Winter (2023) 13(44): 31-44.

DOI: 10.30473/cb.2023.69145.1926
Received: 9, Sep. 2023 Accepted: 26, Dec. 2023

Crop Biotechnology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Genetic diversity of *Tortrix viridana* L. (Lep. Tortricidae) in Zagros Oak forests using 28s gene

Rezvan Mousivand[1], Mohammad Majdi[1], Foad Fatehi[2*], Hamed Ghobari[3]

[1]Department of Plant Production and Genetics, University of Kurdistan, Sanandaj Iran.
[2]Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran Iran.
[3]Department of Plant Protection, University of Kurdistan, Sanandaj Iran.

Correspondence
Foad Fatehi
Email: ffatehi@Pnu.ac.ir

How to cite
Mousivand, R., Majdi, M., Fatehi, F., & Ghobari, H. (2023). Genetic diversity of green oak leaf roller moth, *Tortrix viridana* L. (Lep., Tortricidae) in northern Zagros region using 28s gene. *Crop Biotechnology, 13*(44), 31-44.

ABSTRACT

One of the most harmful pests of Zagros forests is the *Tortrix viridana* (Lep. Tortricidae). Genetic diversity of *Tortrix viridana* host plant populations in the oak forests of northwestern Iran and the northern Zagros region was investigated using 28s gene sequence. The samples were collected from the forest areas of west Azarbaijan, Lorestan, Kurdistan and Kermanshah provinces. They were in the larval stage, were kept in laboratory conditions until they turned into pupa and then into a complete insect. DNA extraction was done by CTAB method. Also, in order to amplify the 28s region, the 28s gene sequence of Tortrix genus was used from NCBI for primer design. The desired region was amplified using the PCR method and the PCR products were sequenced. 21 samples were selected to investigate genetic diversity using the 28s gene, and 18 sequences DNAs were of suitable quality for further investigations. The DNA sequences were edited using Bioedit software and aligned using MegaX software, and the phylogenetic tree was drawn by UPGMA method with 1000 sampling repetitions. The evaluation of the genetic structure of populations showed that the diversity between populations is greater than within populations. The results of the phylogenetic tree also showed that different samples of the *Tortrix viridana* have genetic diversity based on geographical distance. Therefore, the time of appearance of the pest, their behavior and their type of control and management are also different.

KEYWORDS

Tortrix viridana, Pest, geographical distance, 28s rDNA.

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال سیزدهم، شماره دوم، پیاپی چهل و چهارم، زمستان ۱۴۰۲ (۴۴-۳۱)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۵

DOI: 10.30473/cb.2023.69145.1926

نشریه علمی

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی تنوع ژنتیکی پروانه‌ی جوانه‌خوار بلوط *Tortrix viridana* L. (Lep. Tortricidae) در جنگل‌های بلوط زاگرس با استفاده از 28s rDNA

رضوان موسیوند[۱]، محمد مجدی[۱]، فواد فاتحی[۲*]، حامد غباری[۳]

[۱]گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

[۲]گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

[۳]گروه گیاهپزشکی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

نویسنده مسئول:

فواد فاتحی

رایانامه: ffatehi@pnu.ac.ir

چکیده

یکی از مضرترین آفات جنگل‌های زاگرس، پروانه‌ی جوانه‌خوار بلوط *Tortrix viridana (Lep. Tortricidae)* است. تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاه میزبان پروانه‌ی جوانه‌خوار بلوط در جنگل‌های بلوط شمال غرب ایران و منطقه‌ی زاگرس شمالی با استفاده از توالی ژن 28s بررسی شد. جمع‌آوری نمونه‌ها، در مناطق جنگلی استان‌های آذربایجان غربی، لرستان، کردستان و کرمانشاه صورت گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده که در مرحله‌ی لاروی بودند تا زمانی که به شفیره و سپس به حشره‌ی کامل تبدیل شوند، در آزمایشگاه نگهداری شدند. استخراج DNA به روش CTAB انجام و به منظور تکثیر ناحیه 28s از توالی ژن 28s جنس *Tortrix* از NCBI برای طراحی پرایمر استفاده شد. ناحیه‌ی مورد نظر با استفاده از روش PCR تکثیر و محصولات PCR توالی‌یابی شدند. ۲۱ نمونه برای بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از ژن 28s انتخاب شد که ۱۸ نمونه با کیفیت بالاتر توالی DNA برای بررسی‌های بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. توالی‌های DNA با استفاده از نرم افزار Bioedit ویرایش و با نرم افزار MegaX تراز شد و درخت فیلوژنتیک به روش UPGMA با ۱۰۰۰ تکرار نمونه‌برداری ترسیم گردید. ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها نشان داد که تنوع مابین جمعیت‌ها بیشتر از درون جمعیت‌ها است. نتایج درخت فیلوژنتیک نیز نشان داد که نمونه‌های مختلف پروانه‌ی جوانه‌خوار بلوط بر اساس فاصله‌ی جغرافیایی دارای تنوع ژنتیکی هستند. بنابراین زمان ظهور آفت، رفتار و نوع کنترل و مدیریت آفت آنها هم متفاوت است.

واژه‌های کلیدی

Tortrix viridana ، آفت، فاصله جغرافیایی، 28s rDNA.

استناد به این مقاله:

موسیوند، رضوان، مجدی، محمد، فاتحی، فواد و غباری، حامد (۱۴۰۲). تنوع ژنتیکی پروانه‌ی جوانه‌خوار بلوط در جنگل‌های بلوط زاگرس با استفاده از 28s rDNA، ۱۳(۴۴)، ۴۴-۳۱.

https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

مقدمه

جنگل‌ها یکی از منابع تجدیدپذیر و از سرمایه‌های طبیعی و پشتوانه‌های اصلی توسعه و رشد اقتصادی هر کشوری می‌باشند. جنگل‌های ایران ۱۲/۴ میلیون هکتار وسعت دارند و حدود ۷/۴ درصد از سطح کشور را پوشش داده‌اند (غباری و همکاران، ۱۳۸۶). بعد از جنگل های شمال، جنگل‌های زاگرس مهم‌ترین و با ارزش‌ترین جنگل‌های کشور هستند که حفاظت از آب و خاک از جنبه ملی، مهیا کردن شرایط زیستی برای ساکنان محلی و تولید محصولات چوبی از مهم‌ترین فواید این جنگل‌ها به شمار می‌آیند (Jazirehi and Ebrahimi-Rastaghi., 2003).

اصلی‌ترین و وسیع‌ترین رویشگاه گونه‌های مختلف بلوط در ایران، رشته‌کوه‌های زاگرس هستند و به همین دلیل این منطقه اهمیت بسیار ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است. جنگل‌های زاگرس با مساحتی بالغ بر ۵ میلیون هکتار، ۴۰ درصد از جنگل‌های ایران را به خود اختصاص داده است و بیش‌ترین تأثیر را در تأمین منابع آب زیرزمینی، تولید اکسیژن، حفاظت خاک، تعدیل آب و هوا و امرار معاش ساکنین منطقه دارند (طالبی و همکاران، ۱۳۸۴). حدود ۷۰ درصد تیپ گونه‌های غالب در جنگل‌های زاگرس شامل درختان بلوط می‌باشد. که این درختان بلوط شامل گونه‌های دار مازو (*Quercus infectoria*)، ویول (*Quercus libani*) و بلوط برودار (*Quercus brantii*) می‌باشد. که از انتهای شمال غرب کشور آغاز و تا مناطق غرب و جنوب غرب را دربرگرفته اند (مظفریان، ۱۳۸۴). در سالیان اخیر در اثر تغییرات ایجادشده در زیست بوم‌ها و شرایط اقلیمی بخش‌هایی از جنگل‌های زاگرس مورد هجوم آفات و بیماری‌هایی واقع شده‌اند که وضعیت بسیار حادی داشته و شرایطی را برای مرگ و زوال آن‌ها فراهم کرده است (Marvi-Mohajer, 2005).

یکی از آفات مخرب که در چند دهه اخیر، گونه‌های مختلف بلوط را در جنگل های زاگرس مورد حمله قرار داده است، پروانه جوانه‌خوار بلوط (*Tortrix viridana*) است. پایداری جنگل‌های زاگرس به وسیله‌ی عوامل متعددی از جمله پروانه جوانه خوار بلوط (*Tortrix viridana*) تهدید می‌شود (غباری و همکاران، ۱۳۸۶). شیوع پروانه جوانه خوار بلوط (*Tortrix viridana*) محدود به منطقه خاصی نبوده و در بسیاری از نقاط وجود دارد و با طغیان هر ساله به‌ویژه در مناطق جنگلی زاگرس شمالی و میانی خسارات چشمگیری به درختان بلوط تحمیل می‌کند و یکی از مهم‌ترین مشکلات درختان جنگلی در منطقه رویشی زاگرس است (زرگران و همکاران. ۱۳۹۴). در ایران این آفت در حال حاضر به شدت در استان‌های آذربایجان‌غربی، کهگیلویه و بویراحمد،کردستان، لرستان و کرمانشاه پراکنده است (Sabeti, 1995) پروانه جوانه خوار بلوط از طریق تغذیه از جوانه‌های زایای درختان خسارت سنگینی به درختان بلوط وارد می‌کند (Hunter *et al*., 2008). این آفت دارای یک نسل در سال بوده و زمستان‌گذرانی آن به صورت تخم است. خسارت آن همزمان با خروج لاروها از اواخر اسفندماه شروع می‌شود و سن‌های اول و دوم لاروها در داخل جوانه زندگی می‌کنند (Serra *et al*., 2014). لاروهای سن سوم پس از خروج از جوانه‌ها شروع به تغذیه از برگ‌های جوان می‌کنند و در ضمن تغذیه، برگ‌ها را تا کرده و تار می‌تنند، ولی شدت تغذیه و خسارت بالا در سن‌های چهارم و پنجم لاروی ظاهر شده به طوری که در بعضی از موارد و در دوره‌های طغیان درختان را به طورکلی عاری از برگ می‌کنند (Fazeli and Abaei, 1990).

عوامل مختلفی از جمله گونه‌های میزبان، کنترل‌های شیمیایی، فاصله جغرافیایی و موانع جغرافیایی، روی تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی حشرات تاثیر می‌گذارد. ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های پروانه جوانه‌خوار بلوط، به تعیین ساختار ژنتیکی این آفت، میزان جریان ژنی بین جمعیت‌ها و وضعیت تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها می تواند کمک کند. چنین اطلاعاتی برای پی بردن به وضعیت پراکنش این آفت در جنگل بلوط زاگرس شمالی حیاتی خواهد بود، چرا که پراکنش این آفت یکی از مؤلفه‌های کلیدی و مهم در رابطه با اجرای برنامه‌های مدیریت آفت به منظور کنترل موثر آن است. افزون بر این، این اطلاعات می تواند برای انتخاب استراتژی‌های مناسب وکارآمد کنترل این آفت سودمند باشد (مرادی و همکاران، ۱۴۰۱).

هم‌چنین مدیریت پایدار جنگل‌ها و شناسایی تنوع ژنتیکی برای محافظت از جنگل‌های کشور به عنوان ذخیره‌گاه‌های ژنتیکی بسیار حائز اهمیت است. این ضرورت در مواقعی که توده‌های طبیعی یک گونه دارای اهمیت اقتصادی ویژه‌ای هستند بسیار دارای اهمیت‌اند (Jones and Despland., 2006). شناخت و گسترش یک شیوه کارآمد برای مدیریت هرچه بهتر و کارآمدتر آفت مهم مذکور، نیازمند شناخت هرچه بیشتر آفت و میزبان آن است (غیاث الدین و همکاران، ۱۳۹۹). یکی از جنبه‌هایی که در کنار شناخت دشمنان طبیعی، سموم مؤثر و عادات رفتاری، تولیدمثلی و تغذیه‌ای آفت مورد نیاز است، بررسی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه خوار بلوط (*T. viridana*) است که منجر به درک درست و دقیق‌تری از بیولوژی آفت و تغییرات

درون گونه‌ای آن می‌شود که می‌تواند در امر مدیریت آفت مذکور به عنوان یکی از مهمترین آفات جنگل‌های بلوط بسیار مؤثر باشد (DuMerle, 1999).

اخیرا روش‌های ژنتیک مولکولی، پیشرفت بزرگی را در زمینه زیست شناسی تکاملی ایجاد کرده‌اند. هم‌چنین مجموعه‌ای از ابزارهای مولکولی برای مطالعه تنوع ژنتیکی به کار برده می‌شوند که این مطالعات با استخراج DNA از ارگانیسم‌های خاصی آغاز شده و برای اهدافی چون بازسازی تاریخ فیلوژنیک هر گونه داخل مجموعه، ژنتیک جمعیت و برسی ویژگی های ژنتیکی گیاهان و جانوران به کار می‌روند (Wharton *et al*., 2000; Wang and Messing, 2003).

نشانگرهای مولکولی توالی‌هایی از DNA یا پروتئین هستند که دارای جایگاه‌های مشخصی روی کرومزوم‌ها می‌باشند و با یک سری صفات بخصوص ارتباط و پیوستگی دارند (Bhau *et al*., 2014). انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی وجود دارد که تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها و موجودات مختلف را نشان می‌دهند و دارای مزیت‌هایی از جمله سنجش آسان و سریع، تکرار پذیر بودن، دسترسی آسان می‌باشند و امکان تبادل اطلاعات بین آزمایشگاه‌های مختلف دارند (Schroeder *et al*., 2010).

RNA ریبوزومی 28S یک RNA ساختاری ریبوزومی برای زیر واحد بزرگ ریبوزومی ریبونوکلئیک اسید در ریبوزوم‌های سیتوپلاسمی سلول‌های یوکاریوتی و یکی از اجزاء پایه‌ای آن‌هاست. این RNA، هم‌ساخت RNA ریبوزومی 23S در پروکاریوت‌ها و 16S RNA کُدشونده توسط میتوکندری است. به ژن‌های کُدکننده RNA ریبوزومی 28S، 28S rDNA گفته می‌شود. گاهی از مقایسه توالی اسید نوکلئیک این ژن‌ها، برای تجزیه وتحلیل مولکولی ساختار درخت‌های فیلوژنتیکی و برسی تنوع ژنتیکی درآغازیان، قارچ‌ها، حشرات، خرس‌های آبی و مهره‌داران استفاده می‌شود (Nugnes *et al*., 2015). در این مطالعه تنوع ژنتیکی پروانه جوانه خوار بلوط با استفاده از ژن 28s، بر اساس فاصله جغرافیایی و فاصله ژنتیکی بررسی می شود.

پیشینه پژوهش

مطالعه ژنتیک جمعیت، الگوهای تنوع زیستی را نشان می‌دهد و در مورد محرک‌های تمایز و سازگاری تکاملی، از جمله جریان ژن، رانش ژن و انتخاب طبیعی اطلاعاتی را به ما می‌دهد. این موضوع می‌تواند درک ما را نسبت به تصمیم‌گیری در مورد انتخاب روش‌های صحیح مدیریت و حفاظت افزایش دهد (Sunde *et al*., 2020). مطالعه و بررسی ساختار ژنتیکی و تنوع ژنتیکی در حشرات امکان دارد از عواملی چون گونه‌های میزبان، فاصله‌ی جغرافیایی و موانع جغرافیایی تاثیر بپذیرد و همچنین در برخی از گونه‌های Lepidopterous ساختار و تنوع ژنتیکی به تعداد نسل و ظرفیت مهاجرت آن‌ها بستگی دارد (Men *et al*., 2017).

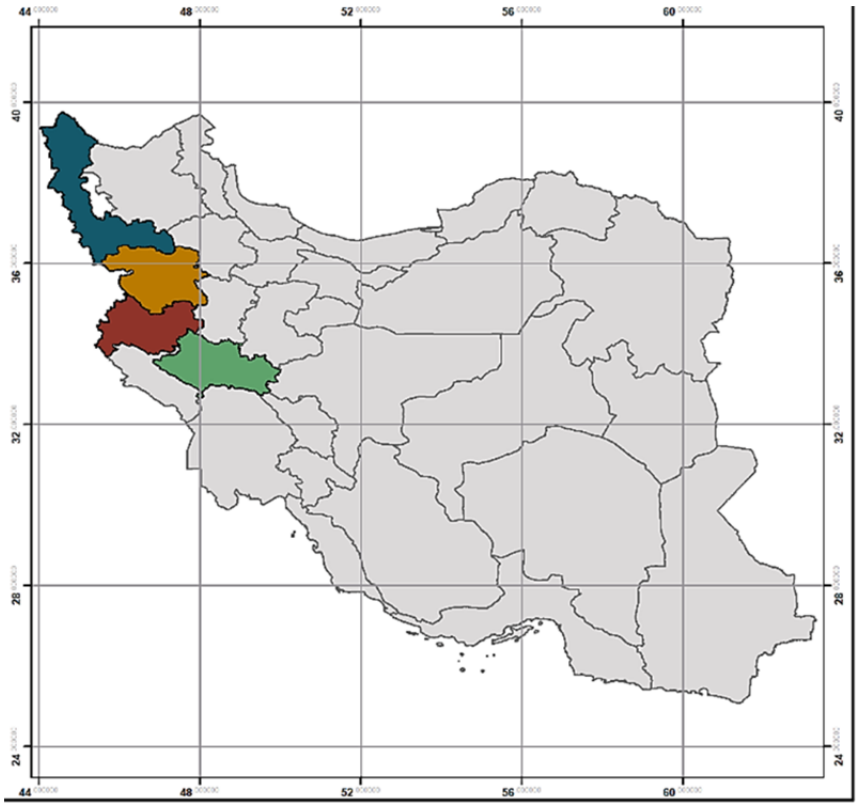
در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی جوانه‌خوار بلوط در دنیا بررسی‌های متعددی انجام گرفته است. به‌طور مثال، در مطالعه‌ای در کشور آلمان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انجام شده، اثر فاصله جغرافیایی بر جدایی جمعیتی پروانه جوانه‌خوار بلوط مورد بررسی قرار گرفته است (Schroeder *et al*., 2010).

در شهر مونستر کشور آلمان بررسی تنوع درون گونه‌ایی جمعیتی از پروانه جوانه خوار بلوط انجام شد که در آن بررسی از نشانگرهای سیتوکروم اکسیداز ۱ و ۲ استفاده کردند که بیانگر آن بود که تنوع درون گونه ایی در این شب پروانه بیش‌تر از تنوع درون گونه ایی سایر حشراتی است که قبلا روی آنها بررسی انجام داده اند و همچنین تفاوت در فراوانی انواع هاپلوتیپ‌ها در بین جمعیت های مورد بررسی بالا است که این بیانگر آن است که مارکرهای توسعه‌یافته تا کنون برای مطالعات ژنتیکی در *T. viridana* مناسب هستند (Schroeder and Scholz, 2005). در بررسی دیگر که توسط Serra و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام شد، از نشانگرهای ریزماهواره و نشانگرهای سیتوکروم اکسیداز ۱ و ۲ استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که جمعیت‌های پروانه جوانه‌خوار بلوط بر روی گونه‌های مختلف بلوط در منطقه ساردینین و سایر مناطق مدیترانه‌ای براساس فاصله جغرافیایی، گونه‌های بلوط، فنولوژی برگ و زمان خروج از تخم پروانه‌ها دارای تنوع ژنتیکی هستند. در زمینه استفاده از ژن 28S نیز مطالعاتی صورت گرفته است. به عنوان مثال از RNA ریبوزومی 28S برای بررسی تنوع ژنتیکی زنبور عسل اروپایی (*Apis mellifera*) به منظور کمک به حفظ تنوع ژنتیکی زنبور عسل اروپایی در زمینه کمک به گرده افشانی طیف گسترده‌ای از گل‌های زراعی استفاده شد و شاخص‌های تنوع ژنتیکی پایین و تنوع درون و بین گونه‌ها را نشان دادند Meemongkolkiat *et al*., 2019). در مطالعه‌ای دیگر از ژن‌های 28S در خانواده شپشک‌های گیاهی (*Hemiptera: Coccoidea*) که یکی از مهاجم‌ترین و آسیب‌رسان‌ترین گروه‌های حشرات هستند برای شناسایی ژنتیکی و مورفولوژیکی آن‌ها استفاده شد (Amouroux *et al*., 2017). در بررسی دیگر، از ژن 28S در کنه شکارچی *Amblyseius largoensis* استفاده شدکه در آن موفق به

شناسایی و طبقه‌بندی کنه‌ها شدند (Navia *et al*., 2014). ارزیابی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه خوار بلوط *Tortrix viridana* فعال بر روی گونه‌ی بلوط *Quercus robur* در داخل و بین جمعیت‌های حشره مذکور با استفاده از نشانگرهای میتوکندریایی و کلروپلاستی و AFLP بر روی ۱۰ توده بلوط در شمال غربی آلمان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله از نشانگر میتوکندریایی و AFLP تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های پروانه جوانه‌خوار بلوط بیشتر از بین جمعیت‌ها بود که نشان‌دهنده‌ی جریان ژنی بالا مابین جمعیت‌ها است. در بررسی که توسط (Schroeder and Degan, 2008) روی تنوع ژنی بلوط‌ها و پروانه جوانه خوار بلوط انجام شد، نتایج همبستگی منفی معنی‌داری را برای هر دو نشانگر نشان داد. به طور خلاصه، دلایل این تفاوت در الگوهای تنوع ژنتیکی میزبان و حشره‌ی گیاهخوار را می‌توان در زمان‌های مختلف ظهور نسل، مکانیسم‌ها و پتانسیل پراکندگی آفت مذکور یافت در مطالعه‌ای توسط Schroeder و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای تعیین تنوع ژتتیکی یک جمعیت ایزوله و جداشده‌ی پروانه جوانه‌خوار بلوط از لحاظ جغرافیایی در منطقه Bashkir Transural (جنوب روسیه) با پنج جمعیت دیگر با استفاده از هشت نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد نمونه مورد بررسی در هر جمعیت ۴۸ تا ۶۲ نفر بوده که نتایج نهایی حاصله حاکی از آن بود که تنوع ژنتیکی در جمعیت جدا شده بیشتر از جمعیت در مرکز منطقه توزیع بوده است. در طی آنالیزهایی که می‌توانست مخزن ژنی این جمعیت را شکل دهد اثرات محدود کننده‌ای کشف نشد. پدیده انتخاب طبیعی موجب حفظ آلل‌های خاص در درون این جمعیت شده و این عامل می‌تواند توجیهی برای ایجاد تنوع ژنتیکی بالای غیرمنتظره‌ای در این جمعیت ایزوله شده باشد (Shroeder *et al*., 2010).

روش شناسی پژوهش

در این مطالعه از جنگل‌های بلوط استان‌های کردستان، کرمانشاه، آذربایجان غربی و لرستان به صورت تصادفی و براساس فاصله جغرافیایی، تعداد ۱۸ ژنوتیپ به صورت لارو و شفیره از روی گونه بلوط برودار (*Quercus branti*) جمع‌آوری شد. به ترتیب در استان کردستان ۷ ایستگاه، در کرمانشاه ۵ ایستگاه، در آذربایجان غربی ۵ ایستگاه، و همچنین در استان لرستان ۴ ایستگاه نمونه‌برداری، مورد مطالعه قرارگرفتند (جدول ۱). حداقل فاصله بین ایستگاه‌های نمونه برداری ۳۰ کیلومتر بود و در هر ایستگاه نمونه‌برداری ۱ نمونه که نماینده یک جمعیت است، جمع‌آوری شد. طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا نیز به وسیله دستگاه GPS ثبت گردید.



شکل ۱. نمایش مناطق جغرافیایی که نمونه برداری در آنجا انجام شد (کردستان، کرمانشاه، آذربایجان، لرستان) (Gao *et al*,.2020)

لاروها و شفیره‌های پروانه جوانه خوار بلوط جمع‌آوری شده و در محیط مناسب در آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشگاه کردستان، نگهداری شدند تا زمانی که تبدیل به حشره کامل شوند. و در پایان حشرات‌کامل ظهور یافته را به وسیله اتیل استات معدوم نموده و به تفکیک منطقه جغرافیایی میزبان، آن‌ها را در ظروف شیشه‌ای حاوی الکل ۷۰ درصد قرار داده و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سپس به منظور انجام بررسی‌های مولکولی استخراج DNA از قسمت سر و تنه حشره کامل با روش CTAB (Dumolin *et al.*, 1995) با مقداری تغییر انجام گرفت. در مرحله‌ی اول برای فریز و خرد کردن نمونه‌های حشره مذکور، از نیتروژن مایع استفاده شد. در مرحله ی اول برای خرد کردن نمونه‌های حشره مذکور، آن‌ها را به میکروتیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری که هر یک دارای برچسب مربوط به نمونه مورد نظر بودند منتقل کرده و با استفاده از نیتروژن مایع نمونه‌ها فریز و خرد شدند. سپس ۶۳۰ میکرولیتر از بافر CTAB (CTAB ۱ درصد، Tris Base pH: ۱۰۰7/5 میلی‌مولار، NaCl ۷۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۵۰ میلی‌مولار، مرکاپتواتانول ۱۴۰ میلی مولار) و ۷۰ میکرولیتر از SDS۱۰ درصد از پیش گرم شده (با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد) و همچنین ۱۵ میکرو لیتر پروتئیناز K به آن افزوده شده و به مدت ۱۲ الی ۱۸ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد در بن ماری قرار داده شد و سپس ۲۴۰ میکرو لیتر از NaCl ۵ مولار و ۳ میکرو لیتر مرکاپتواتانول به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرارگرفت. پس از لیز شدن کامل نمونه،۲۵۰ میکرو لیتر کلروفرم به آن اضافه شد و به مدت ۱۰–۱۵ دقیقه به صورت دستی تکان داده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. این مرحله برای از بین بردن آلودگی پروتئینی یکبار دیگر تکرار شد. فاز رویی را به یک میکروتیوب انتقال داده و ۷۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) به آن اضافه گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ انجام گرفت. سپس فاز رویی را دور ریخته و با ۵۰۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰ درصد پلت (رسوب) را شستشو داده و نهایتا پلت با جریان هوا خشک شد. سپس با استفاده از دستگاه بیوفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. و جهت مشاهده باندها و همچنین بررسی کیفیت DNA، از دستگاه UV doc استفاده شد. با به‌کارگیری دستگاه بیوفتومتر، جذب محلوهای رقیق شده DNA در طول موج ۲۸۰ نانومتر (طول موج جذب حداکثری نوری پروتئین‌ها) و۲۶۰ نانومتری (طول موج جذب اسیدنوکلئیک) اندازه‌گیری شد و همچنین نسبت جذب نوری محلول‌های DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر که خود شاخص میزان خلوص DNA است، محاسبه شد.

جدول ۱. ویژگی‌های مناطق نمونه‌برداری از نظر ارتفاع از سطح دریا و موقعیت جغرافیایی

شناسه	گونه میزبان	نام محل	طول و عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا
4kurd	برودار	کردستان، بانه، کانی سوره	1907.8١4.6 E4٢20٨N3	۱۲۸۶
5kurd	برودار	کردستان، بانه، سورین	N352216.0 E461620.1	۱۲۳۸
14kurd	برودار	کردستان، بانه، سیف تاله	N352216.0 E461620.1	۱۳۶۰
17kurd	برودار	کردستان، مریوان، کانی دینار	N352704.1 E461322.7	۱۲۸۶
15kurd	برودار	کردستان، مریوان، بسطام	2704.1 E461322.7٣١N	۱۳۶۷
16kurd	برودار	کردستان، مریوان، چناره	N352431.6 E461811.9	۱۳۹۵
18kurd	برودار	کردستان، مریوان، دزلی	N352431.6 E461811.9	۱۳۹۵
2k-r	برودار	کرمانشاه، نودشه	N353552.6 E460721.9	۱۳۶۷
3k-r	برودار	کرمانشاه، پاوه	N353552.6 E460721.9	۱۳۶۰
6k-r	برودار	کرمانشاه، قوری قلعه	N353350.2 E466546.8	۱۳۶۰
7k-r	برودار	کرمانشاه، جوانرود	N3530029 E460633.6	۱۵۳۵
1kr	برودار	کرمانشاه، هرسین	N360121.9 E451103.2	۱۵۲۰
9az	برودار	آذربایجان غربی، پیرانشهر	N360121.9 E451103.2	۱۵۲۰
10az	برودار	آذربایجان غربی،بادین آباد	N355642.0 E455704.2	۱۳۷۴
11az	برودار	آذربایجان غربی، میرآباد	N362843.7 E451917.0	۱۳۱۲
12az	برودار	آذربایجان غربی، نلاس	N362843.7 E451917.0	۱۳۱۲
13az	برودار	آذربایجان غربی، سردشت	N362255.7 E452336.0	۱۳۴۰
8lores	مازودار	لرستان، نورآباد	N362255.7 E452336.0	۱۳۴۰

طراحی پرایمرها، با استفاده از توالی گونه های نزدیک در پایگاه اطلاعاتی NCBI به وسیله نرم افزار آنلاین Primer3، انجام شد.

در این مرحله DNAهای استخراج شده را رقیق کرده و در واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز (PCR) از آن استفاده کردیم. به‌منظور انجام واکنش PCR[1] از دستگاه ترموسایکلر استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از کیت PCR (Master mix، Primer-Primer-F،R ، DNA الگو، آب دوبار تقطیر شده) با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و استفاده از آغازگرهای از پیش طراحی شده انجام شد (Hebert *et al*., 2004). در این تحقیق طراحی آغازگر از RNA ریبوزومی 28s صورت گرفت. ابتدا منطقه کنترلی از RNA ریبوزومی برای گونه‌های نزدیک به گونه *T. viridana* در سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) در بخش نوکلئوتید جست‌وجو شد و توالی به دست آمده از این سایت برای ادامه مراحل طراحی آغازگر، مورد استفاده قرار داده شد. سپس با استفاده از نرم افزار primer3 آغازگر مورد نظر طراحی شد (جدول ۲) و در نهایت توالی نوکلئوتیدی جهت سنتز به شرکت Genscript آمریکا ارسال گردید. بعد از سنتز آغازگر مورد نظر و دریافت آن با توجه به دستورالعمل‌های شرکت مربوطه رقیق شد و مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجام واکنش PCR جهت مشاهده قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شد. سپس باندها توسط دستگاه UVdoc مشاهده شدند. الگوهای نواری به‌صورت کدگذاری حروف لاتین امتیازدهی شد. فاصله‌ی ژنتیکی بین جمعیت‌ها بر اساس ضریب نئی محاسبه و دندروگرام به روش neighbor-joining[2] با استفاده از نرم افزار Bioedit و MEGA برای دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها رسم شد. برای تعیین توالی ژن 28s از همان آغازگرهایی که برای تکثیر آن به کار برده شد استفاده شد. تکثیر توالی‌ها توسط شرکت بیومجیک انجام گرفت. پس از تکثیر، توالی‌های به کار رفته در این بررسی توسط نرم‌افزار BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.9.0 ویرایش شده و به طول ۸۵۰ جفت باز درآمدند.

یافته‌های پژوهش

در کل از بین ۲۱ نمونه، ۱۸ نمونه که از کیفیت مناسبی برخوردار بودند (جدول۳)، برای بررسی مولکولی انتخاب شدند. ناحیه 28s در تمام جمعیت‌هایی که بررسی شد در واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز تکثیر شد و اندازه آن حدود ۸۵۰ جفت باز بود (شکل۲). محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ایی پلی‌مراز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد مورد مشاهده قرار گرفتند. که نشان داد آغازگر مورد استفاده به خوبی عمل کرده و قطعات اختصاصی برای ناحیه 28s تهیه شده است. وجود یک باند اختصاصی بیانگر آن بود که توالی مشابهی برای جفت شدن باآغازگر مورد استفاده در این محل وجود ندارد.

جدول۳. نمونه‌های بررسی شده در مطالعات مولکولی

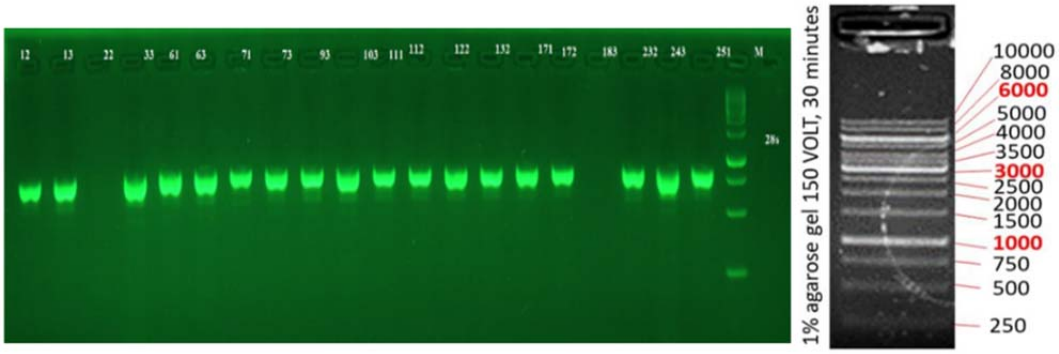
نمونه‌ها	علامت اختصاری
5kurd	12
4kurd	13
14 kurd	33
17 kurd	61
15 kurd	63
16 kurd	71
18 kurd	93
2k-r	111
3 k-r	103
6 k-r	122
7 k-r	112
1 k-r	132
9az	232
10 az	171
11 az	243
12 az	172
13 az	251
8lores	73

جدول ۲. آغازگرهای استفاده شده در مطالعات مولکولی

آغازگر	توالی
28s_F	GAGAGTTMAASAGTACGTGAAAC
28s_R	TCGGARGGAACCAGCTACTA

1. Polymerase chain reaction

۲. روش همسایگی مجاور



شکل ۲. تصویر خط‌کش مولکولی 1kb، الگوی باندی ناحیه تکثیر شده 28s

نتایج اولیه PCR نشان داد که از تعداد ۲۱ نمونه مورد مطالعه، ۳ نمونه دارای کیفیت لازم برای تولید نبودند، که در ادامه کار از آن‌ها استفاده نکردیم و از مابقی ۱۸ نمونه استفاده شد و جهت توالی‌یابی ارسال شدند.

باندهای مشاهده شده توسط دستگاه UV doc، به وسیله خط‌کش مولکولی 1kb مورد بررسی قرار گرفتند. باندها همگی در ناحیه حدود bp ۸۵۰ ایجاد شده‌اند.

هم‌چنین تنوع ژنتیکی مابین جمعیت‌های (Fst) آذربایجان غربی و کرمانشاه بسیار کم بوده و معادل ۰/۰۰۱ است درحالی که مابین جمعیت‌های کردستان و آذربایجان غربی تنوع ژنی متوسطی وجود دارد و مقدار آن برابر با ۰/۰۰۴ است.

توسط نرم‌افزار DNAsp تعداد ۵ هاپلوتایپ، ۱۳ ناحیه متغییر (پلی‌مورفیسم) و ۱۴ جهش ژنتیکی[1] تشخیص داده شد. میزان تنوع هاپلوتیپی برای جمعیت‌های انتخاب شده ازاستان کردستان، کرمانشاه و آذربایجان غربی ۱ بود که نشان می‌دهد جمعیت‌های این ۳ استان از لحاظ ژنتیکی کاملا متفاوت هستند. اما در استان لرستان به علت دارا بودن فقط یک جمعیت قادر به اندازه‌گیری میزان تنوع هاپلوتیپی نبودیم.

جدول ۴. شاخص آماره Fst و جریان ژن بین جمعیت‌ها

Nm	Fst	نام	اندازه جمعیت
۱/۷۵	۰/۰۷۲	کردستان- کرمانشاه	۱
۱/۷۲	۰/۰۰۴	کردستان- آذربایجان غربی	۲
۱/۹۸	۰/۰۰۱	آذربایجان غربی- کرمانشاه	۳

بعد از دریافت نتیجه توالی‌یابی (شکل۲)، الکتروگرام مربوط به هر نمونه، با نرم‌افزار BioEdite باز شد و کیفیت توالی‌های به دست آمده مورد بررسی و کنترل قرار گرفت. سپس به کمک همین نرم افزار توالی‌ها اصلاح شدند و نوکلئوتیدهای با کیفیت کم از ابتدا و انتهای توالی‌ها حذف شدند. در نهایت نتیجه حاصل منجر به تولید یک قطعه به طول ۸۵۰ نوکلئوتید شد. فرآوانی هر یک از نوکلئوتیدهای آدنین، سیتوزین، گوانین و تیمین برای پروانه جوانه خوار بلوط با استفاده از نرم افزار MEGA X محاسبه شد به طوری که بازگوانین بیش‌ترین فرآوانی و باز آدنین کم‌ترین فرآوانی را در بین نوکلئوتیدهای ذکر شده داشت (جدول۶).

جدول ۵. تنوع هاپلوتیپی و تنوع نوکلئوتیدی و تعداد هر یک از جمعیت‌های مورد بررسی

گروه بندی	جمعیت موجود در هر گروه	تعداد توالی (N)	تنوع هاپلوتیپی (Hd)	تنوع نوکلئوتیدی (pi)
گروه اول	۱۸توالی‌های مورد بررسی در این مطالعه	۱۸	۰/۹۸	۰/۰۶
گروه دوم	توالی جمعیت‌های استان کردستان	۷	۱	۰/۰۰۶
گروه سوم	توالی جمعیت‌های استان کرمانشاه	۵	۱	۰/۰۰۷
گروه چهارم	توالی جمعیت‌های استان آذربایجان غربی	۵	۱	۰/۲

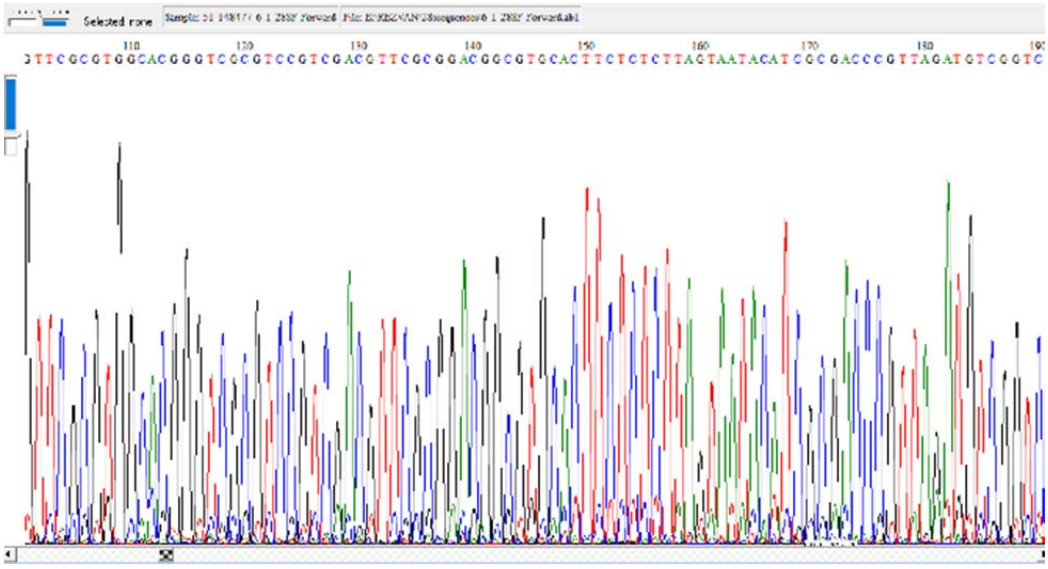
جدول ۶. فراوانی نوکلئوتیدها حاصل از مجموع تمام مناطق نمونه‌گیری

نوکلئوتیدها	T	C	A	G	C+G	T+A
میانگین فرآوانی	۲۱/۴۶	۲۷/۴۰	۱۹/۶۷	۳۱/۴۷	۵۸/۸۷	۴۱/۱۳

1. Mutation

میزان فاصله ژنتیکی میان توالی‌های به دست آمده از ۱۸ جمعیت مورد مطالعه، به دست آمد (جدول۷). بر طبق این جدول فاصله ژنتیکی بین ۱۸ جمعیت مرتبط با ۴ استان غربی کشور از صفر تا ۱/۲۰ متغییر است. بیش‌ترین فاصله ژنتیکی (۱/۲۰) مابین دو جمعیت 10az (بادین آباد پیرانشهر) و 3k-r (پاوه-کرمانشاه) بود. با در نظر گرفتن این نکته که مقادیر عددی کمتر از یک درصد میزان اختلاف ژنتیکی پایین را نشان می‌دهند، می‌توان نتیجه گرفت که فاصله ژنتیکی بین اکثر جمعیت‌های مورد بررسی بالا بوده است.

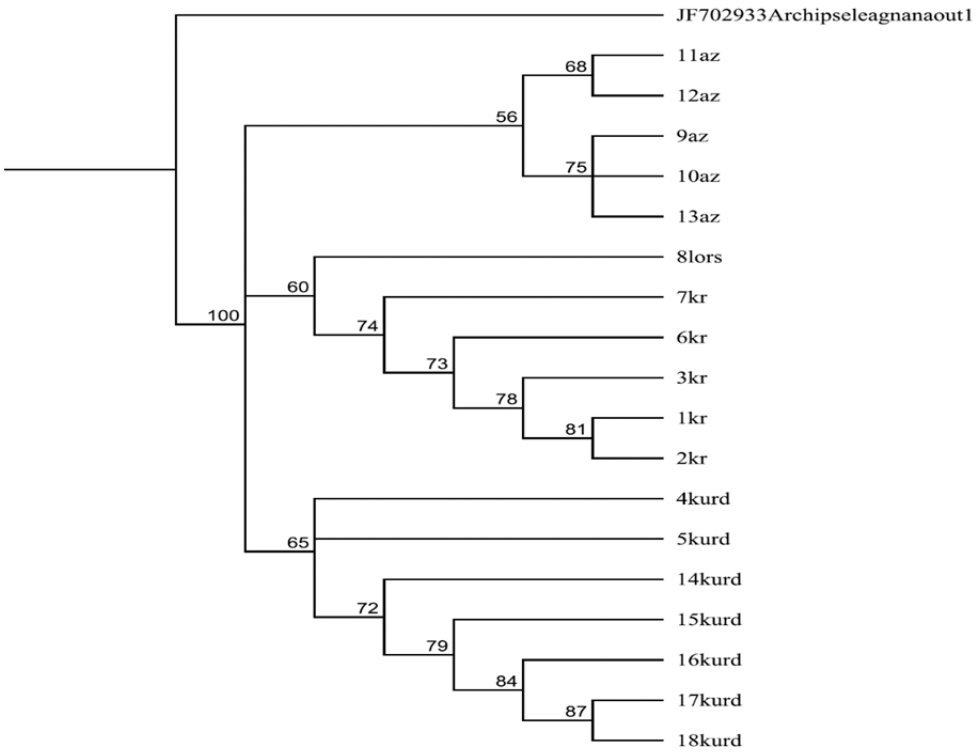
چون هدف اصلی از انجام این پژوهش، بررسی تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌های مختلف پروانه جوانه‌خوار بلوط در بخشی از جنگل‌های زاگرس غربی است پس با مقایسه نتایج توالی‌یابی متوجه شدیم که میزان اختلاف بالایی در ناحیه 28s وجود دارد. درخت فیلوژنتیک (شکل۴) به کمک ۱۸ توالی ناحیه 28s پروانه جوانه خوار بلوط که از مناطق جغرافیایی مختلف چهار استان حوزه غرب جنگل‌های زاگرس جمع‌آوری شده بودند، ترسیم شد. با توجه به درخت فیلوژنتیک تمامی نمونه‌ها از یک ریشه جد مشترک و قدیمی منشعب شده‌اند و به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی شده‌اند.



شکل ۳. بخشی از توالی28s

1k-r																	
2k-r	0.00																
3k-r	0.00	0.00															
4kurd	0.00	0.00	0.01														
5kurd	0.00	0.00	0.00	0.00													
6k-r	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01												
7k-r	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01											
8lores	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02										
9az	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01									
11az	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00								
12az	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00							
13az	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01						
10az	1.18	1.19	1.20	1.18	1.19	1.19	1.18	1.19	1.17	1.19	1.17	1.19					
14kurd	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	1.19				
15kurd	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	1.17	0.01			
16kurd	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	1.20	0.01	0.00		
17kurd	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	1.18	0.00	0.00	0.01	
18kurd	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	1.20	0.01	0.01	0.01	0.01

جدول ۷. تخمین فاصله ژنتیکی بین گونه های T viridana با نرم‌افزار MEGA و بوت استراپ ۱۰۰۰.



شکل ۴. نمودار فیلوژنتیکی (درخت فیلوژنتیک با روش neighbor-joining) بر اساس ناحیه 28S پروانه جوانه خوار بلوط، اعداد روی گره‌ها مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰۰ مرتبه تکرار است.

نتایج حاصل از بررسی درخت فیلوژنتیک بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا مابین جمعیت‌های نقاط جغرافیایی مختلف و تنوع کم در درون جمعیت‌ها بود. هم چنین سه جمعیت 1kr,2kr,3kr که از یک استان (کرمانشاه) هستند، طبق جدول فاصله ژنتیکی، اختلاف ژنتیکی مابین این سه جمعیت وجود ندارد (صفر بوده) با توجه به مطالعه حال حاضر و هم چنین مطالعات قبلی می توان نتیجه گرفت به علت فاصله جغرافیایی کم و عدم وجود تنگه جغرافیایی مابین این سه جمعیت اختلاف ژنتیکی هم وجود ندارد. این نتایج برای جمعیت‌های 12az,11az هم صدق می کند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های پروانه جوانه‌خوار بلوط با استفاده از ژن 28s نشان‌دهنده این بود که تنوع ژنتیکی بالایی بین جمعیت‌هایی که مطالعه شدند وجود دارد. در بررسی تنوع هاپلوتیپی (Hd)، استان‌های کردستان، آذربایجان‌غربی و کرمانشاه هر کدام دارای تنوع هاپلوتیپی ۱ بوده و کاملا از نظر ژنتیکی این جمعیت‌ها از هم جدا هستند. هم‌چنین بیشترین تنوع نوکلئوتیدی (pi) مربوط به استان آذربایجان‌غربی و کمترین تنوع نوکلئوتیدی مربوط به استان کردستان بود.

با در نظر گرفتن شاخص‌های مورد بررسی (جدول تعیین فاصله ژنتیکی، درخت فیلوژنتیک و آماره Fst) در بین جمعیت‌های مورد مطالعه، میزان تنوع هاپلوتیپی بالا و تنوع نوکلئوتیدی کم در بین جمعیت‌ها مشاهده شد که این نتایج با نتایج حاصل از بررسی‌های قبلی برروی پروانه جوانه‌خوار بلوط که با تکنیک‌های مختلفی انجام شده بودند تطابق چشم‌گیری داشت، به گونه‌ای که در طی یک بررسی در سال ۲۰۱۴ با استفاده از ژن‌های COI و COII، در جمعیت‌های *T. viridana* بیان شد که تنوع هاپلوتیپی بالا و تنوع نوکلئوتیدی کم بین جمعیت ها وجود دارد که ای عامل می‌تواند به دلیل رانش ژن باشد (Serra *et al*., 2014).

طبق درخت فیلوژنتیکی، فاصله ژنتیکی کردستان و آذربایجان غربی بیش‌تر از فاصله بین کردستان و کرمانشاه بوده چون کردستان و آذربایجان در دو گروه دور از هم قرار گرفته اند که این نتایج با بررسی فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌های استان کرمانشاه و جمعیت‌های استان آذربایجان غربی که در حدود ۵۴۰ کیلومتر بوده، و هم چنین استان کردستان و کرمانشاه که ۱۳۵ کیلومتر فاصله دارند بیانگر اثر فاصله جغرافیایی برتنوع ژنتیکی بود که با تایج حاصل از بررسی‌های (Men *et al*., 2017)

مطابقت دارد. طبق درخت فیلوژنتیکی جمعیت مربوط به استان لرستان در یک گروه با جمعیت های استان کرمانشاه قرار گرفته که بررسی فاصله جغرافیایی هم صحت این موضوع را تایید می‌کند (فاصله جغرافیایی استان لرستان تا کرمانشاه ۱۹۳ کیلومتر می‌باشد) که از فاصله استان های بررسی شده نسبت به یکدیگر کمتر است پس جریان ژن بین این دو استان زیاد است که این نتایج با نتایج (Men *et al*., 2017) که بیانگر اثر فاصله جغرافیایی بر جدایی جمعیت‌ها از هم است مطابقت دارد.

هم‌چنین از مقایسه درخت فیلوژنتیکی براساس مقایسه درون‌جمعیتی برداشت شد، جمعیت‌های 11azو 12az در یک گروه و جمعیت‌های 9az,10az و13az در یک گروه قرار گرفتند. فاصله جغرافیایی 11az مربوط به میرآباد آذربایجان‌غربی و 12az مربوط به نلاس آذربایجان‌غربی از روی نقشه 5km می‌باشد. لذا قرارگیری نمونه‌های برداشت شده از میرآباد ونلاس در یک گروه در درخت فیلوژنتیکی منطقی می‌باشد زیرا فاصله جغرافیایی بسیار کمی با یکدیگر دارند. این در حالی است که فاصله مابین جمعیت 11az با سه جمعیت دیگر آذربایجان‌غربی (9az، 10az و 13az) که در یک گروه دیگر قرار گرفته‌اند بیش‌تر است که این نتایج با نتایج حاصل از بررسی های قبلی روی پروانه جوانه‌خوار بلوط که در سال ۲۰۲۰ انجام شده مطابقت دارد (Ghiasoddin *et al*., 2020).

هم‌چنین از مطالعه جریان ژن (NM) و تنوع ژنتیکی (Fst) مشخص شد که بیشترین جریان ژن، بین استان‌های کردستان و کرمانشاه است و کمترین آن بین استان‌های کردستان و آذربایجان غربی است و بیشترین تنوع ژنتیکی طبق جدول به دست آمده مربوط به تنوع ژنتیکی بین استان‌های کرمانشاه و آذربایجان‌غربی وکمترین تنوع ژنتیکی بین استان‌های کردستان وکرمانشاه است.

طبق نتایج این بررسی مابین جمعیت‌های ذکر شده تنوع ژنتیکی مشاهده شد و میزان این تنوع بسیار بالا بوده که این موضوع را می توان با نتایج حاصل از تحقیق .Salvato *et al* (2008) که از نشانگرهای DNA برای بررسی تنوع ژنتیکی پروانه زمستانه کاج (از آفات مهم درختان جنگلی کاج) استفاده شد و تنوع ژنتیکی قوی را بین جمعیت‌ها نشان داد. هم‌چنین نشان داد که به دلیل مهاجرت کم، جریان ژنی نیز کم است و تنوع ژنتیکی در طیف وسیعی افزایش یافته است.

با بررسی درخت فیلوژنتیک می‌توان دریافت که جمعیت‌های مناطق جغرافیایی مختلف در گروه‌های مجزا قرار گرفته‌اند که این خود بیانگر وجود تنوع بالا بین مناطق جغرافیایی مختلف است.

هم‌چنین طبق درخت فیلوژنتیکی، دو جمعیت موجود در استان کردستان (kurd 7 و kurd 18) در یک گروه قرار گرفته‌اند که نشان می‌دهد تنوع ژنتیکی در این دو منطقه (کانی‌دینار مریوان و دزلی مریوان) کمتر می‌باشد. می‌توان علت وجود تنوع ژنتیکی کم درون جمعیت‌ها را بیانگر وجود فاصله جغرافیایی کم دانست. جمعیتی که تنوع ژنتیکی غنی دارد اغلب دارای سازگاری قوی با محیط است و بنابراین شیوع و گسترش آن افزایش می‌یابد (Li *et al*., 2022).

در بررسی‌کنونی ما، تنوع داخل جمعیت‌های مورد مطالعه کمتر از تنوع مشاهده شده در بین جمعیت‌ها بود که این نتایج در دو بررسی دیگر که توسط Schroder and Degan (2008a, 2008b) انجام شده بود نیز چنین نتایجی حاصل شده بود. تقسیم‌بندی میزان تنوع ژنتیکی در داخل و مابین جمعیت‌های آفت‌های جنگلی، با مهاجرت و پتانسیل جابه‌جایی آن‌ها و در نهایت با میزان توانایی آن‌ها در انتقال ژن ارتباط مستقیم دارد. بنابراین بسیار دارای اهمیت است که جریان ژن، تنوع ژنتیکی و ویژگی‌های اکولوژیکی جمعیت‌های آفات مورد نظر، قبل از سرمایه‌گذاری برای کنترل آفت، تشخیص داده شود.

تهیه استراتژی‌های مدیریت آفات، به اطلاعاتی مانند اندازه جمعیت آفت، عوامل موثر بر آن و حتی سطح تعامل بین افراد جمعیت از مکان‌های مختلف بستگی دارد که همگی می‌توانند در ایجاد روش تاثیرگذار برای کنترل آفات نقش موثری داشته باشند (Assefa *et al*., 2017). داده‌های مولکولی قادر هستند که میزان تنوع ژنتیکی را به ما نشان‌دهند و با کمک این داده‌ها می‌توانیم به پیش‌بینی توسعه، انتشار و طغیان آفات بپردازیم. با بهینه‌کردن یک نشانگر خوب که قادر باشد تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها را به درستی نشان‌دهد، قادر خواهیم بود که جمعیت‌های آفات را شناسایی‌کنیم و به مبارزه تلفیقی علیه آن‌ها اقدام کنیم. هم چنین با مطالعه جدول فاصله ژنتیکی چنین استنباط شد که، جمعیت 10az (بادین آباد پیرانشهر) بیشترین فاصله ژنتیکی را با جمعیت های دیگر استان آذربایجان‌غربی دارد این در حالی است که همین جمعیت کمترین میزان فاصله جغرافیایی را با جمعیت های مورد بررسی این استان دارد. که همین موضوع حاکی از آن است که این جمعیت یا از ژنوتیپ های متفاوت گونه میزبان (برو) تغذیه کرده اند و یا گونه مهاجر بوده است و به تازگی وارد منطقه شده است. این نتایج با نتایج حاصل از بررسی روی پروانه Danaus plexippus که در آمریکای شمالی انجام شد، مطابقت دارد که نشان می‌دهد جمعیت مهاجر دارای فاصله

ژنتیکی بیشتری با سایر جمعیت ها هستند. در تحقیق بر روی ساختار ژنتیکی پروانه جوانه‌خوار بلوط با کمک برسی درخت فیلوژنتیک و جدول تعیین فاصله ژنتیکی مشاهده کردیم که علاوه بر وجود میزان تنوع ژنتیکی بالا مابین جمعیت‌هایی که بررسی‌نمودیم آن هم به علت وجود فاصله جغرافیایی، جمعیت‌های موجود در این تحقیق به تفکیک منطقه جغرافیایی از هم جدا شدند. دو جمعیت از یک منطقه در استان آذربایجان‌غربی (میرآباد آذربایجان غربی و سردشت) مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به جدول تعیین فاصله ژنتیکی، این دو جمعیت ۱/۱۹ فاصله از هم داشته، که وجود این مشاهدات می‌تواند به علت سازگار شدن آفت با درخت میزبان باشد.

هر اندازه که آگاهی در مورد چگونگی سازگاری جمعیت‌های آفات به یک یا انواع میزبان داشته باشیم، به طراحی موفق‌تر و موثرتر راهکارهای مدیریتی مبارزه علیه آفات با حداقل تخریب نظام اکولوژیکی یک سیستم که آفت نیز جزو آن است نزدیک‌تر می‌شویم (Bhau *et al.*, 2014).

در بررسی تاثیرات متقابل بین پروانه جوانه‌خوار بلوط و درخت میزبان، مشخص شد که در اثر فعالیت حشره مذکور تفاوت‌های زیادی در سطح بی‌برگی درختان بلوط ایجاد می‌شود. نتایج این بررسی به این صورت بود که برخی از درختان دارای قدرت تحمل نسبی به فعالیت لارو آفت مذکور هستند. این در حالی است که برخی دیگر از درختان بلوط نسبت به فعالیت لاروهای این آفت بسیار حساس هستند. همچنین بیان شده است که لاروهای این آفت توانایی بالایی در انتخاب بین برگ‌های درختان مقاوم و حساس دارند (Schroder *et al.*, 2011). علاوه بر این‌ها نتایج انجام آزمایش‌های بویایی‌سنجی[2] روی حشرات ماده بالغ بیانگر آن بود که پروانه‌های بالغی که جفت‌گیری کرده‌اند قادرند مابین پایه‌های حساس و مقاوم یکی را انتخاب کنند و این گونه به نظر می‌رسد که با توجه به توانایی حشره مذکور در انتخاب بین میزبان‌ها و همچنین الیگوفاژ بودن آن، *T. viridana* قادر به تشخیص نوع میزبان باشد و این توانایی در کنار تفاوت در انتقال ژن، می‌تواند گروه بندی ایجاد شده در درخت فیلوژنتیک را توجیه کند.

رفتار تولیدمثلی پروانه جوانه‌خوار بلوط در مورد حشرات نر، توجیهی است برای وجود تنوع کم مابین جمعیت‌های آفت مذکور، آن هم به علت ایجاد جریان ژن بین جمعیت‌ها که در کنار نحوه جفت‌گیری نرها که با اولین ماده در جایی که نر از تخم خارج می‌شود، جفت‌گیری انجام می‌دهد و علاوه بر این‌ها میزان تحرک کم در حشرات بالغ ماده می‌تواند دلیل جدایی جمعیت‌ها از هم و همچنین ایجاد سازگاری با مکان و میزبان خاص باشد که ترکیب هردوی این‌ها باعث تنوع بالایی مابین جمعیت‌ها می‌شود و جمعیتی مختص به یک منطقه جغرافیایی ایجاد می‌کندکه در مورد مطالعه کنونی هم مشاهده‌شد. هرچند که عواملی همچون طغیان آفت که باعث شیوع آفت مذکور در ابعاد وسیع‌تر می‌شود و در نهایت جریان ژنی بیش‌تری ایجاد می‌کند و نیز عواملی مثل توپوگرافی مختص به هر ناحیه و موانع جغرافیایی که از جریان ژن جلوگیری می‌کنند را باید مورد مطالعه قرار داد.

نتیجه گیری کلی

۱. نشانگر 28s تنوع ژنتیکی مابین جمعیت‌های مورد بررسی و همچنین تنوع درون جمعیت‌های پروانه جوانه خوار بلوط را به درستی نشان داد.

۲. نشانگر 28s قادر بود به خوبی جمعیت‌های مورد بررسی پروانه جوانه خوار بلوط را بر اساس فاصله جغرافیایی تفکیک کند.

پیشنهادات

۱. استفاده از ژن 28s برای بررسی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه خوار بلوط در جنگل‌های سایر استان‌های حوزه زاگرس (زاگرس‌جنوبی) و جنگل‌های استان‌های حوزه استان‌های شمالی کشور (جنگل‌های هیرکانی).

۲. انجام تحقیقات مورفومتریک و مقایسه آن با نتایج تحقیقات ژنتیکی.

۳. استفاده از سایر نشانگرها جهت بررسی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه خوار بلوط و یافتن بهترین نشانگر.

۴. بررسی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه‌خوار بلوط *T. viridana* با استفاده از ژن 28s در جمعیت های خسارت زا و کمتر خسارت‌زای آفت.

۵. بررسی تنوع ژنتیکی پروانه جوانه‌خوار بلوط *T. viridana* با بهره‌گیری از سایر نشانگرهای مولکولی در مناطق مورد مطالعه.

1. Olfactometry

References

Zargaran, M. Mousavi Mirkla, S.R. Banj Shafi'i, A. and Ramezani Kakroudi, A. (2014). Studying the biology of the oak borer and its distribution in West Azarbaijan province. Journal of Forest Research and Development, 1 (1), 31-42.

Talebi, Kh. Sajdi, T., & Yazdian, F. (2014). A look at the forests of Iran. The second edition, published by the Forestry and Rangeland Research Institute. Pages 1-65.

Ghabari, H. Guldansaz, S.H. Ashuri, A., Kharazi, A., & Bi-Hamta, M. (2016). Investigating the presence and distribution of the oak bud-eating moth in the forests of Kurdistan province. Entomological Society letter. 27 (1), 47-59.

Ghiyasuddin, H., Shabanian, N., Kavossi, M., & Talebi, R. (2019). Genetic diversity and population structure of the oak bud-eating butterfly in the forests of North Zagros. Journal of modern genetics. 15 (2), 136-123.

Assefa, Y., Goftishu, M., Capdevielle-Dulac, C., & Le Ru, B. (2017). Clarifying the source of *Conicofrontia sesamoides Hampson* (Lepidoptera: Noctuidae) population in South African sugarcane using morphological identification and mitochondrial DNA analysis. Phytoparasitica, 45(1), 45-55.

Aylor, D.E., & Irwin, M.E. (1999). Aerial dispersal of pests and pathogens: implications for integrated pest management. Agricultural and Forest Meteorology, 97, 233-234.

Bhau, B.S., Mech, J., Borthakur, S., Bhuyan, M., & Bhattacharyya, P.R. (2014). Morphological and genetic diversity studies among populations of tea mosquito bug, Helopeltis theivora from Assam, India. Molecular Biology Reports, 41, 7845-7856.

Castagneyrol, B., Jactel, H., Vacher, C., Brockerhoff, E.G., & Koricheva, J. (2014). Effects of plant phylogenetic diversity on herbivory depend on herbivore specialization. Journal of Applied Ecology, 51(1), 134-141.

Du Merle, P. (1999). Egg development and diapause: ecophysiological and genetic basis of phenological polymorphism and adaptation to varied hosts in the green oak tortrix, *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Insect Physiology, 45(6), 599-611.

Fazeli, M.J., & Abai, M. (1990). Green oak leaf-roller moth in Kohkiluyeh and Boyer-Ahmad province (*Tortrix viridana* L., Lep.: Tortricidae). Applied Entomology and Phytopathology, 57(1-2), 1-2.

Gao, B., Hedlund, J., Reynolds, D. R., Zhai, B., Hu, G., & Chapman, J. W. (2020). The 'migratory connectivity'concept, and its applicability to insect migrants. *Movement Ecology*, *8*, 1-13.

Ghobari, H., Goldansaz, S.H., Askari, H., Ashouri, A., kharazi, P.A., & Bihamta, M.R. (2007). Investigation of presence, distribution and flight period of oak leaf roller moth, *Tortrix viridana* (Lep.: Tortricidae) using pheromone traps inKurdistan province. Journal of Entomological Society of Iran, 27(1), 47-59.

Guo, J., Wang, Z., & Francis, F. (2017). Use of molecular markers for entomological diversity assessment and their application in population study of aphids. Entomologie faunistique-Faunistic Entomology.

Haase, J., Castagneyrol, B., Cornelissen, J.H.C., Ghazoul, J., Kattge, J., Koricheva, J., Scherer Lorenzen, M., Morath, S., & Jactel, H. (2015). Contrasting effects of tree diversity on young tree growth and resistance to insect herbivores across three biodiversity experiments. Oikos, 124(12), 1674-1685.

Hunter, M.D. (2008). A variable insect–plant interaction: the relationship between tree budburst phenology and population levels of insect herbivores among trees. Journal of Ecological Entomology, 17(1), 91-95.

Jazirehi, M.H., & Ebrahimi-Rastaghi, M. (2003). Silviculture in Zagros. Tehran University publications. (In Farsi).

Jones, B.C., & Despland, E. (2006). Effects of synchronization with host plant phenology occur early in the larval development of a spring folivore. Canadian Journal of Zoology, 84(4), 628-633.

Li, X., Wu, S., Xu, Y., Liu, Y., & Wang, J. (2022). Population Genetic Structure of *Chlorops oryzae* (Diptera, Chloropidae) in China. Insects, 13(4), 327.

Marvi mohajer, MR. (2005). Silviculture, Tehran University Prees, Tehran, 388p. (In Pertion).

Nugnes, F., Gebiola, M., Monti, M.M., Gualtieri, L., Giorgini, M., Wang, J., & Bernardo, U. (2015). Genetic Diversity of the Invasive Gall Wasp Leptocybe invasa (Hymenoptera: Eulophidae) and of its Rickettsia Endosymbiont, and Associated Sex-Ratio Differences. Journal of Plos one, 10(5), 1-20.

Sabeti, H.A. (1995). Forests, trees and shrubs of Iran. Yaz University publications. (In Farsi).

Salvato, P., Battisti, A., Concato, S., Masutti, L., Patarnello, T., & Zane, L. (2002). Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa–wilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. Mol Ecol 11, 2435-2444.

Schroder, H. (2008). Genetic differentiation of populations of the green oak leaf roller (*Tortrix viridana* L.) and its host (*Quercus robur* L.) using nuclear gene markers. Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft fur Allgemeine und Angewandte Entomologie, 16(4), 237-242.

Schroeder, H., & Degen, B. (2008a). Genetic structure of the green oak leaf roller (*Tortrix viridana* L.) and one of its hosts, *Quercus robur* L. Forest Ecology and Management, 256, 1270-1279.

Schroeder, H., & Degen, B. (2008b). Spatial genetic structure in populations of the green oak leaf roller, *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera, Tortricidae). European Journal of Forest Research, 127(6), 447-453.

Schroeder, H., Arens, P., & Smulders, M.J.M. (2010). Autosomal and sex-linked microsatellite loci in the green oak leaf roller *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera, Tortricidae). Journal of Molecular Ecology Resources, 9(3), 809-811.

Serra, G., Maestrale, GB., Baratti, M., & Lentini, A. (2014). Genetic variation in Sardinian populations of the Green oak leaf roller *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera, Tortricidae). Integrated protection in oak forests. IOBC/wprs Bulletin, 101, 221-225.

Shuster, S.M., Lonsdorf, E.V., Wimp, G.M., Bailey, J.K., & Whitham, T.G. (2006). Community heritability measures the evolutionary consequences of indirect genetic effects on community structure. Evolution, 60(5), 991-1003.

Wang, X., & Messing, R.H. (2003). Intra- and interspecific competition by Fopius arisanus and Diachasmimorpha tryoni (hymenoptera: Braconidae), parasitoids of tephritid fruit flies. Biological Control, 27, 251-259.

Wharton, R.A., Trostle, M.K., Messing, R.H., Copeland, R.S., Kimani-Njogu, S.W., Lux, S., Overholt, W.A., Mohamed, S., & Sivinski, J. (2000). Parasitoids of medfly, ceratitis capitata, and related tephritids in kenyan coffee: a predominantly koinobiont assemblage. Bulletin of Entomological Research, 90, 517-526.

Xu, Y., Mai, J.W., Yu, B.J., Hu, H.X., Yuan, L., Jashenko, R., & Ji, R. (2019). Study on the genetic differentiation of geographic populations of *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae) in sino-kazakh border areas based on mitochondrial COI and COII genes. Journal of Economic Entomology, 112(4), 1912-1919.