

بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های ژاپنی کرم ابریشم ایران با استفاده از نشانگرهای تفاوت طول قطعات تکثیر شده (AFLP)

*عبدالرضا صالحی^۱، لیلا علی طالش چپولی^۲، ضیاءالدین میرحسینی^۳ و بنیامین دلیرصفت^۴

^۱دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه تهران، آ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه تهران،
^۲استادیار گروه علوم دامی دانشگاه گیلان، ^۳کارشناس آزمایشگاه ژنتیک و مارکرهای مولکولی گروه علوم دامی دانشگاه گیلان
تاریخ دریافت: ۸۶/۲/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۴/۲

چکیده

تنوع ژنتیکی داخل و بین سه لاین کرم ابریشم ایران (ژاپنی) با استفاده از نشانگرهای AFLP بررسی شد. نمونه‌ها (۳۰ لارو از هر لاین) از مرکز تحقیقات کرم ابریشم (پسیخان- رشت) جمع‌آوری شد. از غده ابریشمی با روش فنل - کلروفرم، DNA استخراج گردید. در این مطالعه از ۱۰ ترکیب آغازگر PstI - TaqI استفاده شد که ۱۹۹ نشانگر چند شکل AFLP تولید گردید. داده‌ها با استفاده از نرم افزار popGene32 آنالیز شدند. کمترین تنوع ژنی (۰/۱۰۸۸۰) مربوط به لاین ۳۱ و بیشترین (۰/۱۴۸۴) مربوط به لاین ۱۰۳ و میانگین تنوع ژنتیکی برای کل لاین‌ها و آغازگرها برابر ۰/۳۶۹۲ بود. حداکثر و حداقل فاصله ژنتیکی با احتساب نا اریبی بترتیب بین لاین‌های ۳۱ و ۱۰۷ (۰/۶۸۶۲) و بین لاین‌های ۳۱ و ۱۰۳ (۰/۳۹۶۴) مشاهده شد. در دندروگرام ایجاد شده با استفاده از روش UPGMA دو گروه مشخص گردید. در یک گروه لاین‌های ۳۱ و ۱۰۳ و در گروه دیگر لاین ۱۰۷ قرار گرفتند. لاین ۱۰۳ بیشترین میزان چندشکلی و لاین ۳۱ کمترین میزان چند شکلی را داشت.

واژه‌های کلیدی: کرم ابریشم، لاین‌های ژاپنی، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای AFLP

مقدمه

بررسی و شناسایی چند شکلی‌ها در توالی DNA که به‌طور طبیعی اتفاق می‌افتد یکی از دستاوردهای مهم در بیولوژی مولکولی است (ناگاجارو و همکاران، ۲۰۰۱). برخلاف ویژگی‌های فنوتیپی، ویژگی‌های ژنتیکی مستقل از تأثیرات محیطی هستند و داده‌های حاصل از آنها دارای دقت بیشتری می‌باشند، بخصوص در اتخاذ تصمیم برای

برنامه‌های حفاظتی، استفاده از اطلاعات ژنتیکی حیوان یک امر ضروری است (سرانو و همکاران، ۲۰۰۴). نشانگرهای ژنتیکی چند شکل کاربردهای بالقوه‌ای در برنامه‌های اصلاحی گیاهان و حیوانات داشته و به‌عنوان ابزاری برای تعیین تنوع، اصل و نسب، ارزیابی مکان‌های ژنی مؤثر بر صفات اقتصادی و تهیه نقشه پیوستگی ژن‌ها به‌کار می‌روند (ناگاجارو و همکاران، ۲۰۰۲). یکی از این نشانگرها، چندشکلی‌های حاصل از تفاوت طول قطعات

چهار گروه مشخص شد. در گروه یک لاین‌های ۱۰۱، ۱۰۲ و توده لیمویی خراسان، در گروه دوم لاین‌های ۱۰۳ و ۱۰۴ در گروه سوم توده‌های پرتقالی خراسان و بومی گیلان و در گروه چهارم توده بغدادی قرار گرفتند. تنوع لاین‌های خارجی نسبتاً زیاد بود ولی نسبت به توده‌های بومی از تنوع کمتری برخوردار بودند. بلواسی (۲۰۰۳) با استفاده از سه نشانگر ISSR تنوع ژنتیکی پنج توده بومی شامل خراسان صورتی، خراسان لیمویی، خراسان پرتقالی، بومی گیلان و بغدادی و شش لاین وارداتی شامل ۳۱، ۳۲، ۱۰۳، ۱۰۴، ۱۰۷ و ۱۱۰ را مورد بررسی قرار داد. با توجه به اطلاعات حاصل از این تحقیق جمعیت‌های لیمویی خراسان، صورتی خراسان و ۱۰۴ به تنهایی سه گره مستقل را تشکیل دادند و جمعیت‌های بومی گیلان و ۱۰۳، ۱۰۴، ۱۰۷ و ۱۱۰ و لاین‌های ۳۱ و ۱۰۷ هرکدام در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. دلیرصفت (۲۰۰۳) با استفاده از نشانگرهای AFLP به بررسی تنوع ژنتیکی هفت جمعیت بومی ایران شامل توده‌های بغدادی، هراتی سفید گیلان پرتقالی، نارنجی خراسان، هراتی زرد، لیمویی خراسان و صورتی خراسان پرداخت. طبق این تحقیق هفت جمعیت در دو گروه عمده قرار گرفتند.

هدف از این مطالعه تعیین میزان تنوع ژنتیکی داخلی لاین‌های ژاپنی، تعیین فاصله ژنتیکی این لاین‌ها با استفاده از نشانگر AFLP بود.

مواد و روش‌ها

لاین‌های کرم ابریشم و استخراج *DNA*: در این پژوهش لاین‌های ژاپنی ۳۱، ۱۰۳ و ۱۰۷ مورد بررسی قرار گرفتند. لاین ۳۱ و ۱۰۳ بترتیب در سال‌های ۱۳۶۴ و ۱۳۶۶ وارد کشور شدند و در بخش اصلاح نژاد واحد تولید نوغان شرکت ابریشم ایران نگهداری و تکثیر گردیدند و به علت پر محصول بودن در خط تولید *P*، *P*، ۲ قرار گرفتند. با شروع پروژه فائو (اصلاح نژاد کرم ابریشم) در سال ۱۳۷۱ به عنوان لاین‌های ژاپنی به بانک ژن معرفی گردیدند. لاین ۱۰۷ از پرورش هیبرید کره‌ای ۱۰۸ × ۱۰۷ (F₁) در راستای اجرای پروژه فائو (اصلاح نژاد کرم ابریشم) طی سال‌های ۱۳۷۱ تا ۱۳۷۶ به روش

تکثیر شده^۱ (AFLP) است که یک روش معتبر و سریع برای تولید تعداد زیادی از نشانگرهای *DNA* می‌باشد (سانتوس و سیمون، ۲۰۰۲). AFLP یک روش تصادفی است و بزرگترین مزیتی که نسبت به سایر روش‌های تصادفی (DAF، AP-PCR، RAPD) دارد این است که به شرایط واکنش، کیفیت *DNA* و پروفایل‌های دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حساس نیست (ووس و همکاران، ۱۹۹۵).

کرم ابریشم (بومبیکس موری^۲) یک مدل فوق‌العاده در مطالعه سیستم‌های ژنتیکی و یک حشره مهم از نظر اقتصادی است. بیش از ۳۰۰۰ سوبه کرم ابریشم در کشورهای مختلف جهان نگهداری می‌شوند که مخزن تفاوت‌های ژنتیکی برای صفات مختلف مانند طول رشته ابریشم، رشد لارو و مقاومت در مقابل بیماری هستند (ناگاجارو و همکاران، ۲۰۰۱). کرم ابریشم به راسته پروانه‌ها تعلق دارد که این راسته شامل مهم‌ترین آفت‌های کشاورزی است. بنابراین، پیشرفت‌ها در ژنوم کرم ابریشم یک تأثیر عمده نه تنها در اساس ژنتیکی و تحقیق‌های کاربردی کرم ابریشم بلکه در بیولوژی مقایسه‌ای و کاربردهایی مانند کنترل حشرات در بخش‌های مختلف کشاورزی دارد (یانسوکوچی، ۱۹۹۸).

پژوهشگرانی نظیر ردی و همکاران (۱۹۹۹a) با استفاده از ISSR-PCR و نیز در مطالعه دیگر (b) (۱۹۹۹) با استفاده از ریزماهوره‌ها تنوع ژنتیکی کرم ابریشم را بررسی کردند. میرحسینی (۱۹۹۸) با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک، پروتئینی و *DNA* برای اولین بار در ایران به بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از نژادهای کرم ابریشم ایران پرداخت. در این تحقیق به کمک نشانگر RAPD، چهار توده بومی شامل پرتقالی خراسان، لیمویی خراسان، بومی گیلان و بغدادی و چهار لاین وارداتی شامل ۱۰۱، ۱۰۲، ۱۰۳ و ۱۰۴ با استفاده از آغازگرهای ۱۰ نوکلئوتیدی تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اطلاعات حاصل از این نشانگرها،

1- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)
2 - Bombyx mori

گرفت. توالی سازگارهای آنزیم‌های TaqI و PstI، در جدول ۱ ارائه شده است. محصولات مرحله قبل رقیق شده و مرحله تکثیر مقدماتی با آغازگرهای TaqI و PstI بدون نوکلئوتید اضافی در انتهای ۳' (در حجم ۲۵ میکرولیتر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۲۰۰ میکرومولار از هر یک از dNTP، ۰/۲ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰x و ۵۰ نانوگرم از هر کدام از آغازگرهای دو آنزیم مذکور، ۲ میکرولیتر از DNA هضم شده و متصل شده به سازگارها) تحت چرخه حرارتی به صورت زیر انجام شد:

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (دمای واسرشته سازی)، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (دمای اولیه اتصال آغازگر) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه (دمای بسط واکنش)، این چرخه ۳۰ بار تکرار گردید و ۷۲ درجه سانتی‌گراد هم برای سنتز نهایی در نظر گرفته شد. توالی آغازگرهای آنزیم‌های TaqI و PstI، در جدول ۱۲ ارائه شده است. فرآورده‌های حاصل از تکثیر مقدماتی به نسبت ۵:۱ با آب مقطر رقیق شده و در مرحله تکثیر انتخابی مورد استفاده قرار گرفت. مرحله تکثیر انتخابی با استفاده از ۱۰ آغازگر AFLP (در واکنشی به حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۲۵ نانوگرم از هر کدام از جفت آغازگرهای AFLP، ۰/۳ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase، ۱ میکرولیتر DNA پیش تکثیر شده، ۰/۲ میلی‌مولار از dNTP و ۱ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰x) و تحت چرخه حرارتی زیر به صورت کاهش^۱ انجام شد:

۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (دمای واسرشته سازی)، ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (دمای اولیه اتصال آغازگر)، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (دمای نهایی اتصال آغازگر) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه (دمای بسط واکنش)، تعداد چرخه مرحله اول ۱۲ چرخه بود. تعداد چرخه مرحله دوم ۲۳ چرخه و به صورت: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد

اصلاح نژادی تلاقی برگشتی به دست آمد و در سال ۱۳۷۶ با کد ۱۰۷ به عنوان لاین ژاپنی به بانک ژن معرفی گردید. از هر لاین در روز سوم سن پنجم لاری تعداد ۳۰ نمونه به طور تصادفی انتخاب شدند. نمونه‌ها از مرکز تحقیقات کرم ابریشم رشت جمع‌آوری و غده ابریشمی لاروها جدا شد و بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد گردید. برای استخراج DNA از روش فنل- کلروفرم (ناگاراچا و گلدسمیت، ۲۰۰۲؛ ناگاراچا و همکاران، ۲۰۰۱) با اندکی تغییرات استفاده شد. برای استخراج DNA، غده ابریشمی منجمد در داخل هاون چینی قرار داده شده و سپس روی نمونه مقدار کافی ازت مایع ریخته و به خوبی سائیده شد. سپس مقدار ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به نمونه اضافه و در حمام آبی ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ ساعت قرار داده شد. بعد به نمونه مقدار ۳۰۰ میکرولیتر کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴:۱) و ۳۰۰ میکرولیتر فنل نیز به نمونه اضافه گردید و بعد از سانتریفیوژ کردن لایه بالایی جدا و به لوله دیگر منتقل گردید. این مرحله یک بار دیگر تکرار شد. به لایه بالایی جمع‌آوری شده از مرحله قبل مقدار ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم - ایزوآمیل الکل اضافه گردید. بعد از سانتریفیوژ کردن لایه بالایی جدا و به آن ایزوپروپانل ۲۰- درجه سانتی‌گراد اضافه شد. کلاف DNA تشکیل شده با استفاده از قلاب شیشه‌ای جمع‌آوری و با الکل ۷۰ درصد و ۹۶ درصد شستشو و پس از خشک شدن در بافر TE حل گردید.

روش AFLP: DNA ژنومی به میزان ۵۰۰ نانوگرم با آنزیم‌های TaqI و PstI (در حجم ۴۰ میکرولیتر شامل ۵ واحد از دو آنزیم مذکور، ۴ میکرولیتر از بافر (OPA) ۱x، ۱۵ میکرولیتر از آب دوبار تقطیر استریل) به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم شد. سپس اتصال سازگارها به قطعات DNA هضم شده (در حجم واکنش ۱۰ میکرولیتر شامل ۵۰ و ۵ پیکومول به ترتیب از سازگارهای TaqI و PstI، ۱۰ میلی‌مول ATP، ۱ واحد T₄ - DNA Ligase و ۱ میکرولیتر از بافر (OPA) ۱x، به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۲ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام

آغازگر مورد استفاده در جدول ۳ ارائه شده است.

به مدت ۶۰ ثانیه بود و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (برای مرحله نهایی تکمیل سنتز DNA). توالی ۱۰

جدول ۱- توالی سازگارسازهای آنزیمهای TaqI و PstI

بخش آنزیمی	بخش مرکزی	آنزیم
G-3' CGC-5' ATGCA-3' T-5'	5'-GACGATGAGTCCTGA 3'-TACTCAGGACT 5'-GACGTGACGGCCGTC 3'-GCACTGCCGGCAG	TaqI- adapter PstI- adapter

جدول ۲- توالی آغازگرهای آنزیمهای TaqI و PstI

بخش آنزیمی	بخش مرکزی	آنزیم
TGCAG-3' CGA-3'	5'-GACGGCCGTCA 5'-GATGAGTCCTGAG	Primer – PstI- o Primer– Taq-o

جدول ۳- توالی آغازگرهای مورد استفاده در مرحله تکثیر انتخابی.

شماره	آغازگرهای PstI	آغازگرهای TaqI
۱	5'-GACGGCCGTCATGCAGTA	5'-GATGAGTCCTGAGCGATA
۲	5'-GACGGCCGTCATGCAGAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGATG
۳	5'-GACGGCCGTCATGCAGAAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGATG
۴	5'-GACGGCCGTCATGCAGTC	5'-GATGAGTCCTGAGCGATC
۵	5'-GACGGCCGTCATGCAGAGA6	5'-GATGAGTCCTGAGCGATG
۶	5'-GACGGCCGTCATGCAGATG	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAT
۷	5'-GACGGCCGTCATGCAGAAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAT
۸	5'-GACGGCCGTCATGCAGAAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGATC
۹	5'-GACGGCCGTCATGCAGAAG	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAT
۱۰	5'-GACGGCCGTCATGCAGTC	5'-GATGAGTCCTGAGCGATAC

BSFهای محاسبه شده برای تمام آغازگرها به عنوان تشابه ژنتیکی درون لاینی (WGS^2) در نظر گرفته شد. برای بررسی تشابه ژنتیکی درون جمعیتی از ضریب تشابه ژنتیکی لینج (۱۹۹۰) استفاده شد.

$$BSF = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$$

N_a : تعداد باندهای حاصله برای فرد a، N_b : تعداد باندهای حاصله برای فرد b، N_{ab} : تعداد باندهای مشترک بین فرد a و b

تنوع ژنی از معادله نئی (۱۹۷۳) به صورت احتمال متفاوت بودن دو آلل که به طور تصادفی از یک جمعیت گرفته می شود محاسبه گردید:

$$H = 1 - \sum_i P_i^2 \quad (1)$$

بعد از عمل تکثیر انتخابی به نمونه ها مقدار ۱۰ میکرولیتر بافر بارگیری اضافه شد که پس از واسرشته سازی نمونه ها در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه روی ژل پلی آکریل آمید واسرشته ساز ۶ درصد منتقل و به مدت ۱/۵ ساعت با توان ۷۵ وات تفکیک و پس از رنگ آمیزی به روش نترات نقره با اسکنر اسکن شدند.

تجزیه و تحلیل داده ها: از نرم افزار اکسل ۲۰۰۳ و فتوشاپ ۷ برای امتیازبندی و تعیین وزن مولکولی باندها استفاده شد. براساس یک و صفر به ترتیب برای حضور و یا عدم حضور باند به تمام باندها امتیاز داده شد. بعد از امتیاز دادن برای هر لاین و به ازاء هر جفت آغازگر مقدار ضریب اشتراک نواری (BSF^1) محاسبه و سپس متوسط

به طوری که P_i فراوانی i امین آل است.

محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC^1) از معادله ۲ محاسبه گردید:

$$PIC = 1 - \sum_i P_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i-1}^k P_i^2 P_j^2 \quad (2)$$

که در آن k تعداد آلها و P_i و P_j به ترتیب فراوانی های جمعیتی i و j امین آل می باشند. پارامتر PIC نشان دهنده میزان چند شکلی یک نشانگر می باشد که می تواند از صفر تا یک متغیر باشد هر چه این عدد بزرگتر باشد بیانگر وجود تعداد آل های زیاد و متعاقبا چند شکلی بالا برای آن جایگاه در جمعیت تحت مطالعه است. و همچنین برای محاسبه فاصله ژنتیکی از فرمول نئی (۱۹۷۲، ۱۹۷۸) استفاده شد. تعداد آل های با فراوانی غیر صفر به عنوان تعداد آل در نظر گرفته شده و تعداد آل مؤثر با فرمول زیر محاسبه گردید (کراو و کیمور، ۱۹۶۴):

$$A_e = ne = \frac{1}{1-H} \quad (3)$$

شاخص اطلاعاتی شانون (I) طبق معادله زیر محاسبه گردید:

$$I = -\sum_i p_i \ln(p_i) \quad (4)$$

حداکثر مقدار I برابر با $\ln(n)$ می باشد.

با استفاده از روش جفت گروه های غیر وزنی ($UPGMA^2$) و نرم افزار $PopGene32$ مقدار فاصله ژنتیکی بین لاین ها اندازه گیری و دندروگرام مربوط به آنها رسم شد. اساس این روش میانگین فاصله افراد یا گروه ها از همدیگر می باشد. از این رو، مقادیر به دست آمده را در ماتریس فاصله قرار داده و افرادی که کمترین فاصله را از همدیگر دارند، با هم ادغام و در یک گروه قرار می دهد و به این ترتیب درخت فیلوژنی جمعیت های مورد مطالعه ایجاد می گردد.

نتایج

متوسط تنوع ژنی، شاخص اطلاعاتی شانون، متوسط تعداد آل های مؤثر و متوسط درصد چند شکلی در جدول ۴ ارائه شده است. فاصله ژنتیکی بدون و با احتساب اریبی در برآوردها به ترتیب در جدول های ۵ و ۶ ارائه گردیده است. در این مطالعه که از ۱۰ جفت آغازگر $AFLP$ (۱۰ آغاز گر برای هر آنزیم) استفاده شد مجموعاً ۱۹۹ باند چند شکل تولید گردید. بیشترین درصد چند شکلی در لاین ۱۰۳ به مقدار ۴۱/۲۱ درصد و کمترین درصد چند شکلی در لاین ۳۱ به میزان ۲۶/۶۳ درصد بود. متوسط تعداد آل های مؤثر برای کل لاین ها و آغازگرها ۰/۲۸۸۱±۰/۱۶۴۳۲، برای لاین ۱۰۳ بیشترین تعداد (۰/۳۶۲۶±۰/۲۵۶۸۱) و برای لاین ۳۱ کمترین تعداد (۰/۳۴۷۸±۰/۱۹۶۶۴) به دست آمد. نزدیک بودن این عدد به تعداد آل واقعی یعنی ۲ دلیلی بر تأثیر خوب آل ها در چند شکلی بالا و برآورد تنوع ژنتیکی می باشد. متوسط تنوع ژنتیکی به دست آمده (نئی، ۱۹۷۲) برای کل لاین ها و آغازگرها برابر با ۰/۳۶۹۲ بود که نشان می دهد تنوع ژنتیکی کل لاین ها از تنوع ژنتیکی درون هر لاین بیشتر است. حداکثر فاصله ژنتیکی با احتساب نااریبی (نئی، ۱۹۷۸) بین ۳۱ و ۱۰۷ به میزان ۰/۶۸۴۱ و حداقل این فاصله بین لاین های ۳۱ و ۱۰۳ به میزان ۰/۳۹۳۹ برآورد گردید.

اعداد قطر جدول بیانگر تنوع ژنتیکی درون گروهی و اعداد پائین قطر جدول بیانگر تنوع ژنتیکی بین گروه ها و اعداد بالای قطر جدول بیانگر تشابه ژنتیکی بین گروه های مورد مطالعه می باشد

اعداد قطر جدول بیانگر تنوع ژنتیکی درون گروهی و اعداد پائین قطر جدول بیانگر تنوع ژنتیکی بین گروه ها و اعداد بالای قطر جدول بیانگر تشابه ژنتیکی بین گروه های مورد مطالعه می باشد.

1- Polymorphic Information Content
2- Un weighted pair grouping method with arithmetic means

جدول ۴- متوسط تنوع ژنی، شاخص اطلاعاتی شانون، متوسط تعداد آلل‌های مؤثر، متوسط تعداد آلل‌های مشاهده شده، متوسط درصد چند شکلی.

لاین	متوسط تنوع ژنی	درصد تشابه درون لاینی	شاخص اطلاعاتی شانون	متوسط تعداد آلل‌های مؤثر	متوسط تعداد آلل‌های مشاهده شده	متوسط درصد چند شکلی
۳۱	۰/۱۰۸۸	۹۴/۵۵	۰/۱۵۸۳	۱/۱۹۶۴±۰/۳۴۷۸	۱/۲۶۷۷	۲۶/۶۳
۱۰۳	۰/۱۴۸۴	۹۲/۵۲	۰/۲۲۰۷	۱/۲۵۶۸±۰/۳۶۲۶	۱/۴۲۲۷	۴۱/۲۱
۱۰۷	۰/۱۱۰۲	۹۴/۲۶	۰/۱۶۰۷	۱/۱۹۸۰±۰/۳۵۳۰	۱/۲۷۹۲	۲۷/۶۴

جدول ۵- فاصله ژنتیکی بین لاین‌ها با احتساب نا اریبی (نتی، ۱۹۷۸).

لاین	۳۱	۱۰۳	۱۰۷
۳۱	۰/۱۰۸۸	۰/۶۷۲۷	۰/۵۰۳۵
۱۰۳	۰/۳۹۶۴	۰/۱۴۸۴	۰/۵۶۳۹
۱۰۷	۰/۶۸۶۲	۰/۵۷۲۹	۰/۱۱۰۲

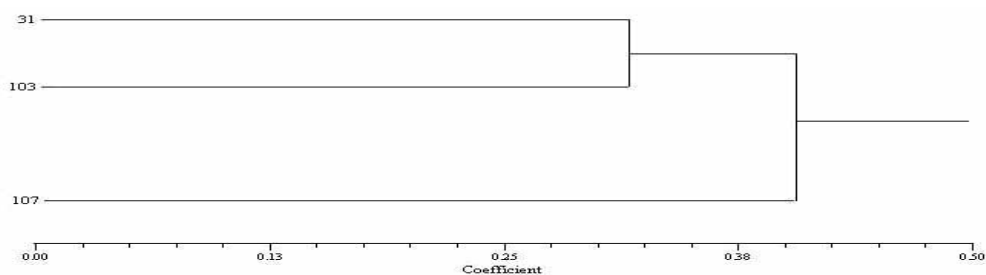
جدول ۶- فاصله ژنتیکی بدون احتساب نا اریبی (نتی، ۱۹۷۲).

لاین	۳۱	۱۰۳	۱۰۷
۳۱	۰/۱۰۸۸	۰/۶۷۴۴	۰/۵۰۴۵
۱۰۳	۰/۳۹۳۹	۰/۱۴۸۴	۰/۵۶۵۳
۱۰۷	۰/۶۸۴۹	۰/۵۷۰۴	۰/۱۱۰۲

بحث

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نمونه‌ها دو گروه لاین‌های وارداتی و توده‌های بومی را شامل می‌شود. لاین‌های ژاپنی نیز دو گروه را تشکیل دادند. بلوآسی (۲۰۰۳) با مطالعه دو گروه از لاین‌های با منشأ چینی و ژاپنی با استفاده از نشانگر ISSR نیز نشان داد که لاین‌های ۳۱، ۱۰۳ در یک گروه و لاین ۱۰۷ در گروه دیگری به همراه یک لاین چینی قرار دارد.

در دندروگرام به دست آمده به روش *UPGMA* (شکل ۱) سه لاین نژاد ژاپنی در دو گروه قرار گرفتند. در یک گروه لاین‌های ۳۱، ۱۰۳ و در گروه دیگر لاین ۱۰۷ قرار گرفت. انتظار این بود که چون سه لاین از یک نژاد هستند باید در یک گروه قرار بگیرند اما نتایج چنین چیزی را نشان نداد. میرحسینی (۱۹۹۸) با مطالعه صفات مورفولوژیک گروه‌های کرم ابریشم نشان داد که



شکل ۱- دندروگرام به دست آمده از روش *UPGMA* برای لاین‌های ژاپنی با احتساب نا اریبی از نشانگرهای *AFLP*.

در یک برنامه هیبرید حیاتی است چون در همه کشورهای که پرورش کرم ابریشم رواج دارد پرورش هیبرید نیز انجام می‌گیرد.

نتیجه‌گیری

انتظار می‌رفت که تمام لاین‌ها که از نظر مکان جغرافیایی در یک گروه قرار داده می‌شوند در این تحقیق نیز در یک گروه رده‌بندی شوند در صورتی که لاین ۱۰۷ از دو لاین دیگر جدا شد و در گروه جداگانه‌ای قرار گرفت.

سپاسگزاری

از موسسه تحقیقات استان گیلان، مرکز تحقیقات کرم ابریشم (پسیخان-رشت) به جهت فراهم آوردن امکانات انجام این تحقیق و همکاری صمیمانه تشکر می‌گردد.

در این مطالعه فاصله ژنتیکی لاین ۱۰۷ از دو لاین دیگر زیاد بود. و این فاصله ممکن است به این علت باشد که این لاین‌ها پس از ورود به ایران در هر نسل مورد انتخاب قرار گرفته‌اند و با توجه به معیار انتخاب مورد نظر احتمال تغییر در ساختار ژنتیکی آنها وجود دارد. تنوع ژنتیکی درون گروهی هر لاین اندک بود. در مقایسه توده‌های بومی تنوع داخلی بیشتری را نشان می‌دهند (دلیرصفت، ۲۰۰۳). این تنوع ژنتیکی کم می‌تواند به این علت باشد که این لاین‌ها برای تولید هیبریدهای تجاری مورد استفاده قرار گرفته‌اند و جایگاه‌های ژنی آنها به مقدار زیاد خالص شده باشد. لاین ۳۱ کمترین تنوع ژنتیکی درون گروهی و لاین ۱۰۳ بالاترین میزان تنوع ژنتیکی درون گروهی را دار بود. اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی درون گروهی و بین گروهی برای انتخاب سویه‌های والدینی مختلف و خالص ژنتیکی برای موفقیت

منابع

- Balvasi, A. 2003. Study of genetic diversity of silkworm of Iran using SSR markers. M.Sc. Thesis. University of Tehran. Faculty of Agricultural.
- Crow, J.F., and Kimura, M. 1964. The number of alleles that can be maintained in finit population. *Genetics*. 49: 725-738.
- Dalirshafat, S.B. 2003 Study of genetic diversity of local silkworm of Iran using protein and DNA markers. M.Sc. Thesis. University of Azad Islamic. Faculty of Agric. Karaj.
- Lynch, M. 1990. The Similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* 7: 478-484.
- Mirhoseini, S.Z. 1998. Study of genetic diversity of silkworm of Iran using protein and DNA markers. PhD Thesis. University of Tarbiate Moddares. Faculty of Agric.
- Nagaraju, J., and Goldsmith, M.R. 2002. Silkworm genomics - progress and prospects. *Current Science*. 83: 415-425.
- Nagaraju, J., Reddy, K.D., Nagaraja, G.M., and Sethurman, B.N. 2001. Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of Silkworm, *Bombyx mori*, *Heredity*. 86: 588 - 597.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between line. *Am. Nat.* 106: 283 - 292.
- Nei, M. 1973 Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 85: 583-590.
- Reddy, K.D., Nagaraju, J., and Abraham, E.G. 1999a. Genetic Characterization of the Silkworm, *Bombyx mori* by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored PCR. *Heredity*. 83: 681 687.
- Reddy, K.D., Abraham, E.G., and Nagaraju, J. 1999b. Micro Satellites in the Silkworm, *Bombyxmori*: Abundance, Polymorphism and Strain Characterization. *Genome*. 42: 1057 1065.
- Santos, C.A.F, and Simon, P.W. 2002. Some AFLP amplicons are highly conserved DNA sequences mapping to the same linkage groups in two F₂ lines of carrot. *Genetics and Molecular Biology* 25 (2): 195-201.
- Serrano, G.M., Egito, A.A., Mcmanuc, C., and Marianta, D.S. 2004. Genetic diversity and line structure of Brazilian native bovine breeds. *pesq . agropee. bras. Brasilia*. 39: 543 – 549.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA finderprinting. *Nucleic Acids research*. 23: 4407- 4414.
- Yansukochi, Y. 1998. A Dense Genetic map of the Silkworm, *Bombyx mori*, Covring all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics*. 150: 1513 – 1525.

Study of genetic diversity in japanese lines of Iranian silkworm population using AFLP markers

*** A. Salehi¹, L. Alitalesh Chapooli², Z. Mirhoseini³ and B. Dalirsefat⁴**

¹Associate Prof., Dept. of Animal Sciences, University of Tehran-Pakdasht, Iran, ²Former M.Sc. Student, Dept. of Animal Sciences, University of Tehran, Iran, ³Assistant Prof. Dept. of Animal Sciences, University of Guilan, Iran, ⁴Instructor of Genetic and Molecular Markers Laboratory of college of Natural Resources, University of Guilan, Iran

Abstract

Genetic diversity of three lines of Iranian Silkworm (Japanes Lines) was assessed, using the AFLP markers. Samples (30 Larvae at 3rd day of 5th instars from each line) were collected from Silkworm Research Institute (Rasht- Pasikhan). Genomic DNA was extracted from sericigence glands using phenol- chloroform method. In this Study ten PstI – TaqI primers combinations were used from which that 199 AFLP Polymorphic markers were generated. The dendrogram was constructed using the UPGMA method showed two groups, where Lines 31 and 103 were located in one group and line 107 in the other group. Average genetic diversity for total population and Primers was 0.3692. The lowest genetic diversity (0.1088) was observed for Line 31 and minimum was (0.1484) for Line 103. The maximum and minimum unbiased genetic distance was observed between Lines 31 and 107, and between Lines 31 and 103, respectively. Maximum and Minimum Polymorphism was observed in Lines 103 and 31, respectively.

Keywords: Silkworm; Japanese Lines; Genetic diversity; AFLP markers

* - Corresponding author; Email:arsalehi@ut.ac.ir