فصلنامه علمی-ترویجی پدافند غیرعامل

سال نهم، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۷، (پیاپی ٣٦): صص ۴۰-۳۳

مطالعه و ارزیابی تهدید زیستی کرم قوزه پنبه در غرب و مرکز استان گلستان با استفاده از روش مولکولی

حسین هنری[۱*]، سید محمد هاشم زمانی[۲]، اسماعیل رضوی[۳]، سید مجتبی آقایی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۲۵

چکیده

روغن‌کشی، در ایجاد ارزش افزوده و اشتغال‌زایی بخش‌های کشاورزی، صنعت و بازرگانی نقش مهمی ایفا می‌کند. در سال‌های اخیر سطح کشت و تولید گیاه استراتژیک پنبه در مناطق مختلف کشور به ویژه استان گلستان به دلایل مختلف که یکی از آنها آفت کرم قوزه خوار Helicoverpa armigera بوده روند کاهشی را تجربه کرده است. مطالعه همه جانبه بر روی این آفت بخصوص از جنبه ژنتیکی و ملکولی از ماموریت‌های اصلی سازمان پدافند غیرعامل کشور می‌باشد. آگاهی از میزان تنوع جمعیت‌ها در شناخت بهتر کانون‌های حمله آفت و برنامه‌ریزی صحیح برای کنترل سودمند می‌باشد. نشانگرهای میتوکندریایی ابزاری مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنی موجودات جانوری در دنیا می‌باشند. در این پژوهش، برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف کرم‌قوزه از نشانگر میتوکندریایی COI استفاده شده است. بدین منظور نمونه‌های کرم قوزه از چند شهرستان استان گلستان جمع‌آوری گردید. ژنوم میتوکندریایی هر یک از لاروها استخراج و با آغازگرهای COI به‌وسیله واکنش PCR تکثیر و محصولات PCR توالی‌یابی شد. توالی‌های به‌دست‌آمده به کمک نرم‌افزار Online Blast مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. عدم تنوع ژنتیکی در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان، بیانگر بسته‌بودن مخزن ژنی این آفت و عدم انتقال آلودگی از خارج از شهرستان می‌باشد. مطالعه تنوع ژنتیکی کرم قوزه پنبه به مدیران و برنامه‌ریزان در نحوه مدیریت و کنترل آن، شناسایی نقاط خطر ساز و تاثیرگذار و ارائه راه‌کارهای بهبود و ارتقاء عملکرد این مراحل، کمک خواهد کرد.

کلیدواژه‌ها: کرم قوزه پنبه Helicoverpa armigera، نشانگر میتوکندریایی COI، توالی‌یابی

۱- دانشیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)،- honari.hosein@gmail.com - نویسنده مسئول
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد پدافند زیستی دانشگاه جامع امام حسین (ع)
۳- استادیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۴- کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

۱- مقدمه

از زمان‌های بسیار دور کشت پنبه در ایران متداول بوده است و سوابق تاریخی نشان می‌دهد که در قدیم پوشاک پنبه‌ای رواج داشته است. سطح کشت پنبه در کشور از سال ۱۳۵۳ از ۳۷۰ هزار هکتار به ۷۲ هزار هکتار در سال ۱۳۹۴ کاهش‌یافته است. پنبه از مهم‌ترین و اصلی‌ترین گیاهان تولیدکننده الیاف طبیعی است که در صنایع متنوع و گوناگون مصرف دارد. نیاز صنعت نساجی داخلی به مقدار ۱۸۰هزار تن در سال می‌باشد. در دانه این محصول تا حدود ۳۰٪ روغن وجود دارد و در جهان بعد از سویا مهم‌ترین دانه روغنی محسوب می‌گردد. کنجاله پنبه دانه که پس از روغن‌کشی حاصل می‌گردد با داشتن ۴۸-۳۶٪ پروتئین یکی از ترکیبات اصلی خوراک دام است. پنبه علاوه‌بر، ایجاد اشتغال در کشاورزی و صنایع نساجی، چرخ کارخانجات روغن‌کشی را به حرکت در آورده و صدها فرآورده غذایی، دارویی، نظامی، بهداشتی و صنعتی را که تنها با مشقات نفت خام قابل مقایسه می‌باشند، به جامعه عرضه می‌دارد [۱]. عدم ماشین‌آلات مناسب کاشت، داشت و برداشت محصول پنبه و کشت سنتی آن از مسائلی است که رغبت کشاورزان را برای تولید این محصول کم‌کرده است. سود کم نسبت به سایر محصولات با مصرف بالای آب، هزینه‌ای زیاد نیروی انسانی، آب بها، اجاره بها و قیمت بذر و نهاده‌ها از جمله چالش‌های پیش‌روی پنبه‌کاران است [۲]. در حال حاضر در کشور ما عملیات آماده‌سازی بستر بذر به‌صورت ۱۰۰٪ مکانیزه، عملیات کاشت پنبه به‌صورت ۷۰٪ دستی و ۳۰٪ مکانیزه، عملیات داشت به‌صورت ۹۰٪ دستی و عملیات برداشت به‌صورت تقریبا ۱۰۰٪ دستی انجام می‌گیرد و برداشت دستی پنبه حدود ۴۰٪ هزینه‌های تولید این محصول را به خود اختصاص می‌دهد [۳]. به اعتقاد کارشناسان کشاورزی، کاهش سطح زیر کشت پنبه، باعث افزایش آفات در دیگر محصولات کشاورزی منطقه شده که افزایش استفاده از سموم دفع آفات را سبب می‌شود و این موضوع نیز مشکلات زیست محیطی برای سایر محصولات کشاورزی، منابع زیرزمینی آب، دام و حتی انسان‌ها را درپی داشته است. بنابراین، حمایت از کاشت پنبه نه تنها یک تصمیم صحیح اقتصادی است، بلکه از جنبه‌های حفاظت از محیط زیست و سلامت انسان و دام نیز حائز اهمیت است. همچنین کشت پنبه، بالاترین میزان اشتغال را در بخش کشاورزی ایجادکرده و در هر هکتار از مزارع پنبه ۹۵ نفر روز اشتغال ایجاد می‌شود. میزان خسارت کرم قوزه پنبه به مزارع پنبه گرگان، گنبد و مازندران به‌طور متوسط ۳۰٪ کلیه محصول می‌باشد. ضرورت برنامه‌ریزی مدون و کارامد در جهت مبارزه با کرم قوزه پنبه دیده می‌شود. شناخت ژنتیکی و مولکولی این آفت به ماموریت‌های پدافند غیرعامل کشور کمک شایانی خواهد کرد. نشانگرهای مولکولی، ابزارهای مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف حشرات و آفات می‌باشد، زیرا حشرات متنوع‌ترین گروه جانداران با گسترش وسیع جهانی هستند. آنها تمام محیط‌ها و زیستگاه‌های زمین را اشغال کرده و دارای روابط متقابل زیادی با رنج وسیعی از موجودات هستند. مقایسه توالی میتوکندریایی DNA یکی از روش‌های معتبر در فیلوژنی می‌باشد که به زیست‌شناسان اجازه می‌دهد تا به بررسی روابط تکاملی بین گونه‌ها بپردازند. این ژن حتی زمینه بررسی روابط بین جمعیت‌ها در سطح پایین‌تر از گونه‌ها را نیز فراهم می‌کند به‌طوری که امروزه به‌فراوانی برای بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای، در بسیاری از موجودات به خدمت گرفته شده است [۴].

توالی‌یابی ژن میتوکندریایی COI در جانوران خشکی‌زی و دریازی، حشرات، کنه‌ها و ... مرسوم بوده و تنوع در گونه‌ها و زیرگونه‌ها را مشخص می‌کند. برای ۱۴۲۳۹۸ گونه شناخته شده حشرات (BOLD[1]) ایجاد شده است. در حشرات، مناطق ژنی سیتوکروم اکسیداز یک،NADH (ITS-2) و سیتوکروم اکسیداز b، به‌عنوان بارکد پیشنهاد شده است [۵،۶ و۷]. در بین بارکدهای استفاده شده سیتوکروم اکسیداز I از اهمیت بیشتری برخوردار بوده و اندازه آن در میتوکندری حشرات ۶۵۸ Kb است. اندازه ژنوم میتوکندری بعضی از حشرات توالی یابی شده است که اندازه آن بین ۱۴۵۰۳ تا ۱۹۵۱۷ Kb است. تعداد نوکلئوتیدهای ژنوم کامل متیوکندریایی کرم قوزه پنبه ۱۵۳۴۷ Kb بوده که با شماره GU18827301 در پایگاه NCBI به ثبت رسیده است [۹-۸].

پدافند غیرعامل دربخش کشاورزی، با اقدامات پیشگیرانه در حوزه دام و گیاه می‌تواند اثر تهدیدات را کاهش داده و آستانه آسیب‌پذیری آن را افزایش دهد و با تبیین اهداف و روشن کردن مخاطرات پیش‌رو به دلیل کاهش سطح زیر کشت و کاهش درآمد کشاورزان در این زمینه، فعالیت بسیار قوی و موثری داشته باشد.

پنبه از لحاظ اقتصادی دارای نقش بسیار پررنگ در منطقه بوده و صنایع زیادی به این گیاه مهم ارتباط دارد و با توجه به نقش به سزای آن در به‌کارگیری نیروهای منطقه و نیز سرمایه‌گذاری‌هایی که در این حوزه انجام شده از قبیل کارخانجات چوب، ریسندگی، نساجی، صنایع تبدیلی و ... این گیاه می‌تواند برای افراد سودجو یا کشورهای متخاصم و دشمن ابزار بسیار خوبی برای رسیدن به اهداف شوم خود باشد که نمونه‌هایی از آن مشاهده شده است. کرم قوزه پنبه با توانایی که در ایجاد خسارت و به تبع آن کاهش عملکرد و کاهش رضایت تولید کننده و ... دارد و از طرفی باعث ایجاد وابستگی به وارد کردن سموم دفع آفات نباتی و ایجاد وابستگی به کشورهای بیگانه می‌گردد و می‌تواند به‌عنوان یک عامل تهدید زیستی و اقتصادی در منطقه‌ای مشخص، مورد بررسی و تحقیق قرار گیرد.

1- Barcode of Life Data system

۲- روش تحقیق

۲-۱- جمع‌آوری نمونه

تعداد ۱۵۰ نمونه از جمعیت‌های مختلف کرم قوزه پنبه از شهرستان‌های مختلف استان گلستان طی تابستان سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری شد. شهرستان‌های مورد مطالعه شامل شهرستان‌های گرگان، آق‌قلا، بندرترکمن و علی آباد کتول بود. برای جمع‌آوری کرم قوزه پنبه در سطح مزارع در فاصله ۱۰ تا ۱۵ شهریور ماه یعنی زمان پیک جمعیت کرم قوزه به‌صورت فیزیکی و دستی در سطح مزارع جمع‌آوری گردید. در این روش با در نظرگرفتن مزارعی که در شهرستان‌های یاد شده اقدام به کشت پنبه کرده بودند در زمان پیک جمعیت و در هنگام غروب (به علت خنک شدن هوا و زمان شروع تغذیه کرم‌ها) جمع‌آوری و در الکل ۷۰٪ نگهداری شدند.

۲-۲- استخراج DNA توسط روش حرارتی

تعداد ۲۵ نمونه از هر منطقه انتخاب و به روش حرارتی استخراج DNA انجام گرفت. در این روش هر یک از نمونه‌های کرم قوزه را بعد از شستشو در آب مقطر و جداسازی قسمت شکمی از سر و گردن در تیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری با ۱۰۰ µl TE به‌صورت کامل له شدند. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در فریزر C^0 (-۷۰) قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه جوشانده شدند. نمونه‌ها با دور ۱۳۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند، سپس مایع بالایی هر تیوب را جدا کرده و در تیوب‌های جدیدی که با نام منطقه و عدد نمونه، شماره‌گذاری و مشخص شده بود قرار داده شد [۱۰].

۲-۳- توالی ژن COI میتوکندریایی حشره Helicoverpa armigera برای طراحی پرایمر

برای طراحی پرایمرهای ژن COI ابتدا توالی ژن از سایت NCBI با شماره KP868999.1 استخراج شد. با استفاده از نرم افزار primer3 پرایمرها با توالی جدول (۱) طراحی و به شرکت سینا ژن سفارش داده شد.

جدول (۱): مشخصات پرایمرهای طراحی‌شده

نام آغازگر	توالی آغازگر	ناحیه ژنی	اندازه (bp)
Zamani for	CTCGAGCTTATTTCACATCAGC	COI	۶۰۰
zamani Rev	CTGGAGGTAAGTTCTGGTATCAT		

۲-۴- تکثیر قطعه DNA میتوکندریایی (COI) به‌وسیله PCR:

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعهٔ (COI) در دستگاه PCR با برنامه زیر انجام شد.

سیکل اول PCR واسرشته‌سازی در C^0 ۹۴ به مدت ۵ دقیقه، سیکل دوم، ۴۵ سیکل شامل، واسرشته سازی در C^0 ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در C^0 ۵۸ به مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن در C^0 ۷۲ به مدت ۵۰ ثانیه و سیکل سوم گسترش نهایی در دمای C^0 ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد [۱۱].

برای تکثیر یک قطعه از DNA میتوکندریایی (COI) به طول تقریبی ۶۰۰ Kb از یک جفت آغازگر تکثیر شده به‌وسیله شرکت سیناژن استفاده شد. همانندسازی این قطعه از ژن در حجم ۲۵ µl انجام شد. اجزای واکنش PCR مطابق جدول (۲) است:

جدول (۲): جدول اجزای واکنش PCR

اجزای واکنش	مقدار در هر نمونه (µl)	غلظت نهایی
بافر PCR	۲/۵	۱۰ X
MgCl2	۱	۲ ml
dNTPs	۰/۵	۰/۲ ml
Forward primer	۱	۰/۴ µl
Reverse primer	۱	۰/۴ µl
Taq-polymers	۰/۲	۱ U
DNA	۱	-
ddH2O	۱۷/۸	-
جمع	۲۵	

۲-۵- بررسی محصول PCR بر روی ژل آگارز

بعد از انجام PCR، قطعات همانندسازی‌شده با جفت پرایمرهای اختصاصی، ارزیابی شدند. بدین منظور از ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE (ddH2O 60, EDTA 10ml, Boric acid 71ml, Tris 24.2 gr ml) استفاده شد. برای تخمین محدوده وزن ملکولی قطعات تکثیرشده از مارکر ۱ Kb استفاده شد که دارای قطعاتی با اندازه‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ ~ و ۱۰۰۰۰ Kb می‌باشد. سپس ژل به‌وسیلهٔ دستگاه پاور ساپلای با ولتاژ ۸۰ به مدت تقریبی ۶۰ دقیقه الکتروفورژ شد. در نهایت به‌وسیله محلول اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شده و با دستگاه Gel Documentation system عکس‌برداری از ژل انجام شد [۱۱].

۲-۶- توالی‌یابی محصولات PCR

پس از مشاهده باندهایی با طول مورد نظر برای هر کدام از پرایمرهای محصول PCR، ۶ نمونه از هر منطقه انتخاب و به منظور خالص‌سازی و توالی‌یابی به شرکت سیناژن فرستاده شد.

۲-۷- روش‌های زیست داده ورزی

اولین گام برای اطمینان از صحت توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده از DNA میتوکندریایی کرم قوزه پنبه، بررسی و مقایسه این توالی‌ها با توالی‌های موجود از این آفت در بانک جهانی ژن می‌باشد. بدین منظور هر یک از توالی‌های به‌دست‌آمده حاصل از واکنش PCR مربوط به هر یک از آغازگرها، با توالی‌های موجود از کرم قوزه پنبه در بانک جهانی ژن، به کمک نرم‌افزار Online Blast ارزشیابی شد. به‌منظور مقایسه توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های متعلق به کرم قوزه پنبه از سایر کشورها، تعدادی توالی از بانک جهانی ژن مورد استفاده قرار گرفت.

۳- نتایج

۳-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها و شناسایی مرفولوژیکی آنها

حشره کامل، پروانه‌ای به طول mm ۱۰-۲۰ و عرض بدن mm ۳۵-۴۰ است، رنگ بدن بسیار متغیر است; ولی عمدتاً خاکستری یا سبز روشن می‌باشد. معمولاً بال‌های جلویی به رنگ قهوه‌ای روشن بوده و دارای یک لکه لوبیایی و یک لکه گرد تیره هستند. علاوه بر این، بال‌های جلویی دارای یک نقطه سیاه رنگ بوده و در حاشیه خارجی آنها یک نوار عرضی مضرس وجود دارد. بال‌های عقبی سفید رنگ و در حاشیه بیرونی دارای یک‌هاله تیره پهن است. اطراف بال‌ها مجهز به ریشک می باشد، شکل (۱).

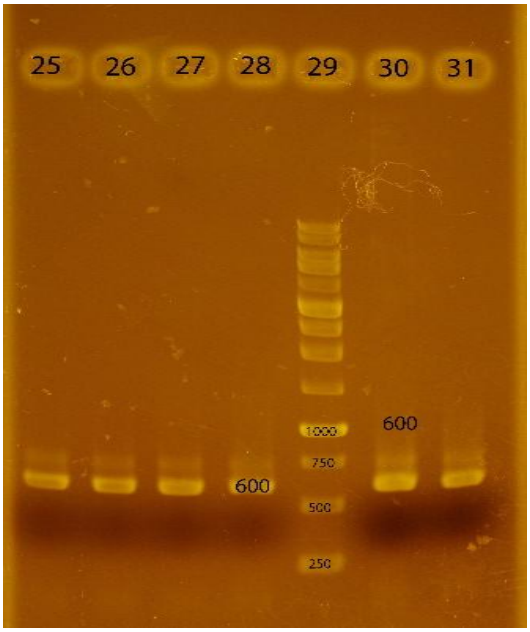
شکل (۱): سن‌های مختلف لارو کرم قوزه جمع‌آوری شده از مزارع پنبه استان گلستان

۳-۲- مقایسه روش‌های مختلف استخراج DNA

برای استخراج DNA از دو روش حرارتی (شامل ۱- کوبیدن و له کردن آن در TE و جوشاندن به مدت ۵ دقیقه و سانتریفیوژ ۲- فرو بردن لارو در نیتروژن مایع و کوبیدن و له کردن آن در TE و جوشاندن به مدت ۵ دقیقه و سانتریفیوژ ۳- کوبیدن و له کردن آن در TE، قراردادن نمونه‌ها بمدت نیم ساعت در فریزر C^0 (۷۰-) و جوشاندن به مدت ۵ دقیقه و سانتریفیوژ) و شیمیایی استفاده گردید. در ابتدا تعداد سه نمونه از هر منطقه جدا نموده و با هردو روش، استخراج صورت پذیرفت، در مقایسه بین دو روش، روش حرارتی به لحاظ اینکه سرعت دستیابی به نتیجه مورد نظر و نیز درصد موفقیت در رسیدن به نتیجه (استخراج DNA) ساده تر بود، روش حرارتی انتخاب و انجام شد.

۳-۳- تکثیر قطعه DNA میتوکندریایی (COI) بررسی محصول PCR بر روی ژل آگارز:

در این بخش از پژوهش، زیر واحدی از ناحیه ژنی COI در کرم قوزه پنبه توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. برای این ناحیه از ژن، طول توالی تخمین زده توسط بررسی ژل آگارز محصول PCR، حدود ۶۰۰ Kb می‌باشد. شکل (۲) نشان می‌دهد که قطعه ژنی مورد نظر تکثیر شده است.



شکل (۲): واکنش زنجیره ای پلیمراز جهت تشخیص ژن COI در نمونه‌های مختلف کرم قوزه پنبه ستون ۲۵ تا ۲۸، ۱۴ مارکر Kb ۱، ستون ۳۰ تا ۳۱ حضور باندهای روشن به اندازه‌های ۶۰۰ Kb مربوط به ژن COI

۳-۴- تجزیه وتحلیل توالی‌ها به‌وسیله روش بلاست

توالی‌های بدست آمده با استفاده از روش BLASTBasic Lgical Alignment Search Tool) مورد ارزیابی قرارگرفتند و با توالی‌های

ثبت شده در بانک ژنی، مقایسه شد. توالی به‌دست‌آمده از نمونه‌های بررسی حاضر با موارد ثبت در بانک ژنی مشابهت بالای ۹۹٪ داشتند.

۳-۵- نتایج بلاست داده‌ها

مقایسه توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های متعلق به کرم قوزه پنبه، با استفاده از نرم‌افزار بلاست انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده از بلاست نشان می‌دهد که توالی‌های سیتوکروم اکسیداز یک کرم قوزه پنبه استان گلستان شباهت ۱۰۰٪ و ۹۹٪ با ژن‌های استخراجی از پایگاه NCBI دارند. نمونه‌های توالی‌های سیتوکروم اکسیداز یک کرم قوزه پنبه استان گلستان با همدیگر مقایسه شدند. در این آنالیز مشخص گردید نمونه‌های جمع‌آوری‌شده (۶ نمونه توالی‌یابی شده) از مزارع گرگان و آق‌قلا با یکدیگر مشابهت ۱۰۰٪ دارند. نمونه های جمع‌آوری شده (۶ نمونه توالی‌یابی شده) از مزارع کردکوی و علی آباد با یکدیگر تفاوت دارند. در بین نمونه-های کردکوی و علی آباد مشابهت ۱۰۰٪ وجود ندارد. توالی نمونه های مزارع کردکوی و علی‌آباد با توالی کامل ژنوم میتوکندریایی (Helicoverpa armigera) با شماره GU188273.1 و با وزن ۱۵۳۴۷ bpمقایسه شدند. توالی‌های این نمونه‌ها فقط در یک نوکلئوتید با توالی کامل ژنوم میتوکندریایی اختلاف داشتند. توالی‌های یک نمونه از مزارع کردکوی هیچ اختلافی با توالی کامل ژنوم میتوکندریایی (**Helicoverpa armigera**) نداشت.

۴- بحث

دانشمندان برای طبقه‌بندی و کشف گونه‌های جدید جانوری و گیاهی به دنبال یافتن روش سریع، دقیق و بدون نقص برای شناسایی گونه‌ها، بر اساس خصوصیات ظاهری می‌باشند. روشی که قادر به شناسایی گونه در همه مراحل زندگی و دارای مقایسه موثر و سریع برای کشف گونه جدید باشد. در ابتدا به نظر می‌رسید یافتن چنین روش توانا و کارآمدی غیرممکن باشد. اما پیشرفت در تحقیقات DNA، افق‌های امیدوارکننده‌ای برای یافتن چنین روش‌هایی به روی محققان گشوده است. DNA بارکد، یک قطعه کوتاه از ناحیه ژنی سیتوکروم اکسیداز DNA I میتوکندری است. بر خلاف DNA هسته، DNA میتوکندری برای مدت طولانی بدون تغییر باقی می‌ماند و از نسلی به نسل دیگر انتقال می‌یابد. به همین دلیل بارکدها به‌عنوان روشی برای یافتن تفاوت‌ها در بین گونه‌ها، درنظر گرفته شده است. استفاده از میزان تفاوت‌های ژنتیکی به‌عنوان وسیله‌ای برای مقایسه بین گونه‌ها استفاده می‌شود. نسخه‌های بسیار زیاد این ژنوم در هر سلول، کاربرد آن را آسان نموده است. وراثت مادری و عدم نوترکیبی، باعث گسترش کاربرد آن در مطالعات تاکسونومی و فیلوژنی و بررسی ژنتیکی شده است [۱۲].

DNA بارکدهای مورد استفاده در حشرات سیتوکروم اکسیداز I، NADHII و ITS می باشند. DNA میتوکندری به‌عنوان مولکول حاوی اطلاعات مفید برای تجزیه و تحلیل حشرات استفاده می‌شود [۶-۷]. در این مطالعه برای نخستین بار، DNA بارکد در ایران برای کرم قوزه مورد بررسی قرارگرفته است. تمامی مطالعات گذشته براساس مطالعات مورفولوژیکی این موجود صورت‌گرفته است. توالی استفاده شده در درخت فیلوژنی، دارای تنوع بسیار پایین است. استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌تواند تنوع در جمعیت آفات را آشکار نماید و به انتخاب روش‌های مناسب کنترل آنها کمک کند. بررسی و هم‌ردیف‌سازی توالی‌های DNA تکثیر شده از لاروها و حشرات کامل و میزبان‌های مختلف نشان داد که تمام نمونه‌های*Helicoverpa armigera* توالی کاملا یکسان و نمونه‌ها در یک نوکلئوتید تفاوت دارند. به‌نظر می‌رسد اختلاف ژنتیکی بین نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف وجود ندارد اگرچه تعداد نمونه‌ها کم می‌باشد [۱۳].

فراوانی هاپلوتایپی میتوکندریایی درون گونه‌ای متاثر از رویدادهای مربوط به استقرار و همچنین اندازه جمعیت می‌باشد. فراوانی هاپلوتایپی یکی از پیش نیازهای آگاهی از ساختار ژنتیکی جغرافیایی است. این ساختار ژنتیکی در سازگاری گونه با محیط زیست و میزبان و همچنین چگونگی مهاجرت و وضعیت پدیده تنگنای ژنتیکی که ممکن است سطح تنوع جمعیت را تغییر دهد، موثر است. در مورد مطالعه آفات، این داده‌ها از این نظر که می‌توان جمعیت مرجع مربوط به گروهی را که به آفت تبدیل شده‌اند را تشخیص داد اهمیت دارند. گاهی از این موضوع در ردیابی و جمع‌آوری دشمن طبیعی سازگار با جمعیت تبدیل شده به آفت اقتصادی، کمک شایانی می‌کند.

وجود تنوع کافی در جمعیت پرورشی باعث سازگاری مناسب‌تر و سریع‌تر با شرایط محیطی یا میزبان جدید می‌شود [۱۳،۱۰و۱۴]. صرف‌نظر از مطالعات جمعیتی، شناسایی صحیح آفات هدف و عوامل کنترل بیولوژیکی آنها ضروری است. شناسایی صحیح دشمنان طبیعی در بهبود کارایی عوامل کنترل بیولوژیک نقش دارد از طرفی تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های دشمنان طبیعی می‌تواند در شناسایی نژاد مناسب برای برنامه های کنترل بیولوژیک در یک منطقه جغرافیایی خاص مفید باشد [۱۵]. در یک اکوسیستم، تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های جغرافیایی به عوامل زیادی وابسته است که از جمله می‌توان به جریان ژنی و دامنه میزبانی اشاره کرد [۱۳]. در سال‌های اخیر استفاده از نشانگرهای ملکولی توانسته برای بسیاری از این شاخص‌های زیستی توصیف مناسبی ارائه‌دهد. نشانگرهای ملکولی، شاخص‌هایی دقیق و مؤثر بوده و تنوع جمعیتی گونه‌های حشرات را در مناطق مختلف به‌خوبی توصیف می‌کنند [۱۶-۱۵]. بین نشانگرهای مولکولی که

به‌طور رایج برای تعیین تنوع ژنتیکی در دسترس هستند، یک روش سریع، ساده و موثر برای ارزیابی جمعیت‌های حشرات فراهم می‌کند. از دیدگاه تکاملی می‌توان دو نوع تغییرات زیستی را تشخیص داد: ۱- تغییرات گروهی که مربوط به اختلافات بین جمعیت‌های یک گونه می‌شود. ۲- تغییرات فردی که مربوط به اختلافات موجود بین افراد یک جمعیت در یک گونه خاص است. تغییر در فراوانی ژنی و ژنوتیپی یک جمعیت، طی مراحل انتقال ژنها از نسلی به نسل دیگر، ناشی از عوامل مختلفی است. از جمله این عوامل می توان به اندازه جمعیت، جهش، مهاجرت، گزینش طبیعی و رانش ژنتیکی اشاره نمود. این عوامل باعث برهم‌خوردن تعادل جمعیت و در نتیجه تنوع ژنتیکی می‌شود و هر چه تنوع ژنتیکی جمعیت بیشتر باشد در واقع تعداد تیپ‌های ژنتیکی جمعیت بیشتر می‌شود. در این صورت آن جمعیت واجد ژنوتیپ‌های مقاوم در برابر تغییرات و تنش‌های محیطی است. تغییرات ژنوتیپی یک جمعیت ناشی از فرایند جریان ژنی و نوترکیبی است اما باید توجه داشت که منشا اصلی آنها جهش‌ها هستند. قابلیت ایجاد تنوع این عوامل به اندازه‌ای است که در هر جمعیت دارای تولید مثل جنسی، دو فرد مشابه نمی‌توان یافت. فرایند تکامل جمعیت‌های طبیعی باعث شده که آنها دارای مقادیر بسیاری از این تغییرات ژنتیکی باشند و مطالعات تفاوت‌های فردی نشان داده است که تا چه حد این تصور که تمام افراد هر گونه دارای نسخه‌های یک نوع مشابه‌اند، نادرست است [۱۸-۱۷]. تغییرات جغرافیایی به تفاوت بین جمعیت‌های هر گونه اطلاق می‌شود که از نظر مکانی مجزا هستند. هر جمعیتی از یک گونه، از نظر ژنتیکی با بقیه جمعیت‌ها تفاوت دارد و در صورت استفاده از آزمون‌های دقیق، این تفاوت مشخص خواهد شد [۲۱-۱۹] درجه تفاوت بین جمعیت‌های مختلف یک گونه از تشابه کامل تا تمایز نسبی در سطح گونه‌ها متغیر است. آگاهی از تنوع ژنتیکی در حشرات کمک می‌کند که از ساختار ژنتیکی، قابلیت سازگاری جمعیت و برخی ویژگی‌های رفتاری از جمله موفقیت در یافتن منبع غذایی آگاه شویم. علاوه‌بر این، بررسی تنوع ژنتیکی حشرات، پیش از اتخاذ یک برنامه مدیریتی موثر امری ضروری است. امروزه انواع گوناگونی از نشانگرهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی اعمال می‌شود که به‌عنوان مکمل روش‌های سنتی مطرح هستند. ابزارهای مولکولی به‌خاطر توانایی بالا، اطلاعات ارزشمندی در مورد تنوع ژنتیکی فراهم می‌کنند [۲۳-۲۱].

۵- نتیجه‌گیری

با توجه به مشخصات گیاهی، پنبه قابلیت انطباق زیادی با شرایط اقلیمی و خاک کشور داشته و بدون محدودیت در بسیاری از مناطق کشور قابل کشت و کار می باشد. در حال حاضر به دلیل ۱- عدم حمایت مناسب از این محصول، ۲- واردات بی رویه و غیر قانونی، ۳- عدم تطابق علوم روز با بخش کشاورزی خصوصاً عدم همراهی بخش پژوهش با بخش اجرایی در کشاورزی، ۴- واردات بی‌رویه و غیراصولی روغن و عدم حمایت از تولیدکننده داخلی، ۵- عدم برنامه‌ریزی در خصوص اجرای طرح‌های مکانیزاسیون کشاورزی، ۶- آفات و بیماری‌ها و عدم آمادگی لازم در جهت مقابله با آنها، باعث شده تا سطح زیر کشت پنبه به‌طور چشم‌گیری کاهش یابد به‌طوری که براساس آمارها تنها ۴۰ ٪ از سهم نیازمندی داخلی، از طریق تولید داخلی تامین و الباقی علیرغم وجود ظرفیت‌های مناسب از طریق واردات و به‌طور عمده به‌صورت قاچاق و از مبادی غیرقانونی تامین می‌شود.

حمایت از تولیدکننده جهت کاهش هزینه‌ها و استفاده از علم و دانش جدید می‌تواند گره‌گشای این معضل باشد. در این تحقیق با توجه به ایجاد خسارت ۲۵ تا ۳۰ ٪ آفت کرم قوزه و نیز کاهش کیفیت تولید ناشی از طغیان این آفت، در صورتی که دشمن بخواهد این حوزه را مورد هدف قرار دهد می‌تواند با به‌کار بستن عوامل بیولوژیکی مثل کرم قوزه و انتشار آن (به دلیل این‌که این آفت پلی‌فاژ بوده و می‌تواند به ۷۰ نوع محصول خسارت وارد کند) در منطقه باعث ایجاد دلسردی و عدم رضایت از سیستم‌های کنترل دولتی شده و به اهداف خود نائل می‌شود. پس می‌توان کرم قوزه را به‌عنوان یک تهدید مورد بحث و بررسی قرار داد. حال با بینش پدافند غیرعامل زیستی می‌تواند با ایجاد آگاهی و به کار بستن امکانات و نیروهای موجود در وزارتخانه‌های ذیربط (جهاد کشاورزی و علوم تحقیقات و فناوری) و هماهنگ و همسو نمودن خواسته‌ها و با نگاهی عالمانه به چالش‌های پیش‌رو و استفاده از تجارب کشورهای همسایه خصوصاً پاکستان در کشت پنبه تراریخته، نقش عمده‌ای در پیشبرد اهداف و مقابله با توطئه‌های خصمانه دشمن بازی نماید.

برای مقابله با کرم قوزه با دانش پدافند غیرعامل زیستی موارد ذیل را باید عملیاتی نمود:

۱. ایجاد ایستگاه‌های مرزی جهت رصد و پایش که در صورت ورود آفات چه به‌صورت عمدی و چه به‌صورت طبیعی از کشورهای همسایه، زمان مناسب برای مقابله وجود داشته باشد.
۲. ایجاد پایگاه‌هایی که بتوان با استفاده و بهره‌گیری از سیستم‌های مراقبت و استفاده از فناوری‌های مرتبط و با تعیین و تهیه نقشه‌های ماهواره‌ای از ورود آفات قبل از اشاعه آن مطلع شد.
۳. شناسایی نقاطی که احتمالاً بروز و شیوع آفت در آن مناطق چه به لحاظ تراکم کاشت و چه به لحاظ آمادگی منطقه برای آفت بیشتر است.
۴. آموزش کارشناسان این بخش و نیز دادن آگهی به کشاورزان و بهره‌برداران به جهت آمادگی در جهت مقابله و پیشگیری؛

۵. آموزش و تبیین کشاورزی پایدار با سیستم‌های مدیریت تلفیقی آفات؛
۶. آمادگی در جهت داشتن منابع و انبارهای ذخیره‌سازی سموم دفع آفات نباتی در زمان شیوع آفات به جهت جلوگیری از شیوع بیشتر آن؛
۷. استفاده از مبارزه تلفیقی با آمادگی ایجاد کارگاهای تولید و تکثیر شکارگران بیولوژیک؛
۸. استفاده از ارقام مناسب و مقاوم در منطقه؛
۹. ایجاد بانک ژنی به‌صورت منطقه‌ای در سطح کشور که دسترسی و رسیدگی را آسان‌تر نماید.
۱۰. ایجاد پایگاهی به‌عنوان مرکز تجمیع امکانات که بتوان در مواقع بروز آفت به‌صورت متمرکز عمل نماید.
۱۱. ایجاد آزمایشگاه‌های تشخیص سریع
۱۲. تشکیل بانک ژنی از آفات داخلی کشور که بتوان با تکیه به اطلاعات موجود در آن نسبت به تشخیص نوع مبارزه و نحوه عمل (آفات بومی یا یک نوع حمله بیولوژیک) اقدام نمود.
۱۳. تاکید بر رعایت اصول قرنطینه داخلی و خارجی خصوصا در زمان‌های شیوع آفت.

۶- منابع

1. N. M. Abyar, M. Asgari, "The Influence of Price Support Policy on Cotton Acreage Development in Golestan province" JCRI, vol. 3, no. 27, 2015. (In Persian)
2. F. Darvishi, T. Darvish, "Barriers to the Development of Cotton Mechanized in Iran" The first national conference on natural environment, 1394.(In Persian)
3. Criteria Indicators and Standards for Oilseeds Production, Ministry of Agriculture, Deputy Director General, 2014. (In Persian)
4. G.M. Hewitt, "The Structure of Biodiversity-Insights from Molecular Phytogeography" Frontiers in Zoology, vol. 1, pp. 1-16, 2004.
5. A. Kumar, S. K. Jalali, T. Venkatesan, R. Stouthamer, "Internal Transcribed Spacer-2 Restriction Fragment Length Polymorphism (ITS-2-RFLP) Tool to Differentiate some Exotic and Indigenous Trichogrammatid Egg Parasitoids in India" Biological Control, vol. 49, pp. 207-213, 2009.
6. M. G. Mury, W. F. Tampson, "Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA" Nucleic Acids Res, vol. 8, pp. 4321- 4325, 1980.
7. B. Zarifnia, J. Khajehali, A. Mazaheri, M. R. Sabzalian, "Molecular Identification of Clearwing moth Species on Landscape Trees in Isfahan and Determination of their Infestation Intensity on different Tree Species" Plant Pests Research, vol. 4, pp. 55-72, 2014. (In Persian).
8. S. Kumar, Y.S. Ahi, S. S. Salunkhe, M. Kou, "Effective Protection by High Efficiency Bicistronic DNA Vaccine against Infectious Bursal Disease Virus Expressing VP2 Protein and Chicken IL-2" Vaccine, vol. 27, pp. 864-869, 2009.
9. A.T. Beckenbach, J.B. Joy, "Evolution of the Mitochondrial Genomes of Gall Midges (Diptera: Cecidomyiidae): Rearrangement and Severe Truncation of tRNA Genes" Genome Bio E, vol. 1, pp. 278–287, 2009.
10. J.A. Lewter, A.L. Szalanski, R.N. Nagoshi, J.R. Meagher, C.B. Owens, R.G. Luttrell, "Genetic Variation within and between Strains of the Fall Armyworm, Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae)" The Florida Entomologist, vol. 89, pp. 63-68, 2006.
11. M. Rezaee, H. Honari, A. Zand, "Molecular Cloning and Expression of Bacillus Anthracis Lethal Factor Domain 1 Gene in Escherichia coli" JSKUMS, vol. 14, pp. 38-46 ,2012.
12. F.S. Kirsty, J. Thia, E. C. Chrissen, E.F. Andrew, "Barcoding of the Cytochrome Oxidase I (COI) Indicates a Recent Introduction of Ciona Savignyi into New Zealand and Provides a Rapid Method for Ciona Species Discrimination" Aquatic Invasions, vol. 7, pp. 305–313, 2012.
13. A. V. Z. Brower, "Rapid Morphological Radiation and Convergence among Races of the Butterfly Heliconuius erato Inferred from Patterns of Mitochondrial DNA Evolution" Proc. Natl. Acad. Sci, vol. 91, pp. 6491-6495, 1994.
14. L. Excoffier, P.E. Smouse, J.M. Quattro, "Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA restriction data" Genetics, vol.131, pp. 479–491, 1992.
15. A. G. Teacher, C. Andre, J. Meril€a, C. W. Wheat, "Whole Mitochondrial Genome Scan for Population Structure and Selection in the Atlantic Herring" BMC Evol. Biol, vol. 12, pp. 248, 2012.
16. J. Yin, G. Y. Hong, A. M. Wang, Y. Z. Cao, Z. J. Wei, "Mitochondrial Genome of the Cotton Bollworm Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) and Comparison with other Lepidopterans" Mitochondrial DNA, vol. 21, pp. 160–169, 2010.
17. G. Behere, W. Tay, D. Russell, D. Heckel, B. Appleton, K. Kranthi, P. Batterham, "Mitochondrial DNA Analysis of Field Populations of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) and of its Relationship to H" zea. BMC Evol. Biol, vol. 7, pp. 117, 2007.
18. H. M. Pereira1, S. Ferrier, M. Walters, G. N. Geller, R. H. G. Jongman, R. J. Scholes, "Essential Biodiversity Variables" Science, vol. 339, pp. 277–278, 2013.
19. M. Winter, V. Devictor, O. Schweiger, "Phylogenetic Diversity and the Nature of Conservation: where are we?" Trends Ecol Evol, vol. 28, pp. 199–204, 2012.
20. X. Guang-Hua, X. Long-Sheng, L. Zhe, T. S. Tusar, W. Chengshu, "High Throughput Profiling of the Cotton Bollworm Helicoverpa armigera Immuno Transcriptome during the Fungal and Bacterial Infections" BMC Genomics, vol. 16, pp. 321, 2015.
21. S. L. Cameron, "Insect Mitochondrial Genomics: Implications for Evolution and Phylogeny" Annu. Rev. Entomol, vol. 59, pp. 95–117, 2014.
22. S. L. Pearce, D. F. Clarke, P. D. East, S. Elfekih, K. H. J. Gordon, "Genomic Innovations, Transcriptional Plasticity and Gene Loss Underlying the Evolution and Divergence of two Highly Polyphagous and Invasive Helicoverpa Pests pecies, BMC Biology, vol. 15, pp. 63, 2017.
23. P. P. Omaththage, T. K. Walsh, R. G. Luttrell, "Complete Mitochondrial Genome of Helicoverpa zea (Lepidoptera: Noctuidae) and Expression Profiles of Mitochondrial-Encoded Genes in Early and Late Embryos" Journal of Insect Science, vol. 16, pp. 1–10, 2016.

Study and Evaluation of Biological Threat of Cotton Bollworm in the West and Central Part of the Golestan Province Using Molecular Method

H. Honari[*], S. M. Hashem Zamani, E. Razavi, S. M. Aghaee

Abstract

One of the important issues in passive defense considerations is progressive collapse. Progressive collapse of the structure occurs when the major structural load carrying members are removed suddenly and the remaining structural elements are not capable of supporting the weight of the building and eventually result in collapse and failure of the structure. The main purpose of this investigation is assessment of the progressive collapse capacity of reinforced concrete special moment frame that is designed according to Iranian National Building Code (part 9). In this paper, two methods of analysis, nonlinear static analysis (pushdown analysis) and linear static analysis, are used for evaluating the progressive collapse capacity of special moment resisting frames with 3, 5 and 7 stories under two different scenarios. The Progressive collapse potential of SMRFs is evaluated based on the acceptance criteria of the last edition of UFC 4-023-03 document. The results show that the linear static analysis procedure has more conservative results compared to the pushdown analysis and the beam elements are also more vulnerable to progressive collapse than column elements.

Key Words: *Helicoverpa armigera cotton worm, mitochondrial marker COI, Sequencing*

[*] Imam Hossein Comprehensive University- (honari.hosein@gmail.com) - Writer-in-Charge