مقدمه

اسب یکی از نخستین حیوانات پستاندار اهلی شده می باشد که هم اکنون حدود ۶۲ میلیون رأس از آنها در بیش از ۴۰۰ نژاد، گونه و واریته در سراسر دنیا گسترده اند. اسب برای سالیان متمادی حیوانی همراه و یاریگر انسان بوده است و به عنوان یک حیوان مؤثر در تولید و اقتصاد جوامع بشری نقش داشته است تا اینکه در اواخر قرن نوزدهم میلادی، با ورود ماشین به زندگی انسان، نقش آن در حمل و نقل و تأمین نیروی نیاز انسان کاهش یافت. با این وجود، در دنیای مدرن امروزی این حیوان جایگاه بسیار ویژه ای در ورزش، تفریحات و حتی ساخت دارو و پادزهرهای مصرفی انسان دارد. ایران نیز به لحاظ دارا بودن نژادهای منحصر به فرد از قبیل اسب کردی، عرب، ترکمن، خزر و فارس و نیز موقعیت جغرافیایی مناسب از جایگاه بالایی برخوردار است. اسب کردی دارای خصوصیات برجسته ای همچون استقامت ، قدرت، دست و پای قوی و عضلانی است که در مناطق غربی کشور یافت می شود.

متأسفانه در قرن حاضر جمعیت بسیاری از نژادهای اسب موجود در دنیا کاهش یافته و در این میان جمعیت اسب های کردی در ایران به دلیل نگهداری غیر اصولی و نادرست، بی توجهی به نحوهٔ تولید مثل و نبود مرکز پرورشی مناسب، تعداد آنها خیلی کاهش یافته و در معرض انقراض قرار گرفته است. این در حالی است که هر نژاد یا سویه، حاصل فرآیندهای موتاسیون، رانش ژنتیکی، تکامل و سازگاری مجزایی است که طی قرون متمادی حاصل گردیده است. نابودی گونه ها و از دست رفتن توانایی اکوسیستم ها برای رفع نیازهای روز افزون بشر، نابودی منابع ضروری و مورد نیاز برای رفع احتیاجات امروزه و آینده است. تنوع زیستی به معنای گوناگونی موجودات زنده از انواع گیاهان و جانوران کوچک و بزرگ تا قارچ ها، جلبک ها و انواع موجودات ذره بینی است. موجودات زندهٔ

گوناگون که در سراسر دنیا پراکنده اند از نظرخصوصیات ظاهری، رفتاری، زیست محیطی و از نظر ژن ها بسیار متفاوت می باشد. تنوع ژنتیکی یک مؤلفه اساسی تنوع زیستی و یک جزء حیاتی برای توانایی و حفاظت از منابع طبیعی همچون تنوع گونه ها و اکوسیستم می باشد. تنوع زیستی علاوه بر آنکه توسعه کشاورزی را ممکن می سازد، امکان سازگاری با شرایط جدید را برای گونه هایی که فاقد چنین امکاناتی هستند، فراهم می آورد[۱۱]. احتمالاً متجاوز از ۴۵۰۰ نژاد و سویه حیوان اهلی در جهان وجود دارد، که ذخایر ژنتیک حیوانی جهانی را تشکیل می دهند. ولی بیش از ۳۰٪ آنها در حال انقراض بوده و تعداد بسیار بیشتری نیز، به ویژه در کشورهای در حال توسعه، به واسطه بهره برداری نادرست تهدید می گردند. کاهش تنوع ژنتیکی بصورت از دست رفتن نژادها و سویه ها یک تهدید جهانی است. انقراض گونه ها از زمان پیدایش حیات وجود داشته است. شاید تاکنون ۳۰ میلیارد گونه بوجودآمده باشند اما امروزه تنها ۱ درصد آنها بر روی کرهٔ زمین زندگی می کنند. گرچه انقراض گونه ها یک چرخه طبیعی است، اما از زمان آغاز کشاورزی سرعت بیشتری پیدا کرده است. بنابراین حفاظت از تنوع زیستی یکی از اساسی ترین مسائل غالب کشورهای جهان محسوب می گردد. این امر نیز بدون بررسی و شناخت تنوع زیستی یک منطقه یا کشور و به بیان دیگر شناسایی موجودات مختلف میسر نیست.

در کشورهای توسعه یافته معمولاً یک سازمان رسمی برای هر نژاد وجود دارد اما در کشورهای در حال توسعه چنین سازمانی وجود نداشته و خطر از دست رفتن ذخایر ژنتیکی بسیار زیاد است. به عنوان مثال هنوز هیچ تلاش سازمان یافته ای جهت حراست از این نژاد اسب با ارزش در ایران صورت نگرفته است. بنابراین ضرورت بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت این نژاد جهت تعیین استراتژی مناسب به منظور مدیریت ژنتیکی این نژاد در حال انقراض بیش از هر زمان دیگری احساس می گردد تا در نهایت موجب حفظ ذخایر ژنتیکی و سرمایه ملی کشور گردد.

با شکل گیری روش های نوترکیبی DNA در نیمهٔ دوم دهه۱۹۷۰، که گاه مهندسی ژنتیک نامیده می شود، بیوتکنولوژی زمینه جدیدی را برای رشد پیدا نمود[۴]. با این روش ها می توان اختلافات بین افراد و ژنوتیپ های مختلف را از طریق بررسی مستقیم ژن ها شناسایی نمود. با توسعه PCR توسط Mullis در سال ۱۹۸۶ امکان تکثیر و مطالعه مناطق ویژه ای از ژنوم فراهم شده و بدین ترتیب اشکال جدیدی از چند شکلی های موجود در سطح ژنوم شناسایی گردیده و برای آنالیز تنوع ژنتیکی در داخل و بین جمعیت ها مناسب می باشد. از جمله این نشانگرها که در راستای این تحقیق استفاده گردید نشانگر

RFLP می باشد، که سهم بسزایی را در شناسایی ژن ها داشته و پیشرفت های شگرفی را در ژنتیک مولکولی و تعیین ژنوتیپ از روی توالی DNA ایجاد کرده است. جهت تشخیص شکل های مختلف آللی یک ژن که به یک حیوان انتقال یافته از روش تعیین ژنوتیپ که بر مبنای DNA استوار است استفاده می گردد. تعیین ژنوتیپ بر اساس DNA، هزینه های برنامه های اصلاح نژاد را کاهش داده و باعث کاهش فاصله بین نسلی می گردد. از کاربردهای بیوتکنولوژی در ژنتیک و اصلاح نژاد دام می توان به لقاح آزمایشگاهی، تعیین جنسیت، حیوانات همانند سازی شده، ایجاد حیوانات تراریخت، ژن درمانی، تشخیص بیماری های دامی و انتخاب بر اساس نشانگرها اشاره نمود.

هدف این مطالعه تعیین پلی مورفیسم ژنتیکی ژن سیتوکروم b، DNA میتوکندری در اسب های نژاد کردی می باشد تا پس از بررسی، استراتژی مناسبی برای حفظ این نژاد با ارزش در نظر گرفته شود.

فصل اول

پیشینه و تاریخچه تحقیق

امروزه نژادهای بومی به واسطه داشتن تنوع ژنتیکی مناسب که ناشی از عدم استفاده از سطوح بالای انتخاب مصنوعی و همچنین دارا بودن شایستگی بالا در شرایط طبیعی که نتیجه سازگاری آنها به واسطه انتخاب طبیعی می باشد، مورد توجه علم ژنتیک مولکولی قرار گرفته اند تا بتوان از ذخایر ژنتیکی نژادهای بومی برای بهبود ژنتیکی نژادهای تجاری استفاده نمود[۴].

۱– ۱- جایگاه اسب در تقسیم بندی جانوری

بر اساس رده بندی سیستماتیک جانورشناسی، اسب در سلسله جانوران، دسته طنابداران، زیر دسته مهره داران، رده پستانداران، راسته تک سمی ها، خانواده *Equidea*، جنس *Equus* و گونه *Caballus* قرار دارد.

۱– ۲- خانواده *Equidae* و جنس *Equus*

خانواده *Equidae* شامل تمامی نژادهای اسب به علاوه گونه های مختلف گورخر و الاغ می باشد. جنس *Equus* می تواند به سه زیر بخش تقسیم شود:۱) *Equus* که اسب ها متعلق به این زیر جنس هستند.، ۲) *Asinus* که شامل الاغ های حقیقی هستند و ۳) *Hippotigris* که گورخرها را در بر دارد[۳۴و ۴۴]. اسب های مدرن امروزی در واقع از حیوانات کوچکی تحت عنوان *Eohippus* که حدود ۶۰ میلیون سال قبل می زیسته اند منشاء گرفته اند. امروزه تقریباً ۴۰۰ نژاد مشخص اسب شناسایی شده اند که این نژادها بیشتر بر اساس نوع و کارایی و در برخی موارد بر پایه رنگ، منشاء جغرافیایی و سرعت طبقه بندی

شده اند. به نظر می رسد بسیاری از اسب های مدرن امروزی از اسب های وحشی آسیایی منشاء گرفته باشند. از این رو به نظر می رسد بررسی های ژنتیکی دربارهٔ اسب های آسیایی و نیز ارتباط آنها با سایر نژادها جهت درک بهتر روابط تکاملی در این حیوان ضروری باشد[۱].

۱– ۳- تکامل اسب[1]

در سال ۱۸۴۱ ریچارد آون[2] در پی تحقیق بر روی اجداد اسب های فعلی در اطراف لندن سنگواره هایی از اسب پیدا کرد که متعلق به دوران ائوسن[3](۸۵–۶۰ میلیون سال پیش) یعنی دومین دوره زمین شناسی بود. پس از بررسی و مطابقت با یافته های دوره های بعد زمین شناسی، نخستین اسب بر روی زمین تشخیص داده شد و نام علمی ائوهیپوس[4] بر روی آن گذاشته شد. انتخاب این نام به دلیل شباهت این حیوان با روباه یا خرگوش بوده است که حدود ۴۵–۴۰ سانتی متر قد داشته است. این حیوان علف خوار بوده و در آسیا، اروپا و آمریکای شمالی می زیسته است. با شروع دوره الیگوسن (۴۰–۲۵ میلیون سال پیش) تغییراتی همچون افزایش قد (۷۰–۶۰ سانتی متر) و رشد یکی از انگشت ها در اسب ایجاد شد. این اسب مزوهیپوس نام داشته و به دلیل تغییرات حاصله، نام میوهیپوس را به خود گرفته است. در اواخر دوره میوسن (۱۰ میلیون سال پیش) اسبی ظاهر شده که به اسب های امروزی شباهت زیادی داشته و مری کیپوس نامیده می شد. این اسب فقط بر روی یکی از انگشتان خود تکیه می کرد و قد آن به۹۰–۸۰ سانتی متر رسیده بود. سپس در دوره پلیوسن[5] حیوانی که هپاریون نام داشت پیدا شد. قد هپاریون از یک متر بیشتر شده، یک سم در هر دست و پا داشته و در آسیا، آمریکا و اروپا زندگی کرده است. در دوران بعد از هپاریون، اسب پلیوهیپوس[6] به وجود آمده است که به معنای واقعی تک سمی و ۱۴۰ سانتی متر قد داشت و به شکل واقعی و امروزی آن که اسب پرزوالسکی[7] نام دارد در جنوب سیبری موجود می باشد. بنابراین از زمانی که ژنوم اسب ها مورد مطالعه قرار گرفته است اطلاعات تازه تری به تئوری ها و فرضیه های گفته شده راه یافته که عبارتند از ۱– اسب در قاره آمریکا تولد و تکامل یافته و از طریق قطب شمال به قاره آسیا منتقل شده است. هنگام وارد شدن اسب از قطب شمال، به دسته های

1- Evolution of Horse
2- Richard Owen
3- Eocene
4- Eohippus
5- Pliocene
6- Pliohippus
7- Prezwalski Horse

شرقی، میانی و غربی تقسیم شده و در شرق اسبچه های مغولی، در غرب اسب های خونسرد و دسته ای از اسبچه ها و در بخش میانی اسب های متوسط امروزی به وجود آمده اند.۲- اسب های دسته میانی که در ابتدا ۱۲۰ سانتیمتر قد داشته اند در سراسر خاورمیانه، هندوستان و آسیای مرکزی و جنوب روسیه گسترش یافته اند و به تدریج تکامل یافته و به صورت اسب های امروزی در آمده اند.۳- اولین اسب هایی که حاصل شصت میلیون سال تکامل بوده و در شرق دریای خزر به وجود آمده اند اسب های ترکمن و نسایی می باشند. اسب نسایی به غرب ایران منتقل و از آن اسب کردی امروزی حاصل شده است. با انتقال اسب کردی به غرب و عربستان و مصر، اسب عرب و بارب به وجود آمده اند[۱].

۱- ٤- اهلی شدن اسب[1]

در مورد زمان و مکان اهلی شدن اسب مناقشات زیادی وجود دارد. اگر چه به طور عمده عقیده بر این است که جلگه های (اروپایی-آسیایی) یک مرکز مهم اهلی کردن بوده و حدود سه هزار سال قبل از میلاد انجام گرفته است. اهلی شدن به طور جداگانه در خاورمیانه نزدیک شرق و شرق آسیا اتفاق افتاده است. حرکت و جابجایی بالای اسب ها و استفاده از آن به وسیله انسان در طول تاریخ تا امروز به طول انجامیده است. این عمل باعث ساختار ژنتیکی مبهمی داخل گونه ها بعد از اهلی شدن شده است که این ویژگی در میان اسب های اروپایی بیشتر است[۴۲]. درک تکامل و تنوع ژنتیکی اسب و تقسیم بندی جمعیت ها به وسیله تکاملشان برای حفاظت و گسترش جمعیت های اسب اهلی و وحشی قابل توجه و ضروری است[۴۴]. در اسب ترتیب های نژادی بر اساس شباهت های مورفولوژیکی انجام شده است. علاوه بر این به وسیله منابع تاریخی و باستان شناسی نیز انجام شده است.گونه های اهلی اسب از سه نوع اسب زیر منشاء گرفته اند:

۱- *Equus ferus gmelini*

۲- *Equus ferus przewalski*

۳- *Equus ferus stenonis, robustus or solutreensis*

1- Domestication of horse

۱- ٤- ۱- *Equus ferus gmelini*

بیشترین گونه های مرتبط با آنها اسب های تارپان و پلاتیو می باشد. اسب های تارپان حیواناتی کوچک جثه بوده و رنگ بدن خاکستری، دست و پا دودی تا سیاه، مفصل خرگوشی به پایین کشیده شده، یال فرفری و دمی کوتاه با موهای سیاه داشته است. این اسب در لهستان در سال های ۱۹۱۹-۱۹۱۸ از بین رفته است. در بین سه لاین اجداد اسب های فعلی، تارپان بیشتر از بقیه شکل آن تغییر پیدا کرده است. همه ی گونه های اسب فعلی از تارپان منشاء گرفته اند[۳۴و ۵۵].

۱- ٤- ۲- *Equus ferus przewalski*

مشابه ترین نوع این طبقه، اسب przewalski یا اسب مغول می باشد. پرزوالسکی یکی از گو نه های در حال انقراض و مطرح می باشد. پرزوالسکی شباهت زیادی با اسب اهلی دارند و می تواند برای پی بردن به خصوصیات ویژه اهلی شدن استفاده شود. این اسب بیشترین تعداد کروموزم (۶۶ =۲n) را در بین گونه های اسبی دارد. تنها اسب وحشی راستین زنده در جهان امروز است[۷و ۳۴].

۱- ٤- ۳- *Equus ferus stenonis, robustus or solutreensis*

مشابه ترین نوع آن اسبهای Solutre یا اسب جنگلی است که در هزاران سال پیش، در جنگل ها و مراتع اروپای امروزی وجود داشته و اجداد اسب های باری امروزی می باشد.

همه نژادها و انواع مختلف اسب در نتیجه انتخاب مصنوعی و انتخاب طبیعی برای سازگاری با آب و هواهای محلی و شرایط محیطی به وجود آمده اند. بنابراین اکثر تفاوت های رنگی، اندازه، تناسب بدنی و غیره می تواند در نتیجه اهلی شدن باشد. علیرغم انتخاب مصنوعی به نظر می رسد که نژادهای اسب در مناطق مختلف، در ارتباط با دو قانون دمای محیط نسبت به اندازه بدن (قانون Bergman) و طول بدن (قانون Allen) به وجود آمده باشند. بنابراین اسب های پونی چهار شانه کوچک در شمال اروپا، اسب های سنگین در شمال و مرکز اروپا و اسب های دست و پا باریک در جنوب اروپا وجود دارند. در کل، خصوصیات مورفولوژیکی برای کامل کردن دانش روابط ژنتیکی بین نژادهای اسب امروزی استفاده می شود[۳۴].

۱- ۵- اسب کردی

بر سنگ های کوه بیستون تصویر اسب شگفت انگیزی با استخوان بندی بسیار قوی نمایان است. آن چنان که شایسته یک اسب کوهستان است. این اسب سری بزرگ، استخوان پیشانی و ستیغ های گونه ای بر جسته، گوش ها عقب و سرشار از توانایی و هوش است (شکل ۱–۱). اینها خصوصیات اسبی که چندان بلند نیست ولی چنان قوی و مستقر و تواناست که در طول قرون و اعصار، مرکوب انسان هایی است که در نبرد بی امان زندگی برای زنده ماندن و برتری جویی جنگیده و به کار مشکل زندگی اشتغال داشته اند. نام این نژاد اسب نسایی است و امروزه وجود ندارد ولی گاهی سری با ستیغ های گونه ای بر جسته و چشمانی سنگین و پوزه ای دراز در اسبی دیده می شود که یادگار نیاکان او، همان اسب نسایی است. از نژاد نسایی به معنای خالص آن کمتر اسبی باقی مانده است ولی از نتاج آن دو تیره وجود دارد که یکی در شرق و دیگری در غرب مناطق کردستان است. تیره شرقی شباهت های فراوانی با نسایی باستانی دارد و به نام اسب کردی مشهور است که خصوصیات زیر را دارد[۱].

- گوش ها اندکی عقب
- پیشانی برجسته و گاهی مستقیم
- سر سنگین و استخوان بینی دراز
- چشم ها عمیق و خشمگین
- منخرین تنگ و اتصال سر و گردن خشن
- گردن قوی، سینه از جلو به حد قابل توجه عضلانی
- دست و پا کوتاه و بسیار محکم با اندک مو در ناحیه شاخ مو
- بسیار با هوش، مطیع، صبور و در راهپیمایی در زمین های کوهستانی توانا

اسب کردی فوق العاده قانع و کم خوراک و در زمستان های سخت نواحی کوهستانی کردستان که هیچ وسیله نقلیه ای قادر به حرکت و عبور نیست عامل انتقال افراد و بیماران از روستایی به روستایی یا به مرکز بخش است و دلیل ماندگاری آن را می توان همین مقاومت بی مانند در کوهستان دانست. اسب کردی در میدان های چوگان به عنوان بهترین اسب انتخاب شده است، زیرا پر نفس است و نه تنها به زودی از پا در

نمی آید بلکه به علت قوی بودن اعضاء و دست و پا، کمتر به بیماری های رایج میدان چوگان مبتلا می شود. تیره غربی اسب کردی با از دست دادن قسمتی از شکل ظاهری و حفظ اندام ها توانسته است خود را با محیطی که با قسمت شرقی اختلاف دارد، سازگار نماید. گاهی گردن و زمانی چشم ها به پدران شباهت پیدا می کند در حالی که عضلانی بودن سینه و ناحیه قدامی، استحکام دست و پا، قاب و قلم هم چنان بر جای مانده است. در عوض به بلندی قد آن افزوده شده و سرعت بیشتری یافته است. تیره غربی اسب کرد به نیرومندی تیره شرقی آن نیست ولی از نظر اندام شناسی از آن زیباتر است. چشم ها، پیشانی و گردن به اسب های عرب شباهت زیادی دارد اصطلاحاً این تیره را اسب جاف می گویند که قومی از اقوام شرقی کردستان است[۱].

شکل ۱-۱ : نمایی از اسب کردی

بنابراین حفاظت و حراست از نژادها در مرحله اول ارزش قابل توجهی برای انسان و طبیعت دارند. چون این نژادهای بومی بخشی از تنوع زیستی بوده و وابسته به اکوسیستم خاص و مقاوم به بیماری های آن ناحیه هستند. و در آینده برای استراتژی های اصلاح دام و مدیریت اهمیت دارند[۲۰]. اسب کردی به دلیل خصوصیات منحصر به فرد (هوش بالا، پر نفس، صبور و مقاوم به مسافت های طولانی) نه تنها از نژادهای دیگر کشورهای دنیا که جزء اقلام صادراتی آنها می باشند، دست کمی ندارد، بلکه جزو معدود نژادهای برتر دنیا می باشد. منشاء اسب کردی منطقه ای است به نام نساء در دامنه کوههای زاگرس و این موضوع به ۵۰۰ سال قبل از میلاد مسیح بر می گردد[۱].

۱- ٦- نشانگرهای ژنتیکی[1]

هر آنچه در میان افراد، لاین ها، جمعیت ها، گونه ها، نژادها و یا سویه های مختلف به لحاظ ژنتیکی تفاوت داشته و سبب تمایز آنها از یکدیگر گردد به عنوان نشانگر ژنتیکی شناخته می شود. چند شکلی بودن[2] و توارث پذیری از جمله شرایط لازم برای یک نشانگر ژنتیکی می باشد[۴].

از مهم ترین ویژگی های یک نشانگر برتر می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- تشخیص آسان همه ی فنوتیپ های ممکن (افراد هتروزیگوت و هموزیگوت)

۲- نداشتن تأثیر بر روی آلل های سایر جایگاههای ژنی (اپیستازی)

۳- تظاهر در مراحل اولیه نمو

۴- حداقل بودن یا عدم اثر متقابل با نشانگرهای دیگری که می تواند به طور هم زمان در یک جمعیت در حال تفرق مورد استفاده قرار گیرند.

۵- پیوستگی بسیار نزدیک با ژن های مورد نظر

۶- توارث پذیری کامل

۷- سادگی اندازه گیری

۸- داشتن حداقل هزینه[۲و ۳۸].

۱- ۷- انواع نشانگرها

۱- ۷- ۱- نشانگر مورفولوژیکی: نشانگرهایی هستندکه در صفات ظاهری حیوان و یا در اثر جهش های قابل رؤیت در ارگانیسم ها به وجود می آیند.

۱- ۷- ۲- نشانگر سیتولوژیکی: نشانگرهایی بر مبنای تنوع ساختمانی کروموزم می باشند.

۱- ۷- ۳- نشانگر مولکولی: دارای دو نوع پروتئینی و DNA هستند.

1- Genetic Markers
2- Polymorphism

۱- ۷- ۳- ۱- نشانگر پروتئینی: تفاوت های موجود در ردیف های DNA دو موجود، منتهی به ترتیب آمینواسیدی متفاوت و به صورت پروتئین هایی با اندازه و ساختارهای متفاوت است که از راههای مختلف بیوشیمیایی قابل ردگیری و مطالعه است (مثل آیزوزایم ها).

۱- ۷- ۳- ۲- نشانگر DNA: نشانگرهایی هستند که منعکس کننده مستقیم تنوع در ساختار ژنتیکی (ساختمان DNA) هستند. ولی تغییرات DNA در درون ژن ها رخ می دهد و با تجزیه و تحلیل مستقیم DNA قابل شناسایی هستند[۵].

۱- ۸- انواع نشانگرهای DNA

۱- ۸- ۱- نشانگرهای غیر مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR[1])

۱- ۸- ۱- ۱- RFLP[2]

ابداع و معرفی این تکنیک بدون تردید نقش اساسی در تحول علم رده بندی ایفا کرده و موجب پیدایش شاخه های جدیدی در علم سیستماتیک موجودات زنده گردید. امروزه این مارکر به عنوان یکی از تکنیک های بسیار قوی در بیولوژی مولکولی محسوب شده و امتیاز عمده این تکنیک در تشخیص ژن های مشترک بین گونه ها یا ژن های حفاظت شده می باشد. این تکنیک عمدتاً متأثر از عملکرد آنزیم های محدود کننده بوده و تفاوت نوکلئوتیدی قطعات DNA را در افراد نشان می دهد[۲و ۴۵]

مزایای RFLP

۱- این نشانگرها هم بارز هستند و امکان تشخیص افراد خالص از ناخالص را فراهم می کنند.

۲- تکرارپذیری، دقت و قابلیت اعتماد این نشانگرها بالاست.

۳- این نشانگرها تحت تأثیر عوامل محیطی داخلی و خارجی قرار نگرفته و صد در صد ژنتیکی می باشد.

۴- نتایج RFLP به راحتی قابل نمره دهی و تفسیر می باشد.

۵- فراوانی این نشانگرها بالاست.

1- Polymerase Chain Reaction
2- Restriction Fragment Length Polymorphism

۶- امروزه تعداد زیادی از آنزیم های محدودالاثر با قیمت مناسب در دسترس اند که امکان شناسایی پلی مورفیسم ژن را فراهم می کنند.

۷- قابلیت کاربرد در تمام بافت های بدن و در تمام مراحل رشد.

۸- عدم اثرات پلیوتروپی[۲و ۳۸]

معایب RFLP

۱- به زمان و هزینه زیاد نیاز دارند.

۲- نیازمند کاوشگرهای رادیواکتیو می باشند.

۳- نیاز به DNA با کمیت وکیفیت خوب دارد.

۴- عدم توانایی در تشخیص ارقام بسیار نزدیک.

۵- سطح پلی مورفیسم کم بوده و در هر سنجش بیش از چند لوکوس شناسایی نمی شوند[۳۹].

۱-۸-۱-۲- RLGS [1]

بر مبنای این فرضیه که نقاط اختصاصی آنزیم های محدودالاثر به عنوان نشانه و وجه تمایز ارقام و افراد به کار گرفته می شوند، این روش برای تجزیه و تحلیل DNA ژنوم به کار می رود. می توان از این روش برای طبقه بندی گیاهان، مطالعات فیلوژنتیک، تهیه نقشه های ژنتیکی و مطالعات دیگر ژنومی استفاده نمود. زیرا در این روش به آغازگر نیازی نیست. داشتن کیفیت بالای DNA و هضم ناقص DNA توسط آنزیم های محدودالاثر باعث ایجاد نتایج تکرار ناپذیر شده و پیچیدگی فوق العاده قرائت و تفسیر نتایج حاصل از پرتو نگاری از معایب این روش است[۳۸].

۱-۸-۱-۳- VNTR [2] و ماهوارک ها[3]

این دو نشانگر بر اساس تفاوت در تعداد ردیف های با تکرار متوسط در DNA ژنومی موجودات مورد مقایسه ابداع شده اند. از نظر تکنیکی مبتنی بر استفاده از کاوشگرهای مصنوعی و کاربرد مواد

1- Restriction Landmark Genomic Scanning
2- Variable Number of Tandem Repeats
3- Minisatellites

رادیواکتیو و روش ساردن می باشند. کاربرد اصلی آنها در انگشت نگاری است. دشواری زیاد قرائت، امتیازبندی و تفسیر نتایج به دلیل وجود تعداد زیاد باند بر روی خود پرتونگارها موجب عدم کاربرد وسیع این نشانگرها گردیده است[۳۹و ۴۵].

۱- ۸- ۲- نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

تکثیر ناحیه ای از DNA که بین دو توالی مشخص DNA دیگر قرار گرفته، واکنش زنجیره ای پلیمراز یا PCR نامیده می شود. واکنش زنجیره ای پلیمراز در سال ۱۹۸۵ توسط Saiki و همکاران معرفی شد. در مدتی کمتر از ۱۰ سال انقلابی را در زمینه زیست شناسی مولکولی ایجاد کرد. زیرا با استفاده از این تکنیک تهیه نسخه های متعدد از یک ژن و بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در یک قطعه DNA در زمان کوتاه میسر گردید[۳].

۱- ۸- ۲- ۱- ALP[1]

ALP قادر به نمایش جهش های حذف و اضافه می باشد. ولی واژه ALP الزاماً زمانی به کار برده می شود که پلی مورفیسم مشاهده شده باشد. اهمیت استفاده از این نشانگر به دلیل سریع و ارزان بودن آن نسبت به سایر روش ها و همچنین عدم احتیاج به میزان زیاد DNA و کاوشگر و کم بودن ثبت تفاوت های ژنتیکی عیب عمده این نشانگر است[۳۸و ۴۵].

۱- ۸- ۲- ۲- RAPD[2]

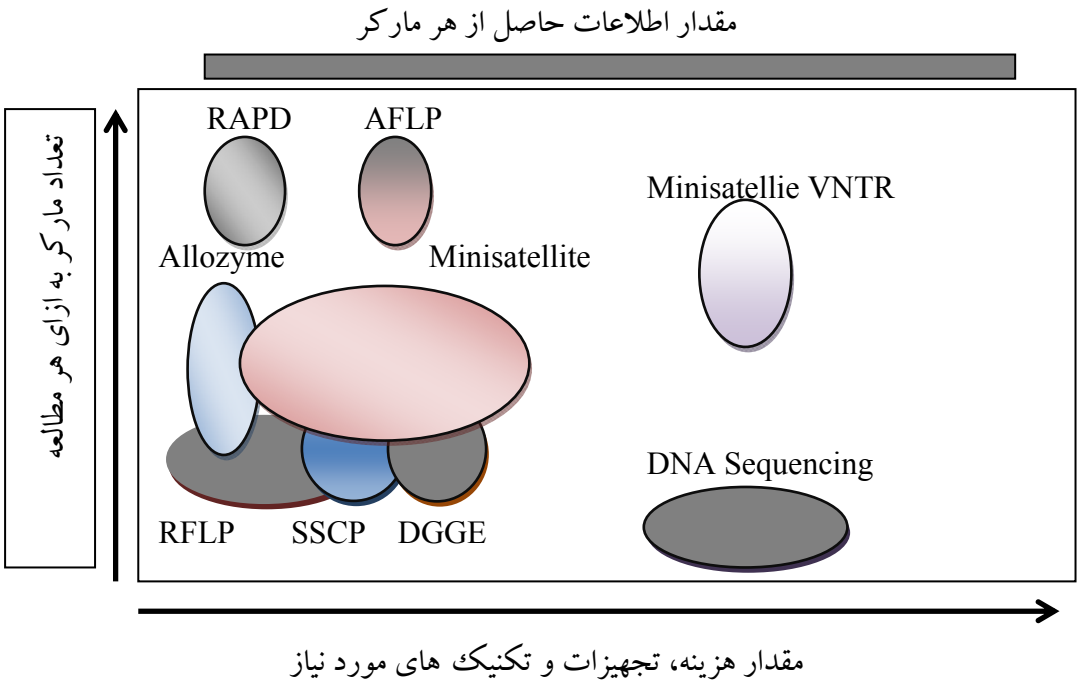
در این روش از تک آغازگرهایی به طول ۱۰-۸ نوکلئوتید که ردیف بازی آن به طور قراردادی تعیین می گردد استفاده می شود. همچنین در این روش از آغازگری با توالی اختیاری استفاده می شود. ماهیت فرآورده های تکثیر شده به توالی آغازگر، طول آغازگر و توالی DNA بستگی دارد. هزینه کم، کاربرد و سرعت تولید و اجرای آنها و همچنین امکان بررسی هم زمان چندین لوکوس در ژنوم نمونه از مزیت های این نشانگر است. غالب بودن این نشانگر و همچنین دشواری امتیازبندی و عدم تشخیص سیستم آللی مهمترین معایب استفاده از RAPD است[۳۸و ۴۵].

1- Amplicon Length Polymorphism
2- Random Amplified Polymorphic DNA

۱- ۸- ۲- ۳- AFLP[1]

AFLP روشی فوق العاده مطمئن و تکرارپذیر است. این روش به آسانی در جنبه های مختلف بیولوژی مولکولی تا به کارگیری در اصلاح نباتات و برنامه بهنژادی می تواند مورد استفاده واقع شود. عیب عمده این روش غالب بودن آن است که موجب عدم امکان تشخیص افراد خالص از ناخالص می گردد[۴۵].

در شکل ۱–۲ مارکرها براساس هزینه یا امکانات و تجهیزات مورد نیاز و تعداد مارکر مورد نیاز در هر مطالعه و همچنین بر میزان نتایج حاصل دسته بندی شده اند. تعیین توالی DNA با بیشترین میزان خروجی اطلاعات، بالاترین هزینه را دارد. از طرفی دیگر RFLP از نظر مقدار اطلاعات قبل از تعیین توالی و ریزماهواره ها قرار می گیرد اما بسیار کم هزینه می باشد.



شکل ۱–۲ : مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قیمت، نیاز به تجهیزات و اطلاعات حاصله از آنها

1- Amlified Fragment Lengh Polymorphism

از نشانگرهای مولکولی در مطالعات مربوط به انگشت نگاری ژنتیکی، تجزیه فیلوژنی، رده بندی و شناسایی افراد، نقشه یابی ژنی، آزمون والدین، نقشه های لینکاژی و فیزیکی و ردیابی ژنی استفاده های بسیار زیادی می شود. طبق تحقیقات انجام گرفته بر روی مارکرهای مولکولی در سال های اخیر، نتیجه کلی آنها این است که هیچ مارکر ژنتیکی وجود ندارد که در همه حالات، کاربردها و تحقیقات از هر حیث بهترین باشد[۱۱].

۱- ۹- آنزیم های محدودالاثر[1]

در دهه گذشته ژنتیک دانها و تاکسنومیست ها، اندونوکلئازهای محدودالاثر را نسبت به توالی یابی[2] برای بررسی تنوع بین و میان گونه ها در قطعات ویژه ای از DNA بیشتر استفاده کردند[۲۴]. اگرچه ارزیابی غیر مستقیم تنوع تغییرات به دست آمده با اندونوکلئازهای محدودالاثر با اشکالات زیادی همراه بوده است اما به دست آوردن اطلاعات توالی یابی هم مشکل است[۳۴]. این آنزیم ها اولین بار طی بررسی اثرات باکتریوفاژها بر روی باکتری ها به دست آمدند. به این صورت که باکتریوفاژهایی که یک سوش باکتری را آلوده می کردند قادر به تکثیر در سوش های دیگر همان گونه باکتری نبودند. این پدیده، محدود کننده میزبان و آنزیم دخیل در آن را آنزیم محدودالاثر نامیدند. بعدها ثابت شد که این آنزیم ها، DNA باکتریوفاژها را در نقاط خاصی برش می دهند. نقاطی که به وسیله این آنزیم ها شناسایی می شوند معمولاً حدود ۴ تا ۶ جفت باز می باشند یکی از مهمترین خصوصیات این توالی های ۴ تا ۶ جفت بازی این است که به صورت قرینه یا در اصطلاح پالیندروم می باشند. منشاء اکثر آنزیم های محدودالاثر، باکتری ها می باشند و تاکنون حدود۲۰۰ نوع آنزیم محدودالاثر جدا سازی شده و توالی های مورد شناسایی آنها نیز تعیین شده است[۳و ۲۴].

انواع آنزیم های محدودالاثر: بر اساس چگونگی وجود سیستم متیلاسیون و نحوه عمل آنزیم های محدودالاثر، این آنزیم ها را به سه گروه عمده تقسیم می شوند: نوع I، II و III

الف- آنزیم های محدودالاثر نوع I: این آنزیم ها وزن مولکولی بالایی در حدود ۳۰۰۰۰۰ دالتون داشته و از واحدهای غیر همسان تشکیل یافته اند. این آنزیم ها برای فعالیتشان به ATP، Mg^{+2} و SAM نیاز دارند. علاوه بر خاصیت نوکلئازی خاصیت متیلاسیون نیز دارند. به این صورت که نواحی خاصی را

1- Restriction Enzymes
2- Sequencing

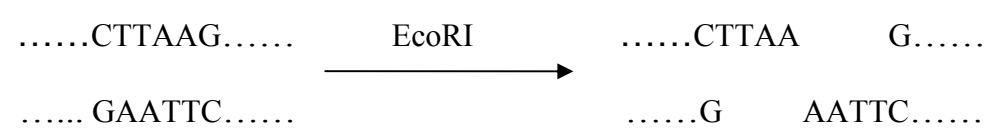
شناسایی می کنند اگر در نواحی توالی هر دو رشته متیله باشند، آنزیم بدون هیچ گونه تغییری عبور می کند و اگر در محل مورد شناسایی یکی از رشته ها متیله شده باشد آنزیم رشته مقابل را نیز متیله می کند. ولی اگر هیچ یک از دو رشته متیله نباشد، آنزیم DNA را به عنوان DNA خارجی شناسایی کرده و آن را برش می دهد. نکته مهم در مورد برش به وسیله آنزیم های محدودالاثر نوع I این است که، آنزیم ها نواحی خاصی را از نظر متیلاسیون مورد شناسایی قرار داده ولی برش را در این نواحی انجام نمی دهند بلکه به طور غیر اختصاصی DNA را برش داده و آن را قطعه قطعه می کنند.

ب- آنزیم های محدودالاثر نوع II: این آنزیم ها وزن مولکولی پایینی در حدود ۲۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ دالتون داشته و از زیر واحدهای همسان تشکیل یافته و برای فعالیتشان به Mg^{+2} نیاز دارند. این آنزیم ها خاصیت متیلاسیون نداشته و توالی های خاصی را می شناسند، اگر این توالی ها متیله شده باشند، این نواحی را برش نمی دهند ولی اگر این توالی ها متیله نشده باشند، آنها را برش و انتهای صاف و یا چسبناک به وجود می آورند. این آنزیم ها نقش اصلی را در تحقیقات زیست مولکولی به عهده دارند[۶].

ج- آنزیم های محدودالاثر نوع III: این آنزیم ها وزن مولکولی در حدود ۲۰۰۰۰۰ دالتون دارند و از واحدهای غیر همسان تشکیل یافته اند. این آنزیم ها به دلیل عدم نیاز به ATP، Mg^{+2} و SAM از دو گروه دیگر متفاوت می باشند. این کلاس از آنزیم ها، کمیاب تر می باشند[۶ و ۲۴].

به طور کلی دو نوع برش به وسیله آنزیم های محدودالاثر ایجاد می شود و منجر به تولید قطعاتی از DNA با انتهای مختلف می گردد.

۱- انتهای چسبناک[1]: این برش ها به وسیله آنزیم هایی مثل EcoRI و HindIII ایجاد می شود. همان طورکه در شکل زیر برای آنزیم EcoRI نشان داده شده است پس از برش با این آنزیم، قطعاتی حاصل می شوند که در انتها تک رشته ای هستند و قادرند که بار دیگر به وسیله پیوندهای هیدروژنی به هم متصل شوند.



1- Stiky ends

۲- انتهای صاف[1]: این برش ها به وسیله آنزیم های مانند HpaI و SmaI ایجاد می شود. بر عکس آنزیم های فوق، این آنزیم ها رشته DNA را به طور عمودی برش می دهند و در نتیجه قطعاتی با انتهای صاف به وجود می آورند که قادر به اتصال مجدد به یکدیگر نمی باشند[۵].

۱- ۱۰- PCR (واکنش زنجیره ای پلیمراز)

واکنش زنجیره ای پلیمراز تکنیکی برای تکثیر داخل آزمایشگاهی توالی های خاصی از DNA به وسیله بسط آغازگرهای مکمل رشته های DNA می باشد. این تکنیک در سال۱۹۸۶ به وسیله کری مولیس[2] توسعه یافت. به دلیل کاربردها و مزیت های آن به سرعت در زیست شناسی مولکولی گسترش پیدا کرد. امروزه این روش تقریباً در تمامی آزمایشگاههای زیست مولکولی جزو کارهای متداول می باشد و به صورت اتوماتیک انجام می شود. این تکنیک تمامی مشکلات قبلی در زیست مولکولی که ناشی از عدم دسترسی به مقادیر زیاد از DNA یکسان بود را برطرف کرد. برای مثال قبلاً برای به دست آوردن نسخه های متعدد از یک ژن خاص می بایست این ژن را به داخل حامل مناسب وارد کرده و به وسیله یک باکتری تکثیر کنند ولی امروزه این کار را به سادگی و با استفاده از PCR انجام می دهند. PCR از نظر اصول علمی تشابه زیادی به همانندسازی DNA دارد و در واقع برگرفته از آن است. یادآوری می شود که DNA پلیمراز، DNA تک رشته ای را در جهت ′۵⟵′۳ به عنوان الگو مورد استفاده قرار می دهد و رشته مکمل را در جهت ′۳ ⟶ ′۵ می سازد. همچنین DNA پلیمراز برای شروع، احتیاج به یک قطعه اولیه یا پرایمر (آغازگر) دارد. از محدودیت های PCR می توان به لزوم مشخص بودن ترتیب ناحیه مورد تکثیر و توانایی تکثیر تنها ناحیه ای از DNA که ما بین دو پرایمر واقع شده است را نام برد[۳، ۵ و ۲۶].

۱- ۱۰- ۱- پرایمرها[3]

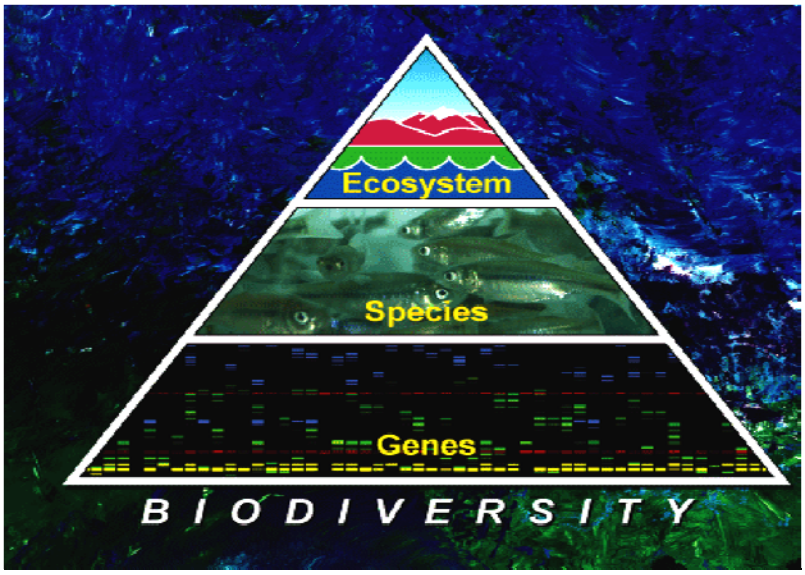
پرایمرها الیگونوکلئوتیدهایی مصنوعی هستند که به طور معمول ۱۸ تا ۳۰ باز دارند. پرایمرها، مولکولهای DNA تک رشته ای کوتاه هستند که هر کدام از آنها مکمل یک انتهای توالی DNA هدف می باشند. از خصوصیات یک نشانگر می توان به تک رشته ای بودن آن، اختصاصی بودن و نشاندار بودن اشاره نمود[۵].

1- Flush end
2- Kary Mulis
3- Primers

۱- ۱۱- تنوع ژنتیکی و اهمیت آن

تنوع ژنتیکی دامنه ای از تفاوت های قابل توارث یک صفت یا مجموعه ای از صفات بین افراد در داخل یک گونه و بین افراد داخل یک جمعیت یا بین جوامع مختلف می باشد. تنوع ژنتیکی را به طور معمول با استفاده از عباراتی همچون پلی مورفیسم، متوسط هتروزیگوسیتی و تنوع آللی بیان می کنند. بقای تنوع ژنتیکی به طور عمده بر حفاظت از جانداران موجود در هر منطقه بستگی دارد. حفظ تنوع ژنتیکی به دو دلیل اهمیت دارد: ۱- تغییر شرایط محیطی فرآیندی است که همواره در جریان بوده و تنوع ژنتیکی برای سازگاری جمعیت ها با چنین تغییراتی لازم است. ۲- فقدان تنوع ژنتیکی غالباً با افزایش همخونی و کاهش سازگاری همراه است[۴ ، ۱۱ و ۱۷].

تنوع ژنتیکی موجود در یک جمعیت توانایی تکامل یافتن جمعیت را منعکس می کند. محیط های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی دائماً باعث تغییراتی در دراز مدت و کوتاه مدت بر روی تنوع ژنتیکی می شوند[۱۱]. تنوع ژنتیکی، هم تنوع درون نژادی و هم تنوع بین نژادی را شامل می شود. اصلاحگران از تنوع ژنتیکی برای رسیدن به حیوانات اهلی منطبق بر احتیاجاتشان، بهره گیری می نمایند. فقدان تنوع، قدرت انتخاب برای رفع نیازهای غیر قابل پیش بینی در آینده را محدود می سازد[۵۳]. مقدار و نوع تنوع ژنتیکی در یک جمعیت تحت تأثیر برخی عوامل همچون انتخاب، موتاسیون، رانش ژنتیکی، همخونی، اندازه جمعیت و جریان ژنی (مهاجرت) قرار می گیرد. این فاکتورها دارای اثرات عمومی هستند. برای مثال جهش همیشه مقدار تنوع را افزایش می دهد و رانش ژنتیکی و همخونی همواره مقدار تنوع را کاهش می دهند. فاکتورهای دیگری همچون انتخاب و جریان ژنی ممکن است منجر به افزایش یا کاهش تنوع ژنتیکی شوند. ترکیب دو یا بیشتر از این عوامل می تواند منجر به تولید تنوع ژنتیکی با مقادیر متفاوت شود[۴ ، ۱۱ و ۱۷]. تنوع زیستی گسترده ای در حیات دیده می شود که در سه سطح اکوسیستم، گونه و ژن قابل بررسی است (شکل ۱–۳). وجود تنوع در سه سطح، عامل اساسی و مورد نیاز برای جمعیت ها در جهت تکامل و مقابله با تغییرات محیطی و مهترین عامل جلوگیری از انقراض موجودات زنده و حفاظت از تنوع زیستی محسوب می شود و کاهش آن اغلب سبب کاهش قدرت تولید مثل و ماندگاری می شود[۱۱].



شکل ۱–۳: هرم تنوع زیستی در سه سطح ژن، گونه و اکوسیستم

آگاهی از تکامل، رده شناسی و تنوع ژنتیکی گونه ها برای فعالیت های حفاظتی مناسب ضروری است. هدف هر گونه برنامه های حفاظتی، محافظت از پتانسیل تکامل می باشد که نیازمند دسته بندی جمعیت ها بر اساس اهمیت تکاملشان می باشد[۴۴].

در دهه های اخیر با افزایش روند نابودی محیط زیست در جهان توجه متخصصان به سطح سوم مسئله تنوع زیستی یعنی تنوع در سطح ژن معطوف شده است چون از دست دادن تنوع در سطح ژن می تواند به ترتیب سبب از بین رفتن تنوع ابتدا در سطح گونه و سپس در سطح اکوسیستم گردد. مطالعه تنوع ژنتیکی فرآیندی است که شامل تجزیه و تحلیل تفاوت های بین افراد یا گروههایی از افراد یا جمعیت ها به یک یا چند روش خاص می باشد. داده های این تجزیه و تحلیل اغلب عددی و در بسیاری ازحالات ترکیبی از انواع مختلف متغیرها است. از مهمترین انواع این داده ها می توان به داده های شجره افراد، خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و نشانگرهای DNA اشاره نمود. از آنجایی که هر کدام از این داده ها اطلاعات متفاوتی ارائه می دهند، انتخاب روش تجزیه و تحلیل بستگی به هدف آزمایش، مقدار دقت مورد نیاز، منابع و تکنیک های موجود و محدودیت های زمانی و عملی دارد[۶ ، ۱۹ و ۳۴]. ژن ها بخش های از ژنوم یک موجود زنده بوده که حامل اطلاعات مسئول تعیین ساختار موجود زنده هستند. ژن ها و ویژگی هایی که به وسیله آنها کد می شوند از طریق والدین به فرزندان منتقل می شوند. از نسلی

به نسل بعد سازوکارهای مولکولی شناخته شده ای، ژن ها را تجدید سازمان، مضاعف و تغییر داده و باعث ایجاد تنوع ژنتیکی شده است[۴۵].

تکامل زیستی به تغییرات تجمعی که در یک جمعیت در طول زمان اتفاق می افتد اشاره دارد. این تغییرات در سطح ژنتیکی به صورت جهش یا نوترکیبی به طرق مختلف اتفاق می افتد. گاهی افراد صفاتی را به ارث می برند که به آنها امکان ماندگاری و تولید مثل بیشتر در محیط زیست می دهد. این صفات تمایل به افزایش فراوانی در جمعیت آن موجود زنده دارند. این در حالی است که فراوانی صفات نامطلوب در جمعیت به تدریج کاهش می یابد. این فرایند به عنوان یکی از مهم ترین مکانیسم های تکاملی و با نام انتخاب طبیعی شناخته می شود. در کنار این مکانیسم، مکانیسم های دیگری همچون رانش ژنتیکی در تکامل جمعیت ها ایفای نقش کرده و باعث تثبیت فراوانی یک آلل در طول نسل های متمادی می گردد. یادآوری این نکته لازم است که تغییرات غیر ژنتیکی (محیطی) یک موجود زنده در طول حیات به نسل های بعدی انتقال نمی یابد[۱۱].

حفاظت و بهره برداری از منابع ژنتیکی در حقیقت ماده خام و دستمایه اصلی پژوهشگران برای تولید فرآورده های زیستی می باشد، که بدون آن فناوری زیستی دستاوردی نخواهد داشت. بنابراین به موازات گسترش فنون بیوتکنولوژی، حفاظت ذخایر ژنتیکی را باید به عنوان سرمایه و ثروتی که روز به روز ارزش بیشتری پیدا می کند، در رأس اولویت های تحقیقات قرار داده و با یک برنامه ملی و همه جانبه امکان حفاظت و بهره برداری هر چه بهتر از ژن های موجود در تنوع زیستی کشور را در برنامه های فناوری زیستی موجود در کشور فراهم نمود. سطح جغرافیایی گسترده و تنوع اقلیمی کم نظیر و موانع طبیعی گوناگون سبب شده است تا در طول زمان تنوع ژنتیکی بی نظیر در کشور ایجاد و تثبیت شود. تنوع ژنتیکی موجودات زنده سرمایه گرانبهایی است که در طول تاریخ پدید آمده و حاصل نتیجه بسیار طولانی از اثر متقابل ژنتیک و محیط است که از زمان های گذشته به نسل امروزی به ارث رسیده است. حفاظت، شناسایی و استفاده پایدار از این تنوع ژنتیکی فوق العاده برای موفقیت هر برنامه بهنژادی و یا زیست فناوری امری حیاتی است.