Archive of SID

در
امور دام و آبزیان شماره ۷۸ بهار ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

مطالعه چند شکلی ۱۲ نشانگر ریز ماهواره در گوسفندان بلوچی ایستگاه عباس آباد مشهد

• **زهرا زاهدی**
کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشگاه تربیت مدرس
• **سعید اسماعیل خانیان**
عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
• **رسول واعظ ترشیزی**
استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۶
Email:zahedi_za@yahoo.com

چکیده

گوسفند بلوچی پرجمعیت ترین گوسفند ایران بوده و در بخش‌های وسیعی از کشور شامل نواحی مرکزی و جنوبی استان خراسان، سیستان و بلوچستان، یزد و کرمان پرورش داده می‌شود. این نژاد نسبت به شرایط سخت محیطی مقاوم بوده و نرخ دوقلوزایی بالایی دارد، لذا انجام بررسی‌های مختلف و برآورد پارامترهای مورد نیاز به منظور شناسایی ظرفیت‌های تولیدی گوسفند بلوچی از ضروریت‌های اصلاح نژاد می‌باشد. در این تحقیق، به منظور شناسایی ریزماهواره‌های چندشکل، تعیین پارامترهای ژنتیکی این ریزماهواره‌ها (محتوای چندشکلی، هتروزایگوسیتی، شاخص شانون، تعداد آلل مؤثر، تعداد آلل واقعی) و تعیین تنوع درون گروهی در جمعیت گوسفند بلوچی ایستگاه عباس آباد مشهد، ۱۲ جایگاه ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت. از جمله معیارهایی که در انتخاب جایگاه‌های مورد بررسی درنظر گرفته شد عبارت بودند از دارا بودن چندشکلی بالا براساس تعداد آلل و PIC-value گزارش شده در مطالعات قبلی. استخراج DNA به روش بهینه یافته استخراج نمکی (Salting-Out) انجام شد، کمیت و کیفیت DNA با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل مشخص گردید، سپس قطعات DNA با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) تکثیر شدند و پس از الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل، باندها قابل رویت شدند. در مجموع از میان ۱۲ جایگاه مورد بررسی، تکثیر در دو جایگاه OarHH۶۲ و OarAE۶۴ انجام نشد و از بین ۱۰ جایگاه باقیمانده نیز جایگاه CSSM۰۵۹ الگوی یک شکلی نشان داد، سایر جایگاه‌های CSSM۰۱۸، BMS۲۲۱۳، BMS۱۳۱۶، BMS۷۹۲، BMS۷۴۴، BMS۲۳۶۱، BMS۱۰۰۴، CSSM۰۰۶ و TGLA۱۲۲ از چندشکلی مناسبی برخوردار بوده، تعداد آلل‌های آنها به ترتیب ۶، ۶، ۴، ۵، ۴، ۲، ۳، و ۳ بود. تمامی‌جایگاه‌ها در تعادل‌هاردی-واینبرگ قرار داشتند ($p<0/005$). دامنه هتروزایگوسیتی برای این جایگاه‌ها در جمعیت تحت مطالعه بین ۰/۵ در جایگاه BMS۱۳۱۶ تا ۰/۷۲ در جایگاه BMS۲۳۶۱ متغیر بود. دو جایگاه مذکور در بین ۹ جایگاه چندشکل به ترتیب از کمترین و بیشترین تنوع برخوردار بودند. مطالعه شاخص شانون و معیار PIC (محتوای چند شکلی) نیز نشان داد که جایگاه BMS۱۳۱۶ دارای کمترین تنوع و جایگاه BMS۲۳۶۱ دارای بیشترین تنوع در بین جایگاه‌های مورد مطالعه می‌باشند. بیشترین تعداد آلل واقعی در بین این ۹ جایگاه متعلق به جایگاه‌های CSSM۰۱۸ و CSSM۰۰۶ با ۶ آلل و کمترین آن متعلق به جایگاه BMS۱۳۱۶ با ۲ آلل بود. در این جمعیت جایگاه BMS ۲۳۶۱ در بین این جایگاه‌ها دارای بیشترین و جایگاه BMS۱۳۱۶ دارای کمترین تعداد آلل موثر بود. آلل‌های ۲۲۸، ۲۳۲ و ۲۴۰ جفت باز در جایگاه CSSM۰۰۶، آلل ۱۸۷ جفت باز در جایگاه BMS۱۰۰۴، آلل‌های ۱۳۸ و ۱۵۴ جفت باز در جایگاه BMS۲۳۶۱، آلل‌های ۱۵۴، ۱۶۶ و ۱۷۰ جفت باز در جایگاه BMS۷۴۴، آلل‌های ۱۵۳ و ۱۶۷ جفت باز در جایگاه BMS۲۲۱۳ و آلل‌های ۱۷۱ و ۲۱۷ جفت باز در جایگاه TGLA۱۲۲ آلل‌هایی بودند که در جمعیت مورد مطالعه یافت شدند، درصورتیکه در مطالعات قبلی گزارش نشده‌اند. میانگین هتروزایگوسیتی برای این جمعیت، با توجه به جایگاه‌های مورد مطالعه، ۰/۵۴ برآورد گردید. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت گوسفند بلوچی ایستگاه عباس آباد مشهد با توجه به جایگاه‌های مورد مطالعه از تنوع ژنتیکی نسبتا بالا برخوردار بوده و نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه دراین جمعیت ازچند شکلی نسبتاً بالایی برخوردار بوده، از آنها می‌توان در مطالعات ژنتیکی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: گوسفند بلوچی، نشانگرهای ریزماهواره، چندشکلی، تنوع ژنتیکی، هتروزایگوسیتی

www.SID.ir

Archive of SID

Pajouhesh & Sazandegi No 78 pp: 39-46

Assessment of genetic variation on balouchi of Abbasabad station of Mashhad

By: Z.Zahedi: Graduated Student of Tarbiyat Modares University.Tehran.Iran., S.Esmaeilkhanian: Dept. of Biotechnology Animal Science Research Institution of Iran.Karaj. Iran, R.Vaez Torshizi: Professer of Tarbiyat Modares University.Tehran.Iran

Balouchi sheep is a widespread breed that is originated in the central and south parts of Khorasan province, Sistan and Balouchestan, Yazd and Kerman province. This native breed is likely to be well-addapted to the hard conditions and it is described as a twinning breed, thus primary emphesis needs to be given to more effective use and genetic improvement of this breed within the prevailing and generally sustainable production systems. Polymorphic loci, genetic parameters (polymorphic information content, heterozygosity, Shannon index, the number of actual alleles, the number of effective alleles) and genetic variation within Balouchi sheep population located in Abbasabad station of Mashhad, was assessed using 12 microsatellite markers. The PCR reactions were successfully done with all primers except for OarHH62 and OarAE64. CSSM059 locus was monomorph, whereas the other 9 loci, CSSM018, CSSM006, BMS1004, BMS2361, BMS744, BMS792, BMS1316, BMS2213 and TGLA122 were polymorph with 6,6,4,4,5,4,2,3 and 3 number of alleles, respectively. All loci were at Hardy-Weinberg equilibirium ($p<0.005$). In this population, heterozygosity varied from 0.5 at BMS1316 to 0.72 at BMS2361 locus. Within 9 polymorphic loci, these two loci had the most and the least diversity, respectively. The study of Shannon index and PIC (Polymorphic Information Content) also indicated the least and the most diversity for BMS1316 and BMS2213 loci, respectively. The most number of actual alleles were belong to CSSM018 and CSSM006 loci with 6 alleles and the least was belong to BMS1316 locus with 2 alleles. BMS2361 locus had the most and BMS1316 locus had the least number of effective alleles. Alleles with 228, 232 and 240 base pairs on locus CSSM006, 187 bp on locus BMS1004, 138 and 154 bp on locus BMS2361, 154,166 and 170 bp on locus BMS744, 153 and 167 bp on locus BMS2213, 171 and 217 bp on locus TGLA122 were new alleles that have been found on Balouchi sheep population and never have been as reported befor. Average heterozygosity was estimated as 0.54 for this population. In general, it can be concluded that Balouchi sheep population of Abbasabad station in Mashhad has approximately high genetic diversity with respect to the studied microsatellites, and microsatellite markers have approximately high polymorphism and therefore can be used for genetic studies.

Keywords: Balouchi sheep, Microsatellite markers, Polymorphism, Genetic variation, Heterozygosity

مقدمه

وجود نژادهای مختلف دام در کشور و بروز اختلاط ژنتیکی بین آنها، نیاز به جمع‌آوری و ثبت مشخصات هر یک را اجتناب ناپذیر می‌نماید تا درصورت لزوم، امکان شناسایی و تفکیک آنها از یکدیگر وجود داشته باشد. این شناسایی تا به حال بر اساس صفات ظاهری (مورفولوژیک)[1] انجام شده که احتمال خطای آن می‌تواند زیاد باشد. اصلاح‌گران از تنوع ژنتیکی برای رسیدن به حیوانات اهلی پرتولید و مقاوم به شرایط نامناسب استفاده می‌نمایند. نبود تنوع در جمعیت‌های پایه قدرت انتخاب برای رفع نیازهای آتی را محدود می‌سازد. کاهش تنوع ژنتیکی به صورت از دست دادن نژادها و سویه‌ها خود را بروز می‌دهد. تنوع درون نژادی پیوسته با ورود تنوع جدید ناشی از جهش مواجهه است، ولی تنوع ژنتیکی بین نژادی را نمی‌توان به راحتی بازسازی نمود، بنابراین می‌توان گفت هر نژاد مجموعه منحصر به فردی از ژن‌هاست که مخزن ژنی آن نژاد را می‌سازد. با حفظ نمونه پایه از تمامی‌نژادهای یک گونه که دارای بیشترین تنوع ژنتیکی می‌باشند، می‌توان حداکثر تنوع ژنتیکی را حفظ نمود. این نمونه‌ها شامل نژادهایی هستند که دارای آلل‌ها یا ترکیبات آللی منحصر بفرد می‌باشند. شرح کامل تفاوت ژنتیکی داخل هر نژاد امکان‌پذیر نیست ولی معیارهای فاصله ژنتیکی بهترین شرح در دسترس برای بیان تفاوت ژنتیکی آنها می‌باشند (۲). در طول دهه‌های اخیر بکارگیری روش‌های مبتنی بر ژنتیک جمعیت و آمار منجر به توسعه حیواناتی با بازده بالا شده است و ترکیب این روش‌ها با علوم جدیدی همچون نشانگرهای DNA پیشرفت‌های شگرفی را در اصلاح نژاد پدید آورده است. چندشکلی‌های موجود در ژن‌های مرتبط با صفات تولیدی می‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی بکار برده شود. استفاده از تکنیک‌های مولکولی می‌تواند برخی محدودیت‌های رایج در اصلاح دام را رفع نماید. گسترش استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[2] (PCR)، توسعه تکنیک‌های توالی یابی ژنوم، شناسایی و کشف انواع نشانگرهای مولکولی در سطح ژنوم، ارائه نقشه‌های ژنتیکی متراکم از گونه‌های مختلف حیوانات اهلی و پیشرفت‌های حاصله در علوم آمار و کامپیوتر از جمله تکنیک‌هایی است که امروزه در اصلاح دام از آنها استفاده‌های

www.SID.ir

Archive of SID

زیادی می‌شود. گسترش تکنیک‌های مولکولی، امکان تعیین تنوع موجود در جوامع را برای نواحی ویژه ای از سطح ژنوم فراهم آورده است (۱۲). DNA اساس تفاوت‌های ژنتیکی بین موجودات مختلف است. هر نوع تفاوت در یک لوکوس بین افراد مختلف که سبب تمایز آنها از یکدیگر می‌گردد اگر منشأ ژنتیکی داشته باشد می‌توان آنرا نشانگر ژنتیکی یا نشانگر مولکولی دانست. داشتن چندشکلی (پلی مورفیسم)[۳] و توارث پذیری از جمله شرایط لازم برای یک نشانگر ژنتیکی است. سهولت جداسازی، تشخیص و به ویژه تغییرپذیری زیاد ریزماهواره‌ها موجب شده است که ریزماهواره‌ها علی رغم مدت زمان کوتاهی که از کشف آنها می‌گذرد به ابزاری توانمند جهت تجزیه و تحلیل ژنتیکی جمعیت‌ها تبدیل شوند (۶). هدف از این مطالعه، بررسی چندشکلی تعدادی از نشانگرهای ریزماهواره در ژنوم گوسفند بلوچی گله ایستگاه اصلاح نژاد شمال شرق کشور (عباس آباد مشهد) و انتخاب نشانگرهای با چندشکلی برای مطالعات بعدی از جمله یافتن نشانگرهای مناسب برای نقشه یابی صفات کمی[۴](QTL mapping) و استفاده از آنها برای انتخاب به کمک نشانگر[۵](MAS) و سایر مطالعات از جمله آزمون انساب می‌باشد. همچنین با استفاده از چند شکلی موجود در جایگاه‌های مورد مطالعه می‌توان به میزان تنوع ژنتیکی در درون گله مورد مطالعه، میزان همخونی، ساختار جمعیتی و شناسایی بهتر این نژاد پی برد. این اطلاعات ما را در مدیریت و حفظ تنوع ژنتیکی این گوسفند کمک می‌نماید. شهبازی و همکاران در سال ۱۳۸۲(۴) چند شکلی مرغان بومی مازندران و آذربایجان غربی را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بررسی کردند، بنابازی در سال ۱۳۸۵ (۱) تنوع ژنتیکی درون و بین پنج جمعیت گوسفند ایرانی را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بررسی کرد و رزبان در سال ۱۳۸۶(۳) پارامترهای ژنتیکی جمعیتی از گوسفندان ایرانی را بر اساس مارکر مولکولی میکروساتلایت بررسی کرد.

مواد و روش‌ها

گوسفند بلوچی به تنهایی ۳۰ درصد جمعیت گوسفندان ایرانی را تشکیل داده است. در حوزه ژنتیک و اصلاح، اطلاع از ساختار ژنتیکی این جمعیت می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه ریزی جهت طرحهای اصلاح نژادی و از همه مهمتر حفظ این ذخیره ژنتیکی باشد (۲).

نمونه گیری و استخراج DNA- نمونه‌های خون کامل به میزان ۱۰ میلی لیتر از سیاهرگ وداج گردن و با استفاده از لوله خلادار (ونوجکت) ۵ میلی لیتر حاوی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه گردید و بلافاصله بعد از خونگیری در داخل یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۴+ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌های خون کامل بطور تصادفی از تعداد ۱۶۰ راس گوسفند بلوچی تهیه گردید. استخراج DNA با روش بهینه یافته Salting-Out (۱۱) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل مشخص گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز و الکتروفورز- تکثیر DNA ژنومی تعداد ۱۶۰ نمونه DNA از طریق واکنش‌های PCR انجام شد. در واکنشهایی با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر از بافر PCR یک مرتبه، ۴ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP ، ۰/۵ واحد از آنزیم DNA پلیمراز (Taq) و ۱۵۰ نانوگرم DNA ژنومی‌استفاده شد. از ۱۲ آغازگر جهت یافتن چندشکلی در جمعیت مورد مطالعه استفاده گردید (جدول ۲). به منظور تعیین تنوع درون گروهی سعی شد جایگاه‌هایی انتخاب شود که بر روی کروموزوم‌های متفاوت قرار داشته باشند. انجام واکنش‌های PCR دردستگاه ترموسایکلرمدل T-Gradient ساخت شرکت Biometra و Eppendorf، انجام گردید. مناسب ترین چرخه حرارتی برای تمامی آغازگرها به صورت واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۵درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر طبق دمای جدول ۱ به مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه به دست آمد. جهت الکتروفورز محصولات PCR و تفکیک قطعات حاصله، از ژل پلی آکریل آمید واسرشته ساز ۸ درصد استفاده شد. برای رنگ آمیزی ژل از روش رنگ آمیزی نقره سریع استفاده شد (۵).

تجزیه و تحلیل آماری- بواسطه همبارز بودن ریزماهواره‌ها ژنوتیپ هر فرد را می‌توان از روی ژل تعیین کرد و فراوانی ژنی و ژنوتیپی را با شمارش مستقیم به دست آورد. در این مطالعه با استفاده از اسکن کردن ژل‌ها و همچنین استفاده از برنامه فتوشاپ و نرم افزار اکسل اندازه آلل‌ها، انواع آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها تعیین شدند. این اندازه‌گیری به کمک نوارهای حاصل از Ladder تجاری V و VIII شرکت Roche انجام گرفت. ابتدا نوارهای Ladder حوالی باندهای مورد نظر اندازه گیری می‌گردد و یک رابطه تابعیت خطی بین این اندازه و اندازه‌های واقعی (bp) آنها به دست می‌آید و سپس با اندازه‌گیری بقیه باندها و اعمال این رابطه برای آنها اندازه (bp) واقعی آنها نیز به دست می‌آید. شکل کلی تابع خطی به صورت y=bx+a می‌باشد که در این رابطه y اندازه باند مورد نظر (bp)، b ضریب تابعیت هر نشانگر اندازه (Ladder)، x فاصله باند مورد نظر از زیر چاهک (cm) و a عرض از مبدا می‌باشد. وضعیت جمعیت مورد مطالعه از نظر تعادل‌هاردی- واینبرگ با دو آزمون مربع کای(X_T^2) و نسبت درست نمایی (G_T^2) بررسی شد.

هتروزایگوسیتی متوسط (تنوع ژنی) به ازاء تمامی‌جایگاه‌ها با فرمول زیر محاسبه شد $H = \sum H_k / r$ که در آن r تعداد جایگاه‌های مورد بررسی و H_k میزان هتروزایگوسیتی برای k امین جایگاه می‌باشد (۹). لذا محاسبه شاخص اطلاعاتی شانون[۶] (I) برای غلبه بر این نقص می‌تواند مفید باشد. بنابراین برای مشخص نمودن بهتر تنوع ژنتیکی از شاخص اطلاعات شانون با فرمول زیر استفاده گردید.

$$H' = -\sum_i p_i \ln p_i$$

برخلاف هتروزایگوسیتی، که برای هر تعداد آلل حد نهایی یک دارد، حداکثر مقدار H' برابر با Ln(n) می‌باشد. با وجود آنکه تفسیر بیولوژیکی این معیار مشخص نیست، ممکن است برای اندازه گیری تنوع جایگاه‌های بسیار متغیر مفید باشد. هر چه شاخص شانون به 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) مناسبتر

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱: دمای اتصال بهینه شده برای ۱۰ آغازگر مورد مطالعه

نام جایگاه	CSSM۰۱۸	CSSM۰۰۶	CSSM۰۵۹	BMS۱۰۰۴	BMS۲۳۶۱
دمای اتصال(درجه سانتی‌گراد)	۵۸	۵۷	۵۷	۶۰	۵۹
نام جایگاه	BMS۷۴۴	BMS۷۹۲	BMS۱۳۱۶	BMS۲۲۱۳	TGLA۱۲۲
دمای اتصال(^{oC})	۵۵	۵۸	۵۸	۵۹	۵۶

است. از آماره ای موسوم به محتوای چندشکلی[۷](PIC) نیز برای تعیین میزان چندشکلی یک جایگاه استفاده می‌شود:

$$PIC = 1 - (\sum_{i=1}^{k} p_i^2) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} 2 p_i^2 p_j^2$$

کـه در آن k تعـداد آلل‌ها و pi و pj فراوانی‌های i و j اُمین آلل در جمعیت مورد مطالعه می‌باشـد (۷). قابل ذکر اسـت که PIC همان مفهوم هتروزایگوسـیتی است به استثنائ افراد هتروزیگوتی که ژنوتیپ والـد خود را به ارث می‌برند، سیسـتم‌های ریزماهـواره PIC بالاتری را نسـبت به نشـانگرهایی مانند RFLP نشـان می‌دهند. در این مطالعه آزمون تعادل‌هاردی- واینبرگ، هتروزایگوسـیتی مشـاهده شده و مورد انتظار، شـاخص شانون و معیارهای چندشکلی از قبیل تعداد آلل واقعی و تعداد آلل مؤثر با استفاده از نرم افزار POPGENE (۱۶) و معیار PIC با استفاده از نرم افزار PIC (۱۴) برآورد گردید.

نتایج و بحث

در این تحقیق، واکنش‌های PCR بـرای تعیین ژنوتیپ ۱۲ جایگاه پراکنده در کروموزوم‌های مختلف گوسـفند نژاد بلوچی ایستگاه عباس آباد مشـهد مورد اسـتفاده قرار گرفت. ابتدا واکنش‌های PCR برای ۱۲ جفت آغازگر بهینه سـازی شد. بهینه سـازی شرایط PCR بیشتر روی سـه فاکتور مهم غلظـت $MgCl_2$، دمای اتصال آغازگـر و برنامه PCR بود. از بین ۱۲ جفت آغازگر ۱۰ جفت آن بخوبی تکثیر شـدند که این جایگاه‌ها شـامل BMS۱۰۰۴، CSSM۰۵۹، CSSM۰۰۶، CSSM۰۱۸ BMS۲۳۶۱، BMS۷۴۴، BMS۷۹۲، BMS۱۳۱۶، BMS۲۲۱۳ و TGLA۱۲۲ بودنـد ولی قطعات مربوط بـه جایگاه‌های OarHH۶۲ و OarAE۶۴ در این نـژاد تکثیر نیافتند و جایگاه CSSM۰۵۹ نیز الگوی یک شـکلی نشـان داد (شـکل۱). برای جایگاه CSSM۰۶۹ و Moore و همکاران تعداد ۴ آلل در گوسـفند و ۵ آلل در گاو گزارش کردند. در مطالعـه حاضر در این جایگاه یک آلل با اندازه ۲۱۱ جفت باز مشـاهده شد. تعداد باندهای نارسا در جایگاه CSSM۰۱۸ و CSSM۰۰۶ (شکل۲) نسـبت به جایگاه‌های دیگر بیشـتر بود که دلیل احتمالی آنرا می‌توان محدوده باندی بزرگتر و تکرارهای دوتایی ریزماهواره دانست (باندهای نارسـا باندهای غیراختصاصی هستند که با فاصله کمی‌از باندهای اصلی قرار گرفته اند و وضوح کمتری نسـبت به باندهـای اصلی دارند). نتایج به دسـت آمده برای این جایـگاه با نتایج Maddox و همـکاران (۱۰) و Gortari و همـکاران (۸) مطابقـت دارد. در جایـگاه BMS۲۳۶۱ بـا وجودیکه الگوی الکتروفورزی حاوی باندهای غیر اختصاصی زیادی بود؛ وضوح باندهای اصلی در آن بارز بود، درنتیجه اشـتباه احتمالی در آلل خوانی در آن به میزان قابل توجهی پایین آمد. دامنه آللی به دست آمده برای جایگاه CSSM۰۰۶ ،۲۴۰-۲۰۰ جفت باز بود که با نتایج Maddox و همکاران (۱۰)، ۲۲۰-۱۹۶ جفت باز مطابقت دارد.

تعـداد آلل و دامنه آللی به دسـت آمده برای جایـگاه BMS۷۴۴ و TGLA۱۲۲ بـا نتایـج تحقیقات محققان دیگر مطابقت کامل نداشـت (۱۵) (جـداول۲ و ۳). مقایسـه تعداد، نوع و دامنه آلل‌هـای حاصل از مطالعـه حاضر با مطالعات قبلی نشـان می‌دهد که گوسـفندان ایرانی

جدول ۲: اندازه آللی هر یک از جایگاه‌های مورد مطالعه

جایگاه / آلل(bp)	CSSM۰۱۸	CSSM۰۰۶	CSSM۰۵۹	BMS۱۰۰۴	BMS۲۳۶۱	BMS۷۴۴	BMS۷۹۲	BMS۱۳۱۶	BMS۲۲۱۳	TGLA۱۲۲
A	۱۲۲	۲۰۰	۲۱۱	۱۵۹	۱۰۶	۱۳۶	۱۳۴	۱۱۲	۱۳۵	۱۴۱
B	۱۲۶	۲۱۲	_	۱۶۳	۱۲۴	۱۴۴	۱۳۸	۱۲۶	۱۵۳	۱۷۱
C	۱۳۰	۲۲۰	_	۱۷۵	۱۳۸	۱۵۴	۱۴۲	_	۱۶۷	۲۱۷
D	۱۳۶	۲۲۸	_	۱۸۷	۱۵۴	۱۶۶	۱۵۴	_	_	_
E	۱۴۲	۲۳۲	_	_	_	۱۷۰	_	_	_	_
F	۱۵۲	۲۴۰	_	_	_	_	_	_	_	_

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: تعدادآلل واقعی، آلل موثر، PIC-value و شاخص Shannonو(I) برای جایگاه‌های مورد مطالعه

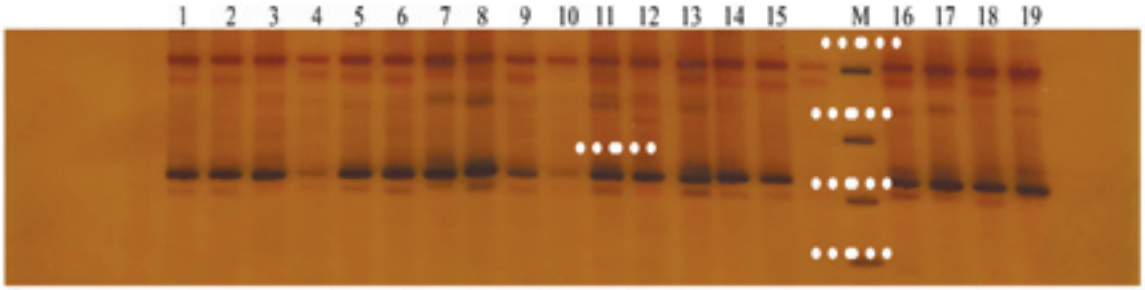
جایگاه	شماره کروموزوم	شماره دسترسی	تعداد آلل واقعی	تعداد آلل موثر	شاخص Shannon	ارزش PIC
CSSM۰۱۸	۱۸	U۰۳۷۹۸	۶	۳/۵۶۲۹	۱/۴۰۰۸	۰/۶۷۰۷
CSSM۰۰۶	۱۹	U۰۳۷۸۷	۶	۲/۷۷۷۱	۱/۱۷۰۹	۰/۵۷۰۶
CSSM۰۵۹	۶	U۰۳۸۳۷	۱	۱/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰
BMS۱۰۰۴	۱۵	G۱۸۶۰۷	۴	۲/۵۰۰۸	۱/۰۴۶۲	۰/۵۱۸۰
BMS۲۳۶۱	۱۶	G۱۸۹۸۴	۴	۳/۶۳۶۰	۱/۳۳۱۳	۰/۶۷۳۵
BMS۷۴۴	۲۴	G۱۸۷۴۳	۵	۳/۴۹۹۳	۱/۳۵۶۷	۰/۶۶۳۵
BMS۷۹۲	۵	G۱۸۸۷۹	۴	۲/۰۶۴۰	۰/۷۷۴۱	۰/۳۹۸۱
BMS۱۳۱۶	۱۰	G۱۸۶۵۴	۲	۲/۰۰۰۰	۰/۶۹۳۱	۰/۳۷۵۰
BMS۲۲۱۳	۱۴	G۱۸۹۳۱	۳	۲/۰۹۹۷	۰/۷۹۲۴	۰/۴۱۰۳
TGLA۱۲۲	۱۸	-	۳	۲/۱۰۸۷	۰/۷۹۹۰	۰/۴۱۳۴
OarHH۶۲	۱۶	L۱۳۸۷۲	-	_	_	-
OarAE۶۴	۷	L۱۳۸۶۹	-	_	_	-

جدول ۴: مقادیرهموزایگوسیتی و هتروزایگوسیتی مورد انتظار، مشاهده شده، هتروزایگوسیتی مورد انتظار Nei و متوسط آن به ازاء هر جایگاه مورد مطالعه

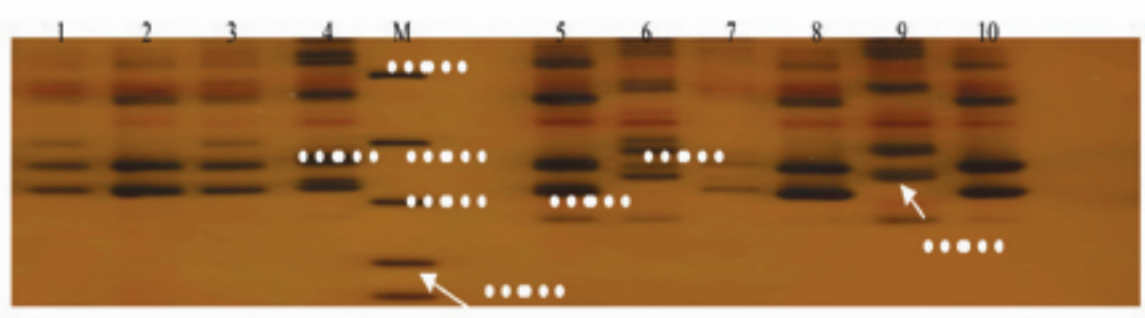
جایگاه	Obs-Hom	Obs-Het	Exp-Hom	Exp-Het	Nei Exp-Het
CSSM۰۱۸	۰/۴۵۷۷	۰/۵۴۲۳	۰/۲۷۸۱	۰/۷۲۱۹	۰/۷۱۹۳
CSSM۰۰۶	۰/۰۰۰۰	۱/۰۰۰۰	۰/۳۵۸۰	۰/۶۴۲۰	۰/۶۳۹۹
CSSM۰۵۹	۱/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۱/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰
BMS۱۰۰۴	۰/۰۲۶۷	۰/۹۷۳۳	۰/۳۹۷۹	۰/۶۰۲۱	۰/۶۰۰۱
BMS۲۳۶۱	۰/۰۲۰۷	۰/۹۷۹۳	۰/۲۷۲۵	۰/۷۲۷۵	۰/۷۲۵۰
BMS۷۴۴	۰/۰۰۰۰	۱/۰۰۰۰	۰/۲۸۳۲	۰/۷۱۶۸	۰/۷۱۴۲
BMS۷۹۲	۰/۰۰۰۰	۱/۰۰۰۰	۰/۴۸۲۵	۰/۵۱۷۵	۰/۵۱۵۵
BMS۱۳۱۶	۰/۰۰۰۰	۱/۰۰۰۰	۰/۴۹۸۱	۰/۵۰۱۹	۰/۵۰۰۰
BMS۲۲۱۳	۰/۰۰۰۰	۱/۰۰۰۰	۰/۴۷۴۱	۰/۵۲۵۹	۰/۵۲۳۸
TGLA۱۲۲	۰/۰۰۰۰	۱/۰۰۰۰	۰/۴۶۹۴	۰/۵۳۰۶	۰/۵۲۵۸
Mean					۰/۵۴۶۴

www.SID.ir

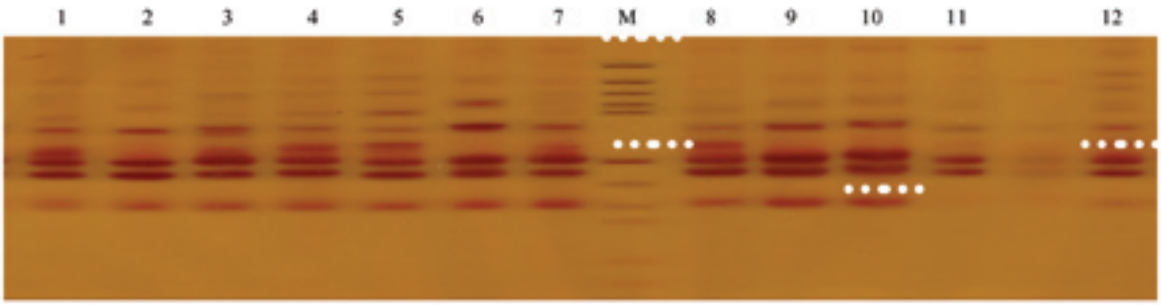
Archive of SID



شکل ۱: نمونه ای از تکثیر الگوی باندی جایگاه CSSM۰۵۹ - چاهک M نشانگر اندازه(Roche VIII)می باشد



شکل ۲: نمونه ای از تکثیر الگوی باندی جایگاه CSSM۰۵۹ - چاهک M نشانگر اندازه(Roche VIII)می باشد



شکل ۳: نمونه‌ای از تکثیر الگوی باندی جایگاه CSSM۰۵۹ - چاهک M نشانگر اندازه(Roche VIII)می باشد

آلل‌های جدیدی را در جایگاه‌های مورد مطالعه (بخصوص CSSM۰۰۶، BMS۲۲۱۳، BMS۷۹۲ و TGLA۱۲۲) دارا می‌باشند و برخی از آلل‌هایی که در مطالعات قبلی گزارش شده بودند در جمعیت مورد مطالعه مشاهده نگردید (۱۳). آلل‌های ۲۲۸، ۲۳۲ و ۲۴۰ جفت باز در جایگاه CSSM۰۰۶، آلل ۱۸۷ جفت باز در جایگاه BMS۱۰۰۴، آلل‌های ۱۳۸ و ۱۵۴ جفت باز در جایگاه BMS۲۳۶۱، آلل‌های ۱۵۴، ۱۶۶ و ۱۷۰ جفت باز در جایگاه BMS۷۴۴، آلل‌های ۱۵۳ و ۱۶۷ جفت باز در جایگاه BMS۲۲۱۳ و آلل‌های ۱۷۱ و ۲۱۷ جفت باز در جایگاه TGLA۱۲۲ آلل‌هایی بودند که در جمعیت مورد مطالعه یافت شدند درصورتیکه در مطالعات قبلی گزارش نشده بودند، همچنین آلل ۲۲۰ جفت بازی در جایگاه CSSM۰۰۶ و آلل ۱۰۶ جفت بازی در جایگاه BMS۲۳۶۱ و آلل ۱۲۶ جفت بازی در جایگاه BMS۱۳۱۶ آلل‌هایی بودند که در تحقیقات قبلی نیز مشاهده شده اند (جدول۲). تمامی‌جایگاه‌ها در تعادل‌هاردی-واینبرگ قرار دارند که دلیل آنرا می‌توان نمونه برداری از تمام سطح جمعیت و یا آمیزش تصادفی دانست.

تعداد ۹ جایگاه از ۱۲ جایگاه مورد بررسی در این مطالعه چندشکل بود. از جمله معیارهایی که برای تعیین میزان چندشکلی جایگاه‌ها استفاده می‌شود تعداد الل واقعی (na) و تعداد آلل موثر (ne) می‌باشد. این دو معیار همراه با PIC-value و شاخص شانون (I) در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، تمام

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌های آلل موثر از تعداد آلل واقعی کمتر است. بیشترین تعداد آلل واقعی در بین ۹ جایگاه چندشکل متعلق به جایگاه‌های CSSM۰۱۸ و CSSM۰۰۶ با ۶ آلل و کمترین آن مربوط به جایگاه BMS۱۳۱۶ با ۲ آلل می‌باشد. بیشترین تعداد آلل موثر مربوط به جایگاه BMS۲۳۶۱، چندشکل ترین جایگاه در این مطالعه است و کمترین تعداد آلل موثر مربوط به جایگاه BMS۱۳۱۶ می‌باشد. نزدیک بودن مقادیر تعداد آلل موثر و واقعی در جایگاه BMS۲۳۶۱ را می‌توان به انحراف معیار کم بین فراوانی آلل‌های مختلف در این جایگاه نسبت داد. بیشترین مقدار شاخص شانون (I) مربوط به جایگاه CSSM۰۱۸ (۰/۴۰۰۸) بود که با توجه به تعداد آلل نسبتاً زیاد (۶ آلل) منطقی بنظر می‌رسد، کمترین مقدار شاخص شانون نیز متعلق به جایگاه BMS۱۳۱۶ (۰/۶۹۳۱) که با توجه به اینکه این جایگاه بعد از جایگاه CSSM۰۵۹ که تک شکل می‌باشد کمترین تعداد آلل را دارد، قابل توجیه است (جدول ۳). در بین ۹ جایگاه چندشکل، جایگاه‌های BMS۲۳۶۱ و BMS۱۳۱۶ به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار PIC-value می‌باشند، و این همان نتیجه ای است که از مطالعه هتروزایگوسیتی به دست آمد. همانطور که انتظار می‌رود تمام مقادیر PIC در مقایسه با مقادیر هتروزایگوسیتی متناظرشان کمتر می‌باشد (جدول ۳). Maddox و همکاران (۱۰) برای جایگاه CSSM۰۵۹ ، ۰/۸۱= PIC گزارش کردند. در مطالعه حاضر این جایگاه فاقد چندشکلی بود و لذا PIC آن برابر صفر به دست آمد. بر اساس مطالعات Maddox وهمکاران (۱۰) برای جایگاه‌های BMS۲۲۱۳، BMS۱۳۱۶، BMS۷۴۴، CSSM۰۰۶ و TGLA۱۲۲ مقادیر PIC به ترتیب برابر ۰/۸۴، ۰/۸۱، ۰/۸۱، ۰/۸۲ و۰/۸۳ گزارش شد. این مقادیر در مطالعه حاضر برای همین جایگاه‌ها بترتیب برابر ۰/۵۷، ۰/۶۶، ۰/۳۷، ۰/۴۱ و ۰/۴۱ به دست آمد. تفاوت‌های زیادی در رابطه با تعداد آلل و مقادیر PIC-value بین مطالعات قبلی و مطالعه حاضر مشاهده می‌شود، این تفاوت‌ها را نمی‌توان با دلایل خاصی تفسیر نمود، چرا که از سویی روش‌های مطالعه در تحقیقات مختلف متفاوت است و از سوی دیگر به دلیل اینکه با ریزماهواره‌ها سروکار داریم وجود چند شکلی‌های زیاد در این نوع نشانگرها بعید نیست. همچنین تفاوت‌ها و شباهت‌های گزارش شده در مطالعات مختلف نیز بدلیل تفاوت در جمعیت‌های مورد بررسی بوده و تفاوت در تعداد و نوع آلل‌های حاصل از مطالعات مختلف کاملاً طبیعی می‌باشد. لذا ارزشهای PIC بایستی برای هر مطالعه، محاسبه و گزارش گردد و مقادیر مربوطه خاص آن مطالعه می‌باشند، ولی از مطالعات قبلی می‌توان بعنوان راهنمایی برای انتخاب جایگاه‌های دارای چندشکلی و مفید برای مطالعات شجره ای مدنظر سود برد.

تنوع درون جمعیتی با تعیین معیارهایی همچون هتروزایگوسیتی مشاهده شده (HO) و هتروزایگوسیتی مورد انتظار (HE) و هتروزایگوسیتی مورد انتظار نا اریب (HENei) مورد بررسی قرار گرفت. تعیین این مقادیر برای هر جایگاه در این جمعیت با استفاده از نرم افزارهای Het (۱۴) و Pop-Gene۳۲ (۱۶) انجام پذیرفت. نتایج در جدول ۴ ارائه شده است. مقدار هتروزایگوسیتی گزارش شده برای سه جایگاه CSSM۰۰۶، CSSM۰۱۸ و CSSM۰۵۹ توسط Moore و همکاران به ترتیب برابر ۰/۶۲، ۰/۶۳ و ۰/۷۸ و در مطالعه حاضر به ترتیب برابر ۰/۷۱، ۰/۶۳ و صفر به دست آمد. بر اساس داده‌های حاصله دامنه هتروزایگوسیتی در این جمعیت بین ۰/۵ (در جایگاه BMS۱۳۱۶) و ۰/۷۲ (در جایگاه BMS۲۳۶۱) می‌باشد که با نتایج به دست آمده از مقادیر PIC-value و دیگر معیارهای چند شکلی مطابقت دارد (جدول ۳ و۴). در مجموع با توجه به میانگین کل هتروزایگوسیتی می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت گوسفند بلوچی با دارا بودن متوسط هتروزایگوسیتی ۰/۵۴ برای تمامی ۱۰ جایگاه تکثیر یافته از تنوع خوبی برخوردار است.

پیشنهادها

با توجه به چند شکلی نسبتاً بالا در جایگاه‌های مورد بررسی در جمعیت مورد بررسی، جایگاه‌های چندشکل مطالعه حاضر را برای سایر مطالعات با استفاده از ریزماهواره‌ها توصیه می‌کنیم، قابل ذکر است که جایگاه‌هایی که چندشکلی بیشتری نشان دادند جهت مطالعات آتی مناسب‌تر می‌باشند. با تلفیق نتایج مطالعه حاضر و مطالعات قبلی می‌توان با در دست داشتن رکوردها و اطلاعات کمی از چند شکلی‌های جایگاه ریزماهواره ای که تا کنون در این جمعیت مورد بررسی قرار گرفته اند در جهت شناسایی و تعیین محل جایگاه‌های موثر بر صفات کمی (QTL) استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری پرسنل موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، بخش بیوتکنولوژی و اساتید محترم گروه علوم دامی دانشگاه تربیت مدرس و ایستگاه اصلاح نژاد عباس آباد مشهد کمال تشکر و قدردانی را دارم.

پاورقی‌ها

1- Morphologic
2- Polymerase Chain Reaction
3- Polymorphism
4- Quantitative Trait Loci
5- Marker Assisted Selection
6- Shannon's Information Index
7- Polymorphic Information Content

منابع مورد استفاده

۱- بنابازی، ح. ۱۳۸۵؛ بررسی تنوع ژنتیکی در درون و بین پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال دهم، شماره چهارم، ص ۴۸۸-۴۸۱.

۲- توکلیان، ج. ۱۳۷۸؛ نگرشی بر ذخائر ژنتیکی دام و طیور بومی‌ایران، کرج، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، ص ۷۹-۶۸.

۳- رزبان، و. ۱۳۸۶؛ پارامترهای ژنتیکی جمعیتی در نژادی از گوسفندان ایرانی بر اساس مارکر مولکولی میکروساتلایت، دومین کنگره علوم دامی و آبزیان کشور، ص ۱۱۵۴-۱۱۵۰.

۴- شهبازی آذربریس، ص. میرحسینی، ض. و اسماعیل خانیان، س. ۱۳۸۲؛

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی چندشـــکلی DNA مرغان بومی‌مازندران و آذربایجان غربی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، سومین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی‌ایران، مشهد، ص ۳۴۲.

5 - Bassam, B.J., and Caetano-Anolles, G., 1993; Silver Staining of DNA in Polyacrylamide gels. Applied Biochemistry and Biotechnology, 42:181-188.

6 - Bovenhuis, H., Van Arendonk, J.A.M., Davis, G., Etsen, J.M., Haley, C.S., Hill, W.G., Baret, P.V., Hetzel, D.J.S., and Nicholas, F.W., 1997; Detection and mapping of quantitative trait loci in farm animals. Livestock Production Science, 52: 135-144.

7 - Buchanan, F.C., and Thune, T.D., 1998; Intrabreed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. Canadian Journal of Animal Science, 78:425-428.

8 - Gortari, M.J.D., Freking, B.A., Kappes, S.M., Leymaster, K.A., Crawford, A.M., Stone, R.T., and Beattie, C.W., 1997; Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. Animal Genetics, 28:274-290.

9 - Hedrick, P.W., 1999; Genetic of populations. Second Edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA, USA.

10 - Maddox, J.F., Davis, K.P., Crawford, A.M., Hulme, D.J., Viaman, D., Cribiu, E.O., Freking, B.A., Beh, K.J., Kang, N., Riffkin, C.D., Moore, S.S., Doddes, K.G., and Lumsden, J.M., 2001; An enhance linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. Genome Research, 11(7):1257-1289.

11 - Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F., 1988; A Simple Salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16:12-15.

12 - Montaldo, H.H., and Meza-Herrera, C., 1998; Use of molecular markers and major genes in the genetic Improvement of Livestock. EJB. Electronic Journal of Biotechnology, 1(2): 0717-3458.

13 - Moore, S.S., Byrne, K., Berger, K.T., Barendse, W., McCarthy, E., Womack, J.E., and Hetzel, D.J.S., 1994; Characterization of 65 bovine microsatellites. Mammalian Genome, 5:84-90.

14 - Ott, J., 1992; Programme PIC version 1.51 Utility programmes for detection of polymorphism information Content. ftp://linkage.Rockefeller.Edu/software/utilities.

15 - Stone, R.T., Polido, J.C., Duyk, G.M., Kappes, S.M., Keele, J.W., and Beattie, C.W., 1995; A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. Mammalian Genome, 6:714-724.

16 - Yeh, F.C., Yang, R., and Boyle, T., 1999; POPGENE. Version 1.31. Microsoft window-based Freeware for population genetic analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.

www.SID.ir