

## بررسی تنوع ژنتیکی مرغان بومی استان خراسان رضوی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره

مهدی نیکبختی<sup>۱\*</sup>، حمید رضا میرزایی<sup>۲</sup>، مجید افشاریان شاندریز<sup>۳</sup>، محمد رضا محمد آبادی<sup>۴</sup> و داوود علی ساقی<sup>۵</sup>

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۲۵

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۸

### چکیده

در این تحقیق به رابطه و تنوع ژنتیکی جمعیت مرغان بومی استان خراسان با استفاده از چهار جفت نشانگر ریزماهواره‌ای (MCW16, MCW5, MCW18 و MCW34) پرداخته شد. از این جمعیت ۹۰ نمونه خون گرفته شد و DNA آنها به روش فنول و کلروفرم استخراج شد. جایگاه MCW5 با ۶ آلل و جایگاه MCW34 با ۴ آلل به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد آلل را نشان دادند که به دنبال آن جایگاه‌های فوق با ۵/۲۹۳ و ۳/۱۳۸ به ترتیب بیشترین و کمترین آلل مؤثر را نشان دادند. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه MCW5 (۰/۸۱۵۷) و کمترین آن مربوط به جایگاه MCW34 (۰/۶۸۵۴) گزارش شد. میزان تنوع درون جمعیتی در این جمعیت (۰/۷۴) گزارش شد که ممکن است ناشی از همخوانی پایین در این جمعیت باشد. تمامی جایگاه‌های مورد بررسی در این جمعیت انحراف از تعادل هاردی واینبرگ را نشان دادند. با توجه به نتایج تحقیق حاضر جمعیت مرغ بومی خراسان تنوع ژنتیکی زیادی نشان داد که ناشی از قابلیت زیاد نشانگرهای ریزماهواره در ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ریزماهواره، مرغ بومی

### مقدمه

پیشرفت در صنعت طیور در چند دهه اخیر در هیچ یک از دامهای دیگر سابقه نداشته است. به همین جهت در بیشتر نقاط جهان صنعت طیور از نظر تکنولوژی پیشرو تمام صنایع دامی دیگر مثل صنعت گاو‌داری، گوسفند داری و خوک داری می‌باشد (۱ و ۵). مناسب‌ترین خاستگاه محیطی پرورش گروه‌های نژادی مرغان بومی ایران، روستاها می‌باشد. در شرایط کنونی روستاییان به نژادهای مقاوم با تولید مطلوب و منطبق با شرایط اقلیمی مختلف نیاز دارند. تعداد گروه‌های نژادی مرغان بومی ایران دقیقاً مشخص

نیست. بعضی محققین آنها را حداکثر تا ۳۵ گروه نژادی ذکر کرده‌اند (۶). امروزه بحث‌هایی در مورد مدیریت ذخایر ژنتیکی دامهای اهلی در سطح جهانی و بین‌المللی شروع شده است. این بحث‌ها عموماً بر روی استراتژی حفظ نژادهای کمیاب متمرکز شده است. از آنجا که ضرورت ارزیابی و حفظ منابع ژنتیکی به طور گسترده‌ای در بیشتر کشورها مورد توجه قرار گرفته است، حفظ توده مرغهای بومی ایران سزاوار توجه جدی و فوری است (۳). توفیق برنامه‌های اصلاح نژادی بستگی به میزان تنوع موجود در جمعیت دارد و فقدان تنوع، قدرت انتخاب‌های ژنتیکی را محدود می‌سازد. شناخت دقیق این ذخایر ژنتیکی می‌تواند مبنای دقیق‌تری برای برنامه‌های اصلاح نژادی در آینده و به نتیجه رسیدن در زمان کوتاه‌تر و استفاده بهینه از منابع موجود در جهت تولید بیشتر گردد. با توجه به اینکه نژادهای بومی در هر کشوری به عنوان یک سرمایه ملی و محصول استراتژیک مطرح می‌باشند، حفظ و تکثیر این نژادها از

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و عضو هیأت علمی گروه علوم دامی

دانشگاه زابل

\* - نویسنده مسئول  
Email: mahdi.nik@gmail.com

۳- عضو هیأت علمی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی مشهد

۴- عضو هیأت علمی گروه علوم دامی دانشگاه باهنر کرمان

۵- کارشناسی ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

اصلاح نژاد و پشتیبانی مرغ بومی استان خراسان رضوی استفاده شد. تعداد ۹۰ نمونه به صورت تصادفی و از هر پرنده مقدار ۱<sup>cc</sup> خون (به طور کلی حجم خون در مرغ بین ۱۰-۸/۸ درصد از وزن پرنده بر حسب گرم است و حداکثر میزان خونگیری طی یک ماه، ۱۵ درصد از حجم خون می باشد) با استفاده از سرنگ از رنگ و داجی زیر بال (ناحیه مثلثی) گرفته شد (۴). برای جلوگیری از انعقاد خون از مقدار 0/5M ماده ضد انعقاد EDTA استفاده شد. استخراج DNA به روش فنول و کلوروفورم و کیفیت و کمیت آن با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه Nano Drop (DNA مورد نیاز برای اندازه گیری غلظت توسط این دستگاه یک میکرولیتر می باشد) انجام شد. در این بررسی از تعداد چهار جفت آغازگر ریز ماهواره ای MCW5، MCW16، MCW18 و MCW34 استفاده شد (جدول ۱). واکنش زنجیره ای پلیمرز در طی ۳۵ سیکل با استفاده از دستگاه Mastercycler gradient انجام شد که برای هر جایگاه شامل ۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA، ۰/۴ میکرومول از هر پرایمر، بافر PCR (1X)، ۰/۲ میلی مولار، کلرید منیزیم ۲ میلی مولار و یک واحد آنزیم Taq پلیمرز بود که در نهایت حجم نهایی واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر به ۲۵ میکرو لیتر رسانیده شد. سیکل حرارتی PCR به صورت مرحله واسرشته سازی اولیه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشته سازی در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۲°C به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و تکثیر نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. لازم به ذکر است برای پرایمرهای مختلف برای جلوگیری از ایجاد باندهای غیر تخصصی در دمای اتصال تغییراتی اعمال شد. صحت انجام PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۲ درصد (ولتاژ ۷۰ به مدت ۲۰ دقیقه) انجام شد. الکتروفورز ژل آکریل آمید ۸ درصد غیر واسرشته با استفاده از تانک عمودی مدل Veu-7704 شرکت پایا پژوهش با ولتاژ ۲۵۰ و ۳۰ میلی آمپر

ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است، چرا که بعد از هزاران سال انتخاب طبیعی و گذر از موانع بسیار و غلبه بر تمامی ناملایمات و شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و از دیاد نسل پرداخته اند. اندازه گیری فاصله ژنتیکی در جمعیت های دامی، اطلاعاتی را در مورد خصوصیات نژادی ارائه می دهد و به حفظ نژادهای بومی کمک خواهد کرد (۹). فراوانی زیاد و همباز بودن ریز ماهواره ها، چند شکلی خیلی زیاد و توزیع آن در سراسر ژنوم، آن را به عنوان یک نشانگر ژنتیکی با ارزش در آورده است (۷). چنگ و همکاران با استفاده از ۵ جفت نشانگر ریز ماهواره ای به بررسی تنوع ژنتیکی ۷ سویه مرغ بومی شاندونگ پرداختند. نتایج سویه های مورد بررسی را در سه گروه مجزا قرار داد (۸). هیل و همکاران با استفاده از ۲۲ دی نوکلئوتید میکروساتلایت به بررسی تفاوت ژنتیکی درون و بین جمعیتی ۵۲ جمعیت مرغ پرداختند. میانگین، کمترین و بیشترین مقدار پلی مورفیسم تخمین زده شد و نتایج، تاریخ ژنتیکی جمعیت ها را تأیید کرد. توزیع آللهای تخصصی و میزان اختلاف ژنتیکی در بین جمعیت ها این فرضیه که Red Jungle Fowl مهمترین جد مرغهای اهلی امروزی است را تأیید کرد (۱۰).

با توجه به حضور توده های مختلف با فنوتیپهای متفاوت (سبزواری، سیاه، حنایی، گل باقلایی و...) در این جمعیت، محاسبه تنوع ژنتیکی و بررسی وضعیت این جمعیت، جهت برنامه های اصلاح نژادی امری ضروری می باشد. با این حال این سوال مطرح است که آیا بیش از یک جمعیت در مرغان بومی خراسان وجود دارد که بایستی در بازسازی ذخایر ژنتیکی مد نظر قرار گیرد. تحقیق حاضر نخستین بررسی ژنتیکی مرغان بومی خراسان می باشد که با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره ای انجام شد.

## مواد و روش ها

در این تحقیق از جمعیت مرغ بومی استان واقع در مرکز

خواندن باندها و برای تجزیه تحلیل داده ها از نرم افزارهای Popgen32 برای تعیین فراوانی آللی، تعداد آللهای مؤثر، هتروزیگوسیتی و از نرم افزار NTSYS برای تشکیل ماتریس تشابهات و رسم دندروگرام تشابهات ژنتیکی استفاده شد.

به مدت ۲/۵ ساعت انجام شد. رنگ آمیزی ژل آکریل به روش نترات نقره صورت گرفت (شکل ۱). لازم به ذکر است با توجه به استفاده از پرایمرهای فوق در تحقیقات قبلی، سیکل حرارتی، ژل گذاری و رنگ آمیزی جهت کاهش خطای آزمایشی به منظور مقایسه با نتایج آن تحقیقات به طور مشابه انجام شد. از نرم افزار UVI برای

جدول ۱. مشخصات جایگاههای مورد استفاده

Marker	Chr.	Primer sequences 5'-3'
MCW5	E5	ACCTCCTGCTGGCAAATAAATTGC TCACCTTAGCTCCATCAGGATTCA
MCW16	E2	ATGGCGCAGAAGGCAAAGCGATAT TGGCTTCTGAAGCAGTTGCTATGG
MCW18	E1	GGAATTTGAACACCTGAGATTTCC CACTATGTTTATGGCAAACCTCCTG
MCW34	E6	TGCACGCACTTACATACTTAGAGA TGCCTTCCAATTACATTCATGGG

جدول ۲. فراوانی آللی در جایگاههای مورد بررسی

فراوانی آللی				
MCW34 (195-288bp)	MCW18 (194-290bp)	MCW16 (136-159bp)	MCW5 (193-255bp)	
۰/۰۵۸۱	۰/۰۸۸۷	۰/۱۳۹۵	۰/۱۰۸۰	A
۰/۳۱۴۰	۰/۱۶۹۴	۰/۱۳۹۵	۰/۲۶۷۰	B
۰/۲۱۵۱	۰/۱۴۵۲	۰/۱۹۷۷	۰/۱۴۷۷	C
۰/۴۱۲۸	۰/۱۹۳۵	۰/۳۸۹۵	۰/۱۱۹۳	D
*	۰/۴۰۳۲	۰/۱۳۳۷	۰/۲۳۳۰	E
*	*	*	۰/۱۲۵۰	F



شکل ۱. آللهای حاصله از آغازگر MCW16

دستگاه Nano Drop مورد بررسی قرار گرفت که از شرایط مطلوبی برای انجام PCR برخوردار بود و هیچگونه آلودگی

## نتایج و بحث

کیفیت و کمیت DNA، با استفاده از ژل آگاروز و

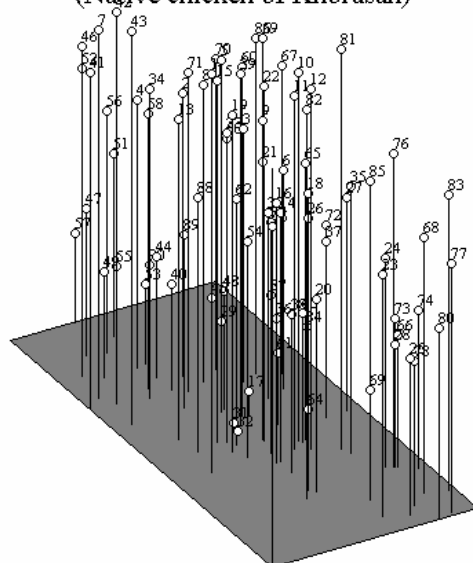
برای جمعیت مورد نظر ۰/۷۴ محاسبه شد که این مقدار تنوع ممکن است ناشی از همخوانی پایین در این جمعیت باشد. Qu و همکاران ضریب هتروزیگوسیتی را برای تمام سویه‌های مورد بررسی بیشتر از ۰/۵ (با میانگین ۰/۶۲۲) گزارش کردند (۱۲). بیشترین و کمترین مقدار شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب برای جایگاه‌های MCW5 (۱/۷۲۸) و MCW34 (۱/۲۲۴) محاسبه شد که البته این مقادیر با توجه به تعداد آللهای این دو جایگاه منطقی به نظر می‌رسید. شکل ۲ پراکندگی سه بعدی افراد جمعیت مورد بررسی را نشان می‌دهد. این نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، ثابت می‌کند که پراکندگی زیادی در بین افراد این جمعیت وجود دارد. این پراکندگی حاکی از تجمع برخی افراد در چند منطقه از تصویر سه بعدی است که با توجه به شماره های افراد مختلف موجود در جمعیت، این انباشتگی در نقاط مذکور مربوط به پرنده‌گانی است که از نظر ظاهری با یکدیگر مشابهند. نتایج به دست آمده از این تحقیق حاکی از آن است که علیرغم کاهش شدید ذخایر این جمعیت هنوز تنوع ژنتیکی در حد بالایی قرار دارد، پس امید است جهت حفظ این ذخایر ارزشمند ژنتیکی که امروزه در جهان بسیار مطرح می‌باشند، تدابیری از طرف سیستم‌های اجرایی استان اندیشیده شود. از طرف دیگر به نظر می‌رسد بیش از یک جمعیت مرغ بومی در منطقه خراسان وجود دارد، پس بایستی در جهت حفظ و نگهداری این ذخایر ژنتیکی اقداماتی صورت پذیرد.

### تشکر و قدردانی

از کلیه همکارانی که ما را در انجام هر چه بهتر این تحقیق کمک نمودند به‌ویژه آقایان دکتر نصیری، دکتر میرحسینی و آقایان مهندسین وحیدی، جوادمنش، طاهری، شوریده و میرزایی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

مشاهده نشد. در مجموع تمامی نشانگرهای ریز ماهواره مورد بررسی در این تحقیق چند شکلی بالایی را نشان دادند. فراوانی آللی و اندازه قطعات مشاهده شده برای هر جایگاه در جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین و کمترین تعداد آلل به ترتیب مربوط به جایگاه MCW5 (۶ آلل) و جایگاه ژنی MCW34 (۴ آلل) گزارش شد. شهبازی آذربیس و همکاران با استفاده از این نشانگرها متوسط تعداد آلل مشابه (۴/۸-۴/۲) را در ۳ جمعیت مرغ بومی ایران گزارش کردند (۲). بیشترین و کمترین تعداد آللهای مؤثر به ترتیب مربوط به جایگاه MCW5 (۵/۲۹۳) و جایگاه ژنی MCW34 (۳/۱۳۸) محاسبه شد (جدول شماره ۳). تعادل هاردی-واینبرگ تنها در جوامعی صادق است که شرایطی چون تعداد افراد جمعیت بالا، جمعیت بسته، جفت گیری تصادفی و احتمال جهش بسیار کم در آنها حکمفرما باشند. تمامی جایگاه‌های مورد بررسی با استفاده از آزمون‌های ( $X^2$ ) و ( $G^2$ ) انحراف از تعادل هاردی واینبرگ را نشان دادند. این انحرافات می‌تواند ناشی از کوچک بودن اندازه جمعیت مورد بررسی و انتخاب برای افزایش تولید برای نسلهای بعد باشد. کیو و همکاران در بررسی فاصله ژنتیکی ۷۸ سویه مرغ بومی چینی با استفاده از ۲۷ جفت نشانگر ریز ماهواره نشان دادند که انحراف از تعادل هاردی واینبرگ تنها در یک جایگاه در بین تمام جمعیت‌ها بود (۱۱). یکی از رایج‌ترین دستاوردهای نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی تنوع آللی، هتروزیگوسیتی می‌باشد. مقادیر مختلف هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده در جایگاه‌های مختلف برای جمعیت مورد بررسی در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به جدول ۳ بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار، مربوط به جایگاه MCW5 (۰/۸۱۵۷) و کمترین آن مربوط به جایگاه MCW34 (۰/۶۸۵۴) می‌باشد. نتایج حاکی از آن است که در جایگاه‌های با تعداد آلل بیشتر، میزان هتروزیگوسیتی بیشتری دیده می‌شود. تنوع درون جمعیتی

### 3D plot of eigenvectors (Native chicken of Khorasan)



شکل ۲. پراکنش سه بعدی جمعیت مورد بررسی

جدول ۳. نتایج حاصل از تجزیه آماری به وسیله نرم افزار Popgen32

مکان ژنی	تعداد آلل	تعداد مؤثر	شاخص اطلاعاتی شانون	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	میانگین هتروزیگوسیتی
MCW5	۶	۵/۲۹۳	۱/۷۲۸	۰/۳۹۷۷	۰/۸۱۵۷	۰/۸۱۱
MCW16	۵	۴/۰۳۸	۱/۵۰۶	۰/۴۷۶۷	۰/۷۵۶۸	۰/۷۵۲۴
MCW18	۵	۳/۸۸۰	۱/۴۷۹	۰/۵۹۶۸	۰/۷۴۸۴	۰/۷۴۲۳
MCW34	۴	۳/۱۳۸	۱/۲۲۴	۰/۴۴۱۹	۰/۶۸۵۴	۰/۶۸۱۴
میانگین	۵	۴/۰۸۷	۱/۴۸۴	۰/۴۷۸۳	۰/۷۵۱۶	۰/۷۴۶۸
انحراف معیار	۰/۸۱۶	۰/۸۹۴	۰/۲۰۶	۰/۰۸۵	۰/۰۵۳	۰/۰۵۳

### منابع

- ۱- اسماعیل خانیان، س. ۱۳۸۳. کاربرد نشانگرهای مولکولی در اصلاح نژاد دام. مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور.
- ۲- شهبازی آذر بريس، ص.، س. ض. میرحسینی. ۱۳۸۴. تنوع ژنتیکی مرغان بومی اصفهان، فارس و یزد با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. کرمان.
- ۳- عصفوری، ر. ۱۳۷۶. مارکرهای ژنتیکی در ده نژاد از گوسفندان بومی ایران. پژوهش و سازندگی. شماره ۳۴. ص ۱۵۶-۱۶۲.
- ۴- نصیری، م. ۱۳۸۲. درسامه مارکرهای مولکولی در بررسی ژنوم حیوانات. سومین همایش ملی بیوتکنولوژی.
- ۵- محقق دولت آبادی، م. ۱۳۷۸. ارزیابی صفات اقتصادی توده های مرغ بومی ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده

کشاورزی. دانشگاه تهران.

۶- وحیدی، س. م. ف. ۱۳۸۲. بررسی چندشکلی DNA در جمعیت‌های گاو و گاومیش بومی ایران با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان.

7. Bassam, B. J., and G. Caetano- Anolles. 1993. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 42: 181-188.
8. Cheng, H. J., Y. S. Yue, X. Z. Fan, C. S. Zhang, and L. X. Du. 2003. Analysis of genetic diversity of Shandong indigenous chicken breeds using microsatellite marker. *Yi Chuan Xue Bao*. 30(9): 855-60.
9. Goldstein, D. B., and C. Schlotterer. 2000. *Microsatellites evolution and application*. Oxford university press.
10. Hillel, J., M. A. Groenen, M. Tixier-Boichard, A. B. Korol, L. David, V. M. Kirzhner, T. A. Burke, Barre-Dirie, R. P. Crooijmans, K. Elo, M. W. Feldman, P. J. Freidlin, A. Maki-Tanila, M. Oortwijn, P. Thomson, A. Vignal, K. Wimmers, and S. Weigend. 2003. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genet Sel Evol*. 35(5): 533-57.
11. Qu, L. X., G. Li, K. Xu, H. Chen, H. Yang, G. Zhang, Z. Wu, G. Hou Xu, and N. Yang. 2006. Evaluation of genetic diversity in Chinese indigenous chicken breeds using microsatellite markers. *Sci China C Life Sci*. 49(4): 332-341.

## Analyses of genetic variation in Khorasan indigenous chicken breed by using of microsatellite markers

M. Nikbakhti\*, H. R. Mirzaee, M. Afsharian Shandiz, M. R. Mohammadabadi and D. A. Saghi<sup>1</sup>

### Abstract

This study investigated genetic variation within indigenous chicken of Khorasan using four microsatellite markers (MCW5, MCW16, MCW18 and MCW34). 90 blood samples were collected from this population and phenol-chloroform extraction method was used to isolate the DNA. The highest and the lowest allele number and effective alleles are shown in MCW5 (6 and 5.293) and MCW34 (4 and 3.138), respectively. The expected heterozygosity varied from 0.8157 (MCW5) to 0.6854 (MCW34). The amount of genetic variation within this population was found 0.74 this could be due to low inbreeding in this population. The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) test showed that all loci deviated from HWE ( $p < 0.005$ ). To short, the results of this study suggested that microsatellite DNA markers are useful tools for studying the genetic relationships among native chicken breeds. This is the first genetical study on indigenous chicken of Khorasan.

**Key words:** Genetic variation, Microsatellite marker, Indigenous chicken

---

1 - A Contribution from University of Zabol, University of Chabahar, Razi Vaccine Serum Research Institute, University of Kerman and Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center

\* - Corresponding author Email: mahdi.nik@gmail.com