

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفت درصد قشر پيله در کرم ابریشم

AFLP (*Bombyx mori* L.) به کمک نشانگرهای

سیدضیاءالدین میرحسینی^۱، علیرضا بیژن‌نیا^۲، بابک ربیعی^۳، محمد تائب^۴، علیرضا
صیداوی^{۵*}، پیام پتکی^۶

۱ و ۳- دانشیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

۲- استادیار مرکز تحقیقات کرم ابریشم کشور، رشت

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

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

۶- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت

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

(تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

روش انتخاب به کمک نشانگرهای DNA، به دلیل حذف شرایط محیطی، روش مطمئنی در فرآیند اصلاح‌نژادی از طریق تهیه نقشه پیوستگی و تعیین مکان(های) ژنی مؤثر در کنترل صفات کمی است. این روش در کرم ابریشم توت به جهت 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 پيله به کمک نشانگرهای AFLP، از ۲۰ ترکیب آغازگری انتخاب شده از بین ۸۱ ترکیب آغازگری *TaqI/PstI* در سطح سه جمعیت F_2 به ترتیب شامل ۳۳، ۳۶ و ۳۴ 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 سازگارهای 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 ۶ درصد منتقل و پس از تعیین ژنوتیپ افراد، نقشه‌های پیوستگی در هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه از طریق تشکیل ماتریس (تعداد نژاد نسل دوم از هر خانواده × تعداد باندهای چندشکلی ظاهر شده) به کمک نرم‌افزارهای *Map manager/QTXT* 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 $LTR>13$ ، به ترتیب ۴، ۲ و ۵ عدد با اثرات تحت غالبیت (مغلوب) تا فوق غالبیت شناسایی شدند.

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).

واژه‌های کلیدی

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

ابريشم به عنوان ماده اوليه در توليد محصولاتي مانند فرش، پارچه، پيراهن، شال گردن، آويزهاي ديواري و تزئينات داخلي منزل همچنين در ساخت چترنجات، تودوزي لاستيک، رگ‌هاي خوني مصنوعي، نخ جراحی، ساخت ادوات نظامي و مواد عايق الکتریکي و برخي ملزومات ديگر نيز استفاده مي‌گردد. به‌علاوه اين موجود در انجام تحقيقات بنيادي و کاربردي از جمله مطالعات ژنومي، تهيه و دست‌يابي به نقشه‌هاي پيوستگي بر پايه‌ي نشانگرهاي مورفولوژيکي (He et al. 2001) و مولکولي مختلف (Seidavi et al. 2008) کاربردهاي قابل توجه‌اي دارد. اکنون بقاي اين صنعت در گرو افزايش بازدهي کمي و کيفي محصول ابريشم و نيز تنوع‌بخشي به محصولات خروجي از اين صنعت مي‌باشد. افزايش راندمان توليد ابريشم به عنوان محصول اصلي اين صنعت، مستلزم به‌کارگيري روش‌هاي علمي پرورش (فراهم ساختن شرايط استاندارد به لحاظ تأمين تغذيه‌ي مناسب، شرايط محيطي دما، رطوبت و نور مناسب، رعايت نکات بهداشتي و غيره) از یک سو و استفاده از دانش ژنتيک و اصلاح‌نژادي به‌منظور تجمع حداکثري عوامل ژنتيکي مطلوب در نژاد(هاي) کرم‌ابريشم توت تجاري، از سوي ديگر است (Jananshir 1996). تا کنون جهت دست‌يابي به ارقام تجاري پر توليد از استراتژي‌هاي مختلف انتخاب والدين (Eagles et al. 2001) بر مبناي مقدار صفات مختلف يا از طريق برآورد شاخص(هاي) انتخاب (Li et al. 2001) و کنترل ميزان شدت انتخاب و سپس اجرائي تلاقي‌هاي لازم بين لاین‌هاي اصلاح‌شده همه ساله استفاده مي‌شود (Javadi 2007).

از آن‌جا که بسياري از ژنوتیپ‌هاي اين حشره علي‌رغم داشتن خصوصيات ژنتيکي منحصر به فرد داراي فنوتیپ‌هاي مشابه‌اي بوده و يا ژنوتیپ‌هاي مشابه تحت شرايط اکولوژيکي مختلف فنوتیپ‌هاي مختلفی را بروز مي‌دهند. وجود چنين تشابهات و تفاوت‌هاي، موجبات ايجاد مشکلاتي براي اصلاح‌گران کرم‌ابريشم مي‌گردد (Okogbenin et al. 2008). استفاده از نشانگرهاي ملکولي راه‌حل مناسبی براي تفکيک نژادهاي مختلف کرم‌ابريشم به‌منظور برآورد تنوع ژنتيکي موجود و انتخاب والدين مناسب براي توليد دوره‌هاي پرتوليد است (Promboon et al. 1995). امروزه از اين نشانگرها در شناسايي روابط فيلوژنتيکي

موجودات، انتخاب به کمک نشانگر، شناسايي مکان(هاي) ژني صفات کمي، تهيه‌ي نقشه‌هاي پيوستگي و کلون کردن ژن‌هاي مفيد استفاده مي‌گردد (Promboon et al. 1995). صفات مهم اقتصادي نظير وزن پيله^۱، وزن قشر پيله^۲، درصد قشر پيله^۳، طول و ضخامت نخ ابريشم، باروري^۴ و مقاومت^۵ به باسيلوويروس‌ها در کرم‌ابريشم از صفات کمي محسوب شده به‌عبارتي تحت کنترل تعداد زيادي ژن با اثرات کوچک و نيز شرايط محيطي مي‌باشند. شناسايي اين مکان‌ها با بهره‌گيري از روش(هاي) دقيق چون نشانگرهاي ملکولي مناسب که داراي پيوستگي نزديک با صفت يا صفات مورد نظر باشند جهت دست‌يابي به اطلاعات مورد نياز، کاهش خطرپذيري انتخاب و جلوگيري از هدر رفتن سرمايه و زمان در اصلاح‌نژاد اين حشره مفيد خواهد بود. به‌طوري‌که امروزه اصلاح‌نژاد ملکولي یک موفقيت بزرگ در اين موجود (Sima et al. 2006) همچون ساير موجودات گياهي و جانوري به شمار مي‌رود (Ghanipoor et al. 2006). به‌طوري‌که امروزه تعداد زيادي از مراکز اصلاح‌نژاد گياهي و جانوري وجود چنين ظرفيتي را براي توسعه‌ي نشانگرها و انتخاب به کمک نشانگرها پذيرفته (Huys et al. 2006) و به‌دنبال آن نيز روش‌هاي تجزيه و تحليل جهت جستجوي مکان‌هاي ژني احتمالي صفات کمي را توسعه داده شده‌اند. در حال حاضر روش‌هاي تجزيه‌ي تک‌نشانگري^۶، مکان‌يابي فاصله‌اي^۷، مکان‌يابي فاصله‌اي مرکب^۸ و مکان‌يابي فاصله‌اي چندگانه^۹ متداول و نرم‌افزارهاي مختلفی بدان منظور ارائه گرديده‌اند (Doira 1992). کرم‌ابريشم توت به‌عنوان یک منبع اقتصادي مهم براي حدود ۳۰ ميليون خانوار کشاورز در سرتاسر جهان (ESCAP 1993) و نيز با کاربردهاي متنوع در بخش‌هاي داروسازي (Tomita et al. 2003)، کشاورزي (Nagaraja and Nagaraju 1997)، پزشکي و صنعت (Yuji 1998)، ديري نيست که بررسي ژنومي 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)

است، چون تشکیل نقشه‌ی پیوستگی اشباع (با تراکم بالا) در کار اصلاح‌نژاد ملکولی چه در تئوری و چه در عمل 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 ای‌اف‌ال‌پی قادر به تولید چندشکلی‌های بیشتری است تحقیق حاضر با هدف شناسایی نشانگرهای AFLP پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفت درصد قشر پيله 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 (به ترتیب 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 پيله و مقایسه اثر جمعیت در نتایج مکان‌یابی ژنی استفاده گردید (جدول ۲). از نرم‌افزار SPSS برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها استفاده شد. بدین ترتیب سه جمعیت F_1 حاصل از این والدین به جهت داشتن بیشترین و کم‌ترین مقادیر فنوتیپی صفات مورد مطالعه، قادر به تولید نتایج 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 (-20°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 ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نهایتاً این تیوب‌ها به دمای -20°C درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده، منتقل گردیدند. نمونه‌های DNA

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^۱ 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 ۱۲۴۸ نشانگر ملکولی بود. از این مقدار ۳۵۶ نشانگر در ۳۰ گروه پیوستگی بودند و هر گروه پیوستگی نیز شامل ۴ تا ۳۶ نشانگر می‌شدند. کل طول نقشه‌ی پیوستگی به‌دست آمده ۶۵۱۲ سانتی‌مورگان با میانگین فاصله‌ی ۱۸/۲ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر بود. با این حال به-دلیل طول بالای نقشه‌ی پیوستگی به‌دست‌آمده 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^۲ ب) تجزیه و تحلیل مکان‌(های) ژنی کنترل‌کننده صفت کمی^۳ درصد قشر پيله. 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- تجزیه و تحلیل 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

¹ Selective Amplification DNA Fragment (SADF)

² Linkage map

³ QTL analysis

ژنومی استخراجی به کمک روش اسپکتروفتومتری تعیین غلظت شدند.

تعیین ژنوتیپ^۱

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 *PstI* (شش‌بازبر) و *TaqI* (چهاربازبر) جهت تولید قطعات چندشکل هضم آنزیمی شدند. در مرحله گیرش یا اتصال سازگارسازهای دو رشته‌ای به انتهای چسبنده از سازگارسازهای *PstI* و *TaqI* استفاده شد. در مرحله گسترش یا مرحله‌ی تکثیر مقدماتی، از آغازگرهای *PstI* و *TaqI* بدون نوکلئوتید اضافی در انتهای^۲ استفاده شد.

تکثیر انتخابی^۲

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 پلیمرز (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 ۶ 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 ای‌اف‌ال‌پی 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 (به ترتیب با اعداد یک

^۱ Genotyping

^۲ Selection

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

آغازگرهای <i>PstI</i>	آغازگرهای <i>TaqI</i>	آغازگر نام ترکیب
5'-GACGGCCGTCATGCAGAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAGC	TP01
5'-GACGGCCGTCATGCAGAAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAGC	TP02
5'-GACGGCCGTCATGCAGAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGAACA	TP03
5'-GACGGCCGTCATGCAGAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAAT	TP04
5'-GACGGCCGTCATGCAGAGA	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAAAG	TP05
5'-GACGGCCGTCATGCAGAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAAAG	TP06
5'-GACGGCCGTCATGCAGAAG	5'-GATGAGTCCTGAGCGAACA	TP07
5'-GACGGCCGTCATGCAGAAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGATG	TP08
5'-GACGGCCGTCATGCAGAAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGATC	TP09
5'-GACGGCCGTCATGCAGAAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAT	TP10
5'-GACGGCCGTCATGCAGTC	5'-GATGAGTCCTGAGCGAACA	TP11
5'-GACGGCCGTCATGCAGTAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGATG	TP12
5'-GACGGCCGTCATGCAGTAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGATAC	TP13
5'-GACGGCCGTCATGCAGTAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGATA	TP14
5'-GACGGCCGTCATGCAGTAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAGC	TP15
5'-GACGGCCGTCATGCAGTAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAAAG	TP16
5'-GACGGCCGTCATGCAGTA	5'-GATGAGTCCTGAGCGAACA	TP17
5'-GACGGCCGTCATGCAGTA	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAAAG	TP18
5'-GACGGCCGTCATGCAGATG	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAGC	TP19
5'-GACGGCCGTCATGCAGATG	5'-GATGAGTCCTGAGCGAACA	TP20

و میزان اثرات هر یک از مکان‌های) 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.

نتایج و بحث

محاسبه و مقایسه میانگین ارزش‌های فنوتیپی صفات وزن پيله، وزن قشر پيله و درصد قشر پيله 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 ($P < 0.01$). 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^۳، 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، ۹۴۴ و ۸۱۰ باند قابل مشاهده به‌ترتیب برای هر یک از جمعیت‌های سه‌گانه مورد بررسی تعداد ۱۴۲ (۱۵/۲۷ درصد)، ۱۷۱ (۱۸/۱۱ درصد) و ۱۷۸ (۲۱/۹۷ درصد) باند چندشکل بودند. کلیه 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 ۶۶، ۸۱ و ۴۰ باند چندشکل مربوط به والد ماده (از لاین

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، ۳۴ و ۳۶ نفر) × تعداد باندهای چندشکلی ظاهر شده (۱۴۲، ۱۷۱ و ۱۷۸ باند چند شکل) به کمک نرم‌افزار مربوطه ترسیم شدند.

تجزیه و تحلیل مکان‌های) ژنی کنترل‌کننده صفت درصد قشر پيله در تعیین مکان‌های) 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 مکان‌های) احتمالی کنترل‌کننده هر صفت تعیین شد. جهت تعیین مکان‌های) ژنی احتمالی کنترل‌کننده صفت مورد بررسی به کمک روش نشانگری ای‌اف‌اِل‌پی 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 مکان‌های) احتمالی کنترل‌کننده هر صفت به صورت نمره لگاریتم تابع درست‌نمایی^۱ (LOD) و آزمون نسبت درست‌نمایی^۲ (LRT) بررسی می‌شوند. این مقادیر بیشترین احتمال وجود مکان‌های) ژنی صفات کمی را نسبت به عدم وجود آن‌ها در بین هر دو نشانگر نشان خواهد داد. در ضمن نوع

^۳ با توجه به این که نسل والدینی P1 و P2 لاین‌های خالص‌اند، تغییرات موجود در آن‌ها تنها منشأ محیطی دارد.

^۱ LOD

^۲ LRT

نسبت لگاریتم درست‌نمایی بالاتر از ۱۳ به دست آمد. این تعداد مکان‌های ژنی در هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه به ترتیب در گروه‌های پیوستگی ۱، ۹، ۱۳، ۱۱، ۱۲، 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 ($h < 0$)، تعداد یک مکان ژنی نیز دارای اثر غالبیت نسبی ($h = 0.81 - 1/20$) و ۵ مکان ژنی مشخص شده دیگر دارای اثر فوق غالبیت ($h > 1/20$) 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. به گونه‌ای که به ترتیب مقدار ۲/۱۶-۱/۲۵ درصد، ۲/۶۳-۱۲/۷۵ درصد و ۵۱/۸۶-۱۹/۳۱ درصد از تنوع فنوتیپی مورد مشاهده در هر یک از جمعیت‌ها تحت تأثیر مکان‌های ژنی به دست آمده از آن جمعیت می‌باشند.

بومی لیمویی خراسان) و تعداد ۷۶، ۹۰ و ۱۳۸ باند چندشکلی متعلق به والد نر (از لاین ۱۰۷) بود. در مجموع میانگین تعداد باندهای چندشکل ظاهر شده به ازای هر جفت آغازگر انتخابی مورد استفاده در هر جمعیت به ترتیب ۷/۱۰، ۸/۵۵ و ۸/۹ نشانگر بودند. نقشه پیوستگی هر جمعیت به ترتیب شامل تعداد ۱۶، ۱۸ و ۲۴ گروه پیوستگی بودند. کل طول نقشه پیوستگی حاصل به ترتیب ۲۱۸۶/۴۰، ۲۵۸۲/۵۰ و ۲۳۹۲/۶۰ سانتی‌مورگان و متوسط فاصله‌ی بین هر دو نشانگر در گروه‌های 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 (جدول ۴). برای صفت درصد قشر پیله در هر یک از جمعیت‌های نسل دوم مورد مطالعه به ترتیب تعداد ۴، ۲ و ۵ مکان ژنی در سطح آستانه حداقل

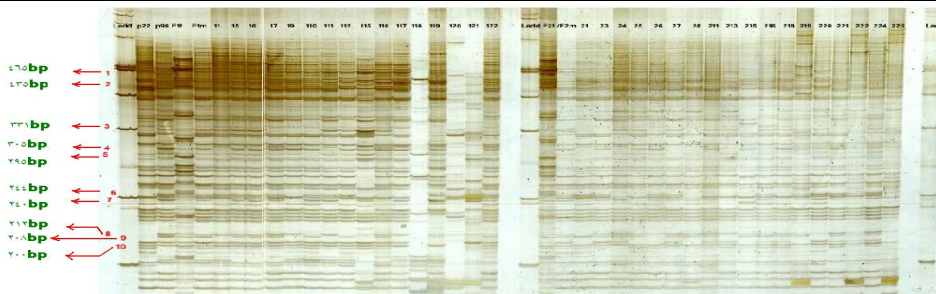
جدول ۲- میانگین ارزش‌های فنوتیپی صفات مورد بررسی در والدین و افراد نسل اول و نسل دوم

تفاوت بین والدین (t-value)	F ₂	F ₁	والدین			صفت
			میانگین والدین	لیمویی خراسانی	لاین ۱۰۷	
۴۱/۹۹۹*	۱۷/۵۴±۱/۹۵	۱۸/۰۸۹±۳/۸۷۷	۱۸/۷۳±۰/۰۲	۱۵/۲۳±۰/۰۲	۲۲/۲۳±۰/۰۲	درصدقشر پیله (S.C.P.)

* اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۳- واریانس فنوتیپی، واریانس ژنتیکی، وراثت‌پذیری عمومی صفات مورد بررسی در کرم ابریشم توت

وراثت‌پذیری (H ₂)	وراثت‌پذیری ژنتیکی (V _G)	وراثت‌پذیری محیطی (V _P)	واریانس فنوتیپی				صفت
			نسل اول (F ₁)	نسل دوم (F ₂)	لاین ۱۰۷	لاین لیمویی خراسان	
۰/۹۹۷	۵۷/۶۴	۰/۱۸۶	۱/۷۷۴۸	۰/۲۵۸۱	۰/۵۲۷۶	۰/۰۸۵۴	درصدقشر پیله (S.C.P.)



شکل ۱- بخشی از الکتروفورز محصول PCR مربوط به آغازگر TP18 (PTA- TAAG) 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، نشان‌دهنده افراد والد (Parental) که به ترتیب از چپ به راست والد ماده‌ی لیمویی خراسان (که در این تصویر P22) و نر ۱۰۷ (که در این تصویر P90) است، F نیز نشان‌دهنده افراد نسل اول که به ترتیب 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 نتایج نسل دوم حاصل از هر جفت از والدین نسل اول می‌باشند.

جدول ۴- مکان‌های ژنی شناسایی شده برای صفت درصد قشر پیله در کرم‌ابریشم به روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب با حداقل $LRT > 13$

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

*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).

چون نشانگرهای مغلوب دابل 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 به ترتیب ۱۵/۲۷، ۱۸/۱۱ و ۲۱/۹۷ درصد بود. مقدار آن در بررسی انجام شده توسط Javadi Mirhosseini et al. (2009) ۱۹/۰۸۶ درصد، در گزارش Tan et al. (2004) ۲۴/۱۴ درصد بوده

در بررسی حاضر که مبتنی بر شناسایی چندشکلی‌ها در یک جمعیت نسل دوم با استفاده از روش نشانگری ای‌اف‌ال‌پی 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 RP جهت ترسیم نقشه پیوستگی استفاده می‌شوند لذا نشانگرهایی که دارای پیوستگی هستند، دافع هم خواهند بود.

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 ای‌اف‌ال‌پی 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 به ترتیب ۷/۱۰، ۸/۵۵ و ۸/۹ باند بوده است. این مقدار نزدیک به میانگین اعلام شده در کرم‌ابریشم توسط (Javadi 2007) ۱۰/۱۴، (Dalirsefat et al. 2009) ۹/۲ و نیز به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از میانگین اعلام شده توسط (Tan et al. 2001) به میزان ۳۵/۷ و (Lu and Xiang 2005) and Xiang (2005) به میزان ۳۶/۴ 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 ۱۶، ۱۸ و ۲۴ گروه (شامل ۱۴۲، ۱۷۱ و ۱۷۸ نشانگر) بودند. (Javadi et al. 2007) تعداد ۶ گروه پیوستگی، (Dalirsefat et al. 2009) تعداد ۲۴ گروه پیوستگی (۳)، (Tan et al. 2001) تعداد ۳۰ گروه پیوستگی، (Lu and Xiang 2005) تعداد ۱۹ گروه پیوستگی با استفاده از نشانگرهای ای‌اف‌ال‌پی و نیز (Goldsmith 1991) با استفاده از ۶۰ نشانگر آرف‌ال‌پی، تعداد ۲۳ گروه پیوستگی، (Yuji 1998) نیز به کمک نشانگرهای رپید تعداد ۲۸ گروه پیوستگی و در جدیدترین نقشه پیوستگی ژنتیکی توسط (Yamamoto et al. 2006) با استفاده از ۵۳۴ نشانگر اس‌ان‌پی 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

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 به ترتیب 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 ۲۷/۰۲۳۴ سانتی مورگان، (Mirhosseini et al. 2009) نیز به ترتیب ۳۴۶۶/۹ و ۱۸/۹۴ سانتی مورگان 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 به عبارتی 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 بالعکس خواهد بود. میانگین فاصله بین نشانگرها در گروه‌های پیوستگی از نقشه‌های پیوستگی اولیه به کمتر از ۲۰ سانتی مورگان نمی‌رسید (Sima et al. 2006). جهت شناسایی محل ژن‌های اصلی یا ماژور، میانگین فاصله نشانگرها باید کمتر از ۲۰ سانتی مورگان باشد. برای تعیین مکان ژن کنترل‌کننده یک صفت کمی در ژنوم باید نقشه پیوستگی با میانگین فواصل نشانگری کمتر از ۱۰ سانتی مورگان تهیه شود. تعداد نشانگرها در پیوستگی‌های به دست آمده از سه خانواده جمعیت نسل دوم مورد مطالعه بین ۲ تا ۴۴ 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

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 ۴) 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 ۱۰۷)، 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 پيله، وزن قشر پيله، وزن سفیره، تعداد دو مکان ژنی برای صفت وزن پيله در گروه پیوستگی ۶ و ۱۹، سه مکان ژنی برای وزن قشر پيله در گروه پیوستگی ۳، ۱۴ و ۱۹، سه مکان ژنی برای صفت درصد قشر پيله در گروه پیوستگی ۲، ۱۱ و ۱۵ شناسایی کردند. با تمام این اوصاف به‌کارگیری روش ملکولی در اصلاح‌نژاد کرم‌ابریشم در ابتدای راه خود می‌باشد. زیرا ارائه نقشه‌های پیوستگی مترکم‌تر (با تعداد بیشتر نشانگر چندشکل) در این زمینه چه به لحاظ استنباطات ثوریک 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 ای‌اف‌ال‌پی 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 آلی و تجزیه و تحلیل مکان‌های ژنی (های) ژنی صفات کمی - اقتصادی مهم خواهد بود. تجزیه و تحلیل داده‌های نشانگری با داده‌های فنوتیپی مربوط به صفت درصد قشر پيله از طریق بررسی همبستگی بین

مکان‌های ژنی که در خصوص صفت درصد قشر پيله 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 پيله تعداد سه مکان ژنی را بر اساس روش تجزیه و تحلیل فاصله‌ای مرکب که دو تا در گروه پیوستگی اول و دیگری در گروه پیوستگی دوم قرار داشتند (csp_{1-2a} ، csp_{1-2b} ، csp_{2-2})، ارائه دادند و Dalirsefat et 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 ایجادکننده تفاوت در نتایج مربوط به تعداد مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفت مورد نظر باشد. در مجموع مکان‌های ژنی احتمالی کنترل‌کننده صفت درصد قشر پيله به دست آمده در این پژوهش به ترتیب توصیف‌کننده ۶/۱۷، ۱۵/۳۸ و ۱۷۹/۷ درصد تنوع فنوتیپی می‌باشند. بقیه تنوع موجود در جمعیت‌های اول و دوم به لحاظ صفت درصد قشر پيله توسط این مکان‌های ژنی توصیف‌پذیر نبوده بلکه ممکن است تحت اثر جایگاه‌های 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

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.

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 پيله‌ای با وزن بالاتر دارای درصد قشر بالاتری نیست. زیرا این خصوصیات توسط ژن‌های مختلف کنترل می‌گردند. با توجه به

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, Ogonnaya 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 of 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 significance 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 length polymorphism of cDNA clones. 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).

- 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 Biotechnology. 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.