

مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفت در صد قشر پیله در کرم ابریشم

AFLP نشانگرهای (*Bombyx mori* L.)

سید ضیاء الدین میرحسینی^۱، علیرضا بیژن‌نیا^۲، بابک ریبیعی^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 اصلاح نژادی از طریق تهیه 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 عمدهاً 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 به ترتیب شامل ۳۳، ۳۶ و ۳۴ پروانه‌ی حاصل از تلاقی سه جفت والدین از لاین‌های خالص، بومی لیموئی خراسان (به عنوان پایه مادری) با چیزی ۱۰۷ (به عنوان پایه پدری) استفاده شد. با استخراج DNA به روش فتل-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 و اسربته‌ساز ۶ درصد منتقل و پس از تعیین ژنوتیپ افراد، نقشه‌های پیوستگی در هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه از طریق تشکیل ماتریس (تعداد نتایج نسل دوم از هر خانواده \times تعداد باندهای چندشکلی ظاهر شده) به کمک نرم افزارهای QTX و Map manager/QTZ و Cartographer ver.2.5 ترسیم و در نهایت تعداد مکان‌های احتمالی کنترل کننده 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 (متلوپ) تا فوق غالبیت شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی

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

مقدمه

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

موجودات، انتخاب به کمک نشانگر، شناسایی مکان(های) ژنی صفات کمی، تهیه‌ی نقشه‌های پیوستگی و کلون کردن ژن‌های مفید استفاده می‌گردد (Promboon et al. 1995). صفات مهم اقتصادی نظیر وزن پیله^۱، وزن قشر پیله^۲، درصد قشر پیله^۳، طول و ضخامت نخ ابریشم، باروری^۴ و مقاومت^۵ به باسیلولوپیروس‌ها در کرم‌ابریشم از صفات کمی محسوب شده به عبارتی تحت کنترل تعداد زیادی ژن با اثرات کوچک و نیز شرایط محیطی می‌باشدند. 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 خطربیزیری 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 مراکر اصلاح‌نژاد گیاهی و جانوری وجود چنین ظرفیتی را برای توسعه‌ی نشانگرها و انتخاب به کمک نشانگرها پذیرفته (Huys et al. 2006) و بهدلیل آن نیز روش‌های تجزیه و تحلیل جهت جستجوی مکان‌های ژنی احتمالی صفات کمی را توسعه داده شده‌اند. در حال حاضر روش‌های تجزیه‌ی تک‌نشانگری^۶، مکان‌یابی فاصله‌ای^۷، مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب^۸ و مکان‌یابی فاصله‌ای چندگانه^۹ متداول و نرم‌افزارهای مختلفی بدان منظور ارائه گردیده‌اند (Doira 1992). کرم‌ابریشم توت به عنوان یک منع 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 (Yuchi Nagaraja and Nagaraju 1997) ۱۹۹۸)، دیری نیست که بررسی ژنومی آن با استفاده از

^۱ Cocoon Weight(C.W.)^۲ Cocoon Shell Weight(C.S.W.)^۳ Cocoon Shell Percentage(C.S.P.)^۴ Fertility^۵ Resistance^۶ Simple Marker Analysis(SMA)^۷ Interval Mapping(IM)^۸ Composite Interval Mapping(CIM)^۹ Multiple Interval Mapping(MIM)

ابریشم به عنوان ماده اولیه در تولید محصولاتی مانند فرش، پارچه، پیراهن، شال گردن، آویزهای دیواری و ترئینات 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. به علاوه 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 به کارگیری 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 تجمعی 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 تلاقي‌های 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 راه حل مناسبی برای تفکیک نژادهای مختلف کرم‌ابریشم به منظور برآورد تنوع ژنتیکی موجود و انتخاب والدین Promboon et al. 1995 مناسب برای تولید دورگه‌های پرتوولید است (). امروزه از این نشانگرها در شناسایی روابط فیلوزنوتیکی

مکان یابی ژن‌های کنترل کننده صفت درصد قشر پیله در کرم ابریشم...

است، چون تشکیل نقشه‌ی پیوستگی اشیاع (با تراکم بالا) در کار اصلاح نژاد ملکولی چه در تئوری و چه در عمل بسیار مهم می‌باشد. چنین نقشه‌های پیوستگی شامل مکان‌های بیشتری از زن‌های صفات کمی است که در فرآیند انتخاب به کمک نشانگر مدل خوبی را ارائه خواهند داد (Sima et al. 2006). لذا با توجه به این که روش نشانگری ای‌اف‌الپی قادر به تولید چندشکلی‌های بیشتری است تحقیق حاضر با هدف شناسایی نشانگرهای AFLP پیوسته با زن‌های کنترل کننده صفت درصد قشر پیله با استفاده از جمعیت تفرق نسل دوم و به واسطه‌ی تهیه‌ی نقشه‌ی پیوستگی و تعیین مکان(های) ثانی احتمالی کنترل کننده این صفات به کمک روش، تجزیه و تحلیلاً مکان‌بایه، فاصله‌ای مرکز 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 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. بدین ترتیب 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 حداقل 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.

برای هر پروانه نر به طور جداگانه و به روش فنل - کلروفرم انجام شد (Nagaraja and Nagaraju 1995). هر نمونه DNA به دست آمده در ۵۰ میکرولیتر بافر، TE (Tris-HCl 1mM pH 8) EDTA ۱mM pH 8) ۱۰ mM به خوبی حل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. نهایتاً این تیوب‌ها به دمای ۲۰- درجه DNA سانته گردیدند. نمنهای گردیدند. استفاده متنقاً تا زمان ساخته گردیدند.

نشانگرهای ملکولی مختلف آغاز شده است. به طوری که 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 مشکل 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 به دست آمده ۶۵۱۲ سانتی‌مترگان با میانگین فاصله‌ی ۱۸/۲ سانتی‌مترگان بین دو نشانگر بود. با این حال به دلیل طول بالای نقشه‌ی پیوستگی به دست آمده این نقشه از تراکم بالایی برخوردار نبود (Tan et al. 2001). جهت تعیین مکان(های) ژئی کنترل‌کننده هر صفت کمی (QTLs) نیاز به اجرای دو مرحله می‌باشد: الف) تهیه نقشه پیوستگی^۲ ب) تجزیه و تحلیل مکان(های) ژئی کنترل‌کننده صفت کمی^۳ 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) ژئی کنترل‌کننده صفت کمی فراهم می‌کند. این چارچوب به کمک تشکیل ماتریس بین داده‌های ژنتیکی و داده‌های کمی مربوط به آن صفت کمی اندازه‌گیری شده در بین افراد والدین و افراد نسل دوم به کمک نرم‌افزار مناسب به دست می‌باشد (Goldsmith 1991): ۱- تهیه جمعیت تفرق، ۲- تعیین چندشکلی، و ۳- تجزیه و تحلیل نقشه پیوستگی بین نشانگرها. درباره تهیه چنین نقشه‌هایی نیاز به اجرای سه مرحله کار می‌آید. در تهیه چنین نقشه‌هایی نیاز به اجرای سه مرحله کار تلاقي مورد استفاده جهت تهیه جمعیت تفرق، والدین انتخاب شده باید دارای تفاوت قابل توجهی به لحاظ صفت یا صفات مورد بررسی باشند. در این حالت جمعیت تفرق فراهم شده شامل افراد با ترکیب ژنتیکی والدینی و ژنتوتیپ‌های نوترکیب است. میزان فراوانی ژنتوتیپ‌های نوترکیب مبنای محاسبه فواصل ژنتیکی بین نشانگرها و ترتیب آن‌ها در هر گروه پیوستگی است.

¹ Selective Amplification DNA Fragment (SADE)

Selective Affinity² Linkage map

³ Linkage map OTL analysis

ناحیه برش آنزیم‌های برشی) مورد نظر که منع تولید چندشکل‌ها 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 آغازگرها مطابق جدول شماره ۱ استفاده گردید.

مشاهده چندشکل‌ها

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 قابل قبولی 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

ژنومی استخراجی به کمک روش اسپکتروفوتومتری 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 نمونه DNA رقیق شده، توسط آنزیم‌های برشی *PstI* (شش‌بازیر) و *TaqI* (چهاربازیر) جهت تولید قطعات چندشکل هضم آنزیمی شدند. در مرحله گیرش یا اتصال سازگارسازهای دو رشته‌ای به انتهای چسبنده از سازگارسازهای $T_{ad} = PstI + P_{ad}$ استفاده شد. در مرحله *PstI* و *TaqI* گسترش یا مرحله‌ی تکثیر مقدماتی، از آغازگرهای *PstI* و *TaqI* بدون نوکلئوتید اضافی در انتهای ۳' 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

¹ Genotyping

² Selection

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

آغازگرهای <i>PstI</i>	آغازگرهای <i>TaqI</i>	آغازگر نام ترکیب
5'-GACGGCCGTATGCAGAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAGC	TP01
5'-GACGGCCGTATGCAGAAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAGC	TP02
5'-GACGGCCGTATGCAGAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAACA	TP03
5'-GACGGCCGTATGCAGAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAAT	TP04
5'-GACGGCCGTATGCAGAGA	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAAG	TP05
5'-GACGGCCGTATGCAGAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAAG	TP06
5'-GACGGCCGTATGCAGAAAG	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAACA	TP07
5'-GACGGCCGTATGCAGAAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGATG	TP08
5'-GACGGCCGTATGCAGAAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGATC	TP09
5'-GACGGCCGTATGCAGAAC	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAT	TP10
5'-GACGGCCGTATGCAGTC	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAC	TP11
5'-GACGGCCGTATGCAGTAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGATG	TP12
5'-GACGGCCGTATGCAGTAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGATAC	TP13
5'-GACGGCCGTATGCAGTAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGATA	TP14
5'-GACGGCCGTATGCAGTAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAC	TP15
5'-GACGGCCGTATGCAGTAT	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAAG	TP16
5'-GACGGCCGTATGCAGTA	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAC	TP17
5'-GACGGCCGTATGCAGTA	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAAG	TP18
5'-GACGGCCGTATGCAGATG	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAC	TP19
5'-GACGGCCGTATGCAGATG	5'-GATGAGTCCTGAGCGAAC	TP20

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 تلاقي‌ها 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 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 ($P < 0.01$). 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 به ترتیب 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). به طوری که از بین تعداد کل ۹۳۰، ۹۴۴ و ۸۱۰ باند قابل مشاهده به ترتیب برای هر یک از جمعیت‌های سه‌گانه مورد بررسی تعداد ۱۴۲ (۱۵/۲۷)، ۱۷۱ (۱۸/۱۱) درصد و ۱۷۸ (۲۱/۹۷) درصد باند چندشکل بودند. کلیه نتایج 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

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

و صفر) نمره‌گذاری و سپس جهت استفاده در نرم‌افزارهای Map Manager/QTX ver.2.5 و Cartographer به کدهای A، B، C و D تبدیل، تا نرم‌افزارها با تشکیل ماتریس این داده‌های ژنوتیپی، مقادیر نوترکیبی بین نشانگرها و فواصل نقشه (سانسی مورگان) به کمکتابع 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 نتایج نسل دوم (۳۳، ۳۴ و ۳۶ نفر)^۴ تعداد باندهای چندشکلی ظاهر شده (۱۴۲، ۱۷۱ و ۱۷۸ باند چند شکل) به کمک نرم‌افزار مربوطه ترسیم شدند.

تجزیه و تحلیل مکان(های) ژنی کنترل کننده صفت درصد قشر پیله در تعیین مکان(های) ژنی احتمالی کنترل کننده 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 کنترل کننده هر صفت تعیین شد. جهت تعیین مکان(های) ژنی احتمالی کنترل کننده صفت مورد بررسی به کمک روش نشانگری ای‌اف‌ال‌پی 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 مركب در این روش با استفاده از آزمون‌های رگرسیونی خطی پیچیده وجود پیوستگی بین نشانگر با مکان(های) احتمالی کنترل کننده هر صفت به صورت نمره لگاریتم تابع درستنمایی^۱ (LOD) و آزمون نسبت درستنمایی^۲ (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

¹ LOD

² 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 و ۳، ۹، ۲۱، ۹ قرار داشتند. با توجه به مقادیر h^2 (۰/۳۰) از جدول ۴، تعداد ۵ مکان ژنی تعیین شده برای صفت مورد بررسی دارای اثر تحت غالبیت (>0)، تعداد یک مکان ژنی نیز دارای اثر غالبیت نسبی ($=0$) (۰/۸۱-۱/۲۰) ($h=0$) 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 فنتوپی از صفت مورد نظر در سطح هر یک از جمعیت‌هاست. به گونه‌ای که به ترتیب مقدار ۱/۶۳-۱۲/۷۵ درصد، ۱/۲۵-۲/۱۶ درصد و ۵۱/۸۶-۱۹/۳۱ درصد از تنوع فنتوپی مورد مشاهده در هر یک از جمعیت‌ها تحت تأثیر مکان‌های ژنی به دست آمده از آن جمعیت می‌باشد.

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 ۰/۱۰، ۷/۱۰ و ۸/۹ نشانگر بودند. نقشه پیوستگی هر جمعیت به ترتیب شامل تعداد ۱۶، ۲۴ گروه پیوستگی بودند. کل طول نقشه‌ی پیوستگی حاصل به ترتیب ۰/۴۰، ۲۱۸/۴۰، ۰/۵۰ و ۲۳۹۲/۶۰ سانتی‌مورگان و متوسط فاصله‌ی بین هر دو نشانگر در گروه‌ای پیوستگی نیز ۰/۴۵، ۱۶/۴۵ و ۱۴/۹۵ سانتی‌مورگان تعیین شدند.

مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده 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 کنترل کننده 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

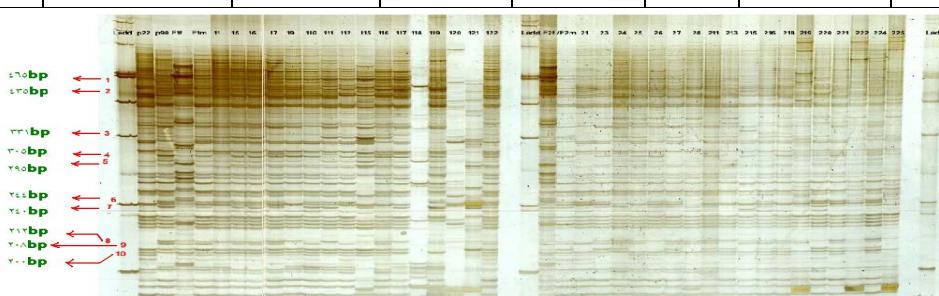
جدول ۲- میانگین ارزش‌های فنتوپی از صفات مورد بررسی در والدین و افراد نسل اول و نسل دوم

تفاوت بین والدین (t-value)	F ₂	F ₁	والدین		صفت
			میانگین والدین	لیمویی خراسانی	
*۴/۹۹۹	۱۷/۵۴±۱/۹۵	۱۸/۰۸۹±۳/۸۷۷	۱۸/۷۳±۰/۰۲	۱۵/۲۳±۰/۰۲	درصد قشر پیله (S.C.P.)

* اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

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

وراثت‌پذیری (H2)	(VG)	واریانس ژنتیکی (VP)	واریانس محیطی (VP)	واریانس فنتوپی				صفت
				(F2)	نسل دوم (F1)	نسل اول (F1)	لاین لیمویی خراسان	
۰/۹۹۷	۵۷/۶۴	۰/۱۸۶	۱/۷۷۴۸	۰/۲۵۸۱	۰/۰۵۲۷۶	۰/۰۸۵۴	درصد قشر پیله (S.C.P.)	



شکل ۱- بخشی از الکتروفورز محصول PCR مربوط به آغازگر TAAG-PTA(TP18) (PUC8) با نام PUC8 (Ladder=size marker) نشان‌دهنده شاخص اندازه (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، نیز نشان‌دهنده افراد نسل اول که به ترتیب از چپ به راست F₁f و F₂f والدین نسل اول ماده، F₁m و F₂m والدین نسل اول نر می‌باشد. سایر اعداد نیز نشان‌دهنده نتایج نسل دوم حاصل از هر جفت از والدین نسل اول می‌باشد.

مکان یابی ژن‌های کنترل کننده صفت درصد قشر پلے در کرم ابریشم...

جدول ۴- مکان‌های ژنی شناسایی شده برای صفت درصد قشر پلے در کرم ابریشم به روش مکان یابی فاصله‌ای مرکب با حداقل LRT>13

R^2	h^a	اثر غالیت (H2:d)	اثر افزایشی (H1:a)	نسبت درست‌نمایی (LRT)	QTL	نیزدیک‌ترین 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	۴/۳۴۴۳	۱/۲۸۳۶	۰/۲۹۵۶	۲۰/۶۲	CSP 11/7	TP01/181-TP07/280	۷	۱۱
۰/۱۲۷۵	۲/۰۵۳۵۱	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

*نیزدیک‌ترین نشانگر به مکان ژنی کنترل کننده صفت کمی مورد نظر از ابتدای گروه پیوستگی

: h^2 نسبت اثرات غالیت به افزایشی است. اگر $h<0$ باشد اثر تخت غالیت یا مغلوب، اگر $h=0$ باشد اثر غالیت نسبی، اگر $h>0$ باشد اثر غالیت و اگر $h=1.2$ باشد اثر فوق غالیت می‌باشد (Stuber et al. 1987).

چون نشانگرهای مغلوب دوبل در افراد جمعیت نسل دوم نشان داده نمی‌شوند لذا محاسبه صحیح موقعیت مکانی شان 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 چندشکل‌های 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 (2007) ۱۹/۰۸۶ درصد، در گزارش Mirhosseini et al. (2009) ۶۱/۱۴ درصد، در گزارش Tan et al. (2004) ۲۴/۱۴ درصد بوده

در بررسی حاضر که مبتنی بر شناسایی چندشکل‌ها در یک جمعیت نسل دوم با استفاده از روش نشانگری ای‌اف‌ال‌پی است، اولاً داشتن جمعیت نسل دوم دارای تفرق مناسب ضروری است. بهمین 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 تحت تأثیر عوامل ژنتیکی باشند نه محیطی که با توجه به محاسبه میزان توارث‌پذیری عام (بیش از ۸۰ درصد) برای صفت مورد مطالعه، این گونه بودند. کرم‌ابریشم از گونه‌هایی است که در جنس ماده آن تبادل کروموزومی انجام نمی‌شود. از آنجایی که هر دو گروه نشانگرهای ملکولی غالب و مغلوب به کمک نشانگرهای AFLP و رپید جهت انجام ترسیم نقشه پیوستگی استفاده می‌شوند لذا نشانگرهایی که دارای پیوستگی هستند، دافع هم خواهند بود.

در (Ngui 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 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 Mirhosseini et al. ترتیب ۱۹۱۸/۷ و ۲۷/۰۲۳۴ سانتی مورگان، (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 بلعکس 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 مژوز، میانگین فاصله نشانگرها باید کمتر از ۲۰ سانتی مورگان باشد. برای تعیین مکان ژن کنترل کننده یک صفت کمی در ژنوم باید نقشه‌پیوستگی 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 ۴ 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

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 نشانگرها 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 and Xiang (2005) میانگین اعلام شده توسط Tan et al. (2001) به میزان ۳۵/۷ و Lu 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 نشانگرها 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 ۳۰ گروه ۲۴ گروه پیوستگی (۳)، Tan et al. (2001) تعداد ۱۹ گروه پیوستگی با پیوستگی، Lu and Xiang (2005) تعداد ۱۶ نشانگر آراف‌ال‌پی و نیز Goldsmith (1991) با استفاده از نشانگرها ای‌اف‌ال‌پی و نیز Yuji (1998) نیز به کمک نشانگرها ریپید تعداد ۲۳ 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 Goldsmith 2002; Miao et al. 2005; Nagaraju and شده‌اند (

هر یک از آن‌ها در گروه‌های پیوستگی که بر مبنای داده‌های فنتوتیپی 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)، وجود کراسینگ‌اور و نیز وجود ساختارهای ژنومی جابه‌جاشونده یا ترانسپوزوم‌ها باشد، نسبت داد (Tan et al. 2001). تا کنون پژوهش‌هایی نیز با اهداف شناسایی نشانگرهای ملکولی پیوسته با صفات تولید ابریشم جهت توسعه روش‌های نشانگری برای مقاصد انتخاب و نیز همسانه‌سازی موضوعی 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 کترل کننده صفات وزن پیله، وزن قشر پیله، وزن شفیره، تعداد دو مکان ژنی برای صفت وزن پیله در گروه پیوستگی ۶ و ۱۹، سه مکان ژنی برای وزن قشر پیله در گروه پیوستگی ۳، ۱۴ و ۱۹، سه مکان ژنی برای صفت درصد قشر پیله در گروه پیوستگی ۱۱ و ۱۵ شناسایی کردند. با تمام این اوصاف به کارگیری روش ملکولی در اصلاح نژاد کرم ابریشم 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 به نژادی، 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 تکارپذیری بالاست لذا نقشه پیوستگی حاصل از آن‌ها ابزار با ارزش جهت مطالعه ژنتیکی در کرم ابریشم جهت تعیین نشانگرهای خاص برای تشخیص سوش‌های خاص جهت جستجوی تغییرات در فراوانی آللی و تجزیه و تحلیل مکان‌های ژنی صفات کمی – اقتصادی مهم خواهد بود. تجزیه و تحلیل داده‌های نشانگری با داده‌های فنتوتیپی مربوط به صفت درصد قشر پیله از طریق بررسی همبستگی بین

مکان‌های ژنی که در خصوص صفت درصد قشر پیله به کمک روش مکان یابی فاصله‌ای مرکب به دست آمد، نشان از تفاوت در تعداد این مکان‌های ژنی احتمالی کترل کننده 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 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 چندشکل‌های 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 کترل کننده صفت درصد قشر پیله به دست آمده در این پژوهش به ترتیب توصیف کننده ۶/۱۷ و ۱۵/۳۸ و ۱۷۹/۷ درصد تنوع فنتوتیپی می‌باشند. یقیه تنوع موجود در جمعیت‌های اول و دوم به لحاظ صفت درصد قشر پیله 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.

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, Bizhnna 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 Entomologica 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).

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

- 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 colonies. *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 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.