جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دوازدهم ـ ویژه‌نامه علوم دامی شهریور ۱۳۸٤
www.magiran.com/jasnr

# مقایسه جمعیت‌های کرم ابریشم چینی و بومی ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR

زربخت انصاری[1]، آسیه بلواسی[2]، جاماسب نوذری[2]، ضیاءالدین میرحسینی[3] و ابراهیم باقری‌زنوز[2]

[1]گروه علوم دامی دانشگاه مازندران، [2]گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران، [3]گروه علوم دامی دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۸۲/۹/۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۰/۲٦

## چکیده

دو گروه از کرم ابریشم تجاری ایران شامل گروه چینی (۱۱۰، ۱۰٤ و ۳۲) با گروه بومی ایران (پرتقالی گیلان، پرتقالی خراسان، لیمویی خراسان، صورتی خراسان و بغدادی) مورد مقایسه ژنتیکی قرار گرفتند. در این مقایسه از نشانگرهای ISSR با سه آغازگر استفاده شد. استخراج DNA به روش بهینه یافته سوزوکی انجام شد. در مرحله PCR در کل ۲۵۳ باند تولید شد که در آنها ۱۰۰ درصد چند شکلی مشاهده شد. متوسط تعداد آلل مؤثر برای کل جمعیت‌ها ۱/۵۱۸ و متوسط تنوع ژنی جمعیت‌ها ۰/۳۱۹٤ محاسبه شد. با استفاده از روش UPGMA برای جمعیت‌ها دندروگرام رسم شد. بیشترین چندشکلی در جمعیت ۱۱۰ و کمترین در جمعیت بغدادی قرار داشت. بیشترین فاصله ژنتیکی نااریب بین جمعیت گیلانی و ۱۰٤ و کمترین فاصله را بغدادی و ۱۱۰ داشتند که در یک گروه مجزا قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهند که از این نشانگر می‌توان به‌عنوان ابزاری مفید در تشخیص گونه‌ها، نژادها، بیوتیپ‌های حشرات و مطالعات فیلوژنی بهره برد.

***واژه‌های کلیدی:*** کرم ابریشم، نشانگرهای ISSR، مقایسه ژنتیکی

## مقدمه

کرم ابریشم (*Bombyx mori*) حشره‌ای است که به دلیل تولید ابریشم همواره از سایر پروانه‌ها متمایز و مورد توجه انسان بوده است (تازیما، ۲۰۰۱). تا به امروز واریته‌های جدید معمول براساس خصوصیات مورفولوژیکی توصیف شده‌اند که بسیار گوناگون و وابسته به محیط هستند. بنابراین به روش‌هایی برای تعیین خصوصیات ژنتیکی نیاز می‌باشد (ناگاراجو و سینگ، ۱۹۹۷). کرم ابریشم از نظر بیولوژی و ژنتیک در راسته پروانه‌ها پیشرفته‌ترین گونه محسوب می‌شود و منبع ژنتیکی قوی و پتانسیل کاربردهای آن در پرورش و به‌عنوان یک مدل مناسب برای دیگر پروانه‌ها دانشمندان را به سمت آغاز تحقیقات ژنتیکی راهنمایی کرده است (ناگاراجو و گلد اسمیت، ۲۰۰۲). در نتیجه مهم است که منابع عظیم ژنتیکی کرم ابریشم که در کشورهای مختلف وجود دارد از نظر ژنتیکی شناسایی شده و به‌طور مطلوب برای پرورش ژنوتیپ‌های مناسب برای تولید صنعتی مورد استفاده قرار گیرند (میتا و همکاران، ۲۰۰۲). اطلاعات ژنوم ابزار قوی را برای فهم سازوکارهای بیولوژیک و عملکردی فراهم می‌کند و در علوم دارویی، بیولوژی و کشاورزی موردنیاز است. بنابراین تجزیه و تحلیل ژنوم کرم ابریشم یکی از نیازهای بسیار مهم در علم حشره شناسی امروزی است (میتا و همکاران، ۲۰۰۲).

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



تا چند سال قبل برای مقایسه موجودات با یکدیگر از مشاهدات مزرعه‌ای، اطلاعات شجره‌ای و نشانگرهای پروتئینی استفاده می‌شده است اما امروزه با توجه به توسعه نشانگرهای DNA و قدرت تمایز، قطعیت و فراوانی آنها، به‌طور گسترده‌ای از این نشانگرها در کشاورزی، مدیریت حیوانات حفاظت شده و توده‌های مختلف جانوری استفاده می‌شود. یکی از این نشانگرها نشانگر ISSR[1] می‌باشد که می‌توان از آن به‌عنوان ابزاری مفید در نقشه یابی ژنتیکی کرم ابریشم و انگشت نگاری ژنتیکی به خوبی استفاده نمود. همچنین جدا شدن مندلی نشانگرهای ISSR به‌طور واضح بر کاربرد گسترده آن در ژنتیک کرم ابریشم تأکید می‌کند. از این رو روشی عالی برای نقشه‌یابی ژنتیکی کرم ابریشم می‌باشد (ردی و همکاران، ۱۹۹۹). ISSR نشانگر مولکولی با کاربرد آسان است که به DNA الگوی کمی نیاز دارد. در آزمایش‌هایی که صورت گرفته است، ISSR تنوع بیشتری نسبت به RAPD[2] نشان داده است (ردی و همکاران، ۱۹۹۹). این روش برای بررسی تنوع ژنتیکی (کانتی و همکاران، ۱۹۹۵ و سالیماث و همکاران، ۱۹۹۵)، تشخیص کولتیوارها[3] (ولف و همکاران، ۱۹۹۵) و تهیه نقشه‌های لینکاژی[4] (بکر و هیون، ۱۹۹۵) به خوبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین نتایج آزمایش‌ها این نشانگر را به‌عنوان ابزاری مفید در نقشه‌یابی ژنتیکی کرم ابریشم و انگشت نگاری ژنتیکی آن پیشنهاد می‌کنند (ردی و همکاران، ۱۹۹۹).

## مواد و روش‌ها

**جمعیت‌های کرم ابریشم و استخراج DNA:** جمعیت‌های بومی (پرتقالی خراسان، لیمویی خراسان، صورتی خراسان، پرتقالی گیلان و بغدادی) و جمعیت‌های چینی (۳۲، ۱۰۴ و ۱۱۰) در این مقایسه مورد استفاده قرار گرفتند و ۳۰ لارو سه روزه سن پنجم از هر جمعیت برای مقایسه انتخاب شد. استخراج DNA به روش بهینه یافته سوزوکی (سوزوکی و همکاران، ۱۹۷۲) انجام شد. در این تحقیق با توجه به شرایط آزمایشگاه و امکانات موجود، تغییرات زیر در این روش داده شد:

در ابتدا مقدار بافر استخراج از یک میلی‌لیتر به ۸۰۰ میکرولیتر رسانده شد. همچنین در مراحل مختلف استخراج مقدار فنل، کلروفرم و ایزوآمیل الکل از سه، دو و یک میلی‌لیتر به ۶۰۰ میکرولیتر کاهش داده شد. به جای استفاده از سانتریفیوژ و رسوب دادن DNA از میله شیشه‌ای سرد برای جمع‌آوری DNA استفاده شد. همچنین در انتها زمان سانتریفیوژ از ۱۵ دقیقه به ۱۷ دقیقه افزایش و سرعت آن از ۱۳ هزار دور به ۱۱ هزار دور کاهش داده شد.

برای استخراج، غدد ابریشمی در داخل هاون چینی قرار داده شده، روی نمونه مقدار کافی ازت مایع ریخته و به خوبی سائیده شد. بعد بافر استخراج به همراه آنزیم پروتئیناز K به نمونه خرد شده اضافه در حمام آبی ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. دو مرحله پی‌درپی محلول فنل، کلروفرم، ایزوآمیل الکل به نمونه اضافه شد و مخلوط حاصله سانتریفیوژ و سپس مایع فوقانی به لوله دیگر منتقل گردید. به محلول حاصل کلروفرم- ایزوآمیل الکل اضافه و سپس سانتریفیوژ شد. لایه فوقانی جمع‌آوری و در لوله‌ای دیگر ریخته شد. به محلول حاصل بافر نمک اتانل اضافه شد. با استفاده از لوله شیشه‌ای سرد DNA جمع‌آوری و با اتانل شستشو شد. DNA پس از خشک شدن در بافرTE حل شد و برای از بین بردن RNA به آن آنزیم Rnase اضافه و در حمام آبی ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای حذف Rnase دوباره از محلول فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل استفاده شد. در نهایت DNA در بافرTE حل شد.

**واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و الکتروفورز:** در این مطالعه از سه آغازگر (Roch, German) زیر استفاده شد (ردی و همکاران، ۱۹۹۹):

1- Inter Simple Sequence Repeat
2- Random Amplified Polymorphic
3- Cultivares
4- Linkage

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



$P_1$ 5′GTG TGT GTG TGT GTG TAG TCY 3′
$P_2$ 5′GCT AGT GCT CAC ACA CAC ACACAY 3′
$P_3$ 5′GCA CAT GCA RTG TGT GTG TGTGTG 3′
Y: C/T, R: A/G

لازم به ذکر است که آغازگرهای فوق به‌صورت تک بوده و به‌طور تصادفی بازهای آدنین یا گوانین در جایگاه R و سیتوزین یا تیمین در جایگاه Y قرار می‌گیرند.

پس از واسرشته سازی محصولات PCR در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها به روی ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته ساز ٦ درصد منتقل شدند (محلول اکریل‌آمید ٤۰ درصد با نسبت ۱۹:۱ اکریل‌آمید- بیس اکریل‌آمید). نمونه‌ها به مدت دو ساعت با توان ۷۵ وات تفکیک و پس از رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره با اسکنر اسکن شدند.

**مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی مراز:** ابتدا تیوب‌های محتوی محلول PCR به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌منظور شروع واسرشته سازی یا ذوب اولیه، حرارت داده شد. سپس دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه (برای واسرشته سازی دی‌ان‌آ)، دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه (برای متصل شدن آغازگرها) و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه (برای سنتز و طویل شدن DNA) اعمال و این چرخه حرارتی ۳٦ بار تکرار شد. سپس جهت تکمیل سنتز DNA یک مرحله حرارت نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. در هر واکنش PCR مواد مورد استفاده براساس ۲۰ میکرولیتر حجم کل نمونه با هم مخلوط شدند که شامل dNTP (۲ میکرولیتر)، بافر PCR (۲ میکرولیتر)، آنزیم پلیمراز Taq (۱ میکرولیتر)، $MgCl_2$ (۲/۵ میکرولیتر)، آغازگر (۳ میکرولیتر)، DNA ژنومی (۲ میکرولیتر) و آب دوبار تقطیر استریل شده (برای رساندن حجم کل به ۲۰ میکرولیتر) می‌باشد.

**تجزیه‌وتحلیل داده‌ها:** از نرم افزار اکسل[1] و فتوشاپ برای امتیازبندی و تعیین وزن مولکولی باندها استفاده شد.

1-Excel

براساس صفر و یک (به‌ترتیب عدم حضور و حضور باند) تمام باندها امتیازبندی و ماتریس ضریب تشابه با استفاده از فرمول $SF= 2N_{ab}/ (N_a+ N_b)$[2] (نئی، ۱۹۷۲) به‌دست آمد که در آن $N_{ab}$ تعداد باندهای مشترک در یک جمعیت، $N_a$ تعداد باندهای فرد a و $N_b$ تعداد باندهای فرد b می‌باشد. سپس تشابه ژنتیکی درون جمعیتی (WGS)[3] از طریق محاسبه متوسط BSFهای محاسبه شده برای تمام آغازگرها به‌دست آمد. واریانس ژنتیکی درون جمعیتی نیز از فرمول $\sigma^2$ WGS -1= محاسبه شد. با استفاده از روش UPGMA و نرم افزار Popgene مقدار فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها اندازه‌گیری و دندروگرام مربوط به آنها رسم شد.

## نتایج

در کل ۲۵۳ باند تولید شد که از میان حداکثر باند به‌دست آمده، در جمعیت ۱۰٤ و در آغازگر اول ($P_1$) و حداقل باند تولیدی، در جمعیت بغدادی در آغازگر اول ($P_1$) و گیلانی و لیمویی در آغازگر دوم ($P_2$) قرار داشت. همچنین بیشترین چندشکلی در جمعیت خراسانی در آغازگر سوم ($P_3$) و کمترین آن در جمعیت‌های لیمویی، گیلانی، خراسانی، بغدادی و ۳۲ در آغازگر دوم ($P_2$) بود (جدول ۱).

در آغازگر اول ($P_1$)، حداکثر باند تولید شده متعلق به جمعیت ۱۰٤ و حداقل باند متعلق به جمعیت بغدادی بود. همچنین حداکثر چندشکلی درون جمعیتی در این آغازگر متعلق به جمعیت ۱۱۰ با ۲۰/۸ درصد چندشکلی با ۵ باند چندشکل و حداقل چندشکلی متعلق به جمعیت گیلانی با ۳/۹ درصد چندشکلی با ۱ باند چندشکل بود.

2- Band shearing frequency (BSF)
3- Within genetic similarity (WGS)

جدول ۱- تعداد باند، درصد تک شکلی و چند شکلی به‌دست آمده به ازای آغازگرها.

| | تعداد کل باند | | | درصد چند شکلی (پلی مورفی) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | آغازگر اول ($P_1$) | آغازگردوم ($P_2$) | آغازگر سوم($P_3$) | آغازگر اول ($P_1$) | آغازگر دوم ($P_2$) | آغازگر سوم($P_3$) |
| لیمویی | ۲۱ | ۱۶ | ۲۳ | ۹۰۵ | ۰ | ۸۷ |
| گیلانی | ۲۶ | ۱۶ | ۲۲ | ۳۰۹ | ۰ | ۲۲۷ |
| صورتی | ۱۹ | ۲۱ | ۳۰ | ۵۰۲ | ۱۹ | ۶۶ |
| خراسانی | ۲۶ | ۲۲ | ۲۳ | ۱۱۰۵ | ۰ | ۳۹۰۱ |
| بغدادی | ۱۶ | ۱۹ | ۲۵ | ۶۰۲۵ | ۰ | ۱۶ |
| ۳۲ | ۲۵ | ۱۸ | ۲۳ | ۸ | ۰ | ۲۶ |
| ۱۰۴ | ۳۱ | ۱۹ | ۲۴ | ۹۰۶ | ۲۱ | ۸۰۳ |
| ۱۱۰ | ۲۴ | ۲۲ | ۲۴ | ۲۰۸ | ۱۸ | ۲۵ |

همچنین حداکثر باند تولید شده در آغازگر دوم ($P_2$) متعلق به جمعیت‌های ۱۱۰ و خراسانی و حداقل باند تولید شده در جمعیت‌های لیمویی و گیلانی قرار داشت. حداکثر چندشکلی در جمعیت ۱۰۴ با ۲۱ درصد چندشکلی و ٤ باند چندشکل و حداقل چندشکلی صفر درصد در جمعیت‌های لیمویی، گیلانی، خراسانی، بغدادی و ۳۲ بود.

در آغازگر سوم ($P_3$) حداکثر باند تولید شده در جمعیت صورتی و حداقل باند تولید شده در جمعیت گیلانی قرار داشت. همچنین حداکثر چندشکلی متعلق به جمعیت خراسانی با ۳۹/۱ درصد چندشکلی و با ۹ باند چندشکل و حداقل چندشکلی در جمعیت صورتی با ٦/٦ درصد چندشکلی و با ۲ باند چندشکل بود.

حداکثر فراوانی اشتراک باندی (BSF) متعلق به جمعیت‌های گیلانی، خراسانی، بغدادی و ۳۲ در آغازگر دوم ($P_2$) بود. همچنین حداکثر ضریب تشابه ژنتیکی متعلق به جمعیت بغدادی بود. واریانس ژنتیکی نیز در تمامی جمعیت‌ها کمتر از ۵ درصد دیده می‌شد که نشان‌دهنده تشابه زیاد درون جمعیتی به ازای این سه آغازگر بود (جدول ۲).

جدول ۲- واریانس ژنتیکی جمعیت‌ها.

| جمعیت | $\delta^2_G$ (%) |
|---|---|
| **لیمویی** | ۱۰۹ |
| گیلانی | ۲ |
| صورتی | ۱۰۲ |
| خراسانی | ۳۰۲ |
| بغدادی | ۰۰۶ |
| ۳۲ | ۱۰۸ |
| ۱۰٤ | ۲۳ |
| ۱۰٤ | ٤۵ |

$\delta^2_G$ = Genetic Variance

حداکثر فاصله ژنتیکی بدون احتساب نااریبی[1] بین جمعیت‌های ۱۰٤ و گیلانی و مقدار آن ۰/۵٦٦۷ و حداقل آن بین جمعیت‌های بغدادی و ۱۱۰ و مقدار آن ۰/۳۰۱۷ بود (جدول ۳). حداکثر این فاصله با احتساب نااریبی[2] باز هم بین جمعیت‌های ۱۰٤ و گیلانی و مقدار آن ۰/۵٦٦۵ و حداقل آن نیز بین جمعیت‌های بغدادی و ۱۱۰ و مقدار آن ۰/۳۰۱۵ بود (جدول ٤).

متوسط تنوع ژنی، تعداد جایگاه‌های چندشکل، درصد چندشکلی و متوسط تعداد مؤثر آلل‌ها در جمعیت‌های مختلف در جدول ۵ و فراوانی ژنی موجود در جمعیت‌ها نیز در جدول ٦ نشان داده شده است.

1-Biased
2-Unbiased

متوسط تعداد مؤثر آلل‌ها برای جمعیت‌ها و آغازگرها ۱/۵۱۸±۰/۲۸۰ بود. با توجه به نزدیک بودن این عدد به تعداد آلل واقعی یعنی ۲ دلیلی بر تأثیر خوب آلل‌ها در چندشکلی بالا و برآورد تنوع ژنتیکی می‌باشد. متوسط تنوع ژنی (درون جمعیت) به‌دست آمده (نئی، ۱۹۷۲) برای کل جمعیت‌ها و آغازگرها برابر با ۰/۳۱۹٤ ±۰/۱۲ بود که نشان‌دهنده تنوع کم داخل جمعیت‌ها می‌باشد.

**جدول ۳- مقادیر فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌های کرم ابریشم بدون احتساب نااریبی (نئی، ۱۹۷۲).**

| جمعیت | لیمویی | گیلانی | صورتی | خراسانی | بغدادی | ۳۲ | ۱۰٤ | ۱۱۰ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| لیمویی | xxxxx | | | | | | | |
| گیلانی | ۰/٤۳۹۵ | xxxxx | | | | | | |
| صورتی | ۰/٤۷٦۹ | ۰/۵۳۳۰ | xxxxx | | | | | |
| خراسانی | ۰ ٤۲۸۳ | ۰/٤۰۰۲ | ۰/۵۱٤۷ | xxxxx | | | | |
| بغدادی | ۰/٤۳۲۵ | ۰/٤۱۹۳ | ۰/٤۳۷۷ | ۰/٤۳۵۰ | xxxxx | | | |
| ۳۲ | ۰ ٤۲۳٤ | ۰/٤۳۹۹ | ۰/٤۰۰۸ | ۰/٤۰۸۲ | ۰/۳۳۷۹ | xxxxx | | |
| ۱۰٤ | ۰ ۵۰٦٤ | ۰/۵٦٦۷ | ۰/٤۷۸۹ | ۰/٤۹۱۵ | ۰/٤۵٦۵ | ۰/٤٤٤۲ | xxxxx | |
| ۱۱۰ | ۰ ٤۳۰۱ | ۰ ۳٦۵٦ | ۰/٤۵۱٦ | ۰/۳۸۰۲ | ۰/۳۰۱۷ | ۰/۳۹۲۹ | ۰/٤۹۵٤ | xxxxx |

**جدول ٤- مقادیر فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌های کرم ابریشم با احتساب نااریبی (نئی، ۱۹۷۸).**

| جمعیت | لیمویی | گیلانی | صورتی | خراسانی | بغدادی | ۳۲ | ۱۰٤ | ۱۱۰ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| لیمویی | xxxxx | | | | | | | |
| گیلانی | ۰/٤۳۹۳ | xxxxx | | | | | | |
| صورتی | ۰/٤۷٦۸ | ۰/۵۳۲۸ | xxxxx | | | | | |
| خراسانی | ۰/٤۲۸۱ | ۰/۳۹۹۸ | ۰/۵۱٤٤ | xxxxx | | | | |
| بغدادی | ۰/٤۳۲٤ | ۰/٤۱۹۲ | ۰/٤۳۷٦ | ۰/٤۳٤۸ | xxxxx | | | |
| ۳۲ | ۰/٤۲۳۳ | ۰/٤۳۹٦ | ۰/٤۰۰٦ | ۰/٤۰۷۹ | ۰/۳۳۷۷ | xxxxx | | |
| ۱۰٤ | ۰/۵۰٦۲ | ۰/۵٦٦۵ | ۰/٤۷۸۷ | ۰/٤۹۱۲ | ۰/٤۵٦٤ | ۰/٤٤٤۰ | xxxxx | |
| ۱۱۰ | ۰/٤۲۹۹ | ۰/۳٦۵۳ | ۰/٤۵۱۳ | ۰/۳۷۹۸ | ۰/۳۰۱۵ | ۰/۳۹۲٦ | ۰/٤۹۵۱ | xxxxx |

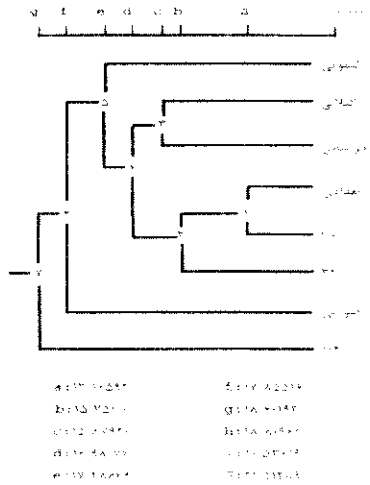
**جدول ۵- متوسط تنوع ژنی، درصد چندشکلی و متوسط تعداد مؤثر آلل‌ها در جمعیت‌های مختلف.**

| جمعیت | متوسط تنوع ژنی | درصد چند شکلی | متوسط Ne ± SD |
|---|---|---|---|
| ۳۲ | ۰/۰۱۱٦ | ٤/۷٤ | ۱/۰۱۷۹±۱/۱۰۱٦ |
| ۱۰٤ | ۰/۰۱٤۳ | ۳/۹۵ | ۱/۰۲٤۱±۰/۱۲۹٤ |
| ۱۱۰ | ۰/۰۲۰۸ | ۵/۹۳ | ۱/۰۳۵۸±۰/۱٦۰۳ |
| لیمویی | ۰/۰۰٤۵ | ۱/۱۹ | ۱/۰۰۷۷±۰/۰۷۵۳ |
| گیلانی | ۰/۰۱٤٤ | ۳/۵٦ | ۱/۰۲۵۱ ±۰/۱۳۵۷ |
| صورتی | ۰/۰۱۲۱ | ۳/۹۵ | ۱/۰۱۹۳±۰/۱۰۸٤ |
| خراسانی | ۰/۰۲۵۱ | ٦/۷۲ | ۱/۰٤٤۳±۰/۱۸۳۷ |
| بغدادی | ۰/۰۰٦۸ | ۱/۹۸ | ۱/۰۱۱۳±۰/۰۸۸٤ |

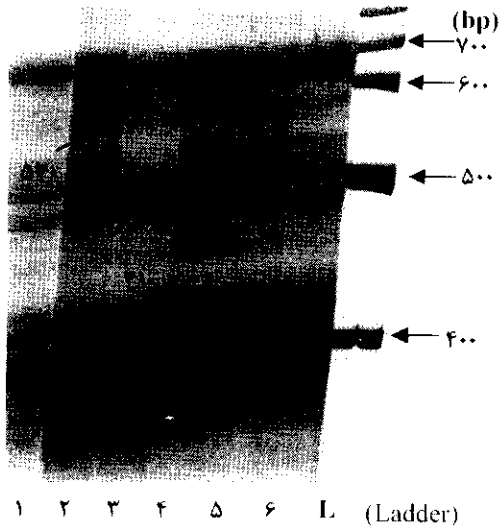
جدول ٦- فراوانی ژنی موجود در جمعیت‌ها.

| آغازگر | غالب (۱) | مغلوب (۰) |
|---|---|---|
| اول ($P_1$) | ۰ ۱۲۵ - ۰ ۹۷۷۱ | ۰ ۰۲۲۹ - ۰ ۰۸۷۵ |
| دوم ($P_2$) | ۰ ۱۲۵ - ۰ ۹۸۹۱ | ۰ ۰۱۰۹ - ۰ ۰۸۷۵ |
| سوم ($P_3$) | ۰ ۲۷۲۸ - ۰ ۰۹۶۸٤ | ۰ ۰۳۱٦ - ۰ ۷۲۷۲ |

همچنین برای هشت جمعیت مورد مقایسه به روش UPGMA دندروگرام رسم و گروه‌بندی انجام گرفت (شکل ۱).



شکل ۱- دندروگرام به‌دست آمده از روش UPGMA برای جمعیت‌های گره ابریشم با احتساب نابینی با استفاده از نشانگرهای ISSR




شکل ۲- الگوی به‌دست آمده از نشانگرهای ISSR در جمعیت ۳۲ فلش‌ها نشان‌دهنده برخی باندهای چندشکل و تک‌شکل می‌باشند.

## بحث

دو جمعیت بغدادی و ۱۱۰ در یک گروه قرار گرفتند که هر دو جمعیت از نظر سطح تولید نیز مشابه هستند. به‌طور کل جمعیت ۱۱۰ در مقایسه با دیگر جمعیت‌های چینی از تولید پایین‌تری برخوردار است. با توجه به وجود جاده ابریشم که از کشورهای شرق آسیا، ایران و اروپا می‌گذشت و عدم مانع برای ورود تخم‌های خارجی این حشره به ایران، همچنین پرورش سازمان نیافته این حشره قبل از سال‌های ۱۳۵۷-۱۳۵٦، نزدیک بودن این دو جمعیت بومی و چینی قابل توجیه می‌باشد. همانطور که در جدول ٦ مشاهده می‌شود در بین این هشت جمعیت، جمعیت‌های مذکور دارای کمترین فاصله ژنتیکی می‌باشند. پس از جمعیت بغدادی نزدیکترین جمعیت به جمعیت ۱۱۰، جمعیت ۳۲ می‌باشد که با توجه به یکی بودن منشا این دو جمعیت (چینی)، نزدیک بودن آنها قابل توجیه است. در رابطه با جمعیت صورتی مشاهده می‌شود که در شاخه‌ای مجزا و جدا از بقیه جمعیت‌های بومی قرار گرفته است که این مسأله قابل مقایسه با اختلاف قابل توجه این جمعیت از نظر برخی صفات تولیدی مانند درصد قشر ابریشمی که از معیارهای سنجش تولید هستند، با دیگر جمعیت‌های بومی می‌باشد (۱۹.۸ درصد در جمعیت صورتی در مقایسه با ۱۷.۳، ۱۵.٦، ۱۵.٤ و ۱۵.۱ درصد به‌ترتیب در جمعیتهای خراسانی، گیلانی، لیمویی و بغدادی).

همچنین دو جمعیت خراسانی و گیلانی با فاصله نزدیکی از هم قرار گرفته بودند که با توجه به خصوصیات مشترک آنها می‌توان فرض یکی بودن منشأ و یا اکوتیپ بودن آنها را مورد بررسی قرار داد. در این بین می‌توان به خوبی از نشانگر ISSR برای اثبات این فرضیه استفاده نمود. این روش به قدری حساس است که حتی می‌تواند دو فرد کاملاً شبیه به یکدیگر را از هم متمایز کند (ردی و همکاران، ۱۹۹۹). با توجه به مطالب گفته شده می‌توان با اطمینان از این نشانگر به‌عنوان ابزاری مناسب برای مطالعات بعدی در زمینه‌های مختلف علم

حشره‌شناسی از قبیل تشخیص گونه‌ها، نژادها، بیوتیپ‌های حشرات و مطالعات فیلوژنی بهره برد.

## سپاسگزاری

از آقایان دکتر جوار گودا ناگاراجو ( Javare Gowda Nagaraju) رئیس آزمایشگاه ژنتیک مولکولی بنگلور هندوستان و مهندس غلامی مسؤول بخش اصلاح مؤسسه تحقیقات و پرورش کرم ابریشم به دلیل همکاری‌های ایشان در مراحل نمونه‌برداری سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

1.Becker, J., and Heun, M. 1995. Polymorphism in multilocus markers. Plant molecular biology. 27: 835-845.

2.Kantety, R.V., Zeng, X., Bennetzen, J.L., and Zehr, B.E. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Mol. Breed. 1: 365–373.

3.Mita, K., Morimyo, M., Okano, K., Koike, Y., Nohata, J., Suzuki, M.G., and Shimada, T. 2002. Construction of an EST database for *Bombyx mori* and its applications. Current science. 83: 426-431.

4.Nagaraju, J.G., and Singh, L. 1997. Assessment of genetic diversity by DNA profiling and its significance in silkworm (*Bombyx mori)*. Electrophoresis. 18: 1676-1681.

5.Nagaraju, J.G., and Goldsmith, M.R. 2002. Silkworm genomics- progress and prospects. Current science. 83: 415-425.

6.Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283-292.

7.Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89: 583-590.

8.Reddy, K.D., Nagaraju, J., and Abraham, E.G. 1999. Genetic characterization of the silkworm *(Bombyx mori)* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. Heredity. 83: 681-687.

9.Suzuki, Y. Gage, L., and Brown, D.D. 1972. The genes for silk fibroin in *Bombyx mori*. J. Mol. Biol. 70: 637-649.

10.Salimath, S.S., de Oliveira, A.C., Godwin, I.D., and Bennetzen, J.L. 1995. Assessment of genomic origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. Genome. 38: 757–763.

11.Tazima, Y. 2001. Improvement of biological functions in the silkworm. Science publishers, Inc. Enfield, New Hampshire, United States of America. pp: 116.

12.Wolf, K., Zietkiewicz, E., and Hofstra, H. 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprinting patterns. Theor. Appl. Genet. 91: 439-447.

*J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(3), Aug - Sep 2005*
*www.magiran.com/jasnr*

# Comparison of China and Iranian native silkworm populations using ISSR markers

**Z. Ansari[1], A. Balvasi[2], J. Nozari[2] E. Bagheri-Zenouz[2] and Z. Mirhoseini[3]**
[1]Dept. of Animal Science, Mazandaran Univ, Sari, [2] Dept. of Agricultural Entomology, Tehran University, Karaj, [3]Dept. of Animal Science, Guilan University, Rasht, Iran

**Abstract**

Two groups of silkworm (*Bombyx mori*-L) contain China (32, 104 and 110) and Iranian native silkworms (Guilan orange, Khorasan orange, Khorasan lemon, Khorasan pink and Bagdadi) were geneticaly compared. In this comparison ISSR markers were used with three primers. DNA was extracted from sericigene glands by modified Suzuki method (phenol-chloroform method). A set of three 5'-anchored repeat primers amplified a total of 253 bands out of which %100 were polymorphic. Effective number of alleles average for total populations were 1.518 and genetic diversity average was 0.3194. A dendrogram was constructed using the UPGMA method. Maximum polymorphism was seen in 110 and minimum in lemon. Maximum unbiased genetic distance was between Gilani and 104 and minimum was between 110 and Baghdadi that were in one group. These results show that this marker is probably a useful tool for recognizing species, races, insect's biotype and phylogenetic studies.

***Keywords***: Silkworm; ISSR markers; China; Native; Comparison



سال دوازدهم، ویژه‌نامه علوم دامی (ضمیمه مرداد - شهریور ۱۳۸۴)