



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

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 تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی و از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) صورت گرفت. طول قطعات تکثیر یافته در آغازگرهای مختلف از ۲۳۷ تا ۳۲۴۰ جفت 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 و ۰/۰۳۹۱ کمترین فاصله ژنتیکی را داشتند. بیشترین و کمترین تنوع درون جمعیتی به ترتیب 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 ایجاد شده بوسیله آغازگرها، در چندین جایگاه تفاوت‌های محسوس مشاهده شد، از جمله در جایگاههای ۵-۳X با طول قطعه ۱۸۵۳bp چهار جمعیت اصفهان، فارس، یزد و آذربایجان غربی دارای فراوانی (وهمه افراد این جمعیت‌ها چنین جایگاهی را داشتند ولی در جمعیت مازندران با فراوانی ۰/۲۲۵ فقط ۴۰٪ 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 همخوانی 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

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 phylogenetic 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 establishing separate base population with large number of chickens.

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

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 الکتروفوروز روی ژل آگارز ۰/۸٪ اندازه گیری شد. تعداد ۲۳ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی تصادفی به صورت لیوفلیزه از شرکت‌های اپرون (Operon) و TIB MolBiol جهت بررسی چند شکلی در جمعیت‌های فوق مورد مطالعه قرار گرفت. جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) از ترموسایکلر ساخت شرکت Amersham Pharmacia Biotech مدل TC۳۴۱ و برنامه حرارتی زیر استفاده شد:

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

تکثیر DNA ژنومی از طریق از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز با حجم ۲۵ µl انجام گردید. واکنشها شامل:

۱ X	بافر PCR
۴ mM	کلرید منیزیم (MgCl ₂)
۰/۶ µM	آغازگر (Primer)
۲۰۰ µM	دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)
۱ Unit	آنزیم Taq DNA Polymerase
۲۰ ng	DNA ژنومی
فرآورده‌ها روی، ژل آگارز (Merck, Germany) ۱/۵٪ و در بافر TAE حاوی اتیدیوم بروماید ۰/۵ µg/ml و بوسیله یک دستگاه الکتروفوروز (OWOL, USA) تفکیک شده و با استفاده از ژل	

مقدمه

حیوانات و گیاهان بومی به عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب می شوند و حفظ و تکثیر آنها 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 و شناخت دقیق این ذخایر ژنتیکی می تواند مبنای دقیق تری برای برنامه های اصلاح نژادی در آینده و نتیجه دهی آنها در زمان کوتاه تر و استفاده بهینه از منابع موجود در جهت افزایش تولید گردد (۱). وجود تنوع ژنتیکی لازمه انجام برنامه های اصلاح نژادی و بهره گیری از توان تولیدی حیوانات و گیاهان در هر منطقه 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.

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 ۱۳ قطعه و طول قطعات تکثیر یافته در آغازگرهای مختلف از ۲۳۷ تا ۳۲۴۰ جفت باز متغیر بود. سبک‌ترین و سنگین‌ترین قطعه به ترتیب توسط آغازگر OPT-۱۷ (۲۳۷ جفت باز) و آغازگر OPN-۱۶ (۳۲۴۰ جفت باز) تولید شد.

به طور کلی 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 در جدول 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.

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

داکیومنیشن (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 Frequency) بین افراد مختلف از فرمول زیر استفاده شد: (۵):

$$BSF_{XY} = \frac{2NA_B}{(N_A + N_B)} \quad (1)$$

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) بر اساس فراوانی نوارها به صورت

زیر محاسبه گردید (۵):

$$U = 1/N \sum V_i \quad (2)$$

V_i : فراوانی i امین نوار

N: تعداد باندهای امتیاز داده شده

برای محاسبه ضریب تشابه بین جمعیتی (Between Population

BGS (Genetic Similarity) از فرمول زیر استفاده شد (۶):

$$BGS = 1 + S_{IJ} / 0.5(S_i + S_j) \quad (3)$$

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):

$$D = L_n [S_{ij} / (S_i S_j)]^{1/2} \quad (4)$$

همچنین جهت ترسیم درخت فیلوژنی و تجزیه خوشه‌ای و با روش

UPGMA از نرم افزار POPGENE (۱۵) استفاده گردید.



شکل ۱- درخت فیلوژنی ترسیم شده با استفاده از فراوانی نوارهای چند شکل و با احتساب نارایی به روش UPGMA (اعداد ۱ تا ۱۵ افراد مختلف این جمعیت می باشند. قطعات ۱۶۴۰ bp، ۱۸۵۰ bp و ۸۳۰ bp در افراد مختلف این جمعیت چندشکلی را نشان می دهند M: نشانگر اندازه ۱ Kb ladder و NC: کنترل منفی)



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

درخت فیلوژنی ترسیم شده براساس روش UPGMA (۱۵) و با استفاده از فراوانی نوارهای چند شکل و با احتساب نارایی بصورت شکل ۱ می باشد:

شکل ۲ نشان دهنده درخت فیلوژنی ترسیم شده براساس روش UPGMA (۱۵) و با استفاده از فراوانی کل نوارها (چند شکل و یک شکل) و با احتساب نارایی است.

براساس این روش و با مشاهده درخت فیلوژنی مشاهده می شود که جمعیت های مورد مطالعه در دو گروه قرار گرفتند: گروه اول: جمعیت های 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 جمعیت های پنجانگانه مورد بررسی این دو جمعیت از قدیمی ترین جمعیت های 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 نسل های آمیزشی این جمعیت ها می تواند موجب بالا بودن تشابه ژنتیکی درون جمعیتی آنها باشد. در صورتیکه این جمعیت ها تنها جمعیت هایی باشند که جهت حفظ ذخایر ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرند 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 نسل های مورد انتخاب نیز خیلی کم می باشد لذا تنوع بیشتری در آن به چشم می خورد.

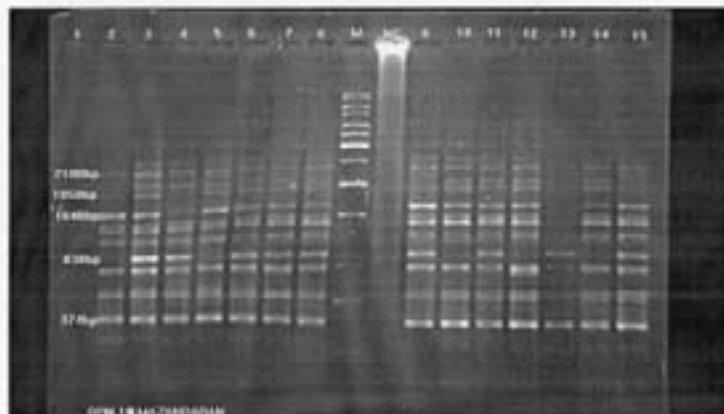
با توجه به جدول شماره ۳ و ۴ جمعیت های استان فارس و اصفهان دارای کمترین فاصله ژنتیکی هستند. همجواری دو استان و

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

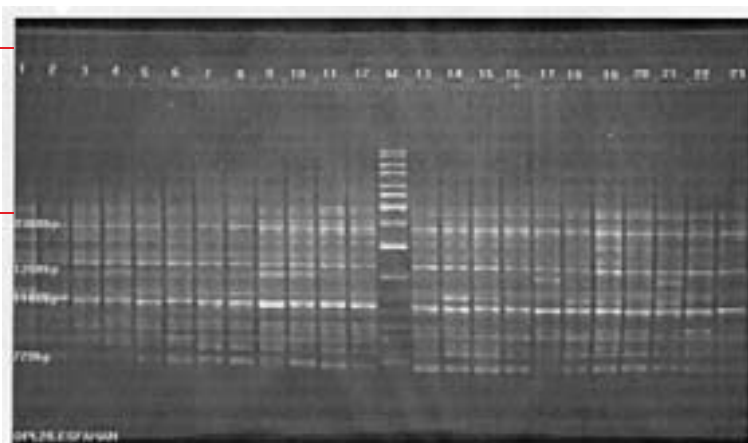
جدول ۱- نامهای بین المللی و توالی آغازگرهایی که نوارهای چند شکل تولید نمودند

نام بین المللی آغازگر	توالی آغازگر
OFG-۱۸	۵' - GGCTCATGTG - ۳'
OFU-۱۳	۵' - GGCTGGTTCC - ۳'
OFU-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'

تصویر ۱- الگوی قطعات تکثیر شده آغازگر OPG-۱۸ در افراد مختلف جمعیت مازندران (اعداد ۱ تا ۱۵ افراد مختلف این جمعیت می‌باشند. قطعات ۱۸۵۰bp و ۱۶۴۰bp و ۸۳۰bp در افراد مختلف این جمعیت چند شکل را نشان می‌دهند. M: نشانگر اندازه، 1kbladder و NC: کنترل منفی)



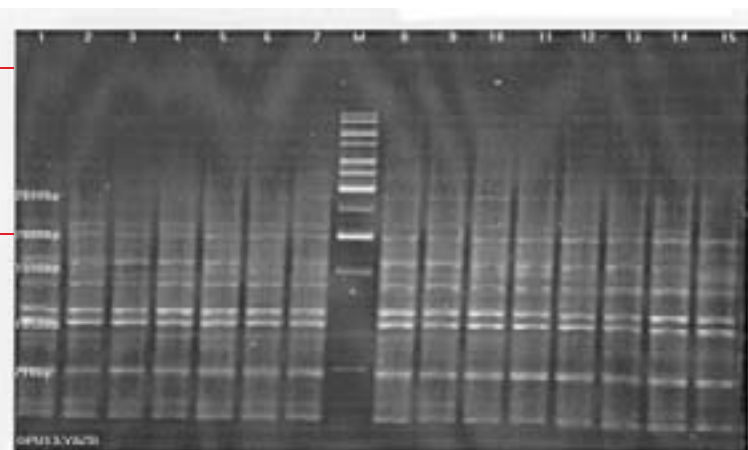
تصویر ۲- الگوی قطعات تکثیر شده آغازگر OPL-۲۰ در افراد مختلف جمعیت اصفهان



(اعداد ۱ تا ۲۳ افراد مختلف این جمعیت می‌باشند. قطعات پایین ۱۶۴۰bp و ۲۳۸۸bp و قطعه ۱۲۸۰bp و قطعات بالای ۱۱۸۰bp در افراد 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

تصویر ۳- الگوی قطعات تکثیر شده آغازگر OPU-۱۳ در افراد مختلف جمعیت یزد



(اعداد ۱ تا ۱۵ افراد مختلف این جمعیت می‌باشند. قطعه ۱۵۵۰bp در افراد مختلف این جمعیت چند شکلی را نشان می‌دهند) (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 ناریبی بین ۰/۸۳۴ تا

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

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

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

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

* اعداد بالای قطر نشان دهنده شاخص تشابه بین جمعیتی و پایین قطر نشان‌دهنده 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 نارایی (با تصحیح اریبی)

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

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

هتروزیگوسیتی اولیه، حداقل نمودن تعداد نسل، حداکثر نمودن اندازه جمعیت (N) و حداکثر نمودن نسبت اندازه مؤثر جمعیت به اندازه جمعیت (Ne/N) افزایش می‌یابد (۲). در این جمعیت‌ها خصوصاً در جمعیت استان مازندران و فارس پیشنهاد می‌شود با افزایش اندازه مؤثر جمعیت، افزایش نسبت اندازه مؤثر جمعیت به اندازه جمعیت (Ne/N) و کنترل آمیزش‌ها از کاهش تنوع ژنتیکی و افزایش همخوانی جلوگیری گردد.

با توجه به پروفیل‌های حاصل از به‌کارگیری آغازگرهای RAPD، همچنین پیشنهاد می‌گردد تعدادی از قطعات یک شکل حاصل از این تحقیق، کلون شده و تعیین توالی گردد و اطلاعات این توالی با اطلاعات ژنوم سایر ماکیان (با توجه به اطلاعات بانک ژنی گونه‌های اهلی) مورد مقایسه قرار گیرد. احتمالاً می‌توان از بین این قطعات یک شکل نشانگر اختصاصی گونه‌ای پیدا نمود.

بعد از تعیین توالی می‌توان نشانگر RAPD را به نشانگرهای STS و SCAR تبدیل نمود و از آن برای تهیه نقشه‌های ژنومی مرغ بومی، و همچنین تعیین توالی صفات تولیدی و پیدا کردن محل قرار گرفتن آنها در ژنوم مرغ بومی استفاده کرد. با بررسی صفات تولیدی و به‌کارگیری روش‌های اصلاح نژادی و اقدامات لازم در این زمینه ظرفیت ژنتیکی این حیوانات را بالا برد و با شناسایی و انتخاب ژنوتیپ‌های برتر و انتقال آن در سطح وسیع به روستاها به بهبود شرایط ژنتیکی آنها اقدام نمود. با توجه به اینکه بهبود شرایط ژنتیکی با بهبود شرایط محیطی توأم می‌باشد و با توجه به سازگاری این حیوانات با شرایط جغرافیایی منطقه زادگاه خود در اثر انتخاب، عامل مثبتی است که شانس موفقیت را بیشتر می‌کند، زیرا این سازگاری قطعاً تحت تاثیر ژنهایی قرار دارند که از یک نسل به نسل بعد منتقل می‌شوند و می‌توان پس از شناسایی از وجود این ژنها به نحو شایسته‌ای استفاده کرده و نهایتاً نتایج خوبی را در امر خودکفایی فرآورده‌های طیور کسب نمود.

با توجه به قابلیت روش RAPD در ایجاد قطعات چند شکل فراوان با تعداد آغازگرهای بیشتر تشخیص نشانگر اختصاصی در بین جمعیت‌ها امکان پذیر خواهد بود. بررسی تنوع ژنتیکی این جمعیت‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی دیگر از جمله ریزماهوره‌ها و مقایسه آن با نتایج حاصل از روش RAPD می‌تواند میزان اطمینان به نتایج این تحقیق را افزایش دهد.

با توجه به نتایج پیشنهاد می‌گردد از آغازگرهایی که در این تحقیق چندشکلی پایین از خود نشان دادند مثل OPU-۱۴ و OPX-۲۰ در تحقیقات بعدی استفاده نگردد.

سیاسگزاری

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی استان گیلان و دانشگاه گیلان بواسطه حمایت مالی و معنوی و نیز انستیتوی تحقیقات بین المللی ماهیان خاوباری، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، مؤسسه تحقیقات برنج کشور به دلیل در اختیار گذاشتن آزمایشگاه و انتقال تجربیات و نیز اداره کل طیور معاونت امور دام وزارت جهاد کشاورزی که در تهیه نمونه‌ها همکاری نمودند ابراز می‌دارند. همچنین از آقایان دکتر متقی طلب،

۹۳۶۰ و بدون احتساب ناریبی بین ۰/۸۲۸ تا ۰/۹۳۰ متغیر می‌باشد. این مقدار با در نظر گرفتن کل نوارها و با احتساب ناریبی بین ۰/۹۰۱ تا ۰/۹۶۲ و بدون احتساب ناریبی بین ۰/۸۹۸ تا ۰/۹۵۸ متغیر است. تشابه ژنتیکی محاسبه شده در این تحقیق تا حدی با تنوع ژنتیکی در بین نژادهای مرغ بومی چین که با استفاده از دو نشانگر ریز ماهوره و RAPD مورد مطالعه قرار گرفته بود مطابقت دارد. شاخص تشابه ژنتیکی در بین نژادهای مرغ بومی چین بین ۰/۸۴۸ تا ۰/۹۵۵ تغییر می‌کرد (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 توسعه این لاین از یک جمعیت پایه کوچک و انتخابی که در هر نسل در این لاین انجام می‌شود بیان نمودند.

از نشانگر RAPD برای بررسی ارتباط ژنتیکی بین ۴ نژاد مرغ بومی (چین) استفاده شد نتایج این تحقیق نشان داد که از نشانگر 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 خوشه دیگر قرار گرفته‌اند. با مشاهده درخت فیلوژنی براساس فقط نوارهای چندشکل و احتساب ناریبی مشاهده می‌شود که دو جمعیت استان اصفهان و شیراز بیشترین تشابه ژنتیکی را با همدیگر داشته و جمعیت استان آذربایجان غربی با اندکی تفاوت در این خوشه قرار گرفته و جمعیت استان یزد نسبت به سه جمعیت مذکور رابطه دورتری دارد. جمعیت استان مازندران نیز بصورت یک خوشه مجزا قرار گرفته است.

مشاهده درخت فیلوژنی براساس کل نوارها و احتساب ناریبی نشان می‌دهد که برخلاف درخت فیلوژنی قبل جمعیت استانهای یزد و آذربایجان غربی در یک خوشه قرار گرفته‌اند جمعیت‌های فوق در یک اندک فاصله دورتر با جمعیت استانهای اصفهان و فارس که در خوشه دیگر قرار گرفته‌اند متصل می‌شوند و جمعیت مازندران نیز همچون درخت فیلوژنی قبل به صورت مجزا در خوشه‌ای دیگر قرار گرفته که در یک نقطه به هم می‌پیوندند.

پیشنهادات

هزینه بالای نگهداری و اصلاح نژاد جمعیت‌های ایستگاه‌های تحقیقاتی پنجگانه موجب شده است تا احتمال حذف برخی از ایستگاه‌ها مورد بررسی معاونت امور دام وزارت جهاد کشاورزی قرار گیرد. همانطور که ذکر گردید جمعیت‌های استان فارس و اصفهان دارای کمترین فاصله ژنتیکی می‌باشند و همچنین همجواری دو استان و احتمال مهاجرت بین موجودات این منطقه و تشابه شرایط منطقه‌ای باعث تشابه بیشتر این دو جمعیت گردیده است در صورت حذف برخی از ایستگاه‌ها از سوی معاونت امور دام جهاد سازندگی، 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 اساس تنوع ژنتیکی در یک گونه، تغییرات جهشی است که با ایجاد آللهای مختلف، شکلهای فنوتیپی و ژنوتیپی متفاوت را بوجود آورده است (۱۰). تنوع ژنتیکی در یک گونه با حداکثر نمودن

salting out procedure 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 Animal Breeding and Genetic*. 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-Sharma D., Appa K.B. C., and Totey S.M. 2000. Measurement 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 are 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 microsatellite polymorphisms and RAPDs in Chinese 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.

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

منابع مورد استفاده

۱ - میرحسینی، س. ض. ۱۳۷۷. بررسی تنوع ژنتیکی کرم ابریشم ایران با استفاده از نشانگرهای پروتئینی و دی 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*. University of Guelph, 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. *Theoretical 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

