نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، ص. ۶۶-۶۳

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 3, No. 1, Spring 2011, p. 63-66

توصیف ژنتیکی دو جمعیت اسب ترکمن ایرانی مناطق ترکمن صحرا و ترکمن جرگلان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

سریرا بهروزی‌نیا[۱]- سید ضیاءالدین میرحسینی[۲]- فضل‌الله افراز[۳]- علیرضا سهرابی[٤]- سید ابوالقاسم محمدی[٥]- صالح شهبازی[٦]- سید بنیامین دلیرصفت[۷*]

تاریخ دریافت:۸۸/۹/۱۰
تاریخ پذیرش:۸۹/۲/۱۳

چکیده

در این تحقیق، تنوع ژنتیکی دو جمعیت اسب ترکمن ایرانی مناطق ترکمن صحرا و ترکمن جرگلان با استفاده از پنج نشانگر ریزماهواره برای مقایسه سطوح چند شکلی و درک روابط بین آنها مورد بررسی قرار گرفت. تمام جایگاه‌ها در دو جمعیت از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف معنی داری را نشان دادند. متوسط تعداد آلل در جمعیت ترکمن صحرا و ترکمن جرگلان به ترتیب ۴ و ۳/۶ آلل بوده و از ۳ آلل در جایگاه HMS1 مربوط به جمعیت ترکمن جرگلان تا ۶ آلل در جایگاه ASB2 مربوط به جمعیت ترکمن صحرا متغیر بود. جایگاه AHT4 در دو جمعیت فاقد چند شکلی بود. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۳۶۶ و ۰/۶۶۸ در جمعیت ترکمن جرگلان و ۰/۳۱۶ و ۰/۶۸۵ در جمعیت ترکمن صحرا بود. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده کمتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار در دو جمعیت موید همخونی بالای ناشی از آمیزش های کنترل نشده می باشد. فاصله ژنتیکی Nei بسیار کم (۰/۰۶۴۷) برآورد شده بین دو جمعیت می تواند به دلیل بنیان ژنتیکی مشترک و منشاء نژادی یکسان آنها و همچنین جریان ژنی موجود بین دو منطقه راز و ترکمن صحرا باشد.

واژه های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ریزماهواره، چند شکلی، اسب ایرانی

مقدمه

نژادهای بومی در هر کشور به عنوان سرمایه ملی تلقی گشته وحفظ و تکثیر آنها از ارزش و اهمیت زیادی برخوردار است (۵). سرزمین پهناور ایران به علت شرایط خاص جغرافیایی دارای اقلیم‌های متنوعی است و در چنین شرایطی انتخاب‌های طبیعی و مصنوعی موجب شده است که نژادهای حیوانات اهلی با استعدادهای متنوع در این کشور بوجود آید (۱۱). اسب ترکمن گونه ای از نژاد اسب ایرانی است که در منطقه ترکمن صحرا زندگی کرده و پرورش می یابد. نژادهای شناخته شده اسب ترکمن در سه گروه یموت، آخال تکه و چناران (مخلوطی از تلاقی اسب ترکمن وعرب) دسته بندی شده است. امروزه خالص ترین اسب های ترکمن ایران را در منطقه راز و جرگلان از توابع استان خراسان شمالی می توان یافت که بیشترین جمعیت این اسب محسوب می شود.

از آنجائیکه شناسایی دقیق نژادهای اسب ایرانی که از ذخایر ملی محسوب می شوند از وظایف ضروری مؤسسات تحقیقاتی ذیربط به شمار می‌رود، اولین گام در این راستا بررسی میزان تنوعی است که در جمعیت‌ها وجود دارد (۵). امروزه از نشانگر های ژنتیکی جهت تعیین تنوع گروهی و نیز دسته بندی[۸] جانداران مختلف استفاده می شود (۱۶). هرچند مجموعهٔ وسیعی از تکنیک های نشانگر DNA جهت مطالعات ژنتیکی در دسترس است، ولی در طی چند دهه اخیر از نشانگرهای ریزماهواره به دلیل چند شکلی زیاد، قابلیت رتبه‌دهی آسان، همبارز بودن و پراکندگی یکنواخت در سراسر ژنوم به طور وسیعی استفاده شده است (۲۰).

تاکنون مطالعات متعددی در زمینه تنوع ژنتیکی نژادها و گونه

۱،۲،۴ و ۶- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشجویان سابق کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۳- عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
۵- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۷- کارشناس ارشد پژوهشی گروه علوم دامی و پرورشی کرم ابریشم دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان
(*- نویسنده مسئول: (Email: bendalir@guilan.ac.ir

8- Classification

های اسب در سراسر دنیا انجام شده است. در مطالعه ای (۱۸)، که به کمک چند شکلی DNA میتوکندریایی، تنوع ژنتیکی اسب های منطقه چجو (یکی از جزایر جنوبی کره) مورد ارزیابی قرار گرفت، میزان تنوع ژنتیکی ۱۷ هاپلوتیپ مورد بررسی، ۰/۹۱ برآورد گردید که موید وجود گروه های ژنتیکی متنوع در اجداد مادری جمعیت اسب چجو بود. آبرله و همکاران (۲)، تنوع ژنتیکی ۶ نژاد اسب بارکش آلمانی را به کمک اطلاعات ژنوتیپی حاصل از ۳۰ جایگاه ریزماهواره مورد مقایسه قرار دادند که نتایج به دست آمده تفاوت آشکار میان نژادهای اسب بارکش را نشان داد. در تحقیقی دیگر (۱۷)، تنوع ژنتیکی ۴۱۷ راس اسب نژاد بومی ناحیه باسک (اسپانیا) با استفاده از ۱۲ نشانگر ریز ماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج حاصله میانگین هتروزیگوسیتی بیشتری را برای این نژادها نسبت به نژادهای دیگر اسب نشان داد.

سید آبادی و همکاران (۱۵)، از ۷ نشانگر ریزماهواره به منظور تهیه سیستم تعیین شجره برای اسب خزر ایران استفاده نمودند. در این تحقیق تعداد آلل در هر جایگاه ژنی از ۳ تا ۴ آلل و هتروزیگوسیتی مورد انتظار از ۰/۶۱۷ تا ۰/۷۴۱ متغیر بود. در تحقیق دیگری در ایران (۳)، چندشکلی پروتئین خون دو جمعیت اسب بومی ایران (کرد و ترکمن) به کمک الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت که از ۱۰ جایگاه مورد بررسی، ۴ جایگاه ژنی همشکل بوده و جایگاه ترانسفرین (*Tf*) با ۵ آلل چند شکلی بسیار بالایی نشان داد. امیری نیا و همکاران (۴)، تنوع ژنتیکی داخل جمعیت اسب خزر ایران را با کمک ۸ نشانگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج به دست آمده تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای را در این جمعیت نشان داد. در یک مطالعه در برزیل (۹)، تنوع ژنتیکی سه جمعیت اسب پانتانیرو[1] با استفاده از اطلاعات حاصل از ۱۰ جایگاه ریز ماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق ۹۱ آلل شناسایی و ضریب همخونی هرجمعیت و همچنین تنوع ژنتیکی بین سه جمعیت پایین گزارش شد. همچنین لروی و همکاران (۱۲)، تنوع ژنتیکی ۱۶۷۹ راس از ۳۴ نژاد اسب فرانسه را با استفاده از ۱۱ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق هتروزیگوسیتی مورد انتظار بسته به نژاد از ۰/۴۳ تا ۰/۷۹ متغیر بود و بر اساس آنالیزهای چند متغیره و روابط ژنتیکی، نژادها به ۴ گروه ژنتیکی متفاوت دسته بندی شدند.

در تحقیق حاضر نیز تنوع ژنتیکی دو جمعیت اسب ترکمن ایرانی مناطق ترکمن صحرا و ترکمن جرگلان با استفاده از پنج نشانگر ریز ماهواره مورد بررسی قرار می گیرد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳۰ رأس اسب به طور تصادفی از جمعیت اسب‌های ترکمن صحرا در منطقه گنبد استان گلستان و جمعیت ترکمن جرگلان در منطقه بجنورد استان خراسان شمالی نمونه برداری و به شکل انفرادی نمونه خون تهیه شد. DNA های ژنومی نمونه‌ها با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج و با استفاده از ۵ آغازگر ریزماهواره اختصاصی اسب شامل HSM1، HSM3، HSM6 (۱۰)، ASB2 (۸) و AHT4 (۷)، در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفتند. اجزای موجود در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲۰۰ میکرومولار از هر کدام از $dNTP_S$ (کمپانی Roche -آلمان)، بافر PCR با غلظت 1X (شرکت سیناژن- ایران)، ۰/۳ میکرومول از هر کدام از آغازگرها (کمپانی MOLBIOL TIB-آلمان)، ۱/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA پلیمراز (شرکت سیناژن- ایران)، ۲/۵ میلی مولار $MgCl_2$ (شرکت سیناژن- ایران) و آب دوبار تقطیر بود. پروفیل حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک مرحله ابتدایی واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه اصلی واکنش (واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و بسط آنزیمی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه) و مرحله بسط آنزیمی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد (۱۰). محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۶٪ واسررشته ساز به وسیله دستگاه الکتروفورز عمودی مدل Sequi-Gen® (Bio-Rad -آمریکا) الکتروفورز شده و سپس با استفاده از نیترات نقره رنگ آمیزی شدند. امتیازدهی باندها با استفاده از نرم‌افزار Quantity one (Bio-Rad- آمریکا) صورت گرفت. تعداد آلل مؤثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای یک جایگاه و بررسی وجود تعادل هاردی- واینبرگ با استفاده از آزمون مربع کای (χ^2) صورت گرفت و فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت بر اساس رابطه نئی (۱۴)، با استفاده از نرم‌افزار POPGENE 32 (۱۹)، برآورد گردید.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج به دست آمده تمام جایگاه‌ها در دو جمعیت از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف معنی‌دار نشان دادند ($p<0/01$). علت این انحراف ممکن است به دلیل تشکیل ساختار ژنتیکی ناشی از اتخاذ استراتژی های متفاوت انتخاب محلی و نمونه برداری در میان ساختار های شناخته نشده باشد. از طرفی وجود آلل‌های تکثیر نشده یا آلل‌های صفر[2] می تواند منجر به اشتباه در مشاهده هموزیگوت ها

1- Pantaneiro

2- Null Allel

باشد (۱۳)، زیرا حضور این آلل‌ها اگر با هتروزیگوت‌ها همپوشانی داشته باشند باعث کاهش هتروزیگوسیتی و متعاقباً افزایش هموزیگوسیتی می‌شود (۲۰).

جدول ۱ خلاصه نتایج مربوط به تنوع ژنتیکی در پنج نشانگر ریز ماهواره مورد مطالعه را نشان می دهد. همانطور که ملاحظه می شود میانگین تعداد آلل ها در دو جمعیت ترکمن صحرا و ترکمن جرگلان به ترتیب ۱/۸۷±۴ و ۱/۲۸±۳/۶ بوده است. بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده در دو جمعیت به ترتیب مربوط به جایگاه ژنی ASB2 در جمعیت ترکمن صحرا با شش آلل و جایگاه ژنی HMS1 در جمعیت ترکمن جرگلان با سه آلل بود. جایگاه ژنی AHT4 نیز در دو جمعیت، همشکل[1] بود. سولیس و همکاران (۱۷)، در بررسی تنوع ژنتیکی چهار نژاد اسب از منطقه باسک (اسپانیا) به کمک ۱۲ نشانگر ریز ماهواره میانگین تعداد آلل از ۵/۷۵ تا ۸/۰۸ را گزارش نمودند. این محققان و همچنین آودی و بانوس (۶)، میانگین ۴/۳۳ و ۴/۱۱ آلل را به ترتیب برای اسب های تروبرد و اسکیروس یونان گزارش نمودند که به برآوردهای ما نزدیکتر هستند. از طرف دیگر در مطالعه اخیر جایگاه ژنی HSM1 برای اسب های اسکیروس یونان نیز مورد استفاده قرار گرفت که بر خلاف مطالعه حاضر همشکل بود. عموماً، مقایسه تعداد آلل در مطالعات مختلف باید بدقت انجام شود زیرا ممکن است نشانگرهای متفاوت ریزماهواره و همچنین انواع متفاوت نشانگر مورد استفاده قرار گیرند.

برای چهار نشانگر چند شکل در این مطالعه، سطوح هتروزیگوسیتی مورد انتظار از ۰/۶۳۸ تا ۰/۷۳۰ (با میانگین ۰/۰۵۰±۰/۶۸۵) در جمعیت ترکمن صحرا و از ۰/۶۱۹ تا ۰/۷۰۴ (با میانگین ۰/۰۲۴±۰/۶۶۸) در جمعیت ترکمن جرگلان متغیر بود، در حالی که میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای دو جمعیت ترکمن صحرا و ترکمن جرگلان به ترتیب ۰/۰۳۳ ±۰/۳۱۶ و ۰/۱۱۶±۰/۳۶۶ بود (جدول ۱). در هر دو جمعیت مورد مطالعه، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده مقادیر کمتری نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار نشان داد که موید همخونی بالای این دو جمعیت ناشی از آمیزش های کنترل نشده می باشد. بدیهی است با در نظر گرفتن اندازه محدود جمعیت، احتمال افزایش افراد هموزایگوت نسبت به هتروزایگوت بیشتر است. در تحقیق انجام شده توسط لوئیس و همکاران (۱۳)، نیز میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت های آخال تکه و اسبچه خزر نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار کمتر بود. درحالیکه در بررسی دیگری بر روی جمعیت اسب خزر ایران (۱۵)، میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۹۴۰) بیشتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۶۷۵) برآورد گردیدکه نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالای این جمعیت می باشد.

در مطالعه حاضر متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت ترکمن صحرا (۰/۶۸۵) تفاوت معنی داری ($p<0/01$) نسبت به متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت ترکمن جرگلان (۰/۶۶۸) نشان نداد. از آنجائیکه هتروزیگوسیتی مورد انتظار در واقع نشان دهنده میزان تنوع ژنی جمعیت می باشد، این نتیجه می تواند موید تنوع ژنی تقریباً یکسان این دو جمعیت باشد.

میزان تشابه و نیز فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت به ترتیب برابر با ۰/۹۳۷۳ و ۰/۰۶۷۴ به دست آمد. کم بودن فاصله ژنتیکی بین این دو جمعیت می تواند به دلیل بنیان ژنتیکی مشترک و منشأ نژادی یکسان آنها باشد. علاوه بر این، جریان ژنی[2] موجود بین دو منطقه راز و ترکمن صحرا نیز می‌تواند موجب تشابه زیاد این دو جمعیت شود. نتایج به دست آمده از نشانگر RAPD نیز فاصله کم بین این دو جمعیت را تأیید می‌کند (۱). در نهایت با توجه به اینکه دو جمعیت مورد مطالعه از تنوع ژنتیکی کمی برخوردار می‌باشند و با عنایت به اهمیت وجود تنوع ژنتیکی در حفظ و بقاء نژاد های بومی، می‌توان با افزایش اندازه مؤثر جمعیت و کنترل آمیزش‌ها از کاهش بیشتر تنوع و افزایش همخونی این جوامع با ارزش جلوگیری به عمل آورد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به خاطر تامین بخشی از هزینه‌ها و آزمایشگاه ژنتیک و مارکرهای مولکولی گروه پژوهشی کرم ابریشم دانشگاه گیلان به خاطر فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و همچنین از مشاوره های علمی آقای پروفسور Gus Cothran استاد دانشگاه کنتاکی آمریکا و همکاری آقای مهندس سید محمد فرهاد وحیدی دانش آموخته دانشگاه گیلان تشکر و قدردانی بعمل آورند.

1- Monomorph

2- Gene Flow

جدول ۱- میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده(H_o) و مورد انتظار (H_e) در دو جمعیت ترکمن صحرا و ترکمن جرگلان

مکان ژنی	ترکمن صحرا			ترکمن جرگلان		
	تعداد آلل	H_o	H_e	تعداد آلل	H_o	H_e
HMS1	۴	۰/۳۶۶	۰/۶۴۵	۳	۰/۳۳۳	۰/۶۱۹
HMS3	۵	۰/۳۰۰	۰/۷۳۰	۴	۰/۱۶۶	۰/۶۷۱
HMS6	۴	۰/۳۰۰	۰/۶۳۸	۵	۰/۵۰۰	۰/۷۰۴
ASB2	۶	۰/۳۰۰	۰/۷۲۸	۵	۰/۴۶۶	۰/۶۷۹
AHT4	۱	–	–	۱	–	–
میانگین	۴	۰/۳۱۶	۰/۶۸۵	۳/۶	۰/۳۶۶	۰/۶۶۸
انحراف معیار	۱/۸۷	۰/۰۳۳	۰/۰۵۰	۱/۲۸	۰/۱۱۶	۰/۰۲۴

منابع

۱- سهرابی، ع. ۱۳۸۲. بررسی تنوع ژنتیکی دو جمعیت اسب ایرانی (ترکمن و اسبچه خزر) با استفاده از نشانگر RAPD. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه گیلان.

2- Aberle, K. S., H. Hamann, C. Drögemüller, and O. Distl. 2004. Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. Anim. Genet. 35: 270-277.

3- Afraz, F., R. Hemmaty, and S. Shamsa. 2006. Genetic polymorphism of blood proteins in Iranian Kurd and Turkoman horse populations. *Pak.* J. Biol. Sci. 9(1): 155-159.

4- Amirinia, C., H. Seyedabadi, M. H. Banabazi, and M. A. Kamali. 2007. Bottleneck study and genetic structure of Iranian Caspian horse population using microsatellites. Pak. J. Biol. Sci. 10(9): 1540-1543.

5- Apostolidis, A. S., Z. Mamuris, E. Karkavelia, and T. Alifakiotis. 2000. Comparison of Greek breeds of horses using RAPD markers. J. Anim. Breed. Genet. 118: 47-56.

6- Avdi, M., and G. Banos. 2007. Genetic diversity and inbreeding in the Greek Skyros horse. Livest. Sci. 114: 362–365.

7- Binns, M. M., N. G. Holmes, A. Holliman, and A. M. Scott. 1995. The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. Br. Vet. J. 151: 9-15.

8- Breen, M., G. Lindgren, M. M. Binns, J. Norman, Z. Irvin, K. Bell, K. Sandberg, and H. Ellegren. 1997. Genetical and physical assignments of equine microsatellites-first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mamm. Genome* 8:267-273.

9- Giacomoni, E. H., G. P. Fernández-Stolz, and T. R. O. Freitas. 2008. Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers. Genet Mol Res 7(1): 261-270.

10- Guerin, G., M. Bertaud, and Y. Amigues. 1994. Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. Anim. Genet. 25,62p.

11- Hendricks, B. L. 1995. International Encyclopedia of Horse Breeds, Univ of Oklahoma Press.

12- Leroy, G., L. Callède, E. Verrie, J. C. Mériaux, A. Ricard, C. Danchin-Burge, and X. Rognon. 2009. Genetic diversity of a large set of horse breeds raised in France assessed by microsatellite polymorphism. *Genet. Sel. Evol.* 41: 5.

13- Luis, C., R. Juras, M. M. Oom, and E. G. Cothran. 2006. Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds based on protein and microsatellite loci variation. Anim. Genet. 38: 20-27.

14- Nei, M. 1978. Estimation of average hetreozigosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 87: 583-590.

15- Seyedabadi, H. R., C. Amirinia, M. H. Banabazi, and H. Emrani. 2006. Parentage verification of Iranian Caspian horse using microsatellites markers. Iran. J. Biotechnol. 4(4): 260-264.

16- Smith, J. S. C., and O. S. Smith. 1990. Fingerprinting crop varieties. Advances in Agronomy 47: 85-140.

17- Solis, A., B. M. Jugo, J. C. Mériaux, M. Iriondo, L. I. Mazón, A. I. Aguirre, A. Vicario, and A. Estomba. 2005. Genetic diversity within and among four south European native horse breeds based on microsatellite DNA analysis: implications for conservation. J. Heredity 96 (6): 670-678.

18- Yang, Y. H., K. I. Kim, E. G. Cothran, and A. R. Flannery. 2002. Genetic diversity of Cheju horses (*Equus caballus*) determined by using mitochondrial DNA D-loop Polymorphism. Biochem. Genet. 40(5-6): 175-186.

19- Yeh, F. C., R. C. Yang, and T. Boyle. 2000. POPGENE VERSION 1.32: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta. Canada.

20- Zane, L., L. Bargelloni, and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Mol. Ecol. 11: 1-16.