

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی خراسانی کرم ابریشم ایران (*Bombyx mori* L.) با استفاده از نشانگرهای ای اف ال پی (AFLP)

سید بنیامین دلیرصفت

کارشناس ارشد گروه پژوهشی کرم ابریشم، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان، صومعه سرا

bendalir@guilan.ac.ir

چکیده

در این تحقیق روابط ژنتیکی داخل و میان سه توده بومی کرم ابریشم ایران با استفاده از انگشت نگاری با نشانگرهای ای اف ال پی (AFLP) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از ۱۰ ترکیب آغازگری *PstI-TaqI* مجموعاً ۱۶۵ نشانگر ای اف ال پی حاوی اطلاعات مفید تولید و بررسی شدند. برآوردهای تنوع ژنتیکی (Nei) برای همه جایگاه‌های ژنی در جوامع انفرادی درجه نسبتاً بالایی از شباهت ژنتیکی داخل هر توده مورد مطالعه را نشان داد. بیشترین و کمترین تنوع ژنتیکی به ترتیب به توده‌های خراسان صورتی ($H=0/2066$) و خراسان لیمویی ($H=0/1819$) تعلق داشت. دندروگرام شده با استفاده از روش UPGMA منجر به تفکیک سه توده به دو خوشه عمده شد. توده‌های صورتی و لیمویی بیشترین و صورتی و پرتقالی کمترین شباهت ژنتیکی را داشتند. شباهت ژنتیکی برآورد شده داخل و میان توده‌های کرم ابریشم را می‌توان بر اساس تنجده، توزیع تاریخی و جغرافیایی توده‌ها و همچنین عواملی نظیر اندازه مؤثر جمعیت، میزان همخونی، شدت انتخاب، جهش و غیره تفسیر نمود.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، کرم ابریشم (*Bombyx mori* L.)، نشانگرهای ای اف ال پی (AFLP).

Study on Genetic diversity of Khorasan native silkworm (*Bombyx mori* L.) populations using AFLP markers

S.B Dalirvafat

Department of Sericulture, Faculty of Natural Resources, Univ. of Guilan

Summary

Genetic relationships within and among three Iranian native silkworm varieties including Khorasan lemon, Khorasan orange and Khorasan pink was determined by DNA fingerprinting using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. A total of 165 informative AFLP markers was generated and analyzed using ten *PstI/TaqI* primer combinations. Estimates of Nei's genetic diversity for all loci in individual populations showed a high degree of genetic similarity within each variety studied. The highest and lowest degree of genetic diversity was related to Khorasan Pink ($H=0.2066$) and Khorasan Lemon ($H=0.1819$) respectively. The dendrogram constructed using the UPGMA method resulted in the 3 varieties resolving into two major clusters. The highest and lowest degree of genetic similarity was related to Khorasan Pink and Khorasan Lemon varieties and Khorasan Pink and Khorasan Orange varieties respectively. The genetic similarity estimated within and among silkworms could be explained by the pedigrees, historical and geographical distribution of the varieties and some factors such as effective number of population, inbreeding rate, selection intensity, mutation and so on.

Keywords: Genetic diversity, Silkworm (*Bombyx mori* L.), AFLP Markers.

مقدمه

فعالیت‌های پرورش کرم ابریشم رایج، شامل دورگ‌گیری بین تعدادی از گروه‌های ممتاز، در حال افزودن واریته‌های جدید در هر سال می‌باشند. لازمه بکنواختی عملکرد آمیخته‌ها بکنواختی ژنتیکی آنها است که بستگی به خلوص لاینهای اصلی دارد. لذا باید با استفاده از روشهای دقیق از میزان خلوص ژنتیکی این لاینها که سالیان زیادی نیز در کشور ما بوده اند اطلاع حاصل نمود (میر حسینی، ۱۳۷۷). در حال حاضر در کرم ابریشم، صفات مورفولوژیکی برای شناسایی واریته‌ها استفاده می‌شوند. انتخاب سویه‌های والدی برای یک برنامه اصلاحی، مبتنی بر این خصوصیات است اما واریته‌های کرم ابریشم به ویژه آنهایی که از تلاقی واریته‌های زیادی به وجود آمده‌اند، با استفاده از خصوصیات رایج به طور واضح قابل شناسایی نیستند. بنا براین پیداست که استفاده از نشانگرهای مولکولی با تهیه پروفیل‌های دی ان ا اف ادر به حل این مشکل است. روش ای اف ال پی (AFLP) (تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر) به عنوان یک سیستم نشانگر مولکولی قابل اعتماد و کارآمد در مقایسه با آر اف ال پی (RFLP)، رپید (RAPD) یا ریزماهوره‌ها شناخته شده است. نشانگرهای ای اف ال پی به طور گسترده و موفقیت آمیزی در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی و حیوانی مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تنوع ژنتیکی مبتنی بر ای اف ال پی داخل سه جمعیت بومی کرم ابریشم ایران و برآورد روابط ژنتیکی میان آنها می‌باشد.

مواد و روشها

سه توده بومی کرم ابریشم ایران شامل خراسان لیمویی، خراسان پرتقالی و خراسان صورتی در مطالعه حاضر مورد آزمون قرار گرفتند. دی ان ای ژنومی از غده‌های ابریشمی لاروهای کرم ابریشم در روز سوم سن پنجم لاروی به روش فنل-

کلروفورم (ناگارجوو همکاران، ۱۹۹۵) با اندکی تغییرات استخراج شد. روش ای اف ال پی به همان ترتیب که توسط وس (Vos) و همکاران (وس و همکاران، ۱۹۹۵) شرح داده شده با تغییرات جزئی طی مراحل زیر انجام شد:

 مرحله اول - هضم DNA ژنومی (Digestion) با آنزیمهای محدودگر *TaqI* و *PstI*

 مرحله دوم - اتصال سازگارسازها (Adapters) به DNA هضم شده (Ligation)

 مرحله سوم - تکثیر مقدماتی (Pre-amplification) با آغازگرهای *PstI* و *TaqI* بدون نوکلئوتید اضافی در انتهای ۳'

 مرحله چهارم - تکثیر انتخابی (Selective Amplification) توسط ۱۰ ترکیب آغازگری با دو یا سه باز اضافی انتخابی در انتهای ۳' آنها.

محصولات پی سی آر (PCR) بر روی ژل پلی اکریل آمید و اسرشته ساز ۶٪ الکتروفورس شده به روش آشکارسازی با نیترات نقره رنگ آمیزی شد. به منظور امتیازدهی، نوارهای مشخص و واضح در محدوده ۱۰۰ bp تا ۱۰۰۰ bp مورد نظر قرار گرفتند. وجود این نوارها با یک (1) وعدم وجود این نوارها در هر مفر ژنی با صفر (0) امتیازدهی شدند. داده ها پس از ورود به نرم افزار اکسل (Excel) جهت تجزیه و تحلیل به نرم افزار پاپ ژن (POPGENE) منتقل شدند. تجزیه خوشه ای و دندروگرام مبتنی بر فاصله ژنتیکی نی (Nei) (نی، ۱۹۷۲ و ۱۹۷۳) با استفاده از الگوریتم (UPGMA) بر روی ماتریس تشابه بکمک نرم افزار پاپ ژن تشکیل شد.

نتایج

تجزیه ای اف ال پی ۹۳ فرد از سه جمعیت بومی کرم ابریشم ایران با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر مجموعاً ۲۹۸ نشانگر قابل امتیازدهی تولید کرد که ۱۶۵ نشانگر یعنی ۵۵/۳ درصد جنود شکل بودند. اطلاعات تهیه شده برای هر جفت آغازگر در جدول ۱ آورده شده اند. این جدول نشان می دهد که جفت آغازگرهای مختلف در آشکارسازی چند شکلی در داخل جوامع توانایی متفاوتی دارند. برآورد های تنوع ژنتیکی نی (Nei) (نی، ۱۹۷۸) برای همه جایگاه های ژنی در جوامع انفرادی بیشترین تنوع را در جمعیت خراسان صورتی ($H=0.71819$) و کمترین تنوع را در جمعیت خراسان لیمویی ($H=0.71819$) نشان داد.

به منظور محاسبه سطح تنوع ژنتیکی بین جوامع، از ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده شد. برآوردهای فواصل ژنتیکی با استفاده از اطلاعات ای اف ال پی در محدوده ۰/۳۱۰۰ برای نزدیکترین جوامع (خراسان لیمویی و خراسان صورتی) و ۰/۳۸۰۳ برای دورترین جوامع (خراسان صورتی و خراسان پرتقالی) قرار داشت. متوسط تعداد آلل های موثر در هر لوکوس برای کل جمعیتها و آغازگرها $0.72882 \pm 1/5989$ بود که با توجه به نزدیک بودن این عدد به تعداد آلل واقعی یعنی ۲ دلیل بر تاثیر خوب آللها در چند شکلی بالا و برآورد تنوع ژنتیکی می باشد. همچنین متوسط تنوع ژنی (درون جمعیت) بدست آمده (نی، ۱۹۷۳) برای کل جوامع و آغازگرها برابر ۰/۳۵۲ بود که دلیلی بر تنوع نسبتاً کم داخل جمعیتها می باشد.

بحث

سه جمعیت مورد مطالعه پس از رسم دندروگرام به روش UPGMA در دو گروه عمده قرار گرفتند (شکل ۱). گروه اول شامل توده های خراسان لیمویی و خراسان صورتی بود و توده خراسان پرتقالی در گروه دوم قرار گرفت. نحوه نگهداری این گروه ها می تواند پاسخ مناسبی برای توجیه فواصل نسبی ژنتیکی بین آنها باشد. در شرکت سهمی پرورش کرم ابریشم، در این سه توده در همان ابتدای پرورش انتخاب بر اساس رنگ صورت گرفته و سه گروه بطور مجزا پرورش داده می شدند. از طرف دیگر به علت عدم وجود امکانات کافی فقط تعداد بسیار کمی از پروانه های گروه های بومی انتخاب و برای انتقال به نسل بعد نگهداری میسوند بنابراین با توجه به پایین بودن اندازه موثر جمعیت و این واقعیت که هر پروانه ماده فقط با یک پروانه نر آمیزش می نماید و تمام فرزندان آنها برادر و خواهر تری خواهند بود، میزان همخونی در داخل هر یک از این گروه ها بشدت افزایش می یابد. در عین حال این امر موجب افتراق و تفاوت بیشتر این گروه ها از یکدیگر می شود (فالکونر، ۱۹۸۹). این نتیجه با نتایج بررسی های بعمل آمده قبلی با نشانگر های مورفولوژیکی، پروتئینی و RAPD (میرحسینی، ۱۳۷۷) و آی اس اس آر (ISSR) (بلواسی، ۱۳۸۲) همخوانی داشته و موید یکدیگر می باشند. همانطور که در دندروگرام حاصل ملاحظه می گردد توده خراسان پرتقالی در یک گروه کاملاً مجزا از دو توده دیگر قرار گرفته است. از آنجایی که در سالهای گذشته توده مشابه دیگری به نام کیلان پرتقالی در استان کیلان پرورش داده می شد لذا اگر وجه تسمیه هر یک از توده ها را منشأ جغرافیایی آنها بدانیم، تشابه ظاهری این توده با خراسان پرتقالی و نیز نزدیکی استانهای خراسان و کیلان احتمال منشأ مشترک آنها را منتفی نمی سازد. در دندروگرام حاصل از مطالعات قبلی (میرحسینی، ۱۳۷۷ و بلواسی، ۱۳۸۲) نیز توده خراسان پرتقالی به همراه توده کیلان پرتقالی در یک گروه قرار گرفته اند. با عنایت به اینکه در پرورش کرم ابریشم که شرایط محیطی یک عامل تعیین کننده می باشد، خصوصیات نظیر سازگاری با شرایط محیطی خصوصاً مقاومت به بیماریهای منطقه ای از اهمیت زیادی برخوردارند، لذا باید توده های بومی ایران را شناسایی نمود و راجع به خصوصیات و ویژگی های آنها اطلاعات جامعی بدست آورد تا در صورت لزوم از ژنهای بومی در لاینها و وارینه های وارداتی استفاده گردد. این امر موجب خواهد شد تا با توجه به تنوع زیاد شرایط اقلیمی در ایران ژنوتیپهای مناسب با هر شرایط آب و هوایی تولید و عرضه گردند.

مراجع مورد استفاده

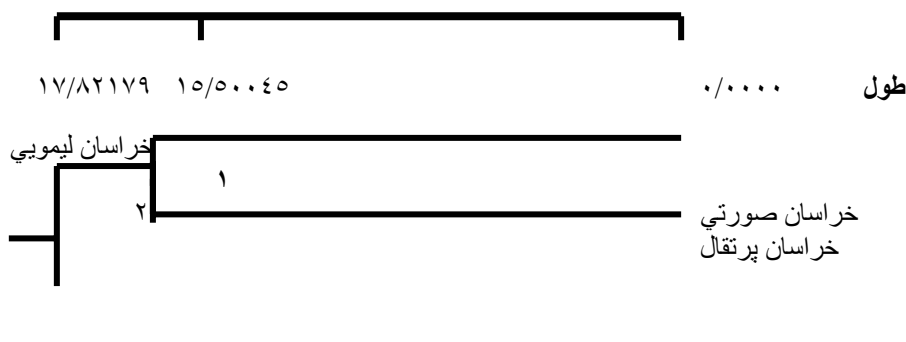
- بلواسی، آ، ۱۳۸۲. بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های کرم ابریشم ایران با استفاده از نشانگر های ریزماهوره. پایان نامه کارشناسی ارشد گروه حشره شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
- میرحسینی، س، ص، ۱۳۷۷. بررسی تنوع ژنتیکی کرم ابریشم ایران با استفاده از نشانگر های پروتئینی و DNA رساله دوره دکتری. دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.
- Falconer, D. S., 1989. Introduction to Quantitative Genetics (3rd ed). Longman, Scientific and Technical, New York.

¹ -Unweighted pair group method using arithmetic averages

- Nagaraju, J., A. Sharma, B. N. Sethuraman, G. V. Rao & L. Singh, 1995. DNA fingerprinting in silkworm *Bombyx mori* using banded krait minor satellite DNA- driven probe. *Electrophoresis* (16): 1639-1642.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between population. *Am Nat* (106): 283-292 .
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* (70): 3321-3323.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* (87):583-590.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. V. D. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* (23): 4407-4414.

جدول ۱- میانگین ارزشهای تنوع مشاهده شده با ده جفت آغازگر AFLP برای توده های کرم ابریشم (n=تعداد لوکوس های چند شکل؛ H=تنوع ژنتیکی؛ N=تعداد نمونه؛ KL=خراسان لیمویی؛ KO=خراسان پرتقالی؛ KP=خراسان صورتی؛ AOP=میانگین کل جمعیت ها)

جفت آغازگر / تعداد کل لوکوس ها													جمعیت ها
میانگین کل لوکوس ها		TAC/TC	AT/AG	TC/AC	AT/AC	AT/ATG	TG/AGA	TC/TC	TG/A T	TG/A AC	TA/T A	N	
H	n	H	n	H	n	H	n	H	n	H	n		
۱۷۸۱	۷۷	۲۰۷۶	۷	۱۳۱۱	۷	۱۱۷۰	۲	۲۱۳۱	۷	۱۷۷۱	۷	۲۲	KL
۱۷۸۱	۷۷	۲۰۷۶	۷	۱۳۱۱	۷	۱۱۷۰	۲	۲۱۳۱	۷	۱۷۷۱	۷	۲۲	KL
۳۳۰۲	۵۷	۱۲۸۴	۵	۱۷۷۸	۱۱	۱۳۳۳	۲	۲۱۳۱	۱۰	۱۰۰۸	۷	۲۰	KO
۳۳۰۲	۵۷	۱۲۸۴	۵	۱۷۷۸	۱۱	۱۳۳۳	۲	۲۱۳۱	۱۰	۱۰۰۸	۷	۲۰	KO
۱۱۰۲	۱۶۷	۱۱۳۰	۵	۷۱۳۸	۷	۱۷۷۸	۲	۱۵۳۸	۱۰	۸۳۸۸	۱۲	۲۰	KP
۱۱۰۲	۱۶۷	۱۱۳۰	۵	۷۱۳۸	۷	۱۷۷۸	۲	۱۵۳۸	۱۰	۸۳۸۸	۱۲	۲۰	KP
۱۰۸۳	۱۶۵	۲۱۳۳	۳	۱۳۱۳	۳	۳۷۷۳	۵	۱۷۷۳	۱۱	۳۷۷۳	۱۷	۱۷	AOP
۱۰۸۳	۱۶۵	۲۱۳۳	۳	۱۳۱۳	۳	۳۷۷۳	۵	۱۷۷۳	۱۱	۳۷۷۳	۱۷	۱۷	AOP



شکل ۱-دندروگرام بدست آمده از روش UPGMA برای جمعیت های کرم ابریشم با استفاده از نشانگرهای AFLP

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله