نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد هشتم، شماره چهارم، ۱۳۹۹
http://ejrr.gau.ac.ir
۳۹-٥٤
DOI: 10.22069/ejrr.2021.17558.1732

تاثیر تعداد و نوع نشانگرهای ریزماهواره بر برآورد پارامترهای جمعیتی درمطالعات تنوع ژنتیکی

***منا هاشمی[۱]، قدرت رحیمی میانجی[۲]، محمدحسین بنابازی[۳]، فیلیپو بیسکارینی[۴] و پابلو اوروزکو ترونگل[۵]**

[۱]دانشجو دکتری و [۲]استاد گروه ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده علوم دامی وشیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[۳]استادیار پژوهشی، بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران،
[٤]محقق ارشد، شورای تحقیقات ملی (CNR) ایتالیا، [٥]استاد ارشد علوم زیستی دانشگاه کاردیف، ولز

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۱٦؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۸

چکیده

سابقه و هدف: ریزماهواره‌ها نواحی تکراری در دی.ان.آشامل آرایه‌های همگنی از موتیف‌های مونو، دی، تری، تترا، پنتا و هگزا نوکلئوتیدی با طول کمتر از یک کیلو جفت باز هستند که به صورت غیر تصادفی در سطح ژنوم پراکنده‌اند. تعداد و تراکم ریزماهواره‌ها در گونه‌های مختلف متفاوت است. حتی در گونه‌های بسیار نزدیک به هم مثل انسان و شامپانزه نیز تفاوت‌هایی وجود دارد. فراوانی موتیف‌های ریزماهواره‌ایی نیز در موجودات مختلف، متفاوت و دارای نرخ جهش متفاوتی می‌باشند. در ژنوم پستانداران، ریزماهواره‌های دی نوکلئوتیدی فراوانترین و پس از آنها ریزماهواره‌های مونو و تترا نوکلئوتیدی از وفور بالایی برخوردارند. تکرارهای تری نوکلئوتیدی معمولاً در گیاهان فراوان‌تر هستند. اما بررسی اثر این موتیف‌های ریزماهواره‌ای متفاوت روی برآورد پارامترهای تنوع ژنتیکی و یا ساختار ژنتیکی در جمعیت‌ها بحثی است که کمتر به آن توجه شده است.

مواد و روش‌ها: این پژوهش با استفاده از فایل نشانگرهای ریزماهواره‌ای حاصل از ۳٦ نمونه از گوسفندان اهلی و وحشی ایرانی از توالی کل ژنوم گوسفندان به روش توالی یابی نسل جدید، تعداد ۱٦۳۹۷۳ نشانگر ریزماهواره را شناسایی کرد. پراکنش نمونه‌های اهلی مربوط به نواحی شمال غرب کشور و نمونه‌های وحشی مربوط به نواحی مرکزی و شمال غرب کشور می‌باشند. پس از طی مراحل مختلف جهت مرتب سازی و فیلتراسیون جایگاه‌ها در نرم افزارهای Samtools و VCFtools نشانگرها در چهار فایل جداگانه شامل نشانگرهای دی، تری و تترا نوکلئوتیدی و نیز فایلی حاوی ترکیبی از هرسه نشانگر دسته بندی شدند. سپس اسکریپتی در نرم‌افزار R جهت تهیه زیرمجموعه‌های مختلفی شامل ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ٥۰، ٦۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱٥۰، ۲۰۰، ۲٥۰، ۳۰۰، ٤۰۰ و ٥۰۰ نشانگر از هر یک از انواع موتیف‌ها تهیه نوشته شد و شش پارامتر معمول مورد استفاده در مطالعات تنوع ژنتیکی از جمله هتروزیگوسیته مشاهده شده، هتروزیگوسیته مورد انتظار، شاخص تنوع ئنی، شاخص شانون، غنای آللی و ضریب همخونی با استفاده از هر یک از انواع موتیف‌ها و تعداد مختلفی از ریزماهواره‌ها در نرم افزار MSA (نسخه ٤.۰٥) محاسبه شد. برای هر پارامتر ۱۰ تکرار در نظر گرفته شد. در نهایت میانگین و واریانس هر پارامتر در بین ۱۰ تکرار محاسبه و نتایج به صورت نمودارهای باکس پلات در نرم‌افزار R (نسخه ۳.۳.۳) گزارش شد. برای بررسی آماری اختلاف‌هایی

*نویسنده مسئول: mona.hashemi1012@gmail.com

که در مقدار برآورد پارامترهای مختلف با استفاده از تعداد و انواع مختلف موتیف‌های ریزماهواره‌ای مشاهده شد، از روش تحلیل واریانس برای آزمون فرض مقایسه میانگین زیرمجموعه‌های مختلف در نرم‌افزار R استفاده شد.

یافته‌ها: برآورد شش پارامتر با استفاده از تعداد و موتیف‌های مختلف نشانگرهای ریزماهواره‌ایی نتایج متفاوتی را نشان دادند. به‌طوری‌که در هر زیر مجموعه، پارامتر برآورده شده با استفاده از موتیف‌های نوع دی مقدار عددی بالاتری را به خود اختصاص داد. همین‌طور در اکثر پارامترهای مورد بررسی بیشترین مقدار برآورده شده برای آن پارامتر با استفاده از ٤٠ نشانگر دی نوکلئوتیدی و کمترین آن با استفاده از ۱۰ نشانگر تری و یا تترا نوکلئوتیدی به دست آمده است. برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار در نتایج به‌دست آمده از برآورد پارامترها با استفاده از تعداد و انواع مختلف موتیف‌های ریزماهواره‌ای از تکنیک آنالیز واریانس برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. در مواردی که اجرای مدل نتایج معنی داری نشان داد به منظور بررسی دوبه‌دوی زیرمجموعه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی دار نشان دادند از روش مقایسه میانگین توکی استفاده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش برتری استفاده از موتیف‌های نوع دی نوکلئوتیدی در مطالعات تنوع ژنتیکی بر جمعیت گوسفند را نشان داد. همینطور نتایج این پژوهش لزوم استفاده از حداقل ۵۰ جایگاه ریزماهوره‌ای را برای داشتن برآوردهایی باثبات از پارامترهای جمعیتی در مطالعات تنوع ژنتیکی پیشنهاد می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، گوسفند، موتیف‌های ریزماهواره‌ایی، نشانگرهای ریزماهواره

مقدمه

حفظ تنوع ژنتیکی جمعیت‌های دامی اساس بقا دراز مدت بیشتر گونه‌هاست که میبایست بر اساس اطلاعات جامعی از ساختار جمعیت‌ها و تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها مورد بررسی قرار گیرد (۲۰). در بررسی این تنوع، نشانگرهای ریزماهواره مدت زمان بسیاری است که به عنوان ابزاری سودمند در این مطالعات شناخته شده‌اند (۲۰). ریزماهواره‌ها دسته خاصی از دئوکسی نوکلئوتید اسید[1] تکراری شامل آرایه همگنی از موتیف‌های مونو، دی، تری، تترا، پنتا و هگزا نوکلئوتیدی با طول کمتر از یک کیلو جفت باز هستند که به صورت غیر تصادفی در سطح ژنوم پراکنده‌اند(۱). ریزماهواره‌ها نسبت به جهش‌های نقطه‌ای نرخ جهش بالایی (10^{-2} تا 10^{-6}) دارند. ناپایداری دی.ان.آ ریزماهواره‌ها از یک مکانیسم جهش خاصی بنام سرخوردگی دی.ان.آ[2] ایجاد می شوند (۲۱). در سرخوردگی دئوکسی نوکلئوتید اسید آنزیمی دخیل نیست و علت آن به ناپایداری ذاتی دئوکسی نوکلئوتید اسید ریزماهواره‌ها ارتباط دارد. به دلیل ماهیت تکراری ریزماهواره‌ها، دو رشته کروموزوم می‌توانند در مقابل یکدیگر دچار سرخوردگی شوند. در حین سنتز دئوکسی نوکلئوتید اسید سرخوردگی منجر به افزایش یا کاهش یک یا چند واحد تکراری می‌شود. بسیاری از این حذف/ اضافه‌ها توسط سیستم تعمیری عدم تطابق[3] اصلاح می‌شود و تنها بخش کوچکی که با این سیستم اصلاح نشده است به صورت جهش‌های ریزماهواره‌ای باقی می‌مانند (٦). در ژنوم انسان ریزماهواره‌ها حدوداً ۳ درصد ژنوم را تشکیل میدهند (۱۳). تعداد و تراکم ریزماهواره‌ها در گونه‌های مختلف متفاوت است. حتی در گونه‌های بسیار نزدیک به هم مثل انسان و شامپانزه نیز تفاوت‌هایی وجود دارد (۲۷). در ژنوم پستانداران، ریزماهواره‌های دی نوکلئوتیدی فراوانترین

1. DNA
2. DNA Slippage
3. Mismatch repairing system

و پس از آنها ریزماهواره‌های مونو و تترا نوکلئوتیدی از وفور بالایی برخوردارند. تکرارهای تری نوکلئوتیدی معمولاً در گیاهان فراوان‌تر هستند. دلیل این تفاوت را به مکانیسم‌های مختلف جهش و یا تعمیر موتیف‌های ریزماهواره ای در درون گونه‌ها نسبت داده‌اند. همچنین ممکن است در انتخاب موتیف‌های ریزماهواره ای مختلف در موجودات مختلف نیز تفاوت وجود داشته باشد (۷). اما بررسی اینکه آیا استفاده از موتیف‌های ریزماهواره‌ایی متفاوت اثری بر برآورد نتایج پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده در جمعیت‌ها و تعیین ساختار جمعیت‌ها دارد یا خیر، بحثی است که کمتر به آن پرداخته شده است.

نشانگرهای ریزماهواره در بیشتر گونه‌ها از وفور بسیار بالایی برخوردار هستند. اما از آنجا که جداسازی آن‌ها به سرمایه گذاری قابل توجهی نیاز دارد، بسیاری از مطالعاتی که تاکنون از آنها جهت تحلیل تاریخچه تکاملی جمعیت‌ها و گونه‌ها استفاده کرده‌اند، تنها به استفاده از تعداد محدودی از این نشانگرها (معمولاً کمتر از۵۰) بسنده کرده‌اند (۵). امروزه با پیشرفت‌هایی که در زمینه توالی یابی ژنوم صورت گرفته می‌توان به تعداد زیادی از این نشانگرها دسترسی داشت. این مطالعه با دسترسی گسترده به این نشانگرها در ژنوم گوسفند به بررسی تاثیر تعداد و نیز نوع موتیف نشانگرهای ریزماهواره‌ای، بر نتایج حاصل از مطالعه تنوع ژنتیکی و برآورد پارامترهای ژنتیکی می‌پردازد.

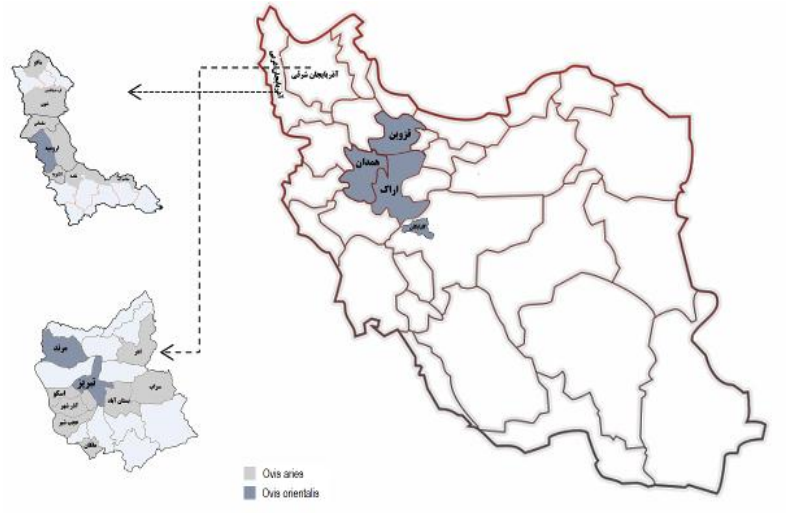
مواد و روش‌ها

داده‌ها: این مطالعه روی تعداد ۳۶ نمونه از جمعیت گوسفندان ایرانی (۲۰ نمونه از جمعیت گوسفندان اهلی[1] با شناسه رده بندی ۹۴۴۰ در سایت NCBI و ۱۶ نمونه از گونه وحشی[2] با شناسه رده بندی ٤٦٩٧٩٦ در سایت NCBI) که توالی کل ژنوم آنها به روش توالی یابی نسل جدید[3] موجود و فراخوانی واریانت‌ها[4] بر روی آنها انجام گرفته بود صورت گرفت. این مطالعه بر روی داده‌های ایجاد شده از پروژه NextGene به آدرس "https://projects.ensembl.org/nextgen/" دراختیار قرار گرفت. برنامه چهارچوب هفتم اتحادیه اروپا با کد FP7/2010-2014 سرمایه گذاری بر روی این پروژه را تحت قرارداد اعطای شماره ۲٤٤۳٥٦ بر عهده دارد. در داده‌های مورد مطالعه پراکنش نمونه‌های اهلی مربوط به نواحی شمال غرب کشور و نمونه‌های وحشی مربوط به نواحی مرکزی و شمال غرب کشور می‌باشند. شکل ۱ موقعیت جغرافیایی محل‌های نمونه گیری را نشان می‌دهد.

آماده سازی داده‌ها: برای شروع، صحت موقعیت مکانی و نوع موتیف جایگاه‌ها در فایل داده موجود با تطبیق دادن تعدادی جایگاه به صورت نمونه روی ژنوم مرجع گوسفند (نسخه ۳.۱) "با شماره دسترسی GCA_000298735.1 در سایت NCBI" مورد بررسی قرار گرفت. این کار در برنامه Samtools (۱٤ و ۱٥) صورت گرفت.

نتایج به دست آمده مکان و نوع موتیف را در تمام نمونه‌های مورد بررسی، صحیح نشان داد. تعداد ۱٦۳۹۷۳ جایگاه از انواع ریزماهواره‌های مونو، دی، تری و تترا نوکلئوتیدی در فایل موجود شناسایی شد. در فایلی جداگانه جایگاه‌های تک شکل شمارش و ذخیره شد. نوع موتیف و شمارش تعداد واحد تکراری آن باید در آلل مرجع[5] و آلل (های) جایگزین[6] یک شکل باشد.

1. Ovis aries
2. Ovis orientalis
3. Next Generation Sequencing (NGS)
4. Variant Calling
5. Reference allele
6. Alternative allele



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق تحت نمونه‌گیری

Figure 1. Geographical location of samples

در فایل داده اولیه مشاهده شد که در برخی جایگاه‌ها علاوه بر تکرار موتیف، یک و یا دو نوکلئوتید اضافی دیگر نیز خوانده شده است که این امر منجر به شناسایی اشتباه یک آلل در آن جایگاه و نیز موجب افزایش تعداد آلل در جمعیت می‌شود. این جایگاه‌ها در فایل داده اصلی شناسایی و با تهیه اسکریپتی در پایتون سعی شد تا تعداد ۲۸٤ جایگاه را به جای حذف به ادامه آنالیزها برگردانیم. سپس با توجه به یکی از اهداف این پژوهش مبنی بر مقایسه اثر نوع موتیف بر نتایج حاصل از آنالیزهای تنوع ژنتیکی، سه فایل جداگانه در قالب فرمت خوانش واریانت‌ها[1] از ریزماهواره‌های دی، تری و تترا نوکلئوتیدی تهیه شد. برای این کار از دستورات مختلف برنامه VCFtools استفاده شد (٤). همچنین فایلی دیگر شامل هر سه نوع موتیف که از این به بعد از آن با عنوان mix-loci نام برده می‌شود، تهیه شد. در این بین از آنجا که جایگاه‌های تک شکل اطلاعاتی در زمینه میزان تنوع جمعیت در اختیار قرار نمی‌دهند و همچنین ریزماهواره‌های مونو نوکلئوتیدی نیز از آنجا که روند تکاملی آنها تا به حال به خوبی بررسی نشده است، از ادامه آنالیزهای تنوع ژنتیکی کنار گذاشته شدند. در ادامه برای بررسی اثر تعداد نشانگر زیرمجموعه‌های مختلفی از هر یک از انواع موتیف ایجاد شد. برای موتیف‌های نوع دی و mix-loci این زیرمجموعه‌ها به‌صورت ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ۵۰، ٦۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ٤۰۰ و ۵۰۰ نشانگر و برای موتیف‌های نوع تری و تترا به صورت ۱۰ الی ۱۰۰ نشانگر بود. این زیرمجموعه‌ها با استفاده از اسکریپتی که در نرم افزار R به همین منظور نوشته شد، ایجاد شدند. این اسکریپت در داخل فایل موتیف‌های ریزماهواره‌ای مختلف به صورت تصادفی تعداد مورد نظر نشانگرها را انتخاب میکند. نمونه گیری با استفاده از این اسکریپت از داخل هر فایل و برای هر تعداد نشانگر ۱۰ بار تکرار شد.

برآورد پارامترهای تنوع ژنتیکی: شش پارامتر معمول تنوع ژنتیکی شامل هتروزیگوسیته مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص اطلاعات شانون، تنوع ژنی نئی، غنای آللی[2] وضریب همخونی[3] در این پژوهش در

1. Variant Call Format (VCF)

2. Allelic richness

3. F_{IS}

نرم‌افزار MSA (نسخه ٤.٠٥) (٥) محاسبه شدند. در بین نرم‌افزارهای موجود جهت انجام آنالیزهای تنوع ژنتیکی نرم افزار MSA به دلیل توانایی در آنالیز تعداد زیادی از داده‌های چند آللی انتخاب شد. برای تبدیل فرمت داده‌ها از فرمت خوانش واریانت‌ها به فرمت مورد قبول برنامه MSA اسکریپتی تحت زبان پایتون نوشته شد. این اسکریپ در فایل داده‌های موجود، فرمت خوانش آلل‌ها را از تعداد تکرار موتیف (در فایل‌های با فرمت خوانش واریانت‌ها) به اندازه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] که فرمت مورد نیاز برنامه MSA می‌باشد تغییر می‌دهد. این نرم افزار پارامترها را براساس هر جمعیت و نیز هر جایگاه گزارش می‌کند. محاسبه پارامترها برای هر یک از ۱۰ تکرار در زیرمجموعه‌های مختلف نشانگری به صورت جداگانه انجام گرفت. سپس میانگین و واریانس هر پارامتر در بین ۱۰ تکرار محاسبه شد و در نهایت نتایج به صورت نمودارهای باکس پلات در نرم‌افزار R (نسخه ۳.۳.۳) گزارش شدند.

آنالیز آماری

بررسی آماری اختلاف‌هایی که در مقدار برآورد پارامترهای مختلف با استفاده از تعداد و انواع مختلف موتیف‌های ریزماهواره‌ای به دست آمد به روش تحلیل واریانس تحت مدل ذکر شده در زیر در نرم‌افزار R نسخه (۳.۳.۳) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این مدل برای هر یک از شش پارامتر مورد بررسی در دو جمعیت اهلی و وحشی به صورت جداگانه اجرا شد:

1) $y_{ij}=\mu+\alpha_i+e_{ij}$

که در آن y_{ij} پارامتر تنوع ژنتیکی محاسبه شده توسط iامین زیرمجموعه در jامین تکرار، μ میانگین، α_i تعداد جایگاه/نوع موتیف در زیرمجموعه i و e_{ij} اثر تصادفی باقیمانده است. در مواردی که مدل اجرا شده، تفاوت معنی دار در مقدار پارامترهای محاسبه شده با تعداد/موتیف‌های نشانگری مختلف را نشان دهد، جهت یافتن زیرمجموعه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی دار داشتند از آزمون مقایسه میانگین به روش توکی استفاده شد.

نتایج و بحث

شمارش تعداد و نوع موتیف‌های ریزماهواره‌ایی در جمعیت مورد مطالعه: تاکنون در مطالعات بسیاری از نشانگرهای ریزماهواره (بدون تاکید بر نوع ریزماهواره استفاده شده) برای بررسی ساختار جمعیت‌ها و برآورد پارامترهای ژنتیکی در گونه‌های مختلفی از موجودات استفاده شده است (۲، ۱۷، ۱۹). طی مطالعات صورت گرفته (۷، ۱۲، ۱۳) فراوانی موتیف‌های ریزماهواره ایی و نرخ جهش در موجودات متفاوت است. برای مثال مونو ریزماهواره‌ها در ناحیه اینترونی پریمات‌ها و باکتری اشریشیا کلای فراوانتر از موتیف‌های دی و تری نوکلئوتیدی گزارش شده است. ریزماهواره‌های دی نوکلئوتیدی بیشتر در ژنوم پستاندارانی چون جوندگان گزارش شده است (۲۰) و تری نوکلئوتیدها در مقایسه با سایر موتیف‌های ریزماهواره‌ای بیشتر در ژنوم گیاهان گزارش شده است (۱). در این مطالعه در دو جمعیت گوسفند مورد بررسی از ۱٦۳۹۷۳ جایگاه ریز ماهواره‌ای موجود، مونو ریزماهواره‌ها بیشترین تعداد (۸٦۸٥٤ جایگاه) را به خود اختصاص دادند. این جایگاه‌ها به دلیل اینکه روند تکاملی آنها به خوبی مورد بررسی قرار نگرفته از ادامه آنالیزها کنار گذاشته شدند. حذف ریزماهواره‌های مونونوکلئوتیدی سبب کاهش تعداد نشانگرها به تعداد ۹۷۸۲ جایگاه شد. از تعداد ۵۷۳۹ جایگاه دارای اشکال نوکلئوتید اضافی تعداد ۲۸٤ جایگاه به ادامه آنالیزها برگردانده شدند. درنهایت برآورد پارامترهای ژنتیکی با استفاده از تعداد ۳۹۹۷ ریزماهواره دی، ۱۱۵ ریزماهواره تری و ۱٤۰

1. PCR

ریزماهواره تترا نوکلئوتیدی، انجام گرفت. جدول ۱ شمارش تعداد جایگاه‌ها در فایل داده اولیه و نیز در مراحل مختلف آماده سازی داده‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۱- تعداد جایگاه‌های ریزماهواره در حین مراحل آماده سازی نمونه‌ها

Table 1. Number of microsatellite loci during sample preparation steps

تترا ریزماهواره‌ها tetra-micros	تری ریزماهواره‌ها tri-micros	دی ریزماهواره‌ها di-micros	مونو ریزماهواره‌ها mono-micros	کل Total	
19779	7061	50279	86854	163973	تعداد اولیه جایگاه‌ها Initial number of loci
18701	6664	41972	56812	124149	جایگاه‌های تک شکل Monomorphic loci
1078	397	8307	30042	39824	جایگاه‌های چند شکل Polymorphic loci
999	228	4512	0	5739	جایگاه‌های چند شکل دارای مشکل آلل خوانی Polymorphic loci with allele calling problem
79	169	3795	30042	34085	جایگاه‌های چند شکل بدون مشکل آلل خوانی Polymorphic loci with no allele calling problem
146	115	4066	30042	34369	جایگاه‌های چند شکل پس از کاربرد اسکریپ Polymorphic loci with using script
140	115	3997	0	4252	جایگاه‌های نهایی Final loci

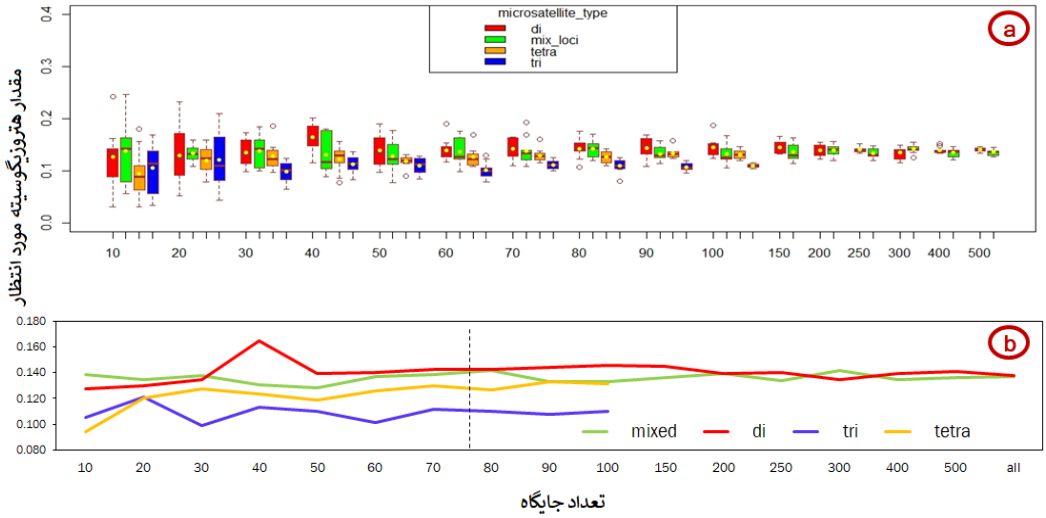
پارامترهای تنوع ژنتیکی: منطقه خاورمیانه به دلیل نزدیکی به ناحیه هلال بارور[1] که یکی از مراکز اصلی اهلی سازی میباشد همیشه مورد توجه محققین بوده است. ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی دامهای این منطقه در مطالعات بسیاری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است. برای مثال وحیدی وهمکاران (۲۰۱٦) تنوع ژنتیکی و انشقاق ۱۰ تیپ مختلف از گوسفندان دنبه دار ایرانی را با استفاده از ۱۸ نشانگر ریزماهواره‌ای مورد بررسی قرار داده و سطح بالایی از تنوع را در بین تیپ‌های مورد بررسی نشان دادند (۲۳). در اکثر مطالعات انجام گرفته بر روی تیپ‌های مختلف گوسفندان ایرانی از تعداد ٤ الی ۲۰جایگاه ریزماهواره‌ای برای آنالیز تنوع ژنتیکی در درون و بین جمعیت‌های مورد بررسی استفاده شده است که همگی تنوع ژنتیکی بالایی را در جمعیت‌های مورد بررسی خود گزارش کرده‌اند (۸، ۱٦، ۲۳، ۲٤، ۲۵، ۲۷). در این مطالعه در آنالیز پارامترهای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد بررسی تعداد ۹ جایگاه دی نوکلئوتیدی خطای "آلل بیش از حد بزرگ" را نشان دادند. این جایگاه‌ها scaffold بودندکه از ادامه آنالیزها کنار گذاشته شدند و ادامه محاسبات با تعداد ٤۲٤۳ نشانگر (۳۹۸۸ریزماهواره دی نوکلئوتیدی) ادامه یافت. محاسبه شش پارامتر تنوع ژنتیکی با استفاده از زیرمجموعه‌های تعریف شده در جمعیت گوسفندان اهلی نتایج را بدین شرح ارائه داد: هتروزیگوسیته مشاهده شده (بیشترین مقدار ۰/۰۷ با ٤۰ نشانگر دی، کمترین مقدار ۰/۰۳۱ با ۱۰ نشانگر تترا)، هتروزیگوسیته مورد انتظار (بیشترین مقدار ۰/۱٦۵ با ٤۰ نشانگر دی، کمترین مقدار ۰/۰۹٤ با ۱۰ نشانگر تترا)، شاخص تنوع نئی (بیشترین مقدار ۰/۲٦٤ با ٤۰ نشانگر دی، کمترین مقدار ۰/۱۷٤ با ۳۰ نشانگر تری)، شاخص شانون (بیشترین مقدار ۰/۲۷۹ با ٤۰ نشانگر دی، کمترین مقدار ۰/۱۵۵ با ۱۰ نشانگر تترا)، غنای آللی (بیشترین مقدار ۱/۸۱با ٤۰ نشانگر دی، کمترین مقدار ۱/٤۵ با ۱۰ نشانگرتری). ضریب همخونی (بیشترین مقدار ۰/۵۰٤ با۳۰ نشانگر mix-loci، کمترین مقدار ۰/۳۳٦ با ۱۰ نشانگر دی).

1. Fertile Crescent

در جمعیت گوسفندان وحشی نیز نتایج بدین صورت بود: هتروزیگوسیته مشاهده شده (بیشترین مقدار ۰/۰۷٤ با ٤۰ نشانگر دی، کمترین مقدار ۰/۰٤٥ با ۸۰ نشانگر تترا)، هتروزیگوسیته مورد انتظار (بیشترین مقدار ۰/۱۹۲ با ٤۰ نشانگر دی، کمترین مقدار ۰/۱۱٤ با ٦۰ نشانگر تری)، شاخص تنوع نئی (بیشترین مقدار۰/۲٦۷ با ٤۰ نشانگر دی، کمترین مقدار۰/۱۸۳ با ٦۰ نشانگر تری)، شاخص شانون (بیشترین مقدار ۰/۳۲٤ با ۱۰ نشانگر mix-loci، کمترین مقدار ۰/۱۸٥ با ۷۰ نشانگر تری)، غنای آللی (بیشترین مقدار ۱/۹۷ با ٤۰ نشانگر mix-loci، کمترین مقدار۱/٦۱ با ۲۰ نشانگر تری)، ضریب همخونی(بیشترین مقدار ۰/٤۸٤ با ۷۰ نشانگر تترا، کمترین مقدار ۰/۳۳۱ با ٦۰ نشانگر تری). این نتایج به شکل گرافیکی با استفاده از نمودارهای باکس پلات برای دو پارامتر در هر دو جمعیت به عنوان نمونه آورده شده است (شکل‌های ۲ تا ٥، aو b).

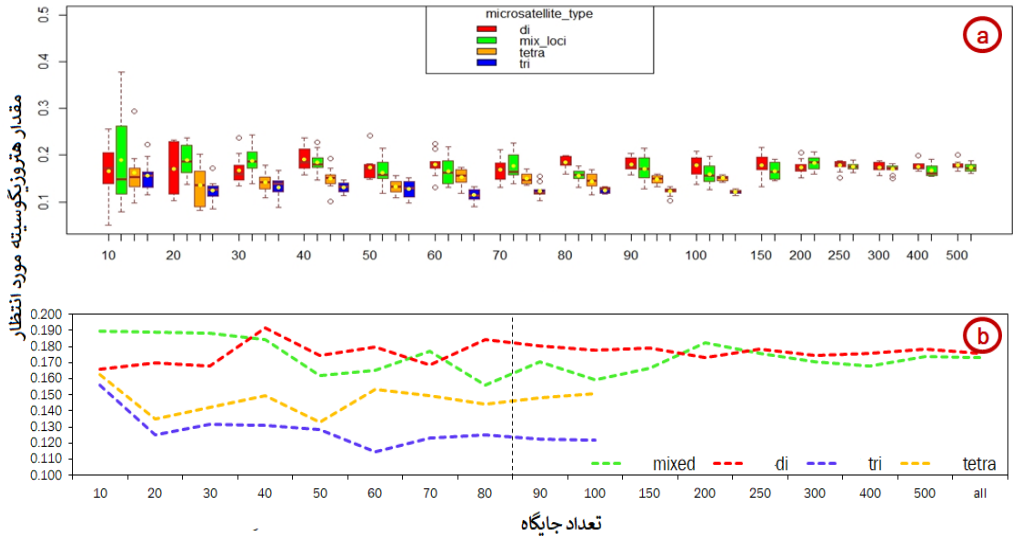
در نمودارهای باکس پلات (شکل‌های ۲-٥،a) هر ستون میزان پراکندگی نتایج به دست آمده از ۱۰ تکرار را نشان می‌دهد. این پراکندگی با افزایش تعداد نشانگر کاهش می‌یابد. مقایسه پلات‌ها نتایج متفاوتی از تخمین یک پارامتر را نشان می‌دهد به طوریکه در هر زیر مجموعه، پارامتر برآورده شده با استفاده از موتیف‌های نوع دی مقدار عدد بالاتری را به خود اختصاص داده است (به جز پارامتر ضریب همخونی که با استفاده از موتیف‌های نوع تترا نوکلئوتیدی بالاترین مقدار به دست آمده است). پس از موتیف‌های دی نوکلئوتیدی، استفاده از mix_loci بالاترین مقدار برای هر پارامتر را نشان داد که با توجه به بالاتر بودن نسبت موتیف‌های دی نوکلئوتیدی در مقایسه با تری و تترا نوکلئوتیدی در این فایل، نتایج قابل توضیح است. نقاط زرد رنگ روی هر ستون مقدار میانگین ۱۰ تکرار را نشان میدهد. نمودارهای b بر اساس میانگین ۱۰ تکرار ترسیم شده‌اند. بر اساس نتایج در استفاده از ۱۰ الی ٤۰ نشانگر، پراکنش زیادی بین تکرارهای مختلف مشاهده میشود. در اکثر پارامترهای مورد بررسی بیشترین مقدار برآورده شده برای آن پارامتر با استفاده از ٤۰ نشانگر دی نوکلئوتیدی و کمترین آن با استفاده از ۱۰ نشانگر تری و یا ترا نوکلئوتیدی به دست آمده است. با استفاده از۵۰ نشانگر نمودارها (b) به سمت ثابت شدن پیش می‌روند و در استفاده از ۸۰ نشانگر به بالا، واریانس‌ها به سمت صفر میل میکنند و تقریبا میتوان در برآورد هر پارامتر به یک مقدار عددی ثابت دست یافت.

مقایسه پارامترهای تنوع ژنتیکی در دو جمعیت اهلی و وحشی در این مطالعه تنوع ژنتیکی بسیار پایینی در هر دو جمعیت را نشان داد که با مطالعات تنوع ژنتیکی پیشین صورت گرفته روی تیپ‌های مختلف گوسفندان ایرانی مغایرت دارد (۸، ۱٦، ۲۳، ۲٤، ۲٥، ۲۷). از آنجا که این مطالعه به تعداد کافی نشانگر دسترسی داشته این میزان تنوع پایین در جمعیت‌های مورد بررسی را میتوان به تعداد کم نمونه و پراکندگی زیاد در بین نمونه‌ها نسبت داد. در این مطالعه پارامترهای تنوع ژنتیکی با اندکی تفاوت در جمعیت وحشی بالاتر بود که نشان دهنده فشار انتخابی کمتر بر روی این جمعیت میباشد. تنها مورد استثنا بالاتر بودن ضریب همخونی در جمعیت اهلی (با استفاده از ریزماهواره‌های تری) بود. وجود تنوع پایین در جمعیت گوسفندان وحشی در این مطالعه باید زنگ خطری برای دست اندرکاران اصلاح نژاد کشور باشد. شناسایی آلل‌های اختصاصی در این جمعیت‌ها و اقدامات اصلاح نژادی در راستای حفظ تنوع باقیمانده در این جمعیت‌ها می‌تواند موضوع مطالعات آتی روی این جمعیت‌ها باشد.



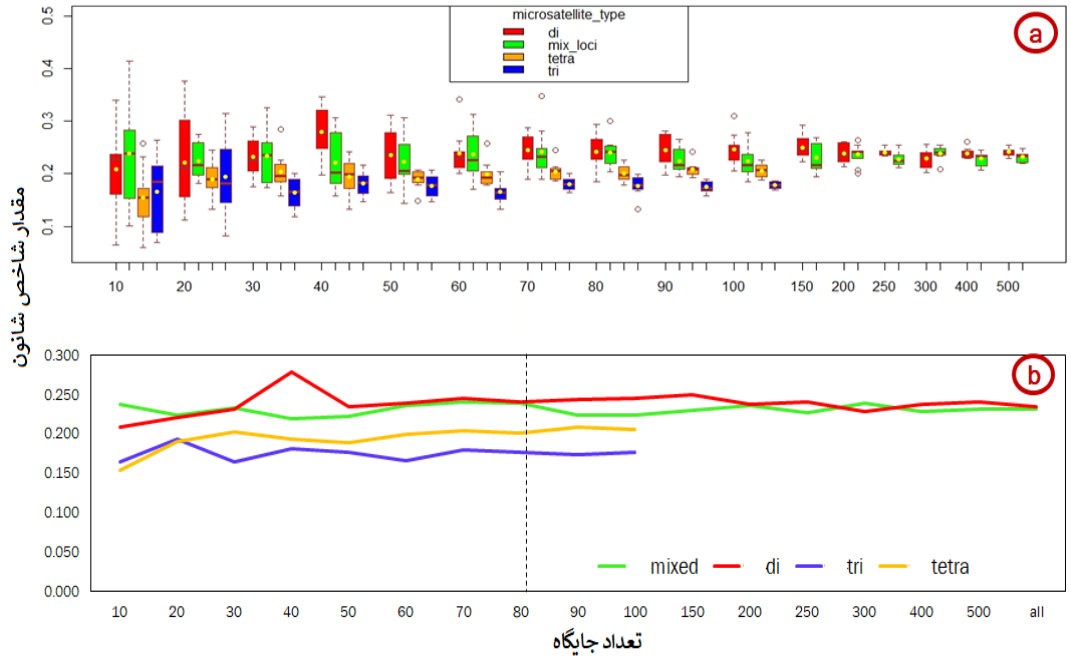
شکل ۲- مقایسه مقدار هتروزیگوسیته مورد انتظار با استفاده از انواع و زیرمجموعه‌های مختلفی از نشانگرهای ریزماهواره در جمعیت گوسفندان اهلی (**a**: پراکنش داده‌ها در ۱۰ تکرار برای هر زیرمجموعه از نشانگرها، **b**: مقدار میانگین به دست آمده از ۱۰ تکرار در هر زیرمجموعه از نشانگرها)

Figure 2. Comparing expected heterozygosity values with different subset of microsatellite types in Ovis aries



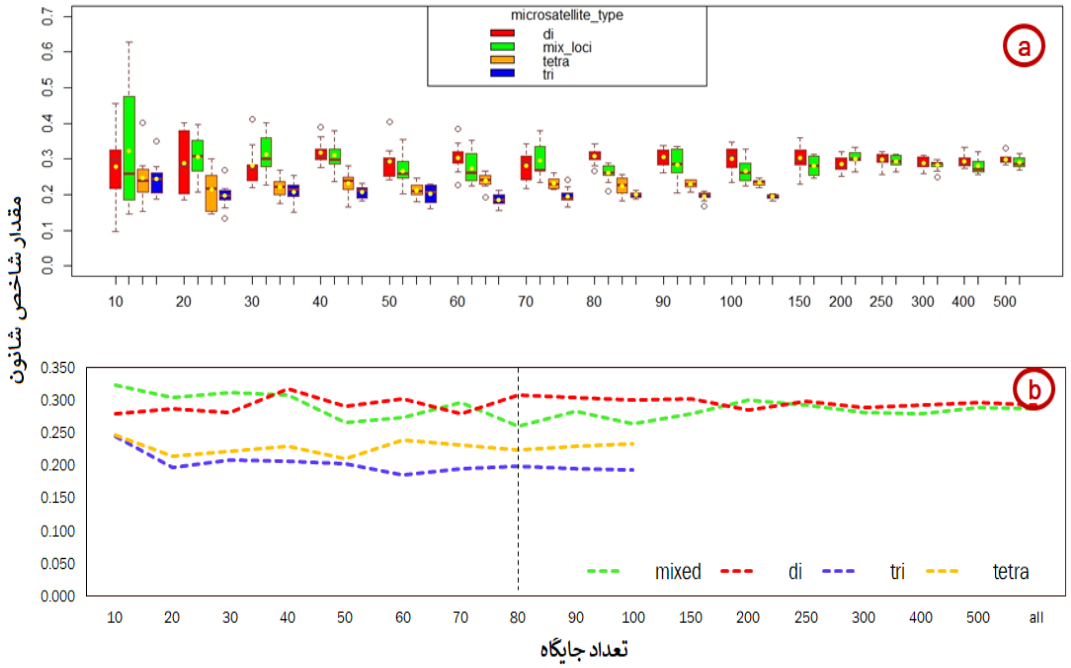
شکل۳-مقایسه مقدار هتروزیگوسیته مورد انتظار با استفاده از انواع و زیرمجموعه‌های مختلفی از نشانگرهای ریزماهواره در جمعیت گوسفندان وحشی(**a**: پراکنش داده‌ها در ۱۰ تکرار برای هر زیرمجموعه از نشانگرها، **b**: مقدار میانگین به دست آمده از ۱۰ تکرار در هر زیرمجموعه از نشانگرها)

Figure 4. Comparing expected heterozygosity values with different subset of microsatellite types in Ovis orientalis



شکل٤- مقایسه مقدار شاخص شانون با استفاده از انواع و زیرمجموعه‌های مختلفی از نشانگرهای ریزماهواره در جمعیت گوسفندان اهلی(**a**: پراکنش داده‌ها در ۱۰ تکرار برای هر زیرمجموعه از نشانگرها، **b**: مقدار میانگین به دست آمده از ۱۰ تکرار در هر زیرمجموعه از نشانگرها)

Figure 3. Comparing Shanon values with different subset of microsatellite types in Ovis aries



شکل ٥- مقایسه مقدار شاخص شانون با استفاده از انواع و زیرمجموعه‌های مختلفی از نشانگرهای ریزماهواره در جمعیت گوسفندان وحشی (**a**: پراکنش داده‌ها در ۱۰ تکرار برای هر زیرمجموعه از نشانگرها، **b**: مقدار میانگین به‌دست آمده از ۱۰ تکرار در هر زیرمجموعه از نشانگرها)

Figure 5. Comparing Shanon values with different subset of microsatellite types in Ovis orientalis

بررسی معنی‌داری تعداد و نوع موتیف بر برآورد پارامترها: در مطالعه‌ای جهت اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی بین چهار جمعیت انسانی با استفاده از ۲۱۳ نشانگر ریزماهواره، کوپر و همکاران (۱۹۹۹) برای اولین بار تفاوت در میانگین طول نشانگرهای ریزماهواره را گزارش کرد. در این مطالعه اثر این تفاوت بر روی معیار فاصله ژنتیکی $(\delta\mu)^2$ مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نهایی تفاوت در مقادیر این معیار با استفاده از طول‌های مختلف ریزماهواره‌ای را نشان داد (۳). در مطالعه دیگری بر روی دروزوفیلا ملانوگاستر مشخص شد استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در موقعیت‌های کروموزومی مختلف می‌تواند باعث تفاوت‌های معنی دار بین ساختار جمعیت‌ها شود و جالب اینکه هریک از ساختارهای جمعیتی که با استفاده از ترکیبات مختلف نشانگری به دست می‌آیند با دارا بودن احتمالات پسین بالا ($P\geq$۰/۹۵) از نظر آماری دارای پشتوانه بالایی هستند. در این مطالعه مشخص گردید هر اندازه تعداد نشانگرها کمتر باشد این اثر در آنها شدیدتر است. در این مطالعه مشخص شد برای داشتن ساختارهای جمعیتی یکسان از نظر ژنتیکی، به تعداد حداقل ۱۲۰ جایگاه نشانگری نیاز است (۱۷). این دو مطالعه تنها مواردی بودند که گریزی به اثر تعداد نشانگر و ترکیبات مختلف آنها بر روی نتایج پارامترهای جمعیتی داشتند. از اینرو این مطالعه برای اولین بار به بررسی جامع تعداد و نوع موتیف نشانگرهای ریزماهواره بر نتایج پارامترهای تنوع ژنتیکی میپردازد. در این مطالعه پس از محاسبه شش پارامتر مختلف تنوع با استفاده از زیرمجموعه‌های مختلف نشانگری برای بررسی معنی‌دار بودن یا نبودن استفاده از تعداد نشانگر و نوع موتیف از تکنیک آنالیز واریانس برای مقایسه میانگین زیرمجموعه‌های مختلف استفاده شد. نتایج این بررسی به‌ترتیب در جدول ۲ و ٤ آورده شده است. اعداد داخل جدول مقدار P به‌دست آمده از این بررسی را نشان می‌دهد.

جدول ۲- ارزیابی اثر تعداد نشانگر در برآورد پارامترهای ژنتیکی با مقایسه مقدار P به‌دست آمده

Table 2. Evaluating the effect of number of loci on genetic parameter estimation comparing P values

جمعیت (population)	گوسفند اهلی (Ovisaries)				گوسفند وحشی (Ovisorentalis)			
نوع موتیف (Motif type) پارامتر (Parameter)	di	tri	tetra	mixloci	di	tri	tetra	mixloci
هتروزیگوسیته مشاهده شده (Het_obs)	0.766	0.874	0.0074*	0.482	0.945	0.676	0.928	0.771
هتروزیگوسیته مورد انتظار (Het_exp)	0.458	0.808	0.0146*	0.999	0.894	0.0004***	0.371	0.382
شاخص شانون Shanon index	0.192	0.748	0.0086***	0.996	0.909	0.0002***	0.426	0.365
شاخص نئی Nei	0.105	0.682	0.364	0.493	0.433	0.235	0.148	0.902
غنای آللی (Allelic richness)	0.267	0.221	0.094	0.875	0.933	0.0356*	0.594	0.589
ضریب همخونی (F_{IS})	0.291	0.906	0.996	0.172	0.986	0.0027**	0.443	0.449

*، **، *** به‌ترتیب نشان دهنده سطح معنی‌داری ($P<0.05$)، ($P<0.01$)، ($P<0.001$)

نتایج نشان می‌دهد با استفاده از موتیف‌های دی (و همین‌طور mix-loci) تفاوت معنی‌داری بین زیرمجموعه‌های نشانگری مختلف در برآورد شش پارامتر مورد نظر مشاهده نمیشود اما استفاده از موتیف‌های تری (در جمعیت گوسفندان وحشی) و ترا نوکلئوتیدی (در جمعیت گوسفندان اهلی) در برآورد برخی پارامترهای ژنتیکی معنی دار است. به منظور بررسی دقیق‌تر و یافتن اینکه دقیقاً کدام دسته از نشانگرها با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند، مقایسه جفتی میانگین‌ها به روش توکی بر روی مواردی که دارای مقدار P معنی‌دار بودند صورت گرفت که نتایج آن در جدول ۳ گزارش شده است.

جدول ۳- آزمون مقایسه میانگین به روش توکی بین تعداد نشانگرهای مختلف در دو جمعیت گوسفند اهلی و وحشی

Table 3. Tukey significant between different numbers of loci in Ovis aries and Ovis orentalis population

جمعیت (population)	گوسفند اهلی (Ovis aries)			گوسفند وحشی (Ovis orientalis)			
نوع موتیف (motif type)	tetra			tri			
پارامتر (Parameter)	هتروزیگوسیته مشاهده شده (Het-obs)	هتروزیگوسیته مورد انتظار (Het-exp)	شاخص‌شانون (Shanon) (index	هتروزیگوسیته مورد انتظار (Het-exp)	شاخص شانون (Shanon index)	ضریب همخونی (F_{IS})	غنای آللی (Allelic richness)
10 loci	0.031^{b}	0.094^{b}	0.155^{b}	0.156^{a}	0.245^{a}	0.449^{a}	1.718^{a}
20 loci	0.047^{a}	0.120^{ab}	0.190^{ab}	0.125^{b}	0.197^{b}	0.362^{ab}	1.607^{b}
30loci	0.044^{ab}	0.128^{a}	0.203^{a}	0.132^{ab}	0.208^{ab}	0.355^{b}	1.650^{ab}
40loci	0.041^{ab}	0.123^{ab}	0.194^{ab}	0.131^{ab}	0.206^{b}	0.354^{b}	1.632^{ab}
50loci	0.043^{ab}	0.118^{ab}	0.189^{ab}	0.128^{b}	0.203^{b}	0.335^{b}	1.631^{ab}
60loci	0.045^{a}	0.126^{ab}	0.199^{a}	0.114^{b}	0.185^{b}	0.331^{b}	1.619^{b}
70loci	0.045^{a}	0.130^{a}	0.204^{a}	0.123^{b}	0.196^{b}	0.341^{b}	1.619^{b}
80loci	0.047^{a}	0.127^{a}	0.201^{a}	0.125^{b}	0.199^{b}	0.345^{b}	1.631^{ab}
90loci	0.047^{a}	0.133^{a}	0.208^{a}	0.122^{b}	0.196^{b}	0.346^{b}	1.622^{ab}
100loci	0.047^{a}	0.131^{a}	0.206^{a}	0.122^{b}	0.194^{b}	0.334^{b}	1.624^{ab}

*، **، *** به‌ترتیب نشان دهنده سطح معنی‌داری ($P<0.05$)، ($P<0.01$)، ($P<0.001$)

اعداد داخل جدول مقدار پارامترهای محاسبه شده با تعداد مختلفی از نشانگرها را نشان می‌دهد. بررسی نتایج در جمعیت گوسفندان اهلی وجود اختلاف معنی‌دار در برآورد پارامترهای نشان داده شده با استفاده از ۱۰ و ۷۰ نشانگر را نشان می‌دهد. در جمعیت گوسفندان وحشی نیز متفاوت بودن نتایج به‌دست آمده از تخمین پارامترها در مقایسه ۱۰ و ٦٠ نشانگر قابل مشاهده است. هرچند استثناهایی در مورد برخی پارامترها وجود دارد اما به طور قطع میتوان گفت در استفاده از ۱۰ و ۷۰ نشانگر تفاوت‌های معنی‌دار در برآورد پارامترها وجود دارد. در واقع میتوان گفت هرچه تعداد نشانگرها بیشتر می‌شود تفاوت در میانگین‌ها معنی دارتر می‌شود (نتایج آورده نشده). همانند ارزیابی اثر تعداد نشانگر، برای بررسی معنی دار نوع موتیف بر برآورد پارامترهای تنوع ژنتیکی نیز از تکنیک آنالیز واریانس برای مقایسه میانگین زیرمجموعه‌های مختلف موتیف‌ها استفاده شد. این بررسی با تعداد ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ نشانگر در هر دو جمعیت صورت گرفت.

جدول ٤-ارزیابی اثر نوع موتیف در برآورد پارامترهای ژنتیکی با استفاده از زیرمجموعه‌های مختلف با مقایسه مقدار P

Table 4. Evaluating the effect of motif type on genetic parameter estimation using different subsets comparing P values

جمعیت (Population)	گوسفند اهلی (Ovis aries)					گوسفند وحشی (Ovis orentalis)				
تعداد جایگاه (Number of loci) پارامتر (Parameter)	10	20	50	70	100	10	20	50	70	100
هتروزیگوسیته مشاهده شده (Het-obs)	0.18	0.172	0.081	0.000^{***}	0.00^{***}	0.186	0.051	0.001^{***}	0.000^{***}	0.00^{***}
هتروزیگوسیته مورد انتظار (Het_exp)	0.263	0.831	0.041	0.003^{**}	0.00^{***}	0.685	0.002^{**}	0.000^{***}	0.000^{***}	0.00^{***}
شاخص شانون (Shanon index)	0.737	0.468	0.004	0.000^{***}	0.00^{***}	0.302	0.0006^{***}	0.000^{***}	0.000^{***}	0.00^{***}
شاخص نئی (Nei)	0.566	0.281	0.012^{*}	0.003^{**}	0.00^{***}	0.748	0.010^{*}	0.002^{**}	0.0002^{***}	0.00^{***}
غنای آللی (Ar)	0.004^{**}	0.017^{*}	0.000^{***}	0.000^{***}	0.00^{***}	0.030^{*}	0.00^{***}	0.000^{***}	0.000^{***}	0.00^{***}
ضریب همخونی (F_{IS})	0.295	0.494	0.138	0.1	0.02^{*}	0.592	0.226	0.057	0.000^{***}	0.00^{***}

*، **، *** به‌ترتیب نشان دهنده سطح معنی‌داری ($P<0.05$)، ($P<0.01$)، ($P<0.001$)

در دو جمعیت مورد بررسی، با استفاده از ۱۰ نشانگر اختلاف معنی‌دار بین موتیف‌های ریزماهواره‌ای مختلف در برآورد پارامترها مشاهده نشد. تنها برای پارامتر غنای آللی اختلاف‌های معنی‌دار مشاهده شد. با افزایش تعداد نشانگرها این اختلاف‌های معنی‌دار در مورد پارامترهای بیشتری نمایان میشود به‌طوری‌که با استفاده از ۱۰۰ نشانگر، در برآورد هر شش پارامتر در هر دو جمعیت اختلافات معنی دار مشاهده می‌شود. بررسی میانگین‌ها برای یافتن موتیف‌هایی که اختلاف معنی دار نشان داده اند با آزمون مقایسه میانگین توکی صورت گرفت که نتایج آن در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵- آزمون مقایسه میانگین به روش توکی بین موتیف‌های مختلف و مقایسه نتایج با استفاده از تعداد نشانگرهای مختلف در جمعیت گوسفندان اهلی و وحشی

Table 5. Tukey significant test between different motif types by comparing results using different number of loci in Ovis aries and Ovis Orientalis populations

تعداد جایگاه Number of loci	جمعیت (population)	گوسفند اهلی (Ovis.aries)						گوسفند وحشی (Ovis.orientalis)					
	پارامتر (Parameter) / نوع موتیف (Motif type)	مشاهده شده (Het-obs)	هتروزیگوسیته انتظار (Het_exp)	شاخص شانون (Shanon)	شاخص نئی (Nei)	غنای آللی (Ar)	ضریب همخونی (F_{IS})	مشاهده شده (Het-obs)	هتروزیگوسیته انتظار (Het_exp)	شاخص شانون (Shanon)	شاخص نئی (Nei)	غنای آللی (Ar)	ضریب همخونی (F_{IS})
10	mixloci	-	-	-	-	1.705[a]	-	-	-	-	-	1.973[a]	-
	di	-	-	-	-	1.625[ab]	-	-	-	-	-	1.910[a]	-
	tri	-	-	-	-	1.447[b]	-	-	-	-	-	1.718[a]	-
	tetra	-	-	-	-	1.484[b]	-	-	-	-	-	1.663[a]	-
20	mixloci	-	-	-	-	1.675[ab]	-	-	0.189[a]	0.305[a]	0.255[a]	1.893[a]	-
	di	-	-	-	-	1.706[a]	-	-	0.170[ab]	0.288[ab]	0.231[ab]	1.962[a]	-
	tri	-	-	-	-	1.545[ab]	-	-	0.125[b]	0.197[c]	0.204[b]	1.607[b]	-
	tetra	-	-	-	-	1.530[b]	-	-	0.135[b]	0.214[bc]	0.203[b]	1.638[b]	-
50	mixloci	-	-	-	0.210[ab]	1.709[a]	-	0.071[a]	0.174[a]	0.292[a]	0.244[a]	1.954[a]	-
	di	-	-	-	0.240[a]	1.717[a]	-	0.067[a]	0.162[a]	0.267[a]	0.240[a]	1.833[a]	-
	tri	-	-	-	0.195[b]	1.507[b]	-	0.057[ab]	0.128[b]	0.203[b]	0.201[b]	1.631[b]	-
	tetra	-	-	-	0.200[b]	1.542[b]	-	0.047[b]	0.133[b]	0.212[b]	0.205[b]	1.636[b]	-
70	mixloci	-	0.139[a]	0.241[a]	0.226[ab]	1.743[a]	-	0.069[a]	0.177[a]	0.296[a]	0.250[a]	1.917[a]	0.450[a]
	di	-	0.143[a]	0.245[a]	0.245[a]	1.738[a]	-	0.066[a]	0.168[ab]	0.281[a]	0.236[a]	1.895[a]	0.433[a]
	tri	-	0.112[b]	0.180[b]	0.196[b]	1.514[b]	-	0.052[b]	0.123[c]	0.196[b]	0.196[a]	1.619[b]	0.341[b]
	tetra	-	0.130[ab]	0.204[b]	0.213[ab]	1.560[b]	-	0.045[b]	0.150[bc]	0.232[b]	0.228[a]	1.651[b]	0.484[a]
100	mixloci	0.051[b]	0.133[a]	0.224[ab]	0.219[ab]	1.666[a]	0.427[ab]	0.063[b]	0.159[ab]	0.265[b]	0.230[b]	1.853[b]	0.394[bc]
	di	0.058[a]	0.146[a]	0.246[a]	0.237[a]	1.736[a]	0.422[ab]	0.073[a]	0.178[a]	0.301[a]	0.258[a]	1.958[a]	0.421[ab]
	tri	0.044[c]	0.110[b]	0.178[c]	0.190[c]	1.517[b]	0.402[b]	0.052[c]	0.122[c]	0.194[d]	0.192[c]	1.624[c]	0.334[c]
	tetra	0.047[bc]	0.131[a]	0.206[b]	0.214[b]	1.558[b]	0.470[a]	0.051[c]	0.151[b]	0.234[c]	0.229[b]	1.652[c]	0.470[a]

*مواردی که با (-) نشان داده شده میانگین‌هایی هستندکه ارزش P معنی دار در مدل برای آنها گزارش نشده و بنابراین تحت آزمون مقایسه میانگین قرار نگرفته اند.**میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار نیستند (در سطح اطمینان ۹۵درصد).

در اکثر مقایسات جفتی بین میانگین‌ها، پارامترهای برآورد شده با استفاده از موتیف‌های نوع دی و mix-loci با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند که دلیل آن را می‌توان به یکسان بودن نسبی فایل داده آنها نسبت داد چرا که در فایل داده mix-loci اکثر نشانگرها را نشانگرهای دی نوکلئوتیدی تشکیل می‌دهند. همین‌طور در مورد پارامترهای برآورد شده با استفاده از موتیف‌های نوع تری و تترا نیز اختلافات معنی‌دار کمی مشاهده شد. بیشترین میزان اختلاف مربوط به مقایسه میانگین پارامترها با استفاده از

موتیف‌های نوع دی با تترا و دی با تری است و این به این معناست که در برآورد پارامترهای تنوع ژنتیکی استفاده از ریزماهواره‌های تری یا تترا تفاوت آنچنانی بر روی نتایج نهایی نخواهد داشت اما استفاده از ریزماهواره‌های دی نوکلئوتیدی قطعا نتایج حاصله را تحت تاثیر قرار داده و برآوردهای دقیق تری ارائه می‌دهد. همینطور باید به این نکته دقت کرد که با به کارگیری تعداد بیشتری از نشانگرها، اختلاف معنی‌دار بیشتری بین داده‌ها قابل رویت است.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج مطالعات تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها می‌تواند تحت تاثیر تعداد جایگاه‌های مختلف و نیز موتیف‌های مختلف نشانگرهای ریزماهواره قرار گیرد. نتایج به دست آمده از این پژوهش تفاوت معنی‌دار در استفاده از موتیف‌های نوع دی در برآورد پارامترهای ژنتیکی را نشان داد. از آنجایی که این ریزماهواره‌ها در سطح ژنوم فراوانی بالاتری دارند می‌توانند در مطالعات بررسی ساختار جمعیتی روی گونه‌های دامی مناسب‌تر باشند. نتایج این پژوهش همچنین لزوم استفاده از حداقل ۵۰ جایگاه ریزماهواره‌ای را برای داشتن برآوردهایی باثبات از پارامترهای جمعیت در مطالعات تنوع ژنتیکی پیشنهاد می‌دهد. تعداد و نوع موتیف ریزماهواره‌ها احتمالاً در برآورد دیگر پارامترها از جمله پیش‌بینی وقایع دموگرافیک رخ داده در جمعیت‌ها تاثیر گذار خواهد بود که می‌تواند موضوع مطالعات آتی باشد. نتایج این پژوهش لزوم بررسی و اعمال دقت بیشتر روی نتایج حاصل از نرم افزارهایی که واریانت‌های ژنتیکی را خوانش می‌کنند (مانند نرم‌افزار lobSTR) نشان می‌دهد. خوانش اشتباه توالی ریزماهواره‌ها در چنین نرم‌افزارهایی می‌تواند سبب تشخیص نادرست آلل‌ها و در نتیجه اعلام نادرست تعداد آلل در محاسبات آتی شود که به نوبه خود بر نتایج حاصل از مطالعات ژنتیکی در جمعیت‌ها تاثیر بسزایی دارد. نتایج به دست آمده از این پژوهش سطح پائینی از تنوع ژنتیکی در دو جمعیت از گوسفندان اهلی و وحشی مورد مطالعه را نشان می‌دهد که باید هشداری برای مسئولین طرح‌های حفاظت ژنتیکی در گوسفندان وحشی و هم چنین طرح‌های اصلاح نژادی در گوسفندان اهلی در داخل کشور باشد.

منابع

1. Abdurakhmonov, I.Y. 2016. Introduction to microsatellites: basics, trends and highlights. Abdurakhmonov, I.Y (eds), Microsatellite Markers, Intech open. Uzbekistan. 4-16.
2. Charoensook, R., Gatphayak, K., Brenig, B. and Knorr, C. 2019. Genetic diversity analysis of Thai indigenous pig population using microsatellite markers. Asian-Australas Journal of Animal Science. 32(10): 1491-1500.
3. Cooper, G., Amos, W., Bellamy, R., Siddiqui, M.R., Frodsham, A., Hill, A. V. and Rubinsztein, D.C. 1999. An empirical exploration of the (delta mu)2 genetic distance for 213 human microsatellite markers. American Journal of Human Genetics. 65(4): 1125-1133.
4. Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C.A., Banks, E., DePristo, Handsaker, R.E., Lunter, G., T.Marth, G., T., Sherry, S., McVean, G. and Durbin, R. 2011. The variant call format and VCFtools. Bioinformatics. 27(15): 2156-2158.
5. Dieringer, D. and Schlötterer, C. 2003. microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Molecular Ecology Notes. 3(1): 167-169.
6. Eisen, J.A. and Hanawalt, P.C. 1999. A phylogenomic study of DNA repair genes. proteins and processes. Mutation research. 435(3): 171-213.
7. Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics. 5(6): 435-445.

8. Esmaeilkhanian S.B.M. 2006. Genetic variation within and between five Iranian sheep populations using microsatellite markers. Pakistan Journal of Biological Sciences. 9: 2488-2492.
9. Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Metzker, M.L., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Scherer, S. and Collins, F. 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. Nature. 428(6982): 493-521.
10. Gymrek, M., Golan, D., Rosset, S. and Erlich, Y. 2012. lobSTR: A short tandem repeat profiler for personal genomes. Genome Research. 22(6): 1154-1162.
11. Hentschel, C.C. 1982. Homocopolymer sequences in the spacer of a sea urchin histone gene repeat are sensitive to S1 nuclease. Nature. 295(5851): 714-716.
12. Katti, M.V., Ranjekar, P.K. and Gupta, V.S. 2001. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. Molecular Biology and Evolution. 18(7): 1161-1167.
13. Lagercrantz, U. and Andersson, L. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. Nucleic Acids Research. 21(5): 1111-1115.
14. Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. and Szustakowki, J. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 409(6822): 860-921.
15. Li, H. 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. Bioinformatics. 27(21): 2987-2993.
16. Nanekarani, S.H., A.C. and Amirmozafari, N. 2011. Genetic analysis of Karakul sheep breed using microsatellite markers. African Journal of Microbiology Research. 5: 703-707 .
17. Orozco-terWengel, P., Corander, J. and Schlötterer, C. 2011. Genealogical lineage sorting leads to significant, but incorrect Bayesian multilocus inference of population structure. Journal of Molecular Ecology. 20(6): 1108-1121.
18. Schlötterer, C. and Tautz, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research. 20(2): 211-215.
19. Seilsuth, S., Seo, J.H., Kong, H.S. and Jeon, G.J. 2016. Microsatellite analysis of the genetic diversity and population structure in dairy goats in Thailand. Asian-Australas Journal of Animal Science. 29(3): 327-332.
20. Sheriff, O. and Alemayehu, K. 2018. Genetic diversity studies using microsatellite markers and their contribution in supporting sustainable sheep breeding programs: Review: Cogent Food and Agriculture. 4(1).
21. Trivedi, S. 2004. Microsatellites (SSRs): puzzles with puzzle. Indian Journal of Biotechnology. 3: 331-347.
22. Tautz, D. and Schlötterer, C. 1994. Simple sequences. Current Opinion in Genetics and Development. 4(6): 832-837.
23. Vahidi, S.M.F., Faruque, M.O., Falahati Anbaran, M., Afraz, F., Mousavi, S.M., Boettcher, P., Joost, S., Han, J.L., Colli, L., Periasamy, K., Negrini, R. and Ajmone-Marsan, P. 2016. Multilocus genotypic data reveal high genetic diversity and low population genetic structure of Iranian indigenous sheep. Journal of Animal Genetic. 47: 463-470.
24. Vajed Ebrahimi, M.T., Mohammad Abadi, M.R. and Esmaeilzadeh, A.K. 2016. Analysis of genetic diversity in five iranian sheep population using microsatellite markers. Journal of Agriculture Biotechnology. 7 (4).
25. Vajed Ebrahimi, M.T., Mohammadabadi, M. and Esmailizadeh, A. 2017. Using microsatellite markers to analyze genetic diversity in 14 sheep types in Iran. Arch. Journal of Animal Breeding. 60(3): 183-189.
26. Webster, M.T., Smith, N.G. and Ellegren, H. 2002. Microsatellite evolution inferred from human-chimpanzee genomic sequence alignments. Proc. . Proceedings of the National Academy of Sciences 99(13): 8748-8753.
27. Zahedi, Z., Esmaeelkhanian, S. and Torshizi, R.V. 2007. Microsatellite variation in one breed of Iranian sheep with 12 markers. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 10(24): 4455-4460.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 8(4), 2021
http://ejrr.gau.ac.ir

The Effect of microsatellite number and motif type on estimation of population parameters in genetic diversity studies

[*]M. Hashemi[1], G. Rahimi Mianji[2], M.H. Banabazi[3], F. Biscarini[4] and P. Orozro-ter-Wengel[5]

[1]Ph.D. Student, and [2]Professor, Dept. of Genetics and animal breeding, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agriculture and Natural Resources university, [3]Assistant Prof., Dept. of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, [4]Senior Research Scientist, National Research Council (CNR), Italy, [5]Senior Lecturer, Cardiff University, Wales

Received: 02/05/2020; Accepted: 12/28/2020

Abstract

Background and objective: Microsatellites are repetitive regions in DNA including a homogeneous array of mono, di-, tri-, tetra-, penta-, and hexa-nucleotides with a length of less than 1 Kbp which are non-randomly distributed in the genome. The number and density of microsatellites are varying within species even in very close species such as humans and chimpanzees. The frequency of microsatellite motifs and their mutation rate are reported differently in various organisms. Di-nucleotide microsatellites are the most abundant motifs followed by mono and tetra microsatellite motifs in mammalian genomes. Tri-nucleotide microsatellites are more frequent in plants. However, the effect of different microsatellite motifs on genetic diversity or population structural parameters is a topic that has received less attention.

Material and methods: In the present study, using the 36 VCf file of microsatellite markers extracted from the whole genome of Iranian sheep "Ovis aries and Ovis orientalis" by NGS, the total number of 163973 microsatellite markers were detected. The distribution of Ovis aries samples is from the north-west part of Iran and Ovis orientalis samples belongs to the central part and north-west of Iran. After rearrangement and filtration on the data file using Samtools and VCFtools software, we classified the whole markers on four different motif types including di- tri- and tetra-nucleotide microsatellites and a file include all three microsatellite types. Several subsets including 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400 and 500 markers were generated from each microsatellite motif types using an R script. Six common genetic diversity parameters including observed and expected heterozygosity, Nei diversity index, Shanon index, Allelic richness, and F_{IS} were calculated for each different subset of number and motif type of microsatellites in MSA (V.4.05) software. 10 replications were considered for each parameter. The mean and variance were calculated among 10 replications and results were represented by boxplots using R (v.3.3.3). The statistical investigation of parameter estimation differences using different microsatellite number and motif types were analyzed using ANOVA for testing the hypothesis of equality of means in R (v.3.3.3).

Results: Estimation of all six parameters revealed various results using a different number of loci as well as motif types. Additionally, the results revealed higher values for parameters estimated with di microsatellite motifs compared to others. In addition, the highest and lowest values for most parameters were obtained by 40-di and 10-tri/tetra microsatellites respectively.

[*]Corresponding author; mona.hashemi1012@gmail.com

The statistical significance on findings of parameter values using different number/motif of microsatellite markers were analyzed using ANOVA in R (v.3.3.3). In cases where the implication of the model showed significant results, Tukey Honestly Significant Difference test was used to test pairwise contrasts between different subsets.

Conclusion: Our results propose a better application of di microsatellites for genetic diversity studies in sheep populations. Moreover, results showed that for stable estimation of population parameters in genetic diversity studies a minimum of 50 microsatellite loci are needed.

***Keywords*:** Genetic diversity, Microsatellite marker, Microsatellite motifs, Sheep