مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۰ (۲۲۶-۲۱۷)

مقایسه DNA بارکدینگ با روش کلاسیک در جهت تشخیص پنج گونه شته درختان میوه در مشهد

ریحانه درسوئی[۱]*، جواد کریمی[۲] و مهدی مدرس اول[۳]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۴ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۱۴)

چکیده

شته‌ها از آفات مهم کشاورزی هستند، اما گرایش تکاملی آنها به سمت کاهش ویژگی‌های مفید تاکسونومیک و تغییرپذیری صفات ظاهری به‌دلیل تأثیر عوامل محیطی و میزبان گیاهی، شناسایی مرفولوژیک آنها را در برخی مواقع دچار مشکل می‌نماید. مدیریت صحیح این آفات مستلزم شناسایی دقیق آنها است، لذا استفاده از روش‌های نوین شناسایی می‌تواند در زمینه کنترل این آفات راه‌گشا باشد. در مطالعه‌ای که به‌منظور شناسایی شته‌های درختان میوه دانه‌دار، طی سال‌های ۱۳۸۷تا ۱۳۸۹ در شهرستان مشهد انجام گرفت، علاوه بر روش‌های مورفولوژیک رایج از روش شناسه‌گذاری (بارکدینگ) DNA نیز استفاده گردید. در این بررسی گونه‌های *Allocotaphis quaestionis*، *Aphis pomi*، *Dysaphis affinis*، *D. plantaginea* و *Nearctaphis bakeri* از روی سیب، به و گلابی جمع‌آوری گردید که گونه *A. quaestionis* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. بارکد DNA برای ناحیه *cox*1 این گونه‌ها تهیه و روابط تبارشناسی میان گونه‌های جمع‌آوری شده و سایر گونه‌های این خانواده بررسی گردید. براساس این شناسه، شناسایی ظاهری تأیید شد و نتایج داده های مولکولی با مشخصات مرفولوژیک و گروه بندی کلاسیک انطباق داشت و گونه‌های مورد مطالعه بر اساس جنس و قبیله تفکیک شدند. استفاده از خط شناسه‌گذاری (DNA بارکد) به عنوان ابزاری برای شناسایی شته‌ها برای اولین بار در ایران انجام گرفت و نتایج این مطالعه مؤید این است که توالی *cox*1 می‌تواند در مطالعه تعیین هویت و بررسی روابط تبارشناسی شته‌ها به کار رود.

واژه‌های کلیدی: شته، *cox*1، خط شناسه‌گذاری DNA، روش NJ

مقدمه

شته‌ها گروهی از حشرات با حدود پنج هزار گونه هستند که از شیره گیاهی تغذیه می‌نمایند. این حشرات با شکل‌های ریخت‌شناسی مختلف در کنار یکدیگر زندگی می‌کنند و به صورت بکرزایی و در تناوب آن با تولیدمثل جنسی تکثیر می‌گردند (Minks & Harrewing, 1987). این آفات علاوه بر خسارت مستقیم، ناقل بسیاری از عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند (Blackman & Eastop, 2000) و به خاطر سهولت در جابجایی و بکرزایی به عنوان آفاتی مهاجم در جهان شناخته می‌شوند (Messing *et al*., 2007). برای حفاظت از گیاهان در ابتدا بایستی آفت مورد نظر شناخته شود، زیرا اطمینان از شناسایی صحیح گونه برای مدیریت انبوهی آفت، امری ضروری است (Miller & Foottit, 2009). تاکنون، کلیدهای طبقه‌بندی متعدد برای تشخیص شته‌ها برمبنای ویژگی‌های ریخت‌شناسی

* نویسنده مسئول: ریحانه درسوئی تلفن: ۰۹۱۵-۳۱۵۸۷۱۴ E-mail: r.darsouei@gmail.com

ارایه گردیده است، اما کوچک جثه بودن این آفات، گرایش تکاملی به سمت کاهش ویژگی‌های مفید تاکسونومیک، تغییرپذیری صفات ظاهری آنها به‌واسطه تأثیر عوامل محیطی و میزبان گیاهی و ایجاد چندشکلی، نه تنها شناسایی این گونه‌ها را می‌تواند دشوار سازد، بلکه بررسی روابط آنها را نیز در سطوح مختلف تاکسونومی دچار مشکل می‌نماید (Foottit, 1997). مشکلات موجود در روش‌های شناسایی سنتی حشرات که مبتنی بر خصوصیات ریخت‌شناسی هستند، محققان را برآن داشت تا روش‌های مولکولی را در این زمینه به کارگیرند. در میان این روش‌ها، توالی‌یابی DNA بیشترین کاربرد را دارا می‌باشد (Lee *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010). ابزارهای شناسایی مولکولی، اطلاعاتی ارزشمند را برای حل مشکلات رده‌بندی خانواده Aphididae در اختیار پژوهشگران قرار داده است (Foottit, 1997). فنون مبتنی بر توالی‌یابی DNA، در شناسایی و مطالعه روابط تبارشناسی حشرات مورد استفاده قرارگرفته‌اند. در این مطالعات از نواحی ریبوزومی و نیز ژن‌های میتوکندری استفاده شده است. ژن‌های میتوکندری که تا کنون در مطالعات شته‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل *cox*1، COII، Cytochrome b، 12S و 16S و ژن‌های هسته‌ای نیز شامل EF-1α، ITS و LWO هستند (Stern *et al.*, 1997; Moran *et al.*, 1999; Normark, 2000; vonDohlen & Moran, 2000; Inbar *et al.*, 2004; Baumann & Baumann, 2005; von Dohlen *et al.*, 2002, 2006; Ortiz-Rivas *et al.*, 2004). استفاده از توالی ژن *cox*1، آغازگر رویکردی موسوم به DNA بارکدینگ می‌باشد (Hebert *et al.*, 2003) که در سال‌های اخیر در مطالعه گروه‌های مختلف حشرات از جمله شته‌ها اهمیت یافته است (Lee *et al.*, 2011; Foottit & Maw, 2009). کارایی این نشانگر در تعیین هویت گونه‌های مختلف حشرات مانند سخت بالپوشان (Lobl & Leschen, 2005)، دوبالان (Scheffer *et al.*, 2006)، ناجوربالان (Foottit *et al.*, 2008)، بال‌غشاییان (Smith *et al.*, 2008) و بالپولکداران (Hajibabaei *et al.*, 2006) به اثبات رسیده است. مزیت این شیوه کارآیی آن در مطالعه گونه‌های نزدیک به هم است که این امکان را فراهم می‌آورد تا بتوان از آن در شناسایی گونه‌ها، مشخص نمودن گونه‌های مخفی، بررسی روابط تبارشناسی و شناخت شکل‌های مرفولوژیکی مختلف موجود در یک گونه استفاده نمود (Foottit & Maw, 2009).

تاکنون حدود ۴۷۰۰ گونه شته در جهان معرفی شده است (Remaudier & Ramaudier, 1997) که در حال حاضر فقط برای کمتر از ده درصد از این تعداد، بارکد DNA وجود دارد (Lee *et al.*, 2011). Foottit *et al.* (2008)، برای بیش از سیصد گونه شته اقدام به تهیه بارکد DNA نمودند که شناخت مولکولی این گونه‌ها را به‌راحتی امکان پذیر ساخته است. روش‌های شناسایی سنتی در مورد شته‌ها در برخی مواقع با مشکلاتی همراه است. DNA بارکد می‌تواند روشی مناسب برای شناسایی شته‌ها در مراحل قبل از بلوغ باشد (Cocuzza *et al.*, 2008).

اولین مطالعه برای پی بردن به روابط تبارشناسی شته‌ها برای سطوح بالاتر از قبیله، با استناد به داده‌های مولکولی و با استفاده از ژن‌های میتوکندری انجام پذیرفت که فاقد ساختار تبارشناسی مناسب برای سطوح بالاتر از قبیله بود (von Dohlen & Moran, 2000; Martínez-Torres *et al.*, 2001). همین امر سبب شد که از ژن هسته‌ای[1] long-wave length opsin (LWO) برای تعیین روابط این خانواده استفاده شود. اطلاعات مفید به دست آمده از ژن LWO روابط گونه‌های خانواده Aphididae را به خوبی روشن کرد. تلفیق ژن LWO با توالی‌های حاصل از ناحیه ATP6 زیرخانواده Lachninae را به عنوان جد این خانواده معرفی نمود (Ortiz-Rivas *et al.*, 2004).

در تحقیق پیش‌رو از ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ برای شناسایی شته‌های جمع‌آوری شده از روی درختان سیب، به و گلابی شهرستان مشهد و حومه استفاده شد. هدف از انجام این مطالعه شناسایی این شته‌ها با استفاده از نشانگر مولکولی DNA و مقایسه کارایی شیوه DNA بارکد با روش کلاسیک می‌باشد.

---

۱. اپسین‌ها رنگدانه‌های حساس به نور بصری در سلول‌های گیرنده نور شبکیه هستند. ژن کدکننده‌ی مرتبط، یک ژن هسته‌ای تک نسخه‌ای است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

طی سال‌های ۱۳۸۸تا ۱۳۸۹ نمونه‌برداری از باغ‌های سیب، گلابی و به مناطق مختلف شهرستان مشهد و حومه انجام گرفت. سرشاخه‌های حاوی کلنی شته چیده و شته‌های جمع‌آوری شده براساس میزبان و منطقه نمونه‌برداری جدا و در الکل ۹۶ درصد نگهداری شدند. شته‌های موجود در هر جمعیت از نظر ریخت‌شناسی مقایسه شدند تا اطمینان حاصل شود افراد مورد استفاده متعلق به یک گونه هستند.

مطالعات ریخت‌شناسی

به‌منظور مطالعات ریخت‌شناسی، ابتدا نمونه‌ها با استفاده از پتاس ده درصد شفاف شد و با استفاده از هویر اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید. تعیین هویت نمونه‌ها با در نظر گرفتن مشخصات ظاهری و برمبنای کلید (Blackman & Eastop, 2006) انجام شد. سپس به منظور تأیید شناسایی، گونه‌های شته جمع‌آوری شده برای Karina Wieczorek در گروه جانورشناسی دانشگاه Silesia لهستان ارسال گردید و در نهایت از نمونه‌های تأیید شده برای انجام مطالعات مولکولی استفاده گردید. نمونه‌های شناسایی شده در مجموعه حشرات گروه گیاه پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد نگهداری می‌شوند.

مطالعات مولکولی

استخراج DNA

به‌منظور استخراج DNA از کیت استخراج DNA ژنومی بایونیر (Bioneer Inc, Daejeon, Korea) استفاده شد. ابتدا نمونه از داخل الکل ۹۶ درصد روی کاغذ صافی منتقل شد و به مدت پانزده دقیقه به همین صورت باقی ماند تا الکل آن به‌طور کامل حذف شود. سپس داخل یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به‌منظور تسهیل در استخراج به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس با استفاده از یک نوک سمپلر آبی که انتهای آن به شکل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری درآورده شده بود، خرد گردید. به منظور هر چه بهتر خرد شدن نمونه، تیوب حاوی نمونه در حین خرد کردن سه نوبت داخل نیتروژن مایع منتقل و سپس دویست میکرولیتر بافر استخراج و بیست میکرولیتر پروتئیناز پتاسیم به تیوب حاوی نمونه اضافه شد. پس از این مرحله، نمونه در دمای شصت درجه سلسیوس به مدت چهار ساعت داخل بن‌ماری و سپس ده دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. بقیه مراحل استخراج با توجه به دستورالعمل کیت انجام گرفت و در نهایت DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استفاده، نگهداری شد.

واکنش PCR

آغازگرهایی که برای تکثیر بخشی از ناحیه cox1 استفاده شد، شامل آغازگر مستقیم (F: LCO1490) -5' GGTC AACAAATCATAAAGATATTGG-3' و آغازگر معکوس (R: HCO2198): 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Folmer *et al*., 1994) بودند. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرو لیتر انجام شد. مواد استفاده شده در این واکنش عبارت بود از سه میکرولیتر بافر 10X، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم (20 mM)، یک میکرولیتر آغازگر مستقیم و یک میکرولیتر آغازگر معکوس (10 pmol)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10 mM)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز (5u/µl) و یک میکرولیتر DNA الگو (۵۰ نانوگرم). برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه، به دنبال آن سی چرخه (واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس برای سی ثانیه، اتصال در ۵۴ درجه سلسیوس برای نود ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای نود ثانیه) و در نهایت، گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هشت دقیقه بود. برای اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر چهار میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری (الکتروفورز) شد و توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید.

توالی‌یابی

به‌منظور توالی‌یابی قطعه مورد نظر، ابتدا محصول PCR توسط کیت خالص‌سازی بایونیر (Bioneer, Inc, Daejeon, Korea) خالص شد و در نهایت جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, Inc, Seoul, Korea) ارسال گردید. قطعه تکثیر شده از دو جهت مستقیم و معکوس به همراه تکرار، توالی‌یابی

شد.

آنالیز داده‌ها

کروماتوگرام توالی‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار Bioedit (Hall, 1999)، (http://www.mbio.ncsu.edu/ bioedit/bioedit.html) بررسی و در صورت نیاز ویرایش شد. بعد از اطمینان از صحت توالی‌ها، از توالی‌های دو رشته مستقیم و معکوس توسط نرم‌افزار DNA Baser (http://www.dnabaser.com) توالی واحدی به‌دست آمد. در سیستم بارکدینگ (www.barcodinglife.org) توالی‌های به دست آمده با استفاده ازگزینه Identify specimen ارزیابی شد و در نهایت توسط نرم‌افزار Banklt در بانک ژن ثبت گردید. برای آنالیز داده‌ها، ۲۷ توالی از گونه‌های زیرخانواده Aphidinae از بانک ژن (www.ncbi.nlm.nih.gov) انتخاب و گونه *Adelges tsugae* (Adelgidae) نیز به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد (von Dohlen & Moran, 2000). گونه‌های مورد استفاده در آنالیز به همراه شماره دسترسی هر یک در جدول ۱ نشان داده شده است. توالی‌ها توسط نرم‌افزار Clustal X (Larkin, 2007) هم‌ردیف و مقایسه شدند. سپس از نرم‌افزار MEGA4 (Tamura *et al*., 2007) برای تعیین فاصله نوکلئوتیدی، مقایسه نوکلئوتیدها و تعیین روابط تبارشناسی با استفاده از روش Neighbor joining (NJ) براساس مدل جایگزینی نوکلئوتیدی کیمورا (K2P)، که بهترین مدل برای آنالیز تبارشناسی در سطح گونه‌ها با کمترین فاصله است، استفاده شد (Hebert *et al*., 2003).

جدول ۱- گونه‌های مورد استفاده در آنالیز ژن *cox*1 به همراه شماره دسترسی

نام علمی گونه	شماره دسترسی	نام علمی گونه	شماره دسترسی
Aphis craccivora	EU701309	*Nearctaphis sensoriata*	EU701817
Aphis fabae	EU701330	*Dysaphis plantaginea*	EU701636
Aphis pomi	EU701477	*Brachycaudus cardui*	EU701531
Aphis glycines	EU701335	*Brachycaudus helichrysi*	EU701532
Aphis gossypii	EU701420	*Macrosiphum euphorbiae*	EU701729
Aphis spiraecola	EU701499	*Macrosiphum rosae*	EU701733
Aphis varians	EU701508	*Myzus ornatus*	EU701794
Nearctaphis crataegifoliae	EU701815	*Myzus persicae*	EU701803
Nearctaphis kachena	EU701816	*Rhopalosiphum maidis*	EU701890
Rhopalosiphum padi	EU701894	*Melanaphis bambusae*	EU701747
Schizaphis graminum	EU701899	*Sitobion avenae*	EU701907
Schizaphis scirpicola	EU701900	*Melanaphis japonica*	GU457792
Sitobion phyllanthi	EU701908	*Adelges tsugae*	FJ502597
Melanaphis japonica	GU457792		

نتایج

نتایج مطالعات ریخت‌شناسی

طی نمونه‌برداری‌های صورت گرفته، پنج گونه شته از روی درختان سیب (*Malus domestica*)، گلابی (*Prunus communis*) و به (*Cydonia oblonga*) از شهرستان مشهد جمع‌آوری و شناسایی شد. گونه‌های *Allocotaphis quaestionis* (Börner)، *Aphis pomi* (de Geer) و *Dysaphis affinis* (Mordvilko) از روی درخت سیب، *A. pomi* از روی درخت به و *D. plantaginea* (Passerini) و *Nearctaphis bakeri* (Cowen) از روی درخت گلابی جمع‌آوری گردیدند. گونه *A. quaestionis* در این بررسی برای اولین بار در ایران، از مشهد گزارش می‌شود. اسلاید میکروسکوپی گونه مذکور در شکل ۱ مشخص می‌باشد. در جدول ۲ گونه‌های جمع‌آوری شده از هر منطقه به تفکیک مشخص شده است.

شکل ۱- شته *Allocotaphis quaestionis*

جدول ۲- فهرست شته‌های جمع‌آوری شده در این مطالعه و محل نمونه‌برداری

گونه شته	محل جمع‌آوری نمونه					
Aphis pomi	مشهد	بند گلستان	شاندیز	گلمکان	مزرعه نمونه دانشگاه فردوسی	تبادکان
Dysaphis affinis	مشهد					
D. plantaginea	کلات	مشهد	نیشابور	فریمان		
N. bakeri	کلات					
A. quaestionis	فریمان	نیشابور	طرقبه			

نتایج مولکولی

بعد از تکثیر ناحیه *cox*1، توالی‌هایی به طول ۶۵۸ جفت باز برای گونه‌های *A. pomi*، *D. plantaginea*، *D. affinis*، *A. quaestionis* و *N. bakeri* به دست آمد که به‌ترتیب با شماره دسترسی‌های HQ900843، JF521490، JF521492، JF521491 و JF719035 در بانک ژن ثبت گردید. در بین پنج توالی ثبت شده از این ناحیه، فقط برای دو گونه *A. pomi* و *D. plantaginea* از قبل در بانک ژن اطلاعات ژنومی وجود داشت و توالی سه گونه دیگر برای اولین بار به ثبت رسیدند.

نتایج حاصل از شناسایی نمونه با استفاده از توالی *cox*1 در سیستم بارکدینگ برای *A. pomi* و *D. plantaginea* به‌ترتیب با ۱۰۰ و ۹۶ درصد شباهت، شناسایی کلاسیک را تأیید نمود. اگر چه برای سه گونه دیگر، بارکد DNA در بانک ژن وجود نداشت، اما آنالیز مشابه، نشانگر نتایج مناسب بود چرا که نتیجه شناسایی توالی *D. affinis* بیانگر شباهت ۹۵ درصدی این گونه با *D. plantaginea* بود و توالی *A. quaestionis* به‌ترتیب با ۹۸ و ۹۵ درصد، شباهت بالایی به جنس‌های *Dysaphis* و *Myzus* از خود نشان داد اما برای گونه *N. bakeri* نتایج متفاوت بود، گرچه سه بارکد DNA از جنس *Nearctaphis* در سیستم بارکدینگ وجود داشت، اما نتیجه شناسایی نمونه با استفاده از توالی *cox*1 شباهت ۹۴ درصدی این گونه را با جنس *Myzus* نشان داد. برای بررسی دقیق‌تر تبارشناسی ناحیه *cox*1، از ۳۲ تاکسون استفاده شد. نسبت T:C:A:G در پنج نمونه جمع‌آوری شده در این مطالعه محاسبه شد (جدول۳)، برای کل نمونه‌های استفاده شده در آنالیز تبارشناسی، میانگین این نسبت‌ها به‌ترتیب ۱۰/۳۱: ۳۵/۳۴: ۱۴/۱۱: ۳۹/۹۶ درصد و میانگین GC و AT به‌ترتیب ۲۴/۶۹ و ۷۵/۳۰ درصد بود.

فواصل نوکلئوتیدی به‌دست آمده با روش K2P برای کل گونه‌ها از ۰ تا ۱/۸۱ درصد متغیر بود و میانگین آنها ۰/۰۹۳ درصد محاسبه گردید. این فاصله برای جنس‌های *Aphis*، *Dysaphis*، *Allocotaphis* و *Nearctaphis* به صورت جداگانه نیز تعیین شد (جدول۴). مقایسه *A. pomi* با سایر توالی‌های ثبت شده از این گونه در بانک ژن نشان داد که هیچ فاصله نوکلئوتیدی بین توالی‌های مختلف این گونه وجود ندارد. در جنس *Dysaphis* آنالیز مشابه برای *D. plantaginea* ایران، *D. affinis* ایران و *D. Plantaginea* کانادا (EU701636) انجام‌گرفت. نتایج نشان داد که این فاصله در دو جمعیت *D. plantaginea* ایران و کانادا بیشتر از این فاصله در دو گونه *D. plantaginea* و *D. affinis* جمع‌آوری شده از ایران می‌باشد. فاصله بین دو جمعیت *D. plantaginea*، ۰/۰۴۳ درصد بود، در حالی‌که برای *D. plantaginea* ایران با *D. affinis*، ۰/۰۳۷ درصد محاسبه شد. این فاصله در *N. bakeri* با سه گونه *N. crataegifoliae*، *N. kachena* و *N. sensoriata* به ترتیب ۰/۰۸۱، ۰/۰۷۷ و ۰/۰۸۹ درصد به‌دست آمد که در *N. kachena* به کمترین مقدار می‌رسد.

فاصله نوکلئوتیدی برای پنج گونه *A. pomi*، *D. affinis*، *D. plantaginea*، *N. bakeri* و *A. quaestionis* نیز به تنهایی محاسبه شد. این فاصله در گونه *A. pomi* با چهار گونه دیگر بیش از ۰/۱ درصد می‌باشد. دلیل این امر قرارگرفتن جنس *Aphis* در قبیله Aphidini است در حالی‌که چهار گونه دیگر در قبیله Macroshiphoni قرار دارند و فاصله نوکلئوتیدی در آنها کمتر و یا مساوی ۰/۱ درصد است.بررسی روابط با استفاده از روش NJ برای آنالیز گونه‌ها در سطح زیرخانواده انجام شد. تبارنمای بازسازی شده بر مبنای NJ به خوبی گونه‌های دو قبیله Aphidini و

جدول ۳- نسبت نوکلئوتیدهای مختلف و درصد GC و AT در شته‌های جمع‌آوری شده

نام علمی گونه	شماره دسترسی	A	C	G	T	GC%	AT%
Aphis pomi	HQ900843	۲۱۴	۶۹	۶۴	۲۳۱	۲۶/۴۵	۷۳/۵۵
Nearctaphis bakeri	JF719035	۲۱۸	۹۶	۶۱	۲۳۰	۲۵/۹۵	۷۴/۰۵
Dysaphis plantaginea	JF521490	۲۱۹	۸۳	۶۲	۲۴۳	۲۳/۸۹	۷۶/۱۱
D. affinis	JF521492	۲۱۷	۸۲	۶۱	۲۴۷	۲۳/۵۶	۷۶/۴۴
Allocotaphis quaestionis	JF521491	۲۲۰	۸۴	۶۴	۲۳۹	۲۴/۳۸	۷۵/۶۲

جدول ۴- میزان واگرایی (درصد) (در بالا) و تعداد تفاوت‌ها (در پایین) در ژن *cox*1 براساس مقایسه دوتایی نوکلئوتیدها میان جنس‌های *Aphis*، *Dysaphis*، *Allocotaphis* و *Nearctaphis*

		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
۱	*A. pomi*		۰/۰۰۰	۰/۰۱۰	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۱۵	۰/۰۱۶	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵
۲	*A.pomi*-Iran	۰/۰۰۰		۰/۰۱۰	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۱۵	۰/۰۱۶	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵
۳	*A. spiraecola*	۰/۰۵۲	۰/۰۵۲		۰/۰۱۴	۰/۰۱۳	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۱۲	۰/۰۱۳	۰/۰۱۵	۰/۰۱۳
۴	*N. crataegifoliae*	۰/۱۰۳	۰/۱۰۳	۰/۱۰۳		۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۰۱۳	۰/۰۱۱	۰/۰۱۱	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲
۵	*N. kachena*	۰/۱۰۷	۰/۱۰۷	۰/۰۹۷	۰/۰۳۴		۰/۰۰۹	۰/۰۱۳	۰/۰۱۱	۰/۰۱۰	۰/۰۱۳	۰/۰۱۲
۶	*N. sensoriata*	۰/۰۹۹	۰/۰۹۹	۰/۰۹۴	۰/۰۴۱	۰/۰۴۸		۰/۰۱۴	۰/۰۱۱	۰/۰۱۲	۰/۰۱۵	۰/۰۱۳
۷	*N. bakeri*-Iran	۰/۱۱۷	۰/۱۱۷	۰/۱۰۹	۰/۰۸۱	۰/۰۷۷	۰/۰۸۹		۰/۰۱۲	۰/۰۰۹	۰/۰۱۳	۰/۰۱۳
۸	*D. plantaginea*	۰/۰۹۳	۰/۰۹۳	۰/۰۹۵	۰/۰۶۴	۰/۰۶۴	۰/۰۵۹	۰/۰۷۶		۰/۰۰۹	۰/۰۱۱	۰/۰۰۸
۹	*D. plantaginea*-Iran	۰/۱۰۱	۰/۱۰۱	۰/۰۹۶	۰/۰۶۶	۰/۰۶۲	۰/۰۶۶	۰/۰۵۵	۰/۰۴۳		۰/۰۰۹	۰/۰۱۱
۱۰	*D. affinis*-Iran	۰/۱۲۶	۰/۱۲۶	۰/۱۲۰	۰/۰۸۶	۰/۰۸۸	۰/۰۸۸	۰/۰۸۷	۰/۰۶۶	۰/۰۳۷		۰/۰۱۱
۱۱	*A.quaestionis*-Iran	۰/۱۱۲	۰/۱۱۲	۰/۱۱۱	۰/۰۸۲	۰/۰۸۰	۰/۰۸۱	۰/۰۸۵	۰/۰۳۶	۰/۰۶۴	۰/۰۶۱	

Macrosiphoni را از یکدیگر تفکیک نمود (شکل۲).

در تبارنمای بازسازی شده، گونه *A. pomi* با صد درصد بوت استرپ در کنار دیگر جمعیت‌های گونه *A. pomi* و با ۸۵٪ بوت استرپ در کنار *A. spiraecola* قرار گرفت. *D. affinis* و *D. plantaginea* با ۸۴ درصد بوت استرپ در کنار یکدیگر در یک شاخه قرارگرفتند. گونه *N. bakeri* نیز بین دو گونه از جنس *Myzus* قرار گرفت. نتیجه بلاست بارکد *cox*1 نیز برای گونه مذکور شباهت بالای این گونه را به جنس *Myzus* نشان داد. گونه *A. quaestionis* نیز بین دو گونه از *D. plantaginea* قرارگرفت.

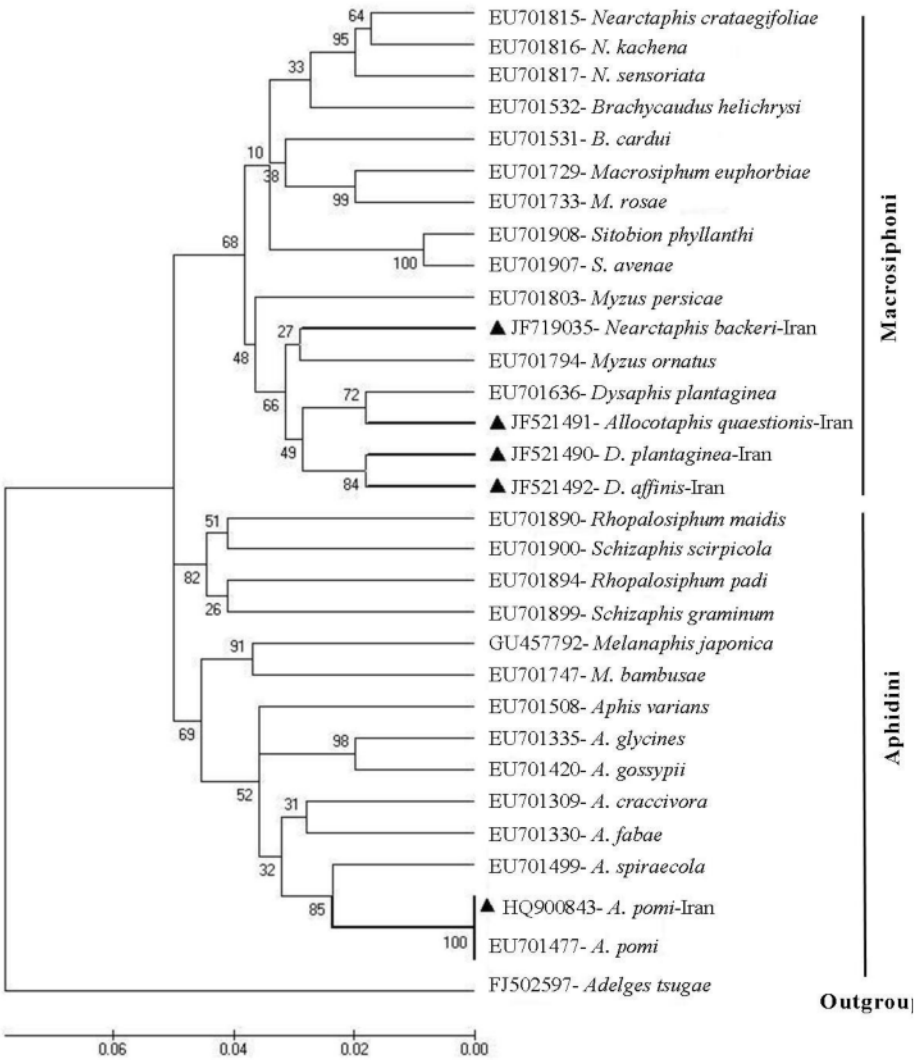
بحث

با توجه به جثه کوچک شته‌ها و دشواری در شناسایی آنها از طریق ویژگی‌های ظاهری، DNA بارکد می‌تواند به‌عنوان ابزاری کارآمد برای بررسی تنوع و تفکیک گونه‌ها استفاده شود. هم‌چنین این روش برای شناسایی شته‌ها در مراحل نابالغ بسیار مناسب می‌باشد. در روش‌های شناسایی سنتی، تشخیص این گروه از حشرات از روی شکل نابالغ آنها ممکن است مشکل باشد و این امر در مدیریت این آفات اختلال ایجاد می‌کند (Cocuzza *et al*., 2008). البته فراتر از شناسایی ساده، DNA بارکدینگ می‌تواند به عنوان راه‌کاری برای حل مشکلات تاکسونومیک مورد استفاده قرارگیرد. در خانواده Adelgidae، این روش توانست گونه‌ها را به‌خوبی شناسایی و بین شکل‌های ریخت‌شناسی مختلف یک گونه ارتباط برقرارکند. هم‌چنین فرم‌های مخفی موجود در شته چغندر (*Pemphigus betae*) از طریق آنالیز DNA بارکدینگ به خوبی آشکار گردید (Foottit & Maw, 2009). شناسایی دو گونه *Aphis frangulae* و *A. gossypii* به‌دلیل پنهان بودن ویژگی‌های ظاهری مفید مشکل بود، اما روش بارکدینگ، دو گونه مذکور را به راحتی از یکدیگر متمایز نمود (Cocuzza *et al*., 2008). نتایج این مطالعه نیز کارآیی بالای بارکدینگ را برای شناسایی گونه‌های Aphidinae تأیید کرد.

از نتایج این مطالعه این طور استنباط شد که گونه‌های مربوط به یک جنس که شباهت ظاهری زیادی به هم دارند در یک شاخه قرارگرفتند. هم‌چنین فاصله

نوکلئوتیدی بین گونه‌های یک قبیله به مراتب کمتر از این فاصله در گونه‌هایی بود که در دوقبیله مختلف قرار داشتند. علاوه بر این دو گونه *Aphis pomi* و *A. spiraecola* که از نظر ظاهری بسیار به هم شبیه هستند و اغلب در گذشته با هم اشتباه گرفته می‌شدند (Foottit *et al*., 2009) بر اساس ژن *cox*1 به خوبی از یکدیگر متمایز شدند و به عنوان گروه‌های خواهری در کنار یکدیگر قرارگرفتند. این نتایج حاکی از این است که روش شناسایی مولکولی می‌تواند به عنوان شیوه‌ای مکمل در کنار روش‌های سنتی مورد استفاده قرارگیرد.

البته این روش کاملاً بی‌نقص نیست و در مواردی دارای کاستی‌هایی می‌باشد. یکی از معایب این روش در مرحله ثبت یک بارکد جدید نمایان می‌شود، در این زمان سیستم بارکدینگ قادر نیست توالی مذکور را به عنوان یک گونه جدید معرفی کند پس توالی ناشناخته را به گونه‌ای که بیشترین شباهت را به آن دارد، نسبت می‌دهد. این نقیصه در این مطالعه به خوبی مشخص گردید چرا که بارکد *A. quaestionis* در سیستم بارکدینگ وجود نداشت و این سیستم توالی مذکور را به جنس *Myzus* نسبت داد. برای *D. affinis* نیز نتایج مشابه به‌دست آمد. با توجه به این که از گونه مذکور تا کنون بارکدی به ثبت نرسیده بود، سیستم بارکد، این گونه را *D. plantginea* تشخیص داد. این نتیجه ثابت کرد که بارکد *cox*1 در سطح جنس نیز قابل اطمینان است. به دلیل نبود بارکد DNA برای جنس *Nearctaphis*، نتیجه بلاست (nBlast)، توالی این گونه



شکل ۲- درخت تبارشناسی گونه‌های زیرخانواده Aphidinae با روش Neighbor joining و مدل K2P براساس بخشی از توالی ژن *cox*1

را به جنس *Myzus* نسبت داد. هرچند این ابزار به شناسایی نمونه‌های نزدیک به هم، گونه‌ها و جنس‌ها کمک می‌کند، اما قادر به‌تعیین روابط تبارشناسی تاکسون‌های بالاتر (از قبیل قبیله و زیرخانواده) به ویژه زمانی که تعداد نمونه‌های موجود، کم باشد، نیست. در آنالیز گونه‌های خانواده Aphididae با استفاده از نشانگر *cox*1، حدود پانزده درصد شته‌ها در زیرخانواده‌های اشتباه قرارگرفته و گونه‌های دو زیرخانواده Lachninae و Chaitophorinae نیز در یک گروه جای گرفتند (Foottit *et al*., 2008). به‌دلیل درجه بالای حفاظت ژن‌های rDNA ممکن است این نشانگرها برای مطالعه تاکسون‌های بالاتر شته‌ها مناسب‌تر باشند (Bulman *et al*., 2005).

توالی ژن میتوکندری *cox*1 قادر است گونه‌های مختلف زیرخانواده Aphidinae را از یکدیگر متمایز کند بنابراین در مواردی که تشخیص سریع ضروری است می‌توان از این شیوه با اطمینان استفاده کرد. اما این ژن به تنهایی نمی‌تواند روابط میان این گونه‌ها را در سطوح بالاتر به وضوح مشخص کند. در این موارد افزایش تعداد تاکسون‌ها و استفاده از نشانگری دیگر (مانند ژن‌های rDNA) در کنار این ژن می‌تواند مؤثر واقع شود.

سپاسگزاری

از مسئولین و کارکنان محترم پژوهشکده علوم گیاه دانشگاهی فردوسی مشهد به ویژه جناب آقای دکتر فارسی و خانم مهندس میرشاهی به خاطر همکاری در اجرای بخشی از این تحقیق و همچنین دکتر Karina Wieczorek در گروه جانورشناسی دانشگاه Silesia لهستان به خاطر کمک در تأیید هویت نمونه‌ها، و همچنین از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به جهت مساعدت در اجرای طرح پژوهشی به شماره ۱۴۴۰۷ تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Baumann, L., Baumann, P., Moran, N. A., Sandstrom, J. & Thao, M. L. (1999). Genetic characterization of plasmids containing genes encoding enzymes of leucine biosynthesis in endosymbionts (*Buchnera*) of aphids. *Journal of Molecular Evolution*, 48, 77-85.
2. Baumann, L. & Baumann, P. (2005). Complete mitochondrial genome of *Daktulosphaira vitifoliae*. Available on: www.ebi.ac.uk.
3. Blackman, R. L. & Eastop, V. F. (2000). *Aphids on the world's crops: an identification and information guide* (2th ed). John Wiley & Sons Publishing, Chichester, England. 466P.
4. Blackman, R. L. & Eastop, V. F. (2006). *Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs*, Host Lists and Keys? John Wiley & Sons Publishering. London. England, 1024 P.
5. Bulman, S. R., Stufkens, M. A. W., Eastop, V. F. & Teul, D. A. J. (2005). Rhopalosiphum aphids in New Zealand. II. DNA sequences reveal two incompletely described species. *The Royal Society of New Zealand*, 32, 37-45.
6. Cocuzza, G., Cavalieri, V. & Barbagallo, S. (2008). Preliminary results in the taxonomy of the cryptic group *Aphis frangulae*/*gossypii* obtained from mitochondrial DNA sequence. *Bulletin of Insectology*, 61(1), 125-126.
7. Folmer, O., Black M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Biology and Biotechnology*, 3, 294-297.
8. Foottit, R. G. (1997). Recognition of parthenogenetic insect species. In: M. F. Claridge, H. A. Dawah & M. R. Wilson (Eds.), *Species, the Units of Biodiversity*. (pp. 291-307). Chapman & Hall, London.
9. Foottit, R. G. & Maw, H. E. L. (2009). DNA barcodes to explore diversity in aphids (Hemiptera Aphididae and Adelgidae). *Redia*, 92, 87-91.
10. Foottit, R. G., Maw, H . E. L., von Dohlen, C. D. & Herbert, P. D. N. (2008). Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 8, 1189-1201.
11. Foottit, R. G., Lowery, D. T., Maw, H. E. L., Smirle, M. J. & Lushai, G. (2009). Identification, distribution, and molecular characterization of the apple aphids *Aphis pomi* and *Aphis spiraecola* (Hemiptera: Aphididae: Aphidinae). *Canadian Entomologist*, 141, 478-495.
12. Hajibabaei, M., Janzen, D. H., Burns, J. M., Hallwachs, W. & Hebert, P. D. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 968-971.
13. Hall, T. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for

Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98.
14. Hebert, P. D., Cywinska, A., Ballm, S. L. & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. In: Proceedings of *the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313-321.
15. Heie, O. E. (1987). Palaeontology and phylogeny. In: A. K. Minks & A. K. Harrewijn (Eds.), *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control.* (pp. 367–391). Elsevier, Amsterdam.
16. Inbar, M., Wink, M. & Wool, D. (2004). The evolution of host plant manipulation by insects: molecular and ecological evidence from gall-forming aphids on pistachia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 504-511.
17. Kim, H., Hoelmer, K. A., Lee, W., Kwon, Y. D. & Lee, S. (2010). Molecular and morphological identification of the soybean aphid and other Aphis species on the primary Host *Rhamnus davurica* in Asia. *Annals of the Entomological Society of America*, 103(4), 532-543.
18. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
19. Lee, W., Kim, H., Lim, J., Choi, H. R., Kim, Y., Kim, Y., Ji, J. Y., Foottit, R. G. & Lee, S. (2011). Barcoding aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Korean Peninsula: updating the global data set. *Molecular Ecology Resources*, 11, 32-37.
20. Lobl, I. & Leschen, R. A. B. (2005). Demography of Coleopterists and Their Thoughts on DNA Barcoding and the Phylocode, with Commentary. *The Coleopterists Bulletin*, 59, 284-292.
21. Martínez-Torres, D., Buades, C., Latorre, A. & Moya, A. (2001). Molecular systematics of aphids and their primary endosymbionts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20, 437-449.
22. Messing, R. H., Tremble, M. N., Mondor, E. B., Foottit, R. G. & Pikek, S. (2007). Invasive aphids attack native Hawaiian plants. *Biological Invasions*, 9, 601-607.
23. Miller, G. L. & Foottit, R. G. (2009). The taxonomy of crop pests: the aphids. In: R.G. Foottit & P. H. Adler (Eds.). *Insect Biodiversity: Science and Society.* (pp. 463-473).Wiley-Blackwell, Oxford.
24. Moran, N. A., Kaplan, M. E., Gelsey, M. J., Murphy, T. G. & Scholes, E. A. (1999). Phylogenetics and evolution of the aphid genus *Uroleucon* based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Systematic Entomology*, 24, 85-93.
25. Normark, B. B. (2000). Molecular systematics and evolution of the aphid family Lachnidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14, 131-140.
26. Ortiz-Rivas, B., Moya, A. & Martinez-Torres, D. (2004). Molecular systematics of aphids (Homoptera: Aphididae): new insights from the long-wavelength opsin gene. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 30, 24-37.
27. Remaudier, G. & Remaudier, M. (1997). *Catalogue des Aphididae dumonde / Catalogue of the World's Aphididae. Homoptera Aphidoidea*. INRA Editions, Versailles, France, 473 P.
28. Scheffer, S. J., Lewis, M. L. & Joshi, R. C. (2006). DNA Barcoding Applied to Invasive Leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. *Annals of the Entomological Society of America*, 99, 204-210.
29. Smith, M. A., Rodriguez, J. & Whitfield, J. B. (2008). Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology and collections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 12359-12364.
30. Stern, D. L., Aoki, S. & Kurosu, U. (1997). Determining aphid taxonomic affinities and life cycles with molecular data: a case study of the tribe Cerataphidini (Hormaphididae: Aphidoidea: Hemiptera). *Systematic Entomology*, 22, 81-96.
31. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
32. van Ham, R. C., Martinez-Torres, D., Moya, A. & Latorre, A. (1999). Plasmid-encoded anthranilate synthase (TrpEG) in *Buchnera aphidicola* from aphids of the family Pemphigidae. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 117-125.
33. van Ham, R. C., Gonzalez-Candelas, F., Silva, F. J., Sabater, B., Moya, A. & Latorre, A. (2000). Postsymbiotic plasmid acquisition and evolution of the repA1-replicon in *Buchnera aphidicola*. In: Proceedings of the *National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10855-10860.
34. von Dohlen, C. D. & Moran, N. A. (2000). Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71, 689-717.
35. von Dohlen, C. D., Kurosu, U. & Aoki, S. (2002). Phylogenetics and evolution of the eastern Asian-eastern North American disjunct aphid tribe, Hormaphidini (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23, 257-267.
36. von Dohlen, C. D., Rowe, C. A. & Heie, O. E. (2006). A test of morphological hypotheses for tribal and

subtribal relationships of Aphidinae (Insecta: Hemiptera: Aphididae) using DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38, 316-329.