ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۲، پاییز ۱۳۹۱
صفحه ۲۵۸- ۲۴۹

بررسی تنوع ژنتیکی شترهای دوکوهانه ایران

سعید شاه‌کرمی[۱]، فضل‌ا.. افراز[۲]، سید ضیاالدین میرحسینی[۳*]، محمد حسین بنابازی[۴]، نادر اسدزاده[۵]، نعمت‌ا.. اسدی[۶]، بهزاد همتی[۷]، اباذر قنبری[۸]، کمال رضوی[۹]

۱و۷ – به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،

۲، ۴، ۵، ۶و ۹–به ترتیب استادیار، مربیان، کارشناس ارشد و کارشناس پژوهش موسسه تحقیقات علوم‌دامی کرج

۳– دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه گیلان

۸–کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mirhosin@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت:۸۹/۳/۱۱– تاریخ پذیرش:۹۱/۳/۲۳)

چکیده

نژادهای دام و طیور بومی در هر کشور به عنوان سرمایه ملی و محصول کلیدی مطرح هستند و حفظ و تکثیر این نژادها از ارزش و اهمیت زیادی برخوردار است. جمعیت شترهای دو کوهانه (*Camelus bactrianus*) کشور به عنوان یکی از نژادهای با ارزش دامی در دهه‌های اخیر به شدت کاهش یافته، در حالیکه هیچگونه اطلاعاتی در مورد تنوع ژنتیک این دام وجود ندارد. در این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیک جمعیت مذکور، ۱۱۰ نفر شتر دو کوهانه با استفاده ازهفت جفت آغازگر ریزماهواره‌ای (YWLL08، VOLP67 ، VOLP03 ، LCA77 ، LCA63 ، LCA56 و LCA33) مورد بررسی قرارگرفتند. استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش استخراج نمکی تغییر یافته بهینه شده انجام شد. واکنش‌های PCR با تمام نشانگرها بخوبی انجام شد. تمامی جایگاه‌ها در جمعیت مذکور، بجز جایگاه LCA77 که یک‌شکل بود، از چندشکلی مناسب برخوردار بودند. در کل جمعیت تمامی مکان‌های ژنی مورد مطالعه از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف معنی‌داری نشان دادند (P<0.001). تنوع ژنتیک، با معیارهای میانگین آلل‌های موثر، هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) بیان شد که به ترتیب، ۲/۶۲۲±۰/۵۳۴، ۰/۷۱۴±۰/۱۸۴، ±۰/۱۱۴ ۰/۴۸۹ و ۰/۵۵۷±۰/۲۳۷ برآورد شدند. بیشترین(۰/۷۷۱) و کمترین (۰/۱۶۵) میزان هتروزایگوسیتی و بیشترین(۰/۷۴۲) و کمترین(۰/۱۵۱) ارزش PIC دربین جایگاه‌های چندشکل به ترتیب مربوط به جایگاه‌هایVOLP67 و LCA33 بود. نتایج نشان داد که جایگاه‌های مورد مطالعه از چندشکلی مناسبی در جمعیت مورد مطالعه برخوردار هستند و علاوه براین تنوع ژنی در شتر دوکوهانه ایران نشان می‌دهد علیرغم اندازه بسیار کم جمعیت، این گونه همچنان از تنوع ژنتیک قابل قبولی برخوردار است، که می‌تواند به حفظ آن کمک شایانی نماید. با این وجود، برای تعیین دقیق تر ساختار ژنتیکی این جمعیت لازم است تعداد بیشتری از جایگاه‌های ریزماهواره بررسی شوند.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی، شتر دوکوهانه، نشانگرهای ریزماهواره، DNA، GenAlEx 6.3.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

اهلی سازی حیوانات از گام‌های اساسی در توسعه جمعیتی و فرهنگی بشر بود که به همراه اهلی شدن گونه‌های مختلف گیاهی بنیان کشاورزی امروزه گذاشته شد(Diamond 2002). در طول تاریخ فشارهای اصلی تکاملی یعنی جهش، انتخاب روش‌های پرورش، سازش‌پذیری، جدا شدن و رانش ژنتیکی موجب پیدایش تنوع بسیار شدید در بین جمعیت‌های محلی دام و طیور شده است. این فرآیند در طی قرون گذشته، تشکیل نژادهای شناخته شده با سطوح عملکردی مختلف را که کاربردهای گوناگون داشتند موجب شده است. در طول بهبود ژنتیکی دهه‌های گذشته، پیشرفت و تمرکز زیاد روی برنامه‌های موثرتر انتخاب، موجب شتاب بخشیدن در تعدادی از نژادها شد. تلقیح مصنوعی و انتقال جنین پخش مواد ژنتیکی را تسهیل نمود. علاوه براین پیشرفت در تکنولوژی تغذیه دام و طیور موجبات تغذیه بهینه را فراهم آورد. همچنین پیشرفت در سیستم‌های حمل و نقل و مکانیزه شدن آن نه تنها منجر به یکنواختی و کنترل جدی محیط‌های پرورشی شد بلکه توجه به دام‌های مورد استفاده در سیستم حمل ونقل یعنی اسب و شتر و.. به شدت کاهش یافت. نتیجه همه این پیشرفت‌ها در جنبه‌های گوناگون، جایگزینی نژادهای پر تولید به جای نژادهای بومی و حذف تقریبا کامل دام از سیستم حمل و نقل در سراسر جهان بود. این پیشرفت‌ها نگرانی‌های روزافزونی را در خصوص فرسایش منابع ژنتیکی پدید آورده است (FAO 2007).

با توجه به اینکه احتمال استفاده از تنوع ژنتیکی نژادهای کم تولید در برنامه های اصلاح نژادی حال و آینده وجود دارد (Bruford et al. 2003; Stevens 1989) . لذا حفاظت از آنها مخصوصا برای استفاده در برنامه‌های اصلاح نژادی آینده ضرورت دارد. بر اساس گزارش‌های FAO، ۲۰درصد از کل ۷۶۰۰ نژاد گزارش شده در جهان که به ۱۸ گونه از پستانداران و ۱۶ گونه از پرندگان تعلق دارند در معرض خطر هستند و ۶۲ نژاد در طول ۶ سال اول این قرن منقرض شده‌اند(FAO 2007).

مدیریت موثر منابع ژنتیکی دام و طیور مستلزم داشتن اطلاعات جامع در خصوص ویژگی‌های نژادی، شامل اطلاعات مربوط به اندازه و ساختار جمعیت، پراکنش جغرافیایی، محیط پرورش و تنوع ژنتیکی بین و داخل نژادها است.

با توجه به اینکه شفاف‌سازی تنوع ژنتیک ارتباط مستقیم با استفاده پایدار از منابع ژنتیک حیوانات دارد، نیاز به اطلاعات وسیع مولکولی تنوع ژنتیکی داخل و بین نژاد برای مدیریت موثر منابع ژنتیکی دام و طیور مورد پذیرش اکثر پژوهشگران است (Stevens 1989;Sanguinetti et al. 1994; Hall and Bradley 1995; Barker JSF 1999; Bruford et al. 2003; Nolte et al. 2005; Toro and Caballero 2005; Toro et al. 2009). خانواده شتر شامل ۴ گونه اهلی است که به ۳ جنس تعلق دارد. یکی از این گونه‌ها شتر دوکوهانه (*Camelus bactrianus*) می باشد که زوج سم بوده و دو کوهان در پشت دارد و به دو حالت اهلی و وحشی(*Camelus bactrianus ferus*) زیست می‌نماید. نوع اهلی این گونه بومی در مناطق استپی کشورهای آسیای مرکزی یعنی افغانستان، هند، قزاقستان، قرقیزستان و پاکستان پراکنده می‌باشد بطوریکه در بعضی از مناطق این کشورها با شترهای تک کوهانه به صورت مشترک وجود دارد. علاوه براین در قسمت‌های جنوب روسیه، بخش‌های غربی چین و مغولستان نیز پراکنده است (Jianlin 2000).

بطور کلی تحقیقات نشانگرهای مولکولی در خانواده اشتران مخصوصا در جنس کاملوس و بطور خاص در گونه دو کوهانه بسیار اندک است لذا توسعه نشانگرهای ریزماهواره در شتر مورد بررسی قرار گرفته است(Jianlin 2005). در این گزارش امکان استفاده مشترک از بسیاری از نشانگرهای ریزماهواره در کلیه شترهای جهان قدیم و جدید، شترهای وحشی و تک کوهانه و دوکوهانه از جنبه‌های تکاملی و تعیین استراتژی‌های لازم جهت حفاظت از گونه‌های در حال انقراض مورد تایید قرار گرفته است. کار گروه ISAG/FAO در فهرست نشانگرهای ملکولی اخیر خود، بیست وپنج نشانگر ریزماهواره را برای بررسی ملکولی شترهای جهان قدیم و جدید پیشنهاد نموده است(Lewontin 1974; Hoffmann et al. 2004). این نشانگرها تاکنون فقط در بررسی‌های منطقه‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

به منظور بررسی رابطه تکاملی بین شترهای وحشی باقیمانده در چین و مغولستان و شترهای دوکوهانه اهلی و همچنین شناسایی منشا این شترها توالی ژن *cytb* میتوکندریایی توسط Ji et al.(2009) تعیین شد. نتایج نشان داد این شترهای وحشی باقیمانده گروهی مستقلی از شترهای اهلی بوده نمی‌توانند اجداد

Archive of SID
www.SID.ir

مستقیم دوکوهانه‌های اهلی باشند. علاوه براین شترهای دوکوهانه تک اجدادی هستند و از یک جمعیت وحشی بوجود آمده‌اند.

در تحقیقی که ۱۹ نشانگر ریزماهواره در شترهای جهان قدیم و جدید مورد استفاده قرار گرفت، کمترین و بیشترین تعداد آلل، میزان هتروزاگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده برای نشانگرهای بررسی شده در شترهای دوکوهانه قدیم به ترتیب (۱ و ۱۴)، (صفر و ۰/۸۷) و (صفر و ۰/۹۰) بود (Jianlin et al. 2000). با بررسی ۱۲ نشانگر ریزماهواره در ۱۴۰ نفر شتر مربوط به ۴ جمعیت چین و ۲ جمعیت مغولستان ۸۰ آلل مختلف مشاهده شد که تعدادآلل هر لوکوس بین ۱۴-۳ متغیر بود. متوسط هتروزایگوسیتی مشاهده شده در چهار جمعیت چینی به ترتیب ۰/۴۹۴، ۰/۵۲۶، ۰/۵۴۱ و ۰/۵۹۵ برآورد شد، در حالیکه این پارامتر در دو جمعیت مغولستان به ترتیب ۰/۴۵۳ و ۰/۵۲۱ نشان داده شد. علاوه براین نتایج نشان داد شترهای اهلی دوکوهانه چین و مغولستان از نقطه نظر برنامه‌های حفاظتی و اصلاح نژادی باید دوجمعیت کاملا مجزا و جداگانه در نظر گرفته شوند(Jianlin et al. 2004).

شتر دوکوهانه ایران با توجه به جثه بسیار درشت و گوشتواری و تولید نتاج مطلوب از نظر تولید گوشت و بعضی صفات تولیدی دیگر در آمیخته‌گری با شترهای ماده تک‌کوهانه و یگانه وسیله حمل و نقل در کوچ عشایر از دشت مغان تا دامنه‌های سبلان، نقشی اساسی در زندگی این عشایر داشت و خاص این منطقه محسوب می‌شد. از اینرو مورد توجه و اقبال بود و ازجمعیت مطلوب برخوردار بود. امروزه با ورود وسائط نقلیه موتوری در زندگی عشایر منطقه جمعیت آن به شدت کاهش یافت بطوریکه کل جمعت حدود ۱۳۰ نفر تخمین زده می‌شود.

شناسایی خصوصیات فنوتیپی و ژنتیکی بخشی از برنامه های حفاظت است. در همین راستا تخمین تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی برای مدیریت منابع ژنتیکی برای استفاده پایدار و حفاظت از آنها مهم می‌باشد. این موضوع وقتی که گونه های دام و طیور، مثل شتر در دهه های گذشته به شدت رو به کاهش نهادند، از اهمیت بیشتری برخوردار می‌شود.

شناسایی ویژگی‌های نژادی اولین اقدام در هر برنامه حفاظتی می‌باشد. ارزیابی ساختار ژنتیک جمعیتی علاوه بر اینکه سهم عمده‌ای در بدست آوردن عناصر مورد نیاز برای حمایت از برنامه‌های حفاظت نژادی دارد، برای بهبود برنامه‌های اصلاح نژادی نیز نقش مشابه را ایفا می‌نماید. همانطور که پیشتر اشاره شد تحقیق در خصوص تنوع ژنتیک دام می‌تواند با نشانگرهای بسیار چندشکل همانند ریزماهواره با دو ویژگی همبارز بودن و طبیعت پرآللی انجام بگیرد. این تحقیق به منظور تعیین ساختار و تنوع ژنتیکی شترهای دوکوهانه ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره اجرا شد.

مواد و روش‌ها

دام، خون‌گیری و استخراج DNA

در مطالعهٔ حاضر، از سیاهرگ وداج ۱۱۰ نفر از شترهای دوکوهانه شترداران نقاط مختلف استان اردبیل (دشت مغان) و ایستگاه‌های جعفرآباد و جهادآباد با استفاده از لوله خلا دار ۵ میلی لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA خون‌گیری شد. نمونه‌های خون کامل در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسهٔ تحقیقات علوم دامی کشور منتقل و در فاصله زمانی کوتاه تا استخراج DNA (چند روز تا دو هفته)، نمونه ها در $4^{\circ}C$ نگهداری شدند. استخراج DNA به روش بهینه شده و تغییر یافته استخراج نمکی (Miller et al. 1988) انجام شد. البته با توجه به مشکلاتی که در روش اصلی استخراج نمکی وجود داشت، تغییراتی در آن داده شد. این تغییرات شامل استفاده از: یک بافر جدا کننده برای رسوب دادن گلبولهای سفید بجای جداسازی لایهٔ نازک حاوی گلبولهای سفید، که کاری بسیار دشوار و ظریف می‌باشد؛ کلروفرم به منظور جلوگیری از مخلوط شدن فاز حاوی DNA با رسوبات تشکیل شده به هنگام جداسازی فازها و حذف هر گونه آلودگی از قبیل پروتیین و نمک‌های اضافی؛ محلول استات سدیم جهت متراکم تر نمودن کلاف DNA در مرحله جمع‌آوری رشته‌های DNA به کمک میله شیشه‌ای بودند. DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین کمیت شده و برخی از نمونه ها جهت تعیین کیفیت، بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ریز ماهواره مورد استفاده در آزمایش

آغازگر	توالی	اندازه(جفت باز)	شمارهٔ دسترسی*
VOLP03	AGACGGTTGGGAAGGTGGTA CGACAGCAAGGCACAGGA	۱۴۸ -۱۶۸	AF305228
VOLP67	TTAGAGGGTCTATCCAGTTTC TGGACCTAAAAGAGTGGAG	۱۵۷ -۱۸۵	AF305237
YWLL08	ATCAAGTTTGAGGTGCTTTCC CCATGGCATTGTGTTGAAGAC	۱۳۲-۱۵۸	non
LCA33	GAGCACAGGGAAGGATATTCA ACAGCAAAGTGATTCCATAATACA	۱۳۶-۱۶۴	AF060103
LCA56	ATGGTGTTTACAGGGCGTTG GCATTACTGAAAAGCCCAGG	۱۳۴-۱۳۸	AF091122
LCA63	TTACCCAGTCCTTCGTGGG GGAACCTCGTGGTTATGGAA	۱۹۶ -۲۲۰	AF091123
LCA77	TGTTGACTAGAGCCTTTTCTTCTTT GGGCAAGAGAGACTGACTGG	۲۳۳-۲۶۳	AF091129

*کُد دسترسی به ریزماهواره ها در بانک ژن NCBI با آدرس اینترنتی http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/viewer.cgi میباشد

هفت جفت آغازگر ریزماهواره با بررسی مقالات و توصیه ISAG/FAO انتخاب.(Hoffmann et al. 2004; Mburu et al. 2003; Nevo 1978) و از شرکت Metabion کشور آلمان بصورت لیوفیلیزه (غیر حساس به دما) تهیه و پس از حل کردن و رقیق ساختن طبق دستورالعمل مربوطه در دمای ۲۰℃- نگهداری شدند (جدول ۱).

واکنش PCR

در این مطالعه از بافر PCR شرکت سیناژن ایران استفاده شد. DNA ژنومی که از نمونه‌های خون استخراج شده بود بعنوان الگو در واکنش‌های PCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنشهای PCR در دستگاه ترموسایکلر(*TGradient*) Biometra، با بلوک ۹۶ تایی برای تیوب‌های PCR به حجم ۰/۲ ml استفاده شد (جدول۲). غلظت نهایی $Mgcl_2$ برای هر یک از جایگاه‌های LCA33، LCA56، LCA63 و LCA77، ۱/۵ mM، برایVOLP67، ۲/۵mM و برای VOLP03 و YWLL08، ۳/۵ mM بود. در مورد دمای اتصال از دمای ذوب هر جایگاه به عنوان مبنا، استفاده و بهینه سازی بر این اساس انجام شد. دمای ذوب بطور معمول از طریق فرمول ساده زیر نیز محاسبه شد:

$Tm = [\ 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)\ ]$ برای هر آغازگر ۲۰نوکلئوتیدی

جدول۲- غلظت اجزا مختلف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در تکثیر نمونه های DNA شتر

اجزای واکنش	غلظت نهایی
بافر PCR	1X
هر یک از آغازگرها	۰/۲۵ µM
dNTPs	۲۰۰ µM
آنزیم تک پلیمراز	۰/۵ unit/reaction
الگو DNA	۱۰۰ -۲۰۰ ng/reaction
$dd\ H_2O$	متغیر
حجم نهایی واکنش	۱۵ µl

Archive of SID

www.SID.ir

دمای اتصال بهینه برای آغازگرهای VOLP03، VOLP67، YWLL08، LCA33 ، LCA56 ، LCA63 و LCA77 بترتیب ۶۴، ۵۳، ۵۳،۵۳، ۵۵، ۵۸ و۵۷ درجهٔ سانتی‌گراد بدست آمد (جدول۳) .

جهت آشکار سازی تفاوت قطعات DNA، از الکتروفورز ژل پلی-آکریلامید ۸ درصد استفاده شد. فرآورده‌های PCR را به نسبت ۲/۵ به ۱ با بافر بارگیری مخلوط شده و حدود ۱۰µl از این مخلوط در چاهک‌ها بارگذاری و با ۷۵ ولت ثابت (شدت جریان حدود ۱۰ میلی آمپر و توان ۰/۹ تا ۱ وات) به مدت ۱۸ ساعت الکتروفورز شدند. برای نمایان سازی باندها از روش سریع رنگ آمیزی نقره (Ruane 2000) استفاده شد.

جدول۳- برنامه حرارتی مناسب برای آغازگرهای موردمطالعه

زمان(دقیقه)	درجه حرارت(C̊)	مراحل PCR	
۵	۹۵	واسرشته‌سازی	۱
۴۵ ثانیه	۹۴	واسرشته‌سازی	۲
۱	براساس آغازگرها	اتصال آغازگر	۳
۱	۷۲	بسط	۴
۱۵	۷۲	بسط نهایی	۵
–	۴	نگهداری	۶

مراحل دو تا چهار، ۳۰ بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل مشاهدات و داده‌ها

پس از تهیه عکس به کمک دستگاه Gel Documentation تصویر ژل‌ها در کامپیوتر ذخیره شده و سپس با استفاده از نرم افزارهای GELPRO و UVIDOC باندها تعیین اندازه و خوانده شدند. اندازه گیری‌ها به کمک باندهای حاصل از Ladder تجارتی#SM1323 شرکت Fermentas انجام شد و پس از آن بر اساس اندازه‌های حاصله و اطلاعات مربوط به هر نشانگر و البته در نظر گرفتن تصویر ژل و تعداد آلل‌های قابل تشخیص، تعداد آلل‌های مشاهده شده مربوط به هر نشانگر بدست آمد و بعد بر اساس تعداد باندهای طیف هر فرد، ژنوتیپ فرد مورد نظر تعیین شد، پس از آن با استفاده نرم افزار GenAlEx 6.3 فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها محاسبه شدند.

در آزمون تعادل هاردی واینبرگ جمعیت مورد مطالعه از آزمون مربع کای استفاده شد. آماره و احتمال برقراری تعادل هاردی واینبرگ در هر مورد با استفاده از نرم افزار GenAlEx 6.3 برآورد شد. میانگین و انحراف معیار تعدادآلل واقعی و موثر، هتروزایگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص شانون محاسبه شدند. از آماره محتوای چند شکلی (PIC) برای تعیین میزان چند شکلی نیز استفاده شد. هتروزایگوسیتی مشاهده شده(H_o) برای یک جایگاه با فرمول زیر محاسبه شد:

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

که در آن N_{ij} $(i \neq j)$ تعداد افراد هتروزیگوت و N تعداد کل افراد در جمعیت مورد مطالعه می باشد(Hedrick 1999). هتروزایگوسیتی مورد انتظار(H_E) برای یک جایگاه نیز از فرمول زیر محاسبه شد:

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

که در آن عبارت $\sum_{i=1}^{n} p_i^2$ نسبت مورد انتظار هموزیگوت‌ها می‌باشد و p_i فراوانی i امین آلل در یک جایگاه معین می‌باشد (Hedrick 1999).

شاخص اطلاعات شانون با فرمول زیر تعیین شد (Lewontin 1974):

$$H' = -\sum_i p_i \ln p_i$$

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد(Buchanan and Thue 1998):

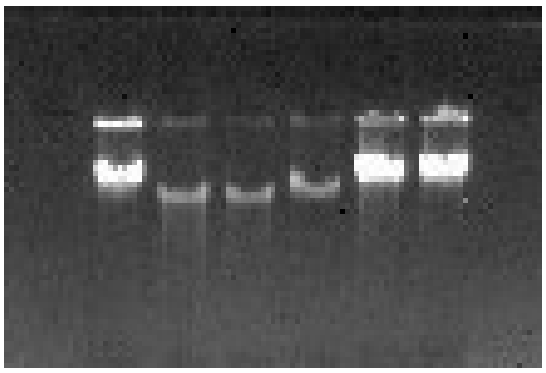
$$PIC = 1 - (\sum_{i=1}^{k} p_i^2) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i-1}^{k} 2\, p_i^2\, p_j^2$$

که در آن k تعداد آللها و p_i و p_j فراوانیهای جمعیتی i و j اُمین آلل می باشد.

نتایج و بحث

همانطور که پیشتر بیان شد تحقیقات نشانگرهای مولکولی در جنس کاملوس بسیار اندک می‌باشد. از اینرو در این مبحث تلاش می‌شود نتایج این تحقیق با نتایج گزارش شده در خصوص دیگر جنس‌ها و گونه‌ها مقایسه شوند. نتایج بارگذاری DNA حاصله بر روی ژل آگارز یک درصد، در شکل ۱ نشان داده شد. همانطور که در این شکل مشهود است کیفیت در حد مطلوب (باندهای کاملا تیز و بدون کشیدگی) بود.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱- کیفیت DNA استخراج شده از نمونه های مورد بررسی

واکنشهای PCR با هر هفت جفت آغازگر بخوبی انجام شد. در سه جایگاه LCA63، VOLP67، YWL08 آلل‌های صفر دیده شدند. معیار چندشکلی بودن هر جایگاه در این پژوهش، این بود که وفور فراوان‌ترین آلل کمتر از ۰/۹۹ یا ۰/۹۵ باشد. در این بررسی تنها جایگاه LCA77، یک‌شکل مشاهده شد. دامنهٔ اندازهٔ آلل‌ها برای جایگاههای LCA33، LCA56، LCA63، LCA77، VOLP03، VOLP67 و YWLL08 بترتیب ۱۰۵-۹۰، ۱۵۵-۱۳۰، ۲۴۰-۲۰۵، ۲۳۹، ۱۲۵-۱۲۰، ۱۹۵-۱۵۰ و ۱۶۰-۱۳۰جفت باز بدست آمد که نامگذاری آلل‌ها نیز بر همین اساس انجام گرفت (جدول۱). تعداد آلل‌های هر جایگاه، معیار مناسبی از تنوع ژنتیک می باشد (Nevo 1978). همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده تعداد کل آلل در جمعیت ۲۵ آلل با ۴ آلل مشترک در جایگاه های مختلف با میانگین ۰/۸۹۶±۳/۵۷۱ برای هر جایگاه است که در دامنه میانگین آللی گزارش شده شتران دو کوهانه چین و مغولستان (۴/۷۵-۳/۵۸) قرار دارد (Jianlin et al. 2004). دامنه تعداد آلل بین ۸-۱ متغیر می‌باشد که در مقایسه با شترهای تک کوهانه وحشی استرالیا که در اواسط قرن نوزدهم میلادی از افغانستان و پاکستان وارد این کشور شدند (Spencer and Woolnough 2010) ازنظر تعداد آلل در جایگاه‌های LCA63 و VOLP67با گزارش این پژوهشگران مطابقت دارد ولی در جایگاه‌های LCA56، VOLP03 و YWLL08 آلل‌های مشاهده شده به مراتب کمتر از آلل‌های گزارش شده توسط پژهشگران مذکور است و تفاوت آللی برای جایگاه LCA77 جزیی می‌باشد. همچنین Jianlin et al. (2000) تعداد آلل های VOLP03 را در شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه به ترتیب ۵ و ۱۵ گزارش نمودند که با دو آلل مشاهده شده در این تحقیق هیچگونه هماهنگی ندارد. در حالیکه در گزارش مذکور تعداد آلل‌های VOLP67 و YWLL08 برای شترهای دوکوهانه به ترتیب ۱۱و ۵ ذکر شده است که می‌توان گفت با تعداد ۸ و ۴ آلل مشاهده شده برای جایگاه‌های مزبور هماهنگی دارد. بطور کلی به نظر می‌رسد تثبیت آلل LCA77 و کاهش شدید آللی در بعضی از جایگاه‌ها در شتر دوکوهانه ایران (قابل زیست در یک منطقه محدود دشت مغان تا دامنه سبلان) مواجه با کاهش شدید جمعیتی دور از انتظار نمی-باشد. بعنوان نتیجه‌گیری می‌توان گفت که از نظر تعداد آلل با آنچه که قبلا جهت تخمین تنوع ژنتیکی پیشنهاد شده بود، همخوانی دارد (Barker 1999) .

دامنه اندازه آلل‌های مشاهده شده در این تحقیق برای جایگاه YWLL08 و جایگاه‌های LCA56، LCA63، LCA77 به ترتیب با نتایج تحقیقات Lang et al. (1996)، Spencer et al. (2010) تقریبا مطابقت دارد. دامنه اندازهٔ آلل VOLP67 با دامنه گزارش شده برای برای دو گونه شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه توسط Jianlin et al. (2000) تقریبا یکسان است. دامنه اندازه آلل دیگر جایگاه‌های مورد مطالعه در این پژوهش با نتایج منابع ذکر شده همخوانی ندارند. البته این عدم تطابق‌ها و ناهماهنگی‌ها در تطبیق گزارش‌های Lang etal. (1996)، Jianlin et al. (2000) و Spencer and Woolnough (2010) برای گونه‌های مختلف شتر حتی در یک گونه نیز مشهود است.

بر اساس نتایج حاصله هیچ یک از جایگاه های مورد بررسی در

Archive of SID
www.SID.ir

تعادل هاردی- واینبرگ نبودند و انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی- واینبرگ نشان دادند ($p < 0.001$). با توجه به اینکه برای مطالعه حاضر از اکثر جمعیت موجود شتر دوکوهانه کشور(۱۱۰نفر) نمونه گیری به عمل آمده است و تعداد جمعیت مذکور در حال حاضر بسیار کم می‌باشد، انتظار عدم تعادل هاردی واینبرگ به علت کوچک بودن اندازه جمعیت منطقی به نظر می-رسد. نکته قابل توجه این بود که شتران دوکوهانه در جایگاه‌های LCA33 وLCA77 هموزایگوت ودر بقیه جایگاه‌ها هتروزایگوت بودند(جدول ۲). تنوع ژنی بصورت هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_o) و هتروزایگوسیتی مورد انتظار (H_e) در هر جایگاه به همراه میانگین و انحراف معیار مربوطه در جدول ۴ ارائه شده است. دامنهٔ H_O در بین همه جایگاه ها ۱-۰ می باشد چون که دو جایگاه LCA33 و LCA77 هموزایگوت بودند. دامنهٔ H_E نیز از صفر(LCA77) تا ۰/۷۷۱ (VOLP67) بود. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جمعیت به ترتیب۰/۱۸۴± ۰/۷۱۴ و۰/۱۱۴± ۰/۴۸۹ بود. چون حد نهایی برای هتروزایگوسیتی‌ها یک است و از اینرو مقادیر هتروزایگوسیتی به افزایش تنوع زیاد حساس نمی‌باشند، مقایسه این مقادیر 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 تفاوت‌های میان آنها اطلاعات دقیقی را بیان نمی‌کنند. بنابراین شاخص اطلاعات شانون (H') نیز برای همه جایگاه‌ها محاسبه و نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. علیرغم آنکه تفسیر بیولوژیکی معیارH' مشخص نیست، ولی چون حداکثر مقدارH' برابر با ln(n) می‌باشد ممکن است برای اندازه-گیری تنوع جایگاه‌های بسیار متغیر مفید باشد(Hedrick 1999) . با این وجود نتایج مشابه با آنچه از هتروزایگوسیتی‌ها مشاهده شده بود (هم از لحاظ روند و هم از لحاظ بیشترین و کمترین مقدار) حاصل شد. بیشترین مقدار H' در بین جایگاه VOLP67 (۱/۷۲۰) می‌باشد که با توجه به تعداد آلل زیاد در این مورد (۸ آلل)، منطقی به نظر می‌رسد. کمترین مقدار نیز از آن جایگاه LCA77 (۰/۰۰۰) است که با توجه به اینکه شتران مورد مطالعه برای این جایگاه‌ها تنها یک آلل را دارند، قابل توجیه است. در بررسی که Spencer et al. (2010) روی شتران تک کوهانه امارات متحده عربی، استرالیا و آفریقا انجام دادند، متوسط هتروزایگوسیتی مورد انتظار را به ترتیب ۰/۵۳۱، ۰/۵۳۰ و ۰/۶۴۶ گزارش کردند. در تحقیق این پژهشگران، متوسط هتروزایگوسیتی مورد انتظار برای شتر دوکوهانه ۰/۵۴۳ برآورد شد. در دو تحقیق دیگر متوسط هتروزایگوسیتی مورد انتظار برای شتران تک‌کوهانه استرالیا، کنیا، پاکستان، عربستان سعودی و امارات متحده عربی به ترتیب۰/۵۴۴، ۰/۵۳۸، ۰/۵۹۳، ۰/۵۹۴ و ۰/۵۱۶ گزارش شده است(Mate´ et al. 2005; Simianer 2005). متوسط پارامتر مذکور برای دو جمعیت شتر دوکوهانه مغولستان و چهار جمعیت چین به ترتیب ۰/۵۲۶، ۰/۵۴۵، ۰/۵۶۱، ۰/۵۴۷، ۰/۵۷۷، و ۰/۶۰۲ محاسبه شد(Jianlin et al. 2004). همانطور که جدول ۵ نشان می‌دهد متوسط هتروزاگوسیتی مورد انتظار محاسبه شده در جمعیت شتر دوکوهانه ایران ۰/۴۸۹ است که تقریبا در حد هتروزایگوسیتی‌های گزارش شده می‌باشد. نسبت چند شکلی (P) ۸۵/۷۱ درصد می‌باشد. تعداد آلل مؤثر (N_E)، معیار دیگری است که برای تعیین میزان چند شکلی جایگاه‌ها استفاده می‌شود که میزان آن در پژوهش حاضر ۲/۶۲۲ محاسبه شد (جدول ۵). این پارامتر در تحقیق Spencer et al. (2010) با ۱۸ نشانگر ریزماهواره (شامل ۷ نشانگر استفاده شده در تحیق حاضر) روی شترهای تک‌کوهانه استرالیا، ۳/۴۴ برآورد شد که به نظر می‌رسد تک شکل شدن LCA77 در جمعیت دوکوهانه ایران عامل کاهش N_E در این شترها باشد. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) نیز از جمله معیارهای چند شکلی است که تحت تأثیر تعداد آلل در جایگاه مورد نظر و نیز فراوانی های آللی قرار دارد. نتایج حاصله در جدول ۵ خلاصه شده است. در میان همه جایگاه‌ها، بیشترین و کمترین ارزش PIC به ترتیب مربوط به جایگاه VOLP67 (۰/۷۴۲) و جایگاه LCA33 (۰/۱۵۱۸) می‌باشد. همچنین همانطور که انتظار می‌رود تمامی مقادیر PIC در مقایسه با مقادیر هتروزایگوسیتی متناظرشان کمتر می باشند. مقایسهٔ ارزشهای PIC در سطح جمعیت‌ها به‌ازا تمامی جایگاه‌ها می‌تواند سطح تغییرپذیری را در داخل هر جمعیت در مقایسه با سایر جمعیت‌ها نشان دهد (Buchanan and Thue 1998).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴- فراوانی های آللی جایگاه های مورد مطالعه در جمعیت شتر دوکوهانه ایران

جایگاه / آلل	LCA33	LCA56	LCA63	LCA77	VOLP03	VOLP67	YWLL08
۹۰	۰/۰۹۱	–	–	–	–	–	–
۱۰	۰/۹۰۹	–	–	–	–	–	–
۱۲۰	–	–	–	–	۰/۵۰۰	–	–
۱۲۵	–	–	–	–	۰/۵۰۰	–	–
۱۳۰	–	۰/۵۰۰	–	–	–	–	۰/۱۰۰
۱۴۰	–	–	–	–	–	–	۰/۲۷۴
۱۵۰	–	۰/۴۸۶	–	–	–	۰/۰۲۰	۰/۴۰۰
۱۵۵	–	۰/۰۱۴	–	–	–	–	–
۱۶۰	–	–	–	–	–	۰/۰۶۱	۰/۲۲۶
۱۷۰	–	–	–	–	–	۰/۰۹۷	–
۱۷۵	–	–	–	–	–	۰/۰۴۱	–
۱۸۰	–	–	–	–	–	۰/۳۶۲	–
۱۸۵	–	–	–	–	–	۰/۰۷۷	–
۱۹۰	–	–	–	–	–	۰/۲۶۲	–
۱۹۵	–	–	–	–	–	۰/۰۷۷	–
۲۰۵	–	–	۰/۲۰۸	–	–	–	–
۲۱۵	–	–	۰/۲۳۴	–	–	–	–
۲۲۵	–	–	۰/۲۰۸	–	–	–	–
۲۳۰	–	–	۰/۲۹۲	–	–	–	–
۲۳۹	–	–	–	۱/۰۰۰	–	–	–
۲۴۰	–	–	۰/۰۵۷	–	–	–	–

از این اطلاعات می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که شاخص های چندشکلی جایگاه‌های مورد مطالعه نیز نشان داد که اگرچه این جایگاه‌ها از شتر تک کوهانه و شترهای دنیای جدید جدا گردیده-اند، همچنان از چندشکلی مناسبی در جمعیت مورد مطالعه برخوردار هستند و می توان آنها را برای مطالعات بعدی بر روی شتر دوکوهانه توصیه نمود. علاوه براین تنوع ژنی در شتر دوکوهانه ایران نشان می‌دهد علیرغم اندازه بسیار کم جمعیت مورد مطالعه، این گونه همچنان از تنوع ژنتیکی قابل قبولی برخوردار است، که می‌تواند به حفظ آن کمک شایانی نماید. با این وجود، پیشنهاد می‌شود برای بررسی بهتر و دقیق تر از تعداد بیشتری جایگاه در تحقیقات بعدی استفاده شود تا تصویری از تنوع موجود در درون این گونه با ارزش ایرانی بدست آید و بعنوان راهنمایی برای تصمیم گیریهای حفاظتی آتی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از موسسه تحقیقات علوم دامی به دلیل تامین اعتبارات و امکانات اجرایی تحقیق و از مسئولین ایستگاه‌های تحقیقات شتر دوکوهانه جهادآباد و جعفرآباد استان اردبیل و همچنین از شترداران آن منطقه که در تهیه نمونه‌های خون همکاری صمیمانه داشته‌اند ابراز می‌دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۵- مقادیر تنوع ژنتیکی ۷ جایگاه ریزماهواره در ۱۱۰ شتر دو کوهانه ایران شامل تعداد آلل موثر(N_E)، هتروزایگوسیتی مشاهده شده(H_O) و مورد انتظار(H_E) و محتوای اطلاعات چند شکلی(PIC) و شاخص شانون(H')

شاخص / نام جایگاه	N_E	H_O	H_E	PIC	H'
LCA33	۱/۱۹۸	۰/۰۰۰	۰/۱۶۵	۰/۱۵۱۸	۰/۳۰۵
LCA56	۲/۰۵۵	۱/۰۰۰	۰/۵۱۳	۰/۳۹۵۳	۰/۷۵۶
LCA63	۴/۳۴۶	۱/۰۰۰	۰/۷۷۰	۰/۷۳۰۸	۱/۵۱۷
LCA77	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰
VOLP03	۲/۰۰۰	۱/۰۰۰	۰/۵۰۰	۰/۳۷۵	۰/۶۹۳
VOLP67	۴/۳۷۵	۱/۰۰۰	۰/۷۷۱	۰/۷۴۱۸	۱/۷۲۰
YWLL08	۳/۳۷۷	۱/۰۰۰	۰/۷۰۴	۰/۶۵۰۱	۱/۲۸۸
Mean±SD	۲/۶۲۲±۰/۵۳	۰/۷۱۴ ±۰/۱۸	۰/۴۸۹ ±۰/۱۱	۰/۵۵۷ ±۰/۲۴	۰/۸۹۷ ±۰/۲۴

منابع

Barker JSF (1999) Conservation of livestock breed diversity. Animal Genetics Resources Information 25:33–43.

Bruford MW, Bradley D, Luikart G (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nature Reviews Genetics 4:900–910.

Buchanan FC, Thue TD (1998) Intrabreed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. Canadian Journal of Animal Science 78:425-428.

Diamond J (2002) Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. Nature 418:700–707.

FAO (2007) The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome.

Hall SJG, Bradley DG (1995) Conserving livestock breed diversity. Trends in Ecology and Evolution 10:267–270.

Hedrick PW (1999) Genetics of populations, Second edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury MA, USA.

Hoffmann I, Marsan PA, Barker SF, Cothran EG, Hanotte O, Lenstra JA, Milan D, Weigend S, Simianer H (2004) New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: recommendations of a joint ISAG/FAO working group. In: 29th International Conference on Animal Genetics p. 123 (abstract), Meiji University, Tokyo, Japan. FAO, Rome.

Ji R, Cui P, Ding F, Geng J, Gao H, Zhang H, Yu J, Hu S, Meng H(2009) Monophyletic origin of domestic bactrian camel (*Camelus bactrianus*) and its evolutionary relationship with the extant wild camel (*Camelus bactrianus ferus*). Animal Genetics 40:377–382.

Jianlin H (2000) Origin, evolution and genetic diversity of old world camelus. Doctoral dissertation of Lanzhou University, Lanzhou, China.

Jianlin H (2005) Achievement of research in the field of camelids. In: WAAP Book of the Year – 2005 (Ed. by Rosati A, Tewolde A, Mosconi C), pp. 177–87.

Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Jianlin H, Mburu D, Ochieng J, Kaufmann B, Rege J, Hanotte O (2000) Ampplication of new world camelidae microsattelite primers for amplication of polymorphic loci in old world camelides. Animal Genettics 31:404-419.

Jianlin H, Ochieng J, Lkhagva B, Hanotte O (2004) Genetic diversity and relationship of domestic bactrian camels (*Camelus bactrianus*) in China and Mongolia. Journal of Camel Practice and Research 12:97–99.

Lang KDM, WangY, Plante Y (1996) Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellits in llama and alpacas.Animal Genetics 27:285.

Lewontin, RC (1974). The genetic basis of evolutionary change. Columbia Univ. Press, New York.

Mate´ M, Bustamante A, Giovambattista G, de Lamo D, von Thungen J, Zambelli A, Vidal-Rioja L (2005) Genetic diversity and differentiation of guanaco populations from Argentina inferred from microsatellite data. Animal Genetics 36:316–321.

Mburu DN, Ochieng JW, Kuria SG, Jianlin H, Kaufmann B, Rege EO, Hanotte O (2003) Genetic diversity and relationships of indigenous Kenyan camel(*Camelus dromedarius*) populations:implications for their classification. Animal Genetics 34:26-32.

Archive of SID
www.SID.ir

Mehta SC, Goyal A, Sahani MS (2007) Microsatellite markers for genetic characterisation of Kachchhi camel. Indian Journal of Biotechnology 6:336-339.
Miller S, DyKes DD, Polesky HF(1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Research, 16:12 -15.
Nevo E(1978) Genetic variation in natural population: Patterns and theory. Theoretical Population Biology 13:121-177.
Nolte M ,Kotzé A, van der Bank FH, Grobler JP (2005) Microsatellite markers reveal low genetic differentiation among southern African *Camelus dromedarius* populations. South African Journal of Animal Science 35:152-161.
Ruane J (2000) A framework for prioritizing domestic animal breeds for conservation purposes at the national level: a Norwegian case study. Conservation Biology 14:1385–1393.
Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR product separated on polyacrylamide gels. Biotechniques 17:915-919.
Simianer H (2005) Decision making in livestock conservation.Ecological Economics 53:559–572.
Spencer PBS, Wilson K J, Tinson A (2010) Parentage testing of racing camels (*Camelus dromedaries*) using microsattelite DNA typing. Animal Genetics 41:662-665.
Spencer PBS, Woolnough AP(2010) Assessment and genetic characterisation of Australian camels using microsatellite polymorphisms. Livestock Science 129:241-245.
Stevens C (1989) Tin Mosques and Ghantowns: A history of Afghan camel drives in Australia. Oxford University Press, Melbourne.
Toro M, Ferna´ndez J, Caballero A (2009) Molecular characterization of breeds and its use in conservation. Livestock Science 120:174–195.
Toro M, Caballero A(2005) Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Science 360:1367–1378.
Weitzman ML (1993) What to preserve? An application of diversity theory to crane conservation. Quarterly Journal of Economy 108:157–183.

Archive of SID

www.SID.ir