



چند شکلی ریزماهواره در جمعیت مرغان بومی مازندران و اصفهان

سعید اسماعیل خانیان^{۱*} - سعید انصاری مهبیاری^۲ - اردشیر نجاتی جواری^۳ - محمدحسین بناء بازی^۴ - مجید صادقیان^۵ - مریم تاتاری^۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۱۸

چکیده

به منظور شناسایی چندشکلی جمعیت مرغان بومی مازندران و اصفهان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای، ۲۰ نشانگر ریزماهواره به نام‌های MCW0014، MCW0081، MCW0183، MCW0067، MCW0104، MCW0123، MCW0330، MCW0165، MCW0069، MCW0020، MCW0222، LEI0094، MCW0295، MCW0034، MCW0216، MCW0268، ADL0112، ADL0278 و LEI0166 مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه خون به ترتیب از ۹۰ و ۱۵۰ مرغ بومی مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی در مازندران و اصفهان به صورت تصادفی اخذ گردید و تخلیص DNA به روش بهینه شده استخراج نمکی انجام گرفت. تعداد آلل‌ها بین ۶-۱ عدد متغیر بودند. در جمعیت مازندران فقط جایگاه MCW0216 و در جمعیت اصفهان جایگاه‌های MCW0216، MCW67 و MCW222 تک‌شکل بودند. سایر جایگاه‌ها از چندشکلی مناسبی برخوردار بودند. به غیر از دو جایگاه MCW222 و MCW165 در جمعیت مازندران، سایر جایگاه‌ها انحراف معنی‌داری را در سطح پنج درصد از تعادل هاردی-وینبرگ دارا بودند. دامنه هتروزیگوسیتی برای این جایگاه‌ها بین ۰/۷۴۳۷ (در جایگاه LEI0094) در جمعیت اصفهان و ۰/۲۴۷۲ (در جایگاه MCW165) در جمعیت مازندران مشاهده شد. کمترین مقدار آلل مؤثر در هر دو جمعیت متعلق به جایگاه MCW216 و بیشترین آلل مؤثر مربوط به جایگاه LEI0094 در جمعیت اصفهان بود. بیشترین PIC در جایگاه MCW0104 در جمعیت اصفهان و کمترین PIC در جایگاه MCW165 در جمعیت مازندران دیده شد. در هر دو جمعیت جایگاه‌های دو آللی کمترین مقادیر شاخص شانون را نشان دادند. جایگاه‌های با آلل‌های بیشتر شاخص شانون بالاتری داشتند. به طور کلی میزان چند شکلی جمعیت‌های مورد مطالعه نسبتاً پایین بود.

واژه‌های کلیدی: جایگاه ژنی، چند شکلی، آلل مؤثر، هتروزیگوسیتی

مقدمه

مرغ‌های بومی در کشور تحقیقاتی انجام شده است. بیشتر تحقیقات به صورت کمی بوده و نتایج نشان داده است که مرغ‌های بومی ایران از ارزش ژنتیکی قابل توجهی برخوردارند (۴). با شناسایی تعداد زیادی ریزماهواره در گونه‌های مختلف و رایج‌شدن تکنیک پی‌سی‌آر در آزمایشگاه‌ها، کاربرد موفقیت آمیز این نشانگرها در مطالعات تنوع کلیه گونه‌های دامی گزارش شده است (۷) و مشخص شده است که نشانگرهای ریزماهواره نسبت به سایر روش‌های قبلی، روش دقیق و کارایی برای تخمین تنوع ژنتیکی است (۲۵).

شهبازی و همکاران (۱) گزارش کردند که بیشترین تنوع ژنتیکی با بیشترین آلل مربوط به طیور بومی فارس (۳/۲) و کمترین تنوع با کمترین تعداد آلل، مربوط به طیور بومی اصفهان (۲/۷) است. نتایج تحقیق مسوف و همکاران (۱۹) نشان داد که رابطه ژنتیکی بین جوجه‌های یک اکوتیپ بالاتر از بین اکوتیپ‌ها است. وای جی و همکاران (۲۶) میانگین هتروزیگوسیتی هشت نژاد بومی را در سطح

یکی از اصولی‌ترین عوامل افزایش تولید محصولات دامی از طریق اصلاح نژاد میسر می‌گردد و مدیریت موفق یک پروژه اصلاحی مستلزم آگاهی از میزان تنوع مجموعه‌های ژنتیکی در مراحل مختلف پروژه‌های اصلاحی است (۳). یکی از اساسی‌ترین موارد دستیابی به کشاورزی پایدار، تعیین هویت کردن منابع ژنتیکی گونه‌ها جهت بقاء و استفاده است (۲۵). در زمینه شناخت و ارزیابی نژادهای مختلف

- ۱- استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان،
 - ۲- استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان،
 - ۳- دانشیار دانشکده علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران،
 - ۴- عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور،
 - ۵- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان،
 - ۶- کارشناس تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان.
- (Email: esmaeilkhaniyan@yahoo.com) *نویسنده مسئول:

مواد و روش‌ها

این تحقیق بر روی جمعیت مرغ بومی موجود در اصفهان و مازندران انجام گرفت. جهاد کشاورزی به منظور تحقیق و بررسی روی این مرغ‌ها، گله اولیه را از مناطق مختلف و روستاهای دورافتاده جمع‌آوری نموده و در طی نسل‌های متمادی از آن‌ها به عنوان مرغ مادر جهت تکثیر جوجه یک روزه و ارسال به پایگاه‌های ترویجی مستقر در شهرستان‌های مختلف این استان‌ها و توزیع آن‌ها در سن ۶ هفتگی بین خانواده‌های روستایی، استفاده کرده است. خون‌گیری از ۹۰ قطعه مرغ بومی استان مازندران و ۱۵۰ قطعه مرغ بومی استان اصفهان با استفاده از سرنگ‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ بال به عمل آمد. سپس نمونه‌ها بلافاصله در داخل یخ به آزمایشگاه مرکز تحقیقات استان اصفهان انتقال داده شد و سعی شد سریعاً از آنها DNA استخراج گردد.

استخراج DNA:

استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل با استفاده از روش استخراج نمکی (۱۷) انجام گرفت. DNA به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. پس از آن کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز و روش اسپکتروفتومتری تعیین شد.

آغازگرهای مورد استفاده:

در این مطالعه، بیست آغازگر ریزماهورهای (از شرکت آرمین شگرف) که قبلاً طراحی شده بودند و در راهنمای مدیریت طرح‌های منابع ژنتیک حیوانی نمایه شده‌اند (۱۲)، برای هر یک از جمعیت‌های اصفهان و مازندران مورد استفاده قرار گرفت که مشخصات آنها در جدول ۱ آورده شده است.

انجام واکنش پی‌سی‌آر:

در این تحقیق از دستگاه ترموسایکلر ساخت اپندورف استفاده گردید. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر و شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، مخلوط ۲۰۰ میکرومولار از هر یک از dNTPs، کلرید منیزیم ۵-۴ میلی‌مولار، ۰/۲۵ میکرومولار از هر یک از آغازگرها و یک واحد آنزیم در High Fidelity PCR Buffer 1X با شرایط دمایی و اسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه تکثیر شامل ۹۴ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر با توجه به نوع آغازگر ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه و ۳۰ ثانیه و نهایتاً یک بسط انتهایی به مدت دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد.

بالایی مشاهده کردند که علت آن تفکیک جغرافیایی عنوان شد. تعداد ۲۴ جایگاه چندشکل بودند که این امر نشان‌دهنده کارایی آنها برای آنالیز روابط ژنتیکی بین نژادهای مرغ است. هیلل و همکاران (۱۳) میانگین هتروزیگوسیتی برای نشانگرهای مورد استفاده در ۵۲ جمعیت از تیپ‌های مختلف طیور را برابر با ۰/۴۷ و میانگین تعداد آلل را ۳/۵ گزارش کردند. ژانگ و همکاران (۲۷) جمعیت مرغ بومی چین، جوجه‌های گوشتی وارداتی و تخم‌گذار را با استفاده از نشانگرهای ریز ماهوره، آلوزایم و ریپید (RAPD) مقایسه کردند. نتایج نشان داد که تنوع ژنی در مرغان بومی چین بالا، در گوشتی‌ها متوسط و در تخم‌گذارها پایین است. داده‌های سه سیستم نشان دادند که بین مرغ بومی چین و جوجه‌های گوشتی رابطه نزدیکی وجود دارد، ولی رابطه بین مرغ بومی چین و تخم‌گذار، رابطه‌ای دور است. کایسر و همکاران (۱۴) چندشکلی زیاد ریزماهورها که بر اساس توالی‌های مایکان جنگلی سرخ و لگهورن سفید حاصل آمده بودند، را نشان دادند. نتایج پژوهش یابو و همکاران (۲۵) نشان‌دهنده چندشکلی بودن تمام جایگاه‌ها و میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۷۶۴ در جمعیت مرغ بومی چینی بود. از این رو بر کارایی ریزماهورها جهت تعیین تنوع ژنتیکی مرغ‌های بومی چینی تأکید شد. از آنجا که ریزماهورها دشواری کمتر، دقت و کارایی بیشتری نسبت به سایر روش‌ها دارند جهت تعیین تنوع ژنتیکی نقش بارزتری را ایفا می‌نمایند. تاکاهاشی و همکاران (۲۳) رابطه ژنتیکی میان نژادهای مرغ بومی ژاپن را بر اساس چند شکلی ریزماهورهای مطالعه نمودند. اکثر مرغان بومی ژاپن، بسته به نژاد و منشأ، در سه گروه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ریزماهورها ابزار مناسبی برای مطالعه روابط ژنتیکی میان نژادهای مرغ می‌باشد (۲۳). الوفسو و همکاران (۲۰) نیز پارامترهای ژنتیکی داخل و در بین جمعیت مرغان Haimen را با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره تعیین کردند و نشان دادند که این نشانگرها ابزار مناسبی جهت تعیین پارامترهای ژنتیکی می‌باشند. میانگین تعداد آلل‌ها در این تحقیق برای ۱۵ جایگاه، $5/88 \pm 0/06$ گزارش شده است و بین جمعیت‌ها نیز $0/6828 \pm 0/01$ به دست آمد.

مرغ‌های بومی ایران مواد ژنتیکی پایه برای برنامه‌های اصلاح نژاد محسوب می‌شوند و شناخت دقیق این ذخایر ژنتیکی می‌تواند مبنای دقیق‌تری برای برنامه‌های اصلاح نژادی در آینده و نتیجه‌دهی آنها در زمان کوتاه‌تر و استفاده بهینه از منابع موجود در جهت افزایش تولید گردد (۱). امروزه جهت بررسی‌های ژنتیکی جمعیت‌ها و حیوانات حفاظت شده، از نشانگرهای مولکولی DNA استفاده می‌شود و میزان چند شکلی بدست آمده از این نشانگرهای ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌ها محسوب می‌شود (۲). در این تحقیق نیز تنوع درون جمعیتی مرغ بومی اصفهان و مازندران با استفاده از بیست جایگاه ریزماهوره مورد مطالعه قرار گرفت تا بدین ترتیب نقشی در زمینه حفظ ذخایر ژنتیک دامی کشور داشته باشد.

دو جمعیت بیانگر این است که در جمعیت مازندران آلل صفر مشاهده نشد، اما تعدادی از جایگاه‌های جمعیت طیور بومی اصفهان آلل‌های صفر را نشان دادند. یکی از علل افزایش هموزیگوت‌ها نسبت به آنچه که در شرایط هاردی وینبرگ مورد انتظار است، وقوع آلل‌های صفر است (۱۵). تصور می‌شود جهش‌های نقطه‌ای در درون محل آغازگر باعث ایجاد آلل‌های صفر می‌گردد (۱۰). همانگونه که قبلاً نیز ذکر گردید، وقایعی مانند حذف و اضافه بین ترتیب مورد تکثیر و محل آغازگر، کیفیت پایین DNA استخراجی و جهش می‌توانند باعث ایجاد آلل‌های صفر شوند (۲۰). داکین و اویس (۱۰) اظهار کردند که آلل‌های صفر باعث اریبی برآورد فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی خواهند شد.

در پژوهش حاضر بیشترین تعداد آلل در جمعیت مازندران متعلق به جایگاه MCW034 با ۶ آلل بود، در حالیکه در جمعیت اصفهان جایگاه‌های MCW104، MCW268 و LEI94 بیشترین آلل (۵ آلل) را نشان دادند. در جمعیت مرغان مازندران از بین بیست جایگاه مورد بررسی ۱۹ جایگاه چند شکل و فقط جایگاه MCW216 تک شکل بود. در حالی که در جمعیت اصفهان از بین بیست جایگاه مورد بررسی، جایگاه‌های MCW67، MCW222 و MCW216 تک شکل بود. کروژمانس و همکاران (۸) نیز یک جایگاه ریزماهوره را در لاین تخم‌گذار، یک شکل و در لاین گوشتی چندشکل گزارش کردند. در هر دو جمعیت کمترین تعداد آلل (یک آلل) برای جایگاه MCW0216 بدست آمد. جایگاه‌های MCW81، MCW295، MCW248، MCW34 و LEI94 در بین دو جمعیت از تعداد آلل‌های متفاوتی برخوردار بودند.

مقایسه تعداد، نوع و دامنه اندازه آلل‌های حاصل از بررسی دو جمعیت بومی مورد بررسی نشان داد که بعضی از جایگاه‌های مورد بررسی دارای آلل‌های جدیدی شده‌اند و برخی از آلل‌هایی که در یک جمعیت گزارش شده در جمعیت دیگر وجود ندارد. در این تحقیق به دلیل اینکه با ریزماهوره‌ها سر و کار داریم، وجود چندشکلی‌های زیاد در این نوع نشانگرها دور از انتظار نیست. کایسر و همکاران (۱۴) با استفاده از ۵۹ جفت آغازگر ریز ماهوره متوسط تعداد آلل را در نژادهای مرغ گوشتی تجاری، ۲/۸ گزارش دادند. ون مارل کویستر و همکاران (۲۴) تنوع ژنتیکی را در ۷ لاین مرغ با کمک ریز ماهوره‌ها بررسی کردند و میانگین تعداد آلل مشاهده شده برای تمامی جایگاه‌ها، ۶/۱ بود. کنت و همکاران (۱۶) در تکثیر بین گونه‌ای با استفاده از DNA ژنومی بوقلمون و با کمک ریزماهوره، میانگین تعداد آلل مشاهده شده را ۱/۴ آلل گزارش کردند. امارا و کیم (۱۱) تنوع ژنتیکی را در ۳ لاین طیور گوشتی خالص مورد مطالعه قرار دادند که تعداد آلل در هر جایگاه ۱ تا ۸ بود و متوسط تعداد آلل هریک از جایگاه‌ها ۳/۵ و ۲/۸ و ۳/۱ برای هریک از لاین‌ها گزارش شد.

در این مطالعه از نشانگر اندازه Hpa-Pbs ساخت شرکت Gene craft که حاوی ۱۳ قطعه در اندازه‌های ۲۶-۷۱۲ جفت باز است، استفاده شد.

برای نمایان‌سازی باندها از روش رنگ‌آمیزی نقره استفاده گردید. ژل به مدت ۶ دقیقه در محلول تثبیت کننده (اتانل ۱۰٪ و اسید استیک ۰/۵٪) قرار گرفته و بر روی شیکر تکان داده شد. پس از شستشوی ژل با آب مقطر، ژل به دومین محلول رنگ‌آمیزی (نیترات نقره ۰/۲٪) منتقل شده و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر تکان داده شد. این بار نیز ژل به مدت ۲۰ ثانیه در آب مقطر شستشو داده شد. سپس ژل به محلول ظهور (۳٪ NaOH و فرم آلدئید ۰/۵٪) منتقل و بر روی شیکر تکان داده شد تا هنگامیکه باندها ظاهر گردند. پس از آنکه باندها کاملاً ظاهر شد، ژل دوباره به محلول تثبیت کننده منتقل شده و بمدت ۵ دقیقه بر روی شیکر تکان داده شد.

پس از خشک شدن نسبی، ژل با یک لایه نایلونی نازک پوشانیده شده و هوای زیر نایلون به دقت خارج گردید. در صورت نگهداری این ژلها در دمای چهار درجه سانتی گراد می‌توان آنها را بدون کاهش کیفیت به مدت چندین هفته نگهداری کرد.

تجزیه و تحلیل مشاهدات و داده‌ها

در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار UVIDOC (UVITECH, UK) و با توجه به توارث همباز ریزماهوره‌ها (هموزیگوت و یا هتروزیگوت بودن هر فرد بترتیب با توجه به مشاهده یک یا دو باند) انواع آلل‌ها و بدنال آن ژنوتیپ افراد مورد مطالعه شناسایی شد. سپس اطلاعات مربوط به ژنوتیپ‌ها به نرم‌افزار POPGENE^۱ انتقال داده شد. این نرم‌افزار برای تخمین هتروزیزوسیستی موردانتظار و مشاهده شده به کار رفت. برای بدست آوردن PIC^۲ نیز از نرم‌افزار Het نسخه ۱۰-۱ (۲۲) استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از استخراج DNA:

نتایج دستگاه اسپکتروفتومتر جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA مطلوب بود. نمونه‌های DNA استخراج شده دارای کیفیت خوب و فاقد آلودگی‌های RNA، پروتئینی و نمکی بود.

مقایسه آلل صفر، تعداد آلل‌ها و دامنه آللی:

آلل‌های صفر در جایگاه‌های ریزماهوره‌ای، آلل‌هایی هستند که یا ضعیف تکثیر می‌شوند و یا پس از تکثیر و تفکیک قابل رؤیت نیستند. این آلل‌ها بطور معنی داری می‌توانند در الگوهای تنوع مشاهده شده در جایگاه‌های ریزماهوره‌ای شرکت نمایند. نتایج حاصل از مقایسه

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ریزماهوره

نام جایگاه	موقعیت کروموزومی	دامنه اندازه آللی (bp)	دمای اتصال (درجه سانتی-گراد)	آغازگرها	شماره ژن بانک
ADL0268	1	۱۰۴-۱۱۲	۶۰	CTCCACCCCTCTCAGAACTA CAACTTCCCATCTACCTACT	G01688
LEI0166	3	۲۴۷-۲۶۰	۶۰	CTCCTGCCCTTAGCTACGCA TATCCCCTGGCTGGGAGTTT	X85531
MCW0295	4	۹۸-۱۱۲	۶۰	ATCACTACAGAACACCCTCTC TATGTATGCACGCAGATATCC	G32051
MCW0081	5	۱۱۸-۱۲۵	۶۰	GTTGCTGAGAGCCTGGTGCAG CCTGTATGTGGAATTACTTCTC	L43636
MCW0014	6	۱۶۵-۱۹۴	۵۸	TATTGGCTCTAGGAAGTGC GAAATGAAGGTAAGACTAGC	None
MCW0183	7	۲۵۵-۳۱۰	۵۸	ATCCCAGTGTGCGATATCCGA TGAGATTTACTGGAGCCTGCC	G31974
ADL0278	8	۱۰۰-۱۲۰	۶۰	GCACTACTGTGTGCTGCAGTTT GAGATGTAGTTGCCACATTCCGAC	G31945
MCW0067	10	۱۶۷-۱۹۲	۶۰	GCACTACTGTGTGCTGCAGTTT GAGATGTAGTTGCCACATTCCGAC	G31945
MCW0248	W29	۲۰۶-۲۲۰	۶۰	GTTGTTCAAAAAGAAGATGCATG TTGCATTAAGTGGGCATTTC	G32016
MCW0020	1	۱۷۰-۱۸۷	۶۰	TCTTCTTTGACATGAATTGGCA GCAAGGAAGATTTGTACAAAATC	L40055
MCW0034	2	۲۱۷-۲۵۳	۶۰	TGCACGCACTTACATACTTAGAGA TGTCCTTCCAATTACATTCATGGG	None
MCW0222	3	۲۱۸-۲۲۸	۶۰	GCAGTTACATTGAAATGATTCC TTCTCAAAAACACCTAGAAGAC	G31996
LEI0094	4	۱۷۲-۲۲۵	۶۰	GATCTCACCAGTATGAGCTGC TCTCACACTGTAACACAGTGC	X83246
MCW0216	13	۱۴۵	۶۰	GGGTTTTACAGGATGGGACG AGTTTCACTCCCAGGGCTCG	AF03058 6
MCW0104	13	۱۹۴-۲۲۵	۶۰	TAGCACAACCTCAAGCTGTGAG AGACTTGCACAGCTGTGTACC	L43640
MCW0330	17	۲۴۲-۲۹۶	۶۰	TGGACCTCATCAGTCTGACAG AATGTTCTCATAGAGTTCTCTGC	G32085
MCW0165	23	۱۱۸-۱۲۲	۶۰	CAGACATGCATGCCAGATGA GATCCAGTCTGCAGGCTGC	L43663
MCW0123	14	۸۶-۱۰۰	۶۰	CCACTAGAAAAGAACATCCTC GGCTGATGTAAGAAGGGATGA	L43645
MCW0069	E60C04W2 3	۱۵۹-۱۷۰	۶۰	GCACCTCGAGAAAACCTCTGCG ATTGCTTCAGCAAGCATGGGAGGA	L43684
ADL0112	10	۱۱۲-۱۳۳	۶۰	GGCTTAAGCTGACCCATTAT ATCTCAAATGTAATGCGTGC	G01725

جمعیت مازندران نیز دو جایگاه MCW222 و MCW165 در تعادل هاردی-وینبرگ بوده و سایر جایگاه‌های این جمعیت انحراف معنی‌داری را از تعادل هاردی-وینبرگ نشان دادند. در واقع بیشتر جایگاه‌های مورد بررسی انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ را نشان دادند. این جایگاه‌ها ممکن است با بعضی از ژن‌های مهم اقتصادی همبستگی داشته باشند (لوکوس تحت پدیده انتخاب باشد) و یا اینکه اسکوربندی (اشتباهات آلل خوانی) به دلیل فراهم نبودن شرایط ۱۰۰ درصد مناسب ژل (اشکالات فنی)، باعث ایجاد اشکال در تعیین ژنوتیپ‌ها شده است (۲۴).

مقایسه تعداد، نوع و دامنه اندازه آلل‌های حاصل از مطالعه حاضر با مطالعات قبلی نشان می‌دهد که مرغان ایرانی آلل‌های جدیدی را در جایگاه‌های مورد مطالعه دارا می‌باشند و برخی از آلل‌هایی که در مطالعات قبلی گزارش شده بودند در جمعیت مورد مطالعه مشاهده نگردید. با توجه به این مطالب می‌توان نتیجه گرفت که این جمعیت یک منبع ژنتیکی متفاوت با ویژگی‌های خاص خود می‌باشد.

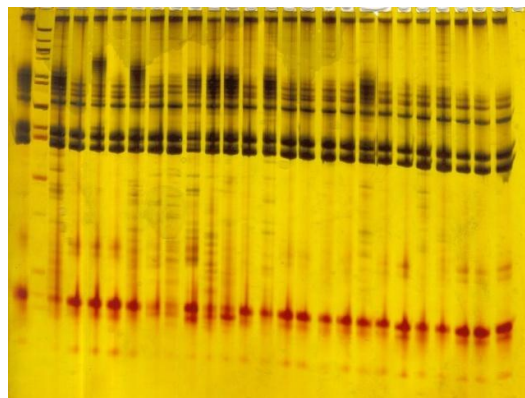
تعادل هاردی-وینبرگ:

جمعیت مرغان بومی اصفهان در هر بیست جایگاه انحراف معنی-داری را از تعادل هاردی-وینبرگ در سطح ۵ درصد نشان دادند. از

نشانگر ریزماهواریه در ۱۲ جمعیت مختلف مرغ مشخص کردند که تمامی جایگاهها در تعادل بودند. نصر (۵) انحراف از تعادل هاردی-وینبرگ در مرغ بومی اصفهان را با استفاده از ۱۰ جایگاه ریزماهواریه گزارش کرد. شهبازی و همکاران (۱) نیز انحراف از تعادل هاردی - وینبرگ را در بررسی تنوع ژنتیکی مرغان بومی ایران به کمک ریزماهواریه، گزارش نمودند و اندازه کوچک مؤثر جمعیت را عامل این انحراف مطرح کردند.

تنوع ژنتیکی:

بر اساس داده‌های حاصله دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای این جایگاه‌ها بین ۰/۷۴۳۷ (در جایگاه LEI0094) در جمعیت اصفهان و ۰/۲۴۷۲ (در جایگاه MCW165) در جمعیت مازندران می‌باشد که با نتایج بدست آمده از مقادیر PIC که یکی از معیارهای چندشکلی است، مطابقت دارد (جدول ۲).



شکل ۱- الگوی باندهای جایگاه MCW34

همچنین، وجود آلل‌های صفر و اثر واهلاند از جمله عوامل بروز این پدیده به‌شمار می‌رود (۱۸). البته در جمعیت مازندران در هیچ جایگاهی آلل صفر مشاهده نشده بود. وجود آلل صفر در جمعیت مرغان بومی اصفهان می‌تواند در انحراف جایگاه‌های این جمعیت از تعادل هاردی- وینبرگ اثرگذار باشد. یا و همکاران (۲۵) با استفاده از ۳۰

جدول ۲- مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب و میانگین هتروزیگوسیتی در دو

جمعیت مرغان مازندران و اصفهان

H _{ave}		H _{Nei}		H _e		H _o		جایگاه
اصفهان	مازندران	اصفهان	مازندران	اصفهان	مازندران	اصفهان	مازندران	
۰/۶۸۱۲	۰/۶۷۶۲	۰/۶۸۱۲	۰/۶۷۶۲	۰/۶۸۳۵	۰/۶۸	۰/۹۹۳۳	۰/۸۴۴۴	MCW14
۰/۷۴۳۷	۰/۶۶۶۵	۰/۷۴۳۷	۰/۶۶۶۵	۰/۷۴۶۲	۰/۶۷۰۳	۱	۱	LEI94
۰/۶۲۸۳	۰/۶۷۵۵	۰/۶۲۸۳	۰/۶۷۵۵	۰/۶۳۰۴	۰/۶۷۹۳	۰/۹۳۲۹	۰/۸۴۴۴	MCW295
۰/۶۴۰۸	۰/۴۵۴۳	۰/۶۴۰۸	۰/۴۵۴۳	۰/۶۴۳۰	۰/۴۵۶۸	۰/۹۴۶۷	۰/۵۳۳۳	MCW248
۰/۵۱۹۶	۰/۶۸۳۵	۰/۵۱۹۶	۰/۶۸۳۵	۰/۵۲۱۳	۰/۶۸۷۳	۱	۰/۹۸۸۹	MCW34
۰/۱۰۰۰	۰/۱۰۰۰	۰/۱۰۰۰	۰/۱۰۰۰	۰/۱۰۰۰	۰/۱۰۰۰	۰/۱۰۰۰	۰/۱۰۰۰	MCW216
۰/۶۶۱۰	۰/۷۲۵۴	۰/۶۶۱۰	۰/۷۲۵۴	۰/۶۶۳۲	۰/۷۲۹۴	۰/۹۹۳۳	۰/۹۶۶۷	ADL268
۰/۷۱۱۷	۰/۷۰۱۸	۰/۷۱۱۷	۰/۷۰۱۸	۰/۷۱۴۰	۰/۷۰۵۷	۰/۹۷۳۳	۰/۹۷۷۸	ADL112
۰/۵۲۶۶	۰/۴۴۴۴	۰/۵۲۶۶	۰/۴۴۴۴	۰/۵۲۸۴	۰/۴۴۶۹	۰/۹۶۶۷	۰/۶۶۶۷	ADL278
۰/۵۰۰	۰/۴۷۷۷	۰/۵۰۰	۰/۴۷۷۷	۰/۵۰۱۷	۰/۴۸۰۴	۱	۰/۷۸۸۹	LEI166
۰/۵۵۹۱	۰/۶۲۲۸	۰/۵۵۹۱	۰/۶۲۲۸	۰/۵۶۱۰	۰/۶۲۶۳	۰/۵۰۶۸	۰/۸	MCW183
۰/۶۸۳۳	۰/۵۱۵۹	۰/۶۸۳۳	۰/۵۱۵۹	۰/۶۸۵۶	۰/۵۱۸۷	۰/۴۶۹۰	۰/۹۸۸۹	MCW81
۰/۴۹۸۹	۰/۲۴۷۲	۰/۴۹۸۹	۰/۲۴۷۲	۰/۵۰۰۶	۰/۲۴۸۵	۰/۳۰۸۷	۰/۲۸۸۹	MCW165
۰/۵۰۰	۰/۴۹۳۸	۰/۵۰۰	۰/۴۹۳۸	۰/۵۰۱۷	۰/۴۹۶۶	۱	۰/۸۶۶۷	MCW67
۰/۵۰۰	۰/۳۰۶۴	۰/۵۰۰	۰/۳۰۶۴	۰/۵۰۱۷	۰/۳۰۸۱	۱	۰/۳۷۷۸	MCW222
۰/۷۸۳۱	۰/۷۱۳۸	۰/۷۸۳۱	۰/۷۱۳۸	۰/۷۸۵۷	۰/۷۱۷۸	۰/۵۲۰۰	۰/۶۲۲۲	MCW104
۰/۶۶۴۴	۰/۶۲۷۷	۰/۶۶۴۴	۰/۶۲۷۷	۰/۶۶۶۶	۰/۶۳۱۲	۰/۵۰۶۷	۰/۸	MCW20
۰/۷۴۶۶	۰/۷۲۷۷	۰/۷۴۶۶	۰/۷۲۷۷	۰/۷۴۹۱	۰/۷۳۱۷	۰/۵۵۳۳	۰/۶۳۳۳	MCW330
۰/۶۹۱۰	۰/۷۳۲۸	۰/۶۹۱۰	۰/۷۳۲۸	۰/۶۹۳۴	۰/۷۳۶۹	۰/۴۳۵۴	۱	MCW123
۰/۵۰۰	۰/۶۶۴	۰/۵۰۰	۰/۶۶۴	۰/۵۰۱۷	۰/۶۶۷۷	۱	۰/۶۳۳۳	MCW69

H_o: هتروزیگوسیتی مشاهده شده

H_e: هتروزیگوسیتی مورد انتظار

H_{Nei}: هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب

H_{ave}: میانگین هتروزیگوسیتی

استفاده جهت PCR و شرایط بهینه‌سازی مطرح می‌نماید. همچنین یا و همکاران (۲۵) نیز این تفاوت‌ها را ناشی از نوع جمعیت آزمایشی، منشأ ریزماهوره‌های مورد استفاده و منطقه پراکنش جمعیت می‌دانند. مقایسه نتیجه این تحقیق با سایرین، نشان می‌دهد که هتروزیگوسیتی جمعیت مرغ بومی اصفهان پایین است و احتمالاً علت آن برنامه‌های اصلاح نژادی است که باعث افزایش هموزیگوسیتی و کاهش هتروزیگوسیتی جمعیتی شده است. همچنین کوچک بودن اندازه این جمعیت در کنار عامل اول می‌تواند این پدیده را تشدید کند.

معیارهای چندشکلی:

مقایسه جدول هتروزیگوسیتی (جدول ۲) و PIC (جدول ۳) نشان داد که جایگاه‌های ریزماهوره با هتروزیگوسیتی بالا، PIC بالایی نیز دارند، همچنین مقدار هتروزیگوسیتی بدست آمده از PIC همواره کمتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار است، زیرا افراد هتروزیگوتی که ژنوتیپ والد خود را به ارث برده‌اند، از آن کاسته می‌شود. با دانستن میزان هتروزیگوسیتی و PIC می‌توان جایگاه‌هایی با قدرت تشخیص بالا را برای مطالعات بعدی انتخاب نمود.

کمترین مقدار آلل مؤثر و آلل واقعی در هر دو جمعیت متعلق به جایگاه MCW216 بود، اما بیشترین آلل واقعی و مؤثر در بین جایگاه‌های دو جمعیت متفاوت بود. به طور کلی بیشترین آلل واقعی مربوط به جایگاه MCW34 با ۶ آلل در جمعیت مازندران و بیشترین آلل مؤثر مربوط به جایگاه LEI0094 در جمعیت اصفهان بود. آغازگرها در این مطالعه به جز تعداد اندکی، دارای تعداد آلل مؤثر خوبی نیستند. با توجه به نتایج تعداد آلل در این مطالعه، می‌توان گفت که پلی مورفیسیم در این جمعیت در حد متوسط رو به پایین است. بیشترین PIC در جایگاه MCW0104 در جمعیت اصفهان و کمترین PIC در جایگاه MCW165 در جمعیت مازندران دیده شد. به طور کلی میزان چند شکلی جمعیت‌های مورد مطالعه نسبتاً پایین است.

شهبازی و همکاران (۱) در طی بررسی تنوع ژنتیکی ۵ جمعیت طیور بومی ایران با کمک ریزماهوره، گزارش کردند که بیشترین تنوع ژنتیکی با بیشترین آلل مربوط به مرغ بومی فارس و کمترین تنوع با کمترین تعداد آلل، مربوط به مرغ بومی اصفهان است. از آنجا که شاخص PIC بر اساس فراوانی آللی محاسبه می‌شود، در مورد جایگاه ADL0268 با وجود ۵ آلل، محتوای چندشکلی کمتر از برخی جایگاه‌های ۴ آللی است.

الوفسو و همکاران (۲۱) میزان PIC جایگاه‌های LEI0094 و LEI0166 را بترتیب 0.0557 ± 0.004 و 0.06155 ± 0.004 گزارش نموده‌اند، که با نتایج این تحقیق مغایرت دارد. دای و همکاران (۹) نیز این شاخص را برای جایگاه MCW0014، 0.3752 گزارش نموده‌اند.

بر اساس داده‌های هتروزیگوسیتی مشاهده شده نیز این دو جایگاه دارای بیشترین (۱) و کمترین (0.2889) مقادیر هستند. در مجموع با توجه به میانگین کل هتروزیگوسیتی می‌توان نتیجه گرفت که این جمعیت‌ها از تنوع نسبتاً پائینی برخوردار هستند. افت هتروزیگوسیتی فقط در سه جایگاه در جمعیت مازندران دیده شد. جایگاه MCW34 با وجود داشتن بیشترین آلل (۶ آلل) در جمعیت مازندران، بیشترین هتروزیگوتی را نشان نداد و آلل‌ها بیشتر به صورت هموزیگوت بودند. در توجه این مسئله می‌توان گفت که ممکن است این جایگاه با ژنی پیوستگی داشته باشند که انتخاب برای آن صفت باعث هموزیگوت شدن این نشانگر شده باشد.

نتایج هتروزیگوسیتی در انسان، خوک و مرغ بیانگر پائین‌تر بودن سطح هتروزیگوسیتی در مرغ به علت انتخاب شدید و اندازه کوچک جمعیت است (۸). در مطالعه‌ای میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه MCW14 در ۵ جمعیت مرغ چینی برابر با 0.3962 و میانگین این پارامتر در ۵ جایگاه ریزماهوره 0.3711 گزارش شد (۹). یا و همکاران (۲۵) میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در ۱۲ جمعیت مرغ در ۳۰ جایگاه ریزماهوره را 0.669 گزارش کردند. الوفسو و همکاران (۲۱) میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در ۴ جمعیت مرغ هایمن با استفاده از ۱۵ جایگاه ریزماهوره را 0.1 ± 0.6828 گزارش کردند و تفاوت در نتایج گزارشات مختلف را به علت تفاوت در اندازه نمونه‌ها، نمونه‌های مورد آزمایش، منابع نشانگرهای ریزماهوره مورد استفاده و موقعیت‌های متفاوت، مرتبط دانستند. همچنین هیل و همکاران (۱۳) نیز برای نشان دادن ساختار ژنتیکی ۵۰ جمعیت مرغ از ۲۲ جایگاه ریزماهوره‌ای استفاده کردند. از این تعداد هشت جایگاه MCW0034، ADL0268، ADL0112، MCW0295، MCW0014، ADL0278، MCW0216 و MCW0248 در تحقیق حاضر نیز مورد استفاده قرار گرفتند، آنها متوسط هتروزیگوسیتی این جایگاه‌ها را بترتیب 0.68 ، 0.55 ، 0.51 ، 0.47 ، 0.38 و 0.31 گزارش نمودند. یا و همکاران (۲۵) در بررسی تنوع و فاصله ژنتیکی ۱۲ نژاد مرغ بومی چین متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده را بترتیب 0.669 و 0.764 گزارش نموده‌اند. دای و همکاران (۹) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی و زمان تفرق جمعیت‌های مرغ بومی چین متوسط هتروزیگوسیتی را 0.3711 ± 0.2 بدست آورده است، در حالیکه متوسط هتروزیگوسیتی در جمعیت مورد مطالعه 0.5613 بدست آمده است که با نتایج این محققین مغایرت دارد، اما با نتایج شهبازی و همکاران (۱) و نصر (۵) مطابقت دارد. این گزارشات نشان می‌دهد که بررسی‌های متفاوت می‌تواند نتایج متفاوتی را داشته باشد. دای و همکاران (۹) علت این تفاوت‌ها را تعداد نشانگرهای مورد استفاده، اندازه جمعیت، برنامه مورد

این شباهت‌ها و تفاوت‌ها اطلاعات خاصی را در اختیار قرار نمی‌دهد و ارزش‌های PIC بایستی برای هر مطالعه محاسبه و گزارش گردد و مقادیر مربوطه خاص آن مطالعه می‌باشند، ولی از مطالعات قبلی می‌توان به عنوان راهنمایی برای انتخاب جایگاه‌های چندشکل و مفید برای مطالعات شجره‌ای مدنظر سود برد. ژن‌های با چندشکلی بالاتر از ۰/۵ ژن‌هایی قلمداد می‌شوند که اطلاعات زیادی را در مورد تنوع ژنتیکی به دست می‌دهند (۶). در این مطالعه از مجموع بیست نشانگر مورد استفاده ۱۱ نشانگر در جمعیت مرغ بومی اصفهان و ۱۲ نشانگر در جمعیت مرغ بومی مازندران دارای این شرایط هستند.

طبق نتایج حاصل شده میزان چندشکلی جمعیت‌های مورد مطالعه پایین بود و میزان هتروزیگوسیتی نیز به دلیل عوامل انتخاب و برنامه‌های اصلاحی موجود پایین می‌باشد. بنابراین دست‌اندرکاران برنامه‌های اصلاحی جمعیت مذکور بایستی در کنار اجرای این برنامه‌ها توجه لازم به حفظ تنوع ژنتیکی گله داشته باشند تا این ذخایر ژنتیکی به عنوان سرمایه‌های ملی کشور حفظ گردند. با توجه به انطباق نتایج حاصله با سایر نتایج کارایی ریزماهواره‌ها جهت تعیین تنوع ژنتیکی انکارناپذیر است. مطالعات بسیاری نیز که قبلاً توسط محققین دیگر انجام شده است چنین نتایجی را تأیید نموده‌اند.

یا و همکاران (۲۵) تعداد آلل مشاهده شده و مؤثر را به ترتیب در جایگاه‌های MCW81 (۶ و ۳/۲۳۲)، MCW295 (۹ و ۵/۰۰۵)، MCW67 (۶ و ۴/۴۸۲)، MCW183 (۹ و ۳/۸۷۷)، MCW330 (۱۰ و ۴/۷۷۲) و MCW104 (۸ و ۳/۱۴۴) در ارزیابی ژنتیکی ۷۲۰ نمونه از ۱۲ جمعیت مرغ بومی چین گزارش کردند. علت تفاوت در نتایج همانطور که قبلاً نیز بیان شد، تفاوت‌های موجود در مطالعات و چندشکلی زیاد ریزماهواره‌ها است. ون مارل کوستر و همکاران (۲۴) مقادیر PIC بیشتری را برای جایگاه‌های MCW222، MCW69 و MCW67 گزارش کردند. کایسر و همکاران (۱۴) که ۵۹ جایگاه ریزماهواره‌ای را جهت تعیین چندشکلی دو جمعیت گوشتی (۶ قطعه از هر جمعیت) بکار بردند دلیل فراوانی پایین تر آلل را در تحقیق خود نسبت به تحقیقات مشابه تعداد کمتر افراد تعیین ژنوتیپ شده مطرح کردند.

نتیجه این تحقیق در مقایسه با نتایج کار سایرین نشان می‌دهد که میزان پلی مورفیسم در جمعیت مرغ بومی اصفهان و مازندران نسبتاً پایین است. که با نتیجه تحقیق مشابه شهبازی و همکاران (۱) مطابقت دارد. با توجه به تفاوت جمعیت‌های مورد بررسی و تفاوت تعداد و نوع آلل‌های حاصل از مطالعات مختلف، شباهت‌ها و تفاوت‌های میان این مطالعه و گزارشات قبلی کاملاً طبیعی است و

جدول ۳- مقادیر آلل واقعی، آلل مؤثر، PIC-value برای جایگاه‌های مورد مطالعه در جمعیت مازندران و اصفهان

نام جایگاه	na		ne		PIC-value
	اصفهان	مازندران	اصفهان	مازندران	
MCW0014	۴	۴	۳/۱۳۶۵	۳/۰۸	۰/۶۱۴
LEI0094	۵	۴	۳/۹۰۱۴	۲/۹۹	۰/۶۰۴
MCW0295	۴	۵	۲/۶۹۰۲	۳/۰۸	۰/۶۳۱
MCW0248	۴	۳	۲/۷۸۴۳	۱/۸۳	۰/۳۹۲
MCW0034	۴	۶	۲/۰۸۱۶	۳/۱۵	۰/۶۲۶
MCW0216	۱	۱	۱/۰۰۰۰	۱	۰/۰۰۰
ADL0268	۵	۵	۲/۹۴۹۹	۳/۶۴	۰/۶۸۰
ADL0112	۴	۴	۳/۴۶۸۲	۳/۳۵	۰/۶۴۷
ADL0278	۳	۲	۲/۱۱۲۶	۱/۸	۰/۳۴۵
LEI0166	۲	۲	۲/۰۰۰۰	۱/۹۱	۰/۳۶۳
MCW0183	۳	۳	۲/۲۶۸۱	۲/۶۵	۰/۵۵۱
MCW0081	۴	۳	۳/۱۵۷۱	۲/۰۶	۰/۳۹۹
MCW0165	۲	۲	۱/۹۹۵۶	۱/۳۲	۰/۲۱۶
MCW0067	۲	۲	۲/۰۰۰۰	۱/۹۷	۰/۳۷۱
MCW0222	۲	۲	۲/۰۰۰۰	۱/۴۴	۰/۲۵۹
MCW0104	۵	۵	۴/۶۱۰۷	۳/۴۹	۰/۶۶۵
MCW0020	۳	۳	۲/۹۷۹۵	۲/۶۸	۰/۵۵۷
MCW0330	۴	۴	۳/۹۴۵۶	۳/۶۷	۰/۶۷۷
MCW0123	۴	۴	۲/۲۳۶۳	۳/۷۴	۰/۶۸۴
MCW0069	۴	۴	۲/۰۰۰۰	۲/۹۷	۰/۵۹۹

PIC-value: محتوای اطلاعات چند شکلی

ne: آلل مؤثر

na: آلل واقعی

منابع

- ۱- شهبازی آذربیس، ص.، و س. ض. میرحسینی. ۱۳۸۴. تنوع ژنتیکی مرغان بومی اصفهان، فارس و یزد با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، کرمان. ص ۲۲۱-۲۱۹
- ۲- قره یاضی، ب. ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. مجموعه مقالات چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. ص ۲۳۸-۲۳۰
- ۳- قنبری، ص.، س. اسماعیل خانیان، م. پ. اسکندری نسب، و ر. عصفوری. ۱۳۸۳. بررسی تنوع ژنتیکی گله اصلاحی گوسفندان بلوچی با استفاده از نشانگرهای میکروساتلایت. مجموعه مقالات اولین کنگره علوم دامی و آبزیان کشور. ص ۸۲۵-۸۲۱
- ۴- میرعبدالباقی، ژ. ۱۳۸۴. تاریخچه و وضعیت مرغان بومی کشور. مجموعه مقالات اولین همایش مرغ بومی کشور. ص ۸۹.
- ۵- نصر، ع. ۱۳۸۴. بررسی تنوع ژنتیکی مرغ بومی اصفهان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه زنجان. ص ۹۳
- 6- Botstein, D., R.L.White, H. Skolmick, and R.W.Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Human Genet.* 32: 314-331.
- 7- Cheng, H.H., I. Levin, R. L. Vallejo, H. Khatib, J. B. Dodgson, L. B. Crittenden, and J. Hillel. 1995. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poultry Sci.* 74: 1855-1874.
- 8- Crooijmans, R.P.M.A., A. J. A. Van Campen, A. F. Groen, and B. S. Vander. 1996. Microsatellite Polymorphism in commercial broiler and layer lines estimated using pooled blood samples. *Poultry Sci.* 75: 904-909.
- 9- Dai, G.J., O. Oloofeso, and J. Y. Wang. 2006. Genetic differentiation degree and time of divergence between Chinese chicken populations inferred from microsatellite data. *Poultry sci.* 5: 365-369.
- 10- Dakin, E.E., and J. C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity.* 93: 504-509.
- 11- Emar, M.G., and H. Kim. 2003. Genetic markers and their application in Poultry breeding. *Poultry Sci.* 82: 952-957.
- 12- Hillel, J., M. A. Geroenen, M. Tixier-Boichard, A. B. Korol, L. David, V. M. Kirzhner, T. Burke, A. Barre- dirie, R. P. M. A. Crooijman, K. Elo, M. W. Feldman, P. J. Freidlin, A. Maki- tanila, M. Ootwijn, P. Thomson, A. Vignal, K. Wimmevs, and S. Wrlgend. 2003. Biodiversity of 52 chicken population assessed by microsatellite typing to DNA Pools. *Genet. Sel. Evol.* 35: 533-557.
- 13- Kaiser, M.G., N. Yonash, A. Cahaner, and S.J. Lamont. 2000. Microsatellite polymorphism between and within broiler populations. *Poultry Sci.* 79: 626-628.
- 14- Karlsson, S., and J. Mork. 2005. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and temporal instability in allele frequencies at microsatellite loci in a local population of Atlantic cod. *ICES J. Mar. Sci.* 8: 1588-1596.
- 15- Kent, M., R. Kirstelle, M. Mendoza, and W.C. Beattie. 2000. Comparative analysis of microsatellite laci in chicken and Turkey. *Genome.* 43: 796-802.
- 16- Miller, S. A., D. D. Dykes, and H. F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
- 17- Mirhoseinie, S.Z., S. M. F. Vahidie, and B. Gharehyazie. 2005. Survey of efficiency of six microsatellite loci in Iranian indigenous cattle and buffalo populations. *Iran. J. Biotech.* 3: 41-47.
- 18- Msoffe, P.L.M., M. M. A. Matamb, U. M. Minga, H. R. Juul-Madsen, and P. S. Gwakisa. 2005. Genetic structure among the local chicken ecotypes of Tanzania based on microsatellite DNA typing. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 768-771.
- 19- Oconnel, M. and J. M. Wright. 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Rev. Fish boil. Fisheries,* 7: 331-363.
- 20- Olowofeso, O., J. Y. Wang, G. J. Dai, Y. Yang, D. M. Mekki, and H. H. Musa. 2005. Measurement of genetic parameters within and between Haimen chicken populations using microsatellite markers. *Poultry sci.* 4: 143:148.
- 21- Ott, J. 1989. Program HET Version 1. 10. Utility programs for analysis of genetic linkage. Rockefeller University. New York, NY, USA.
- 22- Takahashi, H., K. Nirasawa, M. Nagamine, M. Tsudzuki, and Y. Yamamoto. 1998. Genetic relationships among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. *J. Hered.* 89: 543-546.
- 23- Vanmarle-Koster, E., and L. H. Nel. 2003. Genetic marker and their application in livestock breeding in South Africa: A review. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 33: 1-10.
- 24- Ya-BO, Y., W. Jin-Yu, D. M. Mekki, T. Qing-Ping, and L. Hui- Fang. 2006. Evaluation of genetic diversity and genetic distance between twelve Chinese indigenous chicken breeds based on microsatellite markers. *Poultry Sci.* 5: 550-556.
- 25- Yj, T. U., K. W. Chen, J. C. Shen, Q. P. Tang, and S. J. Zhang. 2005. Analysis of genetic diversity of Sichuan indigenous chicken breeds using microsatellite markers. *Yi Chuan.* 27: 724-728.
- 26- Zhang, X., F. C. Leung, D. K. O. Chan, G. Yang, and C. Wu. 2002. Genetic diversity of Chinese native chicken breeds on protein polymorphism, Randomly amplified polymorphic DNA, and microsatellite polymorphism. *Poultry sci.* 81: 1463-1472.