

## شناسایی دو گونه ساقه خوار (*Sesamia nonagrioides* (Lep.: Noctuidae) و *S. cretica* به روش DNA بارکدینگ

ندا مهر آوری<sup>۱</sup>، مهدی اسفندیاری<sup>۲\*</sup> و پگاه سهیلی فر<sup>۳</sup>

- ۱- محقق پژوهشکده توسعه صنایع شیمیایی، کرج، ایران
- ۲- نویسنده مسوول: دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (apameini@yahoo.com)
- ۳- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۵

### چکیده

تاکنون دو گونه از شب پره‌های جنس *Sesamia* Guenee, 1852 به نام‌های (*Sesamia nonagrioides* (Lefebvre, 1827) و *S. cretica* Lederer, 1857 به عنوان آفات کشاورزی از ایران گزارش شده است. تحقیق حاضر به روش DNA بارکدینگ و به منظور تأیید شناسایی‌های مورفولوژیک موجود و یافتن راهی برای تشخیص سریع و مطمئن این دو گونه در زمان عدم دسترسی به تخصص تاکسونومیک انجام گردید. نمونه‌ها از روی گیاهان میزبان ذرت، نیشکر و برنج در استان‌های خوزستان و فارس جمع‌آوری و به روش تاکسونومی کلاسیک شناسایی شد. پس از استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از آغازگرهای مناسب، ژن *COI* تکثیر و توالی‌یابی شد. پس از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها، بارکد گپ تخمین زده شد و میزان واگرایی نوکلئوتیدها مشخص شد. فواصل ژنتیکی بین این دو گونه به همراه پنج گونه نزدیک دیگر از جنس *Sesamia* توسط درخت اتصال همسایه (Neighbour-joining) نمایش داده شد. بدین منظور از مدل جایگزینی نوکلئوتیدی (K2P) استفاده شد. نتایج حاصله گونه‌های *S. nonagrioides* و *S. cretica* را به خوبی از هم متمایز نمود و شناسایی‌های مورفولوژیک را تأیید کرد. استفاده از این نتایج در شناسایی سریع و دقیق دو گونه مذکور و نیز شناسایی مراحل نابالغ آن‌ها توصیه می‌شود.

کلید واژه‌ها: آفات ساقه خوار، *COI* DNA بارکدینگ، *Sesamia cretica*، *Sesamia nonagrioides*

### مقدمه

گونه *S. nonagrioides* در جنوب اروپا، شمال آفریقا و غرب آسیا پراکنش دارد. گونه *S. cretica* نیز علاوه بر جنوب اروپا و آفریقا، در آسیا تا هند پراکنده است (Zilli et al., 2005). گونه *S. cretica* علاوه بر پراکنش در نواحی جنوبی ایران، از نیمه شمالی کشور نیز گزارش شده است (Ebert and Hacker, 2002). در ایران تاکنون علاوه بر گونه‌های *S. nonagrioides* و *S. cretica*، دو گونه *S. rungsi* Boursin, 1957 از هرمزگان (Ebert and Hacker, 2002) و *S. inferens* (Walker, 1865) از استان‌های شمالی (Hacker, 1990) نیز گزارش شده است.

گونه‌های مختلفی از شب پره‌های خانواده Noctuidae (Lepidoptera) به محصولات کشاورزی خسارت می‌زنند. تاکنون دو گونه از شب پره‌های جنس *Sesamia* به نام‌های (*Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) و *S. cretica* Lederer) به عنوان آفات کشاورزی از ایران گزارش شده است. این ساقه‌خواران در جنوب و جنوب غربی ایران به صورت هم‌جا وجود دارند و به ذرت، نیشکر و برنج خسارت وارد آورده و تا ۵ نسل در سال ایجاد می‌کنند (Cheraghali et al., 2015)؛ (Esfandiari et al., 2011b؛ Daniali, 1985).

مربوط به قرنطینه آفات در واردات و صادرات محصولات کشاورزی باشد (Ball and Armstrong, 2006). گونه‌های شب‌پره‌های خانواده Lymantriidae نیوزلند توسط (Ball and Armstrong, 2006) با استفاده از روش DNA بارکدینگ شناسایی شدند. Nagoshi et al. (2011) نیز امکان استفاده از روش DNA بارکدینگ در شناسایی و تفکیک گونه‌های بومی از گونه‌های خارجی شب‌پره‌های آفت جنس *Spodoptera* را در آمریکا بررسی نمودند و مشخص شد که این روش کارایی و دقت لازم را داشته و می‌تواند مکمل روش شناسایی مورفولوژیک باشد. در ایران محققین داخل کشور تاکنون از این روش برای شناسایی بالپولکداران استفاده نکرده‌اند. با این حال Rajaei and Feizpour (2016) گونه و جنس *Gypsochroa renitidata* (Hubner) را به‌عنوان گزارش جدید برای ایران توسط DNA بارکدینگ تأیید و منتشر نموده‌اند.

از آنجا که در هر راهبرد مدیریت آفات، اولین مرحله تشخیص صحیح گونه آفت می‌باشد (Meijerman and Ulenberg, 1996)، لذا به‌منظور تأیید شناسایی‌های مورفولوژیک موجود که بر اساس تاکسونومی کلاسیک است و نیز یافتن راهی برای تشخیص سریع دو گونه *S. cretica* و *S. nonagrioides* بدون نیاز به تخصص تاکسونومیک، تحقیق حاضر انجام شد.

### مواد و روش‌ها

نمونه‌های لارو آفات ساقه‌خوار *S. cretica* و *S. nonagrioides* از مزارع نیشکر، ذرت و برنج مناطق مختلف در استان‌های فارس و خوزستان جمع‌آوری و پس از پرورش، حشره بالغ از آن‌ها به‌دست آمد (جدول ۱). از اندام تناسلی نمونه‌های جمع‌آوری شده اسلاید تهیه شد و نمونه‌ها مورد مطالعه تاکسونومیک قرار گرفتند. سپس گونه‌ها بر اساس منابع موجود (Zilli et al., 2005؛ Tams and Bowden, 1953)

بسیاری از گونه‌های ساقه‌خواران خانواده Noctuidae شباهت ریخت‌شناختی زیادی به هم دارند و شناسایی اشتباه این آفات تاکنون بارها رخ داده و منجر به انتشار اطلاعات غلط شده است (Holloway, 1998؛ Tams and Bowden, 1953؛ Polaszek, 1992). اخیراً مشخص شده است که گزارش زیرگونه آفریقایی *Sesamia nonagrioides botanephaga* Tams & Bowden از ایران اشتباه است و این آفت در ایران گونه تپیک *S. nonagrioides* می‌باشد (Esfandiari et al., 2011b؛ Esfandiari et al., 2015). تفکیک مرحله نابالغ گونه‌های این جنس از یکدیگر به‌طور جامع بررسی نشده و صفات مطمئنی برای آن‌ها ارائه نشده است.

DNA بارکدینگ در کاربرد اصلی خود که شناسایی سریع نمونه‌های مورد بررسی است، مفید بوده و قادر به شناسایی دقیق بیش از ۹۰ درصد گونه‌های موجود است (Mutanen et al., 2014؛ Hausmann et al., 2013). در واقع DNA بارکدینگ از ناحیه کوتاه و استاندارد ۶۴۸ جفت بازی از ژن *COI* برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌کند که تحقیقات نشان داده در شناسایی نمونه در سطح گونه برای اکثر گروه‌های مختلف موجودات زنده اعم از پروانه‌ها، پرنده‌ها، ماهی‌ها و غیره بسیار مؤثر می‌باشد (Janzen et al., 2005). در زمینه شناسایی و تشخیص گونه‌ها، DNA بارکدینگ می‌تواند مکمل خوبی برای روش‌های مورفولوژیک باشد. همچنین می‌تواند در زمینه شناسایی نمونه‌های معیوب و ناقص مورفولوژیک، شناسایی تخم و اشکال نابالغ حشرات، شناسایی گونه‌های مخفی و گونه‌های دارای چندشکلی در چرخه زندگی مفید باشد (Armstrong and Ball, 2005). روش DNA بارکدینگ وابسته به چرخه زندگی یا جنسیت حشره نمی‌باشد. با توجه به وقت‌گیر بودن روش‌های شناسایی سنتی و الزام به انجام آن‌ها توسط یک متخصص، این روش می‌تواند با شناسایی سریع نمونه‌ها، ابزار قدرتمندی در دست متخصصان حفاظت گیاهان به‌خصوص در امور

جدول ۱- فهرست نمونه‌های تهیه شده برای استخراج DNA به همراه کد، اطلاعات محل جمع‌آوری، گیاه میزبان، تاریخ جمع‌آوری و شناسایی مورفولوژیک

Table 1. List of the material sampled: Specimen codes, geographic origin and host plant of the samples used for DNA extraction and morphological identification

Specimen code	Region	GPS coordinates	Host plant	Collection date	Identification
SKhA1	Khuzestan, Amir Kabir Sugarcane Agro-industry	31°03 N, 48°18 E	Sugarcane	Jun. 2007	<i>S. nonagrioides</i>
SKhA3	Khuzestan, Amir Kabir Sugarcane Agro-industry	31°03 N, 48°18 E	Sugarcane	Jun. 2007	<i>S. nonagrioides</i>
NKhCH5	Khuzestan, Imam Khomeini Sugarcane Agro-industry	31°47 N, 48°43 E	Sugarcane	Oct. 2013	<i>S. nonagrioides</i>
WFaF2007	Fars, Firuzabad	29°00 N, 52°33 E	Rice	Sept. 2007	<i>S. nonagrioides</i>
WFaF2011	Fars, Firuzabad	29°00 N, 52°33 E	Rice	Sept. 2011	<i>S. nonagrioides</i>
SKhS1	Khuzestan, Farabi Sugarcane Agro-industry	30°59 N, 48°34 E	Sugarcane	May 2012	<i>S. cretica</i>
NKhS2	Khuzestan, Farabi Sugarcane Agro-industry	30°59 N, 48°34 E	Sugarcane	May 2012	<i>S. cretica</i>
SKhS3	Khuzestan, Amir Kabir Sugarcane Agro-industry	31°03 N, 48°18 E	Sugarcane	Jun. 2007	<i>S. cretica</i>
NKh42	Khuzestan, Shush	32°14 N, 48°12 E	Unknown	Apr. 2012	<i>S. cretica</i>
SKhA4	Khuzestan, Amir Kabir Sugarcane Agro-industry	31°03 N, 48°18 E	Sugarcane	Jun. 2007	<i>S. cretica</i>
WFaN1	Fars, Nurabad	30°05 N 51°30 E	Maize	Sept. 2011	<i>S. cretica</i>
WFaN7	Fars, Nurabad	30°05 N 51°30 E	Maize	Sept. 2011	<i>S. cretica</i>

آن‌ها توسط الگوریتم ClustalW هم‌ردیف شدند. تخمین میزان واگرایی نوکلئوتیدها با مدل جایگزینی نوکلئوتیدی کیمورا<sup>۱</sup> (Kimura 2-parameter (K2P) و به روش Pairwise deletion در نرم‌افزار MEGA انجام شد. جهت محاسبه بارکد گپ<sup>۲</sup> به روش Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre et al., 2012) نیز پس از محاسبه فواصل دو به دو همه توالی‌ها توسط نرم‌افزار MEGA، با استفاده از نرم‌افزار Past V.3 (Hammer et al., 2001) هیستوگرام آن به صورت گرافیکی نشان داده شد. در این محاسبات مقدار بوت استرپ ۱۰۰۰ تعیین شد.

به روش الگوریتم اتصال همسایه<sup>۳</sup> درخت مربوطه بر اساس فاصله ژنتیکی بین گونه‌ها و توسط نرم‌افزار MEGA ترسیم شد. بدین منظور از مدل (K2P) که مناسب‌ترین مدل برای مطالعات در سطح گونه و در فواصل کم است (Hebert et al., 2003) و آزمون بوت‌استرپ با ۱۰۰۰۰ تکرار استفاده شد. همچنین به دلیل وجود توالی‌هایی با داده از دست رفته<sup>۴</sup> از Pairwise deletion استفاده شد. در رسم این درخت تعداد ۱۰ توالی از گونه‌های *S. cretica* و *S. nonagrioides* و ۱۰ توالی از ۵ گونه دیگر جنس *Sesamia* از سایر مناطق دنیا از بانک ژن جهت تحلیل و مقایسه دریافت و استفاده گردید.

### نتایج و بحث

از بین نمونه‌های شب‌پره ساقه‌خوار خسارت‌زا به محصولات کشاورزی در مناطق نمونه‌برداری شده دو گونه از جنس *Sesamia* به شرح زیر تشخیص داده شد. ۱- گونه *S. nonagrioides*: حشره بالغ نر با شاخک شانه‌ای دوطرفه (پروش)، عرض بدن با بال‌های باز ۲۶-۴۰ میلی‌متر. سر، سینه و رنگ زمینه بال جلو از ماشی-نارنجی کمرنگ و بژ تا قهوه‌ای کمرنگ و کاهی، روی بال جلو تیرگی‌هایی در قسمت میانی و انتهایی مشاهده گردید،

شناسایی شدند. سر و سینه حشره بالغ جهت استخراج DNA به روش De La Poza et al. (2008) جدا شد و استخراج با استفاده از کیت استخراج DNeasy Blood & Tissue Kit شرکت Qiagen انجام شد. آغازگرهایی که برای تکثیر ناحیه *COI* در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند، شامل جفت آغازگر مستقیم و معکوس زیر بودند (Hajibabaei et al., 2006):

LEPF(5-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3)  
LEPR(5-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3)  
تنها برای سه نمونه (SKhA4, WFaN1, WFaN7) از آغازگرهای توصیه شده توسط Moyal et al. (2011b) به دلیل در دسترس نبودن آغازگرهای فوق استفاده شد. زیرا این آغازگرها نیز منطقه یکسانی را تکثیر می‌کنند. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مواد مورد نیاز برای انجام واکنش PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۱/۵ میکرولیتر  $MgCl_2$  پنجاه میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ده میلی‌مولار، یک میکرولیتر از هر آغازگر ۱۰ میکرومولار، ۰/۴ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز (۵ واحد در میکرولیتر)، یک میکرولیتر DNA و ۱۷/۱ میکرولیتر آب دو نوبت یونیزه بود. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad به صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس در مدت ۶۰ ثانیه، شش چرخه: (واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه، اتصال ۹۰ ثانیه در ۴۵ درجه سلسیوس، گسترش ۷۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس)، ۳۶ چرخه: (واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه، اتصال ۹۰ ثانیه در ۵۱ درجه سلسیوس، گسترش ۷۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس) و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود.

ناحیه تکثیر شده از ژن *COI* جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen Inc, Seoul, Korea) ارسال شد. پس از توالی‌یابی، به وسیله نرم‌افزار MEGA 6 (Tamura et al., 2004, 2013) توالی‌ها در صورت نیاز ویرایش شده و نهایتاً ۶۰۰ جفت باز از

1- Kimura-two-parameter

2- Barcode gap

3- Neighbour-joining

4- Missing data

میتو کندریایی از ژن *COI* در دسترس بود.

### بررسی میزان انطباق توالی‌های به‌دست آمده با داده‌های بانک ژن

جهت تأیید شناسایی‌های مورفولوژیک انجام شده، توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده‌های بانک ژن توسط جستجوی بلاست انطباق داده شدند. توالی‌ها با درجه شباهتی بین ۹۹ تا ۱۰۰ درصد با توالی‌هایی در بانک ژن منطبق شدند. تنها یک توالی میزان شباهت ۹۷ درصد داشت. از ۱۲ توالی بررسی شده نتیجه بلاست همه توالی‌ها با توالی‌هایی در بانک ژن منطبق شدند و شناسایی مورفولوژیک انجام شده را تأیید نمودند.

### محاسبه فاصله بین تنوع درون گونه‌ای و بین گونه‌ای (بارکد گپ)

تعداد ۱۰ توالی از گونه‌های *S. cretica* و *S. nonagrioides* از سایر مناطق دنیا از بانک ژن استخراج و به توالی‌های مطالعه حاضر اضافه شد. پس از به‌دست آوردن فواصل دو به دو بین همه توالی‌های موجود، تعداد ۲۳۱ فاصله حاصل شد. سپس هیستوگرام این فواصل بر اساس فراوانی آن‌ها رسم شد (شکل ۲). با مراجعه به فواصل به‌دست آمده، حداکثر فاصله درون گونه‌ای ۰/۰۳۵ و حداقل فاصله بین گونه‌ای ۰/۰۸۱ بود. بنابراین چنان‌که در شکل ۲ نیز مشاهده می‌شود می‌توان با احتیاط چنین نتیجه گرفت که با توجه به این فواصل، بارکد گپ کمی کمتر از ۸ درصد است.

میزان واگرایی نوکلئوتیدی بین دو گونه بررسی شده در این مطالعه بر اساس مدل Kimura 2-parameter و آزمون بوت‌استرپ با ۱۰۰۰ تکرار برای محاسبه خطای معیار<sup>۶</sup> حاصل شد. تنوع بین گونه‌ای در دو گونه *S. cretica* و *S. nonagrioides* برابر با (SE) ۰/۰۱۴±۰/۰۹۶ بود. تنوع درون گونه‌ای نیز در گونه *S. nonagrioides* برابر با (SE) ۰/۰۰۴±۰/۰۰۱ و در گونه *S. cretica* برابر با (SE) ۰/۰۱۱±۰/۰۰۲ بود.

فاقد خطوط عرضی و لکه، خطوط پیش میانی و پس میانی ممکن است توسط نقاط سیاه رنگی مشخص باشند. بال عقب سفید یک‌دست با خط انتهایی قهوه‌ای روشن. ماده: شبیه نر، کمی بزرگتر و با شاخک نخی (شکل ۱a). اندام تناسلی نر دارای کوکولوس<sup>۱</sup> و ساکولوس<sup>۲</sup> جدا از هم، یوکستا<sup>۳</sup> ساده و مانیکا<sup>۴</sup> غشایی است (شکل ۱b). در اندام تناسلی ماده کیسه جفتگیری کشیده‌تر و گردتر، منفذ جفتگیری<sup>۵</sup> باریک‌تر و اسکلریته و یک صفحه اسکلریته جلو منفذ جفتگیری است (شکل ۱c). ۲- گونه *S. cretica*: از نظر ظاهری بسیار شبیه *S. nonagrioides* می‌باشد. اما حشره نر بالغ روی شاخک دارای دستجات<sup>۴</sup> تایی از موی ریز است. ماده: شبیه نر، کمی بزرگ‌تر و با شاخک نخی است (شکل ۱d). در اندام تناسلی نر کوکولوس و ساکولوس با هم ادغام شده، یوکستا دارای برآمدگی میانی و مانیکا خاردار است (شکل ۱e). در اندام تناسلی ماده کیسه جفتگیری کوتاه‌تر و پهن‌تر، منفذ جفتگیری پهن و فاقد ناحیه اسکلریته قابل توجه است (شکل ۱f).

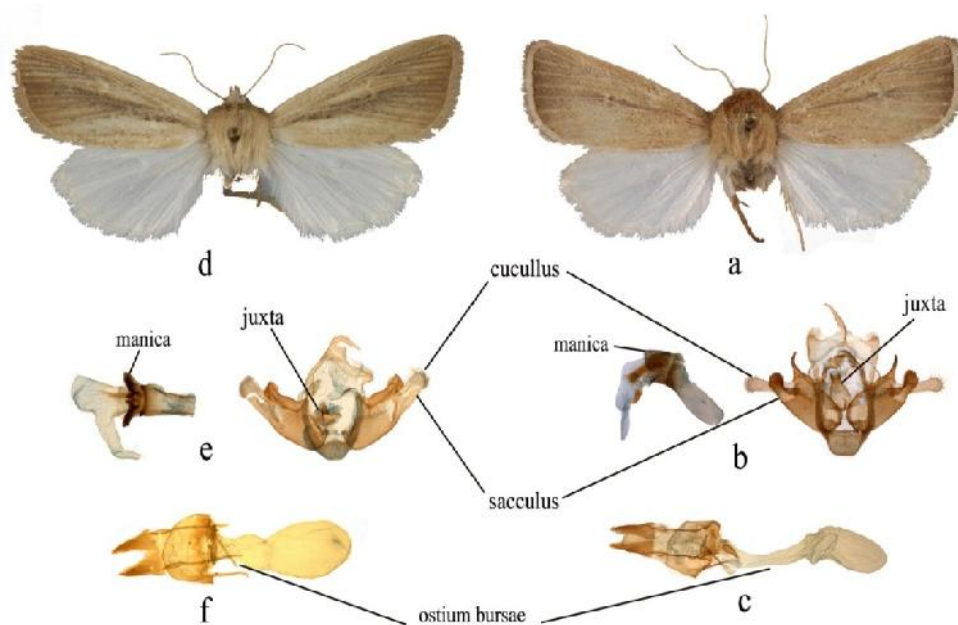
نهایتاً در بین نمونه‌های شناسایی شده از ۵ نمونه از گونه *S. nonagrioides* و ۷ نمونه از گونه *S. cretica* که از مناطق مختلف استان‌های خوزستان و فارس از روی گیاهان میزبان ذرت، نیشکر و برنج جمع‌آوری شده بود در مطالعات ژنتیکی استفاده شد.

### تکثیر و توالی‌یابی ژن *COI*

نشانه‌گر ژنتیکی *COI* به‌منظور تهیه توالی‌هایی از DNA دو گونه آفت یاد شده توانست با موفقیت تکثیر شود. این ناحیه از ژن میتو کندری که کدکننده پروتئین است بسیار حفاظت شده می‌باشد. توالی‌های به‌دست آمده در بانک ژن ثبت شدند و شماره دسترسی آن‌ها در جدول ۲ آمده است. توالی ۶۰۰ جفت باز در این مطالعه همردیف و در تحلیل‌ها استفاده شد. از گونه *S. cretica* در بانک ژن از قبل تنها یک توالی

- 1- Cucullus
- 2- Sacculus
- 3- Juxta
- 4- Manica
- 5- Ostium bursae

6- Standard error



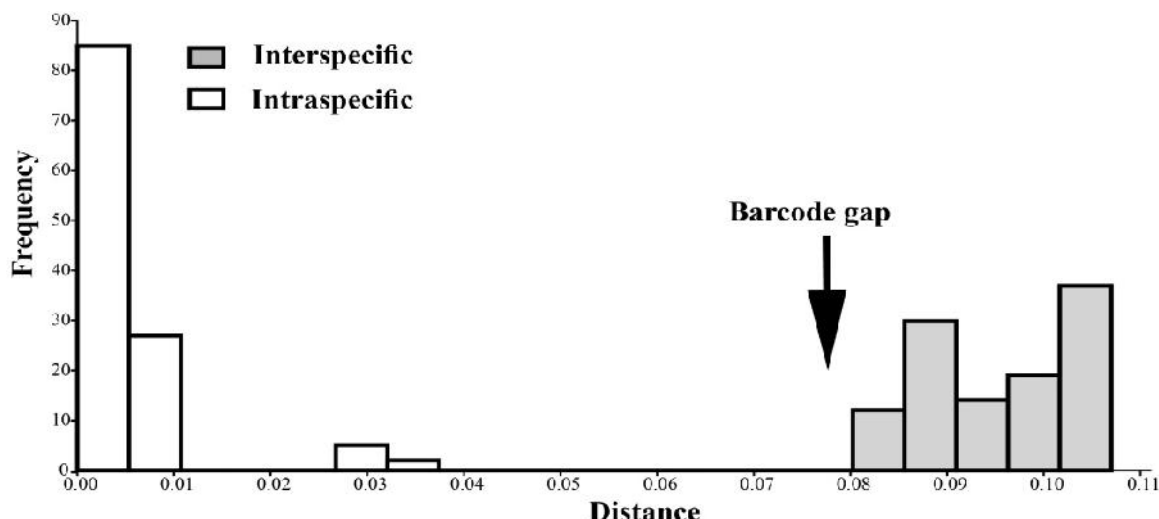
شکل ۱- حشره ماده بالغ *Sesamia nonagrioides* (a)، دستگاه تناسلی نر (b) و ماده (c) آن و حشره ماده بالغ *Sesamia cretica* (d)، دستگاه تناسلی نر (e) و ماده (f) آن

Figure 1. Adult female of *Sesamia nonagrioides* (a), its male (b) and female (c) genitalia and adult female of *Sesamia cretica* (d), its male (e) and female (f) genitalia

جدول ۲- انطباق توالی‌های به‌دست آمده در این مطالعه با توالی‌های بانک ژن توسط جستجوی بلاست به همراه نام و شماره دسترسی گونه مورد نظر، درصد شباهت و میزان پوشش

Table 2. GenBank accession number, Blast Hits, corresponding taxon, % similarity and coverage between our sequences and those from the NCBI GenBank database

Specimen code (GenBank accession#)	Morphological identification	Best Genbank BLAST hit	Corresponding taxon	Similarity %	Coverage (bp)
SKhA1 (KU891967)	<i>S. nonagrioides</i>	KP011969.1	<i>S. nonagrioides</i>	100%	633
SKhA3 (KU891968)	<i>S. nonagrioides</i>	KP011969.1	<i>S. nonagrioides</i>	100%	633
NKhCH5 (KU891969)	<i>S. nonagrioides</i>	JX282463.1	<i>S. nonagrioides</i>	99%	643
WFaF2007 (KU891970)	<i>S. nonagrioides</i>	KP011908.1	<i>S. nonagrioides</i>	100%	633
WFaF2011 (KU891971)	<i>S. nonagrioides</i>	KP011969.1	<i>S. nonagrioides</i>	100%	633
SKhS1 (KU891972)	<i>S. cretica</i>	KP682635.1	<i>S. cretica</i>	99%	586
NKhS2 (KU891975)	<i>S. cretica</i>	KP682635.1	<i>S. cretica</i>	99%	586
SKhS3 (KU891973)	<i>S. cretica</i>	KP682635.1	<i>S. cretica</i>	99%	586
NKh42 (KU891974)	<i>S. cretica</i>	KP682635.1	<i>S. cretica</i>	97%	586
SKhA4 (KU891976)	<i>S. cretica</i>	KP682635.1	<i>S. cretica</i>	99%	404
WFaF1 (KU891977)	<i>S. cretica</i>	KP682635.1	<i>S. cretica</i>	99%	404
WFaF7 (KU891978)	<i>S. cretica</i>	KP682635.1	<i>S. cretica</i>	99%	404



شکل ۲- بارکد گپ بین تنوع درون گونه‌ای و تنوع بین گونه‌ای حاصل از تحلیل فواصل دو به دو بر اساس مدل Kimura 2-parameter  
**Figure 2. Barcode gap between intra and interspecific pairwise distances based on Kimura 2-parameter pairwise distance analysis**

این گونه‌ها عمدتاً در قاره آفریقا است و گونه‌های بسیار کمی در سایر نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیای قدیم انتشار دارند (Zilli et al., 2005). در یک بازنگری تاکسونومیک Tams and Bowden (1953) گونه‌های مختلف ساقه‌خوار جنس *Sesamia* و برخی جنس‌های مرتبط با آن را که تا آن زمان در آفریقا شناخته شده بود بررسی نمودند. به اعتقاد آن‌ها گونه‌های آفریقایی جنس *Sesamia* بر اساس صفات اندام تناسلی<sup>۱</sup> نر و ماده به دو گروه تقسیم می‌شوند. اول گروه گونه *S. nonagrioides* و دوم گروه گونه *S. cretica* می‌باشند. یکی از صفات برجسته در تفکیک این دو گروه، جدایی ساکولوس و کوکولوس در والو اندام تناسلی نر در گروه *nonagrioides* و ادغام این دو در گروه *cretica* می‌باشد. همچنین آن‌ها عنوان کردند که گونه آسیایی *S. inferens* ظاهراً شبیه به گروه *cretica* است. به گزارش Moyal (2006) از آن زمان تاکنون تعداد گونه‌های توصیف شده از جنس *Sesamia* و جنس‌های مرتبط دو برابر شده است.

در مطالعه حاضر برخی گونه‌های مقاله Tams and

#### بررسی فاصله ژنتیکی بین گونه‌ها

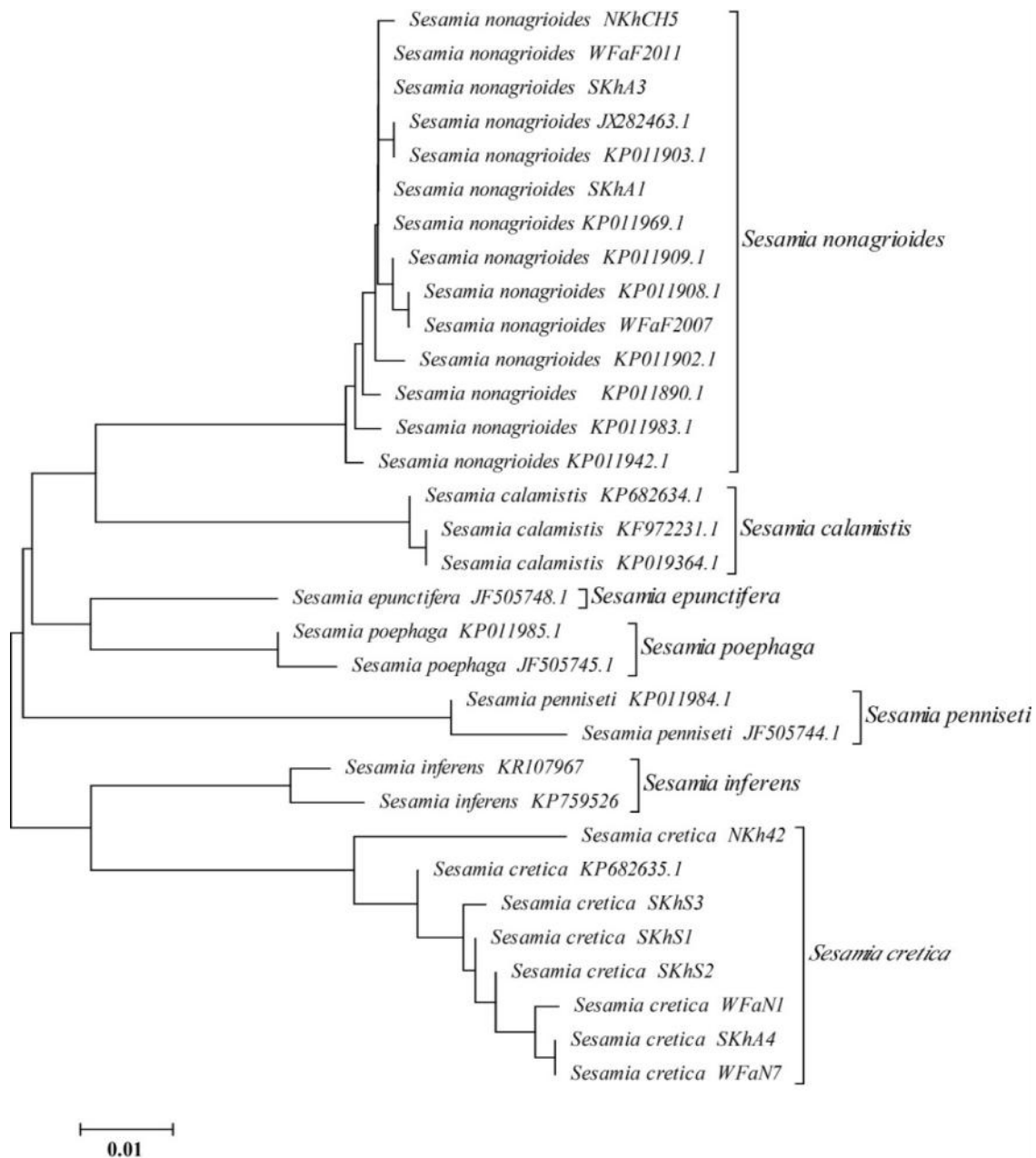
چنانکه ذکر شد تعداد ۱۰ توالی از گونه‌های *S. cretica* و *S. nonagrioides* و ۱۰ توالی از ۵ گونه دیگر جنس *Sesamia* از سایر مناطق دنیا از بانک ژن جهت تحلیل و مقایسه استخراج و به توالی‌های موجود اضافه شد. این گونه‌ها عبارت از *S. calamistis* Hampson، *S. epunctifera*، *S. penniseti* Tams & Bowden، *S. poephaga* Tams & Bowden، Hampson و *S. inferens* (Walker) بودند. نمونه‌های مطالعه شده از گونه‌های مذکور بر اساس شباهت در توالی ژن *COI* توسط روش اتصال همسایه (NJ) بررسی و طبق فواصل ژنتیکی روی درخت مربوطه ترسیم شدند (شکل ۳). فاصله ژنتیکی بین توالی‌های دو گونه *S. nonagrioides* و *S. cretica* به میزان ۹/۶ درصد بود. بیشترین فاصله نیز ۱۰/۸ درصد و بین توالی‌های *S. cretica* و *S. penniseti* بود.

زیر قبیله *Sesamiina* یک واحد تک نیایی بزرگ شامل ۱۰ جنس و ۲۰۱ گونه، از جمله جنس *Sesamia* با ۵۹ گونه می‌باشد. گونه‌های این زیرقبیله ساقه‌خوار هستند و اکثر آن‌ها از آفات کشاورزی می‌باشند. بنابراین بررسی سیستماتیک آن‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. پراکنش

1- Genitalia  
 2- Valve

در درخت مذکور مشخص شده و نمونه‌های به دست آمده در این تحقیق از ایران نیز به درستی در کنار توالی‌های گونه‌های مرتبط قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده صحت شناسایی‌های مورفولوژیک می‌باشد.

Bowden (1953) که توالی ژن *COI* آن‌ها در بانک ژن موجود بود به همراه دو گونه بررسی شده در این تحقیق بر اساس فواصل ژنتیکی در درختی به روش اتصال همسایه نمایش داده شده است (شکل ۳). بر اساس نتایج فاصله ژنتیکی، دو گونه *S. cretica* و *S. nonagrioides*



شکل ۳- درخت رسم شده بر اساس فواصل ژنتیکی (K2P) بین توالی‌های ژن *COI* در هفت گونه از جنس *Sesamia*، به روش N.J. کد نمونه‌ها در جداول ۱ و ۲ شرح داده شده و گونه‌های دارای شماره دسترسی از بانک ژن استخراج شده است  
 Figure 3. Neighbor-joining tree of *COI* sequence divergences in seven *Sesamia* species, using K2P genetic distances. Specimen code details are explained in Table 1 and 2 and those with accession numbers obtained from the NCBI GenBank database



از ایران مورد تردید است (Personal communication, Laszlo Ronkay).

نتایج مطالعه حاضر ضمن تأیید شناسایی‌های مورفولوژیک موجود، به‌طور کلی این امکان را برای گیاهپزشکان و محققین فراهم می‌آورد تا توسط روش بارکدینگ ژن *COI*، دو گونه آفت مهم ساقه‌خواری را که در این تحقیق بررسی شده است به سرعت و دقت شناسایی نمایند. به‌علاوه ابزار خوبی نیز برای شناسایی مراحل نابالغ آن‌ها می‌باشد. چنان‌که ذکر شد از گونه *S. cretica* تاکنون تنها یک توالی از ژن *COI* در بانک ژن در دسترس بود. بنابراین نتایج این بررسی می‌تواند در تحقیقات مرتبط با تاریخچه تکامل جنس *Sesamia* نیز مورد استفاده قرار گیرد.

### سپاس‌گزاری

نویسندگان مرهون آقایان دکتر حسین رجایی از موزه تاریخ طبیعی اشتوتگارت آلمان و دکتر حمید رجبی معماری از گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر کمک در انجام تحلیل‌های این تحقیق هستند. این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفته است.

اگرچه در درخت مذکور نزدیکی گونه *S. inferens* به *S. cretica* و نیز گونه‌ای مانند *S. calamistis* با *S. nonagrioides* توسط Tams and Bowden (1953) بیان شده مطابقت دارد، اما با این حال چنانکه ذکر شد از آن زمان تاکنون گونه‌های جدید بسیاری به جنس *Sesamia* و گروه‌های مرتبط اضافه شده و برخی از اسامی قبلی نیز اصلاح شده است (Kergoat et al., 2015; Moyal, 2006; Moyal et al., 2011a; Kruger, 2005). مطالعات اخیر نشان داده است که در زیرقبیله *Sesamiina* و به‌ویژه جنس *Sesamia* مورفولوژی به تنهایی قادر به تفکیک گونه‌ها نبوده است، در حالی که ساختار ژنتیکی میتوکندری در این‌ها تفاوت‌های بارزی دارد. بنابراین بررسی روابط فیلوژنتیک و تفکیک گونه‌ها در جنس *Sesamia* نیازمند یک بازنگری عمده با استفاده از صفات ژنتیکی و مورفولوژیکی می‌باشد (Moyal et al., 2011a).

چنان‌که ذکر شد در ایران دو گونه *S. rungsi* Boursin از هرمزگان (Ebert and Hacker, 2002) و *S. inferens* از استان‌های شمالی (Hacker, 1990) نیز گزارش شده‌اند. گونه *S. inferens* آفتی مهم در هند و شرق آسیا به خصوص در مزارع نیشکر است و گونه *S. rungsi* نیز از افغانستان توصیف شده است (Zilli et al., 2005; Box, 1953). گونه *S. rungsi* کمیاب است و گزارش *S. inferens*

## REFERENCES

- Armstrong, K.F., and Ball, S.L. 2005. DNA barcodes for biosecurity: Invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462): 1813-1823.
- Ball, S.L., and Armstrong, K.F. 2006. DNA barcodes for insect pest identification: A test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Canadian Journal of Forest Research*, (36): 337-350.
- Box, H.E. 1953. List of sugarcane insects. London Commonwealth Inst. P. 101.
- Cheraghali, Z., Esfandiari, M., Mossadegh, M.S., and Rajabi Memari, M. 2015. Genetic diversity of populations of the stem borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) in southern and southwestern Iran, using RAPD-PCR. *North-Western Journal of Zoology*, 11(1): 70-75.

- Daniali, M. 1985. Effect of biological, cultural and chemical control measures against sugarcane stem borers *Sesamia* spp. (Lep. Noctuidae) in Haft Tappeh, Khuzestan. M.Sc. Thesis, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. (In Farsi).
- De La Poza, M., Farinos, P.G., Berioz, B., Ortego, F., HernandezCrespo, P., and Castanera, P. 2008. Genetic structure of *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) populations in the Mediterranean area. *Environmental Entomology*, 37(5): 1354-1360.
- Ebert, G., and Hacker, H.H. 2002. Beitrag zur Fauna der Noctuidae des Iran: Verzeichnis der Bestände im Staatlichen Museum für Naturkunde Karlsruhe, taxonomische Bemerkungen und Beschreibung neuer Taxa (Noctuidae, Lepidoptera). *Esperiana*, 9: 237-409.
- Esfandiari, M., Mehravar, N., Motamedi, H., Rajabi Memari, H., and Rajaei, H. 2015. Phylogeography of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) in Iran inferred from mitochondrial DNA. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 61(4): 341-359.
- Esfandiari, M., Mossadegh, M.S., and Shishehbor, P. 2011a. *Sesamia botanephaga* Tams & Bowden, 1953 auct. in Iran, read *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre, 1827) (Lepidoptera: Noctuidae). *Munis Entomology and Zoology*, 6(1): 400-403.
- Esfandiari, M., Mossadegh, M.S., and Shishehbor, P. 2011b. Noctuidae s.l. (Lepidoptera) from sugarcane fields of SW Iran. *Fragmenta Faunistica*, 54(2): 137-147.
- Hacker, H.H. 1990. Die Noctuidae Vorderasiens (Lepidoptera). Systematische list mit einer übersicht über die Verbreitung unter besondere Berücksichtigung der fauna der Türkei (einschließlich der Nachbargebiete Balkan, Sudrußland, Westturkestan, Arabische Halbinsel, Agypten). *Neue Entomologische Nachrichten*, 27: 1-707.
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W., and Hebert, P.D.N. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4): 968-971.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1): 1-9.
- Hausmann, A., Godfray, H.C.J., and Huemer, P. 2013. Genetic patterns in European geometrid moths revealed by the Barcode Index Number (BIN) system. *PLoS One*, 8, e84518.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., and Dewaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Holloway, J.D. 1998. Noctuidae: Introduction. In Polaszek, A. (eds). *African cereal stem borers, economic importance, taxonomy, natural enemies and control*. CAB International, Wallingford, pp: 79-86.
- Janzen, D., Hajibabaei, M., Burns, J., Hallwachs, W., Remigio, E., and Hebert, P.D.N. 2005. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462): 1835-1845.

Kergoat, G.J., Toussaint, E.F.A., Capdevielle-Dulac, C., Clamens, A.L., Ong'amo, G., Conlong, D., van Den Berg, J., Cugala, D., Pallangyo, B., Mubenga, O., Chipabika, G., Ndemah, R., Sezonlin, M., Bani, G., Molo, R., Ali, A., Calatayud, P.A., Kaiser, L., Silvain, J.F., and Le Ru, B. 2015. Integrative taxonomy reveals six new species related to the Mediterranean corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre) (Lepidoptera, Noctuidae, Sesamiina). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 175(2): 244-270.

Kruger, M. 2005. New genera and species of noctuid moths from Lesotho (Lepidoptera: Noctuoidea: Noctuidae). *African Entomology*, 13(1): 97-142.

Meijerman, L., and Ulenberg, S.A. 1996. Identification of African stem borer larvae (Lepidoptera: Noctuidae, Pyralidae) based on morphology. *Bulletin of Entomological Research*, 86: 567-578.

Moyal, P. 2006. History of the systematics of the *Sesamia* sensu lato group of African noctuid stem borers of monocotyledonous plants (Lepidoptera). *Annales de la Societe entomologique de France*, 42(3-4): 285-291.

Moyal, P., Le Ru, B., Van den Berg, J., Ratnadass, A., Cugala, D., Matama-Kauma, T., Pallangyo, B., Conlong, D., and Defabachew, B. 2011a. Morphological reinforcement, ancient introgressive hybridization and species delimitation in African stem-borer species of the genus *Sesamia* Guenee (Lepidoptera: Noctuidae). *Systematic Entomology*, 36: 421-434.

Moyal, P., Tokro, P., Bayram, A., Savopoulou-Soultani, M., Conti, E., Eizaguirre, M., Le Ru, B., Avand-Faghih, A., Frerot, B., and Andreadis, S. 2011b. Origin and taxonomic status of the Palearctic population of the stem borer *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 103: 904-922.

Mutanen, M., Kekkonen, M., Prosser, S.W.J., Heber, P.D.N., and Kaila, L. 2014. One species in eight: DNA barcodes from type specimens resolve a taxonomic quagmire. *Molecular Ecology Resources*, 4: 706-715.

Nagoshi, R.N., Brambila, J., and Meagher, R.L. 2011. Use of DNA barcodes to identify invasive armyworm *Spodoptera* species in Florida. *Journal of Insect Science*, 11(1): 154. doi: 10.1673/031.011.15401

Polaszek, A. 1992. Cereal stem borers and their parasitoids in Africa. *Proceedings of the section Experimental and Applied Entomology, N.E.V. Amsterdam.*, 3: 70-71

Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., and Achaz, G. 2012. ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21: 1864-1877.

Rajaei, H., and Feizpour, Sh. 2016. *Gypsochroa renitidata* (Lepidoptera: Geometridae: Desmobaethrinae), a genus and species new for the fauna of Iran. *Zoology in the Middle East*, 62(1): 64-67.

Tams, W.H.T., and Bowden, J. 1953. A revision of the African species of *Sesamia* Guenee and related genera (Agrotidae-Lepidoptera). *Bulletin of Entomological Research*, 43: 645-679.

Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceeding of the national academy of Sciences of the United States of America*, 101: 11030-11035.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.

Zilli, A., Ronkay, L., and Fibiger, M. 2005. *Apameini. Noctuidae Europaeae*. Entomological Press, Sorø, Denmark. P. 323.

## Identification of two stem borers, *Sesamia nonagrioides* (Lep.: Noctuidae) and *S. cretica* by DNA barcoding

N. Mehravar<sup>1</sup>, M. Esfandiari<sup>2\*</sup> and P. Soheilifar<sup>3</sup>

- 1- Researcher of Iranian Institute of Research & Development in Chemical Industries, Karaj, Iran
- 2- **\*Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz and Biotechnology and Bioscience Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (apameini@yahoo.com)
- 3- Former M.Sc. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 15 March 2016

Accepted: 13 February 2017

### Abstract

Two species of the genus *Sesamia*, *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre, 1827) and *S. cretica* Lederer, 1857, have been reported as agricultural pests in Iran. DNA barcoding was used to confirm morphological identifications and achieve a reliable and rapid species identification of these pests when the expertise is limited. Specimens were sampled from host plants of maize, sugarcane and rice in Khuzestan and Fars provinces and identified by a classical taxonomy. The *COI* region was amplified from extracted DNA by appropriate primers and sequenced. The sequences were aligned and barcode gap, nucleotide divergence were calculated. Genetic distances between sequences of the two mentioned species and five closely related *Sesamia* species were evaluated based on a Neighbour-joining tree, using the Kimura 2-parameter distance model. Results could make a satisfactory species delineation and approved morphological identifications for *S. nonagrioides* and *S. cretica*. It is recommended to use these results for a rapid and precise species identification of these two species both in the immature and adults stages.

**Keywords:** *Stem borer pests, COI, DNA barcoding, Sesamia nonagrioides, Sesamia cretica*