ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱
صفحه ۳۵-۲۵

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفت درصد قشر پیله در کرم ابریشم (*Bombyx mori* L.) به‌کمک نشانگرهای AFLP

سیدضیاءالدین میرحسینی[۱]، علیرضا بیژن‌نیا[۲]، بابک ربیعی[۳]، محمد تائب[٤]، علیرضا صیداوی*[٥]، پیام پتکی[٦]

۱ و ۳- دانشیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

۲- استادیار مرکز تحقیقات کرم ابریشم کشور، رشت

٤- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

٥- استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت

٦- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alirezaseidavi@iaurasht.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۲٤ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

روش انتخاب به کمک نشانگرهای DNA، به دلیل حذف شرایط محیطی، روش مطمئنی در فرآیند اصلاح‌نژادی از طریق تهیه‌ی نقشه پیوستگی و تعیین مکان(های) ژنی مؤثر در کنترل صفات کمی است. این روش در کرم ابریشم توت به‌جهت داشتن صفات تولیدی-اقتصادی که عمدتاً از گروه صفات کمی چند ژنی است، می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در پژوهش حاضر، جهت تعیین مکان(های) ژنی مؤثر بر درصد قشر پیله به کمک نشانگرهای AFLP، از ۲۰ ترکیب آغازگری انتخاب شده از بین ۸۱ ترکیب آغازگری *TaqI*/ *PstI* در سطح سه جمعیت F_2 به‌ترتیب شامل ۳۳، ۳٦ و ۳٤ پروانه‌ی حاصل از تلاقی سه جفت والدین از لاین‌های خالص، بومی لیموئی خراسان (به‌عنوان پایه مادری) با چینی ۱۰۷ (به‌عنوان پایه پدری) استفاده شد. با استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم و هضم آن‌ها به کمک آنزیم‌های برشی *TaqI* و *PstI* و اتصال سازگارسازهای مناسب به قطعات DNA هضم شده نسبت به تکثیر انتخابی تمامی نمونه‌های DNA به کمک هر یک از ترکیبات آغازگری انتخابی اقدام گردید. نمونه‌های تکثیر شده به ژل پلی‌اکریلامید واسرشته‌ساز ٦ درصد منتقل و پس از تعیین ژنوتیپ افراد، نقشه‌های پیوستگی در هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه از طریق تشکیل ماتریس (تعداد نتاج نسل دوم از هر خانواده × تعداد باندهای چندشکلی ظاهر شده) به‌کمک نرم‌افزارهای Map manager/QTX و Cartographer *ver.2.5* ترسیم و در نهایت تعداد مکان‌های احتمالی کنترل‌کننده صفت مورد مطالعه در روش تجزیه و تحلیل مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب در سطح حداقل آستانه نسبت درست‌نمایی LTR>13، به‌ترتیب ٤، ۲ و ٥ عدد با اثرات تحت غالبیت (مغلوب) تا فوق غالبیت شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی

**کرم ابریشم،
مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب،
نشانگر،
نقشه‌ی پیوستگی،
AFLP.**

مقدمه

کرم‌ابریشم توت با اهمیت‌ترین موجود زنده اقتصادی در صنعت نوغانداری جهت تولید ابریشم طبیعی است (Qeyasi 1995)، به‌طوری‌که امروزه بیش از ۹۵ درصد ابریشم طبیعی در دنیا از پرورش این حشره به‌دست می‌آید (Collard et al. 2005).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.4.9]

ابریشم به عنوان ماده اولیه در تولید محصولاتی مانند فرش، پارچه، پیراهن، شال گردن، آویزهای دیواری و تزئینات داخلی منزل همچنین در ساخت چترنجات، تودوزی لاستیک، رگ‌های خونی مصنوعی، نخ‌جراحی، ساخت ادوات نظامی و مواد عایق الکتریکی و برخی ملزومات دیگر نیز استفاده می‌گردد. به‌علاوه این موجود در انجام تحقیقات بنیادی و کاربردی از جمله مطالعات ژنومی، تهیه و دست‌یابی به نقشه‌های پیوستگی بر پایه‌ی نشانگرهای مورفولوژیکی(He et al. 2001) و مولکولی مختلف (Seidavi et al. 2008) کاربردهای قابل توجه‌ای دارد. اکنون بقای این صنعت در گرو افزایش بازدهی کمی و کیفی محصول ابریشم و نیز تنوع‌بخشی به محصولات خروجی از این صنعت می‌باشد. افزایش راندمان تولید ابریشم به عنوان محصول اصلی این صنعت، مستلزم به‌کارگیری روش‌های علمی پرورش(فراهم ساختن شرایط استاندارد به لحاظ تأمین تغذیه‌ی مناسب، شرایط محیطی دما، رطوبت و نور مناسب، رعایت نکات بهداشتی و غیره) از یک سو و استفاده از دانش ژنتیک و اصلاح‌نژادی به‌منظور تجمیع حداکثری عوامل ژنتیکی مطلوب در نژاد(های) کرم‌ابریشم توت تجاری، از سوی دیگر است (Jananshir 1996). تا کنون جهت دست‌یابی به ارقام تجاری پر تولید از استراتژی‌های مختلف انتخاب والدین (Eagles et al. 2001) بر مبنای مقدار صفات مختلف یا از طریق برآورد شاخص(های) انتخاب (Li et al. 2001) و کنترل میزان شدت انتخاب و سپس اجرای تلاقی‌های لازم بین لاین‌های اصلاح‌شده همه ساله استفاده می‌شود (Javadi 2007).

از آن‌جا که بسیاری از ژنوتیپ‌های این حشره علی‌رغم داشتن خصوصیات ژنتیکی منحصر به فرد دارای فنوتیپ‌های مشابه‌ای بوده و یا ژنوتیپ‌های مشابه تحت شرایط اکولوژیکی مختلف فنوتیپ‌های مختلفی را بروز می‌دهند. وجود چنین تشابهات و تفاوت‌هایی، موجبات ایجاد مشکلاتی برای اصلاح‌گران کرم‌ابریشم می‌گردد (Okogbenin et al. 2008). استفاده از نشانگرهای ملکولی راه‌حل مناسبی برای تفکیک نژادهای مختلف کرم‌ابریشم به‌منظور برآورد تنوع ژنتیکی موجود و انتخاب والدین مناسب برای تولید دورگه‌های پرتولید است (Promboon et al. 1995). امروزه از این نشانگرها در شناسایی روابط فیلوژنتیکی موجودات، انتخاب به کمک نشانگر، شناسایی مکان(های) ژنی صفات کمّی، تهیه‌ی نقشه‌های پیوستگی و کلون کردن ژن‌های مفید استفاده می‌گردد (Promboon et al. 1995). صفات مهم اقتصادی نظیر وزن پیله[1]، وزن قشر پیله[2]، درصد قشر پیله[3]، طول و ضخامت نخ ابریشم، باروری[4] و مقاومت[5] به باسیلوویروس‌ها در کرم‌ابریشم از صفات کمی محسوب شده به‌عبارتی تحت کنترل تعداد زیادی ژن با اثرات کوچک و نیز شرایط محیطی می‌باشند. شناسایی این مکان‌ها با بهره‌گیری از روش(های) دقیق چون نشانگرهای ملکولی مناسب که دارای پیوستگی نزدیک با صفت یا صفات مورد نظر باشند جهت دست‌یابی به اطلاعات مورد نیاز، کاهش خطرپذیری انتخاب و جلوگیری از هدر رفتن سرمایه و زمان در اصلاح‌نژاد این حشره مفید خواهد بود. به‌طوری‌که امروزه اصلاح‌نژاد ملکولی یک موفقیت بزرگ در این موجود (Sima et al. 2006) همچون سایر موجودات گیاهی و جانوری به شمار می‌رود (Ghanipoor et al. 2006). به‌طوری‌که امروزه تعداد زیادی از مراکز اصلاح‌نژاد گیاهی و جانوری وجود چنین ظرفیتی را برای توسعه‌ی نشانگرها و انتخاب به کمک نشانگرها پذیرفته (Huys et al. 2006) و به‌دنبال آن نیز روش‌های تجزیه و تحلیل جهت جستجوی مکان‌های ژنی احتمالی صفات کمی را توسعه داده شده‌اند. در حال حاضر روش‌های تجزیه‌ی تک‌نشانگری[6]، مکان‌یابی فاصله‌ای[7]، مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب[8] و مکان‌یابی فاصله‌ای چندگانه[9] متداول و نرم‌افزارهای مختلفی بدان منظور ارائه گردیده‌اند (Doira 1992). کرم‌ابریشم توت به‌عنوان یک منبع اقتصادی مهم برای حدود ۳۰ میلیون خانوار کشاورز در سرتاسر جهان (ESCAP 1993) و نیز با کاربردهای متنوع در بخش‌های داروسازی (Tomita et al. 2003)، کشاورزی (Nagaraja and Nagaraju 1997)، پزشکی و صنعت (Yuji 1998)، دیری نیست که بررسی ژنومی آن با استفاده از

[1] Cocoon Weight(C.W.)
[2] Cocoon Shell Weight(C.S.W.)
[3] Cocoon Shell Percentage(C.S.P.)
[4] Fertility
[5] Resistance
[6] Simple Marker Analysis(SMA)
[7] Interval Mapping(IM)
[8] Composite Interval Mapping(CIM)
[9] Multiple Interval Mapping(MIM)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.4.9]

نشانگرهای ملکولی مختلف آغاز شده است. به‌طوری‌که در سال ۲۰۰۱ نقشه‌ی پیوستگی ملکولی نسبتاً متراکمی با استفاده از نشانگرهای راپید و قطعات تکثیر شده انتخابی[1] از ژنوم این حشره حشره ترسیم گردید (Mackill et al. 1996). در همین سال با استفاده از نشانگرهای AFLP و ترکیباتی از ۳۵ آغازگر نقشه‌ی پیوستگی دیگری ارائه شد که متشکل از ۱۲٤۸ نشانگر ملکولی بود. از این مقدار ۳٥٦ نشانگر در ۳۰ گروه پیوستگی بودند و هر گروه پیوستگی نیز شامل ٤ تا ۳٦ نشانگر می‌شدند. کل طول نقشه‌ی پیوستگی به‌دست آمده ٦٥۱۲ سانتی‌مورگان با میانگین فاصله‌ی ۱۸/۲ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر بود. با این حال به‌دلیل طول بالای نقشه‌ی پیوستگی به دست‌آمده این نقشه از تراکم بالایی برخوردار نبود (Tan et al. 2001). جهت تعیین مکان(های) ژنی کنترل‌کننده هر صفت کمی (QTLs) نیاز به اجرای دو مرحله می‌باشد: الف) تهیه نقشه پیوستگی[2] ب) تجزیه و تحلیل مکان(های) ژنی کنترل‌کننده صفت کمی[3] درصد قشر پیله. ترسیم نقشه پیوستگی نقطه آغاز مطالعات ملکولی در ژنوم موجودات زنده می‌باشد. نقشه پیوستگی چارچوب یا زمینه مناسبی را برای تعیین مکان(های) ژنی کنترل‌کننده صفت کمی فراهم می‌کند. این چارچوب به کمک تشکیل ماتریس بین داده‌های ژنوتیپی و داده‌های کمی مربوط به آن صفت کمی اندازه‌گیری شده در بین افراد والدین و افراد نسل دوم به کمک نرم‌افزار مناسب به دست می‌آید. در تهیه چنین نقشه‌هایی نیاز به اجرای سه مرحله کار می‌باشد (Goldsmith 1991): ۱- تهیه جمعیت تفرق، ۲- تعیین چندشکلی، و ۳- تجزیه‌وتحلیل نقشه پیوستگی بین نشانگرها. درباره تهیه جمعیت تفرق باید گفت که بدون توجه به روش تلاقی مورد استفاده جهت تهیه جمعیت تفرق، والدین انتخاب شده باید دارای تفاوت قابل‌توجه‌ای به لحاظ صفت یا صفات مورد بررسی باشند. در این حالت جمعیت تفرق فراهم شده شامل افراد با ترکیب ژنتیکی والدینی و ژنوتیپ‌های نوترکیب است. میزان فراوانی ژنوتیپ‌های نوترکیب مبنای محاسبه فواصل ژنتیکی بین نشانگرها و ترتیب آن‌ها در هر گروه پیوستگی است. اصلاح‌نژاد کرم‌ابریشم بدین روش، هنوز در مراحل اولیه راه خود است، چون تشکیل نقشه‌ی پیوستگی اشباع (با تراکم بالا) در کار اصلاح‌نژاد ملکولی چه در تئوری و چه درعمل بسیار مهم می‌باشد. چنین نقشه‌های پیوستگی شامل مکان‌های بیشتری از ژن‌های صفات کمی است که در فرآیند انتخاب به کمک نشانگر مدل خوبی را ارائه خواهند داد (Sima et al. 2006). لذا با توجه به این‌که روش نشانگری اِی‌اِف‌اِل‌پی قادر به تولید چندشکلی‌های بیشتری است تحقیق حاضر با هدف شناسایی نشانگرهای AFLP پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفت درصد قشر پیله با استفاده از جمعیت تفرق نسل دوم و به واسطه‌ی تهیه‌ی نقشه‌ی پیوستگی و تعیین مکان(های) ژنی احتمالی کنترل‌کننده این صفات به کمک روش تجزیه و تحلیل مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب انجام شد.

مواد و روش‌ها

در بررسی حاضر از سه جمعیت نسل دوم حاصل از تلاقی بین سه جفت پروانه‌های ماده در پروانه‌های نر (به‌ترتیب از نژادهای بومی لیمویی خراسان و لاین ژاپنی ۱۰۷ دارای تفاوت فنوتیپی معنی‌دار) به منظور تعیین تعداد بیشتری از مکان‌های ژنی احتمالی کنترل‌کننده صفت درصد قشر پیله و مقایسه اثر جمعیت در نتایج مکان‌یابی ژنی استفاده گردید (جدول ۲). از نرم‌افزار SPSS برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها استفاده شد. بدین‌ترتیب سه جمعیت F_1 حاصل از این والدین به جهت داشتن بیشترین و کم‌ترین مقادیر فنوتیپی صفات مورد مطالعه، قادر به تولید نتاج نسل دوم با حداکثر تنوع ممکن برای تجزیه و تحلیل‌های لازم خواهند بود (Doira 1992; Baird et al. 1996). پس از انجام سه دوره پرورش تخم‌نوغان والدینی، نسل اول و نسل دوم، به دلیل عدم وقوع کراسینگ‌اور در ماده‌ها تنها پروانه‌های نر جمع‌آوری و در سردخانه (۲۰°C-) تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند.

استخراج DNA

برای هر پروانه نر به‌طور جداگانه و به روش فنل - کلروفرم انجام شد (Nagaraja and Nagaraju 1995). هر نمونه DNA به‌دست آمده در ۵۰ میکرولیتر بافر، TE (Tris-HCl EDTA 1mM pH 8) 10 mM به‌خوبی حل و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. نهایتاً این تیوب‌ها به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده، منتقل گردیدند. نمونه‌های DNA

[1] Selective Amplification DNA Fragment (SADF)
[2] Linkage map
[3] QTL analysis

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.4.9]

ژنومی استخراجی به کمک روش اسپکتروفتومتری تعیین غلظت شدند.

تعیین ژنوتیپ[1]

سپس تمامی نمونه‌های DNA استخراجی به غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه و تمامی افراد نسل دوم، نسل اول و والدین با استفاده از نشانگرهای AFLP و مطابق با روش Vos et al. (1995) البته با اندک تغییرات طی چهار مرحله زیر تعیین ژنوتیپ شدند

مرحله هضم DNA ژنومی

مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه‌ی DNA رقیق شده، توسط آنزیم‌های برشی *Pst*I (شش‌بازبر) و *Taq*I (چهاربازبر) جهت تولید قطعات چندشکل هضم آنزیمی شدند. در مرحله گیرش یا اتصال سازگارسازهای دو رشته‌ای به انتهاهای چسبنده از سازگارسازهای P_{ad} = *Pst*I و T_{ad}= *Taq*I استفاده شد. در مرحله گسترش یا مرحله‌ی تکثیر مقدماتی، از آغازگرهای *Taq*I و*Pst*I بدون نوکلئوتید اضافی در انتهای ′۳ استفاده شد.

تکثیر انتخابی[2]

در این مرحله نمونه‌های DNA استخراجی که مرحله گسترش را پشت‌سر گذاشته‌اند، بعد از افزودن مخلوط شامل آغازگرهای اختصاصی (طراحی شده بر اساس توالی سازگارسازها و توالی ناحیه برش آنزیم‌های برشی) مورد نظر که منبع تولید چندشکلی‌ها و تعیین نشانگر در سطح ژنوم بوده (جدول ۱)، تحت سیکل دمایی طی فرآیند واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شدند. در این روش جهت محدود کردن قطعات تکثیر شونده، از افزودن نوکلئوتیدهای انتخابی در انتهای ′۳ آغازگرها مطابق جدول شماره ۱ استفاده گردید.

مشاهده چندشکلی‌ها

محصول مرحله چهارم به دست آمده با هر جفت آغازگر اختصاصی مورد استفاده، ابتدا با استفاده از ژل آکریل آمید ٦ درصد در دستگاه الکتروفورز عمودی GT nucleic acid Sequi-Gen_Sequencing cell-BioRad مدل ۳۰۰۰PV بارگذاری و الکتروفورز نموده و بعد از اتمام این مرحله ژل رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره را به کمک دستگاه اسکنر GS-800 Calibrated Densitometer و نرم‌افزار مربوطه در رایانه مشاهده و از آن تصاویر لازم در فرمت JPG تهیه گردید.

تجزیه و تحلیل نقشه پیوستگی بین نشانگرها

اطلاعات ژنوتیپی به دست آمده به کمک ۲۰ جفت نشانگر اِی‌اِف‌اِل‌پی که باندهای چندشکل و قابل‌قبولی را در بین والدین لیمویی خراسان و لاین ۱۰۷ نشان دادند، جهت تهیه نقشه پیوستگی بر مبنای وجود و عدم وجود باند (به‌ترتیب با اعداد یک

[1] Genotyping
[2] Selection

جدول ۱- ترکیبات آغازگری مورد استفاده در مرحله تکثیر انتخابی و نحوه‌ی نام‌گذاری هر ترکیب

آغازگر / نام ترکیب	آغازگرهای *Taq*I	آغازگرهای *Pst*I
TP01	5′-GATGAGTCCTGAGCGAAGC	5′-GACGGCCGTCATGCAGAT
TP02	5′-GATGAGTCCTGAGCGAAGC	5′-GACGGCCGTCATGCAGAAC
TP03	5′-GATGAGTCCTGAGCGAACA	5′-GACGGCCGTCATGCAGAT
TP04	5′-GATGAGTCCTGAGCGAAAT	5′-GACGGCCGTCATGCAGAT
TP05	5′-GATGAGTCCTGAGCGAAAG	5′-GACGGCCGTCATGCAGAGA
TP06	5′-GATGAGTCCTGAGCGAAAG	5′-GACGGCCGTCATGCAGAC
TP07	5′-GATGAGTCCTGAGCGAACA	5′-GACGGCCGTCATGCAGAAG
TP08	5′-GATGAGTCCTGAGCGATG	5′-GACGGCCGTCATGCAGAAC
TP09	5′-GATGAGTCCTGAGCGATC	5′-GACGGCCGTCATGCAGAAC
TP10	5′-GATGAGTCCTGAGCGAAT	5′-GACGGCCGTCATGCAGAAC
TP11	5′-GATGAGTCCTGAGCGAACA	5′-GACGGCCGTCATGCAGTC
TP12	5′-GATGAGTCCTGAGCGATG	5′-GACGGCCGTCATGCAGTAT
TP13	5′-GATGAGTCCTGAGCGATAC	5′-GACGGCCGTCATGCAGTAT
TP14	5′-GATGAGTCCTGAGCGATA	5′-GACGGCCGTCATGCAGTAT
TP15	5′-GATGAGTCCTGAGCGAAGC	5′-GACGGCCGTCATGCAGTAT
TP16	5′-GATGAGTCCTGAGCGAAAG	5′-GACGGCCGTCATGCAGTAT
TP17	5′-GATGAGTCCTGAGCGAACA	5′-GACGGCCGTCATGCAGTA
TP18	5′-GATGAGTCCTGAGCGAAAG	5′-GACGGCCGTCATGCAGTA
TP19	5′-GATGAGTCCTGAGCGAAGC	5′-GACGGCCGTCATGCAGATG
TP20	5′-GATGAGTCCTGAGCGAACA	5′-GACGGCCGTCATGCAGATG

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.4.9]

و صفر) نمره‌گذاری و سپس جهت استفاده در نرم‌افزارهای Map Manager/QTX و Cartographer *ver.2.5* به کدهای A، B، C و D تبدیل، تا نرم‌افزارها با تشکیل ماتریس این داده‌های ژنوتیپی، مقادیر نوترکیبی بین نشانگرها و فواصل نقشه (سانتی‌مورگان) به کمک تابع کوزامبی را مشخص تا نقشه پیوستگی ترسیم گردد (Nagaraju and Singh 1997; Manly and Olson, 1999). نقشه‌های پیوستگی با تعیین ژنوتیپ افراد نسل دوم از هر جمعیت مورد مطالعه و تشکیل ماتریس داده‌های ژنوتیپی به ابعاد تعداد نتاج نسل دوم (۳۳، ۳٤ و ۳٦ نفر)× تعداد باندهای چندشکلی ظاهر شده (۱٤۲، ۱۷۱ و ۱۷۸ باند چند شکل) به کمک نرم‌افزار مربوطه ترسیم شدند.

تجزیه و تحلیل مکان(های) ژنی کنترل‌کننده صفت درصد قشر پیله در تعیین مکان(های) ژنی احتمالی کنترل‌کننده صفات کمی مورد مطالعه نرم‌افزار Cartographer ver.2.5 با بررسی ارتباط بین ارزش‌های فنوتیپی رکوردگیری شده با ارزش‌های ژنوتیپی حاصل از نشانگرها و تعیین توزیع فنوتیپی هر صفت در جمعیت با اجرای آزمون‌های t-student و رگرسیون خطی ساده وجود پیوستگی بین نشانگر با مکان(های) احتمالی کنترل‌کننده هر صفت تعیین شد. جهت تعیین مکان(های) ژنی احتمالی کنترل‌کننده صفت مورد بررسی به کمک روش نشانگری اِی‌اِف‌اِل‌پی که در مقایسه با سایر روش‌های نشانگری دارای مزیت استفاده آسانتر، آشکارسازی بیشتر مکان‌های ژنی، قدرت تفکیک و پوشش سطح بیشتری از ژنوم می‌باشد (Vos et al. 1995)، از باندهای چندشکل و تعیین ژنوتیپ افراد جمعیت تفرق به کمک آن‌ها و ترسیم نقشه پیوستگی استفاده شد.

روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب

در این روش با استفاده از آزمون‌های رگرسیونی خطی پیچیده وجود پیوستگی بین نشانگر با مکان(های) احتمالی کنترل‌کننده هر صفت به صورت نمره لگاریتم تابع درست‌نمایی[1](LOD) و آزمون نسبت درست نمایی[2](LRT) بررسی می‌شوند. این مقادیر بیشترین احتمال وجود مکان(های) ژنی صفات کمی را نسبت به عدم وجود آن‌ها در بین هر دو نشانگر نشان خواهد داد. در ضمن نوع و میزان اثرات هر یک از مکان(های) احتمالی در سطح آستانه لگاریتم نسبت درست‌نمایی نیز در این روش محاسبه می‌شوند. تهیه لاین‌ها و اجرای تلاقی‌ها و مراحل پرورش جهت تهیه منبع استخراج DNA در مرکز تحقیقات کرم‌ابریشم کشور و نیز اجرای مراحل آزمایشگاهی تحقیق در پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال کشور واقع در رشت انجام گرفت.

[1] LOD
[2] LRT

نتایج و بحث

محاسبه و مقایسه میانگین ارزش‌های فنوتیپی صفات وزن پیله، وزن قشر پیله و درصد قشر پیله در هر یک از والدین و نتاج نسل اول و نسل دوم، نشان داد که مقادیر میانگین‌های این صفات بین والد ماده لیمویی خراسان (با مقادیر فنوتیپی پایین‌تر) و والد نر ۱۰۷ (با مقادیر فنوتیپی بیشتر) دارای تفاوت معنی‌دار بودند ($P<۰/۰۱$). محاسبه واریانس‌های فنوتیپی نیز نشان‌دهنده وجود واریانس بیشتر در جمعیت نسل دوم به دلیل بروز تفرق ژنی و نیز وجود واریانس کمتر در جمعیت‌های نسل والدینی و نسل اول به‌ترتیب به دلیل خلوص بالای آن‌ها در نتیجه انتخاب و نیز به جهت هتروزیگوت بودن تمامی آن‌هاست. محاسبه واریانس‌های محیطی، ژنتیکی و نیز وراثت‌پذیری عام که به ترتیب با استفاده از محاسبه میانگین واریانس موجود در بین افراد نسل والدینی خالص[3]، محاسبه تفاوت بین کل واریانس موجود در بین افراد نسل دوم با میانگین نسل والدینی و در نهایت از نسبت بین واریانس ژنتیکی موجود در افراد نسل دوم به کل واریانس موجود در بین افراد نسل دوم به دست آمدند، دلالت بر سهم بیشتر عوامل ژنتیکی در بروز صفت مورد بررسی نسبت به شرایط محیطی داشت (جدول ۳). به‌طوری‌که از بین تعداد کل ۹۳۰، ۹٤٤ و ۸۱۰ باند قابل مشاهده به‌ترتیب برای هر یک از جمعیت‌های سه‌گانه مورد بررسی تعداد ۱٤۲(۱۵/۲۷ درصد)، ۱۷۱(۱۸/۱۱ درصد) و ۱۷۸(۲۱/۹۷ درصد) باند چندشکل بودند. کلیه‌ی نتاج نسل دوم از هر خانواده به لحاظ این تعداد باند چندشکل تعیین ژنوتیپ شدند. از بین تعداد باندهای چندشکل به دست آمده، به ترتیب تعداد ٦٦، ۸۱ و ٤۰ باند چندشکل مربوط به والد ماده (از لاین

[3] با توجه به این که نسل والدینی P1 و P2 لاین‌های خالص‌اند، تغییرات موجود در آن‌ها تنها منشأ محیطی دارد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.4.9]

بومی لیمویی خراسان) و تعداد ۷۶، ۹۰ و ۱۳۸ باند چندشکلی متعلق به والد نر (از لاین۱۰۷) بود. در مجموع میانگین تعداد باندهای چندشکل ظاهر شده به ازای هر جفت آغازگر انتخابی مورد استفاده در هر جمعیت به‌ترتیب۷/۱۰، ۸/۵۵ و ۸/۹ نشانگر بودند. نقشه پیوستگی هر جمعیت به ترتیب شامل تعداد ۱۶، ۱۸ و ۲۴ گروه پیوستگی بودند. کل طول نقشه‌ی پیوستگی حاصل به‌ترتیب ۲۱۸۶/۴۰، ۲۵۸۲/۵۰ و ۲۳۹۲/۶۰ سانتی‌مورگان و متوسط فاصله‌ی بین هر دو نشانگر در گروهای پیوستگی نیز ۱۸/۳۷، ۱۶/۴۵ و ۱۴/۹۵ سانتی‌مورگان تعیین شدند.

مکان‌یابی ژن(های) کنترل‌کننده صفت مورد بررسی به روش فاصله‌ای مرکب

در مجموع تعداد ۱۱ مکان ژنی مختلف (QTL) شناسایی شد. این تعداد مکان تعیین شده بدون استثناء حاوی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده برای صفت درصد قشر پیله بودند(جدول۴). برای صفت درصد قشر پیله در هر یک از جمعیت‌های نسل دوم مورد مطالعه به‌ترتیب تعداد ۴، ۲ و ۵ مکان ژنی در سطح آستانه حداقل نسبت لگاریتم درست‌نمایی بالاتر از ۱۳ به دست آمد. این تعداد مکان‌های ژنی در هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه به‌ترتیب در گروه‌های پیوستگی ۱، ۹، ۱۳، ۱۱، ۱۲ و ۳، ۹، ۲۱ قرار داشتند. با توجه به مقادیر **h** (۳۰) از جدول ۴، تعداد ۵ مکان ژنی تعیین شده برای صفت مورد بررسی دارای اثر تحت غالبیت (**h**<۰)، تعداد یک مکان ژنی نیز دارای اثر غالبیت نسبی (**h**=۰/۸۱-۱/۲۰) و ۵ مکان ژنی مشخص شده دیگر دارای اثر فوق غالبیت(**h**>۱/۲۰) هستند. مقدار R^2 هر یک از مکان‌های ژنی (QTLs) احتمالی به دست آمده برای صفت درصد قشر پیله در هر یک از جمعیت‌های سه‌گانه مورد پژوهش (جدول ۴)، بیانگر میزان درصد تأثیر هر یک از QTLها بر تنوع فنوتیپی از صفت مورد نظر در سطح هر یک از جمعیت‌هاست. به‌گونه‌ای که به ترتیب مقدار ۲/۱۶-۱/۲۵ درصد، ۱۲/۷۵-۲/۶۳ درصد و ۵۱/۸۶-۱۹/۳۱ درصد از تنوع فنوتیپی مورد مشاهده در هر یک از جمعیت‌ها تحت‌تأثیر مکان‌های ژنی به‌دست آمده از آن جمعیت می‌باشند.

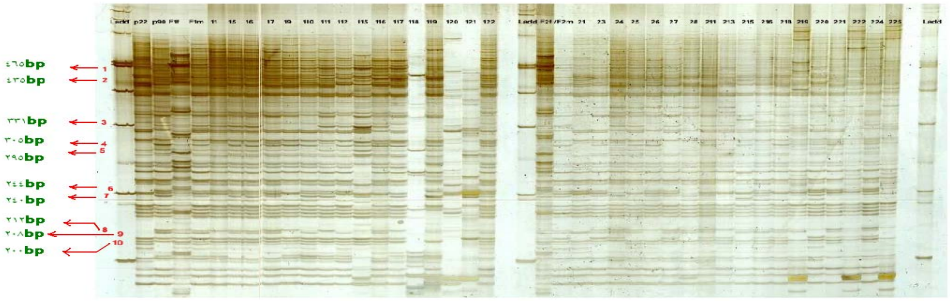
جدول ۲- میانگین ارزش‌های فنوتیپی صفات مورد بررسی در والدین و افراد نسل اول و نسل‌دوم

صفت	والدین			F_1	F_2	تفاوت بین والدین (t-value)
	لاین ۱۰۷	لیمویی خراسانی	میانگین والدین			
درصدقشرپیله(*S.C.P.*)	۲۲/۲۳ ± ۰/۰۲	۱۵/۲۳±۰/۰۲	۱۸/۷۳±۰/۰۲	۱۸/۰۸۹±۳/۸۷۷	۱۷/۵۴±۱/۹۵	*۴۱/۹۹۹

* اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۳- واریانس فنوتیپی، واریانش ژنتیکی، وراثت‌پذیری عمومی صفات مورد بررسی در کرم‌ابریشم توت

صفت	واریانس فنوتیپی				واریانس محیطی(VP)	واریانس ژنتیکی(VG)	وراثت‌پذیری (H۲)
	لاین لیمویی خراسان	لاین ۱۰۷	نسل اول(F1)	نسل دوم(F2)			
درصدقشرپیله(S.C.P.)	۰/۰۸۵۴	۰/۵۲۷۶	۰/۲۵۸۱	۱/۷۷۴۸	۰/۱۸۶	۵۷/۶۴	۰/۹۹۷



شکل ۱- بخشی از الکتروفورز محصول PCR مربوط به آغازگرTP18(TAAG- PTA) بر روی ژل پلی‌آکریل آمید ۶ درصد. نوارهای چند شکل با علامت پیکان مشخص شده‌اند. در این تصویر .Ladd نشان دهنده شاخص اندازه (Ladder=size marker) با نام PUC8، P نشان‌دهنده افراد والد (Parental) که به ترتیب از چپ به راست والد مادهی لیمویی خراسان (که در این تصویرP22) و نر ۱۰۷ (که در این تصویرP90) است، F نیز نشان‌دهنده افراد نسل اول که به‌ترتیب از چپ به راست F_1f و F_2f والدین نسل اول ماده، F_1m و F_2m والدین نسل اول نر می‌باشند. سایر اعداد نیز نشان‌دهنده نتاج نسل دوم حاصل از هر جفت از والدین نسل اول می‌باشند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.4.9]

جدول ٤- مکان‌های ژنی شناسایی شده برای صفت درصد قشر پیله در کرم‌ابریشم به روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب با حداقل LRT>13

صفت	گروه پیوستگی	نزدیک‌ترین نشانگر به QTL از سمت چپ*	نشانگرهای مجاور	QTL	نسبت درست‌نمایی (LRT)	اثر افزایشی (H1:a)	اثر غالبیت (H2:d)	h[a]	R^2
			جمعیت اول						
	۱	۱	TP10/170-TP08/395	CSP 1/1	۱۴/۲۷	۰/۲۴۷۰	-۱/۷۴۷۸	-۷/۰۷۶۱	۰/۰۱۳۰
	۱	۲	TP08/395-TP10/163	CSP 1/2	۱۵/۰۹	۰/۲۵۱۷	-۲/۲۱۷۸	-۸/۸۱۱۲	۰/۰۱۴۶
	۹	۴۱	TP15/182-TP20/570	CSP 9/41	۱۳/۳۷	-۰/۲۴۵۱	۰/۹۷۷۲	-۳/۹۸۶۹	۰/۰۱۲۵
	۱۳	۲	TP20/222-TP12/154	CSP 13/2	۱۸/۲۵	۰/۳۲۸۹	۱/۸۹۳۱	۵/۷۵۵۸	۰/۰۲۱۶
			جمعیت دوم						
درصد قشر پیله	۱۱	۷	TP01/181-TP07/280	CSP 11/7	۲۰/۶۲	۰/۲۹۵۶	۱/۲۸۳۶	۴/۳۴۲۳	۰/۰۲۶۳
	۱۲	۶	TP13/125-TP12/183	CSP 12/6	۲۷/۰۵	۰/۶۷۵۶	۱/۷۱۲۷	۲/۵۳۵۱	۰/۱۲۷۵
			جمعیت سوم						
	۳	۵	TP07/225-TP03/248	CSP 3/5	۲۵/۳۳	۱/۰۷۲۸	-۱/۰۱۸۹	-۰/۹۴۹۷	۰/۲۸۹۷
	۳	۶	TP03/248-TP07/205	CSP 3/6	۲۵/۶۸	۱/۱۳۹۳	-۰/۹۳۲۸	-۰/۸۱۸۷	۰/۳۰۰۵
	۹	۱	TP18/240-TP10/311	CSP 9/1	۲۳/۴۵	-۰/۸۰۲۸	-۱/۱۹۸۰	۱/۴۹۲۲	۰/۱۹۳۱
	۲۱	۳	TP17/295-TP17/110	CSP 21/3	۲۶/۰۱	-۱/۳۹۸۷	-۱/۳۳۹۴	۰/۹۵۷۶	۰/۵۱۸۶
	۲۱	۴	TP17/110-TP18/350	CSP 21/4	۲۶/۶۳	-۱/۱۸۹۶	-۱/۳۰۵۴	۱/۰۹۷۳	۰/۴۹۵۱

*نزدیک‌ترین نشانگر به مکان ژنی کنترل‌کننده صفت کمی مورد نظر از ابتدای گروه پیوستگی

h: نسبت اثرات غالبیت به افزایشی است. اگر h<0 باشد اثر تحت غالبیت یا مغلوب، اگر h=0-0.2 باشد اثر افزایشی، اگر h=0.21-0.80 باشد اثر غالبیت نسبی، اگر h=0.81-1.2 باشد اثر غالبیت و اگر h>1.2 باشد اثر فوق غالبیت می‌باشد (Stuber et al. 19871).

در بررسی حاضر که مبتنی بر شناسایی چندشکلی‌ها در یک جمعیت نسل دوم با استفاده از روش نشانگری اِی‌اِف‌اِل‌پی است، اولاً داشتن جمعیت نسل دوم دارای تفرق مناسب ضروری است. به‌همین دلیل نژادهای والدینی مورد استفاده مطابق با نتایج برخی پژوهش‌ها که روی نژادهای والدینی یکسان انجام شده، مناسب بوده است (Baird et al. 1996; Dalirsefat et al. 2009) زیرا والدین انتخابی دارای تفاوت معنی‌دار به لحاظ خصوصیات مورد بررسی بودند (جدول ۲). ثانیاً صفت انتخابی مورد مطالعه باید بیشتر تحت‌تأثیر عوامل ژنتیکی باشند نه محیطی که با توجه به محاسبه میزان توارث‌پذیری عام (بیش از ۸۰ درصد) برای صفت مورد مطالعه، این‌گونه بودند. کرم‌ابریشم از گونه‌هایی است که در جنس ماده آن تبادل کروموزومی انجام نمی‌شود. از آن‌جایی‌که هر دو گروه نشانگرهای ملکولی غالب و مغلوب به کمک نشانگرهای AFLP و رپید جهت ترسیم نقشه پیوستگی استفاده می‌شوند لذا نشانگرهایی که دارای پیوستگی هستند، دافع هم خواهند بود. چون نشانگرهای مغلوب دوبل در افراد جمعیت نسل دوم نشان داده نمی‌شوند لذا محاسبه صحیح موقعیت مکانی‌شان در هر گروه پیوستگی مشکل خواهد بود (Sima et al. 2006). برای رفع این نقیصه Promboon et al. (1995) در ترسیم نقشه پیوستگی، تقسیم داده‌ها به دو گروه، یکی شامل تمامی نشانگرهای چندشکل جنس ماده و دیگری شامل تمامی نشانگرهای چندشکل جنس نر را پیشنهاد کرد. که این بهترین روش جهت اصلاح عدم وقوع کراسینگ‌اور در افراد ماده خواهد بود. با علم به این موضوع در پژوهش حاضر تنها از پروانه‌های جنس نر نسل والدینی و نسل اول و دوم استفاده شده‌اند. درصد میانگین چندشکلی‌های ظاهر شده نسبت به میانگین تعداد کل باندهای قابل مشاهده در جمعیت‌های نسل دوم مورد مطالعه به‌ترتیب ۱۵/۲۷، ۱۸/۱۱ و ۲۱/۹۷ درصد بود. مقدار آن در بررسی انجام شده توسط Javadi (2007) ۱۹/۰۸٦ درصد، در گزارش Mirhosseini et al. (2009) ۲٤/۱٤ درصد، در گزارش Tan et al. (2004) ٦۱ درصد بوده

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.4.9]

است. تفاوت در میزان چندشکلی ظاهر شده می‌تواند در ارتباط با نوع و تعداد جفت نشانگرها (Vos et al. 1995)، لاین‌های مورد استفاده، نوع جمعیت تفرق (Tan et al. 2001) باشد. استفاده از نشانگرهای اِی‌اِف‌اِل‌پی نیز ابزاری جهت آشکار کردن سطوح بالایی از چندشکلی‌هاست (Manly and Olson 1999). با استفاده از ۲۰ جفت آغازگر AFLP مورد استفاده در این پژوهش(جدول ۱)، میانگین تعداد باندهای چندشکل مشاهده شده به ازای هر جفت نشانگر در هر یک از جمعیت‌های نسل دوم مورد مطالعه به‌ترتیب۷/۱۰، ۸/۵۵ و ۸/۹ باند بوده است. این مقدار نزدیک به میانگین اعلام شده در کرم‌ابریشم توسط Javadi (2007) ۱۰/۱٤، Dalirsefat at al. (2009) ۹/۲ و نیز به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کمتر از میانگین اعلام شده توسط Tan et al. (2001) به میزان ۳۵/۷ و Lu and Xiang (2005) به میزان ۳٦/٤ بود. این تشابه و تفاوت مشاهده شده در پارامترهای اندازه‌گیری شده فوق می‌تواند به ترتیب به یکسان بودن لاین‌های والدینی کرم‌ابریشم و ترکیبات آغازگری مورد استفاده و نیز متفاوت بودن آن‌ها در پژوهش‌های مربوطه نسبت داد. اندازه نشانگرهای چندشکل به دست آمده بین ۹۵ تا ۵۹۵ جفت باز بودند که در ارتباط مستقیم با آنزیم‌های برشی مورد استفاده است. بنابراین با توجه به نوع این آنزیم‌ها نتایج متفاوت خواهد شد. تعداد گروه‌های پیوستگی به دست آمده به ترتیب در هر یک از جمعیت‌های سه‌گانه نسل دوم ۱٦، ۱۸ و ۲٤ گروه(شامل ۱٤۲، ۱۷۱ و ۱۷۸ نشانگر) بودند. Javadi et al. (2007) تعداد ٦ گروه پیوستگی، Dalirsefat at al. (2009) تعداد ۲٤ گروه پیوستگی(۳)، Tan et al. (2001) تعداد ۳۰ گروه پیوستگی، Lu and Xiang (2005) تعداد ۱۹ گروه پیوستگی با استفاده از نشانگرهای اِی‌اِف‌اِل‌پی و نیز Goldsmith (1991) با استفاده از٦۰ نشانگر آر‌اِف‌اِل‌پی، تعداد ۲۳ گروه پیوستگی، Yuji (1998) نیز به کمک نشانگرهای رَپید تعداد ۲۸ گروه پیوستگی و در جدیدترین نقشه پیوستگی ژنتیکی توسط Yamamoto et al. (2006) با استفاده از ۵۳٤ نشانگر اِس‌اِن‌پی تعداد ۲۸ گروه ارائه گردیده است. البته تاکنون بر اساس نتایج تعدادی دیگر از تحقیقات انجام شده به کمک روش‌های مختلف نشانگری تعداد گروه‌های پیوستگی متفاوتی برای نقشه‌ی پیوستگی نیز ارائه شده‌اند (Goldsmith 2002; Miao et al. 2005; Nagaraju and Nguu et al. 2005; Gaviria et al. 2006). علت اختلاف در تعداد گروه‌های پیوستگی را می‌توان به تعداد و نوع نشانگرها، روش نشانگری مورد استفاده به لحاظ توان تولید سطحی از چندشکلی‌ها، نوع جمعیت تفرق مورد استفاده، میزان چندشکلی حاصل مرتبط دانست. کل طول نقشه پیوستگی و متوسط فاصله بین نشانگرها در نقشه‌های پیوستگی به دست آمده برای هر یک از جمعیت‌های نسل دوم مورد بررسی در این تحقیق به‌ترتیب بیش از ۲۳۹۰ و پایین‌تر از ۱۵ سانتی مورگان بوده است. اما این مقادیر برای نقشه پیوستگی ارائه شده توسط Javadi (2007) به ترتیب ۱۹۱۸/۷ و ۲۷/۰۲۳٤ سانتی مورگان، Mirhosseini et al. (2009) نیز به‌ترتیب ۳٤٦٦/۹ و ۱۸/۹٤ سانتی‌مورگان بود. تفاوت در طول نقشه پیوستگی را که علی‌رغم تشابه نژادهای والدینی، نوع جمعیت تفرق، روش نشانگری مورد استفاده، آنزیم‌های برشی و نوع ترکیب آغازگری مورد استفاده، مشاهده شده را می‌توان به تعداد افراد جمعیت تفرق، تعداد جفت ترکیب آغازگری مورد استفاده و میزان چندشکلی‌های حاصل که خود به دلیل تفاوت احتمالی موجود در شرایط مراحل آزمایشگاهی و نیز تفاوت در ترکیب ژنومی جمعیت تفرق نسل دوم و چگونگی تلاقی مورد استفاده بین دو لاین والدینی (مستقیم یا معکوس) یا به‌عبارتی با استراتژی تلاقی و سوش‌های مورد استفاده می‌توان مرتبط دانست. هر چه وضعیت نشانگرها در نقشه پیوستگی از تراکم بالایی برخوردار باشند، طول نقشه کمتر و بلعکس خواهد بود. میانگین فاصله بین نشانگرها در گروه‌های پیوستگی از نقشه‌های پیوستگی اولیه به کمتر از ۲۰ سانتی‌مورگان نمی‌رسید (Sima et al. 2006). جهت شناسایی محل ژن(های) اصلی یا ماژور، میانگین فاصله نشانگرها باید کمتر از ۲۰ سانتی‌مورگان باشد. برای تعیین مکان ژن کنترل کننده یک صفت کمی در ژنوم باید نقشه‌پیوستگی با میانگین فواصل نشانگری کمتر از ۱۰ سانتی‌مورگان تهیه شود. تعداد نشانگرها در پیوستگی‌های به دست آمده از سه خانواده جمعیت نسل دوم مورد مطالعه بین ۲ تا ٤٤ نشانگر متغیر بودند. که بدین لحاظ نیز با نقشه‌های پیوستگی ارائه شده از سوی محققین دیگر نیز تفاوت دارد. تفاوت موجود را نیز می‌توان به نوع و تعداد نشانگرها، روش نشانگری مورد استفاده، تعداد افراد جمعیت تفرق و غیره نسبت داد. تعداد

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.4.9]

مکان‌های ژنی که در خصوص صفت درصد قشر پیله به کمک روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب به دست آمد، نشان از تفاوت در تعداد این مکان‌های ژنی احتمالی کنترل‌کننده صفت یاد شده در مقایسه با نتایج دیگران دارد. چه آن‌هایی که از روش نشانگری، نژادهای والدینی و جمعیت تفرق مشابه استفاده کرده‌اند همانند Javadi (2007) که برای صفت درصد قشر پیله تعداد سه مکان ژنی را بر اساس روش تجزیه‌وتحلیل فاصله‌ای مرکب که دو تا در گروه پیوستگی اول و دیگری در گروه پیوستگی دوم قرار داشتند($csp_{1\text{-}2a}$، $csp_{1\text{-}2b}$، $csp_{2\text{-}2}$)، ارائه دادند و Dalirsefat at al. (2009)، Mirhosseini et al. (2009) که به ترتیب تعداد ۲۵ و ۸ مکان ژنی بر اساس این روش ارائه دادند. تفاوت موجود را می‌توان به تعداد متفاوت جفت نشانگرهای مورد استفاده، تعداد افراد جمعیت تفرق، تعداد چندشکلی‌های حاصل، احتمال عدم یکسان بودن شرایط آزمایشگاهی فراهم شده برای مراحل استخراج DNA، پی‌سی‌آر و سایر مراحل، عدم ترکیب ژنتیکی یکسان جمعیت تفرق علی‌رغم یکسان بودن روش تهیه آن که به طریق جمعیت نسل دوم بوده (جمعیت‌های نسل دوم هیچ‌گاه از یک جمعیت نسل دوم به جمعیت نسل دوم دیگر که هر دو از جفت لاین‌های والدینی مشابه مشتق شده، کاملاً یکسان نبوده خصوصاً آن‌که در پژوهش حاضر از جمعیت تفرق نسل دوم حاصل از تلاقی معکوس استفاده شده است)، انتخاب آستانه نسبت درست‌نمایی متفاوت، استفاده از تلاقی‌های مختلف مستقیم یا معکوس و غیره می‌تواند از عوامل ایجاد کننده تفاوت در نتایج مربوط به تعداد مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفت مورد نظر باشد. در مجموع مکان‌های ژنی احتمالی کنترل‌کننده صفت درصد قشر پیله به دست آمده در این پژوهش به‌ترتیب توصیف‌کننده ٦/١٧، ١٥/٣٨ و ١٧٩/٧ درصد تنوع فنوتیپی می‌باشند. بقیه تنوع موجود در جمعیت‌های اول و دوم به لحاظ صفت درصد قشر پیله توسط این مکان‌های ژنی توصیف‌پذیر نبوده بلکه ممکن است تحت اثر جایگاه(های) ژنی احتمالی دیگر و یا نتیجه اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط باشد(Rabiei, 2003). اما وجود تنوع زیاد در بین افراد جمعیت سوم را که تحت تأثیر مکان‌های ژنی(QTLs) احتمالی به دست آمده می‌باشند، می‌توان به اثرات افزایشی بین این مکان‌های ژنی و یا بروز خطا نسبت داد. تفاوت در تعداد QTLها و مکان هر یک از آن‌ها در گروه‌های پیوستگی که بر مبنای داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی گردآوری شده از هر یک از جمعیت‌های سه‌گانه نسل دوم (جدول ٤) را می‌توان به تفاوت موجود در محتوای ژنی بین جمعیت‌ها که خود می‌تواند به دلایلی چون، تفاوت در محتوای ژنتیکی افراد والدینی (نژاد خراسانی و ١٠٧)، وقوع کراسینگ‌اور و نیز وجود ساختارهای ژنومی جابه‌جاشونده یا ترانسپوزوم‌ها باشد، نسبت داد(Tan et al. 2001). تا کنون پروژه‌هایی نیز با اهداف شناسایی نشانگرهای ملکولی پیوسته با صفات تولید ابریشم جهت توسعه روش‌های نشانگری برای مقاصد انتخاب و نیز همسانه‌سازی موضعی توسط محققین دیگر با جمعیت‌های مشتق از لاین‌های والدینی دیگر و جمعیت‌های تفرق مشابه و غیرمشابه نیز انجام شده است. در همین راستا Lu and Xiang (2005) با استفاده از روش AFLP و جمعیت تفرق حاصل از تلاقی‌های برگشتی جهت تعیین مکان‌های ژنی احتمالی کنترل‌کننده صفات وزن پیله، وزن قشر پیله، وزن شفیره، تعداد دو مکان ژنی برای صفت وزن پیله در گروه پیوستگی ٦ و ١٩، سه مکان ژنی برای وزن قشر پیله در گروه پیوستگی ٣، ١٤ و ١٩، سه مکان ژنی برای صفت درصد قشر پیله در گروه پیوستگی ٢،١١ و ١٥ شناسایی کردند. با تمام این اوصاف به‌کارگیری روش ملکولی در اصلاح‌نژاد کرم‌ابریشم در ابتدای راه خود می‌باشد. زیرا ارائه نقشه‌های پیوستگی متراکم‌تر (با تعداد بیشتر نشانگر چندشکل) در این زمینه چه به لحاظ استنباطات تئوریک و چه عملی به‌نژادی، بسیار دارای اهمیت می‌باشد. تهیه چنین نقشه‌هایی امکان تشخیص مکان‌های ژنی احتمالی بیشتری از صفات مهم تولیدی را که وجودشان در نقشه‌های ژنتیکی پیشین گزارش نشده را فراهم کرده که می‌توانند در فرآیندهای مختلف انتقال ژن و انتخاب به کمک نشانگر بسیار مهم باشند (Sima et al. 2006). در این میان روش اِی‌اِف‌اِل‌پی چون دارای تکرارپذیری بالاست لذا نقشه پیوستگی حاصل از آن‌ها ابزار با ارزش جهت مطالعه ژنتیکی در کرم‌ابریشم جهت تعیین نشانگرهای خاص برای تشخیص سوش‌های خاص جهت جستجوی تغییرات در فراوانی آللی و تجزیه و تحلیل مکان(های) ژنی صفات کمی – اقتصادی مهم خواهد بود. تجزیه و تحلیل داده‌های نشانگری با داده‌های فنوتیپی مربوط به صفت درصد قشر پیله از طریق بررسی همبستگی بین

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.4.9]

این دو گروه از داده‌ها، وجود نشانگرهای پیوسته‌ای را برای صفت مورد بررسی در این پژوهش آشکار کرد. این نتایج هم‌چون نتایج بسیاری دیگر از تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که لزوماً پیله‌ای با وزن بالاتر دارای درصد قشر بالاتری نیست. زیرا این خصوصیات توسط ژن‌های مختلف کنترل می‌گردند. با توجه به اهمیت این صفت به عنوان صفت تولیدی مهم در ارزیابی میزان تولید در صنعت نوغانداری، از این نشانگرهای پیوسته با آن‌ها می‌توان در برنامه‌های اصلاح‌نژادی و در فرآیند انتخاب به کمک نشانگر استفاده کرد.

منابع

Baird WV, Ballard RE, Rajapakse S, Abbott AG (1996) Progress in Prunus mapping and application of molecular markers to germplasm improvement. Horticulture Science. 31: 1099-1106.

Collard BC, Jahufer Y, Brouwer JB, Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica. 142: 169-196.

Dalirsefat SB, Mirhosseini SZ, Rabiei B, Potki P (2009) Interval mapping of QTLs controlling economical traits of silkworm cocoon. 6th Biotechnology congress. Tehran, Iran. (In Farsi).

Doira H (1992) Linkage Maps and List of Genetical Stocks Maintained in Kyushu University (Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Fukuoka, Japan).

Eagles H, Bariana H, Ogbonnaya F, Rebetzke G, Hollamby G, Henry R, Henschke P, Carter M (2001) Implementation of markers in Australian wheat breeding. Australian Journal of Agricultural Research. 52: 1349-1356.

ESCAP (1993) Principle and techniques of silkworm breeding. 114pp. New York, United Nations.

Gaviria DA, Aguilar E, Serrano HJ, Alegria AH (2006) DNA fingerprinting using AFLP markers to search for markers associated with yield attributes in the silkworm, Bombyx mori. Journal of Insect Science. 6: 1-10.

Ghanipoor M, Mirhosseini SZ, Shdparvar A, Seidavi AR, Bizhnnia AR (2006) Comparison of different selection indices for genetic improvement of economic traits in silkworm, (*Bombyx mori* L.) Lines. Sericologia. 46(2), 137-143.

Goldsmith MR (1991) The Bombyx mori genome-mapping project, Sericologia. 31: 145-155.

He NJ, Lu C, Li B, Zhou ZY, Xiang ZH (2001) The construction of linkage map of Bombyx mori by combination of SADF and RAPD. Acta Entomologia Sinica. 44(4): 476-482.

Huys G, Coopman R, Janssen P, Kersters K (1996) High resolution genotypic analysis of genus aeromonas by AFLP finger-printing. International Journal of Systematic Bacteriology. 46: 31-37.

Javadi SA (2007) Determination of QTLs controlling cocoon shell percentage in silkworm. MSc thesis. University og Guilan. (In Farsi).

Javanshir K (1996) Mulberry for Silk and silks without mulberry. University of Tehran Press. 513pp. (In Farsi).

Li M, Yao Q, Hou C, Cheng L, Chen K (2001) Studies on RAPD markers linked to the densonucleosis refractoriness gene, nsd-Z, in the silkworm, Bombyx mori. Sericologia. 41: 409-415.

Lu C, Li B, Xiang Z (2005) QTL mapping of economically important traits in silkworm (Bombyx mori). Yi Chuan. 27(3): 372-376.

Mackill DJ, Zhng Z, Redona ED, Colowit PM (1996) Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome. 39: 969-977.

Manly KF, Olson JM (1999) Overwive of QTL mapping software and introduction to map manager QTL. Mammalian Genome. 10: 327-334.

Miao XX, Xu SJ, Lia MH, Lia MW, Huang JH, Dai FY, Marino SW, Mills DR, Zeng P, Mita K, Jia SH, Zhng Y, Liu WB, Xiang H, Guo QH, Xu AY, Kong XY, Lin HX, Shi YZ, Lu G, Zhng X, Huang W, Yasukochi Y, Sugasaki T, Shimada T, Nagaraju J, Xiang ZH, Wang SY, Goldsmith MR, Lu C, Zho GP, Huang YP (2005) Simple sequence repeat-based consensus linkage map of Bombyx mori. PNAS. 102: 16303-16308.

Mirhosseini SZ, Rabiei B, Potki P, Dalirsefat SB (2009) Preparation of QTL map of silkworm cocoon weight and cocoon shell weight traits using combined interval mapping. 2nd Agricultural Biotechnology Congress. Shahid bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. (In Farsi).

Nagaraja GM, Nagaraju J (1995) Genome fingerprinting in silkworm Bombyx mori, using random arbitrary primers. Electrophoresis, 16: 1633-1638.

Nagaraju IG, Singh L (1997) Assessment of genetic diversity by DNA profiling and its sighnificance in silkworm, Bombyx mori, Electrophoresis. 18: 1676-1681.

Nagaraju J, Goldsmith MR (2002) Silkworm Bombyx mori, Electrophoresis. 18: 1676-1681.

Nguu EK, Kadono-Okuda K, Mase K, Kosegawa E, Hra W 2005. Molecular linkage map for the silkworm, Bombyx mori, based on restriction fragment lenghth polymorphism of cDNA colones. Journal of insect Biotechnology and Sericology. 74: 5-13.

Okogbenin E, Marin J, Fregene M (2008) QTL analysis for early yield in a pseudo F2 population of cassava. African Journal of Biotechnology. 7(2): 131-138.

Promboon A, Shimada T, Fujiwara H, Kobayashi M (1995) Linkage map of RAPDs in the silkworm, Bombyx mori, Genetics Reserch of Cambridge. 66: 1-7.

Qeyasi H (1995) necessity of banks investment in silkworm rearing and related industries. 1st silk seminar. pp58-64. (In Farsi).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.4.9]

rabiei, B (2003) Analysis of QTLs controlling seed traits in Iranian rice races. PhD thesis, University of Tabriz. (In Farsi).
Seidavi AR, Mirhosseini SZ, Ghanipoor M, Bizhannia AR (2008) Comparison of application effects of six different selection strategies in silkworm Japanese line. Proceedings of the 3rd Congress on Animal Science. 15-16 October 2008. Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, Page 246. (In Farsi).
Sima YH, Li B, Chen DX, Sun DB, Zho AC, Zhng L, Lu C, He SM, Xiang ZH (2006) Construction and analysis of an AFLP molecular linkage map of the silkworm (Bombyx mori). Chinese Journal of Agricultural Biotechnology. 3(1): 25-31.
Stuber CW, Edwards MD, Wendel JF (1987) Molecular markers facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. Crop Science. 27: 639-648.
Tan YD, Wan C, Zhu Y, Lu C, Xiang Z, Deng HW (2001) An amplified fragment length polymorphism map of silkworm. Genetics. 157: 1277-1284.
Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hyashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K (2003) Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. Natural Botechnology. 21: 52-56.
Vos P, Hogers R, Bleeker M (1995) AFLP a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23: 4407-4414.
Yamamoto K, Narukawa J, Kadono-Okuda K, Nohta J, Sasanuma M, Suetsugu Y, Banno Y, Fujii H, Goldsmith MR, Mita K (2006) Construction of a Single Nucleotide Polymorphism Linkage Map for the Silkworm, Bombyx mori, Based on Bacterial Artificial Chromosome End Sequences, Genetics Society of America. 173: 151-161.
Yuji Y (1998) A dense genetic map of the silkworm, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. Genetics. 150: 1513-1525.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.1.4.9]