Archive of SID

بررسی تنوع ژنتیکی گوسفند کردی خراسان با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره

اشکان سالاری[۱]، سیروس امیری‌نیا[۲]، علی اکبر قره داغی[۲]، سید اکبر شیری[۳]، صابر خدرزاده[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۸/۱۸
تاریخ پذیرش :۱۳۸۹/۱۰/۳۰

چکیده

باتوجه به اهمیت حفظ تنوع در نژادهای بومی و شناسایی ذخایر ژنتیکی کشور، جمعیت گوسفند کُردی خراسان با استفاده از پنج نشانگر ریزماهواره به نام‌های OarCP49، OarFCB20، OarFCB11، OarFCB304 و OarAE129 از نظر تنوع درون جمعیتی مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا از تعداد ۱۲۰ بره از گله های مختلف در سطح استان خراسان رضوی خونگیری شده و پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه ،DNA نمونه ها استخراج شد. پس از بهینه سازی شرایط و انجام واکنش های PCR ، تمامی جایگاهها بخوبی تکثیر شدند و چند شکلی خوبی نشان دادند. آزمون های مربع کای ( ) و نسبت درست نمایی ( ) برای تعادل هاردی- واینبرگ برای تمام جایگاهها در سطح جمعیت انجام شد و نتایج حاصل در تمامی جایگاهها انحراف معنی‌داری را از تعادل، نشان دادند. دامنه هتروزایگوسیتی مورد انتظار ۰/۸۶۱۶ – ۰/۶۲۸۸ بود که کمترین و بیشترین مقدار بترتیب مربوط به جایگاههای OarAE129 و OarCP49 می شد. بیشترین مقدار شاخص شانون در جایگاه OarCP49 و کمترین مقدار شاخص، در جایگاه OarAE129 بدست آمد. همچنین بیشترین و کمترین تعداد آلل مؤثر بترتیب از آن جایگاه OarCP49 (۷/۰۲۶۰) و جایگاه OarAE129 (۲/۶۷۲۹) بود. از نظر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بیشترین و کمترین مقدار PIC به ترتیب به جایگاه OarCP49 (۰/۸۴۱۶) و OarAE129 (۰/۵۵۳۰) مربوط می شود. در کل می توان به این نتیجه رسید که جایگاه های ریزماهواره ای مورد استفاده در این جمعیت چند شکلی بالایی داشته و می توانند در دیگر مطالعات ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند. این چند شکلی حاکی از وجود تنوع ژنتیکی زیاد در این نژاد است.

کلمات کلیدی: گوسفند کردی خراسان، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه علوم دامی، دانشجوی دکترای رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام، تهران، ایران
۲- استادیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
۳- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی
۴- کارشناس‌ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تنوع ژنتیکی موجودات زنده سرمایه گرانبهایی است که طی سال های متمادی پدید آمده و حاصل برآیندی طولانی از اثر متقابل ژنوتیپ و محیط می‌باشد که از زمانهای گذشته به نسل کنونی به ارث رسیده است. وجود نژادهای مختلف دام در کشور و بروز اختلاط ژنتیکی بین آنها، نیاز به جمع آوری و ثبت مشخصات هریک را اجتناب ناپذیر می‌نماید تا در صورت لزوم، امکان شناسایی و تفکیک آنها از یکدیگر وجود داشته باشد(۲). پس از تعیین میزان تنوع موجود، می‌توان برای اصلاح‌نژاد جمعیت‌ها برنامه‌ریزی کرده و در طی برنامه‌های بلندمدت و هدف‌دار، صفات اقتصادی مورد نظر را انتخاب و صفات نامطلوب این جمعیت‌ها را حذف نمود (۱). در سال‌های اخیر، تکنیک‌های پیشرفتهٔ ژنتیک مولکولی به ابزار قابل‌اعتمادی برای شناسایی تفاوت بین افراد در سطح مولکول DNA تبدیل گردیده است. از ابزارهای ژنتیکی کارآمد که برای تعیین هویت حیوانات اهلی و غیراهلی، مشخص‌نمودن والدین آنها، روابط شجره‌ای بین افراد جمعیت، بررسی ساختار و تمایز جمعیت‌ها به‌کارگیری شده، می‌توان به نشانگرهای ریزماهواره اشاره نمود که پژوهشگران از چندشکلی زیاد آنها به‌منظور تجزیه وتحلیل ژنتیکی و بررسی تفاوت‌های بین گونه‌ها، تعیین منشأ اجدادی و پیگیری روابط مورفولوژیک و رفتاری در سطوح مختلف جوامع، مطالعات شجره‌ای برای شناسایی پیوستگی ژنتیکی با ژن‌های عامل بیماری‌های خطرساز وراثتی و یا آنهایی‌که با صفات مطلوب حیوانات اهلی و گونه‌های گیاهی مرتبط اند، شناسایی اختلافات بین افراد مختلف یک جمعیت و شناخت اصول تکامل و انشعاب جوامع و غیره در حیوانات و گیاهان بهره می‌گیرند (۵ و۶). هدف مطالعه حاضر تعیین ویژگی‌ها و خصوصیات ژنتیکی برخی ریزماهواره‌های پراکنده در ژنوم گوسفند کُردی خراسان می‌باشد تا چندشکل‌ترین جایگاه را شناسایی کرده و با شناسایی پارامترهای ژنتیکی این جایگاه‌ها، مطالعه‌ای بنیادی را در این زمینه پایه‌ریزی کرد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۲۰ نمونه از بره های موجود در گله های سراسر استان خراسان رضوی بصورت تصادفی جمع آوری گردید. نمونه‌های خون کامل از سیاهرگ وداج گردن و با استفاده از لولهٔ خلأ دار ۵ میلی لیتر حاوی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه شد. استخراج DNA از نمونه های خون کامل با استفاده از کیت استخراج صورت گرفت. غلظت DNA استخراج شده و کیفیت آن با روش های استفاده از ژل آگارز ۱% و نیز سنجش بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده شد که DNA استخراجی دارای کیفیت مطلوب و غلظت آن بطور متوسط ۵۰ نانو گرم بر میکرولیتر می باشد. بهینه سازی آغازگرهای مورد استفاده برای این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ – مشخصات پرایمرهای استفاده شده

شماره ردیف	نام جایگاه	شماره دسترسی	توالی (۵-۳) آغازگر	شماره کروموزوم
۱	OarFCB 304	L01535	F: CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG R: CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	۱۹
۲	OarFCB 11	L01531	F: GCAAGCAGGTTCTTTACCACTAGCACC R: GGCCTGAACTCACAAGTTGATATATCTATCAC	۲
۳	OarFCB 20	L20004	F: AAATGTGTTTAAGATTCCATACAGTG R: GGAAAACCCCCATATATACCTATAC	۲
۴	OarAE 129	L11051	F: AATCCAGTGTGTGAAAGACTAATCCAG R: GTAGATCAAGATATAGAATATTTTTCAACACC	۵
۵	OarCP 49	U15702	F: CAGACACGGCTTAGCAACTAAACGC R: GTGGGGATGAATATTCCTTCATAAGG	۱۷

*اطلاعات جدول از سایت NCBI گرفته شده است.

شرایط PCR با در نظر گرفتن دو عامل مقدار MgCl2 و دمای اتصال آغازگرها، بعنوان عوامل متغیرانجام شد. مواد بکار برده شده برای PCR همگی از شرکت GenetBio خریداری شده بودند. غلظت مواد بکار برده شده در PCR به قرار جدول ۲ بود.

چرخه های حرارتی PCR نیز به قرار زیر صورت پذیرفت؛ ۱- واسرشته سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۲- واسرشته سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳- اتصال آغازگر طبق دمای جدول ۳ به مدت ۳۰ ثانیه، ۴- مرحله بسط به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، ۵- تکرار مراحل ۴-۲ به تعداد ۳۵ دور، ۶- مرحله بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، ۷- نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد.

جدول ۲- بهینه سازی شرایط PCR

اجزاء واکنش	غلظت نهایی
بافر PCR	1X
Mgcl2	متغیر
هر یک از آغازگرها	۰/۲۵ µM
dNTPs	۲۰۰ µM
آنزیم تک پلیمراز	1 unit/reaction
الگو DNA	150 ng/reaction
dd H_2O	متغیر
حجم نهایی واکنش	15 µl

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- مقادیر مربوط به دمای اتصال و MgCl2 نشانگرها

ردیف	نشانگر میکروساتلایت	MgCl2 (mM)	Annealing (Temperature)°C
۱	OarFCB304	۳	۶۳
۲	OarFCB11	۴/۵	۶۳
۳	OarFCB20	۲	۵۵
۴	OarCP49	۴/۵	۶۳
۵	OarAE129	۲	۵۲

پس از انجام مراحل PCR قطعات DNA تکثیر شده در طی انجام الکتروفورز با ژل اکریل آمید ۸ درصد از یکدیگر تفکیک شده وسپس بوسیله رنگ آمیزی به روش نیترات نقره نمایان شدند. سپس بوسیله دستگاه Geldoc از ژلها تصویر برداری شد و بوسیله نرم افزار Gelpro Analyzer باندهای بدست آمده مورد سنجش قرار گرفتند. در نهایت داده ها بوسیله نرم افزار PopGene مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج

نتایج حاصل از چرخه های حرارتیPCR نشان داد که تمامی جایگاهها به خوبی تکثیر یافته اند. دامنه آللی بدست آمده در بین تمامی پرایمرها bp ۲۱۶-۹۲ بدست آمد که نتایج آن به تفکیک هر یک از جایگاهها در جدول۴ آمده است.

جدول ۴- دامنه آللی و تعداد آللهای گزارش شده برای هر مارکر از مطالعات پیشین و دامنه های بدست آمده و تعداد آللهای مشاهده شده در این تحقیق در مقایسه با یکدیگر

نام نشانگر	دامنه باندی گزارش شده (bp)	دامنه باندی مشاهده شده (bp)	تعداد آللها (گزارش شده)	تعداد آللها (مشاهده شده)
OarFCB304	۱۵۰-۱۸۸	۱۵۶-۲۱۶	۹	۷
OarFCB11	۱۲۱-۱۴۳	۱۲۰-۱۵۴	۹	۷
OarFCB20	۹۲-۱۱۲	۹۲-۱۱۰	۱۲	۸
OarAE129	۸۵-۱۰۷	۱۳۶-۱۷۲	۷	۵
OarCP49	۱۳۳-۱۵۹	۹۲-۱۱۲	۷	۹

همانطور که درجدول ۴ ملاحظه می شود بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده به‌ترتیب به جایگاههای $OarCP^{49}$ و $OarAE^{129}$ مربوط می‌شوند. از آنجا که بین تعداد آلل مشاهده شده و میزان هتروزایگوسیتی و شاخص اطلاعات شانون و محتوای اطلاعات چند شکلی ارتباط مستقیمی وجود دارد، لذا همانطور که در جدول ۶ خواهیم دید بیشترین و کمترین مقادیر شاخص‌های نامبرده نیز به دو جایگاه فوق الذکر اختصاص یافته است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- مقادیر هتروزایگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار و میانگین هتروزایگوسیتی

جایگاه	اندازه نمونه	Ho	He	میانگین هتروزایگوسیتی
OarFCB304	۲۲۴	۰/۹۷۳۲	۰/۷۱۰۶	۰/۷۰۷۴
OarFCB11	۲۲۲	۰/۹۵۵۰	۰/۸۳۱۵	۰/۸۲۷۸
OarFCB20	۲۰۲	۰/۹۶۰۴	۰/۸۴۱۷	۰/۸۳۷۵
OarAE129	۲۱۸	۰/۹۰۸۳	۰/۶۲۸۸	۰/۶۲۵۹
OarCP49	۲۱۸	۱/۰۰۰۰	۰/۸۶۱۶	۰/۸۵۷۷
Mean	۲۱۷	۰/۹۵۹۴	۰/۷۷۴۸	۰/۷۷۱۳
St.Dev.		۰/۰۳۳۴	۰/۱۰۰۸	۰/۱۰۰۳

جدول ۶- مقایسه شاخص اطلاعات شانون، محتوای اطلاعات چند شکلی، تعداد آللها و هتروزایگوسیتی بر اساس ترکیبات مختلف جایگاه – جمعیت

جایگاه	اندازه نمونه	تعداد آللها	هتروزایگوسیتی*	ارزش PIC	zI**
OarAE129	۲۱۸	۶	۰/۶۲۵۹	۰/۵۵۳۰	۱/۱۵۰۴
OarCP49	۲۱۸	۹	۰/۸۵۷۷	۰/۸۴۱۶	۲/۰۴۷۴
OarFCB20	۲۰۲	۸	۰/۸۳۷۵	۰/۸۱۶۶	۱/۸۹۷۵
OarFCB11	۲۲۲	۸	۰/۸۲۷۸	۰/۸۰۴۷	۱/۸۵۷۸
OarFCB304	۲۲۴	۷	۰/۷۰۷۵	۰/۶۶۰۵	۱/۴۶۲۵
Mean	۲۱۷	۷/۶			۱/۶۸۳۱
St.Dev.		۱/۱۴۰۲			۰/۳۶۸۰

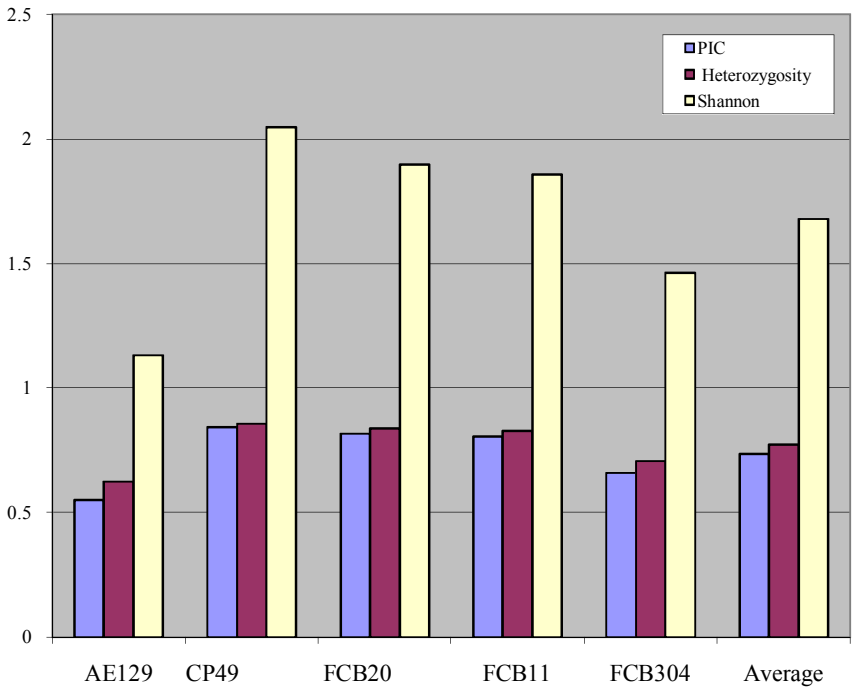
* Max. likelihood estimation (biased)

** I: شاخص اطلاعات شانون [Lewontin (1972)]

با توجه به اطلاعات و داده های جداول فوق و با در نظر گرفتن نتایج دو آزمون کای اسکوور و آزمون نسبت درست نمایی به این نتیجه می رسیم که جمعیت گوسفند کردی خراسان در جایگاههای مورد بررسی در این تحقیق از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف داشته($P<۰/۰۰۵$) و از نظر این جایگاهها بسیار چند شکل می باشد این نتایج در تایید نتایج تحقیقات پیشین بر روی این نژاد می‌باشد(۳ و ۴).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱- مقایسه مقادیر PIC با پارامترهای تنوع ژنتیکی

(هتروزایگوسیتی و شاخص اطلاعات شانون)

بحث

به دلیل وجود عوامل بر هم زننده تعادل هاردی- واینبرگ در این جمعیت انحراف از تعادل در کلیه جایگاهها مشاهده شد. علت انحراف می‌تواند کوچک بودن اندازه نمونه‌ها باشد. از طرفی تنوع ژنتیکی بالای برآورد شده می‌تواند به دلیل نحوه نمونه گیری باشد بدین ترتیب که نمونه گیری از حیوانات غیرخویشاوند می‌تواند حداکثر مقدار تنوع موجود در این جمعیت را بر اساس این شاخص ها ایجاد نماید. با مقایسه بین هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) و قابل انتظار (He) در تمامی‌جایگاههای مورد مطالعه می‌توان دریافت که در بسیاری از جایگاهها تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین این دو مقدار مشاهده می‌شود و یا به عبارتی در تمامی این جایگاهها فزونی هتروزایگوسیتی وجود دارد. با توجه به وجود فزونی هتروزایگوسیتی در این جمعیت می‌توان نتیجه گرفت که این گوسفند را خطری از بابت افت هتروزایگوسیتی تهدید نمی‌کند و آن را می‌توان بعنوان یک ذخیره ژنتیکی مناسب برای اهداف مختلف پرورشی و اصلاح نژادی در کشور به حساب آورد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱. بنابازی، م. ح. (۱۳۸۱). بررسی تنوع ژنتیکی در درون و بین پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

۲. زاهدی، ز. (۱۳۸۳). بررسی چند شکلی ۱۲ نشانگر ریزماهواره در گوسفند نژاد بلوچی، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

۳. شریفی سیدانی، ا. (۱۳۸۵). مطالعه تنوع ژنتیکی اکوتیپ های مختلف گوسفند سنجابی(زردی، کژال، کلول) توسط نشانگرهای ریزماهواره ای، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

۴. کمانگر، ش. (۱۳۸۵). بررسی پلی مورفیسم ژنتیکی در جمعیت نژاد کردی استان کردستان با استفاده از ۱۰ نشانگر ریزماهواره، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

5. Gelfand, D. H. and White, T. J. 1990. PCR protocols: A Guide Methods and Applications. Academic, New York.

6. Hartel, D. L. 1999. A Primer of Population Genetics. USA Associates INC.

www.SID.ir