مقاله تحقیقی

تعیین شکارگر غالب سپردار سفید خرما *Parlatoria blanchardi* با استفاده از نشانگرهای ملکولی در نخلستان‌های بم

محمد جواد عصاری[۱]، کامران مهدیان[۲]، عیسی اسفندیارپور بروجنی[۳]، هادی زهدی[۴]

۱، ۲–مربی، دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر عج رفسنجان، ایران.
۳–استاد، گروه مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر عج رفسنجان، رفسنجان، ایران.
۴–استادیار، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمان، کرمان، ایران.
مسئول مکاتبات: کامران مهدیان ، ایمیل: KamranMahdian@vru.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۵ ۱۱(۱)۹۷–۱۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۹

چکیده

خرما به عنوان یک محصول اقتصادی ارزشمند در نواحی جنوبی ایران است. استان کرمان بیشترین سطح زیر کشت نخیلات را در کشور دارد. سپردار سفید خرما *Parlatoria blanchardi* یکی ازآفات شاخص درخت خرما در ایران است که در برخی موارد، خسارت زیادی به باغات خرما به‌خصوص درختان جوان وارد می‌کند. کنترل آفات خرما معمولاً با استفاده از حشره‌کش‌ها در دهه‌های گذشته انجام شده است. اما با توجه به جنبه‌های منفی برنامه‌های کنترل شیمیایی، در سال‌های اخیر به برنامه مدیریت تلفیقی آفات و کنترل بیولوژیک توجه شده است. شکارچیان مهم و موثری در نخلستان‌ها وجود دارند. یکی از عوامل مهم در موفقیت کنترل بیولوژیک و از شاخص‌های معیار انتخاب، یافتن برهمکنش‌های بین شکارگر و طعمه‌های مختلف آن‌ها است. برهمکنش‌های بین شکار و شکارگر و برهمکنش‌های بین شکارچیان عمومی و طعمه‌های مختلف آن‌ها اجزای کلیدی مطالعات اکولوژیکی است که به دنبال توضیح فرآیندهای پویایی جمعیت جانوران است که می‌توان از آنها در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات استفاده کرد. برای تعیین دشمنان طبیعی مؤثر، استفاده از نشانگرهای مولکولی کاربرد روزافزونی پیدا کرده است. برای تعیین فراوانی ژنوم سپردار در دستگاه گوارش شکارگرها، نمونه‌برداری‌های منظم ماهانه از شکارگرها انجام شد. آزمایش با روش دستی استخراج DNA بر پایه CTAB انجام و برای بررسی ژنوم سپردار از طریق مقایسه نمونه‌ها از دو نشانگر ملکولی (۲۳۳ و ۱۸۶ جفت باز) ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز I (COI) از سپردار سفید خرما استفاده شد. تعداد و محدوده زمان‌های نمونه‌برداری پس از تغذیه به نوع شکارچی مورد مطالعه بستگی دارد و باید از ابتدا مورد توجه قرار گیرد. حداکثر زمان تشخیص از چند ساعت تا ۵ روز پس از تغذیه با طعمه متغیر است. بدین جهت یک آزمایش نیز برای تعیین حداکثر زمان ردیابی بقایای ژنوم شکار در دستگاه گوارش شکارگر نیز طراحی گردید. نتایج تأیید کننده اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده بود. بهترین زمان برای ردیابی ژنوم ۲۴ ساعت پس از تغذیه تعیین گردید. همچنین نتایج نشان داد که گونه کفشدوزک *Chilocorus bipustulatus* L. با بیشترین میزان فراوانی ردیابی مبتنی بر DNA سپردار سفید خرما گونه غالب و مؤثر در نخلستان‌های مورد ارزیابی می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر، پتانسیل استفاده در کنترل بیولوژیکی و مطالعات اکولوژیکی تعاملات شکارچی و طعمه مورد استفاده را دارا است.

واژه‌های کلیدی: کفشدوزک *Chilocorus bipustulatus*، ردیابی ملکولی، سپردار سفید خرما، کنترل بیولوژیک، نشانگر DNA

مقدمه

نخلستان‌های خرما به عنوان سیستم‌های کشاورزی حیاتی در بسیاری از مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری، منبع اصلی درآمد و تغذیه برای بسیاری از جوامع هستند، اما به‌دلیل تنش‌های زیستی و غیرزیستی رشد، تولید محصول و بهره‌وری آنها رو به کاهش است (Khan *et al*., 2023). در میان این عوامل، تنش‌های زیستی، آفات و بیماری‌ها، تهدید اصلی درختان خرما در سراسر جهان می‌باشند. درختان خرما با تهدیدات قابل توجهی از جانب آفات مختلف مواجه هستند (Elshafie *et al*., 2019)، که از میان آنها سپردار سفید خرما *Parlatoria blanchardi* می‌تواند خسارات جبران‌ناپذیری بر عملکرد و کیفیت محصول خرما به‌خصوص درختان جوان وارد کند. این آفت نه تنها باعث کاهش کیفیت و کمیت محصول خرما می‌شود، بلکه چالش‌های بزرگی را در مدیریت پایدار آفات ایجاد می‌کند. (Hakima *et al*., 2015).

روش‌های سنتی کنترل آفات که اغلب به استفاده از سموم شیمیایی متکی هستند، به دلیل تأثیرات زیست‌محیطی و توسعه مقاومت آفات، نگرانی‌های جدی را به همراه داشته‌اند (Heap, 2014; Pimentel & Burgess, 2013). از این رو، تأکید بر استراتژی‌های مدیریت تلفیقی آفات (IPM)که از عوامل کنترل بیولوژیکی بهره می‌گیرند، به طور فزاینده‌ای مورد توجه قرار گرفته است (Abhishek & Dwivedi, 2021).

نتایج مطالعات مربوط به مدیریت آفات خرما نیز بیانگر آن است که روش کنترل بیولوژیکی به‌عنوان محور اصلی در ترکیب با سایر روش‌های کنترل، مانند استفاده از ارقام مقاوم و کنترل زراعی و کنترل شیمیایی، یک برنامه مناسب و پایدار برای مدیریت آفات خرما در ایران است (Latifian, 2017). بنابراین نیاز به توسعه رویکردهایی وجود دارد که پایدار، انعطاف‌پذیر، همچنین دوستدار محیط زیست باشند (Oerke, 2006).

در مطالعات پیشین گزارش شده است که دشمنان طبیعی سپردار سفید خرما در نخلستان‌ها بیش از ۴۵ گونه از ۷ راسته و ۱۵ خانواده مختلف را شامل می‌شوند. بیش از ۲۰ گونه شکارچیان عمومی از خانواده Coccinellidae هستند و بیشتر پارازیتوئیدها هم متعلق به خانواده Braconidae از راسته Hymenoptera می‌باشند (Elshafie, 2012). همچنین در میان شکارچیان عمومی که برای کنترل بیولوژیکی در باغات خرما استفاده می‌شوند کفشدوزک‌های خانواده Coccinellidae بیشترین کاربرد را دارند (Blumberg, 1973). با این وجود تخمین سهم واقعی این دشمنان طبیعی در کنترل سپردار سفید خرما مشکل است و تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. یکی از رویکردهای مورد استفاده برای شناسایی و تخمین میزان شکار شکارچیان در یک گروه طعمه، تجزیه و تحلیل محتویات شکمی شکارچی است (Greenstone *et al*., 2007). نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزارهای قدرتمند در تحقیقات حشره‌شناسی، امکان شناسایی دقیق و حساس توالی‌های DNA خاص را فراهم می‌کنند. در زمینه مدیریت آفات، این نشانگرها می‌توانند برای شناسایی حضور DNA آفت در محتوای شکمی دشمنان طبیعی شکارگر یا پارازیتوئید استفاده شوند (Krehenwinkel *et al*., 2016). این رویکرد به محققان امکان می‌دهد تا تشخیص دهند کدام دشمنان طبیعی در شکار آفت فعال هستند و بنابراین بهینه‌سازی استراتژی‌های کنترل بیولوژیکی را تسهیل می‌کنند (Menalled *et al*., 2004).

در چند سال اخیر، مطالعات استفاده از نشانگرهای مولکولی برای شناسایی پارازیتوئید و شکارچیان مؤثر افزایش چشمگیری داشته است (Gariepy *et al*., 2007). با توجه به اهمیت اقتصادی جهانی خرما و گزارش‌های ارایه شده در رابطه با عدم موفقیت در کنترل سپردار سفید خرما شناخت دقیق تعاملات بین این آفت و دشمنان طبیعی آن برای بهبود تلاش‌های کنترل بیولوژیکی در توسعه این امکان وجود دارد که شکارچیان اجزای مهمی در توسعه برنامه‌های IPM برای کنترل این آفت باشند (Maggio *et al*., 2022).

به منظور ردیابی DNA طعمه در بدن شکارگر از هر دو ژنوم هسته‌ای و میتوکندری برای تشخیص ملکولی شکار به‌عنوان نشانگر در مطالعات مختلف استفاده شده است (Traugott &

Symondson, 2008). اولین بار چن و همکاران Chen *et al*. (2000) برای ردیابی طعمه در محتویات دستگاه گوارش شکارگر از ژن میتوکندری COII استفاده کردند. در این آزمایش شکارچیان با طعمه تغذیه شدند. نتایج آزمایش آنها موفقیت ردیابی ملکولی گونه‌های مختلف شکارگر را نشان داد. در آزمایشی دیگر برای بررسی از پرایمرهای ژن COII و تکثیر قطعه با طول ۲۵۶ جفت باز استفاده گردید و ردیابی طعمه و تعیین شکارگر موثر با موفقیت انجام شد (King *et al*., 2010). بررسی مشابهی در مطالعه تغذیه پسیل‌ها توسط حشرات آنتوکوریید انجام شد (Sarnevesht *et al*., 2018). در این پژوهش ردیابی براساس ژن COI انجام گرفت. از نکات مهم در ردیابی DNA طعمه در محتویات شکمی شکارگر زمان پایداری DNA در دستگاه گوارش حشره است. به طور کلی، طول توالی هدف و فراوانی و تعداد کپی نشانگر در ژنوم طعمه، بر مدت زمان پایداری DNA در محتویات شکمی شکارگر موثر است و از گونه‌ای به گونه دیگر متغییر است (Agustí *et al*., 2003).

هدف این مطالعه بررسی کاربرد نشانگرهای مولکولی برای تشخیص مبتنی بر DNA سپردار سفید خرما در محتوای شکمی دشمنان طبیعی آن در نخلستان‌های خرمای شهرستان بم است. هدف از استفاده از این تکنیک پیشرفته، بهبود درک بهتر از برهمکنش‌های بین جمعیت شکارگر–شکار و تعیین گونه شکارگر با حداکثر فراوانی و در نتیجه کمک به توسعه روش‌های پایدارتر مدیریت آفات و نیز سازگار با محیط زیست است.

مواد و روش

جمع‌آوری و شناسایی سپردار سفید خرما

عملیات نمونه‌برداری از سپردار سفید خرما در طول فصل زراعی سال ۱۴۰۱ به طور تصادفی از نخلستان‌های شهرستان بم با مشخصات جغرافیایی 630704.00 m E , 3219571.00 m N به روش جمع‌آوری مستقیم از طریق چیدن برگچه‌های برگ خرما انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده تا زمان استفاده در فریزر و دمای ۲۰– درجه سیلسیوس نگه‌داری شدند.

استخراج DNA از نمونه‌های مورد بررسی

پس از جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌های مورد نظر جمع‌آوری شده در این پژوهش، برای تهیه بافر از روش دستی استخراج DNA برپایه CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) استفاده شد (Calderon *et al*., 2010). بدین منظور ابتدا بافر استخراج (شامل CTAB: دو درصد، PVP: چهار درصد، سدیم کلرید: ۱/۴ مولار، تریس HCl: ۱۰۰ میلی‌مولار pH۷=/۵، EDTA: ۲۰ میلی‌مولار pH=۸) تهیه شد. در انتها رسوب DNA توسط ۵۰ میکرولیتر از آب مقطر بطور کامل حل شد (دمای ۴ درجه سیلسیوس) و پس از آن، DNA تهیه شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰– درجه سیلسیوس نگه‌داری شد. در انتها کیفیت و کمیت DNA تهیه شده با طیف سنجی جذبی اشعه ماوراءبنفش (ultraviolet) به طور دقیق اندازه‌گیری شد.

پرایمر اختصاصی ژن COI سپردار سفید خرما

بر اساس اطلاعات بانک ژن NCBI (The National Center for Biotechnology Information) قطعه توالی مربوط به سپردار سفید خرما مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه پرایمر از سایت NCBI برای جستجوی نوکلئوتید سپردار، پرایمر 3 برای طراحی پرایمر، پرایمر بلاست برای جستجوی همپوشانی توالی استفاده شد. واکنش طبق برنامه دمایی واکنش PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه (۹۵C°، ۲ دقیقه)، واسرشته‌سازی (۹۴C°، ۴۵ ثانیه)، اتصال پرایمر (۵۸C°–۶۰، ۴۵ ثانیه)، تکثیر (۷۲C°، ۴۵ ثانیه) و تکثیر نهایی (۷۲C°، ۵ دقیقه) در ۳۴ سیکل انجام شد. دمای اتصال پرایمر ۵۹C° برای پرایمر سپردار و ۵۸C° برای پرایمر کفشدوزک بود. بر اساس توالی اخذ شده دو جفت پرایمر اختصاصی برای آفت انتخاب شد (جدول ۱) (Normark *et al*., 2019). پرایمرهای انتخاب شده توسط شرکت سیناکلون سنتز شدند. پس از سفارش و آماده‌سازی پرایمرها دقت پرایمرها مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱– اطلاعات پرایمر اختصاصی جهت تکثیر بخشی از ژن COI

Table 1. Specific primer information for the amplification of a part of the COI gene

Primer annealing temperature	(bp) length	$(5' \longrightarrow 3')$ sequence		Name
59	233	atc gaa gct cta gac gcc at gaa cgt gac aac cat ccc tg	Fw–*P.coI*–1 Rev–*P.coI*–1	P.coI–1
59	182	cgt gtg gaa act ggt gtg tt gcg acg taa cct ctc ctc aa	Fw–*P.coI*–2 Rev–*P.coI*–2	P.coI–2
58	215	gat cag gaa tag tag gaa cag ca tcg agg aaa tgc tat atc tgg ag	Fw–*C.coI*–1 Rev–*C.coI*–1	C.coI–1
58	296	tca aat tta gct cac gga gga tgg taa aga att ggg tcc cc	Fw–*C.coI*–2 Rev–*C.coI*–2	C.coI–2

پس از تهیه پرایمرهای مورد بررسی از نمونه‌های DNA استخراج شده از گونه‌های مورد بررسی به عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. به منظور آزمون اختصاصی بودن پرایمرها و قدرت ردیابی آنها برای تأیید اینکه پرایمرهای سنتز شده ردیف‌های DNA غیرهدف را تکثیر نمی‌کنند، پرایمرهای سنتز شده در گونه‌های دیگر از حشرات (جدول ۲) آزمایش شدند. به همین دلیل DNA حشرات مختلف بدون تغذیه از سپردار سفید خرما به صورت مجزا به عنوان توالی الگو در واکنش PCR با پرایمرهای سنتز شده مورد استفاده قرار گرفت و با بررسی نتایج حاصل از واکنش PCR بر روی ژل آگارز اختصاصی بودن پرایمرهای سنتز شده آزمون شد (Nanini *et al*., 2019) جدول ۲.

جدول ۲– حشرات مورد مطالعه برای اختصاصی بودن پرایمر

Table 2. List of insects used to test PCR primers specificity

The date palm scale DNA detecting in the abdominal contents of the predator		*P.coI*		
Scientific name	Common name	Scientific name	Common name	Row
Chrysoperla carnea	Green lacewing larvae III	*Chrysoperla carnea*	Green lacewing larvae	1
Cybocephalus rufifrons	Cybocephalid	*Aphis fabae*	Black bean aphid	2
Coccinella septempunctata	Seven–spot coccinellid	*Phoenicoccus marlatti*	Red date scale	3
Scymnus syriacus	coccinellid	*Ommatissus lybicus*	The date palm hopper	4
Chilocorus bipustulatus	coccinellid	*Parlatoria blanchardi*	The date palm scale	5

بررسی اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده

ردیابی مولکولی سپردار سفید خرما در محتویات شکمی دشمنان طبیعی و تعیین گونه غالب

جهت ردیابی DNA سپردار سفید خرما در نخلستان‌های خرما ۱۶۰ کفشدوزک و سوسک از ۴ جنس مختلف (*Coccinella*، *Cybocephalus* ، *Scymnus*، *Chilocorus*) (هر کدام ۴۰ عدد) بصورت ماهانه در طول سال جمع‌آوری شد و تا محل آزمایشگاه بر روی یخ درون یخدان قرار داده شدند و در آزمایشگاه تا زمان استفاده درون فریزر با دمای ۲۰– درجه سلسیوس نگهداری شدند. استخراج DNA شکارگر با روش دستی بر پایه CTAB انجام شد (Calderon *et al*., 2010). نمونه‌های شکارگر در میکروتیوب‌های ۱/۵

میلی‌لیتری قرار داده شد و به کمک یک میکروپستل (Micropestle) به همراه ۱۰۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (که از قبل در دمای ۶۵ درجه سلسیوس گرم شده بود) اضافه شدند (نکته: در صورت در دسترس نبودن میکروپستل می‌توان انتهای باریک یک نوک سمپلر آبی را حرارت داد و به شکل کروی در آورد و به‌عنوان جایگزین میکروپستل استفاده کرد). مقدار دو درصد بتامرکاپتواتانول به نمونه اضافه شد و پس از چند بار تکان دادن شدید، درب میکروتیوب به خوبی بسته شد و به مدت یک ساعت در بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و هر ده دقیقه یک‌بار به مدت چند ثانیه عمل ورتکس انجام شد. پس از آن، حجم مساوی از کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۴: ۱) به مخلوط اضافه شد، مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. فاز بالایی به آرامی، با دقت و بدون اختلال با فاز زیرین به میکروتیوب جدید انتقال داده شد. سپس، ۰/۸ حجم نمونه به آن ایزوپروپانول کاملاً سرد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. نمونه DNA توسط سانتریفیوژ با دور rpm ۱۴۰۰۰به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شد و مایع رویی به آرامی بدون آسیب و جدا شدن رسوب سفید رنگ DNA تخلیه شد. رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد شسته شد. اتانول باقی مانده با قرار دادن نمونه‌ها در دمای اتاق تا خشک شدن کامل حذف گردید. در انتها، به رسوب DNA ۲۰ میکرولیتر آب مقطر آمپولی اضافه شد و نمونه حاصل که حاوی DNA شکارگر و احیانا شکاراست تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد. DNA تهیه شده به عنوان الگو واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن COI سنتز و تأیید شده آفت سپردار سفید خرما استفاده شد پس از اتمام واکنش PCR، الکتروفورز ژل آگارز و نمایان سازی نتایج واکنش PCR انجام شد. و ارزیابی‌ها مبنی بر مشاهده و عدم مشاهده باند اختصاصی بعنوان نشان تغذیه یا عدم تغذیه شکارگر از آفت سپردار سفید خرما در نخلستان مورد ارزیابی انجام شد.

ارزیابی تأثیر زمان بر ردیابی مبتنی بر DNA آفت در محتویات شکمی شکارگر

با توجه به شرایط دستگاه گوارش و تاثیر آنزیم‌های گوارشی بر محتوی خورده شده ارزیابی زمان مناسب ردیابی مبتنی بر DNA آفت خورده شده توسط شکارگر بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین، جهت تعیین زمان مناسب ردیابی DNA آفت آزمایشی در ۶ زمان متفاوت پس از تغذیه طعمه توسط شکارگر (ساعت ۴۸ و ۳۶، ۱۲،۲۴، ۸، ۴) و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس طراحی و در شرایط آزمایشگاه اجرا شد. در این آزمایش، جهت بررسی تأثیر زمان بر ردیابی ملکولی سپردار سفید خرما خورده شده توسط شکارگر از مهم‌ترین و فراواترین دشمن طبیعی سپردار سفید خرما یعنی کفشدوزک *Chilohcorus bipustulatus L.* استفاده شد (Stansly,1984). تعداد ۱۲۰ کفشدوزک (حشره کامل) در ۱۴ ظرف مجزا قرار داده شدند و ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در شرایط گرسنگی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند و سپس هر شکارگر توسط ۱۰ عدد پوره آفت سپردار سفید خرما تغذیه شد و پس از زمان‌های مشخص شده، نمونه‌های شکارگر جمع‌آوری شدند و تا زمان استخراج DNA در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

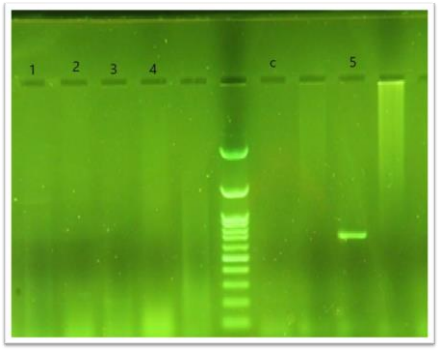
پس از تجزیه و تحلیل آماری نتایج و انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها توسط نرم افزار آماری IBM SPSS v.20، گونه غالب دشمن طبیعی مورد ارزیابی به عنوان شکارگر آفت سپردار سفید خرما (گونه با حداکثر فراوانی ردیابی شده DNA آفت در آن) مشخص شد. تأثیر زمان بر ردیابی مبتنی بر DNA آفت نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل با کمک نرم افزارهای Microsoft Excel 2016 و SPSS v.20 تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

اختصاصی بودن پرایمرها

پس از تهیه پرایمر اختصاصی ژن COI، نتایج PCR با استفاده از DNA حشرات مورد آزمایش (جدول۲) بر روی ژل آگارز نشان داد که پرایمرهای *P.coI–1* و *P.coI–2* قادر

به تکثیر ردیف توالی ژن COI برای هیچ یک از حشرات شکارگر مورد بررسی (جدول ۲) نبودند و برای هیچ‌کدام از آنها باندی مشاهده نشد. در حالیکه تک باند با طول ۲۳۳ و ۲۱۸ جفت باز برای سپردار سفید خرما مشاهده شد. بنابراین نتایج تأیید کننده سنتز پرایمرهای *P.coI–1* و *P.coI–2* و اختصاصی بودن آنها هستند (شکل ۱).



باند (Band) لدر (ladder)

شکل ۱: الکتروفورز ژل تکثیر شده از DNA استخراج شده از۱– *Crysoperla* sp.، ۲– *Aphis fabae*، ۳– *Phoenicoccus marlatti*، ۴–*Ommatissus lybicus* ، ۵– *parlatoria blanchardi* و شاهد C با استفاده از نشانگر اندازه مولکولی ۵۰ جفت باز

Fig. 1. Gel electrophoresis of amplified produced from DNA extracted from 1–*Crysoperla* sp.,2–*Aphis fabae*,3– *Phoenicoccus marlatti*, 4–*Ommatissus lybicus*, 5– *parlatoria blanchardi* and C– control using molecular–size marker 50 bp

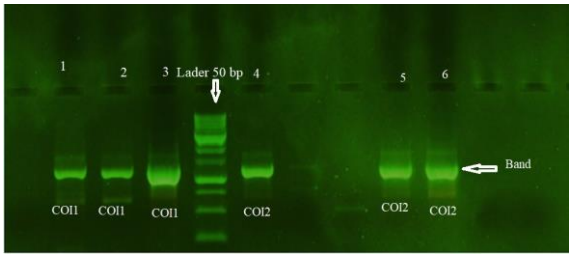
تاثیر زمان بر ردیابی DNA سپردارسفید خرما در محتویات شکمی کفشدوزک C. *bipustulatus*

بررسی تأثیر زمان بر ردیابی DNA آفت در محتویات معده شکارگر نتایج نشان داد که هر دو پرایمر مورد ارزیابی در پژوهش حاضر تا مدت زمان ۲۴ ساعت پس از تغذیه قادرند DNA سپردار سفید خرما را در بدن کفشدوزک *C. bipustulatus*ردیابی کنند. بدین ترتیب که تا ۸ ساعت پس از تغذیه ۱۰۰٪ DNA آفت در بدن شکارگر قابل ردیابی بود و پس از آن با گذشت زمان بر اساس طول قطعه‌ای که هر پرایمر تکثیر می‌کند میزان ردیابی کاهش یافت و ۲۴ ساعت پس از تغذیه این میزان به صفر رسید (جدول ۳).

انجام آزمون مقایسه میانگین با روش *t*– test بین میانگین درصد ردیابی DNA سپردار سفید خرما در بدن کفشدوزک (تغذیه شده در مدت زمان ثابت ۱۲ ساعت)، با دو پرایمر مورد ارزیابی (جدول ۴) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین میانگین درصد ردیابی DNA سپردار سفید خرما با پرایمرهای طراحی شده در دمای ۲۵ درجه وجود ندارد.

بدلیل این فرض که DNA برای مدت طولانی در برابر عملکرد آنزیم‌ها در روده شکارچیان عمومی زنده نمی‌ماند، بررسی زمان ردیابی طعمه در محتویات شکمی شکارگر مورد توجه قرار داده شده است (Traugott & Symondson, 2008) به نظر می‌رسد نتایج پژوهش‌ها نیز این فرضیه را تایید می‌کند. مطالعه شناسایی باکتری جنس *Wolbachia* (طعمه) در سیستم گوارش شکارگران مختلف توسط یک قطعه DNA تقریبا ۹۰۰ جفت بازی نشان داد که باکتری *Wolbachia* در محتویات شکمی هیچ یک از شکارگرهایی که پس از مدت طولانی تری مورد بررسی قرار گرفته بودند مشاهده نشد. در حالی که برای شکارگرانی که مدت کوتاهتری پس از تغذیه مورد بررسی قرار گرفته بودند باند DNA مربوط به *Wolbachia* مشاهده شد (Johanowicz & Hoy, 1996). بنابراین، اگرچه DNA مولکول پایداری است، اما با توجه به شرایط دستگاه گوارش و تاثیر آنزیم‌های گوارشی بر محتوی خورده شده پس از مدتی تجزیه می‌شود و دیگر قابل ردیابی نیست. از این لحاظ ارزیابی زمان مناسب ردیابی مبتنی بر DNA آفت خورده شده توسط شکارگر بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Juen & Traugott, 2005). بررسی تعاملات بین گونه‌ای سه گونه کفشدوزکبر مبنای ردیابی DNA طعمه در محتویات شکمی شکارگر بیانگر رابطه معنی‌داری بین زمان پس از تغذیه و نسبت ردیابی مثبت DNA طعمه در روده‌های کفشدوزک‌ها بود (Yang *et al*., 2016). دو عامل موثر بر تکثیر و ردیابی موفقیت آمیز DNA طعمه از روده شکارچیان بی مهره و مواد دفعی آنها مقدار DNA هدف موجود در نمونه و مقدار DNA باقی مانده پس از تغذیه شکارگر است که می‌توانند

موفقیت و ثبات شناسایی مولکولی طعمه را افزایش دهد (King *et al*., 2008) به طور کلی مدت پایداری DNA در سیستم گوارش شکارگر تغذیه کرده از یک طعمه، به گونه شکارگر، مدت زمان پس از تغذیه و دما به عنوان عامل موثر بر سرعت هضم بستگی دارد و این عوامل اثر مستقیمی بر زمان ردیابی مبتنی بر ژنوم طعمه در محتوی شکمی شکارگر دارند (King *et al*., 2008). نتیجه پژوهش حاضر نیز طبق مطالعه انجام شده بررسی اثر زمان ردیابی DNA طعمه پسیل پسته در بدن شکارگر کفشدوزک *Oenopia conglobata* در دو دمای ۲۵ و ۳۰ همخوانی دارد (Zohdi., *et al*. 2015) . همچنین در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که در شناسایی مبتنی بر DNA آفت کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت *Ostrinia nubilalis* در محتویات شکمی کفشدوزک *Coleomegilla maculata*، افزایش دما با کاهش زمان پایداری DNA و ردیابی طعمه در بدن شکارگر همراه است (Hoogendoorn & Heimpel, 2001). از دیگر عوامل موثر بر زمان ردیابی ملکولی طعمه در محتویات شکمی شکارگر طول قطعه DNA هدف است که بایستی در واکنش PCR تکثیر شود. هرچه طول محصول PCR بزرگتر باشد قابلیت ردیابی آن پس از تغذیه شکارگر کمتر خواهد بود و بالعکس (Traugott & Symondson, 2008). در پژوهش حاضر نیز با توجه به اختلاف کم طول محصول PCR با دو پرایمر *P.coI–1* و *P.coI–2* نشان داده شد که طول قطعه تکثیر شده بر درصد ردیابی قطعه DNA مورد نظر تاثیر قابل توجهی نداشته است. به طور مشابه مطالعه ردیابی ملکولی زنبور پارازیتوئید *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) در محتویات شکمی کفشدوزک *Hippodamia convergens* با پرایمری که قطعه ۲۲۳ bp را تکثیر می‌کند، نشان داد هرچه طول قطعه DNA تکثیر شده که قابلیت رونویسی دارد در PCR کوتاهتر باشد در زمان طولانی‌تری پس از تغذیه، قابلیت ردیابی دارد (Mullins, 2008). نتایج پژوهش حاضر نشان داد افزایش زمان با کاهش درصد ردیابی DNA سپردار سفید خرما در بدن کفشدوزک *C. bipustulatus* همراه است که با موارد بیان شده مطابقت می‌کند (شکل ۲).



شکل ۲– ردیابی DNA سپردار سفید خرما در محتویات کفشدوزک‌های 1–*Cybocephalus rufifrons* 2– *Chilocorus bipustulatus* 3–*Scymnus syriacus* 4– *Cybocephalus rufifrons* 5–*Chilocorus bipustulatus* 6– *Scymnus syriacus*

با جفت پرایمرهای P.COI–1 و P.COI–2 ۱) نشانگر pb ۵۰ (اصلی)

Fig. 2. Amplified produced from DNA extracted from the date palm scale DNA detecting in the abdominal contents of the predators 1– *Cybocephalus rufifrons* 2– *Chilocorus bipustulatus* 3– *Scymnus syriacus* 4– *Cybocephalus rufifrons* 5– *Chilocorus bipustulatus* 6– *Scymnus syriacus* with two primer using molecular–size marker 50 bp

نتایج نشان داد که بین میانگین درصد ردیابی سپردار سفید خرما در گونه‌های مختلف کفشدوزک مورد بررسی اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در حالی‌که نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل عامل زمان جمع‌آوری کفشدوزک‌ها و اثر متقابل دو عامل گونه‌های مختلف کفشدوزک و زمان‌های مختلف نمونه‌برداری معنی‌دار نبود. میانگین درصد ردیابی DNA آفت در هر گونه کفشدوزک مورد بررسی به میانگین کل جمعیت کفشدوزک‌های مورد بررسی جمع‌آوری شده از نخلستان‌های خرما در جدول ۵ آمده است.

نتایج مقایسات میانگین درصد ردیابی سپردار سفید خرما نشان داد بین جمعیت گونه‌هایی از کفشدوزک که DNA سپردار سفید خرما در آن‌ها ردیابی شده بود اختلاف معنی‌دار وجود دارد. اما عامل زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل دو عامل جمعیت گونه‌های کفشدوزک و زمان نمونه‌برداری معنی دار نبود. میانگین درصد فراوانی DNA سپردار سفید خرما در جمعیت گونه‌های کفشدوزک مورد بررسی به میانگین کل جمعیت کفشدوزک‌های مورد بررسی

جمع‌آوری شده از نخلستان‌های خرما جدول ۶ آورده شده است.

جدول ۳– درصد ردیابی DNA سپردار سفید خرما در زمان‌های مختلف (Mean ± SE)

Table 3: The percentage (Mean± SE) of detectability of the date palm scale DNA at different time intervals

Primer. COI 2		Primer. COI 2	
Time	The percentage (± SE) of detectable	Time	The percentage (± SE) of detectable
4	100	4	100
8	100	8	100
12	78.3 ± 3.22	12	72 ± 5.6
24	14.12 ± 2.3	24	11.14 ±3.2
36	0	36	0
48	0	48	0

جدول ۴– میانگین درصد ردیابی DNA سپردار سفید خرما (Mean± SE)

Table 4: The mean percentage of the date palm scale DNA detection (Mean ± SE)

Primer	The average percentage DNA detection	(*t*–test) Mean comparison analysis
P.COI–2	66.66 ± 3.06 A	F=8.89, t=1.54, Sig=0.14^{ns}
P.COI–1	68.51 ± 3.03 A	

جدول ۵– میانگین درصد ردیابی مبتنی DNA سپردار سفید خرما در جمعیت دشمنان طبیعی مورد ارزیابی

Table 5. The mean percentage of the date palm scale DNA detection(Mean ± SE) in in the population of natural enemies evaluated.

The mean percentage of the date palm scale DNA detection (Mean± SE)	Scientific name	Common name	Row
12.51 ± 1.2 b	Cybocephalus *rufifrons*	cybocephalid	1
9.87 ± 0.18 b	*Scymnus syriacus*	coccinellid	2
0c	*Coccinella septempunctata*	Seven–spot coccinellid	3
78.8 ± 1.8 a	*Chilocorus bipustulatus*	coccinellid	4

* Means±SE; means within a column followed by the same letter are not significantly different (*P*>0.05, Duncan's test)

جدول ۶– درصد فراوانی DNA سپردار سفید خرما در جمعیت دشمنان طبیعی مورد ارزیابی (از کل جمعیت دشمنان طبیعی)

Table 6. Percentage frequency of DNA of the date palm scale DNA detection(Mean ± SE) in the population of natural enemies evaluated (out of the total natural enemies population).

The Frequency percentage of the date palm scale DNA detection (Mean ± SE)	Scientific name	Common name	row
23.51 ± .1 b	*Cybocephalus rufifrons*.	Beetle	1
0 c	*Coccinella septempunctata*	Seven–spot coccinellid	2
9.87 ± 1.07 b	*Scymnus syriacus*	coccinellid	3
88.12±2.62a	*Chilocorus bipustulatus*	coccinellid	4

* Means±SE; means within a column followed by the same letter are not significantly different (*P*>0.05, Duncan's test)

نتایج ردیابی مولکولی مبتنی بر DNA سپردار سفید خرما در کفشدوزک‌های جمع‌آوری شده از نخلستان‌های خرما نشان داد که گونه کفشدوزک *C. bipustulatus* دارای بیشترین میزان فراوانی ردیابی مبتنی بر DNA سپردار سفید خرما است و گونه کفشدوزک *Cybocephalus rufifrons* با اختلاف زیاد و معنی‌دار در رده بعدی قرار گرفت. تعیین رژیم غذایی شکارچیان عمومی در اکوسیستم‌های کشاورزی اغلب دشوار است، زیرا آنها کوچک و متحرک هستند و در میان پوشش گیاهی یا در خاک زندگی می‌کنند. تجزیه و تحلیل محتوای روده مبتنی بر DNA یک ابزار قدرتمند است که مطالعه تعاملات شکارگر و طعمه را امکان پذیر می‌سازد (Krey *et al*., 2020). تاکنون اکثر مطالعات شکار توسط دشمنان طبیعی مانند حشرات و عنکبوت‌ها با استفاده از تکنیک‌های ردیابی مبتنی بر DNA در زمینه بررسی و تعیین گونه‌های غالب شکارگر آفات مهم بوده است (Hoogendoorn & Heimpel, 2001). بررسی دشمنان طبیعی شته‌خوار در ارقام تجاری فلفل دلمه‌ای (*Capsicum* spp.) و شناسایی شبکه تغذیه‌ای آنها با استفاده از ردیابی ملکولی محتوای معده شکارگر نشان داد دو گونه از Coccinellidae و یک گونه از Syrphidae فراوان‌ترین شکارچیان شته‌ها روی ارقام تجاری فلفل دلمه‌ای بودند. همچنین، این نتایج مشخص کردکه شکارچیان غالب به دلیل این‌که رژیم غذایی آنها عمدتاً از شته‌هایی است که به گیاهان فلفل دلمه‌ای حمله می‌کنند، می‌توانند در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات جهت کنترل شته‌ها در مزارع و گلخانه‌های فلفل دلمه‌ای مناسب باشندعلاوه بر این، این شکارچیان می‌توانند از طعمه‌های جایگزین در غیاب شته‌ها بهره ببرند (Duque–Gamboa & Toro–Perea, 2023). همچنین در بررسی روابط تغذیه‌ای در خانواده کفشدوزک‌ها Coccinellidae با استفاده از روش metabarcoding DNA ردیابی ملکولی طعمه به ترتیب در ۳۳ تا ۵۵ درصد از نمونه های مزرعه و آزمایشگاهی مشاهده شد. همین بررسی نشان داد در صورت حضور طعمه تنوع رژیم غذایی شکارگر کمتر و ردیابی ملکولی طعمه بیشتر بود و در صورت فراوانی کمتر طعمه، نرخ تشخیص نسبتاً پایین و تنوع رژیم غذایی شکارگر بیشتر بود (Kim *et al*., 2022). در بررسی تعیین فراوان‌ترین شکارگر دو آفت اصلی کاهوی مدیترانه‌ای شته *Nasonovia ribisnigri* و تریپس *Frankliniella occidentalis* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش PCR معمولی نشان داده شد که در فصل بهار آفت اصلی کاهوی مدیترانه‌ای *N. ribisnigri* بود که توسط لاروهای *Allograpta obliqua* و کفشدوزک‌ها مورد تغذیه قرار گرفت. در تابستان، آفت اصلی *Frankliniella occidentalis* بود که عمدتاً توسط *Orius* spp. و در مرتبه بعد توسط *Allograpta obliqua* شکار شدند (Gomez–Polo *et al*., 2016). جمع‌آوری شکارگرهای مختلف از مزرعه ذرت و استفاده از پرایمر اختصاصی، روابط تغذیه‌ای شکارگرهای مذکور با ردیابی مبتنی بر DNA طعمه مورد بررسی و گونه شکارگر غالب و موثر کرم ریشه‌خوار ذرت *Diabrotica virgifera* شناسایی گردید و مشخص شد که گونه‌های *Phalangium opilio*, *Poecilus* و *Scarites quadriceps* Chaudoir L. *chalcites* به عنوان شکارگرهای موثر این آفت هستند (Bollinger & Harwood, 2010). با استفاده از روش شناسایی DNA پسیل گلابی در شکارگرهای جمع‌آوری شده از باغات گلابی در آمریکا با هدف تعیین دشمن طبیعی غالب و موثر پسیل گلابی، گونه سن شکاری *Anthocoris tomentosus* Pericart (Hemi.: Anthocoridae) به عنوان شکارگر موثر پسیل گلابی در آمریکا شناسایی شد (Agustí *et al*., 2003). به طور مشابه نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد در نمونه‌برداری‌های انجام شده بیشترین میزان ردیابی سپردار سفید خرما در کفشدوزک نقاب دار دو لکه‌ای *C. bipustulatus* انجام گرفت و این گونه می‌تواند با انجام مطالعات بیشتر در زمینه پویایی جمعیت آن به عنوان یک

دشمن طبیعی کارا در توسعه روش‌های موثر و پایدار مدیریت تلفیقی سپردار سفید خرما در نخلستان‌ها مورد توجه قرار گیرد.

پیشنهادات

بررسی روابط متقابل شکارگرهای نخلستان از طریق ردیابی ژنوم بخصوص گونه‌های بالتوری‌های موجود.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از رساله دکتری نگارنده اول می باشد. نویسندگان لازم می دانند از زحمات و همکاری مسولین و همکاران محترم، دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر عج رفسنجان برای راهنمایی انجام پژوهش، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور برای شناسایی و تایید گونه های حشرات و بخصوص بخش گیاهپزشکی مرکز کرمان برای تامین امکانات لازم برای بررسی‌های ژنتیکی قدرردانی نمایند.

References

Abhishek, T. & Dwivedi, S. 2021. Review on integrated pest management of coconut crop. International Journal of Entomology Research, 6: 115–120.

Agustí, N., Unruh, T.R. & Welter, S.C. 2003. Detecting Cacopsylla pyricola (Hemiptera: Psyllidae) in predator guts using COI mitochondrial markers. Bulletin of Entomological Research, 93(3): 179–185.

Blumberg, D. 1973. Field studies of Cybocephalus nigriceps nigriceps (J. Sahlberg)(Coleoptera: Cybocephalidae) in Israel. Journal of Natural History, 7(5): 567–571.

Bollinger, S., & Harwood, J. 2010. Diel and seasonal patterns of prey available to epigeal predators: Evidence for food limitation in a linyphiid spider community. Biological Control, 52: 84–90.

Calderon, N., Quesada, M., Cano–Camacho, H., & Zavala Paramo, M. 2010. A Simple and Rapid Method for DNA Isolation from Xylophagous Insects. International journal of molecular sciences, 11: 5056–5064.

Chen, Y., Giles, K.L., Payton, M.E. & Greenstone, M.H. 2000. Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. Molecular Ecology, 9(11): 1887–1898.

Duque–Gamboa, D. N. & Toro–Perea, N. 2023. Aphidophagous predators in commercial Capsicum cultivars and characterization of their trophic network using stomach content analysis. Journal of Applied Entomology, 147(9): 742–755.

Elshafie, H. 2012. Review: List of arthropod pests and their natural enemies identified worldwide on date palm, Phoenix dactylifera L. Agriculture and Biology Journal of North America, 3: 516–524.

Elshafie, H., Abdel–Banat, B., Mohammed, M. & Al–Hajhoj, M. 2019. Monitoring tools and sampling methods for major date palm pests. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 14.

Gariepy, T.D., Kuhlmann, U., Gillott, C. & Erlandson, M. 2007. Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods. Journal of Applied Entomology, 131(4): 225–240.

Gomez–Polo, P., Alomar, O., Castañé, C. & Agustí, N. 2016. Molecular tracking of arthropod predator–prey interactions in Mediterranean lettuce crops. Food Webs, 9: 18–24.

González–Chang, M., Wratten, S., Lefort, M.C. & Boyer, S. 2016. Food webs and biological control. A review of molecular tools used to reveal trophic interactions in agricultural systems. Food Webs, 9: 22–30.

Greenstone, M.H., Rowley, D.L., Weber, D.C., Payton, M.E. & Hawthorne, D.J. 2007. Feeding mode and prey detectability half–lives in molecular gut–content analysis: an example with two predators of the Colorado potato beetle. Bull Entomol Res, 97(2): 201–209.

Hakima, I.I., Idder, M., Doumandji–Mitiche, B. & Chenchouni, H. 2015. Modeling the effects of climate on date palm scale (Parlatoria blanchardi) population dynamics during different phenological stages of life–history under hot arid conditions. International Journal of Biometeorology, 59: 1425–1436.

Heap, I. 2014. Global Perspective of Herbicide–Resistant Weeds. Pest management science, 70(9): 1306–1315.

Hoogendoorn, M. & Heimpel, G.E. 2001. PCR–based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS–1 fragments from prey to estimate predation frequency. Molecular Ecology, 10(8): 2059–2067.

Johanowicz, D.L. & Hoy, M.A. 1996. Wolbachia in a Predator–Prey System: 16S Ribosomal Dna Analysis of Two Phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) and Their Prey (Acari: Tetranychidae). Annals of the Entomological Society of America, 89(3): 435–441.

Juen, A. & Traugott, M. 2005. Detecting predation and scavenging by DNA gut–content analysis: a case study using a soil insect predator–prey system. Oecologia, 142(3): 344–352.

Khan, R.R., Haq, I.U., & Naqvi, S.A. 2023. Pest and Disease Management in Date Palm. In Date Palm, 297–338.

Kim, T.N., Bukhman, Y.V., Jusino, M.A., Scully, E.D., Spiesman, B.J. & Gratton, C. 2022. Using high–throughput amplicon sequencing to determine diet of generalist lady beetles in agricultural landscapes. Biological Control, 170: 104920.

King, R.A., Read, D.S., Traugott, M. & Symondson, W.O. 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA–based approaches. Molecular Ecology, 17(4): 947–963.

King, R., Vaughan, I., Bell, J., Bohan, D. & Symondson, W.O. 2010. Prey choice by carabid beetles feeding on an earthworm community analysed using species– and lineage–specific PCR primers. Molecular Ecology, 19(8): 1721–1732.

Krehenwinkel, H., Kennedy, S., Pekar, S. & Gillespie, R. 2016. A cost efficient and simple protocol to enrich prey DNA from extractions of predatory arthropods for large scale gut content analysis by Illumina sequencing. Methods in Ecology and Evolution, 8.

Krey, K.L., Cooper, W.R. & Renkema, J.M. 2020. Revealing the Diet of Generalist Insect Predators in Strawberry Fields: Not Only Pests, But Other Predators Beware. Environmental Entomology, 49(6): 1300–1306.

Latifian, M. 2017. Integrated Pest Management of Date Palm Fruit Pests: A Review. Journal of Entomology, 14: 112–121.

Maggio, D.H., Rossetti, V.Z., Santos, L.M.A., Carmezini, F.L. & Corrêa, A.S. 2022. A Molecular Marker to Identify Spodoptera frugiperda (JE Smith) DNA in Predators' Gut Content. Insects, 13(7): 635.

Menalled, F., Alvarez, J. & Landis, D. 2004. Molecular techniques, habitat management and parasitoid conservation in annual cropping systems. In (pp. 101–115).

Mullins, C. 2008. Intraguild Predation among Coccinellidae and Lysiphlebus Testaceipes in an Oklahoma Winter Wheat System.

Nanini, F., Maggio, D., Gomes de Abreu, P., Rugno, G.R., Yamamoto, P. & Corrêa, A. 2019. Molecular Marker to Identify Diaphorina citri (Hemiptera: Liviidae) DNA in Gut Content of Predators. Neotropical Entomology, 48.

Normark, B., Okusu, A., Morse, G., Peterson, D., Itioka, T. & Schneider, S. 2019. Phylogeny and classification of armored scale insects (Hemiptera: Coccomorpha: Diaspididae). Zootaxa, 4616: 1–98.

Oerke, E.C. 2006. Crop Losses to Pests. The Journal of Agricultural Science, 144: 31–43.

Pimentel, D. & Burgess, M. 2013. Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. Integrated Pest Management, 3: 47–71.

Sarnevesht, M., Gheibi, M., Hesami, S. & Zohdi, H. 2018. Predation by Anthocoris minki pistaciae Wagner (Hemiptera: Anthocoridae) on Agonoscena pistaciae Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae) at different temperatures. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28: 76–84

Stansly, Ph. 1984. Introduction and evaluation of Chilocorus bipustulatus [Col.: Coccinellidae] for control of Parlatoria blanchardi [Hom.: Diaspididae] in date groves of Niger. Biocontrol. 29: 29–39

Torr, S.J., Wilson, P.J., Schofield, S., Mangwiro, T.N., Akber, S. & White, B.N. 2001. Application of DNA markers to identify the individual–specific hosts of tsetse feeding on cattle. Med Vet Entomol, 15(1): 78–86.

Traugott, M. & Symondson, W.O.C. 2008. Molecular analysis of predation on parasitized hosts. Bulletin of Entomological Research, 98(3): 223–231.

Wright, G. 2023. Organic Date Production. pp. 339–366.

Yang, C., Preisser, E., Zhang, H., Liu, Y., Dai, L., Pan, H. & Zhou, X. 2016. Corrigendum: Selection of Reference Genes for RT–qPCR Analysis in Coccinella septempunctata to Assess Un–intended Effects of RNAi Transgenic Plants. Frontiers in Plant Science, 7: 1835–1845

Zohdi, H., Hosseini, R., Sahragard, A. & Mohammadi, A.H. 2015. Molecular detection of common pistachio psylla (*Agonoscena pistaciae* Burckhardt and Lauterer) in the gut contents of *Oenopia conglobata* Beetles. Journal of Entomology and Zoology Studies, 3: 77–83

Identification of the predominant predator of the date palm scale, Parlatoria blanchardi, using molecular markers in the palm groves of Bam

Mohammad Javad Assari[1], Kamran Mahdian[2], Isa Esfandiarpour– Boroujeni[3], Hadi Zohdi[4]

1., 2. Tutor, Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali–e–Asr University of Rafsanjan, Iran.
3. Professor,Soil Sciences and Engineering Department, Faculty of Agriculture, Vali–e–Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran.
4. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Kerman Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, Kerman, Iran.
Corresponding author: Kamran Mahdian, email: KamranMahdian@vru.ac.ir

Received: Jul., 05, 2024 11(1) 97–108 Accepted: Aug., 19, 2024

Abstract

Date palm is a valuable economic product in the southern regions of Iran. Kerman province has the largest cultivated area of date palm in the country. The date palm scale, Parlatoria blanchardi, is one of the key pests of date palm trees in Iran, which sometimes causes significant damage to date palm groves, particularly young trees. Date palm pest control has typically been conducted using insecticides over the past decades. However, considering the negative aspects of chemical control programs, integrated pest management (IPM) and biological control programs have gained attention in recent years. There are significant and effective predators in date palm groves, and one crucial factor in the success of biological control is finding the interactions between predators and their various prey, which is a key criterion for selection. The interactions between prey and predator, and between generalist predators and their various prey, are essential components of ecological studies aimed at explaining the processes of animal population dynamics that can be used in IPM programs. The use of molecular markers has increasingly been employed to determine effective natural enemies. Regular monthly sampling of predators was carried out to determine the frequency of P. blanchardi genome in the digestive systems of predators. DNA extraction was manually conducted using the CTAB–based method, and for examining the P. blanchardi genome, two molecular markers (233 and 186 base pairs) of the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene from the date palm scale were used. The number and timing of sampling after feeding depend on the predator species studied and should be considered from the outset. The maximum detection time varies from a few hours to 5 days after feeding on the prey. Therefore, an experiment was designed to determine the maximum time for detecting the remnants of the prey genome in the predator's digestive system. The results confirmed the specificity of the primers used. The best time to detect the genome was determined to be 24 hours after feeding. Additionally, the results indicated that the coccinellid, Chilocorus bipustulatus L., with the highest frequency of detection based on the DNA of the date palm scale, is the dominant and effective species in the evaluated date palm groves. The results of this research have the potential to be used in biological control and ecological studies of predator–prey interactions.

Keywords: *Chilocorus bipustulatus*, molecular detection, *Phoenix dactylifera*, biological control, DNA marker