مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۶، سال ۱۳۸۴

معرفی خصوصیات بیوشیمیایی و تولیدی کرم ابریشم‌های بومی ایران

کیوان اعتباری[1] و سیدحسین حسینی مقدم[2]
۱، ۲، اعضای هیات علمی گروه پژوهشی کرم ابریشم، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۱۱/۲۱

خلاصه

توده‌های کرم ابریشم بومی ایران اگرچه در تولید تجاری جایگاهی ندارند ولی به عنوان ذخائر ژنتیکی ایران بسیار حائز اهمیت هستند. در این تحقیق سطوح فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آلانین‌آمینو ترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز و همچنین مقدار گلوکز، کلسترول و پروتئین تام همولنف پنج توده گیلانی، خراسانی، بغدادی، صورتی و لیمویی اندازه گیری شد. نتایج موید آنست که اختلافات معنی داری در خصوص مقدار ترکیبات حاضر در بین ۵ توده بومی وجود دارد. همچنین توده صورتی به ترتیب با میانگین وزن پیله و قشر ۱/۸۳۰ و ۰/۳۶۱ گرم بالاترین مقدار تولید و گروه خراسانی به ترتیب با متوسط وزن پیله و قشر ۱/٤٦٧ و ۰/۲٦۰ گرم کمترین مقدار تولید را به خود اختصاص دادند. تجزیه خوشه‌ای گروه‌ها تحت مدل UPGMA بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، توده های صورتی و گیلانی را در یک گروه جای داد و سه گروه بغدادی، لیمویی و خراسانی هم نه تنها بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی بلکه با تلفیق کلیه داده‌ها بیشترین شباهت درون گروهی را داشتند.

واژه‌های کلیدی: کرم ابریشم، نشانگرهای بیوشیمیایی، تجزیه خوشه‌ای

مقدمه

استفاده از نشانگرهای مختلف به منظور تعیین تنوع زیستی درون‌گونه‌ای و شناخت چندشکلی ژنتیکی همواره مورد توجه محققین بوده است (۱، ۱۲،۱۰). ارزیابی تنوع زیستی در کرم ابریشم و شناخت تفاوتهای بین لاینهای تولیدی در برنامه‌های اصلاح نژادی بسیار مورد توجه است. استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی به عنوان ابزاری برای دستیابی به تفاوتها وشباهتهای بین جمعیتهای مختلف یک موجود مطرح می‌باشد. به عبارت دیگر برخی از ماکرومولکولهای بیوشیمیایی که قادرند تفاوت بین دو گونه یا بیوتیپ یک گونه را نشان دهند در این مبحث بسیار حائز اهمیت هستند و امروزه کاربردهای وسیع و جالب توجه‌ای در حشره‌شناسی پیدا نموده‌اند.

بارتلت (۱۹۸۹) از این نشانگرهای بیوشیمیایی برای شناسایی و وجود تفرق خصوصیات زیستی در گونه‌های مختلف لارو هلیوتیس استفاده نمود. لوکسدال و بروکز (۱۹۹۰) از همین نشانگرها برای شناسایی بیوتیپ‌های شته سبز شاه‌توت[1] استفاده کردند. از نشانگرهای بیوشیمیایی برای شناسایی نژادهای مقام به آفتکش‌ها نیز استفاده می‌شود. شکوری و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند که سطوح فعالیت دو آنزیم آلانین و آسپارتات آمینو ترانسفراز در حشرات کامل نژادهای مقاوم به مالاتیون سوسک آرد بیشتر از نژادهای حساس آن می باشد.

طی سالیان دراز پرورش کرم ابریشم و وارد شدن ذخیره ژنتیکی این حشره مفید از مناطق مختلف نظیر چین، ژاپن، هند، تایلند و ... به سایر مناطق ابریشم خیز دنیا سبب گشته تا

مکاتبه کننده: کیوان اعتباری e-mail: etebari@guilan.ac.ir

1. *Sitobion avenae*

تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در این گونه مشاهده گردد و این زمینه‌ای برای اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی محسوب می‌شود (۱۰، ۱۱).

بسیاری از آنزیمهای موجود در همولنف و مایع معده‌ای کرم ابریشم بعنوان یک نشانگر بیوشیمیایی مناسب در اصلاح نژاد کرم ابریشم مطرح می‌باشند. اندازه گیری دو آنزیم آلفا آمیلاز و اینورتاز توانست جمعیت‌های کرم ابریشم را به دو گروه دو نسله با خصوصیات تولیدی ابریشم بالا و گروه جمعیت‌های چند نسله با صفات تولیدی پائین تقسیم بندی نماید(۱۰). کاتارجی و همکارانش (۱۹۹۳) نشان دادند که همبستگی معنی‌داری بین برخی از پارامترهای بیوشیمایی همولنف و مایع معده‌ای لاروهای کرم ابریشم با صفات زیستی و تولیدی این حشره وجود دارد، که از مهمترین آنها می‌توان به آمیلاز و اینورتاز و آلکالین فسفاتاز اشاره نمود.

توده‌های بومی کرم ابریشم ایران در سطح تجاری تولیدات ابریشم کشور دخالت ندارند و فقط برای حفظ ذخائر ژنتیکی بومی ایران نگهداری می‌شوند. متاسفانه مطالعات محدودی بر روی این گروه‌ها صورت گرفته است و استعداد آنها خصوصا سازگاری با شرایط محیطی ایران و مقاومت به بیماری‌های آن بررسی نشده است. 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 جمعیت‌ها شدیدا کاهش یابد (۵، ۶ ، ۸). امروزه حفظ ذخائر ژنتیکی از مسائل مهم برای دست اندرکاران مسائل ژنتیکی و اصلاح نژاد کشورها خصوصا کشورهای در حال توسعه محسوب می‌گردد. متاسفانه شرایط فعلی به ضرر ذخائرژنتیکی کرم ابریشم بومی ایران در جریان می‌باشد. حفظ تنوع موجود نه تنها ضروریست بلکه باید برای یافتن توده‌های بومی بیشتر که احتمالا در مناطق مختلف کشور پراکنده اند و همچنین جمع آوری و حفظ آنها اقدامات موثری صورت پذیرد (۵، ۸).

بنابراین تهیه شناسنامه زیستی و بیوشیمیایی برای توده‌های بومی موجود در بانک ژن ایران به عنوان یکی از ابزارهای تصمیم‌گیری در فرآیند انتخاب و شرکت در برنامه‌های اصلاح نژادی اساس این تحقیق بوده و در این راستا خصوصیات زیستی و بیوشیمیایی ۵ توده بومی ایران مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش توده‌هاي بومي كرم ابريشم

لاروهای کرم ابریشم از پنج جمعیت بومی با عناوین مصطلح گیلانی، خراسانی، بغدادی، صورتی و لیمویی که از آغاز تا پایان سنین لاروی از برگ واریته شین‌ایچه نویسه تغذیه نموده و تحت شرایط دمای و رطوبتی استاندارد و یکسان پرورش یافته بودند بعنوان جوامع آزمایشی انتخاب شدند. معیارهای مربوط به صفات تولیدی پیله شامل وزن پیله و وزن قشر ابریشمی برای حشرات نر و ماده بر اساس روشهای استاندارد محاسبه شد(۱۷).

استخراج همولنف

در پنجمین روز سن پنجم لاروی از هر لاین ۲۰ لارو بطور تصادفی انتخاب گردید. همولنف لاروها با استفاده از برش عرضی یکی از پاهای شکمی جمع آوری گردید. برای جلوگیری از فعالیت آنزیم پروفنل اکسیداز و ملانیزه شده همولنف مقداری فنیل تیو اوره به نمونه‌ها اضافه شد(۳۰). سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شدند (۱۹). مایع رویی نمونه‌ها جمع آوری و به لوله‌های جدید منتقل و تا شروع آزمایشات در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی با روشهای آنزیمی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و اتوآنالایزر RA-1000 انجام پذیرفت.

اندازه‌گيري‌هاي بيوشيميايي

برای این منظور پروتئین به روش بیوره و با استفاده از کیت اندازه گیری پروتئین تام (شرکت زیست شیمی-تهران) مورد سنجش قرار گرفت. در این روش پروتئین‌ها با محلول قلیایی مس تشکیل کمپلکس آبی متمایل به بنفش داده که میزان جذب آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر، نسبت مستقیم با مقدار پروتئین همولنف دارد. برای اندازه گیری کلسترول کل همولنف بر اساس روش ریکموند (۲۴) عمل گردید. اصول این روش بر مبنای هیدرولیز استرهای کلسترول توسط آنزیم‌های کلسترول اکسیداز، کلسترول استراز و پراکسیداز پایه گذاری شده است. گلوکز نیز به روش سایگرت (۲۸) اندازه گیری شد. دو آنزیم

آلانین آمینو ترانسفراز[1] و آسپارتات آمینو ترانسفراز[2] با روش تغییر یافته توماس(۳۱) اندازه گیری شد. برای اندازه گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز[3] از روش می‌هارا و همکاران(۱۹۸۸) استفاده شد. در این روش از پی ـ نیترو فنیل فسفات به عنوان پیش ماده اندازه‌گیری آنزیم استفاده گردید و جذب نوری در ۴۰۰ نانومتر قرائت گردید.

تجزیه و تحلیل آماري

کلیه داده‌ها برای دستیابی به حداقل اختلاف معنی‌دار در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از آزمون توکی و تحت نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند(۲۶). برای تجزیه خوشه‌ای داده‌ها[4] از نرم افزار SPSS استفاده شده و توده‌های کرم‌ابریشم بومی بر اساس نتایج حاصل از خصوصیات بیوشیمیایی، صفات تولیدی و تلفیق کلیه داده‌ها طبقه بندی شدند. برای دستیابی به فاصله بین گروه‌ها از روش UPGMA[5] استفاده شد.گروه‌ها بر اساس مربع فاصله اقلیدسی از هم متمایز شدند(۲۵). این سیستم پیش از این برای خصوصیات بیوشیمیایی کرم ابریشم توسط کاتاراجی و همکاران (۱۹۹۳) استفاده شده بود.

نتایج

خصوصیات بیوشیمیایي

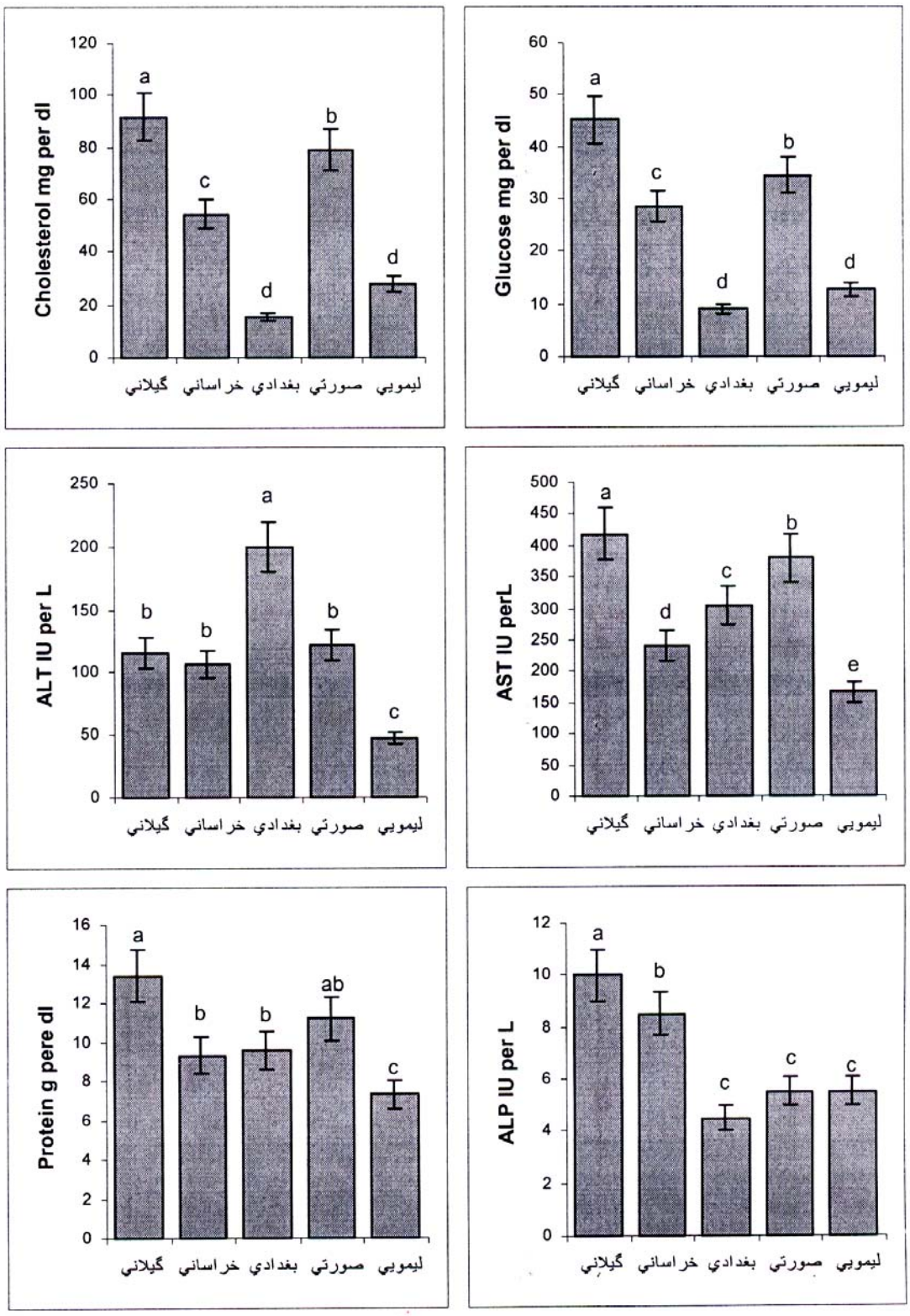
کلیه نتایج حاصل از تجزیه بیوشیمیایی همولنف لاروهای کرم ابریشم بومی ایران در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج موید آنست که اختلاف معنی داری بین داده‌ها در گروهای مختلف وجود دارد. نحوه تغییر مقدار دو ترکیب گلوکز و کلسترول در گروه های مختلف از یک الگو پیروی می‌کند بطوریکه مقدار این دو ترکیب در لاروهای گروه گیلانی به ترتیب با متوسط ۴۵/۲۵ و ۹۱/۵ میلی گرم بر دسی لیتر بالاترین حد را در بین سایر گروه ها دارا بودند. درحالیکه دو توده لیمویی و بغدادی پائین ترین مقدار این دو ترکیب را در همولنف خود نشان دادند. مقدار پروتئین تام همولنف در لاروهای گیلانی به مراتب بیشتر از سایرین بوده بطوریکه با میانگین۱۳/۴۷ گرم بر دسی لیتر اختلاف معنی داری با سایر گروه ها داشته و همچنین مانند دو ترکیب قبلی مقدار پروتئین نیز در لاروهای لیمویی کمتر از سایر گروه ها بود و ۷/۹۳ گرم بر دسی لیتر اندازه گیری شد.

در خصوص نحوه تغییر سطح فعالیت آنزیم AST در بین توده های مختلف وضعیتی مشابه پروتئین مشاهده می‌گردد. مقدار فعالیت این آنزیم در لاروهای گیلانی ۴۱۸/۵ واحد در لیتر ثبت شده است در حالیکه همین مقدار در توده لیمویی به ۱۶۷ واحد در لیتر کاهش پیدا نمود. با وجود اینکه مقدار فعالیت آنزیم ALT در لاروهای لیمویی۴۷/۲۵ واحد در لیتر محاسبه شده و کمترین مقدار را در بین سایر گروه ها داشته ولی در مورد این آنزیم سطوح فعالیت در توده های گیلانی، خراسانی و صورتی از نظر آماری یکسان قلمداد شده است. بنابراین مقدار فعالیت ALT در گروه های مختلف بین ۴۷/۲۵ تا ۱۹۹/۲۵ واحد در لیتر در نوسان بود. توده لیمویی از نظر فعالیت آنزیم ALP نیز مانند تمام ترکیبات دیگر جز گروه‌های کم فعال بوده ولی در این مورد از نظر آماری اختلاف معنی داری با دو توده صورتی و بغدادی نداشت. مقدار فعالیت ALP در توده های مختلف بین ۱۰-۴/۵ متغیر بود.

صفات توليدي

همانگونه که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است میانگین وزن پیله و قشر ابریشمی در گروه صورتی به ترتیب ۱/۸۳۰ و ۰/۳۶۱ گرم بیش از سایر گروه‌ها بوده و اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ با بقیه دارد. همچنین وزن قشر ابریشمی گروه لیمویی در دو جنس نر و ماده کمتر از سایرین بوده است. میانگین وزن پیله نر بین گروه‌های مختلف بین ۱/۳۰۵ گرم در توده خراسانی تا ۱/۶۶۰ در گروه صورتی متغیر بود. این در حالی است که الگوی تغییرات در حشرات ماده بسیار متفاوت بوده بطوریکه کمترین وزن پیله ماده مربوط به توده لیمویی است (۱/۷۰۰ گرم) و بیشترین آن از توده صورتی معادل ۲/۰۱۳ گرم محاسبه شده است.

1. Alanine Aminotransferease (ALT) (EC 2.6.1.2)
2. Asparate Aminotransferase (AST) (EC2.6.1.1)
3. Alkaline Phosphatase (ALP) (EC 3.13. 1)
4. Agglomerative hierarchical clustering
5. Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic average



شکل ۱- مقایسه میانگین (±SE) مقدار ترکیبات بیوشیمیایی اندازه گیری شده در پنج گروه کرم ابریشم بومی ایران

ستونهایی که با حداقل یک حرف مشترک نشان داده شدند هیچگونه اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند.

ALP: Alkaline Phosphatase; AST: Aspartate Aminotransferase; ALT: Alanine Aminotransferase

جدول ۱- مشخصات پیله در ۵ توده بومی کرم ابریشم ایران تغذیه شده با واریته شین ایچه نویسه (گرم)

تودهای کرم ابریشم	پیله نر (SE ± میانگین)		پیله ماده (SE ± میانگین)		میانگین جمعیت‌ها	
	وزن پیله	وزن قشر	ورن پیله	وزن قشر	ورن پیله	وزن قشر
گیلانی	۱/۴۰۴±۰/۱۲b	۰/۲۴۵±۰/۰۲c	۱/۷۴۲±۰/۱۳c	۰/۲۵۹±۰/۰۳cd	۱/۵۷۳bc	۰/۲۵۲bc
خراسانی	۱/۳۰۵±۰/۱۱ d	۰/۲۵۹±۰/۰۲b	۱/۶۳۰±۰/۱۳d	۰/۲۶۲±۰/۰۲bc	۱/۴۶۷d	۰/۲۶۰b
بغدادی	۱/۳۷۰±۰/۱۰ c	۰/۲۵۱±۰/۰۳b	۱/۸۰۶±۰/۱۲bc	۰/۲۷۹±۰/۰۲b	۱/۵۸۸b	۰/۲۶۵b
صورتی	۱/۶۶۰±۰/۱۲a	۰/۳۵۶±۰/۰۲a	۲/۰۱۳±۰/۱۸a	۰/۳۶۷±۰/۰۲a	۱/۸۳۰a	۰/۳۶۱a
لیمویی	۱/۴۰۷±۰/۱۲b	۰/۲۳۴±۰/۰۲d	۱/۷۰۰±۰/۳۰c	۰/۲۴۷±۰/۰۳d	۱/۵۵۳c	۰/۲۴۰c

اعداد در ستونها که با حداقل یک حرف مشترک نشان داده شدند هیچگونه اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند.

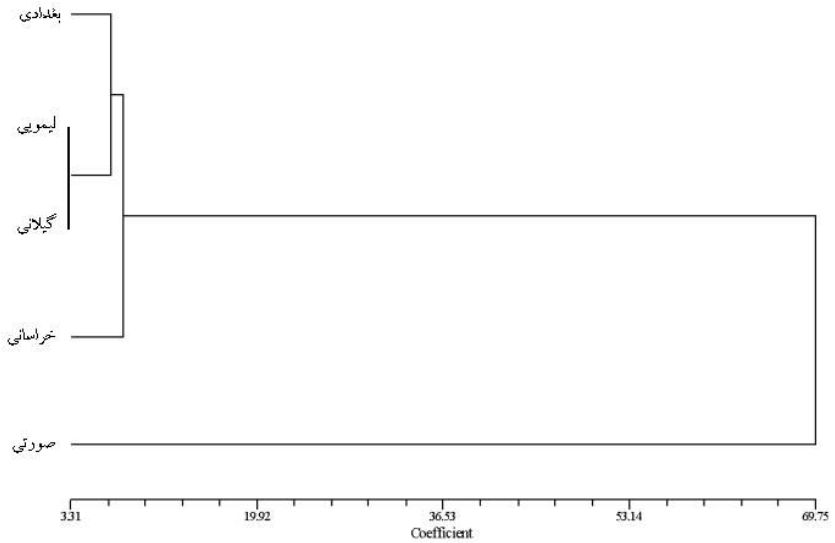
تجزیه خوشه‌ای توده‌ها

توده‌های بومی بر اساس خصوصیات صفات تولیدی، بیوشیمیایی و تلفیق کلیه داده‌ها مورد تجزیه خوشه‌ای قرار گرفتند که به ترتیب دندروگرام حاصل در شکلهای ۲ الی ۴ ارائه شده است.

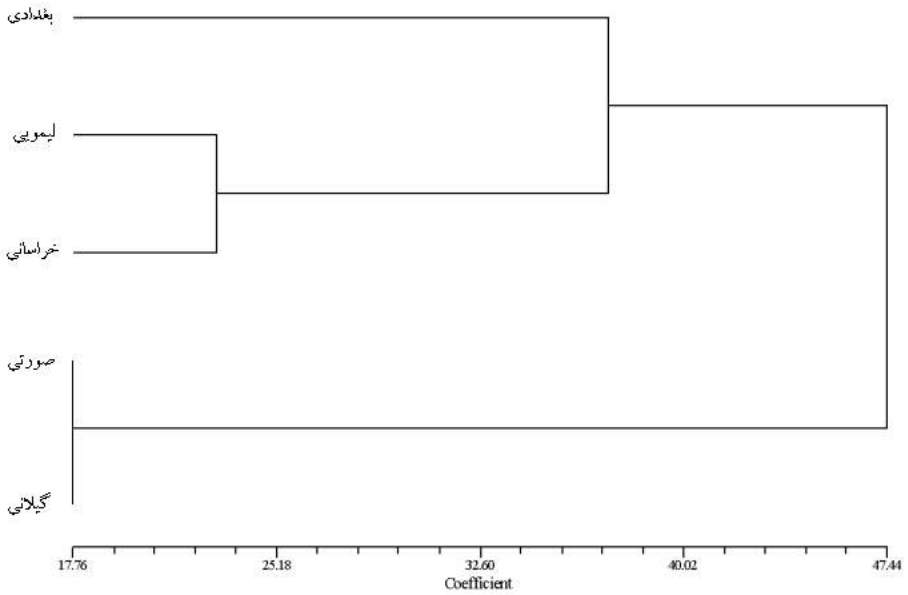
همانگونه که در شکل شماره دو نشان داده شده است و با توجه به جدول ۱ توده صورتی اختلاف قابل ملاحظه‌ای با سایر گروه ها داشته و در یک گروه متمایز قرار گرفته است. مربع فاصله اقلیدسی این توده با گروه خراسانی ۸/۲۴۳۶ بوده بطوریکه بیشترین تفاوت درون گروهی را نشان می‌دهند(جدول ۲). در این بین همانگونه که در شکل شماره ۲ ملاحظه می‌گردد کمترین تفاوت مربوط به توده‌های گیلانی و لیمویی بود بطوریکه آنها در یک کلاستر قرار گرفتند.

تجزیه خوشه‌ای این گروه از حشرات با استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی موید آنست که کمترین تفاوت میان گروهی مربوط به تودهای گیلانی و صورتی است(شکل ۳). هرچند که مربع فاصله اقلیدسی میان گروه گیلانی با دو توده بغدادی و لیمویی که به ترتیب ۷/۶۷۵۵ و ۷/۶۰۰۲ بوده موید بیشترین تفاوت‌های میان گروهی در بین تودهای بومی ایران است(جدول ۳). در صورتیکه کلیه دادهای حاصل از مطالعات بیوشیمیای با رکوردهای تولیدی هم ارزش تلقی شده و در محاسبات تجزیه خوشه‌ای لحاظ گردند نتایج حاکی از آنست که توده صورتی در ابتدا از سایر گروه ها متمایز می گردد(شکل ۴).

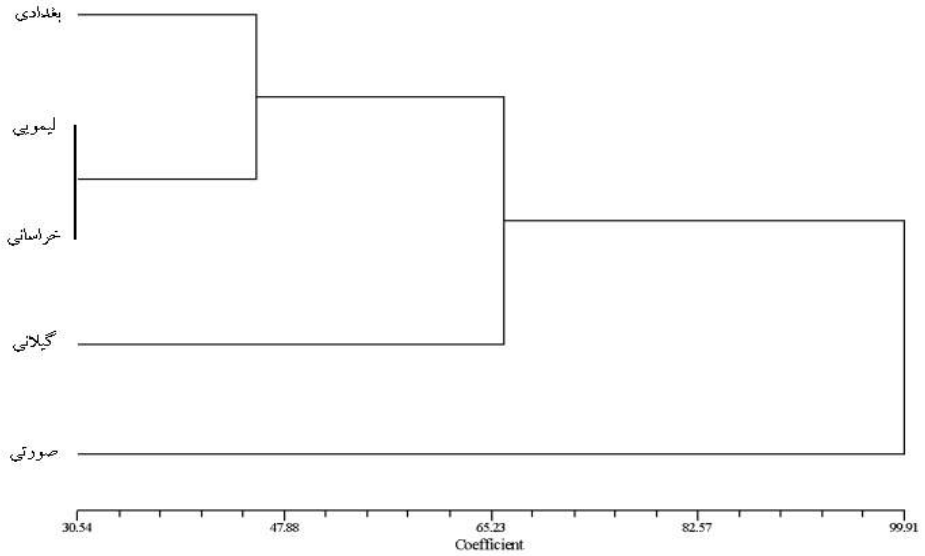
با توجه به دو شکل ۲ و ۳ نیز چنین انتظار می‌رفت که این گروه از لاروهای بومی ایران بیشترین تفاوت را با سایرین داشته باشند. در این بین بیشترین فاصله معادل ۹/۲۸۶۶ مربوط به دو توده صورتی و بغدادی محاسبه شده است (جدول ۴). هرچند که کمترین فاصله میان گروهی هم بین دو گروه صورتی و خراسانی ملاحظه می گردد.



شکل ۲- تجزیه خوشه ای تودههای بومی ایران براساس صفات تولیدی(وزن پیله و قشرابریشمی) تحت مدل UPGMA



شکل۳- تجزیه خوشه ای توده های بومی ایران براساس خصوصیات بیوشیمیایی اندازه گیری شده تحت مدل UPGMA



شکل۴- تجزیه خوشه ای توده های بومی ایران براساس تلفیق کلیه خصوصیات بیوشیمیایی و تولیدی تحت مدل UPGMA

جدول ۲- ماتریس مربع فاصله اقلیدسی توده های بومی ایران برحسب صفات تولیدی

	بغدادی	لیمویی	صورتی	گیلانی	خراسانی
بغدادی	۰				
لیمویی	۸/۷۲۱۰	۰			
صورتی	۵/۶۷۵۰	۷/۹۶۳۲	۰		
گیلانی	۴/۹۸۵۵	۳/۳۱۱۷	۶/۰۱۶۳	۰	
خراسانی	۷/۶۷۹۷	۷/۵۴۲۷	۸/۲۴۳۶	۸/۷۷۶۰	۰

جدول ۳- ماتریس مربع فاصله اقلیدسی توده های بومی ایران برحسب خصوصیات بیوشیمیایی

	بغدادی	لیمویی	صورتی	گیلانی	خراسانی
بغدادی	۰				
لیمویی	۳/۸۲۶۶	۰			
صورتی	۳/۶۱۵۱	۴/۴۷۱۲	۰		
گیلانی	۷/۶۷۵۵	۷/۶۰۰۲	۱/۷۷۵۹	۰	
خراسانی	۳/۶۳۲۱	۲/۲۹۹۶	۲/۲۰۷۸	۲/۸۹۹۲	۰

جدول ۴- ماتریس مربع فاصله اقلیدسی توده های بومی ایران با احتساب کلیه صفات تولیدی و بیوشیمیایی

	بغدادی	لیمویی	صورتی	گیلانی	خراسانی
بغدادی	۰				
لیمویی	۴/۶۹۸۷	۰			
صورتی	۹/۲۸۶۶	۱/۲۴۳۴	۰		
گیلانی	۸/۱۷۴۰	۷/۹۳۱۴	۷/۷۹۲۲	۰	
خراسانی	۴/۴۰۰۱	۳/۰۵۳۹	۱/۰۴۵۱	۳/۷۷۶۸	۰

بحث

نشانگرهای بیوشیمیایی نقش مهمی در گروه بندی موجودات مختلف داشته و تحقیقات بسیاری بر روی آنها انجام گرفته است(۱، ۹، ۱۰، ۱۶، ۱۸). ایزوآنزیم ها مثالهای موفق از نشانگرهای بیوشیمیایی بوده که تاکنون هم کاربردهای قابل توجهی داشته‌اند (۱۲). در این میان استفاده از سطوح ترکیبات بیوشیمیایی مختلف خون جمعیتهای گوناگون به منظور دستیابی به تنوع درون گونه‌ای کمتر مورد توجه قرار گرفته‌است. هر چند که پیش از این هم با اندازه گیری سطوح برخی از ترکیبات بیوشیمیایی همولنف و مایع معده میانی کرم ابریشم توانستند به بررسی تنوع درون گونه‌ای این موجودات بپردازند (۱، ۱۰، ۲۱).

پاتاناک و داتا (۱۹۹۵) نشان دادند که آنزیم آلفا آمیلاز توانسته بعنوان یک نشانگر مطلوب در برنامه‌ریزی‌های اصلاح نژادی ایفای نقش نماید. کاتاراجی و همکاران (۱۹۹۲) علاوه بر تعدادی از آنزیم‌ها از تری‌هالوز نیز به عنوان یک نشانگر استفاده نمود. در مطالعه اخیر نیز سه ترکیب غیرآنزیمی نظیر گلوکز، کلسترول و پروتئین توانستند اختلافات بین توده‌ها را به خوبی نشان دهند. ترکیبات مذکور از ماکرومولکولهایی هستند که ارتباط مستقیم با نحوه تغذیه و عملکرد سیستم گوارشی دارند. عموما لاروهایی که از تغذیه مطلوب‌تری برخوردار بوده و همچنین قابلیت جذب بهتری داشته باشند سطوح این ترکیبات در آنها افزایش می‌یابد(۱۳،۲۷). هرچند که عوامل بسیار زیادی نظیر سن لاروی، تنشهای ناشی از بیماری و گرسنگی، نوع واریته توت مورد تغذیه بر فراوانی این ماکرومولکولها تاثیر دارند (۲). همچنین علاوه بر عوامل فوق اثر نژاد و جمعیتهای مختلف را نیز می‌توان در تغییرات این ترکیبات در نظر گرفت. بنابراین از آنجائیکه کلیه لاروها از برگ یک واریته توت تغذیه شدند تغییرات سطح کلسترول، گلوکز در خون این سری از حشرات بی‌ارتباط با کارآیی سیستم جذب نمی‌باشد. در نتیجه ارزیابی شاخص‌های تغذیه‌ای نیز می‌تواند در گروه‌های مختلف اندازه گیری شود و با داده های حاصل از بررسی‌های بیوشیمیایی مقایسه گردد.

عموما از آنجائیکه آنزیمهای بدن موجودات دارای منشاء ژنی می‌باشند تاثیر نژاد و جمعیت بیش از دیگر متغییرها در نوسانات آنها لحاظ می‌گردد. هرچند که فعالیت این آنزیم‌ها تحت تاثیر عوامل بسیار زیاد دیگری نیز قرار دارند و حتی مقدار و میزان فعالیت آنها در بافتها و اندامهای مختلف بدن یک موجود نیز متفاوت است. هوری و ناکامورا (۱۹۸۶) دریافتند که فعالیت مقدار آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در غده ابریشمی کرم ابریشم به مراتب بیشتر از معده میانی و بافت چربی است در حالیکه بیشترین مقدار فعالیت آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز را از بافت چربی گزارش نمودند. تحقیقات نشان داده که الگوی ایزوآنزیمی آنزیم AST قادر است اختلاف بین دو گونه ساقه خوار*Chilo* sp را به راحتی نشان دهد(۱۶).

ردی و همکاران (۱۹۹۲) نشان دادند که پارازیته شدن لاروهای سن پنجم کرم ابریشم توسط مگس یوزی[1] سبب افزایش مقدار دو آنزیمAST وALT در بافت چربی و همولنف لاروها می‌گردد. افزایش دمای محیط نیز سبب بالا رفتن مقدار فعالیت این دو آنزیم می‌گردد(۲۳). رژیم غذایی و نوع برگ مورد تغذیه نیز می‌تواند تاثیر زیادی بر روی سطوح فعالیت آنزیمی بر جای گذارد. هنگامیکه لاروهای نوعی کرم ابریشم وحشی موسوم به اری[2] از برگهای *Heteropanax fragrans* تغذیه نماید مقدار فعالیت دو آنزیم مزبور در بدن این لاروها بسیار بیشتر از زمانی است که لاروها از برگهای گیاه کرچک[3] تغذیه نمایند(۱۴).

اعتباری و همکاران (۱۳۸۳) پیش از این نشان داد که سطح فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در بین ۸ لاین تجاری کرم ابریشم

1. *Exorista sorbillans*
2. *Philosamia ricini*
3. *Ricinus communis*

با منشاء ژاپنی و چینی هیچگونه اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. ولی تحقیقات اخیر تفاوت قابل ملاحظه‌ای را در سطوح فعالیت این آنزیم نشان می‌دهد. کاتارجی و همکاران (۱۹۹۳) مقدار این آنزیم را در لاروهای جمعیت های مختلف کرم ابریشم بین ۵/۶۱ تا ۳۳/۵۳ واحد در لیتر اندازه‌گیری نمودند. همچنین مقدار فعالیت این آنزیم همبستگی مثبت با خصوصیات پیله شامل وزن پیله و وزن قشر ابریشمی از خود نشان می‌دهد. وزن لاروی نیز همبستگی مثبتی با مقدار آنزیم آلکالین فسفاتاز داشته است. هرچند که فصل پرورش می‌تواند تاثیراتی بر این ضرایب همبستگی داشته باشد.

در تحقیق حاضر سعی گردید لاروها در شرایط کاملاً همگن و استاندارد شده‌ای پرورش یابند و در تمام طول دوره لاروی از برگ یک نوع واریته توت تغذیه نمایند. همچنین زمان نمونه برداری و استخراج همولنف نیز برای کلیه گروه ها بصورت همزمان صورت گرفت تا نتایج دارای کمترین تاثیرات محیطی باشد. شاید بتوان چنین ادعا نمود که عوامل بیان شده باعث گردیده که نشانگرهای بیوشیمیایی کمتر مورد توجه قرار گیرند. ولی مقایسه نتایج حاصل از این گونه مطالعات با سایر نشانگرهای مبتنی برDNA بسیار حائز اهمیت است. میرحسینی و همکاران (۱۳۷۷) با استفاده از نشانگرهای RAPD تعدادی از لاینها و توده‌های بومی کرم‌ابریشم ایران را مورد بررسی قرار داد. نتایج حاکی از آنست که توده‌های لیمویی و بغدادی بیشترین و بغدادی با گیلانی کمترین تشابه ژنتیکی را دارند. با توجه به شکل‌های ۲، ۳ و ۴ نیز می‌توان دریافت که کلیه پارامترها توانسته‌اند دو توده لیمویی و بغدادی را در یک گروه قرار دهند و کمترین فاصله و یا بیشترین شباهت را برای این دو توده خصوصیات بیوشیمیایی از بین متغیرها نشان دادند.

همچنین نتایج اخیر موید انست که دو توده بغدادی و گیلانی بیشترین فاصله را از یکدیگر دارند بطوریکه مربع فاصله اقلیدسی آنها برحسب خصوصیات بیوشیمیایی ۷/۶۷۵ و با احتساب کلیه متغیرها ۸/۱۷۴ محاسبه شده است. میرحسینی و همکاران(۱۳۷۷)مقدار تشابه این دو توده را ۳۸٪ گزارش نمودند.

تحقیقات دلیرصفت (۱۳۸۲) با استفاده از نشانگرهای AFLPنشان داد که گروه صورتی بیشترین تفاوت را با سایر توده های بومی ایران دارد و در این میان توده گیلانی به مراتب بیش از سایرین با آن فاصله ژنتیکی دارد. همچنین این نشانگرهای مبتنی بر DNA بیشترین شباهت را میان دو گروه گیلانی و خراسانی نشان دادند. در تحقیق حاضر نیز نشانگرهای بیوشیمیایی دو توده گیلانی و صورتی را از بقیه جمعیت‌ها جدا نمودند(شکل ۳) ولی برخلاف نتایج حاصل از نشانگرهای AFLP توده گیلانی را بسیار به صورتی نزدیک قلمداد کردند. هرچند اگر نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر حسب صفات تولیدی و تلفیق کلیه داده‌ها (شکل‌های ۲ و ۴) در نظر گرفته شود نتایج این تحقیق با بررسی دلیرصفت (۱۳۸۲) مطابقت دارد. بلواسی و همکاران (۱۳۸۳) نیز با استفاده از نشانگرهای میکروساتلایت توده صورتی را با بیشترین فاصله از جمعیت گیلانی معرفی می‌کند. این دو توده از نظر منشاء جغرافیایی نیز متفاوت هستند.

از بعد دیگر این نشانگرها توانستد گروه‌های مختلف را برحسب منشاء جغرافیایی از یکدیگر جدا کنند. دو توده خراسانی و لیمویی که هر دو از استان خراسان جمع‌آوری و به بانک ژن منتقل شده بودند در این بررسی در کنار یکدیگر قرار گرفتند و فاصله ژنتیکی کمی از خود نشان دادند. میرحسینی (۱۳۷۷) به دنبال طبقه بندی این توده‌ها بر حسب منشاء جغرافیایی بود ولی چنین نتایجی را تحقیقات مزبور نشان نداد. این محقق مهمترین عامل را در عدم اخذ چنین نتایجی را پایین بودن اندازه موثر جمعیت[1] در بانک ژن عنوان می کند و اعتقاد دارد که این امر موجب افزایش همخونی[2] در داخل هر یک از توده‌ها شده و در نتیجه افتراق و فاصله این گروه‌ها از یکدیگر بیشتر می‌شود. کاتارجی و داتا (۱۹۹۲) نیز با بکارگیری نشانگرهای بیوشیمیایی ۵۴ نژاد کرم ابریشم با منشاء جغرافیایی متفاوت طبقه‌بندی کردند. آنها نیز نتایج مشابهی در خصوص

1. Effective number

2 . Inbreeding

هم گروه شدن برخی از نژادهایی با منشاء جغرافیایی و نیز قرار گرفتن برخی از نژادهای هم منشاء در گروه‌های مختلف به دست آوردند.

با توجه به بررسی‌های انجام شده میزان اعتبار این نشانگرها تا حد قابل قبولی ارزیابی می‌گردد چراکه اعتباری و همکاران (۱) با استفاده از همین نشانگرها توانستند لاین تجاری ۱۰۴ را از سایر لاینها تفکیک نماید. نتایج مذکور با مطالعات میرحسینی و همکاران (۱۳۷۹) و بلواسی (۱۳۸۳) که به ترتیب با نشانگرهای RAPD و iSSR انجام شده بود مطابقت داشت.

طبقه بندی نژادهای کرم ابریشم در برنامه‌های اصلاح نژادی اهمیت زیادی دارد. پرورش تجاری این حشره مبتنی بر هیبریدهای حاصل از تلاقی لاینهای خالص صورت می‌گیرد. به دلیل وجود تعداد زیاد نژادها و همچنین استمرار تولید لاینهای جدید انجام تمام تلاقی‌های ممکن جهت دستیابی به بهترین هیبریدها و بیشترین قدرت هیبرید[1] و استفاده از خاصیت هتروزیس ممکن نیست(۶). لذا اینگونه طبقه‌بندی‌ها جهت تعیین بهترین کاندیدهایی که بتوانند با بیشترین فاصله ژنتیکی حداکثر مقدار هتروزیس را تولید کنند اهمیت زیادی دارند. اگر در نظر باشد در برنامه اصلاح نژادی یک خصوصیت مطلوب از یک لاینی با عملکرد بالا ولی ضعیف در این صفت انتقال پیدا کند بهتر است از لاینهایی با کمترین فاصله ژنتیکی انتقال داده شود تا کمترین دستکاری ژنتیکی در لاین برتر اتفاق افتد. بنابراین استفاده از این نشانگرها که هزینه بسیار اندکی را در بر خواهد داشت در کنار سایر آزمونها می تواند بسیار مفید باشد. همچنین با عنایت به اینکه در پرورش کرم ابریشم که شرایط محیطی یک عامل تعیین کننده می‌باشد، خصوصیاتی نظیر سازگاری با شرایط محیطی خصوصا مقاومت به بیماریهای منطقه‌ای از اهمیت زیادی برخوردارند، لذا باید توده‌های بومی ایران را شناسایی نمود و راجع به خصوصیات و ویژگی‌های آنها اطلاعات جامعی بدست آورد تا در صورت لزوم از ژنهای بومی در لاینها و واریته های تجاری 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.

1. Hybrid vigor

سپاسگزاری

این تحقیق از محل اعتبار پژوهشی طرح تحقیقاتی با عنوان «شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات تولیدی و ماندگاری در کرم ابریشم تحت شرایط مختلف ژنتیکی و محیطی» مصوب دانشگاه گیلان اجرا شده است. بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تقدیر به عمل می‌آید. همچنین مساعدتهای مرکز تحقیقات کرم ابریشم ایران در اجرای تحقیق تاثیر به سزایی داشت.

منابع مورد استفاده REFERENCES

۱. اعتباری، ک.، س. ض. میرحسینی، س. ح. حسینی مقدم، و م. ناصرانی. ۱۳۸۳. تغییرات درون گونه‌ای ۸ گروه کرم ابریشم (*Bombyx mori* L) با استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تبریز. صفحه ۴۴۳.

۲. اعتباری، ک. و ل. متین دوست. ۱۳۸۳. مطالعه تاثیر سن لاروی در میزان برخی از ماکرومولکولهای همولنف کرم ابریشم *Bombyx mori* L. (Lep. Bombycidae). نامه انجمن حشره شناسی ایران. جلد ۲۴، شماره ۱

۳. بلواسی، آ.، ا. باقری زنوز، ج. نوذری، و ز. انصاری. ۱۳۸۳. مقایسه ژنتیکی جمعیتهای کرم ابریشم ژاپنی و بومی ایران با استفاده از نشانگرهای میکروساتلایت. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تبریز. صفحه ۴۳۰

۴. بلواسی، آ. ۱۳۸۲. مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کرم ابریشم ایران با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره‌ها. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران. ۱۵۴ صفحه.

۵. دلیرصفت، س. ب. ۱۳۸۲. بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی کرم ابریشم ایران (*Bombyx mori* L.) با استفاده از نشانگرهای AFLP (تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات. ۱۸۳ صفحه.

۶. میرحسینی، س.ض. ۱۳۷۷. بررسی تنوع ژنتیکی کرم ابریشم‌های ایران با استفاده از مارکرهای پروتئینی و DNA. رساله دکتری، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۰۲ صفحه.
۷. میرحسینی، س.، آ. ترکمن زهی، ح. نادری منش، ع. مسعودی نژاد، و م. فیروزی. ۱۳۷۷. تهیه الگوی الکتروفورزی و تعیین چند شکلی پروتئینی چند توده و لاین کرم ابریشم ایران ، مجله دانش کشاورزی، جلد ۸. شماره ۱ و ۲، صفحات ۳۳-۱۹.
۸. میرحسینی، س.، ع. شادپرور. و م. مواج پور. ۱۳۷۹. بررسی خصوصیات ژنتیکی صفات اقتصادی کرم ابریشم بومی ایران. مجموعه مقالات هفتمین همایش علمی و پژوهشی دانشگاه گیلان، ۱۶۱- ۱۵۷.
9. Bartlett, A.C. 1989. The genetics of morphological and biochemical markers in two *Heliothis* species. *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica*. 24: 49-53.
10. Chatterjee S.N. & R. K. Data. 1992. Hierarchical clustering of 54 races and strain of mulberry silkworm, *Bombyx mori*: Significance of biochemical parameters. *Theor. Appl. Genet*. 85: 394-402.
11. Chatterjee, S.N., C. Rao, G. K. Chatterjee, S. K. Ashwath & A. K. Patnaik. 1993. Correlation between yield and biochemical parameters in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *Theor. Appl. Genet*. 87: 385-391.
12. Eguchi, M. 1995. Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp. Biochem. Physiol*. 111B: 151-162.
13. Etebari, K., R. Ebadi, & L. Matindoost. 2004. Effect of feeding mulberry's enriched leaves with ascorbic acid on some biological, biochemical and economical characteristics of silkworm *Bombyx mori* L., *Int. J. Indust. Entomol.* 8(1): 81-87.
14. Gogoi, R. & R. Yadav. 1995 Effect of host plants on some biochemical parameters of eri silkworm, *Philosamia ricini*, during its development. *Ind. J. Exp. Biol.* 33: 372-374.
15. Horie,Y. & M. Nakamura. 1986. Effect of dietary pyridoxine on alanine and aspartate aminotransferases in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Ento. Zool.* 21:164-170.
16. Kioko, E.N., W. A. Overholt, C. O. Omwega, & J. M. Mueke. 1995. Taxonomic significance of isoenzymes in two stem borers (Lepidoptera: Pyralidae) of maize and sorghum in Kenya. *Afric. Entomol*. 3: 167-171.
17. Lim, S.H., Y. T. Kim, S. P. Lee, I. J. Rhee, J. S. Lim & B. H. Lim. 1990. Sericulture training manual. FAO, Agricultural Services Bulletin, Rome. 94 p.
18. Loxdale, H.D. & C. P. Brookes. 1990. Temporal genetic stability within and restricted migration (gene flow) between local populations of the blackberry grain aphid *Sitobion avenae* in southeast England. *J Anim. Eco*. 59: 497-514.
19. Nath, B.S., A. Suresh, B. Mahendra Varma, & R. P. Kumar. 1997. Changes in Protein Metabolism in Hemolymph and Fat Body of the Silkworm, *Bombyx mori* L., in responce to Organophosphorus Insecticides toxicity, *Ecotoxicol. Envirno. Saf*. 36: 169-173.
20. Mihara, Y., A. Saito, K. Koga, & B. Sakaguchi. 1988. Changes in Alkaline phosphatase activity during embryogenesis, *J. Seric. Sci. Jpn* 52: 62-67.
21. Patnaik, A. & R. K. Datta. 1995. Amylase - its genetics and prospects as a marker in silkworm breeding. *Ind. J. Seric*. 34: 82-89.
22. Reddy, K.V., O. Devi, S. B. Magadum, K. V. Benchamin, & R. K. Datta. 1992. Uzi parasitisation: gluconeogenic precursor levels and related enzyme activity profiles in silkworm, *Bombyx mori* L. *Ind. J. Seric*. 31: 123-129.
23. Reddy, K.V. & K. V. Benchamin. 1992. Heat shock effect on testicular composition: a biochemical study in silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the Indian National Science Academy. Part B, Biological Sciences*. 58: 329-332.
24. Richmond, W. 1973. Preparation and properties of cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem*. 19: 1350-1356.

25. Romesburg, H. C. 1984. *Cluster Analysis for Researchers*. Lifetime Learning Publications, Belmont, California.
26. SAS institute. 1997. SAS/STAT User's Guide for personal computers, Cary, NC: SAS Institute.
27. Satake, S., Y. Kawabe, & A. Mizoguchi. 2000. Carbohydrate metebolism during starvation in the silkworm *Bombyx mori* L., *Arch. Insect Biochem. Physiol*., 44:90-98.
28. Siegert, K. J. 1987. Carbohydrate metabolism in *Manduca sexta* During late larval development. *J. Insect Physiol*. 33: 421-427.
29. Shakoori, A.R., N. Tufail & M. A. Salem. 1994. Response of malathion resistant and susceptible strains of *Tribolium castaneum* (Herbst) to bifenthrin toxicity. *Pak. J. Zool.* 26: 169-178.
30. Takeda, H., Y. Kawaguchi, T. Oshiki, H. Maekawa, & K. Tsuchida. 1996. Impaired yolk protein uptake by oocytes of a *Bombyx mori* Mutant, *Insect. Biochem. Molec. Biol*. 26: 607-616.
31. Thomas, L. 1998. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. TH Books Verlasgesell-schaft, Frankfurt, pp. 89-94.