فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۱، جلد ۱۳، شماره ۴، پاییز ۹۹، صفحه ۶۱ تا ۷۰
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

بررسی ساختار ژنتیکی گوسفند سنجابی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

رضا سید شریفی[۱]، سجاد بادبرین[۲]، نعمت هدایت ایوریق[۱]، جمال سیف دواتی[۱]، سیما ساور سفلی[۳]
۱- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل.ایران.reza_seyedsharifi@yahoo.com
۲- عضو هیات علمی، بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران .
۳- عضو هیات علمی، مرکز تحقیقات علوم دامی ایران ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت:۹۹/۶/۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: گوسفند سنجابی یکی از نژادهای با ارزش گوسفند در غرب کشور است که از نظر تولید گوشت و پشم اهمیت زیادی دارد. با توجه به اهمیت نژادهای بومی گوسفند و اصلاح نژاد آن ها جهت دستیابی به تولید با کمیت و کیفیت بیشتر، شناسایی ساختار ژنتیکی و برآورد پارامترهای مربوطه(تعداد آلل های مشاهده شده و موثر، هتروزیگوسیتی، شاخص شانون و غیره) تحقیق حاضر انجام گرفت.

روش کار: جمعیت مورد مطالعه شامل تعداد ۱۰۰ رأس قوچ و میش نژاد سنجابی واقع در ایستگاه مهرگان استان کرمانشاه بود که به صورت تصادفی انتخاب شدند. استخراج DNA به روش نمکی انجام گرفت. واکنش PCR با استفاده از ۱۰ نشانگر ریزماهواره انجام شد. قطعات تکثیر شده DNA روی ژل اکریل آمید وا سرشته شد و توسط روش نیترات نقره آشکار شد. امتیازدهی آلل‌ها با توجه به اندازه آن ها و در مقایسه با شاخص استاندارد PUC8 شرکت فرمنتاز انجام گرفت.

یافته ها: همه نشانگرهای مورد بررسی چندشکل بودند. میانگین تعداد آلل مشاهده شده و موثر برای تمام نشانگرها به ترتیب برابر با ۴/۵ و ۲/۹۰۱۲ محاسبه شد. بیشترین و کمترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار به ترتیب در نشانگرهای OarFCB11 و BMS2721 برابر با ۰/۷۵۴۸ و ۰/۵۶۱۹ به دست آمد. متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای تمام نشانگرها(تنوع ژنتیکی) برابر با ۰/۶۴۸۷ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان بیان کرد که گوسفندان مورد بررسی از سطح تنوع مطلوبی برخوردار بوده و می توان با استفاده از اصلاح نژاد و انتخاب دام های برتر به پیشرفت ژنتیکی بالایی دست یافت. هم چنین نشانگرهای مورد استفاده توانایی بالایی برای بررسی ساختار ژنتیکی گوسفندان سنجابی داشته و استفاده از آن ها در مطالعات آینده توصیه می‌شود.

واژه های کلیدی: ساختار ژنتیکی، گوسفند سنجابی، نشانگرهای ریزماهواره.

مقدمه

گوسفند یکی از دام هایی است که از نظر اقتصادی بسیار مهم بوده و به عنوان منبع گوشت، شیر، پشم و پوست برای جامعه بشری مورد استفاده قرار می‌گیرد. پرورش گوسفند در ایران به دلیل ذائقه مردم، قربانی کردن آن در مراسمات مذهبی، تامین پشم مورد نیاز صنعت قالیبافی و هم چنین حفظ و توسعه اشتغال، یکی از ضرورت های اصلی پرورش دام کشور است. به دلیل سازگاری بیشتر نژادهای بومی و محلی با شرایط محیطی، مقاومت بیشتر در برابر بیماری‌های شایع آن منطقه و توانایی استفاده بهینه از منابع غذایی محلی، اولویت اول دامداران محلی پرورش نژادهای بومی می‌باشد. امروزه جایگاه نژادهای بومی به دلیل معرفی تهاجمی نژادهایی با صفات اقتصادی بهبود یافته، در سراسر جهان به طور فزاینده ای به خطر افتاده است(۱۰). گوسفند نژاد سنجابی (Sanjabi sheep) یکی از نژادهای با ارزش غرب کشور است. منشا این گوسفند در منطقه سنجابی در استان کرمانشاه بوده که از نظر تولید گوشت، کیفیت گوشت و پشم سفید و یکدست اهمیت زیادی دارد. این دام در مقابل بیماری‌ها مقاومت بالایی دارد و در زمان پرواربندی

افزایش وزن مطلوبی دارد(۱۵). اطلاعات جمع آوری شده توسط سازمان FAO نشان می‌دهد که تقریباً ۳۰ درصد از نژادهای حیوانات اهلی در جهان در معرض خطر انقراض قرار دارند. سیاست حفاظت از نژادهای بومی تا حد زیادی به دانش ما از روابط تاریخی و ژنتیکی بین نژادها و همچنین عوامل اقتصادی و فرهنگی بستگی خواهد داشت. در رهنمودهای ارائه شده توسط سازمان FAO، برنامه ای یکپارچه برای مدیریت جهانی منابع ژنتیکی دام با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (Microsatellite Markers) پیشنهاد شده است(۱۷). بعضی از تکنیک های مولکولی امکان تشخیص تغییرات یا چند شکلی‌های افراد در مناطق خاصی از DNA را فراهم می‌کند. از این چند شکلی‌ها می‌توان به منظور تهیه نقشه‌های ژنتیکی و یا بررسی تفاوت‌های افراد در یک ناحیه خاص از ژنوم استفاده کرد. حتی این تفاوت‌ها در برخی اوقات می‌توانند تأثیر مستقیمی بر صفت و عملکرد آن ها داشته باشند. توسعه تکنیک‌های مولکولی به منظور تجزیه و تحلیل ژنتیکی، منجر به درک بیشتری از ژنتیک حیوانات و ساختار ژنوم آن ها شده است. از میان تکنیک‌های مولکولی، نشانگرهای مولکولی برای بررسی دقیق تغییرات توالی DNA در درون و بین گونه‌های جانوری کاربرد گسترده ای پیدا کرده اند. استفاده از نشانگرهای ریزماهواره یا Simple Sequence Repeats (SSR) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های دامی می‌تواند منجر به پیشرفت‌های سریعتری در توسعه و اجرای نشانگرها در برنامه های تولید مثل شود(۱۱). نشانگرهای ریزماهواره به طور گسترده ای به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، مورد استفاد قرار گرفته است(۲۲، ۱۹، ۱۲، ۱۰). در تحقیقی با استفاده از ۱۵ نشانگر ریزماهواره تنوع ژنتیکی گو سفندان بلوچی مورد برر سی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای مورد استفاده چند شکلی بالایی در این نژاد داشته که می‌توان از آن ها در مطالعات بعدی و مخصو صاً برر سی ارتباط چند شکلی آن ها با صفات کمی استفاده نمود(۱). در تحقیق دیگر با استفاده از پنج نشانگر ریزماهواره تنوع ژنتیکی گوسفند کردی خراسان مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که که نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده چند شکلی و تنوع ژنتیکی زیادی در این نژاد دارد(۵). هم چنین تنوع ژنتیکی پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از چهار نشانگر ریزماهواره برر سی شد که نتایج این تحقیق نیز نشان دهنده سطح چند شکلی بالای نشانگرهای ریزماهواره در میان نژادهای گوسفند ایرانی می‌باشد(۲۲). در مورد گوسفند سنجابی تحقیقی با استفاده از ۱۰ نشانگر ریزماهواره به منظور مقایسه تنوع ژنتیکی سه اکوتیپ گوسفند سنجابی(زردی، کژال و کلول) انجام گرفت. در این تحقیق اکوتیپ زردی بیشترین تنوع ژنتیکی را نسبت به بقیه نشان داد. نتایج نشان داد که سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در همه اکوتیپ‌های نژاد سنجابی مشاهده شد و این نژاد در معرض خطر انقراض نبود(۲۱). در تحقیقات پیشین از دامنه وسیعی نشانگر ریزماهواره جهت بررسی ساختار ژنتیکی گوسفند استفاده شده است. نشانگرهای مورد برر سی در تحقیق حا ضر به گونه انتخاب شد که علاوه بر چند شکلی بالا، سطح گسترده ای از ژنوم گوسفند سنجابی نیز بررسی شود. نشانگرهای مشترک در تحقیق حا ضر و تحقیقات پیشین عبارت بودند از: نشانگر OarFCB11 روی کرو موزوم ۲(۲۱، ۸، ۵)، نشانگر OarHH35 روی کروموزوم ۴(۲۲)، نشانگر BM1329 روی کروموزوم ۶(۳)، نشانگر BMS2721 روی کروموزوم ۷(۱)، نشانگر McMA2 روی کروموزوم ۱۳(۲۲)، نشانگر BMS1004 روی کروموزوم ۱۵(۶)، نشانگر MAF214 روی کروموزوم ۱۶(۱۹، ۱۰، ۷)، نشانگر OarCP49 روی کرو موزوم ۱۷(۵،۱۰)، نشانگر OarFCB304 روی کروموزوم ۱۹(۵،۲۱) و نشانگر BM6526 روی

کروموزوم ۲۶(۶). با این وجود، ایجاد یک مجموعه از مناسب‌ترین نشانگرهای ریزماهواره برای تحقیقات آینده، نیاز به غربالگری و آزمایش تعداد زیادی نشانگر روی تعداد زیادی از افراد دارد تا از این طریق میزان چندشکلی آن ها در آن نژاد مشخص شده و در آینده با توجه به شناخت قبلی از این نشانگرها مطالعات مختلف را طراحی کرد. با این عمل علاوه بر شناخت جامعی از ساختار ژنتیکی جمعیت مورد نظر، انتظار می‌رود که در هزینه‌ها و زمان نیز صرفه جویی شود. بنابراین از آن جا که تعداد نشانگرهای بیشتر موجب افزایش دقت ارزیابی خواهد بود، نیاز است که از دیگر نشانگرهای ریزماهواره هم استفاده کرد تا ارزیابی جامع تری نسبت به ساختار ژنتیکی گو سفند سنجابی حا صل شود. بنابراین تحقیق حا ضر با هدف برر سی ساختار ژنتیکی گو سفندان سنجابی ا ستان کرمانشاه با ا ستفاده از دیگر نشانگرهای ریزماهواره انجام گرفت.

مواد و روش¬ها

به منظور انجام این تحقیق، از ۱۰۰ رأس گوسفند اصیل سنجابی واقع در ایستگاه مهرگان استان کرمانشاه، با ا ستفاده از ونوجکت‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون، از سیاهرگ وداج گردن خونگیری شد و DNA آن به روش نمکی ا ستخراج شد(۱۴). سپس DNA ا ستخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اپندورف ساخت کشور آلمان تعیین غلظت شد و سپس غلظت آن ها با استفاده از آب مقطر به ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر رسانده شد. با توجه به تحقیقات پیشین و بررسی پراکنش نشانگرها روی کروموزوم‌های گوسفند، از ۱۰ نشانگر ریز ماهواره که چند شکلی خوبی در دیگر نژاد های گوسفند داشته اند، به منظور تعیین ژنوتیپ استفاده گردید(جدول ۱). ترکیب و غلظت واکنش PCR شامل Each primers ،MgCl2 2.5mM ،PCR buffer 1X ،0.2µM Taq DNA polymerase و dNTPs 0.2mM در حجم کلی ۱۰ میکرولیتر بود. برنامه حرارتی واکنش PCR به صورت تجربی بهینه شد و شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه تکرار شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای بهینه اتصال هر آغازگر و به مدت ۴۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. قطعات DNA تکثیر شده روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد(۱۹ قسمت اکریل آمید، یک قسمت بیس اکریل آمید) با ولتاژ ثابت ۲۵۰ ولت، دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و مدت زمان حدود ۲ ساعت تفکیک و با ا ستفاده از روش رنگ آمیزی سریع نیترات نقره رنگ آمیزی شد. پس از شناسایی آلل‌های مربوط به هر فرد، فایل داده های ژنومی برای افراد مورد بررسی تشکیل شد. پارامترهای اصلی بررسی تنوع ژنتیکی یک جمعیت شامل تعداد آلل مشاهده شده(Na)، تعداد آلل موثر(Ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده((Het(o))، هتروزیگوسیتی مورد انتظار((Het(e)) و شاخص شانون(I) می‌باشد که با استفاده از نرم افزار POPGENE 1.31 محاسبه گرد ید(۲۳). میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱ $Het(O)=\sum Nij/N$

معمول ترین معیار محاسبه تنوع ژنتیکی در یک جمعیت مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار است که برآوردی از میزان تنوع ژنتیکی برای نشانگرهای مورد بررسی در درون آن جمعیت را فراهم می کند و با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد.

$$NeisUnbiasedHeterozygosity= 2n/2n-1(1-\sum Pii2)$$

در این رابطه Pii فراوانی آلل های هموزیگوت نشانگر ریزماهواره مورد نظر می باشد.علاوه بر هتروزیگوسیتی، شاخص شانون یکی دیگر از معیارهای بررسی تنوع

ژنتیکی است. پیشنهاد شده است برای بررسی تنوع ژنتیکی در نشانگرهای با تنوع زیاد علاوه بر هتروزیگوسیتی از شاخص شانون نیز استفاده شود. در این شاخص نسبت آن گونه را به کل(P) تعیین کرده و سپس این نسبت را در لگاریتم طبیعی آن عدد و خود عدد ضرب می شود. این شاخص به عنوان معیاری برای بررسی تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت ها استفاده می شود. شاخص اطلاعات شانون با استفاده از رابطه ۳ محاسبه می شود: رابطه ۳ $I=\sum iPilnPi$

در این رابطه Pi فراوانی آلل iام و k تعداد کل آلل‌های مشاهده شده در آن جایگاه ژنی می باشد. برخلاف هتروزایگوسیتی، که برای هر تعداد آلل حد نهایی یک دارد، حداکثر مقدار شاخص شانون برابر با ln(n) می باشد. هر چه شاخص شانون به عدد صفر نزدیک شود، تنوع کم و هر چه یک آغازگر شاخص شانون بیشتری را نمایش دهد، استفاده از این نشانگر برای آن نژاد (تعیین تنوع) مناسب تر خواهد بود.

جدول ۱- نام نشانگرها، مکان آنها روی کروموزوم و توالی آغازگرهای مورد استفاده

نام نشانگر	کروموزوم	شماره ثبت	دمای اتصال	دامنه آللی	توالی آغازگر
OarFCB11	۲	L01531	۶۱	۱۴۳-۱۲۱	5- GCAAGCAGGTTCTTTACCACTAGCACC-3
					5- GGCCTGAACTCACAAGTTGATATATCTATCAC-3
OarHH35	۴	L12554	۶۲	۱۷۰-۸۷	5-AATTGCATTCAGTATCTTTAAACATCT GGC-3
					5-ATGAAAATATAAAGAGAATGAACCACA CGG-3
BM1329	۶	AF394444	۶۰	۱۱۵-۹۵	5- TTGTTTAGGCAAGTCCAAAGTC-3
					5- AACACCGCAGCTTCATCC-3
BMS2721	۷	G19113	۵۷	۱۵۸-۱۴۲	5-GTTCTCTGGGATTTGTGTCATT-3
					5-ATCCATGCAATAAAATTTAAAAGTG-3
McMA2	۱۳	AF098773	۵۲	۲۰۱-۱۵۷	5-TCACCCAACAATCATGAAAC-3
					5-TTAAATCGAGTGTGAATGGG-3
BMS1004	۱۵	G18607	۵۸	۱۸۹-۱۵۵	5-TTAAAAGTCAGAAAGGGAAGCC-3
					5-CTCGACCTCACATACTCAAAGC-3
MAF214	۱۶	M88160	۶۰	۲۸۲-۱۷۴	5-AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG-3
					5-GGGTGATCTTAGGGAGGTTTTGGAGG-3
OarCP49	۱۷	U15702	۶۲	۱۱۲-۹۰	5-CAGACACGGCTTAGCAACTAAACGC-3
					5-GTGGGGATGAATATTCCTTCATAAGG-3
OarFCB304	۱۹	L01535	۵۸	۱۸۸-۱۴۸	5-CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG-3
					5-CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG-3
BM6526	۲۶	G18454	۵۶	۱۸۸-۱۷۰	5-CATGCCAAACAATATCCAGC-3

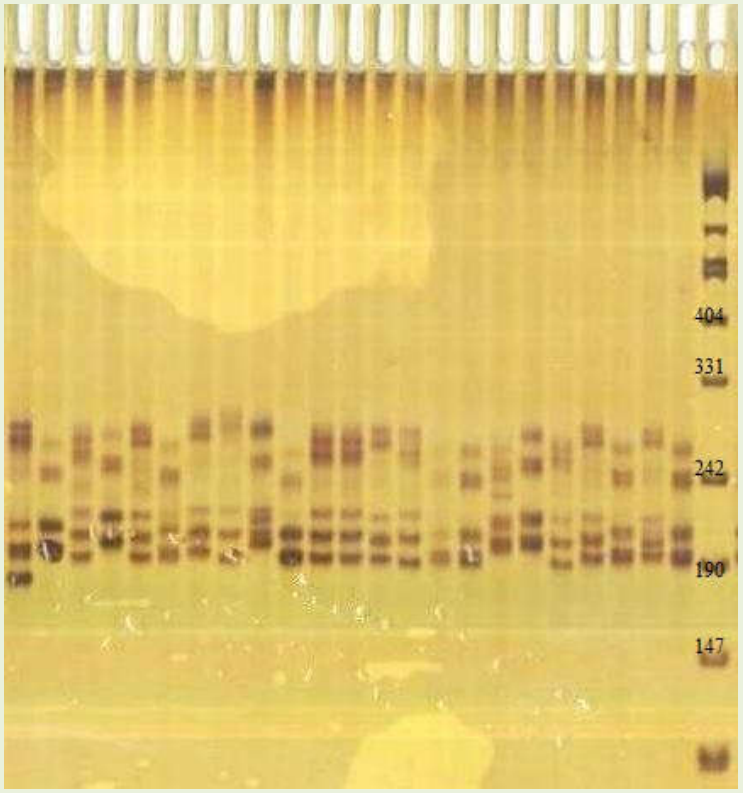
نتایج

نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده چند شکلی بالای نشان دادند. درصد چند شکلی آن ها برابر با ۱۰۰ درصد بود(جدول ۲). بیشترین و کم‌ترین تعداد آلل مشاهده شده به ترتیب در جایگاه OarFCB11 با ۷ آلل و جایگاه های BMS2721 و OarFCB304 با ۳ آلل مشاهده شد. هم چنین بیشترین و کم ترین تعداد آلل موثر به ترتیب برای جایگاه های OarFCB11 با ۴,۰۰۷۹ آلل و BMS2721 با ۲,۲۶۸۰ آلل محاسبه شد(جدول ۲). کمتر بودن تعداد آلل‌های موثر از مشاهده شده نشان می‌دهد

که تعداد زیادی از آلل های آن جایگاه فراوانی کم و تعداد کمی آلل دیگر فراوانی بیشتری دارند. میانگین تعداد آلل مشاهده شده و موثر در تمام جایگاه‌ها به ترتیب برابر با ۴/۵ و ۲/۹۰۱۲ بود. با توجه به اختلاف نسبتا زیاد این دو شاخص معلوم می‌شود که نشانگرهای استفاده شده کارایی نسبتا خوبی برای محاسبه تنوع ژنتیکی داشته اند زیرا هرچه میانگین تعداد آلل مشاهده شده به موثر نزدیک تر باشد نشان دهنده اثر مناسب‌تر آلل‌ها در نشان دادن چندشکلی و تخمین تنوع ژنتیکی است. بیشترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به نشانگر های OarCP49 و OarFCB304 (برابر با ۱) و کمترین هتروزیگوت مشاهده شده مربوط به نشانگرهای OarHH35 (برابر با ۰/۸۳۳۳) بود. از آن جا که نشانگرهای با چند شکلی بالا اطلاعات بیشتری برای بررسی تنوع ژنتیکی فراهم می‌کنند، بنابراین نشانگرهای OarCP49 و OarFCB304 در این پژوهش بیشترین میزان اطلاعات را فراهم کرده است. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای تمام نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق به نسبت بالا و به ترتیب برابر با ۰/۹۶۰۶ و ۰/۶۴۸۷ برآورد گردید(جدول ۲). نزدیکی این مقادیر به عدد ۱ نشان دهنده مناسب بودن نشانگرهای استفاده شده برای بررسی تنوع ژنتیکی گوسفندان سنجابی هستند. همچنین بیشترین و کم ترین مقدار شاخص شانون برابر با ۱/۴۳۲۷ و ۰/۸۸۹۸ به ترتیب مربوط به نشانگرهای OarFCB11 و BMS2721 محاسبه شد. میانگین این شاخص برای تمام نشانگرها برابر با ۱/۱۵۲۴ محاسبه شد.

جدول ۲- خلاصه ای از آماره های تنوع ژنی و هتروزیگوسیتی برای همه نشانگرها (۱۶)

نام نشانگر	اندازه نمونه	تعداد آلل مشاهده شده	تعداد آلل موثر	شاخص شانون	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مورد انتظار نئی	میانگین هتروزیگوسیتی
OarFCB11	۱۷۴	۷	۴/۰۰۷۹	۱/۴۳۲۷	۰/۹۷۷۰	۰/۷۵۴۸	۰/۷۵۰۵	۰/۷۵۰۵
OarHH35	۱۹۲	۶	۲/۷۳۵۱	۱/۲۲۰۶	۰/۸۳۳۳	۰/۶۳۷۷	۰/۶۳۴۴	۰/۶۳۴۴
BM1329	۱۷۴	۴	۲/۲۵۹۳	۱/۰۱۰۶	۰/۹۳۱۰	۰/۶۰۸۱	۰/۶۰۴۶	۰/۶۰۴۶
BMS2721	۱۹۸	۳	۲/۲۶۸۰	۰/۸۸۹۸	۰/۹۴۹۵	۰/۵۶۱۹	۰/۵۵۹۱	۰/۵۵۹۱
McMA2	۱۹۴	۴	۲/۲۶۸۳	۱/۰۴۲۸	۰/۹۸۹۷	۰/۶۳۰۶	۰/۶۲۷۳	۰/۶۲۷۳
BMS1004	۱۹۰	۵	۲/۸۲۳۸	۱/۱۸۵۶	۰/۹۸۹۵	۰/۶۴۹۳	۰/۶۴۵۹	۰/۶۴۵۹
MAF214	۱۷۶	۴	۲/۹۸۱۳	۱/۲۲۵۰	۰/۹۶۵۹	۰/۶۶۸۴	۰/۶۶۴۶	۰/۶۶۴۶
OarCP49	۱۹۲	۴	۳/۱۷۳۰	۱/۲۶۶۹	۱/۰۰۰۰	۰/۶۸۸۴	۰/۶۸۴۸	۰/۶۸۴۸
OarFCB304	۱۹۲	۳	۲/۳۰۷۳	۰/۹۰۹۸	۱/۰۰۰۰	۰/۵۶۸۹	۰/۵۶۵۹	۰/۵۶۵۹
BM6526	۱۹۸	۵	۳/۵۰۶۶	۱/۳۳۹۷	۰/۹۶۹۷	۰/۷۱۸۵	۰/۷۱۴۸	۰/۷۱۴۸
میانگین	۱۸۸	۴/۵	۲/۹۰۱۲	۱/۱۵۲۴	۰/۹۶۰۶	۰/۶۴۸۷	۰/۶۴۵۲	۰/۶۴۵۲
انحراف استاندارد	-	۱/۲۰۴۲	۰/۵۴۲۵	۰/۱۸۱۹	۰/۰۴۹۸	۰/۰۶۱۵	۰/۰۶۱۲	۰/۰۶۱۲



شکل ۱- الگوی باندی نشانگر MAF214 روی ژل اکریل آمید. در باند سمت راست شاخص اندازه PUC8 با اندازه های باندی آن نشان داده شده است

بحث و نتیجه گیری

نشانگرهای ریزماهواره معمولاً جهت مشخص نمودن پدر و مادر افراد مورد استفاده قرار می‌گیرند. هم چنین به عنوان یک گزینه عالی جهت تشکیل پروفایل ژنتیکی نژادها، محاسبه تنوع تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف و طراحی و اجرای برنامه های حفاظت از جمعیت‌های در معرض خطر انقراض در نظر گرفته می‌شوند. این نشانگرها به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردی مانند تجزیه و تحلیل آسان، چند شکلی زیاد و توزیع گسترده در سطح ژنوم نشانگرهای قابل اعتمادی قلمداد می‌شوند. هم چنین از این نشانگرها به راحتی می‌توان به منظور یافتن ارتباط بین آن ها با ژن‌های اصلی و جزئی کنترل کننده صفات مهم و انتخاب به کمک نشانگر(Marker-Assisted Selection)، استفاده کرد. در حال حاضر، مقادیر ارزش اصلاحی جهت انتخاب ژنومی بر اساس نشانگرهای SNP (Single Nucleotide Polymorphism) پیش بینی می‌شود. هم چنین از این نشانگرها در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی جانداران مختلف استفاده شده است. تاکنون بیش از ۵۴ هزار SNP معتبر برای نژادهای مختلف گوسفند معرفی شده است. پتانسیل نشانگرهای SNP جهت توصیف ساختار ژنتیکی جمعیت ها، بستگی زیادی به تراکم تراشه‌های استفاده شده دارد. در تحقیقات مختلف با استفاده از تعداد کمی نشانگر SNP و ریزماهواره، نشانگرهای ریزماهواره نتایج مشابه یا بهتری از SNP ها ارائه داده‌اند. هم چنین هزینه بالای خرید این تراشه‌ها عامل اصلی محدود کننده می‌باشد. بنابراین با توجه به این محدودیت‌ها، اولویت استفاده از نشانگرهای ریزماهواره جهت تحقیقات بررسی ساختار ژنتیکی توجیه می‌شود(۹). در این تحقیق، نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده تعداد نسبتاً بالایی آلل را در جمعیت مورد مطالعه نشان دادند(به طور متوسط ۴/۵ آلل برای تمام نشانگرها). تعداد آلل‌های موجود در یک جمعیت، یکی از پارامترهای اصلی تنوع ژنتیکی و عامل اصلی در میزان تولید حیوانات است، زیرا

وجود تعداد آلل بیشتر در جمعیت، امکان بیشتری برای ترکیب و آرایش مجدد ژن‌ها را فراهم می‌کند. در تحقیقات پیشین میانگین تعداد آلل موثر در ۱۴ نژاد گوسفند ایرانی که با استفاده از پنج نشانگر ریزماهواره بررسی شد ۷/۵۴ محاسبه شده است(۲۰). هم چنین تعداد آلل مشاهده شده نیز به نسبت بالاتر(۹ الی ۱۷ الل به ازای هر نشانگر) به دست آمده است(۳، ۲، ۱). با توجه به این که گوسفندان سنجابی نگهداری شده در ایستگاه برای چندین نسل به صورت بسته انتخاب و جفتگیری کرده‌اند، این اختلاف دور از انتظار نیست. زیرا پس از چندین نسل انتخاب داخل گروهی، به ناچار ضریب هم‌خونی و خویشاوندی افزایش خواهد یافت. این امر موجب هموزیگوت شدن درصد بیشتری از جایگاه‌های ژنی شده و موجب کاهش تنوع ژنتیکی خواهد شد. از طرفی با توجه به این که تعداد آلل مشاهده شده و مورد انتظار به شدت تحت تاثیر تعداد افراد بررسی شده می‌باشد، بنابراین اختلاف این مقادیر می‌تواند به دلیل استفاده از تعداد نشانگرهای کمتر و یا اندازه جمعیت کوچک تر در مقایسه با پژوهش حاضر باشد. شاخص هتروزیگوسیتی نیز تنوع ژنتیکی را در یک جمعیت تخمین می‌زند و یکی از پر کاربردترین پارامترها جهت محاسبه تنوع ژنتیکی در یک جمعیت است. هتروزیگوسیتی بالا بیانگر تلاقی افراد غیرخویشاوند و تثبیت آللی پایین است. برآورد هتروزیگوسیتی مشاهده شده(Ho) و مورد انتظار(He) در این مطالعه(به ترتیب ۰/۹۶۰۶ و ۰/۶۴۸۷) تنوع ژنتیکی بالایی را نشان می‌دهد. در تحقیقات پیشین متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در گوسفندان سنجابی به ترتیب برابر با ۰/۶۴ و ۰/۷۷ محاسبه شده است(۳). اختلاف مقادیر محاسبه شده در مقایسه با پژوهش حاضر می‌تواند به دلیل دریفت ژنتیکی در گوسفندان ایستگاه، اثر اندازه نمونه و یا نوع نشانگرهای ریزماهواره باشد. هم چنین میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در برخی نژادهای گوسفند ایرانی شامل بلوچی(۰/۸۱۶)، کردی شیروان(۰/۷۴۲۳) و کردی خراسان(۰/۷۷۱۳) محاسبه گردید(۶، ۵، ۱). در تحقیقات صورت گرفته روی گوسفندان دیگر کشورها نیز میزان هتروزگوسیتی مورد انتظار مقادیر نسبتاً بالایی گزارش شده است(۱۳، ۱۰). یکی از اصلی ترین عواملی که باعث از بین رفتن هتروزیگوسیتی می شود، تثبیت آلل‌های مرتبط با تولید بیشتر و هدف گذاری جفت-گیری ها جهت دستیابی به میزان تولید بیشتر است. این کاهش هتروزیگوسیتی با افزایش تعداد آلل ها در افراد هموزیگوت باعث تثبیت آلل خواهد شد. از آن جا که نشانگرهای مورد استفاده سطح بالایی از هتروزیگوسیتی را نشان دادند، بنابراین می توان نتیجه گرفت که نشانگرهای ریزماهواره، نشانگرهای کارآمدی جهت بررسی تنوع ژنتیکی گوسفند سنجابی هستند.توصیف تنوع در جمعیت ها برای زیست شناسان، پرورش دهندگان دام و محققان بانک ژن از اهمیت بسیاری برخوردار است، اما تعیین کمیت تنوع گونه‌ای جوامع زیست محیطی پیچیده است. تاکنون شاخص‌های مختلفی جهت مطالعه تنوع ژنتیکی ارائه شده است. یکی از شاخص‌های بررسی تنوع زیستی، شاخص شانون است. شاخص شانون نیز همانند هتروزیگوسیتی مشاهده شده، میزان تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهد و به دلیل این که حداکثر مقدار آن برابر با Ln(n) می باشد، برای بیان تنوع ژنتیکی جایگاه‌های با چند شکلی زیاد، مفید است. معمولاً مقادیر این شاخص در اکثر مطالعات اکولوژیکی بین ۱/۵ تا ۳/۵ است و این شاخص به ندرت از ۴ بیشتر است. این شاخص با افزایش غنا و یکنواختی جامعه افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر میانگین این شاخص برای تمام نشانگرهای مورد بررسی برابر با ۱/۱۵۲۴ محاسبه شد. در تحقیقات پیشین مقدار این شاخص تا حدودی بالاتر از این عدد شامل ۱/۸۴(۱)، ۱/۶۸۳۱(۵)،

اما برخی دیگر مقادیر پایین‌تری گزارش کرده‌اند شامل ۰/۷۳(۳). تفاوت این اعداد بیشتر بر مبنای اندازه نمونه، تفاوت در نوع نشانگر و تفاوت در تعداد نشانگر می‌باشد.

ماهیت چند شکلی زیاد نشانگرهای ریزماهواره زمینه را برای بسیاری از تحقیقات ژنتیکی مانند مطالعه روابط بین نژادهای مختلف گوسفند فراهم کرده است. در مجموع با توجه به اندازه شاخص‌های به دست آمده مانند مقادیر هتروزیگوسیتی و شاخص شانون، می توان نتیجه گرفت که جمعیت گوسفندان مورد مطالعه با وجود بسته بودن و آمیزش درون گروهی از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار هستند. این امر می‌تواند بیانگر قابلیت اصلاح نژادی زیاد این گله باشد و می توان برای آن برنامه های متنوع اصلاح نژادی طراحی و اجرا کرد.

منابع

۱- دانشور آملی، ع ر.، اسماعیل خانیان، س.، سنجابی، م ر.، میرهادی، س ا. ۱۳۹۸. بررسی چند شکلی تعدادی از نشانگرهای ریزماهواره در یک جمعیت از گوسفندان بلوچی. پژوهش های تولیدات دامی. ۱۰(۲۵): ۱۰۳-۹۶.

۲- رزبان، و.، اسماعیل خانیان، س.، واعظ ترشیزی، ر. ۱۳۸۸. بررسی پلی مورفیسم ۱۷ نشانگر میکروساتلایت در جمعیت گوسفند نژاد بلوچی. مجله علوم دامی ایران. ۴۰(۳): ۱۷-۱۱.

۳- رهبر، ر.، چهارآئین، ب.، سلیمانی، ب. ۱۳۹۵. ارتباط چند شکلی نشانگرهای ریزماهواره با صفات تولیدی و تولید مثلی گوسفند سنجابی. ژنتیک نوین. ۱۱(۳): ۴۸۱-۴۷۵.

۴- زاهدی، ز.، اسماعیل خانیان، س.، واعظ ترشیزی، ر. ۱۳۸۷. مطالعه چند شکلی ۱۲ نشانگر ریز ماهواره در گوسفند ان بلوچی ایستگاه عباس آباد مشهد. پژوهش و سازندگی. ۷۸: ۴۶-۳۹.

۵- سالاری، ا.، امیری نیا، س.، قره داغی، ع ا.، شیری، س ا.، خدرزاده، ص. ۱۳۸۹. بررسی تنوع ژنتیکی گوسفند کردی خراسان با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره. مجله دانش و پژوهش علوم دامی. ۷: ۱۷-۱۱.

۶- نقویان، س.، حسنی، س.، آهنی آذری، م.، خان احمدی، ع ر.، ساقی، د ع.، مامیزاده، ن. ۱۳۹۳. مطالعه تنوع ژنتیکی گوسفند کردی شیروان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و مقایسه ضریب هم خونی به دست آمده با استفاده از اطلاعات شجره ای. نشریه پژوهش‌های علوم دامی. ۲۴(۱): ۱۰۵-۹۳.

7.Buchanan, F.C., Crawford, A.M. (1992). Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF214 locus. Animal Genetic, 23; 394.

8.Buchanan, F.C., Crawford, A.M. (1993). Ovine microsatellites at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266, and OarFCB304 loci. Anim. Genet, 24; 145.

9.David, C M G., Quirino, C R., Vega, W H O., Bartholazzi Junior, A., Madella-Oliveira, A F., Costa, R L D. (2018). Diversity of indigenous sheep of an isolated population. BMC Veterinary Research, 14; 1-7.

10. Dudu, A., Popa, G O., Ghița, E., Pelmuș, R., Lazar, C., Costache, M. (2020). Assessment of genetic diversity in main local sheep breeds from Romania using microsatellite markers. Archives Animal Breeding, 63(1); 53-59.

11.FAO. (2000). World watch list for domestic animal diversity. Third edition. Rome. Italy.

12. Khan, MA., Massod, MT., Rashid, N., Ud-Din, Z., Jan, S., Din, M. (2019). SSR based characterization of indigenous harnai sheep breed of Balochistan. Journal of Animal Research, 9(1); 27-33.

13. Kusza, S., Dimov, D., Nagy, I., Bosze, Z., Javor, A., Kukovics, S. (2010). Microsatellite analysis to estimate genetic relationships among five Bulgarian sheep breeds. Genetics and Molecular Biology, 33(1); 51-56.

14. Luis, A., Salazar, M., Hirata, H., Cavalli, A.S., Machado, M.O., Rosario, D.C. (1998). Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. Clinical Chemistry, 44; 1748-1750.

15. Mohammadi, Y., Rashidi, A., Mokhtari, MS., Esmailizadeh, AK. (2010). Quantitative genetic analysis of growth traits and Kleiber ratios in Sanjabi sheep. Small Ruminant Research, 93; 88-93.

16. Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetic, 89; 583-590.

17. Oldenbroek, K. (2007). Utilisation and conservation of farm animal genetic resources. Wageningen Academic Publishers, p:64.

18. Peakall, R., Smouse, P. E. (2012). Gen AlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. Bioinformatics, 28; 2537-2539.

19. Rendo, F., Iriondo, M., Jugo, BM., Mazon, LI., Aguirre, A., Vicario, A. (2004). Tracking diversity and differentiation in six sheep breeds from the North Iberian Peninsula through DNA variation. Small Ruminant Research, 52; 195-202.

20. Shannon, C. E., Weaver, W.(1949). The mathematical theory of communication, urbana: university of illinois press.

21. Sharifi Seidani, E., Amirnia, C., Lavaf, A., Farasati, C., Aminashar, M. (2009). Genetic variation among different ecotypes of the Iranian Sanjabi sheep. Journal of Animal and Veterinary Advances, 8(6); 1173-1176.

22. Vajed Ebrahimi, MT., Mohammadabadi, MR., Esmailizadeh, A. (2017). Using microsatellite markers to analyze genetic diversity. Archives Animal Breeding, 60; 183-189.

23. Yeh, F. C., Yang, R., Boyle, T. (1999). POPGENE version 1.31, Microsoft windows based free ware for population genetic analysis, University of Alberta. Edmonton. Canada.

Investigation of Genetic Structure of Sanjabi Sheep Using Microsatellite Markers

R. Seyed Sharifi[1], S.Badbarin[2], N. Hedayat Aborigh[1],J.seyed Davati[1],S.Saver Sofla[3]

1. Associate Professorin Animal Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. **reza_seyedsharifi@yahoo.com**

2. Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Kermakshah ,Iran.

3. Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Animal Science.Karaj.Iran.

Received:2020.27. 8 **Accepted: 2020.22.9**

Abstract

Inroduction & Objective: Sanjabi sheep is one of the valuable breeds of sheep in the west of the country, which is very important in terms of meat and wool production. Considering the importance of native sheep breeds and their breeding, the present study was performed in order to achieve more production (quantity and quality), identification of genetic structure and estimation of relevant parameters (number of observed and effective alleles, heterozygosity, Shannon index, etc.).

Material and Method: The study population consisted of 100 Sanjabi rams and ewes located in Mehregan station of Kermanshah province that were randomly selected. DNA extraction was performed by salt method. PCR reaction was performed using 10 microsatellite markers. Amplified DNA fragments were stained on acrylamide gel and detected by silver nitrate method. Alleles were scored according to their size and compared to the standard index PUC8 of Fermentase Company.

Results: The results of this study showed that all markers were polymorphic. The mean number of observed and effective alleles for all markers was calculated to be 4.5 and 2.9012, respectively. The highest and lowest expected heterozygosity were obtained in OarFCB11 and BMS2721 markers equal to 0.7548 and 0.5619, respectively. The expected heterozygosity for all markers (genetic diversity) was 0.6487.

Conclusion: According to the obtained results, it can be said that the studied sheep have a desirable level of diversity and can be achieved by high breeding by breeding and selection of superior livestock. The markers used also have a high ability to study the genetic structure of Sanjabi sheep and their use is recommended in future studies.

.

Keywords: Genetic structure, Sanjabi sheep, Microsatellite markers.

.