

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف موربانه *Microcerotermes diversus* (Isoptera: Termitidae) COII با استفاده از ژن

الهام اکبریان فیروزآبادی^{۱*}، بهزاد حبیب‌پور^۲، حمید گله‌داری^۳ و پرویز شیشه‌بر^۴
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار، دانشیار و استاد
دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
(تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۲۳ - تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲)

چکیده

موربانه (*Microcerotermes diversus* (Isoptera: Termitidae)) یک آفت مهم چوب در استان خوزستان بوده که خسارت‌های اقتصادی جدی را به لوازم سلولزی وارد می‌نماید. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی این آفت، ۱۳ جمعیت از نقاط مختلف استان خوزستان به علاوه ۲ نمونه از جزیره خارک و بندرعباس جمع‌آوری گردید. بعد از استخراج ژنوم، یک قطعه با طول ۴۸۶ جفت باز از ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز دو (COII) تکثیر و سپس تعیین توالی گردید. آنالیز پیشینه پارسیمونی با استفاده از نرم‌افزار Mega4 انجام شد. مشخصات تبارنمای حاصل به این شرح بود: طول درخت: ۲۳۷، شاخص ثبات: ۰/۷۷۲۱ و شاخص نگهداری: ۰/۸۶۶۶. در این تبارنما، ۱۵ جمعیت، به استثناء ۲ گروه خارجی، در ۲ شاخه فیلوژنتیکی قرار گرفتند. اختلاف ژنتیکی میان جمعیت‌ها با استفاده از مدل Kimura-2parameter از صفر تا ۰/۱۱۷ تخمین زده شد که سطح پایینی از تنوع ژنتیکی را بیان می‌کند و نشان می‌دهد که جمعیت‌های مورد بررسی از هم جدا نبوده و ارتباط بالایی بین آنها وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: استان خوزستان، پیشینه پارسیمونی، اختلاف ژنتیکی

مقدمه

تأسیسات شهری و روستایی خسارت‌های قابل توجهی وارد کنند (Badawi et al., 2008)، این خسارت‌ها از طریق تغذیه از چوب‌ها و یاف سلولزی بکار برده شده در ساختمان‌ها، لباس، کتاب و هر گونه لوازم و وسایلی که در آنها مواد سلولزی وجود داشته باشد صورت می‌گیرد. موربانه‌ها با از بین بردن تیرهای چوبی در سیستم انتقال برق و شبکه‌های مخابراتی اختلال ایجاد می‌کنند، به انبارهای تسلیحات نظامی، موزه‌ها، آزمایشگاه‌ها، کتابخانه‌ها و اطاق‌های بازرگانی خسارت‌های جبران ناپذیری وارد می‌آورند، که از این لحاظ زیان‌های اقتصادی به ساختمان‌های چوبی، الوار و

موربانه‌ها راسته قدیمی از حشرات اجتماعی هستند که خاستگاه آنها به اوایل دوره کرتاسه در حدود بیش از ۱۲۰ میلیون سال قبل بر می‌گردد (Bergamaschi et al., 2007) این حشرات در دستگاه گوارش خود حاوی میکروارگانیسم‌های همزیست شامل پروتوزئرها، باکتری‌ها و قارچ‌ها بوده و از لحاظ اکولوژیکی، مهمترین تجزیه کنندگان لیگنوسلولز محسوب می‌شوند که قادر به تجزیه چوب‌های پوسیده و تبدیل آنها به مواد آلی و در نتیجه غنی‌سازی خاک می‌باشند (Husen et al., 2006) از طرفی این حشرات می‌توانند به ساختمان‌ها و

بروز خسارت‌های جبران ناپذیر به لوازم چوبی مشاهده شده است (Soleiman-Nejadian, 1991). بررسی‌ها نشان می‌دهد که گونه *diversus Microcerotermes* از خانواده Termitidae یک آفت مهم چوب در استان خوزستان بوده که خسارت‌های اقتصادی جدی را به لوازم سلولزی وارد می‌نماید این گونه دارای حوزه جستجوگری غذای وسیع بوده و توانایی ایجاد اجتماعات ثانویه در دیوارها و سقف اماکن و نیز روی درختان را دارد. این موربانه در کشورهای ایران، عراق، کویت، عمان، عربستان و امارات متحده عربی انتشار دارد و در ایران هم از استان‌های خوزستان، بوشهر، سیستان و بلوچستان و یزد گزارش شده است (Habibpour, 1994).

اگرچه پیشرفت‌های اخیر در فن‌آوری و اطلاعات مولکولی در اغلب گروه‌های حشرات برای شناسایی و بررسی‌های فیلوژنتیکی آنها استفاده شده است، اما براساس منابع موجود در مطالعات ژنتیکی انجام شده بر روی گونه‌های مختلف موربانه‌ها در دنیا، متأسفانه تاکنون هیچ گونه بررسی ژنتیکی از موربانه مخرب *M. diversus* نه تنها در ایران بلکه در جهان نیز گزارش نگردیده است، اما در مطالعات ژنتیکی انجام شده بر روی موربانه‌های دیگر Austin et al. (2006) با استفاده از ۶۴۰ جفت باز از توالی ژن COII موربانه Shiraki *Coptotermes formosanus* را در ۲ قاره آمریکا و آسیا مورد بررسی قرار دادند که در این مطالعه تنوع ژنتیکی پایینی مشاهده گردید. در مطالعه دیگر، Tripodi et al. (2006) برای تعیین وسعت تنوع ژنتیکی گونه *Reticulitermes flavipes* (Kollar) در کالیفرنیا، از محل‌های مختلف نمونه‌برداری انجام دادند، که با استفاده از ژن COII حدود ۱۹ هاپلوتیپ مشاهده گردید. Nobre et al. (2006) توالی نوکلئوتیدی ژن COII در موربانه جنس *Reticulitermes* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور پرتغال را مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی تنوع ژنتیکی و نحوه توزیع جغرافیایی این جنس مورد ارزیابی قرار گرفت که در حدود ۲۰ هاپلوتیپ مشاهده گردید و تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی حاصل به ترتیب ۰/۰۰۸ و ۰/۹۵۶ درصد به دست آمد. پر واضح است که شناسایی دقیق زیست‌شناسی،

درختان یک مشکل جدی در جوامع شهری و روستایی محسوب می‌شود (Ghayourfar, 2005). از این‌رو شناسایی صحیح، آگاهی از وضعیت سیستماتیکی و همچنین بررسی تکاملی و ژنتیکی موربانه‌ها به خصوص در سطح جمعیت‌های یک گونه در بکارگیری تاکتیک‌ها و سموم مناسب به کنترل صحیح آنها کمک می‌کند (Badawi et al., 2008).

روش‌های قدیمی مطالعه موربانه‌ها اغلب از خصوصیات مرفولوژیکی مانند شکل و ساختمان آرواره‌ها، شکل و طول سر، عرض سر، طول پروتوم و ساق پا استفاده می‌نماید. در این روش‌ها به دلیل اینکه تفاوت‌ها واضح نشان داده نمی‌شود چالش‌هایی پیش روی محققین مختلف قرار دارد (Badawi et al., 2008)، اما در مقابل بررسی ژنتیکی موربانه‌ها می‌تواند در شناسایی مشکلات بالقوه و استراتژی‌های کنترلی مؤثرتر و همچنین به حفاظت منابع طبیعی کمک کند (Sobti et al., 2009).

ژنوم میتوکندریایی جانوری یک مولکول کوچک حلقوی در اندازه ۱۵ تا ۱۸ کیلو جفت باز می‌باشد (Stewart, 2005)، ژن‌های میتوکندریایی نسبت به ژن‌های هسته‌ای با دقت بیشتری قادر به بررسی نمودن موربانه‌ها از لحاظ ژنتیکی هستند (Yeap et al., 2007)، که در این میان ژن COII دارای بیشترین موفقیت بوده که به طور گسترده در بررسی فیلوژنی مولکولی، اختصاصات گونه‌ای، خصوصیات ارثی جمعیت‌ها، مطالعه تنوع و توزیع جغرافیایی موربانه‌ها استفاده می‌شود (Long et al., 2009).

در حال حاضر موربانه‌ها دارای ۲۸۰ جنس و بیش از ۲۶۰۰ گونه هستند که در درون ۷ خانواده و ۱۴ زیر خانواده جای می‌گیرند (Lee et al., 2005). خانواده Termitidae از موربانه‌های زیرزمینی یکی از بزرگترین خانواده‌ها با تقریباً ۸۵ درصد از همه جنس‌های شناخته شده و نزدیک به ۷۰ درصد از گونه‌ها می‌باشد (Ohkuma et al., 2003).

در استان خوزستان از دیرباز به دلیل عدم رعایت اصول پیشگیری در هنگام ساختمان‌سازی و نیز عدم بکارگیری مواد محافظت‌کننده از چوب و عدم سم‌پاشی در زمان مناسب، هجوم موربانه‌ها به داخل ساختمان‌ها و

در بن‌ماری در طول شب قرار داده شدند و بعد از آن با اضافه نمودن ۵۰۰ میکرولیتر محلول فنول-کلروفرم-ایزو آمیل الکل در دو مرحله جداگانه، دو بار سانتریفیوژ گشته و با اضافه نمودن استات سدیم به میزان یک دهم و اتانول مطلق در دو برابر حجم محلول و سپس ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد و سانتریفیوژ کردن آنها و در نهایت اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE EDTA, (Tris و آب مقطر)، ژنوم مورد نظر استخراج شد.

بررسی DNA تخلیص شده: بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد کیفیت ژنوم استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز Polymerase Chain Reaction (PCR): برای تکثیر ژن COII، از آغازگرهای زیر استفاده شد:

ACO2R: 5'-ACAAGACAGAGCATCGCCAGTCA-3'
ACO2F: 5'-AGTCGCCAGGTGTTGCGTC-3'

واکنش های PCR با ترموسایکلر Corbett و در حجم ۲۵ میکرولیتری (بافر Taq PCR ۱۰×/۲، آغازگر رفت و برگشت ۲/۵، Mgcl2 ۰/۷۵، DNTPs ۰/۵، Taq polymerase ۰/۵ ddH2O، ۱۴/۲۵ و ژنوم ۱/۵ میکرولیتر) انجام شد. سیکل حرارتی شامل: زمان واسرشته‌سازی مقدماتی ۹۴ درجه در ۵ دقیقه، واسرشته‌سازی ۹۴ درجه در ۳۰ ثانیه، اتصال ۶۲ درجه در ۳۰ ثانیه، گسترش ۷۲ درجه در ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی ۷۲ درجه در ۵ دقیقه.

انجام الکتروفورز: بر روی ژل آگارز ۲ درصد نتایج آزمون PCR الکتروفورز و بررسی گردید.

تعیین توالی: تعیین توالی از روش Sanger و با دستگاه ABI 3730 Sequencer، توسط شرکت ماکرو ژن کره جنوبی صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل نتایج: توالی‌های به دست آمده در نرم‌افزار Chromas خوانده شده، سپس با استفاده از نرم‌افزار Viewer 6 CLC Sequence هم‌ردیف‌سازی گردیده و در نرم‌افزار Mega4 ذخیره شدند و درخت فیلوژنتیکی مورد نظر رسم گردید. در این مطالعه از دو توالی ژن COII گونه *M. minutus* با شماره دسترسی AB193236 و گونه *M. crassus* با شماره دسترسی AY940137 به عنوان گروه خارجی^۱ برای مقایسه

اکولوژی، ساختار جمعیتی و ژنتیکی جمعیت‌های مختلف موربانه‌ها اولین گام برای اتخاذ تصمیمات اساسی برای مبارزه با این آفات می‌باشد و لذا این مطالعه با فرض اینکه بین جمعیت‌های مختلف جمع‌آوری شده اختلاف ژنتیکی وجود داشته و با هدف بررسی ژنتیکی گونه مورد نظر انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری در سال ۱۳۸۸ از برخی مناطق استان خوزستان و همچنین از دو شهر بندرعباس و جزیره خارک صورت پذیرفت (جدول ۱). در آزمایشگاه نمونه‌ها برای مطالعه ژنتیکی تا زمان استخراج DNA در اتانول مطلق و در فریزر در دمای ۲۰- نگهداری شدند.

جدول ۱- محل جمع‌آوری و کد نمونه‌های موربانه *M. diversus* استفاده شده در مطالعه ژنتیکی

کد نمونه	محل نمونه‌برداری
T1	اهواز (گلستان)
T2	اهواز (میدان شهدا)
T3	اهواز (کیانپارس)
T4	اهواز (۲۴متری)
T5	۱۰ کیلومتری اهواز
T6	ملاتانی
T7	شوشتر
T8	شوش
T9	هفت تپه
T10	امیدیه
T11	رامهرمز
T12	دزفول
T13	بهبهان
T14	بندرعباس (استان هرمزگان)
T15	جزیره خارک (استان بوشهر)

استخراج DNA از نمونه‌ها: استخراج ژنوم از ۱۵ جمعیت موربانه جمع‌آوری شده با استفاده از روش Salting out (رسوب گذاری بوسیله محلول های نمکی) صورت پذیرفت. در این روش عملیات استخراج به طور میانگین بر روی حدود ۳۵ موربانه کارگر از هر جمعیت صورت گرفت که در ابتدا نمونه‌ها با استفاده از ۷۰۰ میکرولیتر بافر (TNESEDTA, Tris, Nacl, SDS, Urea) و آب مقطر (و ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز k در یک میکروتیوپ هم زده شده و در دمای ۵۵ درجه سلسیوس

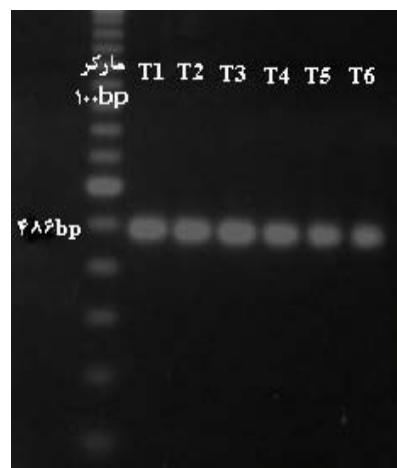
استفاده شد.

بازها برای $A=0/38$ ، $T=0/25$ ، $C=0/22$ ، $G=0/15$ ، $A+T=0/63$ و $C+G=0/37$ بود. تبارنمای موجود با استفاده از آنالیز بیشینه پارسیمونی به دست آمد (شکل ۲)، که در این تبارنما به جز ۲ گروه خارجی، ۱۵ جمعیت مورد بررسی در ۲ شاخه فیلوژنتیکی (clade) به صورت جداگانه قرار گرفتند، که هر کدام از این شاخه‌ها نیز به ۲ زیر شاخه (subclade) تقسیم گردیدند. در یکی از شاخه‌ها موربانه‌های جمع‌آوری شده از ۶ منطقه مختلف اهواز به همراه شهرهای شوش، شوشتر، هفت تپه، امیدیه، رامهرمز و جزیره خارک و در شاخه دیگر موربانه‌های دزفول، بهبهان و بندرعباس قرار گرفتند.

آنالیز پارسیمونی با طول درخت ۲۳۷ مقدار شاخص ثبات را $0/7721$ و مقدار شاخص نگهداری را نیز $0/8666$ نشان داد. مقدار فاصله ژنتیکی میان توالی‌های به دست آمده از ۱۵ جمعیت مورد بررسی به همراه ۲ گروه خارجی با استفاده از مدل Kimura-2 parameter به دست آمد (جدول ۲). براین اساس دامنه اختلافات ژنتیکی بین ۱۵ جمعیت مورد نظر از صفر تا $0/117$ درصد متغیر بود. همچنین درصد اختلاف ژنتیکی ۲ گروه خارجی نسبت به ۱۵ جمعیت مورد مطالعه از $0/106$ تا $0/138$ درصد برای گونه *M. minutus* و $0/939$ تا $1/036$ درصد برای گونه *M. crassus* حاصل گردید.

نتایج

ناحیه ای با طول ۴۸۶ جفت باز از ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز دو در طی فرایند PCR تکثیر شد (شکل ۱).

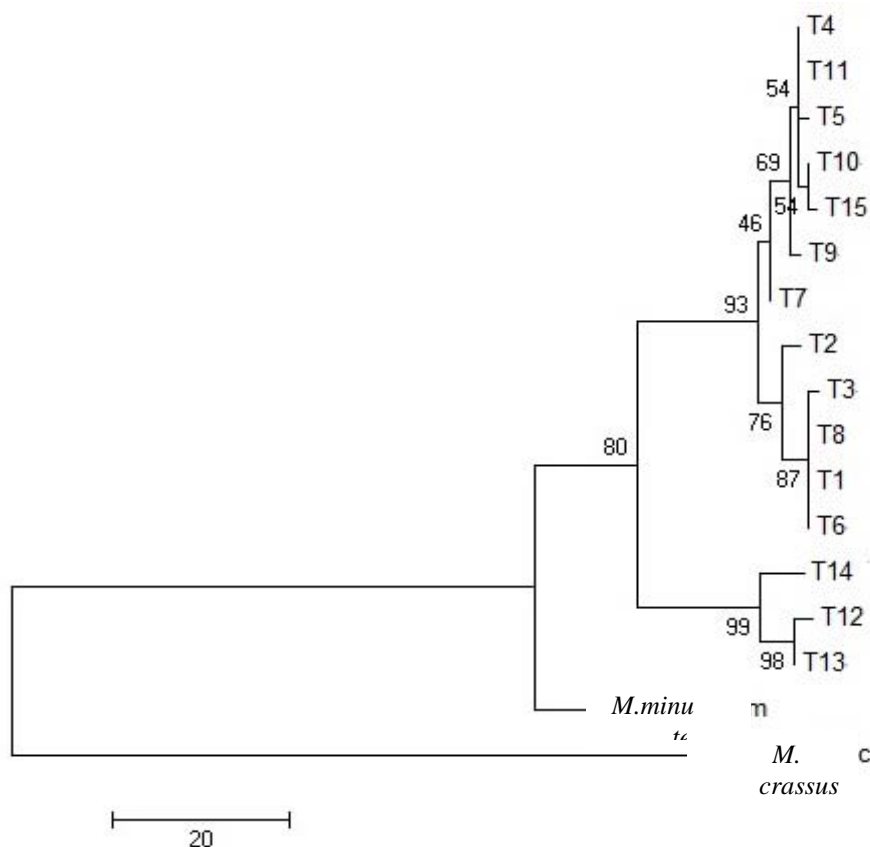


شکل ۱- نتیجه الکتروفورز برخی از محصولات PCR

که از این تعداد حدود ۱۲۵ جفت باز برای اطمینان از صحت نتایج به دست آمده از دو انتهای قطعه تکثیر شده حذف و حدود ۳۶۱ جفت باز از ژن COII در نهایت در مطالعه مولکولی استفاده گردید. میانگین فراوانی

جدول ۲- درصد اختلاف ژنتیکی میان ۱۵ جمعیت گونه *Microcerotermes diversus* به همراه ۲ گونه خارجی با استفاده از مدل

	Kimura-2parameter																
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷
T1																	
T2	0/014																
T3	0/003	0/017															
T4	0/028	0/026	0/031														
T5	0/031	0/028	0/034	0/003													
T6	0/000	0/014	0/003	0/028	0/031												
T7	0/020	0/017	0/023	0/008	0/011	0/020											
T8	0/000	0/014	0/003	0/028	0/031	0/020	0/020										
T9	0/028	0/025	0/031	0/006	0/008	0/028	0/008	0/028									
T10	0/026	0/028	0/028	0/003	0/006	0/026	0/011	0/026	0/008								
T11	0/028	0/026	0/031	0/000	0/003	0/028	0/008	0/028	0/006	0/003							
T12	0/110	0/117	0/113	0/107	0/110	0/110	0/096	0/110	0/106	0/110	0/107						
T13	0/103	0/110	0/107	0/100	0/103	0/103	0/090	0/103	0/100	0/103	0/100	0/006					
T14	0/107	0/113	0/110	0/103	0/107	0/107	0/093	0/107	0/103	0/107	0/103	0/031	0/026				
T15	0/028	0/031	0/031	0/006	0/008	0/028	0/014	0/028	0/011	0/003	0/006	0/107	0/100	0/103			
M.m	0/109	0/116	0/113	0/113	0/116	0/109	0/123	0/109	0/119	0/109	0/113	0/138	0/138	0/134	0/106		
M.c	0/939	0/950	0/954	0/985	1/002	0/939	0/954	0/939	0/982	0/985	0/985	1/019	0/985	1/036	0/985	0/997	



شکل ۲- تبارنمای جمعیت‌های مختلف گونه *Microcerotermes diversus* به همراه دو گونه خارجی براساس روش بیشینه پارسیمونی (اعداد روی انشعابات، مقادیر بوت استرپ هستند)

جمعیت‌ها متداول می‌باشد (Sobti *et al.*, 2009)، که در این باره منطقه COII ابزار مفیدی برای بررسی روابط فیلوژنتیکی موربانه‌ها محسوب می‌شود (Austin *et al.*, 2002).

در مطالعه حاضر، ۱۵ جمعیت مختلف در دو شاخه قرار گرفتند، و میزان تفاوت ژنتیکی از صفر تا ۰/۱۱۷ حاصل شد، که در مقادیر کمتر از یک درصد میزان اختلاف ژنتیکی پایین محسوب می‌شود که از عوامل پایین بودن این اختلاف می‌توان به قرار داشتن نمونه‌ها در محدوده جغرافیایی یک استان و یا استان‌های مجاور به آن اشاره کرد. در بررسی انجام شده نمونه‌های استان خوزستان به استثناء دو جمعیت دزفول و بهبهان در یک شاخه اصلی و دو زیر شاخه فرعی قرار گرفتند که نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی و جریان ژنی بالای آنها با همدیگر می‌باشد. در نمونه‌های بررسی شده سه جمعیت T1 (گلستان)، T6 (۱۰ کیلومتری اهواز) و T8 (شوش) با همدیگر و همچنین دو جمعیت T4 (۲۴

بحث

حشرات بسیار فراوان و متنوع هستند و حدود نیمی از گونه‌های توصیف شده در جهان را تشکیل می‌دهند. حشرات تاریخچه تکاملی طولانی داشته و زیستگاه‌های متنوع، عادات تغذیه‌ای مختلف و شیوه‌های زندگی گوناگونی دارند (Hoy, 2003). تنوع ژنتیکی ژنوم میتوکندریایی و هسته‌ای به عنوان شاخص‌های ژنتیکی ارزشمند در ارزیابی ژنوم و ساختار جمعیتی و محافظت از ذخایر ژنی گونه‌های مورد مطالعه می‌باشد (Taggart *et al.*, 1992). آنالیز mtDNA روش دقیقی را فراهم آورده است که تفاوت‌های ژنتیکی را که ممکن است بین جمعیت‌های درون یک گونه وجود داشته باشد آشکار کند. به طور معمول گونه‌های دارای سطوح بالاتر تنوع ژنتیکی، دارای گونه‌های غنی‌تری بوده و توانایی بیشتری در سازش با شرایط مختلف دارند (Moritz *et al.*, 1989). استفاده از DNA میتوکندریایی به علت نشان دادن تنوع درون‌گونه‌ای در بررسی ژنتیکی

پایینی از تنوع ژنتیکی برای گونه *R. flavipes* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایالت جورجیای آمریکا به دست آوردند که نشان‌دهنده میزان جریان ژنی بالایی بین آنها بود. در بررسی دیگری *Austin et al.* (2006) میزان تنوع ژنتیکی محدودی را با استفاده از نشانگر COII برای گونه *C. formosanus* در آمریکا گزارش دادند. در بررسی که *Ye et al.* (2004) بر روی موربانه *R. arenicola* در ایالات متحده انجام دادند میزان تنوع ژنتیکی بالای ۱۰ درصد با استفاده از نشانگر COII حاصل شد که نشان‌دهنده میزان تفاوت ژنتیکی بالایی می‌باشد. همچنین در مطالعه‌ای که *Pinzon & Houseman* (2009) بر روی تنوع ژنتیکی گونه *R. hageni* Banks در منطقه میسوری آمریکا انجام داده بودند میزان تنوع درون‌گونه‌ای پایین حاصل گردید. در صورتی که برای گونه *R. flavipes* این تنوع بالا مشاهده شد. مطالعه حاضر اولین بررسی ژنتیکی از گونه مورد نظر در جهان محسوب می‌شود که می‌تواند شروعی برای مطالعه بیشتر از طریق افزایش دادن تعداد جمعیت‌ها و همچنین تحت پوشش قرار دادن مناطق بیشتر نمونه‌برداری حتی از سایر کشورهای دیگر و همچنین استفاده از سایر نشانگرهای مولکولی برای مقایسه بهتر باشد که از این طریق می‌توان نتایج جالب توجه تری را به دست آورد و نتیجه‌گیری بهتری را از میزان تنوع ارائه داد.

نتیجه‌گیری کلی

در بررسی حاضر، مقدار اختلاف ژنتیکی پایینی حاصل شد، که نشان‌دهنده جدا نبودن جمعیت‌های مورد مطالعه از هم و همچنین وابستگی و ارتباط بالای بین آنها می‌باشد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به دلیل تأمین بخشی از هزینه‌های مربوط به تحقیق انجام شده تشکر و قدردانی می‌گردد.

متری اهواز) و T11 (شوش) نیز با یکدیگر هیچ گونه اختلافی را نشان ندادند. از طرفی ۲ جمعیت خارج از استان خوزستان نیز در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت که نمونه خارک با اینکه در فاصله دورتری نسبت به نمونه‌های داخل استان قرار داشت اما ارتباط ژنتیکی نزدیک‌تری را با آنها به نسبت دو نمونه دزفول و بهبهان که در شاخه دیگری همراه با جمعیت بندرعباس قرار گرفته بودند نشان داد، که از عوامل مهم در ایجاد این شباهت‌های ژنتیکی را می‌توان به دخالت انسان و عوامل طبیعی مانند باد در انتقال چوب و وسایل آلوده به موربانه‌های بالدار به نقاط مورد نظر را بر شمرد، که این جابجایی‌ها باعث می‌شود تا موربانه‌های مولد یک کلنی، در نقاط مختلف پراکنده شده و کلنی‌های متعددی را ایجاد کنند، و به همین دلیل در مناطق متفاوت با فاصله‌های دور از همدیگر میزان شباهت ژنتیکی بالا بین آنها مشاهده می‌شود، از طرفی در بررسی حاضر بیشترین اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌های بهبهان، دزفول و بندرعباس با سایر نمونه‌های دیگر دیده شد که از عوامل ایجاد این تفاوت‌ها را می‌توان به جدا شدن مولدهای جنسی در مدت زمان طولانی‌تری از کلنی اولیه و همچنین ایجاد تفاوت‌های ژنتیکی بر اثر عوامل محیطی، شیمیایی و غیره را بر شمرد. در مطالعه انجام شده با استفاده از مدل kimura-2parameter، ۱۵ جمعیت بررسی شده با مقدار بوت استرپ بالایی (۸۰) از هم جدا شدند و نمونه‌ها با مقدار اطمینان بالایی در دو شاخه قرار گرفتند. در بررسی حاضر دو گونه خارجی از بانک ژن استخراج و برای مقایسه بهتر در تجزیه و تحلیل‌ها استفاده گردید، که با توجه به تبارنمای حاصل، در شاخه مجزایی از ۱۵ نمونه مورد مطالعه قرار گرفتند. از آنجایی که در دنیا هیچ مطالعه‌ای بر روی موربانه *M. diversus* انجام نشده بود امکان مقایسه از طریق مطالعات مشابه برای این گونه وجود نداشت، اما در مطالعاتی که بر روی جنس‌های دیگری انجام گرفته بود، *Jenkins et al.* (2000) با استفاده از نشانگر COII سطح

REFERENCES

1. Austin, J. W., Szalanski, A. L., Uva, P., Bagneres, A-G. & Kence, A. (2002). A comparative genetic analysis of the subterranean termite genus *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95(6), 753-760.
2. Austin, J. W., Szalanski, A. L., Scheffrahn, R. H., Messinger, M. T., Mckern, J. A. & Gold, R. E.

- (2006). Genetic evidence for two introductions of the formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae), to the United States. *Florida Entomologist*, 89(2), 183-192.
3. Badawi, H. M., Ahmed, B. M., French, J. R. J. & Schwarz, M. P. (2008). The use of molecular techniques in studying Australian subterranean termites genus *Coptotermes*. *International Research Group on Wood Preservation Do No IRG/WP/08-10669*, 1-16.
 4. Bergamaschi, S., Dawes-Gromadzki, T. Z., Scali, V., Marini, M. & Mantovani, B. (2007). Karyology, mitochondrial DNA and the phylogeny of Australian termites. *Chromosome Research*, 15, 735-753.
 5. Ghayourfar, R. (2005). *Iran Termites, (Morphology, Behaviuor, Classification, Control)*. Publishing for Agricultural Education, Karaj. (In Farsi)
 6. Habibpour, B. (1994). *Termite (Isoptera) fauna, economic importance and their biology in Khuzestan province, Iran*. M. SC. Dissertation, College of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran (In Farsi).
 7. Hoy, M. A. (2003). *Insect molecular genetics, an introduction to principles and applications*. (2nd ed.). Academic Press, USA. 544pp.
 8. Husen, T. J., Kamble, S. T. & Stone, J. M. (2006). A characterization of subterranean termites in Nebraska using micro-morphological and molecular techniques. *Sociobiology*, 48(2), 1-18.
 9. Jenkins, T. M., Haverty, M. I., Basten, C. J., Nelson, L. J., Page, M. & Forschler, B. T. (2000). Correlation of mitochondrial haplotypes with cuticular hydrocarbon phenotype of sympatric *Reticulitermes* species from the southeastern United States. *Journal of Chemical Ecology*, 26(6), 1526-1542.
 10. Lee, C-Y., Forschler, B. T. & Jenkins, T. M. (2005). Taxonomic questions on Malaysian termites (Isoptera: Termitidae) answered with morphology and DNA biotechnology. In: Proceedings of the *Fifth International Conference on Urban Pests*, Singapore, 205-211.
 11. Long, Y., Xiang, H., Xie, L., Yan, X. & Wang, Q. (2009). Intra-and inter-specific analysis of genetic diversity and phylogeny of termites in East China detected by ISSR and COII markers. *Sociobiology*, 53(2), 411-430.
 12. Moritz, C., Dowling, T. E. & Brown, W. M. (1989). Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 269-292.
 13. Nobre, T., Nunes, L., Eggleton, P. & Bignell, D. E. (2006). Distribution and genetic variation of *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) in Portugal. *IRG/WP/Doc 06-10581*, 1-16.
 14. Ohkuma, M., Yuzawa, H., Amornsak, W., Sorntuwat, Y., Takematsu, Y., Yamada, A., Vongkaluang, C., Sarnthoy, O., Kirtibutr, N., Noparatnaraporn, N., Kudo, T. & Inoue, T. (2003). Molecular phylogeny of Asian termite (Isoptera) of the families Termitidae and Rhinotermitidae based on mitochondrial COII sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 701-710.
 15. Pinzon, O. P. & Houseman, M. (2009). Species diversity and intraspecific genetic variation of *Reticulitermes* (Isoptera: Rhinotermitidae) subterranean termites in woodland and urban environments of Missouri. *Annals of the Entomological Society of America*, 102(5), 868-880.
 16. Sobti, R. C., Kumari, M., Sharma, V. L., Sodhi, M., Mukesh, M. & Shouche, Y. (2009). Sequence analysis of a few species of termites (Order: Isoptera) on the basis of partial characterization of COII gene. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 331, 145-151.
 17. Soleiman-Nejadian, E. (1991). *Termites, identification and control of them*. V. Harris (Ed.), Academic Publishing Center. Tehran. (In Farsi)
 18. Stewart, J. B. (2005). *The evolution of mitochondrial genome structure and function in insects*. Ph. D. dissertation. *Simon Fraser University, Canada*, 208pp.
 19. Taggart, J. B., Hynes, R. A., Prodoehl, P. A. & Ferguson, A. (1992). A simplified protocol for routine total DNA isolation from Salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*, 40, 619-633.
 20. Tripodi, A. D., Austin, J. W., Szalanski, A. L., Mckern, J. A., Carroll, M. K., Saran, R. K. & T, M. (2006). Phylogeography of *Reticulitermes* termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in California inferred from mitochondrial DNA sequences. *Annals of the Entomological Society of America*, 99(4), 697-706.
 21. Ye, W., Lee, C-Y., S, R. H., Aleong, J. M., Su, N-Y., Bennett, G. W. & Scharf, M. E. (2004). Phylogenetic relationships of Nearctic *Reticulitermes* species (Isoptera: Rhinotermitidae) with particular reference to *Reticulitermes arenincola* Goellner. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30, 815-822.
 22. Yeap, B-K., Othman, A. S., Lee, V. S. & Lee, C-Y. (2007). Genetic relationship between *Coptotermes gestroi* and *Coptotermes vastator* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*, 100(2), 467-474.