



بررسی تنوع ژنتیکی پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای

محمدتقی واجد ابراهیمی^{۱*}، محمدرضا محمدآبادی^۲، علی اسماعیلی زاده^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام گروه علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

^۲ دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

^۳ استاد گروه علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۰۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۰۱

چکیده

نژادهای بومی در هر کشور به عنوان یک سرمایه ملی و محصولی استراتژیک در اقتصاد و رونق آن کشور محسوب می شوند که حفظ و نگهداری این نژادها بسیار ارزشمند است. با توجه به اهمیت حفظ تنوع در نژادهای بومی و شناسایی ذخایر ژنتیکی، پنج جمعیت از نژادهای گوسفند ایرانی (عربی، آرمان، دلاق، قره گل و لری) با استفاده از ۴ نشانگر ریزماهورهای (McMA26، McMA2، OarHH35 و BM6444) از نظر تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. از تعداد ۲۲۵ نمونه خون DNA ژنومی به روش استخراج نمکی بهینه شده، به دست آمد. واکنش های PCR به خوبی انجام شد. نتایج نشان داد که تمامی جایگاه ها کاملاً چندشکل بودند. آزمون تعادل هاردی-وینبرگ به روش آزمون مربع کای نشان داد که برخی ترکیبات مختلف جایگاه ها-جمعیت در حالت عدم تعادل قرار داشتند ($P < 0.05$). بیشترین تعداد آلل مشاهده شده در جایگاه های McMA26، McMA2 و OarHH35 به ترتیب مربوط به جمعیت های دلاق، عربی، لری و قره-گل (۱۲ آلل) و کمترین تعداد از آن جایگاه OarHH35 در جمعیت دلاق بود. حداکثر هتروزیگوسیتی مورد انتظار در حالت ترکیب جمعیت-جایگاه برای جایگاه های McMA26، McMA2، OarHH35، BM6444 به ترتیب ۰/۸۸۵، ۰/۹، ۰/۸۸ و ۰/۸۷ بودند. در مجموع می توان نتیجه گرفت که جمعیت های گوسفند مورد بررسی در این پژوهش با توجه به جایگاه های مورد مطالعه، از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی برخوردارند. واژه های کلیدی: گوسفند، نشانگرهای ریزماهورهای، تنوع ژنتیکی، چندشکلی.

سال‌های اخیر جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و حیوانات حفاظت‌شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است. میزان چندشکلی به‌دست‌آمده از این نشانگرهای ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Davis et al., 2002). در این میان، ریزماهوره‌ها به سبب برتری‌هایی که دارند، برای مطالعات ژنتیک جمعیت نسبت به سایر نشانگرها ارجح هستند. انجمن بین‌المللی ژنتیک حیوانی ۱ ریزماهوره‌ها را به عنوان بهترین نشانگر جهت تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌های حیوانی معرفی کرده است (Mohammadifar and Mohammadabadi, 2011). بر اساس بررسی‌های ثبت شده توسط FAO، ۶۶ درصد کل مطالعات تعیین فاصله ژنتیکی با استفاده از ریزماهوره‌ها انجام گرفته است و ۷۰ درصد پژوهشگران ریزماهوره‌ها را انتخاب کرده‌اند (Mohammadifar and Mohammadabadi, 2011).

در مطالعه‌ای (Esmail-Khanian et al., 2007) تنوع ژنتیکی ۱۵۶ رأس گوسفند بلوچی ایران را با استفاده از ۱۹ جایگاه ریزماهوره‌ای بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که بر اساس آزمون تعادل هاردی-وینبرگ این جمعیت در بیشتر

نژادهای بومی در هر کشور به‌عنوان یک سرمایه ملی و محصولی استراتژیک در اقتصاد و رونق آن کشور محسوب می‌شوند و نیز به دلیل شدت انتخاب پایین، تعداد زیاد پرورش‌دهندگان و محدودیت استفاده از تلقیح مصنوعی، معمولاً از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند. از طرفی باگذشت زمان و کسب آگاهی بیشتر نسبت به اهمیت صفات مختلف، نیازهای جدیدی مطرح می‌شود که متخصصین اصلاح نژاد را بر آن می‌دارد که از ذخیره ژنی دام‌های بومی استفاده نمایند. این مسئله، بخصوص با افزایش تولید محصولات دامی و تولید محصولات پیش‌بینی‌نشده در آینده، لزوم حفظ تنوع ژنتیکی در دام‌های بومی را الزامی ساخته است (Frankham, 1994) چرا که یک گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی قادر به سازگاری با تغییرات محیطی و مبارزه با انگل‌ها نیست (Askari et al., 2011). در ایران بیش از ۵۰ میلیون رأس گوسفند، شامل ۲۷ نژاد و اکوتیپ وجود دارد (Zamani et al., 2013) که باید تنوع ژنتیکی آنها محاسبه شده و سپس در حفظ این نژادهای بومی تلاش شود. حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Shojaei et al., 2010). استفاده از نشانگرهای مولکولی در

OarHH55، OarHH35 و BM1329 به ترتیب (۰/۹۳۳۳ و ۱/۷۶۶۱)، (۰/۹۶ و ۲/۰۷۸۶) و (۰/۹۱ و ۱/۵۶۹۸) بود و نتایج به دست آمده نشان داد که هر سه جایگاه مورد مطالعه از حالت تعادل هاردی-وینبرگ انحراف داشتند.

برای مطالعه ۱۲۰ گوسفند زندی Nanekarani et al (2010) از ۱۵ نشانگر ریزماهورای استفاده کردند. آنها بیان داشتند که همه جایگاه‌های مورد مطالعه چندشکل بودند و به خاطر فزونی هتروزیگوت‌ها در همه جایگاه‌ها انحراف از تعادل مشاهده شد ($P < 0/01$). میانگین محتوای چندشکلی در جمعیت به ازای تمام جایگاه‌ها، برابر ۰/۸۰۸ بود که نشان دهنده تغییرپذیری بسیار بالا در جمعیت مورد مطالعه بود. نتایج پارامترهای تنوع در این مطالعه نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در نژاد زندی وجود دارد. در مطالعه‌ای به منظور بررسی مقدار کارایی و سودمندی نشانگرهای ریزماهورای ویژه کروموزوم Y گاوی در تعیین تنوع ژنتیکی در گوسفند، وضعیت تکثیر ۱۷ نشانگر ریزماهورای ویژه کروموزوم Y گاوی در گوسفند کرمانی مورد بررسی قرار گرفت (Mohammadifar and Mohammadabadi, 2011). در مجموع ۱۰۲ آلل در این جایگاه‌ها شناسایی شدند که بیشترین و کمترین باندهای مشاهده شده به ترتیب ۱۶ و ۵ باند بود. نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان از ریزماهورای ویژه کروموزوم Y گاوی به منظور

جایگاه‌ها انحراف معنی داری از حالت تعادل نشان داد ($P < 0/05$). دامنه هتروزیگوسیتی برای این جایگاه‌ها بین ۰/۱ تا ۰/۹۳ متفاوت بود. در مجموع آنها نشان دادند که بیشتر جایگاه‌های مورد مطالعه دارای چندشکلی بوده و می‌توان از آنها برای مطالعات بعدی استفاده کرد. در پژوهشی دیگر Banabazi et al (2007) تنوع ژنتیکی درون و بین پنج جمعیت گوسفند ایرانی (سنجابی، کردی کردستان، کردی خراسان، مهربان و مغانی) را با استفاده از شش جفت آغازگر ریزماهورای بررسی کردند و نشان دادند که تمامی جایگاه‌ها چندشکل بودند، تمامی جمعیت‌های مورد مطالعه در جایگاه‌های ریزماهورای مورد بررسی، در تعادل هاردی-وینبرگ بوده و بیشترین و کمترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در همه جایگاه‌ها برآورد گردید که به ترتیب مربوط به جمعیت مهربان (۰/۸۴۷) و کردی خراسان (۰/۷۴۴) بود.

میزان چندشکلی برخی از نشانگرهای ریزماهورای پیوسته به ژن دوقلوژی FecB را Mohammad and Saberivand (2007) در گوسفندان قزل بررسی کردند. آنها میزان چندشکلی ۳ جفت پرایمر ریزماهورای متصل به ژن چندقلوژی FecB در ۳۰۰ گوسفند نژاد قزل را مطالعه کردند. جایگاه OarHH55 و OarHH35 به ترتیب با ۶ و ۹ آلل کمترین و بیشترین آلل را تولید کردند. میزان هتروزیگوسیتی و میزان شاخص شانون برای جفت پرایمرهای

مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۵۷۴۹ و ۰/۶۸۹۶ بود. میانگین تمایز ژنتیکی برای هم‌خونی در بین و داخل جمعیت‌ها و همچنین میانگین تمایز ژنتیکی جمعیت گوسفندان به ترتیب ۰/۱۰۰۶، ۰/۱۶۴۷ و ۰/۰۷۱۲ بود. بر اساس نتایج این پژوهش، جمعیت گوسفندهای اندونزی به یک برنامه حفاظت ژنتیکی و اصلاحی نیاز دارند. با توجه به این که نژادهای عربی (۴۷ رأس)، آرمان (۴۶ رأس)، دالاق (۴۴ رأس)، قره‌گل (۴۳ رأس) و لری (۴۵ رأس) ایران تاکنون با نشانگرهای ریزماهورای مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند، لذا هدف تحقیق حاضر مطالعه تنوع درون و بین جمعیتی موجود در این پنج نژاد گوسفند ایرانی به کمک ۴ جایگاه ریزماهورای بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از ۲۲۵ گوسفند شامل نژادهای عربی (۴۷ رأس)، آرمان (۴۶ رأس)، دالاق (۴۴ رأس)، قره‌گل (۴۳ رأس) و لری (۴۵ رأس) از مراکز اصلاح نژاد و جهاد کشاورزی نقاط مختلف کشور، نمونه‌های خون کامل از سیاهرگ و داج و با استفاده از لوله CBC/5ml حاوی محلول ضد انعقاد K2/K3 EDTA جمع‌آوری و تهیه گردید. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل به روش بهینه شده و تغییر یافته استخراج نمکی (Abadi et al., 2009)

بررسی تنوع ژنتیکی، فراوانی ژنی، هتروزیگوسیتی و فاصله ژنتیکی در گوسفندان استفاده کرد. در پژوهشی Tomasco et al. (2002) چندشکلی ۱۰ جایگاه ریزماهورای در گله‌های گوسفند اروگوئه را مورد ارزیابی قرار دادند. در این بررسی جایگاه‌ها چندشکلی بالایی نشان دادند و تعداد آلل گزارش شده برای این ۱۰ جایگاه ۷ تا ۱۵ آلل و شاخص PIC بین ۰/۶۳ و ۰/۸۷ متغیر بود. نتایج نشان داد که این سری جایگاه‌ها برای آزمون ارتباطات ژنتیکی مؤثر می‌باشند. در مطالعه دیگری میزان تنوع ژنتیکی نژاد گوسفند نجدی ۱ عربستان با ۱۹ نشانگر ریزماهورای اندازه‌گیری شد و در مجموع ۱۷۳ آلل مشاهده گردید. به‌طور متوسط هتروزیگوسیتی قابل مشاهده، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص شانون به ترتیب ۰/۶۷، ۰/۷۱ و ۱/۶۹ به دست آمد و نتایج نشان داد که این نژاد از تنوع ژنتیکی مناسبی برخوردار است و از لحاظ هم‌خونی در خطر نیست و می‌توان از تنوع ژنتیکی درون این نژاد برای پیشرفت روند ژنتیکی استفاده کرد (Musthafa Muneeb et al., 2012). در مطالعه‌ای دیگر (Jakaria et al., 2012) با استفاده از ۱۸ جایگاه ریزماهورای تنوع ژنتیکی جمعیت گوسفندهای اندونزی را بررسی کردند. در این پژوهش ۱۸۰ آلل از ۱۷ جایگاه شناسایی شدند. متوسط هتروزیگوسیتی

¹ Najdi

معیارهای چندشکلی از جمله تعداد آلل مشاهده شده و مؤثر با استفاده از نرم‌افزار PopGene (Yeh et al., 1999) انجام شد. محتوای اطلاعات چندشکلی هریک از جایگاه‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel و فرمول $PIC = \frac{N(1 - \sum P_i^2)}{N-1}$ (به دست آمدند) Buchanan and Thue., (1998).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد نشان داد که کیفیت DNA های استخراج‌شده با استفاده از روش نمکی بهینه‌شده بسیار مناسب و تقریباً تمامی باندهای نمونه‌ها شفاف و بدون کشیدگی بودند (شکل ۱).

واکنش‌های PCR با چهار جفت آغازگر انجام گردید، تمامی جایگاه‌های مورد مطالعه طبق برنامه‌های دمایی به‌دست‌آمده برای آن جایگاه، تکثیر شدند و به‌منظور تائید تکثیر قطعات موردنظر، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۲). پس از تائید تکثیر قطعات موردنظر، الکتروفورز روی ژل آکريل‌آمید محصولات PCR انجام گرفت و سپس ژل‌های آکريل‌آمید رنگ‌آمیزی شدند. شکل ۳ نمونه‌ای از الگوهای باندهای به‌دست‌آمده را برای جایگاه BM6444 در جمعیت عربی نشان می‌دهد.

انجام گردید که برای تجزیه سلول‌های قرمز از بافر شستشو و نیز برای تجزیه اسیدهای نوکلئیک از بافر لایسیز، استفاده گردید. مشخصات جایگاه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. واکنش‌های PCR با استفاده از ۴ جفت آغازگر ریزماهورای OarHH35, McMA26, McMA2 و BM6444 (در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر) انجام شد (جدول ۲). در این پژوهش از دستگاه ترموسایکلر peqSTAR 96X ساخت آلمان، با بلوک ۹۶ تایی برای تیوب‌های PCR به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر، استفاده شد. برنامه دمایی برای آغازگرها مورد مطالعه به‌صورت واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها با توجه به دمای اتصال بهینه‌شده برای هر جایگاه و به مدت ۴۵ ثانیه، بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سرانجام بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بهینه شد. فرآورده‌های PCR به‌دست‌آمده روی ژل پلی‌آکريل‌آمید ۸ درصد الکتروفورز گردید و نمایان‌سازی آلل‌ها به روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام شد (Promega, 1993). آزمون نسبت درست نمایی برای تعادل هاردی-وینبرگ ($P < 0/05$) در هریک از جایگاه‌ها، همچنین تنوع درون جمعیت به‌صورت متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار و

جدول ۱- مشخصات جایگاه‌های انتخاب شده برای تحقیق حاضر.

Table 1- Characteristics of selected microsatellites in present study.

نام جایگاه و موقعیت کروموزومی*	آغازگرها (5'-3') Primers	شماره دسترسی ^۱ ** Accession Numbers	منبع Reference
McMA2 (13)	TCA CCC AAC AAT CAT GAA AC TTA AAT CGA GTG TGA ATG GG	AF098773	Maddox <i>et al.</i> (2000)
McMA26 (18)	TCT CTG CTT TCC AGC CTT ATT C AGA GCT TTT AGG ACA GCC ACC	AF098961	Maddox <i>et al.</i> (2000)
OarHH35 (4)	AAT TGC ATT CAG TAT CTT TAA ACA TCT GGC/ ATG AAA ATA TAA AGA GAA TGA ACC ACA CGG	L12554	Henry <i>et al.</i> (1993)
BM6444 (2)	CTC TGG GTA CAA CAC TGA GTC C TAG AGA GTT TCC CTG TCC ATC C	G18444	Buchanan <i>et al.</i> (1994)

* اعداد داخل پرانتز شماره کروموزومی است که ریزماهوره مربوطه بر روی آن واقع شده است.

** این شماره‌ها کُد دسترسی به هر یک از این ریزماهوره‌ها در بانک ژن NCBI با آدرس اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/viewer.cgi> است.

* The numbers in parenthesis is chromosomes of marker that is located on it.

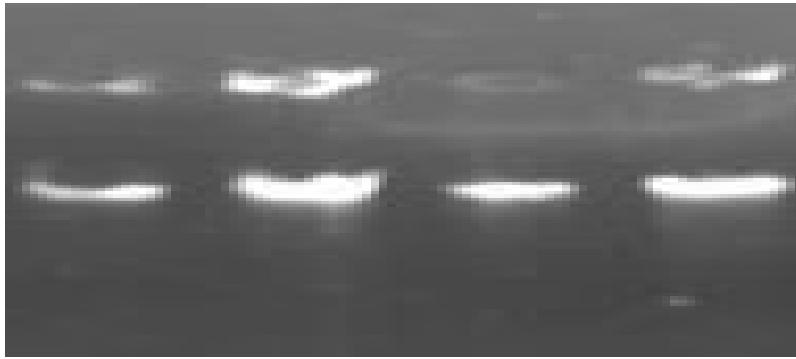
** The accession number of the markers in the NCBI and the URL is <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/viewer.cgi>.

جدول ۲- غلظت اجزاء مختلف PCR.

Table 2- The concentration of PCR components.

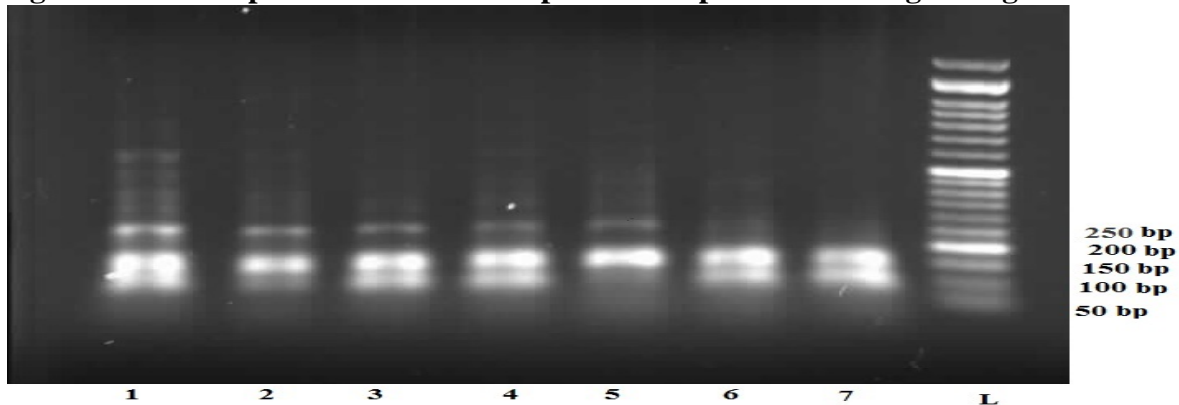
غلظت استوک Stoke concentration	حجم مورد استفاده در واکنش (میکرولیترا) volume reaction (ml)	اجزاء واکنش Components
50-100 ng / μ l	2	DNA
—	متغیر (changeable)	H ₂ O
10X	2.5	بافر (Buffer)
10 mM	0.5	dNTPs
1.5 Mm	1	MgCl ₂
10 pM	1	Primer Forward
10 pM	1	Primer Reverse
5 Unit/ μ l	0.3	TaqDNA Polymerase
—	25	حجم نهائی واکنش (Total)

¹ Accession Number



شکل ۱- الکتروفورز چند نمونه DNA استخراج شده گوسفند روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.

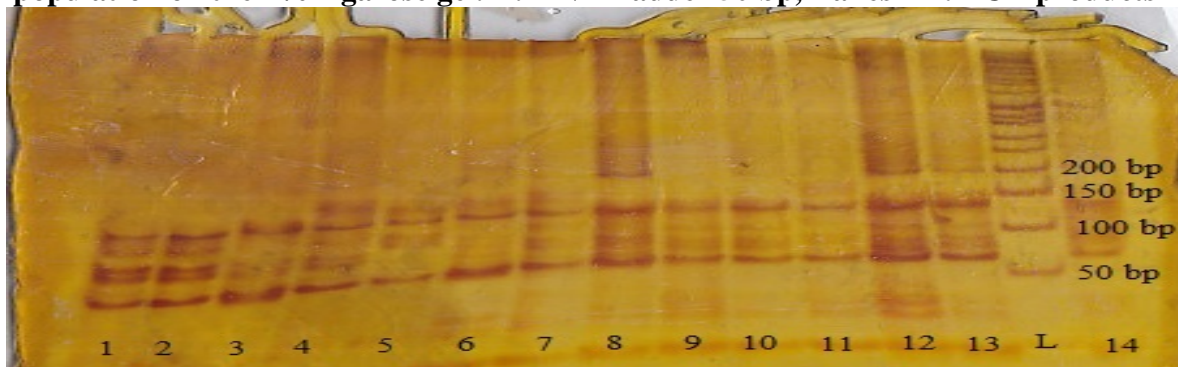
Figure 1- Electrophoresis of some sheep DNA samples on 0.8% Agarose gel.



شکل ۲- نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات PCR جایگاه OarHH35 در جمعیت آرمان روی ژل آگارز ۱٪. L:

DNA Ladder 50 bp. ۱-۷: محصولات PCR

Figure 2- A sample of electrophoresis of OarHH35 locus PCR products in Arman population on the 1% Agarose gel. L: DNA Ladder 50 bp, Lanes 1-7: PCR products



شکل ۳- نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات PCR جایگاه BM6444 در جمعیت عربی روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪.

L: DNA Ladder 50 bp. ۱-۱۴: محصولات PCR

Figure 3- A sample of electrophoresis of BM6444 locus PCR products in Arabi population on the 8% Polyacrylamide gel. L: DNA Ladder 50 bp, Lanes 1-14: PCR products.

جدول ۳- تعداد آلل واقعی (Na)، تعداد آلل مؤثر (Ne) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) برای ترکیبات مختلف جایگاه-جمعیت و برای هر جمعیت.

Table 3- The number of actual alleles (Na), effective alleles (Ne) and expected heterozygosity (He) for different combinations of locus-population and for each population.

OarHH35		McMA26			BM6444			McMA2			جایگاه (Marker) جمعیت (Population)	
He	Ne	Na	He	Ne	Na	He	Ne	Na	He	Ne		Na
0.85	7	9	0.9	10.3	12	0.87	7.7	11	0.88	8.2	11	عربی (Arabi)
0.86	7.1	9	0.87	7.9	11	0.86	7.1	9	0.875	7.88	10	آرمان (Arman)
0.83	5.9	8	0.87	7.7	11	0.87	8.01	10	0.885	8.56	12	دالاق (Dalagh)
0.88	8.6	12	0.87	8.04	11	0.86	7.29	10	0.87	7.73	11	قره گل (Karakul)
0.85	7.19	9	0.88	8.42	12	0.86	7.14	9	0.86	7.27	10	لری (Lory)

جدول ۴- معیار شاخص Shannon (H') و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای ترکیبات مختلف جایگاه-جمعیت و برای هر جمعیت.

Table 4- Shannon index (H') and polymorphism information content (PIC) for different combinations of locus-population and for each population.

OarHH35		McMA26		BM6444		McMA2		جایگاه (Marker) جمعیت (Population)
PIC	I	PIC	I	PIC	I	PIC	I*	
0.87	2.065	0.9	2.396	0.88	2.23	0.88	2.266	عربی (Arabi)
0.86	2.07	0.87	2.242	0.86	2.074	0.87	2.18	آرمان (Arman)
0.83	1.926	0.87	2.198	0.87	2.184	0.88	2.311	دالاق (Dalagh)
0.88	2.316	0.87	2.225	0.86	2.142	0.87	2.22	قره گل (Karakul)
0.85	2.05	0.88	2.30	0.86	2.075	0.86	2.137	لری (Lory)

* شاخص اطلاعات شانون (Shannon and Weaver., 1949)

Arora (2007) و Crispim et al. (2014) که روی گوسفندان دیگر انجام گردیده است نیز گزارش شده است. تنها Buchanan et al. (1994) هیچ انحرافی از تعادل هاردی-واینبرگ را گزارش نکردند. به طور کلی انحراف از تعادل را می توان به علت وجود آمیزش های خویشاوندی در بین گونه ها، نزدیک هم بودن تعداد محدودی از آلل ها، ناکافی بودن تعداد نمونه ها و خطای نمونه برداری دانست (Chauhan et al., 2007).

مقایسه تعداد، نوع و دامنه اندازه آلل های حاصل از مطالعه حاضر تفاوت ها و شباهت هایی با مطالعات Sun et al. (2010)، Mohammadifar and Mohammadabadi (2011)، Bhatia and Arora (2007)، Crispim et al. (2014)، Nanekarani et al. (2010) و Esmail-Khanian et al. (2007) دارد که این شباهت ها و تفاوت ها را نمی توان با دلایل خاصی تفسیر نمود زیرا محیط، مواد و روش های استفاده شده در این مطالعه با مطالعات دیگر متفاوت بوده و همچنین نشانگرهای ریزماهواره ای چندشکلی زیادی دارند که این امر نیز طبیعی است. دامنه اندازه آلل ها برای جایگاه های McMA2، McMA26، BM6444 و OarHH35 به ترتیب ۲۰۲-۱۵۵، ۲۱۸-۱۸۴، ۱۷۷-۷۸ و ۱۶۴-۸۷ جفت باز به دست آمد. تعداد واقعی آلل (Na) و تعداد آلل مؤثر (Ne) برای ترکیبات

نتایج حاصل از آزمون نسبت درست نمایی برای جایگاه McMA2 نشان داد که این جایگاه فقط در جمعیت های عربی از حالت تعادل هاردی-واینبرگ انحراف دارد. نتایج حاصل از آزمون مربع کای نیز نشان داد که جمعیت گوسفند آرمان در تمامی جایگاه ها، به جز McMA26 انحراف معنی داری از تعادل هاردی-واینبرگ دارد ($P < 0/05$). علت این انحرافات را می توان احتمالاً ناشی از کوچک بودن اندازه نمونه ها، انتخاب و مهاجرت دانست. هنگامی که در هر جایگاه تمامی جمعیت ها با هم در نظر گرفته شد، با هر دو آزمون نیز انحراف معنی داری از تعادل هاردی-واینبرگ در بیشتر جایگاه ها دیده شد ($P < 0/05$)، علت چنین امری را نیز می توان تکامل غیر هم جهتی دانست که در جمعیت های مختلف برای یک جایگاه خاص در طول زمان در اثر تفاوت های جغرافیایی مناطق پراکنش آنها روی داده است. این امر موجب می گردد جایگاه مورد نظر برای کل جمعیت های ادغام شده از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف داشته باشد. نرخ بالای جهش در ریزماهواره ها و ایجاد آلل های جدید و وجود آلل های نول در برخی از نشانگرها نیز از عوامل مهم انحراف از تعادل است. چنین مشاهداتی در مطالعات Sun et al. (2010)، Mohammadifar (2010)، Nanekarani et al. (2010) and Mohammadabadi Bhatia and (2011)

در پژوهشی Nanekarani et al. (2010) در بررسی تنوع ژنتیکی گوسفندان نژاد زندگی تعداد ۱۱ آلل و Maddox et al. (2000) تعداد ۱۷ آلل را برای این جایگاه گزارش کردند. در بین جایگاه‌های مورد مطالعه، این جایگاه کمترین دامنه آللی را نیز داشت (۳۴bp). در مورد جایگاه BM6444، تعداد آلل مشاهده شده در این جایگاه متفاوت با مطالعات قبلی بود و نیز با داشتن دامنه آللی ۹۹ جفت باز، بیشترین دامنه را در بین جایگاه‌های مورد مطالعه داشت. در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت گوسفند بلوچی Esmail-Khanian et al. (2007) تعداد ۱۵ آلل را برای این جایگاه گزارش کردند که تقریباً مشابه با تعداد آلل مشاهده شده در گزارش حاضر (۱۳ آلل) بود. در بررسی چندشکلی برخی از نشانگرهای ریزماهوره‌ای مرتبط با ژن اینه‌بین در گوسفند سنجابی Solimani et al. (2011) تعداد آلل متفاوتی را (۴ آلل) نسبت به مطالعه حاضر و مشاهدات قبلی گزارش کردند. جایگاه OarHH35 نسبت به مطالعات گذشته تعداد آلل بیشتری مشاهده شد (۱۲ آلل). در مطالعه Mohammadi and Saberivand (2007) روی تعیین چندشکلی برخی از نشانگرهای ریزماهوره‌ای پیوسته به ژن دوقلوزایی FecB در گوسفند قزل، تعداد ۹ آلل را در دامنه آللی ۱۳۰-۱۷۰ گزارش کردند و Solimani et al. (2011) نیز در بررسی چندشکلی برخی از نشانگرهای

مختلف جایگاه-جمعیت، هر جمعیت به ازای تمامی جایگاه‌ها در جدول ۳ خلاصه شده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود. بیشترین تعداد آلل مشاهده شده در جایگاه‌های McMA2، McMA26 و OarHH35 به ترتیب مربوط به جمعیت‌های دلاق، عربی، لری و قره-گل (۱۲ آلل) و کمترین تعداد از آن جایگاه OarHH35 در جمعیت دلاق بود. کمترین تعداد آلل مؤثر مربوط به جایگاه OarHH35 در جمعیت دلاق (۵/۹) و بیشترین مقدار آن مربوط به جایگاه McMA26 در جمعیت عربی (۱۰/۳) بود، در ضمن بدلیل کوچک بودن اندازه نمونه و چند شکلی فراوان ریزماهوره‌ها نبایستی به دنبال آلل‌های اختصاصی گشت.

در مورد جایگاه McMA2، Mohammadifar, Nanekarani and Mohammadabadi (2011)، Esmail-Khanian et al. (2010) و (2007) تعداد آلل یکسان و دامنه آللی تقریباً مشابهی را گزارش کردند، اما Maddox et al. (2000) تعداد ۱۷ آلل را برای این جایگاه گزارش کردند که خیلی بیشتر از تعداد آلل به دست آمده برای این جایگاه در مطالعه حاضر بود. تعداد آلل مشاهده شده و دامنه آللی مربوط به جایگاه McMA26 در مطالعه حاضر با گزارش Esmail-Khanian et al. (2007) مشابه بود، اما Qanbari et al. (2007) در مطالعه‌ای که روی نژاد افشاری داشتند، این جایگاه را تک شکل گزارش کردند.

حداقل نشان می‌دهد که تنوع درون جمعیتی برای جمعیت‌های مورد مطالعه تقریباً یکسان بود. همچنین می‌توان گفت که این جایگاه‌ها برای تشخیص آزمون والدینی در جمعیت گوسفندان مناسب هستند.

مقادیری که برای He در دو جایگاه McMA2 و McMA26 به دست آمد نزدیک به گزارش Maddox et al. (2000) بود که به ترتیب مقادیر ۰/۹ و ۰/۸۸ را برای این دو جایگاه به دست آورده‌اند. در مطالعه Nanekarani et al. (2010) روی جایگاه‌های McMA2، BM6444 و McMA26 برای هتروزیگوسیتی مورد انتظار به ترتیب مقادیر ۰/۹۱، ۰/۸۲ و ۰/۸۹۶ را گزارش کردند. مقدار He در مطالعه Sun et al. (2010) برای جایگاه OarHH35، ۰/۶۶ بود که خیلی کمتر از مقدار به دست آمده در مطالعه حاضر بود. Esmail-Khanian et al. (2007) هتروزیگوسیتی مورد انتظار نااریب Nei را در مورد جایگاه‌های McMA2 و BM6444 به ترتیب ۰/۹ و ۰/۹۳ گزارش کردند و نیز Mohammadi and Saberivand (2007) این پارامتر را برای جایگاه OARHH35، ۰/۸۶ گزارش کردند.

چون حد نهایی برای هتروزیگوسیتی یک است و از این رو مقادیر هتروزیگوسیتی به افزایش تنوع زیاد حساس نمی‌باشند، مقایسه این مقادیر به عنوان معیار تنوع درون جمعیتی برای نشانگرهای بسیار چندشکل همچون ریزماهورها

ریزماهورهای مرتبط با ژن اینهیبین در گوسفند سنجابی، تعداد ۳ آلل با دامنه آلی ۱۱۳-۱۶۳ جفت باز را برای این جایگاه گزارش کردند.

تنوع درون جمعیتی یا تنوع ژنی به صورت هتروزیگوسیتی مورد انتظار نااریب Nei در هر جایگاه و برای هر جمعیت در جدول (۳) خلاصه شده است. دامنه He نیز بین ۰/۸۳-۰/۹ بود که کمترین مقدار مربوط به جایگاه OarHH35 در جمعیت دالاق و بیشترین مقدار آن مربوط به جایگاه‌های McMA26 در جمعیت عربی بود.

هنگامی که برای هر جمعیت هتروزیگوسیتی مورد انتظار در سطح تمامی جایگاه‌ها و به صورت میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار جایگاه‌ها، محاسبه شد، بیشترین و کمترین مقدار He به ترتیب برای جمعیت‌های عربی (۰/۸۷۵) و لری (۰/۸۶۲) و با دامنه محدود ۰/۰۱۳ به دست آمد. البته میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای جمعیت قره‌گل (۰/۸۷) نیز تنها تفاوت اندکی با مقدار حداکثر در جمعیت عربی داشت. دامنه انحراف معیار (St. Dev) هتروزیگوسیتی مورد انتظار نااریب برای تمامی چهار جایگاه در جمعیت‌های مختلف بین ۰/۰۱۳۲ و ۰/۰۴۹۳ است که حاکی از تفاوت اندک میان آن‌ها است. نتایج، حاکی از تنوع بالا در جمعیت‌های مورد مطالعه بود، تمام جایگاه‌های مورد مطالعه چندشکل بودند در نتیجه خطری از بابت افت هتروزیگوسیتی وجود ندارد. تفاوت اندک بین مقادیر حداکثر و

۲/۴۱، ۲/۳۳ و ۱/۸۹ را برای شاخص شانون گزارش کردند. در پژوهشی Kumar et al. (2006) شاخص شانون را ۱/۴۰۹ برای جایگاه OarHH35 گزارش نموده‌اند. برای جایگاه OarHH35 در پژوهش Mohammadi and Saberivand (2007)، شاخص شانون به ترتیب ۲/۲۳ و ۲/۰۷۸ گزارش شده است. هنگامی که H' در سطح جایگاه‌ها به ازای تمامی جمعیت‌ها ارزیابی می‌گردد، معیار مناسبی را نیز برای ارزیابی چندشکلی و میزان تغییرپذیری جایگاه‌های مورد مطالعه فراهم می‌نماید.

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از PIC مشابه با آنچه از هتروزیگوسیتی‌ها و شاخص شانون حاصل شده بود نیز حاصل گردید. بیشترین مقدار PIC در بین ۲۰ ترکیب جایگاه-جمعیت مربوط به جایگاه‌های McMA26 در جمعیت عربی و کمترین مقدار نیز از آن جایگاه OarHH35 در جمعیت‌های دالاق و لری (۰/۸۲) بود. جایگاه‌های چندشکلی همچون نشانگرهای ریزماهواره‌ای را در صورت دارا بودن مقادیر PIC بالاتر از ۰/۵ جزو نشانگرهای دارای محتوای اطلاعاتی زیاد در نظر می‌گیرند (Botstein et al. 1980). بررسی معیارهای مختلف چندشکلی نیز حاکی از چندشکلی تمامی جایگاه‌های مورد مطالعه بود به طوری که بر اساس تعریف چندشکلی می‌توان تمام نشانگرهای تکثیر یافته را ۱۰۰ درصد چندشکل

(که در اکثر موارد هتروزیگوسیتی حدود ۰/۸ یا بالاتر دارند) صحیح نبوده و این تفاوت‌های میان آن‌ها اطلاعات دقیقی را بیان نمی‌کنند. لذا، شاخص اطلاعات Shannon (H') و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در جدول (۴) خلاصه شده است.

برخلاف هتروزیگوسیتی، که برای هر تعداد آلل، حد نهایی یک را دارد، حداکثر مقدار شاخص شانون (H') برابر با $\ln(n)$ است. با وجود آنکه تفسیر بیولوژیکی این معیار مشخص نیست، ممکن است برای اندازه‌گیری تنوع جایگاه‌های بسیار متغیر همچون ریزماهواره‌ها مفید باشد (Hedrick, 1999; Shannon and Weaver, 1949). نتایج بدست آمده برای شاخص شانون نیز مشابه با آنچه از هتروزیگوسیتی‌ها حاصل شده بود (هم از لحاظ روند و هم از لحاظ بیشترین و کمترین مقدار)، حاصل گردید (جدول ۴). بیشترین مقدار شاخص شانون H' از آن جایگاه McMA26 در جمعیت عربی (۲/۳۹۶) و کمترین مقدار نیز از آن جایگاه OarHH35 در جمعیت دالاق (۱/۹۲۶) بود. در اینجا نیز همچون هتروزیگوسیتی‌ها تفاوت بین جمعیت‌ها به ازای تمامی جایگاه‌ها زیاد نیست که بار دیگر بر یکسان بودن تنوع در جمعیت‌های مورد مطالعه دلالت دارد. برای سه جایگاه McMA26، McMA26 و BM6444، Nanekarani et al. (2010) به ترتیب مقادیر

تعداد آلل مؤثر و تنوع ژنی Nei نشان‌دهنده تنوع مناسب در جمعیت‌های مورد بررسی بود که می‌توان آن‌ها را به عنوان یک ذخیره ژنتیکی مناسب برای اهداف مختلف پرورشی و اصلاح نژادی در کشور به حساب آورد و نیز با توجه به انطباق نتایج حاصله با پیش‌فرض‌های معلوم می‌توان جمع‌بندی کرد که نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه در این پژوهش ابزار بسیار توانمندی برای بررسی و ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی درون و بین جمعیتی و روابط تکاملی میان جمعیت‌ها و به طور کلی مطالعات ژنتیک جمعیتی هستند.

سپاسگزاری

این پژوهش در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر انجام شد، لذا از همراهی و همکاری تمامی اساتید، دانشجویان و کارکنان گروه علوم دامی این دانشگاه و نیز تمامی مراکز اصلاح نژاد دام و جهاد کشاورزی سراسر کشور که برای انجام این طرح همکاری کردند، تشکر و قدر دانی می‌شود.

در نظر گرفت. مقدار PIC به دست آمده برای جایگاه‌های McMA2، McMA26 تقریباً مشابه با نتایج Nanekarani et al. (2010) و Esmail-Khanian et al. (2007) بود (۰/۹). در پژوهشی Esmail-Khanian et al. (2007) برای جایگاه BM6444 مقدار ۰/۹۲ را برای PIC گزارش کردند. در مورد اطلاعات چندشکلی Kumar et al. (2006)، Bhatia and Arora (2007) و Arora and Bhatia (2006) به ترتیب مقادیر ۰/۸۴، ۰/۷۸ و ۰/۸۲ را برای جایگاه OarHH35 گزارش نموده‌اند که مشابه با نتایج به دست آمده بود. مقادیر زیاد به دست آمده برای ارزش‌های PIC در جمعیت‌ها و جایگاه‌های مورد مطالعه در حدی بود که از جایگاه‌های بسیار چندشکل همچون ریزماهواره‌ها انتظار می‌رود. به‌رحال، استفاده از آغازگرهای مورد مطالعه در این پژوهش که در سایر مطالعات نیز چندشکلی بالایی را نشان داده‌اند، احتمال دستیابی به چندشکلی را در مطالعات جدید افزایش می‌دهد. نتایج به دست آمده از برآورد معیارهای تنوع درون جمعیتی مانند شاخص شانون، محتوای اطلاعات چندشکلی، تعداد آلل مشاهده شده،

منابع

Abadi MRM, Askari N, Baghizadeh A, Esmailizadeh AK (2009). A directed search around caprine candidate loci provided evidence for microsatellites linkage to growth and cashmere yield in Rayini goats. *Small Ruminant Research* 81: 146-151.

- Arora R, Bhatia S (2006). Genetic diversity of Magra sheep from India using microsatellite analysis. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)* 19: 938 – 942.
- Askari N, Abadi MM, Baghizadeh A (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. *Iranian Journal of Biotechnology* 9: 222-9.
- Banabazi MH, Esmaeil-khanian S, Miraei-Ashtiani SR, Moradi Shahrabak M (2007). Genetic variation within and between five Iranian sheep populations using microsatellite markers. *Iranian Journal of Science Technology Agriculture Nature Research*. 10: 4 [In Persian].
- Bhatia S, Arora R (2007). Genetic diversity in Kheri-A pastoralists developed Indian sheep using microsatellite markers. *Indian Journal of Biotechnology* 108-112.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet* 32: 314-331
- Buchanan FC, Thue TD (1998). Interbreed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. *Canadian Journal of Animal Science* 78: 425-428.
- Buchanan FC, Adams LJ, Littlejohn RP, Maddox JF, Crawford AM (1994). Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics* 22: 397-403.
- Chauhan T, Lal KK, Mohindra V, Singh R, Punia O, Gopalakrishnan A, Sharma PC, Lakra WS (2007). Evaluation genetic differentiation in wild populations of the Indian major carp. *Aquaculture* 269: 135-149.
- Crispim BDA, Seno LDO, Egito AADE, Junior FMDV, Grisolia AB (2014). Application of microsatellite markers for breeding and genetic conservation of herds of Pantaneiro sheep. *Electronic Journal of Biotechnology* 17: 317–321.
- Davis GH, Galloway SM, Ross IK, Gregan SM, Ward J, Nimbkar BV, Ghalsasi PM, Nimbkar C, Subandriyog GD, Inounu I, Tiesnamurti B, Martyniuk E, Eythorsdottir E, Mulsant P, Lecerf F, Hanrahan JP, Bradford GE, Wilson T (2002). DNA test in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the booroola FecB mutation. *Biology of Reproduction* 66:1869-1874.
- Esmail-Khanian S, Nejati JA, Afraz F, Daneshyar P, Ghanbari S (2007). Genetic variation among baluchi sheep population using microsatellite markers. *Iranian Journal of Science Technology Agriculture Nature Research* 11: 41 [In Persian].
- Frankham R (1994). Conservation of genetic diversity for animals. 5th world congress on genetics Applied to livestock production, University of Guelph, Ontario, Canada 21: 385-392.
- Hedrick PW (1999). Genetic of populations, Second edition. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, MA, USA.
- Henry HM, Penty JM, Pierson CA, Crawford AM (1993). Ovine microsatellites at the OARHH 35, OARHH 41, OARHH44, OARHH47 and OARHH64 loci. *Animal Genetics* 24: 222.
- Jakaria Zein MSA, Sulandari S, Subandriyo, Muladno (2012). The use of microsatellite markers to study genetic diversity in Indonesian sheep. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture (J Indonesian Trop Anim Agric)* 371.

- Kumar D, Sharma R, Pandey AK, Gour DS, Malik G, Ahlawat SPS, Jain A (2006). Genetic diversity and bottleneck analysis of Indian Bellary sheep by microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics* 43, 9: 996-1005.
- Maddox JF, Riffkin CD, Beh KJ (2000). Dinucleotide repeat polymorphism at ovin MCMA1, MCMA2, MCMA5, MCMA8, MCMA9, MCMA11, MCMA14, MCMA20, MCMA24, MCMA26 loci. *Animal Genetics* 31: 148-149.
- Mohammadi G, Saberivand A (2007). Molecular study of polymorphisms of some microsatellite markers linked to the FecB genes in Ghezel Iranian sheep. *Iranian Veterinary Journal* 2: 34-43 [In Persian].
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011). Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. *Iranian Journal of Animal Science* 42, 4: 337-344 [In Persian].
- Musthafa Muneeb M, Aljummah RS, Alshaik MA (2012). Genetic diversity of Najdi sheep based on microsatellite analysis. *African Journal of Biotechnology* 1183: 14868-14876.
- Nanekarani Sh, Amirinia C, Mozafari NA, Vaez Torshizi R, Gharahdaghi AA (2010). Genetic Variation among Zandi Sheep Population Using Microsatellite Markers. *Veterinary Journal of Islamic Azad University* 11: 79-85 [In Persian].
- Promega C (1993). DNA Silver Staining System, product DQ7050. Madison, WI, USA.
- Qanbari S, Osfoori R, Eskandari Nasab MP (2007). Introgression of major genes into elite breeding flock of afshari sheep: a preliminary evaluation of polymorphism content and applicability of marker data. *Iranian Journal of Animal Science* 1: 39-47 [In Persian].
- Saadat-Noori M, Siah-Mansoor S (1990). Sheep husbandry and management. 4th ed. Ashrafi Publ. Co, Tehran, Iran [In Persian].
- Shannon CE, Weaver W (1949). *Mathematical theory of communication*. 1st Edn. University of Illinois Press, Urbana, IL10: 0252725484.
- Shojaei M, Mohammad Abadi MR, Asadi Fozi M, Dayani O, Khezri A, Akhondi M (2010). Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research* 2: 67-73.
- Solimani B, Chaharaein B, Rahimi Mianji GH (2011). Assessing polymorphism in BM6444, INRA13 and Oarhh35 microsatellite markers associated with inhibin gene in sanjabi sheep. *Journal of Studies of Animal Sciences Iran* 1: 85-90 [In Persian].
- Sun W, Chang H, Hussein Musa H, Chu M (2010). Study on relationship between microsatellite polymorphism and producing ability on litter size of Hu sheep in China. *African Journal of Biotechnology* 8704-8711.
- Tomasco I, Wlasiuk G, Lessa EP (2002). Evaluation of polymorphism in ten microsatellite loci in Uruguayan sheep flocks. *Genetics and Molecular Biology* 25: 37-41.
- Wang QG, Zhong FG, Li H, Wang XH, Liu SR, Chen XJ, Gan SQ (2005). Detection of major gene on litter size in sheep. *Yi Chuan* 271:80-84.
- Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999). PopGene, Version 1.31. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.
- Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, Saki AA, Ershadi A, Banabazi MH, Abdolmohammadi AR (2013). Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology* 10: 1812-1817.

Analysis of genetic diversity in five Iranian sheep population using microsatellites markers

Vajed Ebrahimi M.T.^{*1}, Mohammad Abadi M.R.², Esmailzadeh A.K.³

¹MSc Student, Department of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

²Associate Professor, Department of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

³Professor, Department of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

Abstract

Indigenous races in each country are as a national capital and strategic product in the economy and prosperity of the country that maintenance of these races are very valuable. Due to the importance of maintaining diversity and identification of genetic resources in indigenous breeds, five breeds of Iranian sheep population (Arabi, Arman, Dalagh, Karakul and Lory) using four microsatellite markers (McMA2, McMA26, OarHH35 and BM6444) was evaluated in terms of genetic diversity. Genomic DNA was extracted from 225 blood samples by optimized salting-out DNA extraction procedure. The PCR reactions were successfully performed with all primers. The results showed that all loci were quite polymorph. Hardy-Weinberg equilibrium test using chi-square test showed that some various combinations of loci-population were in a state of Hardy-Weinberg disequilibrium ($P < 0.05$). The highest number of alleles was observed in loci of McMA2, McMA26 and OarHH35 of Dalagh, Arabic, Lory and Karakul populations respectively (12 alleles) and the lowest number of alleles for OarHH35 in Dalagh population. The maximum expected heterozygosity in combination locus-population of loci McMA2, McMA26, OarHH35, BM6444 were 0.885, 0.9, 0.88 and 0.87 respectively. With respect to the studied loci, it is concluded that all studied sheep populations have wide genetic diversity.

Keywords: *Sheep, Microsatellite Markers, Genetic Variation, Heterozygosity.*

* Corresponding Author: Vajed Ebrahimi M.T.

Tel: 03431322689

Email: m.vajed@yahoo.com