

بررسی تنوع ژنتیکی شترهای دوکوهانه ایران

سعید شاه کرمی^۱، فضل‌ا. افراز^۲، سید ضیال‌الدین میرحسینی^{۳*}، محمد حسین بنابازی^۴، نادر اسدزاده^۵، نعمت‌ا. اسدی^۶، بهزاد همتی^۷، ابذر قنبری^۸، کمال رضوی^۹

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،

۲-، ۴، ۵، ۶- به ترتیب استادیار، مریبان، کارشناس ارشد و کارشناس پژوهش

موسسه تحقیقات علوم دامی کرج

۳- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه گیلان

۸- کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mirhosin@guiilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۱/۳/۸۹ - تاریخ پذیرش: ۲۲/۳/۹۱)

چکیده

نزادهای دام و طیور بومی در هر کشور به عنوان سرمایه ملی و محصول کلیدی مطرح هستند و حفظ و تکثیر این نزادهای از ارزش و اهمیت زیادی برخوردار است. جمعیت شترهای دوکوهانه (*Camelus bactrianus*) کشور به عنوان یکی از نزادهای با ارزش دامی در دهه‌های اخیر به شدت کاهش یافته، در حالیکه هیچگونه اطلاعاتی در مورد تنوع ژنتیک این دام وجود ندارد. در این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیک جمعیت مذکور، ۱۱۰ نفر شتر دوکوهانه با استفاده از هفت جفت آغازگر ریزماهواره‌ای (YWLL08، VOLP03، VOLP67، LCA77، LCA63، LCA33) و LCA56 استخراج نمکی تغییر یافته بهینه شده انجام شد. واکنش‌های PCR با تمام نشانگرهای بخوبی انجام شد. تمامی جایگاه‌ها در جمعیت مذکور، بجز جایگاه LCA77 که یکشکل بود، از چندشکلی مناسب برخوردار بودند. در کل جمعیت تمامی مکان‌های ژنی مورد مطالعه از تعادل هاردی- واینرگ انحراف معنی‌داری نشان دادند ($P < 0.001$). تنوع ژنتیک، با معیارهای میانگین آلل‌های موثر، هتروزاگوستی مشاهده شده و مورد انتظار و محتواهای اطلاعات چند شکلی (PIC) بیان شد که به ترتیب، 0.534 ± 0.0534 ، 0.184 ± 0.0714 ، 0.114 ± 0.0489 و 0.237 ± 0.0557 براورد شدند. بیشترین (۰/۰۷۷۱) و کمترین (۰/۰۱۶۵) میزان هتروزاگوستی و بیشترین (۰/۰۷۴۲) و کمترین (۰/۰۱۵۱) ارزش PIC درین جایگاه‌های چندشکل به ترتیب مربوط به جایگاه‌های VOLP67 و LCA33 بود. نتایج نشان داد که جایگاه‌های مورد مطالعه از چندشکلی مناسبی در جمعیت موردنظر برخوردار هستند و علاوه بر این تنوع ژنی در شتر دوکوهانه ایران نشان می‌دهد علیرغم اندازه بسیار کم جمعیت، این گونه همچنان از تنوع ژنتیک قابل قبولی برخوردار است، که می‌تواند به حفظ آن کمک شایانی نماید. با این وجود، برای تعیین دقیق تر ساختار ژنتیکی این جمعیت لازم است تعداد بیشتری از جایگاه‌های ریزماهواره بررسی شوند.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،
شتر دوکوهانه،
نشانگرهای ریزماهواره،
.DNA
.GenAlEx 6.3

مقدمه

با توجه به اینکه شفافسازی تنوع ژنتیک ارتباط مستقیم با استفاده پایدار از منابع ژنتیک حیوانات دارد، نیاز به اطلاعات وسیع مولکولی تنوع ژنتیکی داخل و بین نژاد برای مدیریت موثر منابع (Stevens 1989; Sanguinetti et al. 1994; Hall and Bradley 1995; Barker JSF 1999; Bruford et al. 2003; Nolte et al. 2005; Toro and Caballero 2005; Toro et al. 2009) ژنتیکی دام و طیور مورد پذیرش اکثر پژوهشگران است (Toro 2009). خانواده شتر شامل ۴ گونه اهلی است که به ۳ جنس تعلق دارد. یکی از این گونه‌ها شتر دوکوهانه (*Camelus bactrianus*) می‌باشد که زوج سم بوده و دو کوهان در پشت دارد و به دو حالت اهلی و وحشی (*Camelus bactrianus ferus*) زیست می‌نماید. نوع اهلی این گونه بومی در مناطق استپی کشورهای آسیای مرکزی یعنی افغانستان، هند، قرقیزستان، پاکستان پراکنده می‌باشد بطوريکه در بعضی از مناطق این کشورها با شترهای تک کوهانه به صورت مشترک وجود دارد. علاوه براین در قسمت‌های جنوب روسیه، بخش‌های غربی چین و مغولستان نیز پراکنده است (Jianlin 2000).

بطور کلی تحقیقات نشانگرهای مولکولی در خانواده انتتران مخصوصاً در جنس کاملوس و بطور خاص در گونه دو کوهانه بسیار اندک است لذا توسعه نشانگرهای ریزماهواره در شتر مورد بررسی قرار گرفته است (Jianlin 2005). در این گزارش امکان استفاده مشترک از بسیاری از نشانگرهای ریزماهواره در کلیه شترهای جهان قدیم و جدید، شترهای وحشی و تک کوهانه و دوکوهانه از جنبه‌های تکاملی و تعیین استراتژی‌های لازم جهت حفاظت از گونه‌های در حال انقراض مورد تایید قرار گرفته است. کار گروه ISAG/FAO در فهرست نشانگرهای مولکولی اخیر خود، بیست و پنج نشانگر ریزماهواره را برای بررسی مولکولی شترهای جهان قدیم و جدید پیشنهاد نموده است (Lewontin et al. 2004; Hoffmann et al. 1974). این نشانگرها تاکنون فقط در بررسی‌های منطقه‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

به منظور بررسی رابطه تکاملی بین شترهای وحشی باقیمانده در چین و مغولستان و شترهای دوکوهانه اهلی و همچنین شناسایی منشا این شترها توالی ژن *cytb* میتوکندریایی توسط Ji et al. (2009) تعیین شد. نتایج نشان داد این شترهای وحشی باقیمانده گروهی مستقلی از شترهای اهلی بوده نمی‌توانند اجداد

اهلی سازی حیوانات از گام‌های اساسی در توسعه جمعیتی و فرهنگی بشر بود که به همراه اهلی شدن گونه‌های مختلف گیاهی بنیان کشاورزی امروزه گذاشته شد (Diamond 2002). در طول تاریخ فشارهای اصلی تکاملی یعنی جهش، انتخاب روش‌های پرورش، سازش‌پذیری، جدا شدن و رانش ژنتیکی موجب پیدایش تنوع بسیار شدید در بین جمیعت‌های محلی دام و طیور شده است. این فرآیند در طی قرون گذشته، تشکیل نژادهای شناخته شده با سطوح عملکردی مختلف را که کاربردهای گوناگون داشتنند موجب شده است. در طول بهبود ژنتیکی دهه‌های گذشته، پیشرفت و تمرکز زیاد روی برنامه‌های موثرتر انتخاب، موجب شتاب پخشیدن در تعدادی از نژادها شد. تلقیح مصنوعی و انتقال جنین پخش مواد ژنتیکی را تسهیل نمود. علاوه براین پیشرفت در تکنولوژی تغذیه دام و طیور موجبات تغذیه بهیته را فراهم آورد. همچنین پیشرفت در سیستم‌های حمل و نقل و مکانیزه شدن آن نه تنها منجر به یکنواختی و کنترل جدی محیط‌های پرورشی شد بلکه توجه به دام‌های مورد استفاده در سیستم حمل و نقل یعنی اسب و شتر و... به شدت کاهش یافت. نتیجه همه این پیشرفت‌ها در جنبه‌های گوناگون، جایگزینی نژادهای پر تولید به جای نژادهای بومی و حذف تقریباً کامل دام از سیستم حمل و نقل در سراسر جهان بود. این پیشرفت‌ها نگرانی‌های روزافزونی را در خصوص فرسایش منابع ژنتیکی پدید آورده است (FAO 2007).

با توجه به اینکه احتمال استفاده از تنوع ژنتیکی نژادهای کم تولید در برنامه‌های اصلاح نژادی حال و آینده وجود دارد (Bruford et al. 2003; Stevens 1989) لذا حفاظت از آنها مخصوصاً برای استفاده در برنامه‌های اصلاح نژادی آینده ضرورت دارد. بر اساس گزارش‌های FAO، ۲۰ درصد از کل ۷۶۰۰ نژاد گزارش شده در جهان که به ۱۸ گونه از پستانداران و ۱۶ گونه از پرنده‌گان تعلق دارند در معرض خطر هستند و ۶۲ نژاد در طول ۶ سال اول این قرن منقرض شده‌اند (FAO 2007).

مدیریت موثر منابع ژنتیکی دام و طیور مستلزم داشتن اطلاعات جامع در خصوص ویژگی‌های نژادی، شامل اطلاعات مربوط به اندازه و ساختار جمیعت، پراکنش جغرافیایی، محیط پرورش و تنوع ژنتیکی بین و داخل نژادها است.

ای در بدست آوردن عناصر مورد نیاز برای حمایت از برنامه‌های حفاظت نژادی دارد، برای بهبود برنامه‌های اصلاح نژادی نیز نقش مشابه را ایفا می‌نماید. همانطور که پیشتر اشاره شد تحقیق در خصوص تنوع ژنتیک دام می‌تواند با نشانگرهای بسیار چندشکل همانند ریزماهواره با دو ویژگی همبارز بودن و طبیعت پرآلی انجام بگیرد. این تحقیق به منظور تعیین ساختار و تنوع ژنتیکی شترهای دوکوهانه ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره اجرا شد.

مواد و روش‌ها

دام، خون‌گیری و استخراج DNA در مطالعه حاضر، از سیاه‌رگ و داج ۱۱۰ نفر از شترهای دوکوهانه شترداران نقاط مختلف استان اردبیل (دشت مغان) و ایستگاه‌های جعفرآباد و جهادآباد با استفاده از لوله خلا دار ۵ میلی لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA خون‌گیری شد. نمونه‌های خون کامل در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور منتقل و در فاصله زمانی کوتاه تا استخراج DNA (چند روز تا دو هفته)، نمونه‌ها در ۴°C نگهداری شدند. استخراج DNA به روش بهینه شده و تغییر یافته استخراج نمکی (Miller et al. 1988) انجام شد. البته با توجه به مشکلاتی که در روش اصلی استخراج نمکی وجود داشت، تغییراتی در آن داده شد. این تغییرات شامل استفاده از: یک بافر جدا کننده برای رسوب دادن گلوبولهای سفید بجای جداسازی لایه نازک حاوی گلوبولهای سفید، که کاری بسیار دشوار و ظریف می‌باشد؛ کلروفرم به منظور جلوگیری از مخلوط شدن فاز حاوی DNA با رسوبات تشکیل شده به هنگام جداسازی فازها و حذف هر گونه آلودگی از قبیل پروتئین و نمک‌های اضافی؛ محلول استاتس سدیم جهت متراکم تر نمودن کلاف DNA در مرحله جمع‌آوری رشته‌های DNA به کمک میله شیشه‌ای بودند. استخراج شده با دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین کمیت شده و برخی از نمونه‌ها جهت تعیین کیفیت، بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند.

مستقیم دوکوهانه‌های اهلی باشند. علاوه براین شترهای دوکوهانه تک اجدادی هستند و از یک جمعیت وحشی بوجود آمده‌اند.

در تحقیقی که ۱۹ نشانگر ریزماهواره در شترهای جهان قدیم و جدید مورد استفاده قرار گرفت، کمترین و بیشترین تعداد آلل، میزان هتروزاگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده برای نشانگرهای بررسی شده در شترهای دوکوهانه قدیم به ترتیب (۱۴ و ۱۴)، (صفر و ۰/۸۷) و (صفر و ۰/۹۰) بود (Jianlin et al. 2000). با بررسی ۱۲ نشانگر ریزماهواره در ۱۴۰ نفر شتر مربوط به ۴ جمعیت چین و ۲ جمعیت مغولستان ۸۰ آلل مختلف مشاهده شد که تعداد آلل هر لوکوس بین ۳-۱۴ متغیر بود. متوسط هتروزاگوسیتی مشاهده شده در چهار جمعیت چینی به ترتیب پارامتر در دو جمعیت مغولستان به ترتیب ۰/۴۵۳ و ۰/۵۲۱ نشان داده شد. علاوه براین نتایج نشان داد شترهای اهلی دوکوهانه چین و مغولستان از نقطه نظر برنامه‌های حفاظتی و اصلاح نژادی باید دو جمعیت کاملاً مجزا و جداگانه در نظر گرفته شوند (Jianlin et al. 2004).

شتر دوکوهانه ایران با توجه به جثه بسیار درشت و گوشواری و تولید نتاج مطلوب از نظر تولید گوشت و بعضی صفات تولیدی دیگر در آمیخته‌گری با شترهای ماده تک‌کوهانه و یگانه وسیله حمل و نقل در کوچ عشاير از دشت مغان تا دامنه‌های سبلان، نقشی اساسی در زندگی این عشاير داشت و خاص این منطقه محسوب می‌شد. از اینرو مورد توجه و اقبال بود و از جمعیت مطلوب برخوردار بود. امروزه با ورود وسائل نقلیه موتوری در زندگی عشاير منطقه جمعیت آن به شدت کاهش یافت بطوریکه کل جمعت حدود ۱۳۰ نفر تخمین زده می‌شود.

شناسایی خصوصیات فنوتیپی و ژنتیکی بخشی از برنامه‌های حفاظت است. در همین راستا تخمین تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی برای مدیریت منابع ژنتیکی برای استفاده پایدار و حفاظت از آنها مهم می‌باشد. این موضوع وقتی که گونه‌های دام و طیور، مثل شتر در دهه‌های گذشته به شدت رو به کاهش نهادند، از اهمیت بیشتری برخوردار می‌شود.

شناسایی ویژگی‌های نژادی اولین اقدام در هر برنامه حفاظتی می‌باشد. ارزیابی ساختار ژنتیک جمعیتی علاوه بر اینکه سهم عمدۀ-

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ریز ماهواره مورد استفاده در آزمایش

| شماره دسترسی* | اندازه(جفت باز) | توالی | آغازگر |
|---------------|-----------------|---|--------|
| AF305228 | ۱۴۸-۱۶۸ | AGACGGTTGGGAAGGTGGTA CGACAGCAAGGCACAGGA | VOLP03 |
| AF305237 | ۱۵۷-۱۸۵ | TTAGAGGGTCTATCCAGTTTC TGGACCTAAAAGAGTGGAG | VOLP67 |
| non | ۱۳۲-۱۵۸ | ATCAAGTTGAGGTGCTTCC CCATGGCATTGTGTTGAAGAC | YWLL08 |
| AF060103 | ۱۳۶-۱۶۴ | GAGCACAGGGAAGGATATTCA ACAGCAAAGTGATTCCATAATACA | LCA33 |
| AF091122 | ۱۳۴-۱۳۸ | ATGGTGTTCACAGGGCGTTG GCATTACTGAAAAGCCCAGG | LCA56 |
| AF091123 | ۱۹۶-۲۲۰ | TTACCCAGTCCTCGTGGG GGAACCTCGTGGTTATGGAA | LCA63 |
| AF091129 | ۲۳۳-۲۶۳ | TGTTGACTAGAGCCTTTCTTCTTT GGGCAAGAGAGACTGACTGG | LCA77 |

*کُد دسترسی، به ریزمهاروهای در بانک زن NCBI با آدرس اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/viewer.cgi> میباشد

سازی بر این اساس انجام شد. دمای ذوب بطور معمول از طریق
فرمایش از نزدیکی سطح اجرا شد.

۲۰ نوکلئوتیدی $T_m = [4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)]$ برای هر آغازگر

جدول ۲- غلظت اجزا مختلف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در تکثیر نمونه های *DNA* شست

| غلط نهایی | اجزای واکنش |
|-----------------------|---------------------|
| ۱X | بافر PCR |
| ۰/۲۵ μM | هر یک از آغازگرها |
| ۲۰۰ μM | dNTPs |
| ۰/۵ unit/reaction | آنزیم تک پلیمراز |
| ۱۰۰ - ۲۰۰ ng/reaction | الگو DNA |
| متغیر | dd H ₂ O |
| ۱۵ μl | حجم نهایی واکنش |

هفت جفت آغازگر ریزماهواره با بررسی مقالات و توصیه (Hoffmann et al. 2004; Mburu et al. ISAG/FAO 2003) انتخاب Metabion کشور آلمان (Nevo 1978) و از شرکت Metabion ۲۰۰۳ به دلیل نگهداری در دمای ۲۰°C طبق دستورالعمل مربوطه ساختن رقیق مساختن بصورت لیوپلیزه (غیر حساس به دما) تهیه و پس از حل کردن و شدند (جدول ۱).

PCR واکنش

در این مطالعه از بافر PCR شرکت سیناژن ایران استفاده شد. DNA ژنومی که از نمونه‌های خون استخراج شده بود، عنوان الگو PCR و اکنش‌های PCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر Biometra (*TGradient*)، با بلوك ۹۶ تایی برای تیوب‌های PCR به حجم 0.2 ml ، استفاده شد (جدول ۲). غلظت نهایی MgCl_2 برای هر یک از جایگاه‌های LCA33، LCA63 و LCA77، 2.5 mM VOLP67، 1.5 mM VOLP03 و 0.5 mM YWLL08 بود. در مورد دمای اتصال از دمای ذوب هر جایگاه به عنوان مبدأ، استفاده و بهمنه

واینبرگ در هر مورد با استفاده از نرم افزار GenAIEx 6.3 برآورد شد. میانگین و انحراف معیار تعدادآلل واقعی و موثر، هتروزایگوسیتی مشاهده شده، هتروزایگوسیتی مورد انتظار و ساختار شانون محاسبه شدند. از آماره محتوای چند شکلی (PIC) برای تعیین میزان چند شکلی نیز استفاده شد. هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_o) برای یک جایگاه با فرمول زیر محاسبه شد:

$$H_o = \frac{\sum N_{ij}}{N}$$

که در آن N_{ij} ($i \neq j$) تعداد افراد هتروزایگوت و N تعداد کل افراد در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد (Hedrick 1999).

هتروزایگوسیتی مورد انتظار (H_E) برای یک جایگاه نیز از فرمول

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

که در آن عبارت $\sum_{i=1}^n p_i^2$ نسبت مورد انتظار هموژیگوت‌ها می‌باشد و p_i فراوانی i امین آلل در یک جایگاه معین می‌باشد (Hedrick 1999).

ساختار اطلاعات شانون با فرمول زیر تعیین شد (Lewontin 1974):

$$H' = - \sum_i p_i \ln p_i$$

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Buchanan and Thue 1998):

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2 p_i^2 p_j^2$$

که در آن k تعداد آللهای p_i و p_j فراوانی‌های جمعیتی i و j امین آلل می‌باشد.

نتایج و بحث

همانطور که پیشتر بیان شد تحقیقات نشانگرهای مولکولی در جنس کاملوس بسیار اندک می‌باشد. از این‌رو در این مبحث تلاش می‌شود نتایج این تحقیق با نتایج گزارش شده در خصوص دیگر جنس‌ها و گونه‌ها مقایسه شوند. نتایج بارگذاری DNA حاصله بر روی ژل آگارز یک درصد، در شکل ۱ نشان داده شد. همانطور که در این شکل مشهود است کیفیت در حد مطلوب (باندهای کاملاً تیز و بدون کشیدگی) بود.

دمای اتصال بهینه برای آغازگرهای VOLP67، VOLP03، LCA56، LCA33، YWLL08، LCA63 و LCA77 بترتیب ۵۴، ۵۳، ۵۳، ۵۳، ۵۵، ۵۷ درجه سانتی‌گراد بدست آمد (جدول ۳). جهت آشکار سازی تفاوت قطعات DNA، از الکتروفورز ژل پلی-اکریلامید ۸ درصد استفاده شد. فرآوردهای PCR را به نسبت ۲/۵ به ۱ با بافر بارگذاری مخلوط شده و حدود ۱۰۰ ملی‌لتر (شدت جریان حدود ۱۰ میلی‌آمپر و توان ۰/۹ تا ۱ وات) به مدت ۱۸ ساعت الکتروفورز شدند. برای نمایان سازی باندها از روش سریع رنگ آمیزی نقره (Ruane 2000) استفاده شد.

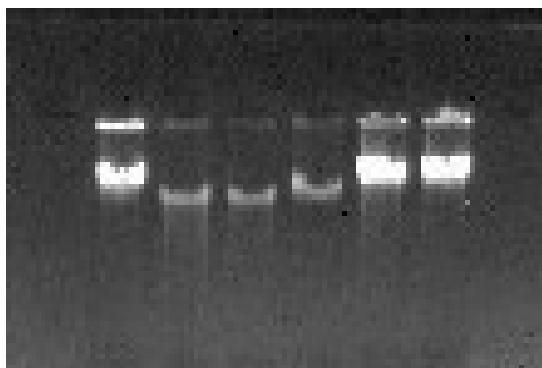
جدول ۳- برنامه حرارتی مناسب برای آغازگرهای مورد مطالعه

| مراحل | درجه حرارت (C) | زمان (دقیقه) |
|-----------------|----------------|--------------|
| واسرشناسازی | ۹۵ | ۵ |
| واسرشناسازی | ۹۴ | ۴۵ ثانیه |
| براساس آغازگرها | ۱ | اتصال آغازگر |
| بسط | ۷۲ | ۱ |
| بسط نهایی | ۷۲ | ۱۵ |
| نگهداری | ۴ | - |

مراحل دو تا چهار، ۳۰ بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل مشاهدات و داده‌ها پس از تهیه عکس به کمک دستگاه Gel Documentation تصویر ژل‌ها در کامپیوتر ذخیره شده و سپس با استفاده از نرم افزارهای GELPRO و UVIDOC باندها تعیین اندازه و خوانده شدند. اندازه گیری‌ها به کمک باندهای حاصل از تجاری #SM1323 شرکت Fermentas انجام شد و پس از آن بر اساس اندازه‌های حاصله و اطلاعات مربوط به هر نشانگر و البته در نظر گرفتن تصویر ژل و تعداد آللهای قابل تشخیص، تعداد آللهای مشاهده شده مربوط به هر نشانگر بدست آمد و بعد بر اساس تعداد باندهای طیف هر فرد، ژنوتیپ فرد مورد نظر تعیین شد، پس از آن با استفاده نرم افزار GenAIEx 6.3 ژنوتیپ‌ها و آللهای محااسبه شدند.

در آزمون تعادل هاردی واینبرگ جمعیت مورد مطالعه از آزمون مرتع کای استفاده شد. آماره و احتمال برقراری تعادل هاردی



شکل ۱- کیفیت DNA استخراج شده از نمونه های مورد بررسی

شترهای تککوهانه و دوکوهانه به ترتیب ۵ و ۱۵ گزارش نمودند که با دو آلل مشاهده شده در این تحقیق هیچگونه هماهنگی ندارد. در حالیکه در گزارش مذکور تعداد آلل های VOLP67 و YWLL08 برای شترهای دوکوهانه به ترتیب ۱۱ و ۵ ذکر شده است که می توان گفت با تعداد ۸ و ۴ آلل مشاهده شده برای جایگاه های مزبور هماهنگی دارد. بطور کلی به نظر می رسد ثبت آلل LCA77 و کاهش شدید آللی در بعضی از جایگاه ها در شتر دوکوهانه ایران (قابل زیست در یک منطقه محدود داشت معان تا دامنه سبلان) مواجه با کاهش شدید جمعیتی دور از انتظار نمی باشد. بعنوان نتیجه گیری می توان گفت که از نظر تعداد آلل با آنچه که قبل جهت تخمین تنوع ژنتیکی پیشنهاد شده بود، همخوانی دارد (Barker 1999).

دامنه اندازه آلل های مشاهده شده در این تحقیق برای جایگاه YWLL08 و جایگاه های LCA63، LCA56، LCA77 به ترتیب با نتایج تحقیقات Spencer et al. (2010)، Lang et al. (1996) تقریباً مطابقت دارد. دامنه اندازه آلل VOLP67 با دامنه گزارش شده برای برای دو گونه شتر تککوهانه و دوکوهانه توسط Jianlin et al. (2000) تقریباً یکسان است. دامنه اندازه آلل دیگر جایگاه های مورد مطالعه در این پژوهش با نتایج منابع ذکر شده همخوانی ندارند. البته این عدم تطابق ها و ناهمانگی ها در تطبیق گزارش های Jianlin et al. (2000)، Lang et al. (1996) و Spencer and Woolnough (2010) برای گونه های مختلف شتر حتی در یک گونه نیز مشهود است.

بر اساس نتایج حاصله هیچ یک از جایگاه های مورد بررسی در

واکنشهای PCR با هر هفت جفت آغازگر بخوبی انجام شد. در سه جایگاه VOLP67، LCA63، YWL08 آلل های صفر دیده شدند. معیار چندشکلی بودن هر جایگاه در این پژوهش، این بود که وفور فراوان ترین آلل کمتر از ۰/۹۹٪ یا ۰/۹۵٪ باشد. در این بررسی تنها جایگاه LCA77 یک شکل مشاهده شد. دامنه اندازه آلل ها برای جایگاه های LCA33، LCA56، LCA63، VOLP03، VOLP67، YWLL08 بترتیب ۱۰۵-۱۵۵، ۹۰-۱۰۵، ۱۳۰-۱۶۰ و ۱۳۰-۱۹۵ باز بدست آمد که نامگذاری آلل ها نیز بر همین اساس انجام گرفت (جدول ۱). تعداد آلل های هر جایگاه، معیار مناسبی از تنوع ژنتیک می باشد (Nevo 1978). همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده تعداد کل آلل در جمعیت ۲۵ آلل با ۴ آلل مشترک در جایگاه های مختلف با میانگین $3/571 \pm 0/896$ برای هر جایگاه است که در دامنه میانگین آللی گزارش شده شتران دوکوهانه چین و مغولستان ($3/58-4/75$) قرار دارد (Jianlin et al. 2004). دامنه تعداد آلل بین ۱-۸ متغیر می باشد که در مقایسه با شترهای تککوهانه وحشی استرالیا که در اواسط قرن نوزدهم میلادی از افغانستان و پاکستان وارد این کشور شدند (Spencer and Woolnough 2010) از نظر تعداد آلل در جایگاه های LCA63 و VOLP67 با گزارش این پژوهشگران مطابقت دارد ولی در جایگاه های LCA56، VOLP03 و YWLL08 آلل های مشاهده شده به مراتب کمتر از آلل های گزارش شده توسط پژوهشگران مذکور است و تفاوت آللی برای جایگاه LCA77 جزیی می باشد. همچنین Jianlin et al. (2000) تعداد آلل های VOLP03 را در

بررسی که (Spencer et al. 2010) روی شتران تک کوهانه امارات متحده عربی، استرالیا و آفریقا انجام دادند، متوسط هتروزایگوسیتی مورد انتظار را به ترتیب 0.530 , 0.530 و 0.546 گزارش کردند. در تحقیق این پژوهشگران، متوسط هتروزایگوسیتی مورد انتظار برای شتر دوکوهانه 0.543 براورد شد. در دو تحقیق دیگر متوسط هتروزایگوسیتی مورد انتظار برای شتران تک کوهانه استرالیا، کنیا، پاکستان، عربستان سعودی و امارات متحده عربی به ترتیب 0.544 , 0.548 , 0.593 , 0.594 و 0.594 گزارش شده است (Mate' et al. 2005; Simianer 2005). متوسط پارامتر مذکور برای دو جمعیت شتر دوکوهانه مغولستان و چهار جمعیت چین به ترتیب 0.526 , 0.545 , 0.561 , 0.577 و 0.547 میانگین و انحراف معیار مربوطه در جدول ۴ ارائه شده است. همانطور که جدول ۵ نشان می‌دهد متوسط هتروزایگوسیتی مورد انتظار محاسبه شده در جمعیت شتر دوکوهانه ایران 0.489 است که تقریباً در حد هتروزایگوسیتی‌های گزارش شده می‌باشد. نسبت چند شکلی (P) 0.8571 درصد می‌باشد. تعداد آلل مؤثر (N_E), معیار دیگری است که برای تعیین میزان چند شکلی جایگاه‌ها استفاده می‌شود که میزان آن در پژوهش حاضر $2/622$ محاسبه شد (جدول ۵). این پارامتر در تحقیق (Spencer et al. 2010) با ۱۸ نشانگر ریزماهواره (شامل ۷ نشانگر استفاده شده در تحقیق حاضر) روی شترهای تک کوهانه استرالیا، $3/44$ براورد شد که به نظر می‌رسد تک شکل شدن LCA77 در جمعیت دوکوهانه ایران عامل کاهش N_E در این شترها باشد. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) نیز از جمله معیارهای چند شکلی است که تحت تأثیر تعداد آلل در جایگاه مورد نظر و نیز فراوانی‌های آلی قرار دارد. نتایج حاصله در جدول ۵ خلاصه شده است. در میان همه جایگاه‌ها، بیشترین و کمترین ارزش PIC به ترتیب مربوط به جایگاه VOLP67 0.742 و جایگاه LCA33 0.1518 می‌باشد. همچنین همانطور که انتظار می‌رود تمامی مقادیر PIC در مقایسه با مقادیر هتروزایگوسیتی متناظر شان کمتر می‌باشند. مقایسه ارزش‌های PIC در سطح جمعیت‌ها به ازا تمامی جایگاه‌ها می‌تواند سطح تغییرپذیری را در داخل هر جمعیت در مقایسه با سایر جمعیت‌ها نشان دهد (Buchanan and Thue 1998).

تعادل هاردی- واینبرگ نبودند و انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی- واینبرگ نشان دادند ($p < 0.001$). با توجه به اینکه برای مطالعه حاضر از اکثر جمعیت موجود شتر دوکوهانه کشور (۱۱۰ نفر) نمونه گیری به عمل آمده است و تعداد جمعیت مذکور در حال حاضر بسیار کم می‌باشد، انتظار عدم تعادل هاردی- واینبرگ به علت کوچک بودن اندازه جمعیت منطقی به نظر می‌رسد. نکته قابل توجه این بود که شتران دوکوهانه در جایگاه‌های LCA77 هموزایگوت و در بقیه جایگاه‌ها هتروزایگوت بودند(جدول ۲). تنوع ژنی بصورت هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_0) و هتروزایگوسیتی مورد انتظار (H_e) در هر جایگاه به همراه میانگین و انحراف معیار مربوطه در جدول ۴ ارائه شده است. دامنه H_0 در بین همه جایگاه‌ها 0.41 می‌باشد چون که دو جایگاه LCA33 و LCA77 هموزایگوت بودند. دامنه H_E نیز از صفر (LCA77) تا 0.771 (VOLP67) بود. متوسط هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جمعیت به ترتیب 0.184 ± 0.714 و 0.489 ± 0.114 بود. چون حد نهایی برای هتروزایگوسیتی یک است و از اینرو مقادیر هتروزایگوسیتی به افزایش تنوع زیاد حساس نمی‌باشد، مقایسه این مقادیر بعنوان معیار تنوع درون جمعیتی برای نشانگرهای بسیار چند شکل همچون ریزماهواره‌ها (که در اکثر موارد هتروزایگوسیتی حدود 0.8 یا بالاتر دارند) صحیح نبوده و این تفاوت‌های میان آنها اطلاعات دقیقی را بیان نمی‌کنند. بنابراین شاخص اطلاعات شانون (H') نیز برای همه جایگاه‌ها محاسبه و نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. علیرغم آنکه تفسیر بیولوژیکی معیار H' مشخص نیست، ولی چون حد اکثر مقدار H' برابر با $\ln(n)$ می‌باشد ممکن است برای اندازه-گیری تنوع جایگاه‌های بسیار متغیر مفید باشد (Hedrick 1999). با این وجود نتایج مشابه با آنچه از هتروزایگوسیتی‌ها مشاهده شده بود (هم از لحاظ روند و هم از لحاظ بیشترین و کمترین مقدار) حاصل شد. بیشترین مقدار H' در بین جایگاه VOLP67 0.720 می‌باشد که با توجه به تعداد آلل زیاد در این مورد $8/1720$ ، منطقی به نظر می‌رسد. کمترین مقدار نیز از آن جایگاه LCA77 0.000 است که با توجه به اینکه شتران مورد مطالعه برای این جایگاه‌ها تنها یک آلل را دارند، قابل توجیه است. در

جدول ۴- فراوانی های آللی جایگاه های مورد مطالعه در جمعیت شتر دوکوهانه ایران

| YWLL08 | VOLP67 | VOLP03 | LCA77 | LCA63 | LCA56 | LCA33 | جاگاه | آلل |
|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| - | - | - | - | - | - | •/•٩١ | ٩٠ | |
| - | - | - | - | - | - | •/•٩٩ | ١٠ | |
| - | - | •/٥٠٠ | - | - | - | - | - | ١٢٠ |
| - | - | •/٥٠٠ | - | - | - | - | - | ١٢٥ |
| •/١٠٠ | - | - | - | - | •/٥٠٠ | - | - | ١٣٠ |
| •/٢٧٤ | - | - | - | - | - | - | - | ١٤٠ |
| •/٤٠٠ | •/٠٢٠ | - | - | - | •/٤٨٦ | - | - | ١٥٠ |
| - | - | - | - | - | •/٠١٤ | - | - | ١٥٥ |
| •/٢٢٦ | •/٠٦١ | - | - | - | - | - | - | ١٦٠ |
| - | •/٠٩٧ | - | - | - | - | - | - | ١٧٠ |
| - | •/٠٤١ | - | - | - | - | - | - | ١٧٥ |
| - | •/٣٦٢ | - | - | - | - | - | - | ١٨٠ |
| - | •/٠٧٧ | - | - | - | - | - | - | ١٨٥ |
| - | •/٢٦٢ | - | - | - | - | - | - | ١٩٠ |
| - | •/٠٧٧ | - | - | - | - | - | - | ١٩٥ |
| - | - | - | - | •/٢٠٨ | - | - | - | ٢٠٥ |
| - | - | - | - | •/٢٣٤ | - | - | - | ٢١٥ |
| - | - | - | - | •/٢٠٨ | - | - | - | ٢٢٥ |
| - | - | - | - | •/٢٩٢ | - | - | - | ٢٣٠ |
| - | - | - | ١/٠٠٠ | - | - | - | - | ٢٣٩ |
| - | - | - | - | •/٠٥٧ | - | - | - | ٢٤٠ |

تنوع موجود در درون این گونه با ارزش ایرانی بدهست آید و
بعنوان راهنمایی برای تصمیم گیریهای حفاظتی آتی مورد استفاده
قرار گیرد.
سپاسگزاری

بدین وسیله نویسنده‌گان مراتب تشکر و قدردانی خود را از موسسه تحقیقات علوم دامی به دلیل تأمین اعتبارات و امکانات اجرایی تحقیق و از مسئولین ایستگاه‌های تحقیقات شتر دوکوهانه جهادآباد و جعفرآباد استان اردبیل و همچنین از شترداران آن مطقه که در تهیه نمونه‌های خون همکاری صمیمانه داشته‌اند ابراز ممداده.

از این اطلاعات می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که شاخص‌های چندشکلی جایگاه‌های مورد مطالعه نیز نشان داد که اگرچه این جایگاه‌ها از شتر تک کوهانه و شترهای دنیای جدید جدا گردیده‌اند، همچنان از چندشکلی مناسبی در جمعیت مورد مطالعه برخوردار هستند و می‌توان آنها را برای مطالعات بعدی بر روی شتر دوکوهانه توصیه نمود. علاوه بر این تنوع ژنی در شتر دوکوهانه ایران نشان می‌دهد علیرغم اندازه بسیار کم جمعیت مورد مطالعه، این گونه همچنان از تنوع ژنتیکی قابل قبولی برخوردار است، که می‌تواند به حفظ آن کمک شایانی نماید. با این وجود، پیشنهاد می‌شود برای بررسی بهتر و دقیق‌تر از تعداد بیشتری جایگاه در تحقیقات بعدی استفاده شود تا تصویری از

جدول ۵- مقادیر تنوع ژنتیکی ۷ جایگاه ریزماهواره در ۱۱۰ شتر دوکوهانه ایران شامل تعداد آلل موثر (N_E), هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_O) و مورد انتظار (H_E) و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص شانون (H')

| نام جایگاه \ شاخص | N_E | H_O | H_E | PIC | H' |
|-------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| LCA33 | ۱/۱۹۸ | ۰/۰۰۰ | ۰/۱۶۵ | ۰/۱۵۱۸ | ۰/۳۰۵ |
| LCA56 | ۲/۰۵۵ | ۱/۰۰۰ | ۰/۵۱۳ | ۰/۳۹۵۳ | ۰/۷۵۶ |
| LCA63 | ۴/۳۴۶ | ۱/۰۰۰ | ۰/۷۷۰ | ۰/۷۳۰۸ | ۱/۵۱۷ |
| LCA77 | ۱/۰۰۰ | ۰/۰۰۰ | ۰/۰۰۰ | ۰/۰۰۰۰ | ۰/۰۰۰ |
| VOLP03 | ۲/۰۰۰ | ۱/۰۰۰ | ۰/۵۰۰ | ۰/۳۷۵ | ۰/۶۹۳ |
| VOLP67 | ۴/۳۷۵ | ۱/۰۰۰ | ۰/۷۷۱ | ۰/۷۴۱۸ | ۱/۷۲۰ |
| YWLL08 | ۲/۳۷۷ | ۱/۰۰۰ | ۰/۷۰۴ | ۰/۶۵۰۱ | ۱/۲۸۸ |
| Mean±SD | ۲/۶۲۲±۰/۰۵۳ | ۰/۷۱۴±۰/۱۸ | ۰/۴۸۹±۰/۱۱ | ۰/۵۵۷±۰/۲۴ | ۰/۸۹۷±۰/۲۴ |

منابع

- Barker JSF (1999) Conservation of livestock breed diversity. Animal Genetics Resources Information 25:33–43.
- Bruford MW, Bradley D, Luikart G (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nature Reviews Genetics 4:900–910.
- Buchanan FC, Thue TD (1998) Intrabreed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. Canadian Journal of Animal Science 78:425–428.
- Diamond J (2002) Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. Nature 418:700–707.
- FAO (2007) The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome.
- Hall SJG, Bradley DG (1995) Conserving livestock breed diversity. Trends in Ecology and Evolution 10:267–270.
- Hedrick PW (1999) Genetics of populations, Second edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury MA, USA.
- Hoffmann I, Marsan PA, Barker SF, Cothran EG, Hanotte O, Lenstra JA, Milan D, Weigend S, Simianer H (2004) New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: recommendations of a joint ISAG/FAO working group. In: 29th International Conference on Animal Genetics p. 123 (abstract), Meiji University, Tokyo, Japan. FAO, Rome.
- Ji R, Cui P, Ding F, Geng J, Gao H, Zhang H, Yu J, Hu S, Meng H(2009) Monophyletic origin of domestic bactrian camel (*Camelus bactrianus*) and its evolutionary relationship with the extant wild camel (*Camelus bactrianus ferus*). Animal Genetics 40:377–382.

Jianlin H (2000) Origin, evolution and genetic diversity of old world camelus. Doctoral dissertation of Lanzhou University, Lanzhou, China.

Jianlin H (2005) Achievement of research in the field of camelids. In: WAAP Book of the Year – 2005 (Ed. by Rosati A, Tewolde A, Mosconi C), pp. 177–87.

Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Jianlin H, Mburu D, Ochieng J, Kaufmann B, Rege J, Hanotte O (2000) Application of new world camelidae microsatellite primers for amplification of polymorphic loci in old world camelids. Animal Genetics 31:404–419.

Jianlin H, Ochieng J, Lkhagva B, Hanotte O (2004) Genetic diversity and relationship of domestic bactrian camels (*Camelus bactrianus*) in China and Mongolia. Journal of Camel Practice and Research 12:97–99.

Lang KDM, Wang Y, Plante Y (1996) Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llama and alpacas. Animal Genetics 27:285.

Lewontin, RC (1974). The genetic basis of evolutionary change. Columbia Univ. Press, New York.

Mate' M, Bustamante A, Giovambattista G, de Lamo D, von Thungen J, Zambelli A, Vidal-Rioja L (2005) Genetic diversity and differentiation of guanaco populations from Argentina inferred from microsatellite data. Animal Genetics 36:316–321.

Mburu DN, Ochieng JW, Kuria SG, Jianlin H, Kaufmann B, Rege EO, Hanotte O (2003) Genetic diversity and relationships of indigenous Kenyan camel (*Camelus dromedarius*) populations: implications for their classification. Animal Genetics 34:26–32.

- Mehta SC, Goyal A, Sahani MS (2007) Microsatellite markers for genetic characterisation of Kachchhi camel. Indian Journal of Biotechnology 6:336-339.
- Miller S, Dykes DD, Polesky HF(1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Research, 16:12 -15.
- Nevo E(1978) Genetic variation in natural population: Patterns and theory. Theoretical Population Biology 13:121-177.
- Nolte M ,Kotzé A, van der Bank FH, Grobler JP (2005) Microsatellite markers reveal low genetic differentiation among southern African *Camelus dromedarius* populations. South African Journal of Animal Science 35:152-161.
- Ruane J (2000) A framework for prioritizing domestic animal breeds for conservation purposes at the national level: a Norwegian case study. Conservation Biology 14:1385–1393.
- Sanguinetti CJ, Neto ED, Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR product separated on polyacrylamide gels. Biotechniques 17:915-919.
- Simianer H (2005) Decision making in livestock conservation.Ecological Economics 53:559–572.
- Spencer PBS, Wilson K J, Tinson A (2010) Parentage testing of racing camels (*Camelus dromedaries*) using microsatellite DNA typing. Animal Genetics 41:662-665.
- Spencer PBS, Woolnough AP(2010) Assessment and genetic characterisation of Australian camels using microsatellite polymorphisms. Livestock Science 129:241-245.
- Stevens C (1989) Tin Mosques and Ghantowns: A history of Afghan camel drives in Australia. Oxford University Press, Melbourne.
- Toro M, Fernández J, Caballero A (2009) Molecular characterization of breeds and its use in conservation. Livestock Science 120:174–195.
- Toro M, Caballero A(2005) Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Science 360:1367–1378.
- Weitzman ML (1993) What to preserve? An application of diversity theory to crane conservation. Quarterly Journal of Economy 108:157–183.