



بررسی چندشکلی تعدادی از نشانگرهای ریزماهوره (Microsatellite) در یک جمعیت از گوسفندان بلوچی

عبدالرضا دانشور آملی^۱، سعید اسماعیل خانیان^۲، محمدرضا سنجابی^۳ و سید احمد میرهادی^۲

۱- دکتری، جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلولهای انسانی و جانوری، تهران، ایران، (نویسنده مسوول: daneshvaramoli@gmail.com)

۲- دانشیار، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳- استادیار، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، بخش تحقیقات دام، طیور و آبزیان، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۲

صفحه: ۹۶ تا ۱۰۳

چکیده

نظر به اهمیت حفظ و نگهداری نژادهای بومی به عنوان ذخایر ژنتیکی کشور، نژاد گوسفند بلوچی به عنوان پرجمعیت‌ترین نژاد گوسفند ایرانی و داشتن شجره قابل‌اطمینان، انتخاب شد. در این تحقیق با استفاده از ۱۵ نشانگر ریزماهوره (TGLA231, OarVH110, McMA10, McMA1, McM214, McM139, McM63, LSCV38, LSCV36, KD101, BMS2721, BMS995, BMS332, BM1815, BM737) تنوع ژنتیکی در یک جمعیت از گوسفند بلوچی مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۴۰ رأس دام از ایستگاه عباس‌آباد مشهد به صورت تصادفی انتخاب شدند. پس از انجام واکنش‌های PCR، جایگاه McM139 به هیچ‌کدام از شرایط بهینه‌سازی تکثیر جواب نداد. جایگاه LSCV38 به علت داشتن آلل صفر زیاد و عدم وضوح آللی مورد استفاده قرار نگرفت. بقیه جایگاه‌ها در جمعیت مورد مطالعه چندشکل بودند. تعداد آللهای مشاهده‌شده از ۶ آلل در جایگاه‌های BMS332, BM737, McMA10 تا ۱۲ آلل در جایگاه McM63 و آلل مؤثر از ۳/۵۱ در جایگاه LSCV36 تا ۸/۶۶ در جایگاه OarVH110 متغیر بودند. بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جایگاه OarVH110 با ۱۲ آلل و به مقدار (۰/۸۹۰) و کمترین آن در جایگاه LSCV36 (۰/۷۱۸) با ۷ آلل مشاهده شد. بیشترین محتوای اطلاعاتی چندشکلی (PIC) در جایگاه OarVH110 (۰/۸۷۳) و کمترین مقدار این معیار در جایگاه LSCV36 (۰/۶۶۹) بود. بیشترین و کمترین مقدار شاخص شانون به ترتیب برای جایگاه OarVH110 (۲/۲۱) و LSCV36 (۱/۴۷) برآورد شد. با توجه به نتایج، جایگاه‌های ریزماهوره مورد استفاده از چندشکلی بالایی در جمعیت گوسفند بلوچی برخوردار بودند و می‌توان از چندشکلی بالای آنها در مطالعات بعدی، به‌ویژه برای یافتن جایگاه‌های صفات کمی استفاده نمود. وجود آلل‌ها و دامنه آللی جدید در این نژاد حاکی از تفاوت ساختار جمعیتی آنها در مقایسه با گوسفندان نژادهای خارجی است.

واژه‌های کلیدی: گوسفند بلوچی، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ریزماهوره

مقدمه

یکی از اهداف علم ژنتیک و اصلاح نژاد استفاده از تنوع ژنتیکی و حفظ ذخایر ژنتیکی برای رسیدن به جمعیت‌هایی در آینده است که از جمعیت‌های قبلی برتر باشند، به صورتی که بتوان از آنها میزان تولید و راندمان بیشتری را دریافت کرد و نیازهای انسان را به صورت مطلوب‌تری تأمین نمود. چنین افزایشی در راندمان تولید از طریق انتخاب داخل نژادها یا دور جفتی و آمیخته‌گری تأمین می‌گردد (۲،۱).

برای انجام مطالعات تنوع ژنتیکی می‌توان از نشانگرهای مولکولی استفاده کرد. این نشانگرها تفاوت در ترتیب نوکلئوتیدی DNA را مشخص نموده و با شناسایی تنوع در سطح DNA تفاوت صحیح ژنتیکی بین دو موجود را مشخص می‌نمایند (۳).

ریزماهوره‌ها به عنوان یک نشانگر ژنتیکی با ارزش با داشتن خصوصیتی چون توزیع وسیع در اکثر گونه‌های مهره‌داران و پراکندگی یکنواخت در سراسر ژنوم و چندشکلی بالا در سال‌های اخیر به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و در تهیه نقشه‌های ژنومی، انگشت‌نگاری DNA، تعیین هویت و تعیین محل بسیاری از ناهنجاری‌های ژنتیکی، مطالعه آثار هم‌خونی و همچنین در آنالیز همبستگی‌ها و درجه تغییرپذیری خصوصیات فردی در درون و بین جمعیت‌ها مفید هستند (۳-۵).

در مطالعه‌ای از ۱۸ جایگاه ریزماهوره بر روی ۶ نژاد گوسفند بومی اسپانیا استفاده گردید. بالاترین تنوع در نژاد مرینو و کمترین آلل در نژاد لاتوکسا مشاهده شد. بالاترین تنوع آللی در TGLA13, MAF70 و کمترین آن در Oarcp34, ADCYC گزارش شد (۶).

محققین در پژوهشی دیگر با استفاده از ۱۰ جایگاه ریزماهوره به بررسی بر روی نژاد کوریدال^۱ گوسفند اروگوئه پرداختند. جایگاه‌های دارای چندشکلی بالا، حدوداً بین ۷ تا ۱۵ آلل را نشان می‌دادند. این مطالعه اولین گزارش پلی مورفیسم ریزماهوره‌ها در نژاد کوریدال است (۷).

در پژوهشی در ایران تنوع ژنتیکی در درون و بین پنج جمعیت گوسفند ایرانی (سنجابی، کردی کردستان، کردی خراسان، مهربانی و مغانی) با استفاده از شش جفت آغازگر ریزماهوره (McMA2, McMA26, MAF64, OarCP26, OarAE64, OarFCB304) مورد بررسی قرار گرفت. تمامی جایگاه‌ها در همه جمعیت‌ها کاملاً چندشکل بودند به جزء جمعیت مغانی برای جایگاه McMA2. همچنین بیشترین و کمترین تنوع درون جمعیتی، که برای هر جمعیت به صورت متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار همه جایگاه‌ها برآورد گردید، به ترتیب مربوط به جمعیت‌های مهربانی (۰/۸۴۷) و کردی خراسان (۰/۷۴۴) بود (۸).

دام از گله شماره ۲ با ۱۵ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفتند. ترکیب جنسی این دام‌ها شامل تعداد ۷۰ رأس میش، ۵۵ رأس بره نر و ماده و ۱۵ رأس قوچ بود. جایگاه‌های مورد مطالعه از کروموزوم‌های متفاوتی از ژنوم گوسفند انتخاب شدند تا امکان پیوستگی بین جایگاه‌ها کاهش یافته و بتوان برآورد مناسبی از تنوع ژنتیکی با توجه به پراکندگی یکسان جایگاه‌ها در کروموزوم‌های مختلف به دست آورد (جدول ۱).

استخراج DNA از نمونه خون‌هایی که در لوله‌های خلاءدار حاوی ماده ضدانعقاد Na₂EDTA به صورت فریز شده نگهداری می‌شدند به روش استخراج نمکی بهینه‌سازی شده در آزمایشگاه بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام گرفت (۱۲). اجزاء واکنش PCR شامل بافر PCR با غلظت 1X، آغازگرها هر کدام با غلظت ۰/۲۵ μM، dNTPs با غلظت ۰/۲ μM، آنزیم Taq با غلظت ۰/۵ ng/reaction، DNA با غلظت ۱۵۰ ng/reaction و MgCl₂ انتخاب شد که حجم نهایی واکنش به کمک آب مقطر به ۱۵ μl رسید. غلظت MgCl₂ و دمای اتصال آغازگر (Annealing) برای هر آغازگر بهینه‌سازی شد.

برای انجام واکنش PCR از دستگاه ترموسایکلر Biometra (T-Gradient) استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده برای جایگاه McM214 مطابق با برنامه مرجع و Touch down در نظر گرفته شد (۱۳). برنامه دمایی بقیه جایگاه‌ها به صورت زیر انجام شد:

در مطالعه‌ای دیگر تنوع ژنتیکی در گوسفند بلوچی با استفاده از ۷ جایگاه ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت. جایگاه‌های مورد مطالعه بین ۴ تا ۷ آلل و به طور متوسط ۵/۵ آلل را نشان دادند. شاخص اطلاعات چند شکل (PIC) در این مطالعه به طور متوسط ۰/۶۵ برآورد شد. نتایج این تحقیق نشان داد که جمعیت مورد مطالعه از تنوع ژنتیکی خوبی برخوردار است (۹).

علاوه بر موارد فوق، مطالعات دیگری نیز در زمینه بررسی تنوع آلی ژن‌های مؤثر در صفات عملکردی گوسفندان بومی انجام شده است (۱۱،۱۰). لذا با توجه به اهمیت نژادهای بومی و مطالعه بر روی آنها، گوسفند بلوچی به عنوان پرجمعیت‌ترین نژاد گوسفند ایرانی، انتخاب گردید. در این تحقیق چندشکلی ۱۵ جایگاه ریزماهواره به منظور شناسایی جایگاه‌های مناسب و همچنین تنوع ژنتیکی، در یک جمعیت از گوسفندان بلوچی مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در ایستگاه پرورش گوسفند بلوچی عباس آباد مشهد دو گله به طور مجزا نگهداری می‌شوند، که به منظور کاهش هم‌خونی جابه‌جایی قوچ بین این دو گله و یا ورود قوچ از روستاها نیز اتفاق می‌افتد. به منظور بررسی عملکرد برنامه اصلاح نژادی و تلاقی گری، گوسفندان یکی از گله‌ها به طور تصادفی انتخاب شدند. برای اینکه بتوان از نظر آماری اطلاعات دقیقی از وضعیت تنوع ژنتیکی در این گله و همچنین چندشکلی نشانگرها بدست آورد، تعداد ۱۴۰ رأس

جدول ۱- شماره کروموزوم، دمای اتصال و محدوده باندی جایگاه‌های ریزماهواره ای مورد مطالعه در گوسفندان بلوچی

Table 1. Microsatellite chromosome number, annealing temp (°C) and size range in Baluchi Sheep

| نام جایگاه | شماره کروموزوم | دمای اتصال (سانتی‌گراد) | | محدوده طول باند مشاهده شده (bp) |
|------------|----------------|-------------------------|-----------|---------------------------------|
| | | اعلام شده | بهینه شده | |
| BM737 | ۲۴ | ۵۴ | ۵۵ | ۱۲۶-۱۴۴ |
| BM1815 | ۲۰ | ۵۵ | ۵۵ | ۱۴۶-۱۷۴ |
| BMS332 | نامعلوم | ۵۷ | ۵۷ | ۱۴۶-۱۷۲ |
| BMS995 | ۱۳ | ۵۸ | ۵۹ | ۱۲۸-۱۶۴ |
| BMS2721 | ۷ | ۵۷ | ۵۸ | ۱۵۲-۱۸۲ |
| KD101 | ۸ | ۵۵ | ۵۵ | ۱۵۳-۱۸۷ |
| LSCV36 | ۱۱ | ۵۴ | ۵۵ | ۱۱۵-۱۵۹ |
| LSCV38 | ۱۲ | ۵۴ | ۵۴ | باند مشاهده نشد |
| McM63 | ۹ | ۵۵ | ۵۴ | ۱۳۰-۱۸۰ |
| McM139 | ۷ | ۵۵ | --- | باند مشاهده نشد |
| McM214 | ۶ | ۵۵ | ۵۵ | ۷۵-۱۰۵ |
| McMA1 | ۲۳ | ۵۲ | ۵۴ | ۱۴۰-۱۶۸ |
| McMA10 | ۹ | ۵۲ | ۵۴ | ۹۴-۱۳۴ |
| OarVH110 | ۲۱ | ۵۵ | ۵۵ | ۱۱۶-۱۶۰ |
| TGLA231 | ۱۷ | ۶۰ | ۶۰ | ۱۱۰-۱۵۶ |

Shannon) به عنوان معیارهای بررسی تنوع ژنتیکی به کمک نرم افزارهای POPGENE و HET برآورد شدند (۱۵،۱۴).

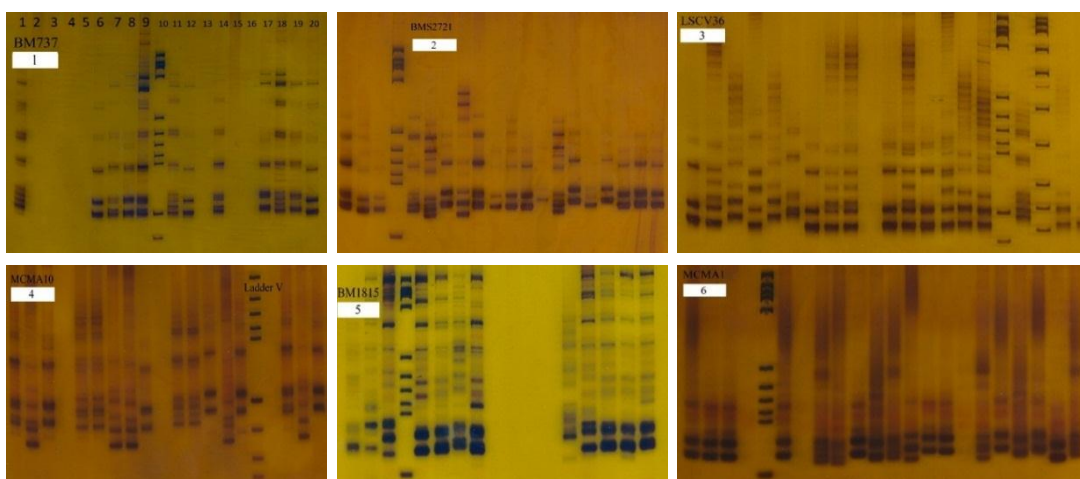
نتایج و بحث

کلیه جایگاه‌های ریزماهواره به جز دو جایگاه چندشکلی بالایی را نشان دادند. جایگاه McM139 به هیچ‌کدام از شرایط بهینه‌سازی صورت گرفته در حین واکنش جواب نداده و تکثیر آن انجام نگرفت که علت احتمالی آن می‌تواند نقص در ساخت آغازگرها و یا جهش‌های احتمالی در محل اتصال آغازگرها در جمعیت مورد مطالعه باشد که مورد بررسی قرار نگرفت. همچنین، جایگاه LSCV38 به علت عدم وضوح بانندی و آلل‌های صفر زیاد که یکی از دلایل آن می‌تواند بزرگ بودن این جایگاه (۶۴۴ bp) باشد، مورد آنالیز قرار نگرفت. این جایگاه در مطالعه دیگری که بر روی بز انجام گرفت نیز عدم وضوح آللی را نشان داد (۱۶). بقیه جایگاه‌ها به خوبی تکثیر و مورد آنالیز قرار گرفتند (شکل ۱).

- ۱- پیش و اسرشته‌سازی^۱ (۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴ دقیقه)
- ۲- واسرشته‌سازی (۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه)
- ۳- اتصال آغازگر^۲ (دما متغیر، جدول ۱، ۳۰ ثانیه)
- ۴- گسترش (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه)
- ۵- گسترش نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه) مراحل ۲ تا ۴ با ۳۵ تکرار انجام گرفت.

به علت تفاوت خیلی کم فواصل آلل‌های ریزماهواره و امکان تظاهر این تفاوت‌ها، سیستم الکتروفورز عمودی و ژل پلی‌اکریلامید ۸٪ استفاده شد. سپس ژل‌ها به روش قلیایی نیترات‌نقره سریع رنگ‌آمیزی شده و کلیه باندها به کمک نشانگر اندازه شماره V و VIII شرکت Roche و با استفاده از نرم‌افزار Excel برای تبدیل سانتی‌متر به جفت باز اندازه‌گیری شدند.

جایگاه‌های مورد مطالعه از لحاظ تعادل هاردی-واینبرگ به کمک دو آزمون کای اسکوئر (χ^2) و نسبت درست‌نمایی (G2) مورد آزمون قرار گرفتند. همچنین، تعداد آلل‌های واقعی و مؤثر، مقادیر هتروزایگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار، محتوای اطلاعات چندشکل PIC و شاخص اطلاعات شانون

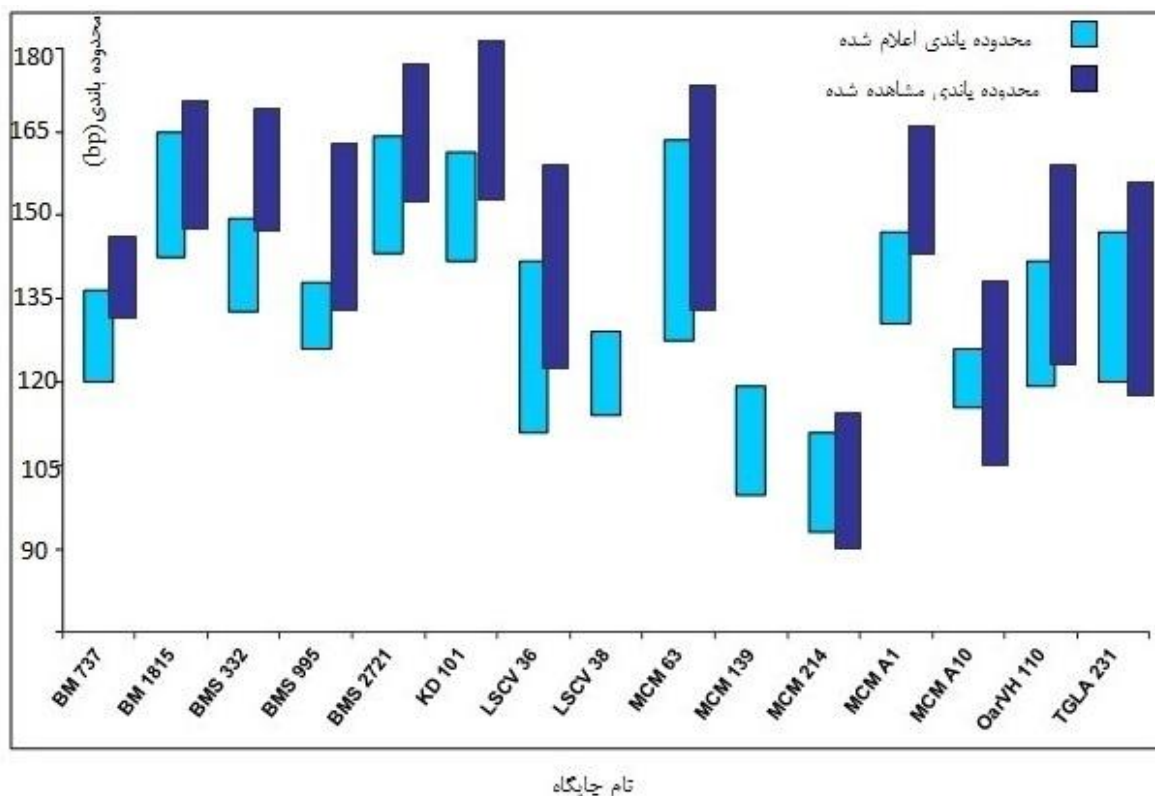


شکل ۱- الگوی بانندی در جایگاه‌های ۱. BM737، ۲. BMS2721، ۳. LSCV36، ۴. MCMA10، ۵. BM1815، ۶. MCMA1
Figure 1. Samples band size in microsatellite loci 1. BM737، 2. BMS2721، 3. LSCV36، 4. MCMA10، 5. BM1815، 6. MCMA1

وسیع‌ترین دامنه آللی در جایگاه‌های مورد مطالعه در جایگاه McM63 (۱۶۸-۱۲۰) و تعداد ۱۴ آلل گزارش شد (۱۸). در این مطالعه نیز وسیع‌ترین دامنه آللی در همین جایگاه (۱۸۰-۱۳۰) و تعداد ۱۲ آلل که ۶ آلل آن جدید است، مشاهده شد و محدودترین دامنه آللی در جایگاه MCMA10 (۱۱۸-۱۰۴) و تعداد ۸ آلل توسط Hulme و همکاران گزارش شد، اما در این مطالعه محدودترین دامنه آللی در جایگاه BM737 (۱۲۶-۱۴۴) مشاهده شد (۱۳). Stone و همکارانش (۱۹۹۵) برای جایگاه‌های BM737، BM1815، BMS332 تعداد ۸ آلل و برای جایگاه BMS995 ۶ آلل را گزارش کردند (۱۹، ۲۰). در پژوهشی برای جایگاه LSCV36 تعداد ۱۴ آلل را در گوسفند گزارش کردند. درحالی که در مطالعه حاضر تعداد ۷ آلل مشاهده شد (۲۱).

برای بررسی میزان انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ از هر دو آزمون استفاده شد و نتایج آنها در سطح احتمال ۵ درصد یکسان بود. نتایج نشان داد که هیچ‌کدام از جایگاه‌ها در هیچ یک از آزمون‌ها انحرافی از این تعادل نشان ندادند ($p > 0.05$). این نتایج با مطالعه دیگری که بر روی گوسفند بلوچی انجام گرفت، همخوانی دارد (۱۷).

بیشترین تعداد آلل واقعی در جایگاه McM63 به تعداد ۱۲ آلل و کمترین آلل در جایگاه‌های BM737 BMS332، MCMA10 به تعداد ۶ آلل مشاهده شد. همچنین، بیشترین تعداد آلل مؤثر در جایگاه OarVH110 با ۸/۶۶ و کمترین آن در جایگاه LSCV36 با ۲/۵۱ آلل محاسبه شد. در نمودار ۱ محدوده بانندی (bp) اعلام شده در مقالات مرجع که حاصل مطالعه بر روی نژادهای خارجی است با مقادیر مشاهده شده در این مطالعه مقایسه شده که در کلیه جایگاه‌ها محدوده بانندی مشاهده‌شده بزرگ‌تر است.



نمودار ۱- مقایسه دامنه طول باندهای مشاهده شده در گوسفند بلوچی با مقادیر اعلام شده در منابع مرجع
Figure 2. Allele range comparison between Baluchi sheep and source references

مقادیر هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_0) و موردانتظار (H_e) در هر جایگاه به عنوان معیاری از تنوع درون جمعیتی به همراه میانگین و انحراف معیار آن محاسبه گردید (جدول ۲). هتروزایگوسیتی بالای جایگاههای مورد مطالعه در جمعیت گوسفند بلوچی حاکی از حفظ تنوع بالای درون جمعیتی علی رغم کارهای اصلاح نژادی صورت گرفته بر روی این گله است.

در یک تحقیق Davies و همکاران برای جایگاه KD101 هتروزایگوسیتی ۰/۸۶ با ۱۱ آلل را گزارش کردند که در این مطالعه که بر روی گوسفند بلوچی انجام گرفته، این جایگاه ($H_0=0/98$) و ($H_e=0/79$) با ۹ آلل را نشان داد و به طور کلی در کلیه جایگاهها، تعداد آلل و مقدار هتروزایگوسیتی به دست آمده در بین این دو مطالعه متفاوت بود (۲۳).

محدوده باندى مشاهده شده در جایگاههای مورد مطالعه با محدوده باندى گزارش شده در مقالات مرجع مقایسه شده و تفاوت هایی را نشان می دهد. (نمودار ۱) محدوده باندى مشاهده شده در کلیه جایگاهها بزرگ تر است که این به معنای بزرگ تر بودن اندازه آلل های جایگاههای مورد مطالعه در جمعیت گوسفند بلوچی نسبت به نژادهای خارجی است و این نکته می تواند تفاوت ساختاری را در بین این نژادها نشان دهد که نیازمند تحقیق و بررسی بیشتری است.

در مطالعه دیگری بر روی گوسفند برای جایگاه McMA1 تعداد ۱۲ آلل با دامنه (۱۲۴-۱۴۶ bp) گزارش شده، در حالی که در مطالعه حاضر برای این جایگاه تعداد ۸ آلل با محدود (۱۶۸ - ۱۴۰) که تعداد ۶ آلل آن جدید بود مشاهده گردید (۲۲).

جدول ۲- تعداد آل‌های واقعی و مؤثر، هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، PIC و شاخص شانون در گوسفند بلوچی
 Table 2. Number of real and effective alleles, observed and expected heterozygosity, Polymorphism Information Content (PIC) and Shannon index of Baluchi sheep

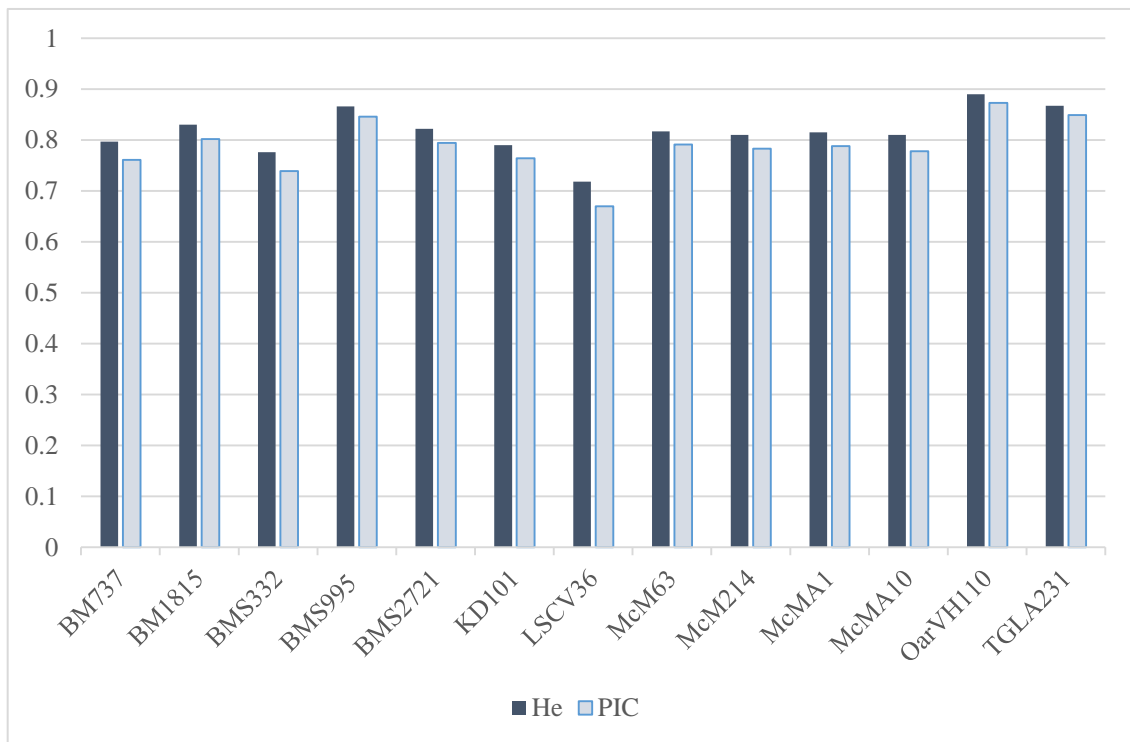
| نام جایگاه | تعداد آل | | هتروزایگوسیتی | | PIC | شاخص اطلاعات Shannon |
|--------------|----------|----------------|----------------|----------------|-------|----------------------|
| | n | n _e | H _o | H _e | | |
| BM737 | ۶ | ۴/۸۳ | ۰/۹۸۸ | ۰/۷۹۷ | ۰/۷۶۱ | ۱/۶۵ |
| BM1815 | ۹ | ۵/۷۳ | ۰/۹۸۸ | ۰/۸۳۰ | ۰/۸۰۲ | ۱/۸۶ |
| BMS332 | ۶ | ۴/۳۹ | ۰/۶۵۶ | ۰/۷۷۶ | ۰/۷۳۹ | ۱/۶ |
| BMS995 | ۹ | ۷/۲۳ | ۰/۶۵۵ | ۰/۸۶۶ | ۰/۸۴۶ | ۲/۰۷ |
| BMS2721 | ۹ | ۵/۵ | ۰/۸۸۹ | ۰/۸۲۲ | ۰/۷۹۴ | ۱/۸۴ |
| KD101 | ۹ | ۴/۷۱ | ۰/۹۸۵ | ۰/۷۹۰ | ۰/۷۶۴ | ۱/۸۳ |
| LSCV36 | ۷ | ۳/۵۱ | ۰/۹۷۰ | ۰/۷۱۸ | ۰/۶۷۰ | ۱/۴۷ |
| McM63 | ۱۲ | ۵/۳۵ | ۰/۸۷۳ | ۰/۸۱۷ | ۰/۷۹۱ | ۱/۹۸ |
| McM214 | ۸ | ۵/۱۸ | ۰/۹۰۲ | ۰/۸۱۰ | ۰/۷۸۳ | ۱/۸۳ |
| McMA1 | ۸ | ۵/۳۱ | ۰/۸۳۶ | ۰/۸۱۵ | ۰/۷۸۸ | ۱/۸۱ |
| McMA10 | ۶ | ۵/۱۷ | ۰/۹۸۲ | ۰/۸۱۰ | ۰/۷۷۸ | ۱/۷ |
| OarVH110 | ۱۰ | ۸/۶۶ | ۱/۰۰ | ۰/۸۹۰ | ۰/۸۷۳ | ۲/۲۱ |
| TGLA231 | ۱۰ | ۷/۳۵ | ۰/۹۶۰ | ۰/۸۶۷ | ۰/۸۴۹ | ۲/۱ |
| میانگین | ۸/۳۸ | ۵/۶۱ | ۰/۹۰ | ۰/۸۱۶ | ۰/۷۸۷ | ۱/۸۴ |
| انحراف معیار | ۱/۸۰ | ۱/۳۸ | ۰/۱۲۰ | ۰/۰۴۳ | | ۰/۲۱ |

تعداد آل‌های واقعی (n)، آل‌های مؤثر (n_e)، هتروزایگوسیتی مشاهده شده (H_o)، هتروزایگوسیتی مورد انتظار (H_e)

در پژوهشی بر روی گوسفند مریوس برای جایگاه‌های KD101، McMA10، McMA1 و OarVH110 به ترتیب مقادیر PIC را ۰/۹۰، ۰/۸۷ و ۰/۸۳ گزارش شد که از مقادیر به دست آمده در این مطالعه که به ترتیب ۰/۷۷، ۰/۷۸ و ۰/۷۶ می‌باشند بالاتر بود (۲۲، ۲۳).

در یک پژوهش بر روی سه گله گوسفند مریوس در استرالیا، از نشانگر McMA10 برای یافتن یک پانل مارکری برای انجام آزمون‌های تعیین هویت و شجره استفاده شد. محدوده آللی این جایگاه (۱۱۸ - ۱۰۴ bp) و مقدار PIC در سه گله ۰/۷۸، ۰/۷۴ و ۰/۶۴ گزارش گردید. در این تحقیق مقادیر بالایی از تعداد آل و هتروزایگوسیتی برای این جایگاه به دست آمد که نشان می‌دهد، این جایگاه برای انجام آزمون‌های تعیین والدین مناسب است (۲۴).

محتوای اطلاعاتی پلی مورفیک PIC به عنوان یکی دیگر از معیارهای تعیین کننده تنوع ژنتیکی با استفاده از فراوانی آللی برای هر جایگاه ریزماهواره به طور جداگانه محاسبه شد (جدول ۲) همان طور که نتایج نشان می‌دهد بیشترین مقدار PIC متعلق به جایگاه OarVH110 (۰/۸۷۳) که خود بیشترین آل را نیز دارا بود است. مقایسه مقادیر PIC و هتروزایگوسیتی در هر جایگاه نشان می‌دهد که جایگاه‌های با هتروزایگوسیتی بالا، PIC بالایی نیز دارند و مقادیر PIC، با توجه به اینکه افراد هتروزایگوتی که همان ژنوتیپ والد خود را به ارث می‌برند در اطلاعات پلی مورفیک وارد نمی‌کند، از مقادیر هتروزایگوسیتی متناظرشان کمتر می‌باشند و هر چه افرادی که ژنوتیپ یابی می‌شوند غیرخویشاوند باشند، تفاوت PIC از هتروزایگوسیتی کمتر می‌شود (نمودار ۲).



نمودار ۲- مقایسه مقادیر PIC و هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای کلیه جایگاه‌های ریزماهواره
Figure 3. Comparison between PIC and expected heterozygosity values in all microsatellites loci

قرار گرفت. در این مطالعه ۱۴۰ نفر شتر آلیاکا با ۶۹ نشانگر ریزماهواره آنالیز شدند. تعداد یازده آلل از چهارده آلل مشاهده در جایگاه‌های LCA68 (۲۰۵-۲۰۳-۲۰۱-۱۹۹-۱۹۷) و (۱۸۹)، VOLP59 (۱۱۲ و ۱۱۰) و LCA90 (۲۴۳-۲۲۹ و ۲۲۷) ارتباط و اثر مثبت (کاهش قطر الیاف) نشان دادند. همچنین، فقط سه آلل در جایگاه‌های LCA68 (۱۹۵) و LCA90 (۲۳۱-۲۴۹) اثر منفی (افزایش قطر الیاف) را نشان دادند (۲۵). لذا در صورتی که سیستم پرورش گوسفند در ایران صنعتی شده و رکوردهای صفات اقتصادی مربوط به افزایش وزن، کیفیت لاشه، تولید شیر و ضخامت الیاف ثبت شود، با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره می‌توان نسبت به تعیین ارزش ژنتیکی هر دام اقدام نمود و برنامه‌های اصلاح نژادی و تلاقی‌گری مناسبی را داخل و بین نژادهای بومی کشور در راستای ارتقاء عملکرد نژادهای بومی کشور تدوین نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام گرفته و بدین وسیله از کلیه اعضا هیئت علمی و کارکنان این موسسه و همچنین از اساتید گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران که هر کدام به نحوی در انجام این تحقیق یاری نمودند، قدردانی به عمل می‌آید.

شاخص اطلاعات شانون به عنوان آخرین معیار جهت برآورد سطح تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه مقادیر هتروزیگوسیتی برای هر تعداد آلل حد نهائی یک را دارا است. به کمک این معیار که شامل مقادیر بالاتر از یک و دو هم می‌شود و حداکثر آن برابر $\ln(n)$ است می‌توان مقایسه بهتری بین جایگاه‌هایی که دارای هتروزیگوسیتی ۰/۸ یا بالاتر هستند انجام داد. مقادیری که برای شاخص اطلاعات شانون به دست آمد، تفاوت جایگاه‌های با هتروزیگوسیتی بالا را به خوبی نشان داد.

نتایج جمعیت بیانگر این مطلب است که، جایگاه‌های ریزماهواره مورد استفاده از چندشکلی بالایی در جمعیت گوسفند بلوچی برخوردار هستند و می‌توان از چندشکلی بالای آنها در مطالعات بعدی، به ویژه برای یافتن جایگاه‌های صفات کمی استفاده نمود.

همچنین وجود آلل‌ها و دامنه آللی جدید در گوسفند بلوچی و سایر نژادهای گوسفند ایرانی (۸، ۹)، حاکی از تفاوت ساختار ژنتیکی جمعیتی آنها در مقایسه با نژادهای خارجی است. نتایج هتروزیگوسیتی جایگاه‌های مورد مطالعه در جمعیت گوسفند بلوچی، نشان داد که این جمعیت علیرغم به‌گزینی‌های انجام شده برای صفات مختلف، همچنان از تنوع بالایی برای جایگاه‌های ریزماهواره برخوردار است.

در مطالعه‌ای ارتباط نشانگرهای ریزماهواره با صفت ضخامت الیاف پشم شتر آلیاکا (ویکوگنا پاکوس) مورد بررسی

منابع

1. Ruane, J. 1999. A critical review of the value of genetic distance studies in conservation of animal genetic resources. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 116(5): 317-323.
2. Amanlo, H. 2000. Genetic and Animal Breeding. Iran: Zanjan University.
3. Dodgson, J.B., H.H. Cheng and R. Okimoto. 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science*, 76(8): 1108-1114.
4. Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6): p. 365-371.
5. Amoli, A.D., M. Aminafshar, S.A.S. Fazeli, N.E.J. Kashan and K.J. Khaledi. 2017. Isolation and characterization of Microsatellite markers from Endangered Species *Camelus bactrianus*. *Iranian Journal of Applied Animal Science (IJAS)*, 7(4): 693-698.
6. Arranz, J., Y. Bayon and F. San Primitivo. 2001. Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. *Small Ruminant Research*, 39(1): 3-10.
7. Tomasco, I., G. Wlasiuk and E. Lessa. 2002. Evaluation of polymorphism in ten microsatellite loci in Uruguayan sheep flocks. *Genetics and Molecular Biology*, 25(1): 37-41.
8. Banabazi, M.H., S. Esmaeilkhanian, S.M. Ashtiani and M.M. Shahrababak. 2007. Genetic Variation Within and Between Five Iranian Sheep Populations Using Microsatellite Markers. *JWSS- Isfahan University of Technology*, 10(4): 481-488.
9. Dashab, G.R., A. Aslaminejad, M.R. Nasirri, A. Esmailzadeh and D.A. Saghi. 2011. Analysis of genetic diversity and structure of Baluchi Sheep by microsatellite markers. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(3).
10. Gholizadeh, M. and M. Najafi. 2017. Association of genetic variation in exon 1 and 3 of FSHB gene with litter size in Baluchi Sheep. *rap*, 8(16): 177-182.
11. Hosseinzadeh, S. and S.A. Rafat. 2017. Investigation of Relationship between DRB2 Gene Polymorphism and egg number of *Marshallagia Marshalli* Parasites in Gastrointestinal of Ghezel Sheep Breed. *Research on Animal Production*, 8(16): 152-157.
12. Miller, S., D. Dykes and H. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16(3): 1215.
13. Hulme, D., A. Smith, J. Silk, J. Redwin and K. Beh. 1995. Polymorphic sheep microsatellites at the McM2, McM131, McM135, McM136, McM140, McM200, McM214, McM373, McM505, McM507 and McM512 loci. *Animal genetics*, 26(5): 369a-370.
14. Ott, J. 1989. Program HET Version 1.10. Utility programs for analysis of genetic linkage. Rockefeller University, New York, USA, 20.
15. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3): 583-590.
16. Georges, M. and J.M. Massey. 1992. Polymorphic DNA markers in Bovidae. World Intellectual Property Organization.
17. Esmaeilkhanian, S. and R.V. Torshizi. 2007. Microsatellite variation in one breed of Iranian sheep with 12 markers. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 10(24): 4455-4460.
18. Nanekarani, S., C. Amirinia, N. Amirmozafari, R.V. Torshizi and A.A. Gharahdaghi. 2010. Genetic variation among pelt sheep population using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, 9(44): 7437-7445.
19. Bishop, M.D., S.M. Kappes, J.W. Keele, R.T. Stone, S. Sunden, G.A. Hawkins, S.S. Toldo, R. Fries, M.D. Grosz, and J. Yoo. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136(2): 619-639.
20. Stone, R., J. Pulido, G. Duyk, S. Kappes, J. Keele and C.W. Beattie. 1995. A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mammalian Genome*, 6(10): p. 714-724.
21. Poissant, J., A. Shafer, C. Davis, J. Mainguy, J. Hogg, S. Coté and D. Coltman. 2009. Genome-wide cross-amplification of domestic sheep microsatellites in bighorn sheep and mountain goats. *Molecular Ecology Resources*, 9(4): 1121-1126.
22. Maddox, J., C. Riffkin and K. Beh. 2000. Dinucleotide repeat polymorphism at the ovine McMA1, McMA2, McMA5, McMA8, McMA9, McMA11, McMA14, McMA20, McMA24, McMA26 loci. *Animal genetics*, 31(2): 148-148.
23. Davies, K. and J. Maddox. 1997. Genetic linkage mapping of three anonymous ovine EST microsatellites: KD101, KD103 and KD721. *Animal genetics*, 28(6): 455-456.
24. Al-Atiyat, R.M. 2015. The power of 28 microsatellite markers for parentage testing in sheep. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(2): 116-121.
25. Paredes, M., A. Membrillo, J. Gutiérrez, I. Cervantes, P. Azor, R. Morante, A. Alonso-Moraga, A. Molina, and A. Muñoz-Serrano. 2014. Association of microsatellite markers with fiber diameter trait in Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*). *Livestock Science*, 161: 6-16.

Investigation of Polymorphism of Some Microsatellite Markers in Baluchi Sheep Population

Abdolreza Daneshvar Amoli¹, Saied Esmaelkhanian², Mohammad Reza Sanjabi³ and Seyed Ahmad Mirhadi²

1- Ph.D. Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Animal Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

3- Assistant Professor, Department of Animal, Poultry & Aquatic Sciences, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

Received: October 25, 2016 Accepted: June 2, 2019

Abstract

Due to the importance of conservation and preserving indigenous breeds, Baluchi sheep as the most populous breed of Iranian sheep with reliable pedigree was selected. In this study genetic variations were analyzed with 15 microsatellites markers (BM737, BM1815, BMS332, BMS995, BMS2721, KD101, LSCV36, LSCV38, McM63, McM139, McM214, McMA1, McMA10, OarVH110, TGLA231) in a population of Baluchi sheep. Whole blood samples were randomly collected from 140 sheep at Abbas Abad Breeding Station (Mashhad). After PCR reactions, McM139 locus wasn't amplified and LSCV38 locus was ignored for many null Alleles. Thirteen microsatellites loci were %100 polymorphic. Number of alleles, observed and expected heterozygosity, polymorphic information content (PIC) and Shannon index were calculated. Highest and lowest allele numbers was observed in OarVH110 locus with 12 alleles and 6 alleles in BM737, BMS332, McMA10, respectively. Effective number of allele was between 3.51 (LSCV36) to 8.66 (OarVH110). The highest and the lowest heterozygosity belonged to 0.89 (OarVH110) and 0.71 (LSCV36), respectively. OarVH110 locus indicated the highest PIC (0.873) and LSCV36 locus indicated the lowest PIC (0.669). The highest and lowest Shannon index were belonged to 2.21 (OarVH110) and 0.66 (LSCV36), respectively. These results verify high efficiency of microsatellites marker for screening of population's structure in Iranian native sheep and in future study for QTL mapping. So, presence of new alleles and allele range indicates difference between Baluchi sheep population structure with foreign Sheep breeds.

Keywords: Baluchi Sheep, Genetic Variation, Microsatellite Marker