Archive of SID

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 4, No. 2, Summer 2012, p. 154-158

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۴، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، ص. ۱۵۸-۱۵۴

ارزیابی آزمون انساب درتعدادی از گاوهای هلشتاین با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره نشاندار شده با فلورسانس

منا هاشمی[۱]- سیروس امیری نیا[۲*]- محمدطاهر هرکی نژاد[۳]- محمدحسین بنابازی[۴]

تاریخ دریافت:۹۰/۳/۱۵
تاریخ پذیرش:۹۱/۲/۳۰

چکیده

به منظور ارزیابی آزمون انساب با استفاده از جایگاههای ریزماهواره‌ای، تعداد ۸ نمونه از جمعیت گاوهای هلشتاین ایرانی مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور بدون آنکه هیچ اطلاعاتی از هویت و روابط ژنتیکی بین آنها در اختیار قرار داده شود با استفاده از ۱۲ جایگاه ریزماهواره ای توصیه شده انجمن بین المللی ژنتیک حیوانی (ISAG) مورد آزمون قرار گرفتند. ژنوتیپ هر فرد با استفاده از یک سری ۱۲ جفتی از آغازگرهای نشاندارشده فلورسنتی تعیین گردید. پس از برآورد فراوانیهای آللی و ژنوتیپی و شبیه سازی داده‌ها در نسخه ۲ نرم افزار CERVUS، آزمون انساب انجام و روابط ژنتیکی میان افراد مورد آزمون بدست آمده و مورد تایید مرکز ارسال کننده قرار گرفت. در روابط میان این افراد، انواعی از مناسبات شامل تکرار یک فرد با شماره های متفاوت، وجود یک و هر دو والد برای یک فرزند مشاهده شد. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار حاصل از ۱۱ جایگاه بررسی شده در این تحقیق ۰/۷۲ و متوسط PIC در آنها ۰/۶۳۱ بود. بجز جایگاه TGLA53 که به دلیل اشتباه در خوانش آلل و کیفیت نامناسب ژنوتیپ‌های قرایت شده از آنالیز نهایی حذف گردید، مجموع مقادیر حاصل از EP ۱۱ جایگاه دیگر نشان داد که جایگاههای مورد مطالعه به خوبی و با دامنه اطمینان بسیار مناسب قابلیت انجام آزمون انساب و تعیین روابط ژنتیکی (والد – فرزندی) را دارا می‌باشند و برای آزمون‌های انساب در جمعیت‌های بزرگتر و با شجره‌های پیچیده‌تر نیز توصیه می‌شوند.

واژه های کلیدی: آزمون انساب، نشانگر ریزماهواره، گاو هلشتاین

مقدمه

ارزیابی ژنتیکی محور اصلی اصلاح گاوهای شیری است و افزایش پیشرفت ژنتیکی تا اندازه‌ی زیادی بستگی به ارزیابی صحیح بر اساس شجره کامل و دقیق دارد. از آنجا که امروزه پیش بینی ارزش‌های اصلاحی بر اساس یک مدل حیوانی صورت می‌گیرد که در آن از اطلاعات تمام خویشاوندان یک فرد استفاده می‌شود، صحت اطلاعات شجره‌ای می‌تواند نقش بسزایی داشته باشد به طوریکه خطاهای شجره‌ای ممکن است صحت انتخاب را کاهش داده و پیشرفت ژنتیکی مورد نظر حاصل نشود (۱ و ۱۱). مطالعات اخیر نشان داده که ۳ تا ۴ درصد کاهش در پیشرفت ژنتیکی به دلیل ۱۰ درصد افزایش در خطاهای شجره‌ای در هر سال بوده است (۱۰). بنابراین برای به دست آوردن پیشرفت ژنتیکی بهینه در اصلاح گاوشیری، ضروری است که شجره از طریق آزمون والدینی شناسایی و تصحیح شود.

آزمون انساب، روشی ساده برای آزمون صحت اطلاعات شجره‌ای ثبت شده می‌باشد. این آزمون پیش از این با استفاده از نشانگرهای پروتئینی و گروه‌های خونی صورت می‌گرفت در صورتیکه در اواسط دهه ۹۰ آزمون DNA یا تعیین ژنوتیپ جایگزین آن شده است (۶ و ۷). استفاده همزمان از چندین نشانگر ژنتیکی به نام ریزماهواره‌های DNA، دسترسی به قابلیت اطمینانی در حدود ۰/۹۹ درصد برای تعیین شجره را ممکن ساخته است (۶). نشانگرهای ریزماهواره به دلیل چند شکلی بالا، توارث هم بارز مندلی، سهولت کار و توزیع گسترده در ژنوم به ابزاری قوی جهت انجام مطالعات در سطح ژنوم تبدیل شده‌اند و به طور گسترده جهت انجام آزمون انساب در جمعیت دامهای اهلی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱ و ۹). اوزکان و همکاران (۴)، ۱۲ جایگاه ریزماهواره را برای بررسی روابط شجره‌ای منتخب

۱و۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۲و۴- استادیار و مربی پژوهشی بخش پژوهش های بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
(*- نویسنده مسئول: Email: amirinia@asri.ir)

www.SID.ir

Archive of SID

بین ۷ گاو نر، ۲۱ گوساله نر و ۶۴ گوساله ماده آنها مورد ارزیابی قرار دادند که در آن مطالعه به استثنای سه مورد (۴/۷ درصد)، روابط منتسب تائید شد. تی گاما و همکاران (۲)، نیز با به کارگیری تعداد ۱۰ نشانگر ریزماهواره یک گروه شامل ۱۴۰ گوساله از چندین نژاد را که مشکوک به ثبت نسب نادرست بودند، مورد ارزیابی قرار دادند. روی هم رفته ۷۶/۴ درصد از گوساله‌ها با والدین ثبت شده سازگار بودند که بیشترین ناسازگاری هم در نتیجه شناسایی نادرست مادر بود. میزان خطاهای شجره‌ای تخمین زده شده در جمعیت گاو هلشتاین در تعداد زیادی از کشورها از جمله دانمارک ۱۵- ۵ درصد (کریستنسن و همکاران ۱۹۸۲)، آلمان ۲۳-۴ درصد (گلدرمن و همکاران ۱۹۸۶)، ایرلند ۲۰- ۸ درصد (بیچینور و کلی ۱۹۸۷)، هلند ۱۲ درصد (بون هیوس و ون ارندونک ۱۹۹۱)، در گله های شیری انگلیس ۱۰ درصد (ویسچر و همکاران ۲۰۰۲) و در اسرائیل ۱۱/۷ درصد (ولر و همکاران ۲۰۰۴) گزارش شده است (۶). در ایران سیدآبادی و همکاران (۸)، ۴۵ اسبچه خزر شامل ۱۴ کره اسب را جهت آنالیز انساب، ۱۷ نریان و ۱۴ مادیان را جهت شناسایی فردی با استفاده از هفت نشانگر ریزماهواره-ای تعیین ژنوتیپ کردند. مجموع مقادیر به دست آمده از قدرت تشخیص (PE) این نشانگرها ۹۷/۳ درصد گزارش شد که سودمندی این نشانگرها برای تایید انساب اسب خزر را نشان داد. با وجود تحقیقات بسیاری که با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بر روی گاوهای هلشتاین ایرانی صورت گرفته اما تاکنون در زمینه بررسی روابط والدینی و آزمون انساب در این نژاد تحقیقی گزارش نشده است. لذا تحقیق حاضر در راستای ارزیابی آزمون انساب و تایید انساب نمونه ای کوچک از گاوهای هلشتاین ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره صورت گرفت.

مواد و روش ها

در این تحقیق تعداد ۸ نمونه DNA از جمعیت گاوهای هلشتاین ایران که به صورت A، D، E، F، H، I، J و K نامگذاری شده بودند توسط مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی در اختیار قرار گرفت. اطلاعات مربوط به هویت و روابط ژنتیکی بین نمونه ها تا پایان آزمون های مربوطه و مشخص شدن روابط در اختیار محققین این پژوهش قرار داده نشد. ابتدا ۱۲ جایگاه ریزماهواره‌ای توصیه شده انجمن بین المللی ژنتیک حیوانی (ISAG) توسط ۱۲ جفت پرایمر بر روی نمونه های ذکر شده با واکنش PCR تکثیر گردید. از هر جفت پرایمر یک پرایمر در انتها توسط رنگ فلئوروسنت نشان گذاری شده بود. جدول ۱ اطلاعات نشانگرها را نشان می دهد.

برای تکثیر جایگاه‌ها از یک کیت تجاری تعیین ژنوتیپ گاوی ساخت شرکت FINNZYMES DIAGNOSTICS (Panel 1.2, F-904) استفاده شد.

جدول۱- مشخصات جایگاه های استفاده شده برای تعیین ژنوتیپ نمونه ها همراه با پرایمرهای استفاده شده

جایگاه	کروموزوم	توالی پرایمر	دامنه اندازه آلل (جفت باز)	رنگ
TGLA227	۱۸	F: CGA ATT CCA AAT CTG TTA ATT TGC T R: ACA GAC AGA AAC TCA ATG AAA GCA	۶۳ -۱۱۵	FAM
BM2113	۲	F: GCT GCC TTC TAC CAA ATA CCC R: CTT CCT GAG AGA AGC AAC ACC	۱۱۶ -۱۴۶	FAM
TGLA53	۱۶	F: GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA R: ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	۱۴۷ -۱۹۷	FAM
ETH10	۵	F: GTT CAG GAC TGG CCC TGC TAA CA R: CCT CCA GCC CAC TTT CTC TTC TC	۱۹۸ -۲۳۴	FAM
SPS115	۱۵	F: AAA GTG ACA CAA CAG CTT CTC R: AAC GAG TGT CCT AGT TTG GCT GTG	۲۴۰ -۲۷۰	FAM
TGLA126	۲۰	F: CTA ATT TAG AAT GAG AGA GGC TTC T R: TTG GTC TCT ATT CTC TGA ATA TTC C	۱۰۴ -۱۳۲	VIC
TGLA122	۲۱	F: CCC TCC TCC AGG TAA ATC AGC R: AAT CAC ATG GCA AAT AAG TAC ATA C	۱۳۳ -۱۹۳	VIC
INRA23	۳	F: GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTC R: TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C	۱۹۴ -۲۳۶	VIC
BM1818	۲۳	F: AGCTGGGAATATAACCAAAGG R: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	۲۴۸ -۲۷۶	VIC
ETH3	۱۹	F: GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG R: ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	۸۹ -۱۳۱	NED
ETH225	۹	F: GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T R: ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT	۱۳۲ -۱۶۶	NED
BM1824	۱	F: GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC R: CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG	۱۷۰ -۲۱۸	NED

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش در قالب یک واکنش چندگانه[1] و در حجم ۲۰ میکرولیتر و طبق دستورالعمل موجود در کیت استفاده شده صورت گرفت. سپس ۱/۵ میکرو لیتر از هر محصول PCR مطابق با روش ذکر شده در دستورالعمل کیت مذبور آماده سازی و جهت الکتروفورز به دستگاه Genetic Analyzer ABI 3130 (ساخت شرکت ABI) انتقال یافت. در کلیه مراحل از یک کنترل مثبت حاوی DNA ژنومیک گاوی با غلظت ۰/۵ نانوگرم/میکرولیتر برای تائید شرایط PCR و الکتروفورز استفاده شد. داده‌های به دست آمده با نرم افزار Genemapper (appliedbiosystems.com) تجزیه و تحلیل شدند. فراوانی‌های آللی، هتروزیگوسیته مشاهده شده و مورد انتظار، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) وEP[2] برای هر جایگاه با استفاده از نسخه ۲ نرم افزار CERVUS (www.fieldgenetics.com) (۲)، محاسبه شد و پس از شبیه سازی داده‌ها در نهایت با استفاده از همان نرم افزار آزمون انساب به منظور برقراری روابط والد- فرزندی میان نمونه‌ها صورت گرفت.

نتایج و بحث

پس از تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها در بین ۱۲ جایگاه مورد استفاده، جایگاه TGLA53 به دلیل کیفیت پائین و اشتباه در خوانش آلل از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شد. این جایگاه در تحقیق صورت گرفته توسط پوتنووا و همکاران (۵)، که از ۱۷جایگاه ریزماهواره‌ای (از جمله ۱۲ جایگاه به کار رفته در این مطالعه) جهت بررسی قابلیت استفاده از این نشانگرها در ردیابی گاوها در سه نژاد از جمعیت گاوهای چک استفاده کردند نیز از کیفیت پائینی در خوانش آلل‌ها برخوردار بود و از ادامه آنالیز حذف گردید. در بین ۱۱ جایگاه باقیمانده کمترین و بیشترین تعداد آلل مشاهده شده به ترتیب برای جایگاه SPS115 و جایگاه ETH10 برابر با ۳ و ۷ و میانگین تعداد آلل به ازای هر جایگاه ۴/۵۵ بود. کمترین و بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار نیز برای همان جایگاه‌ها و به ترتیب ۰/۳۴۲ و ۰/۸۸۳ برآورد گردید. شکل ۱ نحوه تعیین ژنوتیپ یک نمونه برای ۴ جایگاه را نشان می‌دهد. در بین ۱۱ جایگاه آزمون شده جایگاه‌های ETH10، BM2113، BM1824 به ترتیب با مقادیر هتروزیگوسیته ۰/۸۸۳، ۰/۸۶۷ و ۰/۸۴۲ بیشترین چند شکلی را با مقادیر PIC بالاتر از ۰/۷ نیز نشان دادند که بر کارایی مناسب آنها برای آزمون انساب دلالت دارد. مقادیر PIC به دست آمده برای این سه نشانگر در این تحقیق با نتایج گزارش شده توسط ژانگ و همکاران (۱۰)، که از ۳۰ جایگاه ریزماهواره‌ای برای تخمین کارایی این نشانگرها در آزمون والدینی گاوهای هلشتاین چین استفاده کردند، مطابقت دارد. ریوجاس والدس و همکاران (۷)، نیز هشت نشانگر ریزماهواره مشابه با نشانگرهای استفاده شده در این تحقیق را برای ارزیابی امکان استفاده از این نشانگرها در تایید شجره در شش نژاد از گاوهای مکزیک مورد تحقیق قرار دادند. در پژوهش آنها در نژاد هلشتاین تمام جایگاه‌ها مقادیر PIC بالاتر از ۰/۷ را نشان دادند. در بررسی ۱۲ جایگاه ریزماهواره‌ای مشابه دیگر نیز، اوزکان و همکاران (۴)، برای هشت جایگاه از ۱۲ جایگاه مطالعه شده از جمله جایگاه‌های ETH10، BM2113 و BM1824 مقادیر PIC بالاتر از ۰/۷ را گزارش کردند. در این تحقیق متوسط PIC گزارش شده برای ۱۱ جایگاه ۰/۶۳۱ بود. جدول ۲ نتایج به دست آمده از نشانگرهای مختلف را نشان می دهد.

از فراوانی‌های آللی به دست آمده توسط نرم افزار CERVUS ژنوتیپ‌های شبیه سازی شده ایجاد گردید و سپس آن فراوانی‌های آللی جهت آزمون انساب نمونه‌ها استفاده گردیدند. نتایج حاصل از آزمون انساب بر روی نمونه‌های موجود انواع متفاوتی از مناسبات از جمله وجود یک فرد با شماره‌های متفاوت، وجود یک و هر دو والد برای یک فرد را نشان داد. بدین ترتیب که F وH به دلیل دارا بودن ژنوتیپ‌های یکسان یک فرد بودند همچنین A، F و H دارای رابطه خویشاوندی بودند به طوریکه به احتمال زیاد A والد فرد H و/یا F می‌باشد ($P<0.02$). رابطه دو فرد E و I نیز تایید شد که مشخص گردید E والد I میباشد. رابطه خویشاوندی نمونه‌های D و J با K تایید شد که به احتمال زیاد D و J والدین K می‌باشند ($P<0.02$). روابط خویشاوندی به دست آمده کاملا مشابه با روابط واقعی بین نمونه‌ها بود و توسط مرکز ارسال کننده نمونه مورد تائید قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان می‌دهد در صورتی که در بررسی با تعداد بیشتری نمونه همین نتایج تکرار گردد می‌توان از آن برای آزمون انساب در گاو هلشتاین ایران استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل بخش بیوتکنولوژی خصوصا" خانم خدیجه فرهنگ کارشناس آزمایشگاه ژنومیکس موسسه تحقیقات علوم دامی کشور به خاطر همکاری در اجرای این پژوهش و همکاران مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی وزارت جهاد کشاورزی جهت تهیه نمونه های مورد نیاز کمال تشکر و قدردانی را داریم.

1- Single multiplex reaction
2- Exclusion probability

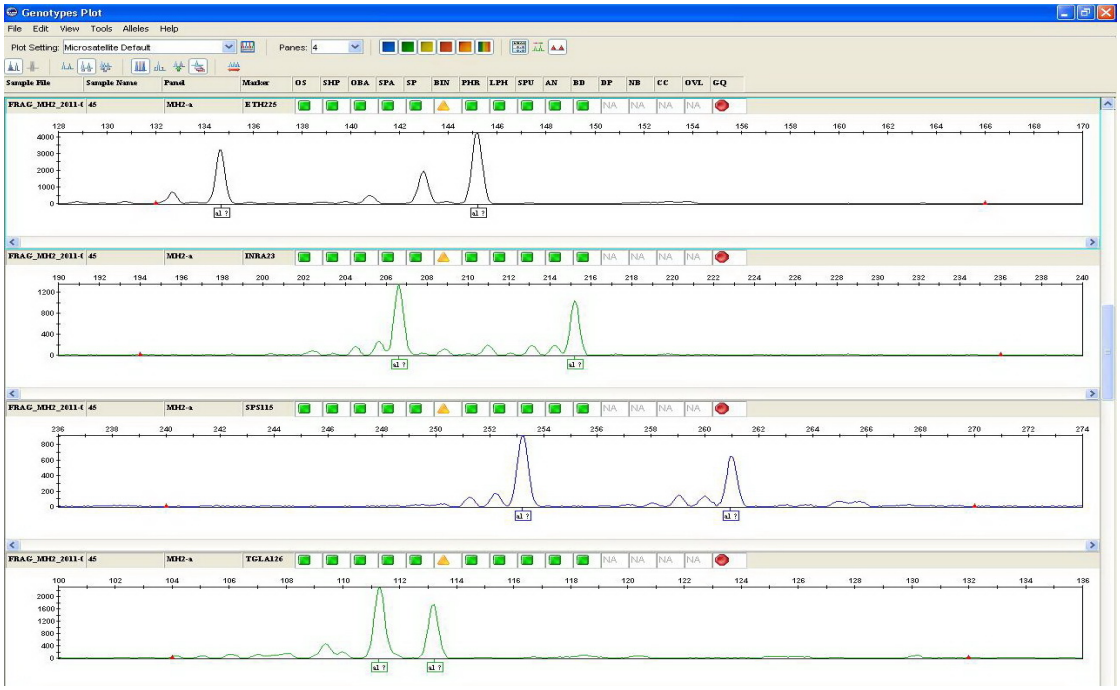
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- آماره‌های نمونه حاصل از ۱۱ جایگاه ریزماهواره‌ای نشاندار شده با فلورسانس

نشانگر	تعداد آلل	فراوانی فراوانترین آلل	هتروزیگوسیته مورد انتظار	PIC	EP(1)[A]	EP(2)[B]
TGLA227	۵	۰/۳۱	۰/۷۸۳	۰/۶۷۸	۰/۳۱۸	۰/۴۹۱
BM2113	۶	۰/۲۵	۰/۸۶۷	۰/۷۸۵	۰/۴۴۷	۰/۶۲۴
ETH10	۷	۰/۲۵	۰/۸۸۳	۰/۸۰۵	۰/۴۸۴	۰/۶۵۷
SPS115	۳	۰/۸۱	۰/۳۴۲	۰/۲۹۴	۰/۰۵۱	۰/۱۶۳
TGLA126	۴	۰/۵۶	۰/۶۴۲	۰/۵۴۷	۰/۱۹۴	۰/۳۵۲
TGLA122	۴	۰/۶۲	۰/۵۹۲	۰/۵۱۰	۰/۱۶۵	۰/۳۲۵
INRA23	۴	۰/۳۷	۰/۷۴۲	۰/۶۳۶	۰/۲۶۴	۰/۴۲۷
BM1818	۴	۰/۴۳	۰/۷۴۲	۰/۶۴۵	۰/۲۷۲	۰/۴۴۴
ETH3	۴	۰/۴۳	۰/۷۲۵	۰/۶۲۲	۰/۲۵۱	۰/۴۱۵
ETH225	۴	۰/۳۷	۰/۷۵۸	۰/۶۵۸	۰/۲۸۶	۰/۴۵۶
BM1824	۵	۰/۲۵	۰/۸۴۲	۰/۷۵۵	۰/۳۹۹	۰/۵۷۹
میانگین	۴/۵۵		۰/۷۲۰	۰/۶۳۱	۰/۹۷۸۶	۰/۹۹۸۹

A: EP حاصل از جایگاه‌ها برای اولین والد محتمل B: EP حاصل از جایگاه‌ها برای دومین والد محتمل



شکل۱ - آلل‌های به دست آمده برای یک نمونه در جایگاه‌های ETH225، INRA23، SPS115 و TGLA126 (هر پیک نشان دهنده یک آلل است و وجود ۲ پیک در یک جایگاه نشان دهنده ژنوتیپ هتروزیگوت برای آن فرد در آن جایگاه است).

منابع

1- Bhuyan, D. K., M. L. Sangwan, V. C. Gole, and R. K. Sethi. 2010. Studies on DNA fingerprinting in Murrah buffaloes using microsatellite markers. Indian J. Biotechnology. 9: 367-370.

2- Carolino, I., C. O. Sousa, S. Ferreira, N. Carolino, F. S.Silva, and L. T. Gama. 2009. Implementation of a parentage control system in Portuguese beef-cattle with a panel of microsatellite markers. Gene. Mol. Biol.

www.SID.ir

Archive of SID

32: 306-311.
3- Marshal, T. C., J. Slate, L. E. B. Kruuk, and J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Mol. Ecol. 7: 639-655.
4- Ozkan, E., M. I. Soysal, M. Ozder, E. Koban, O. Sahin, and I. Togan. 2009. Evaluation of parentage testing in the Turkish Holstein population based on 12 microsatellite loci. Livest Sci. 124: 101-106.
5- Putnova, L., L. Vrtkova, P. Srubarova, and L. Stehlik. 2011. Utilization of a 17 Microsatellites Set For Bovine Traceability in Czech Cattle Populations. Iranian J. Anim. Sci. 1(1): 33-38.
6- Rehout, V., E. Hradecka, and J. Citek. 2006. Evaluation of parentage testing in the Czeck population of Holstein cattle. Czech J. Anim. Sci. 12: 503-509.
7- Riojas-Valdes, V. M., J. C. Gomez-de-la-Fuente, J. M. Garza-Lozano, D. C. Gallardo-Blanco, J. N. Tellitu-Schutz, A. Wong-Gonzalez, G. Davalos-Aranda, and J. A. Salinas-Melendez. 2009. Exclusion probabilities of 8 DNA microsatellites in 6 cattle breeds from Northeast Mexico. J Anim Vet Adv. 8: 62-66.
8- Seyedabadi, H., C. Amirinia, M. H. Banabazi, and H. Emrani. 2006. Parentage verification Iranian Caspian horse using microsatellite markers. Iranian J. Biotechnology. 4: 260-264.
9- Stevanovic, J., Z. Stanimirovi, V. Dimitrijevi, V. Stoji, Fratric Natalija, and M. Lazarevi. 2009. Microsatellite DNA polymorphism and its usefulness for pedigree verification in simental cattle from Serbia. Acta Vete. J. 59 (5-6): 621-631.
10- Tian, F., D. Sun, and Y. Zhang. 2008. Establishment of paternity testing system using microsatellite markers in Chinese Holstein. J. Genet .Genomics. 35: 279-284.
11- Zhang, Y., Y. Wang, D. Sun, Y. Yu, and Y. Zhang. 2010. Validation of 17 microsatellite markers for parentage verification and identity test in Chinese Holstein cattle. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 23(4): 425-429.

www.SID.ir