

اولین گزارش طغیان شب پره ابریشم باف ناجور *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) از جنگل‌های زاگرس شمالی و شناسایی آن با استفاده از ژن COI در ایران

مجید توکلی^۱، اسداله حسینی چگنی^{۲*} و صمد خاقانی‌نیا^۳

- ۱- دانشجوی دکتری حشره شناسی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران، پست الکترونیک: Hosseinichegeni@gmail.com
۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۱/۲۰

چکیده

شب‌پره ابریشم باف ناجور یا کولی (*Lymantria dispar* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Lymantriidae)) یکی از خسارت‌زاترین آفات برگ‌خوار درختان جنگلی در دنیا است. پژوهش حاضر اولین گزارش شیوع و خسارت این آفت در جنگل‌های زاگرس شمالی بر اساس مشاهدات میدانی، نمونه‌برداری صحرائی و بررسی‌های آزمایشگاهی برای تأیید تشخیص است. نمونه‌های لارو در بهار از روی درختان بلوط (*Quercus brantii*, *Q. infectoria*, *Q. libani*) و سایر درختان و درختچه‌های جنگلی جمع‌آوری شدند. به‌منظور شناسایی دقیق و سریع آفت و تشخیص افتراقی لارو از گونه‌های مشابه، استخراج DNA و PCR قسمتی از ژن COI برای ۱۰ نمونه تخم و لارو و توالی‌یابی قسمتی از ژن COI برای دو نمونه لارو انجام گرفت. نتیجه بلاست توالی‌ها در بانک ژن نشان داد که هر دو توالی مطالعه حاضر متعلق به گونه *L. dispar* با شباهت ۹۹ تا ۱۰۰ درصد می‌باشد. هر چند این پروانه هنوز در بسیاری از مناطق جنگلی غرب مستقر نشده است اما با توجه به تهدید بالقوه این آفت برای بوم‌سازه جنگل و عرصه وسیع فعالیت آن، باید اقدام بلافاصله و تلاش برای مدیریت کنترل جمعیت آن انجام شود.

واژه‌های کلیدی: شب‌پره کولی، لارو، میوان کردستان، درخت تبارشناسی، ژن COI

مقدمه

گذشته و دامنه میزبانی این آفات و بیماری‌ها از درختان بلوط فراتر رفته، زالزالک، ارژن، زبان‌گنجشک، آلوی وحشی، رزهای وحشی و سایر درختان و درختچه‌ها را هم آلوده کرده است (Tavakoli et al., 2017). روند ظهور، استمرار حضور، طغیان، گسترش و فعالیت چند ساله گروه‌های خاصی از حشرات برگ‌خوار در عرصه‌های جنگلی نکته بسیار مهمی است که نیاز به پایش و مراقبت

در چند سال گذشته در اثر تغییرات ایجادشده در زیست‌بوم‌ها و شرایط اقلیمی بخش‌هایی از جنگل‌های منطقه رویشی زاگرس مورد تهاجم آفات و بیماری‌هایی واقع شده‌اند که وضعیت بسیار حادی داشته و شرایط مناسبی برای مرگ و زوال آنها فراهم شده است (Beiranvand et al., 2015). هر ساله آفات جدیدی پا به عرصه ظهور

(Strain) آسیایی و اروپایی است. شب‌پره‌های ماده کولی آسیایی بر خلاف نژاد اروپایی قدرت پرواز بیشتری دارند و سرعت انتشار این نژاد زیادتر است (FAO, 2009). پراکنش این حشره به دو صورت انجام می‌گیرد لاروهای تازه تفریخ شده از تخم (لاروهای سنین اول) اقدام به تنیدن تارهای ابریشمی کرده و ضمن آویزان شدن از روی درختان میزبان در مسیر جریان باد قرار می‌گیرند و جابجا می‌شوند (انتشار Ballooning). اغلب این پراکندگی کمتر از ۵۰ متر است، گرچه بعضی از لاروها با جریان‌های تند باد محلی به ویژه در موقعیت شهری فاصله‌های بیشتری را طی می‌کنند. در مورد لاروها فاصله ۱۹ و ۲۱ کیلومتری هم گزارش شده است (Taylor & Reling, Fosberg & Peterson, 1986) اما شکل اصلی انتشار شب‌پره کولی پراکنش غیرمستقیم آن به وسیله انسان است. در مواردی توده‌های تخم گذاشته شده شب‌پره بر روی وسایل نقلیه موتوری یا دیگر اشیای غیرزنده توسط انسان به مکان‌های جدید غیرآلوده دیگر جابجا می‌شوند و به این شکل هر ساله دامنه انتشارشان را گسترش می‌دهند (Talerico, 1981). به دلیل اینکه این شب‌پره در یک جا ساکن نمی‌ماند و حالت مهاجر یا کوچ‌رویی دارد و در شرایط طغیانی جمعیت پروانه‌های ماده به راحتی در هر جایی حتی روی سنگ‌ها، کُنده‌ها، دیوارها و حتی روی وسایل نقلیه در حال عبور هم تخم‌گذاری می‌کنند نام کولی را در دنیا روی این حشره نهاده‌اند. از طرفی هم با توجه به تشکیل پیله‌هایی شبیه به کرم ابریشم در مرحله شفیرگی، ولی با این اختلاف که الیاف آن ضخیم‌تر بوده و از پیله باز نمی‌شود به آن نام ابریشم‌باف ناجور داده‌اند (McManus, 1987). شب‌پره ابریشم‌باف ناجور یک نسل در سال دارد. این شب‌پره روی طیف گسترده‌ای از گونه‌های درختی و درختچه‌ای (حداقل از ۱۰ خانواده گیاهی) شامل گونه‌های بلوط (*Quercus spp.*), صنوبر (*Populus spp.*), زالزالک و رز تغذیه می‌کند (Mauffette et al., 1983). شیوع شب‌پره ابریشم‌باف ناجور در جنگل‌هایی که درختان غالب آن‌ها گونه‌های ذکر شده هستند، بیشتر رخ می‌دهد. شب‌پره ابریشم‌باف ناجور بر

دائمی دارد (Tavakoli et al., 2017).

در گذشته تعدادی از این آفات به صورت محدود و اندک در این عرصه‌ها حضور داشتند و پس از چند سال جمعیت آن‌ها رو به کاهش می‌گذاشت و دیگر مشکلی را ایجاد نمی‌کردند یا به نوعی طغیان دوره‌ای داشتند. اما در چند سال اخیر این آفات به شکلی در منطقه مستقر شده‌اند که جمعیت‌شان تمایلی برای فروکش کردن ندارند و به یکی از عوامل مهم تهدیدکننده برای بقای جنگل‌ها تبدیل شده‌اند (Liebhold et al., 1995). در بعضی مناطق درختان و درختچه‌های آسیب‌دیده دیگر توان دفاع و تجدید حیات نداشته و مورد هجوم آفات ثانویه قرار می‌گیرند (Ciesla & Donaubauer, 1994). امروزه شیوع آفات برگ‌خوار همچون پروانه جوانه‌خوار سبز بلوط (*Tortrix viridana*) دیگر محدود به منطقه خاصی نبوده در بسیاری از نقاط وجود داشته و با طغیان هر ساله به ویژه در مناطق جنگلی زاگرس شمالی و میانی خسارات چشمگیری به درختان بلوط تحمیل می‌کند و یکی از جدی‌ترین مشکلات درختان جنگلی در منطقه رویشی زاگرس است (Banj-e Shafii et al., 2011).

شب‌پره ابریشم‌باف ناجور یا کولی (*Gypsy moth*) با نام علمی *Lymantria dispar* Linnaeus, 1758 که متعلق به خانواده Lymantriidae می‌باشد، یکی از خسارت‌زاترین آفات برگ‌خوار درختان جنگلی در دنیا است (FAO, 2009). این حشره بومی اروپا و آسیا است (Myers et al., 2000). محدوده بومی آن از ژاپن، چین و سیبری به سمت روسیه و اروپای غربی و تا جنوب کوه‌های اطلس و محدوده کوه‌های واقع شده در شمال آفریقا است (Stehr, 2003). پروانه کولی به طور تصادفی در سال ۱۸۶۸ از یک آزمایشگاه پرورشی در ماساچوست که برای انجام یکسری تحقیقات نگهداری می‌شد فرار کرد و در حال حاضر یک آفت مهم و جدی برگ‌خوار در عرصه وسیعی از جنگل‌ها در شرق آمریکای شمالی و بسیاری از مناطق شرقی ایالات متحده و کانادا محسوب می‌شود (Woodward & Quinn, 2011). به طور کلی شب‌پره کولی در دنیا دارای دو نژاد

طوری که بخش عمده‌ای از درختان این منطقه و در امتداد آن در مناطق و شکلان، چناران، حوزه سد گاران، حومه مریوان در همه جهت‌ها، اطراف دریاچه زریوار تا منطقه مرزی باشماق و خروجی مریوان به سمت سروآباد، عرصه فعالیت شب‌پره ابریشم‌باف ناجور است. همه این جنگل‌ها در مناطق کوهستانی و بخشی از منطقه رویشی زاگرس شمالی-اند که در غرب کشور قرار دارد. شرایط اقلیمی حاکم بر این منطقه جنگلی از نوع مدیترانه‌ای نیمه خشک با نزولات جوی ۴۵۰-۶۵۰ میلی‌متر در سال است. گونه غالب درختی جنگل‌های منطقه را بلوط با گونه‌های *Quercus brantii* و *Q. infectoria* تشکیل می‌دهد.

بررسی‌های ریخت‌شناسی

جمع‌آوری و شناسایی نمونه

نمونه‌های لارو در بهار توسط پنس از روی درختان بلوط (*Quercus brantii*, *Q. infectoria*, *Q. libani*) و سایر درختان و درختچه‌های جنگلی جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری همراه با برچسب مشخصات شامل تاریخ و مکان نمونه‌برداری و میزبان به آزمایشگاه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان انتقال داده شدند. همچنین تعدادی از لاروهای جمع‌آوری شده از مناطق آلوده برای پرورش تا مرحله بلوغ به ظروف پرورشی در آزمایشگاه منتقل شدند. سپس نمونه‌های بالغ با استفاده از کلید تشخیصی پوگو و شافر در سطح گونه شناسایی شدند (Pogue & Schaefer, 2007). از میان نمونه‌های لارو تعدادی از آنها برای مطالعات مولکولی انتخاب شدند. با توجه به تنوع زیاد شب‌پره‌های برگ‌خوار از خانواده‌های *Lasiocampidae* و *Lymantriidae* روی درختان بلوط، شناسایی گونه برگ‌خواران موجود از روی مرحله لاروی کار مشکلی است. بنابراین به منظور شناسایی دقیق و سریع حشره آفت، کار استخراج DNA و PCR برای ۱۰ نمونه تخم و لارو و توالی‌یابی قسمتی از ژن COI برای دو نمونه لارو انجام شد.

روی بسیاری از گونه‌های دیگر درختی و درختچه‌ای مانند افرا (*Acer spp.*) تغذیه می‌کند، اما آسیب جدی به این درخت‌ها معمولاً تنها در زمان طغیان آفت اتفاق می‌افتد.

برگ‌خواری کامل درختان جنگلی توسط این آفت امری شایع است اما به ندرت درختان و درختچه‌ها را از بین می‌برد. با این حال، اکثر درختان بعد از یک دوره برگ‌خواری زنده خواهند ماند، اما اگر شیوع چندین سال متوالی ادامه پیدا کند، احتمالاً درصد چشمگیری از درختان می‌میرند. درختانی که بعد از برگ‌خواری جان سالم به در می‌برند، از میزان رشد و تولیدشان در سال‌های بعدی کاسته شده و متحمل خساراتی می‌شوند. آلودگی‌های درختان به شب‌پره کولی باعث کاهش رشد، ضعف و ضایع شدن ظاهر درختان می‌شود (Anonymous, 2012).

در ایران طی دو دهه اخیر چندین مورد از طغیان شب‌پره کولی در مناطق جنگلی هیرکانی و ارسباران گزارش شده است (Hajizadeh et al., 2013). در جنگل‌های زاگرس این آفت هیچ‌گاه به شکل طغیانی وجود نداشته البته در سال‌های گذشته مواردی از وجود این حشره توسط محققان از استان‌های آذربایجان غربی، کردستان، کهگیلویه و بویراحمد ثبت شده است (Nikdel, 2015). تحقیق حاضر اولین گزارش شیوع و خسارت این آفت دارای دامنه میزبانی وسیع در منطقه جنگل‌های زاگرس شمالی بر اساس مشاهدات، نمونه‌برداری و مطالعات آزمایشگاهی تأییدی است و به منظور شناسایی دقیق و سریع آفت و تشخیص افتراقی لارو از گونه‌های مشابه با استفاده از ژن *COI* طراحی و اجراء شده است.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

این تحقیق در عرصه‌های جنگلی بلوط استان کردستان اطراف مریوان انجام شد. مسیر جاده آسفالتی از کیلومتر ۸۵ بانه به سمت مریوان با وضعیت رویشی جنگلی و توپوگرافی کوهستانی، منطقه شروع طغیان این آفات برگ‌خوار است به

بررسی‌های مولکولی

استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، چرخه دمایی و بررسی کیفی محصول PCR

استخراج DNA با فنل و کلروفرم بر اساس مطالعه حسینی چگنی (۲۰۱۵) با تغییرات مختصر انجام شد (Hosseini-Chegeni, 2015). پس از اطمینان از کمیت و کیفیت DNA، محصول استخراج در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. مواد، مقادیر مورد نیاز آنها برای انجام هر بار واکنش PCR و غلظت اجزای واکنش (مقدار برحسب میکرولیتر: غلظت نهایی برای ۲۵μl شامل آب استریل ۱۴/۸: ۱۴/۸μl، بافر واکنش (10x-Bioflux®) ۲/۵: ۱μl، کلرید منیزیم (50 mM-Bioflux®) ۱: ۲mM، آغازگر رفت (10 μM) ۱: ۰/۴μM، آغازگر برگشت (10 μM) ۱: ۰/۴μM، نوکلئوتیدهای آزاد (10 mM-) 5 U/μl- (Bioflux®) ۰/۵: ۲۰۰ μM، آنزیم تک پلیمرز (Bioflux®) ۰/۳: ۱/۵U و DNA الگو ۴: ۱۰۰ ng/μl - ۵۰. پرایمرهای استفاده شده شامل: رفت (C1-J-1718: 3'- 5' GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA G و برگشت (C1-N-2191: 3'- 5' CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC از Simon همکاران (۱۹۹۴) با کمی تغییرات بودند (Simon et al., 1994). چرخه دمایی بهینه برای تکثیر قطعه COI براساس الگوی دمایی تاج داوون (Touchdown) به صورت مرحله؛ دما (درجه سلسیوس)؛ زمان (ثانیه) عبارت است از: ۱. واسرشته‌سازی اولیه؛ ۹۵؛ ۳۰۰، ۲. واسرشته‌سازی؛ ۹۴؛ ۵۰، ۳- اتصال؛ ۵۰ تا ۶۰؛ ۵۰، ۴- گسترش؛ ۷۲؛ ۶۰، و ۱۱ بار تکرار مراحل ۲ تا ۴ به طوری که در هر بار دمای اتصال یک درجه کمتر می‌شود تا به ۵۰ برسد. سپس ۵- واسرشته‌سازی؛ ۹۴؛ ۵۰، ۶- اتصال؛ ۵۰؛ ۵۰، ۷- گسترش؛ ۷۲؛ ۶۰، و ۲۴ بار تکرار مراحل ۵ تا ۷ در مجموع ۳۵ چرخه و در نهایت مرحله ۸- گسترش نهایی؛ ۷۲؛ ۳۰۰. به منظور مشاهده تکثیر قطعه DNA مورد نظر (ناحیه ژنی مورد نظر)، ژل آگاروز ۱٪ استفاده و در دستگاه ژل داک (UVITEC®-Cambridge) بررسی شد.

توالی‌یابی و ویرایش توالی‌ها

قطعات تکثیرشده مورد نظر برای توالی‌یابی به شرکت تجاری فزایزوه (ایران) ارسال گردید. توالی‌یابی برای ژن COI به صورت یک‌طرفه از سمت آغازگر رفت (C1-J-1718) انجام شد. توالی‌ها توسط نرم‌افزار Finch TV® (نسخه 1.4.0) بررسی و در صورت نیاز ویرایش شدند. ویرایش بر اساس مشاهده ستون‌نگار (کروماتوگرام) انجام گرفت.

مطالعات تبارشناسی

بلاست، ثبت توالی در بانک ژن، فواصل ژنتیکی و درخت تبارشناسی

قبل از استفاده از توالی‌ها در مطالعات تبارشناسی، ابتدا هر توالی به صورت جداگانه در قسمت بلاست تارنمای بانک جهانی ژن <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> قرار گرفت تا از صحت توالی ناحیه مورد بررسی و انطباق آن با گونه‌های مشابه اطمینان حاصل شود. پس از بلاست توالی‌ها، تعدادی از توالی‌های COI جنس‌های *Lymantria* و *Leucoma* بانک ژن برای مقایسه با توالی‌های COI مطالعه حاضر در درخت تبارشناسی استفاده شدند. بعد از ویرایش و اطمینان از صحت هر توالی، توالی‌ها به بانک ژن ارسال و بعد از بارگزاری در تارنمای بانک ژن www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit و تأیید آن توسط متخصصین مربوطه، برای هر توالی یک کد دسترسی اختصاص داده شد. برای مقایسه توالی‌ها با یکدیگر همه توالی‌های مورد مطالعه توسط نرم‌افزار SeaView (Gouy et al., 2010) هم‌تراز شدند. میزان فاصله ژنتیکی یا اختلاف نوکلئوتیدی بین توالی‌های یک گونه یا توالی‌های مربوط به گونه‌های مختلف با استفاده از مدل تلفیقی حداکثر احتمال (MCL) در نرم‌افزار MEGA® (نسخه ۷) (Tamura et al., 2013) محاسبه و به عنوان شاخص اندازه‌گیری میزان تنوع درون و بین گونه‌ای توالی‌های نوکلئوتیدی تاکسون‌های مطالعاتی در نظر گرفته شد. برای ترسیم درخت‌های تبارشناسی با روش‌های تفسیر Bayesian از نرم‌افزار BEAST (نسخه

ابریشم‌باف ناجور نمونه‌برداری شد (جدول ۱). نمونه‌های لارو و بالغ بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی به عنوان *Lymantria dispar* Linnaeus, 1758 تشخیص داده شدند. از جمله ویژگی‌های مهم در شناسایی این آفت دوشکلی شدید نر و ماده (شکل ۱) و همچنین دامنه میزبانی وسیع لاروهای آن بود. مراحل زندگی این گونه در شکل ۱ نشان داده شده است. لاروهای پرورشی در آزمایشگاه با موفقیت تبدیل به شفیره و سپس بالغ شدند. حجم و شکل خسارت آفت روی درختان بلوط در برخی از مناطق محل خسارت آفت، در شکل ۲ آورده شده است.

(۲,۵,۱) (Bouckaert *et al.*, 2014) استفاده شد. بعد از ترسیم درخت تبارشناسی وضعیت تک‌نیایی جنس *Lymantria* و موقعیت گروه خارجی *Leucoma* حالت پلی‌تومی درخت، میزان صحت کلاد اصلی *L. dispar* براساس میزان آزمون احتمال ثانویه (Posterior probability) و در نهایت قرابت تاکسون‌های کلاد این تحقیق نسبت به یکدیگر بررسی شد.

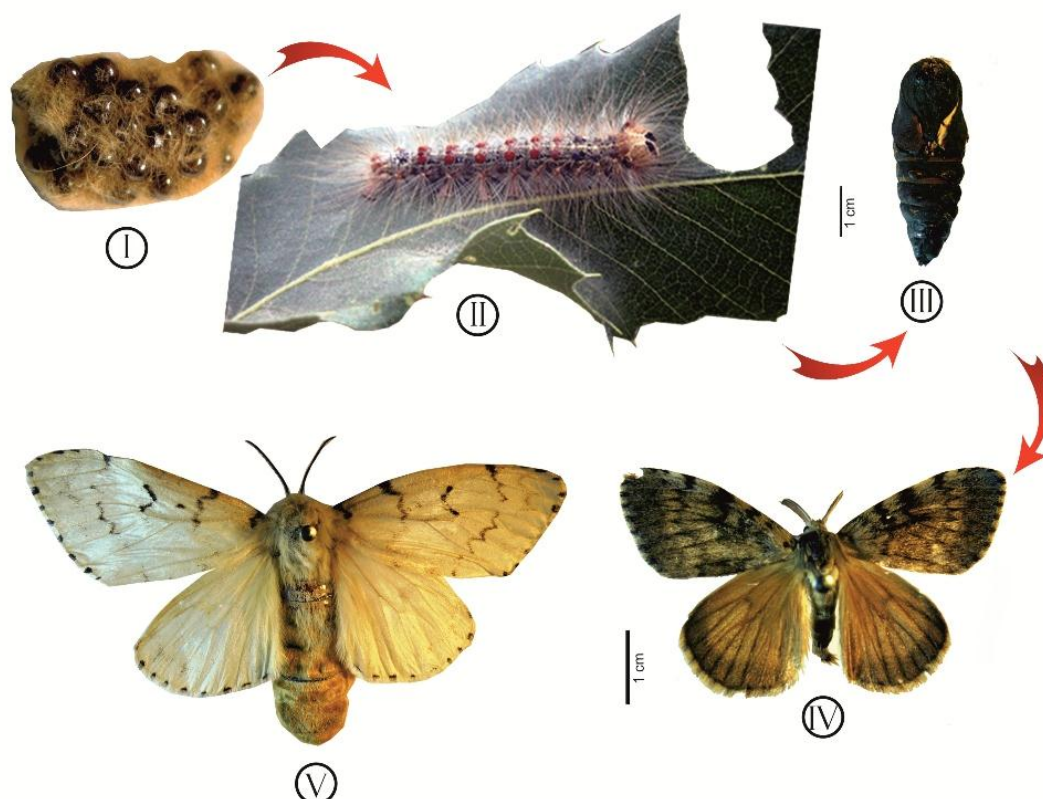
نتایج

بررسی‌های ریخت‌شناسی

در تحقیق حاضر ۱۱ مکان استقرار و طغیان شب‌پره

جدول ۱- محل‌های جمع‌آوری نمونه واقع در استان کردستان شهرستان مریوان

ردیف	محل جمع‌آوری	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۱	مسیر مریوان - سقز ۱	۳۵°۳۱'۵۰"	۴۶°۱۷'۰۵"	۱۳۸۳
۲	مسیر مریوان - سقز ۲	۳۵°۳۲'۰۰"	۴۶°۱۷'۵۹"	۱۳۳۶
۳	مسیر مریوان - سقز ۳	۳۳°۳۲'۴۴"	۴۶°۱۸'۳۳"	۱۳۵۷
۴	مسیر مریوان - سقز (چنار)	۳۳°۳۷'۴۴"	۴۶°۱۵'۲۸"	۱۵۴۹
۵	مسیر مریوان - سقز (گاران)	۳۵°۳۵'۴۹"	۴۶°۱۹'۱۶"	۱۴۱۲
۶	مسیر مریوان - سقز (بالا تر از گاران)	۳۵°۳۶'۴۸"	۴۶°۱۵'۳۱"	۱۴۵۲
۷	مسیر مریوان - سقز (وشکلان)	۳۵°۳۷'۲۵"	۴۶°۱۸'۲۰"	۱۵۱۰
۸	مریوان (نقطه مرزی باشماق)	۳۵°۳۶'۲۳"	۴۶°۰۲'۳۰"	۱۴۹۰
۹	مریوان (کانی میران)	۳۵°۳۶'۲۵"	۴۶°۰۱'۲۷"	۱۳۳۴
۱۰	مریوان (برده رَشه)	۳۵°۳۳'۳۵"	۴۶°۰۳'۳۵"	۱۶۷۲
۱۱	مریوان (جنوب کانی دینار)	۳۵°۲۵'۲۰"	۴۶°۱۳'۲۸"	۱۴۳۹



شکل ۱- مراحل مختلف زندگی شب پره کولی؛ I: توده تخم مستتر در مواد ترشخی حفاظتی از پروانه ماده، II: لارو سن چهارم و آثار تغذیه و خسارت آن روی برگ بلوط، III: شفیره، IV: پروانه بالغ نر، V: پروانه بالغ ماده (تصاویر با اصالت)

بررسی‌های مولکولی و مطالعات تبارشناسی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، توالی یابی و بلاست از تعداد ۱۰ نمونه DNA استخراج شده از تخم و لارو که PCR شدند ژن *COI* از نمونه‌های مربوط به لاروها تکثیر شد.

PCR با نمونه‌های DNA استخراج شده از تخم و مرحله بالغ موفقیت‌آمیز نبود. تعداد دو نمونه از محصولات PCR مثبت، توالی‌یابی و توالی‌ها بعد از ویرایش دستی در بانک ژن ثبت شدند. پس از تأیید متخصصان مربوطه در بانک ژن شماره‌های دسترسی MF769005 و MF769006 به آنها اختصاص داده شد. نتیجه بلاست توالی‌ها در بانک ژن نشان داد که هر دو توالی پژوهش کنونی متعلق به گونه *L. dispar* با شباهت ۹۹ تا ۱۰۰ درصد می‌باشد.

فواصل ژنتیکی و درخت تبارشناسی

فواصل ژنتیکی به عنوان شاخص تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و بین گونه‌ای قسمتی از توالی *COI* جمعیت‌های مختلف *Lymantria dispar* و گونه‌های *L. L. monacha* در *Leucoma salicis* و *sugii* در جدول ۲ آورده شده است. درخت تبارشناسی مربوط به گونه‌های مطالعه حاضر و توالی‌های بانک ژن در شکل ۳ آورده شده است. گونه *L. salicis* از جنس *Leucoma* نزدیک به جنس *Lymantria* به عنوان تاکسون خواهری به صورت گروه خارجی (Outgroup) در درخت تبارشناسی قرار گرفت. درخت تبارشناسی به صورت یک درخت کاملاً تفکیک شده (Fully resolved) یعنی تک‌نیایی بودن جنس *Lymantria* حالت دو شقی (Dichotomy) و میزان‌های صحت (آزمون احتمال ثانویه) با نمره کامل (صد درصد) در محل گره‌ها ایجاد شد.



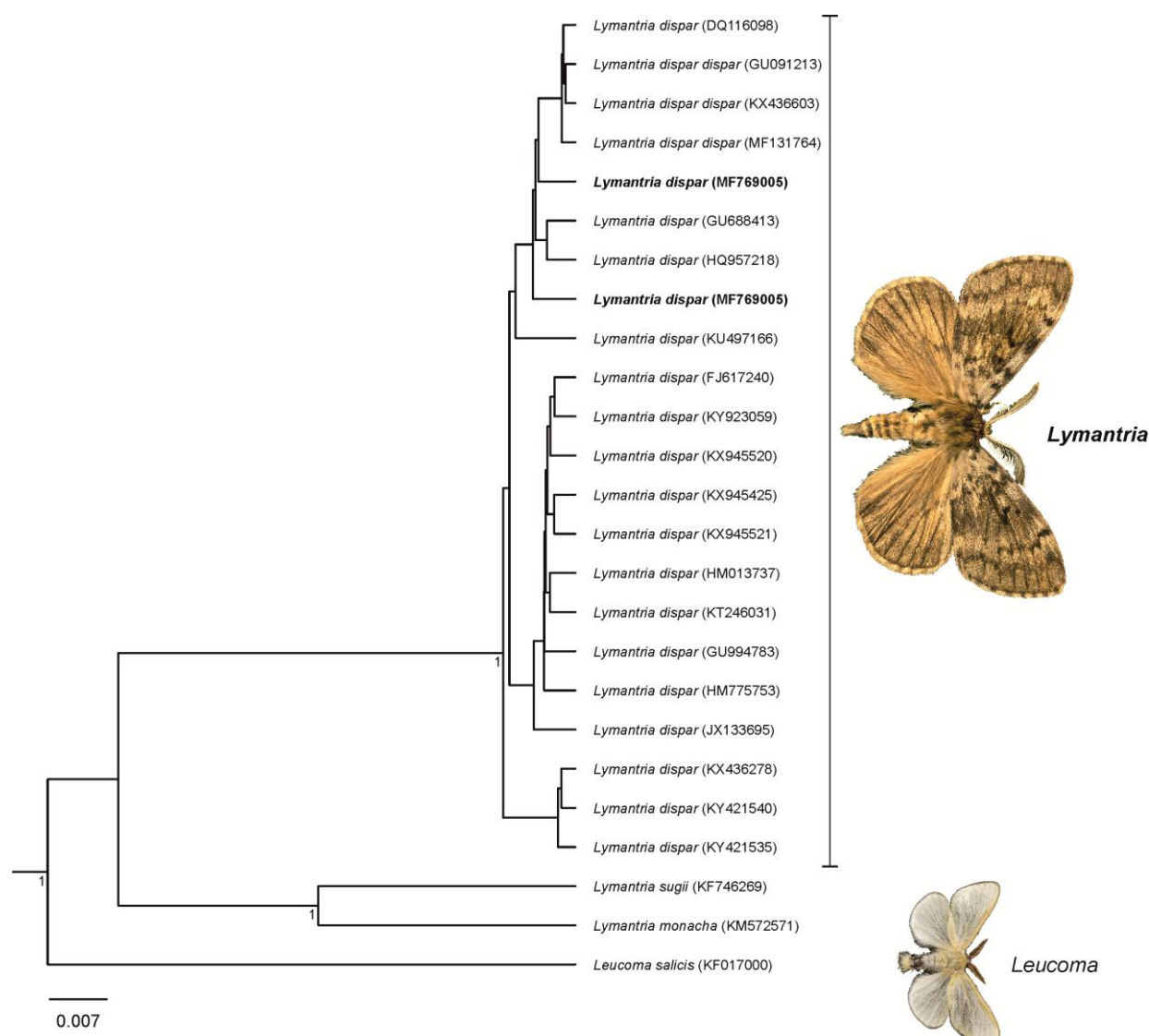
شکل ۲- میزان خسارت شب‌پره کولی در مناطق مختلف مطالعاتی؛ الف: مسیر مریوان سقز (بالا تر از گاران)، ب: منطقه مرزی باشماق، ج: مسیر مریوان سقز (گاران)، د: مریوان (برده ریشه). فلش‌های سفید نشان دهنده ناحیه جنگلی خسارت دیده محصور در ناحیه جنگلی دست نخورده (ب و ج) و یا ناحیه جنگلی که شب‌پره کولی با وسعت بیشتری به آن خسارت زده است.

جدول ۲- تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و بین گونه‌ای توالی‌های COI پژوهش حاضر و توالی‌های بانک ژن (شماره‌های دسترسی داخل پرانتز آورده شده است).

گونه	<i>L. monacha</i>	<i>L. sugii</i>	<i>L. salicis</i>	<i>L. dispar</i>
<i>Lymantria monacha</i> (KM572571)	۸	۱۵	۱۶	۱۲
<i>Lymantria sugii</i> (KF746269)	۱۶	۱۳	۱۶	۱۲
<i>Leucoma salicis</i> (KF017000)	۱۶	۱۳	۱۶	۱۲
<i>Lymantria dispar</i> ^{*°}	۱۶	۱۳	۱۶	۱۲

* توالی مورد اجماع (consensus) ۲۵۲ توالی ژن COI شامل دو توالی مطالعه حاضر

° تنوع درون گونه‌ای *L. dispar* حداکثر تا یک درصد



شکل ۳- درخت تبارشناسی استنباط شده از توالی‌های قسمتی از ژن COI این پژوهش و توالی‌های بانک ژن، ایجاد شده با روش استنباط بیزی؛ کلاد *Lymantria dispar* با رنگ سبز در سمت راست درخت مشخص شده است. توالی‌های مطالعه حاضر (با فونت درشت همراه با پیکان قرمز) درون کلاد *L. dispar* قرار گرفته‌اند. ترتیب همه توالی‌ها به صورت جنس، گونه و شماره دسترسی بانک ژن (درون پرانتز) قرار داده شده است. اعداد مربوط به میزان‌های صحت (آزمون احتمال ثانویه) در محل گره‌ها قرار گرفته است. طول شاخه‌ها متناسب با میزان تغییرات تکاملی گونه‌های مورد مطالعه است. گونه *Leucoma salicis* به عنوان گروه خارجی مد نظر بوده است.

بحث

در جنگل‌های حومه مریوان نمونه‌برداری شد. این طغیان بعد از شیوع شب‌پره جوانه‌خوار سبز بلوط به وقوع پیوست. طی مشاهدات ما لاروهای شب‌پره کولی مناطق وسیعی از جنگل‌ها را فاقد برگ کرده بودند. آنها روی

شب‌پره کولی به عنوان آفت در منطقه زاگرس شمالی در تحقیق پیش‌رو طی یک بازدید در خرداد ۱۳۹۶ تعداد ۱۱ مکان استقرار و طغیان شب‌پره ابریشم باف ناجور

چندین گونه درختی و درختچه‌ای تغذیه می‌کردند و تراکم شدید لاروها به وضوح مشاهده می‌شد. دامنه میزبانی این آفت علاوه بر بلوط، درختان زالزالک، آلوی وحشی، رز وحشی و سایر گیاهان تیره رزاسه مثل شیرخشت و انواع بادام کوهی بود. زمان شروع به فعالیت شب‌پره کولی در منطقه مریوان اواسط اردیبهشت است و در اواسط الی اواخر خرداد پایان دوره لاروی و ظهور حشرات بالغ آن اوایل تیر است. با توجه به تشابهات بسیار زیاد لارو این حشره نوظهور در منطقه با لارو شب‌پره‌های برگ‌خوار دیگر متعلق به خانواده‌های *Lymantridae*، *Noctoidae* و *Lasiocampidae* شناسایی آنها مشکل به نظر می‌رسید. لذا در گام نخست علاوه بر پرورش لاروها تا مرحله ظهور حشره بالغ در آزمایشگاه مرکز تحقیقات کشاورزی لرستان، کار شناسایی دقیق و سریع آفت و تشخیص افتراقی لارو از گونه‌های مشابه با استفاده از روش مولکولی انجام شد. نمونه‌های بالغ بعد از خروج از شفیره بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، دوشکلی شدید نر و ماده و همچنین دامنه میزبانی وسیع لاروها به عنوان *Lymantria dispar* Linnaeus, 1758 تشخیص داده شدند. نتیجه بلاست توالی‌ها هم در بانک ژن نشان داد که هر دو توالی تحقیق حاضر متعلق به گونه *L. dispar* با شباهت ۹۹ تا ۱۰۰ درصد می‌باشد. به‌کارگیری روش مولکولی در شناسایی آفات جنگلی و به‌طور کلی مراحل نابالغ حشرات آفت بسیار ارزشمند است که در مطالعات قبلی هم بر آن تأکید شده است. در این پژوهش نیز این روش برای تشخیص سریع و دقیق مرحله نابالغ *L. dispar* به منظور پایش سریع این آفت توصیه می‌شود. به‌طور کلی جنگل‌های بلوط مریوان از نظر آلودگی به آفات برگ‌خوار در مقایسه با سایر مناطق زاگرس شمالی از نظر وسعت سطح آلودگی، شدت برگ‌خواری و تنوع برگ‌خواران متفاوت بوده است؛ به عنوان نمونه در این حوزه وجود آبراهه‌ها، سد گاران و دریاچه زریوار عامل بسیار مهم و تأثیرگذاری در استقرار پروانه برگ‌خوار *Tortrix viridana* طی چند سال اخیر در این منطقه بوده است.

ابتدای اردیبهشت زمان فعالیت برگ‌خواری لاروهای این حشره بوده و در اوایل خرداد حشرات بالغ آن‌ها با جمعیت بسیار زیاد روی درختان در حال فعالیت‌های زیستی و تخم‌گذاری هستند. نکته مهم دیگر این بود که بعد از فعالیت پروانه جوانه‌خوار بلوط طغیان انبوه لاروهای حشره برگ‌خوار *L. dispar* در مناطق جنگلی مریوان شروع شده و خسارات فراوانی به درختان تحمیل می‌کند. توأم شدن طغیان پروانه جوانه‌خوار سبز بلوط و شب‌پره کولی موضوع بسیار مهمی است که با توجه حساسیت منطقه و با در نظر گرفتن تغییر شرایط اقلیمی، همه‌گیری پدیده زوال در این منطقه دور از ذهن نخواهد بود. بر اساس گزارش‌های موجود آسیب‌های ناشی از تغذیه حشرات برگ‌خوار از عوامل مهمی هستند که باعث تضعیف درختان شده‌اند به طوری که طغیان پروانه ابریشم‌باف ناجور *Lymatria dispar* در شمال آمریکا به عنوان یک عامل محرک عمده زوال بلوط معرفی شده است (Ciesla & Donaubauer, 1994). در سال ۱۳۹۴ وجود یکی از عوامل مهم بروز پدیده زوال بلوط در زاگرس، قارچ *Biscogniauxia mediterranea* در منطقه گاران و اطراف دریاچه زریوار گزارش شده است (Tavakoli et al., 2017). بنابراین گزارش طغیان شب‌پره ابریشم‌باف ناجور و هم‌زمانی طغیان آن با حضور عامل قارچ بیماری زغالی بلوط و طغیان پروانه جوانه‌خوار سبز بلوط بسیار جدی است. از طرفی منشاء شیوع آفت شب‌پره کولی در منطقه مریوان ناشناخته است. اگرچه این احتمال وجود دارد که یک توده تخم از سایر مناطق آلوده با یک وسیله نقلیه وارد منطقه شده باشد. از آنجا که کلنی جمعیت این آفت در منطقه مریوان بسیار بزرگ است و با تولید توده‌های تخم و شفیره‌های زیاد ممکن است به وسایل نقلیه و یا سایر لوازم و اشیاء متصل شده و می‌تواند به راحتی تا مسافت‌های دور هم پراکنده شوند، شیوع محلی آن ممکن است طی سال‌های آینده تقریباً در هر نقطه از غرب رخ دهد. از طرفی یکی از مناطق آلوده منطقه مرزی باشماق توقف‌گاه مرزی کامیون‌ها و محل ترانزیت کالا به کشور عراق است لذا

سیاسگزاری

نویسندگان این مقاله تشکر بی‌شائبه خود را از آقایان مهندس منوچهری، مهندس پژوهی و مهندس نصری از اداره منابع طبیعی مریوان به سبب معرفی مناطق جنگلی آفت‌زده و تأمین تدارکات اعلام می‌دارند.

منابع مورد استفاده

- Anonymous, 2012. Gypsy moth management in the United States: a cooperative approach. USDA Forest Service, Washington DC. USA, 25p.
- Banj-e Shafii, A., Eshaghi-Rad, J., Alijanpour, A. and Pato, M. 2011. Effect of the oak leafroller moth, *Tortrix viridana* L. on diameter growth increment of Lebanon oak (*Quercus libani* Oliv.) in Pirnashahr and Sardasht forests. Journal of Plant Protection (Agricultural Science and Technology), 25(2): 178-185 (In Persian).
- Beiranvand, A., Atarod, P., Tavakoli, M. and Marvi-Mohajer, M.R. 2015. The decline of silvan ecosystems in Zagros forests; the causes, consequences and solutions. Forest and Rangeland Journal, 106: 18-28 (In Persian).
- Bogdanowicz, S.M., Schaefer, P.W. and Harrison, R.G. 2000. Mitochondrial DNA variation among worldwide populations of gypsy moths, *Lymantria dispar*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 15(3): 487-495.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. and Drummond, A.J. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. PLOS Computational Biology, 10(4): e1003537.
- Ciesla, W.M. and Donaubaue, E. 1994. Decline and dieback of trees and forests: a global overview. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome Italy, 90p.
- deWaard, J.R., Mitchell, A., Keena, M.A., Gopurenko, D., Boykin, L.M., Armstrong, K.F., Pogue, M.G., Lima, J., Floyd, R., Hanner, R.H. and Humble, L.M. 2010. Towards a global barcode library for *Lymantria* (Lepidoptera: Lymantriinae). PLoS ONE, 5(12): e14280.
- FAO, 2009. Global review of forest pests and disease. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome Italy, 222p.
- Fosberg, M.A. and Peterson, M. 1986. Modeling airborne transport of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. Agricultural and Forest Meteorology, 38(1-3): 1-8.
- Gouy, M., Guindon, S. and Gascuel, O. 2010.

احتمال جابجایی آن از این نقاط وجود دارد. هر چند این پروانه هنوز در بسیاری از مناطق جنگلی غرب مستقر نشده است با توجه به تهدید بالقوه این آفت برای بوم‌سازه جنگل و عرصه وسیع فعالیت آن، باید بلافاصله اقدام و تلاش برای مدیریت کنترل جمعیت آن انجام شود. تمامی گزارش‌های اولیه در مورد وجود و شیوع شب‌پره کولی در زاگرس جدی در نظر گرفته شود و متولیان امر حفاظت از جنگل‌ها جزئیات جنبه‌های کنترل و نظارت شدید را برای مدیریت این موجود زنده مهاجم را مشخص کرده و اجرا کنند.

گونه *Lymantria dispar* و موقعیت تبارشناسی آن

گونه *Lymantria dispar* در خانواده Lymantriidae

قرار دارد. اخیراً این خانواده بر اساس مطالعات تکاملی مولکولی ژن‌های مختلف به زیرخانواده Lymantriinae و هفت قبیله شامل Lymantriini, Arctornithini, Daplasini, Nygmiini, Orgyiini, Leucomini و Locharnini تقسیم می‌شود (Wang et al., 2015). بر اساس توالی‌های قسمتی از ژن COI گونه‌های *Lymantria dispar* مطالعه حاضر و توالی‌های بانک ژن یک کلاد تبارشناسی مجزا ایجاد شد. مجموع اختلاف یا فاصله ژنتیکی بین اعضای این کلاد بسیار ناچیز بود (صفر تا یک درصد) به طوری که می‌توان ادعا کرد نمونه‌های این گونه در مناطق مختلف دنیا از نظر این بخش از ژن COI تفاوتی ندارند. بنابراین این ناحیه از ژن COI قادر به تفکیک نژادهای اروپایی و آسیایی *L. dispar* نخواهد بود. نتایج مطالعه Bogdanowicz و همکاران (۲۰۰۰) روی جمعیت‌های شب‌پره کولی اروپایی و آسیایی (غیر از ژاپن) یافته این پژوهش را نیز تأیید می‌کند (Bogdanowicz et al., 2000). در مطالعه deWaard و همکاران (۲۰۱۰) هم با وجود معرفی سه کلاد تبارشناسی *L. d. dispar* (امریکای شمالی و فرانسه)، *L. d. dispar* (غرب آسیا) و *L. d. asiatica* (ژاپن و شرق آسیا) اما اختلاف ژنتیکی خاصی در توالی‌های قسمتی از ژن COI جمعیت‌های مورد مطالعه آنها دیده نمی‌شود (deWaard et al., 2010).

- potentially invasive to North America. US Department of Agriculture, Forest Health Technology Enterprise Team, Colorado USA, 221p.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and 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.
 - Stehr, F.W. 2003. Caterpillars: 154-156. In: Resh, V.H. and Cardé, R.T. (Eds.). *Encyclopedia of insects*. Academic Press, London UK.
 - Talerico, R.L. 1981. Methods of gypsy moth detection and evaluation: 31-6. In: Doane, C.C. and McManus, M.L. (Eds.). *The gypsy moth: research toward integrated pest management U.S. Department of Agriculture, Washington, DC USA*.
 - Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729.
 - Tavakoli, M., Khaghaninia, S. and Arzanlo, M. 2017. The oak decline in Zagros vegetation region is a threat for Arasbaran forests, 1st National Congress of Arasbaran Forests, Tabriz, Iran (In Persian).
 - Taylor, R.A.J. and Reling, D. 1986. Density/height profile and long-range dispersal of first-instar gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environmental Entomology*, 15(2): 431-435.
 - Wang, H., Wahlberg, N., Holloway, J.D., Bergsten, J., Fan, X., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Wen, L., Wang, M. and Nylin, S. 2015. Molecular phylogeny of Lymantriinae (Lepidoptera, Noctuoidea, Erebidae) inferred from eight gene regions. *Cladistics*, 31(6): 579-592.
 - Woodward, S.L. and Quinn, J.A. 2011. *Encyclopedia of invasive species: from Africanized honey bees to zebra mussels*. Greenwood, California USA, 764p.
 - SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2): 221-224.
 - Hajizadeh, G., Kavosi, M.R. and Jalilvand, H. 2013. Evolution of oviposition behavior in gypsy moth (*Lymantria dispar*) in Hyrcanian forests, North of Iran. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 14(2): 101-105.
 - Hosseini-Chegeni, A. 2015. Taxonomy and phylogeny of Iranian ticks of the genus *Hyalomma* (Acari: Ixodidae) with morphologic and molecular methods. Doctor of Philosophy, Department of Plant Protection, Guilan University, Rasht Iran, 190p.
 - Liebhold, A.M., MacDonald, W.L., Bergdahl, D. and Mastro, V.C. 1995. Invasion by exotic forest pests: a threat to forest ecosystems. *Forest Science*, 41(30): 1-49.
 - Mauffette, Y., Lechowicz, M.J. and Jobin, L. 1983. Host preferences of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.), in southern Quebec. *Canadian Journal of Forest Research*, 13(1): 53-60.
 - McManus, M.L. 1987. The gypsy moth problem: history, biology, spread, Proceedings of coping with the Gypsy moth in the new frontier. West Virginia University, West Virginia USA, 1-10.
 - Myers, J.H., Simberloff, D., Kuris, A.M. and Carey, J.R. 2000. Eradication revisited: dealing with exotic species. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(8): 316-320.
 - Nikdel, M. 2015. The gypsy moth as the most important pest of forest and ornamental trees. Azerbaijan-e Sharqi Organization of Agriculture Jihad, Azerbaijan-e Sharqi Iran, 15p (In Persian).
 - Pogue, M. and Schaefer, P.W. 2007. A review of selected species of *Lymantria* Hübner, 1819 (Lepidoptera: Noctuidae: Lymantriinae) from subtropical and temperate regions of Asia, including the descriptions of three new species, some

The first report of Gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) outbreak from northern Zagros forests and its identification using COI gene in Iran

M. Tavakoli¹, A. Hosseini-Chegeni^{2*} and S. Khaghaninia¹

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2*- Corresponding author, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Lorestan, Lorestan, Iran

E-mail: Hosseinichegeni@gmail.com

Received: 02.10.2017

Accepted: 09.04.2018

Abstract

The Gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) is one the most destructive defoliator pest of forests across world. The present study is the first report of outbreak and damage of this pest in Northern Zagros forests based on the field observations, sampling and laboratory assays to confirm the identification. In spring the larvae specimens were collected on the Oak (*Quercus brantii*, *Q. infectoria*, *Q. libani*) and other forest trees and shrubs. In order to rapid and accurate identification of the pest, DNA extraction and PCR amplification of the COI gene fragment was performed for ten specimens including eggs, larvae and adults, followed by sequencing of two larvae specimens. The Blast results revealed that two sequences belong to *L. dispar* species with 99-100% similarity to other GenBank sequences. However, this species is not established yet in many western forests of Iran. But, due to the potential threats of the pest for the forest ecosystems and its widely flying activity, immediate action and efforts must be taken to control the pest population.

Key words: Gypsy moth, Larvae, Marivan Kurdistan, Phylogenetic tree, COI gene.