

بررسی تنوع ژنتیکی نژادهای بومی کرم ابریشم *Bombyx mori* ایران با استفاده از نشانگر ISSR

مجتبی زارعی^{۱*}، الهام صنعتگر^۲، روح الله رجیبی^۳، حسین شوهانی^۴، مهدی ابراهیم‌قلعه‌سیدی^۲

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی، گروه حشره‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
۲- مربی، گروه حشره‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
۳- مربی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دزفول
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد حشره‌شناسی، گروه حشره‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم

چکیده

نشانگر مولکولی ISSR به منظور جداسازی نژادهای کرم ابریشم *Bombyx mori* بومی ایران استفاده شد و استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم صورت گرفت. پس از سنجش کمی و کیفی DNA استخراج شده و رقیق‌سازی آن، مقادیر حاصل از باندهای به دست آمده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نمره‌دهی و آنالیز صورت گرفت. نتایج نشان داد که باندهای مشاهده شده بین ۱۰۰۰-۲۰۰۰ جفت باز قرار دارند و بیشترین باندهای مشاهده شده مربوط به گونه بغدادی با ۳۲ باند و کمترین تعداد باند مربوط به خراسانی-لیمویی با ۲۵ باند بوده است. از میان آغازگرها بیشترین تعداد باند مربوط به آغازگر ۲ با ۴۳ باند و کمترین تعداد باند مربوط به آغازگر ۴ با ۳۰ باند بود. آنالیز خوشه‌ای نژادهای مورد مطالعه آن‌ها را در ۳ گروه اصلی قرار داد. در گروه اول نژادهای گیلانی-نارنجی، هراتی-زرد و خراسانی- صورتی قرار گرفتند و نژادهای خراسانی-لیمویی و بغدادی هر کدام به تنهایی در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. در آنالیز خوشه‌ای گیلانی-نارنجی بیشترین شباهت را به هراتی-زرد نشان داد و این دو با نژاد خراسانی- صورتی در گروه اول قرار گرفتند. بیشترین شباهت ژنتیکی بین نژادهای گیلانی-نارنجی و هراتی-زرد و بیشترین فاصله ژنتیکی بین نژاد بغدادی با هر چهار نژاد دیگر به دست آمد. به نظر می‌رسد نشانگر ISSR بتواند به خوبی نژادهای مختلف کرم ابریشم با منشأ مختلف را از هم جدا سازد. لذا جهت اثبات آن کاربرد بیش از ۳۰ آغازگر برای ۱۴ فرد کرم ابریشم با توجه به $2n=28$ مناسب‌تر است.

واژه‌های کلیدی: کرم ابریشم، نژاد، نشانگر مولکولی، ISSR

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: Mojtabazarei22@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله (۹۱/۴/۱۰) - تاریخ پذیرش مقاله (۹۱/۱۰/۵)

مقدمه

کرم ابریشم حشره‌ای اقتصادی و اهلی شده، از راسته بال‌پولکداران است که در کنار زنبور عسل به صورت انبوه پرورش داده می‌شود. کرم ابریشم در کشورهای زیادی از جمله ایران پرورش داده شده و به دلیل نیاز به مدت زمان نسبتاً کم برای پرورش و سادگی مراحل پرورش، می‌توان از پرورش آن برای کمک به اقتصاد خانواده‌ها و استفاده افرادی که غیرفعال تلقی می‌شوند و همچنین جلوگیری از مهاجرت روستائیان به شهرها استفاده برد. اقتصادی بودن کرم ابریشم و استفاده از ابریشم تولیدی آن محققان را بر آن داشته است که برای اصلاح نژاد، به نژادی و برای به دست آوردن لاین‌های اقتصادی‌تر از لحاظ میزان قشر پيله تولیدی و دیگر خصوصیات مطلوب کرم ابریشم، مطالعات بسیاری روی ژنوم و فیلوژنی آن انجام دهند. ژنوم کامل کرم ابریشم در سال ۲۰۰۸ به وسیله کنسرسیوم بین‌المللی ژنوم کرم ابریشم منتشر شد (Xia et al., 2008). توالی اولیه کرم ابریشم در سال ۲۰۰۴ منتشر شده بود (Xia et al., 2004; Mita et al., 2004). از آن‌جا که بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی حشرات از طریق تکامل شکل می‌گیرند، مطالعه کرم ابریشم به شفاف‌سازی مطالعات اعمال هومولوگ‌های ژن و تسهیل مطالعات اهلی‌سازی حشرات، مورفوژنیز، جنین‌شناسی، تولیدمثل، رفتار و ایمنی‌شناسی در حشره‌شناسی کمک خواهد کرد. توالی ژنوم کرم ابریشم سهم مهمی در ژنومیکس عملی برای کرم ابریشم و ژنومیکس عملی و مقایسه‌ای برای گونه‌های بال‌پولکداران داشته و اساسی برای تلفیق اطلاعات بیولوژیکی برای بال‌پولکداران و حتی گونه‌های حشرات فراهم خواهد کرد (Mita et al., 2004; Xia et al., 2004; Yamamoto et al., 2008).

به دلیل اقتصادی و مفید بودن کرم ابریشم استفاده از نشانگرهای مختلف به منظور تعیین تنوع زیستی درون و برون گونه‌ای و شناخت چندشکلی ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و نژادهای مختلف آن همواره مورد توجه محققین بوده است (Dusinsky et al., 2006; Liu et al., 2010). پژوهشگران با استفاده از ISSR-PCR و نیز در مطالعه دیگر با استفاده از ریز ماهواره‌ها تنوع ژنتیکی کرم ابریشم را بررسی کرده‌اند (Redy et al., 1999a; Redy et al., 1999b). نشانگر DNA مبتنی بر PCR برای تحقیق در روابط ژنتیکی بسیاری از جمعیت‌ها و ارقام گیاهی و نژادهای جانوری از جمله حشراتی چون کرم ابریشم استفاده شده است (Zietkiewics et al., 1994; Prevost & Wilkinson, 1999; Deshpande et al., 2001; Borner et al., 2002). نتایج آزمایش‌ها این نشانگر غالب را به عنوان ابزاری مفید در نقشه‌یابی ژنتیکی کرم ابریشم و انگشت‌نگاری ژنتیکی پیشنهاد می‌کنند (Redy et al., 1999a).

با توجه به هزینه‌بر بودن و کار زیاد نشانگرهایی چون AFLP و SSR نشانگر ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاندی کرم ابریشم نژادهای بومی ایران مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

استخراج DNA: در این تحقیق از پنج نژاد بومی ایرانی شامل، خراسانی- لیمویی، خراسان- صورتی، بغدادی، هراتی- زرد و گیلانی- نارنجی، از هر جمعیت ۶ حشره کامل به صورت تصادفی نمونه‌برداری و جهت استخراج DNA استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- نژادهای مورد استفاده در تحقیق، خلاصه نام، منشاء جغرافیایی و سال معرفی نژادها به بانک ژن

Table 1- Strains used in this study, short name, geographical origin and x

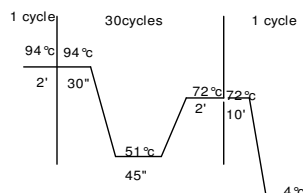
Silkworm races	Code	Original	Year of introduction to germplasm
Gilani-oreng	Gi-or	(Guilan)	1992
Khorasani-lemon	Kh-le	(Khorasan)	2001
Harati-yellow	Ha-ye	(Arak)	1992
Khorasani-pink	Kh-pi	(Khorasan)	1992
Baghdadi	Ba	(Baghdad)	1992

پس از جداسازی بال‌های حشره با استفاده از روش بهینه شده سوزوکی (فنل-کلروفرم) DNA استخراج شد (Suzuki *et al.*, 1972). با استفاده از هاون چینی و ازت مایع حشرات کاملاً خرد و به صورت پودر درآورده شدند و سپس به تیوپ‌های ۱/۵ میکرو لیتری منتقل و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. به محتوی پودر شده آن‌ها برای جداسازی DNA، ۴ میکرو لیتر SDS ۲۰ درصد و ۷۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج اضافه شد و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۶۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. هر ۱۰ دقیقه یکبار تیوپ‌ها از بن‌ماری خارج و محتوی آن‌ها به آرامی در حدود ۵ ثانیه مخلوط گردید. پس از پایان مدت زمان، تیوپ‌ها به سانتریفیوژ منتقل و در دور ۷۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و فاز بالایی آن‌ها به میزان ۳۰۰ تا ۵۰۰ میکرو لیتر بر اساس میزان جدا شدن دو فاز جدا و به تیوپ‌های جدید منتقل شد، در مرحله بعد کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) به میزان ۳۰۰ میکرو لیتر و ۳۰۰ میکرو لیتر فنل افزوده و در دور ۸۵۰۰ به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شد، این کار دو بار تکرار و در هر بار فاز رویی به میزان ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکرو لیتر جدا سازی و به تیوپ دیگر انتقال داده شد. در مرحله بعد هم حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل الکل اضافه شد و سانتریفیوژ با دور ۸۵۰۰ و به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت. سپس فاز رویی جداسازی و ۳۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانل سرد جهت مشاهده کلاف DNA افزوده شد. سپس در دمای ۵- درجه سلسیوس به مدت یک ساعت نگهداری و پس از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، DNA به صورت رسوب درآمد و محلول رویی دور ریخته شد. در نهایت یک بار با الکل اتانول سرد ۷۰ درصد و یک بار با الکل اتانول سرد ۹۰ درصد شستشو داده شد که در هر مرحله به مدت ۱ دقیقه در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد و سپس الکل دور ریخته شد. برای از بین بردن آلودگی RNA از آنزیم RNase و محلول فنل-کلروفرم- ایزوآمیل الکل استفاده شد. کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد سنجیده شد. نمونه‌های با کیفیت بالا پس از تعیین میزان دقیق آن توسط نانودراپ رقیق شده و برای استفاده در زنجیره PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: ۱۵ میکرو لیتر مخلوط واکنش شامل ۱/۵ میکرو لیتر بافر PCR 10X، ۱/۵ میکرو لیتر dntps با غلظت ۲ میلی‌مول، ۰/۶ میکرو لیتر MgCl₂ با غلظت ۲ میلی‌مول، ۱ میکرو لیتر از آغازگر با غلظت ۱/۵ میلی‌مول، ۲ میکرو لیتر DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم بر میکرو لیتر، ۰/۲ میکرو لیتر تک دی‌ان‌آ پلیمرز با غلظت ۵U/μL و ۸/۲ میکرو لیتر آب مقطر دوبار استریل تشکیل شد. پس از آماده‌سازی تحت شرایطی که در شکل نشان داده شده در دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز قرار داده شد (شکل ۱) و پس از تکمیل این چرخه‌ها، نمونه‌ها در سیکل چهارم در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند و سپس برای بررسی چگونگی عملکرد این مرحله، محصولات PCR شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد آورده شد.

در این تحقیق از ۴ آغازگر به شرح زیر استفاده شد:

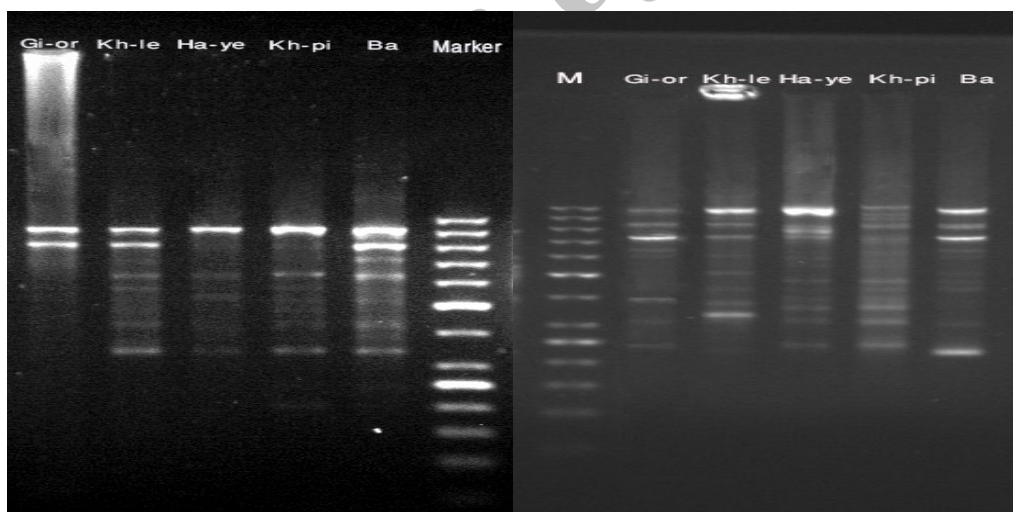
P₁: 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'
 P₂: 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGG-3'
 P₃: 5'-GAGAGAGAGAGAGAGAA-3'
 P₄: 5'-ACACACACACACACACG-3'



شکل ۱- برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد استفاده در نشانگر ISSR

Fig-1- PCR Plan using ISSR markers

الکتروفورز محصول PCR: ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد که با اتیدیوم بروماید مخلوط شده بود بارگیری و به مدت ۳ ساعت با توان ۷۰ وات درون TBE1X با الکتروفورز اجرا شد. سپس با استفاده از دستگاه ژل‌داک از ژل عکس‌برداری و جهت نمره‌دهی استفاده شد و اعداد جهت آنالیز وارد برنامه اکسل شدند (شکل ۲).



شکل ۲- تصویر ژل آگارز ۱/۵ درصد نشانگر ISSR، آغازگر ۳ (سمت راست) و آغازگر ۲ (سمت چپ)، M=50bp

Fig. 2-- Image gel 1.5% marker ISSR, primer 3 (right) and primer 2 (left), M=50bp of 1.5% gel of ISSR marker Image

تجزیه و تحلیل داده‌ها: محصولات حاصل از تکثیر در مرحله PCR، به صورت صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) برای تمام جمعیت‌ها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۰۷ امتیازبندی شد. تعداد باند چندشکل و تک‌شکل و درصد چندشکلی برای هر آغازگر و نژاد محاسبه گردید.

محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگر با استفاده از جمع مربع فراوانی آلی و حذف جایگاه ژنی تک‌شکل با استفاده از فرمول (Polymorphism Information Content) PIC_i محاسبه شد (Anderson et al., 1993).

$$PIC_i = 1 - \sum_j f_{ij}^2$$

f_{ij} فراوانی الگوی th^i از باند th^j

BI (Band Informativness) از فرمول زیر محاسبه شد:

$$BI_i = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

که در آن p نسبتی از ژنوتیپ‌های دارای باند می‌باشد.

قدرت حل هر آغازگر از فرمول RP (Resolving Power) محاسبه شد:

$$RP = \sum_{i=1}^n BI_i$$

نسبت چندگانه موثر که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل موجود در یک ژرم‌پلاسم می‌باشد از طریق فرمول EMR (Effective Multiplex Ratio) محاسبه می‌شود (Powel et al., 1996).

$$EMR = n_p \times B$$

$$B = n_p / (n_p + n_{np})$$

در این فرمول n_p تعداد کل باندهای چندشکل و B نسبت تعداد باند چندشکل به تعداد کل باند می‌باشد (Powel et al., 1996).

شاخص نشانگری که بیانگر میزان چندشکلی است و می‌تواند به‌عنوان شاخصی جهت برآورد کارایی یک نشانگر در یک ژرم‌پلاسم ناشناخته استفاده گردد با استفاده از رابطه MI (Marker Index) محاسبه شد (Milbourne et al., 1997; Powel et al., 1996).

$$MI = PIC \times EMR$$

ضریب تشابه جاکارد در اندازه‌گیری میزان تشابه تنها باندهایی را در نظر می‌گیرد که در هر فرد وجود داشته باشد (Jaccard, 1908). لازم به ذکر است که در مطالعات انجام شده بین سه ضریب تشابه Jaccard, Sorenson Dice و Simple matching تفاوتی مشاهده نشد (Dalirsefat et al., 2009) در نتیجه در این تحقیق از ضریب جاکارد استفاده گردید.

$$s_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

a: تعداد باندهایی که در هر دو فرد i و j وجود دارد.

b: تعداد باندهایی که در فرد i وجود دارد ولی در فرد j وجود ندارد.

c: تعداد باندهایی که در فرد i وجود ندارد ولی در فرد j وجود دارد.

دندروگرام نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار MVSP3.2 و NTsys رسم شد.

نتایج و بحث

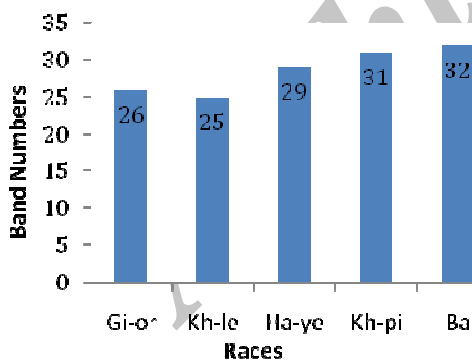
در آغازگر P₁ حداکثر تعداد باند تولید شده مربوط به جمعیت‌های خراسانی- صورتی و گیلانی- نارنجی با ۹ باند و حداقل تعداد باند مربوط به جمعیت خراسانی- لیمویی با ۴ باند بود. همچنین حداکثر تعداد باند تولید شده در آغازگر P₂ متعلق به جمعیت خراسانی- لیمویی با ۱۰ باند و حداقل تعداد باند تولید شده مربوط به خراسانی- صورتی با ۶ باند بود. در آغازگر P₃ حداکثر تعداد باند تولید شده مربوط به جمعیت بغدادی با ۱۰ باند و حداقل تعداد باند مربوط به جمعیت گیلانی- نارنجی با ۲ باند بود. در آغازگر P₄ حداکثر تعداد باند تولید شده مربوط به جمعیت خراسانی- صورتی با ۷ باند و حداقل تعداد باند مربوط به جمعیت خراسانی- لیمویی با ۵ باند بود (جدول ۲).

جدول ۲- تعداد باند تولیدی هر آغازگر در هر نژاد بومی کرم ابریشم با نشانگر ISSR

Table 2- The number of bands produced by each primer in native silkworm race with ISSR markers

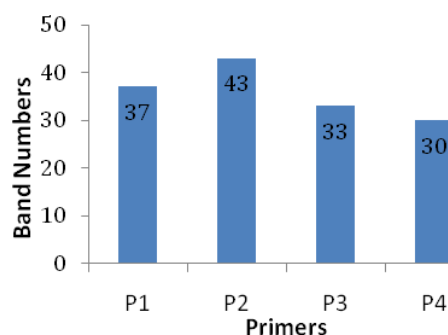
Perimer	Local silkworm races				
	Gi-orange	Kh-lemon	Ha-yellow	Kh-pink	Baghdadi
1	9	4	8	9	7
2	9	10	9	6	9
3	2	6	6	9	10
4	6	5	6	7	6

از میان ۱۴۳ باند ایجاد شده از چهار آغازگر مورد بررسی، بیشترین تعداد باند ایجاد شده در آغازگرها مربوط به آغازگر ۲ با ۴۳ باند ایجاد شده و کمترین تعداد باند مربوط به آغازگر ۴ با ۳۰ باند ایجاد شده می‌باشد (شکل ۳) و حداکثر باند تولید شده در بین نژادها مربوط به نژاد بغدادی با ۳۲ باند می‌باشد و کمترین باند تولید شده مربوط به نژاد خراسانی- لیمویی با ۲۵ باند می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴- تعداد باندهای تولید شده در نژادهای بومی کرم ابریشم با کاربرد ۴ آغازگر

Fig. 4- The number of bands produced in native silkworm races using 4 primer



شکل ۳- تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر برای نژادهای بومی کرم ابریشم

Fig. 3- The number of bands produced by each primer for native silkworm races

میزان شاخص نشانگری، قدرت حل، میانگین قدرت حل و نرخ موثر چندگانه آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه نژادهای بومی کرم ابریشم در جدول ۳ نشان داده شده است. شاخصهای اندازه‌گیری شده تابع تعداد باندهای تولیدی و تعداد باندهای چندشکل در هر آغازگر می‌باشد. با افزایش تعداد باندها قدرت آغازگرها در جداسازی افزایش می‌یابد و با کم شدن تعداد باندهای تک‌شکل و افزایش باندهای چندشکل این قدرت افزایش می‌یابد. بر طبق جدول ۳ مقدار PIC برای ۴ آغازگر به ترتیب از آغازگر ۱ تا ۴ عبارت بودند از: ۰/۳۴۴، ۰/۳۲۸، ۰/۳۴۲ و ۰/۳۷۷ که از این بین بیشترین مقدار PIC برای آغازگر شماره ۴ با ۰/۳۷۷ واحد و کمترین مقدار آن برای آغازگر شماره ۲ با ۰/۳۲۸ واحد بود. مقدار RP (قدرت حل آغازگر) برای هر ۴ آغازگر به ترتیب از آغازگر ۱ تا ۴ عبارت بودند از: ۱۱/۲۴، ۱۵/۱۲، ۱۲/۱۵ و ۱۲/۳۹ که بیشترین RP مربوط به آغازگر شماره ۲ با ۱۵/۱۲ واحد و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر شماره ۱ با ۱۱/۲۴ واحد بود. مقدار MRP (میانگین قدرت حل آغازگر) به ترتیب برای آغازگرهای ۱ تا ۴ عبارت بودند از: ۰/۹۳۶، ۰/۹۴۵، ۰/۹۳۴ و ۰/۹۵۳، که از میان آغازگرها بیشترین مقدار مربوط به آغازگر شماره ۴ و کمترین مقدار مربوط به آغازگر شماره ۳ بود. مقدار عددی EMR (نرخ چند گانه موثر) برای ۴ آغازگر به ترتیب از آغازگر ۱ تا ۴ عبارتند از: ۱۱/۰۷۶، ۱۳/۴۷۳، ۱۲/۰۷۱ و ۱۳ که بیشترین مقدار EMR مربوط به آغازگر شماره ۲ و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر شماره ۱ بود. همچنین MI (شاخص نشانگری) که از ضرب اعداد PIC در EMR به دست آمد برای هر ۴ آغازگر محاسبه شد که به ترتیب از آغازگر ۱ تا ۴ نشان دهنده اعداد روبرو هستند: ۳/۸۱۷، ۴/۴۲۵، ۴/۱۳۸ و ۴/۹۰۲، که بیشترین مقدار MI مربوط به آغازگر شماره ۴ با ۴/۹۰۲ واحد و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر شماره ۱ با ۳/۸۱۷ واحد بود (جدول ۳)

جدول ۳- میزان برخی شاخص‌های آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی کرم ابریشم با

نشانگر ISSR

Table 3- Primers used in this study measures the amount of genetic variation in native silkworm races with ISSR markers

Primer	PIC Mean	RP	MRP	EMR	MI
P1	0.344	11.24	0.936	11.076	3.817
P2	0.328	15.12	0.945	13.473	4.425
P3	0.342	12.15	0.934	12.071	4.138
P4	0.377	12.39	0.953	13	4.902
Average	0.347	12.72	0.942	12.405	4.32

RP=Resolving power, PIC=Polymorphism Information, EMR=Effective Multiplex Ratio, MI=Marker Index

همچنین تک‌شکلی و چندشکلی نیز در آغازگرها مورد بررسی قرار گرفت که آغازگر شماره یک ۱۲ جایگاه چندشکلی و یک جایگاه تک‌شکلی، آغازگر شماره دو ۱۶ جایگاه چندشکلی و ۳ جایگاه تک‌شکلی، آغازگر شماره سه ۱۳ جایگاه چندشکلی و یک جایگاه تک‌شکلی و آغازگر شماره چهار ۱۳ جایگاه چندشکلی و صفر جایگاه تک‌شکلی ایجاد کردند. هم‌چنین بیشترین چندشکلی در آغازگر شماره ۴ با ۱۰۰ درصد چندشکلی و کمترین چندشکلی در آغازگر شماره ۲ با ۸۴/۲ درصد چندشکلی بود. در کل آغازگرهای ISSR با میانگین ۹۲/۸ درصد چندشکلی زیادی را از خود نشان دادند (جدول ۴).

جدول ۴- توالی آغازگرها، تعداد جایگاه‌ها، جایگاه‌های تک‌شکل و چندشکل و درصد چندشکلی

Table 4 - Primers sequences. Number of positions. A single place. Polymorphic. Percentage of polymorphic

Primer number	Prime name	Sequence (5'_3')	Fragment size (bp)	Number of total band	Number of polymorphic bands	Number of Monomorphic bands	Percentage of Polymorphism (%)
1	Ow-01	(AG)8T	200-1000	37	12	1	92.3
2	Ow-02	(AG)8G	200-1000	43	16	3	84.2
3	Ow-03	(GA)8A	300-1000	33	13	1	92.8
4	Ow-04	(AC)8G	400-1000	30	13	0	100
Total	-	-	-	143	54	5	92.3

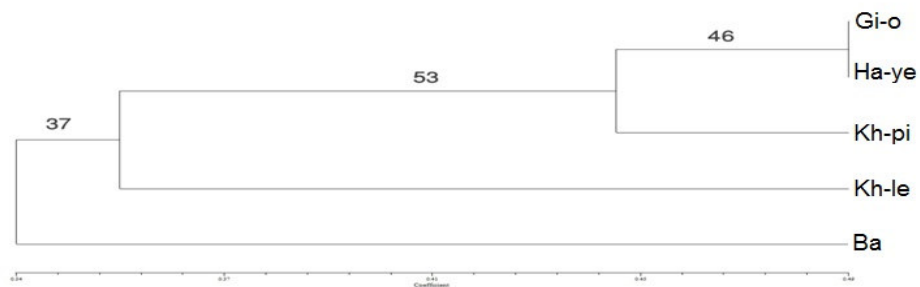
در ماتریس شباهت نژادها، بیشترین شباهت‌ها بین گیلانی- نارنجی و هراتی- زرد (۰/۴۸۶۴) مشاهده شد و هراتی- زرد و خراسانی- صورتی (۰/۴۴۴۲) و گیلانی- نارنجی و خراسانی- صورتی (۰/۴۴۴۲) در رتبه دوم قرار گرفتند (جدول ۵). بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۶۶۶۹) بین نژاد بغدادی با هر چهار نژاد دیگر مشاهده شد و گیلانی- نارنجی با خراسانی- لیمویی و هراتی- زرد با خراسانی- لیمویی با (۰/۶۴۶۱) فاصله در رتبه دوم قرار داشتند (جدول ۵). شباهت ژنتیکی نژادها با برنامه FAMD نیز آنالیز شدند که نتیجه‌ای مشابه به دست آمد با اندکی تفاوت نسبت به اعداد به دست آمده با برنامه NTsys می‌باشند و به نظر می‌رسد که برنامه FAMD میزان دقت بالاتری داشته باشد ولی در این‌جا از نتایج به دست آمده توسط برنامه NTsys استفاده شد تا آنالیزها و کلاستر با یک برنامه انجام شده باشند (جدول ۵).

جدول ۵- ضریب تشابه ژنتیکی (قسمت پایین) و فاصله ژنتیکی (قسمت بالا) بر اساس نشانگر ISSR استفاده از برنامه NTsys

Table 5- Coefficients of genetic similarity (bottom) and genetic distance (above) based on ISSR markers using the program NTsys

Races	Gi-or	Kh-le	Ha-ye	Kh-pi	Ba
Gi-or	*****	0.6461	0.5154	0.5558	0.6649
Kh-le	0.3539	*****	0.6461	0.6461	0.6649
Ha-ye	0.4864	0.3539	*****	0.5558	0.6649
Kh-pi	0.4442	0.3539	0.4442	*****	0.6649
Ba	0.3351	0.3351	0.3351	0.3351	*****

پنج جمعیت مورد مطالعه پس از رسم دندروگرام به روش UPMGA در سه گروه مجزا تقسیم‌بندی شدند که در گروه اول گیلانی- نارنجی با هراتی- زرد بیشترین نزدیکی را دارا هستند و این دو با خراسانی- صورتی رابطه خویشاوندی نزدیکی دارند و در گروه دوم خراسانی- لیمویی به تنهایی و در گروه سوم نژاد بغدادی نیز به تنهایی در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۵).

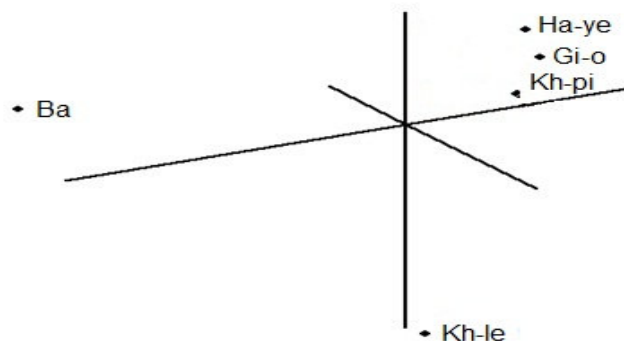


شکل ۵- دندروگرام به دست آمده به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد حاصل از آنالیز پنج نژاد بومی ایران با استفاده از

برنامه NTsys و FAMD

Fig 5- Dendrogram obtained by the method UPGMA. Jaccard's similarity coefficients obtained from the analysis of five indigenous races using the program FAMD and NTsys

نتایج حاصل از آنالیز خوشه‌ای نژادهای مطالعه شده به خوبی در پلات سه بعدی حاصل از برنامه FAMD ترسیم شد و بیانگر فاصله نژادهای مورد مطالعه از یکدیگر می‌باشد این دندروگرام به خوبی توانست فاصله ژنتیکی نژادها را از هم‌دیگر ترسیم کند (شکل ۶).



شکل ۶- پلات سه بعدی (Pcoa) حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به روش ماتریس تشابه، با استفاده از برنامه FAMD برای پنج نژاد

کرم ابریشم بومی ایران با استفاده از نشانگر RAPD

Fig. 6- Three-dimensional plot (Pcoa) of the principal coordinate analysis using similarity matrix, using a five-race program FAMD Iranian native silkworm using RAPD markers

محققان با استفاده از نشانگر ISSR گونه‌های خراسانی- صورتی و خراسانی- لیمویی را در دو گروه مجزا قرار دادند و به نتایج مشابهی دست یافتند (Balvasi, 2003). بر اساس نتایج تحقیق دیگر با استفاده از ISSR دو جمعیت هراتی- زرد و خراسانی- صورتی در یک گروه قرار گرفتند و به نتایج مشابهی دست یافتند و گیلانی- نارنجی را در گروه بغدادی و خراسانی- لیمویی قرار دادند و به نتایج متفاوتی دست یافتند که این تفاوت‌ها ممکن است به خاطر استفاده از تعداد آغازگرهای بیشتر باشد (Radjabi *et al.*, 2012). بر اساس نتایج به دست آمده دو جمعیت خراسانی- صورتی و خراسانی- لیمویی در دو گروه متفاوت قرار گرفتند که این دو نژاد با هیچ گونه‌ای در یک گروه مشترک قرار نگرفتند و نتایج متفاوتی به دست آوردند و این احتمالاً به خاطر استفاده از تعداد آغازگرهای کمتر و همچنین استفاده از ژل اکریل آمید می‌باشد (Balvasi, 2003). در تحقیق دیگری نژادهای خراسانی- لیمویی و

خراسانی- صورتی در دو گروه متفاوت قرار گرفتند و به نتایج مشابه دست یافتند و همین‌طور نژادهای گیلانی- نارنجی و بغدادی در یک گروه قرار گرفتند که به نتایج متفاوتی دست یافتند (Dalirsefat et al., 2009). تفاوت در نتایج به دلیل استفاده از نژادهای کمتر و همچنین استفاده از آغازگرهای متفاوت در تحقیق حاضر می‌باشد. در این مطالعه دو جمعیت هراتی- زرد و گیلانی- نارنجی با هم بیش‌ترین نزدیکی را دارا می‌باشند که می‌توان مشابهت و نزدیکی مدت زمان تفریح تخم (ساعت)، تعداد پیله تولیدی، تعداد پیله خوب و تعداد پیله خوب دارای شفیره زنده، میانگین وزن قشر پیله خوب ماده و میانگین وزن قشر پیله خوب نر در این دو جمعیت را مویده این گفته بدانیم این دو گونه با گونه خراسانی صورتی بیش‌ترین نزدیکی را دارند که یکسان بودن وزن تخم گونه گیلانی- نارنجی و خراسانی- صورتی و همچنین نزدیکی تعداد پیله‌های متوسط خراسانی- صورتی با هراتی- زرد و همچنین یکسان بودن طول دوران تفریح در هر سه نژاد گیلانی- نارنجی، هراتی- زرد و خراسانی- صورتی می‌تواند تایید کننده این دندروگرام باشد. محققان بسیاری نژادهای کرم ابریشم را بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و اقتصادی همچون وزن پیله، وزن قشر پیله، درصد قشر و مانند آن طبقه‌بندی کرده‌اند (Salehi et al., 2009). در دندروگرام به دست آمده به روش UPGMA دو نژاد خراسانی- صورتی و خراسانی- لیمویی در دو گروه متفاوت قرار گرفتند. چون این دو نژاد از یک منطقه جغرافیایی هستند و انتظار می‌رفت که هر دو در یک گروه قرار بگیرند که نتایج چنین چیزی را نشان نداد.

نتیجه گیری

انتظار بر این بود که گونه‌هایی که از نظر منشاء جغرافیایی نزدیک به هم هستند در یک گروه و گونه‌هایی که از نظر منشاء جغرافیایی با یکدیگر اختلاف بیش‌تری دارند در گروه دیگری قرار بگیرند که وجود نژادهای خراسانی صورتی و خراسانی لیمویی در دو گروه متفاوت و همچنین نزدیکی بیشتر جمعیت خراسانی- صورتی با گونه‌های هراتی- زرد و گیلانی- نارنجی که از نظر منشاء جغرافیایی با آنها نزدیکی کمتری را داد، چنین پیش فرضی را رد کرد. اما با توجه به مطالعات صورت گرفته قبلی در کشورهای ایران و هند بررسی این نشانگر با تعداد آغازگرهای بیشتر ضروری به نظر می‌رسد.

References

- Anderson, J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D. and Sorrells, M. E. 1993.** Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36: 181-186.
- Balvasi, A. 2003.** Study of genetic diversity of silkworm of Iran using SSR markers. M.Sc. Thesis. University of Tehran. Faculty of Agricultural, 154pp.
- Bornet, B., Goragner, F. and Joly, G. 2002.** Genetic diversity in European and Argentinean cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome*, 45: 481-484.
- Chatterjee, S. N. and Datta, R. K. 1992.** Hierarchical clustering of 54 races and strains of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. significance of biochemical parameters. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 394-402.
- Dalirsefat, S. B., Da Silva Meyer, A. and Mirhoseini, S. Z. 2009.** Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with amplified fragment length polymorphism markers in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of insect science*, 9: 1-8.
- Deshpande, A. U., Apte, G. S. and Bahulikar, R. A. 2001.** Genetic diversity across natural populations of montane plant species from the western Ghats, India, revealed by inter simple sequence repeats. *Molecular Ecology*, 10: 2397-2408.
- Dusinsky, R., Kudela, M., Stloukalova, V. and Jedlicka, L. 2006.** Use of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for discrimination between and within species of blackflies (Diptera: Simuliidae). *Biologia (Bratislava)*, 61: 299-304.
- Eguchi, M. 1995.** Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comparative Biochemistry Physiology*, 111B: 151-162.
- Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J. and Owen, J. L. 1994.** Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 998-1006.
- Jaccard, P. 1908.** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bul. Soc. Vaudoise Sci. Nat*, 44: 223-270.
- Liu, J. N., Gui, F. R. and Li, Z. Y. 2010.** Genetic diversity of the planthopper, *Sogatella furcifera* in the Greater Mekong Subregion detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. *Journal of Insect Science*, 10/52:1-14.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. and Waugh, R. 1997.** Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 3(2): 127-136.
- Mita, K., Kasahara, M., Sasaki, S., Nagayasu, Y., Yamada, T., Kanamori, H., Namiki, N., Kitagawa, M., Yamashita, H. and Yasukochi, Y. 2004.** The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research*, 11: 27-35.
- Prevost, A. and Wilkinson, M. J. 1999.** A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107-112.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. 1996.** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
- Radjab, R., Sarafrazi, A., Tarang, A., Kamali, K. and Targari, S. 2012.** Intraspecific Biodiversity of Iranian Local Races of Silkworm *Bombyx mori* by ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) Molecular Marker. *World Journal of Zoology*, 7 (1): 17-22.
- Ratnaparkhe, M. B., Tekeoglu, M. and Muehlbauer, F. J. 1998.** Intersimple- sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 515-519.
- Reddy, K. D., Nagaraju, J. and Abraham, E. G. 1999a.** Genetic characterization of the silkworm (*Bombyx mori*) by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR. *Heredity*, 83: 681-687.

- Reddy, K. D., Abraham, E. G. and Nagaraju, J. 1999b.** Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: abundance, polymorphism, and strain characterization. *Genome*, 42: 1057–1065.
- Salehi Nezhad, M., Mirhosseini, S. Z., Gharahveysi, S., Mavvajpour, M. and Seidavi, A. R. 2009.** Investigation on Intra-Specific Biodiversity of 51 Peanut Cocoon Strains of Iran Silkworm (*Bombyxmori*) Germplasm Based on Reproductive Traits. *Biotechnology*, 9(2): 149-156.
- Suzuki, Y., Gage, L. P. and Brown, D. D. 1972.** The genes for fibroin in *Bombyx mori*. *Journal of Molecular Biology*, 70: 637-649.
- Tsumura, Y., Ohba, K. and Strauss, S. H. 1996.** Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (*Pseudotsugamenziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 40–45.
- Wang, G., Mahalingan, R. and Knap, H. T. 1998.** (C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 1086–1096.
- Xia, Q., Wang, J., Zhou, Z., Li, R., Fan, W. and Cheng, D. 2008.** The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(12): 1036-1045.
- Xia, Q., Zhou, Z., Lu, C., Cheng, D., Dai, F., Li, B., Zhao, P., Zha, X., Cheng, T. and Chai, C. 2004.** A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306: 1937-1940.
- Yamamoto, K., Nohata, J., Kadono-Okuda, K., Narukawa, J., Sasanuma, M., Sasanuma, SI., Minami, H., Shimomura, M., Suetsugu, Y. and Banno, Y. 2008.** A BAC-based integrated linkage map of the silkworm *Bombyx mori*. *Genome Biology*, 9:R21.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

Archive

Evaluation of genetic diversity in indigenous breeds of Iranian silkworm *Bombyx mori* using ISSR markers.

M. Zarei^{*1}, E. Sanatgar², R. Radjabi³, H. Shouhani⁴, M. Ibrahim Ghaleh Seyedi¹.

1-Graduated student, Entomology Department, Agriculture College, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran

2-Lecturer, Entomology Department, Agriculture College, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran

3-Lecturer, Plant Protection Department, Agriculture College, Islamic Azad University, Dezfoul Branch, Dezfoul, Iran

4-Graduated student, Entomology Department, Agriculture College, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran

Abstract

ISSR molecular marker, in order to isolate the Iranian native *Bombyx mori* silkworm breeds were used. Extracted DNA by using phenol-chloroform was performed. The qualitative and quantitative measurements of extracted DNA and its dilution, was obtained from the bands on 1.5% agarose gel and they marked and analyzed. The results showed that the observed bands were between 200-1000 bp and the most bands were observed corresponding to Harati-yellow with 32 bands and Khorasani-lemon had their lowest with 25 bands. Second Primers were the highest number of bands with 43 bands and the fourth primer had the lowest number of bands with 30 bands. Cluster analysis of races, placed them in three main groups. The first groups consisted of Gilani-orange, Harati-yellow and Khorasani-pink, Khorasani-lemon and Baghdadi races placed in separate groups. In cluster analysis, Gilani-orange showed the most similar to Harati-yellow and this two races with khorasani-pink were the first group. The most genetic similarity were between Gilani-orange and Harati-yellow and the most genetic distance was obtained between Baghdadi and other four races. It is concluded that, ISSR marker can separate different races of silkworm with different origin very well. there fore to approve the it is suitable to use more than more than 30 primer for 14 silkworm individuals with $2n= 28$ is better.

Keywords: Silkworm, Race, Molecular markers, ISSR

* Corresponding Author, E-mail: Mojtabazarei22@yahoo.com
Received:30 jun 2012- Accepted:25 dec 2012