13 (1) 119-128, Spring 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Assessment of genetic structure of common buzzard species in East Azerbaijan using PCR-RAPD Markers

Javad Ghahari* [1], Shirin Mahoodi [2]

[1] *General Department of Environmental Protection of East Azerbaijan, Tabriz, Iran*
[2] *Department of Environmental Science, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran*

Key Words:
PCR-RAPD
Buzzard
Genetic diversity
East Azarbayjan

Abstract

Introduction: The discussion over the conservation of the genetic resources of wild species is a hot topic in scientific circles around the world. The objective of the present study was the identification of genetic diversity of captive Buzzard one of the predatory birds in East Azerbaijan province using PCR-RAPD markers.

Materials & Methods: For this purpose, In the first step, blood sampling was performed from the wing vein of 10 birds and DNA extraction and subsequently 15 arbitrary primers were applied for PCR-RAPD technique.

Result: After electrophoresis, selected primers exhibited sufficient variability, which yielded overall 150 distinct bands, 29 polymorphic bands, for details, range of a number of bands per primer was 11 to 22, and product size varied between 234 to 1230 bp. Highest and lowest polymorphic primers were OPA-14, OPA-13, respectively as a general conclusion, analyses using more regions, more birds, and more DNA markers will be useful to confirm or to reject these findings.

Conclusion: However, the management implications and decisions regarding the genetic conservation of this bird require further sampling from multiple populations.

* Corresponding Author's email: ghahari1979@yahoo.com
Received: 14 February 2020; Reviewed: 8 May 2020; Revised: 30 May 2020; Accepted: 10 June 2020
(DOI): 10.22034/aej.2020.132966

مقاله پژوهشی

ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت پرنده شکاری سارگپه معمولی در استان آذربایجان‌شرقی با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی با ماهیت تصادفی PCR-RAPD

جواد قهاری[1] ، شیرین محمودی[2]*

[1] *اداره کل حفاظت محیط زیست آذربایجان‌شرقی، تبریز، ایران*

[2] *گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه تهران، کرج، ایران*

کلمات کلیدی

سارگپه معمولی
استان آذربایجان‌شرقی
تنوع ژنتیکی
PCR-RAPD

چکیده

مقدمه: مباحث پیرامون، حفاظت ذخایر ژنتیکی گونه‌های وحشی بحث داغ محافل علمی جهان می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی کاربری تجزیه وتحلیل نشانگرهای PCR-RAPD برای ارزیابی و تخمین ساختار ژنتیکی، جمعیت پرنده شکاری سارگپه معمولی که یکی از پرندگان شکاری که به‌دلیل شکار بی‌رویه در معرض تهدید جدی است در استان آذربایجان‌شرقی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بدین‌منظور، در مجموعه، ۱۵ عدد از آغازگرهای تصادفی شرکت اپرون، برای تکثیر تعداد ۱۵۰ جایگاه در ده پرنده مورد استفاده قرار گرفت. در گام اول، خونگیری از ورید بالی سارگپه‌ها صورت پرندگان محبوس در قفس صورت گرفت و استخراج DNA از خون کامل توسط پروتکل موجود انجام پذیرفت.

نتایج: پس از امتیازدهی باندهای تولیدشده در روی ژل، آغازگر، آغازگرOPA-14، بالاترین میزان باند تولیدی(۲۲باند) و آغازگرOPA-13 کم‌ترین میزان باندی (۹ باند) را روی ژل متافاور آگاروز ٤ درصد و الکتروفورز افقی نشان دادند. هم‌چنین، با تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار پاپ ژن، میزان هتروزیگوتی مشاهده شده داخل نمونه‌ها در حد ۰/۰۰۰۸±۰/٤٥ برآورد شد. هم‌چنین محاسبه فاصله ژنتیک و تجزیه کلاستر، نشان داد که از لحاظ ژنتیکی نمونه‌های موردمطالعه با یکدیگر تفاوت ژنتیکی دارند. اما شباهت‌ژنتیکی بالایی بین آن‌ها برقرار است.

نتیجه‌گیری و بحث: با این وجود، استنتاجات و تصمیم‌گیری‌های مدیریتی در مورد حفاظت ژنتیکی این پرنده نیازمند نمونه‌گیری‌های بیش‌تر از مناطق جغرافیایی متعدد می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ghahari1979@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۲۵ بهمن ۱۳۹۸؛ تاریخ داوری: ۱۹ اردیبهشت ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۰ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۲۱ خرداد ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.132966

مقدمه

تنوع ژنتیکی، به‌عنوان یکی از سطوح اولیه تنوع زیستی و لازمه بقای طولانی مدت گونه‌ها، جمعیت‌ها و اکوسیستم‌ها شناخته می‌شود (Primack، ۲۰۱۴). تنوع، در سطح ژن هم‌چنین برای برازش و بقای افراد، پویایی جمعیت‌ها و توانایی گونه برای سازگاری با تغییرات محیطی حیاتی می‌باشد (Allendorf و همکاران، ۲۰۱۲؛ Frankham و همکاران، ۲۰۱۰). بنابراین، حفاظت از تنوع ژنتیکی به تنهایی اهمیت دارد. محققان در بسیاری از رشته‌ها شامل بوم‌شناسی و تکامل و حفاظت علاقه‌مند هستند که عوامل دخیل در شکل‌گیری الگوهای تنوع ژنتیکی در طبیعت را شناسایی کنند. مطالعه درک و شناخت تنوع ژنتیکی از حدود صد سال پیش آغاز شده است (Hardy، ۱۹۰۸) تکنیک‌های آزمایشگاهی هنوز تا آن حد پیشرفت نکرده‌اند. متعاقباً، بیش‌تر کارهای پیشین در زمینه ژنتیک جمعیت تئوری و مفهومی بودند و بعداز کشف ساختار DNA در سال ۱۹۵۳ توسط کریک (Francis Crick) و جیمز واتسون (James Watson) و ماریس ویکینز (Maurice Wikins) و هم‌چنین توسعه PCR توسط Kary Mulis در سال ۱۹۸۳ تغییر یافت. با پیشرفت این فناوری‌ها داده‌های ژنتیکی به‌راحتی برای مطالعه اکولوژیست‌ها و متخصصان حفاظت در دسترس هستند. در دهه ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ فاکتورهای ژنتیکی برای اهداف موفقیت‌آمیز حفاظت سازمان‌دهی شدند. فاکتورهای مهمی ازجمله انتخاب طبیعی، رانش ژنتیکی، جهش، اندازه جمعیت موثر، گردنه بطری، اثر بنیان‌گذار، سیستم جفت‌گیری، ساختارجمعیت، پراکندگی، جریان ژن، اتصالات زیستگاه و اقدامات مدیریتی بر روی تنوع ژنتیکی اثر می‌گذارند (Dewoody، ۲۰۰۵). متخصصان ژنتیک جمعیت اغلب دو مولفه مهم تغییرپذیری ژنتیکی که شامل تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی است را ارزیابی می‌کنند. تنوع ژنتیکی شامل تنوع ژنتیکی درون افراد، جمعیت و منطقه است از طرف دیگر ساختار ژنتیکی شامل توزیع تنوع درون افراد، جمعیت و منطقه است. ساختار ژنتیکی درون یک گونه زمانی توسعه می‌یابد که یک گونه از خویشاوندان خود جدا می‌شود و یک زیرجمعیت جدا را تشکیل می‌دهدکه در آن تبادل از طریق پراکندگی و جفت‌گیری صورت نمی‌گیرد (Zhang و همکاران، ۲۰۰۹ ؛ Colonna و همکاران، ۲۰۰۹؛ Intarapanich و همکاران، ۲۰۰۹) شناسایی و مشخص کردن زیرجمعیت‌ها برای اهدافی ازجمله حفاظت، نقشه‌برداری ارتباطات، مطالعه سازگاری، توصیف زیستگاه‌ها و موانع موجود در آن و تعیین و شناسایی مهاجرت مورد توجه می‌باشد (Intarapanich و همکاران، ۲۰۰۹؛ Fogelqvist و همکاران، ۲۰۱۰؛ Hoban و همکاران، ۲۰۱۳؛ Jorde، ۲۰۱۲). کشف ساختار ژنتیکی موجود یک روش مناسب و رایج برای به‌دست آوردن ساختار جمعیت برای اکثر تاکساها می‌باشد. مباحث پیرامون حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های وحشی بحث داغ محافل علمی جهان می‌باشد. سازمان خواربار جهانی (FAO) در سال ۱۹۸۵ تحت مسئولیت کمیته حفظ ذخایر ژنتیکی راهکارهای اساسی و جهانی را جهت تشویق کشورهای عضو به‌منظور تلاش ملی در زمینه حفظ ذخایر ژنتیکی کشورها پایه‌ریزی نمود. احتمالاً بیش از ۴۵۰۰ نژاد و سویه حیوان در جهان وجود دارد که ذخایر ژنتیک جانوری جهانی را تشکیل می‌دهند که بیش از ۳۰٪ آن‌ها در معرض خطر انقراض بوده و تعداد بسیار بیش‌تری نیز، به‌ویژه در کشورهای درحال توسعه، به واسطهٔ بهره‌برداری نامناسب تهدید می‌گردند. کاهش تنوع ژنتیکی به صورت از دست رفتن نژادها و سویه‌ها بیان می‌گردد. براساس آمارهای موجود در سطح جهان بیش از ۵۰ درصد از مهره‌داران در خطر انقراض گونه‌ها و نژادها ثبت شده‌اند و حداقل ۸۰۰ مورد انقراض گونه‌های جانوری به ثبت رسیده است. تنوع ژنتیکی یک عامل اساسی و مورد نیاز برای جمعیت‌ها در جهت حرکت به سوی تکامل و مقابله با تغییرات محیطی و مهم‌ترین عامل در جهت جلوگیری از انقراض موجودات زنده و حفاظت از تنوع زیستی محسوب می‌شود و کاهش آن اغلب سبب کاهش قدرت تولیدمثل و ماندگاری می‌گردد (نصیری، ۱۳۸۰). حفاظت از تنوع زیستی ایران و به تبع آن انتخاب طبیعی در سالیان متمادی سبب تولید گونه‌هایی شده است که از نظر ژنتیکی متنوع بوده و از سرمایه‌های مهم و ملی محسوب می‌شوند (الیاسی زرین‌قبایی، ۱۳۸۱). بسیاری از گونه‌های جانوری در کشور منحصر به کشور بوده و اگر هم در جای دیگر یافت شوند، منشاء ایرانی دارند. گونه‌های نادری مانند اسب کاسپین، یوزپلنگ، گورخر آسیایی، گوزن زرد و انواع پرندگان کمیاب نمونه‌هایی از تنوع ژنتیکی جانوری ایران هستند (نصیری، ۱۳۸۰). به‌همین دلیل احساس می‌شود که برنامه‌ریزی در زمینه شناسایی تنوع ژنتیکی و تدوین برنامه‌های حفاظت براساس قواعد علمی شناخته شده در ژنتیک یک نیاز جدی و اساسی کشور است. شناسایی دقیق این ذخایر ژنتیکی می‌تواند مبنای دقیق‌تری برای سیاست‌گذاری‌های آتی در جهت حفاظت گونه‌های در خطر انقراض باشد. ازجمله مواردی که هم اکنون بیش از سایر موضوعات مورد توجه قرار گرفته بحث پیرامون شناسایی ماکیان مفید و غیرمتداول است. امروزه برای تعیین تنوع ژنتیکی از نشانگرهای مولکولی DNA استفاده می‌کنند بنابراین میزان چندشکلی نشانگرها یکی از فاکتورهای قابل ارزیابی برای تعیین تفاوت‌های ژنتیکی میان افراد و یا جمعیت‌ها است. در سال ۱۹۹۰ دو گروه تحقیقاتی، مستقل و هم‌زمان روشی را برای سنجش میزان چندشکلی DNA ابداع نمودند. یک گروه در شرکت Dupont تهیه و کاربرد نقشه‌های ژنی را شرح داد و روش RAPD را ابداع نمود. گروه دیگر در موسسه تحقیقات زیست‌شناسی کالیفرنیا، انگشت‌نگاری ژنوم را در محور مطالعات خود قرار داده و روش خود را PCR به کمک تک آغازگرهای اختیاری (PCR - AP) نامید. از آن زمان

کاربردهای زیادی برای RAPD به‌وجود آمده که در هر یک از آن‌ها از قابلیت چندشکلی‌هایی که براساس توالی DNAاز روش RAPD به‌وجود می‌آیند بهره‌برداری می‌گردد. از آن‌جایی‌که اطلاعات کمی از بررسی تنوع ژنتیکی این گونه وجود دارد یکی از روش‌های مبتنی بر PCR که امروزه برای بررسی تنوع و روابط ژنتیکی بین جمعیت‌ها استفاده می‌شود روش RAPD است. این روش دارای چندین مزیت است از جمله این‌که در این روش از نشانگرهای کوتاه دارای توالی تصادفی برای تکثیر قسمت‌های مجزای ژنوم یک موجود استفاده می‌شود. انجام آزمایش‌ها با استفاده از این روش آسان‌تر و با سرعت بیش‌تری صورت می‌گیردو به اطلاعاتی در مورد پیشینه ژنتیکی گونه احتیاج ندارد و قادر است با استفاده از مقدارکم DNA، اختلاف وجود بین گونه‌ها را در سطح DNA مشخص کند (Hadrys، ۱۹۹۲). چندشکلی ایجاد شده در روش RAPD برای تعیین اختلاف ژنتیکی جمعیت، نقشه‌های ژنتیکی، انگشت‌نگاری، تعیین گونه‌ها و تعیین نژادهای هر گونه بسیار مناسب است.در روش RAPD یک‌آغازگر چند نوکلئوتیدی کوتاه به‌طور تصادفی در مجاورت DNA ژنومی با آنزیم DNA پلی‌مراز مخلوط شده و واکنش PCR انجام می‌پذیرد و پلی‌مورفیسم موجود به‌صورت حضور و غیاب یک باند تجلی می‌یابد (Williams و همکاران، ۱۹۹۰).طول آغازگرهای RAPD ۱۰-۸ نوکلئوتیدی با حداقل محتوای ۵۰ درصد G و C بوده و فاقد تکرارهای معکوس داخلی هستند و می‌توانند ۱۰ـ۲ محصول تکثیر شده را تولید نمایند (Kantanen و همکاران، ۱۹۹۵). عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد توالی DNA، هزینه کم، کاربرد و سرعت تولید و اجرای آن‌ها، امکان بررسی هم‌زمان چندین لوکوس در ژنوم نمونه‌ها، عدم نیاز به کاوشگر و مواد رادیواکتیو از مزایای RAPD است. تکرارپذیری پایین، حساسیت فوق‌العاده به آلودگی،غالبیت این نشانگر،دشواری امتیازدهی،عدم تشخیص سیستم اللی، نامعلوم بودن جایگاه نشانگرهای RAPD بر روی نقشه‌های ژنتیکی از معایب آن می‌باشد (Appa Rao و همکاران، ۱۹۹۶). که این معایب در بررسی تنوع ژنتیکی و زیستی قابل اغماض است. از این روش برای بررسی روابط و تنوع ژنتیکی گونه ماهیان قزل‌آلای قهوه‌ای، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Elo و همکاران، ۱۹۹۰) ماهی باس دهان بزرگ (willoms و همکاران، ۱۹۹۸) ماهی کپورمعمولی (Bartfai و همکاران، ۲۰۰۳) و کپورهندی(Barman و همکاران، ۲۰۰۳) استفاده‌شده است. یعش‌بچاری و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی تنوع‌ژنتیکی‌ماهی گلخورک با استفاده از نشانگر RAPD پرداختند هم‌چنین محرابی و همکاران (۱۳۹۵) به بررسی ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بنه با استفاده از نشانگر RAPD پرداختند. تصمیمات مدیریتی عاقلانه تصمیماتی هستند که بر مبنای درک صحیحی از ساختار ذخایر زیستی مورد نظر، اتخاذ گردند. ولی قلمروهای فرضی این ذخایر زیستی به‌ویژه در محیط‌هایی‌هم‌چون اقیانوس‌هاکاری‌پیچیده و دشوار است. نشانگرهای ژنتیکی را می‌توان برای تعریف ساختار این ذخایر به‌کار برد. برآورد فواصل ژنتیکی جمعیتی میان تمامی نژادهای یک گونه و فیلوژنی حاصل از این فواصل، ما را در تصمیم‌گیری منطقی در مورد انتخاب نژادها به‌منظور حفظ یا استفاده و نیز برای مطالعات تکاملی جهت تعیین ارزش ژنتیکی مقایسه‌ای از نظر صفات تولیدی کمک خواهند نمود. پرنده‌های شکاری تحت نام سارگپه‌ها از راسته شاهین‌سانان (Falconiformes)و تیره‌قوشیان (Accipiteridae)می‌باشد.این‌پرندگان بال‌های‌پهن، گردن کوتاه، سر نسبتاً گرد و دم نسبتاً کوتاهی درمقایسه با عقاب‌ها دارند (منصوری، ۱۳۸۷). سارگپه قلمروطلب و اغلب تک همسر است و معمولاً تا پایان عمر همسرش با او می‌ماند. این ویژگی در پرنده‌های شکاری ایران کم‌تر دیده می‌شود. فصل تولیدمثل در زمان‌های مختلف براساس طول و عرض جغرافیایی آغاز می‌شود. در سارگپه معمولی فصول تولیدمثل ممکن است در اوایل ژانویه تا آوریل پاییز باشد اما به‌طور معمول فصل تولیدمثلی در مناطق پالئارتیک بیش‌تر در ماه مارس تا ژوئیه است. جفت‌گیری معمولاً در لانه یا در نزدیکی لانه اتفاق می‌افتد و حدود ۱۵ ثانیه طول می‌کشد به‌طور معمول چندین بار در روز اتفاق می‌افتد. تخم‌ها معمولاً در فواصل ۲ تا ۳ روز گذاشته می‌شوند. اندازه دسته تخم می‌تواند از ۲ تا ۶ باشد، یک دسته تخم نسبتاً بزرگ در Accipitridها است. هر دو جنس نر و ماده روی تخم‌های خود می‌نشینند و ۳۰ الی ۵۰ روز طول می‌کشد که جوجه‌ها از تخم خارج شوند. گوشت سارگپه جزو گوشت‌های حرام می‌باشد و هم‌چنین به‌علت پرواز کند و عدم علاقه به تعقیب شکار و لاشه‌خواری، مورد علاقه قوش بازان نیستند و به‌همین دلیل از نظر فراوانی‌مشکل‌چندانی‌ندارند.اخیراًدر استان آذربایجان‌شرقی شکاربانان سازمان محیط زیست به تعدد با افرادی که بدون انگیزه این پرنده را شکار می کنند روبرو می شوند. هدف از تحقیق حاضر تجزیه و تحلیل نشانگر PCR-RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی احتمالی بین نمونه‌های پرنده شکاری سارگپه است که به علت حرام گوشت بودن و آموزش ناپذیر بودن آن برای قوش بازان، انحطاط جمعیت آن بعید به‌نظر می‌رسد اما اخیراً به‌دلایل ناشناخته و پیچیدگی‌های فرهنگی شکارچیان، در معرض تهدید جدی در استان آذربایجان‌شرقی‌می‌باشند.بنابراین،هدف این مطالعه تعیین چندشکلی در نمونه‌های سارگپه و چگونگی تنوع در این نمونه‌ها از لحاظ ژنتیکی بوده است.

شکل ۱: نقشه مناطق حضور پرنده شکاری سارگپه در ایران و تفاوت‌های مرفولوژیکی موجود بین سه گونه سارگپه در ایران

مواد و روش‌ها

جامعه آماری مطالعه: تعداد ۱۰ نمونه در سال ۱۳۹۸ از اقصی نقاط استان آذربایجان‌شرقی ازجمله منطقه حفاظت‌شده سهند، منطقه حفاظت شده ارسباران و هم‌چنین سایر مناطق آزاد با همکاری اداره کل حفاظت از محیط زیست استان آذربایجان‌شرقی تهیه گردید. این نمونه‌ها از سارگپه‌های شکار شده توسط شکارچیان جمع‌آوری شده است و توسط سازمان حفاظت محیط زیست در اختیار این مطالعه قرار گرفته است (شکل ۱). از ورید بالی پرندگان خون‌گیری شد و نمونه‌های خون در ویال‌های حاوی خلا و EDTA با یخ دمای منفی ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی (بانک ژن شمال غرب کشور) منتقل شدند و تا زمان استخراج در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند (شکل ۲)

شکل ۲: نحوه خونگیری از ورید بالی و مهار موقت پرنده (عکس از جواد قهاری)

استخراج DNA: استخراج DNA مطابق با انجام شد و تعیین کمیت و کیفیت به‌وسیله روش اسپکتوفتومتری صورت گرفت. برای شرح جزئیات، ابتدا نمونه‌های خون بلافاصله در اتانل ۹۵ درصد قرار گرفت و به فریزرمنفی ۲۰ درجه سلیسیوس انتقال یافت. DNA ژنومی درمنفی ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شود. اما در طولانی مدت در منفی ۷۰ درجه‌سلیسیوس نگه‌داری‌می‌شود. DNA درمنفی ۲۰ درجه سلیسیوس به‌علت‌وجود رادیکال‌های آزاد، امکان شکسته‌شدن‌از حالت دو رشته‌ای‌را دارد.لذابرای‌ذخیره‌درازمدت،منفی ۷۰ درجه سلیسیوس

از منفی ۲۰ درجه‌سلیسیوس مناسب است. در این مطالعه از ۱۵پرایمر تصادفی برای بررسی ساختار ژنتیکی سارگپه استفاده شد.

بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده: امروزه از روش دقیق‌تری‌برای اندازه‌گیری میزان DNA و خلوص آن استفاده می‌گردد و در این مطاله از روش اسپکتروفتومتر که متکی بر جذب نوری نمونه‌های مورد آزمایش در موج‌های خاصی می‌باشد، استفاده شد. اسیدهای نوکلئیک با ترکیبی از ۴ نوکلئوتید عمدتاً نور ماوراء بنفش با طول موج ۲۶۰ نانومتر را جذب می‌کنند. پروتئین‌ها که متداول‌ترین آلوده‌کننده‌ها در نمونه‌های DNA و RNA می‌باشند، نور ماوراء بنفش را در طول موج ۲۸۰ نانومتر جذب می‌کنند از طول موج ۳۲۰ نانومتر نیز برای تعیین آلوده‌کننده‌های فنلی و الکلی استفاده می‌شود لذا، با محاسبه جذب نوری نمونه اسیدنوکلئیک‌در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر و محاسبه نسبت‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۳۲۰ می‌توان خلوص اسیدهای نوکلئیک را مشخص کرد که این نسبت در محدوده ۱/۸ برای DNA و در محدوده ۲ برای RNA ایده‌آل می‌باشد. میزان جذب در ۲۶۰ نانومتر برای تعیین غلظت DNA استفاده می‌گردد اگر OD=۱ باشد در این صورت ۵۰ نانوگرم/میکرولیتر از مولکول‌های دو رشته‌ای DNA و ۴۰ نانوگرم/میکرولیتر از مولکول‌های تک رشته‌ای DNAو RNAو ۲۰ نانوگرم/میکرولیتر از نوکلئوتیدهای منفرد می‌باشد. ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه DNA در ۱۹۹۰ میکرولیتر بافر TE رقیق گردید و میزان جذب نوری آن در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. خلوص DNA با استفاده از OD۲۶۰/OD۲۸۰ اندازه‌گیری گردید و مقدار DNA با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد که فاکتور رقت در این آزمایش ۲۰۰ می‌باشد:

فاکتور رقت×۵۰×۲۶۰ OD=مقدار DNA در نمونه (نانوگرم/میکرولیتر)

اجرای واکنش PCR: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۰/۵dNTPs میکرولیتر، پرایمر ۲ میکرولیتر، DNA ۲۵ نانوگرم، بافر PCR ۲ میکرولیتر با غلظت 10X، کلریدمنیزیوم ۰/۶ میکرولیتر و آب مقطر ۱۲ میکرولیتر انجام گرفت (جدول ۲)

چرخه‌های دمایی واکنش PCR به‌ترتیب زیر انجام شد: مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر به هدف در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه، مرحله گسترش زنجیره در دمای ۷۲ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه و مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه بهینه‌سازی گردید (جدول ۱). بعد از انجام مراحل فوق محصولات به دست آمده در ژل متافور ۴ درصد اجرا شد.

الکتروفورز محصولات PCR: مقدار ۴ گرم از پودرمتافور ۴ درصد را به ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر TAE اضافه کرده و درون ارلن حاوی یک عدد آهنربا که روی هیتر قرار داده شده، می‌ریزیم. پس از رسیدن دما به حدود ۱۰۰ درجه و محلول شدن کامل پودر، ارلن در دمای اتاق خنک شده و در دمای حدود ۵۰ درجه محلول، به داخل ژل مولد (که شانه درون آن گذاشته شده بود) ریخته شد. پس از نیم‌ساعت ژل همراه با شانه درون تانک الکتروفورز قرار داده می‌شود. سپس حدود ۲ میلی‌متر بیش از سطح ژل بافر TAE ریخته شده و شانه به آرامی از روی ژل جدا می‌گردد تا چاهک‌ها تشکیل شوند. مقدار ۱۵ میلی‌لیتر از هرمحصول PCR نمونه با ۳ میلی‌لیتر از بافر ۶X مخلوط شده و در چاهک‌ها ریخته می‌شود. تانک الکتروفورز به منبع تامین برق متصل شده و با شدت جریان ۵۰mA و ۷۰ ولت به‌مدت ۶ ساعت الکتروفورز گردید.ژل‌متافور به‌مدت ۳۰ دقیقه‌در محلول‌رنگ‌آمیزی اتیدیوم‌برماید قرار داده شد و سپس با آب مقطر شستشو داده شده و در داخل اتاقک اشعه UV قرار داده شد. با استفاده از سیستم Gel document کار عکس‌برداری و تعیین طول قطعات تکثیر شده انجام پذیرفت که جهت این‌کار طول قطعات DNA نشانگر به‌حافظه نرم‌افزار داده شد (شکل ۳).

جدول ۱: پروفیل حرارتی مورد استفاده در تکثیر ژنوم پرنده شکاری سارگپه

۱	دمای واسرشت اولیه	۹۵ درجه سانتیگراد	به مدت ۴ دقیقه
۲	دمای واسرشت	۹۵ درجه سانتیگراد	به مدت ۱ دقیقه
۳	دمای اتصال پرایمرها	۳۷ درجه سانتیگراد	به مدت ۲ دقیقه
۴	دمای پلیمریزاسیون	۷۲ درجه سانتیگراد	به مدت ۳ دقیقه
۵	دمای پلیمریزاسیون نهایی	۷۲ درجه سانتیگراد	به مدت ۱۰ دقیقه

جدول ۲: مواد مورد استفاده در PCR و غلظت هر کدام از آن‌ها

ترکیبات واکنش	غلظت محصول	مقدار مصرف شده برای ۲۰ میکرولیتر واکنش
DNTP	10 mM	۰/۴ میکرولیتر
MgCl2	50 mM	۰/۶ میکرولیتر
Taq DNA Polymerize	1 u/µl	۱ میکرولیتر
PCR Buffer	10X	۲ میکرولیتر
Primer	10 µmol	۲ میکرولیتر
DNA	25 ng	۲ میکرولیتر
آب دوبار تقطیرشده	-	۱۲ میکرولیتر

نحوه امتیازدهی باندهای RAPD : بعد از مشخص شدن اندازه دقیق باندها، در هر ژل در صورت حضور باند امتیاز یک و در صورت عدم حضور باند امتیاز صفر داده شد. برای این منظور ابتدا برای هر جمعیت‌نمونه‌برداری‌شده‌جدولی تهیه‌شد که‌در ستون آن افراد مختلف ودر ردیف آن جایگاه‌های‌مختلف‌هرآغازگربه‌ترتیب‌از قطعات سنگین‌تر

به سبک‌تر درج گردید. این جدول برای همه توده‌ها و تمام آغازگرهای به‌کار رفته تکمیل شد. بر اساس حضور یا عدم حضور باند امتیاز دهی صورت گرفت.

جدول ۳: کدهای پرایمرهای تصادفی، توالی، میانگین تعداد باند، دامنه اندازه باندی تولید شده

نام آغازگر	تولی آغازگر ('5-'3)	GC content (%)
OPA 001	GCGCACGG	۸۷/۵
OPA 002	GCCGTCCGAG	۸۰
OPA 003	CAGCCTCGGC	۸۰
OPA 004	GGGACGTCTC	۷۰
OPA 006	CCGCGCCGGT	۹۰
OPA 007	GTCCGAGGCC	۸۰
OPA 008	CGAGGCCGTC	۸۰
OPA 009	TCGGCGAGCC	۸۰
OPA 010	GCCATCGGGC	۸۰
OPA 011	AAACGGGCG	۷۰
OPA 012	AGGGCTCGGC	۸۰
OPA 013	GTCCACGCCG	۸۰
OPA 014	GACCTCGCCG	۸۰
OPA 015	GTGCCTGCCG	۸۰

برای محاسبه فراوانی سهم باندی بین افراد مختلف از فرمول زیر استفاده می‌شود:

$$BSF_{XY} = \frac{2N_{AB}}{(N_A + N_B)}$$

که NAB: تعداد باندهای مشترک بین دو فرد A و B، NA: تعداد باندهای حاصله از فرد A، NB: تعداد باندهای حاصله از فرد B

ضریب تشابه داخل جمعیتی به‌صورت متوسط فراوانی سهم باندی به دست آمده از تمام مقایسات بین افراد داخل یک توده محاسبه می‌گردد. هم‌چنین ایندکس یکنواختی داخل جمعیتی (U) براساس فراوانی باندها به‌صورت زیر محاسبه گردید:

$$u = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} V_i$$

که در این فرمول، Vi: فراوانی i امین باند و N: تعداد باندهای امتیاز داده شده

برای محاسبه ضریب تشابه بین جمعیتی از فرمول زیر استفاده می‌شود (Lynch، ۱۹۹۰):

$$BGS = 1 + S_{IJ}\, IJ\, 0.5(S_I + S_J)$$

که در این فرمول S'_{IJ}: متوسط فراوانی سهم باندی برای تمام مقایسات افراد جمعیت‌های I و J، SI: ضریب تشابه داخل جمعیتی در جمعیت I، SJ: ضریب تشابه داخل جمعیتی در جمعیت

هم‌چنین ایندکس تشابه ژنتیکی (Genetic Identity Index) (I) بین دو جمعیت براساس فراوانی باندها به‌صورت زیر محاسبه می‌گردد:

$$I = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} \frac{2V_i^{(1)}.V_i^{(2)}}{(V_i^{(1)})^2 + (V_i^{(2)})^2}$$

در این فرمول N: تعداد باندهای مختلف در دو جمعیت، Vi(1): فراوانی i امین باند در جمعیت ۱، Vi(2): فراوانی i امین باند در جمعیت ۲

برای محاسبه فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت از فرمول زیر استفاده می‌گردد (Nei، ۱۹۷۸).

$$D_{IJ} == In\left[S'_{IJ} /(S_I.S_J)^{\frac{1}{2}} \right]$$

هم‌چنین براساس فراوانی باندها فاصله ژنتیکی به‌صورت زیر محاسبه می‌شود: D= -Ln (I) یا D=1-I

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحلیل آماری، ژل‌های عکسبرداری شده چاپ شد و براساس دستورالعمل تکنیک RAPD، امتیاز دهی باندهای به‌دست آمده، صورت گرفت. بدین‌صورت که برای باندهای موجود در مقایسه با همدیگر امتیاز ۱ و برای باندهای غایب امتیاز صفر داده شد. سپس یک فایل متنی از نتایج امتیازدهی ایجاد گردید که توسط نرم‌افزار PopGene قابل خواندن بود. تعیین فواصل و شباهت‌های ژنتیکی افراد موردآزمایش و ترسیم دندروگرام با استفاده از نسخه ۱/۳۱ این نرم‌افزار صورت گرفت. این پکیج تعیین فواصل ژنتیکی بین افراد را با استفاده از فرمول Nei انجام می‌دهد و جداول و نمودارهایی در اختیار استفاده کننده قرار می‌دهد.

جدول ۴: خروجی‌های مولکولی پرایمرهای مورد استفاده در جمعیت پرنده شکاری سارگپه

Primer	Range Bands	Number scored bands
OPA 013	۴۰۰-۱۱۰۰	۶/۹۰
OPA 008	۲۰۶-۷۸۰	۷/۷۰
OPA 003	۴۱۰-۱۲۳۰	۹/۶۰
OPA 012	۳۰۰-۷۰۰	۹/۷۰
OPA 002	۳۷۰-۹۸۰	۱۰/۷۰
OPA 015	۲۹۰-۸۰۰	۱۱/۰۰
OPA 004	۲۸۰-۱۲۰۰	۱۱/۲۰
OPA 010	۱۶۰-۹۸۰	۱۱/۳۰
OPA 007	۲۷۰-۸۵۰	۱۱/۴۰
OPA 009	۳۵۰-۵۰۰	۱۲/۲۰
OPA 014	۲۴۰-۱۱۵۰	۱۲/۶۰
OPA 011	۲۲۰-۱۰۰۰	۱۴/۱۰
OPA 001	۲۳۴-۹۸۰	۱۵/۸۰
OPA 006	۳۵۰-۱۳۰	۱۸/۲۰

در موارد کار با جانداران دیپلوئید همانند سارگپه می‌تواند تعادل هاردی-واینبرگ، فراوانی ژنی، تعداد الل‌ها، تعداد الل‌های مؤثر، میزان چندشکلی،هموزیگوتی مشاهده‌شده و قابل انتظار، را برای مارکر غالبی مثل RAPD انجام دهد که مراحل فوق به تفصیل در زیر آورده شده است:

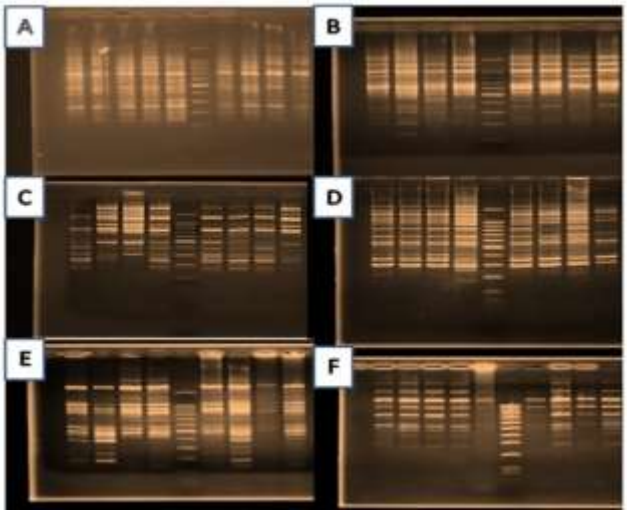
تجزیه خوشه‌ای یکی از روش‌های آماری است که افراد یک جامعه را براساس تشابه به زیرجامعه‌های همگن تقسیم‌بندی می‌کند.در این تحقیق از روش UPGMA (Unweighed Pair Group Method using an ariphetic average) برای تجزیه خوشه‌ای و ترسیم درخت فیلوژنی استفاده شده است. اساس این روش میانگین فاصله افراد یا گروه‌ها از همدیگر می‌باشد. لذا مقادیر به‌دست آمده را در ماتریس فاصله قرار داده و افرادی که کم‌ترین فاصله را از همدیگر دارند، با هم ادغام و در یک گروه قرار می‌دهیم که به این ترتیب درخت فیلوژنی جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه ایجاد گردید (جدول ۵). انجام این قسمت از تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نسخه ۱/۳۱ نرم‌افزار PopGene (Yeh و همکاران، ۱۹۹۹) انجام گردید.

نتایج

براساس روش UPGMA و مشاهده درخت فیلوژنی، نمونه‌های مورد مطالعه در ۵ گروه قرار گرفتند. خوشه آبی رنگ روابط دورتری دارندوخوشه سبز و قهوه‌ای، با اندکی تفاوت از هم‌فاصله‌دارند و احتمال مهاجرت افراد بیش‌تر است و ممکن است تشابه شرایط محیطی سبب شده که افراد بیش‌ترین تشابه را داشته باشند(شکل ۴). به‌دلیل این‌که روی سارگپه ایران هیچ‌گونه شناسایی ازجمله تعیین توالی ژنوم صورت نگرفته است، بنابراین استفاده از نشانگر RAPD که در آن به شناسایی قبلی ژنوم موجود نیاز نیست، برای مطالعات ژنتیکی می‌تواند مناسب و مفید باشد. ماتریس شباهت بین افراد براساس فاصله ژنتیکی بین افراد با استفاده از شاخص نی نشان داد که هم‌پوشانی و میزان آمیختگی بین افراد زیاد است. چندان نمی‌توان آن‌ها را جدا از هم در نظر گرفت. و فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های Buzzard3، Buzzard4 و Buzzard2 مشهوداست.

جدول ۵: ماتریس شباهت و فاصله بر اساس نشانگر تصادفی ایجاد شده در جمعیت مورد مطالعه سارگپه

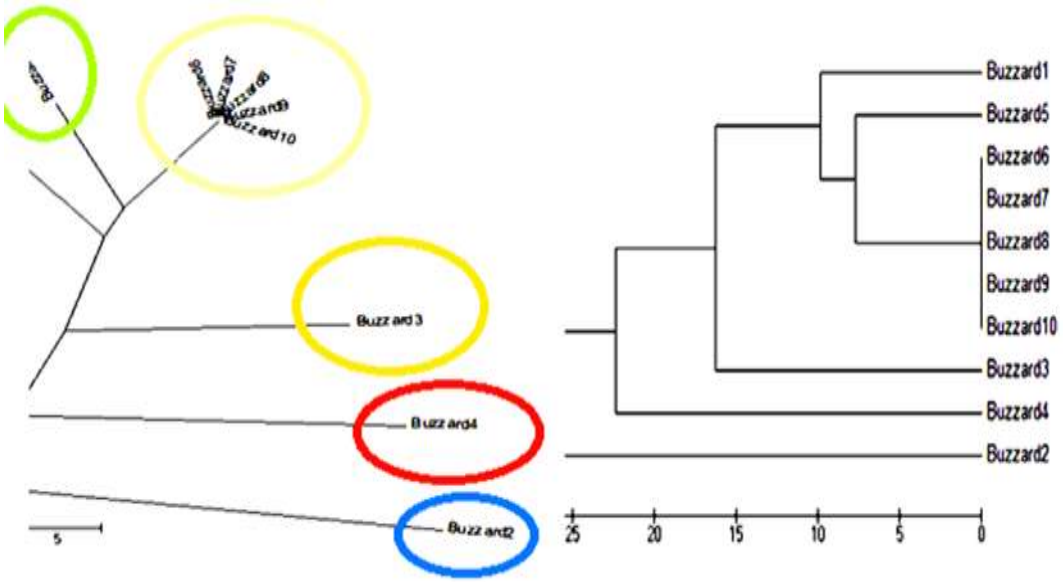
Bird ID	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱		۰/۶۱	۰/۷۱	۰/۵۷	۰/۸۲	۰/۸۲	۰/۸۲	۰/۸۲	۰/۸۲	۰/۸۲
۲	۰/۵۰		۰/۴۶	۰/۶۱	۰/۶۴	۰/۵۷	۰/۵۷	۰/۵۷	۰/۵۷	۰/۵۷
۳	۰/۳۴	۰/۷۷		۰/۵۰	۰/۶۱	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵
۴	۰/۵۶	۰/۵۰	۰/۶۹		۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۶۸
۵	۰/۲۰	۰/۴۴	۰/۵۰	۰/۳۹		۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۶۸
۶	۰/۲۰	۰/۵۶	۰/۲۹	۰/۳۹	۰/۱۵		۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰
۷	۰/۲۰	۰/۵۶	۰/۲۹	۰/۳۹	۰/۱۵	۰/۰۰		۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰
۸	۰/۲۰	۰/۵۶	۰/۲۹	۰/۳۹	۰/۱۵	۰/۰۰	۰/۰۰		۱/۰۰	۱/۰۰
۹	۰/۲۰	۰/۵۶	۰/۲۹	۰/۳۹	۰/۱۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰		۱/۰۰
۱۰	۰/۲۰	۰/۵۶	۰/۲۹	۰/۳۹	۰/۱۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	



شکل ۳: الگوی باندی تکثیر شده متعلق به ۶ ست پرایمری تصادفی شرکت اپرون

بحث

نتایج نشان داد که نمونه‌های Buzzard7، Buzzard8، Buzzard9، Buzzard10، Buzzard6 در یک خوشه قرار گرفتند و شباهت ژنتیک بیش‌تری دارند و آلل مشترک بین آن‌ها وجود دارد که این موضوع را می‌توان به ارتباط قوی بین آن‌ها نسبت دادو میزان جریان ژن بین آن‌ها بیش‌تر است در نتیجه افزایش ارتباط ژنتیکی بین افراد، پتانسیل درون‌آمیزی را کاهش می‌دهد و درنتیجه از بروز مشکلات مربوط به پیامدهای درون‌آمیزی جلوگیری می‌کندوهم‌چنین باعث افزایش میزان هتروزیگوسیتی می‌شودواز انقراض جمعیت‌ها جلوگیری می‌کند. جریان ژن بالا میزان سلامت ژنتیکی جمعیت را بهبود می‌بخشد و این ارتباط قوی ژنتیکی را می‌توان به قابلیت پرواز گونه و توانایی آن برای عبور از موانع ژنتیکی نسبت داد. پرندگان به‌دلایل متعدداز جمله وضعیت جوی نامساعد، کمبود منابع غذایی، خشکسالی تغییرات فصول یا باران‌های



شکل ۴: نمودار شبکه‌های فیلوژنتیکی بین نمونه‌ها بر اساس ماتریس‌های فاصله ژنتیکی در داخل جمعیت پرنده شکاری سارگپه

نابهنگام مهاجرت می‌کند. عواملی مانند طول روز و شب، درجه حرارت و رطوبت هوا اثرات غیرمستقیمی روی مهاجرت پرندگان می‌گذارد. مهاجرت و برقرای جریان ژن درنتیجه به حفظ جمعیت فعلی و افزایش ارتباط بین آن‌ها کمک می‌کند. نمونه‌های Buzzard3، Buzzard4 و Buzzard2 در یک کلاد مجزا قرار دارند و شباهت کم‌تری با سایر نمونه‌ها دارند. درخت فیلوژنی نشان داد که نمونه Buzzard2 از سایر نمونه‌ها جدا است در نتیجه می‌توان آن را به‌عنوان تبار مجزایی از سایر نمونه‌ها درنظر گرفت. اگر مقدار فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ها زیاد باشد می‌توان هر کدام از آن‌ها را به‌عنوان یک جمعیت مجزا لحاظ کرد این درحالی است که وجود فاصله ژنتیکی کم در بین نمونه‌ها نشان‌دهنده نزول آن‌ها به یک جمعیت همگن بوده است. Ponsuksili و همکاران (۱۹۹۵) از تکنیک RAPD و ریزماهواره استفاده کردند و به این نتیجه رسیدن که تعداد باندهای تولید شده توسط روش RAPD بیش‌تر است. نشانگرهای RAPD در شناسایی ارتباط ژنتیکی، تنوع ژنتیکی و تشابه ژنتیکی خوب عمل می‌کند. البته با این تعداد نشانگر و به تبع آن با این تعداد باند نمی‌توان قطعی تصمیم‌گیری کرد به‌دلیل اینکه کارایی این روش به تعداد نشانگرهای مورد استفاده و هم‌چنین تعداد باندهای تشکیل شده بستگی دارد هرچه تعداد نشانگر و باندهای تشکیل شده بیش‌تر باشد عملکرد این روش بهتر است. Abbasi و Ahmoorespour (۲۰۱۰) از روش RAPD برای بررسی پارامترهای ژنتیکی جمعیت در خطر انقراض کبک‌چوکار در ایران استفاده کردند هدف آن‌ها بررسی شباهت ژنتیکی بین جمعیت‌های این گونه بود. از ۷۵ فرد پرنده نمونه خون تهیه شد. RAPD با ۶۷ مکان ژنی با ۲۸ باند چندشکل اجرا شد. نتایج آن‌ها نشان داد که جریان ژن بین جمعیت‌ها برقرار است. Chan و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از روش RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی *Pezoporus wallicus* از هفت پرایمر استفاده کردند و میزان چندشکلی هر پرایمر به‌طورمیانگین ۹/۲ درصد بود. در کل نتایج آن‌ها نشان داد که تشابه ژنتیکی بین نمونه‌ها وجود دارد. Khaliq و همکاران (۲۰۱۰) از روش RAPD برای بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت کبک *Ammoperdix griseouglavis* در محدوده سلیمان پرداختند. این گونه در معرض تهدید است و در آسیا و خاورمیانه پراکنده شده است. درصد چندشکلی باندها ۹۴/۵ درصد بود. شاخص فاصله ژنتیکی بین آن‌ها نشان داد که هر دو جمعیت تا حدودی از هم جدا شدند اما تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها از لحاظ ژنتیکی وجود ندارد. Tubalyte و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی تنوع ژنتیکی اردک *Aythya fuligula* در اروپای شرقی با استفاده از روش RAPD پرداختند هم‌چنین از ۵ پرایمر استفاده کردند. تمایز ژنتیکی بین نمونه‌ها بالا بود و میزان چندشکلی ۸۰ درصد بود. Oghah و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی تنوع ژنتیکی اردک *Muscovy* با استفاده از روش RAPD پرداختند. از مناطق انسانی و طبیعی نمونه‌ها جمع‌آوری شدند و از ۵۰ فرد از دو جمعیت نمونه خون تهیه شد و هفت پرایمر به‌کار گرفته شد. مطابق با مطالعه حاضر باندها کدگذاری شدند. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها محاسبه گردید و تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌ها مشاهده شد و میزان فاصله ژنتیکی پایین بود که نشان می‌دهد اجداد مشترک دارند. Barzinji و همکاران (۲۰۱۵) ارتباط ژنتیکی میان سه رده بوقلمون در اربیل عراق را با استفاده از نشانگر RAPD بررسی کردند از ۵۰ نمونه خونگیری

شد و از بیش از ۲۰ پرایمر استفاده کردند. نظری و همکاران (۱۳۹۷) به بررسی ساختار ژنتیکی و روابط تکاملی زیرگونه کمرکولی جنگلی رشته کوه زاگرس در مقایسه با کلادهای اروپایی، آسیایی و قفقازی پرداختندو ازنمونه‌خون برای استخراج DNA استفاده کردنداز سیاهرگ زیر بال خونگیری کردند و در بافر EDTA به آزمایشگاه منتقل کردند. برای استخراج DNA از کیت کیاژن استفاده کردند و تعیین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها توسط نرم‌افزار MEGA ۵/۳ صورت گرفت. دهقان‌زاده و همکاران (۱۳۸۳) به بررسی تنوع ژنتیکی مرغان بومی ایران با استفاده از نشانگر RAPD پرداختند از ۱۰ نشانگر تصادفی ۱۰ نوکلوئیدی تکثیر DNA صورت گرفت. درخت فیلوژنی براساس روش UPGMA تهیه شد. Ponsuksili و همکاران (۱۹۹۹) تنوع ژنتیکی مبتنی بر انگشت‌نگاری DNA و تنوع ژنتیکی مبتنی بر ریزماهواره نمونه‌های مربوط به اندازه‌گیری هتروزیگوسیتی بود. در رابطه با برآوردهای مربوط به فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، معلوم گردید که براورد هتروزیگوسیتی از هر دو روش بسیار مشابه بودند (r= ۰/۸) و حاوی توان این نشانگرها به‌عنوان ابزاری برای انگشت‌نگاری DNA بر روی‌مخلوطی از DNAهای مربوط به افراد هر لاین یا جمعیت مناسب، سریع و اقتصادی است. از این‌رو این روش، به‌ویژه در گونه‌هایی که اطلاعات برای طراحی آغازگرهای لازم جهت تشخیص ریزماهواره‌ها محدود است، قابل رقابت با کاربرد ریزماهواره‌ها می‌باشد. Xi-Quan و همکاران (۱۹۹۸) تغییرپذیری و رابطه میان سه نژاد مرغ بومی چین را بررسی کردند و براساس ریزماهوارها و RAPD روابط بین آن‌ها بسیار نزدیک بود و بیان کردند که این امر به‌واسطهٔ میزان چندشکلی بالا و توارث صورت گرفته است. نتایج RAPD نیز نشان داد که تغییرپذیری در میان ۴ نژاد پایین است. رابطهٔ بین ۴ نژاد هم براساس چندشکلی برداری شده بودند و نیز سویه ساختگی که به‌مدت بیش از ۱۰ سال هم‌خون شده است، پایین است ولی در نژاد دیگر نشان دادند که تغییرپذیری درون نژادی از طریق متوسط هتروزیگوسیتی مبتنی بر چندشکلی مناسب‌تر است.

شایان ذکر است نشانگر مورد استفاده به کل ژنوم متصل می‌شود اما نشانگر ریزماهواره حداکثر به ۲۰۰ الی ۴۰۰ باز ژنوم متصل می‌شود در نتیجه مطالعه حاضر می‌تواند اطلاعات اولیه خوبی درمورد این گونه ایجاد کند هم‌چنین یادآور می‌شود که نمونه‌گیری از این گونه مستلزم شکار مستیم و یا زنده‌گیری و درنهایت بی‌هوش کردن گونه است که به حیوان استرس‌واردمی‌شودو سلامت آن را تهدیدمی‌کندونمونه‌های این‌مطالعه‌درواقع با همکاری محیط‌زیست از صیادان تله‌گذار غیرمجاز جمع‌آوری شد و درنتیجه اجباراً امکان‌نمونه‌گیری گسترده وجود ندارد. پیشنهادمی‌شود در مطالعه بعدی روی گونه سارگپه از تعداد نمونه‌های بیش‌تری استفاده شود. هم‌چنین از نشانگرهای با توالی مختلف که باندهای چندشکل بیش‌تری ایجادمی‌کند، استفاده‌شود. به‌دلیل معایب این نشانگر ازجمله تکرارپذیری پایین، حساسیت فوق‌العاده به آلودگی، غالبیت این نشانگر، دشواری امتیازدهی، عدم تشخیص سیستم اللی، نامعلوم بودن جایگاه نشانگرهای RAPD بر روی نقشه‌های ژنتیکی توصیه می‌شود از نشانگرهای دیگری نیز استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات اداره کل حفاظت محیط‌زیست آذربایجان شرقی کمال تشکر و قدردارنی به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. **الیاسی‌زرین‌قبایی، ق.، ۱۳۸۱.** مطالعه پلی‌مورفیسم ژن بتالاکتو گلوبولین در پنج نژاد گوسفند. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۲. **دهقان‌زاده، ه.؛ میرحسینی، ض. و عبدالاحد، ش.، ۱۳۸۳.** بررسی تنوع ژنتیکی مرغان بومی ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD. مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. دوره ۱۷، شماره ۱، صفحات ۲ تا ۹.

۳. **محرابی، ع.ا.؛ غلامی، پ.؛ اطمینان، ع. و محمدی، س.، ۱۳۹۵.** بررسی ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت‌های درختان بنه (*P. atlantica* subsp. *mutica*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD-PCR. جنگل و فرآورده‌های چوب (مجله منابع طبیعی ایران). دوره ۶۹، شماره۲، صفحات ۲۳۷ تا ۲۴۸.

۴. **نصیری، م.ر.، ۱۳۸۰.** درس‌نامه اولین کارگاه آموزشی مارکرهای مولکولی DNA در اصلاح و پرورش دام. ۱۹ الی ۲۲ اسفند، مشهد.

۵. **نظری، م.؛ کابلی، م.؛ رضایی، ح.ر.؛ ایمانی، ج.؛ محمدی، ع. و خاکی، س.، ۱۳۹۷.** بررسی تاریخ تکاملی زیرگونه کمرکولی جنگلی در کوه‌های زاگرس، ایران. یافته‌های نوین در علوم زیستی. جلد ۵، شماره ۳، صفحات ۱۵۵ تا ۱۶۷.

۶. **یعش‌بچاری، س.؛ ذوالقرنین، ح.؛ محمدی، م.؛ سالاری‌علی آبادی، م.ع. و قاسمی، ا.، ۱۳۹۱.** بررسی تنوع ژنتیکی ماهی گل خورک *Periophthalmus waltoni* با استفاده از نشانگرهای RAPD درخلیج فارس. مجله علوم و فنون دریایی. دوره ۱۱، شماره ۳، صفحات ۶۴ تا ۷۱.

7. **Appa Rao, K.B.C.; Bhat, K.V. and Totey, S.M., 1996.** Detection of species specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD) Genetic Analysis. Biomolecular Engineering. Vol. 13, pp: 135-138.

8. **Allendorf, D. and Clarkson, J.M., 2012.** A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. Nucleic Acids Research. Vol. 22, No. 18, pp: 3801-3805.

9. **Abbasi, H.T. and Ahmoorespour, M., 2010.** Analsis of

genetic diversity of Chukar Partridge population in Khorasan e-Razavi province of Iran by RAPS-PCR. Biochem Genet. Vol. 48, pp: 954-961.

10. **Barman, H.; Barat, A.; Bharat, M.; Banerjee, Y.; Meher, P.; Reddy, P. and Jana, R., 2003.** Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assays. Aquacult. Vol. 217, pp: 115-123.
11. **Batfai, R.; Egedi, S.; Yue, G.H.; Kovacs, B.; Urbanyi, B.; Tamas, G.; Horvath, L. and Orban, L., 2003.** Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. Aquacult. Vol. 219, pp: 157-167.
12. **Barzinji, S. and AL Yousif, M.M., 2015.** Genetic diversity among three domestic Turkey lines in Erbil using RAPD PCR technique. Garmyam university journal. Vol. 2, pp: 885-899.
13. **Chan, K.; Glover, D.R.; Ramage, M.C. and Harrison, D.K., 2008.** Low genetic diversity in the ground parrot revealad by randomly amplified DNA fingerprinting.Ann. zool. Fennici. Vol. 45, pp: 211-216.
14. **Colonna, V.; Nutile, T.; Ferrucci, R.R.; Fardella, G.; Aversano, M. And Barbujani, G., 2009.** Comparing population structure -as inferred from genealogical versus genetic information. Eur. J. Hum. Genet. Vol. 17, pp: 1635-1641.
15. **Dewoody, W.T.; Dodds, K.G.; Crawford, A.M. and Medrano, J.F., 2008.** Identification and genetic mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to the sheep genome. Mammalian Genome. Vol. 7, pp: 580-585.
16. **Elo, K.; Ivanoff, S.; Jukka, A.; Vuorinen, J.A. and Piironen, J., 1997.** Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. Aquacult. Vol. 152, pp: 55-56.
17. **Frankham, M., 2010** The polymerase chain reaction. In: Frederick, M.; Ausubel, P.; Brent, R.E.; kingston, D.D.; Moor, M.; Seidman, J.G.; John, A.; Smith, K.S., (eds.). Short protocols in molecular biology. Harvard medical school. pp: 15/1-15/42.
18. **Hubisz, M.J.; Falush, D.; Stephens, M. and Pritchard, J.K., 2009.** Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Mol. Ecol. Resour. Vol. 9, pp: 1322-1332.
19. **Hadrys, H.; Balick, M. and Schierwater, B., 1992.** Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol. Ecol. Vol. 1, pp: 55-63.
20. **Hoban, S.M.; Mezzavilla, M.; Gaggiotti, O.E.; Benazzo, A.; van Oosterhout, C. and Bertorelle, G., 2013.** High variance in reproductive success generates a false signature of a genetic bottleneck in populations of constant size: a simulation study. BMC Bioinformatics. Vol. 14, 309 p.
21. **Intarapanich, A.; Shaw, P.J.; Assawamakin, A.; Wangkumhang, P.C.; Ngamphiw, K. and Chaichoompu, E., 2009.** Iterative pruning PCA improves resolution of highly structured populations. BMC Bioinformatics. Vol. 10, 382 p.
22. **Jorde, P.E., 2012.** Allele frequency covariance among cohorts and its use in estimating effective size of age structured populations. Mol. Ecol. Resour. Vol. 12, pp: 476-480.
23. **Khaliq, I.; Bahar, M.; Riaz, M. and Khan, A.A., 2010.** Genetic diversity in see see partridge population from sub Himalayan ranges of Pakistan.Belg.J.Zool. Vol. 140, No. 2, pp: 229-234.
24. **Lunch, T.M., 1990.** The polymerase chain reaction. Breakthroughs in Bioseience, http://www. bioscience. com.
25. **Ogah, D.M. and Momoh, M., 2014.** Analsis of genetic diversity of Nigeria Indigenous Nuscovy Duck Ecotypes using RAPD Marker. PTA. Vol. 10, No. 2, pp: 225-232.
26. **Nei, M., 1987.** Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
27. **Permic, G.; Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M., 2014.** DNA amplification fingerprinting: A strategy for genome analysis. Plant Mol. Biol. Rep. Vol. 9, pp: 292-305.
28. **Ponsuksili, K.B.; Bhat, K.V. and Totey, S.M., 1999.** Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified ploymorphic DNA (RAPD). Genet. Anal. Vol. 13, No. 5, pp: 135-138.
29. **Tubelyte, K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Schare, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. and Erlich, H.A., 2011.** Genetic diversity of tufted ducks in Eastern Europe. Science. Vol. 239, pp: 487-491.
30. **Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990.** DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Researeh. Vol. 18, No. 22, pp: 6531-6535.
31. **Williams, D.J.; Kazianis, S. and Walter, R.B., 1998.** Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of largemouth bass subspecies and their intergrades. Trans. Am. Fish. Soc. Vol. 127, pp: 825-832.
32. **Xi-Quan, G.O.; Myakishev, M.V.; Kapanadze, G.I.; Georgiev, G.P. and Beritashvili, D.R., 1998.** Extraction of DNA from the whole blood by silica gel. Institute of gene biology, Moscow, Russia.
33. **Yeh, K.B.; Ferre, B.F. and Gibbbs, R.A., 1991.** The Polymerase Chain Reaction. Birch, User, Boston MA. pp: 182-200.
34. **Zhang, J.; Niyogi, P. and McPeek, M.S., 2009.** Laplacian eigenfunctions learn population structure. PLoS ONE. Vol. 4, pp: e7928.