نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، ص. ۳۵۱-۳۴۵

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 4, No. 4, Winter 2013, p. 345-351

بررسی تنوع ژنتیکی در اسب اصیل ترکمن ایران با استفاده از ٤ جایگاه ریزماهواره

محبوبه سموزاد[۱]- محمدرضا نصیری[۲]- علی‌اصغر اسلمی‌نژاد[۳]- مجتبی طهمورث‌پور[٤]- محمد دوستی[۵*]- عبدالجلیل غیادی[٦]- شاهرخ قوتی[۷]

تاریخ دریافت:۱۳۸۹/۹/۷
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۵/۷

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی اسب اصیل ترکمن ایران با استفاده نشانگرهای ریزماهواره بود. تعداد ۵۱ نمونه خون از اسب‌های اصیل ترکمن در منطقه راز و جرگلان در خراسان شمالی جمع آوری شد. DNA ژنومی استخراج، سپس واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر قطعات چهار جایگاه ریزماهواره (HMS02، HMS03، HMS07 و AHT04) با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی به صورت استاندارد انجام شد سپس محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چهار جایگاه بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز و رنگ‌آمیزی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد آلل‌های چهار جایگاه مورد مطالعه از ۹ تا ۱۲ آلل متغیر بودند که بیشترین تعداد آلل در جایگاه ژنی HMS02 (۱۲ آلل) و کمترین تعداد آلل در جایگاه ژنی HMS07 (۹آلل) مشاهده شد. بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی(۰/۸۸۴۷) در جایگاه HMS02 و کمترین مقدار این معیار (۰/۸۰۳۹) در جایگاه HMS03 مشاهده شد. بیشترین مقدار اطلاعات چند شکلی PIC (۰/۸۶) مربوط به جایگاه (HMS07) و کمترین مقدار این معیار (۰/۷۷) مربوط به جایگاه HMS03 بود. بیشترین و کمترین مقدار شاخص شانون (۲/۲۶۱۷ و ۲/۰۵۳۲) نیز به ترتیب در جایگاه‌های ژنیHMS07 و AHT04 برآورد گردید. نتایج نشان دادند که ۴ جایگاه ریزماهواره مطالعه شده چند شکلی بالایی دارند و می‌توانند به عنوان نشانگر ملکولی مناسبی در مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: اطلاعات چند شکلی، اسب اصیل ترکمن، تنوع ژنتیکی، هتروزیگوسیتی، نشانگر ریزماهواره

مقدمه

اسب زیبا، لاغر اندام و کشیده ترکمن از ذخیره‌های ژنتیکی خالص و با ارزش کشور ایران است. نژادهای بومی در هر کشور به عنوان سرمایه‌های ملی و ذخایر کلیدی بوده و حفظ و تکثیر آن‌ها از ارزش و اهمیت زیادی برخوردار است (۲). امروزه نژادهای مختلفی از اسب در جهان وجود دارد که از نظر نوع فعالیت، تیپ، رنگ، وزن، شکل و غیره با یکدیگر تفاوت‌های زیادی دارند (۴). امروزه خالص‌ترین اسب‌های ترکمن ایران را در منطقه راز و جرگلان از توابع استان خراسان شمالی می‌توان یافت که این منطقه بیشترین جمعیت این اسب را دارا می‌باشد. استفاده از نشانگرهای مرفولوژیکی در شناخت نژادهای اسب دنیا قدمت زیادی دارد. در مورد اسب ترکمن، رنگ، قد، استخوان بندی، سرعت و استقامت خاص این نژاد شاخص‌های تشخیص مرفولوژیکی آن هستند (۱۰). اما خصوصیات ظاهری نمی‌تواند راهنمای کاملاً دقیق و خوبی برای تشخیص تفاوت‌های ژنتیکی باشد. در طی دو دهه اخیر تکنیک‌های ملکولی به کمک متخصصین مربوطه آمده که امکان بررسی ساختار ژنتیکی جانوران مختلف را بطور مستقیم فراهم نموده است. از بین نشانگرهای ملکولی نیز ریزماهواره‌ها برای مطالعات ژنتیک جمعیت و تنوع ژنتیکی نسبت به بقیه نشانگرها برتری ویژه‌ای دارند (۱۳). این جایگاه‌ها در سرتاسر ژنوم پراکنده‌اند و چندشکلی بالایی را نشان می‌دهند که علت آن تفاوت تعداد یکسری توالی‌های ساده تکراری است که یکی پس از دیگری پشت سر هم قرارگرفته‌اند این نشانگرها سطح بالایی از هتروزیگوسیتی را نشان می‌دهند و به صورت صفات همبارز به ارث می‌رسند. این خصوصیات موجب شده‌است که این نشانگرها برای اهدافی همچون تجزیه و تحلیل پیوستگی، آزمون والدین، نقشه برداری ژنومی و مطالعات فیلوژنتیک به‌طور وسیعی مورد

۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۷- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، دانشیار و دانشجوی دکتری و دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: doosti.m@gmail.com)
۶- مدیرعامل شرکت تعاونی تولید و مشاوره اسب اصیل ترکمن. بجنورد، ایران

استفاده قرارگیرند (۱۳). تاکنون مطالعات متعددی در زمینه تنوع ژنتیکی نژادها و گونه های مختلف اسب در دنیا انجام شده اما تحقیقات کمی در باره تنوع ژنتیکی اسب های ترکمن در ایران صورت گرفته است. سهرابی و همکاران (۲)، تنوع ژنتیکی دو نژاد اسب ترکمن (دو جمعیت ترکمن صحرا و جرگلان) و اسبچه خزر را با ۵ جایگاه ریز ماهواره مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند فاصله ژنتیکی کمی بین دو جمعیت اسب‌های ترکمن صحرا و جرگلان وجود دارد. بهروزی‌نیا و همکاران (۱)، نوع ژنتیکی دو جمعیت اسب ترکمن ایرانی مناطق ترکمن صحرا و ترکمن جرگلان با استفاده از پنج نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند و در این تحقیق فاصله ژنتیکی دو جمعیت بسیار پایین برآورد شد. آزور و همکاران (۵)، مطالعه‌ای بر روی اسب‌های اسپانیایی با آنالیز ۱۶ جایگاه ریزماهواره انجام دادند که در این بررسی تعداد ۱۲۱ آلل به دست آمد و تعداد آلل‌ها در هر جایگاه از ۵ تا ۱۲ متغیر بود. سرنو و همکاران (۱۵)، تعداد ۱۲ جایگاه ریزماهواره را در ۱۰۱ راس اسب نژاد Pantaneiro مورد بررسی قرار دادند آنها تعداد آلل‌ها در جایگاه‌های ریزماهواره از ۶ تا ۱۳ و میانگین تعداد آلل‌ها را ۷/۸ بیان کردند. گوئرین و همکاران (۹)، نیز ۷ ریز ماهواره اسب را در ۳ خانواده بزرگ ناتنی پدری که هر کدام دارای ۳۰ فرزند بودند، مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه انجام شده مشخص شد بیشترین تعداد آلل مربوط به جایگاه HMS02 (۸ آلل) است که بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی (۰/۷۷) را نشان می‌داد. کانن و همکاران (۸)، نیز برای نشان دادن ساختار ژنتیکی اسب‌های نژاد سلتیک اسپانیایی از ۱۳ جایگاه ریزماهواره استفاده کردند. در این تحقیق جایگاه‌های HMS03 و AHT04 در اسب‌های اسپانیایی انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی- واینبرگ نشان دادند. آن‌ها اظهار کردند که مهمترین عامل انحراف در این نژادها احتمالا اندازه خیلی کوچک جمعیت بوده است. هدف از این تحقیق امکان بررسی تنوع ژنتیکی اسب اصیل ترکمن ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره می‌باشد.

مواد و روش‌ها

خونگیری و استخراج DNA

خونگیری از تعداد ۵۱ راس اسب اصیل ترکمن در مناطق اصلی پرورش آنها در خراسان شمالی (منطقه راز و جرگلان) در مرز ایران و ترکمنستان صورت گرفت. استخراج DNA از ۱۰۰ میکرو لیتر نمونه خون به روش گوانیدین تیوسیانات-سیلیکاژل با استفاده ازکیت دیاتوم محصول شرکت Isogene (مسکو) مبتنی بر استفاده از روش بوم و همکاران (۷)، انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش طیف سنجی[1] با استفاده از دستگاه Nanodrop ND-2000 (Thermo, Wilmington, USA) تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگرهای چهار جایگاه ریزماهواره (HMS02، HMS03، HMS07 و AHT04) که از سایت انجمن بین المللی ژنتیک حیوانی[2] (ISAG) انتخاب شده بودند، توسط دستگاه ترموسایکلر (T-Personal, Biometra, Germany) بر اساس روش استاندارد انجام شد (جدول ۱). اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱ U آنزیم *Taq* پلیمراز (Invitrogen, California, USA)، ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر[3](BSA) ، ۰/۲ mM از هر (Pharmacia, Uppsala, Sweden) dNTP، ۱/۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ و ۲۰ نانوگرم از DNA الگو بود. چرخه‌های حرارتی برای تمامی آغازگرها به صورت واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه (جدول ۱) بسط آغازگرها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چهار جایگاه بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد انجام شد. رنگ آمیزی ژل اکریل‌آمید به روش نیترات نقره صورت گرفت. تعیین ژنوتیپ هر یک از نمونه‌ها برای جایگاه‌های مختلف با شمارش مستقیم آلل‌ها از روی ژل صورت گرفت.

تجزیه وتحلیل آماری

در این مطالعه برای محاسبه تعداد آلل در هرلوکوس، تعداد آلل‌های موثر (Ne)، هتروزیگوتی و هموزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار بر طبق تعادل هاردی- واینبرگ و شاخص اطلاعات شانون[4] از نرم افزار PopGene v1.32 (۱۴)، و برای محاسبه محتوای اطلاعات چند شکل[5] (PIC)، و فراوانی‌های آللی از نرم افزار F- STAT 1.2 استفاده شد.

وضعیت جمعیت مورد مطالعه از نظر تعادل هاردی- واینبرگ با آزمون‌های کای مربع (chi – square Test) و نسبت درست نمایی (G_t^2) بررسی شد.

هتروزیگوسیتی هر جایگاه با معادله ۱ محاسبه شد.

$$H_o = \frac{\sum N_{ij}}{N} \qquad (۱)$$

1- Spectrophotometric method
2- International Society for Animal Genetics
3- Bovine Serum Albumin
4- Shannon Index
5- polymorphic information contents

جدول۱- خصوصیات ٤ جایگاه ریزماهواره مورد استفاده

جایگاه ژنی	شماره کروموزوم	توالی آغازگرها (۳→۵)	دمای اتصال آغازگرها	محدوده اندازه آللی	منبع
HMS02	۱۰	ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG CTTGCAGTCGAATGTGTATTAAATG	۶۸	۲۱۸ -۲۳۸	Guerin et al. (1994)
HMS03	۹	CCAACTCTTTGTCACATAACAAGA CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT	۶۶	۱۵۰ -۱۷۴	Guerin et al. (1994)
HMS07	۱	CAGGAAACTCATGTTGATACCATC TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	۶۷	۱۶۷ -۱۸۹	Guerin et al. (1994)
AHT04	۲۱	AACCGCCTGAGCAAGGAAGT GCTCCCAGAGAGTTTACCCT	۶۷	۱۳۸ -۱۷۰	Binns et al. (1995).

در این رابطه $N_{ij}, (i \neq j)$ تعداد افراد هتروزیگوت و i و j نوع آلل-ها در جایگاه ژنی مورد مطالعه و N تعداد افراد در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد. مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای یک جمعیت خاص که در تعادل هاردی- واینبرگ است با معادله ۲ محاسبه شد:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^{k} p_i^2 \qquad (۲)$$

در این معادله P_i بیانگر فراوانی آلل iام در یک جایگاه معین و $\sum_{i=1}^{k} p_i^2$ نسبت مورد انتظار هموزیگوت‌ها و عدد یک نشان‌دهنده کل ژنوتیپ‌ها (مجموع فراوانی نسبی هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها) است. نی (۱۲)، این فرمول را معیار اندازه‌گیری تنوع نامید و بیان کرد که این فرمول برای جانداران دیپلوئید (و همچنین برای جانداران با سیستم تولید مثلی خاص و متفاوت از پستانداران) می‌تواند معرف میزان هتروزیگوسیتی باشد (۱۰).

شاخص تنوع شانون به عنوان سنجه ای از تنوع گونه‌ای طبق معادله ۳ محاسبه شد (۱۴).

$$H' = -\sum p_i Ln p_i \qquad p_i = \frac{ni}{N} \qquad (۳)$$

که در آن p_i فراوانی نسبی آلل‌ها برای هر جمعیت، n_i تعداد آلل‌های دیده شده در جمعیت iام و N تعداد کل آلل‌ها می‌باشد.

محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) آماره‌ای است برای تعیین چند شکلی یک جایگاه، که با معادله ۴ در جمعیت مورد مطالعه محاسبه شد:

$$PIC = 2\sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} P_i P_j \left(1 - P_i P_j\right) \qquad (۴)$$

در این معادله P_i بیانگر فراوانی آلل iام، P_j بیانگر فراوانی آلل jام و k بیانگر تعداد آلل در جمعیت مورد مطالعه است. میزان اطلاعات چند شکل (PIC) ارزش یک نشانگر برای کشف چند شکلی درون یک جمعیت را نشان می‌دهد که به تعداد آلل‌های قابل شناسایی و توزیع آن بستگی دارد (۳).

نتایج و بحث

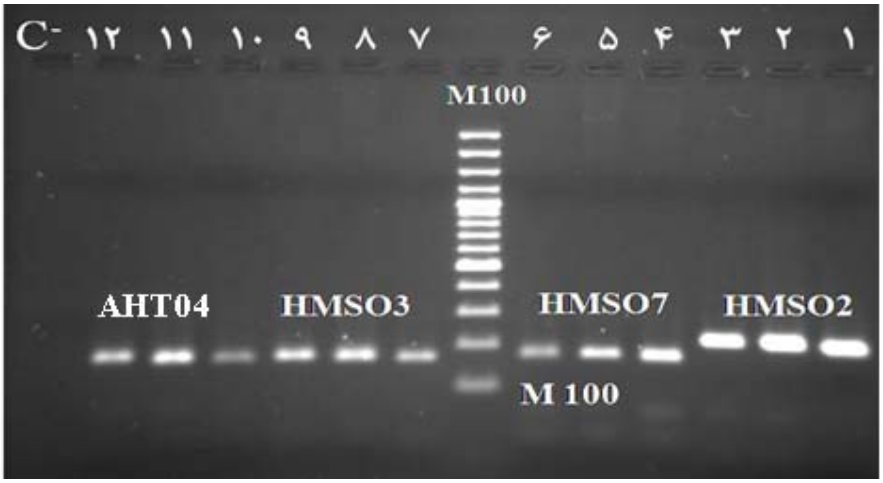
استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمراز

نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA های استخراج شده با غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر کیفیت مناسبی برای انجام PCR برخوردار بودند. نتایج بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز نشان داد که واکنش زنجیرهای پلیمراز برای هر ۴ جایگاه HMS02 و HMS03 و HMS07 و AHT04 به خوبی انجام شده و قطعات بصورت کاملاً اختصاصی تکثیر شده بودند (شکل۱). نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل اکریل‌آمید نشان داد که ۴ جایگاه مورد مطالعه بخوبی بر روی ژل اکریل آمید تفکیک شده‌اند و اندازه آللی هر جایگاه را می‌توان مشخص نمود (شکل ۲).

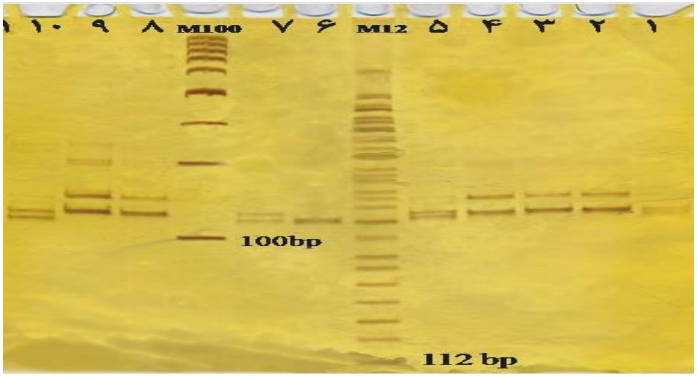
تجزیه وتحلیل داده‌ها

در این پژوهش بیشترین تعداد آلل در جایگاه ژنی HMS02 (۱۲ آلل) و کمترین تعداد آلل در جایگاه ژنیHMS07 (۹آلل) مشاهده شد (جدول ۲). میانگین تعداد آلل مشاهده شده چهار جایگاه ۱۰/۵ آلل بود که نشان داد جمعیت مورد بررسی از تنوع آللی بالایی برخوردار است و این احتمالا ناشی از تلاقی این اسب‌ها با اسب‌های نژادهای دیگر بخصوص تروبرد به منظور افزایش عملکرد یا دقت مالکین در جفتگیری‌ها برای دور ماندن از عوارض هم‌خونی باشد. همچنین بیشترین (۸/۰۶۵۱) و کمترین (۴/۹۰۲۹) تعداد آلل موثر به ترتیب مربوط به جایگاه ژنی HMS02 و HMS03 بود و میانگین آلل موثر در جمعیت ۶/۰۷۸۲ محاسبه شد.

بهل و همکاران (۶)، تعداد ۲۵ جایگاه را در اسب نژاد zanskari مورد بررسی قرار دادند که بالاترین تعداد آلل مشاهده شده در جایگاه‌های HMS07 و AHT04 با ۹ آلل گزارش شد. هر ۴ جایگاه مورد استفاده در مطالعه حاضر نیز در بین این ۲۵ جایگاه قرار داشت.



شکل۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز چهار جایگاه ریزماهواره (HMS02، HMS07، HMSO3، AHT04). شماره C- کنترل منفی، شماره ۳-۱ جایگاه HMS02، شماره ٦-٤ جایگاه HMT07، شماره ۹-۷ HMT03، شماره ۱۲-۱۰ جایگاه AHT04 ، M نشانگر وزنی مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR



شکل۲- نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد با رنگ آمیزی نیترات نقره شماره ۱۰-۱ جایگاه HMS02، M نشانگر وزنی مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولاتPCR

جاکابوا و همکاران (۱۱)، با استفاده از ۶ جایگاه ریزماهواره ۳۵۲ راس اسب تروبرد را در اسلواکی مورد بررسی قرار دادند. تعداد آللها در جایگاهها از ۷ تا ۱۱ آلل متغیر بود و جایگاههای HMS03 و HMS07 به ترتیب ۱۰ و ۹ آلل را نشان دادند.

نتایج این پژوهش نشان داد که ۳ جایگاه ژنی (HMS03 و HMS02 و AHT04) از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف داشتند ($p<0.05$) که این انحرافات احتمالا ناشی از کوچک بودن اندازه جمعیت مورد بررسی و وجود جریان ژنی و تاثیر انتخاب در جمعیت می‌باشد (جدول ۳). انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ همچنین می‌تواند به ساختار و سیستم آمیزشی درون جمعیت مربوط شود و از نظر تکنیکی وجود آلل‌های صفر می‌تواند باعث چنین انحرافی شوند. همچنین این جمعیت در جایگاه ژنی (HMS07) در تعادل هاردی- واینبرگ قرار داشت. این مورد با یافته‌های پیشین تناقضی ندارد.

برای ارزیابی تنوع آللی مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_0)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب (H_{Nei}) بررسی شد که نتایج در جدول ۴ ارائه شده است. در این پژوهش بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۸۸۴۷) در جایگاه ژنی HMS02 مشاهده شدکه این جایگاه در جمعیت دارای بیشترین تعداد آلل نیز بود. همچنین کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۸۰۳۹) در جایگاه HMS03 که دارای ۱۰ آلل است مشاهده شد (جدول ۴). در تحقیق بهل و همکاران (۶)، در بین ۲۵ جایگاه مورد بررسی بالاترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار مربوط به جایگاه ژنی بود که بالاترین تعداد آلل مشاهده شده را داشتند. که با نتایج به دست آمده ازاین پژوهش مطابقت دارد. در واقع میزان

هتروزیگوسیتی بستگی به فراوانی و توزیع آلل‌ها در جمعیت دارد.

جدول ۲- اندازه آللی و فراوانی مربوط به جایگاه‌های مورد مطالعه

آلل‌ها	HMS02	HMS03	HMS07	AHT04
A	۲۰۶*(۰/۰۳۹)**	۱۵۰(۰/۰۲۹)	۱۶۸(۰/۰۱۰)	۱۴۰(۰/۰۱۰)
B	۲۰۸(۰/۱۴۷)	–	۱۷۰(۰/۰۹۸)	–
C	۲۱۰(۰/۰۵۹)	–	۱۷۲(۰/۱۸۶)	–
D	۲۱۲(۰/۰۴۹)	۱۵۶(۰/۰۱۰)	۱۷۴(۰/۱۳۷)	۱۴۶(۰/۰۳۹)
E	۲۱۴(۰/۱۷۶)	۱۵۸(۰/۲۴۵)	۱۷۶(۰/۰۲۹)	۱۴۸(۰/۰۴۹)
F	۲۱۶(۰/۲۰۶)	۱۶۰(۰/۱۰۸)	۱۷۸(۰/۰۸۸)	۱۵۰(۰/۰۶۹)
G	۲۱۸(۰/۰۵۹)	۱۶۲(۰/۱۴۷)	۱۸۰(۰/۰۹۸)	۱۵۲(۰/۲۰۶)
H	۲۲۰(۰/۰۲۹)	۱۶۴(۰/۰۴۹)	۱۸۲(۰/۳۴۳)	۱۵۴(۰/۰۸۸)
I	–	–	۱۸۴(۰/۰۱۰)	۱۵۶(۰/۰۴۹)
J	–	۱۶۸(۰/۰۲۹)	–	۱۵۸(۰/۰۳۹)
K	–	۱۷۰(۰/۳۲۴)	–	۱۶۰(۰/۱۸۶)
L	۲۲۸(۰/۰۹۸)	۱۷۲(۰/۰۲۹)	–	۱۶۲(۰/۲۴۵)
M	۲۳۰(۰/۰۲۰)	۱۷۴(۰/۰۲۹)	–	–
N	۲۳۲(۰/۰۴۹)	–	–	–
O	۲۳۴(۰/۰۶۹)	–	–	۱۶۸(۰/۰۲۰)
محدوده آللی	۲۰۶–۲۳۴	۱۵۰–۱۷۴	۱۶۸–۱۸۴	۱۴۰–۱۶۸

* اندازه آللی

** فراوانی آللی

جدول ۳- نتایج حاصل از تست تعادل هاردی- واینبرگ در جایگاه‌های ریزماهواره

مکان ژنی	کای مربع	نسبت درست نمایی	درجه آزادی	نتیجه
HMS02	۱۳۸/۹۵۲۳۰۰	۹۸/۸	۶۶	*
HMS03	۱۱۹/۱۴۵۲۱۲	۹۳/۶	۴۵	*
HMS07	۲۶/۲۴۹۹۲۹	۳۰/۰۴	۳۶	Ns
AHT04	۹۷/۵۹۷۷۴۸	۸۰/۰۷	۵۵	*

* در سطح ۰/۰۵معنی‌دار می‌باشد

Ns در سطح ۰/۰۵معنی‌دار نمی‌باشد

در این پژوهش هتروزیگوسیتی مورد انتظار در نمونه‌های مورد بررسی جایگاه ژنی HMS03 پایین‌تر از جایگاه ژنی HMS07 بود و این در حالی است که تعداد آلل‌های مشاهده شده در این جایگاه نسبت به جایگاه HMS07 بیشتر است. همچنین مشاهده شد در جایگاه ژنی HMS03، ۴ آلل بیشترین فراوانی را نسبت به بقیه آلل‌ها دارا بودند به همین دلیل هتروزیگوسیتی کمتری نسبت به جایگاه ژنی HMS07 نشان داد (جدول ۴). این نتیجه با نتایج مطالعات گوئرین و همکاران (۹)، مطابقت دارد. آن‌ها در بررسی چند جایگاه ریز ماهواره اسب نشان دادند که جایگاه ژنی HMS05 با ۳ آلل دارای هتروزیگوسیتی برابر با ۰/۶۶ است، در حالی که میزان این پارامتر در جایگاه ژنی HMS08 با ۵ آلل معادل۰/۲۶ محاسبه شد.

با توجه به جدول ۴ مشاهده می‌شود که در جایگاه HMSO7 میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده کمتر از میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار است که علت آن ممکن است تلاقی‌های نزدیک، کوچک بودن جمعیت، واریانس نمونه‌گیری و رانش تصادفی ژنتیکی باشند که این عوامل باعث افزایش همخونی و کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شده می‌شوند. همچنین با دقت در این جایگاه مشاهده می‌شود فراوانی ژنوتیپ‌های هموزیگوت در این جایگاه نسبت به دیگر جایگاه‌ها بالاتر است.

بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به جایگاه HMS02 بود که با توجه به تعداد آلل زیاد این جایگاه منطقی به نظر می‌رسد و کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به جایگاه HMS07 می‌شود که دارای کمترین تعداد آلل می‌باشد (جدول ۴). با ارزیابی این شاخص در این جمعیت معیار مناسبی برای ارزیابی چند شکلی و میزان تغییر پذیری جایگاه‌های مورد مطالعه فراهم می‌شود. هرچه شاخص شانون به صفر نزدیکتر شود تنوع کمتر و هرچه یک جایگاه ژنی شاخص شانون بیشتری نشان دهد تنوع بالاتر و استفاده از نشانگری که شاخص شانون بالاتری دارد جهت تعیین تنوع مناسب‌تر است (۱۴).

در این مطالعه بالاترین مقدار چند شکلی (PIC) مربوط به جایگاه HMS02 (۰/۸۶) و کمترین مقدار آن مربوط به جایگاه HMS03 (۰/۷۷) بود همچنین میانگین PIC در این جمعیت برابر با ۰/۸۰۷۵ برآورد شد (جدول ۴). میزان بالای چند شکلی نشانگرهای ریزماهواره نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در این جمعیت است.

مقادیر جدول ۴ نشان می‌دهند که جایگاه‌های ریزماهواره با هتروزیگوسیتی بالا، PIC بالایی نیز دارند و همین طور مقادیر PIC از مقادیر هتروزیگویستی متناظرشان کمتر می‌باشد در نتیجه این دو پارامتر با هم رابطه مستقیم دارند. از این رو با دانستن میزان هتروزیگوسیتی و PIC می توان جایگاه‌هایی با قدرت تشخیص بالا را برای مطالعات بعدی انتخاب نمود. در بررسی انجام شده توسط گوئرین و همکاران (۹)، با استفاده از ۷ جایگاه ریزماهواره، بیشترین مقدار PIC مربوط به جایگاه ژنی HMS02 (۰/۷۴) بود که بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی (۰/۷۷) را نیز داشت. مقدار PIC در این بررسی نیز کمتر از مقدار هتروزیگوسیتی مربوطه بود که این موارد با نتایج حاصل از پژوهش ما مطابقت دارد.

ورینگن و همکاران (۱۶)، از نشانگر ریزماهواره VHL20 با چند شکلی بالا برای تمایز ۴ نژاد اسب کوارتر، مینیاتوری، استانداردبرد و تروبرد استفاده کردند. مقدار هتروزیگوسیتی در استانداردبرد ۰/۸۱ برآورد گردید که نسبت به بقیه نژادها بیشتر بود مقدار PIC نیز در این نژاد برابر با ۰/۷۹ بود که نسبت به بقیه نژادها بالاترین مقدار را داشت.

جدول ٤- تعدادآلل مشاهده شده (N)، تعداد آلل موثر (Ne)، هتروزیگوستی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوستی مورد انتظار(He)، شاخص شانون، محتوای چند شکلی (PIC) برای هریک از جایگاه‌های مورد مطالعه

جایگاه ژنی	N	N_e	Ho	He	Shannon Index	PIC
HMS02	۱۲	۸/۶۵	۰/۹۰۲	۰/۸۸۴۷	۲/۲۶۱۷	۰/۸۶
HMS03	۱۰	۴/۰۲۹	۱	۰/۸۰۳۹	۱/۸۳۹۸	۰/۷۷
HMS07	۹	۵/۱۶۴	۰/۷۶۴۷	۰/۸۰۸۶	۱/۸۱۶۶	۰/۷۸
AHT04	۱۱	۶/۲۸۵	۰/۹۸۰۴	۰/۸۵۰۳	۲/۰۵۳۲	۰/۸۲
میانگین	۱۰/۵	۶/۷۸۲	۰/۹۱۱۸±۰/۱۰۶۸	۰/۸۳۶۹±۰/۰۳۸۱	۱/۹۹۲۸	۰/۸۰۷۵

نتایج تحقیقات ورینگن و همکاران (۱۶)، نشان داد که نژاد دارای بیشترین هتروزیگوسیتی، بیشترین مقدار PIC را نیز دارا می‌باشد. همچنین مقدار PIC در هر یک از نژادها کمتر از مقدار هتروزیگوسیتی مربوطه بود.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ریزماهواره‌ها می‌توانند به عنوان نشانگر ملکولی مناسبی در تحقیقات ژنتیکی و علوم زیستی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین مشخص شد ۴ جایگاه ریزماهواره استفاده شده چند شکلی بالایی را نشان دادند و می‌توانند در اسب‌های نژاد ترکمن علاوه بر تنوع زنتیکی برای تشخیص انساب مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

ازمعاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی دانشگاه فردوسی مشهد به سبب فراهم نمودن امکانات و تجهیزات پژوهشی، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- بهروزی‌نیا، س.، س. میرحسینی، ف. افراز، ع. سهرابی، ا. محمدی، ص. شهبازی، و س. دلیرصفت. ۱۳۹۰. توصیف ژنتیکی دو جمعیت اسب ترکمن ایرانی مناطق ترکمن صحرا و ترکمن جرگلان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره . نشریه پژوهش های علوم دامی ایران. جلد ۳. شماره ۱. ص ۶۶-۶۳.

۲- سهرابی، ع. ۱۳۸۲. بررسی تنوع ژنتیکی دو نژاد اسب ایرانی (اسبچه خزر و ترکمن) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (microsatellite) پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان.

۳- نقوی، م. و ب. قره یاضی. ۱۳۸۴. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران.

۴- گلشن، ع. و س. رجبی. ۱۳۸۴ . معرفی اسب ترکمن در ایران. انتشارات پژواک کیوان

5- Azor, P. J., M. Valera, M. D. Gomez, F. Goyache, and A. Molina. 2007. Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. Genet. Mol. Biol. 30(1):37-42.

6- Behl, R., J. Behl, N. Gupta, S. C. Gupta, S. P. S. Ahlawat, M. Ragnekar, and Z. Ahmed. 2006. Genetic characterization of Zanskari breed of horse. J. Genet. 85(3):199-203.

7- Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheimvandillen, and J. Vandernoordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic-acids. J. Clin. Microbiol. 28(3):495-503.

8- Canon, J., M. L. Checa, C. Carleos, J. L. Vega-Pla, M. Vallejo, and S. Dunner. 2000. The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. Anim. Genet. 31(1):39-48.

9- Guerin, G., M. Bertaud, and Y. Amigues. 1994. Characterization of 7 new horse microsatellites - HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 AND HMS8. Anim. Genet. 25(1):62-62.

10- Hendricks, B. L., and A. A. Dent. 2007. International Encyclopedia of Horse Breeds. University of Oklahoma Press.

11- Jakabova, D., J. Trandzik, J. Chrastina, L. Hudecova, E. Zetochova, J. Bulla, A. Bugarsky, F. Jakab, and P. Kozlik. 2002. Effectiveness of six highly polymorphic microsatellite markers in resolving paternity cases in Thoroughbred horses in Slovakia. C.J.A.S. 47(12):497-501.

12- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individualS.

Genetics 89(3):583-590.

13- Nicholas, F. W. 2009. Introduction to Veterinary Genetics. John Wiley and Sons.

14- Orians, G. H. 1990. The Preservation and valuation of biological resources. University of Washington Press.

15- Sereno, F., J. R. B. Sereno, J. L. Vega-Pla, and J. V. Delado. 2008. DNA testing for parentage verification in a conservation nucleus of Pantaneiro horse. Genet. Mol. Biol. 31(1):64-67.

16- Vanhaeringen, H., A. T. Bowling, M. L. Stott, J. A. Lenstra, and K. A. Zwaagstra. 1994. A highly polymorphic horse microsatellite locus - VHL20. Anim Genet. 25(3):207-207.