

## مقایسه ژنتیکی جمعیت‌های سوسک پوست‌خوار، (*Orthotomicus erosus* (Col.: Curculionidae, Scolytinae) از آسیا (استان‌های اصفهان و کرمان) با اروپا و آفریقا

مسعود مهرپرور<sup>۱</sup>، جهانگیر خواجه‌علی<sup>۱\*</sup>، غلامرضا صالحی جوزانی<sup>۲</sup> و رسول امیریان<sup>۳</sup>

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲- بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، کرج، ایران، ۳- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)

\*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: khajeali@cc.iut.ac.ir

### Genetic comparison of *Orthotomicus erosus* (Col.: Curculionidae, Scolytinae) populations from Asia (Isfahan and Kerman provinces) along with Europe and Africa

M. Mehrparvar<sup>1</sup>, J. Khajehali<sup>1&\*</sup>, Gh. Salehi Jouzani<sup>2</sup> and R. Amirian<sup>3</sup>

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, 2. Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran, 3. ABRII-Central Region Branch (Isfahan), Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

\*Corresponding author, E-mail: khajeali@cc.iut.ac.ir

#### چکیده

سوسک‌های زیر خانواده Scolytinae از مهم‌ترین آفات درختان میوه و جنگلی می‌باشند که به طور عمده به درختان ضعیف و تحت تنش‌های محیطی حمله کرده و ممکن است خسارات زیادی را وارد می‌کنند. یکی از مهم‌ترین پوست‌خوارهای درختان کاج در کشور، پوست‌خوار مدیترانه‌ای کاج با نام علمی *Orthotomicus erosus* می‌باشد که در خصوص آن در کشور مطالعات زیادی صورت نگرفته‌است. با توجه به اینکه تجزیه و تحلیل دی‌ان‌ای میتوکندریایی، اطلاعات مهمی در مورد تنوع ژنتیکی جمعیت‌های حشرات می‌دهد، هدف از انجام مطالعه حاضر، مطالعه به منظور شناسایی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت سوسک‌های پوست‌خوار مدیترانه‌ای کاج از آسیا (استان‌های اصفهان و کرمان) با اروپا و آفریقا با استفاده از تکثیر و توالی‌یابی ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز زیر واحد یک (*COI*) و آنالیز تبارشناسی آن‌ها بوده‌است. برای استخراج DNA نمونه‌ها از روش CTAB استفاده شد. در نتیجه تکثیر قسمتی از توالی ژن *COI* با استفاده از یک جفت آغازگر طراحی شده، قطعه‌ای به اندازه ۴۸۸ نوکلئوتید بدست آمد. نتیجه توالی‌یابی و آنالیز تبارشناسی جمعیت‌ها وجود ۵ هاپلوتایپ را نشان داد. مقایسه شاخص اختلاف فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های آسیا، جمعیت‌های اروپا و آفریقای جنوبی تفاوت ژنتیکی معنی‌دار نشان داد ( $x=0/03$ ,  $p<0/05$ ). با این حال نمونه‌های مورد بررسی به جمعیت‌های اروپا نزدیکی بیشتری نسبت به نمونه‌های آفریقای جنوبی نشان داد و احتمالاً از آن منشأ می‌گیرند.

واژگان کلیدی: پوست‌خوار مدیترانه‌ای کاج، تنوع ژنتیکی، تبارشناسی، *Orthotomicus erosus*, *COI*.

#### Abstract

Bark beetles of subfamily Scolytinae are known as one of the most destructive pests on horticultural and forest trees, which mainly attack the weak and under environmental stress trees, and may cause an economic damage to trees. The Mediterranean pine bark beetle (*Orthotomicus erosus*) is known as one of the most destructive bark beetles of pine, and little is known about the biology and genetic diversity of this pest in Iran. Considering the fact that the analysis of mitochondrial DNA provides important information about the genetic diversity of its populations, the objective of the present study was molecular identification and determination of genetic diversity among different populations of *O. erosus* collected from Asia (Isfahan and Kerman provinces) along with Europe and Africa using PCR amplification and sequencing of the Cytochrome oxidase I gene (*COI*), and finally reconstructing of its phylogeny analysis. CTAB method was used in order to extract the samples' DNA. As result of amplification of a fragment from the *COI* gene using a pair of designed primers and polymerase chain reaction (PCR), a fragment 488 of bp length was achieved for each sample. The results of sequencing, Blast and phylogenetic studies showed five different haplotypes in the given regions. The difference index of genetic distance was also estimated. There was a significant genetic difference ( $x= 0/03$ ,  $p<0/05$ ) between the populations of Europe, South Africa and Asia. Based on the constructed phylogenetic tree, collected samples were closer to European populations than South African population, and possibly they have originated from this region.

**Key words:** *COI*, Genetic diversity, Mediterranean pine bark beetle, *Orthotomicus erosus*, Phylogeny

#### مقدمه

خانواده Curculionidae شامل بخش قابل توجهی از تمام گونه‌های شناخته‌شده و در حال حاضر بعنوان بزرگترین خانواده مهم و آشکار در بین راسته سخت‌بالپوشان هستند. سخت‌بالپوشان به مراتب غنی‌تر از سایر گونه‌های جانوری هستند (Lieutier et al., 2004). سوسک‌های پوست‌خوار در زیر خانواده Scolytinae از این خانواده قرار دارند. تاکنون ۲۶ قبیله، ۲۲۵

جنس و بیش از ۶۰۰۰ گونه آن در سراسر جهان شناسایی شده‌اند (Lieutier et al., 2004; Wood et al., 1993). اهمیت سوسک‌های پوست‌خوار در زیست‌شناسی و شیوع بیماری منجر به مطالعات مختلفی برای برآورد ظرفیت انتشار و پراکندگی آن‌ها شده‌است. این سوسک‌ها اندوفیت بوده و در تمام دوره زندگی خود به جز دوره‌های کوتاهی، داخل بافت گیاه به سر می‌برند و با تغذیه از آوند آبکش و ایجاد اختلال در جریان شیره‌نباتی و انتقال قارچ باعث خسارت اقتصادی به درختان میوه می‌شوند و از مهم‌ترین آفات در مناطق جنگلی به حساب می‌آیند (Haack et al., 2006; Avtzis et al., 2014).

گونه *Orthotomicus erosus* (Wollaston, 1857) به طور گسترده در سراسر نواحی اروپای مدیترانه‌ای و جنوبی، آسیا و آفریقای شمالی وجود دارند. این گونه به شیلی، فیجی، آفریقای جنوبی، سوئیس و ایالت متحده‌ی آمریکا وارد شده‌است (Avtzis et al., 2014). سوسک‌ها کاج‌هایی که در زمین‌های پست، بلند و مناطق خشک کاشته می‌شوند را مورد حمله قرار می‌دهند. این آفت همیشه بعنوان آفت ثانویه در نظر گرفته می‌شود که به درختان دورافتاده و درختان تحت تنش حمله می‌کند. موفقیت آن در هجوم به کشورهای خارج از محدوده بومی منجر به نگرانی قابل توجهی به سایر جنگل‌ها شده‌است (Hebert et al., 2004). اطلاعات توالی DNA در سال‌های اخیر، برای بسیاری از گروه‌ها منبع توانمندی برای تبارشناسی آن‌ها فراهم کرده‌است (Lieutier et al., 2004). تحقیقات اخیر کارایی استفاده از تکنیک‌های ژنی را به منظور شناسایی منشا گونه‌های جدید، تجدید نظر در مرز بین گونه‌ها، برآورد زمان انشعاب از رده‌بندی لینه و پی‌بردن به سازگاری با محیط‌های محلی و الگوهایی از گسترش دامنه فعالیت را در سوسک‌های پوست‌خوار نشان داده‌است (Maroja et al., 2007). تنوع ژنتیکی یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های یک جمعیت است. محیط‌ها همواره در حال تغییرند و تنوع ژنتیکی برای تداوم تکامل و سازگاری گونه‌ها برای زیست در شرایط جدید لازم است. علاوه بر این، تنوع ژنتیکی اندک منجر به افزایش درون‌آمیزی شده که می‌تواند بر زندگی افراد و جمعیت‌ها را کاهش دهد. بنابراین ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در یک جمعیت از مهم‌ترین اهداف در مطالعه ژنتیک جمعیت‌هاست (Freeland, 2001). امروزه بررسی مطالعات جمعیتی تنوع ژنتیکی پوست‌خواران بیشتر با استفاده از روش‌های توالی‌یابی صورت می‌پذیرد و هدف از این قبیل مطالعات نیز، بیشتر تعیین وجود ساختار ژنتیکی سوسک‌ها بوده‌است و در سایر موارد هدف، شناسایی تقسیمات تاریخی و تغییرات جغرافیایی زیستی می‌باشد (Footit et al., 2011). نشانگرهای مولکولی از جمله نشانگرهای میتوکندری، ابزارهای مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف حشرات از جمله حشرات آفت می‌باشند. این آفت در کشورهای مختلف نواحی مدیترانه‌ای از جنبه‌های مختلف از جمله تنوع ژنتیکی جمعیت‌های موجود در کشور بررسی شده‌اند ولی در ایران هیچ تحقیقی در این زمینه صورت نگرفته‌است. چهارچوب فیلوژنتیک سخت‌بالپوشان برای اولین بار توسط کراوسون (Crowson) ایجاد شد و بوسیله تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک با استفاده از مورفولوژی و توالی‌یابی DNA مورد تایید قرار گرفت (Lieutier et al., 2004). مطالعاتی که بر اساس توالی‌یابی مناطق با الای DNA میتوکندریایی صورت می‌پذیرد، ساختارهای شجره‌شناسی جغرافیایی یا فیلوژنتیکی گونه‌های نزدیک بهم و هم‌چنین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مختلف را معلوم می‌سازد (Khaniki, 2006). مطالعه‌ای که به منظور برآورد تمایز جمعیت‌های بین دو منطقه و درک اختلافات زیست‌محیطی از سوسک *Tomiscus piniperda* (Linnaeus, 1758) بر اساس توالی‌یابی با *COI* صورت گرفته‌است، نشان می‌دهد تنوع mtDNA جمعیت‌های آسیا کمتر از اروپاست و نمونه‌های آسیا متعلق به یک گونه جدید می‌باشند (Duan et al., 2004). هم‌چنین توالی‌یابی ۹ جمعیت *Ips cembrae* (Heer, 1836) از اروپا با ۲ جمعیت آسیایی با *COI*، اختلاف بالایی را از نظر جغرافیایی بین این جمعیت‌ها نشان داده‌است (Christina, 2011).

اخیرا باتوجه به وخیم‌شدن شرایط آب و هوایی کشور و افزایش تنش‌های محیطی از قبیل خشکی، گرما و پدیده ریزگردها در مناطق مختلف کشور، منجر به گسترش آفات مختلف از جمله پوست‌خوارها شده‌است. یکی از مهم‌ترین آفات

مخرب اخیر در مناطق دارای کاج، سوسک پوست‌خوار کاج می‌باشد که در مناطق مختلف کشور مثل اصفهان، کرمان، خراسان و تهران خساراتی را در درختان کاج وارد کرده‌است. مطالعات زیادی در خصوص بیولوژی، مکانیسم خسارت‌زایی و همچنین تنوع ژنتیکی این آفت در کشور انجام نشده‌است. لذا هدف از انجام تحقیق حاضر، شناسایی مولکولی جمعیت سوسک‌های پوست‌خوار مدیترانه‌ای کاج در مناطق اصفهان و کرمان با استفاده از تکثیر و توالی‌یابی ژن سیتوکروم‌اکسیداز یک میتوکندریایی (COI) و بررسی تنوع ژنتیکی با نمونه‌هایی از اروپا و آفریقا و آنالیز تبارشناسی آن‌ها بوده‌است.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه‌های سوسک پوست‌خوار کاج و استخراج DNA

جمع‌آوری نمونه‌ها طی سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴، از چهار منطقه شهرستان استان اصفهان و یک منطقه استان کرمان (جدول ۱) انجام شد (اسامی در ادامه به صورت اختصار استفاده شدند). سپس نمونه‌ها جهت انجام آزمایشات به آزمایشگاه دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل و در الکل ۷۰ درصد، در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای استخراج DNA پوست‌خوارها روش CTAB بکاررفت (Cognato *et al.*, 2000; Jordal *et al.*, 2004).

جدول ۱- نمونه‌های *Orthotomicus erosus* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان‌های اصفهان و کرمان

**Table 1.** Collected *Orthotomicus erosus* samples from various areas of Isfahan and kerman provinces.

Province	Area	Abbreviation
Isfahan	Bakhtiyar dasht	Isf-Bkt 1
Isfahan	Bakhtiyar dasht	Isf-Bkt 2
Isfahan	Park shargh	Isf-Psh 1
Isfahan	Malek shahr	Isf-Mak 1
Isfahan	Koh sofe	Isf-Sof 1
Kerman	Rafsanjan	Ker-Raf 1

### ۲- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

جهت تکثیر بخشی از ژن سیتوکروم‌اکسیداز زیر واحد یک (COI) (قطعه ۴۸۸ بازی)، استفاده‌شد.

جدول ۲- آغازگرهای نوکلئوتیدی جهت انجام PCR و توالی‌یابی.

**Table 2.** Primers used for PCR amplification and sequencing.

Gen	Primer name	Sequence Primer	length	First cited
COI	C-1J-1751 (F)	5'-GGA TCA CCT GAT ATA GCA TTC CC-3'	23	(Simon et al., 1994)
COI	C1-N-2193 (R)	5'-CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC-3'	26	(Simon et al., 1994)

محلول واکنش PCR با ترکیب ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X حاوی MgCl<sub>2</sub>، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز، ۸/۵ میکرولیتر آب و ۳ میکرولیتر DNA الگو در مجموع محلول با حجم ۱۵ میکرولیتر

آماده‌شد. برنامه واکنش PCR مورد استفاده در تکثیر قطعه ژنی مورد نظر در ۶ نمونه DNA به صورت واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سیلیسیوس به مدت یک دقیقه سپس ۳۹ دور که در هر دور مرحله واسرشت‌سازی به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سیلیسیوس، مرحله اتصال به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۵۳ درجه سیلیسیوس و مرحله تکثیر به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس و پس از آن بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس بود. محصول به دست آمده از تکثیر قطعه ژنی در نمونه‌ها، بر روی TBE ۸٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، از باندهای مشاهده‌شده روی ژل عکس‌برداری شد (Cognato et al., 2000).

### ۳- آنالیز مولکولی

پس از خالص‌سازی محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره‌جنوبی ارسال و توالی‌های بدست‌آمده با توالی‌های موجود در ژن بانک (پایگاه NCBI) مقایسه شد و توالی‌های مشابه و نزدیک بدست‌آمدند و به کمک نرم افزار Blast مقایسه توالی‌ها صورت‌پذیرفت (Cognato et al., 2000). جهت ارزیابی شباهت ژنتیکی و رسم درخت تبارشناسی از نرم‌افزار MEGA6 استفاده و توالی اسیدهای نوکلئیک به وسیله clustal x با استفاده از روش (Neighbor joining) و مدل ماتریسی Kimura (2-parameter) فواصل ژنتیکی و درخت فیلوژنی رسم شد. آزمون درخت تبارشناسی با روش Bootstrap برای ۱۰۰۰ تکرار بر روی شاخه‌ها نمایش داده شده‌است (Lakatos et al., 2007).

جدول ۳- ژن‌های مورد استفاده از بانک ژن و سیستم نام‌گذاری BOLD در تحلیل‌های آماری.

Table 3. Datasets from GenBank and BOLD-system included in the analysis.

Species	Country	Abbreviation	Sequence ID
O. erosus	Spain-Balearic Islands, Balears	Spn-BI	SCOL066-12.COI-5P
O. erosus	South Africa-West Cape	Afr-WC	SCOL225-12.COI-5P
O. erosus	South Africa-Knysna, Millwood Road	Afr-KM	KC845480

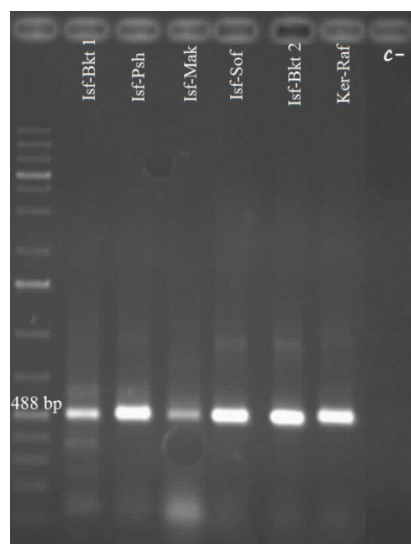
### ۴- تنوع ژنتیکی

برای محاسبه فاصله ژنتیکی درون‌گونه‌ای سوسک‌های *Orthotomicus erosus* در مناطق مختلف از نرم افزار MEGA6 مدل (1969) Jukes-cantor بوسیله Compute Pairwise distances و خروجی داده آن بصورت ماتریسی در نرم افزار اکسل و برای محاسبه فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای (۳ قاره)، بوسیله Compute Between Group Mean distances و خروجی داده آن به صورت ستونی در نرم‌افزار اکسل استفاده‌شد.

### نتایج و بحث

در نتیجه تکثیر قطعه ژن سیتوکروم‌اکسیداز زیر واحد یک در جمعیت‌های مختلف پوست‌خوار جمع‌آوری شده، باندهای ۴۸۸ بازی در ژل آگارز مشاهده‌شد که با قطعات مورد انتظار در تطابق بود (شکل ۱). تمام توالی‌ها با شباهت بالای ۹۸ درصد با توالی‌های سیتوکروم‌اکسیداز زیر واحد یک سوسک پوست‌خوار مدیترانه‌ای کاج شباهت داشتند و لذا گونه موجود در

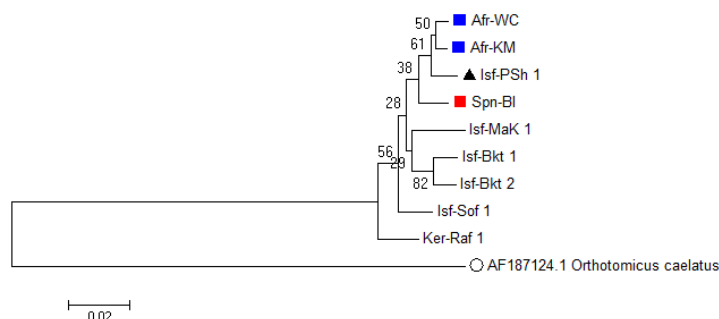
درختان آلوده اصفهان و کاج از نوع *O. erosus* تشخیص داده شد که با نتایج کلید شناسایی که بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیکی سر، پیش‌گرده و بالپوش‌ها انجام شده بود نیز هم‌خوانی داشت.



شکل ۱- الکتروفورز حاصل از ۶ نمونه DNA بر روی ژل آگارز با لدر 1 kb.

**Fig. 1.** The electrophoresis image of 6 DNA samples on the Agarose gel with Lader 1 kb.

تجزیه خوشه‌ای روش مناسبی برای اندازه‌گیری و تعیین فواصل ژنتیکی، دوری یا نزدیکی خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد. بنابراین تجزیه خوشه‌ای روش برآورد شباهت بین افراد در یک جمعیت است. از تجزیه و تحلیل توالی‌های بدست آمده از ترسیم درخت فیلوژنی، نمونه‌ها بعنوان *O. erosus* شناسایی شدند. نمونه‌هایی که از نظر نسبی مشابه باشند، در درخت فیلوژنتیکی هم‌گروه می‌شوند. درخت فیلوژنی حاصل از داده‌های مولکولی برای ۶ نمونه مورد بررسی، در شکل ۲ آورده شده است. نمونه‌ها به ۲ گروه کلی تقسیم شدند. گروه اول که دارای دو زیرمجموعه که در یک بخش آن تنها یک نمونه از کوه‌صفه (اصفهان) و در زیرمجموعه دیگر جمعیت‌های اصفهان (بجز کوه‌صفه) قرار گرفتند. در زیر شاخه اول، تنها نمونه پارک‌شرق (اصفهان) در کنار نمونه‌هایی از اروپا و آفریقای جنوبی قرار گرفت. زیر شاخه دوم، از مجموع نمونه‌های ملک‌شهر و فازهای مختلف بختیاردشت (اصفهان) تشکیل شد. گروه دوم مربوط به نمونه کرمان-رفسنجان، و فاقد شاخه فرعی بود.



شکل ۲- درخت فیلوژنی حاصل از جمعیت‌های مختلف سوسک *Orthotomicus erosus* بر اساس توالی‌یابی ژن *COI*. سوسک *Orthotomicus caelatus* بعنوان برون‌گونه انتخاب شده است.

**Fig. 2.** a Neighbor joining tree of *Orthotomicus erosus* obtained from various populations based on *COI* sequences. *Orthotomicus caelatus* (Eichhoff, 1868) has been used as an out-group.

فاصله ژنتیکی درون‌گونه‌ای در جدول ۴ آورده شده‌است. فاصله ژنتیکی مشاهده درون‌گونه‌ای، به طور کامل با تنوع درون‌گونه در بین سایر حشرات سازگار می‌باشد. برای ژن *COI* فاصله ژنتیکی بین‌گونه‌ای بیشتر از درون‌گونه‌ای بود و در بعضی موارد با یکدیگر حالت هم‌پوشانی دارند (Duan et al., 2004).

**جدول ۴-** محاسبه فاصله ژنتیکی دو به دو سوسک‌های *Orthotomicus erosus* در مناطق مختلف براساس مدل Jukes-cantor (1969).

**Table 4.** Compute Pairwise genetic distance of *Orthotomicus erosus* in various areas based on Juke-Cantor (1969) model.

	Isf-Psh 1	Isf-Mak 1	Isf-Sof 1	Isf-Bkt 1	Isf-Bkt 2	Ker-Raf 1	Afr-WC	Spn-BI	Afr-KM
Isf-Psh 1									
Isf-Mak 1	0.033								
Isf-Sof 1	0.028	0.033							
Isf-Bkt 1	0.030	0.033	0.030						
Isf-Bkt 2	0.033	0.030	0.025	0.015					
Ker-Raf 1	0.041	0.041	0.036	0.038	0.033				
Afr-WC	0.015	0.028	0.033	0.030	0.033	0.036			
Spn-BI	0.023	0.036	0.028	0.028	0.033	0.041	0.018		
Afr-KM	0.013	0.028	0.030	0.028	0.028	0.033	0.008	0.020	

**جدول ۵-** مقایسه جمعیت‌های بین‌گونه‌ای سوسک‌های *Orthotomicus erosus* در ۳ قاره براساس مدل Jukes-cantor (1969).

**Table 5.** Compute Between Group Mean distances of *Orthotomicus erosus* in three areas based on Juke-Cantor (1969) model.

Area	Area	
Asia	Europe	0/0279
Asia	Africa	0/0313

میزان تنوع ژنتیکی در آسیا (۵ هاپلوتایپ برای ۶ فرد) در مقایسه با نمونه‌های مشابه از اروپا (۱ فرد) و آفریقای جنوبی (۲ فرد) کمتر بود. نتایج ماتریس فاصله ژنتیکی (جدول ۴) نشان‌داد که بین دو نمونه پارک‌شرق (Isf-Psh 1) و آفریقای جنوبی (Afr-KM) کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۱۳) وجود دارد. هم‌چنین بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۴۱) بین دو نمونه کرمان (Ker-Raf 1) با اروپا (Spn-BI) وجود دارد. با این حال نتایج تنوع ژنتیکی کاملاً مشابه نتایجی بود که قبلاً در مورد *T. pinipenra* (Col.: Scolytinae) به ثبت رسیده‌بود (Duan et al., 2004). نتایج این تحقیق حاکی از آن است که جمعیت‌های *O. erosus* موجود در استان‌های اصفهان و کرمان در واقع شامل ۵ هاپلوتایپ می‌باشند. نتایج درخت تبارشناسی نشان‌می‌دهد که تنوع کمی (۰/۰۳) بین نمونه‌های اصفهان وجود دارد. از طرفی طبقه‌بندی بین نمونه‌ها توانست تا حدودی نمونه‌ها را از نظر منشا از همدیگر جداکند. با توجه به درخت فیلوژنی حاصل از داده‌ها، نمونه‌های اصفهان در مقایسه با نمونه کرمان در گروهی مجزا قرار می‌گیرند، که مطابق با فاصله جغرافیایی بین دو استان است. هم‌چنین قرار گرفتن نمونه‌هایی از مناطق مختلف

بختیاردشت و ملک‌شهر در زیر شاخه دوم، تایید بر آن است که این دو نیز از لحاظ مسافت درون استانی به هم نزدیکتر می‌باشند. تنها نمونه پارک‌شرق (Isf-Psh 1) بین نمونه‌های اروپا و آفریقای جنوبی قرار گرفت که از دلایل عدم تطابق با طبقه‌بندی سایر نمونه‌های جمع‌آوری شده، می‌توان به نامتجانس بودن و تنوع ژنتیکی کم آن، تعداد ناکافی نمونه با توجه به سطح زیاد زیر کشت منطقه پارک‌شرق و هم‌چنین منشا جغرافیایی متفاوت به علت قرار گرفتن در معرض ورودی شهر اصفهان و احتمال انتقال و جابجایی نمونه‌ها از یک منطقه به منطقه دیگر اشاره کرد. نتایج گروه‌بندی براساس درخت فیلوژنی موید تشابهات ژنتیکی زیادی بین هر گروه بود. قرار گرفتن سه نمونه: بختیاردشت 1 (Isf-Bkt 1 فاز ۱ منطقه بختیاردشت) و بختیاردشت 2 (Isf-Bkt 2 فاز ۲ منطقه بختیاردشت) و ملک‌شهر (Isf-Mak 1)، در زیر شاخه دوم حاکی از تشابه بالای این سه نمونه و احتمالاً همولوژی زیاد بین ژن‌های آن‌ها می‌باشد. در گروه اول نیز گونه‌هایی که کنار هم قرار گرفته‌اند از نظر ژنومی مانند یکدیگر هستند. نتایج گروه‌بندی همه نمونه‌ها در این تحقیق حاکی از آن بود که برمبنای خصوصیات اندازه‌گیری شده بین برخی از ژنوتیپ‌ها و نمونه‌ها فاصله ژنتیکی وجود داشته و این اطلاعات ما را در شناسایی دورترین والدین جد مشترک یاری خواهد کرد.

بر اساس این نتایج با اطمینان می‌توان گفت که هاپلوتایپ‌هایی که از اصفهان جمع‌آوری شده متعلق به *O. erosus* می‌باشند. بررسی‌های تنوع زیستی و مطالعات فیلوژنتیک سوسک‌های پوست‌خوار در آسیا کمتر صورت گرفته و به نظر می‌رسد فون این حشرات در این منطقه بسیار بیشتر از آنچه تعیین شده است می‌باشد (Cognato et al., 2007). از آنجایی که هیچ ثبت اطلاعات ژنومی در مورد گونه مذکور در ایران وجود ندارد، احتمالاً تعداد بیشتری از هاپلوتایپ‌ها در ایران وجود دارد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد ارتباط نزدیک نسبی بین جمعیت‌های آسیا با اروپا در مقایسه با آفریقای جنوبی وجود دارد (جدول ۵). این فرضیه تکاملی و جغرافیایی زیستی باید با نمونه‌های دیگری از سایر نقاط کشور ارزیابی شود. با توجه به این‌که این گونه تنها به یک نوع میزبان گیاهی (کاج) حمله می‌کند، این دامنه میزبانی کم و رژیم غذایی محدود، باعث کاهش تنوع ژنتیکی در آن می‌شود.

در مجموع این مطالعه نشان داد که نمونه‌های *O. erosus* می‌توانند توسط آنالیز مولکولی تفکیک شوند و داده‌ها نشان می‌دهد نمونه‌های مورد بررسی به نمونه‌های مشابه موجود از اروپا نزدیک‌تر است و احتمالاً از آن منشا می‌گیرند (جدول ۵ و شکل ۲). تفاوت‌های تنوع ژنتیکی هرچند کم بین جمعیت‌های اصفهان با سایر نقاط اختلافاتی را در فرمون‌های تولیدی و واکنش‌های رفتاری بین گروه‌ها می‌تواند در پی داشته‌باشد.

## منابع

- Avtzis, D. N., Bertheau, C. & Stauffer, C. (2012) What is next in bark beetle phylogeography. *Insects* 3, 453-472.
- Cognato, A. I. & Sperling, F. A. (2000) Phylogeny of *Ips degeer* species (Coleoptera: Scolytidae) inferred from Mitochondrial Cytochrome Oxidase I DNA sequence. *Molecular phylogenetics and evolution* 14, 445-460.
- Cognato, A. I. & Sun, J. H. (2007) DNA based cladograms augment the discovery of a new *Ips* species from China (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Cladistics*. 23, 539-551.
- Christina, R. (2011) Master thesis to obtain the academic grade. Phylogeographic Analysis of Palaearctic *Ips cembrae* (Coleoptera, Scolytinae) Populations. *Department of Forest and Soil Sciences*. BOKU, 68.
- Duan, Y., Kerdelhué, C., Ye, H., & Lieutier, F. (2004) Genetic study of the forest pest *Tomicus piniperda* (Col., Scolytinae) in Yunnan province (China) compared to Europe: new insights for the systematics and evolution of the genus *Tomicus*. *Heredity*, 93(5), 416-422.
- Footitt, R. G. & Adler, P. H. (2009) *Insect biodiversity: science and society*. 632 pp.
- Freeland, J. R., Kirk, H., & Petersen, S. (2011). *Molecular Genetics in Ecology*. Molecular Ecology, Second Edition, 1-34.

- Haack, R. A.** (2006) Exotic bark and wood boring Coleoptera in the United States: recent establishments and interceptions. *Canadian Journal of Forest Research* 36, 269-288.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S. & Francis, C. M.** (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*. 2, 312-319.
- Jordal, B. H. & Hewitt, G. M.** (2004) The origin and radiation of Macaronesian beetles breeding in Euphorbia: the relative importance of multiple data partitions and population sampling. *Systematic Biology*. 53, 711-734.
- Khaniki, Gh.** (2006) Biodiversity, Payam Noor university Publisher. 227 p. [in Persian].
- Kerdelhué, C., Roux-Morabito, G., Forichon, J., Chambon, J. M., Robert, A., & Lieutier, F.** (2002) Population genetic structure of *Tomicus piniperda* L. (Curculionidae, Scolytinae) on different pine species and validation of *T. destruens* (Woll.). *Molecular Ecology*, 11(3), 483-494.
- Lakatos, F., Grodzki, W., Zhang, Q. H., & Stauffer, C.** (2007) Genetic comparison of *Ips duplicatus* (Sahlberg, 1836) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) populations from Europe and Asia. *Journal of forest research* 12(5), 345-349.
- Lieutier, F., Day, K. R., Battisti, A., Grégoire, J. C. & Evans, H. F.** (2004) Bark and wood boring insects in living trees in Europe: a synthesis. 41, 1-581.
- Maroja, L. S., Bogdanowicz, S. M., Wallin, Raffa, K. F. & Harrison, R. G.** (2007) Phylogeography of spruce beetles (*Dendroctonus rufipennis* kirby) (Curculionidae, Scolytinae) in North America. *Molecular Ecology* 16, 2560-2573.
- Simon, C., 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(6), 651-701.
- Wood, S. L.** (1993) Revision of the genera of Platypodidae (Coleoptera). *The Great Basin Naturalist*, 259-281.