مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۴، سال ۱۳۸۴ (۸۳۱-۸۲۵)

بررسی تنوع ژنتیکی کرم ابریشم بومی ایران با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره

آسیه بلواسی[۱]، جاماسب نوذری[۲]، ابراهیم باقری زنوز[۳]، بهزاد قره یاضی[٤]، زربخت انصاری[٥] و ضیاءالدین میرحسینی[٦]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، مربی و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران - کرج
٤، دانشیار مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کشور ٥، مربی مجتمع آموزش عالی علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری ٦، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۷/۸

خلاصه

با استفاده از یک نشانگر ریز ماهواره (ISSR) پنج جمعیت بومی کرم ابریشم ایران مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای هر جمعیت ۳۰ نمونه از روز سوم سن پنجم لاروی از مؤسسه تحقیقات ابریشم (رشت-پسیخان) جمع آوری شد. با استفاده از روش بهینه شده سوزوکی و همکاران (۱۹۷۲) (فنل-کلروفرم) از غده ابریشم ساز آنها DNA استخراج شد. از سه آغازگر آنکورد استفاده شد که پس از تکثیر در واکنش زنجیره ای پلی مراز ۲۱۱ باند تولید شد و از این تعداد، ۲۰۸ باند (۹۸/۵۸٪) چند شکل بودند. با استفاده از نرم افزار Popgene و روش UPGMA دندروگرام این جمعیتها رسم شد و جمعیتهای بومی در دو گروه مشخص قرار گرفتند. جمعیت صورتی و گیلانی بیشترین فاصله ژنتیکی نااریب و گیلانی و بغدادی کمترین فاصله را داشتند. گیلانی و بغدادی در یک گروه مجزا قرار گرفتند. متوسط تنوع ژنتیکی جمعیتها ۰/۳۵۷۵ بود. بیشترین چند شکلی در جمعیت خراسانی و کمترین در جمعیتهای لیمویی و بغدادی قرار داشت. نتایج به دست آمده دلالت بر قابلیت بالای این نشانگر در مطالعات تنوع ژنتیکی و نقشه یابی ژنتیکی کرم ابریشم دارند.

واژه‌های کلیدی: کرم ابریشم، نشانگر ISSR، تنوع ژنتیکی

مقدمه

در ژنوم های یوکاریوتیک توالیهای تکرار شونده بسیار زیادی به صورت پراکنده وجود دارد که به اصطلاح ریزماهواره یا توالیهای تکرار شونده ساده (اس‌اس‌آر) نامیده می‌شوند. این توالیهای کوتاه DNA معمولاً به طول ۵-۲ جفت باز هستند(۲). نشانگر SSR برای اولین بار در سال ۱۹۸۲ معرفی شد (۴). آی‌اس‌اس‌آر[۱] ریزماهواره‌ای است که در آن از آغازگرهای خاصی استفاده می‌شود. در اینجا آغازگرها همان توالی ریزماهواره می‌باشند که در یک انتهای ′۳ یا ′۵ به ۴-۲ باز پورین یا پریمیدین متصل (آنکورد[۲]) شده است و به منظور تکثیر قطعه‌ای از DNA که بین دو ریزماهواره که در ژنوتیپ یک گونه در حالت عکس یکدیگر قرار گرفته‌اند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این نشانگر از نوع غالب بوده (هتروزایگوتی را نشان نمی‌دهد) و نتایج آزمایشها این نشانگر غالب را به عنوان ابزاری مفید در نقشه‌یابی ژنتیکی کرم ابریشم و انگشت نگاری ژنتیکی پیشنهاد می‌کنند (۹، ۱۱).

1. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)

2. Anchored

مکاتبه کننده: زربخت انصاری
e-mail: ansari2000@yahoo.com

کرم ابریشم (بمبیکس موری[1]) حشره‌ای اقتصادی است که دارای تعداد زیادی اکوتیپ و لاینهای همخون می‌باشد و در مناطق گرمسیر و معتدله گسترش دارد. این ژنوتیپها در صفات کیفی و کمی تفاوت زیادی نشان می‌دهند. در دنیا بیش از ۳۰۰۰ ژنوتیپ کرم ابریشم تخمین زده می‌شود که شامل اکوتیپهای مختلف جغرافیایی است. برخلاف چنین تنوع وسیعی در ژنوتیپ کرم ابریشم، اطلاعات بسیار کمی در مورد خصوصیات ویژه بسیاری از این ژنوتیپها یا تنوع ژنتیکی بین یا داخل ژنوتیپها وجود دارد که این موضوع استفاده از آنها را در تولید ذخایر ژنتیکی بهتر، برای بهبود کیفیت و تولید ابریشم محدود می‌کند (۶).

اطلاعات مربوط به ژنوم پروانه‌ها کمک بزرگی به دانش حشره‌شناسی، تولید حشره‌کشهای مناسب، کنترل آفات و تولید ابریشم می‌کند. در حال حاضر اطلاعات لازم در مورد ژنوم پروانه‌ها بسیار محدود است. در این میان کرم ابریشم که دارای تعدادی جمعیتهای جهش یافته بوده و از نظر ژنتیکی بهبود یافته است، برای مطالعات پایه‌ای و بنیادی مورد استفاده قرار گرفته است (۵). مخازن ژنتیکی قوی کرم ابریشم باعث می‌شود تا به عنوان مورد مناسبی برای مطالعات راسته پروانه‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۵).

با توجه به اینکه در پرورش کرم ابریشم شرایط محیطی یک عامل تعیین کننده می‌باشد، خصوصیاتی نظیر سازگاری با شرایط محیطی خصوصا مقاومت به پارازیتها و بیماریهای منطقه‌ای از اهمیت زیادی برخوردارند، لذا باید توده های بومی ایران را شناسایی نموده و راجع به خصوصیات و ویژگیهای آنها اطلاعات جامعی به دست آورده تا در صورت لزوم از ژنهای بومی در لاینها و واریته‌های وارداتی استفاده گردد. این امر موجب خواهد شد تا با توجه به تنوع زیاد شرایط اقلیمی در ایران ژنوتیپهای مناسب با هر شرایط آب و هوایی تولید و عرضه گردند.

3. *Bombyx mori*- L

مواد و روش‌ها

جمعیتهاي کرم ابریشم

در این تحقیق از پنج جمعیت بومی ایران شامل پرتقالی گیلانی، پرتقالی خراسان، لیمویی خراسان، صورتی خراسان و بغدادی و از هر جمعیت ۳۰ لارو به صورت تصادفی نمونه‌برداری و استفاده شد.

استخراج DNA

DNA از غدد ابریشم ساز لاروهای سه روزه سن پنجم، با استفاده از روش بهینه شده سوزوکی (فنل کلروفرم) (۱۰) بهینه شده استخراج و سپس در منهای۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آغازگرها

در این مطالعه از سه آغازگر (Roch, German) به شرح زیر استفاده شد:

P_1: 5′ GTG TGT GTG TGT GTG TAG TCY 3′
P_2: 5′ GCT AGT GCT CAC ACA CAC ACA CAY 3′
P_3: 5′ GCA CAT GCA RTG TGT GTG TGT GTG 3′
Y: C/T
R: A/G

واکنش زنجیره‌اي پلي مراز

مخلوط واکنش (۲۰ میکرو لیتر) پس از آماده سازی تحت شرایط زیر در دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (Biometra) قرار داده شد. ۲ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه ۵۲ درجه و ۲ دقیقه دمای ۷۲ درجه اعمال و این چرخه حرارتی ۳۶ بار تکرار شد. سپس جهت تکمیل سنتز DNA یک مرحله حرارت نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. پس از تکمیل عمل، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

برای بررسی چگونگی عملکرد این مرحله، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ آورده شد.

الکتروفورز

سه میکرولیتر از محصول PCR به مدت سه دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشته سازی قرار داده و سپس بلافاصله روی یخ منتقل گردید. نمونه‌ها روی ژل اکریل آمید

(CM^2 ۴۰×۳۸) واسرشته‌ساز ۶٪ بارگیری و به مدت دو ساعت با توان ۷۵ وات ران شد. سپس ژل با روش نیترات نقره رنگ آمیزی و در دمای اتاق خشک شد (۹). سپس از ژل‌ها به وسیله اسکنر با درجه ۶۰۰DPI عکس‌برداری شد.

تجزیه و تحلیل داده ها

محصولات حاصل از تکثیر در مرحله PCR، به صورت صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) برای تمام جمعیتها امتیاز بندی شد و ماتریس ضریب تشابه با استفاده از فرمول زیر (۸) به دست آمد:

$$BSF = 2N_{ab}/(N_a+N_b)$$ [1]

N_{ab}: تعداد باندهای مشترک در یک جمعیت

N_a: تعداد باندهای فرد a

N_b: تعداد باندهای فرد b

سپس متوسط BSFهای محاسبه شده برای تمام آغازگرها به عنوان تشابه ژنتیکی درون جمعیتی (WGS^2) در نظر گرفته شد. واریانس ژنتیکی درون جمعیتی نیز از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\sigma^2 = 1 - WGS$$

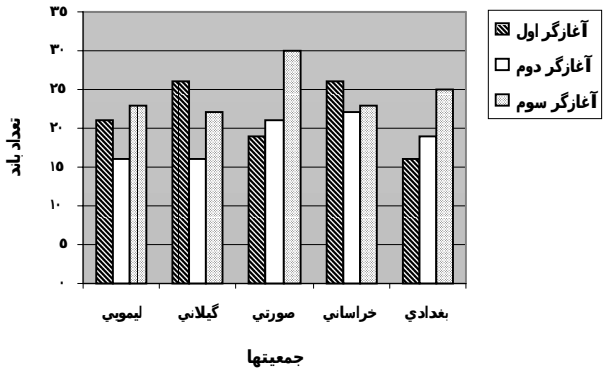
درصد چند شکلی (شکل ۲) و مقدار فاصله ژنتیکی بین جمعیتها (جداول ۲و ۳) با استفاده از روش UPGMA در نرم افزار Popgene اندازه گیری شد و ارتباط جمعیتها به صورت یک دندروگرام نشان داده شد.

نتایج

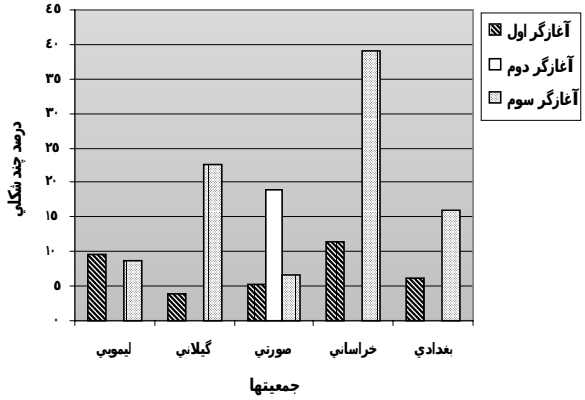
حداکثر باند به دست آمده، در جمعیت صورتی و در آغازگر P_3 و حداقل باند تولیدی، در جمعیتهای بغدادی در آغازگر P_1 و گیلانی و لیمویی در آغازگر P_2 قرار داشت (شکل ۱).

همچنین بیشترین چند شکلی در جمعیتهای گیلانی و خراسانی در آغازگر P_3 و کمترین آن در جمعیتهای لیمویی، گیلانی، خراسانی و بغدادی و در آغازگر P_2 بود (شکل ۲).

در آغازگر P_1، حداکثر باند تولید شده متعلق به جمعیتهای گیلانی و خراسانی با ۲۶ باند و حداقل باند متعلق به جمعیت بغدادی با ۱۶ باند بود. همچنین حداکثر چندشکلی درون جمعیتی در این آغازگر متعلق به جمعیت خراسانی با ۱۱/۵٪ چند شکلی با ۳ باند چندشکل و حداقل چندشکلی متعلق به جمعیت گیلانی با ۳/۹٪ چندشکلی با ۱ باند چند شکل بود.



شکل ۱- تعداد باند به دست آمده داخل جمعیتها به ازای هر آغازگر



شکل ۲- درصد چند شکلی به دست آمده داخل جمعیتها به ازای هر آغازگر

همچنین حداکثر باند تولید شده در آغازگر P_2 متعلق به جمعیتهای خراسانی با ۲۲ باند و حداقل باند تولید شده در جمعیتهای لیمویی و گیلانی با ۱۶ باند قرار داشت. حداکثر چند شکلی در جمعیت صورتی با ۱۹٪ چندشکلی و ۴ باند چند شکل و حداقل چند شکلی ۰٪ در جمعیتهای لیمویی، گیلانی، خراسانی و بغدادی بود.

در آغازگر P_3 حداکثر باند تولید شده در جمعیت صورتی با ۳۰ باند و حداقل باند تولید شده در جمعیت گیلانی با ۲۲ باند قرار داشت. همچنین حداکثر چندشکلی متعلق به جمعیت خراسانی با ۳۹/۱٪ چند شکلی و با ۹ باند چندشکل و حداقل

1. Band shearing frequency
2 . Within genetic similarity

چند شکلی در جمعیت صورتی با ۶/۶٪ چندشکلی و با ۲ باند چندشکل بود.

حداکثر فراوانی اشتراک باندی (BSF) در آغازگر P_2 متعلق به جمعیتهای گیلانی، خراسانی و بغدادی بود. همچنین حداکثر ضریب تشابه ژنتیکی (WGS) متعلق به جمعیت بغدادی بود. واریانس ژنتیکی نیز در تمامی جمعیتها کمتر از ۵٪ دیده می‌شد که نشان دهنده تشابه زیاد درون جمعیتی به ازای این سه آغازگر بود (جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی اشتراک باندی، ضریب تشابه ژنتیکی درون جمعیتی و واریانس ژنتیکی

جمعیت	BSF (%)		WGS (%)	δ^2_G (%)
لیمویی	P1	۹۷/۵		
	P2	۹۹/۱	۹۸/۱	۱/۹
	P3	۹۷/۷		
گیلانی	P1	۹۸/۱		
	P2	۱۰۰	۹۸	۲
	P3	۹۶/۱		
صورتی	P1	۹۸/۸		
	P2	۹۶/۱	۹۸/۸	۱/۲
	P3	۹۸/۵		
خراسانی	P1	۹۷/۳		
	P2	۱۰۰	۹۶/۸	۳/۲
	P3	۹۳/۳		
بغدادی	P1	۹۹/۴		
	P2	۱۰۰	۹۹/۴	۰/۶
	P3	۹۹		

BSF: Band shearing frequency
WGS: Within-population genetic similarity
δ^2_G = Genetic Variance

حداکثر فاصله ژنتیکی بدون احتساب نااریبی بین جمعیتهای صورتی و گیلانی و مقدار آن ۰/۶۸۷۹ و حداقل آن بین جمعیتهای بغدادی و گیلانی و مقدار آن ۰/۴۹۴۸ بود (جدول ۲). حداکثر این فاصله با احتساب نااریبی باز هم بین جمعیتهای صورتی و گیلانی و مقدار آن ۰/۶۸۷۶ و حداقل آن نیز بین جمعیتهای بغدادی و گیلانی و مقدار آن ۰/۴۹۴۶ بود (جدول ۳). متوسط تنوع ژنی، تعداد جایگاههای چندشکل، درصد چند شکلی و متوسط تعداد موثر آللها در جمعیتهای مختلف در جدول ۴ و فراوانی ژنی موجود در جمعیتها نیز در جدول ۵ نشان داده شده است. در این جدول حداقل و حد اکثر فراوانی ژنی به ازای هر آغازگر در دو آلل غالب (۱) و مغلوب (۰) آورده شده است.

جدول ۲- مقادیر فواصل ژنتیکی بین جمعیتهای کرم ابریشم بدون احتساب نا اریبی (۷)

جمعیت	لیمویی	گیلانی	صورتی	خراسانی	بغدادی
لیمویی	×××××				
گیلانی	۰/۵۵۲۹	×××××			
صورتی	۰/۶۰۶۰	۰/۶۸۷۹	×××××		
خراسانی	۰/۵۳۵۹	۰/۵۰۶۴	۰/۶۶۱۴	×××××	
بغدادی	۰/۵۴۲۲	۰/۴۹۴۸	۰/۵۶۷۰	۰/۵۵۰۱	×××××

جدول ۳- مقادیر فواصل ژنتیکی بین جمعیتهای کرم ابریشم با احتساب نا اریبی (۸)

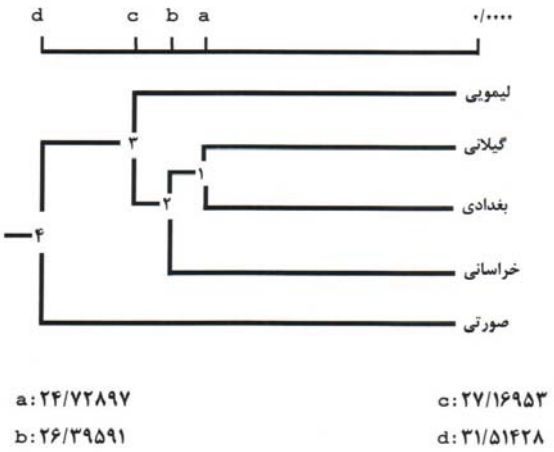
جمعیت	لیمویی	گیلانی	صورتی	خراسانی	بغدادی
لیمویی	×××××				
گیلانی	۰/۵۵۲۷	×××××			
صورتی	۰/۶۰۵۷	۰/۶۸۷۶	×××××		
خراسانی	۰/۵۳۵۵	۰/۵۰۶۰	۰/۶۶۱۰	×××××	
بغدادی	۰/۵۴۲۰	۰/۴۹۴۶	۰/۵۶۶۸	۰/۵۴۹۸	×××××

جدول۴- متوسط تنوع ژنی، تعداد جایگاههای چند شکل، درصد چند شکلی و متوسط تعداد موثر آللها (Ne) در جمعیتهای کرم ابریشم

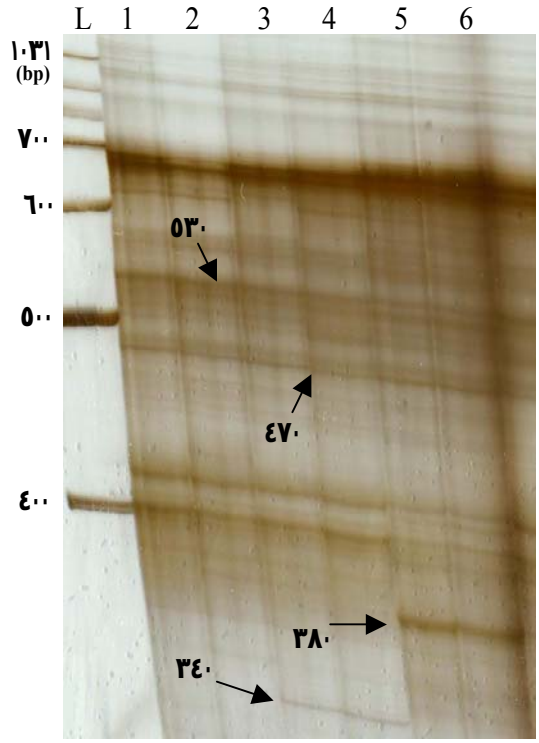
جمعیت	متوسط تنوع ژنی	تعداد جایگاه چند شکل	درصدچند شکلی	Ne متوسط ± SD
لیمویی	۰/۰۱۱۲	۶	۲/۸۴	۱/۰۱۸۹±۰/۱۱۴۴
گیلانی	۰/۰۱۷۳	۹	۴/۲۵	۱/۰۳۰۱ ±۰/۱۴۸۱
صورتی	۰/۰۱۶۳	۱۱	۵/۲۱	۱/۰۲۵۶±۰/۱۲۱۸
خراسانی	۰/۰۲۵۳	۱۳	۶/۱۶	۱/۰۴۷۵±۰/۲۰۱۵
بغدادی	۰/۰۱۰۳	۶	۲/۸۴	۱/۰۱۷۵±۰/۱۱۱۳

جدول ۵- فراوانی ژنی موجود در جمعیتها

آغازگر	غالب (۱)	مغلوب (۰)
P1	۰/۰۰۶۸ -۱	۰ -۰/۹۹۳۲
P2	۰/۰۱۷۴ -۱	۰ -۰/۹۸۲۶
P3	۰ -۰/۶	۰/۴ -۱



شکل ۳- دندروگرام به دست آمده از روش UPGMA برای جمعیتهای کرم ابریشم با احتساب نا اریبی



شکل ۴- پروفیل به دست آمده از نشانگرهای ISSR. در جمعیت خراسانی. فلشها نشان دهنده برخی باندهای چند شکل و تک شکل می باشند.

تعداد جایگاههای چند شکل شناخته شده توسط سه آغازگر، ۲۱۱ جایگاه که درصد جایگاههای چند شکل ۹۸/۵۸٪ بود. این مقدار چند شکلی دلیلی بر مناسب بودن نوع آغازگر انتخابی می باشد. متوسط تعداد موثر آللها برای جمعیتها و آغازگرها ۱/۵۹۹۵±۰/۲۵۷ بود. نزدیک بودن این عدد به تعداد آلل واقعی یعنی ۲ دلیلی بر تاثیر خوب آللها در چند شکلی بالا و برآورد تنوع ژنتیکی می باشد. لازم به ذکر است که تعداد موثر آللها (Ne[1]) با چند شکلی رابطه مستقیم دارد. همچنین متوسط تنوع ژنی (درون جمعیت) به دست آمده (۸) برای کل جمعیتها و آغازگرها برابر با ۰/۱۱۰۸ ±۰/۳۵۷۵ بود که دلیلی بر تنوع کم داخل جمعیتها می باشد.

پنج جمعیت مورد مطالعه پس از رسم دندروگرام به روش UPGMA در گروه های مجزا قرار گرفتند (شکل ۳).

بحث

در روش ISSR به انجام کلونینگ و توالی یابی ناحیه متصل به ریزماهواره که روشی پر هزینه است، نیاز نیست. نتایج آزمایشها این نشانگر را به عنوان ابزاری مفید در نقشه یابی ژنتیکی کرم ابریشم و انگشت نگاری ژنتیکی پیشنهاد می کنند. این روش داده هایی حاوی اطلاعات مفید، سریع، قابل تکرار و ارزان ارائه می‌نماید. آی‌اس‌آر نشانگر مولکولی با کاربرد آسان است که به DNAی الگوی کمی نیاز دارد. جدا شدن مندلی نشانگرهای آی‌اس‌آر به طور واضح بر کاربرد گسترده آن در ژنتیک کرم ابریشم تاکید می‌کند. از این رو روشی عالی برای نقشه یابی ژنتیکی کرم ابریشم می‌باشد (۹).

دندروگرام به دست آمده به روش UPGMA پنج جمعیت مورد مطالعه را در گروههای متفاوتی قرار داده است. دو جمعیت لیمویی و صورتی مجزا از سه جمعیت دیگر قرار گرفتند. پس از مطالعه در مورد جمعیت لیمویی و بررسی برخی صفات مورفولوژیک مشخص شد که این جمعیت از نظر صفاتی مانند اندازه لاروها، شکل و رنگ و اندازه پیله، سهولت پرورش، مقاومت و غیره کاملا از دیگر جمعیتها متفاوت است.

در بررسی تحقیقات انجام شده دیگر در کشورمان دیده شد که تعداد کم افراد انتخاب شده در هر نسل و آمیزش خویشاوندی شدید و کوشش شرکت سهامی پرورش کرم ابریشم در تثبیت برخی صفات نظیر رنگ پیله، موجب شده است که تنوع درون گروهی این جمعیت ها شدیدا کاهش یابد، به طوری

1. Effective number of alleles

که توده بغدادی کمترین تنوع درون گروهی را در سایر گروه ها دارد، نکته حائز اهمیت این است که در تحقیق انجام شده توسط دلیرصفت با استفاده از نشانگرهای AFLP[1] به نتایج مشابه برخورد می کنیم (۱)، در حالی که در تحقیقی که میرحسینی با استفاده از نشانگرهای RAPD[2] انجام داد، عکس این نتیجه به دست آمده است (۳) که این اختلاف می تواند به دلیل متفاوت بودن نشانگر انتخابی، تعداد نمونه و تعداد آغازگر باشد.

همچنین بررسی انجام شده روی خصوصیات تولیدی جمعیت لیمویی نشان داد که از نظر برخی صفات تولیدی نیز کاملا از دیگر جمعیتها متمایز می باشد. به طوری که از نظر وزن پیله، وزن پیله نر و ماده با شفیره، متوسط وزن قشر پیله نر و ماده و درصد قشر ابریشمی (۱۰۰×(متوسط وزن پیله نر و ماده / متوسط قشر پیله نر و ماده)) که از پارامترهای اقتصادی پیله ابریشم می باشند، در سطح پایین تری نسبت به چهار جمعیت دیگر قرار داشت (جدول ۶). همچنین جمعیت صورتی که خود در شاخه‌ای مجزا از بقیه قرار داشت، تفاوت قابل توجه‌ای با دیگر جمعیتها از نظر درصد قشر ابریشمی و متوسط قشر پیله (نر و ماده) داشت (جداول ۵ و ۶).

دو جمعیت خراسانی و گیلانی با فاصله نزدیکی از هم قرار گرفته بودند که پس از تحقیق مشخص شد قبل از سالهای ۱۳۵۸-۱۳۵۷ جمعیت گیلانی در موسسه پرورش کرم ابریشم پرورش داده نمی شد، اما در این سالها این جمعیت که از نظر صفات مورفولوژیک بسیار شبیه به جمعیت خراسانی بود از روستاهای شهرستان آستانه در استان گیلان جمع آوری شد. بنابر این می توان حدس زد این دو جمعیت دو اکوتیپ باشند که به دلیل جدا بودن منطقه جغرافیایی و زیستگاه طی سالیان متمادی و احتمالا رخ دادن برخی جهشها از یکدیگر جدا شده اند که این موضوع به تحقیق و بررسی بیشتری نیاز دارد. نکته حائز اهمیت این است که در بررسی های به عمل آمده دیگر نیز به نتایج مشابهی برخورد می کنیم (۱، ۳).

جدول ۶- مقایسه برخی صفات تولیدی در جمعیتها

جمعیت	وزن پیله	درصد قشر ابریشم	متوسط وزن پیله با شفیره	متوسط قشر پیله
لیمویی	۱/۴	۱۵/۴	۱/۳۹۵	۰/۲۱۵
گیلانی	۱/۶	۱۵/۶	۱/۶۲	۰/۲۵۳
صورتی	۱/۵	۱۹/۸	۱/۵۴۵	۰/۳۰۴۵
خراسانی	۱/۵	۱۷/۳	۱/۵۴۵	۰/۲۶۷
بغدادی	۱/۸	۱۵/۱	۱/۸	۰/۲۷۱۵

سپاسگزاری

از آقای دکتر سید ضیاءالدین میرحسینی ریاست محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، آقای دکتر جوار گودا ناگاراجو (Javare Gowda Nagaraju) رئیس آزمایشگاه ژنتیک مولکولی بنگلور هندوستان، آقای مهندس غلامی مسؤول بخش اصلاح مؤسسه تحقیقات و پرورش کرم ابریشم به دلیل همکاریهای ایشان در مراحل نمونه برداری و دکتر فرامرز علی نیا و مهندس علی اکبر عبادی به ترتیب رئیس و محقق مؤسسه تحقیقات برنج کشور به جهت همکاریهای لازم تشکر می شود.

از همکاری آقای مهندس بنیامین دلیرصفت مسؤول آزمایشگاه ژنتیک دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان سپاسگزاری می شود.

1 . Amplified Fragment Length Polymorphism

2. Random Amplified Polymorphic DNA

منابع مورد استفاده REFERENCES

۱. دلیرصفت، س.ب. ۱۳۸۲. بررسی تنوع ژنتیکی توده های بومی کرم ابریشم ایران با استفاده از نشانگرهای AFLP (تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر). رساله دوره کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج. ۷۹ صفحه.

۲. قره یاضی، ب. ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای دی ان آ در اصلاح نباتات. ارائه شده در چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۳. میرحسینی، س.ض. ۱۳۷۷. بررسی تنوع ژنتیکی کرم ابریشم ایران با استفاده از نشانگرهای پروتئینی و DNA. رساله دوره دکتری. دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس. ۱۰۰ صفحه.

4. Hamada, H., M. Petrino, & T. Kakunaga. 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79: 6465-6469.
5. Mita, K. M. Morimyo, K. Okano, Y. Koike, J. Nohata, M. G. Suzuki, & T. Shimada. 2002. Construction of an EST database for *Bombyx mori* and its applications. Current Science, 83: 426-431.
6. Nagaraju, J. G. & L. Singh. 1997. Assessment of genetic diversity by DNA profiling and its significance in silkworm (*Bombyx mori)*. Electrophoresis, 18: 1676-1681.
7. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, 106: 283-292.
8. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics., 89: 583-590.
9. Reddy, K.D., J. Nagaraju, & E.G. Abraham. 1999. Genetic characterization of the silkworm (*Bombyx mori)* by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR. Heredity., 83: 681-687.
10. Suzuki, Y., L. Gage, & D.D. Brown. 1972. The gene for silk fibron in *Bombyx mori*. J. Mol. Biol., 70: 637-649.
11. Zietkiewicz, E., A. Rafalski, & D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple-sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176-183.