علوم دامی ایران
دورۀ ۴۶، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۴ (ص ۳۴۳-۳۳۵)

برآورد اندازۀ مؤثر جمعیت در گاو سرابی بر اساس نشانگرهای چندشکل تک‌نوکلئوتیدی

کریم کریمی[1*]، علی اسماعیلی‌زاده کشکوئیه[2] و مسعود اسدی فوزی[3]
۱. دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشکدۀ کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان و عضو انجمن پژوهشگران جوان، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲ و ۳. دانشیاران گروه علوم دامی، دانشکدۀ کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۲۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۷/۴)

چکیده

این مطالعه با هدف برآورد اندازۀ مؤثر تعداد افراد در حال جفت‌گیری در جمعیت گاو سرابی با روش هتروزیگوسیتی اضافی و بر پایۀ استفاده از نشانگرهای متراکم چندشکل تک‌نوکلئوتیدی انجام گرفت. بدین منظور از ۲۰ رأس گاو سرابی نمونه‌برداری شد. تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها با چیپ Illumina High-density Bovine BeadChip **شامل ۷۷۷۹۶۲ جایگاه** SNP **صورت گرفت. متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار، متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، متوسط فراوانی آلل‌های نادر و درصد آلل‌های در حالت عدم تعادل هاردی-وینبرگ در مجموعۀ داده‌ها برآورد شد. اندازۀ مؤثر تعداد افراد در حال جفت‌گیری بر اساس روش هتروزیگوسیتی اضافی و به کمک نرم‌افزار** NEESTIMATOR (v2) **به ازای هریک از کروموزوم‌ها جداگانه برآورد شد. متوسط اندازۀ مؤثر برآوردشده، ۲۸ فرد بود و متوسط فاصلۀ اطمینان ۹۵٪ برای این برآوردها ۱۷/۳ تا ۴۰/۲ به دست آمد. نتایج مطالعه نشان داد که گاو بومی سرابی در معرض خطر جدی انقراض قرار دارد و تدوین برنامه‌هایی برای حفاظت از گاوهای خالص باقی‌مانده ضروری است.**

واژه‌های کلیدی: چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی، ژنتیک حفاظت، گاو سرابی، هتروزیگوسیتی اضافی.

مقدمه

مدیریت منابع ژنتیکی نیازمند شناخت صحیح ساختار ژنتیکی، توزیع جغرافیایی و وضعیت اکولوژیک جمعیت‌هاست. اندازۀ مؤثر جمعیت (Ne) یکی از مهم‌ترین پارامترها در ژنتیک جمعیت محسوب می‌شود و میزان رانش تصادفی و هم‌خونی را در جمعیت‌ها مشخص می‌کند. دسترسی به اندازۀ مؤثر کنونی جمعیت‌ها به‌منظور مدیریت جمعیت‌های کوچک در معرض خطر از اهمیت بسیاری برخوردار است (Frankham, 2005). اندازۀ مؤثر جمعیت می‌تواند به کمک داده‌های شجره‌ای نظیر تعداد والدین و واریانس تعداد فرزندان برآورد شود (Caballero, 1994). با این حال، به‌ویژه در جمعیت‌های کوچک دام‌های بومی، در اغلب اوقات داده‌های شجره‌ای مورد نیاز جهت برآورد Ne در دسترس نیستند. در سال‌های اخیر علاقۀ زیادی به استفاده از نشانگرهای ژنتیکی به‌عنوان روشی جایگزین برای برآورد اندازۀ مؤثر جمعیت‌ها وجود داشته است. روش موقت (Pollak, 1983)، روش عدم تعادل پیوستگی (Hill, 1981)، روش هتروزیگوسیتی اضافظ (Pudovkin *et al.*, 1996) و روش اشتراک آللی (Nomura, 2008) از جمله روش‌های مهمی هستند که تاکنون بر اساس استفاده از نشانگرهای مولکولی برای برآورد اندازۀ مؤثر جمعیت استفاده شده‌اند. روش هتروزیگوسیتی اضافی

* تلفن: ۰۹۱۰۷۰۰۶۸۵۸
E-mail: Karim.karimi81@gmail.com
1. Heterozygote Excess

بر اساس تفاوت در فراوانی‌های آللی افراد نر و ماده در یک جمعیت بنا نهاده شده و در مقایسه با سایر روش‌ها به لحاظ محاسباتی ساده‌تر است. برآورد حاصل از این روش با عنوان اندازهٔ مؤثر تعداد افراد در حال جفت‌گیری در جمعیت[1] (N_{eb}) شناخته می‌شود و از کارایی بیشتری در جمعیت‌های با اندازهٔ مؤثر کوچک برخوردار است (Luikart *et al*., 2010; Luikart & Cornuet, 1999). در این روش تنها به داده‌های یک فصل از جفت‌گیری افراد یک جمعیت نیاز است و به همین دلیل ارزان‌تر بوده و نیازمند صرف وقت کمتری است. این روش در برآورد اندازهٔ مؤثر برخی جمعیت‌ها در گونه‌های حیات‌وحش استفاده شده است (Frankham, 1995; Hedgecock, 2007; Schmeller & Meril, 2006).

پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های ژنومی امکان کاربرد بیشتر روش‌های تک‌نسلی را در برآورد Ne فراهم کرده است. انتظار می‌رود داده‌های حاصل از چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) در سرتاسر ژنوم امکان بهبود شایان توجهی را در برآورد Ne فراهم آورند (Nomura, 2009). این نشانگرها نتیجهٔ تغییر یک باز منفرد در توالی دی.ان.ای هستند و تنها دو حالت نوکلئوتیدی برای یک جایگاه خاص در توالی دی.ان.ای دارند. این نشانگرها در مقایسه با سایر نشانگرها از تراکم بیشتری برخوردارند و امکان ارزیابی تنوع سطح ژنوم را با جزئیات بیشتر فراهم آورده‌اند (Helyar *et al*., 2011; Matukumalli *et al*., 2009). در حال حاضر دسترسی روزافزون به نشانگرهای SNP در گونه‌های مختلف موجب شده است که این نشانگرها به ابزاری استاندارد در ژنتیک حفاظت تبدیل شوند (Engelsma *et al*., 2012; Fahlén, 2014).

گاو سرابی از جمله گاوهای بومی کشور است که در نواحی کوهستانی شمال غرب ایران پرورش داده می‌شود. این نژاد به‌عنوان یکی از نژادهای شیری ایران شناخته شده است و به سبب داشتن ویژگی‌هایی همچون سازگاری با آب‌وهوای نیمه‌خشک و سرد، مقاومت ژنتیکی برابر انگل‌ها و بیماری‌های منطقه و سازگاری با خوراک‌های با کیفیت پایین‌تر دارای ارزش ژنتیکی فراوانی است. متأسفانه در مورد تعداد گاوهای سرابی کشور آمار دقیقی در دسترس نیست. مرکز پشتیبانی گاو بومی سرابی نخستین بار در اواخر دههٔ ۶۰ با شناسایی و خرید تعدادی از گاوهای سرابی آغاز به کار کرد. هرچند خلوص گاوهای موجود در این ایستگاه حفظ شده است، تلاقی‌های کنترل‌نشده در سطح منطقه، خلوص گاوهای باقی‌مانده را به‌شدت تحت تأثیر قرار داده است. از سوی دیگر، شرایط اقتصادی تولید موجب کاهش تمایل دامداران به نگهداری گاوهای بومی شده و همین امر این نژاد را با خطر جدی انقراض مواجه ساخته است. از آنجا که برآورد اندازهٔ مؤثر جمعیت از اصلی‌ترین مراحل اولویت‌بندی برنامه‌های حفاظت از گونه‌ها محسوب می‌شود، این مطالعه با هدف برآورد اندازهٔ مؤثر جمعیت گاوهای سرابی به کمک روش هتروزیگوسیتی اضافی و بر پایهٔ استفاده از نشانگرهای متراکم چندشکل نوکلئوتیدی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و تعیین ژنوتیپ

از ۲۰ رأس گاو سرابی موجود در مرکز پشتیبانی گاو بومی سرابی واقع در کیلومتر ۹ جادهٔ سراب به اردبیل نمونه‌گیری شد. بر اساس اطلاعات شجره‌ای، دام‌هایی انتخاب شدند که با یکدیگر خویشاوندی نداشتند یا خویشاوندی کمتری داشتند. نمونه‌های مو از ناحیهٔ انتهایی دم گاوها گرفته شدند و پس از ثبت مشخصات در بسته‌های مجزا به آزمایشگاه منتقل شدند. دی.ان.ای از ریشه‌های مو استخراج شد و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها به کمک چیپ Illumina High-density Bovine BeadChip (Illumina, Inc, San Diego, CA, USA) انجام گرفت. این چیپ شامل ۷۷۷۹۶۲ جایگاه SNP است. نمونه‌ها در آزمایشگاه تحقیقات ژنتیک حیوانی دانشگاه کوئینزلند (بریسبون، استرالیا) تعیین ژنوتیپ شدند.

تصحیح داده‌ها

داده‌ها به کمک نرم‌افزار PLINK 1.07 (Purcell *et*

1. Effective Number of Breeders (Neb)

al., 2007) تصحیح شد. از آنجا که توارث جایگاه‌های واقع‌شده روی کروموزوم‌های X، Y و دی.ان.ای میتوکندری (توارث مادری) بین دو جنس نر و ماده متفاوت است، به‌منظور یکسان‌شدن نشانگرهای مورد استفاده در افراد هر دو جنس، تنها از جایگاه‌های اتوزوم استفاده شد. جایگاه‌های با نرخ فراخوانی تعیین ژنوتیپ کمتر از ۹۰ درصد، افراد با نرخ تعیین ژنوتیپ کمتر از ۷۰ درصد و SNPهای دارای فراوانی آلل نادر[1] کمتر از ۰/۰۱ از مجموعهٔ داده‌ها حذف شدند. آزمون تعادل هاردی-وینبرگ در همهٔ جایگاه‌ها انجام گرفت و جایگاه‌های با P-value کمتر از $۱۰^{-۷}$ از داده‌ها کنار گذاشته شدند. پس از اعمال این محدودیت‌ها روی داده‌های اولیه، ۴۵۰۳۴۱ SNP در ۱۹ فرد برای محاسبات بعدی باقی ماندند. همچنین متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و متوسط فراوانی آلل نادر در این مجموعه داده به دست آمد. به‌منظور کاهش تراکم جایگاه‌ها و حذف SNPهایی که در حالت عدم تعادل پیوستگی با یکدیگر قرار داشتند، از نرم‌افزار PLINK 1.07استفاده شد. بدین منظور در پنجره‌هایی شامل ۵۰ SNP و با حرکت ۱۰ SNP رو به جلو در هر مرحله، SNPهای دارای r^2 (معیار عدم تعادل پیوستگی) بیش از ۰/۲ با یکدیگر از مجموعه داده‌ها حذف شدند. در نهایت تعداد ۷۴۸۴۳ SNP در ۱۹ فرد جهت برآورد اندازهٔ مؤثر جمعیت در مجموعه داده‌ها باقی ماندند.

برآورد اندازهٔ مؤثر تعداد افراد در حال جفت‌گیری در جمعیت

در روش هتروزیگوسیتی اضافی فرض می‌شود که در جمعیت‌های کوچک، تفاوت فراوانی‌های آللی جایگاه‌های ژنی در والدین نر و ماده موجب افزایش هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده در مقایسه با هتروزیگوسیتی مورد انتظار در فرزندان خواهد شد که در اصطلاح به آن هتروزیگوسیتی اضافی گفته می‌شود (Roberston, 1965). در این روش ابتدا فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده بر اساس تعداد نمونه‌های موجود در هر جایگاه ژنی به دست می‌آید ($H_j^{obs}{}_{(i)}$). مقدار مورد انتظار هتروزیگوسیتی ($H_j^{exp}{}_{(i)}$) در هر جایگاه ژنی نیز بر اساس رابطهٔ زیر به دست می‌آید (Zhadanova *et al*., 2008):

$$Hj^{exp}(i) = ۲p_i(۱-p_i)\,(۱+\frac{۱}{۲N_j-۱}) \qquad (۱)$$

در این معادله p_i نمایانگر فراوانی آلل i اُم در j اُمین جایگاه ژنی است. همچنین N_j تعداد نمونه‌هایی هستند که در جایگاه j اُم یافت می‌شوند. در مرحلهٔ بعد شاخص D به‌عنوان معیار افزایش یا کاهش هتروزیگوسیتی به کمک رابطهٔ زیر به دست می‌آید:

$$D_{j(i)} = \frac{Hj^{obs}(i) - Hj^{exp}(i)}{Hj^{exp}(i)} \qquad (۲)$$

اگر n_j تعداد آلل‌های جایگاه j اُم باشد، میانگین Dj در تمامی آلل‌های جایگاه j برابر است با:

$$D_j = \frac{۱}{nj}\sum_{i=۱}^{nj} D_{j(i)} \qquad (۳)$$

در صورت وجود چندین جایگاه ژنی، شاخص D به‌صورت میانگین وزن‌یافتهٔ همهٔ جایگاه‌های ژنی به دست می‌آید. در این حالت وزن هر یک از آلل‌ها در هر جایگاه ژنی بر اساس رابطهٔ زیر به محاسبه می‌شود (Zhadanova *et al*., 2008):

$$W_{ij} = \sqrt{Nj}^{\,(\frac{nj-۱}{nj})} \qquad (۴)$$

با توجه به معادلات بالا، مقدار N_{eb} را می‌توان به کمک رابطهٔ زیر برآورد کرد:

$$N_{eb} = \frac{۲D+۱}{۲D\,(D+۱)} \qquad (۵)$$

برای این محاسبات از نرم‌افزار NEESTIMATOR (v2) (Do *et al*., 2014) استفاده شد. اندازهٔ مؤثر جمعیت برای هریک از کروموزوم‌ها جداگانه محاسبه شد و میانگین این مقادیر، اندازهٔ مؤثر کل جمعیت در نظر گرفته شد. تنها آلل‌هایی در محاسبات استفاده شدند که فراوانی آللی آن‌ها حداقل ۱ درصد بود. همچنین فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد برای هریک از برآوردها با استفاده از توزیع t به دست آمد.

نتایج و بحث

کنترل کیفی روی مجموعه‌ای از داده‌ها شامل

1. Minor Allele Frequency (MAF)

۷۷۷۹۶۲ جایگاه SNP در ۲۰ رأس گاو سرابی انجام گرفت. به ترتیب ۳۹۳۶۷، ۱۲۲۴ و ۳۴۳ جایگاه SNP روی کروموزوم‌های X, Y و میتوکندری واقع شده بودند و از محاسبات کنار گذاشته شدند. نرخ فراخوانی تعیین ژنوتیپ در۲۶۸۵۹۳ جایگاه کمتر از ۹۰ درصد بود و یک فرد نیز نرخ فراخوانی تعیین ژنوتیپ کمتر از ۷۰ درصد داشت. بررسی تعادل هاردی- وینبرگ نشان داد که ۱۲۱ جایگاه دارای P-value کمتر از $۱۰^{-۷}$ هستند. همچنین ۱۵۸۷۸ جایگاه دارای فراوانی آلل نادر کمتر از ۰/۰۱ بودند و از مجموعهٔ داده‌ها حذف شدند. به‌منظور کاهش تراکم داده‌ها و استفاده از جایگاه‌های دارای اطلاعات مفید، عدم تعادل پیوستگی میان جایگاه‌ها بررسی شد و ۳۷۵۴۹۸ جایگاه که r^2 میان آن‌ها بیشتر از ۰/۲ بود، از داده‌ها حذف شدند. مجموعهٔ دادهٔ نهایی شامل ۷۴۸۴۳ SNP با نرخ فراخوانی ۹۷/۴ درصد بود. متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار، متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، متوسط فراوانی آلل نادر و درصد آلل‌های در حالت عدم تعادل هاردی-وینبرگ (در سطح ۰/۰۵) در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱. متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، فراوانی آلل‌های نادر و درصد آلل‌های در حالت عدم تعادل هاردی-وینبرگ در مجموعهٔ داده‌های SNP گاو سرابی

در صد آلل‌های در حالت عدم تعادل هاردی-وینبرگ*	متوسط فراوانی آلل‌های نادر	متوسط هتروزیگوسیتی موردانتظار	متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده	تعداد نمونه
۱/۸	۰/۲۳۸	۰/۳۱۹	۰/۳۳۳	۱۹

*: درصد آلل‌هایی که مقدار P حاصل از آزمون در آن‌ها کوچک‌تر از ۰/۰۵ بوده است.

تعداد کل جایگاه‌های مورد بررسی، درصد جایگاه‌های غیر چندشکل، میانگین هارمونیک تعداد نمونه‌ها و تعداد آلل‌های مستقل استفاده‌شده در برآورد N_{eb} به ازای هر یک از کروموزوم‌های مورد بررسی در جدول ۲ ارائه شده است. بیشترین تعداد آلل بررسی‌شده روی کروموزوم یک (۴۲۸۸) و کمترین تعداد آن‌ها روی کروموزوم ۲۵ (۱۵۲۳) مشاهده شد. همچنین بالاترین سطح چندشکلی در کروموزوم ۹ (۹۸ درصد) و کمترین سطح چندشکلی در کروموزوم ۲۵ (۸۴/۶ درصد) دیده شد. برآورد اندازهٔ مؤثر تعداد افراد در حال جفت‌گیری بر اساس روش هتروزیگوسیتی اضافی به ازای هریک از کروموزوم‌ها جداگانه محاسبه شد. برآوردهای مربوط به کروموزوم‌های ۲۵ و۲۶ ناشناخته بودند و در محاسبات لحاظ نشدند. همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، بیشترین برآورد اندازهٔ مؤثر مربوط به کروموزوم ۱۰ و برابر با ۱۴۲/۵ بوده است. کمترین مقدار N_{eb} نیز در آلل‌های موجود روی کروموزوم ۷ مشاهده شد (۷/۲). متوسط مقادیر برآوردشده برابر با ۲۸ بود که به‌عنوان اندازهٔ مؤثر جمعیت در نظر گرفته شد. متوسط فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد برای این برآوردها ۱۷/۳ تا ۴۰/۲ به دست آمد. کمترین فاصلهٔ اطمینان به برآورد کروموزوم ۷ مربوط بوده است (بین ۶/۶ تا ۸) و بیشترین فاصلهٔ اطمینان مشاهده‌شده مربوط به کروموزوم ۱۸ و بین ۲۱/۷ تا ۱۲۶/۲ بوده است. حد بالای دامنهٔ اطمینان در کروموزوم‌های ۱۰ و ۱۱ به سمت بی‌نهایت میل کرده است که نشان از نبود دقت کافی در برآوردهای مربوط به این دو کروموزوم است. حذف این دو برآورد می‌تواند N_{eb} را به ۲۲ کاهش دهد.

نوع ژنتیکی بر پتانسیل تکاملی و قابلیت زیستی درازمدت یک جمعیت تأثیرات شایان‌توجهی دارد. این معیار در ژنتیک حفاظت به کمک نسبت جایگاه‌های چندشکل و سطح هتروزیگوسیتی قابل توصیف است. سطح چندشکلی مناسبی در جمعیت گاوهای سرابی بر اساس داده‌های پرتراکم SNP مشاهده شد. همچنین متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، ۰/۳۲۸ بود که نشان‌دهندهٔ تنوع ژنتیکی مناسب در این جمعیت است. در این مطالعه تعداد زیادی از جایگاه‌های مورد بررسی به دلیل نداشتن کیفیت مناسب از مجموعهٔ داده‌ها کنار گذاشته شدند؛ این امر را می‌توان بیشتر به دلیل اثر اریب ناشی از شیوهٔ

انتخاب SNPها[1] در ایجاد چیپ دانست. این اثر در سایر نژادهای گاو بومی دنیا نیز مشاهده شده است، برای مثال در چندین مطالعهٔ مختلف، چندشکلی و تنوع ژنتیکی بیشتری در نژادهای تایورین در مقایسه با نژادهای ایندیسین گزارش شده است (Gautier *et al*., 2007; Lin *et al*., 2010; Edea *et al*., 2013). نشانگرهایی که تغییرپذیری زیادی در جمعیت پایه دارند، ممکن است تنوع بیشتر یا کمتری به لحاظ فراوانی‌های آللی در جمعیت‌های مورد مطالعه داشته باشند (Ascertainment Bias). به‌طورکلی مشاهده شده است که چیپ‌های SNP ایلومینا شامل بخش زیادی از نشانگرهایی هستند که در نژادهای ایندیسین تثبیت شده‌اند و این امر به مشاهدهٔ تنوع ژنتیکی کمتر در این نژادها در مقایسه با نژادهای تایورین می‌انجامد (Lachance & Tishkoff, 2013). گاوهای بومی ایران نیز در پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم مورد توجه نبوده‌اند و اطلاعات ژنوم این گاوها در طراحی چیپ‌های موجود استفاده نشده است. به همین دلیل ممکن است فراوانی آلل نادر در برخی از جایگاه‌ها در گاوهای بومی ایران نیز کمتر باشد.

جدول ۲. تعداد جایگاه‌های مورد بررسی، درصد جایگاه‌های فاقد چندشکلی و تعداد آلل‌های مستقل در برآورد اندازهٔ مؤثر جمعیت گاو سرابی به ازای کروموزوم‌های مختلف

کروموزوم	تعداد جایگاه‌ها	درصد جایگاه‌های غیرچندشکل	تعداد آلل‌های مستقل
۱	۴۲۸۸	۹/۶	۳۸۷۳
۲	۳۷۰۸	۹/۷	۳۳۴۷
۳	۳۴۹۲	۱۰/۴	۳۱۲۸
۴	۳۵۰۸	۹	۳۱۹۱
۵	۳۲۹۱	۱۲/۲	۲۸۸۹
۶	۳۴۰۲	۱۲/۳	۲۹۸۴
۷	۳۰۳۹	۱۲/۲	۲۶۶۷
۸	۳۰۶۵	۱۳/۸	۲۶۴۱
۹	۳۰۸۱	۸	۲۸۳۶
۱۰	۳۲۲۹	۱۲/۷	۲۸۱۸
۱۱	۳۲۵۲	۱۰/۸	۲۹۰۰
۱۲	۲۴۹۳	۱۱/۲	۲۲۱۴
۱۳	۲۴۷۴	۱۰/۹	۲۲۰۴
۱۴	۲۳۲۷	۱۲/۶	۲۰۳۳
۱۵	۲۵۶۵	۱۰/۵	۲۲۹۵
۱۶	۲۵۰۰	۱۲/۳	۲۱۹۳
۱۷	۲۲۵۹	۱۱	۲۰۱۱
۱۸	۲۱۴۹	۱۳	۱۸۶۹
۱۹	۲۲۱۲	۱۱/۵	۱۹۵۷
۲۰	۲۲۴۶	۹/۷	۲۰۲۹
۲۱	۲۱۵۸	۱۱/۲	۱۹۱۷
۲۲	۲۰۹۹	۸/۷	۱۹۱۷
۲۳	۱۹۲۸	۱۰/۲	۱۷۳۲
۲۴	۱۷۷۴	۱۰/۱	۱۵۹۵
۲۵	۱۵۲۳	۱۵/۴	۱۲۸۸
۲۶	۱۷۳۴	۱۰/۱	۱۵۵۹
۲۷	۱۶۲۴	۱۱/۱	۱۳۳۷
۲۸	۱۶۴۵	۹/۸	۱۴۸۴
۲۹	۱۷۷۸	۹/۷	۱۶۰۶

1. Ascertainment bias

جدول ۳. مقادیر به‌دست‌آمده برای میانگین‌های وزن‌یافته D، اندازهٔ مؤثر تعداد افراد در حال جفت‌گیری و فاصلهٔ اطمینان آن‌ها در سطح ۹۵ درصد در کروموزوم‌های مختلف گاو سرابی

کروموزوم	میانگین وزن‌یافته D	اندازهٔ مؤثر تعداد افراد در حال جفت‌گیری	فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد
۱	۰/۰۲۰۳	۲۵/۱	۱۹/۱-۳۶/۶
۲	۰/۰۲۹۶	۱۷/۳	۱۳/۹-۲۳/۲
۳	۰/۰۱۷۹	۲۸/۴	۲۰/۳-۴۷/۹
۴	۰/۰۱۵۳	۳۳/۱	۲۲/۷-۶۲
۵	۰/۰۲۰۷	۲۴/۶	۱۸/۳-۳۷/۹
۶	۰/۰۲۱۱	۲۴/۱	۱۷/۹-۳۷/۲
۷	۰/۰۷۳۸	۷/۲	۶/۶-۸
۸	۰/۰۲۸۷	۱۷/۹	۱۴/۱-۲۴/۶
۹	۰/۰۲۶۸	۱۹/۱	۱۵-۲۶/۳
۱۰	۰/۰۰۳۵	۱۴۲/۵	۴۳/۳-inf *
۱۱	۰/۰۰۶۳	۸۰/۲	۳۶/۳-inf
۱۲	۰/۰۳۹۲	۱۳/۲	۱۱-۱۶/۶
۱۳	۰/۰۵۷۸	۹/۱	۸/۱-۱۰/۵
۱۴	۰/۰۱۶۳	۳۱/۱	۲۰/۴-۶۷/۲
۱۵	۰/۰۱۲۶	۴۰/۱	۲۴-۱۲۷/۴
۱۶	۰/۰۱۵۸	۳۲/۱	۲۰/۶-۷۴/۴
۱۷	۰/۰۳۲۳	۱۶	۱۲/۶-۲۱/۹
۱۸	۰/۰۱۳۷	۳۶/۹	۲۱/۷-۱۲۶/۲
۱۹	۰/۰۱۹۷	۲۵/۹	۱۸/۲-۴۵/۵
۲۰	۰/۰۴۷۴	۱۱	۹/۳-۱۳/۶
۲۱	۰/۰۲۱۲	۲۴/۱	۱۶/۸-۴۳/۳
۲۲	۰/۰۲۹۶	۱۷/۴	۱۳/۵-۲۴/۶
۲۳	۰/۰۲۹۷	۱۸/۴	۱۳/۹-۲۷/۵
۲۴	۰/۰۳۶۹	۱۴	۱۱/۱-۱۹/۲
۲۵	-۰/۰۴۶۵	Inf	Inf
۲۶	-۰/۰۰۳۲	Inf	Inf
۲۷	۰/۰۲۲۴	۲۲/۸	۱۵/۷-۴۱/۷
۲۸	۰/۰۳۳	۱۵/۶	۱۱/۹-۲۲/۸
۲۹	۰/۰۳۸۱	۱۳/۶	۱۱-۱۷/۹
میانگین کل	-	۲۸	۱۷/۳-۴۰/۲

*: مقادیر به سمت بی‌نهایت میل کرده‌اند.

جلوگیری از کاهش تنوع ژنتیکی و حفظ بقای یک جمعیت نیازمند برآورد صحیح از اندازهٔ مؤثر آن جمعیت است. بر اساس پیشنهاد Franklin (1980) به‌منظور جلوگیری از بروز ضعف ناشی از هم‌خونی در کوتاه‌مدت (در حدود ۵ نسل) در یک جمعیت، اندازهٔ مؤثر جمعیت باید بیشتر از ۵۰ فرد باشد. همچنین در درازمدت باید Ne بیشتر از ۵۰۰ فرد باشد تا تنوع ژنتیکی و بقای طولانی‌مدت جمعیت تضمین شود. این

پیشنهاد در اصطلاح با عنوان قانون سرانگشتی «پنجاه به پانصد» شناخته شده است. اخیراً این قانون، بازبینی و پیشنهاد شده است که Ne کوتاه‌مدت باید حداقل ۱۰۰ فرد باشد تا نسبت هم‌خونی طی پنج نسل کمتر از ۱۰ درصد باشد و Ne درازمدت باید حداقل برابر با ۱۰۰۰ فرد باشد تا بتوان پتانسیل تکاملی جمعیت را در درازمدت حفظ کرد (Frankham *et al.*, 2014). مقدار اندازهٔ مؤثر جمعیت گاو سرابی در این مطالعه بر اساس روش هتروزیگوسیتی اضافی ۲۸ فرد به دست آمد. این عدد با مقادیر پیشنهادشده جهت حفاظت از جمعیت‌ها فاصلهٔ زیادی دارد و این امر نشان‌دهندهٔ خطر جدی حذف گاو بومی سرابی در آیندهٔ نزدیک است. تمایل‌نداشتن روستاییان به پرورش گاوهای بومی به دلیل اقتصادی‌نبودن سطح تولید آن‌ها در مقایسه با نژادهای خارجی، موجب کاهش شدید جمعیت این گاوها در سال‌های اخیر شده است. از سوی دیگر تلاقی‌های کنترل‌نشده میان نژادهای وارداتی با گاوهای سرابی، خلوص این نژاد را با چالش جدی روبه‌رو کرده است. از این رو، تدوین برنامه‌هایی برای حفاظت از گاوهای خالص باقی‌مانده ضروری به نظر می‌رسد. برای حفظ این نژاد در زیست‌بوم طبیعی آن، تعریف یک سیستم تولیدی اقتصادی جهت گاوهای بومی ضروری است. به عبارت دیگر پرورش گاوهای بومی تنها زمانی اقتصادی خواهد بود که در مکان‌هایی با شرایط مرتعی مناسب و بر اساس سیستم چرا یا مبتنی بر استفاده از پسمانده‌های برداشت غلات صورت پذیرد. همچنین سوق‌دادن اهداف پرورش به سمت تولید گوشت می‌تواند توجیه اقتصادی بیشتری به همراه داشته باشد. کنترل تلاقی‌ها و شناسایی دام‌های خالص نیز باید مورد توجه جدی قرار گیرد. حفاظت در خارج از زیست‌بوم می‌تواند از طریق ایجاد بانک ژن مورد توجه قرار گیرد. در این زمینه استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌تواند در شناسایی دام‌های خالص مؤثر باشد. همچنین استفاده از نشانگرهای SNP جهت محاسبهٔ روابط ژنتیکی میان حیوانات، انتخاب بهینهٔ مشارکتی و حفظ تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها قابل توصیه است (Engelsma *et al.*, 2014). از آنجا که در بیشتر دام‌های بومی کشور، داده‌های شجره‌ای و اطلاعات سرشماری شدهٔ صحیحی یافت نمی‌شود، استفاده از نشانگرهای متراکم SNP می‌تواند جایگزین مناسبی برای بررسی خصوصیات ژنتیکی این جمعیت‌ها باشد.

برآورد دقیق پارامترهای ژنتیکی ممکن است تحت تأثیر اندازهٔ کوچک نمونه‌ها قرار گیرد. بنابراین، سؤال متداول این است که آیا تعداد افراد نمونه‌گیری‌شده می‌تواند اطلاعات کافی را برای آنالیزهای ژنتیک حفاظت فراهم آورد. Smith & Wang (2014) ثابت کردند که اندازهٔ کوچک نمونه تنها می‌تواند موجب ایجاد اریب کوچکی در برآورد معیارهایی نظیر هتروزیگوسیتی مورد انتظار، F_{ST} جفتی و ساختار جمعیت‌ها شود، اما این اریب در مورد معیاری مانند تنوع آللی بسیار بیشتر است. Willing *et al.* (2012) گزارش کرده‌اند که به‌هنگام برآورد آمارهٔ F_{ST} (که خود بر اساس مقادیر هتروزیگوسیتی محاسبه می‌شود) در صورت استفاده از برآوردگر مناسب و در حضور تعداد زیادی از نشانگرهای ژنتیکی دو آللی، اندازهٔ نمونه می‌تواند به‌طور معناداری کاهش داده شود (۴ تا ۶ نمونه). نتایج مشابهی نیز دربارهٔ هتروزیگوسیتی مورد انتظار توسط Pruett & Winker (2008) گزارش شده است.

نتیجه‌گیری کلی

اندازهٔ مؤثر جمعیت در نژاد سرابی بسیار کم بود (۲۸ فرد). حفظ ماهیت ژنتیکی این نژاد ارزشمند در دوره‌های کوتاه‌مدت و بلندمدت دچار مخاطرهٔ جدی شده است. کاهش اندازهٔ مؤثر موجب افزایش حساسیت این جمعیت به تغییرات محیطی پیش‌رِو خواهد شد. از این رو لازم است با به‌کارگیری راهکارهایی نظیر شناسایی و پرورش گاوهای خالص، اقتصادی‌کردن سیستم تولیدی، کنترل تلاقی‌گری‌ها و ایجاد بانک‌های ژنی برای حفاظت از این نژاد برنامه‌ریزی شود.

سپاسگزاری

از همهٔ کارکنان ایستگاه اصلاح‌نژاد گاو سرابی به پاس همکاری ایشان در تهیهٔ نمونه‌های مورد مطالعه تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Caballero, A. (1994). Developments in the prediction of effective population size. *Heredity*, 73, 657-679.
2. Do, C., Waples, R.S., Peel, D., Macbeth, G.M., Tillett, B.J. & Ovenden, J.R. (2014). NEESTIMATOR v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 209-214.
3. Edea, Z., Dadi, H., Kim, S.W., Dessie, T., Lee, T., Kim, H., Kim, J.J. & Kim, K.S. (2013). Genetic diversity, population structure and relationships in indigenous cattle populations of Ethiopia and Korean Hanwoo breeds using SNP markers. *Frontiers in Genetics*, 4, 35.
4. Engelsma, K.A., Veerkamp, R.F., Calus, M.P.l., Bijma, P. & Windig, J.J. (2012). Pedigree and marker based methods in the estimation of genetic diversity in small groups of Holstein cattle. *Jouranl of Animal Breeding and Genetics*, 129, 195-205.
5. Engelsma, K.A., Veerkamp, R.F., Calus, M.P.L. & Windig, J.J. (2014). Consequences for diversity when animals are prioritized for conservation of the whole genome or of one specific allele. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 131(1), 61-70.
6. Fahlén, J. (2014). *SNP-based conservation genetics of the southern Swedish brown bear (Ursus arctos)*. M.Sc dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden.
7. Frankham, R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. *Genetical Research*, 66, 95-107.
8. Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126, 131-140.
9. Frankham, R., Bradshaw, C.J.A. & Brook, B.W. (2014). Genetics in conservation and management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, 170, 56-63.
10. Franklin, I.R. (1980). Evolutionary change in small populations. In: M.E. Soulé & B.A. Wilcox (Ed.), *Conservation biology: An evolutionary-ecological perspective*. (pp. 135–150). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
11. Gautier, M., Faraut, T., Moazami-Goudarzi, K., Navratil, V., Foglio, M., Grohs, C., Boland, A., Garnier, J.G., Boichard, D., Lathrop, G.M., Gut, I.G. & Eggen, A. (2007). Genetic and haplotypic structure in 14 European and African cattle breeds. *Genetics*, 177, 1059-1070.
12. Hedgecock, D., Launey, S., Pudovkin, A.I., Naciri, Y., Lape`gue, S. & Bonhomme, F. (2007). Small effective number of parents (N b) inferred for a naturally spawned cohort of juvenile European flat oysters Ostrea edulis. *Molecular Biology*, 150, 1173-1182.
13. Helyar, S.J., Hemmer-Hansen, J., Bekkevold, D., Taylor, M.I., Ogden, R., Limborg, M.T., Cariani, A., Maes, G.E., Diopere, E., Carvalho, G.R. & Nielsen, E.E. (2011). Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources*, 11, 123-136.
14. Hill, W.G. (1981). Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research*, 38, 209-216.
15. Lachance, J. & Tishkoff, S.A. (2013). SNP ascertainment bias in population genetic analyses: why it is important, and how to correct it. *Bioessays*, 35, 780-786.
16. Lin, B.Z., Sasazaki, S. & Mannen, H. (2010). Genetic diversity and structure in Bos taurus and Bos indicus populations analyzed by SNP markers. *Animal Science Journal*, 81, 281-289.
17. Luikart, G. & Cornuet, J.M. (1999). Estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny. *Genetics*, 151, 1211-1216.
18. Luikart, G., Ryman, N., Tallmon, D.A., Schwartz, M.K. & Allendorf, F.W. (2010). Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conservation Genetics*, 11, 355-373.
19. Matukumalli, L.K., Lawley, C.T., Schnabel, R.D., Taylor, J.F., Allan, M.F., Heaton, M.P., O'Connell, J., Moore, S.S., Smith, T.P., Sonstegard, T.S. & Van Tassell, C.P. (2009). Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS ONE*, 4, e5350.
20. Nomura, T. (2008). Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. *Evolutionary Applications*, 1(3), 462-474.
21. Nomura, T. (2009). Interval estimation of the effective population size from heterozygote-excess in SNP markers. *Biometrical Journal*, 51(6), 996-1016.
22. Pollak, E. (1983). A new method for estimating the effective population size from allele frequency changes. *Genetics*, 104, 531-548.
23. Pruett, C.L. & Winker, K. (2008). The effects of sample size on population genetic diversity estimates in song sparrows Melospiza melodia. *Journal of Avian Biology*, 39, 252-256.

24. Pudovkin, A.I., Zaykin, D.V. & Hedgecock, D. (1996). On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. *Genetics*, 144, 383-387.
25. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I., Daly, M.J. & Sham, P.C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81, 559-575.
26. Robertson, A. (1965). The interpretation of genotypic ratios in domestic animal populations. *Animal Production*, 7, 319-324.
27. Schmeller, D. & Merilä, J. (2006). Demographic and genetic estimates of effective population and breeding size in the Amphibian Rana temporaria. *Conservation Biology*, 21(1), 142-151.
28. Smith, O. & Wang, J. (2014). When can noninvasive samples provide sufficient information in conservation genetics studies?. *Molecular Ecology Resources*, 14, 1011-23.
29. Willing, E., Dreyer, C. & van Oosterhout, C. (2012). Estimates of genetic differentiation measured by FST do not necessarily require large sample sizes when using many snp markers. *PLoS ONE*, 7(8), e42649.

Iranian Journal of Animal Science, Vol. 46, No. 3, Autumn 2015

Estimation of effective population size in Sarabi cattle based on single nucleotide polymorphism markers

Karim Karimi[1*], Ali K. Esmaeelizadeh[2] and Masoud Asadi Fozi[3]
1. Ph. D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, and Member of Young Researchers, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran
2, 3. Associate Professors, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran
(Received: Dec. 17, 2014 - Accepted: Sep. 26, 2015)

ABSTRACT

The objective of this study was to estimate the effective number of breeders in Sarabi cattle population using heterozygote-excess method based on single nucleotide polymorphism markers. Data consisted of 20 Sarabi cows. SNP genotyping was performed using Illumina High-density Bovine BeadChip designed to genotype 777,962 SNPs. Average observed heterozygosity, expected heterozygosity, minor allele frequencies and percentage of deviation from Hardy-Weinberg test were estimated. Effective number of breeders was estimated per each chromosome using NEESTIMATOR (v2) software based on heterozygote-excess method. Average chromosome-wise effective number of breeders was equal to 28 and corresponding average confidence interval was between 17.3 and 40.2. Results of this study indicated that Sarabi breed is on serious risk of extinction. Design of appropriate programs is necessary to conserve remaining purebred cattles.

Keywords: effective population size, genetic conservation, minor allele frequency, observed heterozygosity.

* Corresponding author E-mail: Karim.karimi81@gmail.com Tel: +98 910 7006858