پژوهش و سازندگی
در امور دام و آبزیان
شماره ۶۹، زمستان ۱۳۸۴

مقاله کوتاه

بررسی چندشکلی ژنتیکی درنمونه‌ای از جمعیت اسبچه خزر ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD

• **علی رضا سهرابی**، کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان
• **سید ضیاءالدین میرحسینی**، استادیارگروه علوم دامی دانشگاه گیلان. رشت
• **فضل ا.. افراز**، استادیارپژوهشی بخش ژنتیک و اصلاح نژاد دام موسسه تحقیقات علوم دامی کرج
• **سعید اسماعیل خانیان**، استادیار بخش بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور.

تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۳

Email:sohrabi@icrason.com

چکیده

پرورش اسب در ایران از قدمت هزاران ساله برخوردار است و نژادهای اسب ایرانی شهرت جهانی دارند. لازمه توسعه ذخایر ژنتیکی شناسایی تنوع ژنتیکی این موجودات است. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی نمونه‌ای از جمعیت اسبچه خزر ایران واقع در مرکز تحقیقات خجیر استان تهران با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار گرفت. از این جمعیت به صورت تصادفی و انفرادی ۳۰ نمونه خون تهیه شد و با استفاده از روش فنل- کلروفرم، DNA نمونه‌ها استخراج گردید. از ۲۰ آغازگر RAPD مورد استفاده جهت تکثیر بخش‌هایی از ژنوم نمونه‌ها، ۱۴ آغازگر چند شکلی مناسبی تولید کردند. از این آغازگرها مجموعاً ۱۵۱ نوار بدست آمد که چند شکلی آنها در این جمعیت ۵۵/۶۳ درصد محاسبه شد. بیشترین نوارهای چندشکل توسط آغازگر OPB ۱۸ و کمترین آن توسط آغازگر OPX ۱۶ ایجاد گردید. دامنه ظهور نوارها از ۲۴۰ تا ۵۵۰۰ جفت باز متغیر بود. شاخص تنوع ژنتیکی در این جمعیت به میزان ۰/۲۳۵ برآورد گردید، همچنین متوسط هتروزیگوتی و تعداد آلل‌های مؤثردر جمعیت به ترتیب ۰/۲۱۶۱ و ۱/۳۷۲ محاسبه شد. با توجه به اینکه جمعیت مورد بررسی دارای تنوع ژنتیکی بالایی نیست و در طی زمان در اثر حوادث ناگهانی، ژن‌های زیادی از جمعیت حذف گردیده است، پیشنهاد می‌شود در راستای حفظ ذخایر ژنتیکی کشور، با کنترل تلاقی‌ها و افزایش اندازه موثر جمعیت از کاهش تنوع و افزایش همخونی در این جمعیت منحصر بفرد و با ارزش جلوگیری به‌عمل آید.

کلمات کلیدی : اسبچه خزر، تنوع ژنتیکی، نشانگر RAP

مقدمه

نگهداری و پرورش این اسب در ایران از قدمت هزاران ساله برخوردار است(۶). سرزمین پهناور ایران، به علت شرایط خاص جغرافیایی، دارای شرایط اقلیمی متفاوتی است، وجود چنین شرایطی و متعاقب آن عامل انتخاب، باعث شده که نژادهای مختلفی، با خصوصیات متفاوت در این کشور بوجود آیند (۱). اما به علت شرایط خاصی که در چند دهه اخیر برتوده‌های اسب ایران اعمال شد، این توده‌ها در معرض خطر انقراض قرار گرفته‌اند. (۶). بر همین اساس شناسایی دقیق نژادهای اسب ایرانی که از ذخایر ملی هستند، از وظایف ضروری مؤسسات تحقیقاتی به شمار می‌رود تا در نهایت بتوان در حفظ و نگهداری و حمایت از این ذخایر ژنتیکی با ارزش گامهای مؤثری برداشت بررسی میزان تنوع موجود در این جمعیت‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است، زیرا موفقیت در برنامه‌های اصلاح نژادی و بوجود آوردن شرایطی مناسب جهت حفاظت از ذخایر ژنتیکی پایه، بستگی به شناخت میزان این تنوع در جمعیت دارد (۳). در مورد هر یک از نژادهای اسب ایرانی ، تا حدودی اطلاعات مورفولوژیکی و فنوتیپی وجود دارد، اما صفات مورفولوژیک معیار کاملی برای تعیین تنوع ژنتیکی نیستند، چرا که فقط بخشی از تنوع ژنتیکی موجود در این صفات بروز می‌کند، از طرفی جهت بررسی مطالعات تنوع ژنتیکی، نشانگرهای DNA، قابلیت خوبی از خود، نشان داده‌اند (۴،۳) و در این میان نشانگرهای RAPD به علت دارا بودن سرعت بالا در حصول نتایج، هزینهٔ پایین و سادگی کار و همچنین عدم نیاز به اطلاعات اولیه از ژنوم موجودات برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب هستند. (۴). این روش توسط Bailey و Lear برای مقایسه بین نژادهای اسب عرب و تروبرد بکار رفت و مشخص گردید که نشانگرهای RAPD برای مقایسات بین نژادها قابلیت خوبی از خود نشان می‌دهند(۵). هدف از این تحقیق تعیین چند شکلی‌های نشانگرهای RAPD در جمعیت اسبچه خزر ایران است تا بدین‌وسیله اطلاعات ژنتیکی پایه‌ای جهت شناخت بهتر این ذخیره ژنتیکی ارزشمند و هدایت بهتر مطالعات بعدی میسر گردد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳۰ رأس اسبچه از مرکز تحقیقات خجیر واقع در استان تهران بصورت تصادفی انتخاب و به شکل انفرادی از آنها نمونه خون تهیه شد و با استفاده از روش فنل کلروفرم DNA آنها استخراج شد(۱۲) و تعیین کیفیت و کمیت گردید. با استفاده از ۲۰ آغازگر ده نوکلئوتیدی تصادفی از شرکت اپرون نمونه ها مورد آزمایش PCR قرار گرفتند و محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و با استفاده از بافر TBE، الکتروفورز شدند(۳) ، از بین آغازگرهای مورد استفاده، ۱۴ آغازگر که چند شکلی و وضوح باندی خوب نشان دادند، انتخاب شدند. این چهارده آغازگر عبارت بودند از OPA OPA۰۵ ۱۶،OPA ۰۹ ، OPA۰۷، UBC۳۹۱ ،UBC۱۲۶،UBC ۸۵،OPX۱۶ OPA۱۹، OPB۱۷، OPB۱۸، OPN ۱۹، OPM۱۹،OPX۰۱، توالی این ۱۴ آغازگر در جدول ۱ مشاهده می شوند(۵ و۳.) اجزای PCR موجود در واکنش PCR، شامل $MgCl_2$ ۲/۵ میلی مولار، بافر PCR ۱x (KCl ۵۰۰ میلی مولار و Tris ۱۰۰میلی مولار) $dNTP_s$ ۰/۲۵ میلی مولار ، ۳۰ نانوگرم آغازگر، ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی و یک واحد آنزیم Tag پلیمراز بود(۳).

از پروفیل حرارتی PCR شامل مرحلهٔ ابتدای و اسرشته سازی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه و۳۵ چرخه (واسرشته سازی در ۹۴ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال ۳۸ درجه به مدت ۱ دقیقه) و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه استفاده شد (۳). شمارش باندها و رتبهبندی آنها براساس وجود، یا عدم وجود باندها به ترتیب با ثبت اعداد ۱ و ۰ انجام شد و تجزیه وتحلیل داده ها با استفاده از نرم افزارهای PopGen۳۲ و Ntsys۲،۰۲ انجام گرفت(۸، ۱۳). با استفاده از نرم افزار PopGen۳۲ تعداد آلل‌های مؤثر بر اساس رابطه Kimura و Crow و معیار هتروزیگوسیتی بر اساس رابطه تنوع ژنی Nei با رابطه زیر بدست آمد(۵، ۱۱).

رابطه -۱

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

H=

که در واقع q نمایانگرفراوانی باندی یک شکل در هر لوکوس در داخل جمعیت است. علاوه بر این روش با استفاده از همین نرم افزار، تنوع ژنتیکی درون گروهی بر اساس روش Kuhnline و همکاران(رابطه۲) محاسبه شد(۷).

رابطه -۲ $H=\sum h/r$

در این رابطه H شاخص تنوع ژنتیکی داخل هر نژاد و r نیز تعداد نوارهای چند شکل می‌باشد، در فرمول فوق h به صورت رابطه-۳ محاسبه می‌شود:

رابطه -۳ $h=1-\sum q^2$

در این رابطه نیز q فراوانی هر نوار در داخل افراد هر نژاد می‌باشد. نرم افزار Ntsys۲،۰۲ نیز برای ترسیم دندروگرام تک فرد در این نمونه از جمعیت بکار رفت.

نتایج و بحث

DNA های بدست آمده از افراد این جمعیت انتخابی (۳۰ راس اسبچه که به طور تصادفی از یک جمعیت ۱۱۰ راسی انتخاب شده بودند) دارای کیفیت بسیار خوبی بوده و هیچگونه آلودگی درنمونه‌های جمعیت مشاهده نشد. در مجموع از چهارده آغازگر مورد استفاده ۱۵۱ لوکوس مشاهده شد و دامنه ظهور این لوکوسها از ۵۵۰۰ تا ۲۴۰ جفت باز متفاوت بود. میزان متوسط درصد چندشکلی آغازگرها در جمعیت۵۵/۶۳ می‌باشد، بیشترین و کمترین میزان چندشکلی در جمعیت اسبچه خزر مربوط به آغازگرهای OPB۱۸ و OPX۱۶ می‌باشد. هر دو دامنه ۲۴۰ و ۵۵۰۰ جفت‌باز در آغازگر

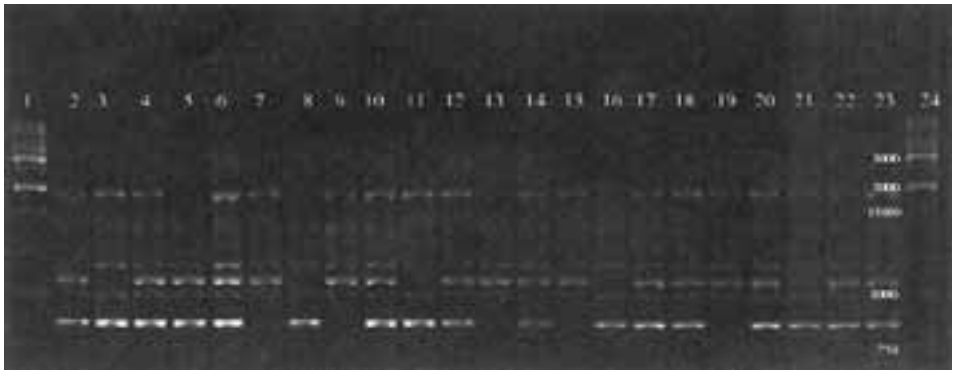
جدول ۱- نام‌هـای بین المللی و توالی آغازگرهای RAPD به کار رفته در مرحله PCR (۵،۳).

نام آغازگر	توالی
OPA ۰۵	۵´-AGGGGTCTTG-۳´
OPA ۰۷	۵´-GAAACGGGTG-۳´
۰PA ۰۹	۵´-GGGTAACGCC-۳´
OPA ۱۶	۵´-AGCCAGCGAA-۳´
OPA ۱۹	۵´-CAAACGTCGG-۳´
OPB ۱۷	۵´-AGGGAACGAG-۳´
OPB ۱۸	۵´-CCACAGCAGG-۳´
OPN ۱۶	۵´-AAGCGACCTG-۳´
OPM ۱۹	۵´-CCTTCAGGCA-۳´
OPX ۰۱	۵´-CTGGGCACGA-۳´
OPX ۱۶	۵´-CTCTGTTCGG-۳´
UBC ۸۵	۵´-GTGCTCGTGC-۳´
UBC ۱۲۶	۵´-CTTTCGTGCT-۳´
UBC ۳۹۱	۵´-GGCTAACATG-۳´

OPA۱۹ مشاهده شد. آغازگرهای ۱۷OPB و ۱۸OPB تعداد زیادی لوکوس تولید کردند ولی نوارهای حاصله کاملا شـفاف و مشـخص نبودند. در کل آغازگرهـای OPB ۱۷، OPB ۱۸، OPA۱۹، OPA۰۹، OPA۱۶، UBC۸۵، UBC۱۲۶ ، در جمعیت از خود چند شـکلی مناسبی نشان دادند و به جز دو آغازگر اول بقیه آغازگرها نوارهای واضحی را از خود نشان دادند. همین آغازگرها توسـط Apostolidis و همکاران برای مقایسـات ۵ نژاد اسب‌های یونان اسـتفاده شد و چند شکلی بالایی در مورد این آغازگرها گزارش شد، این آغازگرها از بین ۴۰ آغازگر غربال شـده بودند (۳) و همانطورکه انتظار مـی رفت، در ایـن تحقیق نیز چند شـکلی بالایی داشـتند، همانطور که مشـخص است مابقی آغازگرهای مورد استفاده نیز چندشکلی خوب و قابل قبولی از خود نشان دادند. شکل ۱ نشاندهنده استفاده از آغازگرOPA۰۹در نمونه های دو جمعیت است.

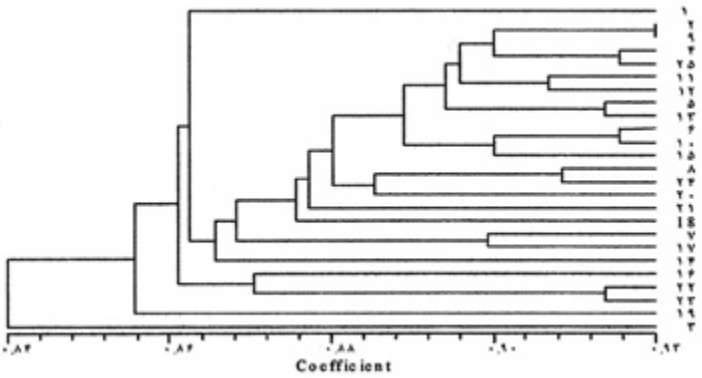
شاخص درون جمعیتی محاسبه شده در این جمعیت به میزان ۰/۲۳۵ محاسـبه گردید، علاوه بر این شـاخص، متوسـط هتروزیگوسیتی و تعداد آلل‌های مؤثر که می‌توانند تصویری نسـبتاً واضح و مشخص از میزان تنوع ژنتیکـی یک جمعیت ارائه کنند در ایـن تحقیق به ترتیب برابر ۰/۲۱۶۱ و ۱/۳۷۲ محاسبه گردید. تعداد محدود افراد یافت شده از این نژاد در معرض انقراض بعد از دهه ۱۳۴۰ می‌تواند میزان تنوع نسبتاً پایین مشاهده شده را تفسیر کند. افراد تشکیل دهندهٔ این جمعیت از تعداد بسیار کمی به وجود آمده‌اند و با وتوجه به مقدار هتروزیگوسـیتی که مشاهده شده، اثر مؤسس (Founder Effect) ، به وضوح در این جمعیت کاملاً قابل تشـخیص است. در نمونه‌گیری‌هـای انجام شـده که به صورت تصادفـی از افراد مادیان‌ها و نریان‌های این نژاد انجام گرفت، با مطالعهٔ شجره‌های موجود مشخص گردید که روابط خویشـاوندی نسـبتاً بالایی در این جمعیت وجود دارد. با مقایسه اعداد بدسـت آمده در این جمعیت در تحقیقی که با استفاده از نشانگرهای RAPD بر روی تیره‌های اسـب ترکمن انجام گرفت (۲)، مقایسه معیارهای درون جمعیتی این‌طور نشان می‌دهد که تنوع این نژاد در گله مورد مطالعه نسبت به تیره‌های ترکمن پایین‌تر است.

در مورد تجزیه تحلیل‌های حاصل از این آزمایش با استفاده از نرم افزار Ntsys، شاخص جاکارد، بیشترین ضریب کوفنتیک را به خود اختصاص داد و این عدد در حدود ۰/۷۶ برآورد شد که در حقیقت نشان دهندهٔ همبستگی بـالا بین صحت دندروگرام تک فردی ترسـیم شـده با ماتریـس داده‌های حاصل از رتبه‌بندی می‌باشـد(۶). همانطوری که از شـکل ۲ مشخص است مرز تفکیک در این نمونه جمعیت اسـبچه خزر از بین ۰/۸۴ تا ۰/۸۶ شروع



شکل ۱-الگوی قطعات تکثیر شده توسط آغازگر OPA۰۹ در افرادی از جمعیت اسبچه‌خزر (اعداد ۲-۲۳ افراد مختلف این جمعیت می‌باشند شماره‌های ۱ و ۲۴ مربوط به نشانگر اندازه Kb Ladder۱ بر حسب معیار جفت باز می‌باشد)

می‌شود و تا ۰/۹۳ ادامه دارد و این مبین این نکته است که جمعیت اسبچه خزر از خود بنیان ژنتیکی محدودی را نشان می‌دهد، ولی به علت اینکه شاخص مناسبی برای ترسیم دندروگرام بکار رفته تفکیک افراد در این فاصله کم به خوبی صورت گرفته است. در کل با توجه به این که تنوع ژنتیکی جمعیت اسبچه خزر زیاد نیست می‌توان با افزایش نسبت اندازه مؤثر جمعیت به اندازه جمعیت و کنترل آمیزش‌ها از کاهش تنوع و افزایش همخونی جلوگیری کرد. برای بررسی دقیق‌تر تنوع ژنتیکی یک چنین جمعیت‌هایی می‌توان از تعداد بیشتر نشانگرهای RAPD استفاده نمود. علاوه بر این با استفاده از نشانگرهای ملکولی دیگر از جمله ریزماهواره‌ها و مقایسه آن با نتایج حاصل از این روش می‌توان میزان اطمینان به نتایج این تحقیق را افزایش داد.



شکل ۲ –دندروگرام تک‌فردی جمعیت اسبچه خزر محاسبه شده با استفاده از شاخص جاکارد

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر خود را از سرکار خانم لوئیز فیروز،آقایان مهندس عبادی ، راتق و قربانی وآقای دکتر ربیعی جهت همکاری صمیمانه مراحل مختلف اجرای این تحقیق ابراز می‌دارند.

منابع مورد استفاده

۱ –میرحسینی، س. ض. ۱۳۷۷؛ بررسی تنوع ژنتیکی کرم ابریشم ایران با استفاده از نشانگرهای پروتئینی و DNA. رساله دکترا، دانشگاه مدرس.

۲ –سهرابی، ع. ۱۳۸۲؛ بررسی تنوع ژنتیکی دو نژاد اسب ایرانی با استفاده از نشانگرهای RAPD. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان.

3-Apostolidis, A.P., Z. Mamuris, E. Karkavelia and T. Alifakiotis. 2000; Copmarison of Greek breeds of horses using RAPD markers. Animal Breeding and Genetics. 118: 47-56.

4-Arvindakshan, T.V and A.M. Nainar. 1998; Genetic variation in cattle and buffalo breeds analysis by RAPD markers. Indian Journal of Dariy Science. 51: 368-374.

5-Bailey, E and T.L. Lear. 1994; Comparison of throughbred horse using RAPD markers. Animal Genetics. 25: 105-108.

6- Bonnie. 1997; International Encyclopedia of Horse Breeds.

7-Hedrick, P.W. 1997; Genetics of Populations

8-Jamesrohlf, F. 1999; NTSYSpc, Numerical Taxonomy System, Version 2.02. University of Washingtown.

9-Mohammadi, S.A and B.M. Prasanna. 1999; Analysis of genetic diversity in crop plants. Indian Agricultural Research. 7: 23-35.

10-Nainar, M. N. 1998; Genetic variation in cattle and buffalo breeds analysed by RAPD markers. Indian Journal of Dairy Science. 51:368-374.

11-Nei M. 1978; Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89,583-590.

12-Sambrook J., Fritsch, E.F. & Maniatis T. 1989; Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA.

13-Yeh F.C., Yang R. & Boyle T.1999; POPGENE. Version 32. Microsoft Window–based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada