گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٤، شماره٤، زمستان ١٤٠٠

doi 10.22055/ppr.2021.17218

وقوع شته فیلوکسرای بلوط *Phylloxera quercina* (Ferr.) روی *Quercus brantii* در استان لرستان، غرب ایران

مجید توکلی[1]، اسداله حسینی چگنی[2*]

۱- مربی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لرستان، ایران

۲- *نویسنده مسوول: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران (hosseinichegeni@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۴

چکیده

شته‌ها یکی از مهم‌ترین آفات کشاورزی و جنگلی هستند که به صورت مستقیم با مکیدن شیره اندام‌های گیاهی و غیرمستقیم با انتقال عوامل بیماری‌زای میکروبی به میزبان‌های گیاهی سبب ایجاد خسارت می‌شوند. همچنین اشکال دیگر خسارت غیرمستقیم می‌تواند به صورت ایجاد گال، بدشکلی اندام‌ها، لکه‌های رنگ پریده بافت مردگی هر سه به دلیل ترشح بزاق سمّی و ایجاد منظره کپک دوده‌ای به علت ترشح عسلک به عنوان منبع غذایی برای قارچ‌های پوسیده‌خوار دیده شود. تعداد گونه‌های شته در حال حاضر بیش از ۵۲۰۰ گونه و در حدود ٦٩ گونه در شش جنس متعلق به خانواده Phylloxeridae است. به استثناء شته فیلوکسرای مو که آفت جهانی تاکستان‌های صنعتی است، زیستگاه بقیه گونه‌ها، عرصه‌های جنگلی و زیست‌بوم‌های غیر زراعی می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی یک گونه شتهٔ تغذیه کننده از بلوط گونه *Q. brantii* به عنوان مسبب احتمالی بروز لکه‌های زرد بافت مردگی روی برگ‌های درخت‌های آلوده بود. نمونه‌های شته روی درخت بلوط *Q. brantii* در اطراف شهرستان خرم آباد جمع آوری شدند. توالی یابی بخشی از قطعه ژنی COI انجام و تبارشناسی مولکولی این گونه با سایر گونه‌های جنس *Phylloxera* بررسی و مقایسه شد. به منظور شناسایی ریخت شناسی، نمونه‌های مونته شده (اسلایدهای میکروسکوپی) شته با روش‌های مرسوم زیر میکروسکوپ نوری و با کمک کلیدهای تاکسونومیک، تشخیص داده شدند. براساس تشخیص مولکولی و ریخت شناسی، نمونه‌ها به عنوان *Phylloxera quercina* (Ferrari, 1872) شناسایی شدند. مطالعه حاضر اولین گزارش وقوع *P. quercina* به صورت یک آفت در ناحیه رویشی زاگرس می‌باشد. قطعه ژنی COI بارکد قادر است تا به همراه ویژگی‌های ریخت‌شناسی به تشخیص دقیق گونه‌های جنس *Phylloxera* در ایران کمک شایانی نماید.

کلیدواژه‌ها: لکه زرد، خسارت، شناسایی، درخت تبارشناسی، ژن COI

دبیر تخصصی: دکتر محسن مهرپرور

Citation: Tavakoli, M., & Hosseini-Chegeni, A. (2022). Occurrence of oak leaf *phylloxeran aphid*, *Phylloxera quercina* (Ferr.) on *Quercus brantii* in Lorestan province, western Iran. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 44(4): 123-133. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2021.17218

مقدمه

شته‌ها (فرو راسته Aphidomorpha) به عنوان یکی از مهم‌ترین گروه‌های آفات کشاورزی و جنگلی به صورت مستقیم با مکیدن شیره اندام‌های گیاهی و غیر مستقیم با انتقال عوامل بیماری‌زای گیاهی سبب ایجاد خسارت می‌شوند. از طرفی هم با ترشح بزاق سمی سبب بروز لکه‌های زرد بافت مردگی در گیاه و ایجاد بدشکلی در برگ‌ها، ساقه‌ها و ریشه‌ها و با تولید و ترشح عسلک به عنوان منبع غذایی برای قارچ‌های پوسیده‌خوار، سبب ایجاد منظره کپک سیاه و دوده‌ای روی برگ‌ها می‌شوند (Vilcinskas, 2016). چرخه زندگی شته‌ها اغلب پیچیده و شامل دوره‌های تولید مثل جنسی و غیرجنسی است و چندین نسل در سال تولید می‌کنند. اغلب گونه‌ها دارای دامنه میزبانی بسیار محدود هستند (Lin et al., 1999). شته‌ها دارای پراکنش جهانی هستند به طوری که در سراسر جهان تا سال ۲۰۲۱ تعداد گونه‌های بالاخانواده Aphidoidea بیش از ۵۲۰۰ گونه گزارش شده است (Favret, 2021). از این تعداد تقریباً ۱۷۸۵ گونه متعلق به ۲۷۰ جنس، تمام یا بخشی از چرخه زندگی خود را روی درختان تغذیه می‌کنند (Blackman & Eastop, 1994). حدود ۶۹ گونه شته در شش جنس، متعلق به خانواده Phylloxeridae می‌باشد (Favret et al., 2016).

به طور کلی ۲۲۵ گونه از شته‌ها در بیش از ۴۰ جنس از روی درختان بلوط در سراسر جهان شناسایی و گزارش شده است (Blackman & Eastop, 1994). برخی گونه‌های خانواده Phylloxeridae روی درختان بلوط (جنس *Quercus*) زندگی می‌کنند. از میان گونه‌های این خانواده فقط یک گونه فیلوکسرای مو *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch) آفت مهم کشاورزی محسوب می‌شود و بقیه روی درختان جنگلی و در اکوسیستم‌های غیرزراعی زندگی می‌کنند (Blackman & Eastop, 2007). شته‌های فیلوکسرای برگ درخت بلوط منحصراً تخم‌گذار هستند و چرخه زندگی پیچیده‌ای دارند که شامل فرم‌های جنسی و هم فرم‌های غیرجنسی (بکرزا) می‌باشد. زمستان‌گذرانی به صورت تخم در لابه لای درز و شکاف‌های پوسته شاخه‌های کوچک و یا گاهی اوقات به صورت پوره‌های سنین اول در قسمت‌های سرپوشیده روی شاخه‌ها اتفاق می‌افتد (Rezvani, 2001; Rezvani, 2004). گونه *Phylloxera quercina* در جدیدترین چک لیست شته‌های ایران به عنوان تنها گونه جنس *Phylloxera* گزارش گردیده است (Momeni Shahraki et al., 2019). در سال‌های ۲۰۰۳ و ۲۰۰۵ کاربرد و اهمیت روش‌های مولکولی تشخیصی بر پایه بخشی از قطعه بارکدینگ ژن COI (Hebert et al., 2003; Hebert & Gregory, 2005) معرفی شد. مطالعات در جهت شناسایی شته‌ها با استفاده از توالی‌های DNA همچنان ادامه دارد (Niu et al., 2021; Manzano et al., 2020). هدف اصلی از مطالعه حاضر شناسایی یک گونه شتهٔ تغذیه کننده از گونه بلوط *Q. brantii* به عنوان مسبب احتمالی بروز لکه‌های زرد بافت مردگی روی برگ‌های درخت‌های آلوده بود. تحقیق حاضر به منظور مشخص کردن هویت دقیق این آفت نوظهور با استفاده از ریخت شناسی و توالی‌یابی قسمتی از ژن COI طراحی و اجراء شده است.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه و جمع آوری نمونه

مطالعه حاضر به صورت متمرکز طی بهار سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۸ روی شته‌های مرتبط با درختان بلوط *Quercus brantii* در هشت مکان انتخاب شده عرصه‌های جنگلی اطراف شهر خرم‌آباد واقع در استان لرستان انجام گرفت. نمونه‌های شته از روی ۳ تا ۵ درخت و یا درختچه بلوط آلوده جمع آوری شدند. از هر درخت حداقل ۲۰ برگ و یا سرشاخه‌ها آلوده انتخاب و جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها در آزمایشگاه حفاظت و حمایت مرکز تحقیقات با استفاده از

استریومیکروسکوپ مورد بررسی و تعداد شته‌ها روی هر برگ شمارش شدند.

بررسی‌های ریخت شناسی و خسارت‌زایی

در شناسایی اولیه این شته با روش ریخت شناسی، عدم وجود کورنیکول در شته‌های این جنس سبب بروز ابهام در تشخیص این گونه گردید که به کارگیری ابزار مولکولی ضرورت اجتناب ناپذیری پیدا کرد. شناسایی گونه این شته بر اساس مطالعات مولکولی و تهیه اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از محیط مونت پوری (مخلوط نسبت مشخص صمغ عربی، اسید استیک غلیظ، کلرال هیدرات و آب) و با کمک گرفتن از کلیدهای شناسایی انجام گرفت. در ابتدا برای سرعت و سهولت در تشخیص براساس رویکرد معکوس از مولکولی به ریخت شناسی، تعدادی از نمونه‌های پوره به منظور انجام مطالعات مولکولی انتخاب شدند. سپس نمونه‌های بالغ با استفاده از کلیدهای تشخیصی (Blackman & Eastop, 1994; Rezvani, 2001) در سطح گونه شناسایی شدند. تصاویر مربوط به خسارت‌زایی شته فیلوکسرا روی درخت بلوط *Q. brantii* شامل تورم، پیچیدگی برگ، لکه و آثار خسارت روی نهالستان‌های بلوط در همان محل جمع آوری تهیه شدند.

بررسی‌های مولکولی

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

استخراج DNA با روش CTAB انجام شد (Doyle & Doyle, 1987). پس از اطمینان از کمیت و کیفیت DNA، محصول استخراج در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. از تعداد ۱۰ نمونه پول شده (pool) پوره شته، DNA استخراج شده برای PCR بخشی از ژن COI 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 مستقیم (10 µM) ۱: ۰/۴µM، آغازگر معکوس (10 µM) ۱: ۰/۴µM، نوکلئوتیدهای آزاد (10 mM-Bioflux®) ۰/۵: ۲۰۰ µM، آنزیم تک پلیمراز (5 U/µl-Bioflux®) ۰/۳: ۱/۵U و DNA الگو ۴: ۱۰۰ ng/µl– ۵۰ بودند. آغازگرهای استفاده‌شده شامل: رفت (C1-J-1718: 3'- GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA G -5') و برگشت (C1-N-2191: 3'- CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC -5') اقتباس از Simon et al. (۱۹۹۴) با کمی تغییرات (حذف –TTCC– از انتهای '5) بودند (Simon et al., 1994). چرخه دمایی بهینه برای تکثیر قطعه COI براساس الگوی دمایی تاچ داون (Touchdown) به صورت مرحله؛ دما (درجه سلسیوس)؛ زمان (ثانیه) عبارت بود از: ۱) واسرشته‌سازی اولیه؛ ۹۵؛ ۳۰۰، ۲) واسرشته‌سازی؛ ۹۴؛ ۵۰، ۳) اتصال؛ ۶۰–۵۰؛ 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 بررسی 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

نتیجه قطعات تکثیر شده مورد نظر برای توالی‌یابی به شرکت کدون، ایران (Codon Genetics Group®) ارسال گردید. توالی‌یابی برای ژن COI به صورت یک‌طرفه از سمت آغازگر مستقیم (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 ستون–نگار (کروماتوگرام) انجام گرفت. یک نمونه از محصولات PCR مثبت، توالی‌یابی و توالی بعد از ویرایش دستی در بانک ژن ثبت شد (MN197541).

مطالعات تبارشناسی

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

قبل از استفاده از توالی مورد نظر در مطالعات تبارشناسی، ابتدا توالی در قسمت بلاست تارنمای بانک جهانی ژن به آدرس 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، تعدادی از توالی‌های COI جنس *Phylloxera* بانک ژن براساس معیارهای درصد شباهت (present identity) و هم‌پوشانی (query cover) برای مقایسه با توالی‌های COI مطالعه حاضر در درخت تبارشناسی استفاده شدند. برای مقایسه توالی‌ها با یکدیگر همه توالی‌های مورد مطالعه توسط نرم‌افزار MEGA® (نسخه ۷) (Kumar et al., 2016) 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 محاسبه و به عنوان شاخص اندازه‌گیری میزان تنوع درون و بین گونه‌ای توالی‌های نوکلئوتیدی تاکسون‌های مطالعاتی در نظر گرفته شد. برای بازسازی روابط تکاملی و ساخت درخت تبارشناسی با روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) از نرم‌افزار مگا استفاده شد. بعد از ایجاد درخت تبارشناسی وضعیت تک‌نیایی جنس *Phylloxera* و موقعیت گروه خارجی *Phylloxerina*، حالت پلی‌تومی درخت، میزان صحت کلادهای اصلی براساس هزار بوت استرپ (Bootstrapping) و در نهایت قرابت تاکسون‌های کلاد این تحقیق نسبت به یکدیگر بررسی شد.

نتایج

بلاست

بلاست توالی در بانک ژن نشان داد که توالی پژوهش حاضر متعلق به جنس *Phylloxera* براساس ۹۰ تا ۹۵ درصد شباهت با توالی‌های این شته از کشورهای امریکا و کانادا (شماره‌های دسترسی AF307447, MG400169, MG400388, MG402289) می‌باشد.

بررسی‌های ریخت شناسی و نحوه خسارت زایی

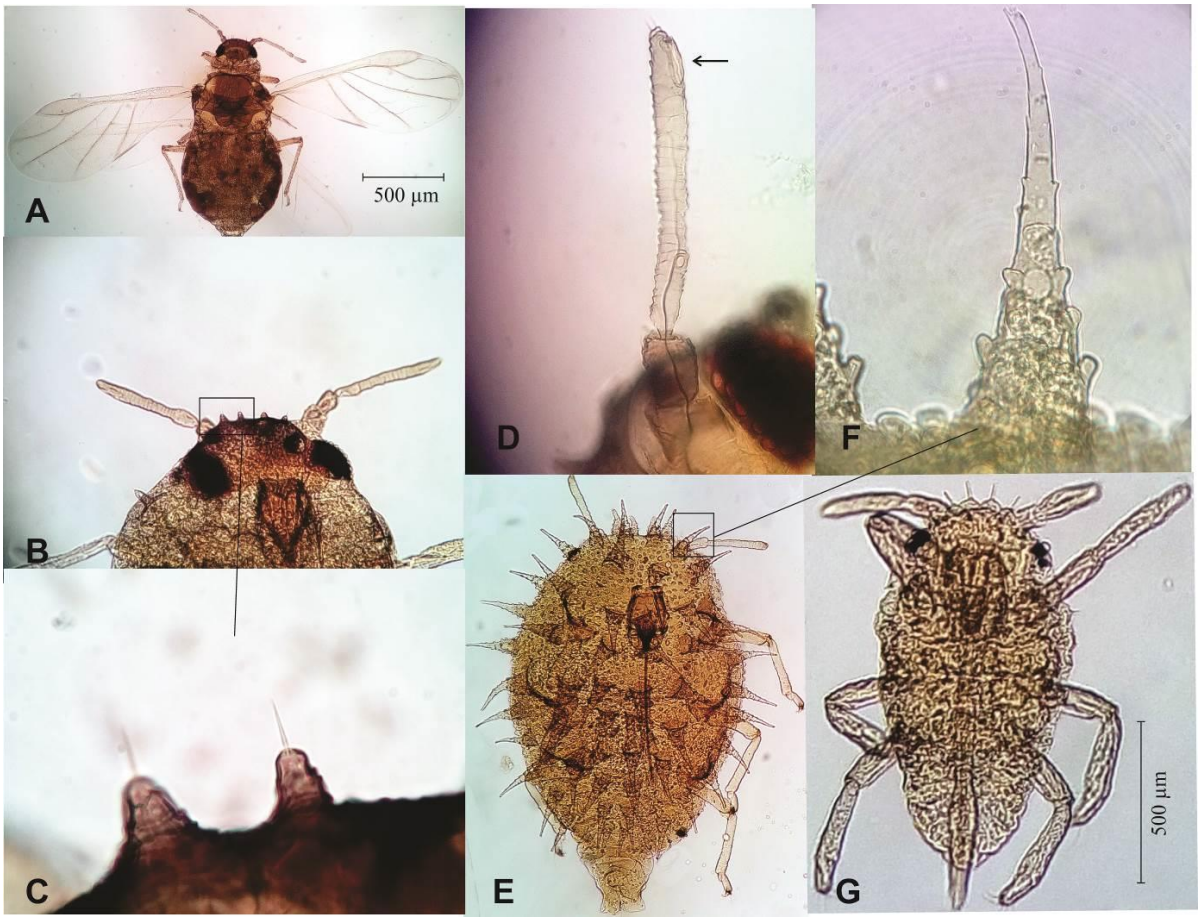
در پژوهش حاضر از ۸ مکان استقرار و طغیان شته فیلوکسرای بلوط نمونه‌برداری شد (جدول ۱). بعد از تأیید

جدول ۱- مشخصات محل جمع آوری نمونه‌های شته فیلوکسرای بلوط *Phylloxera quercina* (Phylloxeridae) در استان لرستان

Table 1. Collecting data of *Phylloxera quercina* (Phylloxeridae) in Lorestan province

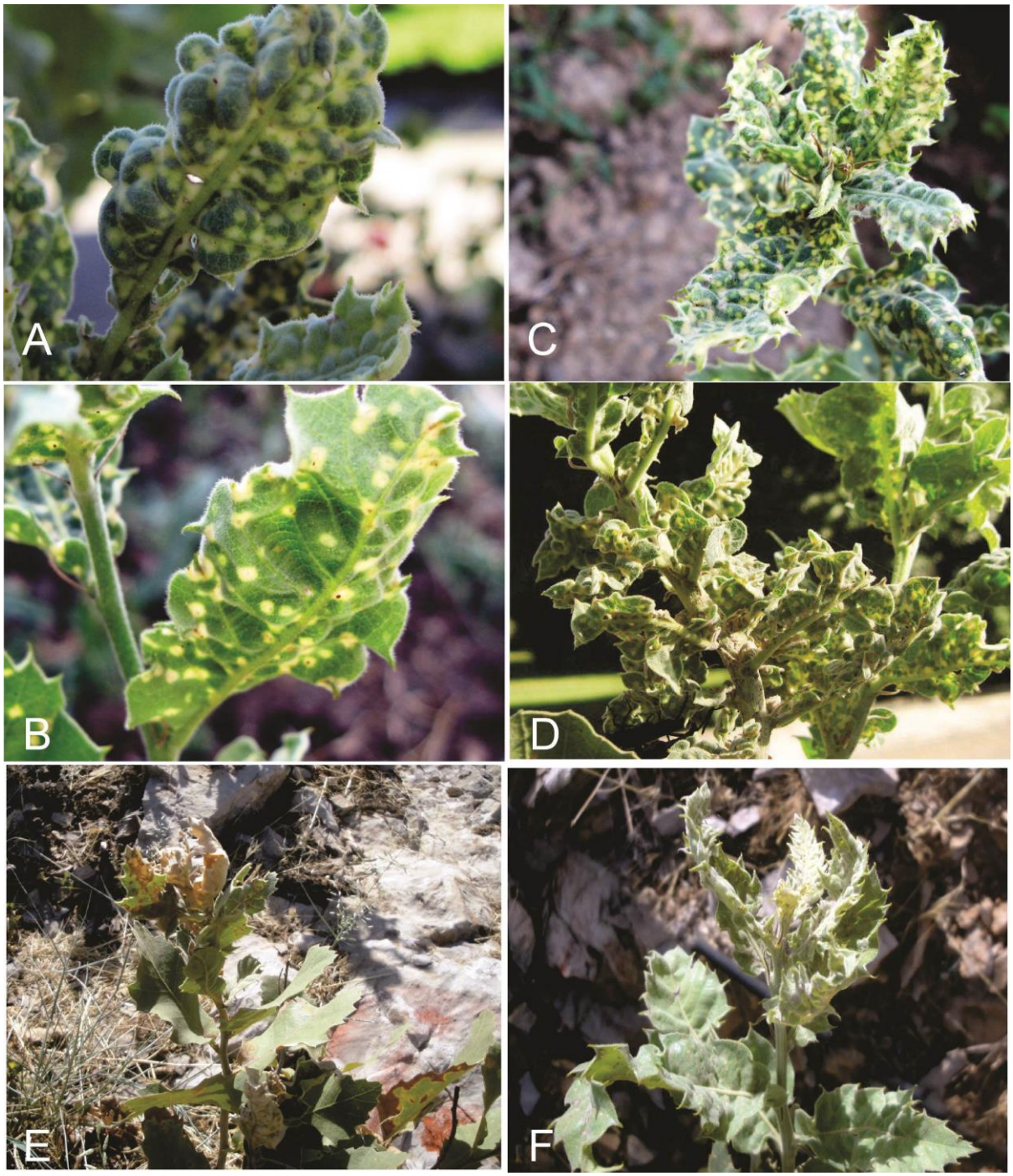
Collection site	Station	Coordinates	Altitude (a.s.l.)
Khorramabad – Agricultural Garden	1	48°20'53"E 33°30'02"N	1205
Sarab Dowreh	2	48°05'45"E 33°32'32"N	1161
Khorramabad – Ghale Gol	3	48°28'40"E 33°16'48"N	1973
Kuhdasht – Boluran	4	47°15'13"E 33°33'11"N	1707
Firuzabad – Eshaqabad	5	47°56'04"E 33°46'14"N	1386
Khorramabad – Cheshmeh Paryan	6	48°54'22"E 33°19'51"N	1492
Dorud – Gorkesh	7	48°55'38"E 33°13'24"N	1525
Aleshtar – Cham Takleh	8	48°05'43"E 33°43'44"N	1456

مولکولی جنس *Phylloxera*، نمونه‌های پوره و بالغ بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی به عنوان *Phylloxera quercina* (Ferrari, 1872) تشخیص (توسط نویسندگان با تأیید مولکولی) داده شدند. تحقیق حاضر اولین گزارش وقوع و خسارت زایی شته فیلوکسرای برگ بلوط با دامنه میزبانی نسبتاً وسیع بر روی گونه‌های مختلف بلوط در استان لرستان است. از جمله خصوصیات مرفولوژیک افتراقی در شناسایی این آفت، فقدان کورنیکول، دو شکلی (دای مورفیسم) خیلی واضح بین حشرات بالغ جنس نر و ماده، برجستگی‌های بخش میانی پیشانی سر و خارهای روی آن، ریناریا روی شاخک افراد بالغ، زائده انگشتی اطراف بدن ماده‌های بی بال بود (شکل ۱). حجم و شکل خسارت آفت روی درختان بلوط در برخی از مناطق محل خسارت آفت، در شکل ۲ آورده شده است. این درختان از سن تقریباً ۶ تا بیش از ۱۰۰ سال و ارتفاع آنها بین ۵ تا ۶ متر بوده است. در مطالعه حاضر شته فیلوکسرای بلوط *P. quercina* فقط روی درختان بلوط *Quercus brantii* مشاهده گردید.



شکل ۱- نمای کلی و برخی ویژگی های مورفولوژیک شته فیلوکسرای بلوط (Phylloxeridae) *Phylloxera quercina*؛ A: شته بالغ بال‌دار، B: سر از نمای شکمی همراه با برجستگی‌های بخش میانی پیشانی سر، C: برجستگی‌های سر و موهای روی آن، D: ریناریا روی شاخک حشره بالغ (پیکان)، E: ماده بی بال، F: زائده انگشتی اطراف بدن ماده بی بال، G: نمای کلی پوره.

Figure 1. Habitus and some morphological features of the oak leaf phylloxeran aphid, *Phylloxera quercina* (Phylloxeridae), A: Alate adult, B: Ventral view of head with tubercules on the middle part of front of head, C: Head tubercules and their spines, D: Rhinaria on adult antenna (arrow), E: Apterous female, F: Finger-like appendage around the body of apterae, G: nymph.



شکل ۲- خسارت زایی شته فیلوکسرای بلوط (Phylloxeridae) *Phylloxera quercina* روی درخت بلوط *Quercus brantii*؛ A: تورم شدید همراه با لکه برگ‌های آلوده، B: لکه همراه با تورم خفیف در برگ، C: تورم و لکه همراه با پیچیدگی برگ، D: تورم و لکه همراه با پیچیدگی شدید برگ، E و F: نهال‌های دو ساله درخت بلوط.

Figure 2. Damage of the oak leaf phylloxeran aphid, *Phylloxera quercina* (Phylloxeridae) on the oak tree *Quercus brantii*; A: Severe swelling combined with chlorotic spots on infested leaves, B: Chlorotic spots on the oak leaves combined with mild swelling, C: Swelling and chlorotic spots on the oak leaves combined with leaf twisting, D: Swelling and chlorotic spots combined with severe leaf twisting, E and F: Two-years-old oak seedlings.

این حشره در سطح زیرین برگ درختان بلوط مستقر شده و از شیره برگ‌ها تغذیه کرده و سبب ایجاد نقاط و یا لکه‌های زرد کوچک روی برگ می‌شود. این شته‌ها حشراتی ریز (۰/۹ تا ۱/۵ میلی‌متر)، فرم نابالغ گلابی شکل و به رنگ زرد یا نارنجی می‌باشد. فاقد کورنیکول در سطح پشتی شکم هستند و اغلب تشخیص آنها با پسیل اشتباه می‌شود. در طول سه سال، ۱۲۵۰ نمونه جمع آوری شد. سایت ۱ در سال ۱۳۹۶ آلوده‌ترین منطقه بود که ممکن است به دلیل وجود شدت آلودگی در نهال‌های بلوط حساس به شته باشد. اولین شته‌ها در آخرین روزهای اردیبهشت و اولین روزهای خرداد روی برگ‌های بلوط مشاهده شدند. اوج فعالیت (حداکثر تعداد شته در سطح برگ‌ها) از اواخر خرداد لغایت اوایل شهریورماه ثبت گردید. تشکیل لکه‌های زرد رنگ و نقاط نکروتیک متمایل به رنگ قهوه‌ای در سطح فوقانی برگ درختان با حضور و تغذیه شته‌ها شروع می‌شود. افراد بالغ و پوره‌های آنها به وفور لابلای کرک‌های سطح برگ مشاهده می‌شوند که گاهی توسط کفشدوزک‌ها مورد تغذیه قرار می‌گیرند. علاوه بر برگ، همچنین این شته به سرشاخه‌ها و جوانه‌های قسمت‌هایی تحتانی درختان و نهال‌های کاشته شده درخت بلوط (*Quercus brantii*) در مناطق مورد بررسی خسارت وارد می‌کند.

در موارد آلودگی شدید تأثیر آفت روی نهال‌های بلوط شامل تضعیف، کاهش یا توقف رشد و حتی خشکاندن درخت به همراه سایر عوامل استرس‌زا مانند خشکسالی پس از چندین سال متوالی، کاهش رشد، تغییر شکل و یا خزان زودرس برگ‌ها بوده است. صدمات وارده به درختان میزبان با هر نسل جدید شته در طول سال افزایش یافته است. حساسیت درختان و درختچه‌های جوان بلوط گونه *Q. brantii* در مناطق مورد بررسی نسبت به گونه *Q. infectoria* بسیار بیشتر بود. در مواردی بسیاری از آنها هیچ نشانه‌ای از ضعف یا خزان برگ‌ها نداشتند (مشاهدات شخصی). علاوه بر این، مطالعات انجام شده طی ۳ سال نشان داد که آلودگی به درختان دیگر پیشرفت نکرده بود.

مطالعات تبارشناسی

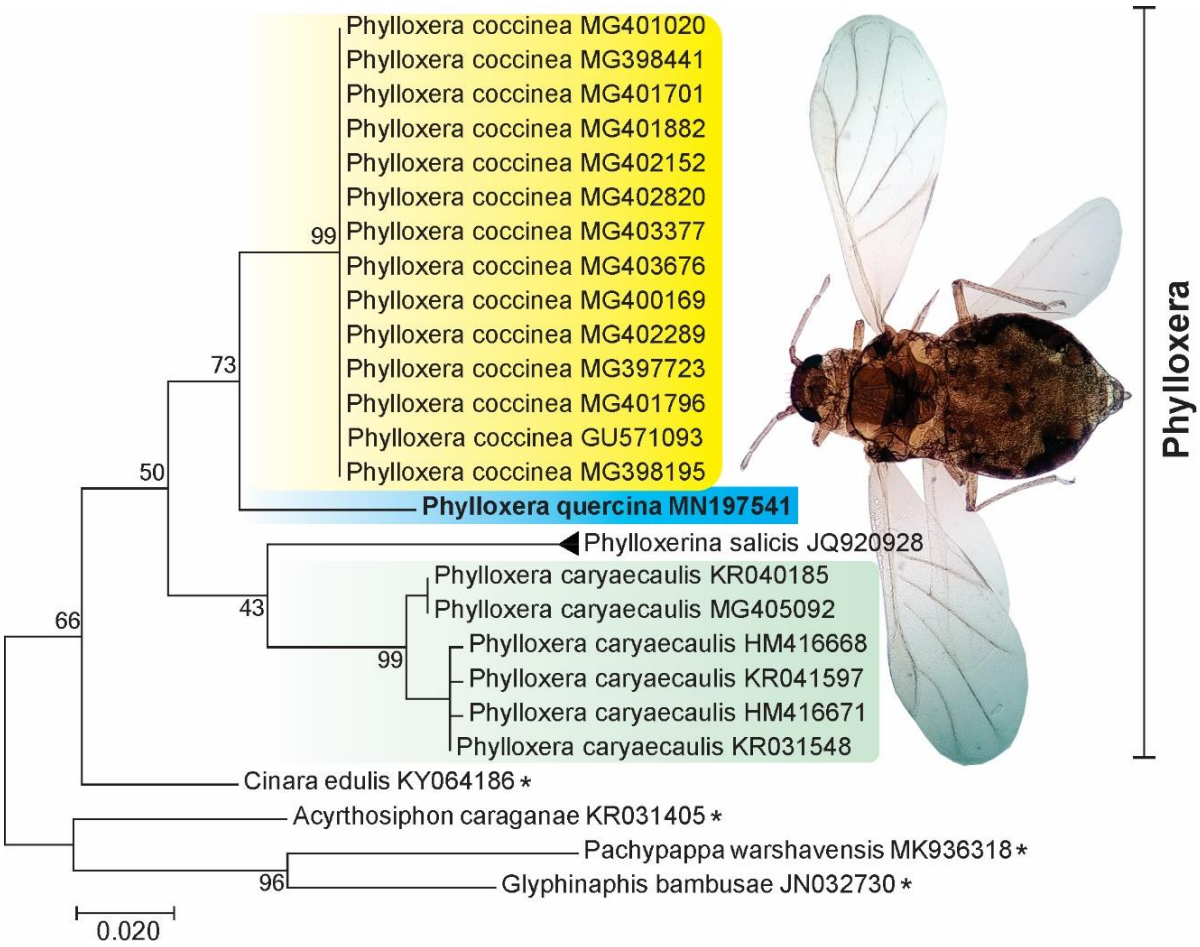
فواصل ژنتیکی به عنوان شاخص تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و بین گونه‌ای قسمتی از توالی COI محاسبه شده با نرم افزار مگا با مدل MCL برای گونه‌های *Phylloxera quercina* (von Heyden, 1837)، *P. coccinea* (Fitch, 1855)، *P. caryaecaulis* (Lichtenstein, 1884)، *Phylloxerina salicis* (Cholodkovsky, 1908)، *Acyrthosiphon caraganae* (Wilson, 1919)، *Cinara edulis* (Outgroup) و گروه خارجی *Pachypappa warshavensis* (Nasonov, 1894) و *Glyphinaphis bambusae* van der Goot, 1917 در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲- تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و بین گونه‌ای توالی‌های COI شته‌های خانواده Phylloxeridae در پژوهش حاضر و توالی‌های بانک ژن. مقادیر تنوع درون کلاد (درون گونه‌ای) به صورت اریب و پررنگ در جدول آورده شده است.

Table 2. Inter- and intraspecific genetic variation among *COI* sequences of Phylloxeridae in this study and GB data bank. Within-clade divergences (intraspecies) are shown as diagonal (in bold)

Species (GenBank accession number)	1.	2.	3.	4.
1. *Phylloxera quercina* (MN197541)				
2. *Phylloxera coccinea* (GU571093, MG397723, MG398195, MG398441, MG400169, MG401020, MG401701, MG401796, MG401882, MG402152, MG402289, MG402820, MG403377, MG403676)	5	**0**		
3. *Phylloxera caryaecaulis* (HM416668, HM416671, KR031548, KR040185, KR041597, MG405092)	9	8	**1**	
4. *Phylloxerina salicis* (JQ920928)	14	12	11	

درخت تبارشناسی مربوط به گونه ذکر شده و توالی‌های بانک ژن در شکل ۳ آورده شده است. گونه *P. salicis* از جنس *Phylloxerina* نزدیک به جنس *Phylloxera*، خارج از کلاد *Phylloxera* در درخت تبارشناسی قرار گرفت. درخت تبارشناسی به صورت یک درخت کاملاً تفکیک شده (Fully resolved) یعنی تک‌نیایی بودن جنس *Phylloxera*، حالت دو شِقی (Dichotomy) و میزان‌های صحت (آزمون بوت استرپ) با نمره نزدیک به کامل (۹۹ درصد) در محل گِره‌های کلادهای اصلی به دست آمد.



شکل ۳- بازسازی روابط تکاملی با استفاده از درخت تبارشناسی استنباط شده از توالی‌های قسمتی از ژن COI پژوهش حاضر و بانک ژن با روش حداکثر درست‌نمایی (ML)؛ توالی مطالعه حاضر (با فونت درشت) درون کلاد *Phylloxera* و کلادهای اصلی درون کادرهای رنگی هست. ترتیب توالی‌ها به صورت جنس، گونه و شماره دسترسی بانک ژن همراه با مقادیر بوت استرپ در محل گِره‌ها می‌باشد. گونه‌های *Pachypappa warshavensis* و *Glyphinaphis bambusae* به عنوان گروه خارجی مد نظر بوده است. تاکسون‌های غیر فیلوکسر با علامت ستاره (*) مشخص شده اند.

Figure 3. Reconstruction of evolutionary relationships using a phylogenetic tree of inferred partial *COI* sequences of this study and GB data bank constructed by Maximum Likelihood (ML) method; A sequence of the present study (as bold) located inside the *Phylloxera* clade. Main clades enclosed by the color boxes. The order of all sequences is in the form of genus, species and GB accession number with bootstrap support values located at the node places. *Pachypappa warshavensis* and *Glyphinaphis bambusae* species were considered as outgroups. Non-phylloxerid taxa are marked with asterisk (*)

بحث

مطالعه حاضر اولین گزارش شته *Phylloxera quercina* از منطقه رویشی زاگرس است. در ایران این آفت قبلا توسط رضوانی (Rezvani, 2001) از روی نهال‌های بلوط *Quercus castaneifolia* واقع در نهالستان‌های استان گلستان گزارش شده است. گونه *P. quercina* از قسمت زیرین برگ‌های گونه‌های برگ‌ریز و همیشه سبز بلوط‌های جنس *Quercus* (Fagaceae) تغذیه می‌کند (Blackman & Eastop, 1994). گونه *P. quercina* شایع‌ترین گونه‌ای است که باعث آسیب رساندن به درختان بلوط در ایتالیا، به ویژه در مناطق شهری و حومه می‌شود (Croci et al., 2012). حضور و افزایش جمعیت این گونه در زاگرس احتمالا پیامد تغییرات آب و هوایی و اثرات فعالیت‌های انسانی می‌باشد. درختان جوان مستعدتر به این آلودگی می‌باشند که به دلیل فعالیت شدید تغذیه‌ای این شته برگ‌های آنها ضعیف و از بین می‌روند. خسارت این شته توام با سایر عوامل تنش‌زای محیطی و بیماری‌زا می‌تواند به زوال درختان بلوط منجر شود (Lubiarz, 2007; Hallquist et al., 2009). شته‌ی دیگر از جنس *Phylloxera* به نام *P. quercus* از مناطق مدیترانه‌ای، ایتالیا، اسرائیل، پرتغال، اسلوونی، ترکیه و الجزیره از روی درخت بلوط گزارش شده است (Blackman & Eastop, 2007; Lubiarz, 2007; Laamari, 2016). شته *P. quercus* در کشور عراق طی چند سال متوالی و در طول آلودگی‌های شدید سبب خشکیدگی درختان جوان بلوط شده است (Mohammad & Abdulla, 1985).

با توجه به این‌که شته *P. quercina* یک آفت خسارت‌زا برای درختان و درختچه‌های بلوط محسوب می‌شود پیشنهاد می‌شود گونه‌های دیگر جنس *Phylloxera* در ایران به‌ویژه شته‌های فیلوکسر آفت درختان بلوط در زاگرس و ناحیه هیرکانی مورد مطالعه و هویت آنها با استفاده از ژن COI مورد تأیید قرار گیرد. در نهایت پیشنهاد می‌شود اقدامات ذیل صورت گیرد؛ الف) عملیات پایش سالیانه درختان و نهال‌های بلوط از نظر وجود این آفت. ب) مشخص کردن مناطق پراکنش آفت، از نظر جغرافیایی، توپوگرافی و شرایط اقلیمی. ج) انجام مطالعات تکمیلی در رابطه با نوسانات جمعیتی و دشمنان طبیعی این آفت. د) مقایسه گونه‌ها و هیبریدهای مختلف درخت بلوط از نظر میزان آلودگی در مناطق مختلف رویشی زاگرس. ه) کنترل آفت با استفاده از روش‌های سازگار با محیط زیست شامل حمایت از دشمنان طبیعی مانند کفشدوزک‌های شکارگر و زنبورهای انگل واره.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مراتب سپاس‌گزاری خود را از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی لرستان ابراز می‌دارند.

REFERENCES

Vilcinskas, A. (2016). Preface. In A. Vilcinskas (Ed.). *Biology and ecology of aphids* (pp. V–VII). London UK, CRC Press.

Lin, H., Downie, D. A., Walker, M. A., Granett, J., & English-Loeb, G. (1999). Genetic structure in native populations of grape *Phylloxera* (Homoptera: Phylloxeridae). *Annals of the Entomological Society of America*, *92*(3), 376–381. https://doi.org/10.1093/aesa/92.3.376

Favret, C. Aphid species file. Version 5.0/5.0. 2021 [cited 2021 07 November 2021]. Available from: http://Aphid.SpeciesFile.org.

Blackman, R. L., & Eastop, V. F. (1994). Aphids on the world's trees. an identification and information guide. Wallingford Oxon UK, CABI. 986 pp.

Favret, C., Blackman, R. L., Miller, G. L., & Victor, B. (2016). Catalog of the phylloxerids of the world (Hemiptera, Phylloxeridae). *ZooKeys*, *629*, 83-101.

Blackman, R. L., & Eastop, V. F. (2007). Taxonomic issues. In H. F. van Emden, & R. Harrington (Eds.), *Aphids as crop pests* (pp. 1–29). Wallingford UK, CAB International.

Rezvani, A. (2001). Key to the identification of Iranian aphids. Tehran Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). 289 pp. [In Persian]

Rezvani, A. (2004). Aphids on trees & shrubs in Iran. Tehran Iran, Plant Pests and Diseases Research Institute. 289 pp. [In Persian]

Momeni Shahraki, F., Minaei, K., & Barjadze, S. (2019). Checklist of Iranian Aphids (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphidomorpha). *Journal of Insect Biodiversity and Systematics*, *5*(4), 269–300.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, *270*, 313–321. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218

Hebert, P. D. N., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, *54*(5), 852–859. https://doi.org/10.1080/10635150500354886

Niu, R., Gao, X., Luo, J., Wang, L., Zhang, K., Li, D., Ji, J., Cui, J., Zhu, X., & Zhang, S. (2021). Mitochondrial genome of *Aphis gossypii* Glover cucumber biotype (Hemiptera: Aphididae). *Mitochondrial DNA Part B*, *6*(3), 922–924. https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1888328

Manzano, M. R., Tálaga-Taquinas, W., Melo-Cerón, C. I., Lagos-Álvarez, Y. B., Duque-Gamboa, D. N., & Toro-Perea, N. (2020). Identification and life history of aphids associated with chili pepper crops in southwestern Colombia. *Universitas Scientiarum*, *25*(2), 175–200. https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC25-2.ialh

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, *19*, 11–15.

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. https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(7), 1870–1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

Croci, F., Bracalini, M., Bonuomo, L., Tiberi, R., & Niccoli, A. (2012). Bioecology of oak *Phylloxera* and its natural enemies on urban and peri-urban holm oaks. *IOBC-WPRS Bulletin*, *76*, 263–270.

Hallquist, M., Wenger, J. C., Baltensperger, U., Rudich, Y., Simpson, D., Claeys, M., Dommen, J., Donahue, N., George, C., & Goldstein, A. (2009). The formation, properties and impact of secondary organic aerosol: current and emerging issues. *Atmospheric Chemistry and Physics*, *9*(14), 5155-5236.

Lubiarz, M. (2007). Life cycle and number dynamics of *Phylloxera* sp. on pedunculate oak (*Quercus robur* L.) in industrial and protected areas. *Aphids and other Hemipterous Insects*, *13*, 137–144.

Laamari, M. (2016). First report of *Phylloxera quercus* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae) in Algeria. *EPPO Bulletin*, *46*(3), 576–579. https://doi.org/10.1111/epp.12323

Mohammad, M., & Abdulla, A. (1985). Ecological studies on a corn aphid *Phylloxera quercus* Boyer (Phylloxeridae, Homoptera) in Iraq. *Zanco (Iraq)*, *3*(1), 69-76 [In Arabic].

© 2022 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)
44(4), Winter, 2022

doi 10.22055/ppr.2021.17218

Occurrence of oak leaf phylloxeran aphid, *Phylloxera quercina* (Ferr.) on *Quercus brantii* in Lorestan province, western Iran

M. Tavakoli[1] and A. Hosseini-Chegeni[2*]

1. Instructor Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Research Center of Agriculture and Natural Resource of Lorestan, Khorramabad, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran (Hosseinichegeni@gmail.com)

Received: 4 September 2021 Accepted: 5 December 2021

Abstract

Background and Objectives

Aphids are one of the most important agricultural and forest pests that may directly injure by sucking the sap of plant organs and indirectly by the transmission of microbial pathogen agents into the plant hosts. Moreover, other indirect forms of damage from feeding may be seen as gall formation, deformation of plant organs, chlorosis / necrosis spotting of the leaves all three due to the injection of poisonous saliva, and the presence of sooty mold view resulting in the honeydew excretion as a food source for the saprophytic fungi. The number of aphids is currently more than 5200 species, of which about 69 species within six genera belong to the family Phylloxeridae. Apart from the grape *Phylloxera*, a commercial pest of grapevines worldwide, the habitats of remaining species are forest trees and non-agroecosystems. The oak leaf phylloxeran aphids have a complex life cycle as exclusively egg-laying with parthenogenic forms. These aphids overwinter as egg inside seams and shell gaps of small branches or sometimes as first nymphal instar in branches. This study aimed to identify an aphid species feeding of Brant's oak, *Quercus brantii*, as a probable cause of yellow chlorosis spotting on the leaves of infected trees. Various methods have been proposed to assign unknown specimens to known species using their DNA barcodes.

Materials and Methods

Aphid specimens were collected on *Q. brantii* oak trees in eight selected forest sites around Khorramabad County, Lorestan Province. They were identified based on molecular and morphological evidences and was subjected to molecular characterization. DNA sequencing of partial *COI* gene fragment was performed, and the phylogeny of this species was compared with other species within the genus *Phylloxera*. In order to identify, the mounted aphid samples (microscopic slides) were morphologically identified by the conventional method under a light microscope with the help of taxonomical keys.

Results
Samples were recognized as *Phylloxera quercina* (Ferrari, 1872) based on molecular and morphological identification. The phylogenetic tree was constructed as a fully resolved tree with *Phylloxera* genus as monophyly, dichotomous branching, and near-full bootstrap values.
Discussion
The present study is the first report showing the occurrence of *P. quercina* as a pest in the Zagros vegetation zone. Here we suggest the annual monitor of seedling oak and investigation of the geographical distribution of pest species. The utility of COI barcode gene fragment, along with the morphological characters, can help accurately identify *Phylloxera* species in Iran.

Keywords: Yellow spotting; Damage; Identification; Phylogenetic tree; COI Gene

Associate editor: M. Mehrparvar (Ph.D.)

Citation: Tavakoli, M., & Hosseini-Chegeni, A. (2022). Occurrence of oak leaf *phylloxeran aphid*, *Phylloxera quercina* (Ferr.) on *Quercus brantii* in Lorestan province, western Iran. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 44(4): 123- 133. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2021.17218