

بررسی وضعیت باتلنک در نمونه‌های از جمعیت کبک‌ایرانی با استفاده از آنالیز ریز ماهواره‌ها

عباس کربلائیان*^۱، سیروس امیری نیا^۲، بهزاد همتی^۱ و حسین عمرانی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۱۱

تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۲/۱۰

چکیده

در این تحقیق، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و احتمال بروز باتلنک در جمعیت کبک‌ایرانی موجود در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور که از مراتع کشور گردآوری شده بودند از ۸ نشانگر ریز ماهواره استفاده گردید. جایگاه‌های مورد استفاده عبارت بودند از: Aru 1F25، Aru 1E9، Aru 1E7، Aru 1I 125، Aru 1G49، Aru 1K10، Aru 1A1 و Aru 1D39. جمعیت مذکور برای تمامی مکان‌های ژنی مورد مطالعه انحراف معنی داری از تعادل هاردی واینبرگ را نشان دادند. بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده به ترتیب مربوط به جایگاه‌های Aru 1G49 با 21 آلل و Aru 1K10 با ۴ آلل بود. میانگین فراوانی آللی (na)، شاخص شانون و PIC^۱ به ترتیب ۰/۷۰۹۲ و ۱/۸۲۸۳، ۰/۳۳۳ و ۰/۷۰۹۲ برآورد شدند. تنوع درون جمعیتی نیز بر اساس آنالیز مقادیر هتروزیگوسیتی بررسی شد. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۲۰۳ و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب در این جمعیت ۰/۷۹۷ بود. تعداد مورد انتظار جایگاه‌های با افزایش میزان هتروزیگوسیتی با استفاده از مدل‌های IAM و TPM به ترتیب ۳/۵۶ و ۳/۵۴ بدست آمد. مقادیر احتمالات نیز در این دو مدل به ترتیب ۰/۴۳۳۱ و ۰/۴۲۲۸ محاسبه شد. برای بررسی وجود اختلاف معنی دار بین تعداد جایگاه‌هایی که افزایش تنوع ژنتیکی دارند آزمون‌های Sign test, Standardized different test و آزمون رتبه‌ای Wilcoxon - که نسبت به دو آزمون دیگر توانمند تر است - به کار گرفته شدند و بر اساس آن می‌توان گفت که در جمعیت مذکور باتلنک اتفاق نیفتاده است.

کلمات کلیدی: کبک‌ایرانی، نشانگرهای ریز ماهواره، هتروزیگوسیتی، باتلنک

۱- گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۲- عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

* عهده دار مکاتبات: Karbala_47@yahoo.com

مقدمه

تقاضا برای پرورش صنعتی سایر ماکیان و عدم وجود مزارع پشتیبان و تمرکز بخش‌های مرغ مادر، تخمگذار، گوشتی و جوجه کشی در یک مزرعه و کمبود آگاهی‌های اصلاح نژادی در بین پرورش دهندگان مخاطرات زیادی را برای این پرندگان به همراه دارد، لذا افزایش اطلاعات از ساختار ژنتیکی پرندگانی مثل کبک و بلدرچین (۳) می‌تواند مقدمه‌ای بر برنامه ریزی‌های اصلاح نژادی آتی باشد. از آنجا که تعیین خصوصیات ژنتیکی و فنوتیپی برای تعیین اهداف اصلاح نژادی و اولویت بندی نژادها برای حفظ ذخایر ژنتیکی ضروری می‌باشد از نشانگرهای مولکولی که دارای چند شکلی بالا، توارث مندلی، سهولت کار و توزیع گسترده در طول ژنوم می‌باشند استفاده می‌شود (۵). در پژوهش‌های جمعیتی بر روی کبک‌های پا قرمز که توسط Ferrero و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از ۱۶ نشانگر ریز ماهواره انجام شد و همچنین تحقیقات بروفه (۱۳۸۹) که بر روی جمعیت کبک ایرانی موجود در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، با استفاده از ۸ نشانگر ریز ماهواره انجام شد، آلل‌های جدیدی که معرف وجود پلی مورفیسم در جایگاه مذکور بودند شناسایی شدند. علاوه بر این مطالعات متعددی در خصوص بررسی روابط خویشاوندی و تفاوت‌های ژنتیکی به کمک نشانگرهای ریز ماهواره‌ای برای کبک گزارش شده است (۱۲)، (۱۱، ۴). این تحقیق به عنوان دومین بررسی بر روی ساختار ژنتیکی کبک ایرانی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام شده است. به طور کلی باتلنک به کاهش ناگهانی تعداد افراد جمعیت در اثر وقوع حوادث مختلف گفته می‌شود. علایم افت همخونی^۱ پس از کاهش اندازه جمعیت موثر موجب افزایش آمیزش خویشاوندی در جمعیت پدیدار می‌شود. واریانس ژنتیکی نیز معمولاً کاهش می‌یابد و بسیاری از آلل‌ها از مخزن ژنی حذف می‌شوند و لذا فراوانی‌های ژنی دستخوش تغییر می‌شوند. در جمعیت‌های مبتلا به باتلنک، احتمال باقی ماندن ژن‌هایی با فراوانی بالاتر بیشتر و همچنین احتمال کاهش و عدم وجود ژن‌های نادر بسیار زیاد است و به دلیل ثبات آلل‌های کشته و کاهش واریانس ژنتیکی بر روی مقاومت و سازگاری فرد تاثیر منفی می‌گذارد. ضمناً به دلیل کاهش اندازه موثر جمعیت، موتاسیون‌های مفید کمتری رخ می‌دهد و به سبب رانده شدن ژنی بسیاری از آلل‌های مفیدی که در اثر موتاسیون قبلاً ایجاد شده بود نیز حذف خواهند شد (۸)، لذا بسیاری از جمعیت‌های باتلنک یافته به این ترتیب منقرض شده و یا در معرض خطر انقراض قرار می‌گیرند. هدف از این تحقیق بررسی احتمال بروز باتلنک در نمونه‌ای از جمعیت کبک ایرانی موجود در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

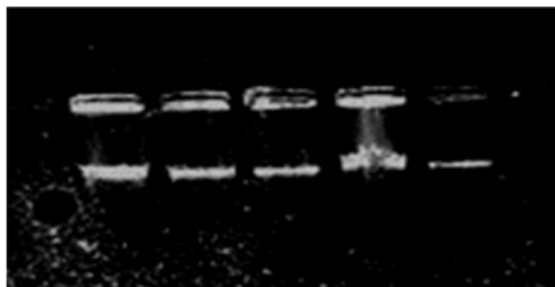
در تحقیق حاضر از ۱۲۰ قطعه کبک ۵ ماهه موجود در موسسه تحقیقات علوم دامی (جمع آوری شده از مراتع کشور)، ۲۰۰ میکرولیتر خون گرفته شد و سپس استخراج نمکی DNA صورت گرفت (۷). پس از استخراج DNA،

برای تعیین کیفیت DNA ژنومی از دو روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد (۵). برای تعیین میزان چند شکلی (PIC) به عنوان یکی از معیارهای مناسب در مطالعه تنوع ژنتیکی، تعداد آلل^۱، تعداد آلل موثر^۲ و میزان هتروزیگوسیتی از آغازگرهای طراحی شده توسط Ferrero (۲۰۰۷) استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، در صورت جدول شماره ۱ مشاهده می شود. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از بافر PCR، dNTPs، MgCl₂ و آنزیم Taq پلیمرز ساخته شده توسط شرکت Gene Craft آلمان استفاده شد. برنامه‌های دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۳۵ سیکل تکثیر با دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، دمای واسرشت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمر متغیر (جدول ۲) به مدت ۳۰ ثانیه، دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و دمای گسترش نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل پلی اکریلامید ۸٪ الکتروفورز و متعاقباً با روش نترات نقره رنگ آمیزی گردید (۹) و سپس تعیین ژنوتیپ صورت گرفت و داده‌های حاصل با استفاد از نرم افزار POPGENE (۱۳) و برای اطمینان بیشتر توسط نرم افزار GENALEX مورد آنالیز قرار گرفتند و جهت برآورد میزان باتلنک از نرم افزار BOTTLENECK استفاده شد. نمونه‌ها عاری از هر گونه کشیدگی و شکستگی بودند که نشان دهنده کیفیت خوب و عدم آلودگی آن‌ها بود و کیفیت آن‌ها برای انجام واکنش PCR مناسب ارزیابی گردید. کلیه نشانگرهای مورد مطالعه در این تحقیق، به جز دو نشانگر Aru1A1 و Aru1F25، پس از بهینه سازی میزان دماها و غلظت اجزای مورد استفاده در واکنشهای زنجیره‌ای پلیمرز به خوبی تکثیر شدند. محاسبه تنوع ژنی مورد انتظار در این جمعیت از روی تعداد آلل‌های مشاهده شده انجام می پذیرد به این ترتیب برای انجام آزمون باتلنک مدل TPM (جهش دو مرحله‌ای) که حد واسط دو مدل SMM (جهش مرحله‌ای) و IAM (آلل نامحدود) می باشد و نسبت به این دو مدل، برای ریز ماهواره‌ها مناسب تر می باشد، پیشنهاد می گردد (۲). برای تعیین معنی دار بودن یا نبودن تعداد جایگاه هایی که افزایش تنوع ژنتیکی دارند سه آزمون به کار گرفته شد. آزمون Sign test، که از لحاظ آماری آزمون ضعیف شناخته می شود، آزمون Standardized different test یا آزمون تفاوت‌های استاندارد شده که این آزمون به حداقل ۱۰ جایگاه چند شکل برای داشتن دقت بالا نیاز دارد و آزمون رتبه‌ای Wilcoxon (آزمون ناپارامتری) که نسبت به دو آزمون دیگر توانمندتر است، زیرا برای تعداد جایگاه کم و یا برای هر جمعیت با هر تعداد فرد می تواند مورد استفاده قرار گیرد (۲).

1- Polymorphism Information Content

2- Number of alleles

3- Number of effective alleles



شکل ۱- DNA استخراج شده پس از الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز

جدول ۱- مشخصات جایگاه‌های انتخاب شده در تحقیق حاضر

| نام جایگاه | توالی آغازگرها | سایز (bp) | واحد تکرار شونده | شماره دسترسی |
|------------|--|--------------|----------------------|--------------|
| Aru1A1 | GGAAGCCAGATGAACCAAGG ATGCATGCGTGGAGGCTGAG | F R | ۲۳۲-۲۵۲ (CCAT)19 | AEF54663 |
| Aru 1D39 | ATGTGGAGACCTGGCGAGGA CCACTTCACATCAACACCCA | F R | ۱۵۰-۱۶۰ (GT)16 | EF546639 |
| Aru 1E7 | CCACTTCACATCAACACCCA GACTGTTTTCGGTTTGG | F R | ۱۷۶-۲۱۲ (GGAT)12 | EF546640 |
| Aru 1G49 | TTCTACGATCTGGTCAGCCTC GCACTTCTCAGGCGCAGCT | F R | ۲۳۳-۲۳۳ (GAGAA)31 | EF546648 |
| Aru 1H121 | TTCTACGATCTGGTCAGCCTC TGCCTGCTAAGGAGCCCAC | F R | ۹۱-۹۷ (GCT)8 | EF546649 |
| Aru 1E93 | CACGTCAATATGCTAGAGCG TGCCTGCTAAGGAGCCCAC | F R | ۸۲-۱۲۶ (GACA)32 | EF546642 |
| Aru 1K10 | GTGGAGAAGATATTGTTT GGGAGCATTCAATTTATTG | F R | ۹۱-۹۷ (GT)14 | EF546651 |
| Aru 1F25 | CCTAATGCTGTGTCCACCTC CCTAATGCTGTGTCCACCTC | F R | ۱۷۴-۲۴۰ (CCAT)15 | EF546645 |

جدول ۲- غلظت و میزان اجزاء مورد استفاده در این تحقیق

| غلظت | اجزاء واکنش |
|-----------------|--------------------|
| 1x | Buffer PCR |
| 2 mM | MgCL ₂ |
| 1.5μM | Primer Forward |
| 1.5μM | Primer Reverse |
| 200μM | dNTP _s |
| 0.5u/reaction | Taq |
| 150 ng/reaction | DNA |
| - | ddH ₂ O |
| 20ML | حجم نهایی |

نتایج و بحث

قبل از انجام واکنش های PCR، اجزا و چرخه های دمایی PCR طبق پیشنهاد Ferrero و همکاران (۱۹۹۶) بهینه سازی شد. اندازه آلی، تعداد آلل مشاهده شده و دمای اتصال برای هر جایگاه بررسی و به شرح جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همچنین غلظت و میزان اجزای مورد استفاده PCR در این تحقیق به شرح جدول ۲ ارائه شده است. در این تحقیق، دامنه مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) از ۰/۹۴ تا یک متغیر می باشد که کمترین مقدار در جایگاه Aru 1D39 و بیشترین مقدار در جایگاه های Aru 1E7, Aru 1G49 می باشد و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این مطالعه ۰/۷۹۴ بدست آمد.

میانگین آلل موثر در این مطالعه ۶/۲۲ بدست آمد در حالیکه Ferrero و همکاران (۲۰۰۷) که از جایگاه های مشابه تحقیق حاضر بر روی کبک های اسپانیا استفاده کرده بودند، میانگین آلل واقعی (برای ۶ جایگاه مشابه در این تحقیق) در منطقه Cadiz را ۷/۴۵ مورد و برای منطقه Alava، ۸/۱۵ مورد گزارش نمودند. با توجه به مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) محاسبه شده مربوط به نشانگر Aru 1G49 در جمعیت کبک های مورد مطالعه، با وجود تعداد ۲۱ آلل مشاهده شده در آن دارای بیشترین چندشکلی است. شاخص اطلاعات شانون (I) نیز تایید کننده این مطلب است. همچنین نشانگر Aru 1K10 که ۴ آلل دارد، چند شکلی کمتری دارد.

با توجه به اینکه جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی واینبرگ نمی باشد (جدول شماره ۴)، لذا محاسبه تنوع ژنی مورد انتظار در این جمعیت از روی تعداد آلل های مشاهده شده انجام می پذیرد به این ترتیب برای انجام آزمون باتلنک مدل TPM (جهش دو مرحله ای) که حدواسط دومدل SMM (جهش مرحله ای) و IAM (آلل نامحدود) می باشد و نسبت به این دو مدل، برای ریز ماهواره ها مناسب تر می باشد، پیشنهاد می گردد (۲). برای تعیین معنی دار بودن یا نبودن تعداد جایگاه هایی که افزایش تنوع ژنتیکی دارند سه آزمون به کار گرفته شد. آزمون Sign

بررسی وضعیت باتلنک در نمونه‌ای از جمعیت کبک ایرانی با استفاده از آنالیز ریز ماهواره‌ها

test, که از لحاظ آماری آزمونی ضعیف شناخته می‌شود، آزمون Standardized different test یا آزمون تفاوت‌های استاندارد شده که این آزمون به حداقل ۱۰ جایگاه چند شکل برای داشتن دقت بالا نیاز دارد و آزمون رتبه‌ای Wilcoxon (آزمون ناپارامتری) که نسبت به دو آزمون دیگر توانمند تر است، زیرا برای تعداد جایگاه کم و یا برای هر جمعیت با هر تعداد فرد می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۲).

جدول ۳- خلاصه‌ای از وضعیت تکثیر جایگاه‌های مورد مطالعه

| نام جایگاه | دمای اتصال در این تحقیق | تعداد آلل مشاهده شده | تعداد آلل موثر در گزارش FERRERO CADIZ /ALAVA | دامنه اندازه آللی مشاهده شده (BP) | دامنه اندازه آللی در گزارش FERRERO |
|------------|-------------------------|----------------------|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Aru1D39 | ۵۸ | ۷ | ۴ / ۵ | ۱۴۰-۱۷۰ | ۱۵۰-۱۶۰ |
| Aru1E7 | ۵۵ | ۹ | ۷ / ۸ | ۱۷۵-۲۱۵ | ۱۷۶-۲۱۲ |
| Aru1G49 | ۶۲ | ۲۱ | ۱۵ / ۱۵ | ۲۳۵-۳۳۵ | ۲۳۳-۳۳۳ |
| Aru1H121 | ۶۲ | ۶ | ۲ / ۳ | ۹۰-۹۸ | ۹۱-۹۷ |
| Aru K10 | ۵۲ | ۴ | ۲ / ۴ | ۹۰-۹۷ | ۹۱-۹۷ |
| Aru1E93 | ۵۶ | ۹ | ۷ / ۷ | ۸۰-۱۲۰ | ۸۲-۱۲۶ |

جدول ۴- نتایج آزمون X^2 برای تعادل هاردی-وینبرگ

| نام جایگاه | دمای اتصال در این تحقیق | تعداد آلل مشاهده شده | تعداد آلل موثر در گزارش FERRERO CADIZ /ALAVA | دامنه اندازه آللی مشاهده شده (BP) | دامنه اندازه آللی در گزارش FERRERO |
|------------|-------------------------|----------------------|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| Aru1D39 | ۵۸ | ۷ | ۴ / ۵ | ۱۴۰-۱۷۰ | ۱۵۰-۱۶۰ |
| Aru1E7 | ۵۵ | ۹ | ۷ / ۸ | ۱۷۵-۲۱۵ | ۱۷۶-۲۱۲ |
| Aru1G49 | ۶۲ | ۲۱ | ۱۵ / ۱۵ | ۲۳۵-۳۳۵ | ۲۳۳-۳۳۳ |
| Aru1H121 | ۶۲ | ۶ | ۲ / ۳ | ۹۰-۹۸ | ۹۱-۹۷ |
| Aru K10 | ۵۲ | ۴ | ۲ / ۴ | ۹۰-۹۷ | ۹۱-۹۷ |
| Aru1E93 | ۵۶ | ۹ | ۷ / ۷ | ۸۰-۱۲۰ | ۸۲-۱۲۶ |

Key: ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

جدول ۵- آزمون فرض صفر با استفاده از ۳ مدل تکامل ریزماهواره‌ای

| Test/Model | IAM | | TPM | | SMM | |
|-----------------------------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|
| | انتظار | احتمال | انتظار | احتمال | انتظار | احتمال |
| Sign test | ۳/۵۶ | ۰/۴۳۳۱ | ۳/۵۴ | ۰/۰۴۲۲۸ | ۳/۵۵ | ۰/۵۲۵۶۶ |
| Wilcoxon test | ۳/۵۱۷ | ۰/۰۰۰۲۲ | ۲/۹۱۰ | ۰/۰۰۱۸۰ | ۱/۲۳۴ | ۰/۰۱۰۸۵ |
| Standardized different test | ۱/۰۰۰ | ۰/۰۰۷۸۱ | ۱/۰۰۰ | ۰/۰۰۷۸۱ | ۰/۹۷۶۵۶ | ۰/۳۹۰۶ |

در مطالعه حاضر تعداد مورد انتظار جایگاه‌های با افزایش میزان هتروزیگوسیتی با استفاده از مدل IAM و TPM به ترتیب ۳/۵۶ و ۳/۵۴ بدست آمد. مقادیر احتمالات نیز در این دو مدل به ترتیب ۰/۴۳۳۱ و ۰/۰۴۲۲۸ محاسبه شد که بر اساس آن می‌توان گفت *باتانک* اتفاق نیفتاده است (جدول ۵).

تشکر و قدردانی

این مطالعه در محل موسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام گرفته است، که بدینوسیله از کلیه مسئولین، هیئت علمی، کارشناسان و کلیه کارکنان محترم آن موسسه و گروه محترم علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- ۱- بروفه ۱۳۸۹. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت کبک ایرانی موجود در مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور با استفاده از آنالیز ریز ماهواره. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.
- ۲ - سیدآبادی حمیدرضا و همکاران. ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی و احتمال وقوع باتلنک در جمعیت اسبچه خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره.
- ۳- عمرانی. ح.، نجاتی. ا.، امیری نیا. س.، اسماعیل خانیان. س.، علیوردی نسب. ر.، جوانروح. ع.، ۱۳۸۸. آنالیز تنوع ژنتیکی در جمعیت بلدرچین با استفاده از مارکرهای ریزماهواره. مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور. گزارش نهایی.
- 4-Arruga, M. V. , HandJisterkotis E. , Monteagudo, L. V. , 2007. A comparative genetic study of two groups of chukar partridges (*Alectorise chukar*) from Cyprus and Argentia using micro satellite analysis. European Journal of wild life research.
- 5-Ferrero, M. E. , Gonzalez, P. , DAVILA P. , 2007. Sixteen new polymorphic microsatellite markers isolated for red legged partridge (*Alectoris rufa*) and related species. Molecular Ecology Notes. 2007. Volume 7 Issue 6, Pages 1349 – 1351
- 6-Karp. A. , P. G. Isaac and D. S. Ingram. 1988. Molecular tools for screening biodiversity, Plants and Animals, First edition. Chapman & Hall, London. UK.
- 7-Luikart G. , Allendorf F. W. , Cornuet J. M. and Sherwin W. B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. The Journal of Heredity 89, 238-247.
- 8- Miller S. A. , Dykes D. D. and Polesky H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16, 1215.
- 9-Reed D. H, E. H. Lowe, D. A. Briscoe and R. Frankham, 2003. Fitness and adaptation in novel environment:Effect of inbreeding, prior environment and lineage.
- 10-Sanguinetti C. J. , Neto E. D. and Simpson A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR product separated on polyacrylamide gels. Biotechniques 17, 915-919.
- 11- M. T. Tejedor, L. V. Monteagudo, E. Hadjisterkotis, M. V. Arruga. 2005. Genetic variability and population structure in Cypriot chukar partridges (*Alectoris chukar cypriotes*) as determined by microsatellite analysis. European Journal of Wildlife Research. (2005) 51: 232–236.

12-Xin Zhou, Yu Xu, Jianghong Ran, Bisong Yue, Lusha Cao and Jing Li. 2009. Polymorphic microsatellites in Buff-throated partridge developed by cross-species amplification. *European Journal of Wildlife Research* (2009) 55:81–83.

13- Yeh, F. C. , Yang, R. and Boyle, T. 1999. POPGENE Version 1. 31. Microsoft windows based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta. Edmonton. AB. Canada. pp. 26.