التشخيص الجزيئي لدودة الحشد الخريفية (*Spodoptera frugiperda*) المعزولة من حقول الذرة الصفراء في محافظة كركوك، العراق

أحمد حسن الجبوري[1]* وصفاء زكريا بكر[2]

(1) مديرية زراعة كركوك، العراق؛ (2) كلية الزراعة، جامعة تكريت، العراق.

*البريد الالكتروني للباحث المراسل: ahmedhassen2004@yahoo.com

الملخص

الجبوري، أحمد حسن وصفاء زكريا بكر. 2024. التشخيص الجزيئي لدودة الحشد الخريفية (*Spodoptera frugiperda*) المعزولة من حقول الذرة الصفراء في محافظة كركوك، العراق. مجلة وقاية النبات العربية، 42(3): 403–405. https://doi.org/10.22268/AJPP-001250

أجريت هذه الدراسة بمحافظة كركوك في العراق، حيث جمعت فيها يرقات دودة الحشد الخريفية (*Spodoptera* sp.) بطريقة الجمع اليدوي المباشر من حقول الذرة الصفراء المصابة بالآفة في الفترة الممتدة من شهر تموز/يوليو 2022 وحتى نهاية شهر تشرين الأول/أكتوبر 2022، وذلك لكشف وتشخيص نوع الحشرة باستخدام تحليل التتابعات النيوكليوتيدية للجين Cytochrome c oxidase subunit I (COX1). أظهرت النتائج وجود النوع *Spodoptera frugiperda* في العراق، وسجلت الحشرة المكتشفة في البنك الوراثي العالمي برمز العزلة *Spodoptera frugiperda* isolate K2 strain AHM-1 تحت الرقم العالمي OP557603.1.

كلمات مفتاحية: دودة الحشد الخريفية، العراق، الذرة الصفراء، التشخيص الجزيئي.

المقدمة

تعدّ دودة الحشد الخريفية (*Spodoptera frugiperda*) آفة رئيسة على الذرة الصفراء مسببة خسائر كبيرة في إنتاجها، وذلك لقدرتها العالية على مهاجمة المحصول بدءاً من مرحلة البادرة وحتى تكوين العرانيس، فضلاً عن تعدّد عوائلها وقدرتها على مهاجمة 353 عائلاً نباتياً. كما تكمن خطورتها في كونها حشرة مهاجرة قادرة على الانتشار عبر مناطق جغرافية واسعة، إذ يمكنها أن تتحرك لأكثر من 500 كيلومتر قبل وضع البيض، وعند توفر الرياح يمكن للبالغات أن تقطع 1600 كم، فضلاً عن قدرتها التكاثرية العالية إذ تضع الأنثى بحدود 1500–2000 بيضة خلال فترة حياتها على شكل لطع، وتتكون كل لطعة من 100–400 بيضة.

إنّ هذه الحشرة متعددة الأجيال وتهاجم كافة أجزاء النبات (الأوراق والسوق والاجزاء التكاثرية)، وتتراوح خسائر محصول الذرة الصفراء في حدود 21–67% من إجمالي الإنتاج، وقد تصل إلى 100% في حالة عدم مكافحتها (Deshmukh *et al.*, 2021). ولدودة الحشد طرازان أو سلالتان غذائيتان تسمى سلالة الرّز (RS) وسلالة الذرة الصفراء (CS) تنتميان للجنس *Spodoptera* وتتشابهان مظهرياً ولكنهما مختلفتان في البصمة الوراثية، فضلاً عن أن وجود تشابه كبير بين دودة الحشد الخريفية (*Spodoptera frugiperda*) ودودة الحشد الافريقية (*S. exempta*) (الجبوري، 2017)، وقد يؤدي الاعتماد على الاختلافات المظهرية إلى التشخيص الخاطئ للحشرة، ولهذا اتجه الباحثون إلى اعتماد التشخيص الجزيئي للحمض النووي DNA المعتمدة على تحليل التتابعات النيوكليوتيدية للجين cytochrome c oxidase subunit I (COX1) لبالغات ويرقات الحشرات (Cock *et al.*, 2017؛ Osabutey *et al.*, 2022)، ولهذا فقد هدفت هذه الدراسة الى تشخيص نوع دودة الحشد الخريفية التي انتشرت بشكل واسع في حقول محصول الذرة الصفراء وأحدثت خسائر كبيرة في محافظة كركوك، العراق باستخدام طرائق التشخيص الجزيئية.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات

جمعت يرقات الحشرة من حقول الذرة الصفراء في قضاء الحويجة بكركوك. وضعت العينات في أطباق بتري بلاستيكية وتمّ وضعها في حافظة بلاستيكية مغلقة بغرض نقلها إلى مختبر الحشرات في المعهد الزراعي بكركوك. حُفظت اليرقات في أنابيب تحتوي على كحول إيتيلي بتركيز 90% ووضعت في ثلاجة عند درجة حرارة 4°س (Carvalho & Vieira, 2000)، لحين ارسالها لإجراء التحليل الجزيئي القائم على

https://doi.org/10.22268/AJPP-001250
© 2024 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

استخلاص الحمض النووي DNA والتشخيص الجزيئي باستخدام تحليل التتابعات النيوكليوتيدية للجين cytochrome c oxidase subunit I (COX1).

التشخيص الجزيئي للحشرات

أكد التشخيص (Folmer *et al.*, 1994) المعتمد على تتابع القواعد النتروجينية للجين سايتوكروم اوكسديز C الوحدة الثانوية 1 (في المايتوكوندريا) الذي اعتمد على عزل الحمض النووي DNA الجينومي من جسم الحشرة كاملاً باستخدام طقم الاستخلاص (G- spin DNA extraction kit, cat.no. 17045, intron biotechnology, Korea). تمّ استخراج الـ DNA الجينومي من الحشرة المدروسة باستخدام الترحيل الكهربائي في هلام الأجاروز 1% بواقع 5 فولت/سم لمدة 90 دقيقة، وصورت نتائج الترحيل الكهربائي للـ DNA الجينومي باستخدام كاميرا رقمية. أجري تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) لتضخيم جين السايتوكروم أوكسيدز C الوحدة الثانوية I (COI) باستخدام زوج البادئات التالي (Folmer *et al.*, 1994) وبحجم ناتج تفاعل بلغ 720 زوج قاعدي:

LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HC02198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

كما استخدم طقم الاختبار Maxime™ PCR PreMix (i-Taq), Cat. No. 25025, iNtRON Biotechnology, Korea) بغرض إجراء التفاعل بحجم إجمالي قدره 25 ميكروليتر. استخدم البرنامج التالي في إتمام التفاعل باستخدام جهاز التدوير الحراري: دورة واحدة لمدة خمس دقائق عند حرارة 95°س يليها 35 دورة تتكون كل منها من 45 ثانية عند حرارة 95°س، 45 ثانية عند حرارة 58°س، 45 ثانية عند حرارة 72°س ودورة واحدة أخيرة لمدة سبع دقائق عند حرارة 72°س.

تمّ الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR) على هلام الأجاروز بتركيز 2% عند 5 فولت/سم^2 ضمن محلول 1x TBE، لمدة 90 دقيقة، ثم جرى تصوير ناتج التفاعل باستخدام عدّة التوثيق.

تحليل التتابع النيوكلوتيدي

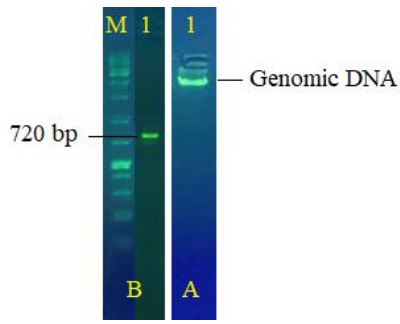
حُدّد التتابع النيوكلوتيدي للجين المضخم COI مباشرةً بعد الحصول على ناتج تضاعف الجين عن طريق الشركة الكورية Macrogen ووفقاً لتعليمات الشركة، ثم قورنت النتائج من خلال برنامج حاسوبي على شبكة الانترنت (BLAST) مع قاعدة البينات المتاحة في الموقع العالمي للمعلومات الوراثية National Center for Biotechnology Information (NCBI) لإجراء التراصف ومقارنة التسلسل والتطابق للتتابع الجيني للحشرة المراد تشخيصها ومعرفة نوعها وجنسها مقارنة مع التتابعات المتاحة في قاعدة البيانات المعروفة والمشخصة مسبقاً.

النتائج والمناقشة

يبين الشكل A–1 نتائج الترحيل الكهربائي للـ DNA الجينومي للحشرة *Spodoptera frugiperda* (مسار رقم 1)، إن ظهور حزمة واحدة للحشرة هو دليل على كفاءة استخلاص الـ DNA الجينومي من الحشرة، كما يبين الشكل B–1 ظهور حزمة لناتج تفاعل PCR باستخدام البادئ الخاص بالجين سايتوكروم اوكسديز C الوحدة الثانوية 1 بحجم جزيئي بلغ 720 زوج قاعدي، وأن الحجم الجزيئي لناتج التفاعل بلغ 720 زوج قاعدي، ويدلّ هذا الحجم على كون العينات المدروسة هي *Spodoptera frugiperda* (Folmer *et al.*, 1994).

أظهرت نتائج تحليل التتابعات النيوكليوتيدية أن هناك تطابقاً بلغت نسبته 99.84% لتتابعات الجين سايتوكروم أوكسديز C الوحدة الثانوية 1 للحشرة المراد تشخيصها من العراق مع تتابعات هذا الجين للحشرة *Spodoptera frugiperda* المعزولة من كوريا الجنوبية والمسجلة بالرقم العالمي OP132904.1. وتمّ تسجيل العزلة العراقية باسم *Spodoptera frugiperda* isolate K2, strain AHM-1 تحت الرقم العالمي OP132904.1. تؤكد هذه النتائج بأن نوع الحشرة المدروسة هو بالفعل دودة الحشد الخريفية (*Spodoptera frugiperda*).

يعدّ التشخيص الجزيئي باستخدام بادئ الجين سايتوكروم أوكسديز C الوحدة الثانوية 1 في المايتوكوندريا من التقنيات الدقيقة التي يمكن بواسطتها التشخيص الدقيق للحشرات على مستوى النوع، وقد شخّصت الدراسات السابقة أنواعاً كثيرةً من الحشرات اعتماداً على هذا الجين (Asokan *et al.*, 2011؛ Choudhary *et al.*, 2018؛ Tyagi *et al.*, 2017).



شكل 1. الترحيل الكهربائي للـ DNA الجينومي لحشرة *Spodoptera frugiperda* على هلام الاجاروز 1% (A)، والترحيل الكهربائي لناتج تفاعل الـ PCR على هلام الاجاروز 2% (B)، M = سلم الدليل الحجمي.
Figure 1. *Spodoptera frugiperda* genomic DNA electrophoresis on 1% agarose gel (A), and PCR products electrophoresis on 2% agarose gel (B), M= Molecular size ladder.

نظراً للتشابه الكبير في الصفات الشكلية لأنواع جنس العثّ (*Spodoptera*) على المحاصيل الزراعية وصعوبة التمييز بينها على أساس المفاتيح التقسيمية المعروفة، فقد سهلت البيولوجيا الجزيئية المتمثلة بالتتابع الجيني التمييز بين الأنواع وأصبح التصنيف الجزيئي مرجعاً معتمداً يتمّ اللجوء إليه لأغراض المطابقة وتأكيد النوع.

Abstract

El-Jiboory, A.H. and S.Z. Bakr. 2024. Molecular Diagnosis of Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* Isolated from Corn Fields in Karkuk Governorate, Iraq. Arab Journal of Plant Protection, 42(3): 403-405.
https://doi.org/10.22268/AJPP-001250

This study was conducted in Karkuk Governorate, Iraq, where fall armyworm (FAW), *Spodoptera frugiperda* larvae were collected by the direct manual method from corn fields. The research was conducted during the period July-October 2022 with the purpose of diagnosing FAW species by determining the nucleotide sequence of the cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene. Sequence analysis confirmed the presence of the species *Spodoptera frugiperda* in Iraq. The Iraqi species was conserved in the global GenBank under the code AHM-1 *Spodoptera frugiperda* isolate K2 under the international number OP557603.1.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*, Iraq, maize, fall armyworm, molecular diagnosis.

***Affiliation of authors**: A.H. El-Jiboory[1*] and S.Z. Bakr[2]. (1) Agricultural Directorate, Karkuk, Iraq; (2) Faculty of Agriculture, Tikrit University, Iraq. [*]Email address of the corresponding author: ahmedhassen2004@yahoo.com*

المراجع

الجبوري، إبراهيم جدوع. 2017. دودة الحشد الخريفية: الخطر القادم لتهديد المحاصيل الزراعية. نشرة فنية. كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق. 20 صفحة.

*[**Al-Jboory, I.J.** 2017. Fall army worm: coming danger which threatens agricultural crops. Technical Bulletin, Faculty of Agriculture, University of Baghdad, Iraq. 20 pp. (In: Arabic)].*

Asokan, R., K.B. Rebijith, S.K. Singh, A.S. Sidhu, S. Siddharthan and P.K. Karanth. 2011. Molecular identification and phylogeny of Bactrocera species (Diptera: Tephritidae), Florida Entomologist, 94(4):1026-1035. https://doi.org/10.1653/024.094.0441

Carvalho, A.O.R. and L.G.E. Vieira. 2000. Comparison of preservation methods of *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) for RAPD analysis. Annals of the Society of Entomology in Brazil, 29(3):489-496. https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000300011

Choudhary, J.S., N. Naaz, M. Lemtur, B. Das, A.K. Singh, B.P. Bhatt and C.S. Prabhakar. 2018. Genetic analysis of *Bactrocera zonata* (Diptera: Tephritidae) populations from India based on cox1 and nad1 gene sequences. Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing and Analysis, 29(5):727-736. https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1350952

Cock, M.J.W., P.K. Beseh, A.G. Buddie, G. Cafá and J. Crozier. 2017. Molecular methods to detect

تاريخ الاستلام: 2023/7/19؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2023/8/17

References

Spodoptera frugiperda in Ghana and implications for monitoring the spread of invasive species in developing countries. Scientific Reports, 7(1):4103. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04238-y

Deshmukh, S.S., B.M. Prasanna, C.M. Kalleshwaraswamy, J. Jaba and B. Choudhary. 2021. Fall Armyworm *(Spodoptera frugiperda)*. Pp. 349-372. *In:* Polyphagous Pests of Crops. Omkar (ed.). Springer Nature, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8075-8

Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5):294-299.

Tyagi, K., V. Kumar, D. Singha, K. Chandra, B.A. Laskar, S. Kundu, R. Chakraborty and S. Chatterjee. 2017. DNA Barcoding studies on Thrips in India: Cryptic species and species complexes. Scientific Report, 7:4898. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05112-7

Osabutey, A.F., B.Y. Seo, A.Y. Kim, T.A. Thi Ha, J. Jung, G. Goergen, E.O. Owusu, G.S. Lee and Y.H. Koh. 2022. Identification of a fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*)-specific gene and development of a rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification assay. Scientific Reports, 12:874. https://doi.org/10.1038/s41598-022-04871-2

Received: July 19, 2023; Accepted: August 17, 2023