چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

پلی مورفیسم نشانگرهای میکروساتلایت در گله اصلاحی گوسفند افشاری

مهدی رضوی نیا[1]، مرادپاشا اسکندری نسب[2]، علی حق نظری[3]، صابر قنبری[4]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه زنجان: M_Razavi1@yahoo.com
۲- عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه زنجان.
۳- عضو هیئت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه زنجان.
۴- عضو هیئت علمی پژوهشکده فیزیولوژی و بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه زنجان.

چکیده

این تحقیق بر روی گله اصلاحی گوسفند افشاری دانشگاه زنجان انجام گرفت تنوع ژنتیکی در پنج جایگاه میکروساتلایت بررسی شد. از ۴۰ راس گوسفند(۱۰ قوچ ، ۲۰ میش و ۱۰ بره) بطور تصادفی خونگیری به عمل آمد. مراحل عملی طرح شامل تهیه نمونه خون، استخراج و تلخیص DNA، تکثیر DNA با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز و الکتروفورز بود. پارامترهای مختلف تنوع درون جمعیتی و نیز تعادل هاردی واینبرگ برای جمعیت مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت. تعداد آللها برای جایگاههای مختلف (۵ آلل) OarHH55، (۶ آلل) OarAE101، (۸ آلل) BM2508،(۵ آلل) BM143 و (۷ آلل) LSCV43 بود و فراوانی آللی برای هر یک بدست آمد. نتایج دو آزمون مربع کای (X^2_T) و نسبت درست نمایی (G^2_T) برای تعادل هاردی واینبرگ، حالت عدم تعادل را برای تمامی جایگاهها نشان داد. میانگین هتروزیگوسیتی بدست آمده برای کل جایگاهها ۰/۷۶ برآورد شد. نتایج این مطالعه نشان دهنده آن است که علیرغم اعمال اصلاح انتخابی برای چند سال متمادی و نیز سیستم جفت گیری بسته گله، هنوز سطح بالایی از هتروزیگوسیتی در گله مورد نظر وجود دارد.

واژه های کلیدی: پلی مورفیسم، گوسفند افشاری، میکروساتلایت.

مقدمه

امروزه آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان جزء مهم پروژه های اصلاح نژاد دام تلقی می گردد. گوسفند نژاد افشاری از نژادهای موجود در کشور می باشد که به علت دارا بودن جثه بزرگ و صفات مطلوب گوشتی، مستعد انجام کارهای اصلاحی در جهت تبدیل شدن به یک نژاد گوشتی می باشد. در این راستا از چند سال گذشته طرح ملی اصلاح نژاد گوسفند افشاری در دانشگاه زنجان در حال اجرا است. وجود یک سیستم بسته نگهداری و جفت گیری از ویژگی های این گله اصلاحی می باشد که در طول چند سال گذشته روی آن اعمال شده است.

با توجه به رواج استفاده از نشانگرهای میکرو ساتلایت و اثبات کارایی آنها در برآورد تنوع ژنتیکی موجوددر جوامع، نتایج حاصل از این تحقیق می تواند برآوردی از وضعیت فعلی این گله اصلاحی را ارائه دهد و دید بهتری را برای مجریان این پروژه اصلاحی فراهم آورد. همچنین می تواند موجبات تصمیم گیری دقیق تری را در مورد راهبرد اصلاحی پروژه برای تسریع در پیشرفت ژنتیکی گله فراهم آورد.

مواد و روشها

گله گوسفند افشاری در دانشگاه زنجان شامل ۵۰۰ راس گوسفند می باشد. طی این طرح از ۴۰راس (۱۰ قوچ ، ۲۰ میش و ۱۰ بره) گوسفند به طور تصادفی نمونه های خون کامل از سیاهرگ وداج گردن و با استفاده از لوله خلا ۵ سی سی حاوی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه شد.. استخراج DNA به روش اصلاح شده استخراج نمکی (میلر و همکاران ۱۹۹۸) انجام شد. برای سنجش کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. پنج جایگاه میکروساتلایت در این تحقیق بررسی شدند که مشخصات آنها در جدول شماره ۱ آمده است. واکنش زنجیره ای پلی مراز برای تک تک جایگاهها شامل ۵۰ نانو گرم DNA، ۳/۷۵ پیکومول هر پرایمر، ۲۰۰ میکرو مولارdNTP، ۳/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، بافر با غلظت یک برابر و یک واحد آنزیمTaq Polymerase بود که حجم نهایی واکنش به ۱۵ میکرو لیتر رسانده می شد. فرآورده های PCR بعد از واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، بر روی ژل اکریلامید ۸٪ بار می شدند تا در محیط بافری TBE 0.5X با توان ۱۰ وات (۲۰۰ ولت، ۵۰ میلی آمپر) برای مدت ۲/۵ ساعت الکتروفورز شوند. نمایان سازی باندها به روش سریع رنگ آمیزی نقره انجام شد.

باندخوانی به روش دستی و با مقایسه با مارکر Hpa II-pBS شرکت Gene Craft انجام گرفت. معیارهـای مختلـف تنـوع درون جمعیتی همچون تعداد آللی (n)، تعداد موثر آللی (ne)، شاخص شانون (I)، میانگین هتروزیگوسیتی (h) و همچنین نسبت های هاردی واینبرگ (HWP) از داده های ژنوتیپی با استفاده از نرم افزار Pop Gene3.2 بدست آمد.

جدول شماره ۱ : اطلاعات مربوط به جایگاههای مورد مطالعه در این تحقیق.

نام جایگاه	توالی تکراری	محدوده اندازه آللی گزارش شده	محدوده اندازه آللی مشاهده شده	دمای اتصال در واکنش PCR	
OarHH55	*	۱۱۷-۱۵۵	۱۱۱-۱۲۷	۶۳	Montgomery et al (1994)
OarAE101	CA	۹۹-۱۲۳	۱۰۷-۱۲۹	۶۳	Montgomery et al (1994)
BM143	TG	۱۰۲-۱۲۸	۱۰۷-۱۱۷	۶۱	Bishop et al(1994)
BM2508	TG	۱۴۳-۱۶۱	۱۵۴-۱۸۸	۵۸	Mulsant et al(1998)
LSCV43	*	۱۱۰-۱۳۰	۱۰۱-۱۱۹	۵۲	Mulsant et al(1998)

* ثبت شده ولی توالی مربوطه در بانک اطلاعاتی موجود نیست.

جدول شماره ۲ : فراوانی و اندازه هر یک از آللها در جمعیت.

جایگاه / آلل	LSCV43		BM2508		BM143		OarHH55		OarAE101	
	فراوانی آللی	اندازه آللی	فراوانی آللی	اندازه آللی	فراوانی آللی	اندازه آللی	فراوانی آللی	اندازه آللی	فراوانی آللی	اندازه آللی
A	۰/۱۵	۱۰۱	۰/۱۱	۱۵۴	۰/۲۱	۱۰۷	۰/۰۲	۱۱۱	۰/۳۲	۱۰۷
B	۰/۱۸	۱۰۷	۰/۲۱	۱۵۸	۰/۲۱	۱۰۹	۰/۲۰	۱۱۳	۰/۰۸	۱۰۸
C	۰/۰۶	۱۰۹	۰/۰۸	۱۶۴	۰/۲۲	۱۱۱	۰/۳۷	۱۱۷	۰/۲۲	۱۱۲
D	۰/۳۷	۱۱۱	۰/۰۳	۱۷۰	۰/۳۲	۱۱۴	۰/۳۲	۱۱۹	۰/۰۶	۱۱۳
E	۰/۱۲	۱۱۴	۰/۰۱	۱۷۴	۰/۰۲	۱۱۷	۰/۰۷	۱۲۷	۰/۱۷	۱۱۶
F	۰/۰۷	۱۱۶	۰/۰۲	۱۷۸	----	----	----	----	۰/۱۲	۱۲۹
G	۰/۰۲	۱۱۹	۰/۲۱	۱۸۰	----	----	----	----	----	----
H	-----	-----	۰/۳۰	۱۸۸	----	----	----	----	----	----

نتایج و بحث

در این مطالعه تمامی پنج جایگاه تکثیر یافتند. در مجموع از بررسی این ۵ جایگاه ۳۱ آلل با میانگین ۶/۲ آلل مشاهده گردید. تعداد آللهای مشاهده شده برای تک تک جایگاهها بدین صـــورت (۵ آلـــل) OarHH55، (۶ آلـــل) OarAE101، (۷ آلل) LSCV 143 (۸ آلل) BM2508 و (۵ آلل) BM143 بود که بیشترین پلی مورفیسم مشاهده شده مربوط به جایگاه BM2508 با ۸ آلل و کمترین آن مربوط به جایگاه های (۵ آلل) OarHH55 و (۵ آلل) BM143 بود. اندازه آللهای بدست آمده برای تک تک جایگاهها با مطالعات پیشین هم خوانی داشت. بررسی تعادل هاردی واینبرگ برای تک تک جایگاهها با استفاده از دو آزمون مربع کای و حداکثر درست نمایی صورت گرفت. هیچ کدام از جایگاهها در حالت تعادل هاردی واینبرگ نبودند (α=۰/۰۵). دلایلی همچون کوچک بودن اندازه گله، نرخ بالای جهش در میکرو ساتلایتها و نیز اعمال انتخاب را میتوان به عنوان دلایل عدم وجود تعادل هاردی واینبرگ در این گله برشمرد.

جدول شماره ۳ : اطلاعات بدست آمده از آنالیز آماری توسط نرم افزار POP Gene 3.2

نام جایگاه	تعدادآلل مشاهده شده	تعدادآلل موثر	شاخص شانون	هموزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	میانگین هتروزیگوسیتی
OarHH55	۵	۳/۴۱	۱/۳۴	۰/۳۷	۰/۷۱	۰/۷۰
OarAE101	۶	۴/۶۷	۱/۶۵	۰/۴۲	۰/۸۰	۰/۷۸
BM143	۵	۴/۰۴	۱/۴۵	۰/۲۰	۰/۷۶	۰/۷۵
BM2508	۸	۴/۹۴	۴/۹۳	۰/۶۵	۰/۸۰	۰/۷۹
LSCV43	۷	۴/۴۷	۴/۴۶	۰/۱۷	۰/۷۸	۰/۷۷
Mean (SD)	۶/۲ (۱/۳)	۴/۳۰ (۰/۵۹)	۲/۷۶(۰/۱۷)	۰/۳۶(۰/۱۹)	۰/۷۷(۰/۰۳)	**۰/۷۶ (۰/۰۳)**

میانگین هتروزیگوسیتی به عنوان معیار تنوع درون گله ای ۰/۷۶ برآورد شد که مقدار نسبتا بالایی برای گله اصلاحی است. این میزان هتروزیگوسیتی در این گله، با وجود آمیزشهای درون جمعیتی در سالهای اخیر می تواند به این علت باشد که در این سالها مدیریت این واحد گوسفند داری از آمیزشهای خویشاوندی مخصوصا تلاقی های برگشتی جلوگیری بعمل آورده و آمیزشها کنترل شده و انتخابی بوده است. در حال حاضر نرهای گله با بیشتر میش ها خویشاوند هستند و ادامه این روند اصلاحی می تواند باعث افزایش همخونی در این گله شود. با این وجود باید توجه داشت که نتایج بدست آمده برای تنوع درون جمعیتی بصورت برآوردی از این پارامترها است که از جایگاههای مورد مطالعه حاصل شده و این برآورد با مطالعه جایگاههای دیگری بر روی این گله احتمالاً متفاوت خواهد بود. بدیهی است که با افزایش تعداد جایگاههای مورد مطالعه، برآوردها به مقادیر واقعی، نزدیکتر خواهند بود.

منابع

- قنبری ، ص. ، اسماعیل خانیان، س .اسکندری نسب،م.پ .۱۳۸۲. بررسی تنوع ژنتیکی گوسفندان بلوچی با استفاده از مارکرهای میکروساتلایت. چاپ شده در اولین کنگره علوم دامی و آبزیان کشور.
- Miller, S. A., D. D. Dykes., H. F. Polesky. (1998). A Simple Salting Out Procedure For Extraction DNA From Human Nucleated Cells. Nucleic Acids Research. 16: 1215.
- Montogomery, G. W & Gallebaut, S. M. 1993. The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. Nature Genetics. 4: 410-414.
- Mulsant, p., Leserf, f., Fabre & Jean-Michel Elsen. 2001. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB isassociated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. PNAS. 98(9):5104-5109.
- Yeh, F.C., Yang, R. & Boyle, T. 1999. POPGENE. Version 3.2.University of Alberta. Edmonton Canada

Microsatellite Polymorphism of Afshari Sheep Breeding Flock

The purpose of this study was preliminary investigation of intrapopulation variation of the breeding flock of Afshari sheep, which has had a close mating system during last years. Variation at 5 microsatellite loci was investigated. The study was conducted on overall 40 sheep. Microsatellite markers were amplified by polymerase chain reaction (PCR), followed by 8% denatured polyacrylamide gel electrophoresis. Different parameters for intrapopulation variation such as heterozygosity, Shannon index, were estimated and also hardy-weinberg proportions were considered. The average heterozygosity calculated from data on polymorphic was estimated as 0.76. The results of this study indicate, despite the historical selective breeding and closed flock system a significant high level of heterozygosity still exists in the representative sheep flock.

Key Words: Afshari sheep, Microsatellite, Polymorphism.

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop