نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱٤، بهـــار ۱۳۹٦
ص‌ص: ٦٥~٧٦

بررسی چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی ناحیه پروموتور ژن TFAM و ارتباط آن با صفات رشد در گاو سیستانی

- **حسین مرادقلی**
دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشگاه زابل
- **غلامرضا داشاب** (نویسنده مسئول)
استادیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشگاه زابل.
- **مهدی وفای واله**
استادیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشگاه زابل

تاریخ دریافت : اردیبهشت ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش : خرداد ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۵۴۴۱۴۷۹
Email: dashab@uoz.ac.ir

چکیده

گاو سیستانی نژاد گوشتی و از ذخایر ژنتیکی باارزش کشور است که از لحاظ تولید گوشت، کمیت و کیفیت لاشه و بازده غذایی مناسب است. در پژوهش حاضر، به منظور بررسی چندشکلی ژن TFAM (Mitochondrial transcription factor A) با استفاده از PCR-RFLP، از ۱۵۰ رأس گاو سیستانی به صورت تصادفی و انفرادی خون‌گیری از ورید گردنی انجام گرفت. سپس نمونه‌های خون دام‌ها با روش شستشوی نمکی بهینه شده استخراج وکیفیت آن‌ها با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. ناحیه پروموتور جایگاه TFAM به طول ۸۰۱bp با روش PCR تکثیر و محصول PCR توسط آنزیم *BsuRI* برش داده شد. محصولات هضم شده توسط الکتروفورز با ژل آگارز ۳ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید نمایان‌سازی گردیدند. با توجه به این که آنزیم برشی مذکور در قطعه تکثیر شده دارای چندین سایت برشی می‌باشد، نتایج الگوی هضمی در حیوانات هموزیگوت (AA) سه باند با اندازه ۱۵۲، ۱۸۷ و ٤٦۲ جفت باز، در حیوانات هموزیگوت (CC) چهار باند با اندازه ۸۳، ۱۰٤، ۱۵۲ و ٤٦۲ جفت باز و نهایتاً در حیوانات هتروزیگوت (AC) پنج باند با اندازه‌های ۸۳، ۱۰٤، ۱۵۲، ۱۸۷ و ٤٦۲ جفت باز مشاهده گردید. داده‌های آماری با استفاده از نرم افزار POPGENE3.2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جمعیت در جایگاه TFAM انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را نشان داد(P<۰/۰۵). شاخص شانون(I)، شاخص نئی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار به ترتیب، ٦۹، ٤۹، ۳۷، ۵۰ درصد محاسبه شدند. در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های گاو سیستانی در جایگاه ژن TFAM با صفات رشد مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: گاو سیستانی، صفات رشد، افزایش وزن، ژن TFAM

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 65-76

Polymorphism of TFAM gene and its association with growth traits in Sistani cattle

By: Hossein Moradgholi[1], Gholam Reza Dashab[2]*, Mehdi Vafaei Valeh[2]

1: MS.c of Animal Breeding and Genetic, Department of Animal Science, University of Zabol.

2: Assistant professor of Animal Breeding and Genetic, Department of Animal Science, University of Zabol, Email: dashab@uoz.ac.ir

Received: March 2016 **Accepted: May 2016**

Sistani beef cattle is a native breed of east of Iran that as a valuable genetic resource in the tropical area could be good a candidate to produce high quantity of muscular carcass portions with high efficiency. In order to explore the Mitochondrial transcription factor A gene (TFAM) polymorphisms using PCR-RFLP, 150 Sistani cows were randomly selected and then blood samples were taken from the jugular vein of each animal individually. Thereafter, blood samples were salting-out and electrophoresed with 1% agarose gel. The position of the TFAM promoter region amplified by PCR and PCR products with 801bp length were sliced by *BsuRI* enzyme. Digestion products on 3% agarose gel were shown by electrophoresis and staining with ethidium bromide. The patterns of digestion in AA homozygotes, CC homozygotes, and AC heterozygotes were as follows: three bands with 152, 187, and 462bp; four bands with 83, 104, 152, and 462bp; and five bands with 83, 104, 152, 187, and 462bp, respectively. The results showed that the position of TFAM population deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). Shannon index (I), Nei index, observed heterozygosity, and expected heterozygosity were 0.69, 0.49, 0.37, and 0.50, respectively. In conclusion, no significant differences between genotypes of Sistani cattle were observed for TFAM gene polymorphism and growth traits.

Key words: Sistani cattle, Growth traits, Daily gain, TFAM gene.

مقدمه

شواهد امروزی، نظریه همزیستی درونی (Endosymbiosis) را تقویت کرده و تأکید دارد که میتوکندری از باکتری‌های قدیمی مشتق شده است که با اندازه ۱-۰/۵ میکرومتر درون سیتوپلاسم سلول‌های هسته‌دار (یوکاریوتی) واقع شده و دارای DNA خارج هسته‌ای به نام mtDNA است (Beltinger و همکاران، ۲۰۰۰). میتوکندری از بزرگ‌ترین اندامک‌های سلول بوده که ۲۵ درصد حجم سیتوپلاسم را اشغال می‌کند. تعداد آن در سلول‌ها از چند صد تا چند هزار متغیر است. هر میتوکندری دارای ۲ تا ۱۰ نسخه از DNA است. در نتیجه به طور معمول هر سلول دارای 10^3 تا 10^4 نسخه mtDNA می‌باشد که توسط DNAی هسته (nuclear DNA) تنظیم می‌شود (Dimauro و Schon، ۲۰۰۱). اندازه mtDNA در پستانداران بین ۱۶ تا ۱۸ کیلو باز متغیر است. mtDNA گاو مولکول حلقوی دو رشته به اندازه ۱۶۶۶۶ جفت باز می‌باشد و شامل ۳۷ عدد ژن به هم چسبیده بوده که تنها توسط چند نوکلئوتید از هم جدا شده‌اند. دو ژن آن رمز کننده rRNA (۱۶s rRNA و ۱۲s rRNA)، ۲۲ ژن رمزکننده tRNA و ۱۳ ژن آن رمزکننده پلی‌پپتیدهایی می‌باشد که همگی از ترکیبات زنجیره تنفسی هستند (Woodward، ۲۰۰۸).

سال‌ها تصور می‌شد، بافت چربی نقش اصلی در تنظیم و متابولیسم انرژی از طریق ترشح، ذخیره‌سازی و حمل و نقل تری‌گلیسریدها دارند. اما با کشف میتوکندری در درون سلول‌ها دیدگاه‌ها تغییر کرد؛ زیرا بسیاری از متابولیت‌های مورد نیاز برای سنتز تری-

گلیسرید از زمان پیدایش میتوکندری شناخته شده است (Wilson و همکاران، ۱۹۹۸). سیستم میتوکندریایی، یکی از راه‌های تولید اسید چرب می‌باشد که عکس بتا اکسیداسیون عمل می‌کند (Kunej و همکاران، ۲۰۰۹).

فاکتور رونویسی میتوکندری TFAM (Mitochondrial transcription factor A)، اولین عامل رونویسی میتوکندری شناسایی شده است (Fisher و Clayton، ۱۹۸۸) و به همراه پروتئین‌های گروه HMG (High Mobility Group) نقش اساسی در بیان، تعمیر، نگهداری و سازماندهی ژنوم میتوکندری دارد (Chan و همکاران، ۲۰۱۲). پروتئین TFAM نقشی شبیه هیستون در هسته سلول دارد و به همراه رشته نوکلئوتیدی mtDNA است؛ زیرا مدارک و شواهد نشان می‌دهند، یک مولکول mtDNA به طور متوسط با ۹۰۰ مولکول TFAM بسته بندی شده تا DNA میتوکندری فشرده گردد (Ahmetov و همکاران، ۲۰۱۰). همچنین، TFAM عامل تنظیم تعداد کپی mtDNA در پستانداران است. با بررسی سطح بالا و پایین TFAM جنین موش مشخص شد که رابطه مستقیم بین سطح پروتئین TFAM و تعداد کپی mtDNA وجود دارد (Clayton، ۲۰۰۰). همچنین، بررسی بیان TFAM درون سلول‌های هیلا (Hela) نیز نشان داد که مقدار mtDNA به صورت موازی با مقدار TFAM ارتباط دارد. بنابراین، TFAM نقش تحریک رونویسی mtDNA را دارد. از طرف دیگر TFAMبا پروتئین‌های HMG متصل شده و باعث باز کردن پیچ و تاب DNA میتوکندری می‌گردد و در نتیجه شروع رونویسی از mtDNA تسهیل می‌گردد. شواهد و مدارک نشان داده که وارد نمودن TFAM به کبد موش‌های صحرایی سنتز RNAرا تا ۴ برابر افزایش می‌دهد (Clayton، ۲۰۰۰).

با مطالعه ژن TFAM در انسان، موش، موش صحرایی، مرغ و گاو ۶ ناحیه اگزون و ۷ ناحیه اینترون مشخص گردید. در توالی ژن TFAM گاوی شناسایی شده، ناحیه پروموتور به طول bp ۸۰۱، ناحیه اگزون ۱به طولbp ۴۰۵، ناحیه اگزون۲ به طولbp ۴۲۱، ناحیه اگزون۳ به طول bp ۴۰۷، ناحیه اگزون۴ به طولbp ۴۵۶، ناحیه اگزون ۵ به طولbp ۳۹۲، ناحیه اگزون۶ به طول bp ۴۰۸، ناحیه اینترون۵ به طول bp ۲۲۲، ناحیه اینترون۶ و ناحیه اگزون۷ به طول bp۷۳۶ گزارش شد (Woodward، ۲۰۰۸). در تحقیق آمیخته‌های حاصل از تلاقی گاوهای Wagyu×Limousin، دو جهش نقطه‌ای (SNP) در ناحیه پروموتور ژن TFAM گزارش گردید. اولین جهش در موقعیت ۱۲۲۰– ژن قرار دارد که منطقه برشی آنزیم *BsuRI* است، که باز آدنین (A) به سیتوزین (C) تبدیل شده است. دومین جهش شناسایی شده در سایت برشی آنزیم *Mbol* TFAM (C/T) واقع شده که در موقعیت ۱۲۱۲– ژن قراردارد (Jiang و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج نشان داده اند که چند شکلی نواحی فوق مرتبط با کیفیت لاشه و ضخامت چربی زیر پوست هستند (Jiang و همکاران، ۲۰۰۵؛ Amaral و همکاران، ۲۰۰۷).

نتایج مطالعات محققین نشان دادند که هر دو SNPها پروموتور ژن TFAM گاو به طور مشترک و یا به طور جداگانه منجر به افزایش کیفیت گوشت از طریق افزایش چربی داخل عضله می‌گردند. همچنین، مقایسه ژن TFAM با ژن‌های LEP، TG و DGAT1 اثر قابل توجه ژن TFAM برکیفیت لاشه را نشان داد (Kaplanová و همکاران، ۲۰۰۹).

گاو سیستانی به عنوان یکی از پتانسیل‌ها و سرمایه‌های دامی کشور است که دارای استعدادها و قابلیت‌های ژنتیکی بالایی از نظر تولید گوشت می‌باشد. همچنین، خصوصیاتی مانند مقاومت به بیماری‌ها، تغییرات جوی و نیز کم توقعی این نژاد در کنار استعداد رشد و پروار شدن جبرانی گوساله‌های نر سیستانی در دوران پرواربندی، قابلیت تولید گوشت، کمیت و کیفیت لاشه و بازده غذایی و قابلیت پرواربندی مناسب در این نژاد قابل توجه می‌باشد (بیرجندی، ۱۳۷۶). لذا بررسی چندشکلی ژن TFAM و اثرات آن روی صفات مختلف در این نژاد بومی می‌تواند در تعیین استراتژی‌های اصلاح نژادی مفید باشد. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر، بررسی چندشکلی تک نوکلئوتیدی ناحیه پروموتور جایگاه ژن TFAM و ارتباط آن‌ها با صفات رشد در گاو سیستانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر بر روی گله گاو سیستانی موجود در ایستگاه تحقیقات (مرکز به‌گزینی گاو سیستانی) شهرستان زهک انجام گرفت. خون‌گیری از سیاهرگ وداجی تعداد ۱۵۰ رأس گاو سیستانی در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA (۰/۵ درصد) انجام شد. در طی مدت استخراج DNA، نمونه‌ها در آزمایشگاه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در تحقیق حاضر استخراج DNA به روش شستشوی نمکی بهینه شده انجام گرفت. جهت بررسی کمیت و کیفیت DNA از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز۱ درصد استفاده شد.

الیگو نوکلئوتیدهای مورد استفاده در تحقیق حاضر شامل یک جفت آغازگر اختصاصی (Jiang و همکاران، ۲۰۰۵) بود که توسط شرکت الیگو (Oligo) سنتز گردید (جدول ۱).جایگاه ژن TFAM بر روی کرموزوم ۲۸ گاوی واقع شده است.

جدول۱- ویژگی‌های آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر ناحیه پروموتور ژن TFAM

مکان ژنی	توالی پرایمرها رفت و برگشت	اندازه (جفت باز)	شماره دسترسی	منبع
پروموتور جایگاه ژنی TFAM	F:5`- GTTGTTGCAGAAATCAGCTAAAATG -3` R:5`- CATCCACTGAGACTATCGCTGACCT -3`	801	NM_003201	Jiang و همکاران، ۲۰۰۵

در تحقیق حاضر، واکنش PCR با استفاده از کیت PCR Master (شرکت تکاپو زیست تهران) در حجم ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسیکلر اپندورف امریکا استفاده گردید. اجزای کیت شامل تیوب‌های استریل و یک عدد بافر با ترکیبات dNTP mix, Buffer 10X PCR Buffer, *Taq* DNA Polymerase, MgCL2 می‌باشد. ترکیبات مورد استفاده در واکنش شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر Master (10X)، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت (10 ng/µL)، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت (10 ng/µL)، ۳ میکرولیتر DNA (100 pmol/µL) و ۱۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه بودند.

برنامه حرارتی شامل ۹۵ درجه سانتیگراد برای واسرشته سازی اولیه به مدت ۱۰ دقیقه، در ادامه ۳۵ سیکل با دماهای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته سازی ثانویه به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به منظور اتصال آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتاً آخرین مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکر مدل اپندرف انجام گرفت. فرآورده‌های تکثیر شده حاصل از واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در ولتاژ ثابت ۸۰ به مدت یک ساعت الکترو فورز شدند و رنگ‌آمیزی باندها در محلول اتیدیوم بروماید انجام گرفت. سپس ۶ میکرولیتر از محصول PCR در محیط بافری شامل ۲ میکرولیتر بافر10XBuffer B3 و در حضور ۰/۵ میکرولیتر آنزیم برشی *BsuRI* (10 unit/ µL) در حجم ۲۰ میکرولیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۲ ساعت مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. نهایتاً جهت متوقف کردن فعالیت آنزیمی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در داخل بن ماری قرار داده شد. محصول برش یافته روی ژل آگارز ۳ درصد در ولتاژ ۸۰ به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شد.

آنزیم *BsuRI*، SNP ناحیه پروموتور باز آدنین (A) به سیتوزین (C) جهش یافته را شناسایی کرده و توالی مورد نظر را برش می‌زند (Jiang و همکاران، ۲۰۰۵).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی جمعیت از نرم افزار POPGENE3.2 (Yeh و همکاران، ۱۹۹۹) استفاده شد. به کمک این نرم افزار فراوانی ژنی و ژنوتیپی، تعادل هاردی-واینبرگ و سایر شاخص‌های تنوع ژنتیکی و جمعیتی محاسبه گردید.

برای تجزیه و تحلیل داده‌های مرتبط با رشد با ژنوتیپ‌های جایگاه مورد مطالعه از مدل‌های خطی ثابت استفاده شد. صفات مورد مطالعه شامل وزن تولد (BW)[1] ، وزن از شیرگیری(W3)[2] ، وزن ۶ ماهگی (W6)[3]، وزن ۹ ماهگی (W9)[4] و وزن یک‌سالگی (YW)[5] به همراه افزایش وزن دوره‌ای شامل تولد تا ۳ ماهگی (ADG1)[6]، ۳ تا ۶ ماهگی (ADG2)[7]، ۶ تا ۹ ماهگی (ADG3)[8] و ۹ تا ۱۲ ماهگی (ADG4)[9] بودند. جهت برآورد اثرات عوامل موجود در مدل از رویه GLM نرم افزار SAS (۲۰۰۹) استفاده گردید و مقایسه میانگین حداقل مربعات سطوح عوامل مورد مطالعه از روش توکی کرامر در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت، مدل آماری عبارت است از:

$$Y_{ijk}= \mu+ S_i+ Y_j+ G_k+e_{ijk}$$

در مدل بالا، Y_{ijk}، رکورد فنوتیپی هر یک از صفات مرتبط با رشد؛ μ، میانگین کل؛ S_i، اثرات ثابت جنس (دو سطح)؛ Y_j، اثرات ثابت سال تولد (سه سطح)؛ G_k، اثر ثابت ژنوتیپ حیوان در جایگاه TFAM (سه سطح) و e_{ijk}،خطای تصادفی عوامل غیر قابل کنترل یا باقیمانده می‌باشد. در ضمن وزن تولد به عنوان عامل همبسته برای اوزان ۳، ۶، ۹ و ۱۲ماهگی در مدل وارد شد، اما به جهت این که معنی‌دار نبود در مدل نهایی حذف شد.

نتایج و بحث

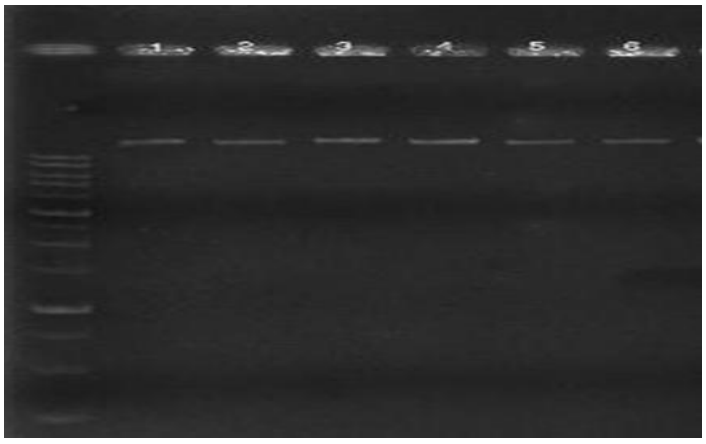
نتایج نشان دادند که استفاده از روش شستشوی نمکی بهینه شده برای استخراج DNA از نمونه خون از لحاظ کمیت و کیفیت و مدت زمان استحصال DNA مناسب می‌باشد. جهت اطمینان از کیفیت DNA نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز گردید. نمونه‌ها دارای باندهای بدون شکستگی بوده و در نهایت کیفیت مطلوبی داشتند (شکل ۱).

تکثیر قطعه ۸۰۱ جفت بازی از ناحیه پروموتور ژن TFAM به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به خوبی صورت گرفت. قطعه ۸۰۱ جفت بازی بدون قطعات غیراختصاصی به دست آمد که با نتایج Jiang و همکاران (۲۰۰۵) بر روی آمیخته‌های حاصل از تلاقی گاوهای Wagyu×Limousin و Ayres و همکاران (۲۰۱۰) بر روی تلیسه‌های Nellore مطابقت داشت (شکل ۲).

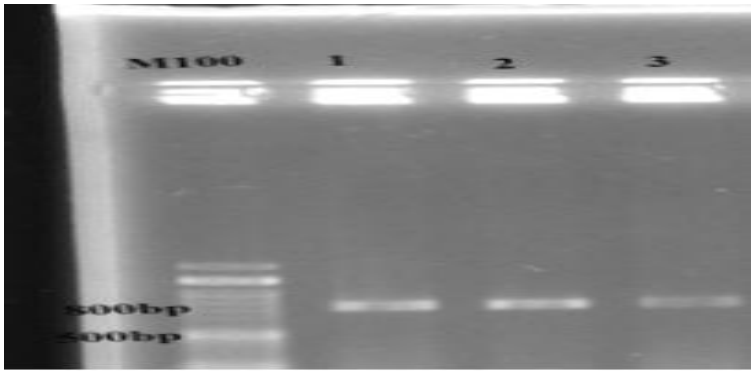
پس از هضم محصول PCR توسط آنزیم *BsuRI* ، محصولات هضم روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز گردیدند و قطعات حاصل از هضم توسط آنزیم برشی مورد شناسایی و بررسی قرار گرفت (شکل ۳). نتایج این مطالعه منجر به شناسایی سه ژنوتیپ AA، AC و CC در جایگاه مورد مطالعه ژن TFAM شد.

---

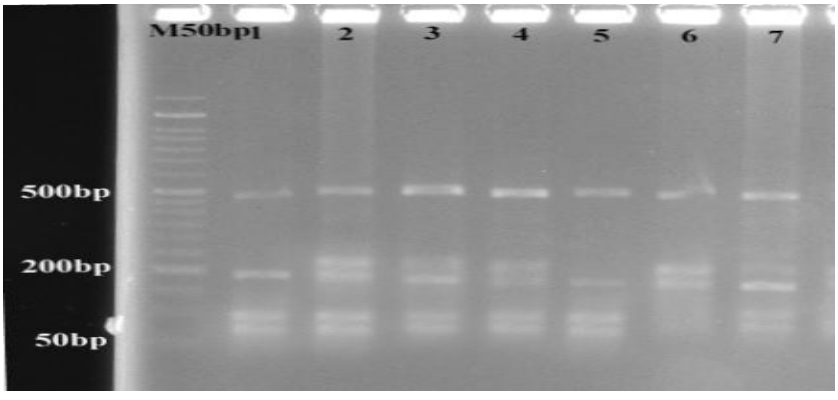
[1] Body weight
[2] Three months weight
[3] Six months weight
[4] Nine months weight
[5] Yearling weight
[6] Average daily gain from birth day to 3 months
[7] Average daily gain from 3 to 6 months
[8] Average daily gain from 6 to 9 months
[9] Average daily gain from 9 to 12 months



شکل ۱– DNA استخراج شده از خون کامل با استفاده از روش نمکی بهینه یافته گاوهای سیستانی روی ژل آگارز ۱٪ (از سمت چپ: چاهک اول Ladder M250 و سایر چاهک ها مربوط به نمونه‌های مختلف DNA است).



شکل ۲– الکتروفورز محصولات PCR برای جایگاه TFAM گاوهای سیستانی بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ (از سمت چپ: چاهک اول Ladder M100 و سایر چاهک‌ها مربوط به نمونه‌های مختلف).



شکل ۳– الکتروفورز محصولات حاصل از هضم توسط آنزیم *BsuRI* در جایگاه ژن TFAM در گاو های سیستانی (از سمت چپ: چاهک اول Ladder M50 و سایر چاهک‌ها مربوط به:حیوانات ۱و۵ هموزیگوت آلل C با چهار باند با اندازه ۸۳، ۱۰۴، ۱۵۲ و ۴۶۲bp، حیوانات ۲، ۳، ۴ و ۷ هتروزیگوت AC پنج باند با اندازه‌های ۸۳، ۱۰۴، ۱۵۲، ۱۸۷ و ۴۶۲bp و حیوان ۶ هموزیگوت آلل سه باند با اندازه ۱۵۲، ۱۸۷ و bp ۴۶۲ A مشاهده شد).

مطابق شکل ۳، نمونه‌ای که محصولات هضم آن دارای قطعات ۸۳، ۱۰۴، ۱۵۲ و ۴۶۲bp بودند، ژنوتیپ هموزیگوت CC، نمونه‌هایی که

دارای قطعات ۸۳، ۱۰۴، ۱۵۲، ۱۸۷ و ۴۶۲bp باشند ژنوتیپ هتروزیگوت AC و نمونه‌هایی که دارای قطعات ۱۵۲، ۱۸۷ و ۴۶۲bp بودند، ژنوتیپ هموزیگوت AA نامگذاری شدند. فراوانی ژنوتیپ‌های جایگاه TFAM و متعاقب آن فراوانی آللی در جدول ۲ ارائه شده است. در تحقیق حاضر ژنوتیپ هتروزیگوت AC با ۳۷ درصد بیشترین فراوانی را در بین سایر الگوها نشان داد. در تحقیقAyres و همکاران (۲۰۱۰)، فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AC و CC در نژاد Nellore به ترتیب ۸۱، ۱۸ و ۱درصد گزارش گردید. در نتایج Jiang و همکاران (۲۰۰۵) بر روی نسل F2 گاوهای دورگهWagyu x Limousin که در ایالات متحده امریکا انجام گرفته، فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AC و CC به ترتیب ۱۸، ۴۹ و ۳۲ درصد گزارش گردید که بیشترین فراوانی متعلق به ژنوتیپ هتروزیگوت AC می‌باشد. همچنین، در مطالعه فراوانی ژنی در جایگاه BOLA-DRB در جمعیت گاو کشور ایالات متحده امریکا (A=٪۴۴ و C=٪۵۶) و در جمعیت گاوهای برزیلی (A=٪۹۰ و C=٪۱۰) گزارش شده است. نتایج تحقیق حاضر نشان دادند که فراوانی ژنی و ژنوتیپی جایگاه BOLA-DRB در جمعیت گاوهای نژاد سیستانی مطالعه حاضر در حدواسط دو جمعیت گاوهای برزیلی و امریکایی و مشابه گاوهای آمیخته حاصل از تلاقی دو نژاد گاوهای Wagyu×Limousin قرار دارند که Wagyu از نژادهای بومی کشور ژاپن و متعلق به گونه Bos Indicus هستند که توده گاوهای سیستانی هم در همین جنس و گونه قرار دارد و لیموزین یکی از نژادهای اروپایی و متعلق به جنس و گونه Bos Taurus است. لذا دلیل شباهت ساختار ژنتیکی جایگاه مذکور در بین هیبریدهای حاصل از این دو نژاد با توده گاوهای سیستانی احتمالا مربوط به سرمنشاء اصلی نژادها و شرایط مشابه محیطی و سازگاری نژادهای گاو جهت ماندگاری در این شرایط است.

تنوع مبنای همه گزینش‌ها بوده و انتخاب ژنوتیپی نیز نیازمند تنوع می‌باشد. بدیهی است که با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه حدود انتخاب نیز وسیع‌تر خواهد گردید. تنوع ژنتیکی در یک جایگاه را می‌توان با معیارهایی همچون هتروزیگوسیتی مورد انتظار (HE)[10] و هتروزیگوسیتی مشاهده شده (HO)[11] تعیین کرد (Yeh و همکاران، ۱۹۹۹). اطلاعات مربوط به میزان هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی در جدول ۲ ارائه شده است. میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژن TFAM به ترتیب ۳۷ و ۵۰ درصد محاسبه گردید. از آن‌جایی که یک جایگاه ژنی با داشتن ۱۰ درصد هتروزیگوسیتی، چند-شکل محسوب می‌گردد (Botstein و همکاران، ۱۹۸۰؛ Joti، ۲۰۰۸) بنابراین، می‌توان نشانگر تکثیر یافته را چندشکل در نظر گرفت.نتایج آزمون مربع کای ($\chi 2$) و نسبت درست‌نمایی (G2) در جایگاه ژن TFAM انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان داد ($P<۰/۰۵$) (جدول ۳). عدم تعادل در جایگاه ژن TFAM می‌تواند به دلیل کوچک بودن اندازه جمعیت، تعداد نمونه، پیش زمینه ژنتیکی حیوانات (نحوه تشکیل جمعیت پایه در گله‌های هسته) و روابط خویشاوندی بالا و همچنین به‌گزینی چندین ساله گاو سیستانی موجود در ایستگاه تحقیقاتی شهرستان زهک باشد.

شاخص شانون (I) بیانگر میزان تنوع ژنتیکی در هر جمعیت بر حسب درصد است، یعنی هر چه مقدار این شاخص به صفر نزدیک‌تر شود تنوع کم خواهد بود. میزان شاخص شانون(I) محاسبه شده برابر ۶۹ درصد بود که بیانگر بالا بودن تنوع در جمعیت مورد مطالعه است (جدول ۴). شاخص دیگری که برای تعیین میزان چندشکلی جایگاه مورد مطالعه برآورد گردید، شاخص PIC بود. بر اساس این شاخص (اگر مقدار PIC کمتر از ۰/۲۵ باشد میزان چند شکلی کم، اگر PIC بین ۰/۲۵ و ۰/۵۰ باشد چندشکلی متوسط و بالاتر از ۰/۵۰ میزان چندشکلی بالا خواهد بود (Botstein و همکاران، ۱۹۸۰). بنابراین، جایگاه فوق با محتوی چندشکلی برابر با ۰/۳۷ در حد متوسط قرار دارد (جدول ۴). میزان هتروزایگوسیتی برآورد شده به وسیله شاخص نئی (Nei) در جمعیت مورد بررسی ۰/۵۰ محاسبه شد (جدول ۴) که یکی دیگر از شاخص‌های تنوع ژنتیکی متوسط در جایگاه ژن TFAM در جمعیت گاو سیستانی می‌باشد.

[10] Expected heterozygosity

[11] Observed heterozygosity

ارتباط ژنوتیپ‌های جایگاه TFAM بر صفات مرتبط با رشد

میانگین حداقل مربعات اثرات ثابت جنس، سال تولـد و ژنوتیـپ-های مختلف جایگاه TFAM بر صفات مرتبط با رشد در جداول ۵ و ۶ ارائه شده است. در نتایج مقایسات میانگین حداقل مربعـات، اثرات ژنوتیپ‌های مختلف بر صفات مرتبط با رشد تفاوت معنـی-داری بین ژنوتیپ های AA، AC و CC با صفات وزن تولـد، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ مـاهگی مشـاهده نگردیـد (P>۰/۰۵). اگـر چـه از نظـر عـددی در بـین ژنوتیـپ‌هـای جایگـاه TFAM، بـرای وزن تولـد ژنوتیـپ AC کمتـرین (۸۶/±۲۴/۰۰) و ژنوتیـپ CC بیشـترین (۹۸/.±۲۵/۷۴) میانگین حداقل مربعات را دارد، امـا ژنوتیـپ AC برای وزن‌های ۳ماهگی و یک‌سالگی عملکرد بالاتری داشـت، امـا از نظـر آمـاری معنـی‌دار نبودنـد (P>۰/۰۵). همچنـین، اختلافـات معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلـف بـا صـفات افـزایش وزن‌هـای دوره‌ای مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

مطالعـه چنـدشـکلی ژن TFAM در ناحیـه D-Loop ژنـوم میتوکنـدری گـاو دورگـه Wagyu x Limousin F_2 شـش جهـش گـزارش گردیـد کـه هاپلوتیـپ‌هـای مختلـف آن اثـرات متفاوتی بر صـفات رشـد در جمعیـت خـوک داشـتند (Kunej و همکاران، ۲۰۰۹).

نتایج به دست آمده از مطالعه ژنوتیپ‌های مختلف ژن TFAM با صفات رشد بر روی گاو گوشتی نشان دادند که جهش نقطه‌ای در جایگاه پروموتور ژن TFAM با صفات رشد اثرات معنی‌دار دارد (Woodward، ۲۰۰۸). این دو جهش در ارتباط با عمق چربی زیر پوست و چربی داخل عضله است که ضمن افزایش کیفیت گوشت موجب افزایش وزن آن نیز می‌گردد که در تضاد با نتایج حاصل از مطالعه حاضر در جمعیت گاو سیستانی است که دلیل آن احتمالا به واسطه اثرات اپی ژنتیکی (نواحی متیلاسیون) و تاثیر تعداد و اثرات جایگاه‌های مختلف ژنی بر صفات رشد می باشد.

در مطالعه آمیخته‌های حاصل از تلاقی نژاد Wagyu x Limousin گزارش گردید، جهش در ناحیه پروموتور جایگاه ژنی TFAM مربوط به آلل C است، به طوری که ژنوتیپ CC اثر مطلوب‌تری بر کمیت و کیفیت صفات رشد نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد (Jiang و همکاران، ۲۰۰۵) و با نتایج تحقیق حاضر متفاوت است. تحقیق بر روی گاو نژاد نیلور برزیلی اختلاف معنی‌داری بین صفات رشد و ژنوتیپ¬های مختلف جایگاه ژن TFAM نداشت (Ayres و همکاران، ۲۰۱۰) که با نتایج مطالعه اخیر مطابقت دارد.

نتیجه گیری و پیشنهادات

جایگاه ژنی TFAM در جمعیت گاو سیستانی دارای چندشکلی متوسط بـود و هـر سـه ژنوتیـپ ممکنـه شـامل AA، AC و CC مشاهده گردید، اما ژنوتیپ‌های جایگاه مذکور تاثیری بـر صـفات وزنی و افزایش وزن‌های دوره‌ای از تولد تا یک‌سـالگی نداشـت. لذا با توجه به نقش مهم جایگاه ژنی TFAM بر متابولیسم چربـی و ذخیـره آن‌هـا پیشـنهاد مـی‌گـردد در تحقیقـات آینـده ارتبـاط ژنوتیپ‌های جایگاه فوق با صفات کیفی لاشه مـورد بررسـی قـرار گیرد.

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپی و آللی، محصولات هضم آنزیم *BsuRI* جایگاه ژن TFAM در گاوهای سیستانی

ژنوتیپ	تعداد	فراوانی مشاهده شده	فراوانی مورد انتظار
AA	۵۰	۰/۳۴	۰/۲۸
AC	۵۶	۰/۳۷	۰/۵۰
CC	۴۴	۰/۲۹	۰/۲۲
آلل ها		درصد فراوانی آلل‌ها	
A		۵۳	
C		۴۷	

جدول ۳- نتایج آزمون بررسی تعادل هاردی_واینبرگ جایگاه ژن TFAM در جمعیت گاو سیستانی

جایگاه ژنی TFAM	کای اسکور ($\chi 2$)	حداکثر درست‌نمایی(G2)
درجه آزادی	۲	۲
مجموع مربعات	۸۷.۳	۳/۹۱
p-Value	۰/۰۴۹	۰/۰۴۸

جدول٤- نتایج خلاصه‌ای از معیارهای تنوع ژنتیکی جایگاه ژن TFAM در جمعیت گاو سیستانی

شاخص های تنوع ژنتیکی	شاخص شانن	محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC)	شاخص نئی	تعداد آلل مشاهده شده	تعداد آلل مؤثر	آماره F
برآورد ها	۰/۶۹	۰/۳۷	۰/۴۹	۲	۱/۹۹	۰/۸۱

جدول ۵- میانگین حداقل مربعات اثرات ثابت جنس، سال تولد و ژنوتیپ‌های جایگاه TFAM بر صفات وزنی (کیلوگرم)

منابع تغییرات	میانگین حداقل مربعات ± خطای استاندارد				
	وزن تولد	وزن سه ماهگی	وزن شش ماهگی	وزن نه ماهگی	وزن یک‌سالگی
جنس					
نر	۲۵/۹۷±۰/۸۲	۵۷/۰۳±۳/۲۹	۸۳/۲۹±۳/۳۷	۱۰۸/۱۱±۴/۵۳	۱۳۵/۴۱±۶/۵
ماده	۲۳/۴۷±۰/۷۵	۵۵/۳۶±۲/۹۱	۸۶/۸۴±۳/۲۲	۱۰۵/۵۸±۴/۱۶	۱۳۱/۵۵±۵/۹
p-Value	*۰/۰۲	۰/۶	۰/۴	۰/۶	۰/۶
سال تولد					
۸۹	۲۵/۲۸±۱/۳	۵۷/۷±۶/۲۴	۸۸/۱۴±۵/۶۴	۱۰۸/۸۴±۷/۱۸	۱۳۷/۲۵±۱۰/۲۳
۹۰	۲۴/۵۹±۰/۷۰	۵۴/۸±۲/۳۷	۸۲/۱۳±۲/۸۶	۱۰۵/۰۸±۳/۸۷	۱۲۹/۱۸±۵/۵۲
۹۱	۲۴/۳±۰/۹۵	۵۶/۰۸±۳/۲۲	۸۴/۹۳±۳/۸۸	۱۰۶/۶۳±۵/۲۵	۱۳۴/۰۲±۷/۷۴
p-Value	۰/۸	۰/۸	۰/۶	۰/۸	۰/۷
ژنوتیپ					
AA	۲۴/۴۳±۰/۹۱	۵۵/۳۴±۳/۶	۸۳/۰۴±۳/۹۲	۱۰۲/۲۱±۵/۰۳	۱۲۶/۸۶±۷/۴۳
CA	۲۴±۰/۸۶	۵۷/۳±۳/۲۱	۸۴/۸۶±۳/۵۱	۱۰۷/۸۲±۴/۷۲	۱۳۸/۳۷±۶/۷۵
CC	۲۵/۷۴±۰/۹۸	۵۵/۸۸±۳/۶۷	۸۷/۳±۴	۱۱۹/۸۱±۵/۳۹	۱۳۵/۲۱±۸/۶۹
p-Value	۰/۳	۰/۸	۰/۷	۰/۴	۰/۴

*سطح معنی داری $P<0.05$

جدول ٦- میانگین حداقل مربعات اثرات ثابت جنس، سال تولد و TFAM برصفات افزایش وزن دوره‌ای (کیلوگرم)

منابع تغییرات	میانگین حداقل مربعات ± خطای استاندارد			
	افزایش وزن از تولد تا سه ماهگی	افزایش وزن از سه تا شش ماهگی	افزایش وزن شش تا نه ماهگی	افزایش وزن نه تا داوزده ماهگی
جنس				
نر	۰/۳۵±۰/۰۳۵	۰/۲۷±۰/۰۳۵	۰/۲۷±۰/۰۲۷	۰/۳۱±۰/۰۴۱
ماده	۰/۳۶±۰/۰۳۱	۰/۳۴±۰/۰۳۱	۰/۲۱±۰/۰۲۶	۰/۲۹±۰/۰۳۸
p-Value	۰/۸	۰/۱۱	۰/۰۸	۰/۶
سال تولد				
۸۹	۰/۳۷±۰/۰۶۷	۰/۳۱±۰/۰۶۷	۰/۲۳±۰/۰۴۶	۰/۳۱±۰/۰۶۵
۹۰	۰/۳۵±۰/۰۲۵	۰/۳۰±۰/۰۲۵	۰/۲۵±۰/۰۲۳	۰/۲۶±۰/۰۳۵
۹۱	۰/۳۵±۰/۰۳۴	۰/۳۲±۰/۰۳۴	۰/۲۴±۰/۰۳۱	۰/۳۲±۰/۰۴۹
p-Value	۰/۸	۰/۸	۰/۹	۰/۶
ژنوتیپ				
AA	۰/۳۵±۰/۰۳۸	۰/۳۱±۰/۰۳۸	۰/۲۱±۰/۰۳۲	۰/۲۹±۰/۰۴۷
CA	۰/۳۷±۰/۰۳۴	۰/۲۸±۰/۰۳۴	۰/۲۵±۰/۰۲۸	۰/۳۴±۰/۰۴۳
CC	۰/۳۳±۰/۰۳۹	۰/۳۴±۰/۰۳۹	۰/۲۶±۰/۰۳۲	۰/۲۷±۰/۰۴۹
p-Value	۰/۷	۰/۵	۰/۵	۰/۵

*سطح معنی‌داری $P<0.05$

منابع

بیرجندی، م. ر. (۱۳۷۶). بررسی وضعیت پرورش و تعیین توان تولید شیر و خصوصیات شیرواری گاو سیستانی در منطقه سیستان. *چکیده طرح‌های تحقیقاتی وزارت جهاد سازندگی (جلد دوم)*. ص ۳۶۸-۳۷۰. وزارت جهاد سازندگی.

Ahmetov, I. I., Popov D. V., Missina S. S., Vinogradova O. L. and Rogozkin V. A. (2010). Association of Mitochondrial Transcription Factor (TFAM) gene polymorphism with physical performance in Athletes. *Human Physiology*. 36: 229–233.

Amaral A., Ramalho-Santos J. and John J. C. (2007). The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Human Reproduction*. 22: 1585-1596.

Ayres D. R., Souza F. R. P., Mercadante M. E. Z., Fonseca L. F. S., Tonhati H., Cyrillo J. N. S. G., Bonilha S. F. M. and Albuquerque L. G. (2010). Evaluation of TFAM and FABP4 gene polymorphisms in three lines of Nellore cattle selected for growth. *Genetics and Molecular Research*. 9:2050-2059.

Beltinger C., Fulda S., Kammertoens T., Uckert A. and Debatin K. M. (2000). Mitochondrial Amplification of Death Signals Determines Thymidine Kinase. *Ganciclovir-triggered Activation of Apoptosis*. 60:3212-3217.

Botstein D., White R. L., Skolnick M. and Davis R. W. (1980). Construction of a genetic-linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic*. 32: 314-331.

Chan D. C., Ngo H. B. and Kaiser J. T. (2012). TFAM, a mitochondrial transcription and packaging factor, imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nature Structure Molecular Biology*. 18: 1290-1296.

Clayton D. A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human Reproduction*. 15: 11-17.

Dimauro S. and Schon E. A. (2001). Mitochondrial DNA genetic pandoras. *American Journal of Medical Science*. 16: 103-116.

Fisher R. P. and Clayton D. A. (1988). Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Molecular Cell Biology*. 8: 3496-509.

Jiang Z., Kunej T., Michal J. J., Gaskins C. T., Reeves J. J., Busboom J. R., Dove P. and Wright-RW J. R. (2005). Significant associations of the mitochondrial transcription factor A promoter polymorphisms with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Biochemical Biophysical Research Communication*. 334: 516-523.

Jothi M. P. (2008). Genetic distance and phylogenic inference. Course notes, University of Putra, Malaysia.

Kaplanová K., Dvořák J. and Urban T. (2009). Association of single nucleotid polymorphisms in TG, LEP and TFAM genes with carcass traits cross-breed cattle. *Biologie Zivacichu*. 4: 647-651.

Kunej T., Wu X. L., Michal J. J., Berlic T. M. Jiang Z. and Dovc P. (2009). The Porcine Mitochondrial Transcription Factor a Gene: Molecular Characterization, Radiation Hybrid Mapping and Genetic Diversity among 12 Pig Breeds. *American Journal of Animal and Veterinary Science*. 7: 129-135.

SAS Institute Inc, Statistics. (System for Mixed Models. (2009). SAS Institute Inc., Cary. NC. USA. *sasdof@wnt.sas.com.*

Wilson D. E., Rouse G. H., Graser G. H. and Amim V. (1998). Prediction of carcass traits using live animal ultrasound. In: *Beef Research Report*. Amsterdam Iowa State University, 7: 1-7.

Woodward B. (2008). Polymorphisms in mitochondrial transcription factor A ("TFAM") gene and their associations with carcass traits. *Patent Application Publication*. 56: 1-56.

Yeh F. C., Yang R. C. and Boyle T. (1999). Popgene version 1.31. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. *In Water Catchments Systems.* 416-432 pp.