بررسی تنوع ژنتیکی مرغان بومی ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD

• هوشنگ دهقان زاده، کارشناس ارشد مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی دریای خزر
• سید ضیاءالدین میر حسینی، استادیار گروه علوم دامی دانشگاه گیلان
• عبدالاحد شادپرور، استادیار گروه علوم دامی دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۲

چکیده

تنوع ژنتیکی پنج جمعیت از مرغهای بومی استانهای مازندران ، اصفهان ، فارس ، یزد ، آذربایجان غربی با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار گرفت . استخراج DNA با روش تغییر یافته استخراج نمکی (Salting out) انجام شد . تکثیر DNA ژنومی با تعداد ۳۰ فرد از هر جمعیت و با استفاده از ۱۰ آغازگر تصادفی۱۰ نوکلئوتیدی و از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) صورت گرفت . طول قطعات تکثیر یافته در آغازگرهای مختلف از ۲۳۷ تا ۳۲۴۰جفت باز متغیر بود. براساس باندهای چند شکل و براساس کل باندها، جمعیت‌های استان فارس و مازندران به ترتیب با ۰/۱۸۱۹ و ۰/۱۰۴۲ بیشترین فاصله ژنتیکی و جمعیت‌های استان فارس و اصفهان به ترتیب با ۰/۰۶۶ و۰/۰۳۹۱ کمترین فاصله ژنتیکی را داشتند. بیشترین و کمترین تنوع درون جمعیتی به‌ترتیب متعلق به جمعیت‌های استان یزد (۰/۲۰۸) و استان مازندران (۰/۱۵۶) بودند. درخت فیلوژنی ترسیم شده براساس روش UPGMA ، جمعیت‌های مرغ بومی مورد مطالعه را در دو گروه قرار داد : گروه اول شامل جمعیت‌های استانهای اصفهان، فارس، یزد و آذربایجان غربی و گروه دوم شامل جمعیت استان مازندران بود .

اگرچه در این تحقیق نشانگرهای اختصاصی برای هر جمعیت یافت نشد ولی با بررسی جایگاههای ایجادشده بوسیله آغازگرها، در چندین جایگاه تفاوتهای محسوسی مشاهده شد ،از جمله در جایگاههای X۰۳-۵ با طول قطعه ۱۸۵۳bp چهار جمعیت اصفهان، فارس، یزدوآذربایجان غربی دارای فراوانی۱وهمه افراد این جمعیت‌ها چنین جایگاهی را داشتند ولی در جمعیت مازندران با فراوانی۰/۲۲۵فقط۴۰٪ از افراد این جمعیت دارای چنین جایگاهی بودند.

با توجه به تنوع ژنتیکی پایین در درون جمعیت‌ها می‌توان با افزایش تعداد موثر جمعیت ،کنترل آمیزشها برای ایجاد حداقل همخونی در هر گله و نیز ایجاد جمعیت‌های جداگانه با تعداد اولیه بیشتر موجب جلوگیری از کاهش تنوع ژنتیکی می‌شود .

کلمات کلیدی: مرغان بومی ایران، تنوع ژنتیکی، چند شکلی، فاصله ژنتیکی ، نشانگرهای RAPD

Pajauhesh & Sazandegi No: 62 pp: 2-9

Study on DNA polymorphism of Iranian native chickens population using RAPD markers

By: H.Dehghanzadeh, Dept. of Biotechnology . The Caspian Sea Bony Fishes Research Center -Bandar Anzali. Gilan Province. S.Z.Mirhosseini, and A.A.Shadparvar, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Gilan, Rasht , Iran.

Genetic diversity of five Iranian native chickens population from five province including Mazandaran , Isfahan , Yazd, Fars and Azarbayjan were studied . From each population 30 birds randomly were selected and their blood samples were collected individually . The DNA of samples were extracted by modified salting-out method. The genomic DNA amplified by using 10 RAPD randomly primer through polymerase chain reaction (PCR) . Length of amplified fragments by all primers were varied from 237 to 3240 base pairs. Based on polymorphic bands with 0.1819 as well

Archive of SID
www.SID.ir

as total bands with 0.1042 , Fars and Mazandaran population had the highest genetic distance. On the other hand Fars and Isfahan population with 0.066 and 0.0391 had the lowest genetic distance Yazd and Mazandaran population with 0.208 and 0.156 had the highest and lowest inter population genetic diversity respectively . Based on phylogenic tree plotted by UPGMA method , chickens population were divided to two groups : Group I , including Isfahan , Fars , Yazd and Azarbayjan , and group II including Mazandaran only . Although there has not been found specific marker for each population in this study but we have found considerable differences in many loci . For instance locus of X03-5 the allele with 1853bp length , Isfahan ,Fars , Yazd and Azarbayjan has frequency of 1 but in Mazandaran population has frequency of 0.225.With regard to low genetic diversity in population we can prevent the decreasing of genetic diversity by increasing of effective number of population , controlling mating system to obtaining the lowest inbreeding in each population and estabilishing separate base population with large number of chickens .

Keywords : Iranian native chickens , Genetic diversity, Polymorphism , Genetic distance , RAPD marker .

مقدمه

حیوانات و گیاهان بومی به عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب می شوند و حفظ وتکثیرآنها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است . این موجودات پس از هزاران سال انتخاب طبیعی و مصنوعی و نیز گذر از موانع بسیار و با غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته اند همچنین نسبت به بسیاری از محدودیتهای محیطی سازگاری پیدا کرده اند (۱).

مرغهای بومی ایران مواد ژنتیکی پایه برای برنامه های اصلاح نژاد در زیستگاه خویش محسوب می شوند وشناخت دقیق این ذخایر ژنتیکی می‌تواند مبنای دقیق تری برای برنامه های اصلاح نژادی در آینده و نتیجه دهی آنها در زمان کوتاه‌تر و استفاده بهینه ازمنابع موجود در جهت افزایش تولید گردد(۱). وجود تنوع ژنتیکی لازمه انجام برنامه های اصلاح نژادی و بهره‌گیری ازتوان تولیدی حیوانات و گیاهان در هرمنطقه است . لذا حفظ تنوع ژنتیکی گونه هادر دستور کار موسسات اصلاح نژادی منطقه ای و سازمانهای بین المللی مربوطه قرار دارد (۴) .

استفاده از نشانگرهای DNA در بررسی و تعیین تنوع ژنتیکی گیاهان و حیوانات نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی کارایی بیشتری از خود نشان داده اند (۸). نشانگرهای RAPD ، یکی از نشانگرهای DNA محسوب می شوند که در آن از آغازگرهای تصادفی استفاده می شود . این نشانگرها قابلیت بسیار خوبی در تعیین تنوع ژنتیکی گونه های مختلف حیوانات و گیاهان از خود به نمایش گذاشته اند (۱۲) . عدم نیاز به دانستن اطلاعات از ژنوم موجود زنده ، عدم نیاز به مواد رادیواکتیو و سرعت بالای این روش باعث گردید که از آن برای تعیین تنوع ژنتیکی ، تهیه نقشه های ژنتیکی ، پزشکی مولکولی ، مطالعات ژنتیکی تکاملی و طبقه بندی موجودات زنده ،تعیین هویت و غیره استفاده گردد (۳). در این تحقیق تنوع ژنتیکی جمعیت‌های موجود مرغ بومی ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار گرفت .

مواد و روشها

از هر یک از جمعیت‌های مرغ بومی موجود در ۵ ایستگاه تحقیقاتی اصلاح نژاد مرغ بومی در استانهای مازندران ، اصفهان ، فارس ، یزد و آذربایجان غربی ، تعداد ۳۰ پرنده بصورت تصادفی انتخاب و به شکل انفرادی نمونه خون تهیه شد DNA نمونه‌ها با روش استخراج نمکی Salting out (۷) تهیه و کیفیت و کمیت آنها بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ ٪ اندازه گیری شد . تعداد ۲۳ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی تصادفی به‌صورت لیوفلیزه از شرکتهای اپرون (Operon) و TIB MolBiol جهت بررسی چند شکلی در جمعیت‌های فوق مورد مطالعه قرار گرفت . جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) ازترموسایکلر ساخت شرکت Amersham Pharmasia Biotech مدل TC۳۴۱ و برنامه حرارتی زیر استفاده شد :

مرحله واسرشت ابتدایی، واسرشت چرخه اصلی، اتصال ، بسط چرخه اصلی وبسط انتهایی به ترتیب در درجه حرارتهای ۷۲،۷۲،۳۴،۹۴،۹۴ درجه سانتیگراد و در مدت زمانهای ۵،۳،۱،۱،۳ دقیقه انجام گردید. تعداد دور چرخه اصلی برابر با ۴۰ بود.

تکثیر DNAژنومی از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز با حجم ۲۵ µl انجام گردید. واکنشها شامل:

بافر PCR	۱ X
کلرید منیزیم (MgCl۲)	۴ mM
آغازگر (Primer)	۰/۶ µM
دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)	۲۰۰ µM
آنزیم Taq DNA Polymerase	۱ Unit
DNA ژنومی	۲۰ ng

فرآورده‌ها روی، ژل‌آگارز ۱/۵٪ (Merck, Germany) و در بافر TAE حاوی اتیدیوم بروماید ۰/۵ µg/ml و بوسیله یک دستگاه الکتروفورز(OWOL,USA) تفکیک شده و با استفاده از ژل

Archive of SID
www.SID.ir

داکیومنتیشن (Bio Rad,USA) عکسبرداری گردید.

از ۱ Kb Ladder (MBI, Fermentase ,France) به عنوان استاندارد وزن مولکولی استفاده شد.

برای محاسبه فراوانی سهم نواری (Band Sharing Frequence) بین افراد مختلف از فرمول زیر استفاده شد: (۵):

معادله (۱) $BSF_{XY}=2NA_B/(N_A+N_B)$

N_{AB}: تعداد باندهای مشترک بین دو فرد A و B

N_A : تعداد باندهای حاصله از فرد A

N_B : تعداد باندهای حاصله از فرد B

شاخص یکنواختی داخل جمعیتی U (Index of the Uniformity) براساس فراوانی نوارها به صورت زیر محاسبه گردید (۵):

معادله (۲): $U=1/N \sum V_i$

Vi : فراوانی i اُمین نوار

N : تعداد باندهای امتیاز داده شده

برای محاسبه ضریب تشابه بین جمعیتی (Between Population Genetic Similarity) BGS از فرمول زیر استفاده شد (۶):

معادله (۳) : $BGS=1+S_{IJ}' \; IJ \; 0.5(S_I+S_J)$

S_{IJ}' : متوسط فراوانی سهم نواری برای تمام مقایسات افراد جمعیت‌های I و J

S_I : ضریب تشابه داخل جمعیتی در جمعیت I

S_J : ضریب تشابه داخل جمعیتی در جمعیت J

جهت محاسبه فاصله ژنتیکی (Genetic Distance) بین دو جمعیت (D) از فرمول ۴ استفاده گردید.(۹):

معادله (۴) $D=L_n[S_{IJ}'/(S_I.S_J)^{\frac{1}{2}}]$

همچنین جهت ترسیم درخت فیلوژنی و تجزیه خوشه‌ای و با روش UPGMA از نرم افزار POPGENE (۱۵) استفاده گردید.

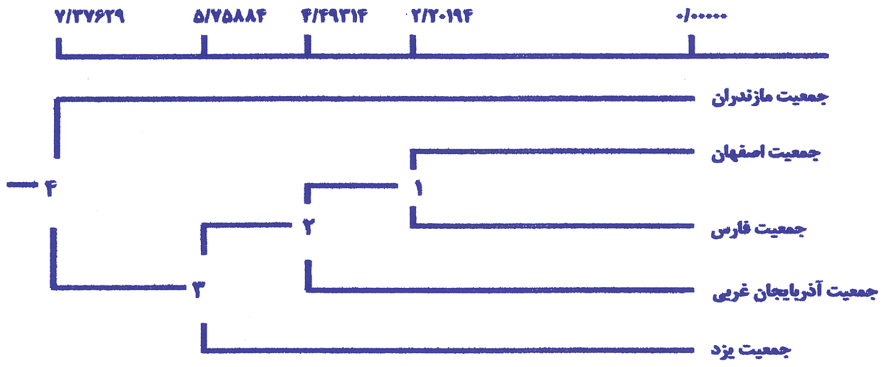
نتایج

از مجموع ۲۳ آغازگر ۱۰ بازی مورد استفاده ، ۴ آغازگر ، نواری تولید نکرده و از میان ۱۹ آغازگر باقیمانده ، ۹ آغازگر به دلایل داشتن نوارهای یک شکل در همه جمعیت‌ها و ضعیف بودن نوارهای حاصله حذف گردید .تعداد قطعات تکثیر یافته از ۴ قطعه در آغازگر OPX-۲۰ تا ۱۹ قطعه در آغازگرهای OPG-۱۸ و OPN-۱۶ متغیر بود. بیشترین نوارهای چند شکل توسط آغازگر OPN-۱۶ با ۱۶ نوار چند شکل و کمترین آن توسط آغازگرهای OPU-۱۴ و OPX-۲۰ با ۳ نوار چند شکل ایجاد گردید .متوسط قطعات تکثیر یافته به ازاء هر آغازگر با در نظر گرفتن قطعات تکثیر شده در همه آغازگرها برابر ۱۳قطعه و طول قطعات تکثیر یافته در آغازگرهای مختلف از ۲۳۷ تا ۳۲۴۰ جفت باز متغیر بود. سبک‌ترین وسنگین ترین قطعه به‌ترتیب توسط آغازگر OPT-۱۷ (۲۳۷ جفت باز) و آغازگر OPN-۱۶ (۳۲۴۰ جفت باز) تولید شد.

به طورکلی تعداد ۱۳۰ نوار از مجموع آغازگرهای مورد استفاده بدست آمد که ۸۶ نوار در بین جمعیت‌های مورد مطالعه چند شکل و ۴۴ نوار یک شکل حاصل گردید. لذا درصد قطعات چند شکل ۶۶/۱۵ برآورد گردید(تصاویر ۱ تا ۳) .

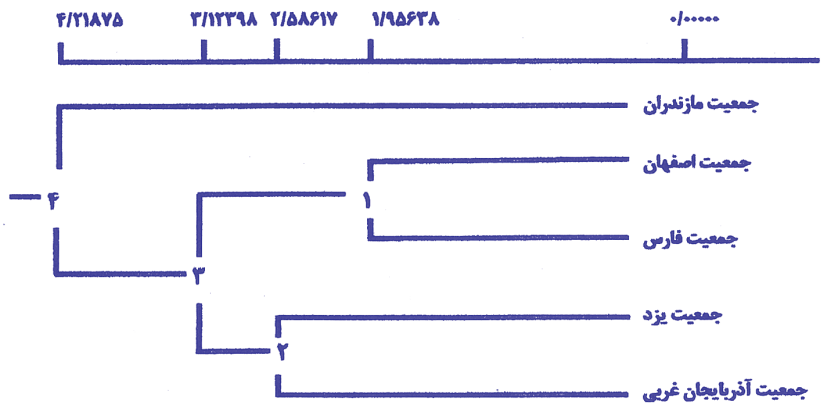
شاخص یکنواختی درون جمعیتی (U) و تنوع درون جمعیتی در پنج جمعیت مرغ بومی ایران درجدول شماره ۲ نشان داده شده است بر اساس اطلاعات این جدول کمترین و بیشترین تنوع درون جمعیتی به ترتیب متعلق به جمعیت‌های استان مازندران (۰/۱۵۶) و استان یزد (۰/۲۰۸) می باشد .

براساس نوارهای چند شکل بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های استان فارس و مازندران بود که بدون احتساب نا اریبی برابر ۰/۱۸۸۱ و با احتساب نا اریبی برابر ۰/۱۸۱۹ می‌باشد. همچنین جمعیت‌های استان فارس و اصفهان کمترین فاصله ژنتیکی را داشتند که این مقدار بدون احتساب نا اریبی برابر ۰/۰۷۲۵ و با احتساب نا اریبی برابر ۰/۰۶۶۰ می باشد (جدول ۳). همچنین براساس کل نوارها (نوارهای چند شکل و یک شکل) بیشترین فاصله ژنتیکی مجدداً به جمعیت‌های



شکل ۱ - درخت فیلوژنی ترسیم شده با استفاده از فراوانی نوارهای چند شکل و با احتساب نا اریبی به روش UPGMA (اعداد ۱ تا ۱۵ افراد مختلف این جمعیت می‌باشند. قطعات ۱۶۴۰ bp ، ۱۸۵۰ bp و ۸۳۰ bp در افراد مختلف این جمعیت چندشکلی را نشان می‌دهند M :نشانگر اندازه۱ Kb ladder وNC :کنترل منفی)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲ - درخت فیلوژنی ترسیم شده با استفاده از فراوانی نوارهای چند شکل و یک شکل(کل نوارها) و با احتساب نا اراییی به روش UPGMA

استان فارس و مازندران تعلق داشت که بدون احتساب نا اریبی برابر ۰/۱۰۸۰ و با احتساب نا اریبی برابر ۰/۱۰۴۲ می باشد و جمعیت‌های استان فارس و اصفهان کمترین فاصله ژنتیکی را داشته که این مقدار بدون احتساب نا اریبی برابر ۰/۰۴۳۰ و با احتساب نا اریبی برابر ۰/۰۳۹۱ محاسبه شد (جدول ۴) .

جدول ۱- نامهای بین المللی و توالی آغازگرهایی که نوارهای چند شکل تولید نمودند

نام بین المللی آغازگر	توالی آغازگر
OPG-۱۸	۵´- GGCTCATGTG - ۳´
OPU-۱۳	۵´- GGCTGGTTCC - ۳´
OPU-۱۴	۵´- TGGGTCCCTC - ۳´
OPN-۱۶	۵´- AAGCGACCTG - ۳´
OPX-۱۳	۵´- ACGGGAGCAA - ۳´
OPX-۲۰	۵´- CCCAGCTAGA - ۳´
OPT-۱۷	۵´- CCAACGTCGT - ۳´
OPX-۰۳	۵´- TGGCGCACTG - ۳´
OPT-۲۰	۵´- GACCAATGCC - ۳´
OPL-۲۰	۵´- TGGTGGACCA - ۳´

درخت فیلوژنی ترسیم شده براساس روش UPGMA(۱۵) و با استفاده ازفراوانی نوارهای چند شکل و با احتساب نا اریبی بصورت شکل ۱می‌باشد:

شکل ۲ نشان‌دهنده درخت فیلوژنی ترسیم شده براساس روش UPGMA (۱۵) و بااستفاده از فراوانی کل نوارها (چند شکل و یک شکل) و با احتساب نااریبی است.

براساس این روش و با مشاهده درخت فیلوژنی مشاهده می‌شود که جمعیت‌های مورد مطالعه در دو گروه قرار گرفتند :

گروه اول : جمعیت‌های استان فارس ، اصفهان ، یزد و آذربایجان غربی

گروه دوم : جمعیت استان مازندران

بحث

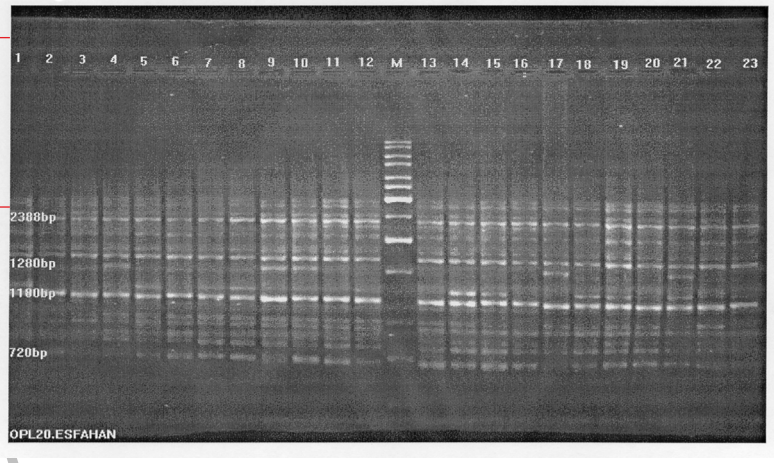
با توجه به جدول شماره ۲ جمعیت استان مازندران و پس از آن استان فارس بیشترین یکنواختی ژنتیکی درون جمعیتی را دارا هستند. در بین جمعیت‌های پنجگانه مورد بررسی این دو جمعیت از قدیمی‌ترین جمعیت‌های تشکیل شده هستند که در آنها انتخاب ژنتیکی نیز صورت می پذیرد . پایین بودن تعداد جمعیت اولیه و نیز انتخاب برای حیوانات با تولید برتر و نیز تعداد نسلهای آمیزشی این جمعیت‌ها می‌تواند موجب بالا بودن تشابه ژنتیکی درون جمعیتی آنها باشد. درصورتیکه این جمعیت‌ها تنها جمعیت‌هایی باشند که جهت حفظ ذخایر ژنتیکی مورد استفاده قرارمی‌گیرند باید مورد حفاظت ژنتیکی بیشتری قرار گیرند تا تنوع موجود در آنها کاهش نیابد. با توجه به اینکه جمعیت استان یزد از قدمت کمتری برخوردار بوده و تعداد نسلهای مورد انتخاب نیز خیلی کم می‌باشد لذا تنوع بیشتری در آن به چشم می‌خورد.

با توجه به جدول شماره ۳ و ۴ جمعیت‌های استان فارس و اصفهان دارای کمترین فاصله ژنتیکی هستند. همجواری دو استان و

Archive of SID

www.SID.ir

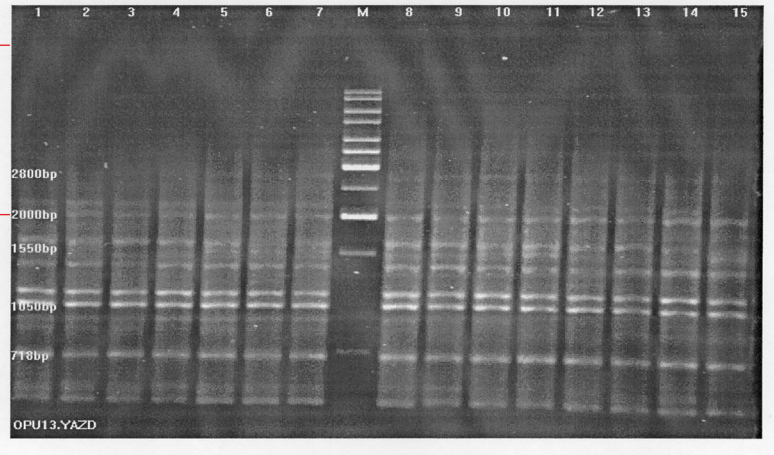
تصویر۱ - الگوی قطعات تکثیر شده آغازگر OPG-۱۸ در افراد مختلف جمعیت مازندران (اعداد تا ۱۵ افراد مختلف این جمعیت می‌باشند. قطعات ۱۸۵۰bp، ۱۶۴۰bp و ۸۳۰bp در افراد مختلف این جمعیت چند شکل را نشان می‌دهند. M: نشانگر اندازه، 1kbladde و NC: کنترل منفی)



تصویر۲ - الگوی قطعات تکثیر شده آغازگر OPL-۲۰ در افراد مختلف جمعیت اصفهان

(اعداد ۱ تا ۲۳ افراد مختلف این جمعیت می‌باشند. قطعات پایین ۱۶۴۰ bp، ۲۳۸۸ bp و قطعه ۱۲۸۰ bp و قطعات بالای ۱۱۸۰ bp درافراد مختلف چند شکلی را نشان می‌دهند M : نشانگر اندازه 1Kb ladder)

احتمال مهاجرت بین موجودات این دو منطقه و تشابه بیشتر شرایط منطقه ای موجب شده است که جمعیت‌های مذکور دارای بیشترین تشابه باشند. این دو جمعیت به لحاظ مقایسه تنوع ژنتیکی درون جمعیتی نیز تفاوت کمی با یکدیگر دارند .جمعیت‌های استان فارس و مازندران بیشترین فاصله ژنتیکی را نسبت به همه دارا هستند . وجود رشته کوههای البرز و زاگرس موجب شده است که شرایط محیطی کاملاً متفاوتی بین منطقه شمال ایران در استانهای مازندران و گیلان و نیز مناطق مرکزی و جنوب غربی کشور ایجاد شود . این تفاوت شرایط محیطی موجب شده است که جمعیت‌های سازگار با هر یک از



تصویر۳ - الگوی قطعات تکثیر شده آغازگر OPU-۱۳ در افراد مختلف جمعیت یزد

(اعداد ۱ تا ۱۵ افراد مختلف این جمعیت می باشند. قطعه ۱۵۵۰ bp در افراد مختلف این جمعیت چندشکلی را نشان می دهند) (M : نشانگر اندازه 1Kb ladder)

این مناطق با خصوصیات ژنتیکی متفاوت بین دو منطقه فارس و مازندران ایجاد شود . فاصله زیاد دو منطقه و نیز موانع طبیعی موجود دو منطقه نیز امکان مهاجرت بین این جمعیت‌ها را کاهش می‌دهد. لذا طبیعی است که فاصله ژنتیکی این دو جمعیت نسبت به جمعیت‌های دیگر بیشتر باشد.

تشابه ژنتیکی مورد بررسی در این تحقیق با در نظر گرفتن فقط نوارهای چند شکل و با احتساب نا اریبی بین۰/۸۳۴ تا

Archive
www.SID.ir

جدول ۲ - شاخص یکنواختی ژنتیکی و تنوع درون جمعیتی در جمعیت‌های مرغ بومی ایران

جمعیت‌های مرغ بومی					
	مازندران	اصفهان	فارس	یزد	آذربایجان غربی
شاخص یکنواختی داخل جمعیتی	۰/۸۴۴	۰/۸۲۰	۰/۸۴۰	۰/۷۹۲	۰/۸۱۱
تنوع داخل جمعیتی	۰/۱۵۶	۰/۱۸۰	۰/۱۶۰	۰/۲۰۸	۰/۱۸۹

جدول ۳ - شاخص تشابه و فواصل ژنتیکی بین جمعیتی در جمعیت‌های مرغ بومی ایران با استفاده ازنوارهای چند شکل و با احتساب نا اریبی (با تصحیح اریبی)

جمعیت‌های مرغ بومی	استان مازندران	استان اصفهان	استان فارس	استان یزد	استان آذربایجان غربی
استان مازندران	۰/۰۰۰۰	۰/۸۷۵۵	۰/۸۳۳۷	۰/۸۵۲۳	۰/۸۹۱۰
استان اصفهان	۰/۱۳۳۰	۰/۰۰۰۰	۰/۹۳۶۱	۰/۸۸۷۹	۰/۹۲۴۹
استان فارس	۰/۱۸۱۹	۰/۰۶۶۰	۰/۰۰۰۰	۰/۸۷۲۳	۰/۹۰۳۳
استان یزد	۰/۱۵۹۸	۰/۱۱۸۹	۰/۱۳۶۶	۰/۰۰۰۰	۰/۹۱۳۹
استان آذربایجان غربی	۰/۱۱۵۴	۰/۰۷۸۱	۰/۱۰۱۷	۰/۰۹۰۰	۰/۰۰۰۰

* اعداد بالای قطر نشان دهندهٔ شاخص تشابه بین جمعیتی و پایین قطر نشان‌دهندهٔ فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌باشد.

جدول ۴ - شاخص تشابه و فواصل ژنتیکی بین جمعیتی در جمعیت‌های مرغ بومی ایران با استفاده از کل نوارها و با احتساب نا اریبی (با تصحیح اریبی)

جمعیت‌های مرغ بومی	استان مازندران	استان اصفهان	استان فارس	استان یزد	استان آذربایجان غربی
استان مازندران	۰/۰۰۰۰	۰/۹۲۶۶	۰/۹۰۱۰	۰/۹۱۳۳	۰/۹۳۵۸
استان اصفهان	۰/۰۷۶۲	۰/۰۰۰۰	۰/۹۶۱۶	۰/۹۳۴۵	۰/۹۵۶۰
استان فارس	۰/۱۰۴۲	۰/۰۳۹۱	۰/۰۰۰۰	۰/۹۲۴۴	۰/۹۴۲۴
استان یزد	۰/۰۹۰۷	۰/۰۶۷۷	۰/۰۷۸۶	۰/۰۰۰۰	۰/۹۴۹۶
استان آذربایجان غربی	۰/۰۶۶۴	۰/۰۴۵۰	۰/۰۵۹۴	۰/۰۵۱۷	۰/۰۰۰۰

* اعداد بالای قطر نشان دهندهٔ شاخص تشابه بین جمعیتی و پایین قطر نشان‌دهندهٔ فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها می باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

۹۳۶۰ و بـدون احتسـاب نااریبی بین ۰/۸۲۸ تا ۰/۹۳۰ متغیر می باشـد. این مقدار با در نظر گرفتن کل نوارها و با احتساب نا اریبی بین ۰/۹۰۱ تا ۰/۹۶۲ و بدون احتسـاب نااریبی بین ۰/۸۹۸ تا ۰/۹۵۸ متغیر است . تشابه ژنتیکی محاسـبه شـده در این تحقیق تا حدی با تنوع ژنتیکی در بین نژادهای مرغ بومی چین که با استفاده از دو نشانگر ریز ماهواره و RAPD مـورد مطالعه قـرار گرفته بودمطابقت دارد .شـاخص تشـابه ژنتیکی در بیـن نژادهـای مرغ بومی چین بیـن ۰/۸۴۸ تا۰/۹۵۵تغییرمی کرد(۱۴). میزان تشابه ژنتیکی درون و بین شش لاین بلدرچین محاسبه شد(۱۱). در این مطالعه بیشترین میزان تشابه ژنتیکی (۰/۸۱۵) مربوط به لاین WES بود. آنها علت آن را توسعهٔ این لاین از یک جمعیت پایهٔ کوچک و انتخابی که در هر نسل در این لاین انجام می شود بیان نمودند.

از نشـانگر RAPD برای بررسـی ارتباط ژنتیکی بین ۴ نژاد مرغ بومی (چین) اسـتفاده شـد نتایج این تحقیق نشـان داد که از نشـانگر RAPD می‌توان برای شناسایی نژادها استفاده کرد(۱۳).

با توجه به درخت فیلوژنی شکلهای ۱ و ۲، جمعیت‌های استانهای فارس ، اصفهان ، یزد ،آذربایجان غربی در یک خوشه و جمعیت استان مازندران بصورت مجزا در یک خوشـه دیگر قرار گرفته‌اند. با مشـاهده درخت فیلوژنی براسـاس فقط نوارهای چندشـکل و احتساب نااریبی مشاهده می‌شود که دو جمعیت استان اصفهان و شیراز بیشترین تشابه ژنتیکی را با همدیگر داشته و جمعیت استان آذربایجان غربی با اندکی تفـاوت در ایـن خوشـه قرار گرفته و جمعیت اسـتان یزد نسـبت به سـه جمعیت مذکور رابطه دورتری دارد. جمعیت اسـتان مازندران نیز بصورت یک خوشه مجزا قرار گرفته است .

مشـاهده درخت فیلوژنی براسـاس کل نوارها و احتسـاب نااریبی نشان می‌دهد که برخلاف درخت فیلوژنی قبل جمعیت استانهای یزد و آذربایجان غربی در یک خوشـه قرار گرفته اند جمعیت‌های فوق در یک اندک فاصله دورتر با جمعیت استانهای اصفهان و فارس که در خوشه دیگـر قرار گرفته اند متصل می‌شـوند و جمعیت مازنـدران نیز همچون درخت فیلوژنی قبل به‌صورت مجزا در خوشـه ای دیگر قرار گرفته که دریک نقطه به هم می‌پیوندند.

پیشنهادات

هزینـه بالای نگهـداری و اصلاح نـژاد جمعیت‌های ایسـتگاه‌های تحقیقاتـی پنجگانه موجب شـده اسـت تا احتمال حـذف برخی از ایسـتگاه‌ها مورد بررسـی معاونت امور دام وزارت جهاد کشـاورزی قرار گیرد . همانطور که ذکر گردید جمعیت‌های اسـتان فارس و اصفهان دارای کمترین فاصله ژنتیکی می باشند و همچنین همجواری دو استان واحتمال مهاجرت بین موجودات این منطقه وتشـابه شـرایط منطقه ای باعث تشابه بیشتر این دو جمعیت گردیده است در صورت حذف برخی از ایستگاه‌ها از سـوی معاونت امور دام جهاد سـازندگی، تشکیل یک جمعیت از این دو منطقه می‌تواند نماینده مناسب‌تری برای دو استان باشد .

تنوع ژنتیکی داخلی جمعیت‌های مورد مطالعه خیلی زیاد نیست. پایه و اسـاس تنوع ژنتیکی دریک گونه ، تغییرات جهشـی است که بـا ایجـاد آللهـای مختلف ، شـکلهای فنوتیپی و ژنوتیپـی متفاوت را بوجود آورده است (۱۰) . تنوع ژنتیکی در یک گونه با حداکثر نمودن هتروزیگوسیتی اولیه ، حداقل نمودن تعداد نسل ، حداکثر نمودن اندازه جمعیـت (N) و حداکثر نمودن نسـبت اندازه مؤثـر جمعیت به اندازه جمعیـت (Ne/N) افزایـش می‌یابد (۲). در ایـن جمعیت‌ها خصوصاً در جمعیت اسـتان مازندران و فارس پیشـنهاد می شـود با افزایش اندازه مؤثـر جمعیت، افزایش نسـبت اندازه مؤثر جمعیـت به اندازه جمعیت (Ne/N) و کنترل آمیزش‌ها از کاهش تنوع ژنتیکی و افزایش همخونی جلوگیری گردد.

بـا توجه بـه پروفیلهای حاصل از به‌کارگیری آغازگرهای RAPD، همچنیـن پیشـنهاد می‌گردد تعدادی از قطعات یک شـکل حاصل از این تحقیق، کلون شـده و تعیین توالی گردد و اطلاعات این توالی با اطلاعات ژنوم سـایر ماکیان (با توجه به اطلاعات بانک ژنی گونه‌های اهلی) مورد مقایسـه قرار گیرد.احتمالاً می‌توان از بین این قطعات یک شکل نشانگر اختصاصی گونه‌ای پیدا نمود.

بعد از تعیین توالی می توان نشـانگر RAPD را به نشـانگرهای STS و SCAR تبدیـل نمود و از آن برای تهیه نقشـه‌های ژنومی مرغ بومی ، و همچنیـن تعیین توالی صفات تولیدی و پیـدا کردن محل قرار گرفتن آنها در ژنوم مرغ بومی اسـتفاده کرد . با بررسـی صفات تولیدی و به‌کارگیری روشـهای اصلاح نژادی و اقدامات لازم در ایـن زمینه ظرفیت ژنتیکی این حیوانات را بالا برد و با شناسـایی و انتخاب ژنوتیپهای برتر و انتقال آن در سـطح وسیع به روسـتاها به بهبود شرایط ژنتیکی آنها اقدام نمود . با توجه به اینکه بهبود شـرایط ژنتیکی با بهبود شـرایط محیطی توام می باشد و با توجه به سـازگاری این حیوانات با شرایط جغرافیایی منطقه زادگاه خود در اثر انتخاب ، عامل مثبتی اسـت که شانس موفقیت را بیشتر می کند ، زیرا این سـازگاری قطعاً" تحت تاثیر ژنهایی قرار دارند که از یک نسـل به نسل بعد منتقل می شـوند و می توان پس از شناسـایی از وجود این ژنها به نحو شایسته ای استفاده کرده و نهایتاً" نتایج خوبی را در امر خودکفایی فرآورده های طیور کسب نمود.

با توجه به قابلیت روش RAPD در ایجاد قطعات چند شکل فراوان با تعداد آغازگرهای بیشترتشخیص نشانگر اختصاصی در بین جمعیت‌ها امکان پذیر خواهد بود . بررسی تنوع ژنتیکی این جمعیت‌ها بااستفاده از نشـانگرهای مولکولی دیگر از جمله ریزماهواره ها و مقایسه آن با نتایج حاصل از روش RAPD می تواند میزان اطمینان به نتایج این تحقیق را افزایش دهد.

با توجه به نتایج پیشـنهاد می گـردد از آغازگرهایی که در این تحقیق چندشـکلی پاییـن از خود نشـان دادند مثـل OPX-۲۰ و OPU-۱۴ در تحقیقات بعدی استفاده نگردد .

سپاسگزاری

نویسـندگان مراتب تقدیر و تشـکر خود را از سـازمان پژوهشـهای علمی و صنعتی استان گیلان ودانشگاه گیلان بواسطه حمایت مالی و معنوی و نیز انستیتوی تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشـاورزی ، مؤسسـه تحقیقات برنج کشـور به دلیل در اختیار گذاشـتن آزمایشـگاه و انتقال تجربیات و نیز اداره کل طیـور معاونـت امور دام وزارت جهاد کشـاورزی کـه در تهیه نمونه‌ها همـکاری نمودند ابراز می‌دارند . همچنیـن از آقایان دکتر متقی طلب،

Archive of SID
www.SID.ir

دکتر پورکاظمی ،مهندس بناءبازی، مهندس عبادی، مهندس فشخامی، مهندس انصاری ،مهندس سعیدنیا، و مهندس جوانروح که نهایت لطف و همکاری را در اجرای پروژه به‌عمل آوردند سپاسگزاری می‌شود

منابع مورد استفاده

۱ - میرحسینی ، س .ض . ۱۳۷۷. بررسی تنوع ژنتیکی کرم ابریشم ایران با استفاده از نشانگرهای پروتئینی ودی ان آ، رساله دکتری ، دانشگاه تربیت مدرس .

2-Barker, J.S.F. 1994. A global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds. Proceeding of the 5th world congress on Genetics Applied to Livestock production. niversity ofGuelph, Guelph.No21: 501-508.

3-Cushwa, W.T., and J.F. Medrano, 1996. Application of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genetic analysis of Livestock . Animal Biotechnology, 7: 11-13.

4-Frankhan,R.1994.Conservation of genetic diversity for animal improvement 5th world congress on Genetic Applied to livestock production.27:385- 392.University of Guelph, Ontario, Canada.

5-Kuhnelein,U., Y.Dawe, D.Zadworny , and J.S.Gavora,1989.DNA fingerprinting :A tool for determining genetic distances between strains of poultry. Theoritical and Applied Genetic.77: 662-672.

6-Lynch,M.1990.The similarity index and DNA fingerprinting .Molecular Biology Evolution. 7: 478-484.

7-Miller,S,A., D.D.Dykes and H.F.Polesky.1988. A simple salting out precedure for extracting DNA from Human nucleated cells. Nucleic Acid Research,16(3):1015.

8-Nagamine,Y.,and M. Higuchi, 2001. Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. Journal of AnimalBreeding andGenetic. 118: 101-109.

9-Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalists, 106: 83-291.

10-Notter, D.R. 1999. The importance of diversity in livestock population of the future. Journal of Animal science, 77: 61-69.

11-Shrma D., Appa K.B. C., and Totey S.M. 2000. Measurment of within and between population genetic variability in quails, British Poultry Science 41:29-32.

12-Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990.DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers ara useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18: 6531-6535.

13-Xuemei L., Guanfu Y., Xiquan Z., and Chong W. 1996. Analysis of relationships between four fowl breeds in Guangdong with RAPD markers, Animal Biotechnology Bulletin 5: 63- 66.

14-Xi-quan, Z., L. Xue-Mei, L. Jing-Shun, Y. Guan-Fu, and W. Zian-hua.1998. Population genetic variability of microsatllite polymorphisms and RAPDs in chines chicken breeds in Guangdong. Chinese Journal of Genetics. 25: 92-97.

15-Yeh, F.C., R. Yang, and T. Boyle.1999. POPGENE. Version 1.31.Microsoft window - based freeware for population genetic analysis , Quick user guide, University of Alberta, U.S.A.

Archive of SID

www.SID.ir