بررسی تنوع ژنتیکی چهار نژاد از گوسفندان موجود در ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای

Genetic Diversity Analysis of Four Sheep Breeds Existing in Iran Using Microsatellite Markers

محمدتقی واجد ابراهیمی[1*]، محمدرضا محمدآبادی[2] و علی اسماعیلی زاده[3]

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۲۰

چکیده

با توجه به اهمیت شناسایی و حفظ تنوع ذخایر ژنتیکی کشور، چهار جمعیت از نژادهای گوسفند موجود در ایران (پاکستانی (۲۵ رأس)، کرمانی (۱۰۲ رأس)، ایران‌بلک (۴۴ رأس) و لری‌بختیاری (۲۵ رأس)) با استفاده از ۴ نشانگر ریزماهواره‌ای (McMA2، HSC، OarHH35 و BM6444) از نظر تنوع ژنتیکی بررسی شدند. استخراج DNA ژنومی از تعداد ۱۹۶ نمونه خون به روش نمکی بهینه شده، انجام شد و واکنش‌های PCR با استفاده از چهار جفت آغازگر اجرا شد. نتایج نشان داد که تمامی جایگاه‌ها چندشکل هستند. تعادل هاردی- واینبرگ به روش آزمون مربع کای نشان داد که برخی ترکیبات مختلف جایگاه‌ها- جمعیت در حالت عدم تعادل قرار داشتند (P<۰/۰۵). بیش‌ترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به جایگاه HSC در جمعیت پاکستانی (۱۴ آلل) و کم‌ترین تعداد نیز از آن جایگاه HSC در جمعیت‌های کرمانی و ایران‌بلک (۷ آلل) بود. حداکثر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در حالت ترکیب جمعیت- جایگاه برای جایگاه‌های McMA2، HSC، OarHH35 و BM6444 به‌ترتیب ۰/۹، ۰/۸۷، ۰/۸۷ و ۰/۸۶ بودند. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت‌های گوسفند مورد بررسی در این تحقیق با توجه به جایگاه‌های مورد مطالعه، از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی برخوردارند.

واژه‌های کلیدی: هتروزیگوسیتی، جمعیت، آلل، چندشکلی

۱، ۲ و ۳. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استادان گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

*: نویسنده مسوول Email: m.vajed@yahoo.com

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول با راهنمایی دکتر محمدرضا محمدآبادی ارائه شده به دانشگاه شهید باهنر کرمان می‌باشد.

مقدمه

پرورش گوسفند یکی از بخش‌های مهم دامپروری کشور است، انتخاب گوسفند در جهت تولید محصولات خاص در زمان طولانی موجب به‌وجود آمدن تیپ‌های متفاوتی از این حیوان شده است. نژاد پاکستانی یکی از نژادهای گوشتی محسوب می‌شود. منشأ این نژاد کشور پاکستان است اما به علت دوقلوزایی بالا، وزن بلوغ مناسب و مقاومت به آب‌وهوای خشک به تازگی موردتوجه دامداران ایران قرار گرفته است. خصوصیات ظاهری آن نیز شامل خمیدگی در قسمت پیشانی، دارای دم، قد و گوش‌های بلند است. گوسفند کرمانی در زمره بهترین نژادهای پشمی ایران به شمار می‌رود و شیر و سایر فرآورده‌های آن در درجات دوم و سوم اهمیت، قرار دارد. این گوسفند در برابر آب و هوای خشک کمبود علوفه، در مجموع مقاوم و چابک است و با داشتن دست و پایی بلند می‌تواند به راحتی برای جستجوی علوفه راهپیمایی نموده و به ارتفاعات صعود نماید. گوسفند لری‌بختیاری یکی از نژادهای سنگین و ممتاز کشور از نظر صفات تولیدی است. محل اصلی پرورش آن استان چهارمحال و بختیاری است ولی به سبب خصوصیات ممتاز آن در استان‌های هم‌جوار نظیر (اصفهان، لرستان، کهگیلویه و بویراحمد و خوزستان) به‌صورت آمیخته پرورش می‌یابد. نژاد ایران‌بلک از تلاقی چرخشی گوسفندهای بلوچی ایران و کیوسی یونان در سال ۱۳۵۴ در ایستگاه عباس‌آباد مشهد ایجادشده است، وضعیت مقاومت این نژاد نسبت به بیماری‌ها، تغییرات دما، کمبود تغذیه و شرایط خشک‌سالی بسیار بالاست (خالداری، ۱۳۸۷). علیرغم تجربه جهانی در زمینه استفاده از اصلاح نژاد در جهت افزایش سودآوری در دامپروری، برنامه‌های مدون اصلاح نژادی در بخش پرورش گوسفند در کشورمان اجرا نشده است. مطالعه تنوع ژنتیکی نقش مهمی در توسعه استراتژی‌های اصلاح نژادی برای گونه‌های حیوانات اقتصادی دارد *سوهیر* و همکاران (Soheir *et al.*, 2008). استفاده از نشانگرهای مولکولی در سال‌های اخیر جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و حیوانات حفاظت شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است. *دیویس* و همکاران (Davis *et al.*, 2002).

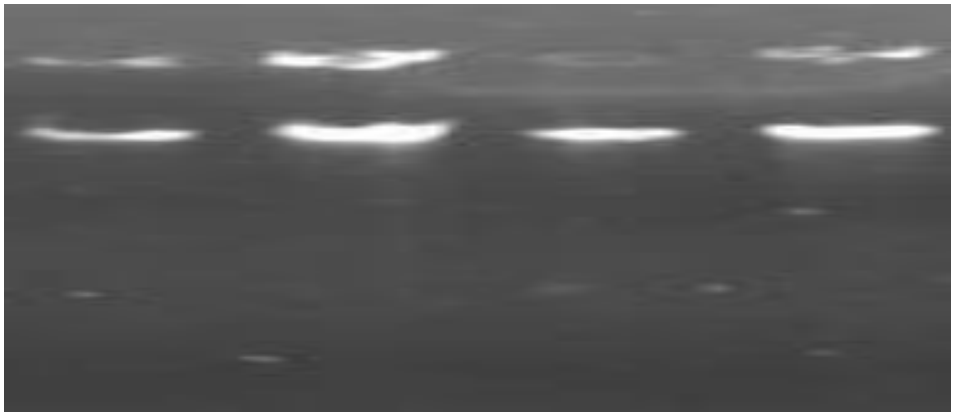
محمدی‌فر و محمدآبادی (۱۳۹۰) در مطالعه‌ای به‌منظور بررسی مقدار کارآیی و سودمندی نشانگرهای ریزماهواره‌ای ویژه کروموزوم Y گاوی در تعیین تنوع ژنتیکی در گوسفند، وضعیت تکثیر ۱۷ نشانگر ریزماهواره‌ای ویژه کروموزوم Y گاوی را در گوسفند کرمانی مورد بررسی قرار دادند. در مجموع ۱۰۲ آلل در این جایگاه‌ها شناسایی شدند که بیش‌ترین و کم‌ترین آلل مشاهده شده به‌ترتیب ۱۶ و ۵ آلل بود. نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان از ریزماهواره‌های ویژه کروموزوم Y گاوی به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی، فراوانی ژنی، هتروزیگوسیتی و فاصله ژنتیکی در گوسفندان استفاده کرد. در مطالعه دیگری میزان تنوع ژنتیکی نژاد گوسفند نجدی عربستان با ۱۹ نشانگر ریزماهواره‌ای اندازه‌گیری شد و در مجموع ۱۷۳ آلل مشاهده گردید. به‌طور متوسط هتروزیگوسیتی قابل‌مشاهده، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص شانون به‌ترتیب ۰/۶۷، ۰/۷۱ و ۱/۶۹ به‌دست آمد و نتایج نشان داد که این نژاد از تنوع ژنتیکی مناسبی برخوردار است و ازلحاظ هم‌خونی درخطر نیست و می‌توان از تنوع ژنتیکی درون این نژاد برای توسعه ژنتیکی آن استفاده کرد. *مصطفی مونیب* و همکاران (Musthafa Muneeb *et al.*, 2012). اسماعیل‌خانیان و همکاران (۱۳۸۶) تنوع ژنتیکی ۱۵۶ رأس گوسفند بلوچی ایران را با استفاده از ۱۹ جایگاه ریزماهواره‌ای بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که براساس آزمون تعادل هاردی- واینبرگ این جمعیت در بیشتر جایگاه‌ها انحراف معنی‌داری از حالت تعادل نشان داد ($P< ۰/۰۵$). 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. *جکاریا* و همکاران (2012) با استفاده از ۱۸ جایگاه ریزماهواره‌ای تنوع ژنتیکی ۲۰۰ گوسفند از جمعیت گوسفندهای اندونزی را بررسی کردند. ۱۸۰ آلل از ۱۷ جایگاه شناسایی شد. متوسط هتروزیگوسیتی 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 به‌ترتیب ۰/۱۰۰۶، ۰/۱۶۴۷ و ۰/۰۷۱۲ بود. براساس نتایج این تحقیق، جمعیت گوسفندهای اندونزی به یک برنامه حفاظت ژنتیکی و اصلاحی نیاز دارند *جکاریا* و همکاران (Jakaria *et al.*, 2012). با توجه به رواج استفاده از ریزماهواره و اثبات کارآیی آن‌ها در برآورد تنوع و فاصله ژنتیکی واجدابراهیمی و همکاران (۱۳۹۴)؛ منتظری و همکاران (۱۳۹۱)؛ *چووهان* و همکاران (Chauhan *et al.*, 2007)، نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند برآوردی از وضعیت فعلی این جمعیت‌ها برای مدیریت منابع ژنتیکی، بهره برداری پایدار و حفاظت از آن‌ها را ارائه دهد و با توجه به این که تاکنون با این نشانگرها ژنوم گوسفندان پاکستانی، کرمانی، ایران‌بلک و لری‌بختیاری مورد بررسی قرار نگرفته است، لذا هدف تحقیق حاضر مطالعه تنوع درون و بین جمعیتی موجود در چهار نژاد گوسفند پاکستانی، کرمانی، ایران‌بلک و لری‌بختیاری با نشانگرهای ریزماهواره‌ای بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از ۱۹۶ گوسفند شامل نژادهای پاکستانی ۲۵ رأس (۲۰ میش، ۵ قوچ)، کرمانی ۱۰۲ رأس (۷۵ میش، ۲۷ قوچ)، ایران‌بلک ۴۴ رأس (۴۰ میش، ۴قوچ) و لری‌بختیاری ۲۵ رأس (۱۹ میش، ۶ قوچ) از مراکز اصلاح نژاد و جهاد کشاورزی نقاط مختلف کشور، نمونه‌های خون کامل از سیاهرگ وداج و با استفاده از لوله CBC/5ml حاوی محلول ضدانعقاد K2/K3 EDTA جمع‌آوری و تهیه گردید. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل به روش بهینه شده و تغییریافته استخراج نمکی انجام گردید. *عبادی* و همکاران (Abadi *et al.*, 2009). 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. در این تحقیق از دستگاه ترموسایکلر peqSTAR 96X ساخت آلمان، با بلوک ۹۶ تایی برای تیوب‌های PCR به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر، استفاده گردید. برنامه دمایی برای آغازگرها مورد مطالعه به‌صورت واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها با توجه به دمای اتصال بهینه شده (جدول ۲) 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. واکنش‌های PCR با استفاده از ۴ جفت آغازگر ریزماهواره‌ای McMA2، HSC، OarHH35 و BM6444 (در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر) انجام شد (جدول ۲). فرآورده‌های PCR به‌دست آمده روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد الکتروفورز گردید و نمایان‌سازی آلل‌ها به روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام شد، *پرومگا* (Promega, 1993). محتوای اطلاعات چندشکلی هریک از جایگاه‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel و فرمول آن PIC= N (1-∑Pi^2) /N- 1 به‌دست آمدند. *بوچنان* و *تیو* (Buchanan and Thue, 1998). آزمون نسبت درست نمایی برای تعادل هاردی- واینبرگ (P<۰/۰۵) در هریک از جایگاه‌ها، هم‌چنین تنوع درون جمعیت به‌صورت متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار و معیارهای چندشکلی ازجمله تعداد آلل مشاهده شده و مؤثر، با استفاده از نرم‌افزار PopGene انجام گردید. *یه* و همکاران (Yeh *et al.*, 1999).

نتایج و بحث

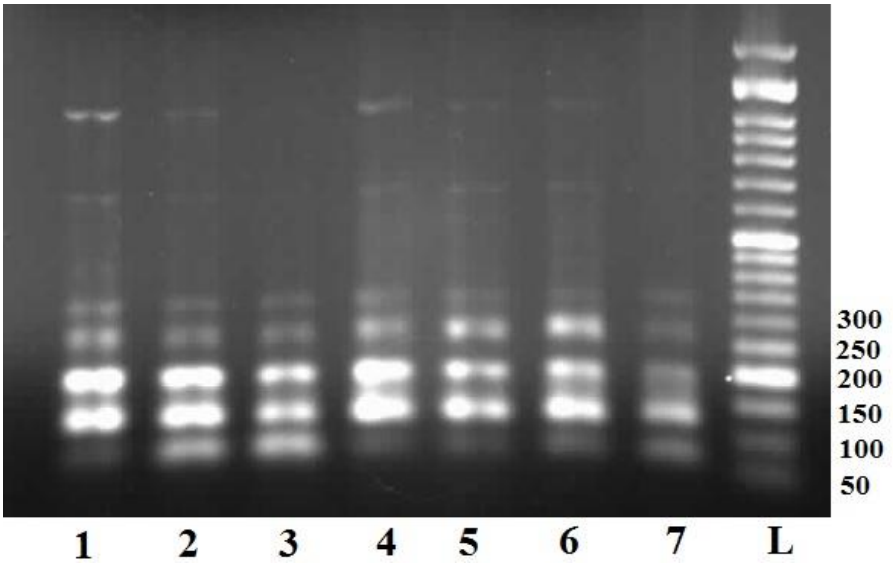
نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸درصد نشان داد که کیفیت DNAهای استخراج شده با استفاده از روش نمکی بهینه‌شده بسیار مناسب و تقریباً تمامی باندهای نمونه‌ها شفاف و بدون کشیدگی بودند (شکل ۱).



شکل ۱: الکتروفورز چند نمونه DNA استخراج‌شده گوسفندان مورد مطالعه روی ژل آگارز ۰/۸ درصد

Fig. 1: Electerophoresis of some studied sheep DNA samples on 0.8% agarose gel

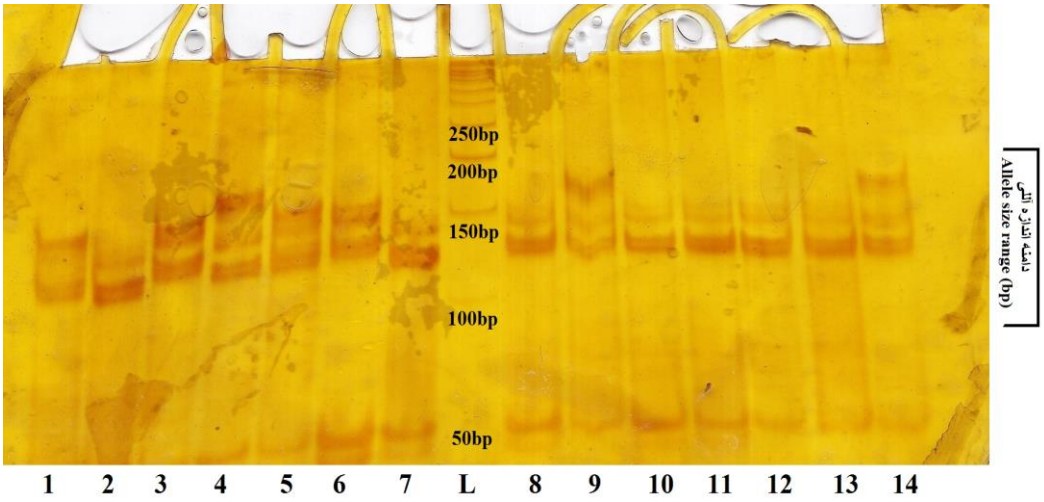
واکنش‌های PCR با چهار جفت آغازگر انجام گردید، تمامی جایگاه‌های مورد مطالعه طبق برنامه‌های دمایی به‌دست آمده برای آن جایگاه، تکثیر شدند و به‌منظور تائید تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲: چند نمونه از الکتروفورز محصولات PCR جایگاه BM6444 در جمعیت کرمانی روی ژل آگارز ۱ درصد. L: DNA Ladder 50 bp، ۱-۷: محصولات PCR

Fig. 2: Some samples of electrophoresis of BM6444 locus PCR products in Kermani population on the 1% agarose gel. L: DNA Ladder 50 bp, Lanes 1-7: PCR products

پس از تائید تکثیر قطعات موردنظر، الکتروفورز روی ژل آکریل‌آمید محصولات PCR انجام گرفت و سپس ژل‌های آکریل‌آمید رنگ‌آمیزی شدند. شکل ۳ نمونه‌ای از الگوهای باندی به‌دست‌آمده را برای جایگاه OarHH35 در جمعیت پاکستانی را نشان می‌دهد (شماره‌های ۱-۱۴ افرادی از جمعیت منتخب و L نشانگر اندازه ۵۰ جفت بازی از شرکت ماهان ژن است)



شکل ۳: نمونه‌ای از الگوهای به‌دست آمده محصولات PCR جایگاه OarHH35 در جمعیت پاکستانی روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد. L: DNA Ladder 50 bp، چاهک‌های ۱-۱۴: شماره نمونه‌ها

Fig. 3: A sample of patterns obtained of OarHH35 locus PCR products in Pakistani population on the 8% polyacrylamide gel. L: DNA Ladder 50 bp, Lanes 1-14: Sample number

جدول ۱: مشخصات نشانگرهای ریزماهواره‌ای انتخاب‌شده در تحقیق حاضر

Table 1: Characteristics of selected microsatellite markers in present study

نام جایگاه (موقعیت کروموزومی) Marker (chromosome)	آغازگرها (´5-´3) Primers (´5-´3)	شماره دسترسی* Accession Numbers*	واحد تکرار شونده Type of repeat	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing temperature (°C)	دامنه اندازه آللی (جفت باز)** Allele size range (bp)**	منبع Reference
McMA2 (13)	F: TCACCCAACAATCATGAAAC R: TTAAATCGAGTGTGAATGGG	AF098773	AC	52	157-201	(*مادوکس* و همکاران، 2000) (Maddox *et al.*, 2000)
HSC (20)	F: CTGCCAATGCAGAGACACAAGA R: GTCTGTCTCCTGTCTTGTCATC	M90759	-	60.2	267-301	NCBI
OarHH35 (4)	F: AATTGCATTCAGTATCTTTAAACATCT GGC R: ATGAAAATATAAAGAGAATGAACCACA CGG	L12554	GT	59.7	87-170	(*هنری* و همکاران، 1993) (Henry *et al.*, 1993)
BM6444 (2)	F: CTCTGGGTACAACACTGAGTCC R: TAGAGAGTTTCCCTGTCCATCC	G18444	GT	57.5	75-178	(*بوچنان* و همکاران، 1994) (Buchanan *et al.*, 1994)

*http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/viewer.cgi, **http://www.thearkdb.org/

جدول ۲: غلظت مختلف اجزاء PCR

Table 2: The concentration of PCR components

اجزاء واکنش Components	حجم مورداستفاده در واکنش (میکرولیتر) Volume reaction (µl)	غلظت استوک Stoke concentration
DNA	2	50-100 ng/µl
آب H_2o	متغیر Variable	-
بافر PCR Buffer PCR	2.5	10X
dNTPs	0.5	10 mM
$MgCl_2$	1	1.5 Mm
Primer Forward	1	pM 10
Primer Reverse	1	pM 10
TaqDNA Polymerase	0.3	5 Unit/ µl
حجم نهائی واکنش Total reaction	25	-

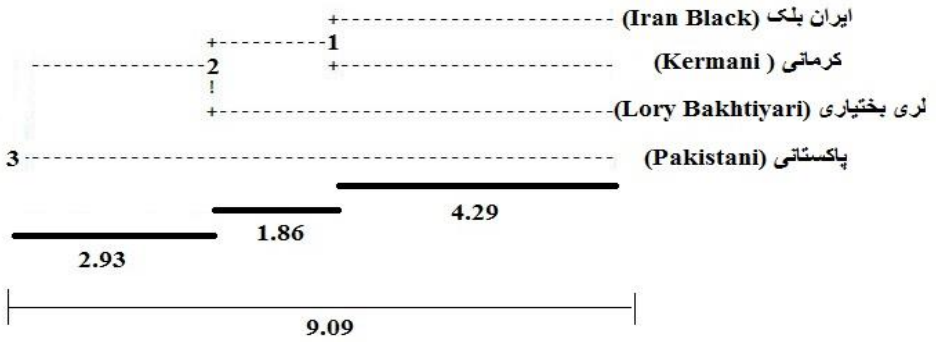
نتایج دو آزمون مربع کای و نسبت درست‌نمایی برای جایگاه مورد نظر، برای کل جمعیت‌های ادغام شده اختلاف جزئی با هم داشتند که می‌توان علت آن را تفاوت اندازه نمونه‌ها دانست زیرا آزمون مربع کای به اندازه و حجم نمونه حساس است. نتایج حاصل از آزمون مربع کای نشان داد که جایگاه HSC در تمامی جمعیت‌ها به جز جمعیت گوسفندان پاکستانی از حالت تعادل هاردی-واینبرگ انحراف داشت. جایگاه‌های دیگر نیز در برخی جمعیت‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف داشتند (جدول ۳). علت این انحرافات را می‌توان احتمالاً ناشی از کوچک بودن اندازه نمونه‌ها، انتخاب و مهاجرت دانست. نرخ بالای جهش در ریزماهواره‌ها و ایجاد آلل‌های جدید و وجود آلل‌های نول در برخی از نشانگرها نیز از عوامل مهم انحراف از تعادل است.

چنین مشاهداتی در مطالعات واجدابراهیمی و همکاران (۱۳۹۴)؛ ننه‌کرانی و همکاران (۱۳۸۹)؛ *سان* و همکاران (Sun *et al.*, 2010)، محمدی و همکاران (۱۳۹۰)، *آرورا* و *بهاتیا* (Arora and Bhatia, 2006)؛ *کریسپیم* و همکاران (Crispim *et al.*, 2014) که بر روی گوسفندان دیگر انجام گردیده است نیز گزارش شده است، تنها *بوچنان* و همکاران (Buchanan *et al.*, 1994) هیچ انحرافی از تعادل هاردی- واینبرگ را گزارش نکردند.

مقایسهٔ تعداد، نوع و دامنه اندازهٔ آلل‌های حاصل از مطالعهٔ حاضر با مطالعات قبلی (واجدابراهیمی و همکاران (۱۳۹۴)؛ ننه‌کرانی و همکاران (۱۳۸۹)؛ *سان* و همکاران (2010)) نشان می‌دهد که گوسفندهای ایرانی آلل‌های جدیدی را در جایگاه‌های مورد مطالعه دارا می‌باشند. دامنه اندازه آلل‌ها برای جایگاه‌های McMA2، HSC، BM6444 و OarHH35 به‌ترتیب

۲۰۲-۱۵۵، ۳۰۲-۲۶۴، ۱۷۷-۷۸ و ۱۶۴-۸۷ جفت باز به‌دست آمد. تعداد واقعی آلل (Na) و تعداد آلل مؤثر (Ne) و نیز مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) برای ترکیبات مختلف جایگاه- جمعیت، هر جمعیت به ازای تمامی جایگاه‌ها در جدول (۴) خلاصه شده است. همان‌طورکه در این جدول دیده می‌شود، بیش‌ترین تعداد آلل مؤثر نیز مربوط به جایگاه McMA2 در جمعیت کرمانی (۱۰/۲۲) بود. در مورد جایگاه McMA2، محمدی و همکاران (۱۳۹۰)، ننه‌کرانی و همکاران (۱۳۸۹) و اسماعیل‌خانیان و همکاران (۱۳۸۶) تعداد آلل یکسان و دامنه آللی تقریباً مشابهی را گزارش کردند. 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. ننه‌کرانی و همکاران (۱۳۸۹) در مطالعه خود تعداد ۸ آلل را برای این جایگاه گزارش کردند. جایگاه OarHH35 نسبت به مطالعات گذشته تعداد آلل بیشتری مشاهده شد (۱۳ آلل). *سان* و همکاران (2010)، *وانگ* و همکاران (Wang *et al.*, 2005) در مطالعات خود به‌ترتیب تعداد ۵ و ۴ آلل را برای این جایگاه مشاهده کردند. تعداد آلل مشاهده و دامنه آللی به‌دست آمده در مطالعه حاضر برای جایگاه HSC با گزارش *زاهان* و همکاران (Zahan *et al.*, 2011) که تنوع ژنتیکی گونه‌ای از گوسفندان بومی رومانی به نام Tsigai را بررسی کردند مشابه است (۱۴ آلل، دامنه آللی ۲۶۳-۳۰۱) که در بین تمام جایگاه‌های مورد مطالعه بیش‌ترین تعداد آلل را نشان داد. *هپسیبها* و همکاران (Hepsibha *et al.*, 2014) در بررسی ساختار ژنتیکی نژاد گوسفند هندی تعداد ۷ آلل، *کریسپیم* و همکاران (2014) تعداد ۱۵ آلل را در مطالعات خود گزارش کردند.

دندروگرام حاصل از فاصله ژنتیکی D_s که به روش UPGMA تشکیل گردید (شکل ۴). همان‌طور که مشاهده می‌شود، نژادهای ایران‌بلک و کرمانی در یک خوشه مشترک قرار دارند که با توجه به هم منشأ بودن این جمعیت‌ها (حاصل از نژاد بلوچی) و هم‌چنین به واسطه مجاورت مناطق پراکنش آن‌ها (استان‌های خراسان جنوبی و کرمان) و حضور کم و بیش آن‌ها در مناطق پراکنش یکدیگر، قابل توجیه است. از آنجایی‌که در پیش‌فرض‌های اولیه جمعیت پاکستانی، به‌واسطه فاصله جغرافیایی زیاد بین محل پراکنش آن یعنی کشور پاکستان با گوسفندان ناحیه شرق و غرب کشور و نیز وجود موانع جغرافیایی (مرز) امکان تبادل ژنتیکی طبیعی این جمعیت با سایر جمعیت‌های موردمطالعه را محدود می‌سازد، به‌عنوان یک گروه متفرقه فرض گردیده بود، انتظار می‌رفت که در یک خوشه مجزا قرار گیرد.



شکل ۴: دندروگرام درخت ژنتیکی بین چهار جمعیت گوسفند با استفاده از روش UPGMA

Fig. 4: Dendrogram of genetic tree between four sheep population by using UPGMA method

جدول ۳: آزمون کای (X_T^2) و نسبت درست‌نمایی (G_T^2) برای تعادل هاردی- واینبرگ (HWE) هر جایگاه در جمعیت‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر

Table 3: The chi-square (X_T^2) and G-square (G_T^2) test for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) equilibrium of each locus in the populations studied in present study

OarHH35		HSC		BM6444		McMA2		جایگاه Marker / جمعیت Population
G_T^2	X_T^2	G_T^2	X_T^2	G_T^2	X_T^2	G_T^2	X_T^2	
**	**	*	*	*	*	**	**	ایران بلک Iran Black
*	*	*	*	**	**	*	*	کرمانی Kermani
**	**	*	*	**	**	**	**	لری‌بختیاری Lory-Bakhtiyari
**	**	**	**	**	**	**	**	پاکستانی Pakistani
**	*	*	*	**	*	*	*	کل All breeds

*: عدم تعادل هاردی- واینبرگ (P<۰/۰۵). **: تعادل هاردی- واینبرگ (P<۰/۰۵)

*: Hardy weinberg disequilibrium (P<0.05). **: Hardy weinberg equilibrium (P<0.05)

جدول ۴: مقادیر تعداد آلل واقعی (Na) و تعداد آلل مؤثر (Ne) و نیز مقادیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) برای ترکیبات مختلف جایگاه- جمعیت و برای هر جمعیت

Table 4: The number of actual alleles (Na), effective alleles (Ne) and expected heterozygosity (He) for different combinations of locus-population and for each population

Average (He)	OarHH35			HSC			BM6444			McMA2			جایگاه Marker / جمعیت Population
	He	Ne	Na	He	Ne	Na	He	Ne	Na	He	Ne	Na	
0.83	0.84	6.21	13	0.87	7.81	14	0.8	4.96	11	0.81	5.23	10	پاکستانی Pakistani
0/86	0/86	7.52	10	0.83	6	7	0.86	7.25	8	0.9	10.22	12	کرمانی Kermani
0.83	0.87	7.75	11	0.77	4.36	8	0.81	5.28	8	0.88	8.56	12	ایران بلک Iran Black
0.81	0.81	5.38	9	0.78	4.61	7	0.84	6.21	13	0.84	6.31	12	لری‌بختیاری Lory-Bakhtiyari

جدول ۵: مقادیر اطلاعات Shannon (H') و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای ترکیبات مختلف جایگاه-جمعیت و برای هر جمعیت

Table 5- Shannon index (H') and polymorphism information conten (PIC) for different combinations of locus-population and for each population

Average (I)	OarHH35		HSC		BM6444		McMA2		جایگاه Marker / جمعیت Population
	PIC	I	PIC	I	PIC	I	PIC	I*	
2.08	0.84	2.18	0.87	2.31	0.79	1.94	0.8	1.9	پاکستانی Pakistani
2.11	0.86	2.15	0.83	1.87	0.86	2.03	0.9	2.39	کرمانی Kermani
2.02	0.87	2.19	0.77	1.72	0.81	1.85	0.88	2.31	ایران بلک Iran Black
1.98	0.81	1.91	0.78	1.71	0.84	2.18	0.84	2.13	لری‌بختیاری Lory-Bakhtiyari

*: شاخص اطلاعات شانون (*شانون و ویور*، 1949)

*: Shannon Index (Shannon and Weaver, 1949)

تنوع درون جمعیتی یا تنوع ژنی به‌صورت هتروزیگوسیتی مورد انتظار نااُریب Nei در هر جایگاه و برای هر جمعیت در جدول (۴) خلاصه شده است. *نئی* (Nei, 1978). دامنه H_e نیز بین ۰/۷۷-۰/۹ بود. نتایج، حاکی از تنوع بالا در جمعیت‌های مورد مطالعه بود به عبارتی در تمامی این جایگاه‌ها فزونی هتروزیگوسیتی وجود داشت و تمام جایگاه‌های مورد مطالعه چندشکل بودند، درنتیجه خطری از بابت افت هتروزیگوسیتی وجود ندارد و می‌توان آن‌ها را به‌عنوان یک ذخیره ژنتیکی مناسب برای اهداف مختلف پرورشی و اصلاح نژادی کشور به حساب آورد. هم‌چنین می‌توان گفت که این جایگاه‌ها برای تشخیص آزمون والدینی در جمعیت گوسفندان نیز مناسب هستند. تفاوت اندک بین مقادیر حداکثر و حداقل نشان می‌دهد که تنوع درون جمعیتی برای جمعیت‌های مورد مطالعه تقریباً یکسان است. مقادیری که برای H_e در جایگاه McMA2 به‌دست آمد نزدیک به گزارش *مادوکس* و همکاران (Maddox *et al.*, 2000) است که مقدار ۰/۹ را برای این جایگاه به‌دست آورده‌اند. ننه‌کرانی و همکاران (۱۳۸۹) در مطالعه خود بروی جایگاه‌های McMA2 و BM6444 برای هتروزیگوسیتی مورد انتظار به‌ترتیب مقادیر ۰/۹۱ و ۰/۸۲ را گزارش کردند. مقدار H_e در مطالعه *سان* و همکاران (2010) برای جایگاه OarHH35، ۰/۶۶ بود که خیلی کمتر از مقدار به‌دست آمده در مطالعه حاضر است. محمدی و صابری‌وند (۱۳۸۶) این پارامتر را در مورد جایگاه OARHH35، ۰/۸۶ گزارش کردند. هتروزیگوسیتی به‌دست آمده در مطالعه حاضر برای جایگاه HSC تقریباً مشابه با گزارش *کریسپیم* و همکاران (2014) است (۰/۸۵). شاخص اطلاعات Shannon (H') و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در جدول (۵) خلاصه شده است. نتایج مشابه با آنچه از هتروزیگوسیتی‌ها حاصل‌شده بود (هم ازلحاظ روند و هم ازلحاظ بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار) حاصل گردید. 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. ننه‌کرانی و همکاران (۱۳۸۹) در مورد دو جایگاه McMA2 و BM6444 به‌ترتیب مقادیر ۲/۴۱ و ۱/۸۹ را برای شاخص شانون گزارش کردند. *مصطفی مونیب* و همکاران (2012) برای جایگاه HSC، محمدی و صابری‌وند (۱۳۸۶) برای جایگاه OarHH35 در تحقیق خود، شاخص شانون را به‌ترتیب ۲/۲۳ و ۲/۰۷۸ گزارش نمودند. هنگامی‌که 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. *شانون* و *ویور* (Shannon and Weaver, 1949). همان‌طورکه در جدول (۵) مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از PIC مشابه با آنچه از هتروزیگوسیتی‌ها و شاخص شانون حاصل‌شده بود نیز حاصل گردید. جایگاه‌های چندشکلی همچون ریزماهواره‌ای را در صورت دارا بودن مقادیر PIC بالاتر از ۰/۵ جزو نشانگرهای دارای محتوای اطلاعاتی زیاد در نظر می‌گیرند. *بوتستین* و همکاران (Botstein *et al.*, 1980). بررسی معیارهای مختلف چندشکلی نیز حاکی از چندشکلی تمامی جایگاه‌های مورد مطالعه است به‌طوری‌که بر اساس تعریف چندشکلی می‌توان تمام نشانگرهای تکثیر یافته را ۱۰۰ درصد چندشکل در نظر گرفت. چندشکلی بودن جایگاه‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر، احتمالاً به علت وجود هتروزیگوسیتی در جمعیت‌های مورد مطالعه در جایگاه‌های مذکور است، اما نمی‌توان از اختصاصی بودن آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق و چندشکلی آن‌ها، با توجه به تعداد آلل مشاهده شده در مطالعات قبلی، چشم پوشی کرد. به هر حال، استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه، که در سایر مطالعات قبلی، چند شکلی بالایی را نشان داده‌اند، احتمال دستیابی به چند شکلی را در مطالعه جدید افزایش می‌دهد. مقدار PIC به‌دست آمده برای جایگاه McMA2 تقریباً مشابه با نتایج ننه‌کرانی و همکاران (۱۳۸۹) و اسماعیل‌خانیان و همکاران (۱۳۸۶) بود (۰/۹). اسماعیل‌خانیان و همکاران (۱۳۸۶) برای جایگاه BM6444 مقدار ۰/۹۲ را برای PIC گزارش کردند. در مورد اطلاعات چندشکلی *کومار* و همکاران (Kumar *et al.*, 2007)، *آرورا* و *بهاتیا* (2007) و *بهاتیا* و *آرورا* (Bhatia and Arora, 2008) به‌ترتیب مقادیر ۰/۸۴، ۰/۷۸ و ۰/۸۲ را برای جایگاه OarHH35 گزارش نموده‌اند که مشابه با نتایج به‌دست آمده است. *هپسیبها* و همکاران (2013)، *کریسپیم* و همکاران (2014) برای جایگاه HSC به‌ترتیب مقادیر ۰/۶۹ و ۰/۸۴ را برای اطلاعات چندشکلی (PIC) گزارش کردند. مقادیر زیاد به‌دست آماده برای ارزش‌های PIC در جمعیت‌ها و جایگاه‌های مورد مطالعه در حدی است که از جایگاه‌های بسیار چندشکل همچون ریزماهواره‌ها انتظار می‌رود. به‌هرحال، استفاده از آغازگرهای مورد مطالعه که در سایر مطالعات نیز چندشکلی بالایی را نشان داده‌اند، احتمال دستیابی به چندشکلی را در مطالعات جدید افزایش می‌دهد. با توجه به انطباق نتایج حاصله با پیش‌فرض‌های معلوم می‌توان جمع‌بندی کرد که نشانگرهای ریزماهواره‌ای مورد مطالعه در این پژوهش ابزار بسیار توانمندی برای بررسی اهدافی نظیر تمایز، شناسایی، ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی درون و بین جمعیتی گوسفندان موجود در کشور سودمند بوده و هم‌چنین می‌توان اظهار کرد که شناسایی نمونه‌های تکراری و مشابه، که یکی از اهداف مدیریت ذخایر

توارثی نگه‌داری شده در بانک ژن‌ها است، با استفاده از این نشانگرهای ریزماهواره‌ای امکان‌پذیر است. مطالعات بسیاری نیز که قبلاً توسط محققین دیگر انجام‌شده است چنین نتایجی را تأیید می‌کنند.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۴-۱۵ متن انگلیسی مراجعه شود.