نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۶ شماره ۲/ سال۱۳۹۵

آزمون انساب در جمعیت گوسفندهای آمیخته به کمک نشانگرهای ریزماهواره

کاوه کسرایی[۱]، سید عباس رافت[۲*]، جلیل شجاع غیاث[۳] و آرش جوانمرد[۴]

تاریخ دریافت: ۹٤/٤/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۲۹

[۱۲۳٤]بترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار ، استاد و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[*]مسئول مکاتبات Email:Rafata@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: صحت شجره و اطمینان از درستی روابط بین افراد، ازجمله عوامل مهم تاثیرگذار در ارزیابی صحیح ژنتیکی گوسفند می‌باشد. **هدف**: هدف از مطالعه حاضر، انجام آزمون انساب در ۳۲راس گوسفند گوسفندهای آمیخته به کمک پنج نشانگرهای ریزماهواره با استفاده ازروش تکثیر مولتیپلکس پی سی ار می‌باشد. **روش کار**: روابط شجره در بره های آمیخته پرورش داده شده در ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز بررسی شد که در آن تعداد چهار قوچ به همراه ۲۸ نتاج مربوطه تعیین ژنوتیپ شدند. آماره‌های توصیفی داده‌های خام مولکولی با استفاده از نرم افزار POPGENE و شاخص قدرت تشخیص ترکیبی با استفاده از نرم افزارCERVUS محاسبه گردید. **نتایج**: نتایج مطالعه حاضر نشان داده که جایگاه های ریزماهواره کاندید مورد استفاده سطح بالایی از تنوع ژنتیکی و چندشکلی را بروز دادند. در واقع حصول چنین مشاهده‌ای پیش شرط ادامه تجزیه و تحلیل‌های بعدی در آزمونهای انساب می‌باشد. همچنین از مجموع این نشانگرها، شاخص قدرت تشخیص ترکیبی در آنالیز انساب ۰/۹۹ برآورد گردید که بر کارایی این مجموعه در آنالیز انساب و تشخیص هویت در این جمعیت اشاره داشت. **نتیجه گیری نهایی**: بر اساس نتایج مشاهده شده، به نظر می رسد نشانگر ریزماهواره می تواند بعنوان یکی از ابزارهای قدرتمند برای ردیابی آلل مندلی از پدر و مادر به فرزندان برای بررسی دقت شجره در جمعیت های دو رگ مورد استفاده قرار گیرد.

واژگانی کلیدی: آزمون انساب، اشتباهات شجره‌ای، نشانگر ریزماهواره، دورگ گیری

مقدمه

درکشورمان ایران، محورهای تحقیقاتی عمده در اصلاح نژاد گوسفند را می‌توان به برآورد پارامترهای ژنتیکی و تخمین وراثت پذیری صفات مختلف، ارزیابی روندژنتیکی صفات اقتصادی در ایستگاه‌های اصلاح نژاد، آمیخته‌گری بین نژادهای بومی و وارداتی مختلف، تعیین معیار مناسب انتخاب، روش‌های علمی بهبود کیفیت لاشه و استفاده ازابزار ژنتیک مولکولی و دیدگاه نوین انتخاب ژنومیک خلاصه نمود. در این راستا، در روش‌های انتخاب بر اساس رکورد فنوتیپی، دلیل اصلی عدم دستیابی به پیشرفت ژنتیکی مورد انتظار را احتمالا می‌توان به مشخص نبودن اهداف اصلاحی، فقدان معیار مناسب انتخاب، نبود اعتبار و صحت رکوردگیری صفات تولیدی وبعضا ثبت نادرست شجره و روابط حیوانات نسبت‌داد (وطنخواه).

از جمله روش‌های پر کاربرد اصلاحی، رویه‌ی بهترین پیش‌بینی نااریب خطی (BLUP) است که به میزان زیادی در پیش‌بینی ارزش ژنتیکی دام‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (مرود ۱۹۹٦). از آنجایی که در روشBLUP تمام اطلاعات موجود در شجره استفاده می شود در مقایسه با روشهای دیگر برآورد دقیقتری را ارائه داده است. پایه و اساس ارزیابی‌های مدل دام مبتنی بر تمام روابط ژنتیکی شناخته شده بین حیوانات موجود در محاسبه است (هندرسون ۱۹۷۵). پیش فرض این مدل اینست که تمام مراحل ثبت شجره‌ها و روابط موجود در آن به طور دقیق ثبت شده است. بنابراین زمانی که اطلاعات ثبت شده در شجره مشکوک به خطا باشد یا از اطلاعات خویشاوندان استفاده شود، برآورد-های این رویه اریب شده و پیامد آن نتایج ارزیابی‌های ژنتیکی با دقت کمتر و روند پیشرفت ژنتیکی آهسته‌تر نسبت به حالت معمول می باشد.

در تحقیقات گاو شیرده ون ولک (a,b ۱۹۷۰) گزارش کرد که در فایل شجره ناصحیح، انساب گاوهای نر می-تواند باعث اریبی برآوردهای وراثت‌پذیری، ارزیابی ژنتیکی با صحت پایین گاو نر و برآوردهای ناصحیح روند پیشرفت ژنتیکی حاصل از انتخاب شود. لذا صحت اطلاعات ثبت شجره می‌تواند نقش بسزایی در تعیین آتی ارزش اصلاحی داشته باشد به طوری‌که خطاهای شجره‌ای دقت انتخاب را کاهش می‌دهد. بر اساس این منطق، اطمینان از ثبت درست روابط والدین موجود در ماتریس روابط خویشاوندی برای پیش‌بینی ارزش ژنتیکی گاوهای نر، ضروری است. شناسایی افراد سهیم در ایجاد شجره و کنترل والدین گام اولیه ضروری در مدیریت ژنتیکی کارآمد در مطالعه‌ی جمعیت‌های دامی می‌باشد. بنابراین ثبت صحیح والدین گله‌های اصلاحی به منظور اجرای یک برنامه‌ی اصلاحی موثر در تمام حیوانات مزرعه لازم است. بطور خلاصه استنتاجات حاصل از مقالات مرتبط ، سه منبع عمده‌ی بروز خطا در شناسایی هویت حیوانات مزرعه‌ی را به ترتیب مفقود شدن پلاک شناسایی به علت نزاع دام‌ها، حصار نامناسب و ورود پیش‌بینی نشده‌ی برخی از قوچ‌ها به آغل‌های مجاور و آمیزش ثبت نشده با میش‌ها و در نهایت خطاهای کاربری و انسانی در هنگام ثبت روابط حیوانات اشاره کرد (کریستین و همکاران ۱۹۸۲).

آزمون انساب، روشی ساده برای اطمینان و کنترل مجدد صحت اطلاعات شجره‌ای ثبت شده است. این آزمون پیش از این با استفاده از نشانگرهای پروتئینی و گروه‌های خونی صورت گرفته، در صورتی که در اواسط دهه ۹۰ آزمونهای مبتنی بر DNA یا تعیین ژنوتیپ جایگزین آن شد (ریوجس وهمکاران ۲۰۰۹). استفاده همزمان از چندین نشانگر ژنتیکی به نام ریزماهواره‌های دسترسی به قابلیت اطمینانی در حدود ۹۹٪ برای تعیین شجره را ممکن ساخت (امیری نیا ۱۳۸۹). ریزماهواره در واقع توالی‌های تکراری دارای ردیف‌های با طول ۱ تا ٦ نوکلئوتید هستند (بویان و همکاران۲۰۱۰). ازمزایای این نشانگرمی‌توان به چند-شکلی بالا، همبارز بودن، پراکندگی یکنواخت در ژنوم و کار کردن آسان با نشانگر ریزماهواره اشاره نمود. معایب این نشانگر نیز می‌توان به الل نول[۱] و استاتر باند[۲]، اشاره نمود.

بنابراین هدف از مطالعه حاضر آزمون انساب در جمعیت گوسفندهای آمیخته به کمک نشانگرهای ریزماهواره در ترکیب‌های ژنتیکی مورد بررسی شامل قزل × بلوچی، مرینوس و بلوچی، مغانی × مرینوس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ماده آزمایشی مطالعه حاضر گوسفندان در حال پرورش در ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز بود که.برای انجام استخراج DNA ازروش

[۱]-Null Allele

[۲]-Sututerr band

جوشاندن استفاده شده است. درابتدا۱۵μL خون برروی کاغذهای®FTA به شعاع۲ در ۲ میلی متر شدو در دمای اتاق خشک شده است. سپس کاغذهای ®FTA حاوی خون را ۲ باربا ۲۰۰ میلی لیترازبافرخالص®FTA به مدت ۱۵ دقیقه شستشوداده شد. درمرحله بعدبااستفاده از ۲۰۰ میلی لیترازبافر TE-1 (شامل1MmTris-HCL با PH=8 و0/1 Mm EDTAبا PH=8) برای ۲ بارآنرا به مدت ۵ دقیقه شستشوداده ودرآخرین مرحله آنرادردمای اتاق خشک کردیم.غلظت‌های DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲٦۰ نانوگرم اندازه‌گیری شد. انتخاب ۵ جایگاه‌های میکروساتلیت به توصیه انجمن ژنتیک و FAO صورت گرفت. در این مطالعه، در قدم اول برای تشخیص چند شکلی از روش pooling و بعد تایید چندشکلی استفاده از روش مولتیپلکس و تکثیر گروهی جایگاهها در یک واکنش صورت گرفت این روش، روش توصیه شده و بسیار مناسب برای کاهش وقت، هزینه و انتخاب نهایی جایگاه‌ها می‌باشد، مبنی روش pooling این است که در یک غلظت مساوی DNA ٥-٤ حیوان را با یکدیگر مخلوط کردیم و سپس جایگاه‌های که تعداد حداقل ۳- ۵ باند را نشان دادند مناسب برای تعیین ژنوتیپ اختصاصی جمعیت‌های در نظر گرفته شد. پس از انجام این کار سایز دقیق جایگاه‌ها یادداشت شد و سپس دمای اتصال هر جایگاه و توالی هر دو آغازگر هر جایگاه تعیین گردید. شایان ذکر است که توالی آغازگرهای هر جایگاه برای اجتناب از اثرات متقابل بین توالی‌ها و ساختارهای ثانویه مزاحم، تکثیر از طریق نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی بررسی و بهترین کاندیداها برای Multiplxing انتخاب شد. جایگاه‌های ریزماهواره ای که حداقل دامنه باندی آنها ۳۰ جفت باز با هم فاصله داشتند مناسب برای گروه‌بندی بدون استفاده از نشاندارکردن آغازگرها انتخاب و با رنگ‌های مختلف نشاندار شد.

برای انجام واکنش زنجیره پلی مراز حجم ۲۵ میکرولیترشامل $MgCl_2$ ۱/۵ mM، ۰/۲ mMdNTP، ۰/۰۱mM ازهرکدام از آغازگرها (Research Biolab)، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۰/۲ واحد از Tag DNA polymerase (شرکت پرومگا) انجام شد. واکنش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر که کاملا اتوماتیک و قابل برنامه‌ریزی است، انجام شد. با توجه به اینکه یکی از معایب تعیین ژنوتیپ میکروساتلیت باندهای غیر اختصاصی است و همچنان نیاز داریم همه جایگاه‌ها در Multiplx PCR با یک برنامه اجرا شوند در این جا اقدام به طراحی برنامه PCR Touch down گردید که جزییات ان شامل یک مرحله‌ی آغازین واسرشت شدن در ۹٤ درجه‌ی سانتیگراد برای ۳ دقیقه، ۱۰ چرخه‌ی ۹٤ درجه (٤٥ ثانیه)، ٦٥ درجه (کاهش یک درجه‌ی سانتیگراد به ازای هر چرخه برای ٦۰ ثانیه) و ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد (٤٥ ثانیه) و به دنبال آن ۲۵ چرخه‌ی ۹٤ درجه‌ی سانتیگراد (٤٥ ثانیه)، ٥٥ درجه‌ی سانتیگراد (۱۲۰ ثانیه) و ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد (٤٥ ثانیه) و یک مرحله‌ی بسط گرمایی ۱۰ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد بود. برای تعیین صحت قطعه تکثیر یافته بعد از PCR، از ژل متافر آگارز٤٪ استفاده شد. مقدار ۸ میکرولیتر از هر نمونه محصول PCR با ۲ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط کرده و در چاهک‌های ۳ به بعد ریخته شد. در چاهک‌های اول مقدار ۳ میکرولیتر از سایز مارکر و در چاهک دوم ۸ میکرولیتر از نمونه کنترل منفی (بدون DNA) ریختیم. بعد از انتقال نمونه‌ها به چاهک، دستگاه الکتروفورز را روشن کردیم. ولتاژ را روی ٦٥ ولت تنظیم کردیم و نهایتا مدت زمان مورد استفاده جهت الکتروفورز ۲ تا ۳ ساعت است که زمان به اندازه باندها وابسته بود.

شکل ۱- فنوتیپ ترکیب‌های ژنتیکی گوسفندان بلوچی × مغانی × مرینوس(بالا) و قزل × بلوچی × مرینوس(پایین)

جدول۱- مشخصات جایگاه‌ها همراه با توالی آغازگرهای استفاده شده برای هر جایگاه

جایگاه	دامنه اندازه آللی (جفت باز)	توالی پرایمر (5´→3´)
ILSTS004	۱۰۰- ۱۲۰	F: CTTAAAATCTGTCTTTCTTCC R: TAGTGTGTATTAGGTTTCTCC
CSSM004	۱۹۶ – ۲۲۰	F: ATGCGTCCTAGAAACTTGAGATTG R:GAAATCATCTGGTCATTATCAGTG
BM1312	۱۰۵-۱۱۹	F:CCATGTGCTGCAACTCTGAC R:GGAATGTTACTGAACCTCTCCG
BM148	۱۵۰-۲۷۰	F:AGGCACAGTACCACCCCTC R:CTCAGCCTCAGCACCATG
CSSM032	۹۷-۲۷۰	F:TTATTTTCAGTGTTTCTAGAAAAC R:TATAATATTGCTATCTGGAAATCC

آنالیز آماری

برای برآورد فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی از نرم‌افزار POPGENE (نسخه ی ۱/۳۱) استفاده شد (یه و همکاران ۱۹۹۹). فراوانی‌های آللی و تعداد آل‌ها به ازای هر جایگاه با محاسبه‌ی مستقیم از ژنوتیپ‌های مشاهده شده برآورد شد. هتروزیگوتی، محتوی اطلاعات پلی-مورفیسم و احتمالات حذف با استفاده از نرم-افزار CERVUS (نسخه ی ۳، مارشال و همکاران ۱۹۹۸) محاسبه شد.نسبت ژنوتیپ هتروزیگوت با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه شد:

$$ph = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2$$

که در این رابطه p_i: فراوانی pامین آلل در بین مجموع آل‌ها است.محتوی اطلاعات پلی مورفیسم(PIC) از

رابطه‌ی زیر به دست آمد:

$$PIC = 1 - \sum_{1=1}^{n} p_i^2 - 2\sum_{i=1}^{l} \sum_{j=1}^{i-1} P_i^2 P_j^2$$

قدرت کنار گذاری[۳]، احتمال اینکه یک فرد انتخاب شده به صورت تصادفی از جمعیت به عنوان والد ممکن یک حیوان بر اساس ژنوتیپ یک والد و نتاج کنار گذاشته شود از رابطه ی جامیسون[٤] (۱۹۹۷و ۱۹۹٤) مورد محاسبه قرار گرفت.که در نهایت پس از شبیه‌سازی داده‌ها، با استفاده از همان نرم‌افزار CERVUS آزمون انساب به منظور یافتن رابطه والد- فرزندی میان نمونه-ها صورت گرفت.

نتایج و بحث

سطح محتوی اطلاعات یک میکروساتلایت، تعدادآلل، هتروزیگوتی مورد انتظار (H_e)، هتروزیگوتی مشاهده شده (H_o)، محتوی دارای اطلاعات پلی‌مورفیسم (PIC) و احتمال کنارگذاری (PE) که همه‌ی این موارد وابسته به تعداد آلل‌ها و توزیع فراوانی این آلل‌ها در جمعیت است در جدول دو نشان داده شده است.

اندازه آلل مشاهده شده در هر مکان در محدوده گزارش شده از مطالعات قبلی می‌باشد. متوسط هتروزیگوسیتی، محتوی اطلاعات چندشکلی و تعداد آلل در هر لوکوس به ترتیب برابر با ۰/٦٦ ، ۰/۵۳ و ٤/۲ بود. میزان احتمال کنارگذاری ترکیبی (PEC) نیز برابر با ۰,۹۹۹۹ می‌باشد که دارای قدرت مناسبی برای انجام آزمون انساب می‌باشد. آلل‌های به ارث رسیده به فرزندان در تمامی موارد با والد سازگار بودند. در مطالعه حاضر از میان موارد مطالعه شده تنها در یک مورد از فرزندان (۳/۵۷ درصد) آزمون شده خطاهای شجره وجود داشت. این مقدار کمتر از دامنه خطاهای شجره نشان داده شده در دیگر جمعیت‌های دامی با استفاده از مارکرهای میکروساتلایت بود (۸/۷ تا ۱۵/۵ درصد در گوسفند ، بارنت و همکاران ۱۹۹۹، ۲ تا ۲۲ درصد در گاو: ویسر و همکاران ۲۰۰۲). که از جمله توجیهات برای مشاهدات متفاوت را می توان به تفاوتهای ساختاری در ماده آزمایشی و نژاد گوسفندان مطالعه حاضر، ساختار شجره و تفاوت در گله، تعداد و نوع جایگاههای میکروساتلایت و در نهایت تفاوت در روش تعیین ژنوتیپ و شرایط الکتروفورز دانست. شکل ۲- آلل‌های بدست آمده برای یک نمونه را در جایگا های مورد مطالعه نشان داده است. هر پیک نشان دهنده یک الل است و وجود دو پیک در یک جایگاه نشان دهنده ژنوتیپ هتروزیگوت برای آن فرد در آن جایگاه است

روابط ژنتیکی بین افراد در جامعه را می‌توان بر اساس هر دو اطلاعات شجره‌نامه و اطلاعات نشانگرهای ژنتیکی تعیین نمود. در روش شجرنامه فرض بر این است که هیچکدام از حیوانات با همدیگر در ارتباط نیستند، که همچنین ممکن است در ثبت اطلاعات اشتباه وجود داشته باشد. نشانگرها روشی برای پیدا کردن روابط ژنتیکی مناسب میان افراد است که افراد مرتبط به هم نسبت به افراد غیر مرتبط دارای آلل‌های مشترک هستند. پس روابط میان هر دو فرد را میتوان با ژنوتیپ‌های بدست آمده از نشانگرها تخمین زد. با این وجود تعیین نوع روابط خویشاوندی تنها بر اساس اطلاعات نشانگرها کار آسانی نیست. برای یک برنامه اصلاحی موفق و بهبود تولید در صنعت دام به شجره-نامه دقیق احتیاج است. شناسایی نادرست از والدین می‌تواند منجر به کاهش پیشرفت ژنتیکی و زیان مالی بزرگ در مدیریت گله و صنعت گاو شود (Cervini*et al.*, 2006). کمترین اشتباه در شناسایی والدین برآورد الگوهای ژنتیکی را بیش از حد به خطر می‌اندازد. شناسایی نادرست والدین تا ۱۱ درصد می‌تواند روند ژنتیکی برای صفات شیر را ۱۵-۱۱ درصد کاهش دهد (بانوس و همکاران ۲۰۰۱). اشتباهات شجره‌ای ممکن است که در شاخص‌های انتخاب انعکاس یابد (روت و همکاران ۲۰۰٦: پریبیل و همکاران ۲۰۰٤). متاسفانه کاربرد گسترده‌ای از تلقیح مصنوعی در دام باعث

---

[۳] Exclusion Power(EPR)

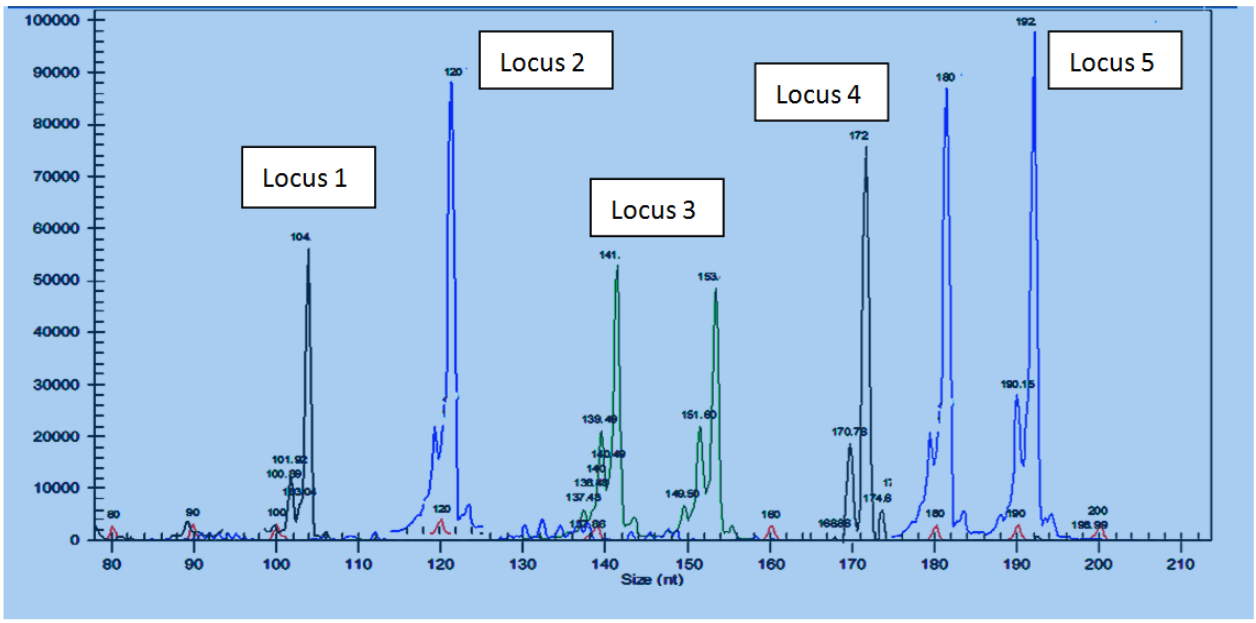
[٤] Jamieson

افزایش خطاهای شجره‌نامه شده است بنابراین، بررسی شجره نامه از طریق آزمون انساب برای رسیدن به پیشرفت ژنتیکی بهینه در دام لازم است. شجره‌نامه نادرست یک مشکل شایع در صنعت دام است و شجره-نامه پدری اشتباه تاثیر منفی قابل توجهی در ارزیابی ژنتیکی ملی و برآورد همخونی دارد.

جدول۲- تعدادآلل مشاهده شده، هتروزیگوستی مورد انتظار و مشاهده شده، محتوی اطلاعات چندشکلی، احتمال کنارگذاری نشانگرهای مورد مطالعه

جایگاه	No	H_o	H_e	PIC	PE
ILSTS004	۷	۰/۹٦۹	۰/۷۰۷	۰/٦٤۷	۰/۳٥٦
CSSM004	٤	۰/۸٤٤	۰/۷٦۰	۰/۷۰۱	۰/۳۲٥
BM1312	۳	۰/۲۸۱	۰/٥۱۲	۰/٤۳۳	۰/٦۱۸
BM148	۳	۰/٤٦۹	۰/٤٦۹	۰/۳٦۸	۰/۷۰٦
CSSM032	٤	۰/۷۱۹	۰/٥۸۹	۰/٤۹۹	۰/٥٥٥
میانگین	٤/۲	۰/٦٥٦	۰/٦۰۷	۰/٥۳۰	

N_e: تعداد الل مشاهده شده، H_o : هتروزیگوستی مشاهده شده،H_e: هتروزیگوستی محاسبه شدهPIC: محتوی اطلاعات چندشکلی، PE: احتمال کنارگذاری



شکل ۲ - الگوی الکتروفورز مویین برای تعیین ژنوتیپ روش 5-Plex نشانگر ریزماهواره‌ای
(1): ILSTS004 (2):BM1312, (3): CSSM004,(4): RM148,(5):CSSM032

تایید والدین برای انتخاب دقیق و بهبود نرخ پیشرفت ژنتیکی مهم است (پولاک ۲۰۰۵، داد و همکاران ۲۰۰۷). شاخص PE برای حل مشکلات برخی از نشانگرهای ژنتیکی در جمعیت است و اغلب در نشانگرهای مولکولی در بررسی شجره‌نامه مورد استفاده قرار می‌گیرد (لویکارت و همکاران ۱۹۹۹). PE والدی، متوسط احتمال مورد انتظاری است که با استفاده از یک جایگاه پلی-مورفیک، نادرست بودن والد فرضی منسوب شده به

عنوان والد حقیقی نشان داده می‌شود. این شاخص به محتوی اطلاعات چندشکلی جایگاه که این خود نیز به تعداد آلل‌ها و فراوانی‌های آللی‌مربوطه مرتبط می‌شود، بستگی دارد. از احتمالات حذف چندین جایگاه امکان محاسبه‌ی PE ترکیبی (PEC) از طریق ضرب مقادیر مربوط به هر جایگاه وجود دارد. مقدار PEC تابعی از تعداد جایگاه‌های مورد آزمون و همچنین محتوی اطلاعات چندشکلی هر جایگاه است. از طریق PE و PEC قابلیت استفاده‌ی جایگاه در یک آنالیز روابط ژنتیکی تعریف می‌شود. از آزمون انساب ژنتیکی می‌توان برای شناسایی والد نر نتاج، زمانی که ماده‌ها در معرض چندین نر قرار گرفته اند، استفاده نمود. اگرچه تعیین درست والد می‌تواند تحت تاثیر فاکتورهایی مربوط به آزمایشگاه و اندازه و ترکیب ژنتیکی گروه‌های پرورشی باشد (لویکارت و همکاران ۱۹۹۹) . در مطالعات دیگری نیز نشان داده شده است که لازم است حداقل از پنج مارکر میکروستلیت با بالاترین مقادیر PE که دارای ۹۷ درصد از کل احتمال کنارگذاری باشند برای به دست آوردن درجه‌ی بالایی اطمینان از حذف والد نادرست استفاده شود (جاکابووا ۲۰۰۲) . در مطالعه‌ای دیگر برای کنترل والدی در گاو یک PE کلی برابر ۰/۸۸ برای دو جایگاه میکروستلیت گزارش شده است (اوشا و همکاران ۱۹۹٤) . مارکلوند و همکاران (۱۹۹٤) هشت جایگاه میکروستلیت را در تست والد برای به دست آوردن احتمال کلی PE برابر ۰/۹۹-۰/۹٦ در نژادهای مختلف اسب مورد آنالیز قرار دادند. میزان اشتباه ۳/۵۷ درصد در میان شجره مورد مطالعه تقریبا مشابه خطاهای شجره نامه گزارش شدهدر چهار نژاد گوسفند در فرانسه (۱۰ – ۱ درصد لوروی ۲۰۱۱) و در گله‌های گوسفند نیوزلند (۹/٤– ۰/۵درصد کرافورد ۱۹۹۳) است. در مطالعات مختلف از گاو (ویشر و همکاران ۲۰۰۲ ، بارون و همکاران ۲۰۰۲، بانوس و همکاران ۲۰۰۱ و گلدرمن و همکاران ۱۹۸٦) نرخ اشتباه پیدا شده با نشانگرهای ریزماهواره‌ای بین ۳٦ – ٤ درصدبوده است. مطالعات متعدد در گاو با شبیه‌سازی و داده‌های واقعی نشان داد که نرخ اشتباه ۵ درصد کمترین اثر را در برآورد ارزش ژنتیکی دارد (ون ولک ۱۹۷۰). از این رو انتظار می‌رود که نرخ اشتباه شجره‌ای در این مطالعه (۳/۵۷ درصد) حداقل تاثیر را بر ارزیابی ژنتیکی داشته باشد. نشانگرهای ریزماهواره مبنی آزمون انساب هستند برای تایید روابط خویشاوندی و یا تعیین انساب در مورد جفت‌گیری‌های کنترل نشده و یا چند نری، که این روش برای بسیاری از گونه‌های دیگر توسعه یافته‌اند، از جمله سگ (دونیس و همکاران ۲۰۰٤) ، گربه (لیپینسکی و همکاران ۲۰۰۷) ، اسب (توزاکی و همکاران ۲۰۰۱) ، گاو(انانمن و همکاران ۲۰۰۷)، بز و گوسفند (گلوواتسکی و همکاران ۲۰۰۷) را می توان نام برد . برای شناسایی والد واقعی به احتمال کنارگذاری ترکیبی ۰,۰۰۱ احتیاج است (شرمن وهمکاران ۲۰۰٤). یافته‌های حاضر سودمندی میکروساتلایت‌های بررسی شده را برای کنترل والدین در گوسفند تایید می‌کند.

نتیجه گیری نهایی

بر اساس نتایج مشاهده شده، به نظر می رسد نشانگر ریزماهواره می تواند بعنوان یکی از ابزارهای قدرتمند برای ردیابی آلل مندلی از پدر و مادر به فرزندان برای بررسی دقت شجره در جمعیت های دو رگ مورد استفاده قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

امیری نیا، س۱۳۸۹. بررسی ساختار ژنتیکی گاومیش‌های بومی ایران با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره . طرح تحقیقات موسسه تحقیقات علوم دامی کشور.

وطن خواه م، مرادی شهر بابک م، نجاتی جوارمی ا، میرائی آشتیانی ر و واعظ ترشیزی ر، ۱۳۹۰. مروری بر اصلاح نژاد گوسفند در ایران. اولین کنگرهٔ علوم دامی و آبزیان کشور، دانشگاه تهران.

Banos G, Wiggans GR and Powell RL, 2001. Impact of Paternity Errors in Cow Identification on Genetic Evaluations and International Comparisons. Journal Dairy Science 84: 2523–2529.

Barnett N, Purvis I, Van Hest B and Franklin I, 1999. The accuracy of current dam pedigree recording strategies employed by stud Merino breeders. In: Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics. Mandurah, Western Australia, July 4–7, 13: 373–376.

Baron E E, Martinez ML, Verneque RS and Coutinho LL, 2002. Parentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in Gir cattle. Genetics and Molecular Biology 25: 389-394.

Bhuyan DK, Sangwan ML, GoleVC and Sethi RK, 2010. Studies on DNAfingerprinting in Murrah buffaloes using microsatellite markers. Indian Journal Biotechnology 9: 367-370.

Christensen LG, Madsen P and Petersen J, 1982. The influence of incorrect sireidentification on the estimate of genetic parameters and breeding values. P. 200-208. World Congress of Genetics Applied to Livestock Production Publications. 1982.Madrid. Spain.

DeNise S, Johnston E, Halverson J and Edwards J,Marshall K, Rosenfeld D, McKenna S and Sharp T, 2004. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. Animal Genetics 35: 14–17.

Dodds KG, ML Tate and JA Sise, 2005. Genetic evaluation using parentage information from genetic markers. Journal of Animal Science 83: 2271-2279.

Geldermann H, Pieper U and Weber WE, 1986. Effect of Misidentification on theEstimation of Breeding Value and Heritability in Cattle. Journal of Animal Science 63:1759-1768.

Henderson CR, 1975. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. Biometrics 31:423-447.

Jakabova D and Trandzik J, 2002. Effectiveness of six highly polymorphic microsatellite markers in resolving paternity cases in Thoroughbred horses in Slovakia. Czech Journal of Animal Science 47 : 497-501.

Jamieson A, 1994. The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic seriesfor (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. Animal Genetics 1:37:44.

Jamieson A and Taylor SCS, 1997. Comparison of three probability formulae forparentage exclusion. Animal Genetics 28:397–400.

Leroy G, Danchin-Burge C, Palhiere I, Baumung R and Fritz S, 2011. An ABC estimate of pedigree error rates: application in dog, sheep and cattle breeds. Animal Genetics 43, 309–314.

Luikart G, Biju-Duval MP, Ertugrul Y, Zagdsuren C, Maudet C and Taberlet P, 1999. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (Capra hircus). Animal Genetics 30: 431-438.

Marklund S, Ellegren H, Eriksson S, Sandberg K and Andersson L, 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. Animal Genetics 25: 19-23.

Marshall TC, Slate J, Kruuk L and Pemberton JM, 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology 7: 639-655.

Mrode RA, 1996. Linear Models for the Prediction of Animal Breeding Values. Biddles, Guildford, 184 pp. 3 Edition.

Pollak EJ, 2005. Application and impact of new genetic technologies on beef cattle breeding: a “real world” perspective. Australian Journal of Experimental Agriculture 45: 739-748.

Rehout V, Hradecka E and Citek J 2006. Evaluation of parentage testing in the Czeck population of Holstein cattle. Czech Journal of Animal Science 12: 503-509.

Riojas-Valdes VM, Gomez-de-la-Fuente JC, Garza-Lozano JM, Gallardo-Blanco DC, Tellitu-Schutz JN, Wong-Gonzalez A, Davalos-Aranda G and Salinas-Melendez JA, 2009. Exclusion probabilities of 8 DNA microsatellites in 6 cattle breeds from Northeast Mexico. Journal Animal Veterinary Advence 8: 62-66.

Tozaki T, H Kakoi S Mashima KI Hirota, T Hasegawa N Ishida, N Miura NH Choi-Miura and M Tomita 2001.Population Study and Validation of Paternity Testing for Thoroughbred Horses by 15 microsatellite Loci. Journal Veterinary Medical Science 63:1191-1197.

Usha AP, Simpson SP and Williams JL 1994. Evaluation of microsatellite markers for parentage verification. In: Proceedings of the 24th ISAG Conference. Animal Genetics. 25: 41.

Van Eenennaam AL, Weaber RL, Drake DJ, Penedo MCT, Quaas RL, Garrick DJ and Pollak EJ, 2007. DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. Journal of Animal Science 85:3159-3169.

Van Vleck L D, 1970a. Misidentification in estimating the paternal sib correlation. Journal of Dairy Science S31469.

Van Vleck,L D, 1970b. Misidentification and sire evaluation. Journal of Dairy Science 53: 1697.

Visscher PM, Woolliams JA, Smith D and Williams JL, 2002. Estimation of pedigree errors in the UK dairy population using microsatellite markers and the impact on selection. Journal of Dairy Science 85:2368-2375.

Yeh, Francis C, Rong-cai Yang and Tim Boyle, 1999. POPGENE Ver. 3.31. Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetic Analysis.

Microsatellite markers for paternity testing of crossbred sheep populations

K Kasraei[1], S A Rafat[2*], J Shoja[3], A Javanmard[4]

Revised: July 06, 2015 Accepted: April 09, 2016

[1234]MSc student, Associate Professor, Professor and Assistant Professor, respectivly, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: Email: Rafata@tabrizu.ac.ir

Abstract

BACKGROUND: Pedigree information and phenotypic records are the key features in animal genetics and breeding. **OBJECTIVES**: This study was aimed to investigate and verify pedigree relations among 32 crossbred individuals who were genotyped for five microsatellite as one multiplex PCR set. **METHODS**: Pedigree relationships in a crossbred population of lambs reared in Tabriz University, Khalatpoushan research station was studied in which four rams were genotyped with 28 progenies. Four sires and 28 offspring were analyzed. Descriptive statistics of molecular raw data using a combination of software POPGENE and power indicator diagnosis was calculated using the software CERVUS. **RESULTS:** The results show that the candidate used microsatellite loci showed high levels of genetic diversity and polymorphism. In fact make such an observation precondition for the continuation of the analysis that follows is based on parentage tests. Also, the combined probability of exclusion values obtained per all loci in both parentage and identification, analysis was 0.99 that indicate the high efficiency of study marker set for parentage and identification test in this population. As results this study showed incorrect pedigree in one individual of 28 ones with known parental relations. **CONCLUSIONS:** In conclusion, based on observed outputs, microsatellite markers seems could be powerful tools for tracing Mendelian allele from parents to offspring for evaluation of pedigrees accuracy.

Keywords: Paternity test, Pedigree errors, Microsatellite, Crossbreeding