بررسی چند شکلی ژنتیکی ژن‌های کاندیدا (کالپاستاتین و آنتی‌ژن‌های لنفوسیتی گاوی) در گاوهای نژاد سیستانی ایران با استفاده از روش PCR-RFLP

Study on the Genetic Polymorphisms of Candidate Genes(Calpastatin and *BoLA*) in Sistani Cattle Using PCR-RFLP

مهدی خسروی[۱]، محسن فخر کاظمی[۱]، امیر محمدی[۲] و محمد رضا نصیری[۳]

چکیده

انتخاب حیوان بر اساس نشانگرهای مولکولی یکی از جدید ترین روش‌های اصلاحی است که می‌تواند باعث بهبود صحت پیش-بینی و پاسخ به انتخاب شود. در این آزمایش ژن‌های کاندیدای کالپاستاتین و آنتی‌ژن‌های لنفوسیتی گاوی (*BoLA-DRB3*) در گاوهای نژاد سیستانی با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی شدند. ژن کالپاستاتین در بررسی راندمان رشد و کیفیت گوشت به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندیدا شناخته شده است و از ژن *DRB3* به‌عنوان یک ژن کاندیدا در ارتباط با بیماری‌ها و صفات ایمونولوژیکی در گاو استفاده می‌شود. از ۸۹ راس گاو نژاد سیستانی در ایستگاه تحقیقات گاو سیستانی زهک به‌طور تصادفی خون‌گیری به‌عمل آمد. استخراج DNA از خون و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر ناحیه چند شکلی ژن‌های کالپاستاتین و *BoLA-DRB3* انجام گرفت. واکنش هضم آنزیمی قطعات تکثیر شده ژن کالپاستاتین به‌وسیله آنزیم محدود الاثر MspI و ژن *BoLA-DRB3* به‌وسیله آنزیم-های *Rsa* I ، *Hae* III و *BstY* I انجام گرفت. فراوانی‌های آللی M و N ژن کالپاستاتین در این نژاد به‌ترتیب ۰/۷۶۴ و۰/۲۳۶ برآورد گردید. آزمون χ^2 تعادل هاردی - واینبرگ را در جمعیت نشان داد. در طی این پژوهش ۱۹ آلل در جایگاه ژنی *BoLA-DRB3* مربوطه در گاو سیستانی شناسایی شد. فراوانی آللی در این نژاد بین ۰/۲۲ تا ۰/۱ بود و دو آلل ۸* و ۳۴* فراوان‌ترین آلل‌ها در جمعیت مورد مطالعه بودند. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی در این نژاد می‌تواند به برنامه های انتخابی آینده مخصوصاً انتخاب به کمک نشانگر (MAS) کمک نماید.

واژه‌های کلیدی: گاو سیستانی، کالپاستاتین، *BoLA-DRB3*، چند شکلی، PCR-RFLP

۱. دانش‌آموختگان کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحدکاشمر ، کاشمر
۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۳. استادیارگروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

امروزه توجه به تردی گوشت (Meat tenderness) از مواردی است که همواره شرکت‌های تجاری جهانی را در یافتن راهکارهای مناسب در جهت ارتقاء کیفیت این پارامتر، به رقابت واداشته است (Koohmarei 1994). سیستم کالپاین یک مجموعه پروتئینی پروتئولیتک می‌باشد که وجود آن در همه سلول‌های عضلانی ثابت شده است. این سیستم شامل پروتئازهای طبیعی وابسته به کلسیم، است که نقش اساسی در رشد ماهیچه و تردی گوشت ذبح شده را دارند. به‌طور کلی آنزیم‌های کالپاین از طریق کنترل تجزیه میوفیبریل‌ها در طول حیات حیوان، رشد ماهیچه را تحت کنترل دارند و پس از کشتار، از طریق تجزیه کردن صفحات Z موجود در ماهیچه اسکلتی و هم‌چنین تضعیف پیوندهای موجود بین میوفیبریل‌ها، باعث تردی و بازارپسندی گوشت می‌شوند (Koohmarei 2002). اکثر محققان عقیده دارند که مهم‌ترین پروتئاز مؤثر بر تردی گوشت،کالپاستاتین، مهار کننده اختصاصی کالپین است، زیرا که سطح کالپاستاتین عضله پس از کشتار بر تردی و نرمی گوشت موثر است (Koohmarei 1994)، (Chung 2003). ژن کالپاستاتین در گاو روی کروموزوم شماره هفت قرار دارد و شناسائی جهش-های موجود در روی این ژن با استفاده از تکنیک‌های RFLP و SSCP از جمله دیدگاه‌های جدید برای دستیابی به اطلاعات بیشتر در مورد این ژن می‌باشد.

مکان ژنی مجموعه‌ی سازگاری بافتی (Major Histocompatability Complex) کد کننده آنتی‌ژن-ها و پروتئین‌های سطح لوکوسیت‌ها می‌باشد که در واکنش-های دفاعی بدن و شناسایی پروتئین‌های خارجی نقش دارند. در گاو این مکان ژنی به نام *BoLA* (Bovine Leucocyte Antigen) معروف می‌باشد که در سه گروه ژنی به نام‌های کلاس I ،کلاس II وکلاس III روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲۳ گاو قرار گرفته‌اند (Lewin 1996 & Kelm 1997). هر یک از این گروه‌های ژنی دارای ژن‌های متعددی است و هر ژن نیز ممکن است تا بیش از چند ده آلل داشته باشد. ویژگی‌های دو گروه I و II این مجموعه تا کنون مورد بررسی قرار گرفته است، اما نقش ژن‌های گروه III هنوز به‌خوبی شناخته نشده است. گروه II خود به دو زیر گروه تقسیم می‌شود که در یک سوم طول بازوی کوتاه کروموزوم از یکدیگر جدا شده‌اند. گروه IIa شامل مکان‌های ژنی *DRA*، *DRB1*، *DRB2*، *DRB3*، *DQA*، *DQA2*، *DQB1* و *DQB2* می‌باشد و در زیر گروه IIb نیز مکان‌های ژنی *DYA*، *DYB*، *DIB* و *DOB* وجود دارند.

ژن *DRB3* بسیار پلی‌مورفیک بوده و مورد توجه خاص است به‌طوری که فقط در اگزون شماره ۲ این مکان حدود ۸۸ آلل مختلف شناسایی شده‌اند که روی بسیاری از صفات مرتبط با ایمنی در دام‌ها، میزان سلول‌های سوماتیک شیر (SCS)، ورم پستان و صفات تولیدی (نظیر شیر، چربی و پروتئین) اثر دارند (Maillard 2001 & Dietz 1997). اولین بار از روش PCR-RFLP برای تشخیص جهش‌ها و آلل‌های جایگاه ژنی *DRB3* استفاده شده و کارآیی این روش با تشخیص ۳۰ آلل در این مکان ژنی نشان داده شده است (Van Eijk 1992).

هدف از اجرای این پژوهش بهینه کردن روش PCR-RFLP جهت بررسی چندشکلی ژنتیکی و فراوانی آللی در جایگاه‌های ژنی کالپاستاتین و *BoLA* در گاوهای نژاد سیستانی ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری و استخراج DNA

از تعداد ۸۹ راس گاو نژاد سیستانی در ایستگاه تحقیقات گاو سیستانی زهک به‌طور تصادفی خون‌گیری بعمل آمد. برای جلوگیری از انعقاد خون به میزان ۰/۱ حجم نمونه‌ها محلول EDTA (۰/۵ مولار با pH=۸) اضافه شد. استخراج DNA از ۱۰۰ میکرولیتر خون با استفاده از روش گوانیدین سیلیکاژل انجام شد. این روش استخراج مبتنی بر استفاده از ایزوتیوسیانات گوانیدین به‌عنوان یک عامل لیز کننده سلول‌های خونی و جمع‌آوری DNA آزاد شده به کمک ذرات سیلیکا می‌باشد (Boom 1989). جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش‌های الکتروفورز مقایسه‌ای استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر ژن کالپاستاتین

دو میکرولیتر DNA در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر مخلوط PCR با استفاده از کیت GenePak PCR Universal تکثیر شد. هرکیت حاوی غیر فعال کننده آنزیم DNA پلی‌مراز جهت شروع، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۲۰۰ میلی‌مول $Mgcl_2$ و بافر استاندارد می‌باشد. مخلوط PCR شامل ۱۰ میکرولیتر PCR diluent، ۳ میکرولیتر از Mix primer و ۵ میکرولیتر ddH2O است. برنامه PCR شامل ۳۵ سیکل تکثیر با دمای واسرشت شدن اولیه $^{\circ c}$۹۵ (به‌مدت ۲ دقیقه)، دمای واسرشت ثانویه $^{\circ c}$۹۴ (به‌مدت۱ دقیقه)، دمای اتصال $^{\circ c}$۶۱ (به‌مدت ۴۵ ثانیه) می-

Archive of SID

www.SID.ir

باشد و تکثیر نهایی شامل ۳۵ سیکل در دمای $72^{\circ c}$ (به‌مدت ۱۰ دقیقه) است. محصولات PCR بروی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورزگردید. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش بر اساس پرایمرهای ژن کالپاستاتین گاوی ساخته شدند و یک قطعه bp ۶۲۲ از ژن مربوطه را در واکنش PCR تکثیر شد (Chung 1999). توالی آغازگرها به شرح ذیل بود:

CAST 1C 5'-CTTGTCATCCGACTTCACCT
CAST 1D 3'-TCTTCTTTTCTCTTTGGGTGGA

تکثیر ژن BoLA-DRB3

تکثیر ناحیه پلی‌مورفیک اگزون ۲ جایگاه ژنی *DRB3* به طول ۲۸۴ جفت باز با روش Hemi-Nested PCR درطی دو مرحله صورت گرفت(Van Eijk 1992).

در مرحله اول PCR از دو آغازگر HLO30 و HLO31 استفاده شد.

5'- ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3' HL030
5'-TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3' HL031

و در مرحله دوم از دو آغازگر HLO30 و HLO32 برای تکثیر استفاده شد.

5'- ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3' HL030
5'- TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC-3' HL032

در هر دو مرحله، واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل یک واحد تک پلیمراز، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۲۰۰ میکرومول MgCl2، ۱۰ تا ۲۰ پیکامول مخلوط پرایمرها، ۰/۸ میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم انجام شد. در مرحله اول تکثیر، واسرشت شدن DNA در $94^{\circ c}$ به مدت ۳ دقیقه شروع شد و طی ۱۰ سیکل با دمای $94^{\circ c}$ (به‌مدت ۲۵ ثانیه)، $60^{\circ c}$ (به‌مدت ۳۰ ثانیه)، $72^{\circ c}$ (به‌مدت ۳۰ ثانیه) و مرحله تکثیر انتهایی $72^{\circ c}$ (به‌مدت ۵ دقیقه) به اتمام رسید. در مرحله دوم از ۳-۴ میکرولیتر از محصولات حاصل از مرحله اول PCR در طی ۲۵ سیکل با دمای $94^{\circ c}$ (به‌مدت۴۰ ثانیه)، $65^{\circ c}$ (به‌مدت۳۰ ثانیه) و مرحله تکثیر انتهایی $72^{\circ c}$ (به‌مدت ۵ دقیقه) انجام شد (Kelm 1997). پس از انجام واکنش‌های تکثیر، برای تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید استفاده شد.

واکنش هضم آنزیمی محصولات PCR به روش RFLP

هضم آنزیمی ژن کالپاستاتین

برش آنزیمی محصولات PCR با استفاده از آنزیم محدودالاثر *Msp*I به مدت ۳ ساعت در دمای $37^{\circ c}$ انجام گرفت. واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر و واکنش‌گرها شامل ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۵ واحد آنزیم برشی و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر بودند. پس از هضم آنزیمی، محصولات هضم با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۲ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مشاهده شدند.

هضم آنزیمی ژن BoLA-DRB3

جهت انجام هضم آنزیمی از۳ آنزیم *Rsa*I، *Hae* III و *BstY* I استفاده گردید. واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر ودر دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم‌های *Rsa*I و *Hae* III و دمای۵۰ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم *Bsx*21 به‌مدت ۳ ساعت انجام گفت. واکنش‌گرها شامل۵ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۵ واحد آنزیم برشی و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر بودند. محصولات هضم شده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد الکتروفورز و با استفاده از اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شدند. در انتها داده‌ها با نرم افزار Popgene32 نسخه ۱/۳۲ آنالیز شدند.

نتایج و بحث

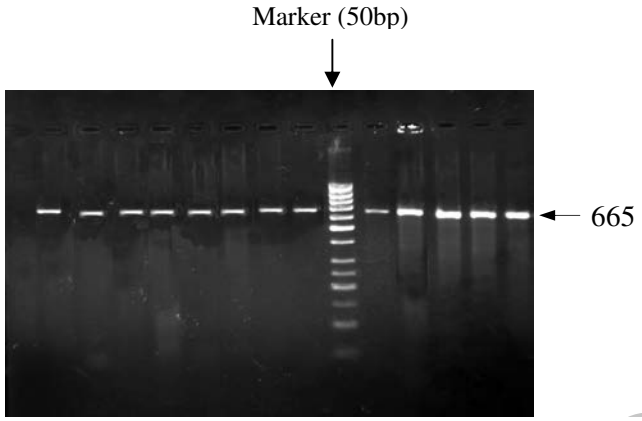
استخراج DNA با روش تیوسیانات گوانیدین سیلیکاژل مقادیر بالایی از DNA ژنومی (حدود ۷۰ng) را حاصل کرد که با اسپکتروفتومتر ارزیابی گردید.

کالپاستاتین

نتیجه واکنش پلیمراز، تکثیرقطعه ۶۲۲ جفت بازی از ژن *CAST*I را تایید می‌کند (شکل ۱). هضم توسط آنزیم محدودالاثر *Msp*I سه ژنوتیپ MM، MN و NN را نشان داد (شکل ۲). ژنوتیپ MM بیشترین تعداد و فراوانی را در گله مورد بررسی نشان داد. فراوانی آللی ۰/۷۶ و ۰/۲۴ به‌ترتیب برای آلل M و N به‌دست آمد (جدول ۱). نتایج مشابهی بر روی گاو توسط *چانگ* (Chung 1999) گزارش گردید. به‌طوری که فراوانی ۷۱٪ و ۲۹٪ را برای M و N گزارش شد. هم‌چنین پالمر نتایج مشابهی را بروی گوسفند گزارش نمود، به‌طوری که فراوانی ۷۷٪ و ۲۳٪ را برای M و N گزارش نمود (Palmer 1998). تست χ^2 برقراری تعادل هاردی واینبرگ را در گله نشان داد که گویای این مطلب است که هیچ‌گونه انتخابی در جمعیت در جهت افزایش یا کاهش ژنوتیپ‌های ژن کالپاستاتین صورت نگرفته است. سطح هتروزیگوسیتی یکی از شاخص‌های میزان تنوع ژنتیکی در یک جمعیت به‌حساب می‌آید. سطح هتروزیگوسیتی پایینی برای ژن

www.SID.ir

کالپاستاتین در گله مورد مطالعه به‌دست آمد کـه علـت آن‌را می‌توان بسته بودن این گله دانست که باعث افزایش هم‌خونی و کاهش سطح هتروزیگوسیتی گردیده است (جدول۲).



شکل۱: محصولات PCR ژن کالپاستاتین (قطعه۲۲۶ جفت بازی) برروی ژل آگارز ۱/۵ ٪ . نشانگر ملکولی مورد استفاده M50 می‌باشد

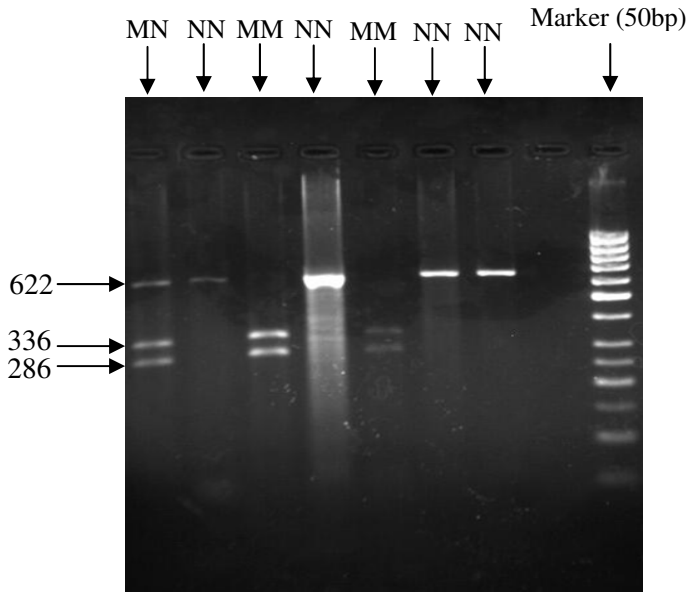
Fig 1: PCR-products of Calpastatin gene with 284 bp size in 1.5% agarose gel. As a molecular marker M50 is used

جدول۱: فراوانی ژنوتیپی و آللی ژن کالپاستاتین و تست‌های کای مربع

Table 1: Genotypic Frequency and Alleles Frequency of Calpastatin gene and χ^2 test

ژنوتیپ	تعداد	فراوانی ژنوتیپی	فراوانی آللی		χ^2
			M	N	
MN	۵۵	۶۱/۸۰			
MN	۲۶	۲۹/۲۱	۰/۷۶	۰/۲۴	۳/۴۲^{NS}
NN	۸	۸/۹۹			

NS: χ^2 غیر معنی‌دار



شکل۲: محصولات هضمی ژن کالپاستاتین. نشانگر ملکولی مورد استفاده M50 می‌باشد

Fig 2: Restriction analysis of amplification products of Calpastatin gene. As a molecular marker M50 is used

www.SID.ir

جدول ۲: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزایگوسیتی موردانتظار و متوسط هتروزیگوسیتی جایگاه ژنی کالپاستاتین

Table 2: Observed heterozygosity and expected heterozygosity of Calpastatin gene

جایگاه ژنی	هتروزیگوتی موردانتظار	هتروزیگوتی مشاهده شده
کالپاستاتین	۰/۳۶	۰/۲۹

تعداد آلل موثر، تعداد آلل‌هایی است که هتروزایگوسیتی یکسان ایجاد می‌نماید. این پارامتر در جدول ۳ آورده شده است. تعداد آلل موثر برای ژن کالپاستاتین در گاوهای نژاد سیستانی ۱/۵۶ به‌دست آمد. با توجه به این‌که کالپاستاتین به‌عنوان مهم‌ترین تنظیم کننده فعالیت کالپین محسوب می‌گردد و آنزیم کالپین بر کیفیت گوشت بسیار موثر می‌باشد، بنابراین لزوم بررسی ژنتیکی ژن کالپاستاتین احساس می‌شود. طی یک پژوهش چند شکلی ژن کالپاستاتین با روش PCR-RFLP و با آنزیم‌های *Eco*RI، *Bam*HI، *Bg1*II، *Pst*I و *Dra*I در خوک مورد بررسی گرفت، در این بررسی هیچ‌گونه چند شکلی دررابطه با آنزیم‌های *Bg1*II، *Pst*I و *Dra*I پیدا نشد (Lonergan 1995). در پژوهشی دیگر چند شکلی آللی ژن *CAST*I (۱C/۱D) مورد بررسی قرار گرفت و سه آلل a، b و c در این ناحیه شناسایی و فراوانی این آلل‌ها را به‌ترتیب ۰/۰،۱۸/۶۹ و ۰/۱۳ گزارش شد (Roberts 1996). پالمر و همکاران گزارش کردند که مارکر مرتبط با کیفیت گوشت با ژن کالپاستاتین پیوستگی دارد. آن‌ها در اینترون ژن *CAST*I، جهش‌های نقطه‌ای فراوانی پیدا کردند. در مجموع سه آلل گزارش کردند که آلل a و b در ۶ جهش نقطه‌ای در ناحیه (1C/1D) با هم تفاوت داشتند و آلل c سه SNP (Single nucleotide polymorphism) متفاوت با آلل a و b و جمعاً ۹ جهش نقطه‌ای داشت (Palmer 1996).

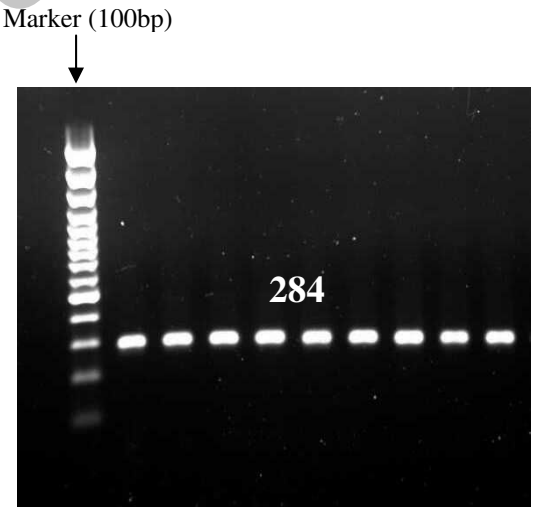
جدول ۳: اندازهٔ مؤثر آللی برای جایگاه ژنی کالپاستاتین

Table 3: Effective number of alleles of Calpastatin gene

جایگاه ژنی	اندازه مؤثر آللی	تعداد نمونه
کالپاستاتین	۱/۵۶	۸۹

BoLA-DRB3: نتیجه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مورد انتظار بود یک قطعه دارای ۲۸۴ جفت بازی از اگزون ۲ ژن *BoLA-DRB3* تکثیر شده است که برای تشخیص اندازه قطعات از مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده شده است (شکل۳).

مقایسه باندهای موجود در نمونه‌های هضم شده با سه آنزیم *Rsa*I، *Hae*III I و *Bst*YI با نشانگر وزنی *pUC19* بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید در شکل ۴ نشان داده شده است.

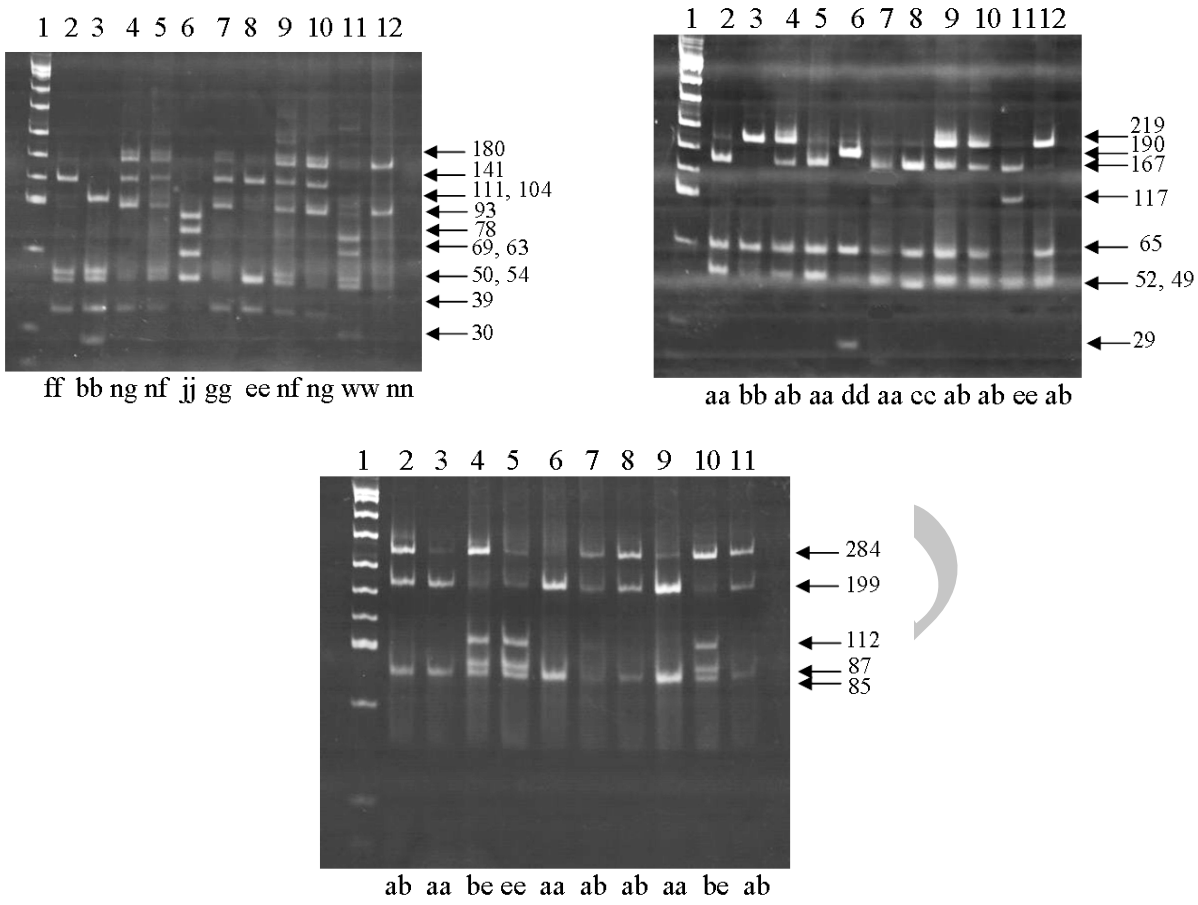


شکل ۳: تصویر تکثیر قطعه ۲۸۴ جفت بازی اگزون ۲ جایگاه ژنی *BoLA-DRB3*.

Fig 3: PCR-products of BoLA-DRB3.2 with 284 bp size

Archive

www.SID.ir



شکل ۴: الگوهای باندی حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید

Fig 4: Restriction analysis of amplification products in polyacrylamide gel.

در این پژوهش تعداد ۱۹ آلل در مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* توسط روش PCR-RFLP شناسایی شد و بین آلل‌های شناسایی شده احتمال جدید بودن یکی از این آلل‌ها (آلل X) مطرح شد. جهت تایید وجود این آلل جدید نیاز به انجام آزمایشات تعیین توالی می‌باشد که در این پژوهش انجام نشده است. فراوانی‌های آللی در جمعیت سیستانی بین ۱ تا ۲۲ در صد به‌دست آمد. ۵ آلل ۸*، ۳۴*، ۱۵*، X* و ۴۴* *BoLA-DRB3.2* به‌ترتیب با فراوانی۲۲/۴۵، ۲۱/۴۳، ۸/۱۶، ۸/۱۶ و ۶/۱۲ در صد از بیشترین فراوانی در این جمعیت برخوردار بودند. آلل‌های ۳*، ۲۹*، ۳۷* و ۵۱* *BoLA-DRB3.2* کمترین فراوانی را در نژاد مورد بررسی داشتند (جدول ۴). فراوانی ژنوتیپی به‌دست آمده نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ‌های ۸/۸ و۳۴/۳۴ به ترتیب با فراوانی۲۰/۴ و۱۴/۲۸می‌باشد (جدول ۵).

در گاو نژاد Gir که بومی کشور برزیل است تعداد ۱۷ آلل در این مکان ژنی شناسایی شد. که دو آلل ۲۰* و ۶* دارای بیشترین فراوانی می‌باشند ولی آلل‌های ۸* و ۱۱* مشاهده نشدند (Da Mota 2002) در جمعیت هلشتاین کانادا فراوانی آلل‌های ۸* و ۱۱* به‌ترتیب ۲۰/۱ و ۱۴/۹ درصد (Roberts 1996) و در گاوهای جرسی فراوانی آلل ۸* معادل ۱۱/۳ درصد (Kelm 1997) گزارش شده است. در صورتی‌که در گاوهای نژاد سیستانی فراوانی آلل ۸* ، ۲۲/۴۵ و فراوانی آلل ۱۱*، ۵/۱ بود. در هلشتاین ایرانی برای این مکان ژنی ۲۷ آلل شناسایی شده که بیشترین فراوانی مربوط به آلل ۸* می‌باشد (Nassiry 2004). در تحقیقاتی که بر روی گاوهای گلپایگانی ایران انجام گرفته است، برای این مکان ژنی ۱۹ آلل گزارش شده است (Nassiry 2008).

هم‌چنین ۱۷ آلل در نژاد Russian Mongolian و ۲۱ آلل در نژاد Russian Black برای مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* گزارش شده است که بیشترین فراوانی به ترتیب برای آلل‌های ۷* و ۲۲* می‌باشد (Mohammadabadi 2003). در یک پژوهش بر روی چهار نژاد گاو ژاپنی بیشترین تعداد آلل در نژاد Japanese Black (۲۳ آلل) و کمترین تعداد آلل در نژاد Jersey (۱۴ آلل) گزارش شده است (Takeshima 2001).

Archive

www.SID.ir

جدول ۴: فراوانی‌های آللی جایگاه ژنی *BoLA-DRB3.2* در نژاد سیستانی

Table 4: Frequencies of BoLA-DRB3.2 alleles in Sistani cattle

آلل	فراوانی (٪)
*۸	۲۲/۴۵
*۳۴	۲۱/۴۳
*۱۵	۸/۱۶
*x	۸/۱۶
*۴۴	۶/۱۲
*۱۱	۵/۱
*۱۰	۴/۰۸
*۷	۴/۰۸
*۴۷	۳/۰۶
*۱۳	۳/۰۶
*۴۵	۲/۰۴
*۳۶	۲/۰۴
*۲۴	۲/۰۴
*۲۱	۲/۰۴
*۴	۲/۰۴
*۵۱	۱/۰۲
*۳۷	۱/۰۲
*۲۹	۱/۰۲
*۳	۱/۰۲

تمام این پژوهش‌ها نشان می‌دهد که در مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* چندشکلی بسیاری وجود دارد که تعداد و فراوانی آلل‌ها از نژادی به نژاد دیگر تفاوت دارد (Maillard 2001., Da Mota 2002.& Mossafer 2005). میزان تغییرات ژنتیکی در داخل یک جمعیت با اندازه‌گیری هتروزیگوسیتی و تعداد آلل موثر مکان ژنی مورد مطالعه تعیین می‌شود. در پژوهش حاضر هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به‌ترتیب ۰/۲۰۴۱و ۰/۸۸۵۳ بود که پایین بودن هتروزیگوسیتی این مکان ژنی در نژاد سیستانی را نشان می‌دهد، همان‌طور که در مورد جایگاه کالپاستاین اشاره شد علت پایین بودن هتروزیگوسیتی را می‌توان بسته بودن این گله نسبت داد (جدول ۶). هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در نژاد هلشتاین به‌ترتیب ۹۲/۱ و ۹۰/۱ درصد، در نژاد شورت هورن ژاپنی ۹۲ و ۹۱/۲ درصد، در نژاد جرسی ۹۱/۳ و ۸۸/۷ درصد و در نژاد سیاه ژاپنی ۹۰/۵ و ۹۱/۴ درصد گزارش شده است(Takeshima 2001). تعداد آلل موثر در تنوع این مکان ژنی در گاوسیستانی معادل ۸/۰۸۴ بود. به‌طور کلی این پارامتر نشان می‌دهد که تعداد آلل‌های موثر در تنوع ژنتیکی این مکان زیاد بوده است. تعداد آلل موثر فقط در مواردی با تعداد آلل واقعی برابر است ولی در بیشتر موارد تعداد آلل موثر کمتر از تعداد آلل واقعی است (Dietz 1997).

مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* در ایجاد پاسخ ایمنی نقش اساسی دارد لذا این مکان ژنی برای مطالعات پایه‌ای ژنتیکی در مورد بررسی مقاومت به بیماری‌ها دارای اهمیت زیادی است. بررسی‌ها نشان می‌دهند گاوهایی که دارای آلل-های ۱۱*، ۲۲* و ۲۸* هستند نسبت به بیماری لکوز مقاوم می‌باشند (Sulimova 1995 & Udina 1998) وجود آلل ۱۱* در نژاد سیستانی می‌تواند نشانه‌ای برای مقاومت این نژاد به بیماری لکوز باشد.

پژوهش حاضر وجود چندشکلی ژنتیکی برای ژن‌های کالپاستاتین و *BoLA-DRB3.2* را به‌خوبی در گاوهای نژاد سیستانی ایران نشان داد. از وجود این چند شکلی‌ها، جهت بررسی ارتباط بین چند شکلی ژنتیکی با صفات تولیدی و ایمونولوژیکی از قبیل تولید وکیفیت گوشت و ارتباط با بیماری‌ها به‌عنوان مارکر ژنتیکی می‌توان استفاده نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵: فراوانی های ژنوتیپی جایگاه ژنی *BoLA-DRB3.2* در نژاد سیستانی

Table 5: Genotypic Frequency of BoLA-DRB3 in Sistani cattle

ژنوتیپ	تعداد	RsaI Patterns	HealII Patterns	BstYI Patterns	فراوانی (٪)
۷/۷	۱	EE	CC	CC	۲/۰۴
۳۴/۳۴	۷	LL	BB	AA	۱۴/۲۸
X/X	۴	LE	BC	AA	۸/۱۶
۸/۱۱	۱	FG	AA	AE	۲/۰۴
۱۵/۱۵	۳	II	AA	BB	۶/۱۲
۱۳/۱۳	۱	HH	AA	BB	۲/۰۴
۸/۸	۱۰	FF	AA	AA	۲۰/۴
۴۷/۳۴	۱	LW	BA	AA	۲/۰۴
۴۳/۱۳	۱	LH	AB	AB	۲/۰۴
۴۴/۴۴	۳	KK	II	BB	۶/۱۲
۴۵/۴۵	۱	SS	BB	DD	۲/۰۴
۴۷/۴۷	۱	WW	AA	AA	۲/۰۴
۱۵/۳۷	۱	IO	AA	BB	۲/۰۴
۲۴/۲۴	۱	NN	BB	BB	۲/۰۴
۳۴/۳۴	۱	LL	BB	AA	۲/۰۴
۲۱/۷	۱	LE	CE	BC	۲/۰۴
۱۱/۱۱	۲	GG	AA	EE	۴/۰۸
۱۰/۱۰	۲	FF	AA	BB	۴/۰۸
۲۱/۳۴	۱	LL	BE	BA	۲/۰۴
۲۹/۵۱	۱	PG	AC	CB	۲/۰۴
۴/۴	۱	CC	AA	BB	۲/۰۴
۸/۳۴	۱	LF	AB	AA	۲/۰۴
۳۶/۳۶	۱	LL	AA	BB	۲/۰۴
۱۵/۳۴	۱	LI	AB	BA	۲/۰۴
۷/۳	۱	BE	BC	CB	۲/۰۴

جدول ۶: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، مورد انتظار و تعداد آلل موثر در مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* در نژاد سیستانی

Table 6: Observed heterozygosity , expected heterozygosity and effective number of alleles of *BoLA-DRB3*.2 gene in Sistani cattle

تعداد آلل موثر Effective number of alleles	هتروزیگوسیتی مورد انتظار expected heterozygosity	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity
۸/۰۸۴۲	۰/۸۸۵۳	۰/۲۰۴۱

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۵۹- ۶۰ متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir