پژوهش‌های علوم کشاورزی پایدار/جلد ۲/شماره ٤/زمستان ۱٤۰۱/ ص ۱۰۷-۹۱

https://www.sarj.iauk.ac.ir

ارزیابی ژنتیکی جمعیت‌های جغرافیایی پروانه کرم ساقه خوار برنج *Chilo suppressalis* در شمال ایران براساس ژن سیتوکروم اکسیداز شماره ۲ میتوکندری

عباس حیدری[۱]، علیرضا نظری*[۲]، محمد علی عشاقی[۳]، الهام صنعتگر[٤]

۱-دانشجوی دکتری، گروه حشره شناسی، دانشکده کشاورزی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۲-استادیار گروه کشاورزی پایدار، پژوهشکده امنیت غذایی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۳-استاد گروه بیولوژی و کنترل ناقلین بیماری‌ها، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ، تهران، ایران

٤-استادیار گروه حشره شناسی، دانشکده کشاورزی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول: nazariazad@yahoo.com

(تاریخ دریافت :۱٤۰۱/۱۰/۲۷- تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱۲/۲۹)

چکیده

گیاه برنج یکی از مهمترین و قدیمی‌ترین محصولات زراعی جهان محسوب می‌شود. کرم ساقه خواری برنج *Chilo suppressalis* از آفات درجه اول (کلیدی) برنج می باشد و تا ۳۳ درصد باعث کاهش عملکرد برنج می گردد. شناخت صحیح و بهتر ساختار ژنتیکی این آفت می‌تواند در بکارگیری و بهبود روش‌های کنترل آن موثر واقع شود. هدف از این مطالعه بررسی ساختار ژنتیکی ژن سیتوکروم اکسیداز شماره ۲ میتوکندری (mtDNA-COII) کرم ساقه خوار برنج در شمال ایران می باشد. در این مطالعه صید و جمع آوری نمونه‌های کرم ساقه خوار برنج از دو استان مازندران و گیلان در طول فصل کاشت برنج در سالهای ۱۳۹۵ و ۱۳۹٦ به انجام رسید. ساختار ژنتیکی نمونه های ۱۸ جمعیت جغرافیایی این افت با تکنیک ملکولی PCR ژن COII و تعیین توالی ژن مشخص شدند. توالی های حاصله با همدیگر و نیز با توالی های موجود در بانک جهانی ژن Genbank مقایسه و مشابهت انها با نمونه های جهانی بدست امد. در مجموع، ۳۱۲ نمونه از استان گیلان و ٦۷٦ نمونه از استان مازندران صید گردید. نتایج بررسی ساختار ژنتیکی نماینده‌هایی از ۱۸ جمعیت شمال ایران نشان داد که همه نمونه‌ها دارای ساختار ژنتیکی مشابه هم هستند. توالی ژن COII نمونه‌های ایرانی این افت شباهت زیادی با جمعیت کره جنوبی با شماره دسترسی MK207057 موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) دارد.

واژه‌های کلیدی: کرم ساقه خوار برنج، ژنوم میتوکندری، ژن سیتوکروم اکسیداز شماره ۲، ساختار ژنتیکی

مقدمه

گیاه برنج (*Oryza sativa* L.) از خانواده (Poaceae) یکی از مهمترین و قدیمی ترین محصولات زراعی بوده و یکی از سه غذای اصلی در دنیا محسوب می گردد و ۲۰ در صد انرژی و ۱۵ در صد پروتئین مصرفی انسانها را تأمین می کند. براساس گزارش FAO برنج پس از گندم بیشترین سطح زیر کشت را در حدود ۱۵۰ میلیون هکتار در جهان به خود اختصاص داده است . سطح زیر کشت برنج در ایران حدود ٦۰۰ هزار هکتار در ١٦ استان برآورد میگردد که ۸۰ درصد آن در استان های شمالی گیلان، مازندران و گلستان واقع شده است.

گیاه برنج از زمان خزانه تا برداشت تحت تأثیر عوامل مختلف مورد تهدید قرار می گیرد : عوامل محیطی یا غیرزنده از قبیل تنش سرما، گرما، طوفان، بارندگی، سیل و خشکسالی که از کنترل انسان خارج است. عوامل زنده از قبیل حشرات زیان آور، عوامل بیماریزا و علفهای هرز. می باشند. براساس آمار FAO، میزان خسارت آفات در زراعت برنج ۱۵%، بیماریها ۱۲ % و علف های هرز۹٪ اعلام شده است. کرم ساقه خواری برنج با نام علمی *Chilo suppressalis* (Walker) از حشرات زیان آور درجه اول(کلیدی) برنج است که هر سال طغیان می کند. کاهش عملکرد ناشی از خسارت کرم ساقه خوارنواری برنج تا ۳۳ درصد گزارش شده است . ارزیابی ها نشان داد که عملکرد ناشی از تغذیه کرم ساقه خوار نواری برنج تا ۷۲۷ کیلوگرم در هکتارکاهش یافته است (Khosrowshahi *et al.*, 1979). همچنین گزارش شده که حمله ساقه خوارهای برنج در مناطقی که برنج دیرکشت میشود به محصول برنج تا ۸۰ درصد خسارت می زند (Salim *et al*. 2001). روشهای کنترل کرم ساقه خوار برنج شامل استفاده ازارقام مقاوم، کنترل زراعی، مکانیکی، فیزیکی، بیولوژیکی و شیمیایی میباشد هرچند که کنترل شیمیایی روش ترجیحی و مقدم کشاورزان است. به‌هرحال بدلیل استقرار این آفت در درون ساقه برنج و تغذیه از آن، معمولاً کنترل شیمیایی آن مشکل و کم تأثیر میباشد(Cao *et al.* 2004). علاوه بر برنج، این افت به سایر گیاهان زراعی مانند بامبو، ذرت، جو دوسر، و نیشکر نیز خسارت می زند (Li *et al*., 2006; Wang *et al.*, 2020). این افت در سال ۱۹۷۳ وارد ایران و در شمال کشور مستقر شد و سپس بتدریج به سایر مناطق کشور گسترش یافت (Moghaddas & Nasiri 1995; Zibaee *et al.*, 2008) .

تا بحال گزارشات متعددی در خصوص وجود تفاوتهای بیولوژیک و رفتاری بین جمعیتهای مختلف این افت در نقاط مختلف دنیا گزارش شده است. این تفاوتها در بسیاری از جنبه های شکل شناسی (مانند رگبندی بال، اندازه بدن، اندازه اندام تناسلی جنس نر)، خصوصیات رفتاری (رفتار جفتگیری، زمان و دوره دیاپوز)، تعداد سن های لاروی، میزان حساسیت به حشره کش ها و ترکیبات بیوشمیایی، و میزان بقائ و پارازیته شدن مشاهده شده است (Samudra *et al*. 2002; Matsukura *et al*. 2009; Ueno *et al*. 2006; Ishiguro *et al*. 2006; Zahiri *et al*. 2006; Zibaee *et al*. 2008; Ding *et al* 2013; Huang *et al* 2016; Poor Amiri *et al*. 2018; Zhou *et al*. 2018). این اختلافات احتمال وجود گونه های خواهری (کمپلکس) داخل گونه و یا ژنوتیپ های مختلف را افزایش می دهد (Wang

(*et al.*, 2020)، در صورتی که وجود گونه های خواهری اثبات شود، مدیریت کنترل این افت می تواند بسیار متفاوت شود. بررسی ها در کشور چین نشان داد که دو ژنوتیپ مختلف در ارتباط با نوع میزبان گیاهی داخل این گونه وجود دارد، به نحوی که یکی از این ژنوتیپ ها ارتباط بسیار زیادی با گیاه برنج و ژنوتیپ دوم ارتباط تنگاتنگی با گیاه جو دو سر دارد(Wang *et al.*, 2020) . بررسی ها نشان داده که علی رغم اینکه این افت گستره جغرافیایی زیادی دارد ولی قدرت پراکنش زیادی ندارد و این موضوع باعث تجمع موتاسیون ها و تشکیل ساختارهای ژنتیکی متفاوتی در مناطق مختلف شده است (Liu *et al.*, 2013). در شمال ایران این افت در قسمت شرق و غرب دریای خزر از نظر طول دوره رشد و تعداد سن های لاروی تفاوتهای فاحشی با هم دارند.

امروزه استفاده از شاخص های ژنتیکی وابسته به اسید نوکلئیک (DNA) تحول عظیمی در شناسایی گونه ها و بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت های گونه های موجودات زنده ایجاد نموده است. ژن های ارگانل میتوکندری از جمله ژن کد کننده پروتئین سیتوکروم اکسیداز شماره ۲ (COII) در مطالعات ژنتیک جمعیتها و روابط فیلوژنی بسیاری از حشرات از جمله دوبالان (Oshaghi *et al* 2006; Oshaghi *et al.*, 2007; Chavshin *et al* 2014;) و سوسری ها (Hashemi-Aghdam *et al*. 2017) و نیز پروانه کرم ساقه خوار مورد استفاده قرار گرفته است (Meng *et al* 2008; Wang *et al*. 2020). ویژگی های منحصر بفرد ژن‌های میتوکندری مانند وراثت مادری (فقط از جنس ماده به نسل بعد منتقل می شود) (Oshaghi, 2005) که در نتیجه با ژنوم پدری ترکیب نمی شود، نیاز به تعداد کمتری نمونه برای مطالعه، و نهایتا دارای جهش پذیری بسیار بالا، انها راتبدیل به مارکرهای قدرتمند در مطالعات ساختار ژنتیکی جمعیت ها جانوری نموده است (Loaiza *et al.*, 2012)

علی رغم اهمیت کرم ساقه خوار برنج در ایران تا بحال مطالعات ناچیزی روی ساختار ژنتیکی این افت انجام شده است (Farahpour Haghani *et al*. 2014; Shayanmehr and Yoosefi-Lafooraki, 2016). به بررسی ساختار ژنتیکی این گونه در شمال ایران با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز شماره یک (COI) پرداختند(Heydari *et al* 2020). هدف اصلی این تحقیق بررسی ساختار ژنتیکی کرم ساقه خوار برنج نواری با نام علمی ***Chilo suppressalis*** (Walker) با کمک ژن COII در مهمترین افت برنج در دو استان مازندران و گیلان در شمال ایران و مقایسه ان با ساختار ژنتیکی این گونه در سایر نقاط دنیا می باشد.

مواد و روش ها

مناطق مورد مطالعه

مناطق مورد مطالعه دو استان گیلان و مازندران می باشند (۱). در این مطالعه نمونه های بالغ به طور زنده به روش های دستی، تله نوری، و نیز با کمک نور چراغ خودرو جمع آوری شده و برای شناسایی به آزمایشگاه تحقیقات برنج آمل منتقل شدند. جمع آوری آفت در مراحل مختلف رشد (لارو، شفیره) از روی گیاه و یا علفهای هرز مزارع برنج انجام شد (شکل شماره ۲). جدول ۱ جزییات محل و زمان صید نمونه ها در دو استان مازندران و گیلان را نشان می دهند. نمونه برداری ها از نسل زمستان گذران آفت به صورت لارو و از نسل دوم آفت بصورت لارو، شفیره، و حشره بالغ (پروانه) که خسارتش

مربوط به مرحله زایشی (مصادف با زمان خوشه رفتن و گل دادن گیاه برنج بوده وقتی که دانه ها در خوشه سفت نشده و منجر به خشک و پوک شدن دانه های برنج می شود که اصطلاحاً به سفید شدن خوشه ها یا White heads معروف است) انجام شد.

شکل ۱- مناطق مربوط به صید نمونه های کرم ساقه خوار برنج در دو استان مازندران و گیلان. مناطق مورد مطالعه طبق شماره گذاری روی نقشه عبارتند از: ۱- آستارا، ۲- تالش، ۳- اسالم، ٤-انزلی، ٥-خمام، ٦- رشت، ۷- لاهیجان، ۸-نویده، ۹-کلاچای، ۱۰- شیرود، ۱۱-کمربندی تنکابن، ۱۲-کمربندی چالوس، ۱۳- آمل ، محمد آباد، ١٤-آمل ، قلعه کش، ١٥-آمل،مرزنگو، ١٦- قائمشهر ، چفت کلا، ۱۷-قائمشهر ، هتل تلار، ۱۸-جویبار ، سروکلا.

جمع آوری لارو با بررسی ساقه های آلوده برنج و یا علف های هرز سوروف اطراف مزارع (وجود سوراخ روی ساقه و نیز وجود فضولات لاروی در داخل ساقه) انجام شد. شناسایی لاروها با کمک و تایید کارشناسان موسسه تحقیقاتی برنج صورت گرفت. لارو های زمستان گذاران در دمای بین ٤ تا ٦ درجه سانتی گراد نگه داری شده و به آزمایشگاه مولکولی منتقل شدند. در مناطق سرد لارو در داخل ساقه و نزدیک به ریشه ودر مناطق گرمتر در ساقه برنج و بالاتر از ریشه قرار داشتند. برای جمع آوری شفیره علاوه بر توجه به سوراخ های رو دیواره ساقه به دیواره ساقه نیز توجه می شد و وجود دیواره نازک شده و باقی ماندن یک لایه پارانشیمی نازک دلیلی بر وجود شفیره در ساقه بود. نمونه ها داخل لوله آزمایش قرار داده و در دهانه لوله آزمایش پنبه قرار داده و به ایستگاه برنج منتقل شدند و پس از شناسایی و تایید کارشناسان موسسه تحقیقاتی به آزمایشگاه مولکولی انتقال پیدا کردند.

شکل ۲. مراحل صید نمونه های کرم ساقه خوار برنج در دو استان گیلان و مازندران. از بالا (راست) به پایین: صید شفیره نسل دو، صید لارو نسل دو، شفیره نسل دو. از بالا (چپ): صید نمونه بالغ با استفاده از تله نوری، صید نمونه بالغ با استفاده از نور خودرو، صید نمونه بالغ با استفاده از روش دستی در دیوارهای منتهی به مزارع برنج

جدول ۱- جزییات زمان و مکان نمونه گیری کرم ساقه خوار در دو استان مازندران و گیلان

استان	محل	تعداد صید	گیاه میزبان	تاریخ	لارو	شفیره	بالغ	تاریخ
	جغتکلا	۳۰	۲۸ ساقه برنج ۲ علف هرز	۹۵/۱۰/۱۹	۱۰	۱۰	۱۱	۹٦/۰٤/۲۳
	تلار	۳۳	۳۲ ساقه برنج ۱ علف هرز	۹۵/۱۰/۱۹	۱۲	۱۰	۲۹	۹٦/۰٤/۲۳
	جویبار سروکلا	۳۱	۲۸ ساقه برنج ۳ علف هرز	۹۵/۱۰/۲۹	۱۰	۱۳	۱۱	۹٦/۰٤/۱۹
مازندران	محمدآباد	۳۰	ساقه برنج	۹۵/۱۰/۰٤	٦	۹	۱۰	۹٦/۰٤/۱۸
	ایستگاه برنج آمل	۳۲	ساقه برنج	۹۵/۱۰/۰٤	۱۰	۱۰	۱۰	۹٦/۰٤/۱٦
	مرزنگو	۳۲	ساقه برنج	۹۵/۱۰/۲۰	۱۰	۱۲	۹	۹٦/۰٤/۱۷
	کمربندی تنکابن	۳۲	۲۹ ساقه برنج ۳ علف هرز	۹۵/۱۰/۲٤	۱۰	۱۰	۱۹	۹٦/۰٤/۳۱
	کمربندی چالوس	۳٤	ساقه برنج	۹۵/۱۰/۲٤	۱۰	۱۱	۱۹	۹٦/۰٤/۳۱
	شیرود	٦	ساقه سوروف	۹۵/۱۰/۲٤	۱۰	۱۱	۷	۹٦/۰٤/۲٦

ادامه جدول ۱

	لاهیجان	۲۵	۱۳ سوروف ۱۲ دونیش	۹۵/۱۲/۱۱	۱۳	۱۰	۲۲	۹۶/۵/۱
	کلاچای	۲٤	۲ ساقه برنج ۲۲ سوروف ۱ دونیش	۹۵/۱۲/۱۱	۱۳	۱۹	۱۱	۹٦/٤/۲٦
	نویده	۲۷	۲۱ ساقه برنج ۵ سوروف	۹۵/۱۲/۱۱	۱۲	۱۰	۱۰	۹٦/٤/۲٤
گیلان	موسسه تحقیقات رشت	۲۱	۲۱ سوروف	۹۵/۱۲/۱۳	۱۱	۱۰	۹	۹٦/٤/۲٤
	خمام	۲۱	ساقه سوروف	۹۵/۱۲/۱۳	۱۲	۱۰	۱۹	۹٦/٤/۲٤
	انزلی	۲۳	سوروف	۹۵/۱۲/۱۳	۱۲	۱۲	۱۷	۹٦/٤/۲۵
	جاده اسالم	۱۲	دونیش	۹۵/۱۲/۱۳	۱۱	۱۰	۱۹	۹٦/٤/۲۵
	تالش	۲٤	۱۲ سوروف ۱۲ دونیش	۹۵/۱۲/۱۱	۱۵	۱۲	۲۳	۹٦/۵/۱
	آستارا(آستانه)	۲۱	سورگوم	۹۵/۱۲/۱۱	۱۱	۱۰	۲٤	۹٦/۵/۱
	جمع	٤۵۸			۱۹۸	۱۹۰	۲۷۹	

جمع آوری پروانه (حشره کامل) ساقه خوار برنج که شب پرواز هستند با کمک روشهای مختلف شامل تلهء نوری (تلهء قیفی شیب تند)، نور چراغ های ماشین که در روی آن توربلندی قرار می گرفت و پس از نشت پروانه ها بر روی تور، تور جمع آوری می شد، و صید دستی پروانه ها از روی دیوارهای

منتهی به مزارع برنج که در مجاورت نور قرار داشتند. تمام پروانه هایی جمع آوری شده داخل ارلن یالوله های آزمایش بزرگ به موسسه تحقیقاتی برنج انتقال و بعد از تایید شناسایی به آزمایشگاه مولکولی منتقل شدند. برای شناسایی نمونه ها از کلیدهای شناسایی استاندارد استفاده شد (Bleszynski 1970; Khan 1991). نمونه ها در دمای منهای ۲۰ درجه سانتیگراد برای انجام مطالعات ملکولی ذخیره شدند.

استخراج DNA ژنومی، PCR، تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی

DNA سلولهای بدن نمونه های کرم ساقه خوار برنج بصورت انفرادی با کمک کیت کیاژن طبق دستورالعمل کارخانه سازنده (Qiagen, Hilden, Germany) استخراج شد. با کمک PCR قطعه ای به طول تقریبی ۳۸۵ جفت باز از ژن سیتوکروم اکسیداز شماره ۲ (COII) میتوکندری به کمک پرایمرجلودار C2-J-3400 با توالی 5'-ATTGGACATCAATGATATTGA-3' و پرایمر عقبدار TK-N-3785 با توالی 5'-GTTTAAGAGACCAGTACTTG-3' انجام شد (Simon *et al.*, 1994). تکثیر ژن با کمک ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix ، ۱۰۰ نانوگرم DNA (حدود ۲ میکرولیتر)، ۵۰ پیکومول از هر پرایمر(حدود ۱ میکرولیتر برای هر پرایمر)، و ٦ میکرولیتر اب مقطر دوبار تقطیر (مجموع حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر) انجام شد. برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکر به شرح زیر بود: ٤ دقیقه در ۹٤ درجه سانتیگراد، سپس ۳۲ سیکل حرارتی شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹٤ درجه ، ٤٥ ثانیه دمای ۵۲ درجه، و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود. نهایتا دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه جهت ترمیم محصولات PCR در نظر گرفته شد. از اب دوبار تقطیر بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

محصولات PCR (۱ تا ۳ نمونه) با کیفیت مناسب از هر منطقه صید انتخاب و جهت تعیین توالی به شرکت سیناکلون (ایران) ارسال شد. این نمونه ها نماینده جمعیت های مختلف منطقه مورد مطالعه و از مراحل مختلف رشد (لارو، بالغ) ، نسل یا فصل رشد، و میزبان مختلف (برنج یا علف هرز) بودند. تعیین توالی با روش Sanger با استفاده از ABI 3730 انجام شد. نتایج توالی ها ابتدا با نرم افزار کروماس (Chromas) بررسی و اصلاح شدند. تشابه این توالی ها با همدیگر با کمک نرم افزار کلاستال امگا (Clustal Omega) انجام شد. همچنین تشابه این توالی ها با توالی های موجود در بانک جهانی ژن (Genbank) (http://www.ncbi.nlm) با کمک برنامه بلاست BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) انجام شد.

نمونه های تعیین توالی شده در بانک جهانی ژن ارسال و ثبت شدند. برای بررسی روابط فیلوژنی بین نمونه های ایران و نمونه های موجود در Genbank (جدول شماره ۲) از نرم افزار Mega7 استفاده شد. قبل از آنالیز فیلوژنی، طول توالی های مورد استفاده یکسان سازی شد و درخت فیلوژنیک با استفاده از الگوریتم Neighbour Joining (NJ) موجود در Mega7 رسم شد. از توالی گونه *Chilo infuscatellus* با شماره دسترسی AY320477 بعنوان گونه خارج گروه استفاده شد.

جدول ۲- جزییات نمونه های استفاده شده در انالیز فیلوژنی جمعیت های مختلف کرم ساقه خوار برنج با استفاده از ژن COII

گونه	کشور	بانک ژن	مرجع
C. suppressalis	ایران		این مقاله
C. suppressalis	کره جنوبی	MK207057	Direct Submission
C. suppressalis	چین	EF44239	Meng *et al* 2008
		EF442381 EF442383	Meng *et al* 2008
		EF442388 EF442394	Meng *et al* 2008
		EU362116 EU362117	Meng *et al* 2008
			Meng *et al* 2008
			Meng *et al* 2008
			Meng *et al* 2008
C. partellus	هند	JF798451	Direct submission
C. orichalcociliellus	کنیا	AY320478	Lange *et al* 2004
C. infuscatellus	تایلند	AY320477	Lange *et al* 2004
C. tumidicostalis	تایلند	AY320488	Lange *et al* 2004
C. auricilius	تایلند	KJ174087	Direct submission

نتایج و بحث

در این مطالعه حدود ۱۱۵۰ نمونه شامل لارور، شفیره، و بالغ از هر دو جنس نر و ماده از دو استان گیلان و مازندران صید و جمع اوری شد. تعداد ماده ها بسیار بیشتر از نرها بود بطوریکه از ۲۸۰ پروانه بالغ صید شده حدود ۲٦۸ (۹۵٪/۷) ماده بودند. اغلب نمونه های لاروی در فصل فعالیت حشره از گیاه برنج صید شدند. نمونه های لارو زمستان گذران در استان گیلان عمدتا از علف های هرز جمع اوری شدند در حالیکه نمونه های لارو زمستان گذران در مازندران ازگیاهان برنج باقیمانده در مزرعه بعد از برداشت برنج صید شدند.

PCR ژن سیتوکروم اکسیداز شماره ۲ نمونه های مختلف پروانه کرم ساقه خوار برنج از مراحل مختلف رشد (لارو، شفیره، بالغ) ، جمع اوری شده از گیاه برنج یا علف هرز، از فصول یا زمان های مختلف سال، و از شهرستانهای مختلف دو استان با موفقیت انجام شد. طول PCR برای همه نمونه ها (حدود ۱۵۰ عدد) یکسان و بطول تقریبی ۳۸۵ جفت باز بود و اختلافی از نظر طول با هم نداشتند. از این نمونه ها تعدادی (۱۸ عدد) بصورت خوشه ای تصادفی برای تعیین توالی انتخاب شدند. انتخاب شده ها نماینده مراحل مختلف رشد (لارو، شفیره، بالغ) ، جمع اوری شده از دو گیاه میزبان یعنی برنج و علف هرز، از فصول یا زمان های مختلف سال، و از شهرستانهای مختلف دو استان بودند.

توالی ژن COII نمونه های تعیین توالی شده با نمونه های موجود در بانک جهانی ژن مقایسه شدند و نتایج این مقایسه (Blast) نشان داد که همگی نمونه ها متعلق به گونه پروانه کرم ساقه خوار برنج *Chilo suppressalis* می باشند و تشخیص های مورفولوژیک انجام شده کاملا تایید شدند. ابتدا و انتهای توالی های بدست امده مورد بررسی قرارگرفتند و بخشهای غیر قابل اعتماد ان حذف شدند و توالی بطول ۳۷۵ جفت باز قابل اعتماد برای انالیزهای بیوانفورماتیک و بررسی های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. برای اطمینان از اینکه توالی ها متعلق به ژنوم میتوکندری می باشد توالی ها از نظر

تعداد بازهای ادنین و تیمین (A+T) مورد بررسی قرار گرفتند. این بررسی نشان داد که ۷۲ درصد توالی‌ها (۲۷۰ از ۳۷۵) از ادنین و تیمین تشکیل شده است و این خصوصیت میتوکندریال بودن ژن را تایید نمود. از انجا که ژن COII یک ژن کدکننده پروتئین است توالی های DNA بدست امده این مطالعه از نظر اسید امینه نیز بررسی شدند تا اطمینان حاصل شود که از ژن های مجازی و غیر فعال نباشند. این بررسی ها نشان داد که هیچگونه اسید نوکلئیک اضافی یا حذف شده (indel) در طول توالی ها وجود ندارد و توالی ها در همه طول به اسید امینه ترجمه شدند و هیچگونه کد توقف (stop codon) نیز در طول توالی ها وجود نداشت. همچنین توالی اسیدهای امینه حاصل از این مطالعه با توالی اسید امینه ژن COII موجود در Genbank مقایسه شد. نتایج نشان داد که همولوژی کاملی بین توالی های بدست امده و توالی های موجود در بانک ژن وجود دارد. توالی های حاصل از این مطالعه به بانک جهانی ژن Genbank ارسال و ثبت شدند.

توالی COII نمونه های مختلف این مطالعه با همدیگر مقایسه شدند. این مقایسه با چیدمان (alignment) انجام شد. این انالیز نشان داد که همه نمونه ها صددرصد مشابه هم بودند و هیچگونه اختلاف ژنتیکی در سطح اسید نوکلئیک و یا در سطح اسید امینه بین نمونه ها وجود ندارد. بعبارت دیگر همه نمونه های مناطق مختلف جغرافیایی دو استان مازندران و گیلان ساختار ژنتیکی یکسان و از یک نوع هاپلوتایپ می باشند.

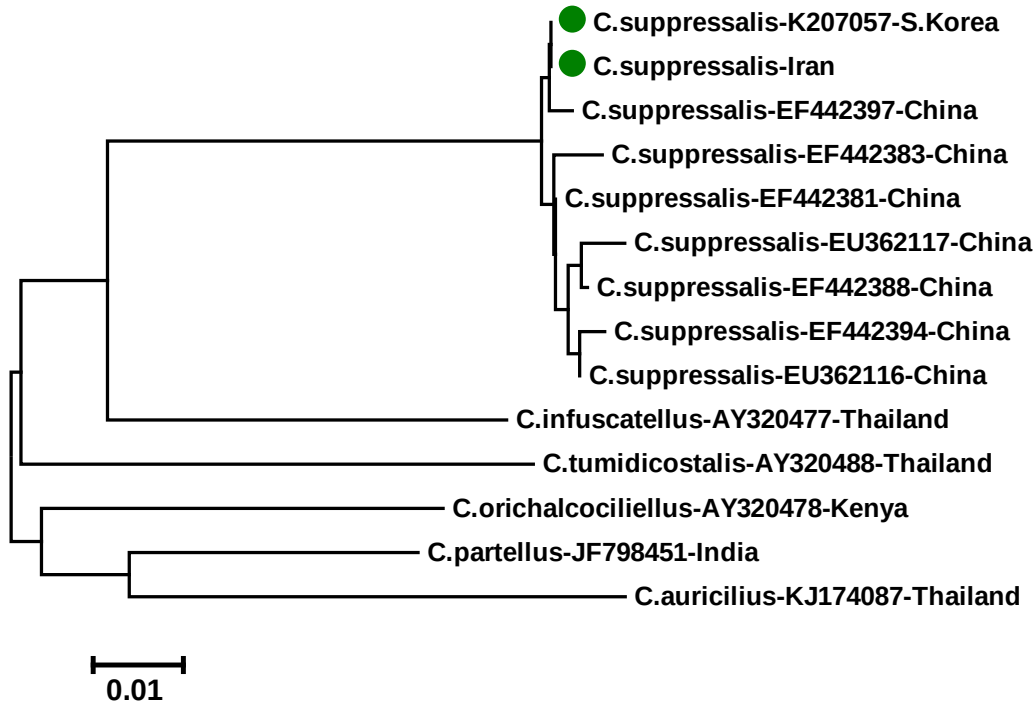
مقایسه توالی ژن COII نمونه های این مطالعه با نمونه های موجود در بانک جهانی ژن نشان داد که نمونه های ایران صد درصد مشابه نمونه ای از کشور کره جنوبی با شماره دسترسی MK207057 در بانک جهانی ژن می باشند (شکل شماره ۲).

```
S.Korea-MK207057    GATTTTAACAATGTTGAATTTGATTCCTATATAATTCCATCAAAAGATCTAAAAAATGAT   60
Iran                GATTTTAACAATGTTGAATTTGATTCCTATATAATTCCATCAAAAGATCTAAAAAATGAT   60
                    ************************************************************

S.Korea-MK207057    AATTTTCGTTTATTAGATGTAGATAATCGAGTTATTTTACCTATAAATAACCAAATTCGA   120
Iran                AATTTTCGTTTATTAGATGTAGATAATCGAGTTATTTTACCTATAAATAACCAAATTCGA   120
                    ************************************************************

S.Korea-MK207057    ATTATAGTTACAGCTACAGACGTTATTCATTCTTGAACAATCCCATCTATAGGGGTAAAA   180
Iran                ATTATAGTTACAGCTACAGACGTTATTCATTCTTGAACAATCCCATCTATAGGGGTAAAA   180
                    ************************************************************

S.Korea-MK207057    GTAGATGCTAACCCAGGCCGATTAAACCAAACCAATTTCTTTATTAACCGACCTGGAATT   240
Iran                GTAGATGCTAACCCAGGCCGATTAAACCAAACCAATTTCTTTATTAACCGACCTGGAATT   240
                    ************************************************************

S.Korea-MK207057    TATTATGGTCAATGTTCAGAAATTTGTGGAGCTAATCATAGATTTATACCTATTCTAATT   300
Iran                TATTATGGTCAATGTTCAGAAATTTGTGGAGCTAATCATAGATTTATACCTATTCTAATT   300
                    ************************************************************

S.Korea-MK207057    GAAAGAATCCCACTTAAAAATTTTATTAATTGAATTAATAATTATTCTTCATTAGATGAC   360
Iran                GAAAGAATCCCACTTAAAAATTTTATTAATTGAATTAATAATTATTCTTCATTAGATGAC   360
                    ************************************************************

S.Korea-MK207057    TGAAAGCAAGTACTG 375
Iran                TGAAAGCAAGTACTG 375
                    ***************
```

شکل ۲- مقایسه توالی ۳۷۵ باز از ژن COII نمونه پروانه کرم ساقه خوار شمال ایران با نمونه کشور کره جنوبی با شماره دسترسی MK207057 موجود در بانک جهانی ژن Genbank. نتایج نشان می دهد دو نمونه ۱۰۰ درصد مشابه هم هستند. *: علامت تشابه.

بررسی های بعدی نشان داد که بعد از کره جنوبی، نمونه های ایران به نمونه های از کشور چین به شماره های دسترسی EF442397, EF442381 به میزان ۹۹,۷۳ درصد، به نمونه هایی از چین با شماره های دسترسی EF442382 , EF442388, EU362116, EU362118 به میزان ۹۹,٤۷ درصد، و به نمونه هایی از چین با شماره های دسترسی EF442394, EF442390, EF442387, EF442383 به میزان ۹۹,۲ درصد مشابهت دارند. از سایر گونه های جنس *Chilo* ، نمونه های ایران مشابه گونه *Chilo infuscatellus* از کشور تایلند با شماره دسترسی AY320477 به میزان ۹۲ درصد بودند.

روابط فیلوژنی با استفاده از توالی های ژن COII بین نمونه های کرم ساقه خوار شمال ایران با توالی های *C. suppressalis* موجود در بانک جهانی ژن بهمراه توالی پنج گونه دیگر از جنس *Chilo* (جدول شماره ۲) در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که تمام نمونه های *C. suppressalis* در یک شاخه اصلی کنار هم قرار می گیرند و بقیه پنج گونه جنس *Chilo* در یک شاخه دیگرقرار می گیرند. علاوه براین نمونه شمال ایران در کنار نمونه کشور کره جنوبی بعنوان نمونه خواهری (Sister taxa) قرار می گیرد. بعد از نمونه کره جنوبی نمونه ای از کشور چین نزدیکترین نمونه به ایران–کره جنوبی است. بقیه نمونه های *C. suppressalis* در یک زیر شاخه مستقل قرار می‌گیرند.



شکل ۳– روابط فیلوژنی با متد Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987) با استفاده از 366 bp توالی های ژن COII بین نمونه های کرم ساقه خوار شمال ایران با توالی های C. suppressalis سایر کشورها موجود در بانک جهانی ژن بهمراه توالی پنج گونه دیگر از جنس Chilo (جدول شماره ۲). نمونه ایران و کره جنوبی که مشابه هم هستند با دایره سبز نشان داده شده اند. مقیاس پایین درخت فیلوژنی شاخص فاصله ژنتیکی بین نمونه ها می باشد.

دلیل کاهش تنوع ژنتیکی بین جمعیت های مختلف می تواند مربوط به دلایل زیر باشد. اول اینکه شرایط اب و هوایی (مانند رطوبت نسبی، درجه حرارت، و ارتفاع از سطح دریا) و شرایط اقلیمی این دو استان بسیار مشابه هم هستند. لذا شرایط متفاوتی برای ایجاد تنوع و سازگاری های متفاوت در اقلیمهای مختلف ایجاد نمی شود. مزارع برنج در اکثر نقاط این دو استان وجود دارد و مانع طبیعی مانند کوهستان و یا دره های عمیق و گسترده بین انها وجود ندارد و پروانه بالغ کرم ساقه خوار برنج براحتی بین مزارع جابجا می شود هرچند که طول پرواز بسیار زیاد ندارد ولی بخوبی بین مزارع پروازمی کند و در گستره سرزمینی دو استان بخوبی گسترش پیدا می کند و جفت گیری بین جمعیت ها ی محلی بخوبی صورت می گیرد این جفت گیری های موفق منجر به ایجاد یک جریان ژنی (gene flow) بین جمعیت های مختلف دو استان شده و نهایتا باعث می شود ساختار ژنتیکی جمعیت های مختلف این گونه یکسان شود. عدم تنوع ژنتیکی یا تنوع ژنتیکی بسیار کم هم قبلاً در دو مطالعه مستقل دیگر توسط (Heydari *et al*., 2020) و (Shayanmehr & Yoosefi-Lafooraki 2016) گزارش شده بود. عدم تنوع ژنتیکی در دو ژن COI-COII در بعضی جمعیت های این افت در کشور چین نیز گزارش شده است (Liu *et al*., 2013). البته وسعت جغرافیایی منطقه مورد مطالعه موضوع مهمی در این مطالعات می باشد و برای مثال در مطالعه ای در سراسر کشور چین که بسیار وسیع تر از وسعت منطقه مورد مطالعه ما بوده است اختلافات ژنتیکی بسیار زیادی بین جمعیت های مختلف این افت گزارش شده است (Tang *et al*., 2016; Wang *et al*., 2020). تنوع جغرافیایی و اقلیمی، وجود موانع جغرافیایی (کوهها و دره های بزرگ)، و اختلاف در تعداد نسل بین جمعیت های مختلف کشورچین علت این تنوع ژنتیکی گزارش شده بودند. (Heydari *et al*., 2018) نشان دادند که بین ۱۸ جمعیت مختلف دو استان شمالی کشور، به استثنا یک نمونه که در یک اسید نوکلئیک تفاوت داشت، هیچ تنوع ژنتیکی مشاهده نشده بود و همه بقیه ۱۷ جمعیت یک هاپلوتایپ ژنتیکی داشتند. (Shayanmehr & Yoosefi-Lafooraki, 2016) نیز نشان دادند که تنها دو هاپلوتایپ در جمعیت های مورد مطالعه در شمال ایران در ژن سیتوکروم اکسیداز شماره یک وجود دارد

تحقیقات در زمینه ساعت ملکولی (Molecular clock) نشان داده که به ازای یک درصد تنوع ژنتیکی در ژنهای میتوکندریال ۲ میلیون سال زمان نیاز است. لذا این نتیجه نشان می دهد که این افت از کشور کره جنوبی وارد کشور شده است. در مطالعه دیگری که روی ژن سیتوکروم اکسیداز شماره یک (COI) این افت در ایران انجام شده بود (Heydari *et al*., 2020) نتیجه مشابه با این مطالعه بدست امده بود و توالی ژن COI جمعیت های شمال ایران مشابه نمونه های کره جنوبی شده بودند و ان محققین احتمال داده بودند که منشائ احتمالی این افت در ایران کشور کره جنوبی می باشد.

نکته قابل توجه در مورد ژن COII که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت یک ژن میتوکندریال است. ژنوم میتوکندری فقط از مادر به نسل بعدی منتقل می شوند و نسل جدید حالت نوترکیبی ندارد یعنی با

ژنوم حشره نر ترکیب نمی شود و عدم نوترکیبی باعث می شود بتوان براحتی اجداد اولیه مادری گونه های جانوری را شناسایی نمود (Oshaghi, 2005; Simon *et al*., 1994). ژن‌های میتوکندریال دارای موتاسیون های بسیار بیشتر از ژنهای هسته ای هستند و سرعت تحولات ژنتیکی در انها بسیار بیشتر از هسته می باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ساختار ژنتیکی کرم ساقه خوار برنج در دو استان شمالی کشور مشابه هم هستند و همه توالی یکسان و از یک نوع هاپلوتایپ هستند.. علاوه بر این عدم وجود تنوع ژنتیکی در شمال ایران میتواند مربوط به کلونیزاسیون یک کلنی از خارج کشور در سالهای نه چندان دور در ایران باشد. بدین ترتیب سالیان زیادی از ورود یک کلون از این حشره در کشور نمی گذرد و فرصت تجمع موتاسیون های جدید و ایجاد تنوع ژنتیکی هنوز پیش نیامده است.

مقایسه توالی های ژن COII جمعیت های شمال ایران با توالی های این ژن از سایر کشورهای دنیا موجود در بانک جهانی ژن (GenBank) نشان داد که ساختار ژنتیکی کرم ساقه خوار برنج ایران شباهت بسیار زیادی به یک نمونه از کشور کره جنوبی با شماره دسترسی MK207057 دارد. در مجموع می توان ابیان کرد که احتمالا این افت از کره جنوبی وارد ایران شده است و به‌علت مشابهت ژنتیکی صد در صد جمعیت های مختلف کرم ساقه خوار برنج در دو استان شمالی کشور روش های فیزیکی، زراعی، بیولوژیک، و شیمیایی یکسانی می توان برای کنترل این آفت مهم کشاورزی توصیه نمود.

REFRENCES

Bleszynski, S. 1970. A revision of the world species of *Chilo Zincken* (Lep.: Pyralidae). Bull Br Mus (Nat His) Entomol. 25:101–195.

Cao, S. S., and Du, Y.Z., 2014. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Chilo auricilius* and comparison with three other rice stem borers. Gene. 548(2):270–276.

Chavshin, A. R., Oshaghi, M. A., Vatandoost, H., Hanafi-Bojd, A. A., Raeisi, A., and Nikpoor, F. 2014. Molecular characterization, biological forms and sporozoite rate of *Anopheles stephensi* in southern Iran. Asian Pac J Trop Biomed. Jan;4(1):47-51. doi: 10.1016/S2221-1691(14)60207-0.

Ding, N., Dalin, P., Zhu, Q. H., Ma, W. H., Zhu, F., and Wang, X. P. 2013. A comparison of the larval overwintering biology of the striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), in rice and water-oat fields. Appl Entomol Zool. 48(2):147–153.

Farahpour, H. A., Hosseini, R., Ebadi, A. A., and Aalami, A. 2014. Genetic variation of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) populations in Guilan and west of Mazandaran provinces analysed with RAPD markers. Plant Protect Sci. 50 (No. 1): 26–35.

Hashemi-Aghdam, S. S., and Oshaghi, M. A. 2015. A Checklist of Iranian Cockroaches (Blattodea) with Description of *Polyphaga* sp. as a New Species in Iran. J. Arthropod Borne Dis. 2015; 9(2): 161-75.

Heydari, A., Oshaghi, M. A., Nazari, A., Shayeghi, M., and Sanatgar, E. 2020. Genetic structure of rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera:Crambidae) in North of Iran. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal. Dec;31(8): 327-334. doi:10.1080/24701394.2020.1815718.

Huang, C., Hu, B., Li, J., and Wang, Y. 2016. Water-oats harbors two strains of the striped stem borer *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) with temporal divergence in mating behavior[J]. Appl Entomol Zool. 51(3): 457–463.

Ishiguro, N., Yoshida, K., and Tsuchida, K. 2006. Genetic differences between rice and water-oat feeders in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae). Appl Entomol Zool. 41(4): 585–593.

Jiang, W. H., Han, Z. J., and Hao, M. L. 2005. Preliminary study on resistance of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* to fipronil. Rice Sci. 12: 295–298.

Khosrowshahi, M., Nikkhoo, F., Dezfulian, A., and Banihashemian, A. 1979. Assessment of rice loss caused by rice stem borer. Appl Entomol Phytopathol. 47(2):107–117.

Khan, Z. R,, Litsinger, J. A., Barrion, A. T., Villanueva, F. F. D., Fer-Nandez, N. J., and Taylo, L. D. 1991. World bibliography of rice stem borers. Manila, Philippines; International Rice Research Institute (IRRI). p. 415.

Lange, C. L., Scott, K. D., Graham, G. C., Sallam, M. N., and Allsopp, P. G. 2004. Sugarcane moth borers (Lepidoptera: Noctuidae and Pyraloidea): phylogenetics constructed using COII and 16S mitochondrial partial gene sequences. Bull Entomol Res. Oct;94(5):457-64. doi: 10.1079/ber2004320. PMID: 15385065.

Li, X., Huang, Q., Yuan, J., and Tang, Z. 2007. Fipronil resistance mechanisms in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker). Pestic Biochem Phys. 89(3): 169–174.

Liu, Y. D., Hou, M. L., Wu, Y. C., and Liu, G. Q. 2013. Population Genetic Analysis of the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis*, in the South China. J Integr Agr. 12(6): 1033–1041.

Matsukura, K., Hoshizaki, S., Ishikawa, Y., and Tatsuki, S. 2006. Morphometric differences between rice and water-oats population of the striped stem borer moth, *Chilo suppressalis* Lepidoptera: Crambidae). Appl Entomol Zool. 41(3):529–535.

Matsukura, K., Hoshizaki, S., Ishikawa, Y., and Tatsuki, S. 2009. Differences in timing of the emergence of the overwintering generation between rice and water-oats populations of the striped stem borer moth, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). Appl Entomol Zool. 44(3): 485–489.

Meng, X. F., Shi, M., and Chen, X. X. 1997. Population genetic structure of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae): strong subdivision in China inferred from microsatellite markers and mtDNA gene sequences. Mol Ecol. 2008 Jun;17(12):2880-97. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03792. x.

Moghaddas, H., and Nasiri M. 1995. Identification of rice striped stem borer in Isfahan, study of its biology and distribution. In: Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran.

Oshaghi, M. A. 2005. mtDNA inheritance in the mosquitoes of Anopheles stephensi. Mitochondrion. 5(4): 266–271.

Oshaghi, M. A., Yaaghoobi, F., and Abaie, M. R. 2006. Pattern of mitochondrial DNA variation between and within *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) biological forms suggests extensive gene flow. Acta Trop. Oct;99(2-3):226-33. doi: 10.1016/j.actatropica.08.005.

Oshaghi, M. A., Shemshad, K. H., Yaghobi-Ershadi, M. R., Pedram, M., Vatandoost, H., Abaie, M. R., Akbarzadeh, K., and Mohtarami, F. 2007. Genetic structure of the malaria vector *Anopheles superpictus* in Iran using mitochondrial cytochrome oxidase (COI and COII) and morphologic markers: a new species complex? Acta Trop. 2007 Mar;101(3):241-8. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.02.006.

Poor-Amiri, M. N., Alinia, A., Imani, S., Shayanmehr, M., and Ahadiyat, A. 2018. Double cropping rice systems affect biological parameters of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). J Entomol Soc Iran(JESI). 38(2): 137–148.

Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.

Salim, M., Masud, A., and Ramzan, M. 2001. "Integrated pest management of Basmati rice in Pakistan." Specialty rices of the world, breeding, production and marketing. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Samudra, I. M., Emura, K., Hoshizaki, S., Ishikawa, Y., and Tatsuki, S. 2002. Temporal difference in mating behavior between rice- and water-oats-populations of the striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae). Appl Entomol Zool. 37(2): 257–262.

Shayanmehr, M., and Yoosefi-Lafooraki, E. 2016. Genetic diversity of rice stem borer (*Chilo suppressalis* Walker) from Northern Iran and comparison with other countries. J Entomol Acarol Res. 48(3): 360–365.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., and 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, 651–701.

Tang, X. T., Zheng, F. S., Lu, M. X., and Du, Y. Z. 2016. New ideas about genetic differentiation of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) populations in China based on the mtDNA cytochrome b gene. Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal. 27(2): 1567–1573.

Ueno, H., Furukawa, S., and Tsuchida, K. 2006. Difference in the time of mating activity between host-associated populations of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker). Entomol Science. 9(3): 255–259.

Wang, Y., Huang, C., Hu, B., Liu, Y., Walter, G. H., and Hereward, J. P. 2020. Gene flow across host-associated populations of the rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae): implications for Bt resistance management in rice. Pest Manag Sci. 76(2):695-703. doi: 10.1002/ps.5567.

Zahiri, R., Sarafrazi, A., Salehi, L., and Kunkel, G. G. 2006. A geometric morphometric study on population of the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) in northern Iran. Zool Middle East. 38(1): 73–84.

Zhou, Y., Sun, D., Quan, W. L., Ding, N., Liu, W., Ma, W. H., and Wang, X. P. 2018. Divergence in larval diapause induction between the rice and water oat populations of the striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae). Environ Sci Pollut Res Int. 25(29): 29715–29724.

Zibaee, A., Sendi, J. J., Alinia, F., and Etebari, K. 2008. A study on bio-chemical differences among five different groups of rice striped stem borer *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). Invertebrate Surviv J. 5: 20–29.

.

Sustainable Agricultural Science Research /Vol. 2/No. 4/Winter 2023/P: 91-107

https://www.sarj.iauk.ac.ir

The Genetic Structure of Geographic Populations of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae) in Northern Iran Based on Mitochondrial COII Gene

Abbas Heydari[1], Alireza Nazari[2*], Mohammad Ali OShaghi[3], Elham Sanatgar[4]

[1] Ph.D. Student, Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

[2] Assistant Professor, Department of Sustainable Agriculture, Institute of Food Security, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

[3] Professor, Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[4] Assistant Professor, Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

* Corresponding Author's Email: nazariazad@yahoo.com

(Received: January. 17, 2023 – Accepted: March. 20, 2023)

ABSTRACT

Rice is one of the most important and oldest crop and is one of the three leading crops in the world. *Chilo suppressalis* (Walker), rice striped stem borer, is a key insect pest damaging the rice crop up to 33 percent. Understanding genetic structure of the pest is essential for an effective pest management program and can corporate with control program. Aim of this stud was to determine the genetic structure of mitochondrial COII (mtDNA-COII) gene of the pest in north of Iran. Rice stem borer specimens were collected from rice fields in Guilan and Mazanderan provinces, at Caspian Sea coast at seasonal activity (spring) in 2016-2017. Genetic structure of 18 populations of the species was invesigated using polymerase chain reaction (PCR) followed by direct-sequencing of mtDNA-COII gene. The obtained sequences were compared with each other and the available data in GenBank database. In total, 312 and 676 specimens were collected from Guilan and Mazanderan provinces respectively. Results showed that all specimens from two provinces are identical are like specimen from South Korea with GenBank ID MK207057.

Keywords: *Chilo suppressalis*, Mitochondrial genome, COII, Genetic structure