تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی – ملکولی
دوره چهارم، شماره شانزدهم، پائیز ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی پلی مورفیسم ژن DGAT-1 درگوسفند نژاد مهربان با استفاده از روشPCR-RFLP

سجاد فولادوند[۱]، رضا یاری[۲]، شهرام ننه کرانی[۳]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد.
۲. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، گروه زیست شناسی، بروجرد، ایران.
۳. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، گروه ژنتیک و اصلاح دام، بروجرد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: هدف از انجام این تحقیق بررسی پلی مورفیسم ناحیه کد کننده اگزون ۱۷ ژن DGAT1 در گوسفندان مهربان بود.

مواد و روش‌ها: استخراج DNA به روش کیت از تعداد ۱۲۰ نمونه گوسفند نژاد مهربان به‌دست آمد و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای تکثیر ۳۰۹ جفت باز از اگزون ۱۷ ژن DGAT1 با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی انجام گرفته و محصولات PCR با روش RFLP و با استفاده از آنزیم برشی AluI هضم شدند و هر سه ژنوتیپ TT، TC، CC به‌دست آمد.

یافته‌ها: یافته‌ها بیانگر وجود فرکانسهای ۰/۲۵، ۰/۲۴ و ۰/۵۱ به ترتیب برای ژنوتیپ‌های CC، TC و TT می‌باشد. عدم وجود تعادل هاردی- واینبرگ با توجه به شرایط نگهداری دام در منطقه می‌تواند مربوط به مهاجرت و انتخاب باشد. یافته‌ها همچنین حاکی از مناسب بودن روش PCR-RFLP در بررسی چندشکلی‌های ژن DGAT1 می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در جمعیت گوسفندان مهربان دو آلل T و C به ترتیب با فراوانی ۰/۳۷ و ۰/۶۳ مشاهده شد. همچنین جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی- واینبرگ قرار نداشت.

کلمات کلیدی: گوسفند نژاد مهربان، ژن DGAT1، PCR-RFLP

مقدمه

سال‌های متمادی است که انسان جهت رفع نیاز خود برای تغییر در جوامع حیوانی تلاش می‌کند. حیوانات به عنوان تبدیل‌کننده پروتئین گیاهی به پروتئین حیوانی مد نظر بوده‌اند و همواره بخش وسیعی از پروتئین مورد نیاز بشر توسط دام‌ها تولید شده است. پروتئین‌های حیوانی با نیاز پروتئین انسانی از نظر اسیدهای آمینه دارای شباهت می‌باشند، بنابراین ارزش بیولوژیکی آنها بالا می‌باشد. تأمین پروتئین حیوانی در جوامع مختلف با توجه به ذائقه مردم، وضعیت جغرافیایی و آب و هوایی و نیز عقاید مذهبی از منابع متفاوت صورت می‌گیرد. در ایران منابع عمده تولید پروتئین حیوانی عبارتند از: گاو، گوسفند، بز، طیور، ماهی، شتر و گاومیش است. گوشت قرمز هم از جنبه تأمین پروتئین مورد نیاز و امنیت غذایی جمعیت رو به رشد کشور و هم از جنبه سهم آن در ارزش افزوده بخش کشاورزی، جایگاه ویژه‌ای دارد. در حال حاضر در هر سال حدود ۴۳۵ هزار و ۹۰۰ تن (۵۲/۶٪) از کل گوشت تولیدی در کشور توسط بیش از ۵۰ میلیون رأس گوسفند در

نویسنده مسئول: سجاد فولادوند
پست الکترونیکی: Fouladvand.s@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۸/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۳۰

Archive of SID
www.SID.ir

قالب ۲۷ نژاد سازگار با شرایط اقلیمی، فرهنگی، اقتصادی و اجتماعی مناطق مختلف تولید می‌گردد. این مقدار گوشت تولید شده پاسخگوی نیاز جمعیت کشور نبوده و افزایش بازدهی در تولید گوشت گوسفند از اهمیت خاصی برخوردار است. بهبود در عملکرد صفات تولیدی در گله‌های گوسفند می‌تواند از طریق بهبود در مدیریت، تغذیه و بهبود ژنتیکی حاصل گردد. لیکن بهبود از طریق استفاده از حیواناتی که از نظر ژنتیکی برتر هستند، به لحاظ تجمعی بودن، بهترین راه برای افزایش بازدهی در تولید حیوانات می‌باشد (۹). بهبود ژنتیکی، استفاده فعال از تنوع ژنتیکی موجود در داخل نژاد و بین نژادهای حیوانات اهلی را نشانه‌گیری می‌نماید. بهبود ژنتیکی بر روی بهبود جهت‌دار در ژنتیک حیوانات که در نسل‌های آینده تولید می‌شوند، متمرکز شده به‌طوری‌که آنها تحت شرایط اقتصادی، اجتماعی و اکولوژیکی محیط تولید آینده، محصولات مطلوب‌تری تولید خواهند کرد (۷).

علی‌رغم جمعیت زیاد گوسفند، تولید گوشت در کشور ایران به دلیل از بین رفتن مراتع و عدم به کارگیری روشهای علمی در گله‌داری و پرواربندی، استفاده غیر صحیح از منابع غیر خوراکی موجود و دیگر عوامل نامساعد از سطح مورد انتظار پایین‌تر می‌باشد. شرایط زیست محیطی متنوع، مهاجرت‌های مختلف و ممتد، جهش[۱]، انتخاب طبیعی و مصنوعی و اعمال اصلاح نژاد بخصوص در قرن گذشته سبب شده تا در حال حاضر بیش از ۲۰۰ نژاد و گروه ژنتیکی مختلف گوسفند در دنیا به‌وجود آید. این تنوع در سایر حیوانات اهلی کمتر به چشم می‌خورد. تیپ‌ها و گروه‌های ژنتیکی گوسفندان ایران نیز بسیار متفاوت بوده به‌طوری‌که کشور ایران از نظر دارا بودن نژادهای مختلف گوسفند متناسب با شرایط اکولوژیکی مناطق مختلف در بین کشورهای دنیا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و شناسایی دام‌های مستعد پرواری و به‌کاربردن روش صحیح پرواربندی یکی از راه‌های افزایش تولید از هر واحد دام و تأمین گوشت از نظر کمی و کیفی است. با توجه به اختلافات ژنتیکی و محیطی موجود در بین گوسفندان بومی لازم است که جهت تأمین گوشت قرمز مورد نیاز جامعه در مورد توان اقتصادی گوسفندان بومی ایران شناخت بهتری پیدا کرد. با توجه به اینکه سیستم پرورش گوسفند در ایران کاملاً سنتی بوده و بازده تولید نیز در این بخش پایین است و عمدتاً سعی بیشتر دامداران برای افزایش درآمد افزایش تعداد گوسفندان در گله می‌باشد، لیکن باید توجه داشت که این امر علاوه بر اینکه مدیریت گله را مشکل می‌کند ضربه‌های جبران‌ناپذیری به منابع تأمین خوراک طبیعی وارد می‌نماید. به دلیل سنتی بودن گوسفندداری در ایران و عدم پرداخت مستقیم هر گونه هزینه‌ای جهت استفاده از مراتع، در اغلب موارد، مراتع طبیعی، عمده ترین منابع تأمین خوراک می‌باشد وجود ۶۰ میلیون هکتار مراتع متوسط تا ضعیف نشان‌دهنده استفاده ناصحیح و فشار بیش از حد دام بر مراتع می‌باشد که با کمی دقت در استفاده از آنها و برنامه‌ریزی جهت بهبود این مراتع می‌توان میزان تولید در واحد سطح مرتع را افزایش داد.

مواد و روش‌ها

مشخصات جمعیت مورد مطالعه

در این تحقیق به‌منظور بررسی پلی مورفیسم ژن DGAT1 در گوسفند نژاد مهربان و هم‌چنین تخمین فراوانی ژنی و ژنوتیپی آن، ۱۲۰ نمونه خون از گله گوسفندان مرکز اصلاح نژاد استان همدان مورد مطالعه قرار گرفت که این گوسفندان پس از شماره زنی با رکوردهای مورد نیاز مشخص شدند.

خون‌گیری

پس از تعیین نمونه‌های مورد نظر، از هر دام ۵ میلی لیتر خون در لوله‌های ونوجکت حاوی EDTA[۲] (۰/۵ مولار) از سیاهرگ‌گردن (وداج) جمع‌آوری گردید و بلافاصله به درون کیسه یخ منتقل شد، شماره بدن حیوان و کد گله روی هر نمونه خون ثبت گردید. محلول EDTA به‌منظور جلوگیری از لخته شدن خون به‌کار رفت. نمونه‌ها از مزرعه همراه با یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی دانشگاه آزاد واحد بروجرد منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی: کمیت و کیفیت

استخراج DNA از نمونه خون کامل با استفاده از کیت‌های استخراج شده (شرکت سینا ژن) انجام گرفت. مدت استخراج DNA با استفاده از ۴ تا ۸ نمونه خون مایع، تقریباً ۳۵ دقیقه است. مجموعه مواد یک کیت برای ۱۰۰ استخراج از ۱۰۰ میکرولیتر خون کامل مناسب است.

تعیین کمیت و کیفیت DNA

پس از استخراج لازم است کیفیت و کمیت DNA استخراج شده تعیین گردد. برای تعیین مقدار DNA از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد معمول‌تر می‌باشد. معمولاً هر دو روش به‌کار می‌رود ولی در

۱. Mutation

۲. Ethylene Diamin Tetra Acetic Acid

Archive of SID
www.SID.ir

صورتی‌که مقدار DNA کم باشد تنها از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد استفاده می‌شود. از روی هر دوی این روش‌ها اطلاعاتی راجع به کیفیت و خلوص DNA به‌دست می‌آید (۸).

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

به کمک روش PCR و با استفاده از دو پرایمر اختصاصی به توالی‌های زیر که توسط زو و همکاران (۲۰۰۸) معرفی شدند. جهت تکثیر قطعه ۳۰۹ بازی از جایگاه اگزون ۱۷ ژن DGAT1 گوسفندی مورد استفاده قرار گرفت.

توالی پرایمرها (شرکت Fermentas آلمان) به صورت زیر بود:

Forward: 5´-GCA TGT TCC GCC CTC TGG-3´

Reverse: 5´-GGA GTC CAA CAC CCC TGA-3´

جهت بهینه‌سازی واکنش PCR برنامه‌های حرارتی مختلفی مورد استفاده قرار گرفت، ولی در نهایت برنامه حرارتی، با ۵ سیکل شروع دمای اتصال بالا جهت عدم اتصال به جایگاه‌های غیر اختصاصی،

- دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه
- ۶۰ درجه سانتی‌گراد (۱ درجه کاهش در هر چرخه) ۳۰ ثانیه برای اتصال پرایمرها
- ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای تکثیر قطعه مورد نظر

و با ۳۰ سیکل زیر ایده‌آل‌ترین شرایط برای تکثیر ژن DGAT1 تشخیص داده شد:

- دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه
- ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال پرایمرها
- ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای تکثیر قطعه مورد نظر
- دمای تکثیر نهایی ۷۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر استفاده گردید.

غلظت‌های مورد استفاده از مواد بعد از بهینه‌سازی در جدول زیر آورده شده است.

جدول ۱: نام و مشخصات مواد PCR شرکت Fermentas آلمان

نام ماده	غلظت استوک اصلی	مقدار مورد استفاده	غلظت نهایی
$mgcl_2$	50 mM/µl	1 µl	2 mM/µl
PCR buffer	10X	2.5 µl	1X
dNTPs	25 mM/µl	0.2 µl	0.2 mM/µl
Primer (Forward)	50 Pm/µl	0.25 µl	0.5 Pm/µl
Primer (Reverse)	50 Pm/µl	0.25 µl	0.5 Pm/µl
Taq DNA Polymerase	5 unit/µl	0.2 µl	1 unit/µl
DNA	Stock	1.5 µl	-
dH_2O	-	19.35 µl	-

پس از انجام واکنش PCR برای اطمینان از عمل تکثیر و صحت میزان DNAی تکثیر شده در واکنش، الکتروفورز تیوب‌های خارج شده از دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. در روش (RFLP) Restriction Fragment Length Polymorphis پس از انجام PCR و تکثیر قطعه مورد نظر، این قطعه توسط آنزیم کاملاً اختصاصی برش داده می شود.

هضم آنزیمی جایگاه DGAT1 (RFLP)

آنزیم برشی مورد استفاده برای این جایگاه آنزیم محدودالأثر AluI می‌باشد که قادر به شناسایی و برش در جایگاه (AG/CT) می‌باشد. موقعیت چند شکلی، اندازه باند و قطعات هضم شده توسط آنزیم برشی AluI در جدول ۲ ارائه شده است. برای هر آنزیم محدودالاثر یک بافر ویژه وجود دارد. برای آنزیم محدودالاثر AluI، بافر R می‌باشد که حاوی (BSA 0.1 mg/ml b، 10 mM Tris-HCIPH=8.5، 10 mM $Mgcl_2$، 100 mM KCl) می‌باشد. بهترین هضم آنزیمی در دمای ۳۷ºC به مدت ۱۶-۱۲ ساعت به‌دست آمد. جهت هضم آنزیمی قطعه تکثیر یافته توسط PCR مواد زیر در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر جمع‌آوری شدند. مقادیر و غلظت مورد استفاده برای هضم آنزیمی در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۲: موقعیت چند شکلی، اندازه باند و قطعات هضم شده توسط برش آنزیمی AluI

جایگاه چندشکلی	موقعیت چندشکلی	اندازه باند (bp)	قطعات هضم شده توسط آنزیم برشی (bp)
DGAT1-AluI	اگزون ۱۷، نوکلئوتید ۱۴۶۱	۳۰۹	TT:۲۷۲،۳۷ TC: ۳۰۹،۲۷۲،۳۷ CC: ۳۰۹

جدول ۳: مقادیر مناسب مواد جهت هضم جایگاه DGAT1

محصول واکنش PCR	۸ میکرولیتر
بافر 10X عرضه شده برای آنزیم	۲ میکرولیتر
آب مقطر ddH_2O	۹/۴ میکرولیتر
آنزیم AluI با غلظت ۶ u/µl	۰/۶ میکرولیتر
حجم کل	۲۰ میکرولیتر

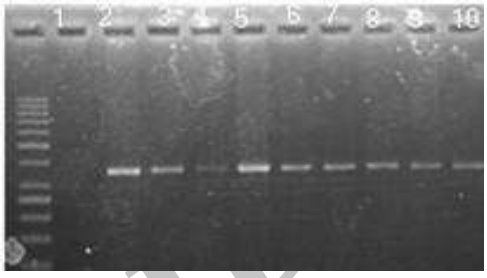
Archive of SID

www.SID.ir

بحث

تکثیر قطعه bp ۳۰۹ اگزون ۱۷ ژن DGAT1

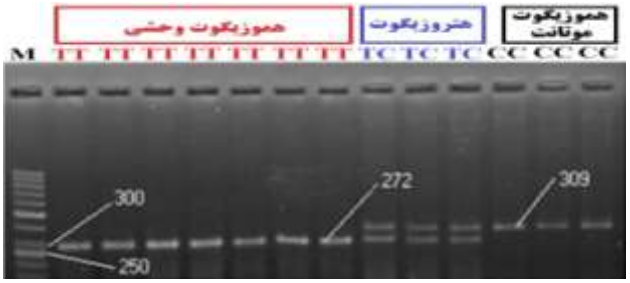
تصویر ۱ الکتروفورز محصولات PCR را بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ نشان می‌دهد. در این تصویر قطعه ۳۰۹ جفت بازی مشاهده می‌شود. استاندارد وزن مولکولی استفاده شده در کنار محصولات PCR صحت تکثیر قطعه مورد نظر را تأیید می‌کند.



شکل ۱: تکثیر قطعه bp ۳۰۹ ژن DGAT1 درگوسفند مهربان
M: Ladder100 bp، نشانگر برای اندازه قطعات تکثیر شده

شناسایی الگوی هضمی

قطعه ۳۰۹ جفت بازی تکثیر شده ژن DGAT1 با آنزیم Alu1 (شرکت Fermentas آلمان) هضم گردید. جهش نقطه‌ای اتفاق افتاده در اگزون ۱۷ برای آنزیم محدودالاثر Alu1 سبب عدم ایجاد برش می‌شود که با هضم آنزیمی تشخیص ژنوتیپ‌های مختلف فراهم خواهد شد. هضم آنزیمی در حجم ۲۰ میکرولیتر تحت شرایط بافری و دمای مناسب با استفاده از آنزیم برشی Alu1 انجام گرفت. هنگام هضم آنزیمی محصولات PCR، در صورت هتروزیگوت بودن (TC) قطعات ۳۰۹، ۲۷۲ و ۳۷ جفت بازی حاصل می‌شود و در صورت هموزیگوت وحشی (TT) بودن قطعات ۲۷۲ و ۳۷ حاصل می‌شود، در حالیکه در هموزیگوت جهش یافته (CC) قطعه ۳۰۹ جفت بازی دست نخورده باقی می‌ماند (شکل ۲).



شکل ۲: الکتروفورز محصولات هضمی حاصل از هضم آنزیم برشی AluI بر روی ژل آگارز (۲/۵٪)
M: Ladder100 bp، نشانگر برای اندازه قطعات تکثیر شده.
قطعات تکثیر شده bp ۳۰۹.

محاسبه فراوانی آللی و ژنوتیپی

فراوانی ژنوتیپی براساس Falconer & MacKay آزمون کای اسکوئر با استفاده از نرم‌افزار Pop Gene با نسخه ۳/۱ انجام گردیده و در جدول ۴ آورده شده است. ژنوتیپ‌های TT، TC و CC به ترتیب با فراوانی‌های۰/۲۵، ۰/۲۴ و ۰/۵۱ در گوسفندان مهربان مشاهده شدند. همان‌طورکه مشاهده می‌شود ژنوتیپ CC دارای بیشترین فراوانی ژنوتیپی بود. نتایج مشابهی نیز در سه نژاد مختلف گوسفندان چینی برای این جایگاه ژنی گزارش شده است. فراوانی ژنوتیپ‌هایTT، TC و CC به ترتیب ۰/۵۷، ۰/۰۹، ۰/۳۴ در گوسفند Han، ۰/۵۳، ۰/۱۱ و ۰/۳۶ در گوسفندان Tan و ۰/۷۳، ۰/۰۲ و ۰/۲۵ در گوسفندان inner Mongolia گزارش کردند (۱۹).

مطابق مطالعات گذشته بیشترین فراوانی آلل KK در نژادهای Gyr، Redsindhi، Guzerat و Nellor توسط لاکورت و همکاران (۲۰۰۶) گزارش شد. و در نژادهای Guzerat و Nellor ژنوتیپ KK با فراوانی ۱۰۰٪ مشاهده شد کسیس و همکاران (۲۰۰۵) در نژاد برهمن برای ژنوتیپ‌های KK، KA، AA به ترتیب فراوانی‌های ۰/۸۱، ۰/۱۸ و ۰/۱ را محاسبه کردند.

برای آلل‌های T و C به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۶۳ در گوسفندان مهربان محاسبه شد (جدول ۴). مقایسه فراوانی آلل T در این گله با تحقیقات مشابه انجام شده بر روی نژادهای چینی، توسط زو و همکاران مطابقت خوبی را نشان داد. این محققان فراوانی بالاتری را برای آلل (۰/۵۹ تا ۰/۷۴) گزارش کردند که نتایج تحقیق حاضر را تأیید می‌کند.

لاکورت و همکاران (۲۰۰۶) برای نژاد Gyr فراوانی بسیار پایین (۰/۰۴) و در نژادهای Redsindi و Nellor اصلا هیچ آلل A را مشاهده نکردند که بر خلاف نتایج هستند.

تالر و همکاران (۲۰۰۳) در نژاد هلشتاین و ناپولیتان و همکاران (۲۰۰۶) در نژاد هلشتاین ایتالیایی فراوانی آللی A را به ترتیب ۰/۵۵ و ۰/۵۹ گزارش کردند. چون در کشورهای کانادا و آمریکا انتخاب در جهت افزایش تولید شیر است به نظر می‌رسد دلیل بالا بودن فراوانی واریته آلانین در گله‌های آنها باشد.

صادقی (۱۳۸۶) و فروتنی فر (۱۳۸۶) نیز طی بررسی اثر جایگاه K232A در گاوهای نر و ماده هلشتاین ایران، فراوانی آلل K را به ترتیب ۰/۳۹۹ و ۰/۳۴ گزارش نمودند. از آنجایی‌که جمعیت گاوهای هلشتاین در ایران، حامل درصد بالایی از ژن‌های گاوهای نر آمریکا یا کانادایی هستند که این عامل می‌تواند سبب مشاهده فراوانی پایین تر آلل K در این تحقیق باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

اسپلمن و همکاران (۲۰۰۲) فراوانی‌های ۰/۲۴ تا ۰/۷۱ را در نژاد هلشتاین نیوزلند گزارش نمودند و اظهار داشتند که فراوانی آلل K به شدت تحت تأثیر ژن‌های خارجی (گاوهای نر آمریکا، کانادا و هلند) قرار گرفته‌اند. به طوری‌که در کشور نیوزلند به دلیل تأکید بیشتر برای افزایش درصد چربی، فراوانی آلل K افزایش یافته است. ناسلوند و همکاران (۲۰۰۲) و پارل و همکاران (۲۰۰۵) بیان کردند که به نظر می‌رسد که واریته K در نژادهایی که درصد چربی شیر بیشتر بالاتر دارند بیشتر است. به عنوان مثال میانگین درصد چربی شیر در نژاد جرسی در مقایسه با سایر نژادها بالاتر است و بنابراین فراوانی واریته K در این نژاد بالاتر از سایر نژادها بوده و بین ۰/۶۹ تا ۰/۸۸ گزارش شد. هم‌چنین ساندرز و همکاران (۲۰۰۶) فراوانی ۰/۶۱ را برای آلل K در نژاد Angeln آلمانی گزارش کردند و بیان کردند که فراوانی نسبتاً بالای واریته K می تواند به دلیل انتخاب بر روی صفات درصد و تولید چربی باشد و چون میانگین درصد چربی در نژاد جرسی از نژاد Angeln بالاتر است به همین دلیل فراوانی آلل K در آنها بیشتر است (۰/۶۹ تا ۰/۸۸).

جایگزینی K232A در چندین نژاد قدیمی وجود دارد که بیانگر این نکته است که این جایگزینی قبل از اهلی‌شدن اتفاق افتاده است (۸). همچنین وینتر و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از توالی یابی مستقیم حداقل هشت هاپلوتیپ را در شش نقطه متغیر نوکلئوتیدی در حیوانات مختلف در نژادهای مختلف به‌دست آوردند. هاپلوتیپ کد کننده لایزین در گونه‌های بوفالوهای آبی و Bos guunnieus وجود داشتند و بنابراین آنها نتیجه گرفتند که واریته کد کننده لایزین اختمالاً حالت اجدادی DGAT1 باشد. با توجه به وجود واریته آلانین در نژاد Anatolian black که بومی منطقه‌هایی است که محل اهلی-شدن بوس تاروس اروپایی بود، احتمالاً جایگزین K232A در همان اوایل اهلی‌شدن گاوها و یا حتی قبل از اهلی‌شدن آنها اتفاق افتاده است. جایگزینی K232A در یک ناحیه‌ای از پپتید است که در بین پستانداران حفاظت شده است. این سیستم بیانگر این مطلب است که در نتیجه موتاسیون در شکل اصلی پروتئین تغییری ایجاد نمی‌شود (۱۸).

جدول ۴: فراوانی ژنی و ژنوتیپی ژن DGAT1 در گوسفندان مهربان

ژنوتیپ	فراوانی مشاهده شده	فراوانی آللی	
		T	C
TT	۰/۲۵	۰/۳۷	۰/۶۳
TC	۰/۲۴		
CC	۰/۵۱		

کمترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ TC می‌باشد بنابراین آلل Tبیشتر در هتروزیگوت‌ها نمود داشته که فراوانی این آلل را به ۰/۳۷ رسانده است.

بررسی تعادل هاردی واینبرگ

بعد از محاسبه فراوانی آللی براساسFalconer & MacKay (۱۹۹۸) آزمون کای اسکوئر با استفاده از نرم افزار Pop Gene با نسخه ۱/۳ انجام گردید. تعداد مشاهده شده، آزمون کای مربع برای این جایگاه ژنی در جدول شماره ۵ ذکر شده است. چون ارزش کای مربع محاسبه شده از ارزش مربع جدول (P=۰/۰۵) بزرگتر است. لذا با احتمال ۹۵ درصد اختلاف بین اعداد به‌دست آمده و اعداد مورد انتظار معنی‌دار است و بنابراین تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه برقرار نیست. عدم تعادل در این جایگاه احتمالاً نشان دهنده حضور بعضی عوامل بر هم زننده تعادل، از جمله مهاجرت و انتخاب است. مهاجرت خصوصاً در مورد نرهایی که از گله‌های دیگر وارد می‌شوند، نقش بسزایی دارد. البته اندازه نمونه مورد بررسی هم در این امر می‌تواند مؤثر باشد.

جدول ۵: آزمون کای در جمعیت مورد مطالعه

ژنوتیپ	فراوانی مشاهده شده	فراوانی مورد انتظار	آزمون مربع کای
CC ,TT	۰/۷۶۰۴	۰/۵۳۱۵	
TC	۰/۲۳۹۶	۰/۴۸۸۵	P< 0.001

لازم به ذکر است که عدم تعادل هاردی واینبرگ برای ژن DGAT1 در جمعیت‌های دیگر نیز توسط محققین گزارش شده است. در مطالعه‌ای که بر روی دو نژاد گوسفند لری بختیاری و گوسفند نژاد زل توسط محمدی و همکاران انجام گرفت، عدم وجود تعادل هاردی واینبرگ را گزارش نمودند که در توافق با نتایج این تحقیق است.

بررسی تنوع ژنتیکی

به منظور بررسی تنوع درون جمعیتی یا تنوع ژن DGAT1 در جمعیت مورد مطالعه، پارامترهایی همچون هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار به‌دست آمده، که این نتایج در جدول ۶ ارائه گردیده است. لازم به ذکر است که سطح هتروزیگوسیتی یکی از شاخص‌های مهم میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت می‌باشد.

جدول ۶: برآورد هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی در جمعیت مورد مطالعه

Archive of SID
www.SID.ir

جایگاه ژنی	تعداد نمونه	هموزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هموزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مورد انتظار
DGAT1	۹۶	۰/۷۶۰۴	۰/۲۳۹۶	۰/۵۳۱۵	۰/۴۶۸۵

همان‌طورکه ملاحظه می‌گردد، هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۲۳۹۶ است که مقدار آن نسبتاً از مقدار هموزیگوسیتی مشاهده شده پایین‌تر بوده که می‌توان نتیجه گرفت که میزان تنوع ژنDGAT1 در جمعیت مورد مطالعه پایین می‌باشد.

در این تحقیق پلی مرفیسم ژن DGAT1 در گوسفندان نژاد مهربان مشاهده گردیده و هم‌چنین سه نوع ژنوتیپ مشاهده شد که سهم هموزیگوت‌ها بیشتر از هتروزیگوت‌ها بوده لذا می‌بایست نسبت به مشکلات ناشی از هم‌خونی در گله مراقب بود. البته این استدلال فقط برای این جایگاه از ژن و جمعیت مورد مطالعه صادق است لذا برای درک بهتر لازم است با دقت بیشتر شرایط نمونه‌گیری تصادفی و تعداد نمونه را در نظر گرفت.

به طورکلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اولاً روش PCR-RFLP برای مطالعه چند شکلی‌های موجود در ژن DGAT1 و بررسی ارتباط آنها با صفات تولیدی مناسب است و دوم اینکه در این نژاد مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری بین صفات مورد بررسی با چند شکلی ناحیه‌ای از اگزون ۱۷ ژن DGAT1 وجود دارد. به هر حال بررسی وضعیت یک جایگاه در یک ژن و بالاتر از آن، بررسی چند شکلی‌های یک ژن بزرگ اثر، به تنهایی برای هر نوع نتیجه‌گیری جامع کافی نیست و تعیین ژنوتیپ توأم چندین ژن عمده تأثیرگذار بر تولید کمیت و کیفیت گوشت مورد نیاز است .در نهایت، شاید بتوان از نتایج حاصل از چنین پژوهش‌هایی در برنامه‌های انتخاب بر اساس نشانگر از این چندشکلی‌ها به عنوان یک مارکر ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژاد صفات لاشه استفاده کرد.

سپاسگزاری

محققان این مقاله از مؤسسه پژوهشی پارس شفق شهرستان بروجرد به‌علت همکاری در خصوص انجام تحقیقات ملکولی حاضر تقدیر و سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1. Anderson, L. (2001). Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. Nat. Rev. Genet. 2:130–138.
2. Anderson, M., Wettesten, M., Boren, j., Magnusson, A., sjoberg, S. (1994).purification of diacylglycerol: acyltransferase from rat liver to near homogeneity.
3. Bertrand, J. K., Green, R. D., Herring, W. O., Moser, D. W. (2001). Genetic evaluation for beef carcass traits. Anim. J. SCi 79: SUPP1. E190 – 200.
4. Beuzen, N. D., Stear, M. J., Chang, K. C. (2000). Molecular markers and their use in animal breeding.the Veter. Am. J. 16:42-52.
5. Casas, E., White, S. N., Riley, D. J., smith, t. p. (2005).Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in Bos indicus cattle. J. Anim. Sci. 83:13 -19.
6. Falconer, D. S., Mackay, T. F. C. (1966). Introduction to Quantitative Geneticsfourth ed. Longman, Harlow, England, 464pp.
7. Groen, A. F. (2001). Breeding goal definition. ICAR Technical Series - No 3.
8. Kaupe, B., Winter, A., Fries, R., Erhardt, G. (2004). DGAT1 polymorphism in Bos indicus and Bos Taurus cattle breeds. J. of Dairy Res. 71: 182–187
9. Kosgey, I. S., Baker, R. L., Udod, H. M. J., Van Arendonk, J. A. M. (2006). Successe and failures of small ruminant breeding programmes in the tropics: a Review.Small Rumin. Res. 61:13–28.
10. Miller S.A., Dykes, D. D., Polesky, H. F. (1988).A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells.Nucl. Acids Res. 16:1255.
11. Moioli, B., Andrea, M. D., Pilla, F. (2007). Candidate genes affecting sheep and goat milk quality Small Rumin. Res. 68:179-192.
12. Nejati-Javaremi, A., Izadi, F., Rahimi, G., Moradi, M. (2007). Selection in fattailed sheep based on two traits of fat-tail and body weight versus single-trait total body weight. Inter. J. of Agri. and Biol. 9:645-648.
13. Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. US A. 83(9):2934-2938.

Archive of SID
www.SID.ir

14. Ramsey, C. B., Kirton, A. H., Hogg, B., Dobbie, J. L. (1991). Ultrasonic, needle, and carcass measurements for predicting chemical composition of lamb carcasses. J. Anim. Sci. 69(9):3655-3664.
15. Smith, S. J., Cases, S., Jensen, D. R., Chen, H., Sande, C. E., Tow, B., Sanan, D. A., Ecke, J. R. H., Farese, R. V. (2000). Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat.Nature Genet. 25(87):1038-1045.
16. Taylor, C. S., Murray, J. I., Thonney, M. L. (1989). Breed and sex differences among equally mature sheep and goats 4. Carcass muscle, fat and bone. Anim. Prod. 49, 385-410.
17. Thaller, G., winter, A., Ewald, G., Bellmann, O., Wegner, J., Zuhlke, H., Fries, R. (2003). DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle.Animal Genet. 43:354-357
18. Winter, A. (2003).Genomic characterization of genes enciding diacylglycerol acyltransferase activity in cattle and swine.Ph.D thesis. Tecnnische universiat munchen, munich, Germany.
19. Xu Q. L., Chen, Y. L., Xand, P., Xue, R. (2008). Polymorphism of DGAT1 associated with intramuscular fat-mediated tenderness in sheep. Inter Scie. 89:232-237.
20. Zamiri, M. J., Izadifard, J. (1997). Relationships of fat-tail weight with fat-tail measurements and carcass characteristics of Mehraban and Ghezel rams. Small Rumin. Res. 26:261–266.

Archive of SID

www.SID.ir