

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف کرم گلوگاه انار (*Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) با استفاده از DNA میتوکندریایینمانه ملک شاهکونی^۱، جاماسب نوذری^{۲*}، وحید حسینی‌نوه^۳ و سید حسین گلدانسانز^۴۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی دکتری، استادیار، استاد و دانشیار، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع دانشگاه تهران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲)**چکیده**

کرم گلوگاه انار، *Ectomyelois ceratoniae* مهم‌ترین آفت انار در ایران و از مؤثرترین عامل‌های تهدیدکننده صادرات این محصول محسوب می‌شود ولی پژوهش‌های کمی روی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های آن در کشور انجام شده است. از این روی به منظور افزایش آگاهی از ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این آفت، انارهای آلوده رقم‌های مختلف از دوازده استان کشور طی سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ جمع‌آوری و با استفاده از بخشی از ژن DNA میتوکندریایی، سیتوکروم اکسیداز I (COI) مؤلفه‌های تنوع ژنتیکی بررسی شد. همچنین شبکه هاپلوتیپی و درخت تبارزایی با روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum Likelihood) ترسیم شد. در این پژوهش، تعداد شش هاپلوتیپ به دست آمد. هاپلوتیپ یک که در بین تمام جمعیت‌ها مشترک بود، می‌تواند به عنوان هاپلوتیپ اجدادی معرفی شود که سایر هاپلوتیپ‌ها از آن تکامل یافته‌اند. این هاپلوتیپ با یک جهش به سایر هاپلوتیپ‌ها متصل و شکل ستاره‌ای را در شبکه هاپلوتیپی تشکیل داده است. نتیجه‌های گروه‌بندی جمعیت‌های جغرافیایی نشان می‌دهند ناحیه مرکزی کشور، تنوع هاپلوتیپی کمتری نسبت به ناحیه‌های شمال و جنوب ایران دارد. تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالا (۹۹/۱۵ درصد) در مقابل تنوع کم ژنتیکی بین جمعیت‌ها ($P > 0.05$; $P = 0.02$ - درصد) حاصل از آزمون AMOVA و سطح بالای اشتراک هاپلوتیپی در شبکه، نشان می‌دهد که ساختار ژنتیکی مشخصی بین جمعیت‌ها وجود ندارد. در آزمون متل ارتباطی بین فاصله ژنتیکی و جغرافیایی و در آزمون متل جزئی اثر معنی‌دار رقم بر بروز اختلاف‌های ژنتیکی به دست نیامد. چنین ساختار ژنتیکی می‌تواند حاصل سازگاری انار با خرداقلیم‌های مختلف، کشت رقم‌های متداول تجاری و برقراری اکوسیستم زراعی یکنواخت و انتقال محصول توسط انسان باشد که منجر به برقراری جریان ژنی زیاد و کاهش اختلاف‌های ژنتیکی حتی در فاصله‌های جغرافیایی گسترده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: جمعیت، سیتوکروم اکسیداز I، هاپلوتیپ.

Genetic diversity of different populations of the pomegranate fruit moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) using the mitochondrial DNASamaneh Malek-Shahkouyi¹, Jamasb Nozari^{2*}, Vahid Hosseini-Naveh³ and Seyed Hossein Goldansaz⁴

1, 2, 3, 4. Ph. D. Candidate, Assistant Professor, Professor and Associate Professor, Plant Protection Department, College of Agriculture and Natural Resources University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Jun. 22, 2018 - Accepted: Oct. 24, 2018)

ABSTRACT

Carob moth, *Ectomyelois ceratoniae*, is the most important pest of pomegranate in Iran and is one of the most effective threats to the export of this product, but only a few studies have been done on the diversity and genetic structure of its populations. Therefore, in order to increase knowledge about the structure and genetic diversity of this pest populations, infested pomegranates were collected from 12 provinces of the country during 2016 and 2017 and genetic diversity components were investigated using a part of the mitochondrial DNA gene, cytochrome oxidase I (COI). Also, the haplotypic network and the phylogenetic tree was drawn using the maximum likelihood method. In the present study, six haplotypes were obtained. The first haplotype (H1) was common in all populations, which can be considered as the ancestral haplotype so that other haplotypes have been evolved from it. This haplotype is connected to other haplotypes with a mutation and forms a star-like shape in the haplotypic network. Results of the grouping populations indicate that the northern part of Iran has the most diversity of haplotypes in comparison to the central and southern parts, which can be related to native cultivars, genetic diversity of cultivars, and natural habitat of Pomegranates in this area. The adaptation of pomegranates to different micro-climates, development of commercial cultivation of traditional varieties, and the role of the human in product transformation lead to high gene flow and genetic differences reduction even at wide geographical distances.

Keywords: Cytochrome oxidase I, Haplotype, Population.

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

مقدمه

اهمیت اقتصادی-اجتماعی انار در کشورمان، پژوهشگران بسیاری را به پژوهش جنبه‌های مختلف زیست‌شناسی و اکولوژی آفت کرم گلوگاه سوق داده است ولی پژوهش‌های اندکی پیرامون تنوع ژنتیکی جمعیت‌های آن انجام گرفته است. Mozaffarian *et al.* (2007) به بررسی ساختار ژنتیکی پنج جمعیت جغرافیایی *E. ceratoniae* روی انار و هشت جمعیت روی چهار میزبان گردو، انار، انجیر و پسته با استفاده از شش جفت پرایمر AFLP پرداختند و اختلاف ژنتیکی معنی‌داری را بین جمعیت‌های جغرافیایی دریافتند، این در حالی است که تنوع درون جمعیتی بالا (۸۵/۵ درصد از کل تغییرها) را بدون ارتباط معنی‌دار بین فاصله‌های جغرافیایی و ژنتیکی جمعیت‌ها به دست آوردند. موانع جغرافیایی همواره به‌عنوان یکی از عامل‌ها کاهنده جریان ژنی بین جمعیت‌های جغرافیایی به‌شمار می‌روند (Mayr & Aschlock, 1991). در مقابل، برخی عامل‌ها نظیر مهاجرت و عامل‌های انسانی، موجب برقراری جریان ژنی شده و نقش مهمی در تغییرهای ژنتیکی و تکامل جمعیت‌ها ایفا می‌کنند (Goodisman *et al.*, 2001; Kremer *et al.*, 2012). با توجه به زیست‌شناسی مخفی این گونه در انار، راهبردهای مدیریت تلفیقی می‌بایست سرلوحه کنترل آفت قرار گیرد. از آن جمله کاربرد ترکیب‌های زیستی و فرمونی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، ولی پیشرفت ردیابی فرمونی و روش‌های کنترل، نیازمند شناسایی دقیق گونه و ساختار جمعیت‌های آن است (Roe & Sperling, 2007). بررسی ژنتیک جمعیت می‌تواند با استفاده از نشانگرهای مختلف مولکولی انجام شود. تاکنون، هیچ نوع نشانگر مولکولی به‌عنوان بهترین شناخته نشده است و برخی ژن‌ها در برخی پژوهش‌ها بهتر عمل می‌کنند (Brower & DeSalle, 1994). ژن‌های DNA میتوکندریایی (mtDNA) برای پاسخ به بسیاری از پرسش‌های مطرح‌شده در سطح گونه و درون گونه به کار می‌روند زیرا به‌سرعت تکامل می‌یابند، از مادر به ارث می‌رسند، جهش‌ها به‌سرعت انباشته می‌شوند و در اثر نوترکیبی نابود نمی‌شوند (Avise *et al.*, 1987; Sperling, 1993; Brower, 1994). هدف از این پژوهش بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کرم گلوگاه انار با در نظر گرفتن رقم‌های مختلف انار است؛ بنابراین

انار یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های شناخته‌شده است که سازش آن با طیف وسیعی از شرایط آب و هوایی، توسعه کشت آن را در نقاط جغرافیایی مختلف فراهم آورده است. تاریخچه کشت انار در ایران به بیش از ۵۰۰۰ سال پیش می‌رسد و برخی پژوهشگران، ایران و ناحیه‌های اطراف آن را بوم اصلی انار می‌دانند (Goor & Libermann, 1956; Glozer & Ferguson, 2011). امروزه، ایران با ۸/۸۹۶۶ هکتار انار، به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین کشورهای تولید و صادرکننده و یکی از پربرترین ذخایر ژنوتیپی رقم‌های انار دنیا محسوب می‌شود (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۵؛ Talebi baddaf *et al.*, 2007; Zamani *et al.*, 2003).

کرم گلوگاه انار *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) (Zeller) مهم‌ترین آفت انار در ایران است که می‌تواند سالیانه تا ۸۰ درصد محصول را از بین ببرد (Kashkuli & Eghtedar, 1975; Shakeri, 2004; Hoseini *et al.*, 2014). گستره بوم این آفت ناحیه‌های مدیترانه‌ای است (Heinrich, 1956) و از آنجا به سایر ناحیه‌های دنیا گسترش یافته است، به‌طوری‌که امروزه از بسیاری از کشورها گزارش می‌شود (Al-Maliky & Al-Izzi, 1986; Yoshiyasu & Kitatsuji 2008; Goldansaz *et al.*, 2012; Morland, 2015).

جمعیت حشرات، تنوع و ساختار ژنتیکی آن‌ها تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی نظیر محدوده گستره مبدأ در مقابل نواحی ورود و پراکنش آفت، فاصله‌های جغرافیایی و گونه گیاه میزبان قرار می‌گیرد (Miller *et al.*, 2003; Sword *et al.*, 2005; Kirk *et al.*, 2013). عموماً حشرات، در محدوده بوم خود تنوع ژنتیکی بالاتری نسبت به ناحیه‌هایی که به‌تدریج مورد تهاجم قرار می‌گیرند، نشان می‌دهند (Puillandre *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2012). بررسی ساختار و تنوع ژنتیک جمعیت، سطح آسیب‌پذیری آن را نسبت به تغییرهای محیطی تعیین می‌کند، تکامل خرد و راهبرد سازگاری اکولوژیکی را توضیح داده و منابعی را برای طراحی و بهینه‌سازی مدیریت آفت‌ها فراهم می‌آورد (Timm *et al.*, 2008; Torriani *et al.*, 2010; Kirk *et al.*, 2013).

مرتباً روی دستگاه ورتکس، سروته شدند. از مخلوط فنل:کلروفرم:ایزوامیل الکل به نسبت حجمی ۱:۲۴:۲۵ جهت استخراج DNA و از ایزوپروپانول سرد، برای رسوب کلاف DNA استفاده شد. ته‌نشین‌های DNA با اتانول ۷۰ درصد شسته شدند و در نهایت در ۵۰ میکرولیتر بافر 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 1 mM EDTA,) TE (pH 8.0 حل شدند و تا زمان استفاده، در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA، از روش اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. برای تکثیر DNA ژنومی، از پرایمر عمومی Folmer *et al.* (1994) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۰/۲ واحد آنزیم Taq (Amplicon, Denmark)، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۲۰۰ نانومولار dNTPs، ۰/۳ میکرومولار هرکدام از پرایمرها در دستگاه ترموسایکلر (Labnet MultiGene™ OptiMax, USA) انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه مرحله اتصال در دمای ۵۴ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه مرحله بسط آنزیمی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. جهت اتمام همانندسازی قطعه‌های تولیدشده مرحله بسط پایانی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR پس از خالص‌سازی (GeneAll Combo Kit, South Korea) به روش سنگر دوطرفه (ABI3730xl, USA) توسط شرکت ماکروژن توالی‌یابی شدند.

در این پژوهش ترکیب ژنتیکی جمعیت(های) کرم گلوگاه انار استان‌های مختلف کشور بر اساس ترکیب نوکلئوتیدی ژن COI ارزیابی شد و جریان ژنی، اختلاف ژنتیکی مبتنی بر فاصله جغرافیایی و نوع رقم انار و در نهایت درخت تبارزایی و شبکه هاپلوتیپی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش که در طول سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ انجام شد، انارهای آلوده به لاروهای آفت از ۱۲ استان کشور (جدول ۱) جمع‌آوری و در آزمایشگاه روی میزبان طبیعی با حفظ نوع رقم، پرورش داده شدند. پس از خروج حشرات بالغ، شناسایی با استفاده از منابع معتبر و بررسی ژنیتالیا (Ren & Yang, 2016) انجام شد و بلافاصله تعداد سه عدد شب‌پره از هر جمعیت، به‌طور تصادفی انتخاب و درون الکل ۹۶ درصد قرار داده شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

استخراج DNA از ۳۶ حشره کامل به روش Zimmermann *et al.* (2000) مبتنی بر روش فنل-کلروفرم با اندکی تغییر به شرح زیر انجام شد: هر یک از شب‌پره‌ها به‌طور تکی درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفت. مقدار ۲۵۰ میکرولیتر بافر استخراج STE buffer (pH 8.0, 50 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, 0.1% SDS)، ده میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K و ۵۰ میکرولیتر سدیم دودیسل سولفات (10% SDS) به هر نمونه اضافه شد و سپس نمونه‌ها در حمام آب‌گرم ۶۰ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت قرار داده شد. در طی این مدت نمونه‌ها

جدول ۱. داده‌های مربوط به جمع‌آوری نمونه‌های *Ectomyelois ceratoniae* ایران

Table 1. Collection data for *Ectomyelois ceratoniae* samples of Iran

Locality	Date	Code	Geographical coordinates	N*	Pomegranate variety	Group
Yazd	2016.6.30	YZ	31°55'09.8"N 54°16'40.8"E	3	Malas yazdi	Center
Golestan	2016.8.1	GL	36°50'32.4"N 54°27'25.6"E	3	Domestic	North
Semnan	2016.8.25	SE	35°38'36.9"N 53°20'22.2"E	3	Malas post nazok yazdi	North
Sistan v Balochestan	2016.9.8	SB	29°00'29.3"N 61°26'51.3"E	3	Meikhosh sangani	South
Markazi	2016.9.27	MZ	35°01'44.4"N 50°20'39.0"E	3	Malas saveh	Center
Kerman	2016.10.19	KA	30°34'18.7"N 56°55'59.0"E	3	Aghdaii & Kabvati	South
Khorasan Razavi	2016.7.21	KH	35°00'33.1"N 58°46'11.8"E	3	Mixed	North
Esfahan	2016.8.5	ES	32°36'10.5"N 51°19'25.7"E	3	Red skin Najaf-Abad	Center
Ghazvin	2016.8.31	GH	36°26'23.2"N 49°10'37.3"E	3	Mixed	North
Mazandaran	2016.9.13	MA	36°43'57.6"N 53°23'59.5"E	3	Domestic	North
Fars	2016.10.10	FA	29°55'26.7"N 53°18'06.3"E	3	Rabab neyriz	South
Lorestan	2016.11.10	LO	33°30'29.3"N 47°36'14.8"E	3	Mixed	Center

N*: Number of samples used in tests.

BLAST شدند و مشابهت بسیار زیادی (۹۶-۱۰۰ درصد) با جمعیت‌های گزارش‌شده از سایر نقطه‌های دنیا مشاهده شد.

میانگین ترکیب نوکلئوتیدی ۶۶۷ جفت باز از توالی‌های ناحیه COI بازهای تیمین، سیتوزین، آدنین و گوانین به ترتیب ۴۰/۵، ۱۵/۳، ۲۹/۴ و ۱۴/۹ درصد به دست آمد. در این توالی‌ها، ۶۶۲ جایگاه ثابت (monomorphic) و پنج جایگاه متغیر (polymorphic)، سه جایگاه سینگل‌تون (singleton) (موقعیت‌های ۱۷۲، ۴۶۲ و ۵۱۴) و دو جایگاه اطلاعاتی، پارسیمونی (موقعیت‌های ۲۸ و ۲۳۵) بود. جایگزینی نوکلئوتیدها G/A، C/T، A/G، T/C بوده است. تعداد شش هاپلوتیپ در بین تمام جمعیت‌های مورد بررسی، به دست آمد (جدول ۲). در بین آن‌ها هاپلوتیپ شماره یک (H1) در تمامی جمعیت‌ها مشاهده شد. هاپلوتیپ شماره ۲ (H2) بین سه جمعیت مازندران، خراسان و سیستان و بلوچستان و هاپلوتیپ شماره ۳ (H3) بین دو جمعیت استان‌های مرکزی و خراسان رضوی مشترک بود. هاپلوتیپ چهارم (H4)، پنجم (H5) و ششم (H6) به ترتیب فقط در یک جمعیت (استان‌های گلستان، مازندران و فارس) مشاهده شدند. تعداد هاپلوتیپ‌ها در هر گروه، از دو تا پنج عدد متغیر بود. داده‌های حاصل از خوشه‌بندی جمعیت‌های *E. ceratoniae* در سه گروه شمال، جنوب و مرکز کشور نشان می‌دهند ناحیه مرکزی، کمترین تنوع هاپلوتیپی (۰/۱۶۷) را نسبت به ناحیه شمال (۰/۵۶۲) و جنوب (۰/۴۱۷) کشور دارد. کمترین مقدار تفاوت نوکلئوتیدی در گروه مرکزی (۰/۱۶۷) و بیشترین مقدار در گروه شمالی (۰/۶۴۸) مشاهده شد (جدول ۳). تنوع هاپلوتیپی، تعداد تفاوت نوکلئوتیدی و تنوع نوکلئوتیدی در تمام جمعیت‌ها به ترتیب ۰/۳۹۴، ۰/۴۳۲، ۰/۰۰۰۶۵ بودند که نشان می‌دهد بین جمعیت‌ها تنوع ژنتیکی اندکی وجود دارد (جدول ۴). در این پژوهش، افزون بر فاصله‌های جغرافیایی، رقم‌های انار نیز لحاظ شدند. رقم‌های انار در استان‌های گلستان و مازندران جز رقم‌های بومی بوده ولی رقم‌های سایر استان‌ها جز رقم‌های تجاری انار هستند.

توالی‌های ۶۶۷ جفت باز بخشی از ناحیه سیتوکروم اکسیداز (COI) ژنوم میتوکندریایی متعلق به ۳۶ نمونه از ۱۲ جمعیت کرم گلوگاه انار، ابتدا توسط برنامه BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1999) به صورت چشمی ویرایش شدند و هم‌ردیف‌سازی با استفاده از برنامه ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) انجام شد. توالی‌ها در بانک ژن ثبت شدند و در سایت NCBI جهت مقایسه و تأیید شناسایی گونه BLAST شدند. تعداد هاپلوتیپ‌ها (H)، تنوع نوکلئوتیدی (π)، تفاوت نوکلئوتیدی (K) و آزمون بی‌طرفی Tajima's D Neutrality test با استفاده از نرم‌افزار DNAsp Ver. 5 (Librado & Rozas, 2009) محاسبه شد. میزان جایگزینی نوکلئوتیدی و فراوانی هر یک و فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها توسط نرم‌افزار MEGA version 6 (Tamura *et al.*, 2011) استفاده از روش Kimura 2-parameter و مدل تکاملی گاما محاسبه شد. رابطه بین فاصله‌های ژنتیکی (Fst) و جغرافیایی (km) با آزمون منتل و رابطه بین فاصله‌های ژنتیکی (Fst) و نوع رقم (var.) با آزمون منتل جزئی با ۹۹۹ تکرار در نرم‌افزار R آزمون شد. فاصله‌های جغرافیایی با برنامه Google Maps Distance Calculator (<http://www.daftlogic.com/projects-google-mapsdistance-calculator.htm>) محاسبه شد. درخت فیلوژنی با استفاده از روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum likelihood) و بوتسترپ (Bootstrap) ۱۰۰۰ در برنامه MEGA به دست آمد. آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) پس از گروه‌بندی جمعیت‌ها در نرم‌افزار DNAsp، با استفاده از نرم‌افزار Arlequin version 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) انجام شد. شبکه هاپلوتیپی بین جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار PopART ver. 1.7.2 (Leit & Bryant, 2015) ترسیم شد.

نتایج

توالی‌های حاصل از DNA ۳۶ فرد از دوازده جمعیت کرم گلوگاه انار در بانک ژن ثبت شدند (GenBank Accession numbers: MG489932- MG489943) و در سایت NCBI جهت مقایسه و تأیید شناسایی گونه

جدول ۲. پراکنش هاپلوتیپ‌های جمعیت‌های مختلف *Ectomyelois ceratoniae* در ایران

Table 2. Distribution of haplotypes of different populations of *Ectomyelois ceratoniae* in Iran

Haplotype	Populations													Total
	MA	GL	KH	MZ	FA	SB	GA	SE	LO	KA	YZ	ES		
H														
H1	1	2	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	
H2	1		1			1								
H3			1	1										
H4		1												
H5	1													
H6					1									
Total	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36	

* اطلاعات مربوط به کد جمعیت‌ها، در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

جدول ۳. پارامترهای تنوع ژنتیکی گروه‌بندی جمعیت‌های *Ectomyelois ceratoniae* در ایران

Table 3. Genetic diversity parameters for the grouping of *Ectomyelois ceratoniae* populations in Iran

Geographical grouping	N	H	Code	Hd	K	P _i
North	15	5	GL, MA, KH, GA, SE	0.562	0.648	0.00097
Center	12	2	ES, YZ, MZ, LO	0.167	0.167	0.00025
South	9	3	SB, KA, FA	0.417	0.444	0.00067
Total	36	6		0.394	0.432	0.00065

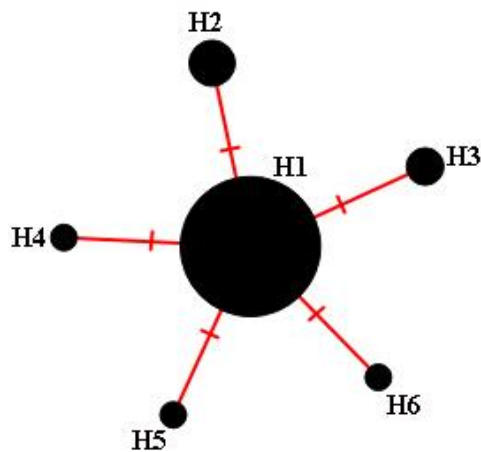
*N: تعداد افراد در هر گروه، H: تعداد هاپلوتیپ، Hd: تنوع هاپلوتیپی، Code: کد شناسایی جمعیت، * متوسط تعداد تفاوت نوکلئوتیدی، Pi: تنوع نوکلئوتیدی.
* اطلاعات مربوط به کد جمعیت‌ها، در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

جدول ۴. پارامترهای تنوع ژنتیکی ژن میتوکندریایی COI برای هر یک از جمعیت‌های *Ectomyelois ceratoniae*

Table 4. Genetic diversity indices of the mitochondrial gene of COI for each *Ectomyelois ceratoniae* population

Location	Population	P _i	K	Hd	H	S	N
North	GL	0.001	0.667	0.667	2	1	3
North	MA	0.00203	1.333	1	3	2	3
North	KH	0.00203	1.333	1	3	2	3
North	GA= SE	0.00	0.00	0.00	1	0	3
Center	MZ	0.001	0.667	0.667	1	1	3
Center	ES= YZ= LO	0.00	0.00	0.00	1	0	3
South	SB	0.001	0.667	0.667	2	1	3
South	FA	0.001	0.667	0.667	2	1	3
South	KA	0.00	0.00	0.00	1	0	3

*N: تعداد افراد در هر گروه، H: تعداد هاپلوتیپ، Hd: تنوع هاپلوتیپی، Code: کد شناسایی جمعیت، * متوسط تعداد تفاوت نوکلئوتیدی، Pi: تنوع نوکلئوتیدی.
* اطلاعات مربوط به کد جمعیت‌ها، در جدول ۱ ذکر شده‌اند.



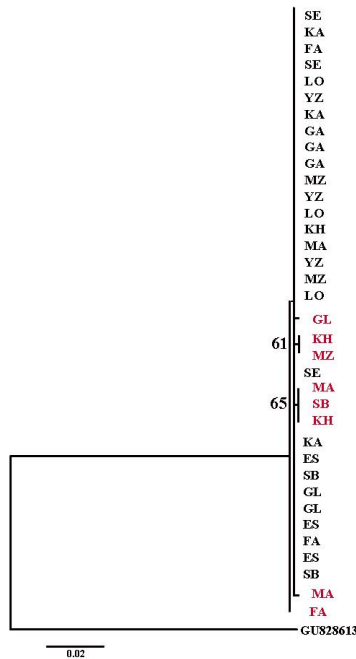
شکل ۱. شبکه هاپلوتیپی جمعیت‌های *Ectomyelois*

ceratoniae در ایران. هر دایره معرف یک هاپلوتیپ و اندازه دایره متناسب با فراوانی جمعیت‌ها در هر هاپلوتیپ است.

Figure 1. Haplotypic network of *Ectomyelois ceratoniae* populations in Iran. Each circle represents a haplotype, and the circle's size is proportional to the populations' frequency in each haplotype.

شبکه هاپلوتیپی با استفاده از نرم‌افزار popART به دست آمد (شکل ۱). شبکه حاضر نشان می‌دهد هاپلوتیپ شماره ۱ که از همه بزرگ‌تر است و شامل همه جمعیت‌های مورد بررسی است، به نظر می‌رسد قدیمی‌ترین هاپلوتیپ و یا هاپلوتیپ بومی باشد. از تجزیه و تحلیل ۳۶ توالی از جمعیت‌های *E. ceratoniae* در ایران، تعداد پنج جهش مشاهده شد.

این هاپلوتیپ، با یک جهش به پنج هاپلوتیپ دیگر متصل شده است و شکل ستاره‌ای را تشکیل داده است. هاپلوتیپ‌هایی که فراوانی کمتری دارند، تعداد جمعیت کمتری را شامل می‌شوند، اندازه کوچک‌تری دارند و بسته به تعداد جهش، با فاصله بیشتری به هاپلوتیپ مرکزی متصل می‌شوند. پژوهش روابط فیلوژنی نشان می‌دهد بیشتر جمعیت‌ها بسیار به هم نزدیک هستند و شش هاپلوتیپ به دست آمده نیز روی درخت تبارزایی متمایز شدند (شکل ۲).



شکل ۲. درخت تبارزایی به روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum Likelihood) بر اساس توالی جمعیت‌های

Ectomyelois ceratoniae در ایران. گونه *Anagasta kuehniella* (GU828613) به‌عنوان اوت‌گروپ (out group) انتخاب و سطح‌های اطمینان با بوتسترپ ۱۰۰۰ محاسبه شده است.

Figure 2. Phylogenetic tree with Maximum likelihood method based on sequences of *Ectomyelois ceratoniae* populations in Iran. *Anagasta kuehniella* (GU828613) was selected as the outgroup, and the confidence level was calculated with the 1000 replicates of the bootstrap test.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد تغییرهای ژنتیکی درون جمعیت‌ها (۹۹/۱۵ درصد) بیشتر از بین گروه‌ها ($P > 0.05$, ۲/۹۸ درصد) و جمعیت‌ها ($P > 0.05$, ۲/۱۳ درصد) است (جدول ۵). شاخص ثبات کلی برای تمام جمعیت‌ها معنی‌دار نبود ($F_{st} = 0.00855$, $P > 0.05$). بر اساس تجزیه جفتی گروه جمعیت‌ها، بیشترین مقدار F_{st} (۰/۴۵۲-) بین گروه جمعیت‌های شمال و جنوب و کمترین مقدار F_{st} بین گروه جمعیت‌های جنوب و مرکز به دست آمد. همچنین بیشترین مقدار F_{st} (۰/۲۸۵۸-) بین جفت جمعیت‌های سیستان و بلوچستان و مازندران مشاهده شد. طبق نتیجه‌های فاصله ژنتیکی بین جفت جمعیت‌ها در برنامه MEGA بیشترین فاصله‌های ژنتیکی بین جمعیت‌های خراسان رضوی، سیستان و بلوچستان، فارس، مازندران و گلستان مشاهده شد (جدول ۶). تست منتل وجود رابطه بین فاصله‌های ژنتیکی و جغرافیایی را رد کرد ($r = 0.08258$, $p = 0.196$). در آزمون منتل جزئی نیز اثر معنی‌دار رقم در بروز اختلاف ژنتیکی به دست نیامد ($r = -0.2647$, $p = 0.985$). جریان ژنی بین همه جمعیت‌های مورد بررسی، $Nm = 21$ و $G_{st} = 0.01176$ (Nei, 1973) مقدار حاصل از آزمون بی‌طرفی (Tajima's $D = -1.67407$) به دست آمد.

جدول ۵. تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های *Ectomyelois ceratoniae* در ایران

Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) of *Ectomyelois ceratoniae* populations in Iran

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Fixation index F_{st}
Among groups	1	0.264	0.00651 Va	2.98	0.00855
Among populations	1	0.164	-0.00464 Vb	-2.13	
Within populations	33	7.141	0.21640 Vc	99.15	
Total	35	7.569	0.21826		

جدول ۶. فاصله‌های ژنتیکی بین جمعیت‌های *Ectomyelois ceratoniae* در ایران

Table 6. Genetic distances between *Ectomyelois ceratoniae* populations in Iran

	ES	GL	SB	MA	FA	KA	LO	MZ	YZ	GH	KH	SE
ES	0.0005	0.0005	0.0007	0.0005	0.0000	0.0000	0.0005	0.0000	0.0000	0.0007	0.0000	0.0000
GL	0.0005	0.0006	0.0008	0.0007	0.0005	0.0005	0.0007	0.0005	0.0005	0.0008	0.0005	0.0005
SB	0.0005	0.0010	0.0008	0.0009	0.0007	0.0007	0.0007	0.0008	0.0007	0.0009	0.0009	0.0007
MA	0.0010	0.0015	0.0012	0.0009	0.0007	0.0007	0.0008	0.0007	0.0007	0.0009	0.0009	0.0007
FA	0.0005	0.0010	0.0010	0.0009	0.0005	0.0005	0.0007	0.0005	0.0005	0.0009	0.0009	0.0005
KA	0.0000	0.0005	0.0005	0.0010	0.0005	0.0000	0.0005	0.0000	0.0000	0.0007	0.0007	0.0000
LO	0.0000	0.0005	0.0005	0.0010	0.0005	0.0000	0.0005	0.0000	0.0000	0.0007	0.0007	0.0000
MZ	0.0005	0.0010	0.0010	0.0015	0.0010	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0008	0.0008	0.0005
YZ	0.0000	0.0005	0.0005	0.0010	0.0005	0.0000	0.0000	0.0005	0.0000	0.0007	0.0007	0.0000
GH	0.0000	0.0005	0.0005	0.0010	0.0005	0.0000	0.0000	0.0005	0.0000	0.0007	0.0007	0.0000
KH	0.0010	0.0015	0.0012	0.0017	0.0015	0.0010	0.0012	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0007
SE	0.0000	0.0005	0.0005	0.0010	0.0005	0.0000	0.0005	0.0000	0.0000	0.0010	0.0010	0.0010

اعداد پایین مورب، فاصله‌های ژنتیکی و مقدارهای بالای مورب، انحراف معیار را نشان می‌دهند.

بحث

در ایران نیز تنوع درون جمعیتی بالایی (۸۵/۵۱ درصد) در مقابل میانگین نرخ مهاجرت (M) ۲/۷۴۶۵ گزارش نمودند و رابطه‌ای بین فاصله‌های ژنتیکی و جغرافیایی نیافتند. در این پژوهش نیز علیرغم نرخ متفاوت تکامل نشان‌گرهای مورداستفاده، تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالا و عدم ارتباط بین فاصله‌های جغرافیایی و ژنتیکی به دست آمد. در پژوهش Mozaffarian *et al.* (2007)، طی تجزیه خوشه‌ای UPGMA، جمعیت ارسنجان (فارس) با فاصله ژنتیکی بیشتری نسبت به سایر جمعیت‌ها و جمعیت سبزوار (خراسان) و ساوه (مرکزی) با مشابهت ژنتیکی بسیار در یک خوشه قرار گرفتند. در شبکه هاپلوتیپی حاصل از این پژوهش نیز، جمعیت خراسان (فیض‌آباد) و مرکزی (ساوه) هاپلوتیپ شماره ۳ و جمعیت فارس (ارسنجان) به تنهایی یک هاپلوتیپ و در درخت تبارزایی، این هاپلوتیپ‌ها، کلادهای مجزایی را تشکیل دادند (شکل ۲). Mozaffarian *et al.* (2007) فاصله ژنتیکی بیشتر ارسنجان و درعین حال فاصله کم جغرافیایی آن با سایر جمعیت‌ها و عدم رابطه بین فاصله‌های ژنتیکی و فاصله‌های جغرافیایی را تحت تأثیر عامل‌های دیگری غیر از عامل جغرافیا برشمردند. Ziaaddini *et al.* (2011) با بررسی رفتار فراخوانی بین جمعیت‌های جغرافیایی (ارسنجان، ساوه و کرمان، تفاوت معنی‌داری را بین تعداد دوره‌های فراخوانی جمعیت ارسنجان با دو جمعیت دیگر یافتند و باور دارند این تفاوت، دارای پایه و اساس ژنتیکی است. از طرفی Ziaaddini *et al.* (2011) اختلاف معنی‌داری را در رفتار جستجوگری جمعیت‌های موردبررسی نیافتند و نتیجه‌ها را به گونه‌ای تفسیر نمودند که اختلاف‌ها به اندازه‌ای نیست که از جلب متقابل بین جمعیت‌ها در شرایط آزمایشگاه جلوگیری نماید. نتیجه‌های حاصل از پژوهش حاضر نیز بیان می‌کند جریان ژنی بالا و تنوع ژنتیکی اندک بین جمعیت‌ها، می‌تواند به جلب متقابل جمعیت‌های مختلف کمک نماید. Norbakhsh *et al.* (2017) نسبت مشابهی از ترکیب‌های فرمونی *E. ceratoniae* بین جمعیت‌های جغرافیایی سیستان و خراسان گزارش کردند و نشان دادند فاصله جغرافیایی در ایجاد واگرایی مؤثر نبوده است. در

کرم گلوگاه انار *E. ceratoniae* یکی از آفت‌های مهم انار در ایران به شمار می‌رود. ژن‌های میتوکندریایی در پژوهش‌های متعدد جمعیت حشرات به کار رفته است (Sperling *et al.*, 1996, 1999; Shufran *et al.*, 2000; King *et al.*, 2002; Lavagnini *et al.*, 2014). ویژگی‌های برجسته ژن‌های میتوکندریایی به خصوص COI نظیر نداشتن اینترون و داشتن نقطه‌های حذف و اضافه اندک، سرعت بالای تکامل (نرخ ۱-۱۰ برابری ژن تک‌نسخه‌ای هسته‌ای) آن را به عنوان یک نشان‌گر مناسب نه تنها در تمایز گونه‌های نزدیک بلکه در پژوهش‌های فیلوجغرافیایی گونه‌ها مناسب می‌سازد (Avisé *et al.*, 1987; Brower, 1994). نرخ سریع واگرایی توالی بخصوص در جایگاه‌های خاموش ژن‌های رمزگذار پروتئینی میتوکندریایی اجازه می‌دهد لاین‌هایی که اخیراً منشعب شده‌اند، از هم جدا شوند (Harrison, 1989; Simon *et al.*, 1994). بر این اساس در پژوهش حاضر از ژن COI برای ارزیابی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های جغرافیایی *E. ceratoniae* در ایران استفاده شد. بررسی پارامترهای تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد که تنوع هاپلوتیپی و ژنتیکی کمی بین جمعیت‌های موردبررسی وجود دارد. تعداد شش هاپلوتیپ از تجزیه و تحلیل توالی‌های ژن COI به دست آمد و شبکه هاپلوتیپی ستاره‌ای شکل نشان می‌دهد که هاپلوتیپ ۱ به دلیل اینکه تعداد ۲۸ نمونه از ۳۶ نمونه را شامل می‌شود و سایر هاپلوتیپ‌ها با یک جهش به آن متصل شده‌اند، به عنوان هاپلوتیپ اجدادی محسوب شده که سایر هاپلوتیپ‌ها از آن تکامل یافتند (Lavagnini *et al.*, 2015; Sridhar *et al.*, 2016). در گروه‌بندی جمعیت‌ها، بیشترین تنوع هاپلوتیپی و متوسط تعداد تفاوت نوکلئوتیدی در جمعیت‌های شمال کشور (خراسان رضوی (فیض‌آباد)، مازندران (بهشهر) و گلستان (گرگان)) مشاهده شد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تغییرهای ژنتیکی درون جمعیت‌ها بیشتر از تغییرهای ژنتیکی بین گروه‌ها و بین جمعیت‌ها است. Mozaffarian *et al.* (2007) در بررسی ساختار ژنتیکی پنج جمعیت جغرافیایی و هشت جمعیت میزبانی *E. ceratoniae*

Chrysoperla externa (Neuroptera: Chrysopidae) در برزیل و *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) در هند، ساختار ژنتیکی مشخصی به دست نیامد (Lavagnini *et al.*, 2014; Sridhar *et al.*, 2016). جریان ژنی و تغییرهای درون جمعیتی بالا بین جمعیت‌های *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) را مرتبط با گسترش جمعیت آفت با تعداد محدودی از بنیان‌گذاران با گرم شدن هوا پس از دوره پلیستوسن، مهاجرت و تهاجم می‌دانند. تغییرهای ژنتیکی اندک می‌توانند مرتبط با فعالیت پروازی ضعیف شب‌پره‌ها به واسطه فراهم بودن منابع غذایی فراوان در همان ناحیه و عدم نیاز به دسترسی منابع غذایی بیشتر باشد. برای نتیجه‌های حاضر چندین دلیل محتمل است:

۱- نقش فزاینده انسان در انتقال نهال و میوه انار، به‌خصوص از ناحیه مرکزی ایران به سایر نقطه‌های کشور باعث شده است ساختار ژنتیکی اولیه تغییر نماید. همان‌طور که (Mozaffarian *et al.*, 2007) به اهمیت نقش انسان در برقراری جریان ژنی اشاره کرده‌اند.

۲- فشار انتخابی حاصل از روش‌های کنترل و شرایط محیطی مشابه، باعث یکنواختی ژنتیکی در ناحیه مرکزی ایران شده است.

۳- اگرچه ارتباط معنی‌داری بین فاصله‌های ژنتیکی و جغرافیایی حاصل نشد ولی با افزایش فاصله جغرافیایی از مرکز کشور و تنوع رقم‌های انار در شمال و جنوب کشور، تنوع ژنتیکی افزایش یافته است. نتیجه‌های حاصل از این پژوهش، نشان می‌دهند الگوی مشخصی برای ساختار جمعیت کرم گلوگاه انار در ایران با استفاده از ژن COI در DNA میتوکندریایی وجود ندارد و این نتیجه می‌تواند در برنامه‌های مدیریت کنترل آفت، به‌ویژه در روش‌هایی که کارایی آن‌ها متأثر از اختلاف یا تشابه جمعیتی است همانند روش‌های مبتنی بر استفاده از فرمون‌ها، در کشور، مدنظر قرار گیرد؛ هرچند کاربرد سایر روش‌های مولکولی مانند ریزماهورها نیز می‌تواند در تأیید یا تکمیل نتیجه‌های حاضر مؤثر باشد.

پژوهش حاضر، رابطه معنی‌داری بین فاصله‌های ژنتیکی و رقم‌های انار به دست نیامد ولی مقایسه مقدار r حاصل از آزمون منتل و منتل جزئی نشان می‌دهد اثر رقم می‌تواند بیش از عامل جغرافیا مؤثر باشد، همان‌طور که (Mozaffarian *et al.*, 2007) بیان کردند فاکتورهای دیگری غیر از جغرافیا می‌توانند بر بروز اختلاف‌های ژنتیکی مؤثر باشند، هرچند که آن‌ها در مقایسه جمعیت‌های جغرافیایی، اثر معنی‌دار فاصله‌های جغرافیایی را گزارش کردند. بررسی منابع نشان می‌دهد که انار بومی ایران است و انارهای وحشی فراوانی در سواحل دریای مازندران، از گرگان تا شفاورد، خصوصاً اطراف نیروگاه نکا وجود دارند. به‌شهر یکی از شهرهای قدیمی استان مازندران است که تنوع واریته‌های وحشی انار در آن فراوان بوده است. در گرگان نیز انارهای وحشی بسیاری در حاشیه مزارع به‌طور طبیعی مشاهده می‌شوند. این ناحیه‌ها یکی از رویشگاه‌های طبیعی انار کشور محسوب شده و حفاظت و استفاده از آن‌ها در پژوهش‌ها به‌نژادی انار کشور به‌عنوان یک منبع ژنی باارزش، توصیه شده است (Behzadi Shahrabaki, 1998). تنوع هاپلوتیپی مشاهده‌شده در جمعیت‌های مازندران و گلستان می‌تواند مرتبط با وجود رقم‌های بومی و تنوع ژنتیکی رقم‌های انار در این ناحیه باشد.

نتیجه‌های آزمون AMOVA درصد تنوع کمی را بین جمعیت‌ها ($P > 0.05$, $F_{ST} = 0.0213$) بدون الگوی ژنتیکی مشخص نشان داد. مقدار منفی حاصل از تست بی‌طرفی (Tajima's $D = -1.67407$) یکپارچگی جمعیت و فرکانس پایین پلی‌مورفیسم را نشان می‌دهد (Tajima, 1989). جریان ژنی بالا همراه با شبکه هاپلوتیپی ستاره‌ای شکل با مرکزیت هاپلوتیپ شماره ۱ (H1) که نمونه‌های زیادی را در بر گرفته است، درخت تبارزایی که ۲۸ نمونه را در یک کلاد قرار داده است، مؤید آن است که علیرغم وجود تنوع بالای ژنتیکی بین افراد، ساختار ژنتیکی مشخصی وجود ندارد. در پژوهش‌های متعدد، از توالی‌های COI برای بررسی ساختار جمعیت‌های یک گونه استفاده شده است و جمعیت‌ها به کلادها یا گروه‌هایی تفکیک شده‌اند (Ito *et al.*, 2011) ولی در بررسی جمعیت‌های

REFERENCES

1. Ahmadi, K., Gholizadeh, H., Ebadzadeh, H., Hatami, F., Hosseinpoor, R., Abdshah, H., Rezaei, M. M. & Fazli-Estabragh, M. (2016). Agricultural Statistics, Horticultural crops. *Ministry of Agriculture*, 3, 1-239. (in Farsi)
2. Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522.
3. Brower, A. V. Z. (1994). Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 6491-6495.
4. Behzadi Shahrababaki, H. (1998). Distribution and diversity of pomegranate varieties in Iran. Agriculture Education Publishing, Ministry of Agriculture. Organization of research, education and extension of agriculture, deputy of education and equipping of human resources. Karaj, Iran. (in Farsi)
5. Brower, V. Z. & DeSalle, R. (1994). Practical and Theoretical Considerations for Choice of a DNA Sequence Region in Insect Molecular Systematics, with a Short Review of Published Studies Using Nuclear Gene Regions. *Entomological Society of America*, 87, 701-716.
6. Chen, M. H. & Dorn, S. (2010). Microsatellites reveal genetic differentiation among populations in an insect species with high genetic variability in dispersal, the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 100, 75-85.
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. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3, 294-299.
8. Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 10, 564-567.
9. Glozer, K. & Fergosun, L. (2011). Pomegranate production in Afghanistan, UC Davis. *College of Agricultural and Environmental sciences*. Pp 1-32.
10. Goldansaz, S. H., Talaei, L., Poorjavand, N. & Dehghani, Y. H. (2012). Inhibition of carob moth damage using *Ferula assafoetida* essential oil in pomegranate orchards of Iran. In: P. Melgarejo Valero (Eds.), *Options Méditerranéennes. Serie A, Seminaires Méditerranéens (II) International Symposium on the Pomegranate, October 19–21, 2011, Madrid, Spain*, 103, 129-131.
11. Goodisman, M. D., Matthews, R. W. & Crozier, H. (2001). Hierarchical genetic structure of the introduced wasp *Vespula germanica* in Australia. *Molecular Ecology*, 2001, 1423-1432.
12. Goor, A. & Liberman, J. (1956). The Pomegranate. pp. 5–57. J. Atsmon (ed.), State of Israel Ministry of Agriculture, *Agr. Publ. Section*, Tel Aviv.
13. Hall, Th. A. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Oxford university press. *Nucleic Acids Symposium*, 41, 95-98.
14. Harrison, R. G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*. 4, 6-11. doi: 10.1016/0169-5347(89)90006-2.
15. Heinrich, C. (1956). American moths in the subfamily Phycitinae. *United States Natural Museum Bulletin*, 207, 1-581.
16. Hoseini, S. A., Goldansaz, S. H., Sadeghhasani, S. & Mousavi, S. G. (2014). A field screening of 10 high yield pomegranate cultivars for resistance to the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae*, in the climate condition of Karaj, Alborz, Iran. Paper presented at: *21th Iranian Plant Protection, Congress; Urmia, Iran*.
17. Kashkuli, A. & Eghtedar, E. (1975). Biologie und Ökologie von *Spectrobates ceratoniae* (Lep.: Pyralidae) in Der Provinz Fars. *Entomol et Phytopathologie Appl*, 32, 21-41.
18. Kirk, H., Dorn, S. & Mazzi, D. (2013). Molecular genetics and genomics generate new insights into invertebrate pest invasions. *Evolutionary Applications*, 6, 842-856.
19. Kremer, A., Ronce, O., Robledo-Arnuncio, J. J., Guillaume, F., Bohrer, G., Nathan, R., Bridle, J. R., Gomulkiewicz, R., Klein, E. K., Ritland, K., et al. (2012). Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecology Letters*, 15, 378-392.
20. Lavagnini, T. C., Morales, A. C. & Freitas, S. (2015). Population genetics of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) and implications for biological control. *Brazilian Journal of Biology*, <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.02014>.
21. Leit, J. W. & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 1-7. doi: 10.1111/2041-210X.12410.
22. Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.

22. Mayr, E. & Ashlock, P. D. (1991). Principles of systematic Zoology. McGraw-Hill.
23. Miller, N. J., Birley, A. J., Overall, A. D. J. & Tatchell, G. M. (2003). Population genetic structure of the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius* (L.), in relation to geographic distance, gene flow and host plant usage. *Heredity*, 91, 217-223.
24. Morland, G. (2015). *The morphology and ecology of the Carob moth (Ectomyelois ceratoniae) (Zeller) in citrus orchards of the Western Cape, South Africa*. M. Sc. thesis of Sciences Stellenbosch University, 1-123.
25. Mozaffarian, F., Mardi, M., Sarafrazi, A. & Ganbalani, G. N. (2007). Assessment of geographic and host-associated population variations of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae*, on pomegranate, fig, pistachio and walnut, using AFLP markers. *Journal of Insect Science*, 8, 1-9.
26. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, Dec; 70, 12, 3321-3323.
27. Noorbakhsh, S., Alizadeh, B. H., Farazmand, H. & Saber, M. (2017). Comparative study of the sex pheromone of carob moth, *Apomyelois ceratoniae* (Zeller, 1839) (Lepidoptera: Pyralidae) from four regions of Iran using headspace solid phase micro extraction-gas chromatography/mass spectrometry. *Turkiye Entomoloji Dergisi-Turkish Journal of Entomology*, 41, 1, 61-73.
28. Puillandre, N., Dupas, S., Dangles, O., Zeddani, J. L., Capdevielle-Dulac C, et al. (2008). Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. *Biological Invasions*, 10, 319-333.
29. Ren, Y. & Yang, L. (2016). *Ectomyelois* Heinrich, 1956 in China, with descriptions of two new species and a key (Lepidoptera, Pyralidae, Phycitinae). *Zookeys*, 559, 125-137.
30. Roe, A. D. & Sperling, F. A. (2007). Population structure and species boundary delimitation of cryptic *Dioryctria* moths: an integrative approach. *Molecular Ecology*, 16, 17, 3617-3633. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03412.x.
31. Shakeri, M. (2004). A review on investigations on pomegranate neck worm in Iran, pp. 18-30. In: A proceeding on evaluation of finding and current problems associated with *Spectrobates ceratoniae* management in pomegranate Ministry of Jihad-e-agriculture, organization of research and education, Yazd agriculture and natural resources research center, Iran.
32. Simon, Ch., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. (1994). Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651-701, <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>.
33. Sridhar, J., Chinna Babu Naik, V., Ghodke, A., Kranthi, S., Kranthi, K. R., Singh, B. P., Choudhary, J. S. & Krishna, M. S. R. (2016). Population genetic structure of cotton pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) using mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene sequences from India, *Mitochondrial DNA Part A*, DOI: 10.1080/24701394.2016.1214727.
34. Sperling, F. A. H. (1993). Mitochondrial DNA phylogeny of the *Papilio machaon* species group (Lepidoptera: Papilionidae). *The Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 65, 233-242.
35. Tajima, F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
36. Talebi Baddaf, M., Sharifi Neia, B. & Bahar, M. (2003). Analysis of genetic diversity in pomegranates cultivars of Iran, using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD markers). In: Proceedings of 3rd National Cong. Biotech., Mashad, Iran, 2, 343-345.
37. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
38. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876-82.
39. Torriani, M. V. G., Mazzi, D., Hein, S. & Dorn, S. (2010). Structured populations of the oriental fruit moth in an agricultural ecosystem. *Molecular Ecology*, 19, 2651-2660.
40. Yang, X. M., Sun, J. T., Xue, X. F., Li, J. B. & Hong, X. Y. (2012). Invasion genetics of the western flower thrips in China: evidence for genetic bottleneck, hybridization and bridgehead effect. *PLoS ONE*, 7 (4), e34567.
41. Yoshiyasu, Y. & Kitatsuji, R. (2008). Discovery of *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) in a peach orchard in Japan. Scientific Reports of Kyoto Prefectural University. *Life and Environmental Sciences*, 60, 31-37.
42. Zamani, Z., Sarkhosh, A., Fatahi, R. & Ebadi, A. (2007). Genetic relationships among pomegranate genotypes studied by fruit characteristics and RAPD markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82, 11-18.

43. Ziaaddini, M., Goldansaz, S. H., Ashouri, A. & Ghasempour, A. (2010). A comparison of the calling behavior and some biological characters of three different geographic populations of *Ectomyelois ceratoniae* under laboratory conditions. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 41, 81-93. (in Farsi)
44. Ziaaddini, M., Goldansaz, S. H., Ashouri, A. & Ghasempour, A. (2011). Study of Sexual Behavior and Comparison of Mutual attraction of Male to Females in Three geographical Populations of the Pomegranate neck worm under Laboratory Conditions. *Journal of Iranian Plant Protection Sciences*, 42, 151-161. (in Farsi)