

بررسی انتساب افراد به جمعیت‌هایی از سگهای بومی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

مهدیه منتظری^۱، علی اکبر مسعودی^{۲*}، رسول واعظ ترشیزی^۳، دامون اللهیار خان خراسانی^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه تربیت مدرس

^۲ استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه تربیت مدرس

^۳ دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه تربیت مدرس

^۴ فارغ التحصیل کارشناسی ارشد علوم دامی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۶/۲۴

چکیده

تست انتساب در تشخیص منشاء یک فرد، ارزیابی تمایز جمعیتی و پزشک قانونی اهمیت به سزایی دارد. در این تحقیق به بررسی برخی از معیارهای تنوع ژنتیکی، مقایسه روشهای مختلف انتساب و نحوه انتساب افراد به ۸ جمعیت از سگهای بومی کشور (کردی، سرابی، سنگسری، تازی، بختیاری، بومی کردستان، بومی البرز و بومی خراسان) با استفاده از ۱۳ جفت نشانگر ریزماهواره (C26.73320؛ FH3053؛ FH2914؛ FH2795؛ FH2790؛ FH20169,20؛ FH20609,20؛ CXX.6727,10,18؛ REN59H07؛ REN87O21؛ REN126A15؛ REN144M10؛ REN86G15) پرداخته شد. به این منظور نمونه‌های خون و بافت از جمعیت‌های بومی کشور بدست آمده و استخراج DNA از خون به روش استخراج نمکی و از بافت نیز با استفاده از روش تغییر یافته هضم آنزیمی صورت گرفت. با توجه به نتایج، بیشترین میزان هتروزیگوسیتی در جمعیت کردی (۰/۷۲) و کمترین آن در جمعیت سنگسری (۰/۵۳) مشاهده شد. برای مطالعه انتساب افراد به جمعیت‌های مربوطه از ۷ روش متفاوت استفاده شد. در بین روش‌های مبتنی بر درست‌نمایی، روش بیزی Baudouin & Lebrun (2001) و در بین روش‌های مبتنی بر فاصله ژنتیکی روش حداقل Nei (1973) بیشترین صحت را نشان دادند. مجموعاً نشانگرهای مورد استفاده توانسته‌اند در ۷۳ درصد موارد در انتساب افراد به جمعیت مبدشان موفق عمل نمایند.

کلید واژه‌ها: انتساب افراد، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره، سگ بومی.

مقدمه

(Shahbazi Azar & Mirhoseini, 2004). واضح است که شرط لازم برای بهبود در یک جمعیت حیوانی وجود تنوع در آن جمعیت است. با این وجود سگ اهلی یکی از حیواناتی است که دارای بیشترین تنوع در بین گونه‌های اهلی است و این امر آنرا به یک موضوع جالب برای مطالعات علمی تبدیل کرده است. امروزه در مطالعات علمی توجه ویژه‌ای به سگ می‌شود که علت این امر می‌تواند تنوع در ژنتیک، رفتار و فنوتیپ (اندازه، شکل، نوع پوشش و رنگ بدن) این حیوان باشد (Scott & Fuller, 1965; Sutter & Ostrander, 2004; Lindblad *et al.*, 2007; Kukekova, *et al.*, 2009). سگ از لحاظ حفاظت از افراد جامعه، گله‌های دام، کشف مواد مخدر، مواد منفجره و افراد زنده زیر آوار اهمیت بسزایی دارد. هم چنین بدلیل موقعیت سگ در درخت فیلوژنی، این حیوان را به عنوان الگوی مهمی برای مقایسه آنالیز ژنوم انسان تبدیل کرده است.

استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در سالهای اخیر جهت بررسی ساختار ژنتیکی حیوانات کاربرد گسترده‌ای یافته است. در سالهای اخیر، پروژه‌های متعددی با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی صورت گرفته که به تشخیص نژادهای منحصر بفرد کمک کرده و می‌تواند در برنامه‌های حفاظت نژادی استفاده شود. همچنین می‌توان از آنالیزهای انجام شده به کمک نشانگرهای ژنتیکی، ماهیت تنوع ژنتیکی را در بین و داخل نژادها تعیین نمود (Zajc *et al.*, 1997; Altet *et al.*,

با توجه به عدم ثبت اطلاعات در برخی از جمعیت‌های حیوانی و نامشخص بودن روابط بین افراد در چنین جمعیت‌هایی، استفاده از روش‌های مناسب انتساب فرد به والدین یا جمعیتی که از آن منشاء گرفته، ضروری می‌باشد. هم‌چنین از تست انتساب می‌توان به بررسی الگوهای مهاجرت، تشخیص منشاء یک فرد خاص، ارزیابی ساختار جمعیت، تمایز جمعیت‌ها و پزشک قانونی به طور موثر بهره گرفت (Cornuet *et al.*, 1996; Manel *et al.*, 2002). اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی موجودات اساسی‌ترین جنبه تمام علوم زیستی از قبیل اکولوژی، زیست‌شناسی تکاملی، رده‌بندی، زراعت، اصلاح و حفظ گونه‌های دامی به شمار می‌رود. حیوانات بومی به عنوان سرمایه ملی و استراتژیک هر کشور محسوب می‌شوند و شناخت دقیق این ذخایر ژنتیکی می‌تواند مبنای دقیق‌تری برای استفاده از برنامه‌های اصلاح نژادی در آینده گردد (Mirhoseini, 1996). هم‌چنین حفظ نژادهای بومی به عنوان ذخایر ژنتیکی ارزشمند برای نسل‌های آینده ضروری می‌باشد. با وجود این، ورود دامهای خارجی به کشورهای در حال توسعه از جمله ایران موجب شده است که دامهای بومی عمدتاً مورد بی توجهی قرار گیرند. در این فرایند دامهای بومی یا به طور کلی حذف و یا محدود شده و از طرفی ممکن است دامهای بومی به علت تلاقی‌های نسنجیده و ناصحیح، از نظر ژنتیکی خلوص خود را از دست بدهند

است (Pires et al., 2009). در مطالعه دیگری محققین با استفاده از همین نشانگرها توانستند افراد جمعیت German Shephard را با دقت ۱۰۰ درصد به جمعیت مربوطه منتسب کنند (Coutts & Harlry, 2009). همان‌طوریکه در بالا نیز اشاره شد، تشخیص هویت یک موجود از جنبه‌های مختلف علمی و یا اقتصادی می‌تواند حائز اهمیت باشد لذا هدف از تحقیق حاضر، بررسی نحوه انتساب افراد به جمعیت‌ها و مقایسه روش‌های مختلف انتساب افراد در هشت جمعیت از سگ‌های بومی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره می‌باشد که نتایج حاصل می‌تواند در زمینه‌های مختلف ارزیابی و تشخیص این گونه‌های حیوانی که ارزش و کاربردهای متعددی دارند، به کار روند.

مواد و روش‌ها

مطالعه اخیر با استفاده از تعدادی نمونه خون و بافت از برخی جمعیت سگ‌های بومی ایران از جمله جمعیت‌های تازی، کردی، سرابی، سنگسری و بختیاری و همچنین از تعدادی سگ‌های آزاد بومی ایران نظیر سگ‌های بومی استان خراسان، کردستان و البرز صورت گرفت. تعداد نمونه مورد استفاده از هر جمعیت در جدول ۱ آورده شده است. از آنجائیکه استخراج DNA با کیفیت و خلوص مطلوب، شرط لازم برای به دست آوردن تکرارپذیری بالا برای بیشتر نشانگرهای مولکولی از جمله ریزماهواره‌ها است (Bechmann & Soller, 1987)، پس از

یکی دیگر از (2001; Lindblad et al., 2005). کاربردهای عمده نشانگرها، استفاده از آنها در مطالعات مربوط به انتساب افراد در جمعیت‌های دامی می‌باشد. سهولت جداسازی، تشخیص و به ویژه تغییرپذیری زیاد ریزماهواره‌ها موجب شده، ریزماهواره‌ها به ابزاری توانمند جهت تجزیه و تحلیل ژنتیکی جمعیت‌ها تبدیل شوند. جایگاه‌های ریزماهواره، جایگاه‌های خنثی هستند که انتخاب طبیعی تاثیر چندانی در بر هم زدن تعادل این جایگاه‌ها ندارد (Rajai, 2004). چون این نشانگرها در سراسر ژنوم پراکنده‌اند، به عنوان ابزاری مناسب جهت بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها، تست انتساب، نقشه‌یابی ژن‌های موثر بر بیماری‌ها و یا صفات کیفی و کمی، تست والدینی و همچنین ویژگی تکاملی گونه‌های دامی از جمله سگ مفید می‌باشند (Wayne & Morin, 2004). از اینرو ضرورت شناسایی تنوع موجود در جمعیت‌های سگ بومی ایران آشکار بوده اما تاکنون هیچ مطالعه جامعی در این مورد صورت نگرفته است. از آنجا که اندازه‌گیری مستقیم میزان تنوع ژنتیکی یک نژاد در مناطق مختلف جغرافیایی مشکل و زمانبر است (Koining et al., 1996)، پیشنهاد شده است که در برخی از موقعیت‌ها، روش انتساب می‌تواند جایگزین اندازه‌گیری پراکنش در محیط‌های زندگی طبیعی شود (Cornuet et al., 1996). در مطالعه‌ای از نشانگرهای ریزماهواره‌ای به منظور تست انتساب در ۱۲ نژاد سگ از کشورهای پرتغال، آفریقا و اسپانیا به خوبی استفاده شده

افزار Excel (2007) استفاده گردید. از آنجاییکه هتروزیگوت‌ها آلل‌های متفاوتی دارند، فراوانی آنها مهم بوده و نشان‌دهنده وجود تنوع می‌باشند. میزان هتروزیگوسیته معمولترین معیار تنوع ژنتیکی در یک جمعیت می‌باشد که در تحقیق حاضر به دو صورت هتروزیگوسیته مشاهده شده (رابطه ۱) و هتروزیگوسیته مورد انتظار (رابطه ۲)، (Nei, 1973) گزارش شده است.

$$H_o = \frac{\sum N_{ij}}{N}$$

رابطه ۱:

در این رابطه N_{ij} ($j \neq i$) تعداد افراد هتروزیگوت، i و j نوع آللها در جایگاه ژنی مورد مطالعه و N تعداد کل افراد در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد.

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

رابطه ۲:

که در آن عبارت $\sum_{i=1}^n p_i^2$ فراوانی مورد انتظار هموزیگوت‌ها می‌باشد و p_i فراوانی i امین آلل در یک جایگاه معین می‌باشد. تعداد آللهای واقعی^۲ (n_a)، تعداد آللهای مشاهده شده یک جایگاه در یک جمعیت است. از آنجاییکه این معیار اغلب به شدت تحت تاثیر اندازه نمونه است، مقایسه بین جمعیت‌هایی با اندازه نمونه متفاوت باید با احتیاط صورت گیرد. گاهی اوقات نیز از تعداد آلل موثر^۳ (n_e) استفاده می‌شود که عکس هموزیگوسیته مورد انتظار می‌باشد (Hartl & Clark, 1989). تعداد آلل موثر با رابطه ۳ محاسبه می‌شود.

استخراج، کیفیت و کمیت DNA تعیین گردید. برای آگاهی از میزان DNA و خلوص آن از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد و جهت تعیین کیفیت آن از دستگاه اسپکتروفتومتری استفاده شد. در این مطالعه از ۱۳ جفت نشانگر ریزماهواره (H20609,20; CXX.6727,10,18; C26.73320; FH20169,20; FH2790; FH2795; FH2914; REN87021; REN59H07; FH3053

(REN86G15; REN144M10; REN126A15

و آغازگرهای مربوطه استفاده شد (Breen et al., 2001; Guyon et al., 2003; Parker et al., 2007). در انتخاب جایگاه‌ها به ویژگی‌هایی از قبیل هتروزیگوسیته و چند شکلی بالا بر اساس تعداد آللها و پراکندگی متعدد ژنومی دقت شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر طی ۳۵ سیکل انجام شد. سیکل حرارتی PCR به صورت مرحله واسرشته سازی اولیه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشته سازی در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۸-۶۶°C، به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. صحت انجام PCR با بررسی وجود محصولات تکثیر در ژل آگارز ۲ درصد صورت گرفت. الکتروفورز عمودی ژل آکرلامید ۶ درصد واسرشته‌ساز با ولتاژ ۱۰۰ تا ۳۰۰ به مدت ۱۸ ساعت انجام شد و رنگ‌آمیزی ژلها به روش نترات نقره صورت گرفت. برای بدست آوردن اندازه آللها از نرم‌افزار فتوشاپ و جهت تعیین انواع آللها و ژنوتیپ‌ها از نشانگر اندازه^۱ و نرم

^۲ Number of Actual Allels

^۳ Number of Effective Alleles

^۱ Size Marker

مربوطه مورد آزمون قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که جایگاه FH20609,20 با ۹ آلل و جایگاه FH3053 با ۴ آلل به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد آلل را نشان دادند که به دنبال آن جایگاه‌های فوق با ۵/۹۳ و ۲/۴۴ به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد آلل مؤثر را داشتند. مطالعه شاخص شانون و معیار PIC (محتوای چند شکلی) نیز نشان داد که جایگاه FH3053 دارای کمترین تنوع و جایگاه FH20609,20 دارای بیشترین تنوع در بین جایگاه‌های مورد مطالعه می‌باشد. در کل نشانگرهای ریزماهواره با متوسط ۰/۷۳ هتروزیگوسیتی مورد انتظار، در جمعیت‌های مورد بررسی تنوع آلی و ژنوتیپی بالایی را نشان دادند. بیشترین و کمترین تنوع درون جمعیتی، که برای هر جمعیت به صورت متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار در همه جایگاه‌ها برآورد گردید، به ترتیب در جمعیت‌های کردی (۰/۷۲) و سنگسری (۰/۵۳) بدست آمد.

$$n_g = 1 / \sum p_i^2 \quad \text{رابطه ۳:}$$

در این رابطه P_i فراوانی آلی برای جایگاه مورد نظر است.

در این تحقیق جهت انتساب افراد به جمعیت‌های مربوطه از دو روش مبتنی بر درست‌نمایی، روش بیزی Baudouin & Lebrun (2001) و روش بیزی Mountain & Rannala (1997)، روش فراوانی آلی Paetkau *et al.* (1997) و روش مبتنی بر فاصله ژنتیکی استاندارد Nei (1972)، حداقل Nei (1973)، ارزش دی Nei (1983) و Edwards & Cavalli-Sforza (1967) استفاده گردید. تست انتساب با استفاده از رابطه ۴ برآورد می‌گردد.

$$A_{XY} = \frac{1}{n_X} \sum_x \left| \log_{10} \left(\frac{Pr_X(g_i)}{Pr_Y(g_i)} \right) \right| \quad \text{رابطه ۴:}$$

در این رابطه X و Y ، جمعیت‌های مورد نظر، n_X اندازه جمعیت X ، g_i ژنوتیپ فرد i و Pr_X و Pr_Y احتمال ژنوتیپ در دو جمعیت X و Y می‌باشند.

به منظور بررسی معیارهایی همچون هتروزیگوسیتی، تعداد آلل واقعی و تعداد آلل مؤثر از نرم افزار PopGene32 استفاده گردید. تجزیه و تحلیل چگونگی انتساب هر فرد به جمعیت‌های مربوطه نیز توسط نرم‌افزار GeneClass2 (Piry *et al.*, 2003) انجام شد.

نتایج و بحث

در تحقیق حاضر، معیارهای تنوع نشانگرهای مولکولی بررسی شده و با استفاده از روش‌های مختلف، انتساب افراد به جمعیت‌های

جدول ۱- تعداد نمونه های استفاده شده در جمعیت های مورد بررسی.

Table 1- The number of the samples used in the current study.

بومی خراسان Khurasan native	بومی البرز Alborz native	بومی کردستان Kurdistan native	سنگسری Sangsari	بختیاری Bakhtiari	تازی Tazi	کردی Kurdish	سرابی Sarabi	جمعیت Population
10	15	11	6	15	8	12	20	تعداد نمونه (Sample Size)

و طراحی تلاقی های مناسب جهت حفظ این جمعیت های بومی وجود دارد.

قدرت آزمون انتساب به تعداد نشانگرهای مورد استفاده، اندازه نمونه در جمعیت، تنوع ژنتیکی، ارزش PIC و میزان فاصله ژنتیکی بین جمعیت ها بستگی دارد (Guinand *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2004). هر قدر فاصله ژنتیکی بین جمعیت ها کمتر باشد، باید تعداد نمونه ها را افزایش داد تا دقت آزمون بیشتر شود (Rafie *et al.*, 2012). تاثیر این فاکتورها در تست انتساب در گونه هایی مانند طیور و گاو نیز گزارش شده است (Maudet, 2001; Paetkau *et al.*, 2004). نتایج حاصل از انتساب صحیح افراد به جمعیت های مربوطه از طریق کلیه روش های مبتنی بر فاصله ژنتیکی و روش های مبتنی بر درست نمایی در جدول ۲ آورده شده است. همانطوریکه مشخص است این مقادیر از ۷۰/۱ درصد برای روش بیزی Mountain & Rannala (1997) تا ۷۶/۳ درصد برای روش حداقل Nei (1973) متغیر و میانگین انتساب افراد به جمعیت های مربوطه ۷۳ درصد می باشد. پس می توان نتیجه گرفت که نشانگرهای مورد استفاده توانسته اند در حدود ۷۳ درصد موارد، در انتساب افراد به جمعیت مبدشان موفق عمل نمایند. همانطوریکه

تفاوت اندک بین مقدار حداکثر و حداقل نشان می دهد که تنوع درون جمعیتی برای جمعیت های مورد مطالعه کم است. همچنین با توجه به متوسط هتروزیگوسیتی در دو جمعیت سرابی و بختیاری (۰/۶۸ و ۰/۶۶) می توان نتیجه گرفت که این دو جمعیت، شباهت ژنتیکی زیادی با یکدیگر دارند. مطالعات متعدد در جمعیت های سگهای خارجی تنوع قابل ملاحظه ای را در این جمعیت ها نشان می دهد.

بر اساس نتایج مطالعه ای در سال ۲۰۰۳، هتروزیگوسیتی برای نژاد German Shephard، ۰/۵۵ گزارش شده است (Cho & Cho, 2003). در بررسی صورت گرفته توسط Parra *et al.* (2008) بر روی ۵ نژاد، متوسط هتروزیگوسیتی برای نژاد German Shephard (۰/۶۴)، English Pointer (۰/۵)، English Setter (۰/۵۲)، Deutsch Drahthaar (۰/۶۲) و Epagneal Breton (۰/۶۵) گزارش شده است. در مقایسه با برخی نژادهای خارجی می توان گفت که تنوع درون جمعیتی اکوتیپ های سگهای بومی کشور مناسب است و با وجود اینکه تعداد حیوانات این جمعیت ها کاهش چشمگیری را داشته است، ولی با توجه به اطلاعات فوق هنوز تنوع ژنتیکی کافی در جمعیت ها برای استفاده در برنامه های اصلاحی

به سایر جمعیت‌ها منتسب نشده است. در کل نتایج نشان می‌دهد که افراد جمعیت کردی به همه جمعیت‌ها شباهت ژنتیکی دارند که احتمالاً اختلاط مواد ژنتیکی این جمعیت با جمعیت‌های دیگر در طول زمان می‌تواند دلیل این شباهت ژنتیکی باشد. با توجه به نتایج مذکور می‌توان گفت که به دلایل متعددی از قبیل قرار گرفتن ایران در مسیر جاده ابریشم و جابجایی حیوانات در این شاهراه تجاری، دارا نبودن جایگاه خاص در تولیدات دامی و بی‌اعتنایی به نگه‌داری این حیوان، تفکرات مذهبی و دینی در رابطه با سگ و عدم توجه به پرورش و حفظ این ذخایر بومی ارزشمند هیچگونه کنترلی برای تلاقی‌ها و نگه‌داری این حیوانات در منطقه بومی خود وجود نداشته است و به مرور زمان باعث اختلاط ژنتیکی این جمعیت‌ها شده است. با نگاهی به فنوتیپ متفاوت و پراکنش اکوتیپ‌هایی از سگها از جمله سگ تازی از کشورهای آسیای میانه تا کشورهای آسیای غربی موارد فوق الذکر بیشتر می‌تواند مورد تایید باشد. با توجه به اهمیت این حیوان در مطالعات متنوع ژنتیکی و تکاملی از یک طرف و توسعه تکنیک‌های مطالعاتی ژنوم از قبیل SNP-Chip از طرف دیگر، بررسی کل ژنوم سگهای بومی کشور در مقایسه با نمونه‌های خارجی می‌تواند دستاوردهای جدیدی از قرابت، خویشاوندی و تکامل این حیوانات را در اختیار بشر قرار دهد. دستیابی به اطلاعات فوق برای کمک به مشکلات پیش‌رو در جامعه امروزی از قبیل دستیابی به حیواناتی با قابلیت‌های خاص

ذکر شد قدرت انتساب به ارزش PIC و هتروزیگوسیتی نشانگرها بستگی دارد. بنابراین بالا بودن درصد میانگین انتساب می‌تواند به این علت باشد که اکثر نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این مطالعه تنوع آلی، هتروزیگوسیتی و ارزش PIC بالایی را نشان دادند. در یک تحقیق صورت گرفته میانگین انتساب افراد به جمعیت‌های مورد مطالعه ۱۳ درصد گزارش شده است، که دلیل پایین بودن این نسبت‌ها، کوچک بودن اندازه جمعیت‌ها و تعداد جایگاه‌های مورد بررسی بوده است (Pires et al., 2009).

یک نمونه از انتساب افراد به جمعیت‌های مربوطه در جدول ۳ آورده شده است. این جدول شامل دو بخش است بخش اول شامل میانگین احتمال انتساب افراد به هر کدام از جمعیت‌ها و بخش دیگر شامل تعداد حیواناتی است که به طور صحیح به جمعیت مربوطه و یا سایر جمعیت‌ها منتسب شده‌اند. همانطوریکه در جدول ۳ مشاهده می‌شود احتمال انتساب افراد جمعیت سرابی به خودشان ۰/۴۳۹ می‌باشد در صورتی که این میزان برای جمعیت‌های بومی البرز، بومی خراسان و بومی کردستان صفر و برای بقیه جمعیت‌ها نیز معنی‌دار است ($p < 0.05$). از نتایج چنین استنباط می‌شود که برخی از سگ‌های جمعیت بختیاری با جمعیت کردی تا حدودی واجد شباهت آلی هستند. به عنوان مثال از ۲۰ فرد در جمعیت سرابی، ۱۹ فرد از آنان به خودشان، ۵ سگ به جمعیت کردی و ۱ فرد نیز به جمعیت بختیاری منتسب شده‌اند. این در حالی است که هیچ سگی

انتساب افراد در سگهای بومی کشور مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت مالی پلیس مبارزه با مواد مخدر ناجا انجام شده است که بدین وسیله از همکاری صمیمانه آنها تقدیر و تشکر شایسته بعمل می آید.

مانند حیوانات توانمند در کشف اجساد زیر آوار و یا پیدا کردن مواد مخدر و مواد منفجره می تواند متمر ثمر باشد. در انتها با توجه به نتایج بدست آمده می توان گفت که در بین روشهای مبتنی بر درست نمایی، روش بیزی Baudouin & Lebrun (2001) و در بین روشهای مبتنی بر فاصله ژنتیکی روش حداقل Nei (1973) بیشترین صحت انتساب را برای نمونه های مطالعه شده نشان می دهند که می تواند در مطالعات بررسی

جدول ۲- صحت انتساب افراد به جمعیت ها با استفاده از روش های مختلف.

Table 2- Correct assignment of the individuals to the populations using different methods.

درصد انتساب صحیح Percentage of the correct assignment	روش آزمون انتساب Assignment test method
72.2	روش بیزی (Bayesian Method)
70.1	Baudouin & Lebrun (2001) Rannala and Mountain (1997)
71.1	فراوانی آلی (Allelic Frequency) Paetkau <i>et al.</i> (1995)
72.2	فاصله ژنتیکی (Genetic Distance) Nei Standard (1972)
76.3	Nei Minimum (1973)
75.3	Nei DNA (1983)
75.3	Cavalli-Sforza & Edwards (1967)

جدول ۳- میانگین انتساب افراد (تعداد انتساب صحیح افراد) به جمعیت‌های مربوطه با روش بیزی.

Table 3- Average individual assignment (number of correct assignment) to the respective populations using Bayesian method.

سنگسری	تازی	بومی کردستان	بومی خراسان	کردی	بومی البرز	بختیاری	سرابی	جمعیت
Sangsari	Tazi	Kurdistan native	Khurasan native	Kurdish	Alborz native	Bakhtiari	Sarabi	Population
0.0009(0)	0.005(0)	0	0	0.031(5)	0	0.013(1)	0.439(19)	سرابی
0.003(0)	0.004(0)	0	0.001(0)	0.060(4)	0.065(1)	0.392(15)	0.023(1)	بختیاری
0.004(0)	0.003(0)	0	0.0008(0)	0.045(4)	0.386(0)	0.028(0)	0.006(0)	بومی البرز
0.005(0)	0.008(0)	0.0002(0)	0.028(0)	0.481(12)	0	0.001(0)	0.006(1)	کردی
0.003(0)	0.019(1)	0.002(0)	0.541(10)	0.191(7)	0.0005(0)	0.004(0)	0.0004(0)	بومی خراسان
0.003(0)	0.008(0)	0.447(11)	0.004(0)	0.048(7)	0.002(0)	0.004(0)	0.032(0)	بومی کردستان
0.005(0)	0.568(8)	0	0.001(0)	0.097(5)	0	0.001(0)	0.0002(0)	تازی
0.563(6)	0.021(0)	0	0.005(0)	0.145(4)	0.014(0)	0.016(1)	0.005(0)	سنگسری

منابع

- Altet L, Francino O, Sanchez A (2001). Microsatellite polymorphism in closely related dogs. *Journal Hered* 92: 276-278.
- Baudouin L, Lebrun P (2001). An operational Bayesian approach for the identification of sexually reproduced cross-fertilized populations using molecular markers. *Acta Horticulturae* 546: 81-94.
- Bechmann JS, Soller M (1987). Molecular markers in the genetic improvement of farm animals. *Biotechnology* 5: 573-576.
- Breen M, Jouquand S, Renier C, Mellersh CS, Hitte C, Holmes NG, Cheron A, Suter N, Vignaux F, Bristow AE, Priat C, McCann E, Andre C, Boundy S, Gitsham P, Thomas R, Bridge WL, Spriggs HF, Ryder EJ, Curson A, Sampson J, Ostrander EA, Binns MM, Galibert F (2001). Chromosome-specific single-locus FISH probes allow nchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. *Genome Research* 11: 1784-1795.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *The American Journal of Human Genetics* 19: 233-257.
- Cho GJ, Cho BW (2003). Validation of microsatellite markers for routine canine parentage testing in korea. *Genetics* 25: 103-108.
- Cornuet JM, Aulagnier S, Lek S, Franck S, Solignac M (1996). Classifying individuals among infra-specific taxa using microsatellite data and neural networks. *Biological Journals and Abbreviations* 319: 1167-1177.
- Coutts NJ, Harley EH (2009). Comparative populationgenetic of the German Shepherd dog in South Africa. *South African Journal of Science* 105: 132-135.

- Fan B, Chen YZ, Moran C, Zhao SH, Liu B, Yu M, Zhu MJ, Xiong TA, Li K (2004). Individual-breed assignment analysis in swine populations by using microsatellite markers. *Journal of Animal Science* 18: 1529-1534.
- Guinand B, Scribner KT, Topchy A, Page KS, Punch W, Burnhum-Curtis MK (2004). Sampling issues affecting accuracy of likelihood-based classification using genetical data. *Environmental Biology of Fishes* 69: 245-259.
- Guyon R, Lorentzen TD, Hitte C, Kim L, Cadieu E, Parker HG, Quignon BP, Lowe JK, Renier C, Vignaux F.O, DeFrance HB, Gloux S, Mahairas GG, Andre C, Galibert C, Ostrander EA (2003). A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. *PNAS* 100: 5296–5301.
- Hartl DL, Clark AG (1989). *Principles of population genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Koinig WD, Vuren DV, Hooge PN (1996). Detectability, philopatry, and the distribution of dispersal distance in vertebrates. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 514-517.
- Kukekova AV, Vorobieva NV, Beklemisheva VR, Johnson JL, Temnykh SV, Yudkin DV, Trut LN, Andre C, Galibert F, Aguirre G D (2009). Chromosomal mapping of canine-derived BAC clones to the red fox and American mink genomes. *Journal of Heredity* 100: S42.
- Lindblad K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438: 803-819.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Wayne RK, Ostrander EA (2007). Lessons learned from the dog genome. *Genetics* 23: 557-567.
- Manel S, Berthier P, Luikart G (2002). Detecting poaching: Identifying the origin of individuals using bayesian assignment tests and multi-locus genotypes. *Biological Journals and Abbreviations* 16: 650-659.
- Maudet C (2001). Diversities characterization genetique des races bovine set caprices originaires de la region Rhone-Alps. Docteur. University Joseph Fourier, Grenoble, France.
- Mirhosieni SZ (1996). The Study of genetic diversity Iranian Silkworm using Protein and DNA markers. Ph.D thesis. Department of animal science, Tarbiat Modares University, Iran .
- Nei M (1973). The theory and estimation of genetic distances. In *Genetic structure of populations* (ed. Morton NE). University Press of Hawaii. Honolulu 70: 3321-3323.
- Nei M (1972). Genetic distances between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19: 153-170.
- Paetkau D, Slade R, Burden M, Estoup A (2004) Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13: 55–65.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.
- Parker HG, Kukekova AV, Akey DT, Goldstein O, Kirkness EF, Baysac KC, Mosher DS, Aguirre GD, Acland GM, Ostrander EA (2007). Breed relationships facilitate fine-mapping studies: A 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Research* 17: 1562–1571.
- Parra D, Mendez S, Canon J, Dunner S (2008). Genetic differentiation in pointing dog breeds inferred from microsatellites and mitochondrial DNA sequence. *Animal Genetics* 39: 1–7.
- Pires AE, Amorim IR, Ginja C, Gomes M, Godinho I, Simoes F, Oom M, Petrucci F, Matos J, Bruford MW (2009). Molecular structure in peripheral dog breed: Portuguese native breeds as a case study. *Animal Genetics* 40: 383-392.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A (2003). GeneClass2: A software for genetic assignment and first generation migrants detection.

- Rafie F, Tarang A, Amirinia C, Nejati Javaremi A, Mirhoseini SZ, Seighalani R, Sharafi A (2012). The use of microsatellite marker for assignment tests in hours populations of Iran. Of 5th Iranian Congress of Animal Science. The University of Esfahan. Sept. 6-8, 2012. pp. 1000-1005.
- Rajai MA (2004). The study genetic diversity in japanese quail using microsatellite markers. Msc.Thesis. Department of animal science, Tarbiat Modares University, Iran.
- Rannala B, Mountain JL (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proceeding of the National Academy of Sciences. USA 94: 9197- 9221.
- Scott JP, JL, Fuller (1965). Genetics and the social behavior of the dog. University of Chicago press publisher, Chicago, USA.
- Shahbazi Azar S, Mirhosieni SZ (2004). The Study of genetic diversity native fowl from Isfahan, Fars and Yazd using microsatellite markers. Of 4th National Biotechnology Congress of Iran.
- Sutter NB, Ostrander EA (2004). "Dog star rising: the canine genetic system." Nature Reviews Genetics 5: 900-910.
- Wayne RK, Morin PA (2004). Conservation genetics in the new molecular age. Ecological Society of Amrica 2: 89-97.
- Zajc I, Cathryn SM, Sampson J (1997). Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds. Mammalian Genome 8: 182-185.

Assignment of Individuals to the Iranian Native Dog Populations Using Microsatellite Markers

Montazeri M.¹, Masoudi A.A.^{2*}, Vaez Torshizi R.³, Allahyar Khan Khorasani D.⁴

¹ Student, Department of Animal Science, Tarbiat Modares University, Iran.

² Assistant Professor, Department of Animal Science, Tarbiat Modares University, Iran.

³ Associate Professor, Department of Animal Science, Tarbiat Modares University, Iran.

⁴ Graduate Student of Animal Science

Abstract

Assignment test is applied to identify the origin of a specific individual, population differentiation and medical forensic cases. Therefore, this study conducted to analyze some genetic variation criteria, comparison of the different assignment methods and assignment of individuals to eight populations of Iranian native dogs using 13 autosomal microsatellite markers (C26.73320; CXX.6727,10,18; FH20609,20; FH20169,20; FH2790; FH2795; FH2914; FH3053; REN59H07; REN87O21; REN126A15; REN144M10 and REN86G15). The blood and tissue samples were taken from the dogs and total DNAs of the samples were extracted using salting out or enzymatic digestion methods. The results indicated that the least and the most diversity for Sangsari population (0.53) and Kurdish population (0.72), respectively. The individual's assignment was done using 7 different methods. Among the methods base on the likelihood, the Baudouin and Lebrun method and among the methods base on the genetic distance, Nei minimum method showed the highest accuracy. Totally, markers used in this study could assign the individuals to their source population with 73 % accuracy.

Keyword: *Individuals assignment, Genetic diversity, Microsatellite markers, Iranian dog native.*

* Corresponding Author: Masoudi A. A. Tel: 02148292353

E-mail: masoudia@modares.ac.ir