

## بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت بلدرچین ایستگاه میبد یزد با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

• آمنه محمدی فر

دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه زابل (نویسنده مسئول)

• سیروس امیرنیا

استادیار بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج، ایران

• حسین عمرانی

عضو هیأت علمی بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج، ایران

• حمیدرضا میرزایی

استادیار بخش علوم دامی دانشگاه زابل، زابل، ایران

• محمدرضا محمدآبادی

استادیار بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۸۷

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۲۹۳۷۰۸۱ و فاکس ۰۳۴۱-۳۲۳۳۰۱۰

Email: amohamadifar@gmail.com

### چکیده

در تحقیق حاضر جهت بررسی تنوع ژنتیکی از هفت جایگاه ریز ماهواره ای که دارای چندشکلی بالایی بودند. برای چهار سویه ایستگاه تحقیقات میبد و استخراج DNA به روش کیت انجام گرفت. واکنش های PCR با تمام نشانگرها به خوبی انجام شد. تعادل هاردی - وینبرگ با دو آزمون مربع کای ( $X^2_T$ ) و نسبت درست نمایی (G<sub>Y</sub>T) بدست آمد ( $p < 0.05$ ). تمامی ترکیبات جایگاه - سویه مورد بررسی قرار گرفتند به طوری که سویه English White با استفاده از هر دو آزمون انحراف معنی داری از تعادل هاردی - وینبرگ نشان داد (۲). کمترین و بیشترین فاصله ژنتیکی با معیار Wright, Rogers, DA, و فاصله همنسبی به ترتیب بین سویه های Spanish Pharaoh و Canadian Pharaoh و سویه های English White و Manchurian Golden بدست آمد. درخت فیلوژنیک حاصل از پنج معیار Wright, Rogers, DS, DA و فاصله همنسبی با روش جفت گیری غیر وزنی از طریق میانگین حسابی (UPGMA) ترسیم گردید. سویه های Spanish Pharaoh, Canadian Pharaoh و Manchurian Golden در یک خوشه و سویه English White در خوشه مجزا قرار گرفت. پارامترهای جمعیتی همچون تعداد آلل موثر، تعداد آلل واقعی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص شانون در جمعیت و برای هر جایگاه محاسبه شد و نشان داد که این جمعیت دارای چند شکلی بالایی می باشد. ما مارکرهای ریز ماهواره ای را در بلدرچین استفاده و توصیف کردیم که در تشکیل یک منبع مفید از مارکرهای DNA برای آغاز و توسعه نقشه ژنتیکی بلدرچین مهم هستند و نقش مهمی را بازی می کنند. علاوه، این مارکرها می توانند بعنوان ابزاری در مطالعات فیلوژنتیکی آینده استفاده شوند و در بهبود درک ما از روابط خویشاوندی بلدرچین و مرغ کمک کنند. توسعه نقشه های ژنومی مقایسه ای در طیور به ابزارهایی از قبیل آنالیز کلون های cDNA و تعیین نقشه های هیبرید رادیواکتیو نیاز دارد که نتایج ما نیز در رسیدن آسانتر به ابزارهای یادشده شرکت و کمک می کنند.

کلمات کلیدی: بلدرچین ژاپنی، نشانگرهای ریز ماهواره، تنوع ژنتیکی، هتروزیگوسیتی، چند شکلی، ایستگاه میبد یزد

Animal Sciences Researches in Pajouhesh & Sazandegi No 82 pp: 72-79

### Analysis of genetic variation in quail population from Meybod Research Station using microsatellite markers

By: Mohammadifar A., MSc Student of Zabol University, Zabol, Iran (Corresponding Author) Tel: +989132937081

Amirnia S., Omrani H., Biotechnology Department, Research and Animal Science Centre, Karaj, Iran

Mirzaei H.R., Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran

Mohammadabadi M.R., Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

In this study, we used seven microsatellite markers (GUJ0023, GUJ0083, GUJ0055, GUJ0099, GUJ0041, GUJ0059 and GUJ0052), that showed high level polymorphism for analyzing of genetic variation in four quail strain [Canadian Pharach (CP), Spanish Pharach (SP), English White (EW) and Manchurian Golden (MG)] from Meybod research station. Whole blood samples were collected from 150 individuals belonging to four strains. Total Genomic DNA was extracted by the GUSN-Silica Gel kit. The PCR reactions were successfully done with all primers. All of locus-strain combinations tested for Hardy-Weinberg equilibrium by chi-square and likelihood ratio. All locus-strain combinations deviated from Hardy-Weinberg equilibrium except GUJ0023 in Canadian Pharach and Spanish Pharach strain, GUJ0099 in Manchurian Golden strain and GUJ0052 in Canadian Pharach and Manchurian Golden strains ( $P < 0.05$ ). The effective number of alleles per locus varied from 2.8064 (GUJ0099) to 4.4662 (GUJ0023). The highest and the lowest PIC values belonged to GUJ0023 in Spanish Pharach (0.6964) and GUJ0083 in English White strains (0.4415) respectively. The expected heterozygosity varied between 0.7438 and 0.5450. The lowest and highest DS, Rogers, Wright and coancestry genetic distances were obtained between (CP) with (SP) and (EW), respectively. The phylogenies based on DA, DS, Rogers, Wright and coancestry distances by unweighted pair-group method using an arithmetic average (UPGMA) were showed CP, SP and MG are together at one cluster and EW at another. We can conclude that microsatellite markers could be a useful tool for screening of biodiversity in quail populations. We have described informative quail microsatellite markers that would form a useful resource base of DNA markers as part of our initiative to develop a genetic map for quail. Furthermore, these studied markers could be used as a tool in future phylogenetic studies aimed at improving our understanding of the relatedness of quail to chickens and guinea fowl. The trend in comparative mapping in poultry is taking several directions including the analysis of cDNA clones and radiation hybrid mapping, and our results would contribute to this collective effort.

**Key words: Japanese quail, Microsatellite Markers, Heterozygosity, Polymorphism genetic variation, Meybod Research Station**

#### مقدمه

شناسی، فیزیولوژیکی، ژنتیکی و همچنین تحقیقات زیست پزشکی به کار رود و همچنین تخم بلدرچین منبع خوبی از ویتامین‌ها (به جز ویتامین C) می باشد و جنبه دارویی برای افراد سالمند و کودکان دارد. ارزش غذایی آن چهار برابر ارزش غذایی تخم مرغ و میزان کلسترول آن کمتر از تخم مرغ است که سبب اهمیت پرورش آن شده است. بلدرچین به منظور تولید گوشت و تخم حدود قرن یازدهم میلادی اهلی شده و شامل ۵ سویه و ۶ نژاد می باشد. لازم به ذکر است که در استان یزد افراد زیادی بطور خصوصی اقدام به وارد کردن و پرورش بلدرچین پرداخته اند، به همین دلیل هیچگونه اطلاع دقیقی از تعداد آنها در این استان در دسترس نیست. در ایستگاه میبد یزد ۴ فنوتیپ اصلی وحشی، سفید (English White)، خاکستری (Manchurian Golden) و سیاه وجود دارد. فنوتیپ وحشی شامل سه سویه کانادایی (Canadian Pharach)، اسپانیایی (Spanish Pharach) و روسی است. سویه اسپانیایی جنبه تجاری دارد و به عنوان مرغ مادر این ایستگاه مورد پرورش قرار

افزایش جمعیت جهان نیاز بشر به مواد پروتئینی را روز به روز افزایش می دهد و همین مسئله سبب شده است که بسیاری از حیوانات که گوشت آنها قابل مصرف انسان می باشد به صورت اهلی درآمده و با پرورش صنعتی آنها بخشی از احتیاجات پروتئینی انسان بر طرف گردد. پرورش بلدرچین امروزه جایگاه خاصی در صنعت پرورش طیور پیدا کرده که با توجه به تقاضای مردم از نظر مصرف گوشت و تخم بلدرچین و اقتصادی بودن آن از نظر تولید، پیش بینی میشود در آینده توسعه بیشتری پیدا کند.

اکثر بلدرچین های اهلی ژاپنی از بلدرچین وحشی ژاپنی مشتق شده اند و به گونه (Coturnix Japonica) تعلق دارند. رشد سریع، بلوغ زودرس، تولید بالای تخم و فاصله نسل کوتاه این پرنده این امکان را فراهم آورده است که علاوه بر برگشت سریع سرمایه ناشی از تولید گوشت و تخم، به عنوان یک موجود آزمایشگاهی بسیار مناسب در مطالعات رفتار

ضد انعقاد سیترات سدیم و تیوب های ۱/۵ میلی لیتری حاوی ضد انعقاد EDTA<sup>۱</sup> نیم مولار (pH=۸) تهیه شد. نمونه های خون بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. استخراج DNA از نمونه های خون به روش کیت DNA tom DIA prep ۱۰۰ شرکت ژن فن آوران انجام گرفت. تعیین کیفیت و کمیت DNA به روش اسپکتوفتومتری و ژل آگارز انجام (۷، ۱۰) و در نهایت ۱۴۰ نمونه برای آزمایشات بعدی انتخاب شد. هفت جایگاه ریز ماهواره ای شامل GJ۰۰۵۵، GJ۰۰۴۱، GJ۰۰۸۳، GJ۰۰۹۹، GJ۰۰۵۹، GJ۰۰۵۲ و GJ۰۰۲۳ در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفتند که مشخصات آنها در جدول ۱ آورده شده است (۸). بهینه سازی شرایط واکنش PCR روی دو فاکتور مهم دمای اتصال و غلظت پرایمر بود. جزئیات سایر واکنش های PCR برای جایگاه های مورد مطالعه به صورت زیر بهینه شد: ۲۵ نانوگرم، DNA ۲۰۰ میکرو مولار هر یک از، ۲۵ dNTP میکرو مولار هر یک از پرایمرها و ۱ واحد آنزیم تک پلی مراز که با غلظت مطلوب بافر PCR و آب دوبار تقطیر به حجم ۱۵ میکرولیتر رسید. دستگاه الکتروفورز مورد استفاده از نوع عمودی دو طرفه مدل (VEV-۷۷۰۴) ساخت شرکت پایا طوس و ابعاد ژل (۱۸×۱۴) سانتی متر بود. فرآورده های اولیه پس از واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ بار شد (۱۲). و در محیط بافری ۰.۵X، TBX با ۲۵۰ ولت برای ۳ ساعت الکتروفورز شدند. ظاهر شدن باندها به روش سریع رنگ آمیزی نیترات نقره انجام شد (۱۴). نمونه ای از یک ژل بدست آمده در شکل ۱ نشان داده شده است. باندخوانی به روش دستی و با مقایسه نشانگر های اندازه VII، XIII شرکت Roche آلمان انجام شد. معیارهای مختلف تنوع درون جمعیتی همچون تعداد آلل واقعی (na)، تعداد آلل موثر (ne)، شاخص شانون (I)، میزان هتروزایگوسیتی (H) و شاخص PIC برای جایگاه های مورد مطالعه مطابق تعاریف (Wier) و (Karp) محاسبه شد (۱۴). تعیین این مقادیر برای هر جایگاه و ترکیب جایگاه- سویه با استفاده از نرم افزارهای

می گیرد. با توجه به اینکه در استان یزد شرایط آب و هوایی برای پرورش دام و طیور سنگین مساعد نیست، پرورش بلدرچین که پرندهای سبک است دارای اهمیت زیادی است و بیشتر از استانهای دیگر مورد توجه قرار گرفته است.

با توجه به رواج استفاده از ریزماهواره و اثبات کارایی آنها در برآورد تنوع ژنتیکی موجود در جوامع (۳، ۶، ۷، ۱۶، ۲۳)، نتایج حاصل از این تحقیق می تواند برآوردی از وضعیت فعلی این جمعیت ارائه دهد. دسترسی به نقشه های ژنومی بدست آمده با استفاده از ریزماهواره ها برای دام و طیور به منظور کشف اساس مولکولی و شناسایی صفات مهم اقتصادی می باشد. تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان یکی از اجزای مهم پروژه های اصلاحی می باشند. امروزه جهت برآورد تنوع ژنتیکی و تعیین فواصل ژنتیکی بین جمعیت ها از تکنیک های پیشرفته مولکولی بر اساس تفاوت های موجود در سطح مولکول DNA استفاده می شود. ریز ماهواره ها یکی از نشانگرهای مولکولی DNA می باشند که برای تهیه نقشه های ژنتیکی و تعیین تنوع ژنتیکی استفاده می شود. در مطالعه ای رجائی (۱۳۸۳) تنوع ژنتیکی را در جمعیت بلدرچین ژاپنی استان آذربایجان مورد بررسی قرار داد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی با استفاده از هشت جفت نشانگر ریز ماهواره ای در چهار سویه بلدرچین ژاپنی شامل Panda، Manchurian Golden، Tuxedo، Pharach تعیین شد. نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از معیارهای مختلف تنوع درون جمعیتی نشان دهنده تنوع نسبتاً بالایی برای اکثر جایگاه های مورد مطالعه می باشد. در میان ۳۲ ترکیب جایگاه-سویه بیشترین و کمترین ارزش PIC و هتروزایگوسیتی به ترتیب مربوط به سویه Panda و Pharach بود. بیشترین فاصله ژنتیکی بین سویه های Panda و Manchurian Golden و کمترین فاصله بین دو سویه Tuxedo و Pharach بود.

علی رغم مطالعات انجام گرفته در مورد بلدرچین تا کنون مطالعه ای به منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی در سطح DNA بر روی جمعیت ایستگاه میبد یزد صورت نگرفته است. هدف از این تحقیق بررسی میزان تنوع درون و بین جمعیتی این پرنده می باشد که با کاهش تنوع ژنتیکی موجب افزایش همخوانی در جمعیت و کاهش پیشرفت ژنتیکی می شود.

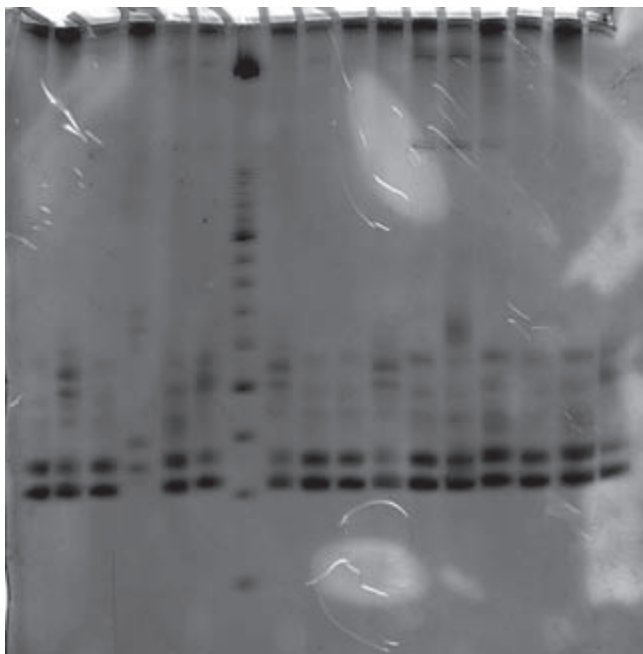
### مواد و روش ها

نمونه برداری به طور تصادفی از جمعیت بلدرچین ژاپنی که شامل چهار سویه

Spanish Pharach (n=۳۶)، Canadian Pharach (n=۵۰)

، Manchurian Golden (n=۳۴) و English White (n=۳۰)

موجود در ایستگاه تحقیقات میبد انجام شد. نمونه های خون از سیاهرگ بال با استفاده از دو نوع لوله خالدار ۵ میلی لیتری حاوی ماده



شکل ۱: نمونه ای از باندهای بدست آمده برای جایگاه GJ۰۰۵۵

جدول ۱ مشخصات جایگاه های مورد مطالعه

| نام جایگاه | توالی آغازگرها        | واحد تکرار شوونده | شماره دسترسی مربوط به جایگاه موجود در بانک ژنی سایت NCBI |
|------------|-----------------------|-------------------|--|
| GUJ۰۰۲۳    | GAGAGGTACAGCAACACTTT  | F                 | AB۰۳۵۸۳۳   |
|            | CGTTTCTTTCTGGAGTGTCT  | R                 |  |
| GUJ۰۰۹۹    | CTCTTATCCATCCTTCCTTC  | F                 | AB۰۶۳۱۶۷   |
|            | TTTTAAGTTTCCCCAGGCAG  | R                 |  |
| GUJ۰۰۵۵    | GCCATACTGCAATATACCTGA | F                 | AB۰۶۳۱۲۳   |
|            | TTGACATACTTGGATTAGAGA | R                 |  |
| GUJ۰۰۸۳    | CCATCTCTGTGCCTTTCCAA  | F                 | AB۰۶۳۱۵۱   |
|            | GCTGAAAAACATTGGGCGTAG | R                 |  |
| GUJ۰۰۵۲    | AAACTACCGATGTAAGTAAG  | F                 | AB۰۶۳۱۲۰   |
|            | ATGAGATATATAAGGAACCC  | R                 |  |
| GUJ۰۰۴۱    | AAAATGTCTGCAAAATGGGC  | F                 | AB۰۳۵۸۵۱   |
|            | TGAAACATACCTGGAGTGCTA | R                 |  |
| GUJ۰۰۵۹    | GACAAAAGTTACAGCTAGGAG | F                 | AB۰۶۳۱۲۷   |
|            | TAGGTGCGAAAAATCTCTGAC | R                 |  |

منبع: کایانک وهمکاران (۲۰۰۲)

بدست آمد (۵).

### نتایج

در کل جمعیت تمامی مکان های ژنی مورد مطالعه از تعادل هاردی-وینبرگ انحراف معنی داری را نشان دادند ( $p < 0.05$ ). تمامی ترکیبات جایگاه-سویه مورد بررسی قرار گرفت به طوری که سویه Canadian Pharach در جایگاه های GUJ۰۰۲۳, GUJ۰۰۹۹, GUJ۰۰۵۲ و سویه Spanish Pharach در جایگاه های GUJ۰۰۵۹, GUJ۰۰۵۵ و GUJ۰۰۲۳, GUJ۰۰۴۱, و سویه Manchurian Golden در جایگاه های GUJ۰۰۹۹, GUJ۰۰۵۲ با آزمون مربع کای در تعادل می باشند. سایر جایگاه ها در سویه های مختلف انحراف معنی داری از تعادل هاردی وینبرگ نشان دادند ( $p < 0.05$ ), ولی با آزمون نسبت درست نمائی سویه Canadian Pharach در جایگاه های GUJ۰۰۵۲ و GUJ۰۰۲۳ و سویه Spanish Pharach در GUJ۰۰۲۳ و سویه

Ott و Yeh (۱۹۹۷) و همکاران (۱۹۹۹) POPGENE انجام شد (۱۵) و (۲۴). نسبت های هاردی-وینبرگ از داده های ژنوتیپی و همچنین فواصل زنتیکی با استفاده از پنج معیار Reynolds, Wright, Rogers, DS, DA با استفاده از نرم افزار POPGENE برآورد گردید (۱۳, ۱۸, ۱۹ و ۲۴). فواصل (DS, DA) برای تغییرات در زمان های طولانی وقتی بدلیل تفرق و جهش مشتق می شوند مناسب نیست به همین جهت Rogers (۱۹۷۲) رابطه ای را ابداع کرد که این نقص را برطرف کند. رابطه Rogers توسط (۱۹۷۸) اصلاح شد. در رابطه مورد نظر فاصله نسبتی از زمان انشقاق در حالت متاثر از مدل با جهش نامحدود و تعادل در جمعیت اجدادی می باشد. دلیل دیگر استفاده از پنج معیار مختلف این می باشد که دو معیار DS و DA بر اساس فراوانی های ژنی و دو معیار Wright, Rogers بر اساس فراوانی های ژنوتیپی می باشند. نهایتاً فیلوژنی ها با استفاده از پنج معیار مذکور و بوسیله نرم افزار TFPGA

به جمعیت های (۵۷۱۴/۳) English white، و جمعیت های Canadian Pharach و Spanish Pharach بود. کمترین تعداد آلل موثر در جایگاه GJ۰۰۸۳ و سویه English white و بیشترین مربوط به جایگاه GJ۰۰۲۳ و سویه Spanish Pharach می باشد. از آنجایی که حد نهایی هتروزیگوسیتی برای هر تعداد آلل ها یکسان (برابر یک) می باشد معیارهای هتروزیگوسیتی حساسیت زیادی به افزایش تنوع ندارند. این محدودیت تفکیک بین جمعیت ها را با استفاده از جایگاه های بسیار متغیر همچون ریز ماهواره دشوار می سازد و تفاوت های میان آنها اطلاعات دقیقی را بیان نمی کند. لذا محاسبه شاخص اطلاعاتی شانون برای غلبه بر این نقص می تواند مفید باشد. شاخص شانون (I) و میزان چند شکلی (PIC) به عنوان دو معیار دیگر برای تعیین چند شکلی ترکیبات مختلف جایگاه-سویه و هر سویه به ازای تمامی جایگاه ها محاسبه شد. با وجود آنکه تفسیر بیولوژیکی شاخص شانون مشخص نیست چون حداکثر مقدار I برابر  $\ln(n)$  می باشد. ممکن است برای اندازه گیری تنوع جایگاه ها بسیار چند شکل مانند ریز ماهواره مفید باشد. کمترین مقدار شاخص شانون (I) در بین ۲۸ ترکیب جایگاه-سویه مربوط به جایگاه GJ۰۰۸۳ در سویه English white که با توجه به تعداد کم آلل در این جایگاه منطقی به نظر می رسد (۳ آلل). بیشترین مقدار آن مربوط به جایگاه GJ۰۰۲۳ سویه Manchurian Golden می باشد. مقدار عددی بالای I نشان از چند شکلی فراوان جایگاه ها و همچنین تفاوت اندک تعداد نوع آلل در آنها (یعنی ۵-۳ نوع آلل) دارد. مقایسه ارزش های PIC در سطح سویه ها به ازای تمامی جایگاه ها می تواند میزان چند شکلی را در داخل هر سویه در مقایسه با سایر سویه ها نشان دهد. چنین مقایسه ای نشان می دهد که کمترین میزان چند شکلی در سویه English white جایگاه (۰/۴۴۱۵) GJ۰۰۸۳ و بیشترین مقدار در سویه Spanish Pharach جایگاه GJ۰۰۲۳ (۰/۶۹۶۴) می باشد (جدول ۴). در مطالعه ای رجائی (۱۳۸۳) تنوع ژنتیکی را در جمعیت بلدرچین ژاپنی استان آذربایجان مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه تنوع ژنتیکی با استفاده از هشت جفت نشانگر ریز ماهواره ای در چهار سویه بلدرچین ژاپنی شامل Pharach و Manchurian Golden، Panda تعیین شد. نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از معیارهای

Manchurian Golden در جایگاه های GJ۰۰۵۲، GJ۰۰۹۹، در تعادل در حالی که سایر جایگاه ها انحراف معنی داری از تعادل هاردی-وینبرگ نشان دادند. کمترین فاصله ژنتیکی با معیار DS میان سویه ها Canadian Pharach و English white ( $DS=0/7992$ ) و بیشترین فاصله میان سویه های Canadian Pharach و Spanish Pharach  $D_S=0/946$  و بر اساس معیار  $D_A$  کمترین فاصله ژنتیکی بین سویه های Pharach Canadian و Spanish Pharach  $D_A=0/555$  و بیشترین فاصله میان سویه های Pharach Canadian و English white  $D_A=0/2242$  می باشد. بر اساس معیارهای Wright و Rogers، کمترین فاصله میان سویه های Pharach Canadian و Spanish Pharach ( $Wright=0/168$  و  $Rogers=0/1508$ ) و بیشترین فاصله میان سویه های Pharach Canadian و English white ( $Wright=0/2799$ ) و Rogers ( $Wright=0/2907$ ) می باشد.

همچنین فاصله همسنجی بین سویه ها محاسبه شد که کمترین فاصله میان سویه های Pharach Canadian و Spanish Pharach (۰/۰۲۶) و بیشترین فاصله میان سویه های Pharach Canadian و English white (۰/۱۰۵۳) می باشد (جدول ۲)، که این نتایج با نتایج حاصل از ماتریس فواصل ژنتیکی با استفاده از معیار Rogers و Wright مطابقت دارد. فیلوژنی های حاصل از پنج معیار Wright، Rogers، DS، DA و Reynolds به روش جفت گیری غیر وزنی از طریق میانگین حسابی UPGMA ترسیم گردید درختان فیلوژنیک حاصله از دو خوشه مجزا تشکیل شده اند بطوری که در خوشه پائینی سویه English white و در خوشه بالای دیگر سویه ها قرار دارند. به علت همبستگی زیاد پنج معیار مذکور و موضع شناسی یکسان در همه آنها درختان حاصل شبیه هم هستند. میانگین هتروزیگوسیتی (Ho, He) برای هر جایگاه در هر سویه محاسبه شد. کمترین و بیشترین مقدار برای He به ترتیب مربوط به سویه English white (۰/۶۰۵۵) و سویه Spanish Pharach (۰/۶۹۶۴) و برای Ho کمترین مقدار در سویه Manchurian Golden (۰/۸۶۲۸) و بیشترین در سویه English white (۰/۹۵۶۸) می باشد (جدول ۳). مطابق نتایج در سطح سویه های مورد مطالعه با توجه به تمامی جایگاه ها با هم، کمترین و بیشترین تعداد آلل واقعی به ترتیب مربوط

جدول ۲ ماتریس فواصل همسنجی بین سویه های مورد مطالعه

|                   | Canadian Pharach | Spanish Pharach | Manchurian Golden | English white |
|-------------------|------------------|-----------------|-------------------|---------------|
| Pharach Canadian  | ***              |                 |                   |               |
| Spanish Pharach   | ۰/۰۲۶            | ***             |                   |               |
| Manchurian Golden | ۰/۰۵۰۹           | ۰/۰۳۱۴          | ***               |               |
| English white     | ۰/۱۰۵۳           | ۰/۰۸۲۴          | ۰/۰۶۶۶            | ***           |

جدول ۳ هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He) برای ترکیبات مختلف جایگاه- سویه

| جمعیت<br>جایگاه | Canadian<br>Pharach |        | Spanish Pharach |        | Manchurian Golden |        | English White |        |
|-----------------|---------------------|--------|-----------------|--------|-------------------|--------|---------------|--------|
|                 | Ho                  | He     | Ho              | He     | Ho                | He     | Ho            | He     |
| GUJ۰۰۲۳         | ۰/۸۵۱۹              | ۰/۶۹۸۹ | ۰/۶۸۱۸          | ۰/۷۴۳۸ | ۰/۹۰۰۰            | ۰/۷۴۰۶ | ۱/۰۰۰۰        | ۰/۵۵۱۹ |
| GUJ۰۰۸۳         | ۱/۰۰۰۰              | ۰/۶۴۴۷ | ۱/۰۰۰۰          | ۰/۶۲۳۸ | ۱/۰۰۰۰            | ۰/۶۳۷۸ | ۱/۰۰۰۰        | ۰/۵۴۵۰ |
| GUJ۰۰۵۵         | ۰/۹۵۲۴              | ۰/۵۷۶۲ | ۱/۰۰۰۰          | ۰/۷۱۱۲ | ۱/۰۰۰۰            | ۰/۶۴۷۲ | ۰/۹۵۰۰        | ۰/۵۸۸۷ |
| GUJ۰۰۹۹         | ۰/۷۰۵۹              | ۰/۶۰۰۸ | ۰/۸۱۴۸          | ۰/۶۶۳۹ | ۰/۵۳۳۲            | ۰/۶۰۵۰ | ۰/۹۴۷۴        | ۰/۶۴۴۰ |
| GUJ۰۰۴۱         | ۰/۹۷۶۲              | ۰/۹۲۹۳ | ۰/۸۶۶۷          | ۰/۷۰۲۲ | ۰/۸۰۰۰            | ۰/۶۹۵۲ | ۰/۹۵۰۰        | ۰/۶۱۵۰ |
| GUJ۰۰۵۹         | ۰/۹۲۶۸              | ۰/۶۶۴۸ | ۰/۹۲۳۱          | ۰/۷۱۰۸ | ۰/۹۶۷۷            | ۰/۷۳۶۷ | ۰/۹۰۰۰        | ۰/۶۸۵۰ |
| GUJ۰۰۵۲         | ۰/۹۰۲۴              | ۰/۶۸۶۲ | ۱/۰۰۰۰          | ۰/۷۱۹۰ | ۰/۸۳۸۷            | ۰/۷۰۴۰ | ۰/۹۵۰۰        | ۰/۶۰۸۸ |
| میانگین         | ۰/۹۰۲۲              | ۰/۶۴۳۰ | ۰/۸۹۸۱          | ۰/۶۹۶۴ | ۰/۸۶۲۸            | ۰/۶۸۰۹ | ۰/۹۵۶۸        | ۰/۶۰۵۵ |
| انحراف معیار    | ۰/۰۹۹۴              | ۰/۰۴۴۵ | ۰/۱۲۰۱          | ۰/۰۳۹۹ | ۰/۱۶۴۹            | ۰/۰۵۱۹ | ۰/۳۴۴۶        | ۰/۰۴۹۵ |

جدول ۴ مقادیر محتوای چند شکلی (PIC) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) برای ترکیبات مختلف جایگاه- سویه

| جمعیت جایگاه | Canadian Pharach |        | Spanish Pharach |        | Manchurian Golden |        | English white |        |
|--------------|------------------|--------|-----------------|--------|-------------------|--------|---------------|--------|
|              | PIC              | I      | PIC             | I      | PIC               | I      | PIC           | I      |
| GUJ۰۰۲۳      | ۰/۶۴۷۱           | ۱/۲۸۴۷ | ۰/۶۹۶۴          | ۱/۳۷۴۵ | ۰/۶۲۵۸            | ۱/۴۶۱۲ | ۰/۴۵۱۵        | ۰/۸۷۴۳ |
| GUJ۰۰۸۳      | ۰/۵۶۸۶           | ۱/۰۶۳۰ | ۰/۵۵۳۱          | ۱/۰۳۷۴ | ۰/۵۶۵۰            | ۱/۰۵۶۴ | ۰/۴۴۱۵        | ۰/۸۵۵۷ |
| GUJ۰۰۵۵      | ۰/۴۸۵۷           | ۱/۰۰۱۲ | ۰/۶۵۹۲          | ۱/۳۶۲۲ | ۰/۵۸۳۴            | ۱/۲۲۳۰ | ۰/۵۰۳۲        | ۱/۰۱۶۸ |
| GUJ۰۰۹۹      | ۰/۵۱۸۶           | ۰/۹۸۶۱ | ۰/۵۸۹۸          | ۱/۰۹۴۵ | ۰/۵۲۷۰            | ۰/۹۹۸۶ | ۰/۵۶۷۹        | ۱/۰۶۱۹ |
| GUJ۰۰۴۱      | ۰/۵۵۹۶           | ۱/۱۱۹۴ | ۰/۶۵۳۳          | ۱/۲۹۹۲ | ۰/۶۳۸۴            | ۱/۲۶۲۹ | ۰/۵۴۴۴        | ۱/۰۹۴۱ |
| GUJ۰۰۵۹      | ۰/۶۰۲۲           | ۱/۲۴۰۹ | ۰/۶۶۴۶          | ۱/۳۷۸۰ | ۰/۶۹۵۳            | ۱/۴۵۲۳ | ۰/۶۲۷۰        | ۱/۲۴۸۸ |
| GUJ۰۰۵۲      | ۰/۶۲۷۷           | ۱/۲۸۳۵ | ۰/۶۷۰۱          | ۱/۳۹۰۷ | ۰/۶۶۱۴            | ۱/۳۸۲۱ | ۰/۵۲۹۳        | ۱/۰۶۷۰ |
| میانگین      | ۰/۵۷۲۷           | ۱/۱۳۹۸ | ۰/۶۴۰۹          | ۱/۲۷۶۷ | ۰/۶۱۵۱            | ۱/۲۶۲۳ | ۰/۵۲۳۵        | ۱/۰۳۱۲ |
| انحراف معیار | -                | ۰/۱۲۹۸ | -               | ۰/۱۴۷۸ | -                 | ۰/۱۸۴۲ | -             | ۰/۱۳۴۹ |

بلدرچین ایستگاه میبید یزد را مطالعه کردیم. این نتایج در ساخت و طراحی نشانگرهای اصلی و مهم بلدرچین برای تهیه نقشه ژنتیکی این پرنده مهم اقتصادی کمک می‌کند. از بین هفت جایگاه مورد مطالعه تنها جایگاه GUJ۰۰۵۲ با دمای پیشنه‌دای ۵۵ درجه Kayang و همکاران هیچ گونه بانندی نداد بنابراین با بهینه سازی شرایط واکنش و انجام گرادیان حرارتی با دمای اتصال ۴۸/۹ درجه باند تشکیل شد. مهم ترین دلیل عدم برقراری تعادل هاردی- وینبرگ در جایگاه های مورد مطالعه اعمال انتخاب در جمعیت بلدرچین ژاپنی می‌باشد (۷). از علل دیگر عدم تعادل کوچک بودن اندازه جمعیت، مهاجرت و نرخ بالای جهش در ریز

مختلف تنوع درون جمعیتی نشان دهنده تنوع نسبتاً بالایی برای اکثر جایگاه های مورد مطالعه می باشد. در میان ۳۲ ترکیب جایگاه- سویه بیشترین و کمترین ارزش PIC و هتروزایگوسیتی به ترتیب مربوط به سویه Pharach و Panda بود. بیشترین فاصله ژنتیکی بین سویه های Panda و Manchurian Golden و کمترین فاصله بین دو سویه Tuxedo و Pharach بود.

### بحث و نتیجه گیری

با استفاده از ۸ نشانگر SSR جدید برای اولین بار خزانه ژنی جمعیت

## 1- Disodium Ethylen Diamine Tetra Acetate

ماهواره ها می باشد (۸).

## منابع مورد استفاده

- ۱ - بناء بازی، م. ح. (۱۳۸۱) بررسی تنوع ژنتیکی در درون و بین پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ۱۳۰ص.
- 2- Bruce, S and B. S. Weir. (1996) *Genetic Data Analysis*. Edition 2. Copyright by sinauer Associates, Inc. pp. 445.
- 3- Crooijmans R.P.M.A., Dijkhof R.J.M., van der Poel J.J., Groenen M.A.M. (1997) New microsatellite markers in chicken optimized for automated fluorescent genotyping, *Anim. Genet.* 28: 427-437.
- 4- Goldestein, D. B and C. Schlotterer. (2000) *Microsatellites: Evolution and Application*. Oxford University Press.
- 5- Hedrick, P.W. (1999) *Genetic of Population*. Second edition. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury. MA. USA.
- 6- Inoue-Murayama M., Kayang B.B., Kimura K., Ide H., Nomura A., Takahashi H., et al. (2001) Chicken microsatellite primers are not efficient markers for Japanese quail, *Anim. Genet.* 32: 7-11.
- 7- Karp, A., P. G. Isaac and D. S. Ingram. (1998) *Molecular tools for Screening Biodiversity: Plant and Animal*, Chapman Hall, London. pp:428.
- 8- Kayang, B. B., Inoue-Murayama, M., Hoshi, T., Matsuo, K., Takahashi, H., Minezawa, M., et al (2002) Microsatellite loci in Japanese quail and cross-species amplification in chicken and guinea fowl. *Genetics Selection Evolution*, 34:233-253.
- 9- Kwok C., Korn R.M., Davis M.E., Burt D.W., Critcher R., McCarthy L., et al (1998) Characterization of whole genome radiation hybrid mapping resources for non-mammalian vertebrates, *Nucleic Acids Res.* 26: 3562-3566.
- 10- Miller, M. P. (1997) TFGA Version 1.3. A *Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data*. Department of Biological Science. Northern Arizona University. pp. 30.
- 11- Mongin P., Plouzeau M. (1984) *Guinea fowl, in: Mason I.L. (Ed.), Evolution of Domesticated Animals*, Longman, London, pp. 322-325.
- 12- Moore, S. S., L. L. Sargeant, T. J. King, J. S. Mattick, M. Georges and D. J. S. Hatzel. (1991) *The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allow the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species*. *Genomics*, 10: 654-660.
- 13- Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106:283-292.
- 14- Nei, M. (1978) Estimation of overage heterozygosity and

نتایج بدست آمده از برآورد معیارهای تنوع درون جمعیتی همچون هتروزایگوسیتی و شاخص شانون نشان دهنده تنوع بالای تمامی جایگاهها در جمعیت است. مقدار عددی بالای I نشان از چند شکلی فراوان جایگاه ها وهمچنین تفاوت اندک تعداد نوع آلل در آنها (یعنی ۵-۳ نوع آلل) دارد. نتایج این تحقیق حاکی از این است که علی رغم اعمال اصلاح انتخابی هنوز هتروزایگوسیتی در چهار جمعیت بالاست که این خود دلیلی بر کم بودن همخونی در جمعیت می باشد. مقادیر عددی بسیار بالای (Ho, He) حاکی از تنوع بسیار زیاد جایگاه های ریز ماهواره می باشد و تفاوت کم بین مقادیر حداقل و حداکثر ناشی از این است که سطح تغییر پذیری جایگاه های مورد مطالعه در این چهار سویه تفاوت چندانی ندارد (جدول ۷). فواصل ژنتیکی بدست آمده با استفاده از معیارهای گوناگون که کمترین بین دوسویه SpanishPharach و CanadianPharach می باشد که احتمال هم منشا بودن دو سویه وجود دارد. و فاصله زیاد بین دو جمعیت Canadian Pharach و English White را می توان به ورود سویه های دیگری مشتق از نژادهای مرتبط با این سویه ها نسبت داد. و به علت همبستگی زیاد پنج معیار گوناگون و موضع شناسی یکسان در همه آنها درختان فیلوژنیک حاصل شبیه هم هستند.

تعداد متوسط آلل های مشاهده شده در این جمعیت برابر ۳/۶ با دامنه ای از ۳ تا ۵ بود. این مشابه با نتایج Crooijmans و همکاران (۳) و Takahashi و همکاران (۲۳) که مطالعات آنها بر روی مرغ انجام شده بود و Kayang و همکاران (۸) که روی بلدرچین مطالعه کرده اند می باشد. بر اساس ارزش های PIC، چون تمامی مارکرهای مورد مطالعه در جمعیت بلدرچین ما چند شکلی بالایی نشان دادند، بنابراین نتیجه می گیریم که این مارکرها در رسم نقشه ژنوم بلدرچین استفاده وسیعی دارند. اگر بخواهیم نقشه های ژنتیکی مقایسه ای برای خانواده Phasianidae، که شامل تعدادی از گونه های مهم طیور هستند را رسم کنیم مارکرهای بکار رفته در این تحقیق بسیار مفید هستند چون هم در مرغ (۳، ۲۳) و هم در بلدرچین (۸) و این مطالعه) چند شکلی بالایی نشان داده اند. بر اساس نتایج بدست آمده و تحقیقات دیگر (۳، ۶، ۱۱، ۲۱ و ۲۲)، ما توصیه می کنیم که به جای تلاش برای سازگار و آداپته کردن نشانگرهای یافت شده در گونه های دیگر برای مطالعه Guinea fowl بهتر است که نشانگرهای میکروساتلایت اصلی برای تعیین نقشه Guinea fowl کشف و جداسازی شوند. ما مارکرهای ریز ماهواره ای را در بلدرچین استفاده و توصیف کردیم که در تشکیل یک منبع مفید از مارکرهای DNA برای آغاز و توسعه نقشه ژنتیکی بلدرچین مهم هستند و نقش مهمی را بازی می کنند. بعلاوه، این مارکرها می توانند بعنوان ابزاری در مطالعات فیلوژنتیکی آینده استفاده شوند و در بهبود درک ما از روابط خویشاوندی بلدرچین و مرغ کمک کنند. توسعه نقشه های ژنومی مقایسه ای در طیور به ابزارهایی از قبیل آنالیز کلون های (۲۱) DNA و تعیین نقشه های هیبرید رادیواکتیو (۹) نیاز دارد که نتایج ما نیز در رسیدن آسانتر به ابزارهای یادشده شرکت و کمک می کنند.

## پاورقی

genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89:589-590.

15- Ott, J. (1989) *Program HET Version 1.10. Utility programs for analysis of genetic linkage*. Rockefeller University. New York. NY. USA. PP. 20.

16- Pang S.W.Y., Ritland C., Carlson J.E., Cheng K.M. (1999) Japanese quail microsatellite loci amplified with chicken-specific primers, *Anim. Genet.* 30: 195-199.

17- Promega, C. (1993) *DNA Sliver Staining System Product DQ7050 Madison*. WI. USA. pp:12.

18- Reynolds, j., B. S. Weir and C. C. Cockerham. (1983) Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105: 767-779.

19- Rogers, J. S. (1972) *Measure of genetic similarity and genetic distance*. P. 145-154 in "Studies in Genetic VII". University of Texas Publication no. 7213, Austin.

20- Sanguitti, C. J., E. D. Neto and A. J. G. Simpson. (1994)

*RAPD Silver staining and recovery of PCR Product separated on polyacrylamide gels.*

21- Smith E., Shi L., Drummond P., Rodriguez L., Hamilton R., Powell E., Nahashon et al. (2000) Development and characterization of expressed sequence tags for the turkey (*Meleagris gallopavo*) genome and comparative sequence analysis with other birds, *Anim. Genet.* 31: 62-67.

22- Stock A.D., Bunch T.D. (1982) The evolutionary implications of chromosome banding pattern homologies in the bird order Galliformes, *Cytogenet. Cell Genet.* 34: 136-148.

23- Takahashi H., Nirasawa K., Nagamine Y., Tsudzuki M., Yamamoto Y. (1998) Genetic relationships among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms, *J. Hered.* 89: 543-546.

24- Yeh, F. C., R. Yang and T. Boyle. (1999) *POPGENE Version 1.31. Microsoft windows based Freeware for Population Genetic Analysis*. University of Alberta. Edmonton. AB. Canada. pp. 26

