

بررسی تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌های کرم ساقه‌خوار نواری برنج *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) با استفاده از نشانگر RAPD در استان گیلان از ایران

آتوسا فرحپور حقانی^۱، رضا حسینی^{۲*}، علی‌اکبر عبادی^۳، علی‌اعلمی^۴ و فرزاد مجیدی شیل‌سر^۵
^{۱، ۲، ۴}، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیاران، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان
^۳، مربی مؤسسه تحقیقات برنج کشور، آمل
^۵، استادیار، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت
 (تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۲ - تاریخ تصویب: ۹۲/۷/۲)

چکیده

به‌منظور بررسی وجود تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌های کرم ساقه‌خوار نواری برنج *Chilo suppressalis* در استان گیلان، ۳۷ نمونه لارو (لارهای سن ۴ تا ۶) از ۱۷ شهرستان انتخاب شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده در سه جمعیت شرق، مرکز و غرب دسته‌بندی شدند. DNA استخراج شده از نمونه‌ها با استفاده از ۱۲ آغازگر تصادفی تکثیر شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و از آنها عکس برداری گردید. پس از امتیازدهی نوارها، تحلیل داده‌ها نشان داد که این ۱۲ آغازگر در مجموع ۱۱۲ نوار چند شکل تولید کرده‌اند. نتایج نشان داد که جمعیت فعال در غرب استان با دو جمعیت فعال در مرکز و شرق تفاوت دارد. دو جمعیت مستقر در شرق و مرکز گیلان دارای شباهت‌های بیشتری با یکدیگر هستند. می‌توان این‌طور پیشنهاد کرد که جریان‌های ژنی موجود بین این دو جمعیت می‌تواند عامل بروز این شباهت‌ها باشد. جمعیت مستقر در مرکز گیلان به دلیل منطقه وسیع‌تر فعالیت و تعداد بیشتر نمونه‌های بررسی شده، بیشترین تنوع ژنتیکی داخل جمعیتی را نشان داد. این نتایج مشخص کرد که جمعیت‌های فعال کرم ساقه‌خوار نواری برنج در استان از نظر ژنتیکی یکنواخت نیستند و احتمالاً از دو بیوتیپ متفاوت تشکیل شده‌اند. به این ترتیب، این نتایج می‌توانند به عنوان توضیحی درباره تفاوت‌های مرفولوژیک و بیوشیمیایی یافت شده بین بیوتیپ‌های فعال آفت در مناطق بررسی شده، محسوب شوند.

واژه‌های کلیدی: آغازگر، الکتروفورز، بیوتیپ، تنوع ژنتیکی، PCR-RAPD.**مقدمه**

بدن عموماً به رنگ زرد و گاهی متمایل به قهوه‌ای روشن است (Walker, 1863). در ایران اولین بار در سال ۱۳۵۱ توسط آزمایشگاه بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی تنکابن به‌وسیله مستوفی‌پور و دزفولیان از رامسر و آمل و چابکسر جمع‌آوری شد (رضوانی و شاه‌حسینی، ۱۳۵۵؛ دزفولیان و مستوفی‌پور ۱۳۵۱). در حال حاضر، در تمامی نواحی برنج‌کاری استان‌های گیلان، مازندران و گلستان انتشار دارد و در سال ۱۳۷۴ توسط مقدس و

کرم ساقه‌خوار نواری برنج با نام علمی *Chilo suppressalis* از خانواده Pyralidae و زیرخانواده Crambinae است (Triplehorn & Johnson, 2005). این آفت اولین بار در دنیا در سال ۱۸۶۳ توسط Walker شناخته شد. حشرات کامل این گونه ۱۰-۱۳ میلی‌متر طول دارند و عرض بدن آنها با بال‌های باز در حشرات نر ۲۰-۲۳ میلی‌متر و در حشرات ماده ۳۵ میلی‌متر است و

تری‌آزوفوس، فیپرونیل و آبامکتین (Yue *et al.*, 2007a) و گروهی از پاپیرتروئیدها به‌طور جداگانه (Yue *et al.*, 2007b) و مطالعات Jiang و همکاران و Li و همکاران دربارهٔ مقاومت کرم ساقه‌خوار نواری برنج در برابر فیپرونیل نشان که جمعیت‌هایی از این آفت نسبت به فیپرونیل، تری‌آزوفوس، مونوسولتاپ و تعدادی از پاپیرتروئیدهای دیگر از خود مقاومت نشان می‌دهند که دربارهٔ تری‌آزوفوس این مقاومت به نسل بعدی نیز انتقال یافت (Li *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2005). این نتایج به احتمال وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های محلی این آفت در چین قوت می‌بخشید. از این رو، تقریباً هم‌زمان با مطالعات انجام شده در ژاپن برای شناسایی مناطق چندشکلی برای ریزماهورک‌ها در کرم ساقه‌خوار نواری برنج (Ishiguro & Tsuchida, 2006)، تنوع ژنتیکی کرم ساقه‌خوار نواری برنج با استفاده از ریزماهورک‌ها در چین بررسی شد که مشخص کرد سه گروه متفاوت از این گونه در چین فعالیت می‌کند (Xiang Feng *et al.*, 2008). از سوی دیگر، تحقیقات روی دو گروه از ساقه‌خوارهای نواری در ژاپن که روی برنج و جوی آبی^۳ تغذیه می‌کردند، مشخص کرد که این دو گروه از نظر تراکم جمعیت بالغ‌ها و اندازهٔ بدن با یکدیگر تفاوت دارند. پروانه‌هایی که روی جوی آبی تغذیه می‌کنند دارای بدن بزرگ‌ترند و تراکم جمعیت بالغان در آنها بیشتر است (Maki & Yamashita, 1956; Takasaki *et al.*, 1969). بررسی‌های ایشیگورو و همکاران روی تفاوت‌های ژنتیکی این دو گروه گرچه نشان داد ساقه‌خوارهایی که روی جوی آبی تغذیه می‌کنند علاوه بر بزرگ‌تر بودن دیرتر نیز فعالیت خود را آغاز می‌کنند، اما اختلافات ژنتیکی دو گروه را به خوبی مشخص نکرد. با این حال وجود زیرجمعیت‌های ژنتیکی مجزا در هر دو جمعیت در این بررسی تأیید شد (Ishiguro *et al.*, 2006).

در ایران و در سال ۱۳۸۶، طی بررسی‌هایی روی چند جمعیت از کرم ساقه‌خوار برنج جمع‌آوری شده از مناطق مختلف گیلان و مازندران، تفاوت‌هایی بین گروه‌های مختلف از نظر بیوشیمیایی مشاهده شد، که در

صیاد نصیری از منطقهٔ لنجان غرب، شهرستان زرین‌شهر و مبارکه در استان اصفهان نیز گزارش شده است (مقدس و صیاد نصیری، ۱۳۷۴). در دنیا این آفت در نواحی برنج‌خیز کشورهای جنوب شرقی آسیا و کشورهای نظیر اسپانیا، پرتغال، مصر و فلسطین اشغالی انتشار دارد (Khan *et al.*, 1991). خسارت آفت به دو صورت خشکی برگ و جوانهٔ میانی^۱ و سر سفیدی^۲ است. گونه‌های دارای انتشار وسیع اغلب سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در خود حفظ می‌کنند، بدون اینکه تفاوت بارزی در سطح جمعیت ایجاد شود (Loveless & Hamrick, 1984). تنوع ژنتیکی مربوط به ژن‌های طبیعی موجود در جمعیت‌ها، که در هر جمعیتی امکان وقوع آن وجود دارد، باعث می‌شود اطلاعات به‌دست‌آمده از ساختارهای ژنتیکی بتواند به درک بهتر عملکرد اختصاصی، سازگاری و تغییرات ژنتیکی جمعیت‌ها و گونه‌ها کمک کند (Syamsuardi & Okada, 2000). از سوی دیگر، چون آفات مقاوم به آفت‌کش‌ها در نتیجهٔ ظهور تنوع ژنتیکی لازم برای گریز از کنترل ایجاد می‌شوند، و جمعیت‌های مقاوم در نتیجهٔ فشار انتخابی شدید در یک منطقهٔ گسترده به وجود می‌آیند (Stankiewicz *et al.*, 2001)، وجود جمعیت‌های مقاوم به یک آفت‌کش می‌تواند نشانهٔ وجود تنوع ژنتیکی در آفت مذکور باشد و شناسایی این تنوع می‌تواند تا حدودی در انتخاب شیوهٔ مقابله با این جمعیت‌ها مؤثر واقع شود. با توجه به این مطلب، نتایج بررسی جمعیت‌های کرم ساقه‌خوار نواری مستقر در مناطق مختلف چین نشان داد این جمعیت‌ها از نظر حساسیت به سم باکتری *Bacillus thuringiensis* واکنش‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهند؛ از این رو، وجود تنوع ژنتیکی احتمالی در جمعیت‌های محلی مستقر در مناطق مختلف این کشور را نشان می‌دهد (Fengxia *et al.*, 2003). به دنبال این بررسی‌ها، مطالعات Cao و همکاران دربارهٔ حساسیت کرم ساقه‌خوار نواری برنج به تری‌آزوفوس (Cao *et al.*, 2004)، مطالعات Yue و همکاران در زمینهٔ حساسیت این آفت به مونوسولتاپ،

1. Dead heart
2. White head

3. Water oat

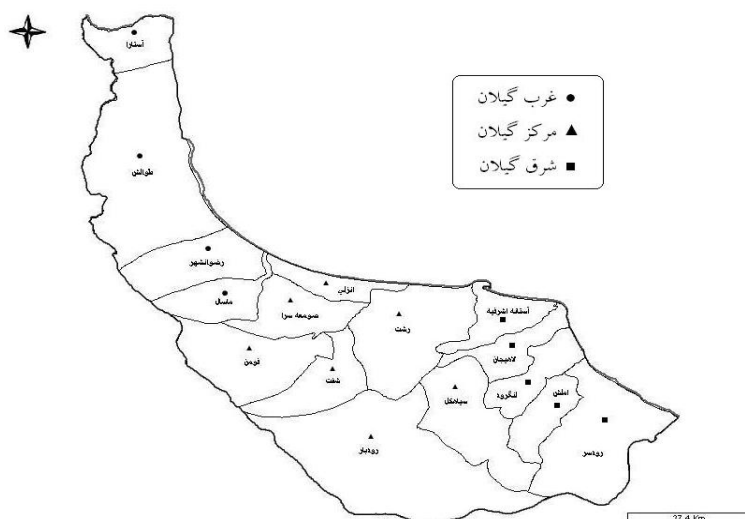
نشانگرهای RAPD نشانگرهایی تصادفی هستند، با توجه به وسعت کم منطقه مورد بررسی و اختلاط شدید جمعیت‌ها، این نشانگر تصادفی می‌تواند کلیه نواحی ژنوم آفت را تحت پوشش قرار دهد. بنابراین و با توجه به امکانات نویسندگان، استفاده از این نشانگر که کاربرد آن ساده‌تر از دیگر نشانگرهای موجود بوده و دسترسی به آن نیز آسان‌تر است، هدف این بررسی را که یافتن تفاوت‌های ژنتیکی موجود در جمعیت‌های فعال آفت است تحقق بخشید. این بررسی اولین تحقیق در زمینه بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های فعال کرم ساقه‌خوار نوری برنج در یکی از مناطق اصلی برنج‌کاری ایران است که با استفاده از نشانگرهای RAPD انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

برای نمونه‌برداری، استان گیلان به سه منطقه غرب، مرکز و شرق تقسیم شد و سپس با توجه به سطح زیر کشت در هر منطقه، نمونه‌برداری از لاروهای سن چهار به بعد نسل سوم آفت، که بعد از برداشت محصول در ساقه‌های باقی‌مانده در مزرعه آماده زمستان‌گذرانی بودند، انجام شد. اندازه لاروهای انتخابی بین ۲ الی ۲/۵ سانتی‌متر بود که پس از نمونه‌برداری زنده به آزمایشگاه انتقال و بلافاصله در فریزر 20°C - قرار داده شدند. شکل ۱ نقشه مناطق نمونه‌برداری، و جدول ۱ سطح زیر کشت در هر منطقه را نشان می‌دهد.

بعضی از این جمعیت‌ها منجر به بروز مقاومت در برابر سم دیازینون می‌شود (Zibaii, 2008). همچنین طی مطالعات ظهیری در سال ۱۳۸۵ روی جمعیت‌هایی از کرم ساقه‌خوار نوری که از مناطق مختلف استان‌های گیلان و مازندران انتخاب شده بودند، تفاوت‌هایی از نظر شکل بال‌ها و طول رگ‌بال‌ها نیز در جمعیت‌های محلی مشاهده شده است (Zahiri, 2006). از آنجا که بسیاری از خصوصیات فیزیولوژیک، مورفولوژیک و حتی رفتاری در حشره مذکور می‌تواند دلایل ژنتیکی داشته باشد، یا اختلافات ژنتیکی می‌تواند به بروز تفاوت‌های فیزیولوژیک، مورفولوژیک و رفتاری در پروانه مذکور منجر گردد، می‌توان این‌طور استنباط کرد که جمعیت‌های محلی فعال این آفت در استان از نظر ژنتیکی مشابه نیستند. با توجه به اینکه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های فعال آفت مورد بحث در هیچ یک از این استان‌ها تاکنون بررسی نشده است، لذا بررسی تفاوت‌های یافت‌شده از جنبه ژنتیکی و تأثیرات آنها بر میزان خسارت و نحوه فعالیت آفت و یافتن روش‌های کاربردی کنترل آفت بر اساس نتایج یافت شده، نحوه استفاده، انتقال و گسترش آنها امکان‌پذیر نبوده است. یافتن عوامل ژنتیکی مؤثر در ایجاد این تفاوت‌ها در صورت وجود می‌تواند در مدیریت این تفاوت‌ها و تأثیرات آنها به‌منظور کنترل آفت مؤثر باشد. هدف از این بررسی مطالعه ساختار ژنتیکی این آفت با استفاده از نشانگر RAPD در مناطق برنج‌کاری استان گیلان، به عنوان یکی از نواحی اصلی کشت برنج در ایران است. گرچه



شکل ۱. نقشه مناطق نمونه‌برداری شده *C. suppressalis* در استان گیلان که در آن هر یک از مناطق نمونه‌برداری مشخص شده است.

جدول ۱. مناطق نمونه‌برداری شده *C. suppressalis* و سطح زیر کشت هر منطقه

منطقه	شهرستان	سطح زیر کشت	منطقه	شهرستان	سطح زیر کشت
شرق	املش	۳۵۰۰	مرکز	انزلی	۴۲۰۰
شرق	لاهیجان	۶۱۵۰	مرکز	سیاهکل	۴۴۳۴
شرق	رودسر	۱۰۷۰۰	مرکز	صومعه‌سرا	۱۳۸۷۰
شرق	آستانه	۲۰۱۰۰	مرکز	شفت	۱۴۳۳۰
شرق	لنگرود	۲۳۸۱۶	مرکز	فومن	۲۷۱۵۰
غرب	آستارا	۳۲۰۰	مرکز	رشت	۶۲۰۰۰
غرب	ماسال	۹۱۰۰	مرکز	لوشان	-
غرب	رضوان‌شهر	۹۳۰۰	مرکز	رودبار	۳۳۵۰
غرب	تالش	۱۴۸۰۰			

استخراج DNA

استخراج DNA از کل بدن لارو (به جز دستگاه گوارش) با استفاده از دو روش انجام شد:

- با استفاده از کیت استخراج DNA سیناژن [DNA Extraction Kit (DNPTM) Cinnagen, Iran]
- با استفاده از روش استخراج با مخلوط فنل، کلروفرم و ایزوآمیل الکل (Sambrook *et al.*, 1989).

همه نمونه‌های استخراج شده برای تعیین کیفیت الکتروفورز شدند. برای تعیین کیفیت و غلظت از DNA فاژ لاند و دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. پس از تعیین غلظت اولیه، DNA به غلظت مناسب برای

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز رسانده شد که در همه آزمایش‌ها ۵۰ ng/μl بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR

در این بررسی از ۱۲ آغازگر RAPD استفاده شد که نام و توالی آنها در جدول ۲ نشان داده شده است. هشت آغازگر از آغازگرهای استفاده شده در بررسی تنوع ژنتیکی کرم ساقه‌خوار زرد در هند (Kumar *et al.*, 2001)، با توجه به تشابه خانواده حشره مذکور با کرم ساقه‌خوار نواری برنج، عملکرد خوب آنها در تفکیک جمعیت‌های کرم ساقه‌خوار زرد برنج انتخاب شدند و ۴ آغازگر نیز به‌طور تصادفی انتخاب شدند.

جدول ۲. آغازگرهای انتخاب شده به همراه توالی نوکلئوتیدی آنها

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی	نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی
OPB14	TCC-GCT-CTG-G	OPK13	GGT-TGT-ACC-C
OPK3	CCA-GCT-TAG-C	OPG11	TGC-CCG-TCG-T
OPF7	CCG-ATA-TCC-C	OPG13	CTC-TCC-GCC-A
OPG16	AGC-GTC-CTC-C	OPH13	CTC-TCC-GCC-A
OPJ13	CCA-CAC-TAC-C	80.8	CGC-CCT-CAG-C
OPJ15	TGT-AGC-AGG-G	80.7	GCA-CGC-CGG-A

اتصال آغازگر در دمای ۳۶°C و بسط آغازگر در دمای ۷۲°C هر یک به مدت یک دقیقه، یک دور و اسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت پنج دقیقه در ابتدا و یک دور بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت پنج دقیقه در پایان بود. به‌منظور اطمینان از نبود

برای انجام PCR مخلوط واکنش و DNA به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای هر نمونه تهیه شد. مقدار هریک از مواد مخلوط واکنش در جدول ۳ نشان داده شده است. برنامه حرارتی برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز شامل ۴۴ دور و اسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C،

نتایج و بحث

در مجموع، ۱۲ آغازگر تصادفی مورد استفاده ۱۱۴ نوار ایجاد کردند که از این تعداد، ۱۱۲ نوار چندشکل^۷ و دو نوار تک‌شکل^۸ بودند. اندازه نوارها از ۱۶۴ تا ۱۸۴۴ جفت باز^۹ متغیر بود. بزرگ‌ترین قطعه ایجاد شده توسط آغازگر OPF7 و کوچک‌ترین قطعه توسط آغازگر OPK13 ایجاد شد. آغازگرهای OPF7 با ۱۳ نوار و OPB14 و OPK3 هر یک با ۱۲ نوار بیشترین و آغازگر OPK13 با ۷ نوار به ترتیب کمترین تعداد قطعات تکثیر شده را ایجاد کردند.

در مقایسه فراوانی جایگاه‌های تکثیر شده (Fi)، بیشترین فراوانی جایگاه‌های تکثیر شده به مقدار ۰/۴۸۹ مربوط به آغازگر OPG16 بود، و کمترین فراوانی جایگاه‌های تکثیر شده با مقدار ۰/۲۲۸ به آغازگر OPB14 تعلق داشت. در حالی که در بررسی تنوع ژنتیکی کرم ساقه‌خوار زرد برنج در هند که هم‌خانواده کرم ساقه‌خوار نواری برنج است، OPB14 بیشترین فراوانی جایگاه تکثیر را به خود اختصاص داده بود، و از این نظر آغازگر OPG16 بعد از آن قرار می‌گرفت. به این ترتیب، عملکرد این آغازگر در این دو آفت کاملاً متفاوت بود (Kumar *et al.*, 2001). با محاسبه محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نیز مشخص شد که بیشترین محتوای چندشکلی به مقدار ۰/۴۱ مربوط به آغازگر OPG11 و کمترین محتوای چندشکلی به مقدار ۰/۲۳ و متعلق به آغازگر 80.8 است. جدول ۴ مقادیر مختلف PIC و Fi محاسبه شده برای کلیه جمعیت‌ها را نشان می‌دهد.

اما زمانی که مقادیر مختلف PIC برای جمعیت‌های مختلف به‌طور جداگانه محاسبه شد، عملکرد آغازگرهای مورد استفاده در جمعیت‌های مختلف متفاوت بود. نمودار ستونی محتوای چندشکلی محاسبه شده به تفکیک جمعیت‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است.

با توجه به اینکه برای هر آغازگر همه نمونه‌ها به‌طور هم‌زمان و در شرایط مشابه مورد PCR قرار گرفتند، این عملکرد متفاوت را می‌شد تنها به تفاوت DNA ژنومی نمونه‌ها نسبت داد.

آلودگی، یک نمونه نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که محتوی مخلوط واکنش بود و فقط در آن DNA وجود نداشت.

پس از پایان PCR نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. برای رنگ‌آمیزی نوارها از محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۰/۵ μg/ml استفاده شد. در نهایت، تصویر نوارهای ایجاد شده توسط دستگاه نهایت (Bio-Rad GelDoc) و با استفاده از نور UV ثبت شد و نوارهای مشاهده شده امتیازبندی شدند.

تحلیل‌های آماری

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC^۱) با استفاده از فرمول $PIC = 2 \sum p_i q_i$ که در آن p_i فراوانی وجود باند i (مقدار ۱) و q_i فراوانی نبود نوار i (مقدار ۰) است و فراوانی جایگاه‌های تکثیر شده (Fi^2) با استفاده از فرمول $Fi = P_i/N$ که در آن p_i فراوانی وجود نوار i و N تعداد کل افراد بررسی شده است، به‌منظور تعیین کارایی آغازگرهای استفاده شده محاسبه شدند. همچنین تنوع ژنی نی (H) (Nei, 1973)، شاخص شانون (I) (Lewontin, 1974)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) (Kimura & Crow, 1964)، فاصله و تشابه ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار POPGEN 1.32 (Yeah *et al.* 1999) محاسبه شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌ها و بین آنها تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA^۳) (Excoffier *et al.*, 1992) با استفاده از نرم‌افزار Peakall GENALEX 6.2 (Smouse & Smouse, 2006) انجام شد.

همچنین نمودار دو بعدی پراکنش افراد (PCA^۴) (Orlóci, 1978) نیز با استفاده از همین نرم‌افزار رسم شد. به‌منظور بررسی بیشتر فاصله و تشابه ژنتیکی جمعیت‌ها تجزیه خوشه‌ای انجام شد و نمودار خوشه‌ای بر اساس ضریب تطابق ساده (Sm^5) به روش (UPGMA^۶) و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 2008) رسم شد.

1. Polymorphic information content
2. Frequency of multi loci
3. Analysis of molecular variance
4. Principal coordinate analysis
5. Simple matching
6. Unweighted pair group method with an arithmetic average

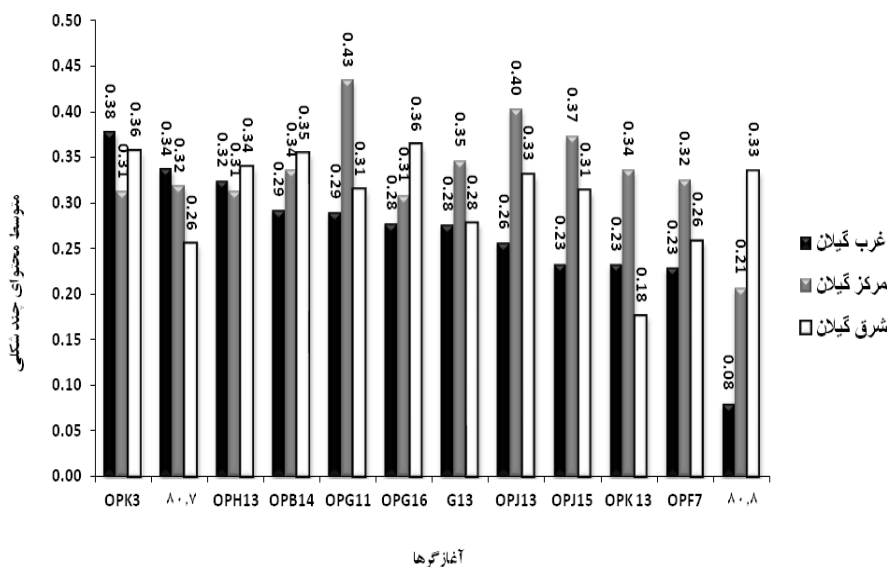
7. Polymorphic
8. Monomorphic
9. Base pair

جدول ۳. اجزای تشکیل‌دهنده مخلوط واکنش PCR.

غلظت نهایی	غلظت اولیه (پایه)	مقدار لازم برای هر نمونه	مواد لازم
		۱۷/۳۵ μl	آب مقطر سترون
۲/۶ mM	۵۰ mM	۱/۳ μl	MgCl ₂
۱ X	۱۰ X	۲/۵ μl	PCR-buffer
۰/۲۲ mM	۱۰ mM	۰/۵۵ μl	dNTPmix ¹ (Bio Flux)
۰/۴ μM	۱۰ μM	۱ μl	Primer
۲۵ ng/μl	۲۵۰ ng/μl	۲ μl	DNA
۱/۵ U/μl	۵ U/μl	۰/۳ μl	Taq DNA polymerase
		۲۵ μl	حجم کل

جدول ۴. مقادیر مختلف PIC و Fi محاسبه شده برای همه جمعیت‌های *C. suppressalis* جمع‌آوری شده از استان گیلان.

آغازگر	فراوانی جایگاه‌های تکثیر شده (Fi)	محتوای چندشکلی (PIC)
OPG16	۰/۴۸۹	۰/۳۲
OPK 13	۰/۴۷۹	۰/۲۹
OPG11	۰/۴۵۰	۰/۴۱
OPH13	۰/۴۵۰	۰/۳۵
OPJ13	۰/۴۲۹	۰/۳۸
80.8	۰/۳۹۰	۰/۲۳
OPK3	۰/۳۵۹	۰/۳۷
OPJ15	۰/۳۵۱	۰/۳۶
80.7	۰/۳۳۳	۰/۳۳
OPF7	۰/۳۳۰	۰/۳۰
OPG13	۰/۳۲۳	۰/۳۴
OPB14	۰/۲۲۸	۰/۳۶



شکل ۲. نمودار ستونی محتوای چندشکلی محاسبه شده برای هر آغازگر به تفکیک جمعیت‌های *C. suppressalis* جمع‌آوری شده از استان گیلان

منطقه‌ای که بیشترین هتروزیگوتی را داشت به عنوان منطقه دارای بیشترین تنوع ژنی شناخته شده، می‌توان گفت بیشترین تنوع ژنتیکی درون جمعیتی با توجه به میزان هتروزیگوتی، در مرکز گیلان وجود دارد. الگوی پراکنش نوارها در جمعیت‌های مختلف در جدول ۵ نشان داده شده است.

بررسی الگوی پراکنش نوارها در جمعیت‌ها نشان داد که بیشترین مقدار هتروزیگوتی در مرکز گیلان دیده می‌شود، و بعد از آن، به ترتیب شرق گیلان و غرب گیلان بیشترین مقدار هتروزیگوتی را دارند. از آنجا که طی بررسی اختلافات بین‌گونه‌ای و ساختارهای جمعیتی *Anticarsia gemmatalis* (Sosa-Gomez, 2004)،

جدول ۵. الگوی پراکنش نوارها در جمعیت‌های مختلف *C. suppressalis* جمع‌آوری شده از استان گیلان

جمعیت	غرب گیلان	مرکز گیلان	شرق گیلان
تعداد نوارهای متفاوت	۱۰۱	۱۱۰	۱۰۵
تعداد نوارهای متفاوت با فراوانی حداقل ۵٪	۱۰۱	۱۱۰	۱۰۵
تعداد نوارهای اختصاصی	۰	۲	۱
تعداد نوارهای محلی شایع با فراوانی حداقل ۵٪ که در ۲۵٪ جمعیت‌ها دیده شده	۰	۰	۰
تعداد نوارهای محلی شایع با فراوانی حداقل ۵٪ که در ۵۰٪ جمعیت‌ها دیده شده	۲	۷	۵
میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار با در نظر گرفتن اربیبی	۰/۲۶۱۳±۰/۰۲	۰/۲۹۱۳±۰/۰۲	۰/۲۷۸۷±۰/۰۲
میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار بدون در نظر گرفتن اربیبی	۰/۲۷۹۱±۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۲۹۵۷±۰/۰۲

تعداد ال‌های مشاهده شده و مؤثر و تنوع ژنی در مرکز گیلان وجود دارد. با توجه به اینکه وسعت منطقه بررسی شده، تعداد افراد و سطح زیر کشت برنج در مرکز گیلان بیش از دو منطقه دیگر بود، و با در نظر گرفتن این نکته که وسعت منطقه فعالیت سبب افزایش تنوع ژنتیکی در جمعیت فعال در منطقه می‌شود (Loveless & Hamrick, 1984)، این نتیجه قابل توجیه است. به این ترتیب، نتایج به‌دست‌آمده، نتایج حاصل از محاسبه میزان هتروزیگوتی را تأیید می‌کند. نتایج محاسبه تعداد ال‌های مشاهده شده، تعداد ال‌های مؤثر و تنوع ژنی نی برای هر جمعیت و برای کل افراد در جدول ۶ آمده است.

نتایج نشان داد که دو نوار اختصاصی در جمعیت مرکز گیلان و یک نوار اختصاصی در جمعیت شرق مشاهده می‌شود. درحالی‌که در جمعیت غرب گیلان هیچ نوار اختصاصی مشاهده نشد. درباره نوارهای محلی شایع هیچ نوار محلی شایعی در ۲۵٪ جمعیت‌های مورد بررسی دیده نشده، درحالی‌که دو نوار محلی شایع در جمعیت غرب گیلان و ۷ و ۵ نوار محلی شایع به ترتیب در مرکز و شرق گیلان دیده شد، که در ۵۰٪ از جمعیت‌ها ایجاد شده بود.

با محاسبه تعداد ال‌های مشاهده شده و تعداد ال‌های مؤثر و تنوع ژنی نی^۱ برای هر یک از جمعیت‌های تحت بررسی، مشخص شد که بیشترین

جدول ۶. تعداد ال‌های مشاهده شده، تعداد ال‌های مؤثر و تنوع ژنی نی برای جمعیت‌های *C. suppressalis* جمع‌آوری شده از استان

گیلان

جمعیت	Na	Ne	H
غرب گیلان	۰/۴۶ ± ۱/۷۱	۰/۳۸ ± ۱/۴۵	۰/۳۰ ± ۰/۲۶
مرکز گیلان	۰/۳۰ ± ۱/۹۰	۰/۳۳ ± ۱/۴۸	۰/۱۶ ± ۰/۲۹
شرق گیلان	۰/۳۷ ± ۱/۸۳	۰/۳۴ ± ۱/۴۶	۰/۱۷ ± ۰/۲۸
در بین کل افراد	۰/۱۳ ± ۱/۹۸	۰/۳۱ ± ۱/۵۱	۰/۱۵ ± ۰/۳۱

Na: تعداد ال‌های مشاهده شده Ne: تعداد ال‌های مؤثر، H: تنوع ژنی نی

نتایج مراحل قبل را تأیید می‌کند. نتایج محاسبه شاخص شانون به همراه تعداد و درصد جایگاه‌های چندشکل در جدول ۷ مشخص شده است.

با محاسبه شاخص شانون^۱ و مشخص کردن تعداد و درصد جایگاه‌های چندشکل مشخص شد که بیشترین تعداد و درصد جایگاه‌های چندشکل و تنوع ژنوتیپی نیز مربوط به مرکز گیلان است. به این ترتیب، این نتایج نیز

جدول ۷. محاسبه شاخص شانون به همراه تعداد و درصد جایگاه‌های چندشکل برای جمعیت‌های *C. suppressalis* جمع‌آوری شده از استان گیلان

جمعیت	تعداد جایگاه‌های چندشکل	P	I	Ht	Hs
غرب گیلان	۸۱	٪۷۱/۰۵	۰/۲۸±۰/۳۹		
مرکز گیلان	۱۰۳	٪۹۰/۳۵	۰/۲۲±۰/۴۴		
شرق گیلان	۹۵	٪۸۳/۳۳	۰/۲۴±۰/۴۲		
بین کل افراد	۱۱۲	٪۹۸/۲۵	۰/۱۸±۰/۴۷	۰/۰۲±۰/۳۰	۰/۰۲±۰/۲۶

P: درصد جایگاه‌های چندشکل، I: شاخص شانون یا تنوع ژنوتیپی، Ht: تنوع ژنتیکی کل، Hs: تنوع ژنتیکی درون جمعیتی

جدول ۸. فاصله و تشابه ژنتیکی محاسبه شده با استفاده از شاخص نی برای جمعیت‌های *C. suppressalis* جمع‌آوری شده از استان گیلان

جمعیت	غرب گیلان	مرکز گیلان	شرق گیلان
غرب گیلان	****	۰/۹۳۳۸	۰/۹۳۹۱
مرکز گیلان	۰/۰۶۸۴	****	۰/۹۶۱۳
شرق گیلان	۰/۰۷۳۶	۰/۰۳۹۵	****

اعداد بالای قطر (****) تشابه‌های ژنتیکی و اعداد پایین قطر (****) فواصل ژنتیکی را نشان می‌دهد.

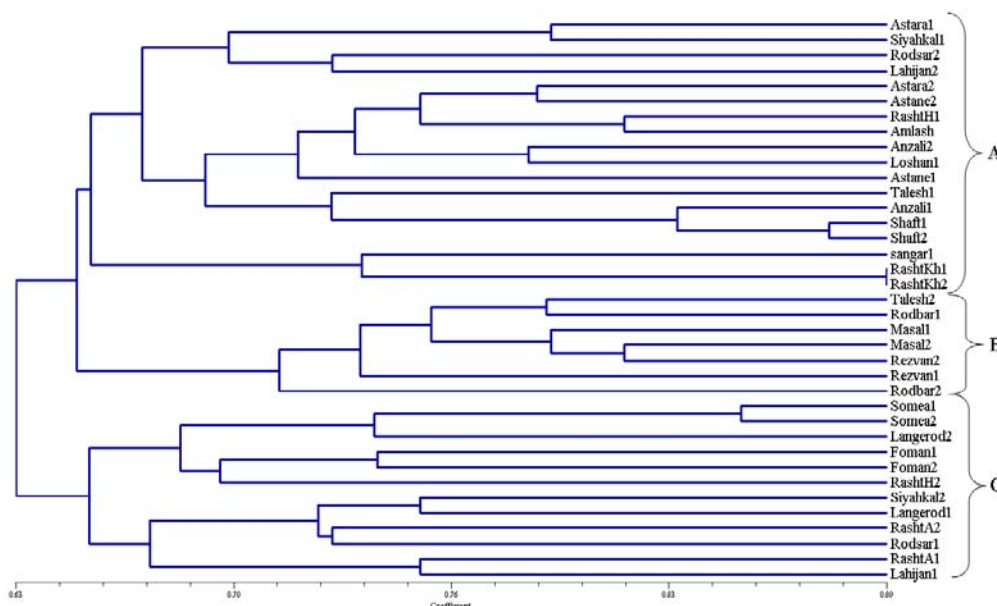
می‌تواند سبب افزایش تشابه ژنتیکی بین این جمعیت‌ها شود. علاوه بر این، نتایج بررسی‌های انجام شده روی ساقه‌خوار زرد برنج در هند (Kumar et al., 2001)، ساقه‌خوار ذرت در آمریکا (Krumm et al., 2008) و کرم ساقه‌خوار نواری برنج در چین (Xiang feng, et al., 2008) نیز قبلاً مشخص کرده بود که جمعیت‌های متعلق به نواحی مجاور تشابه‌های بیشتری با یکدیگر دارند. مطالعات تجربی اجزای فضایی جمعیت‌ها اغلب ارتباط بسیار نزدیکی را بین اختلافات اکولوژیکی و ژنتیکی جمعیت‌ها با اجزای محیطی آنها آشکار کرده است. (Ellis et al., 2007) این ارتباط می‌تواند از نظر واکنش‌های سازگارکننده جمعیت‌ها با تغییرات اجزای فضایی زیستگاه باشد (Galen et al., 1991; Bennington & McGraw, 1995; Sambatti & Rice, 2006; Wright et al., 2006)، و نیز می‌تواند از نظر اختلافات ژنتیکی طبیعی که بین اجزای محیطی جمعیت‌ها وجود دارد باشد (Tribisch et al., 2002; Tero et al., 2003).

جدول ۸ نتایج حاصل از محاسبه فاصله و تشابه‌های ژنتیکی به روش نی (Nei, 1972) را نشان می‌دهد که توسط نرم‌افزار POPGEN محاسبه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در مقایسه با جمعیت‌های دیگر، بیشترین فاصله ژنتیکی و کمترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت غرب گیلان وجود دارد که نشان‌دهنده تمایز نسبی این جمعیت از دو جمعیت دیگر است. دو جمعیت مرکز گیلان و شرق گیلان دارای تشابه‌های بیشتر و فاصله ژنتیکی کمتری نسبت به هم هستند. نتایج بررسی‌های انجام شده درباره قدرت پرواز کرم ساقه‌خوار نواری برنج نشان داد که در هر ثانیه هر فرد نر *C. suppressalis* می‌تواند مسافتی بین ۰/۶ تا ۳/۴ متر و هر فرد ماده *C. suppressalis* مسافتی بین ۰/۴۸ تا ۲/۱۵ متر را طی کند. قدرت پرواز بیشتر گونه‌های ساقه‌خوار ۵-۱۰ مایل است که در صورت وجود باد نیز افزایش خواهد یافت (Pathak & Khan, 1994). در نتیجه، امکان اختلاط جمعیت‌های مناطق مجاور

1. Shannon Information index

به وجود می‌آید، بررسی شد. پروتئین مذکور می‌تواند در واکنش بدن لارو به دمای زیاد مؤثر باشد (Ya-dong *et al.*, 2010). از این رو، شاید یکی از دلایل اختلاف بین جمعیت‌های فعال در غرب گیلان وجود تفاوت‌های اقلیمی و دمایی بین این منطقه با دیگر قسمت‌های استان باشد. نمودار حاصل از تجزیه خوشه‌ای افراد به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده نیز نتایج فوق را تأیید کرد. بر این اساس افراد به سه دسته A، B، C تقسیم شدند (شکل ۳).

تحقیقات انجام شده در تایوان مشخص کرد که دما و شرایط اقلیمی بر رشد و تعداد نسل‌های ساقه‌خوار نواری مؤثر است (Tsumuki *et al.*, 1994). همچنین تحقیقات کیشینو در ژاپن مشخص کرده بود که جمعیت‌های محلی کرم ساقه‌خوار نواری برنج که تحت تأثیر شرایط دمایی و اقلیمی متفاوت قرار دارند، از نظر تعداد نسل و زمان آغاز فعالیت با یکدیگر متفاوتند (Kishino, 1974). به علاوه، طی تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۰ در ژاپن انجام شد، ژن پروتئین heat shock 60 که در سلول‌های خونی لاروها در دمای بین ۳۹-۳۱°C



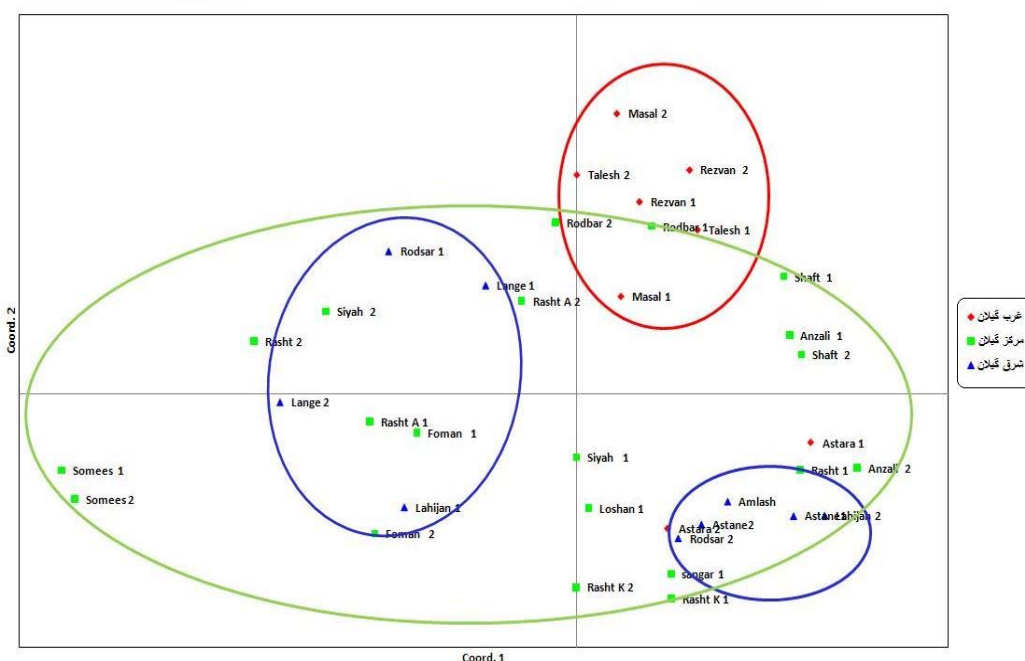
شکل ۳. تجزیه خوشه‌ای افراد *Chilo suppressalis* جمع‌آوری شده از استان گیلان به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده

مناطق بررسی شده و مجاورت آنها با یکدیگر، و نیز به دلیل اینکه جمعیت‌های مناطق مجاور به علت توانایی پروانه در پرواز و جابه‌جایی در مسافت‌های طولانی با هم هم‌پوشانی دارند، تفکیک آنها در جمعیت‌های کاملاً مجزا انجام نشده و ناهماهنگی‌هایی در دسته‌بندی مشاهده می‌شد. نتایج به دست آمده از این نظر تا حدودی مشابه نتایج به دست آمده از بررسی تنوع ژنتیکی پروانه *Oleria onega* در شمال شرقی پرو بود. بررسی این تحقیق نشان داد که نمودار خوشه‌ای رسم شده گرچه توانسته بود بین جمعیت‌ها تا حدودی تمایز ایجاد کند، اما جمعیت‌های مناطق مجاور با هم تداخل داشت و در

نیمی از نمونه‌های مرکز به همراه ۵/۵۵٪ از نمونه‌های شرق در دسته A قرار گرفته بودند. تعدادی از نمونه‌های غرب گیلان نیز در این گروه قرار گرفته بود، اما با توجه به تعداد کل نمونه‌های غرب گیلان تنها ۵/۳۷٪ از نمونه‌های مرکز گیلان در این دسته وجود داشت، که حدود ۱۱٪ از کل نمونه‌های موجود در این دسته را شامل بود. دسته B شامل تمام نمونه‌های غرب گیلان، جز یک نمونه از تالش و دو نمونه از آستارا بود، و ۱۰٪ از نمونه‌های مرکز گیلان نیز در این دسته قرار داشتند. باقی نمونه‌های مرکز و شرق گیلان نیز در دسته C قرار گرفته بودند. به دلیل وسعت کم هر یک از

داده شده است. علاوه بر تمام موارد بالا، نمودار پراکنش دوبعدی افراد که بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی رسم شد نیز تمایز نسبی جمعیت‌های بررسی شده را مشخص کرد. نمودار مذکور در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، می‌توان جمعیت‌های بررسی شده را تا حدودی از یکدیگر تفکیک کرد.

یک گروه قرار می‌گرفت (Gallusser et al., 2004). در بررسی تنوع ژنتیکی کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت در آمریکا گرچه بازهم جمعیت‌های مناطق مجاور در یک گروه قرار گرفته بودند، اما تفکیک بین جمعیت‌ها به‌خوبی آشکار شده بود. علت این امر را می‌توان به وسعت زیاد منطقه مورد بررسی نسبت داد (Krumm et al., 2006). نمودار خوشه‌ای رسم شده به همراه دسته‌های مذکور و جزئیات دیگر آن در شکل ۳ نشان



شکل ۴. پراکنش دوبعدی افراد *Chilo suppressalis* بررسی شده در مناطق و شهرهای مختلف در استان گیلان بر اساس دو مؤلفه اصلی

نتیجه‌گیری کلی

دو جمعیت به دلیل مجاورت با جمعیت غرب گیلان و مازندران و وجود تشابه با هر یک از این جمعیت‌ها، با یکدیگر نیز تفاوت‌هایی دارند. تنوع ژنتیکی درون جمعیتی نیز در هر یک از جمعیت‌های بررسی شده مشاهده شد. به این ترتیب، نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند توجیهی درباره مقاومت‌های مشاهده شده به سم دیازینون و همچنین تفاوت‌های مورفولوژیک مشاهده شده در جمعیت‌های فعال کرم ساقه‌خوار نواری برنج استان به‌شمار آید. از سوی دیگر، با توجه به اینکه تفاوت‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، به‌ویژه تفاوت‌هایی که دارای عامل ژنتیکی هستند

نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده اختلاف ژنتیکی در جمعیت‌های فعال کرم ساقه‌خوار نواری برنج در استان گیلان است؛ به‌نحوی که می‌توان جمعیت‌های فعال آفت در استان را به سه گروه مجزا تقسیم کرد. گروه اول جمعیت فعال در غرب گیلان، گروه دوم جمعیت فعال در مرکز گیلان، و گروه سوم جمعیت فعال در شرق گیلان را در بر می‌گیرد. دو جمعیت فعال در مرکز و شرق گیلان در هنگام بررسی از یکدیگر مجزا در نظر گرفته شده‌اند، اما نتایج نشان داد که به دلیل تشابه‌های زیاد می‌توان آنها را در یک گروه نیز قرار داد، گرچه هر

شناخت ساختار ژنتیکی جمعیت‌هایی از آفت که دارای دوره رشد کوتاه‌تر و قطعات دهانی ضعیف‌تری هستند، می‌تواند در حل برخی از مشکلات مربوط به کشت این ارقام مؤثر باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق در مؤسسه تحقیقات برنج کشور و با مساعدت‌های آقایان دکتر بیژن یعقوبی و دکتر عباس شهدی کومله انجام شده است که به این وسیله از کمک‌های ایشان قدردانی می‌شود.

می‌توانند در میزان خسارت‌زایی و ایجاد مقاومت به سموم تأثیر داشته باشند، از این‌رو، شناخت ساختار ژنتیکی این جمعیت‌ها و بررسی بیولوژی، مورفولوژی و فیزیولوژی آنها می‌تواند راهگشای برخی از مشکلات مربوط به تفاوت واکنش آفت در مقابل سموم و میزان خسارت آن در مناطق مختلف محسوب گردد. همچنین چون ارقام مختلف برنج دارای حساسیت‌های متفاوت در برابر کرم ساقه‌خوار است، و میزان خسارت آفت روی برخی از ارقام اصلاح‌شده با توجه به درصد سیلیس کمتر و دوره رشدی طولانی‌تر بیشتر است، در نتیجه

REFERENCES

1. Bennington, C. C. & McGraw, J. B. (1995). Natural selection and ecotypic differentiation in *Impatiens pallida*. *Ecological Monographs*, 65, 303-323.
2. Dezfoulan, A. & Moustofipoor P. (1972). *Rice striped stem borer*. Agricultural organization of Iran publishing, 13pp.
3. Cao, M. Z., Shen, J. L., Zhang, J. Z., Lu, M., Liu, X. Y. & Zhou, W. J. (2004). Monitoring of insecticide resistance and genetic analysis of triazophos resistance in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: pyralidae). *Rice Science*, 11(6,5), 297-304.
4. Ebert, G. (1973). Der reisstege ibohrer *Chilo suppressalis* ein fur Iran. Appliquees. Publication de l'institudes recherches entomologie et phytopathologiques minister de l' Agriculture et Resources Naturelles, 35, 1-25.
5. Ellis, A G., Weis, A. E. & Gaut, B. S. (2007). Spatial scale of local adaption and population genetic structure in a miniature succulent *Argrogerma pearsonii*. *New Phytologist*, 147, 904-914.
6. Excoffier, L., Smouse P. E., & Quattro J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics*, 131, 479- 491.
7. Fengxia, M., Kongming, W., Xiwu, G., Yufa, P. & Yuyuan, G. (2003). Geographic Variation in Susceptibility of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxins in China. *Journal Economic Entomology*, 96(6), 1838-1842.
8. Galen, C., Shore, J. S. & Deyoe, H. (1991). Ecotypic divergence in alpine *Polemonium viscosum*: genetic structure, quantitative variation, and local adaptation. *Evolution*, 45, 1218-1228.
9. Gallusser, S., Guadagnuolo, R. & Rahier, M. (2004). Genetic (RAPD) diversity *Oleria onega agarista* and *Oleria onega* spp. (Ithomiinae, Nymphalidae, Lepidoptera) in north- eastern peru. *Genetica*, 121, 65-74.
10. Ishiguro, N. & Tsuchida, K. (2006). Polymorphic microsatellite loci for the stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera:pyralidae). *Applied Entomology and Zoology*, 41(4), 565-568.
11. Ishiguro, N., Yshida, K. & Tsuchida, K. (2006). Genetic difference between rice and wather-oat feeders in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae). *Applied Entomology and Zoology*, 41(4), 585-593.
12. Jiang, W. H., Han, Z. J. & Hao, M. L. (2005). Preliminary study on resistance of the rice stem borer (*Chilo suppressalis*) to fipronil. *Rice Science*, 12(4), 295-298.
13. Khan Z. R., Litsinger J. A., Barrion A. T., & Villanueva F. F. D. (1991). World Bibliography of Rice Stem Borers 1794–1990. *International Rice Research Institute*, Makati, Philippines.
14. Kimura, M. & Crow, F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finine population. *Genetics*, 49, 725-738.
15. Kishino, K. (1974). Local Differences of Seasonal Life Cycle in Rice Stem Borer, *Chilo Suppressalis* WALKER. 1st Agronomy Division, Tohoku National Agricultural Experiment Station.
16. Krumm, J. T., Hunt, T. E., Skoda, S. R., Hein, G. L., Lee, D. J., Clark, P. L. & Foster, J. E. (2008). Genetic variability of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, suggests gene flow between populations in the Midwestern United States. *Insect Science*, 8(72), 1-12.
17. Kumar, L. S., Sawant, A. S., Gupta, V. S. & Ranjekar, P. K. (2001). Genetic variation in indian populations of *Scirpophaga incertulas* as revealed by RAPD-PCR analysis. *Biochemical Genetics*, 39(1,2), 43-57.

18. Lewontin, R.C.(1974). *The genetic basis of evolutionary change*. New York: Columbia University Press.
19. Li, X., Huang, Q., Yuan, J. & Tang, Z. (2007). Fipronil resistance mechanisms in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89, 169-174.
20. Loveless, M. D. & Hamrick J. L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15, 65-95.
21. Maki, Y. & Yamashita, M. (1956). Ecological difference of rice stem borer moth *Chilo suppressalis* Walker in the various host plants. *Bulletin of the Hyogo Prefectural Agricultural Experiment Station*, 3, 47-50. (in Japanese).
22. Moghaddas, H. & 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.
23. Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106, 283-292.
24. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 70, 3321-3323.
25. Orlóci, L. (1978). *Multivariate analysis in vegetation research*. The Hague: Dr W. Junk, B.V. 451 p.
26. Pathak, M. D. & Khan, Z. R. (1994). *Insect pests of rice*. International rice research Institute & ICIPE.
27. Peakall, R., & Smouse P. E. (2006). Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Note*, 6, 288-295.
28. Rezvanii, N. A. & Shahhosseini, J. (1976). Studies of rice striped steam borer bioecology in east Mazandaran province. *Plant Pests and Diseases*, 43, 1-38.
29. Rohlf F. J. (2008). *NTSYSpc: Numerical taxonomy system*, Ver. 2.20. Exeter publishing, Ltd.: Setauket, NY.
30. Sambatti, J. B. M. & Rice, K. J. (2006). Local adaptation, patterns of selection, and gene flow in the Californian serpentine sunflower *Helianthus exilis*. *Evolution*, 60, 696-710.
31. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
32. Sosa-Gomez, D. R. (2004). Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Insect: Lepidoptera: Noctuidae). *Genetic and Molecular Biology*, 27(3), 378-384.
33. Stankiewicz, M., Gadamski, G. & Gawronski, S. W. (2001). Genetic variation and phylogenetic relationships of triazine-resistant and triazine-susceptible biotypes of *Solanum nigrum* analysis using RAPD marker. European Weed Research Society. *Weed Research*, 41, 287-300.
34. Syamsuardi & Okada, H. (2002). Genetic diversity and genetic structure of populations of *Ranunculus japonicus* (Thunb) (Ranunculaceae). *Plant Species Biology*, 17, 59-69.
35. Takasaki, T., Noda, M. & Murata, Z. (1969). Ecology of rice stem borer moth *Chilo suppressalis*, I, Seasonal prevalence of rice stem borer moth feeding on the water oats. In: Proceedings *Kyusyu Plant Protection*, 15, 118-121. (in Japanese).
36. Tero, N., Aspi, J., Siikamaki, P., Jakalaniemi, A. & Tuomi, J. (2003). Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species. *Molecular Ecology*, 12, 2073-2085.
37. Tribsch, A., Schonswetter, P. & Stuessy, T. F. (2002). *Saponaria pumila* (Caryophyllaceae) and the ice Age in the European Alps. *American Journal of Botany*, 89, 2024-2033.
38. Triplehorn, C. A. & N. F. Johnson. (2005). *Borror and DeLong's introduction to the study of insects*. Belmont, California Thomson Brooks/Cole.
39. Tsumuki, H., Take, T., Kanehisa, K., Saito, T & Yue, C. (1994). Effect of temperature on the development and voltinism of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) in Taiwan. *Entomology*, 91, 477-479.
40. Walker, F. (1863). *List of specimens of lepidopterous insects in the collection of the British Museum*. Br. Mus. (Nat. Hist.) London. Pt. 27:144. (Taxonomy, *Catagela adjurella*, *Chilo plejadellus*, *Chilo suppressalis*, *Scirpophaga incertulas*, Cambodia, China, India, Japan, Malaysia, Philippines, Singapore, Sri Lanka, Thailand)
41. Wright, J. W., Stanton, M. L & Scherson, R. (2006). Local adaptation to serpentine and non-serpentine soils in *Collinsia sparsiflora*. *Evolutionary Ecology Research*, 8, 1-21.
42. Xiang Feng, M., Min, S. & Xue xin, C. (2008). Population genetic structure of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae), Strong subdivision in China inferred from microsatellite markers and mtDNA gene sequences. *Molecular Ecology*, 17, 2880-2897.
43. Ya-Dong, C., Yu-Zhou, D., Ming-Xing, L. & Cheng-Kui, Q. (2010). Cloning of the heat shock protein 60 gene from the stem borer *Chilo suppressalis*, and analysis of expression characteristics under heat stress. *Journal of Insect Science*, 10, 100.

44. Yeh F. C., Yang R. C., & Boyle T. (1999.) POPGEN version 1.32. *Microsoft windows-based freeware for publication genetic analysis*. University of Alberta and the Centre for International Forestry Research, Edmonton. Available at [www.ulberta.ca/~fyeh]. Accessed January 14, 2012.
45. Yue, F. H., Cong, F. C., Ming, Z. C., Wen, M. C., Li, Q. H., Wei, J. Z., Xu, G. L., Jin, L. S. & Yu, C. Z. (2007a). Survey of susceptibility to monosultap, Triazophos, Fipronil, and abamectin in *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal Economic Entomology*, 100(6), 1854-1861.
46. Yue, F. H., Wen, M. C., Jin, L. S., Cong, F. C., Li, Q. H., Wei, J. Z., Xu, G. L. & Yu, C. Z. (2007b). Differential susceptibilities to pyrethroids in field population of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Pesticide Biochemisry and Physiology*, 89, 12-19.
47. Zahiri, R., Sarafrazi, A., Salehi, L. & Kunkel, G. G. (2006). A geometric morphometric study on population of the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) in northern Iran. *Zoology in the Middle East*, 38, 73-84.
48. Zibaii, A. (2008). *A study on biochemical differences among five different groups of rice striped stem borer Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). M. Sc. dissertation, Guilan University. (In Farsi).