدایی (Forward)، مورد استفاده قرار گرفت. توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده به روش ClustalW Multiple Alignment با استفاده از برنامه (Hall 1999) BioEdit هم‌ردیف‌سازی[1] شده و محل قرارگیری بازها، به‌دقت مورد بازنگری قرار گرفت. توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از دو روش Maximum Parsimony و Maximum Likelihood موجود در نرم‌افزار PAUP (Swofford 2002) مورد تجزیه تحلیل واقع شده و درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد.

از مجموع ۵۷ محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که برای توالی‌یابی ارسال شد، ۱۹ توالی مربوط به قسمت *COI*، برای انطباق مناسب و قابل استناد بودند. در توالی‌های منطبق شده، ٦٥٤ موقعیت برای نوکلئوتیدها مشخص شد که ٤٥۹ موقعیت به صورت نقاط باثبات[2]، ۱٤۹ موقعیت غیر اطلاع رسان[3] و ٤۹ موقعیت اطلاع رسان[4] بودند. در حالی‌که منطقه ITS-1 به‌خوبی توالی‌یابی شد و بسیاری از نقاط مبهم نیز با بررسی نمودارهای توالی‌ها مشخص شد. البته تکرار بازهای مشابه، که به‌صورت متناوب در این توالی‌ها تکرار شده بود، انطباق توالی‌ها را دشوار می‌ساخت. از ۵۰٤ موقعیت نوکلئوتیدها برای منطقه ITS-1، ۱۰۸ موقعیت باثبات، ۳۷۸ موقعیت غیر اطلاع رسان و ۱۸ موقعیت اطلاع رسان بودند. برای یافتن تفرق احتمالی بین جمعیت‌های جمع‌آوری شده بر اساس تفرق بین توالی‌یابی‌های حاصل از منطقه COI یک توالی از گونه *Zeuzera leuconotum* با شماره دسترسی JQ806092 به‌عنوان برون گروه[5] مورد استفاده قرار گرفت. درخت‌های ارتباطی به دو روش Heuristic search و Linkages برای توالی‌های منطبق شده از قسمت COI (شکل ۲ و ۳) و قسمت ITS-1 (شکل ٤ و ۵) ایجاد شد.

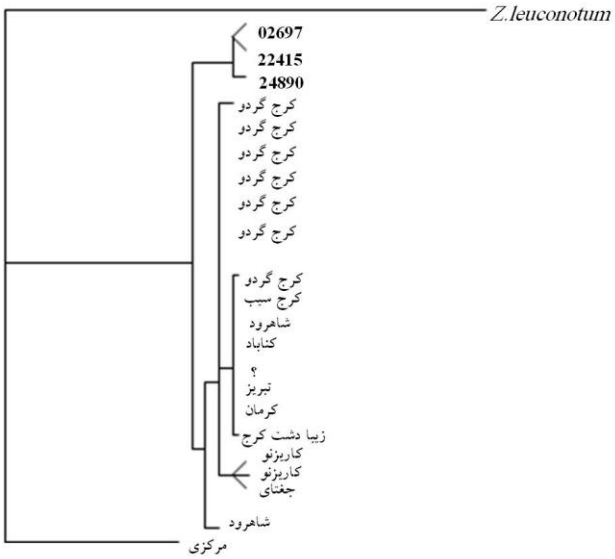
[1] Alignment

[2] Constant
[3] Uninformative
[4] Informative
[5] out group

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.16.8]



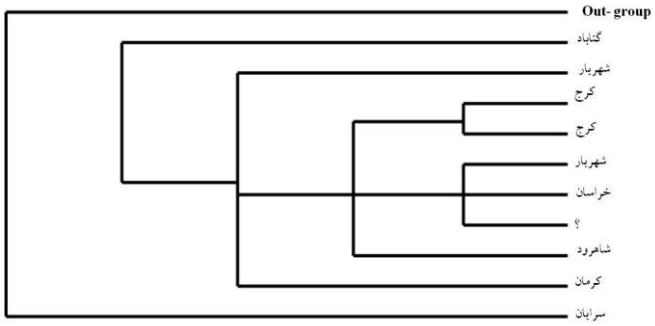
شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از نرم‌افزار PAUP به روش بوت استرپ (۱۰۰۰۰ تکرار) و Heuristic search برای توالی‌های حاصله از قسمت COI



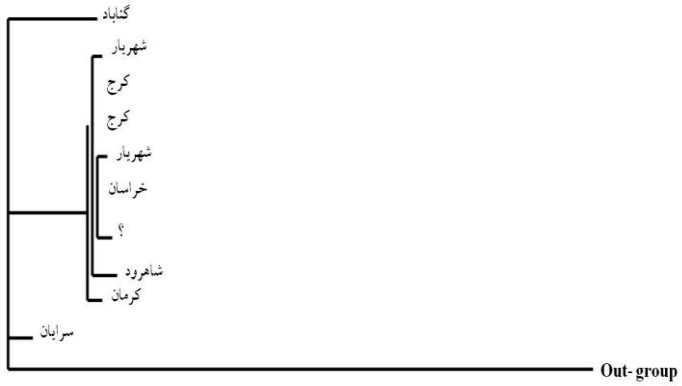
شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی به‌دست آمده به‌روش Branch lengths و Linkages برای توالی‌های حاصله از قسمت COI

نتیجه تجزیه و تحلیل توالی‌های مربوط به ناحیه COI نشان از در کنار هم قرار گرفتن جمعیت‌های منطقه گناباد، شاهرود، تبریز، کرمان و کرج (از روی هر دو میزبان) داشته که نشان‌دهنده اختلافات جزئی بر اساس این توالی‌ها می‌باشد. اگرچه تفرق بین جمعیت‌ها به‌خصوص برای استان مرکزی و شاهرود و تا حدودی خراسان رضوی با سایر جمعیت‌ها دیده می‌شود، اما این نتیجه می‌تواند حاصل تفرق درون فردی باشد تا تفرق واقعی بین جمعیتی. این نوع تشابه ژنتیکی در دو گونه *C. redtenbacheri* و *C. insularis* (که به لحاظ تغذیه‌ای بسیار به کرم خراط شبیه هستند) نیز مشاهد شده به‌طوری‌که تفاوت‌های ژنتیکی کمتر از تغییرات رفتاری و اکولوژیکی در تنوع و تفرق آن‌ها نقش داشته است (Vergara et al. 2012).

اختلاف کم بین جمعیت‌های کرم خراط، برای منطقه ITS-1 نیز با وضوح بیش‌تری به چشم خورد به‌طوری‌که جمعیت‌های مناطق مختلف مانند کرج، شهریار، شاهرود و خراسان، بسیار نزدیک به هم قرار گرفتند، در حالی‌که جمعیت سرایان (استان خراسان جنوبی) و گناباد (خراسان رضوی) که تقریباً هم مرز هستند، بسیار دورتر از هم دیده شدند (شکل ٤ و ٥).



شکل ٤- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از نرم‌افزار PAUP به‌روش بوت استرپ (۱۰۰۰۰ تکرار) و Heuristic search برای توالی‌های حاصله از منطقه ITS1



شکل ٥- درخت فیلوژنتیکی به‌دست آمده به‌روش Branch lengths و Linkages برای توالی‌های حاصله از قسمت ITS1

یکی دیگر از مشکلات مشاهده شده در این تحقیق وجود تکرارهای متوالی از برخی بازها به‌خصوص در منطقه ITS بود که توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل‌ها را با چالش مواجه می‌ساخت. این چالش در بررسی تفرق ژنتیکی بین جمعیت‌های *Spodoptera frugiperda* در دو ایالت آرکانزاس و فلوریدا نیز گزارش شده-

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.16.8]

است (Lewter et al. 2006). در بررسی دیگر، تفرق کافی در جمعیت‌های گونه‌ی *Ostrinia nubilalis* بر اساس آلوآنزیم‌ها مشاهده شده (Thomas et al. 2003)، اما این تمایز در بررسی DNA میتوکندریایی قابل ردیابی و تائید نبوده است (Martel et al. 2003). همین‌طور توالی‌یابی میتوکندریایی نتواسته تفرق بین جمعیت‌های گونه *Aglais urticae* را نشان دهد، که از جمله دلایل آن وجود تعداد زیاد نوکلوتیدهای آدنین و تیمین (حدود ۹۱ درصد) در توالی‌ها ذکر شده‌است (Vandewoestijne et al. 2004). نکته دیگر این که، با توجه به فاصله ۱/۵ تا ۲ ساله بین نسل‌ها در کرم خراط، تغییر ساختار ژنتیکی در جمعیت‌های این آفت نسبت به آفاتی که چندین نسل در سال دارند، کمتر محتمل به‌نظر می‌رسد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده بین جمعیت‌های جمع‌آوری شده گونه *Z. pyrina* از نقاط مختلف مورد مطالعه تمایز ژنتیکی قابل استنادی مشاهده نمی‌شود و تفرق دیده شده بین جمعیت‌های آن می‌تواند حاصل تفاوت‌های میزبانی، تغذیه‌ای و یا شرایط اقلیمی حاکم در منطقه فعالیت این آفت باشد.

منابع

Ardeh MJ (2008) Molecular markers and their application in the science of entomology. Iranian Plant Protection Research Institute. 117pp. (In Farsi).

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT/2000/XP/7. Available at: http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html

Keller A, Forster F, Muller T, Dandekar T, Schultz J, Wolf M (2010) Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. Biology Direct. 5: 1-12.

Lewter JA, Szalanski AL, Nagoshi RN, Meagher Jr RL, Owens CB, Luttrell RG (2006) Genetic Variation within and between Strains of the Fall Armyworm, Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) The Florida Entomologist. 89: 63-68.

Martel C, Rejasse A, Rousset F, Bethenod MT, Bourguet D (2003) Host-plant associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. Heredity 90:141-149.

Nozari J (2008) Geometric morphometric study on Zeuzera pyrina (Lep.: Zeuzeridae) in three regions from Tehran, Markazi and Mazandaran provinces. PhD thesis, University of Tehran, Karaj, Iran (in Farsi).

Radjabi GR (1986) Insect attacking rosaceous fruit trees in Iran (II) Lepidoptera. Agricultural Research Extension and Education, 215 pp. (in Farsi).

Radjabi GR (2001) Insect attacking rosaceous fruit. Agricultural Research Extension and Education, 200 pp. (in Farsi).

Shull VL, Vogler AP, Baker MD, Maddison DR, Hammond PM (2001) Sequence alignment of 18S ribosomal RNA and the basal relationships of Adephagan beetles: evidence for monophyly of aquatic families and the placement of Trachypachidae. Systematic Biology. 50: 945-969.

Swofford DL (2002) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. Trends in Ecology and Evolution. 18: 70-74.

Thomas Y, Bethenod MT, Pelozuelo L, Frerot B, Bourguet D (2003) Genetic isolation between two sympatric host plant races of the European corn borer, Ostrinia nubulalis Hübner. I. Sex pheromone, moth emergence timing and parasitism. Evolution 57: 261-273.

Vandewoestijne S, Baguette M, Brakefield PM, Saccheri IJ (2004) Phylogeography of Aglais urticae (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region. Molecular Phylogenetics and Evolution. 31: 630-646.

Vences M, Thomas M, van der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR (2005) Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. Frontiers in Zoology. 2: 1-12pp. Available at: https://frontiersinzoology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-9994-2-5

Vergara F, Everroad RC, Andraca G, Kikuchi J, Makihara H (2012) Plant host differences between Cossus redtenbacheri and Cossus insularis: insights from mechanical tests and molecular phylogeny. Bulletin of Insectology 65: 217-222.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.16.8]