ارزیابی و خصوصیات ژنتیکی شتر دوکوهانه ایران با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره شترسانان دنیای جدید

Assessment and Genetic Characterization of Iranian Two-Humped Camel Using New World Camelidae Microsatellite Primers

رضا طالبی[۱]، فضل‌اله افراز[۲*]، سیدضیاءالدین میرحسینی[۳]، نعمت اله اسدی[۴] و سید بنیامین دلیرصفت[۵]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۷

چکیده

شتر یکی از منابع مهم تأمین شیر، گوشت، الیاف، وسیله تفریح و سرگرمی و به‌عنوان سرمایه در بعضی از نقاط کشور است. در این تحقیق ساختار ژنتیکی شترهای دوکوهانه ایران مستند شده و همچنین تنوع ژنتیکی این جمعیت ارزیابی می‌شود. با استفاده از ۸۵ نفر شتر، ۹ جفت نشانگر ریزماهواره CVRL07، CVRL01، CVRL05، CMS9، CMS15، VOLP10، LCA66، YWLL38 و YWLL59 برای ارزیابی چندشکلی در این جمعیت آنالیز شدند. DNA ژنومی شترها با روش نمکی بهینه یافته استخراج شد و تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره DNA از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با موفقیت انجام شد و فرآورده‌های حاصل روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸٪ غیرواسرشته‌ساز الکتروفورز شدند. در مجموع ۳۱ آلل مشاهده شد و تمامی جایگاه‌ها به‌غیر از CMS15 چندشکلی نشان دادند. همچنین نسبت چندشکلی (P) جایگاه‌های ریزماهواره تحقیق حاضر در جمعیت شتر دوکوهانه ایرانی، ۸۸/۸۹ ٪ محاسبه و میانگین تعداد آلل‌ها و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) به‌ترتیب ۳/۴۴۴۴ و ۰/۴۷۲۶ به‌دست آمد. تمامی جایگاه‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف نشان دادند ($P<0.005$). میانگین هتروزیگوسیتی موردانتظار بدون احتساب جایگاه تک‌شکل ۰/۵۲۴۲ و در محدوده‌ی ۰/۳۸۶۹ تا ۰/۷۶۶۵ محاسبه شد. براساس نتایج شاخص ثبات جمعیت حاضر از افت هتروزیگوتی (همخونی) برخوردار است که بیانگر اهمیت رسیدگی به برنامه‌های حفاظتی در جمعیت شتر دوکوهانه ایران است. درخت فیلوژنی این جمعیت که براساس روش جفت‌گروهی غیروزنی از طریق میانگین حسابی (UPGMA) نشان داد که ارتباطات بین زیرگروه‌ها آن‌چنان زیاد است که نشانگر روابط خویشاوندی بسیار نزدیک بین شترهای دوکوهانه ایرانی است. از طرف دیگر تعداد نمونه‌های بسیار کمی پیدا می‌شوند که به‌صورت جداگانه و بدون روابط خویشاوندی با سایر گروه‌ها وجود دادرند که می‌توان این افراد را شناسایی کرد و برای تلاقی‌گری با گروه‌های همخون استفاده نمود تا از اثرات همخونی در جمعیت موجود کاسته شود. نتایج نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در شترهای دنیای جدید در شترهای دوکوهانه ایران قابل‌تکثیر بوده و این جمعیت هنوز از تنوع ژنتیکی قابل‌قبولی برخوردار است و می‌توان با برنامه‌های صحیح مدیرتی و اصلاح نژادی از انقراض این ذخیره ژنتیکی با ارزش در کشور جلوگیری کرد.

واژه‌های کلیدی: شتر دوکوهانه، نشانگرهای ریزماهواره، ساختار و تنوع ژنتیکی

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی- ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت
۲. استادیار بخش ژنتیک و اصلاح نژاد مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج
۳. استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت
۴. محقق بخش بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج
۵. محقق گروه پژوهشی کرم ابریشم دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت
*: نویسنده مسوول Email: f_afraz2000@yahoo.com

مقدمه

کشور ایران دارای منابع ژنتیکی گسترده‌ی شتر تک‌کوهانه و همچنین به‌میزان اندکی دوکوهانه است. این حیوان از جنبه-های تولید محصولات دامی از قبیل؛ گوشت، کرک، شیر، پوست، پشم، کود و نیز با قابلیت‌هایی از قبیل؛ تحرک زیاد و مسافرت‌های طولانی در شـــرایط سخـــت طبیعی و نقاط صعب‌العبور و در حمل بار و محموله‌های سنگین، نقش بارزی را در زندگی عشایر ایفا کرده است *توکلیان* (Tavakolian, 1999). امروزه کاهش چشمگیر گونه‌های بومی منجر به اجرای برنامه‌های حفاظتی در جهان شده است *اسپنسر* و *ولناف* (Spencer and Woolnough, 2010) و بسیاری از کشورها لزوم حفاظت از تنوع‌زیستی در حیوانات مزرعه‌ای را پذیرفته‌اند *معاهده بین‌المللی تنوع زیستی* (CBD, 1992). تشخیص این‌که کدام نژاد جهت اجرای برنامه حفاظتی اولویت دارد، بستگی به کاربرد فعلی و منظور نمودن حفظ حداکثر تنوع ژنتیکی در مخزن ژنی هر گونه دارد *فائو* (FAO, 2011). شترهای دوکوهانه ایرانی فقط در نواحی شمال‌غربی کشـــور زیســـت می‌کنند و به دلایل مختلف این ذخایر بومی و اصیل در خطر انقراض قرار دارند. ارزیابی دقیق تنوع ژنتیکی شترهای دوکوهانه کشور، گامی بنیادی در جهت حفاظت از ذخایر ژنتیک این حیوان محسوب می‌شود. امروزه جهت برآورد تنوع ژنتیکی و تعیین فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها از نشانگرهای مولکولی خصوصاً DNA استفاده می‌شود *گرونولد* و همکاران (Groeneveld *et al*., 2010). نشانگرهای ریزماهواره به‌واسطه چندشکلی بالا، هم‌بارز بودن، خنثی‌بودن نسبت به انتخاب طبیعی و مصنوعی، فراوانی زیاد در سرتاسر ژنوم و پراکندگی یکنواخت، استفاده بین گـونه‌ای، ارزان و ساده بودن کار با آنها، تشخیص دقیق ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها، امکان کار در حجم بالا و استفاده از انواع مختلف مواد ژنتیکی، جایگاه ویژه‌ای دارند *فائو* (2011).

در پایگاه اطلاعاتی سازمان‌های جهانی غذا و کشاورزی و مطالعات ژنتیک حیوانی (FAO-ISAG) تعداد ۲۵ نشانگر ریزماهواره برای هر دو جفت شترسانان دنیای جدید (لاما، آلپاکا و ویکیونا) و قدیم (شترهای دوکوهانه و تک‌کوهانه) معرفی شده است *گرونولد* و همکارن (2010). در مطالعات اخیر از نشانگرهای ریزماهواره ویژه شترسانان دنیای جدید، به‌عنوان ابزار ژنتیکی سودمند جهت بررسی تنوع ژنتیکی شترسانان دنیای قدیم توصیه شده است *جیانلین* و همکاران؛ *امبرو* و همکاران؛ *گاتام* و همکاران (Jianlin *et al*., 2000; Mburu *et al*., 2003; Gautam *et al*., 2004). تاکنـــون مطالعات بســـیاری بر روی چندشکـــلی نشانگـــرهای ریزماهـــواره در شترهای تک‌کوهانه انجام شده است *جیانلین* و همکاران (2000)؛ *ماریاسگارام* و همکاران (Mariasegaram *et al*., 2002)؛ *امبرو* و همکاران (2003)؛ *ماهروس* و همکاران (Mahrous *et al*., 2011)؛ *اودوتچنکو* و همکارن (Evdotchenko *et al*., 2003)؛ *نولت* (Nolte 2003)؛ *گاتام* و همکاران (2004)؛ *ویژ* و همکارن (Vijh *et al*., 2007)؛ *اسپنسر* و *ولناف* (2010)؛ ولی مطالعات انجام شده بر روی چندشکلی نشانگرهای ریزماهواره در شترهای دوکوهانه اندک است *جیانلین* و همکاران (2000)؛ *ماریاسگارام* و همکاران (2002)؛ *اودوتچنکو* و همکاران (2003) در ایران نیز تنها مطالعه ژنتیکی بر روی تنوع شترهای دوکوهانه با استفاده از ۷ آغازگر ریزماهواره صورت گرفته *شاهکرمی* و همکاران (Shahkarami *et al*., 2012) که فقط سه آغازگر مورد تأیید FAO بوده و ضمناً هیچ‌یک در شترهای دنیای جدید استفاده نشدند. از طرفی اطلاعات کاملی را از وضعیت شترهای دوکوهانه ی ایرانی ارائه نشده است. از این‌رو هدف تحقیق حاضر بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت شترهای دوکوهانه ایرانی با استفاده از ۹ جفت آغازگر ریزماهواره ویژه‌ی شترسانان دنیای جدید و قدیم بود.

مواد و روش‌ها

از ۸۵ نفر شتـــر دوکوهانه‌ی ایران که در دشـت مغان، ایستگاه‌های جعفرآباد و جهادآباد در استان اردبیل متمرکز بودند، به‌صورت تصادفی و با ونوجکت‌های حاوی ماده ضدانعقاد هپارین از سیاهرگ گردنی (وداج) ۷ میلی‌لیتر خون‌گیری به عمل آمد. DNA به‌روش نمکی بهینه یافته *میلر* (Miller, 1988) استخراج شد و کمیت و کیفیت آن با الکترفورز روی ژل آگارز بررسی شد. در این تحقیق از تعداد ۹ جفت آغازگر جایگاه ریزماهواره (تعدادی ویژه‌ی شترسانان دنیای جدید و تعدادی مربوط به هر دو گروه یعنی شترهای تک‌کوهانه دنیای قدیم و شترهای دنیای جدید، در جدول ۱ استفاده شد. تکثیر جایگاه‌های مذکور با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در دستگاه ترموسایکلر BIO-RAD انجام شد.

اجزای واکنش شامل، بافر PCR (۱X)، $Mgcl_2$ (۳/۵ mM)، هر یک از آغازگرها (۰/۲۵μM)، dNTPs (۲۰۰μM)، آنزیم تک‌پلیمراز (۰/۵unit/reaction)، DNA الگو (ng/reaction ۱۵۰) بود.

دمای ابتدایی واسرشته‌سازی ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه و سپس در ۳۰ چرخه ۹۴°C به‌مدت ۴۵ ثانیه تنظیم شده، بر

اساس جدول ۱ دما و زمان اتصال بهینه هر آغازگر ریزماهواره به‌ترتیب از ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ تا ۶۰ ثانیه متغیر بود. مرحله‌ی بسط در دمای ۷۲°C و به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط نهایی ۷۲°C به‌مدت ۵ دقیقه و سرانجام دمای نگهداری ۴°C برای ۵ دقیقه انجام شد.

الکتروفورز فرآورده‌های PCR با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی دوقلو (مدل VEU-7704) ساخت شرکت پایا پژوهش طوس (ایران) روی ژل‌پلی‌آکریل‌آمید ۸٪ غیر واسرشته‌ساز انجام شد. برای رنگ‌آمیزی ژل‌های پلی‌آکریلامید از روش رنگ‌آمیزی نیترات‌نقره استفاده شد *سانگیونتی* و همکاران (Sanguinetti *et al.*, 1994). سپس ژل‌های رنگ‌آمیزی شده در دستگاه GEL DOC وارد و توسط نرم‌افزار Quantiti one عکس‌برداری شدند. باندهای حاصله امتیازدهی و ژنوتیپ افراد مشخص شدند. محاسبات احتمال برقراری تعادل هاردی-واینبرگ، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و موردانتظار، شاخص اطلاعات شانون، تعداد آلل‌های واقعی، تعداد آلل مؤثر، نسبت جایگاه‌های چندشکل و شاخص ثبات یا معیار افت هتروزیگوتی *رایت* (Wright, 1978) با استفاده از برنامه‌های Pop Gen V. 1.31 *یی* و همکاران (Yeh *et al.*, 1999) و TFPGA *میلر* (Miller, 1997) انجام شد. محتوای اطلاعات چندشکلی با استفاده از برنامه HET V. 1.10 *اوت* (Ott, 1989) محاسبه شد، ضمناً تشکیل دندروگرام فیلوژنی در داخل جمعیت، به روش جفت‌گروه‌های غیروزنی (UPGMA)، توسط نرم‌افزار TFPGA *میلر* (1997) صورت گرفت.

جدول ۱: مشخصات جایگاه‌های انتخاب شده برای تحقیق حاضر

Table 1: Characteristics of the microsatellites under investigation

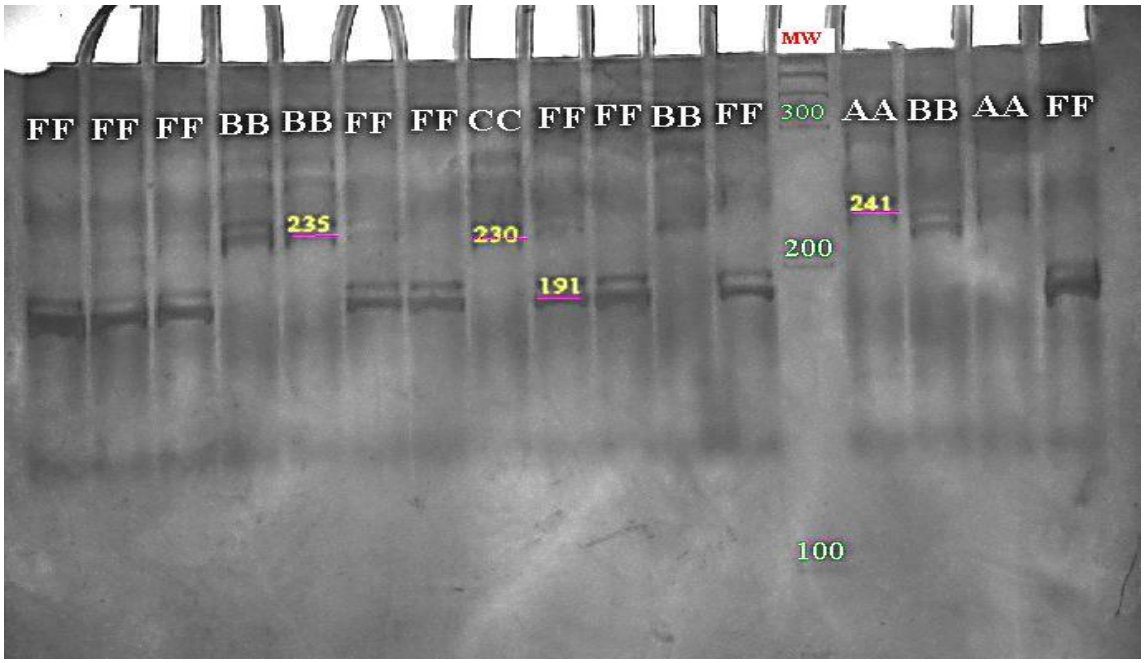
جایگاه ریزماهواره Microsatellite locus	جفت‌آغازگرها (5´-3´) Primers	واحد تکراری Repeated motif	* شماره دسترسی Accession number	منبع گرفته شده Reference	زمان(ثانیه) و دمای اتصال بهینه (°C) Time (S) and optimized annealing temperature (°C)
CMS15	F:AAATACTTAAAGGTTCCCAGA R:TTGTAAACTAAAGCCAGAAAG	$(TG)_{23}$	AF329151	Evdotchenko *et al.*, (2003)	۴۵ ثانیه و ۵۵°C
CMS9	F:TGCTTTAGACGACTTTTACTTTAC R:ATTTCACTTTCTTCATACTTGTGAT	$(GT)_{24}$	AF329160	Evdotchenko *et al.*, (2003)	۴۵ ثانیه و ۵۵°C
CVRL05	F:CCTTGGACCTCCTTGCTCTG R:GCCACTGGTCCCTGTCATT	$i(GT)_{25}$	AF217605	Mariasegaram *et al.*, (2002)	۳۰ ثانیه و ۶۰°C
CVRL01	F:GAAGAGGTTGGGGCACTAC R:CAGGCAGATATCCATTGAA	$(GT)_{27}$, $(GC)_{6}$, $i(GT)_{9}$	AF217601	Mariasegaram *et al.*, (2002)	۴۵ ثانیه و ۵۵°C
CVRL07	F:AATACCCTAGTTGAAGCTCTGTCCT R:GAGTGCCTTTATAAATATGGGTCTG	$(GT)_{14}$, $(AT)_{14}$	AF217607	Mariasegaram *et al.*, (2002)	۴۵ ثانیه و ۵۵°C
YWLL38	F:GGCCTAAATCCTACTAGAC R:CCTCTCACTCTTGTTCTCCTC	N/A	N/A	Lang *et al.*, (1996)	۶۰ ثانیه و ۵۵°C
YWLL59	F:TGTGCAGGAGTTAGGTGTA R:CCATGTCTCTGAAGCTCTGGA	$(CA)_{17}$	AF276047	Evdotchenko *et al.*, (2003)	۶۰ ثانیه و ۵۵°C
LCA66	F:GTGCAGCGTCCAAATAGTCA R:CCAGCATCGTCCAGTATTCA	$(CA)_{13}$	AF091125	Penedo *et al.*, (1999)	۶۰ ثانیه و ۵۰°C
VOLP10	F:CTTTCTCCTTTCCTCCCTACT R:CGTCCACTTCCTTCATTTC	$(TG)_{16}$	AF276037	Obreque *et al.*, (1998)	۶۰ ثانیه و ۵۵°C

* این شماره‌ها کُد دسترسی ریزماهواره‌ها در بانک ژن NCBI می‌باشد (http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/viewer.cgi).

N/A= information was not published or not available (اطلاعاتی در مورد این سری جایگاه‌های ریزماهواره منتشر نشده است)

نتایج و بحث

نمونه‌های DNA استخراج‌شده از کیفیت یکنواخت و مطلوبی برخوردار بودند و ۹ جایگاه ریزماهواره انتخاب شده (که برخی مختص شترسانان دنیای جدید و تک‌کوهانه بودند) با موفقیت در PCR تکثیر شدند. شکل ۱ نشان‌دهنده‌ی قطعات تکثیر شده DNA چندین نمونه از جمعیت شتر دوکوهانه توسط جایگاه CVRL01 است. تمامی جایگاه‌های ریزماهواره‌ی تحقیق حاضر به‌غیر از جایگاه CMS15 همگی چندشکلی نشان دادند و نسبت چندشکلی (P) جایگاه‌های تحقیق حاضر ۸۸/۸۹٪ محاسبه شد (از ۹ جایگاه ۸ تا چندشکلی نشـــان دادند). لذا می‌توان جایگاه‌های ریزماهواره ویژه‌ی گونه‌های مختلف شترسانان را برای مطالعات چندشکلی در بین گونه‌ها نیز به‌کار برد و نتایجی همانند تنوع آللی بالا را در مطالعات بین گونه‌ای مشاهده کرد.



شکل ۱: الگوی باندی جایگاه CVRL01 برای ۱۶ نمونه به‌همراه ژنوتیپ آنها. ستون MW نشانگر اندازه بر حسب جفت‌باز و دیگر ستون‌ها مربوط به نمونه‌های انفرادی است. امتیازدهی و ژنوتیپ هر فرد با حروف بزرگ انگلیسی در قسمت بالای هر ستون مشخص شده است

Fig. 1: SSR marker profiles for CVRL01 locus of 16 individuals. Genotypes are shown with English alphabet and also MW is size marker based on the molecular weight is given (600, 500, 400, 300, 200 and 100 base pair)

تمامی جایگاه‌های ریزماهواره به‌غیر از VOLP10 با احتمال (P<۰/۰۰۱) در جمعیت شتر دوکوهانه ایران از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف نشان دادند درحالی‌که جایگاه VOL10 با احتمال (P<۰/۰۰۵) از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف نشان داد. انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ برای جایگاه‌های مختلف ریزماهواره در جمعیت شترهای دوکوهانه توسط سایر محقیقن نیز دیده شده است *جیانلین* و همکاران (2000)؛ *ماریاسگارام* و همکاران (2002)؛ *اودوتچنکو* و همکاران (2003)؛ *شاهکرمی* و همکاران (2012). دلایل اصلی انحراف یک جمعیت به‌طور معنی‌دار در یک یا چند جایگاه از تعادل هاردی- واینبرگ می‌تواند مرکب بودن آن جمعیت از یک یا چند جمعیت جداگانه، در معرض مهاجرت قرار گرفتن از یک منبع خارجی و همچنین آمیزش غیرتصادفی باشد. *نولت* (Nolte, 2003) نشان داد جایگاه‌های VOLP10 و LCA66 برای جمعیت‌های شتر آلپاکا و تک‌کوهانه (آفریقا و سودان) و YWLL38 برای شترهای تک‌کوهانه‌ی افریقای جنوبی از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف نشان دادند ولی جایگاه‌های YWLL38 برای جمعیت‌های شتر تک‌کوهانه (سودان، نامیبیا و بوتسوانا) و LCA66 برای جمعیت (آفریقای جنوبی، نامیبیا و بوتسوانا) در تعادل هاردی- واینبرگ قرار داشتند (P>۰/۰۵). علت چنین امری را می‌توان به روند تکاملی متفاوت جمعیت‌های مختلف برای یک جایگاه خاص دانست که در طول زمان در اثر تفاوت-های جغرافیایی مناطق پراکنش آنها رخ داده است.

در مجموع برای جایگاه‌های ریزماهواره‌ی تحقیق حاضر ۳۱ آلل دیده شد که بیشترین تعداد برای جایگاه CVRL01 با ۶ آلل و کمترین تعداد برای جایگاه CMS15 با ۱ آلل بود (جدول ۲) که ازجمله معیارهای چندشکلی به حساب می‌آید. انحراف از میانگین برای تعداد آلل واقعی در محدوده‌ی ۳/۴۴±۱/۳۳ محاسبه شد. بیشترین و کمترین تعداد آلل مؤثر نیز به‌ترتیب برای CVRL01 (۴/۲۸ آلل) و CMS15 (۱ آلل) تعلق داشت. انحراف از میانگین برای تعداد آلل‌های مؤثر در محدوده‌ی ۲/۱۶±۰/۹۴ محاسبه شد. جایگاه CMS15 در جمعیت شتر دوکوهانه ایرانی تک‌شکل ولی همین جایگاه در تحقیقات *اودوتچنکو* و همکاران (2003) در جمعیت شتر دوکوهانه روسی، تک‌کوهانه کنیایی، لاما و آلپاکای موجود در باغ وحش آلمان، چندشکلی نشان داد. علت چنین امری را می‌توان خلوص ژنتیکی بیشتر شترهای دوکوهانه ایرانی دانست. *اسپنسر و ولناف* (2010) بیان کردند جایگاه CMS15 طی شرایط PCR در شترهای تک‌کوهانه موجود در استرالیا تکثیر نشد. علت چنین امری را می‌توان ناشی از وقوع اشتباه در

ساخت آغازگر توسط کارخانه‌ی سازنده و یا وقوع جهش در توالی متناظر آن در نمونه‌های مورد مطالعه دانست. تعداد آلل-های مشاهده شده برای جایگاه‌های ریزماهواره تحقیق حاضر در جمعیت شتر دوکوهانه ایرانی نسبت به مطالعات بر روی شترهای دوکوهانه سایر مناطق جهان *جیانلین* و همکاران (2000)؛ *ماریاسگارام* و همکاران (2002)؛ *اودوتچنکو* و همکاران (2003). کمتر می‌باشد. شاید علت این موضوع، تعداد کم جمعیت بررسی شده یا خلوص ژنتیکی بالاتر در جمعیت شتر دوکوهانه ایرانی باشد که این جمعیت را نسبت به شترهای دوکوهانه سایر مناطق جهان متمایز کرده است و نشان می‌دهد این نژاد از سالیان دور بومی استان اردبیل بوده و توانسته با تمامی شرایط این منطقه خود را سازگار نماید.

بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای جایگاه CVRL01 (۰/۷۳) و کمترین میزان بدون در نظر گرفتن جایگاه تک شکل، برای جایگاه YWLL38 (۰/۳۵) محاسبه شد (جدول ۲) که این روند با توجه به تعداد آلل‌های مشاهده شده در آنها قابل پیش‌بینی بود. PIC محاسبه شده برای جایگاه CMS9 و CMS15 در تحقیق حاضر با نتایج حاصل توسط *اودوتچنکو* و همکاران (2003) برای جمعیت شتر دوکوهانه روسی کاملاً متفاوت بود که علـت چنین امری را می‌توان به تفاوت در تعداد آلل مشاهده شده برای جایگاه‌های مذکور در ۲ جمعیت شتر دوکوهانه نسبت داد ولی مشابه PIC محاسبه شده برای جایگاه CMS9 در جمعیت شتر تک‌کوهانه-ی کنیایی بود که علت آن را می‌توان به تعداد آلل‌های کم این جمعیت برای جایگاه CMS9 نسبت داد. نتایج PIC برای سایر جایگاه‌های تحقیق حاضر نسبت به شترهای تک‌کوهانه کاملاً متفاوت بود *نولت* (2003)؛ *گاتام* و همکاران (2004)؛ *ویژ* و همکاران (2007)؛ *اسپنسر* و *ولناف* (2010). *شاهکرمی* و همکاران (2012) میانگین PIC را برای جمعیت شتر دوکوهانه ایران بدون احتساب جایگاه تک‌شکل در حدود ۰/۵۱ بیان کرد که از میانگین PIC تحقیق حاضر (۰/۴۷)، بیشتر بود علت این اختلاف این است که آنها میانگـــین بالاتری را برای تعـــداد آلل‌های مشاهده شده در جمعیت شتر دوکوهانه ایرانی با استفاده از ۷ جایگاه متفاوت ریزماهواره، نسبت به ۹ جایگاه تحقیق حاضر محاسبه نمود.

جدول ۲: نتایج تعداد آلل‌های واقعی و مؤثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و موردانتظار، محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص اطلاعات شانون و شاخص ثبات به‌همراه میانگین و انحراف معیار با احتساب جایگاه تک‌شکل

Table 2: Population genetic parameters for each microsatellite marker (with monomorph locus)

جایگاه ریزماهواره Microsatellite locus	تعداد آلل واقعی Number of actual alleles	تعداد آلل مؤثر Number of effective alleles	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار نئی (۱۹۷۳) Expected heterozygosity *Nei* (1973)	محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphism Information Content	شاخص اطلاعات شانون Shannon's Information Index	شاخص ثبات $(H_E-H_O)/H_E$ Fixation Index
CVRL05	4	2.62	0.26	0.62	0.56	1.10	0.58
CVRL01	6	4.28	0.25	0.77	0.73	1.57	0.68
CMS15	1	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CMS9	3	2.61	0.48	0.62	0.54	1.02	0.22
LCA66	3	1.67	0.34	0.40	0.36	0.71	0.16
CVRL07	4	1.82	0.07	0.45	0.38	0.77	0.84
YWLL59	4	2.07	0.41	0.52	0.48	0.99	0.21
YWLL38	3	1.63	0.21	0.39	0.35	0.71	0.46
VOLP10	3	1.78	0.32	0.44	0.38	0.75	0.28
میانگین Mean	3.44	2.16	0.26	0.47	0.42	0.85	0.38
انحراف معیار Standard deviation	1.33	0.94	0.15	0.21	0.20	0.42	0.28

در تحقیق حاضر از هتروزیگوسیتی به‌عنوان معمول‌ترین معیار تنوع ژنتیکی به‌کار گرفته شد که نتایج آن با احتســـاب جایگـــاه تک‌شکل در جدول ۲ آورده شده است. بدون احتساب جایگاه تک‌شکل بیشترین و کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) به‌ترتیب برای جایگاه‌های CMS9 (۰/۴۸) و CVRL07 (۰/۰۷) تعلق داشت. بیشترین و کمترین مقدار هتروزیگوسیتی موردانتظار (H_e) نیز به‌ترتیب برای جایگاه‌های CVRL01 (۰/۷۷) و YWLL38 (۰/۳۹) تعلق داشت. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و موردانتظار تحقیق حاضر بدون احتساب جایگاه تک‌شکل (به‌ترتیب ۰/۲۹ و ۰/۵۲) نسبت به

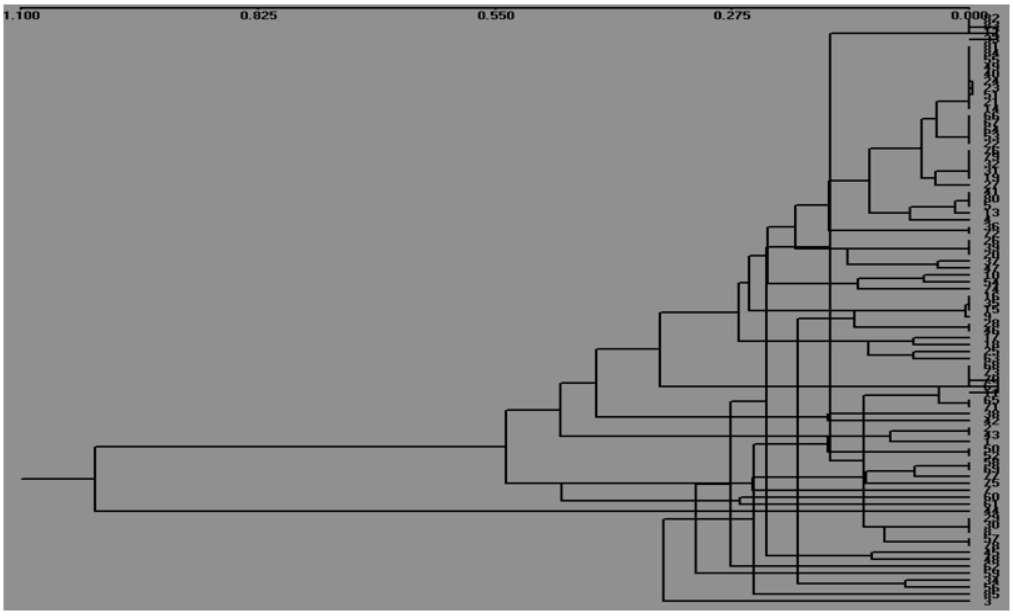
نتایج *شاهکرمی* و همکاران (2012) (به‌ترتیب ۱ و ۰/۵۷) کمتر بود. علت این اختلاف را می‌توان به نحوه‌ی امتیازدهی آلل‌ها و به‌دنبال آن معرفی‌کردن تمام افراد جمعیت در ۲ جایگاه (LCA77 و LCA33) به‌صورت کاملاً هموزیگوت و در ۵ جایگاه (VOLP03، VOLP67، LCA56، LCA63 و YWLL08) به‌صورت کاملاً هتروزیگوت توسط وی دانست. میانگین و هتروزیگوسیتی موردانتظار محاسبه شده برای جایگاه‌های CVRL01، CVRL05 و CVRL07 توسط *ماریاسگارام* و همکاران (2002) در جمعیت شتر دوکوهانه قزاقستان مشابه نتایج تحقیق حاضر بود. میانگین هتروزیگوسیتی موردانتظار برای جمعیت شتر دوکوهانه روسی توسط *اودوتچنکو* و همکاران (2003) نیز مشابه نتایج تحقیق حاضر بود. هتروزیگوسیتی موردانتظار محاسبه شده برای جایگاه‌های ریزماهواره‌ی LCA66، VOLP10، YWLL38 و YWLL59 در جمعیت شتر دوکوهانه چینی توسط *جیانلین* و همکاران (2000) نسبت به نتایج تحقیق حاضر بالاتر بود. براساس نتایج تحقیق حاضر و سایر محققین می‌توان دریافت که شاید کوچک‌بودن جمعیت شتر دوکوهانه‌ی ایران، قزاقستان و روسیه و در نتیجه افزایش آمیزش خویشاوندی در داخل این جمعیت‌ها دلیل افزایش هموزیگوسیتی و کاهش تنوع در این جمعیت‌ها باشد، ولی به دلیل بزرگ‌بودن اندازه جمعیت شترهای دوکوهانه چین و تلاقی با گونه‌های وحشی دوکوهانه‌های چینی، این جمعیت‌ها از تنوع ژنتیکی بالاتری برخوردارند. هتروزیگوسیتی موردانتظار برای جایگاه‌های ریزماهواره‌ی تحقیق حاضر در جمعیت‌های شترهای تک‌کوهانه سایر مناطق جهان با نتایج تحقیق حاضر بر روی شترهای دوکوهانه متفاوت بود و احتمالاً بستگی به اختلاف چندشکلی آلل‌ها در ۲ گونه شتر دوکوهانه و تک‌کوهانه، جمعیت‌ها و نمونه‌های مورد بررسی دارد. از دیگر معیارهای تنوع ژنتیکی شاخص اطلاعات شانون (H') است (جدول ۲). میانگین شاخص اطلاعات شانون و انحراف از آن بدون احتساب جایگاه تک‌شکل به‌ترتیب در حدود ۰/۹۵ و ۰/۴۷ محاسبه شد. بیشترین میزان H' برای جایگاه CVRL01 مقدار ۱/۵۷ محاسبه شده است که با توجه با دارا بودن بیشترین آلل برای این جایگاه (۶ آلل) منطقی به‌نظر می‌رسد. کمترین مقدار این پارامتر بدون در نظر گرفتن جایگاه تک‌شکل CMS15 (۰)، برای جایگاه YWLL38 مقدار ۰/۷۱ می‌باشد که با توجه به تعداد کم آلل‌ها برای این جایگاه (۳ آلل) قابل قبول است (جدول ۲). *شاهکرمی* و همکاران (2012) میانگین شاخص اطلاعات شانون را بدون احتساب جایگاه تک‌شکل در جمعیت شتر دوکوهانه ایران ۱/۰۴۷ و انحراف آن را ۰/۵۴۶ بیان کردند که نسبت به نتایج تحقیق حاضر بدون احتساب جایگاه تک‌شکل، بیشتر بود، علت این تفاوت به‌خاطر این است که هتروزیگوسیتی محاسبه شده برای جمعیت شتر دوکوهانه ایران توسط *شاهکرمی* و همکاران (2012) نسبت به نتایج تحقیق حاضر بالاتر می‌باشد.

در این تحقیق از شاخص ثبات به‌عنوان معیار افت یا فزونی هتروزیگوتی جایگاه‌های ریزماهواره در جمعیت شتر دوکوهانه ایرانی استفاده گردید (جدول ۲). هرچه شاخص ثبات برای جایگاه‌ها (معیار F_{IS}) بزرگ‌تر (مثبت‌تر) باشد، همبستگی بین آلل‌ها بیشتر و نشانگر افت هتروزیگوتی است (افزایش همخونی) و هرچه مقدارش کوچک‌تر (منفی‌تر) باشد، همبستگی بین آلل‌ها کمتر و نشانگر فزونی هتروزیگوتی (کاهش همخونی) است. با توجه به میزان F_{IS} محاسبه شده بیشترین میزان فزونی و افت هتروزیگوتی در تحقیق حاضر به‌ترتیب به جایگاه‌های LCA66 و CVRL07 تعلق داشت. براساس نتایج شاخص ثبات جمعیت حاضر از افت هتروزیگوتی (همخونی) برخوردار است، این موضوع بیانگر اهمیت رسیدگی به برنامه‌های حفاظتی در جمعیت شتر دوکوهانه ایران است. *شاهکرمی* و همکاران (2012)، از آنجایی‌که هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای ۵ جایگاه ریزماهواره را در جمعیت شتر دوکوهانه ایرانی مقدار ۱ (۱۰۰٪) بیان کردند پس باید فزونی هتروزیگوتی در این جایگاه‌ها نیز حداکثر مقدار ممکن بوده باشد (شاخص ثبات برای این جایگاه‌ها منفی یا همبستگی بین آلل‌های این جایگاه‌ها کم است)، یعنی اکثریت جایگاه‌ها در تحقیق *شاهکرمی* و همکاران (2012) از فزونی هتروزیگوتی (همخونی بسیار کم) برخوردار هستند، درحالی‌که جمعیت شتر دوکوهانه ایرانی جمعیت کوچکی است و این فزونی هتروزیگوتی در آن‌ها غیرطبیعی است، زیرا در جمعیت‌های کوچک با آمیزش‌های خویشاوندی فراوان، میزان افت هتروزیگوتی یا همخونی نسبت به فزونی هتروزیگوتی بیشتر است.

درخت فیلوژنی نشانگر روابط تکاملی بین افراد است. درخت فیلوژنی جمعیت شتر دوکوهانه ایران براساس روش جفت‌گروهی غیروزنی از طریق میانگین حسابی (UPGMA) در شکل ۲ ارائه شده است. در این تحقیق جمعیت شتر دوکوهانه ایرانی به ۲ گروه اصلی تقسیم‌بندی شده، که مربوط به جمع‌آوری نمونه‌ها از ۲ منطقه پراکنش متفاوت بوده است (نمونه‌های ۱ تا ۴۵ از دشت مغان و ۴۶ تا ۸۵ از ایستگاه‌های پرورش شتر دوکوهانه جعفرآباد و جهان‌آباد استان اردبیل تهیه

شد). هر گروه اصلی از چندین زیرگروه تشکیل شده که این زیرگروه‌ها به‌صورت درون و بین‌گروهی با همدیگر مرتبط هستند. این موضوع نشانگر جریان ژنی بین مناطق پراکنش مختلف آنها از طریق مهاجرت بین‌گروهی و آمیزش‌های انجام شده بین افراد می‌باشد. به‌طورکلی ارتباطات بین زیرگروه‌ها آن‌چنان زیاد است که نشانگر روابط خویشاوندی بسیار نزدیک بین شترهای دوکوهانه ایرانی است. از طرف دیگر تعداد نمونه-های بسیار کمی پیدا می‌شوند که به‌صورت جداگانه و بدون روابط خویشاوندی با سایر گروه‌ها وجود دارند که می‌توان این افراد را شناسایی کرد و برای تلاقی‌گری با گروه‌های همخون استفاده نمود تا از اثرات همخونی در جمعیت موجود کاسته شود.

به‌طورکلی، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و هتروزیگوسیتی موجود جایگاه‌های ریزماهواره‌ی تحقیق حاضر و همچنین وجود بعضی از افراد منفرد و مجزا از سایرین در جمعیت شتر دوکوهانه ایرانی، نشانگر آن است که این جمعیت از تنوع ژنتیکی قابل‌قبولی برخوردار است و این امکان را به-وجود می‌آورد که طی برنامه‌های صحیح مدیریتی و اصلاح نژادی از انقراض این ذخایر ژنتیکی با ارزش در کشور هرچه سریع‌تر جلوگیری به‌عمل آید.



شکل ۲: درخت فیلوژنتیک حاصل از فاصله‌ی ژنتیکی DA که با ۱۰۰۰ بار خود راه‌اندازی به روش UPGMA تشکیل گردیده است. مقیاس بالای درخت نشان‌دهنده‌ی فواصل ژنتیکی بین افراد می‌باشد

Fig. 2: Dendrogram illustrating genetic relationships among 85 individuals in genetic diversity study generated by UPGMA cluster analysis from 31 SSR alleles produced by 9 primers

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از بخش بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور به جهت انجام امور آزمایشگاهی تحقیق در این مؤسسه، همچنین از جناب آقای مهندس بنابازی هیأت علمی محترم مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور به دلیل همکاری صمیمانه در مراحل مختلف تحقیق، جناب آقای دکتر اسپنسر معاون پژوهشی و هیأت علمی دانشگاه مورداک استرالیا به‌دلیل راهنمایی‌ها و ارسال مقالات مربوطه و از تمامی عزیزانی که در اجرای این تحقیق ما را یاری نموده‌اند صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱۵-۱۶ متن انگلیسی مراجعه شود.