نشریه علوم دامی
شماره ۹۲، پاییز ۱۳۹۰
(پژوهش و سازندگی)

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت کبک ایرانی موجود در مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشـــور با اســـتفاده از آنالیز ریز ماهواره

• **کاظم بروفه** (نویسنده مسئول)
دانش آموخته دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
• **سیروس امیری نیا**
عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
• **علیرضا نوشری**
عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
• **حسین عمرانی**
عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
تاریخ دریافت: مهر ماه ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۷۳۵۴۷۶۴۲
Email: k_boroufeh@asri.ir

چکیده

هدف از این مطالعه اســتفاده از هشــت نشــانگر ریــز ماهواره برای تعیین ســاختار و تنوع ژنتیکی جمعیــت کبک ایرانی موجود در مؤسســه تحقیقات علوم دامی کشــور بود که از اســتان های ســمنان و فارس جمع آوری شــده بودند. برای این منظور از ۱۲۰ قطعه کبک بطور تصادفی خونگیری و با اســتفاده از روش بهینه یافته نمکی، اســتخراج DNA صورت گرفت. جایــگاه های مــورد اســتفاده عبــارت از: Aru ۱F۱۱۴، Aru۱E۹۷، Aru۱E۱۰۲، Aru ۱E۶۶، Aru ۱B۳، Aru ۱G۴، Aru ۱M۱۲۷ و Aru ۱J۷۶ بودنــد. قبــل از انجــام واکنــش های PCR، اجــزا و چرخه های دمایی PCR بــرای هر جایگاه بهینه سازی شد. پس از الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل واسرشته ساز پلی اکریل آمید ۸ درصد و رنگ آمیزی با نیترات نقره،تعیین ژنوتیپ صورت گرفت و داده های آماری با اســتفاد از نرم افزار POPGENE مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تعادل هاردی واینبرگ با دو آزمون مربع کای (X^2) و نسبت درست نمایی (G^2) بدست آمد. در کل جمعیت تمامی مکان های ژنی مورد مطالعه از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف معنی داری نشــان دادند و تنها جایگاه Aru۱E۱۰۲ در تعادل هاردی- واینبرگ قرار داشــت ($P<0/05$). هشــت جایگاه مورد مطالعه در این جمعیت چند شکلی نشان دادند. بیشترین تعداد الل مشــاهده شده مربوط به جایگاه Aru۱E۹۷ با ۱۴ الل و کمترین تعداد الل مشاهده شده مربوط به جایگاه های Aru ۱F۱۱۴، Aru ۱M۱۲۷ و Aru ۱J۷۶ با ۴ الل بود. میانگین آلل های واقعی (na)، شــاخص شــانون (I) و شاخص محتوی چندشکلی (PIC)، به ترتیب ۶/۳۷۵۰، ۱/۴۵۶۸ و۰/۶۵۶۷ بود. تنوع درون جمعیتی بر اســاس تجزیه مقادیر هتروزایگوســیتی بررسی شد که میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده ۰/۴۵۲۲ بدست آمد و میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار نااریب در این جمعیت ۰/۷۰۱۷ بود. میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت مورد مطالعه،در مقایسه با نتایج دیگر مطالعات خارجی، بیانگر وجود سطح مناسبی از تنوع ژنتیکی در کبک های بومی کشور می باشد.

کلمات کلیدی: کبک ایرانی، نشانگرهای ریز ماهواره، تنوع ژنتیکی، چند شکلی، هتروزایگوسیتی.

www.SID.ir

Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 92 pp: 31-40

Genetic structure of a Persian partridge population in Animal Science Research Institute of Iran using microsatellite markers

By: K.Boroufeh, Graduated in Islamic Azad University, Karaj. (Corresponding Author; Tel: +989373547644) Amirinia, C. Emrani, H. Members of Scientific Board of Animal Sciences Research Institute of Iran. Noshari, A.R. Member of Scientific Board of Islamic Azad University, Karaj.

The aim of this study was take advantages of usefulness potential microsatellite markers in detect Persian partridge Genetic Structure and population variability for the first time.The chukar partridge population was collected from Semnan & Fars province that keeping in Animal Science Research Institute of Iran (ASRI).The number of 120 blood samples were collected and DNA was isolated using Optimized and Modified Salting-out method. eight microsatellite markers using in this study was Aru 1F114، Aru1E97، Aru1E102، Aru 1E66، Aru 1B3، Aru 1G4، Aru 1M127 & Aru 1J76 .The elements and thermal cycle for each locus was optimized before done PCR reaction. After PCR amplification, microsatellite alleles were identified on 8% denaturing polyacrylamide gels,followed by AgNO3 staining so partridges had been genotyped. Data analyses consist of several parameters of population genetics were done using GENEPOP 3.1.All of locus tested for Hardy-Weinberg equilibrium by chi-square(X2) and likelihood ratio(G2). All loci except Aru1E102 were deviated from Hardy-Weinberg equilibrium in population ($P<0.05$). The entire loci were polymorphic.The most number of observed alleles were in Aru1E97 with 14 alleles and the lowest number of alleles were in Aru 1F114 ، Aru 1M127& Aru 1J76 with 4 alleles.The average observed number of alleles, Shannon's Information index & ¬ Polymorphic Information Content(PIC) were 6.3750, 1.4568 and 0.6567 respectively.The average observed heterozygosity was 0.4522 and average expected heterozygosity was obtained 0.7017.Results of Genetic variation in Persian partridge population as comparison with other exotic similar studies,detect suitable variation value in Persian native partridge population.

Keywords: Alectoris chukar, Persian partridge, Microsatellite markers, Genetic variation

مقدمه

افزایش جمعیت جهان نیاز بشـر به مـواد پروتئینی را روز به روز افزایش می دهد و همین مسـئله سبب شده است که بسیاری از حیوانات که گوشت آنها قابل مصرف انسـان می باشد به صورت اهلی درآمده و با پرورش صنعتی آنها بخشی از احتیاجات پروتئینی انسان بر طرف گردد(۴). اگرچه هنوز مدت زمان زیادی از ورود گوشـت بلدرچین به بازار مصرف ایران نگذشـته است اما بـه دلیل خواص درمانی و کیفیت مطلوب، مورد قبول بازار مصرف قرار گرفته و جای خود را در عرصه فروش ثابت نموده اسـت، از این رو انگیزه آن دسـته از افرادی که در عرصه پرورش کبک در کشور فعالیت می کنند نیز دوچندان شده است. جذابیت شغلی پرورش کبک، مقاومت در برابر بیماری ها و کیفیت غذایی گوشـت کبک را می توان ازجمله عوامل امید بخش توسـعه روزافزون ایـن حرفه دانسـت(۳). لذا جهت نیل به این هدف یکی از نیازهای اساسـی، اصلاح ژنتیکی کبک های بومی کشـور اسـت و یقینا گام نخست آن شناخت سـاختار ژنتیکی جمعیت کبک بومی ایران می باشـد. متخصصان اصلاح نژاد از تنوع ژنتیکی برای رسـیدن به حیوانات اهلـی منطبق بر نیازهای جامعه و طراحـی برنامه های اصلاح نژاد بهره گیـری می نمایند. فقدان تنوع ژنتیکی، قدرت انتخاب برای رفع نیازهای غیر قابل پیش بینی آتی را محدود می سازد. اسـتفاده از روش های ژنتیک مولکولی همچون نشانگرهای DNA برای این منظور یکی از بهترین گزینه ها به حسـاب می آید و می تواند مکمل سـایر داده هـای موجود از جمله مؤلفه های جمعیتی حاصل از روش های آماری و اطلاعات فنوتیپی باشد(۴).

کبک پرورشـی بـا نـام علمـی *Alectoris chukar* در حقیقت یکی از شـانزده سـویه کبک وحشـی می باشـد که خود از راسـته قرقاول سانان اسـت (بلدرچین و قرقاول نیز در همین گروه جای دارند). از شـانزده سـویه شـناخته شده کبک حداقل پنج نوع در حیات وحش ایرن وجود دارند(۳). در لهجه های مختلف فارسی به آن، خاسه کو، زرج، ژرژ، کو، کوک می گویند. در ایران بومی است و در خیلی از مناطق یافت می شود (بجز کرانه ساحلی دریای خزر و سـواحل جنوبی کشـور). این پرنده همواره در دامنه های کوهستان و مناطق شـیب دار صخره ای وسـنگلاخی به سـر می برد. در شرایط طبیعی وزن کبـک نـر بالغ (سـویهٔ ایرانـی) از ۵۱۰ تا ۸۰۰ گـرم و وزن کبک ماده بالغ از ۴۵۰ تا ۶۸۰ گرم متغییر اسـت. اندازه این پرنده ۳۱ تا ۳۵ سـانتیمتر می باشـد که اندازه پرنده نر بزرگ تر است. در شرایط طبیعی این پرنده ۸ تا ۱۵ تخم می گذارد که البته تا ۳۰ تخم نیز در فصل بهار قابل افزایش اسـت. دوره انکوباسیون تخم کبک حدود ۲۴ روز است (۶).

اسـکندورا و همـکاران (۲۰۰۹) در مطالعه ای به بررسـی وضعیت فعلی کبک های سـاردینی (یکی از سـویه هـای بومی قاره اروپا) با اسـتفاده از ۸ نشـانگر ریز ماهواره پرداختند. آنها سـطح پائینی از تنوع ژنتیکی در جمعیت کبک سـاردینی مشـاهده نمودنـد (HE =۰/۳۱۰) و در مقایسـه با جمعیت

Archive of SID
www.SID.ir

کبک های تونسی نشان دادند که ساختار ژنتیکی کبک های ساردینی پیشینه تاریخی به شمال آفریقا (تونس) دارند (۱۱). باربانرا و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه ای به بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت کبک های چوکار مدیترانه ای با استفاده از هشت جایگاه ریز ماهواره و با هدف مدیریت حفظ ذخایر ژنتیکی اینگونه پرندگان پرداختند. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق شش منطقه جغرافیایی جهت مدیریت حفاظت از ذخایر ژنتیکی برای جمعیت های مدیترانه ای منظور شد. مناطق لیمونس و قبرس،که میزبان گونه های مختلف بودند،گروه های دارای اولویت به منظور رسیدگی و توجه در برنامه حفاظت از ذخایر ژنتیکی عنوان شدند. همچنین مدارک ژنتیکی دال بر اینکه کبک های آمریکایی منشا آسیایی دارند، بدست آمد (۹). Xinzhou و همکاران (۲۰۰۹) برای اولین بار به بررسی ریزماهواره های همشکل در کبک های بومی چین (Buff-Throated) پرداختند. دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار به ترتیب بین ۰/۲۷۸ تا ۰/۶۶۷ و ۰/۲۴۶ الی ۰/۵۳۷ بدست آمد. تمام لوکوس ها در تعادل هاردی واینبرگ قرار داشتند. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد جایگاه های ریز ماهواره کبک های بومی چین، در مطالعات ژنتیک جمعیت و بر روی دیگر گونه های قرقاولیان در معرض انقراض نیز قابل بهره برداری خواهد بود(۱۵). Ferrero و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه ای ۱۶ نشانگر ریز ماهواره پلی مورفیسم جدید را در کبک های پا قرمز شناسایی نمودند. دامنه تعداد آلل های هر جایگاه از ۲ تا ۲۱ بدست آمد، هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین ۰/۰۳ تا ۱/۰۰ بود و هتروزیگوسیتی قابل انتظار در محدوده ۰/۸۱ تا ۰/۹۱ قرار داشت(۸).

در مطالعه حاضر، سؤال اصلی این است که آیا با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره امکان بررسی و تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت کبک ایرانی مورد نظر وجود دارد؟ بنابراین هدف عمده این تحقیق تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت کبک ایرانی با استفاده از تجزیه جایگاه های ریز ماهواره بود و متعاقباً استفاده از نتایج و اطلاعات بدست آمده به عنوان اطلاعات پایه جهت طراحی برنامه اصلاح ژنتیکی، برنامه ریزی به منظور حفظ ذخایر ژنتیکی بومی کشور و نهایتاً تنوع در تامین پروتئین حیوانی مورد نیاز جامعه خواهد بود.

مواد و روش ها

در این تحقیق از ۱۲۰ قطعه از جمعیت ۲۵۰ کبک موجود در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور بطور تصادفی خونگیری بعمل آمد. منشا جمع آوری کبک های مورد مطالعه از استان های سمنان و فارس بود که در سالن پرورش کبک مؤسسه نگهداری می شدند. از هر پرنده بطور میانگین ۵۰۰ میکرولیتر خون از ورید نسج بال تهیه شد و سپس نمونه های جمع آوری شده در تیوپ های ۱/۵ میلی لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA نیم مولار (PH=۸)، به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه منتقل شد. استخراج DNA به روش بهینه شده و تغییر یافته نمکی[1] صورت گرفت. کمیت و کیفیت نمونه های DNA به روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شد(۲). در این مطالعه هشت جفت آغازگر بر روی ۱۲۰ نمونه DNA کبک مورد بررسی قرار گرفت. تمام شرایط PCR[2] و برنامه دمایی بجز دمای اتصال[3] طبق پیشنهاد Ferrero و همکاران (۲۰۰۷) اعمال شد(۸). در این تحقیق هشت جایگاه ریز ماهواره شامل: Aru ۱F۱۱۴، Aru۱E۹۷، Aru۱E۱۰۲، Aru ۱E۶۶، Aru ۱B۳، Aru ۱G۴، Aru ۱M۱۲۷ و Aru ۱J۷۶ مورد بررسی قرار گرفتند که مشخصات آنها در جدول شماره ۱ آورده شده است. بهینه سازی شرایط واکنش PCR روی دو فاکتور مهم دمای اتصال پرایمرها و واکنش PCR انجام گرفت و جزئیات سایر شرایط واکنش های PCR برای جایگاه های مورد مطالعه بصورت ذیل بهینه شد:

برای هر جایگاه شامل ۱۵۰ نانوگرم DNA، ۱/۵ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرو مولار dNTPS، ۲ میلی مولار کلریدمنیزیوم، بافر PCR (۱x) و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز بود که در نهایت حجم نهایی واکنش با استفاده از آب دوبار تقطیر به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. چرخه حرارتی PCR به صورت مرحله پیش گرمایی اولیه در ۹۴ سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، واسرشته سازی ۹۴ سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۳۰ ثانیه، تکثیر ۷۲ سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در $72\ c^{\circ}$ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز در طی ۳۵ چرخه و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biometra (T_Gradient) انجام شد و همه نشانگرهای مورد مطالعه پس از بهینه سازی واکنش های PCR تکثیر شدند.

فرآورده های PCR بر روی ژل های واسرشته ساز پلی آکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز و روش رنگ آمیزی نیترات نقره اعمال شد (۱۱، ۱۴). با استفاده از دستگاه Gel-Doc XR، ساخت شرکت BioRad، تصاویر ژل ها تهیه شد و سپس با استفاده از نرم افزار ANALYSER GELPRO نسخه ۳/۱ و با توجه به نشانگرهای اندازه، اندازه آلل ها براساس جفت باز، محاسبه و ژنوتیپ پرندگان بصورت انفرادی تعیین شد. پس از تعیین ژنوتیپ، معیارهای مختلف تنوع درون جمعیتی مورد بررسی و محاسبه قرار گرفت.

هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho)[4] در یک نشانگر با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد(۱۰):

$$Ho = \frac{\sum N_{ij}}{N}$$

که در آن Nij ($i \neq j$) تعداد افراد هتروزیگوت و N تعداد کل افراد در جمعیت مورد مطالعه است. هتروزایگوسیتی مورد انتظار(HE)[5] برای یک نشانگر نیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۱۰):

$$He = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2$$

که در آن عبارت $\sum_{i=1}^{n} p_i^2$ نسبت مورد انتظار هموزیگوتها و pi فراوانی آلل i در یک نشانگر معین است.

برای هر جایگاه تعداد الل واقعی (na)[6] و تعداد الل مؤثر (ne)[7] (تعداد الل موثر از این رابطه بدست می آید: $ne = \frac{1}{\sum p_i^2}$ که در آن pi فراوانی هریک از آلل ها است) محاسبه شد (۱۰). پارامترهای فوق و همچنین فراوانی اللی برای هر جایگاه نیز با استفاده از نرم افزار POPGEN نسخه ۳/۱ محاسبه شد.

مقادیر هتروزایگوسیتی در نشانگرهای بسیار چند شکل نسبت به افزایش تنوع، خیلی حساس نمی باشند از اینرو مقایسهٔ این مقادیر به عنوان معیار تنوع درون جمعیتی برای نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه مقایسات دقیقی را بیان نمی کند. در این موارد، استفاده از شاخص اطلاعات شانون برای مقایسه تنوع موجود در ترکیب جمعیت- نشانگر مناسب تر است. لذا شاخص اطلاعات شانون(I)[8] با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۱۰):

Archive of SID

$$I = -\sum_{i} P_i \ln P_i$$

Pi فراوانی آلل i در یک نشـانگر معین اسـت. شـاخص اطلاعات شانون با استفاده از نرم افزار Popgen نسخه ۳/۱ محاسبه شد.

یکی دیگر از شـاخص های مورد ارزیابی در این مطالعه، شـاخص محتوای اطلاعات چند شکلی(PIC)[9] بود که برای تعیین میزان چند شکلی[10] یک نشانگر اسـتفاده می شود. هتروزایگوسیتی احتمال مشاهدهٔ افراد هتروزیگوت را در یک جمعیت نشان می دهد. محتوای اطلاعات چند شکلی نیز مقدار هتروزایگوسیتی را نشـان می دهد اما در محاسبه آن از اطلاعات مربوط به افراد هتروزیگوتی که دارای ژنوتیپ متفاوت با ژنوتیپ والدین خود هستند، استفاده می شود. بنابراین در جوامع غیر همخون نسـبت به جوامع همخون مقادیر محتوای اطلاعات چند شـکلی معمولاً دارای اختلاف اندکی با مقادیر هتروزایگوسـیتی است. محتوای اطلاعات چند شکلی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$PIC = 1 - (\sum_{i=1}^{n} p_i^2) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i-1}^{n} 2\, p_i^2 p_j^2$$

در ایـن رابطـه n تعداد آلل هـا و Pi و Pj فراوانی هـای i امین و j امین آلل در هر نشـانگر اسـت. محتوای اطلاعات چند شکلی با اسـتفاده از نرم افزار PicValue برآورد شد (۴).

به منظور بررسـی تعادل هاردی- واینبرگ، جمعیت مورد مطالعه با آزمون کای مربع[11] آزمایش شـدند. در آزمون کای مربع، آماره کای مربع محاسـبه و با توجـه به درجهٔ آزادی مربوط به آن، با مقادیر جدول توزیع کای مربع مقایسـه و رد یا پذیرش فرض صفر که برقراری تعادل اسـت در سـطح آماری $\alpha < ۰/۰۵$ تایید شـد. برای انجام آزمون های فوق از نرم افزار POPGENE نسـخه ۳/۱ استفاده شد.

نتایج

تنوع ژنتیکی

در این مطالعه میانگین هتروزایگوسـیتی مشـاهده شـده (Ho)، میانگین هتروزایگوسـیتی مـورد انتظار (HE) و میانگین هتروزایگوسـیتی مورد انتظار ناریـب (HE Nei) به ترتیـب ۰/۴۵۲۲ ، ۰/۷۰۴۹ و ۰/۷۰۱۷ بدسـت آمد.

جدول ۱- مشخصات جایگاه های مورد مطالعه

نام جایگاه	توالی آغازگرها		واحد تکرار شونده	اندازه الل (bp)	شماره دسترسی
Aru۱E۱۰۲	AGGATCTCCACTGAAGAGTG	F	(GGAT)۷	۱۵۹-۱۹۹	EF۵۴۶۶۴۴
	CTCCATGGCACAAGAGAATAG	R			
Aru۱E۹۷	GCTGTGATTCCATTGGAGAC	F	(GACA)۳۲	۲۰۷-۴۳۵	EF۵۴۶۶۴۳
	GGCGTATGTCTGCATGTAAG	R			
Aru ۱F۱۱۴	TTAATTCTGAGGAGAACTCCA	F	(CCAT)۱۵	۱۸۴-۲۱۲	EF۵۴۶۶۴۶
	GTCGGTATGATTAGACTGATC	R			
Aru ۱B۳	GCTCTATAGACTCCCCTTGA	F	(GAGAA)۳۳	۲۳۵-۳۶۰	EF۵۴۶۶۳۸
	CAGCTCACTGGCTTTGCA	R			
Aru ۱E۶۶	CCTGTTTCCAGAAATACTCCG	F	(CA)۱۷AAA (CAAA)۶	۲۲۶-۲۸۰	EF۵۴۶۶۴۱
	GAAGTTGGACCAGATGGACC	R			
۱G۴ Aru	CTGCAGTCACACAAGGCTAC	F	(CCAT)۱۳	۱۲۹-۱۶۱	EF۵۴۶۶۴۷
	AGTGGGTCAAGGATGAGTGG	R			
۱J۷۶ Aru	GGTATGATTCAGCTGGGAAGT	F	(TG)۱۸	۱۸۶-۲۱۶	EF۵۴۶۶۵۰
	GCAGAACTTGGTTTCCTAACG	R			
۱M۱۲۷ Aru	GCTGTGACTGATGACTATGGCT	F	(GCT)۴۴	۲۷۳-۳۰۹	EF۵۴۶۶۵۲
	CAAAGACGCAAGCAGCAAGA	R			

* حروف F و R بترتیب نشان دهنده توالی های جلو برنده (Forward) و برگشتی (Reverse) آغازگرها می باشند.

www.SID.ir

با توجه به جدول ۲ مقادیر هتروزایگوسیتی قابل مشاهده به استثنای جایگاه Aru ۱J۷۶، در تمامی دیگر جایگاه ها،کمتر از مقادیر هتروزایگوسیتی قابل انتظار است.

معیار های چند شکلی

تعداد آلل واقعی وتعداد آلل موثر

هشت جایگاه مورد مطالعه در این جمعیت چندشکلی نشان دادند. یکی از معیارهایی که برای تعیین چندشکلی جایگاه ها استفاده می شود تعداد آلل واقعی (na) است که بیانگر تعداد آلل‌های مشاهده شده یک جایگاه در جمعیت است. این معیار بشدت تحت تأثیر اندازه نمونه است. همان گونه که در جدول ۳ ملاحظه می شود کمترین تعداد آلل واقعی و آلل موثر در جایگاه های Aru ۱M۱۲۷، Aru ۱F۱۱۴ و Aru ۱J۷۶ و بیشترین تعداد در جایگاه Aru۱E۹۷ می باشد. میانگین الل واقعی در این مطالعه ۶/۳۷۵ بدست آمد.معیاردیگر، تعداد آلل موثر (ne) می‌باشد که عکس هموزایگوسیتی مورد انتظار می‌باشد. این معیار را به این دلیل مورد استفاده قرار می‌دهند که کمتر به اندازه نمونه حساس می‌باشد. میانگین آلل موثر در این مطالعه ۴/۲۸۹۴ بدست آمد.

مقایسه هتروزایگوسیتی بعنوان معیار تنوع درون جمعیتی برای نشانگرهای بسیار چند شکل همچون ریزماهواره ها (که دراکثر موارد هتروزایگوسیتی حدود ۰/۸ یا بالاتر دارند) صحیح نبوده و این تفاوت های میان آنها اطلاعات دقیقی را بیان نمی کنند. بنابراین شاخص اطلاعات شانون (I) نیز برای هر هشت جایگاه محاسبه گردید(۵). بیشترین مقدار شانون مربوط به جایگاه Aru۱E۹۷ بود که با توجه به تعداد آلل زیاد در این جایگاه (۱۴آلل) منطقی به نظر می رسد.

همچنین به منظور مقایسه میزان چندشکلی ۱۰ دونشانگر با تعداد آلل واقعی یکسان، مقادیر اطلاعات محتوی چندشکلی PIC به ازای هر جایگاه محاسبه و با یکدیگر مقایسه شد. این معیار هم تحت تاثیر تعداد آلل های یک جایگاه و هم تحت تاثیر فراوانی این آلل ها قرار دارد . مقدار PIC در جایگاه های دو آللی غالبا پایین است. سیستم های چند آللی همچون ریز ماهواره ها معمولاً PIC بالاتری دارند(۵). میانگین مقادیر PIC برای هشت جایگاه در این مطالعه ۰/۶۵۶۷ بدست آمد.

فراوانی آللی

معیار دیگری که جهت تعیین چند شکلی بکار می رود فراوانی های آللی در جایگاه های مورد مطالعه می باشد. هر هشت جایگاه مورد بررسی در این مطالعه چند شکلی نشان دادند و بدین ترتیب نسبت چند شکلی ۱۰۰ درصد می باشد. در جدول ۴ فراوانی آلل ها آورده شده است.

تعادل هاردی- واینبرگ

بر اساس آزمون مربع کای، جمعیت مورد مطالعه در تمامی جایگاه های ژنی از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف معنی داری داشت و تنها جایگاه Aru۱E۱۰۲ در تعادل هاردی- واینبرگ قرار داشت ($P<0/05$)، آزمون نسبت درست نمایی۱۲ نیز نتایج فوق را تایید نمود(جدول ۵).

جایگاه های ریز ماهواره را جایگاه های خنثی گویند و انتخاب طبیعی تاثیر چندانی در بر هم زدن تعادل این جایگاه ها ندارند.خروج از تعادل هاردی- واینبرگ می تواند به دلیل افزایش تعداد هتروزیگوت ها نسبت به هموزیگوت ها باشد که دلیلش جمع آوری دو گله مختلف از استان های سمنان و فارس و پرورش آنها به صورت آزاد در سالن پرورش کبک موسسه تحقیقات علوم دامی کشور است. همچنین نرخ بالای جهش در ریز ماهواره ها و ایجاد آلل های جدید و وجود آلل های خنثی در برخی نشانگرها از مهمترین دلایل خروج آنها از تعادل هاردی- واینبرگ است.

بحث

Ferrero و همکاران (۲۰۰۷)، در مطالعه ای که با استفاده از ۱۶ جایگاه ریز ماهواره بر روی جمعیت کبک های پاقرمز اسپانیا انجام دادند میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده را در منطقه Cadiz، ۰/۶۱۹۳ و در منطقه Alava، ۰/۷۰۰۶ گزارش نمودند. همچنین آنها میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار نا اریب را در منطقه Cadiz، ۰/۶۸۵ و در منطقه Alava، ۰/۷۳۸۷ گزارش نمودند. Xinzhou و همکاران (۲۰۰۹)، در بررسی تنوع ژنتیکی کبکهای بومی چین با استفاده از ۱۲ جایگاه ریز ماهواره، میانگین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده را ۰/۵۰۹۵ و میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار ناریب را ۰/۴۳۷۵ گزارش نمودند. Arruga و همکاران (۲۰۰۷)، در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت کبک آرژانتینی با استفاده از ۶ جایگاه ریز ماهواره، میانگین مقدار هتروزایگوسیتی مشاهده شده و هتروزایگوسیتی مورد انتظار ناریب را به ترتیب ۰/۳۴۵۵ و ۰/۴۳۵۵ گزارش نمودند. تجدور و همکاران (۲۰۰۵)، در بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی کبک های قبرس، میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده را ۰/۴۵۲۷ و میانگین هتروزایگوسیتی مورد انتظار ناریب را ۰/۴۹۲۵ گزارش نمودند (۱۵،۱۳،۷،۸). میانگین هتروزایگوسیتی مشاهده شده (۰/۴۵۲۲) و هتروزایگوسیتی مورد انتظار ناریب (۰/۷۰۱۷) جمعیت کبک ایرانی مورد نظر در این تحقیق در مقایسه با نتایج مطالعات مشابه خارجی، بیانگر سطح مطلوب و بالای میزان تنوع ژنتیکی است. جمع آوری گله مورد نظر از دو منطقه جداگانه (سمنان و فارس) و نگهداری مخلوط، آمیزش های تصادفی و بدون دخالت انسان از دلایل و توجیهات نتایج بدست آمده می باشد.

میانگین الل واقعی در این مطالعه ۶/۳۷۵ بدست آمد، در حالیکه Ferrero و همکاران (۲۰۰۷) که از جایگاه های مشابه تحقیق حاضر بر روی کبک های اسپانیا استفاده کرده بودند، میانگین الل واقعی را در منطقه Cadiz، ۱۰/۳۷۵ مورد و برای منطقه Alava، ۱۰/۱۲۵ مورد گزارش نمودند(۶). اختلاف موجود در میانگین الل واقعی تحقیق حاضر با مطالعه فررو می تواند ناشی از خطای چشم در تخمین اندازه اللهای مشاهده شده بر روی ژلها، در این مطالعه باشد. در تمامی جایگاه ها تعداد آلل مؤثر کمتر از تعداد آلل مشاهده شده بود. دلیل کمتر بودن تعداد آلل موثر از آلل مشاهده شده این است که تعداد آلل مؤثر در حقیقت، تعداد آلل با فراوانی مساوی در هر جایگاه است. در جایگاه هایی که تفاوت بین این دو مقدار زیاد می باشد دلیل بر وجود فراوانی های آللی با پراکندگی بالا در آن جایگاه هاست. جایگاه هایی که فراوانی های آللی در آنها تقریباً برای تمام آلل ها مشابه باشد تعداد آلل مؤثر بیشتری نشان خواهند داد. تعداد آلل موثر تنها زمانی با تعداد آلل واقعی برابر خواهد بود که همه آلل‌ها فراوانی مشابهی داشته باشند ولی در بیشتر موارد تعداد آلل موثر (ne)کمتر از تعداد آلل واقعی است.

با توجه به مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) محاسبه شده مربوط به سه نشانگر Aru ۱M۱۲۷، Aru ۱F۱۱۴ وAru ۱J۷۶ در جمعیت کبک های مورد مطالعه، با وجود تعداد مساوی آلل های مشاهده شده در آنها

www.SID.ir
Archive of SID

(۴ آلل)، نشـانگر Aru ۱F۱۱۴ دارای بیشـترین چندشـکلی اسـت. شاخص اطلاعـات شـانون(I) نیـز تاییدکننـده این مطلب اسـت. همچنیـن در مورد نشـانگرهای Aru۱E۱۰۲ و Aru ۱E۶۶ که هر دو جایگاه ۵ آلل نشـان دادند، نشانگر Aru۱E۱۰۲ نسبت به نشانگر Aru ۱E۶۶ چند شکلی بیشتری دارد.

طبق نتایج بدست آمده، جمعیت مورد مطالعه در تمامی مکان های ژنی از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف معنی داری داشت و تنها جایگاه Aru۱E۱۰۲ در تعـادل قرار داشـت(P<۰/۰۵). نرخ بالای جهش در ریـز ماهواره ها و ایجاد آللهـای جدید خصوصاً کوچک بودن اندازه جمعیت در این تحقیق، از مهمترین دلایل انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ اسـت. Ferrero و همکاران (۲۰۰۷) نیز در بررسی تعادل هاردی- وینبرگ در جمعیت کبک های اسپانیا و در منطقه Cadiz تنها در سه جایگاه برقراری تعادل هاردی- واینبرگ را گزارش نمودند و پنج جایگاه دیگر انحراف داشتند(P<۰/۰۰۱). آنها همچنین در جمعیت منطقه Alava نیـز تنهـا دو جایگاه را در تعادل هاردی وینبرگ عنوان کردند و شـش جایـگاه باقی مانده از تعـادل هاردی واینبرگ انحراف داشـتند(P<۰/۰۰۱)که نتایج بدسـت آمده آنها با نتایج این مطالعه قابل تطبیق است. البته Xinzhou و همـکاران (۲۰۰۹)، گزارش کردند که کبک های بومی چین در تعادل هاردی واینبـرگ قـرار دارنـد که یکـی از دلایلش می توانـد جامعه آمـاری بزرگتر و نمونه های بیشتری باشد که نسبت به مطالعه حاضر استفاده شده بود.

نتیجه گیری کلی

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد سطح مناسبی از هتروزیگوسیتی در جمعیت کبک های جمع آوری شده از استان های سمنان و فارس وجود دارد (۰/۷۰۱۷) و مـی توان از جمعیت مورد نظر به عنوان جمعیت پایه برای اجرای طرح های اصلاح نژادی استفاده نمود.

جدول ۲- مقادیرهتروزایگوسیتی جایگاه های مورد مطالعه

جایگاه	Obs -Hom[1]	Obs- Het[2]	Exp- Hom[3]	Exp-Het[4]	NeiExp-Het[5]	AveHet[6]
Aru ۱F۱۱۴	۰/۴۹۵۸	۰/۵۰۴۲	۰/۲۷۰۲	۰/۷۲۹۸	۰/۷۲۶۷	۰/۷۲۶۷
Aru۱E۹۷	۰/۲۳۷۳	۰/۷۶۲۷	۰/۱۰۴۹	۰/۸۹۵۱	۰/۸۹۱۳	۰/۸۹۱۳
Aru۱E۱۰۲	۰/۴۷۰۱	۰/۵۲۹۹	۰/۳۰۱۶	۰/۶۹۸۴	۰/۶۹۵۴	۰/۶۹۵۴
Aru ۱E۶۶	۰/۷۰۵۳	۰/۲۹۴۷	۰/۴۳۷۰	۰/۵۶۳۰	۰/۵۶۰۱	۰/۵۶۰۱
Aru ۱B۳	۰/۱۷۸۰	۰/۸۲۲۰	۰/۱۳۶۵	۰/۸۶۳۵	۰/۸۵۹۸	۰/۸۵۹۸
Aru ۱G۴	۰/۸۵۸۶	۰/۱۴۱۴	۰/۲۵۸۳	۰/۷۴۱۷	۰/۷۳۷۹	۰/۷۳۷۹
Aru ۱M۱۲۷	۰/۹۱۲۳	۰/۰۸۷۷	۰/۳۲۳۲	۰/۶۷۶۸	۰/۶۷۳۸	۰/۶۷۳۸
Aru ۱J۷۶	۰/۵۲۵۴	۰/۴۷۴۶	۰/۵۲۹۴	۰/۴۷۰۶	۰/۴۶۸۷	۰/۴۶۸۷
میانگین	۰/۵۴۷۸	۰/۴۵۲۲	۰/۲۹۵۱	۰/۷۰۴۹	۰/۷۰۱۷	۰/۷۰۱۷
انحراف معیار	۰/۲۶۶۴	۰/۲۶۶۴	۰/۱۴۱۰	۰/۱۴۱۰	۰/۱۴۰۵	۰/۱۴۰۵

۱؛ هموزایگوسیتی مشاهده شده

۲؛ هتروزایگوسیتی مشاهده شده

۳؛ هموزایگوسیتی مورد انتظار

۴؛ هتروزایگوسیتی مورد انتظار

۵؛ هتروزایگوسیتی مورد انتظار نااریب

۶؛ میانگین هتروزایگوسیتی اللی

www.SID.ir

جدول ۲- مقادیرهتروزایگوسیتی جایگاه های مورد مطالعه

جایگاه	na	ne	I	PIC
Aru ۱F۱۱۴	۴	۳/۶۵۹۶	۱/۳۴۱۰	۰/۶۷۷۷
Aru۱E۹۷	۱۴	۹/۲۰۲۹	۲/۳۸۴۶	۸۶۹۴/۰
Aru۱E۱۰۲	۵	۳/۲۸۳۱	۱/۳۱۶۸	۶۴۱۸/۰
Aru ۱E۶۶	۵	۲/۲۷۳۰	۱/۱۲۲۵	۵۲۶۲/۰
Aru ۱B۳	۱۰	۷/۱۳۳۲	۲/۰۶۱۹	۸۴۳۹/۰
Aru ۱G۴	۵	۳/۸۱۵۸	۱/۴۴۷۴	۶۹۴۳/۰
Aru ۱M۱۲۷	۴	۳/۰۶۵۵	۱/۱۹۹۶	۶۱۰۷/۰
Aru ۱J۷۶	۴	۱/۸۸۲۰	۰/۷۸۰۵	۳۸۹۹/۰
میانگین	۶/۳۷۵۰	۴/۲۸۹۴	۱/۴۵۶۸	۶۵۶۷/۰
انحراف معیار	۳/۶۶۲۱	۲/۵۴۱۷	۰/۵۲۰۳	-

na: تعداد اللهای مشاهده شده.

ne: تعداد اللهای مؤثر.

I: شاخص اطلاعات شانون.

PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی.

www.SID.ir

جدول ۴- فراوانی های آللی جایگاه های مورد مطالعه

جایگاه\	۱J۷۶ Aru	۱M۱۲۷ Aru	۱G۴ Aru	۱B۳ Aru	۱E۶۶ Aru	Aru۱E۱۰۲	Aru۱E۹۷	۱F۱۱۴ Aru
آلل	۰/۰۱۲۷	۰/۰۴۳۹	۰/۰۶۰۶	۰/۰۶۳۶	۰/۰۸۴۲	۰/۰۲۹۹	۰/۰۱۶۹	۰/۱۵۹۷
A	۰/۰۲۵۴	۰/۴۲۱۱	۰/۱۲۱۲	۰/۱۱۰۲	۰/۱۳۱۶	۰/۰۵۵۶	۰/۰۲۱۲	۰/۲۴۷۹
B	۰/۲۹۶۶	۰/۳۱۱۴	۰/۳۱۸۲	۰/۰۰۸۵	۰/۱۲۶۳	۰/۲۱۳۷	۰/۰۸۴۷	۰/۲۲۲۷
C	۰/۶۶۵۳	۰/۲۲۳۷	۰/۳۴۳۴	۰/۱۲۲۹	۰/۰۲۶۳	۰/۴۱۸۸	۰/۰۸۴۷	۰/۳۶۹۷
D	–	–	۰/۱۵۶۶	۰/۰۵۹۳	۰/۶۳۱۶	۰/۲۸۲۱	۰/۰۱۶۹	–
E	–	–	–	۰/۰۸۹۰	–	–	۰/۰۴۲۴	–
F	–	–	–	۰/۱۹۴۹	–	–	۰/۰۲۵۴	–
G	–	–	–	۰/۱۸۶۴	–	–	۰/۰۲۵۴	–
H	–	–	–	۰/۰۰۸۵	–	–	۰/۰۴۶۶	–
I	–	–	–	۰/۱۵۶۸	–	–	۰/۰۸۹۰	–
J	–	–	–		–	–	۰/۱۸۶۴	–
K	–	–	–		–	–	۰/۱۲۷۱	–
L	–	–	–		–	–	۰/۰۸۴۷	–
M	–	–	–		–	–	۰/۱۴۸۳	–
N								

www.SID.ir

جدول ۵- نتایج آزمون X^2 و G^2برای تعادل هاردی- واینبرگ

جایگاه	df	X۲	ProbabilityX۲	G۲	ProbabilityG۲
Aru ۱F۱۱۴	۶	۵۶/۹۴۰۷۸۲	۰/۰۰۰۰۰۰	۵۳/۸۳۰۳۹۵	۰/۰۰۰۰۰۰
Aru۱E۹۷	۹۱	۱۹۷/۲۰۵۰۷۴	۰/۰۰۰۰۰۰	۱۰۷۰۵۳/۱۴۱	۰/۰۰۰۵۹۹
Aru۱E۱۰۲	۱۰	۲۳/۹۳۳۹۰۸	۰/۰۰۷۷۷۸	۵۶۴۴۵۰/۲۲	۰/۰۱۲۴۷۴
Aru ۱E۶۶	۱۰	۱۵۶/۵۴۳۴۲۱	۰/۰۰۰۰۰۰	۹۰۴۶۳۷/۷۲	۰/۰۰۰۰۰۰
Aru ۱B۳	۴۵	۸۴/۹۱۴۵۶۹	۰/۰۰۰۲۹۸	۶۰۹۰۹۴/۹۳	۰/۰۰۰۰۲۹
Aru ۱G۴	۱۰	۲۷۴/۰۹۲۴۲۵	۰/۰۰۰۰۰۰	۱۸۴۶۳۹/۱۸۵	۰/۰۰۰۰۰۰
Aru ۱M۱۲۷	۶	۲۱۰/۱۵۱۶۲۴	۰/۰۰۰۰۰۰	۰۳۶۱۵۷/۲۲۴	۰/۰۰۰۰۰۰
Aru ۱J۷۶	۶	۱۱۶/۸۲۳۳۵۷	۰/۰۰۰۰۰۰۰	۱۸۸۱۳۸/۲۶	۰/۰۰۰۲۰۵

تقدیر و تشکر

اعتبارات و امکانات عملیاتی و آزمایشگاهی این مطالعه در قالب پایان نامه از محل مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور تامین و اجرا شد که برخود لازم میدانم از تمام پرسنل محترم مؤسسه که به نوعی در اجرای این تحقیق، یاری رسان اینجانب بودند قدردانی و تشکر نمایم.

پاورقی

1- Optimized and Modified Salting-out Method
2- Polymerase chain reaction
3- Annealing
4- Observed Heterozygosity
5- Expected Heterozygosity¬
6- Actual number of alleles
7- Effective number of alleles
8- Shannon's Information index
9- Polymorphic Information Content
10- Polymorphism
11- Chi-square Test
12- Likelihood Ratio Test (G-square Test)

منابع مورد استفاده

۱- امیری نیا، سیروس؛ عصفوری، رحیم؛ بناءبازی، محمدحسین؛ عمرانی، حسین؛ سیدآبادی، حمیدرضا؛ دهقان زاده، هوشنگ؛ حق نظر، علیرضا. (۱۳۸۸) گزارش نهایی بررسی ساختار ژنتیکی گاومیش های بومی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور.۱۰۲ صفحه.

۲- بنا بازی، محمدحسین (۱۳۸۱). بررسی تنوع ژنتیکی بین و داخل پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره ای. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران. ۲۸۳صفحه.

۳- رادمهر، م. (۱۳۸۹) مقالات علمی پژوهشی در باره کبک، قرقاول و بلدرچین. http://dvm.ir

۴- عمرانی، حسین؛ نجاتی، اردشیر؛ امیری نیا، سیروس؛ اسماعیل خانیان، سعید؛ علیوردی نسب، رامین؛ جوانروح، علی. (۱۳۸۸) گزارش نهایی آنالیز تنوع ژنتیکی در جمعیت بلدرچین با استفاده از مارکرهای ریزماهواره. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور. ۷۰ صفحه.

۵- فراستی، سیروس؛ اسماعیل خانیان، سعید؛ نجاتی جوارمی، اردشیر؛ امیری نیا، سیروس؛ اسدی، نعمت اله؛ مولائیان، حسین. (۱۳۸۷) گزارش نهایی مطالعه تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف گوسفندان سنجابی و کردی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور.۸۰ صفحه.

۶- لطفی پور، محمدصادق. (۱۳۸۸)کتاب اصول کاربردی پرورش کبک.مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور.۲۴۰ صفحه.

7- Arruga, M.V. HandJisterkotis. E., Monteagudo, L,V. (2007) A comparative genetic study of tow groups of chukar partridges (*Alectorise chukar*) from Cyprus and Argentia using micro satellite analysis. *European Journal of Wild Life Research*.

8- Ferrero, M.E, Gonzalez, P. DAVILA, P. (2007) Sixteen new

Archive of SID

molecular markers. *Eur J Wildl* Res DOI 10.1007/s10344-009-0286-z.

13- M. T. Tejedor , L. V. Monteagudo, E. Hadjisterkotis, M. V. Arruga. (2005) Genetic variability and population structure in Cypriot chukar partridges (*Alectorischukar cypriotes*) as determined by microsatellite analysis. *Eur J Wildl* Res (2005) 51: 232–236

14- Sanguitti, C. J., E. D. Neto and A. J. G. Simpson. (1994) RAPD Silver staining and recovery of PCR Product separated on polyacrylamide gels.

15- Xin Zhou & Yu Xu & Jianghong Ran & Bisong Yue & Lusha Cao & Jing Li. (2009) Polymorphic microsatellites in Buff-throated partridge developed by cross-species amplification. *Eur J Wildl* Res (2009) 55:81–83.

16- Yeh, F. C., Yang, R. and Boyle, T. (1999) POPGENE Version 1.31. Microsoft windowsbased Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta. Edmonton. AB. Canada. pp. 26.

polymorphic microsatellite markers isolated for red legged partridge (*Alectoris rufa*) and related species. molecular Ecology Notes.2007. Volume 7 Issue 6, Pages 1349 – 1351

9- Filippo Barbanera & Chiara Marchi & Monica Guerrini &Panicos Panayides & Christos Sokos &Pantelis Hadjigerou. Genetic structure of Mediterranean chukar (*Alectoris chukar*, Galliformes) populations: Conservation and management implications. Naturwissenschaften (2009) 96:1203–1212.

10- Hedrick, P. W. (2000) Genetic of populations. Second edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA, USA. Pp 553. ISBN 0 7637 10768. DOI:10.1046/j.1365-2540.2000.0819a.x

11- Heukeshoven J, Dernick R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6:103–112

12- Massimo Scandura & Laura Iacolina & Marco Apollonio & Francesco Dessì-Fulgheri & Mariella Baratti. (2009) Current status of the Sardinian partridge (*Alectoris barbara*) assessed by

Archive of SID

www.SID.ir