مجله دانش کشاورزی/ جلد 18 شماره 1/ سال 1387/ صفحه‌های 148-141

بررسي تنوع ژنتيكي بوقلمون با استفاده از نشانگرهاي RAPD

قربان الياسي زرين‌قبايي[1*]، احد ايازي[1]، ام‌البنين پيراهري[2]، محمدرضا نصيري[3] و عليرضا دهناد[4]

تاريخ پذيرش: 86/7/14

1- پژوهشگر مركز تحقيقات كشاورزي و منابع طبيعي استان آذربايجان شرقي
2- كارشناس معاونت امور دام سازمان جهاد كشاورزي آذربايجان شرقي
3- دانشيار گروه علوم دامي دانشكده كشاورزي دانشگاه فردوسي مشهد
4- پژوهشگر پژوهشكده بيوتكنولوژي كشاورزي شمالغرب و غرب كشور
*مسئول مكاتبه E-mail : Gh.Elyasi@Gmail.com

چكيده

استفاده از نشانگرهاي DNA براي تمايز گونه‌ها و سويه‌هاي طيور از دهه گذشته به سرعت در حال پيشرفت مي‌باشد و تكنيك تكثير تصادفي قطعات DNA (RAPD) با استفاده از آغازگرهاي اختياري كوتاه، DNA ژنوميك را تكثير مي‌كند و نوارهاي الگوي اختصاصي فرد را حاصل مي‌كند بدون اينكه نيازي به اطلاعات قبلي از ژنوم وجود داشته باشد. هدف از اين تحقيق بررسي شباهت‌ها و فواصل ژنتيكي چهار گروه فنوتيپي جمعيت بوقلمون موجود در ايستگاه تحقيقات بوقلمون كشور با استفاده از نشانگرهاي RAPD بود. نمونه‌هاي خون از 18 بوقلمون سفيد، 16 بوقلمون طلايي، 24 بوقلمون الوان و 20 بوقلمون سياه اخذ شد و DNA ژنومي از 25 ميكروليتر خون استخراج گرديد. تكثير قسمتهاي مختلفي از ژنوم بوقلمون با استفاده از 15 آغازگر تصادفي انجام گرديد. نتايج حاكي از وجود تشابه ژنتيكي از 0/94 تا 0/98 بين گروه‌هاي فنوتيپي بود. بيشترين فاصله ژنتيكي بين فنوتيپ‌هاي سفيد و طلايي (0/06) و كمترين فاصله ژنتيكي بين فنوتيپ‌هاي سفيد و سياه (0/02) بدست آمد. بطور كلي با توجه به پارامترهاي ژنتيكي محاسبه شده در گروههاي تحت آزمايش، به نظر مي‌رسد كه جمعيتهاي فنوتيپي ارزيابي شده از لحاظ ژنتيكي تشابهات زيادي با يكديگر دارند و نمي‌توان عامل فنوتيپي رنگ را تنها معيار تمايز ژنتيكي آنها به حساب آورد. نتايج نشان داد كه تكنيك RAPD-PCR مي تواند به عنوان يک عامل وسيله مناسب براي ارزيابي تنوع ژنتيكي در طيور مورد استفاده قرار گيرد.

واژه‌هاي كليدي: بوقلمون، تنوع ژنتيكي، نشانگر RAPD ،DNA

Study of Turkey Genetic Diversity Using RAPD Markers

G Elyasi[1*], A Ayazi[1], O Pirahary[2], MR Nassiry[3] and A Dehnad[4]

[1]East Azarbaijan Research Center for Agriculture and Natural Resources, Tabriz, Iran
[2]East Azarbaijan Jahad-e-Keshavarzi Organization, Tabriz, Iran
[3]Agriculture Faculty of Ferdowsi University, Mashhad, Iran
[4]North-West and West Agricultural Biotechnology Research Institute, Tabriz, Iran
*Corresponding author: E-mail:Elyasi@azaran.org.ir

Abstract

Application of DNA marker technology in poultry as a tool for species and strain identification has progressed rapidly during the last decade. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers can be generated using short arbitrary primers to amplify genomic DNA, giving a genotype-specific pattern of bands. RAPD analysis should lead to the saturation of the genome without the requirement of previous genetic information. The purpose of this study was to evaluate genetic similarities and distances among four-colored phenotype of turkey population that kept in Turkey Research Station of Iran using RAPD technique. Blood samples were taken from 20 Black, 16 Golden, 24 Pied and 18 White local turkeys. Genomic DNA was extracted from 25µl blood samples. RAPD technique, using 15 primers, was applied to amplification of different fragments of genome. The genetic similarity between the groups varied from 0.94 to 0.98 between phenotypic groups. The highest genetic distance (0.06) was determined between the White and Golden phenotypic groups and the lowest genetic distance (0.02) was obtained between White and Black groups. The results of this research showed that RAPD-PCR is an appropriate tool for evaluation of genetic variation in poultry and color is not a usful character to differentiate turkey genetic groups.

Key Words: DNA marker, Genetic distance, RAPD, Turkey

مقدمه

متخصصين اصلاح نژاد از تنوع ژنتيكي براي رسيدن به حيوانات اهلي پر توليد و مقاوم به شرايط نامناسب استفاده مي‌نمايند. نبود تنوع در جمعيتهاي پايه قدرت انتخاب براي رفع نيازهاي غير قابل پيش‌بيني آتي را محدود مي‌سازد. تقريبا متجاوز از 4500 نژاد و سويه دام و طيور اهلي در جهان شناسائي شده است كه ذخاير ژنتيكي دنيا را بوجود آورده‌اند كه از مجموع آنها بيش از 30 درصد در معرض خطر انقراض بوده و تعداد بيشتري نيز (بويژه در كشورهاي در حال توسعه) به واسطه بهره‌برداري نامناسب تهديد مي‌گردند. كاهش تنوع ژنتيكي بصورت از دست دادن نژادها و سويه‌ها خود

را بروز مي‌دهد. تجربه نشان داده است كه تنوع درون نژادي پيوسته با ورود تنوع جديد ناشي از جهش مواجه است ولي تنوع ژنتيكي بين نژادي را نمي‌توان براحتي بازسازي نمود. بنابراين مي‌توان گفت هر نژاد مجموعه منحصر به فردي از ژنهاست كه مخزن ژني آن نژاد را مي‌سازند. با حفظ نمونه‌هايي از تمامي نژادهاي يك گونه كه داراي بيشترين تفاوت ژنتيكي مي‌باشند، مي‌توان حداكثر تنوع ژنتيكي را حفظ نمود. اين نمونه‌ها نژادهايي را شامل مي‌گردند كه داراي اللها يا تركيبات اللي منحصر به فرد مي‌باشند. شرح كامل تفاوت ژنتيكي بين هر دو نژاد امكانپذير نيست ولي معيارهاي فاصلة ژنتيكي بهترين شرح در دسترس براي بيان تفاوت ژنتيكي آنها مي‌باشند (آپا رائو و همكاران 1996). نژادهاي طيور بومي در هر كشور به عنوان يك سرمايه ملي محسوب مي‌شوند كه لزوم حفظ ذخاير بومي طيور كشور و نيز استفاده از اين موجودات به عنوان مواد ژنتيكي پايه در برنامه‌هاي اصلاح نژاد طيور كشور ضروري است و اين امر مستلزم كسب اطلاعات بيشتر و دقيق از اين حيوانات است كه در اين ميان بوقلمون در مقام مقايسه با ساير طيور از كمترين تنوع نژادي برخوردار است. در مناطق مختلف آذربايجان چهار فنوتيپ غالب بوقلمون شامل الوان، طلايي، سياه و سفيد پرورش مي‌يابند كه در حقيقت تنوع زيستي پاييني را دارا مي‌باشد و اهميت افزايش تنوع زيستي را به روشهاي مناسب انتخاب نمايان مي‌سازد.

رشد و توسعه تكنيكهاي مولكولي امكانات جديدي را براي به‌گزيني و بهبود ژنتيكي دام و طيور فراهم آورده است. اختراع PCR[1] تاثير شگرفي را بر روي تحقيقات مربوط به ژنوم يوكاريوتها با استفاده از انواع ماركرهاي DNA داشته است. ماركرهاي مولكولي مبتني بر PCR بخش اصلي ابزار تكامل ژنتيكي مي‌باشند. از اينرو ماركرهاي ژنتيكي اطلاعات مهمي را در مورد سطوح اختلافات، ساختار جمعيت، سطح جريان ژني، روابط فيلوژني، الگوهاي جغرافيايي زيستي و تجزيه و تحليل نسبتهاي والديني فراهم مي‌آورد (فرال 2002).

پونساكسيلي و همكاران (1996) تنوع ژنتيكي مبتني بر انگشت‌نگاري DNA و تنوع ژنتيكي مبتني بر ريزماهواره‌هاي نمونه‌هاي مربوط به 12 لاين مرغ شامل يك لاين همخون، لاينهاي تجاري و جمعيتهاي محلي در حال انقراض را برآورد نمودند. برآوردهاي هتروزيگوسيتي از هر دو روش بسيار مشابه بودند (r=0/8) كه حاكي از توان اين نشانگرها بعنوان ابزاري براي اندازه‌گيري هتروزايگوسيتي بود. در رابطه با برآوردهاي مربوط به فاصله ژنتيكي بين جمعيتها، معلوم گرديد كه كاربرد انگشت نگاري DNA بر روي مخلوطي از DNA هاي مربوط به افراد هر لاين يا جمعيت مناسب، سريع و اقتصادي است. از اينرو اين روش، بويژه در گونه‌هايي كه اطلاعات براي طراحي آغازگرهاي لازم جهت تشخيص ريزماهواره‌ها محدود است، قابل رقابت با كاربرد ريزماهواره‌ها مي‌باشد. تاكاهاشي و همكاران (1998) رابطة ژنتيكي بين نژادهاي مرغ بومي ژاپن را بر اساس چندشكلي ريزماهواره‌ها مطالعه نمودند. اكثر مرغان بومي ژاپن، بسته به نژاد و منشاء، در سه گروه قرار گرفتند. نتايج نشان داده است كه ريزماهواره‌ها ابزار مناسبي براي مطالعه روابط ژنتيكي ميان نژادهاي مرغ مي‌باشد.

علي و احمد (2001) و علي و همكاران (2003) گزارشات اوليه‌اي از فواصل ژنتيكي بين سويه‌هاي ماكيان بومي مصر ارائه دادند و بيان داشتند كه RAPD[2] به عنوان يك ماركر ژنتيكي، داراي قدرت و كاربرد بالايي در علم اصلاح نژاد طيور است. زي-

[1] Polymerase Chain Reaction

[2] Random Amplified Polymorphic DNA

گوان و همکاران (1998) تغييرپذيري و رابطه ميان سه نژاد مرغ بومي چين و يك سويه سنتز شده را با استفاده از چندشكلي 5 ريزماهواره و 70 آغازگر RAPD مطالعه نمودند. معنيدار بودن تفاوتهاي مبتني بر چندشكلي ريزماهوارهاي نشان داد كه متوسط هتروزايگوسيتي در دو نژادي كه از جمعيتهاي حفاظت شده نمونه برداري شده بودند و نيز سويه سنتز شده كه به مدت بيش از 10 سال همخون شده است، پايين است ولي در نژاد ديگر بالا ميباشد. نتايج RAPD نيز نشان داد كه تغييرپذيري در ميان 4 نژاد پايين است. رابطة بين 4 نژاد هم بر اساس چند شكلي ريزماهوارهاي و هم بر اساس RAPD بسيار نزديك بود. اين محققين پيشنهاد كردند كه به واسطة چندشكلي زياد و توارث همبارز ريزماهوارهها، نشان دادن تغييرپذيري درون نژادي از طريق متوسط هتروزيگوسيتي مبتني بر چندشكلي مناسبتر است و حال آنكه تفاوتهاي بين جمعيتي و حتي ويژگيهاي اختصاصي درون جمعيتي، بطور واضح و مستقيم از طريق RAPD انعكاس مييابند. هدف از اين تحقيق بررسي تنوع و فاصله ژنتيكي گروههاي فنوتيپي جمعيتهاي بوقلمون موجود در ايستگاه تحقيقاتي بوقلمون كشور با استفاده از نشانگرهاي RAPD بود.

مواد و روشها

نمونههاي خون از 18 بوقلمون سفيد، 16 بوقلمون طلايي، 24 بوقلمون الوان و 20 بوقلمون سياه در داخل تيوپهاي حاوي 10% ماده ضد انعقاد EDTA اخذ شده و در داخل فلاسك يخ به آزمايشگاه منتقل و تا زمان استخراج در 20- سانتيگراد فريز گرديد. استخراج DNA از 25 ميكروليتر خون با روش سيليكاژل و با روش بوم و همكاران (1990) كه توسط شيخايف (1995) اصلاحاتي در آن گرفته بود انجام گرفت. در اين روش ابتدا سلولهاي خوني با استفاده از مواد شيميايي ليز شده و سپس ذرات بسيار ريز شيشه كه DNA را به خود جذب ميكند به محلول اضافه شد. پس از سانتريفيوژ به غير از رسوب تشكيل شده كه حاوي DNA ميباشد بقيه مواد دور ريخته شد و در مرحله آخر DNA خالصسازي گرديد. جهت تعيين كيفيت و كميت DNA از روشهاي الكتروفورز و اسپكتروفتومتري استفاده گرديد. براي تكثير قسمتهاي مختلف ژنوم از 15 پرايمر اختياري استفاده گرديد (جدول 1). واكنش زنجيرهاي پليمراز در حجم 25 ميكروليتر (1/5 ميليمولار MgCl2، 0/2 ميليمولار از هر dNTP، 20 ميكرومولار پرايمر، 1 واحد *Taq* DNA Polymerase، و 1 برابر بافر واكنش همراه با 50 نانوگرم DNA ژنومي) استفاده گرديد. شرايط PCR شامل دماي واسرشت شدن اوليه 94 درجه به مدت 3 دقيقه، سپس 40 چرخه شامل دماي واسرشت شدن 94 درجه به مدت 45 ثانيه، دماي اتصال 37 درجه به مدت 1 دقيقه، دماي تكثير 72 درجه به مدت 2 دقيقه بود و در ادامه براي تكثير نهايي 72 درجه به مدت 10 دقيقه منظور شد. فرآوردههاي تكثير شده بر روي ژل آگارز 2% به مدت 6 ساعت با 70 ولت الكتروفورز شده و توسط اتيديوم برماید رنگآميزي گرديد. پس از عكسبرداري، امتيازدهي و تجزيه و تحليل نهايي، آورد پارامترهاي فاصله ژنتيكي، ميزان هتروزيگوتي و شاخص شانن و تشكيل ماتريس خويشاوندي با استفاده از نرمافزار Popgene 3.2 انجام پذيرفت. ميانگين فاصله ژنتيكي افراد داخل هر گروه نيز با استفاده از شاخص Nei محاسبه گرديد (ني 1973).

جدول **1**- پرايمرهاي استفاده شده در اين تحقيق

ردیف	نام پرایمر	5'→3'
1	**Moh 01**	**TGGACTCGAG**
2	**Moh 02**	**GCACTGAGTA**
3	**Moh 04**	**GCATGCGATC**
4	**Moh 06**	**ACGTCGAGCA**
5	**Moh 07**	**TACGCAGACT**
6	**Moh 11**	**TGCATCGTAC**
7	**Moh 12**	**ACGCCGTACG**
8	**Moh 13**	**GCTGCTCGAGT**
9	**Moh 26**	**CGAACCTGATC**
10	**Moh 27**	**GCTTGCAGATC**
11	**OPC 02**	**GTGAGGCGTC**
12	**OPC 05**	**GATGACCGCC**
13	**OPC 08**	**TGGACCGGTG**
14	**OPC 16**	**CACACTCCAG**
15	**OPD 05**	**TGAGCGGACA**

نتايج و بحث

استخراج DNA با روش سيليكاژل مقادير بالا و خالصي از DNA ژنومي حاصل كرد كه بنظر مي‌رسد اندازه آنها به علت داشتن طول زياد و خلوص بالا، جهت كارهاي مهندسي ژنتيك و آزمايشهاي مولكولي بسيار مناسب باشد. تكثير قطعات ژنوم با استفاده از پرايمرهاي اختياري نوارهاي روشن و واضحي ارائه دادند كه مي‌توانست هدف از تحقيق را برآورده ساخته و در امتيازبندي مورد استفاده قرار گيرند (شكل‌هاي 1 و 2).

از بين آغازگرهاي مورد استفاده تعداد 5 عدد از آنها (جدول 2) چندشكلي بالايي را نشان دادند كه جهت ارزيابي پارامترهاي ژنتيكي مورد نظر از آنها استفاده گرديد كه بيشترين چندشكلي مربوط به آغازگر OPC-05 با 14 نوار چندشكل بود. نتايج بدست آمده از اين تحقيق نشان داد كه بيشترين فاصله ژنتيكي بين فنوتيپهاي سفيد و طلائي و كمترين فاصله ژنتيكي بين فنوتيپهاي سفيد و سياه وجود دارد (شكل 3 و جدول 3). در كل با توجه به پارامترهاي ژنتيكي، در گروههاي تحت آزمايش، به نظر مي‌رسد كه گروههاي فنوتيپي ارزيابي شده از لحاظ ژنتيكي تشابهات زيادي با يكديگر دارند و نمي‌توان فاكتور فنوتيپي رنگ را تنها معيار تمايز ژنتيكي آنها به حساب آورده و بر اساس رنگ گزينش و اصلاح نژاد انجام داد.

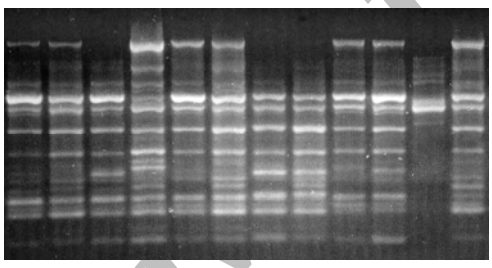
به دليل اينكه تكنيك RAPD يك روش ساده و ارزان بوده و اطلاعات اوليه‌اي از ژنوم موجود لازم ندارد در حال حاضر براي تمايز منابع ژنتيكي اقتصادي مانند طيور و ديگر حيوانات مزرعه‌اي در سطح وسيعي بكار مي‌رود. اگر انتخاب پرايمرها بگونه‌اي باشد كه كل ژنوم را پوشش دهد در اين صورت اطلاعات بسيار مفيدي بصورت سريع، ارزان و راحت در اختيار بهره‌برداران قرار مي‌دهد (گزنا دو اينرچ 2000). اثر بخشي RAPD در تشخيص چند شكلي موجود بين جمعيت‌هاي ماكيان و كاربرد آنها در مطالعات جمعيت و تشخيص روابط خويشاوندي در بين جمعيت ماكيان توسط شارما و همكاران (2001) بررسي شده و سالم و همكاران (2005) نيز

جدول **2**- مشخصات پرايمرهاي داراي چندشكلي بالا

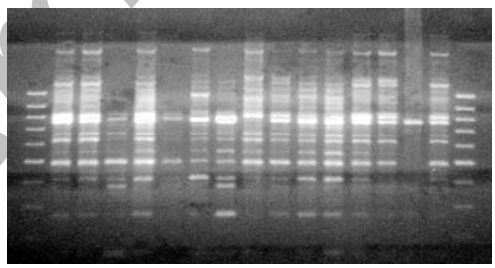
نام پرایمر	5'→3'	تعداد کل نوارها	تعداد نوار چند شکل

OPC 02	**GTGAGGCGTC**	**12**	**9**
OPC 05	**GATGACCGCC**	**18**	**14**
OPC 08	**TGGACCGGTG**	**12**	**9**
OPC 16	**CACACTCCAG**	**11**	**10**
OPD 05	**TGAGCGGACA**	**14**	**11**

در بررسي اجمالي ايـن تكنيـك كـارآيي آن را در تـشخيص چندشـكلي بـين گونـه‌هـاي مختلـف طيـور، كـاربرد آن در مطالعات جمعيت و استفاده از RAPD را در بررسي روابط ژنتيكي مورد تاييد قرار داده‌اند. با توجه بـه اينكـه نژادهـا و سويه‌هاي مختلفي از طيـور بوجـود آمـده‌انـد كـه در سـطح تجاري مورد استفاده قرار مي‌گيرنـد و اطلاعـات موجـود از ساختار ژنتيكي و سـطح تنـوع آنهـا حـداقل اسـت. از اينـرو مطالعات بيشتري لازم اسـت تـا ايـن ذخـاير ژنتيكـي مـورد ارزيابي قرار گرفته و اختلافات و تشابهات ژنتيكي بين آنهـا به منظور افزايش دقت گزينش و اصلاح نـژاد بـرآورد گردد. نتايج نشان داد كه تكنيك RAPD-PCR وسيله مناسبي براي ارزيابي تنوع ژنتيكي در طيور مي‌باشـد. اميد است كه در آينـده اطلاعـات ژنتيكـي بيـشتري بـا بكارگيري تعداد افراد بيـشتر و تكنيكهـاي ديگـر جهـت تمايز بهتر توده‌هاي بومي بوقلمون حاصل گردد.



شكل **1**- ژنوم تكثير شده با استفاده از پرايمر **OPC-02**

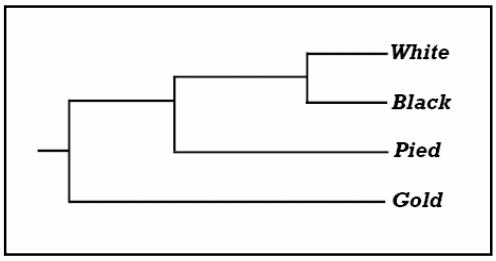


شكل **2**- ژنوم تكثير شده با استفاده از پرايمر **OPC-05**

جدول **3**- شباهتهاي ژنتيكي برآورد شده براي فنوتيپهاي مختلف بوقلمون (ني **1973**)

فنوتيپ	سفيد	طلايي	الوان
سياه	**0/98**	**0/97**	**0/96**

سفيد	---	**0/94**	**0/95**
طلايي	---	---	**0/97**



شكل **3**- دندروگرام حاصل از تجزيه كلاستر فنوتيپ هاي بوقلمون بر مبناي فواصل ژنتيكي ني **(1973)**

References

Ali BA and Ahmed MMM, 2001. Random amplified polymorphic DNA in some chicken strains. Proceeding of the Congress of Role of Biochemistry in Environment and Agriculture. Part I, p. 23-31. 6th–8th February, Cairo Univ., Cairo, Egypt.

Ali BA, Ahmed MMM and Aly OM, 2003. Relationship between genetic similarity and some productive traits in local chicken strains. Afr J Biotechnol 2:46-47.

Appa Rao KBC, Bhat KV and Totey SM, 1996. Detection of species - specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD) Genetic Analysis. Biomolecular Engineering 13: 135 - 138.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME and Van Der Noordaa J, 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology 28: 495-503.

Feral JP, 2002. How useful is the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity. J Exp Mar Biol Ecol 268: 121-145.

Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA 70: 3321 – 3323.

Ponsuksili S, Wimmers K and Horstr P, 1996. Comparison of microsatellite and oligonucleotide DNA fingerprinting analyses to study genetics variability. Proceedings of the XX World`s Poultry Congress, New Dehli, India, Vol IV: 7.

Salem HH, Ali BA, Huang TH and Qin DN, 2005. Use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in poultry research. International Journal of Poultry Science 4: 804-811.

Shaikhayev GO, 1995. Extraction of DNA from the whole blood by silica gel. Inc Gene Biology. Moscow.

Sharma D, Appa KB, RV Rao Singh and Totey SM, 2001. Genetic diversity among

chicken breeds estimated through randomly amplified polymorphic DNA. Anim Biotechnol 12: 111-120.

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

Xena de Enrech N, 2000. A decade of the RAPD method: possibilities and limitations for plant genetics relationship studies. Acta Cient. Venez 51: 197-206.

Xi-Guan, Z, Xue-Mei L, Jing-Shun L, Guan-Fu Y and Xian-Hua W, 1998. Population genetic variability of microsatellite polymorphisms and RAPDs in Chinese chicken breeds in Guangdong. Chinese Journal of Genetics 25: 91-97.