نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۸، پاییـز ۱۳۹۹
ص‌ص: ۶۹~۸۲

واگرایی ژنتیکی دو جمعیت نژاد بز گوشتی و شیرده:
بر پایه تحقیقات چند شکلی‌های نوکلئوتیدی موجود در ژن‌های کاندیدا

- **آرش جوانمرد**
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز.
- **نادر اسدزاده** (نویسنده مسئول)
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، اموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- **رضا توحیدی**
دانشکده کشاورزی و دامپروری تربت جام، مجتمع آموزش عالی و کشاورزی تربت جام، تربت جام.
- **رضا مسعودی**
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، اموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت : اردیبهشت ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۳۹۸
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۲۳۱۶۷۸
Email: naderasadzadeh4@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2019.125931.1904

چکیده

واگرایی ژنتیکی، فرآیندی است که در طی آن، دو یا چند جمعیت از یک گونه با جد مشترک، در طول زمان از طریق سازکارهای تکاملی، همچون جدایی جغرافیایی، نوترکیبی مولکولی و جهش های مستقل، آلل های با فراوانی غیر مشابه در سطح ژنومشان، فاصله ژنتیکی پیدا می کنند. این پدیده را می‌توان، اساس بوجود آمدن دو نژاد متفاوت از لحاظ، تیپ تولیدی در یک گونه دانست. در این راستا، هدف پژوهش حاضر، بررسی مقایسه‌ای چند شکلی های موجود در شش ژن کاندیدا برای تولید، در دو نژاد شاخص بز تیپ گوشتی و شیرده می‌باشد. بدین‌منظور، مجموعاً، تعداد ۳۰ عدد از هر نژاد بز شیری سانن و گوشتی بوئر، برای شناسایی چند شکلی ها در ناحیه ای از شش ژن کالپاستاتین، میوستاتین، هورمون شبه انسولین، لپتین، فاکتور نسخه پرداری اختصاصی هیپوفیزی و SCD با استفاده از تکنیک PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. سپس، پارامترهای ژنتیکی مولکولی، با استفاده از نرم‌افزار POPGENE بین دو جمعیت محاسبه گردید. از آزمون کای‌اسکور، بر طبق جدول توافقی، برای آزمون معنی‌داری تفاوت‌های شاخص های مولکولی بین دو جمعیت استفاده شد. ضمنا، فراوانی آلل های مطلوب مرتبط با تولید در هر دو گروه تعیین گردید. نتایج مطالعه حاضر، نشان داد که ژنوم دو جمعیت مورد مطالعه در پروفایل آلل های شناسایی شده در بیشتر موارد تفاوت معنی‌داری دارد($p<0.01$). چنین مطالعات واگرایی ژن در خصوص ژن‌های بزرگ اثرمرتبط با صفات تولیدی شاید بتواند، بینش اصلاح گران را برای درک بیشتر و پرده برداری از سیمای توارث جهش ها و نقش آنها در واریانس فنوتیپی مشاهده شده در صفات اقتصادی را بالا ببرد.

واژه‌های کلیدی: واگرایی ژنتیکی، بز نژاد سانن و بوئر، ژن کاندیدا، جهش مسبب.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 128 pp: 69-82

Exploring genetic divergence between two superior meat and diary type goat population: A candidate gene polymorphism based evidence.

By: A. Javanmard[1], N. Asadzadeh*[2], R. Tohidi[3], R. Masoudi[2]
1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
2- scientific board member of animal science research institute of IRAN, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) Iran.
3- Education complex of agriculture and animal science of Torbat-e-Jam.

Received: May 2019 **Accepted: August 2019**

The genetic divergence could define as a mechanism which two or more breeds within the same species with a common ancestor could differently evolutionary separated in genome structure. Molecular genetics may provide proper tools for estimation of the level of diversity and mutational events on this breed over time. Accordingly, the main objective of the present report was to evaluate and compare the candidate gene polymorphisms for two meat and dairy type of goat breeds using candidate gene polymorphism approach. For this purpose, in overall, 30 goat individuals for two meat and dairy goat breed were chosen for genotyping of six candidate genes (Calpastatin, Myostatin, Insulin growth like hormone, Leptin, Pituitary-specific transcription factor and SCD genes using PCR-RFLP techniques. Molecular descriptive Statistics such as genotype and allele frequencies observed and expected heterozygosity, Minor allele frequency ,and Hardy-Weinberg Equilibrium was calculated and compared using POPGENE software between populations. The Chi-square test was used for significant differences between the two populations for screened genes. The observed results interesting showed significant genotype and allele frequency pattern between the two studied breeds. Obtained outputs may insight to the understanding of Genetic divergence between well-known breeds due to domestication and artificial selection as well as geographical isolation.

Key words: Genetic divergence, candidate gene, goat, casual mutation.

مقدمه

واگرایی ژنتیکی، فرآیندی است که در طی آن، دو یا چند جمعیت از یک گونه با جد مشترک، در طول زمان از طریق سازکارهای تکاملی، همچون جدایی جغرافیایی، نوترکیبی مولکولی و جهش های مستقل، آلل هایی با فراوانی غیر مشابه، در سطح ژنومشان فاصله ژنتیکی پیدا می کنند. این پدیده را می توان، پایه و اساس بوجود آمدن دو نژاد متفاوت از لحاظ تیپ تولیدی در یک گونه دانست(پروتو و همکاران ۲۰۱۳). فناوری مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمی در داخل یک نژاد و بین چند نژاد متفاوت، برای متخصصان ژنتیک ابزار مطالعاتی مناسبی را فراهم کرد که به این سوال پاسخ دهند که، آیا آلل مسبب مختص به یک ژن بزرگ اثر، منجر به ایجاد تفاوت معنی‌دار در سطح فنوتیپ می‌شود؟ یا وجود آلل های متفاوت در یک جایگاه ایفاگر تنوع فنوتیپی هستند که به هر حال پاسخ این سناریوهای تحقیقاتی از طریق انجام مطالعات ژنتیک مولکولی مقایسه‌ای بین دو جمعیت با فنوتیپ آستانه‌ای متفاوت، قابل رمزگشایی می باشد. مطالعه حاضر، دو نژاد شیری و گوشتی بز را هدف‌گذاری تحقیق خود قرار داده است. در خصوص نژاد سانن خاستگاه این نژاد از دره‌ای به همین نام در کشور سوئیس اخذ شده است. فنوتیپ سفید رنگ و در بعضی مواقع دارای لکه‌های رنگی در روی پوست گوش و پستان است. وزن در ماده‌ها در حدود ۶۰ کیلوگرم و در

نرها در حدود ۸۵ کیلوگرم است. سالیانه، در حدود ۲۰۰۰ کیلوگرم شیر تولید می‌کند. دوره شیردهی آن ۲۹۰ تا ۳۰۵ روز است و روزانه بین ۳ تا ۸ لیتر شیر می‌رسد. متوسط چربی شیر این نژاد، ۳/۶ درصد، پروتئین شیر ۳/۲ درصد و مواد جامد شیر ۱۲/۸ درصد می‌باشد(بیچارد ۱۹۸۹). اخیراً در ایران، پرورش نژاد سانن با استقبال مناسبی بین دامداران مواجه شده است و در نقاط مختلف پرورش داده می‌شود.

نژاد دوم نژاد بوئر است که کلمه بوئر از زبان هلندی به معنی "مزرعه دار" گرفته شده است. خاستگاه نژاد بوئر آفریقای جنوبی است. تیپ این نژاد گوشتی می‌باشد و به داشتن خصوصیاتی همچون، وزن بدن سنگین، سرعت رشد و کیفیت لاشه مطلوب، معروف است(Casey و Van Niekerk، ۱۹۸۸). همچنین، این نژاد به بسیاری از بیماری‌ها مقاوم و از باروری مناسبی برخوردار است، وزن بز ماده بالغ ۴۵-۶۵ کیلوگرم و روزانه ۳/۱ تا ۴/۱ کیلوگرم شیر تولید می‌کند (Sahlu و Goetsch، ۲۰۰۵). بز نر ۵۰- ۷۰ کیلوگرم می‌باشد و بز بالغ ۱۱۰-۱۳۰ کیلوگرم هم می‌رسد.

در راستای مقایسه ساختار ژنتیکی این دو نژاد، ژنتیک مولکولی و ابزارهای موجود در آن می‌تواند در درک فرآیندهای تکاملی، انتخاب طبیعی و آزمون بازدهی برنامه های سنتز نژادی نقش آفرین باشد (Shrestha و Fahmy، ۲۰۰۵). در حال حاضر، تحقیقات گسترده‌ای در خصوص مکان‌یابی جایگاه‌های کنترل کننده صفات کمی و دیدگاه شناسایی چند شکلی‌های موجود در ژن‌های کاندید و ارتباط آن با صفات اقتصادی وجود دارد(Cano و همکاران، ۲۰۰۷؛ Shu و همکاران، ۲۰۰۸). در واقع، وارد شدن اطلاعات نشانگرهای مولکولی در مدل‌های ارزیابی ژنتیکی دام‌های اهلی انقلاب نوینی را در ابداع روش‌های اصلاح نژادی مدرن ایجاد کرد. ارزیابی جایگزینی‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌های کاندیدا و تأثیر آن بر روی صفات اقتصادی می‌تواند سر نخ‌هایی از پدیده اهلی شدن و نشانه های انتخاب در سطح ژنوم را برای محققان ایجاد کند (D'Andrea و همکاران، ۲۰۰۷). دستاوردهای معنی‌دار حاصل، از کاربرد اطلاعات ژنومی در بالا بردن بازدهی برنامه های اصلاح نژادی به خوبی مشخص شده است (Rothschild و Soller ، ۱۹۹۷). یک ژن کاندیدا برای تولید در واقع ژنی است که موقعیت و محل استقرار کروموزومی آن و مکانیزم مولکولی و بیوشیمیایی آن در داخل سلول، پروتئین و نقش آن در مسیرهای هورمونی و پیام های داخل سلولی مشخص است و جهش‌های مسبب که در آن می‌تواند مستقیماً بر روی واریانس فنوتیپی صفت مؤثر باشد از افق های تحقیقاتی بسیاری از مقالات است (Fontanesi و همکاران، ۲۰۰۸).

در تحقیقات پیشین، ژن‌های کاندیدای متعددی برای توجیه واریانس صفات تولیدی، تولیدمثلی و باروری و مقاومت و حساسیت به بیماری‌های متداول شناسایی شده است که از آن میان، در پژوهش حاضر، بررسی مقایسه‌ای چند شکلی‌های موجود در شش ژن کاندیدا با تولید در دو نژاد شاخص برای تیپ گوشتی و شیرده بز می‌باشد. بدین منظور، تعداد ۳۰ عدد از هر نژاد بز سانن و بوئر برای ناحیه‌ای از ژن‌های کالپاستاتین، میوستاتین، هورمون شبه انسولین، لپتین، فاکتور نسخه پرداری اختصاصی هیپوفیزی و SCD[1] با استفاده از تکنیک PCR-RFLP می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، نمونه‌های بز بوئر از طریق مکاتبات انجام شده با انجمن حمایت از این نژاد در امریکا از طریق ارسال نمونه‌های ریشه مو و فولیکول های موجود در آن به تعداد ۳۰ عدد از هر نژاد خالص(نر، ماده) دریافت شد. نمونه‌های خون بز سانن خالص و حاوی شجره (نر، ماده) از مزارع پرورش موجود در ایران جمع‌آوری گردید. پس از ثبت دقیق مشخصات، با استفاده از دستورالعمل پیشنهادی کیتهای تجاری استخراج از ریشه مو و خون شرکت کیاژن آمریکا استخراج DNA صورت گرفت و با استفاده از دستگاه نانودراپ شرکت اپندروف آلمان کمیت و کیفیت نمونه‌های استخراج شده اندازه‌گیری و ثبت گردید. جایگاه‌های مورد انتخاب برای تعیین ژنوتیپ، نام ژن و جزییات کامل در جدول ۱ نشان داده شده است.

[1] Stearoyl-CoA desaturase

جدول ۱- تعداد ۹ جایگاه‌ها مورد انتخاب برای تعیین ژنوتیپ، نام ٦ ژن کاندیدای انتخابی و جزییات کامل تکثیر

جایگاه	توالی آغازگرها	منطقه ژنی	دمای اتصال	اندازه باند	پالیندروم	منبع
لپتین (۱)	5-GATTCCGCCGCACCTCTC-3 5-CCTGTCAAGGCTGCACAGCC-3	اگزون دو	۶۰	۴۶۷	ATCGAT TAGCTA	*et* Lagonigro *al.* (2003)
لپتین(۲)	5- TGGAGTGGCTTGTTGTTATTTTCTTCT- 3 5-GTCCCCGCTTCTGGCTAGGTAACT-3	اینترون دو	۵۵	۴۴۲	GATC CTAG	Liefers *et al*. (2002)
لپتین (۳)	5-ATGCGCTGGACCCCTGTATC-3 5-TGGTGTCATCCTGGACCTTCC-3	اگزون دو	۵۲	۹۴	TCCGGA AGGCCT	*et* Buchanan *al*. (2003).
کالپاستاتین	5-AGCAGCCACCATCAGAGAAA-3 5-TCGGCTGGTTCGGCAGAT-3	اگزون شش و هفت	۶۴	۱۵۵۴	GAANN CTTNN	Chung *et al.* (2001)
میوستاتین	5-CCAAATACTGCTCTGGAGGAT-3 5- GGAGACATCTTTGTAGGAGTACAGC- 3	اگزون سه	۵۵	۱۲۴	GGATG CCTAC	*et* Di Stasio *al.* (2005)
SCD	5-AGTGTAGAAGGGACAGCCCAGC-3 5-GTGGAATGACACATGGAGAGGG-3	اگزون پنج	۶۳	۴۴۷	GTAC CATG	Yahyaoui (2003)
فاکتور شبه انسولین (۱)	5-GAAATGGCAGTGAGTCGG-3 5-TGGGCTCTTGAGTAATGGTG-3	اگزون دو	۶۰	۶۵۵	CTAG GATC	Lan , *et al.* (2007)
فاکتورشبه انسولین (۲)	5- CCAAGCGTGAGACAGAATAC-3 5-AGGAGGGATAGGAGCAAGTT-3	اگزون دو	۵۶	۳۵۰	GGCC CCGG	Lan, *et al.* (2007)
فاکتور اختصاصی نسخه برداری هیپوفیزی	5-CCATCATCTCCCTTCTT-3 5- AATGTACAATGTCCTTCTGAG-3	اگزون شش	۵۴	۴۵۰	AGCT TCGA	*et* Lagonigr *al.* (2003)

غلظت نهایی مواد در ۲۵ میکرولیتر حجم واکنش PCR شامل: یک واحد آنزیم Taq Polymerase، ۲۰۰ میکرومول از هر یک از dNTP، ۲۰۰ میلی مول MgCl2، ۲۰-۱۰ پیکامول از هر یک از آغازگرها، ۱۰۰-۵۰ نانوگرم DNA و بافر استاندارد بوده است. برنامه ترموسایکلر شامل سیکل پیش ران ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و متعاقباً سه چرخه داخلی برنامه شامل دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال آغازگر بر حسب هر ژن (طبق جدول یک) به مدت یک دقیقه و دمای تکثیر یا بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه(در ۳۵ چرخه دمایی) و یک سیکل بسط نهایی دیگر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه مد نظر قرار گرفت. پس از اتمام برنامه شرایط الکتروفورز بسط به اندازه باند معمولاً ولتاژ ۸۰ ولت به مدت متغیر ۲۰-۶۰ دقیقه(بسته به طول ژل و تانک) تعیین شد. رنگ آمیزی ژل بااتیدیوم بروماید (۱۰ mg/ml) و جهت مشاهده باندها از ژل آگارز ۱/۸٪ استفاده شد. پس از حصول اطمینان از تکثیر اختصاصی هر یک از جایگاه‌های مورد مطالعه و شارپی باندها، نبود باند کاذب و غلظت مناسب هر یک از نمونه‌ها اقدام به هضم آنزیمی شد. بدین‌منظور، بسته به هر ژن آنزیم برشی مناسب بر طبق مقالات رفرنس جدول ۱ انتخاب شد و پس از تهیه واکنش هضمی و تأمین ۱۰ واحد آنزیم برای هر واکنش ۱۵ میکرولیتری برای انکوباسیون نمونه ها همگی در دمای ۳۷ درجه به مدت حداقل ۱۶ ساعت تیمار شدند و برای انکوباسیون و جلوگیری از تبخیر نمونه‌های هضمی از دستگاه ترموسایکلر تنظیم شده روی تک چرخه ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده شد. نمونه‌های هضمی پس از تیمار دمایی بسته به اندازه باندها در روی ژل آگارز ۳- ۲ درصد بارگذاری شد. جزییات این هضم آنزیمی و نام آنزیم‌ها در جدول شماره ۲ نمایش داده شده است.

جدول ۲- جزییات هضم آنزیمی و نام آنزیم‌های متعلق به ۹ جایگاه‌های مورد انتخاب برای تعیین ژنوتیپ

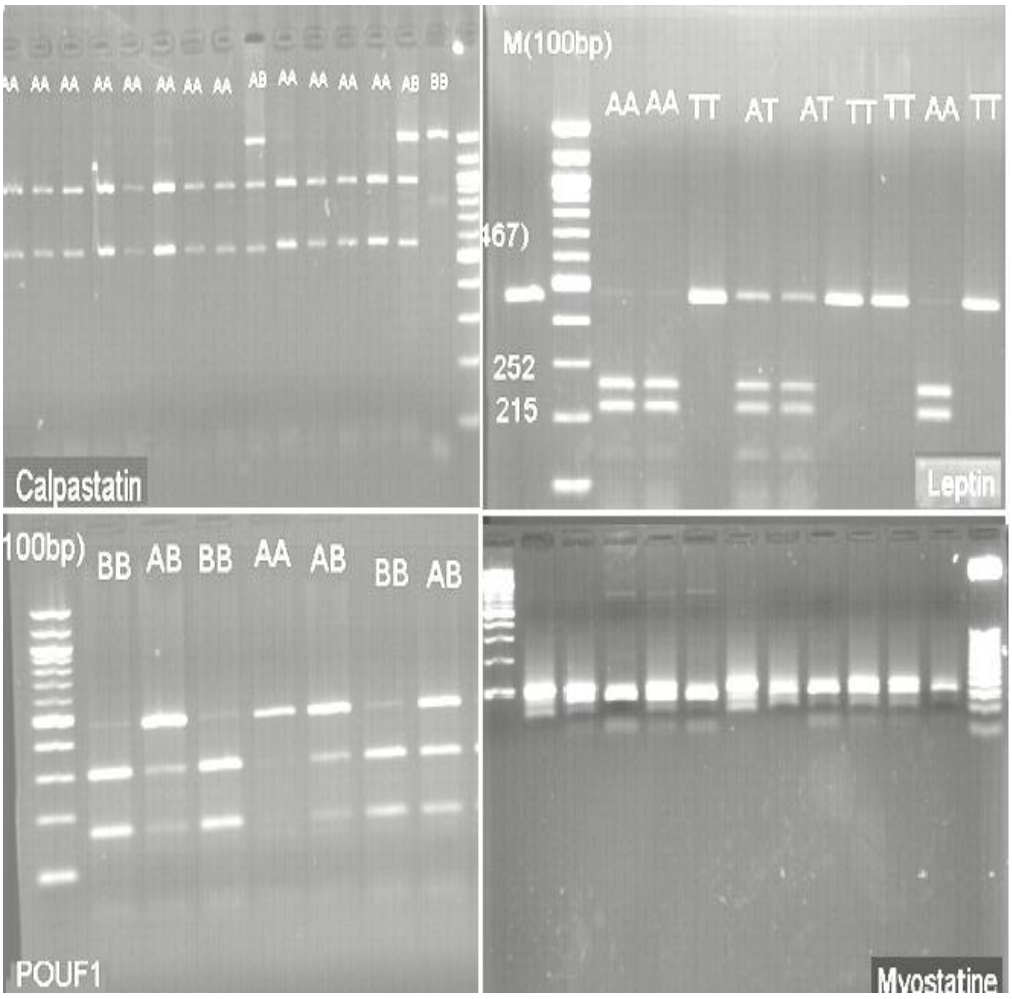
جایگاه	پالیندروم	آنزیم	نوع جهش	محصولات هضمbp	منبع
لپتین (۱)	ATCGAT TAGCTA	*ClaI*	A/T Tyrosine to Phenylalanine	(A 215, 252) T 467	*et al.* (2003) Lagonigro
لپتین(۲)	GATC CTAG	*Sau3AI*	GAC=>GAT	(B 303, 88 and 32) (A 390, 32)	(2002) *et al.* Liefers
لپتین (۳)	TCCGGA AGGCCT	*Kpn2I*	C/T Arginine to Cysteine	T 94 (C 72, 19)	Buchanan *et al.* (2003).
کالپاستاتین	GAANN CTTNN	*XmnI*	گزارش نشده	B 1552 bp (A 960 and 592)	Chung *et al.* (2001)
میوستاتین	GGATG CCTAC	*BstF5I*	گزارش نشده	(A 100,24) B 124	*et al.* (2005) Di Stasio
SCD	GTAC CATG	*RsaI*	G to T	(G 349, 98) (T 238, 110 ,98)	Yahyaoui (2003)
فاکتور شبه انسولین (۱)	CTAG GATC	*XspI*	G>A	(X1 421, 234) X1 600	*et al.* (2007) Lan
فاکتورشبه انسولین (۲)	GGCC CCGG	*HaeIII*	C>G	(H1 264,44,8) (H2 195,69,44,8)	Lan, *et al.* (2007)
فاکتور اختصاصی نسخه برداری هیپوفیزی	AGCT TCGA	*AluI*	AGT>AGC Silent (Ser)	C (216, 124 and 110) T (340 and 110)	*et al.* (2003) Lagonigr

تجزیه و تحلیل آماری

پارامترهای مولکولی ژنتیک جمعیتی، همچون فراوانی ژنوتیپی، فراوانی آللی، هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار، حداقل فروانی آللی ، آزمون تعادل هاری واینبرگ با استفاده از نرم افزار POPGENE(ین و همکاران ۱۹۹۷). بین دو جمعیت محاسبه گردید. از آزمون کای اسکور بر طبق جدول توافقی برای آزمون معنی‌داری تفاوتهای شاخص‌های مولکولی بین دو جمعیت استفاده شد. سپس آلل های مطلوب مرتبط با تولید در هر دو گروه تعیین کردید.

نتایج

در این مطالعه از دو دستورالعمل و کیت تجاری شرکت کیاژن برای استخراج DNA ژنومی از فولیکول‌های ریشه مو و خون کامل استفاده شد. نتایج این دو دستورالعمل نشا ن داد که غلظت و کیفیت DNA ژنومی از ماده اولیه ریشه مو به طور معنی‌دار کمتر از استخراج از خون کامل می‌باشد، به طوری که در روش استخراج از ریشه مو ۲۰±۸۰ نانوگرم DNA در برابر ۳۰±۲۳۰ نانوگرم DNA از خون کامل می‌باشد. در خصوص تکثیر محصولات توسط واکنش زنجیره پلی‌مراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر ژن کاندیدا پیشنهادی توسط مقالات کلیدی پیشین، همه واکنش‌ها تکثیر با اندازه باندی مطابق با مطالعات پیشین را نشان دادند و در تمام جایگاه‌ها این تطابق اندازه باندی مشاهده گردید.



شکل ۱- نمونه‌ای از چندشکلی‌های مشاهده شده در جمعیت بزهای مورد مطالعه

محصولات حاصل از تکثیر در هر جایگاه و گروه ژنی با استفاده از آنزیم برشی مناسب و تحت شرایط بهینه مورد هضم قرار گفت و در خصوص تمامی جایگاه ها باستثنای فاکتورشبه انسولین (۲) پلی مورفیسم و تنوع مناسبی مشاهده گردید. در جدول ۳ اندازه آللی مورد انتظار بعد از هضم به طور دقیق گزارش شده است.

جدول ۳- آمار توصیفی و شاخص‌های مولکولی مقایسه ای بین دو نژاد بز مورد

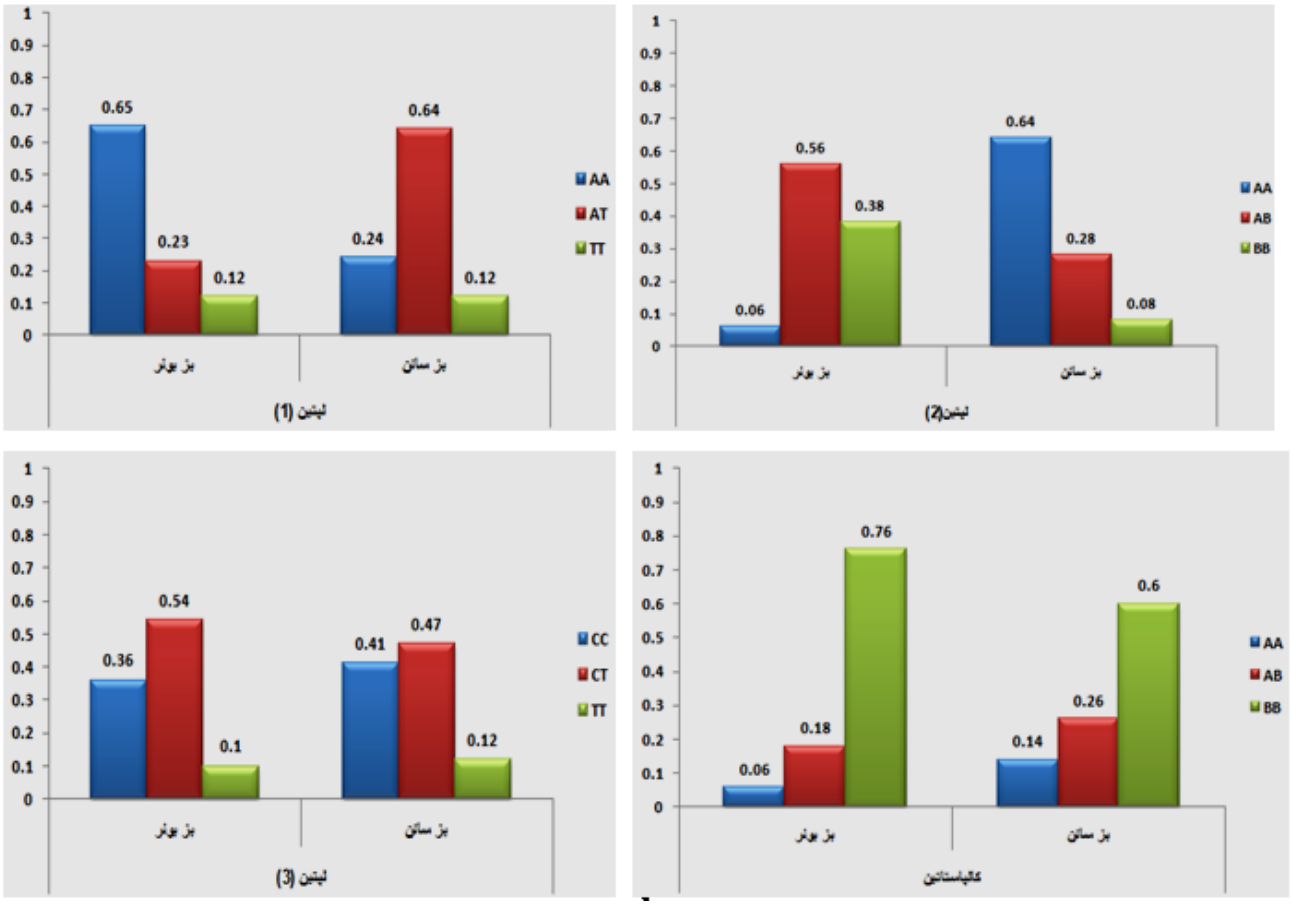
n=30 لیپتن یک	فراوانی ژنوتیپی			فراوانی آللی		هتروزیگوتی		آزمون کای اسکور
	AA	AT	TT	A	T	Ho	He	سطح معنی داری
بز بوئر	۰/۶۵	۰/۲۳	۰/۱۲	۰/۷۶	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۳۷	p>۰/۰۵
بز سانن	۰/۲۴	۰/۶۴	۰/۱۲	۰/۵۶	۰/۴۴	۰/۶۵	۰/۵۱	p>۰/۰۵
لپتین دو	AA	AB	BB	A	B	Ho	He	
بز بوئر	۰/۰۶	۰/۵۶	۰/۳۸	۰/۳۴	۰/۶۶	۰/۵۶	۰/۴۵	p>۰/۰۵
بز سانن	۰/۶۴	۰/۲۸	۰/۰۸	۰/۷۸	۰/۲۲	۰/۲۸	۰/۳۵	p>۰/۰۵
لپتین سه	CC	CT	TT	C	T	Ho	He	
بز بوئر	۰/۳۶	۰/۵۴	۰/۱۰	۰/۶۳	۰/۳۷	۰/۵۴	۰/۴۷	p>۰/۰۵
بز سانن	۰/۴۱	۰/۴۷	۰/۱۲	۰/۶۵	۰/۳۵	۰/۴۷	۰/۴۷	p<۰/۰۱
کالپاستاتین	AA	AB	BB	A	B	Ho	He	
بز بوئر	۰/۰۶	۰/۱۸	۰/۷۶	۰/۱۵	۰/۸۵	۰/۱۸	۰/۲۶	p<۰/۰۵
بز سانن	۰/۱۴	۰/۲۶	۰/۶۰	۰/۲۷	۰/۷۳	۰/۲۶	۰/۴۰	p<۰/۰۱
میوستاتین	AA	AB	BB	A	B	Ho	He	
بز بوئر	۰/۰۴	۰/۹۴	۰/۰۲	۰/۵۱	۰/۴۹	۰/۹۰	۰/۵۱	p<۰/۰۱
بز سانن	۰/۰۶	۰/۱۸	۰/۷۶	۰/۱۵	۰/۸۵	۰/۱۸	۰/۲۶	p<۰/۰۵

Ho: هتروزیگوتی مشاهد شده He: هتروزیگوتی مورد انتظار n: تعداد کل

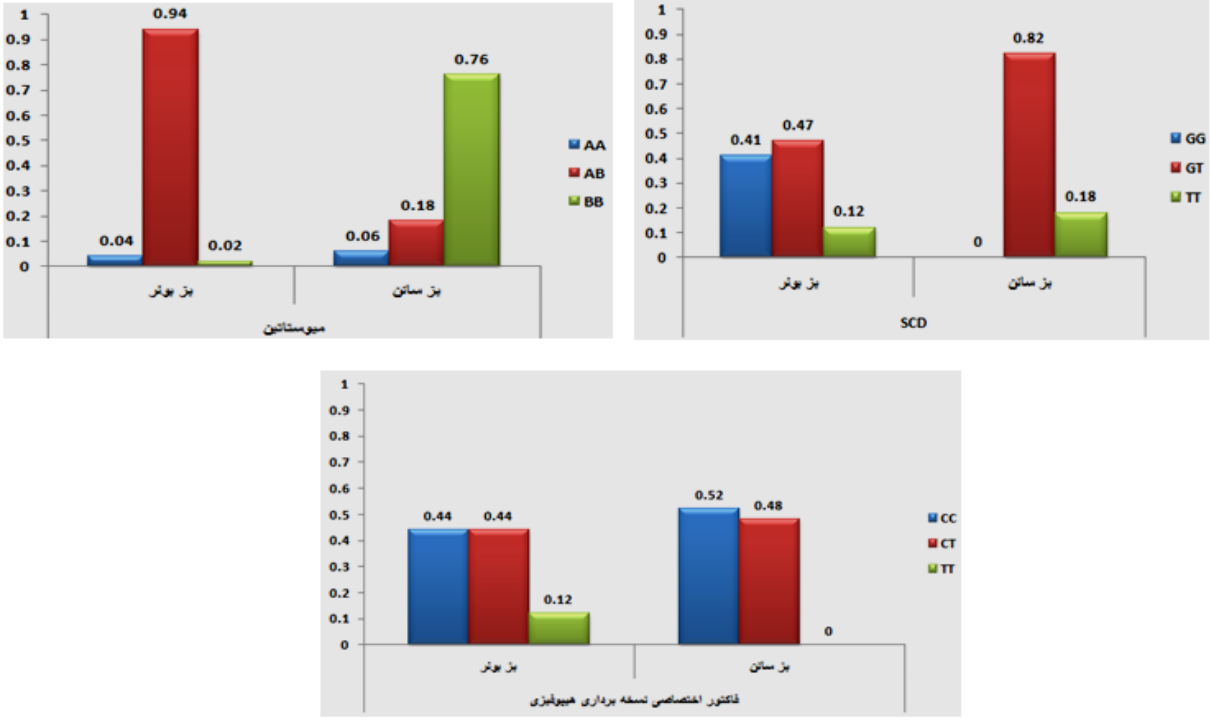
جدول ۳-(ادامه) آمار توصیفی و شاخص‌های مولکولی مقایسه‌ای بین دو نژاد بز مورد مطالعه

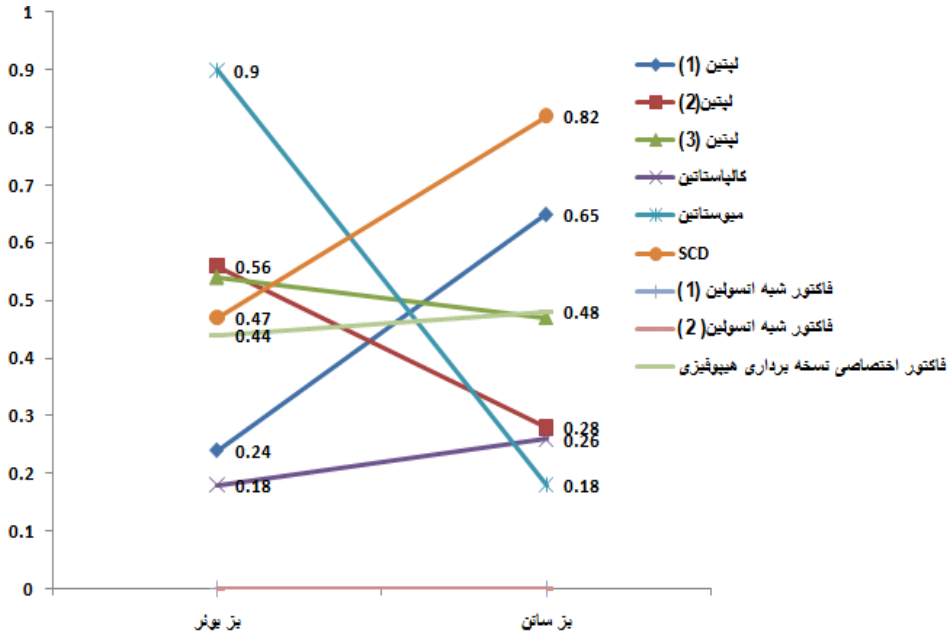
n=30 SCD	فراوانی ژنوتیپی			فراوانی آللی		هتروزیگوتی		آزمون کای اسکور
	GG	GT	TT	G	T	Ho	He	
بز بوئر	۰/۴۱	۰/۴۷	۰/۱۲	۰/۶۵	۰/۳۵	۰/۴۷	۰/۴۷	p<۰/۰۱
بز سانن	۰/۰۰	۰/۸۲	۰/۱۸	۰/۴۱	۰/۵۹	۰/۸۲	۰/۴۹	p<۰/۰۱
فاکتور شبه انسولین (۱)	X_1X_1	X_1X_2	X_2X_2	X_1	X_2	Ho	He	
بز بوئر	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	p<۰/۰۱
بز سانن	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	p<۰/۰۱
فاکتور شبه انسولین (۲)	H_1H_1	H_1H_2	H_2H_2	H_1	H_2	Ho	He	
بز بوئر	۱/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	p<۰/۰۱
بز سانن	۱/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	p<۰/۰۱
فاکتور اختصاصی نسخه برداری هیپوفیزی	CC	CT	TT	C	T	Ho	He	
بز بوئر	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۱۲	۰/۶۶	۰/۳۴	۰/۴۴	۰/۴۵	p>۰/۰۵
بز سانن	۰/۵۲	۰/۴۸	۰/۰۰	۰/۷۶	۰/۲۴	۰/۴۸	۰/۳۷	p<۰/۰۵

Ho : هتروزیگوتی مشاهد شده He: هتروزیگوتی مورد انتظار n: تعداد کل



شکل ۲- پروفایل فراوانی ژنوتیپی در ژن‌های کاندیدای مقایسه شده در جمعیت بزهای مورد مطالعه





شکل ۳- فراوانی هتروزیگوتی مشاهده شده در در ژن‌های کاندیدای مقایسه شده در جمعیت بزها

مطابق شاخص‌های مولکولی محاسبه شده در جدول و شکل ۳ در بین دو نژاد مورد بررسی در۶ ژن کاندیدا نتایج جالبی بدست آمد. بطوری که در بز سانن در جایگاه‌های مورد مطالعه لپتین دو، SCD و فاکتور اختصاصی نسخه برداری هیپوفیزی بطور معنی‌داری فراوانی آللی با بز بوئر متفاوت و این آلل‌ها با صفات تولید شیر ارتباط نشان داده بودند. علاوه بر این طبق همین الگو در نژاد گوشتی بوئر در ژن‌های لپتین یک، دو، کالپاستاتین و میوستاتین آلل مطلوب مرتبط با خصوصیات رشد و وزن تفاوت معنی‌داری را با رقیب بز سانن داشت($p<۰/۱$). در خصوص فراوانی هتروزیگوتی مشاهده شده(طبق شکل ۴) نیز پروفایل و آهنگ تغییرات بین دو نژاد تفاوت‌های فاحشی را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری

فرآیند واگریی به پدیده ای گفته می شود که دو نژاد کاملاً متمایز از لحاظ تیپ تولیدی دارای جد مشترک یکسانی بوده اما عوامل متفاوتی ساختار ژنتیکی و ژنوم آنها را متمایز ساخته است. واگرایی ژنتیکی را می‌توان پایه و اساس وجود آمدن دو نژاد متفاوت، از لحاظ تیپ تولیدی در یک گونه دانست. گونه بز یکی از دام‌های ارزشمند می‌باشد که تنوع نژادی در آن بسیار زیاد است و حدود ۱۲ درصد نژادهای پستانداران را شامل می‌شود. هم اکنون، تعداد جمعیت بز در دنیا ۷۸۶ میلیون در قالب ۵۴۳ نژاد وجود دارد . این تنوع نژادی عظیم، در نتیجه انتخاب طبیعی برای شرایط محیطی بسیار گوناگون و سازگاری آسان بز نسبت به آن‌ها و انتخاب مصنوعی به وجود آمده است. دیدگاه شناسایی جهش‌های مسبب در ژنوم دام‌های اهلی یکی از ابزارهای مطالعاتی مناسب برای، ارزیابی فاصله ژنتیکی بین دو نژاد با تیپ تولیدی کاملاً متمایز و شاخص می‌باشد.

در مطالعه حاضر پلی مورفیسم های موجود در ۹ جایگاه از ۶ ژن کاندید در دو نژاد بز بوئر و سانن بطور مقایسه‌ای تعیین ژنوتیپ گردید و پروفایل شاخص های مولکولی با یکدیگر مقایسه گردید به هرحال الگوهای به تصویر کشیده موجود می‌تواند تغییرات ژنتیکی و جهش‌های رخ داده در طی پدیده‌های همچون اهلی شدن، انتخاب و جدایی جغرافیایی را بطور غیر مستقیم منعکس کند. از جمله ژن‌های کاندیدایی که سه جایگاه از آن در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت ژن کلیدی لپتین می‌باشد.

لپتین از واژه Loptos به معنی لاغری گرفته شده است (Lusk، ۲۰۰۷). یک هورمون پروتئینی است که اثرات عمده ای در تنظیم

وزن بدن، متابولیسم انرژی، بلوغ، سندرم چاقی، عملکرد تولیدمثلی، محورهای عصب ـ هورمونی، ایمنی در برابر بیماری و اشتها دارد که به طور عمده در سلول های چربی پستانداران ترشح می‌شود(Buchanan و همکاران، ۲۰۰۲؛ Fitzsimmons و همکاران، ۱۹۹۸). منبع اصلی ترشح لپتین سلول‌های آدیپوسیت بافت‌های چربی بخصوص آدیپوز سفید می‌باشد. این ژن دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون می‌باشد و از لحاظ اصلاح نژاد برای بهبود و کیفیت گوشت، باروری، بازده مصرف خوراک و تولید شیر حائز اهمیت است. در مطالعه حاضر در هر سه جایگاه این ژن فراوانی ژنوتیپی و آللی متفاوت بین دو نژاد مورد مطالعه مشاهده گردید. Liefers و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که آلل B به طور معنی‌داری باعث افزایش تولید شیر و مصرف خوراک و کاهش بیلان منفی انرژی می‌گردد که نتایج مطالعه ما نیز بر بالا بودن این آلل مرتبط با تولید شیر در بز سانن دلالت داشت (Liefers و همکاران، ۲۰۰۲).

مجموعه پروتئین های کالپاین که در تجزیه ماهیچه و گوشت پس از ذبح، نقش کلیدی را بر عهده دارد یک مجموعه پروتئینی پروئتولیتک و سیتوسولیک می‌باشد(Murachi ، ۱۹۸۳).که وجود آن در همه سلول های عضلانی ثابت شده است. این سیستم شامل پروتئازهای طبیعی وابسته به کلسیم، می‌باشد(Takano و همکاران، ۲۰۰۰). که نقش اساسی در رشد ماهیچه و تردی گوشت ذبح شده دارند. کالپاین‌ها را عامل شروع کننده تجزیه ماهیچه های میوفیبریل، می‌دانند(Zhou و همکاران، ۲۰۰۷). بطور کلی آنزیم های کالپاین از طریق کنترل تجزیه میوفیبریل‌ها در طول حیات حیو ان، رشد ماهیچه را تحت کنترل دارند و پس از کشتار، از طریق تجزیه کردن Z-Disk های موجود در ماهیچه اسکلتی و همچنین تضعیف پیوندهای موجود بین میوفیبریل ها ، باعث تردی و بازارپسندی گوشت می‌شوند (Kapelański و همکاران، ۲۰۰۴).در این مقوله، آنزیم کالپاستاتین یکی دیگر از اعضای خانواده کالپاین‌ها با نقشی متفاوت تر از بقیه شناسائی شده است که به عنوان یک ممانعت کننده اختصاصی پروتئازهای وابسته به کلسیم عمل می‌کند و اخیراً نقش آن در رشد و لاغری و میزان ضایعات متعاقب کشتار دارد (Kury و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین میزان و سرعت تردشدن گوشت تا حدود زیادی تحت تأثیر عملکرد آنزیم کالپاستاتین می‌باشد (Chung و همکاران، ۲۰۰۸). طی مطالعات انجام شده آلل B این ژن، نقش مهمی در رشد و ترددی و بازارپسندی گوشت دارد که نتایج مطالعه حاضر با مطالعات پیشین در خصوص بز بوئر که نژاد گوشتی است موافقت داشت (Schenkel و همکاران، ۲۰۰۶).

ژن‌های PIT1/IGF1 بعنوان یک فاکتور اختصاصی نسخه برداری در غده هیپوفیز شناسائی شده است. پروتئین کد شونده توسط این ژن میزان تظاهر ژن هورمون رشد و پرولاکتین را کنترل می‌کند. وجود چندشکلی در توالی این ژن احتمالاً در میزان و تعداد نسخه برداری ژن‌های هورمون رشد و پرولاکتین ضروری می‌باشد (Hossner و همکاران، ۱۹۹۷). بنابراین این ژن بعنوان ژن کاندیدا برای صفات مرتبط با رشد در گاوهای گوشتی شناخته شده است (Romagnolo و همکاران، ۱۹۹۲). ژن IGF1 ژن دیگری است که پروتئین حاصل از این ژن در تنظیم عمل هورمون رشد نقش عمده‌ای دارد. ژن IGF1، سوماتومدین C نام دارد که توسط کبد ساخته می شود و دارای ۷۰ اسیدآمینه است. بسیاری از محققین نشان داده اند که عمل هورمون رشد از طریق واسطه‌گری پروتئین IGF1 عمل می کند(Maciulla و همکاران، ۱۹۹۷؛ Haegeman و همکاران، ۱۹۹۹؛ Sun ، ۲۰۰۲).

Renavill و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که آلل A از ژن PIT1 نقش قابل توجهی را در تولید شیر دارد، بطوری‌که گاوهای با ژنوتیپ AB حاوی مقادیر بالائی از شیر تولیدی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بودند (Parmentier و همکاران، ۱۹۹۹). Zwierzchowsk و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که گاوهای ماده حاوی ژنوتیپ AB از ژن PIT1 به میزان ۱.۳-۱.۶ کیلو گرم شیر بالاتری به ژنوتیپ‌های BB و AAتولید می‌کنند. ژن میواستاتین کنترل کننده هیپرتروفی ماهیچه[2] میواستاتین نام دارد. پروتئین کد شونده توسط این ژن رشد ماهیچه های اسکلتی را باعث می‌شود اما جهش در این ژن باعث ایجاد رشد بیش از حد ماهیچه می‌شود فنوتیپ های حاصل از این جهش به صورت

[2] Double Muscling

اندام های خلفی گرد و برجسته، سر کوچک، زبان بزرگ، دستگاه تناسلی نابالغ و افزایش حساسیت در مقابل بیماری‌های تنفسی و عضلات مضاعف می‌باشد (Yeh و همکاران ۱۹۹۷).

ژن استریول کو آنزیم آ دسچوراز عامل موثر بر بیوسنتز اسیدهای چرب با یک پیوند دو گانه[3] است که در بوجود آوردن یک پیوند دو گانه سیس (CIS) بین کربن ۹ و ۴۳ در یک طیف وسیعی از اسیدهای چرب اشباع[4] شده با اولویت اسیداستئاریک C18 و اسید پالمتیک C16 نقش کلیدی دارد(Yahyaoui ، ۲۰۰۳).

آنزیم دلتا ۹ دسچوراز نقش مهمی در سوخت و ساز چربی و نگهداری خاصیت سیالیت غشاء، بر اساس اهمیت فیزیولوژیکی نسبت بین اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع را دارد (Yahyaoui ، ۲۰۰۳). تغییرات در این نسبت در انواع اختلالات سیستم ایمنی نقش دارد . رونویسی این ژن با بیان بالا در بافت چربی، کبد و غده پستانی حیوانات شیرده نشخوارکننده انجام می‌شود. استرول کوآنزیم آدسچوراز یک آنزیم حیاتی در تبدیل اسیدهای چرب اشباع به اسیدهای چرب غیراشباع با یک پیوند دوگانه و نیز سنتز لینولئیک اسید کونژوگه (CLA) می‌باشد. یکی از اسیدهای چربی که آنزیم Δ^9- دسچوراز بر آن اثر می کند، واکسینیک (c18:1 trans-11) است که به سیس-۹ ترانس-۱۱ (CLA) موجود در شکمبه تبدیل می شود. بیشترین اسید لینولئیک مزدوج[5] ساخته شده در غده پستانی حیوانات نشخوارکننده، توسط این آنزیم سنتز می‌شود. ایزومر عمده اسید لینولئیک مزدوج در شیر نشخوارکنندگان سیس-۹ ترانس-۱۱ CLA (رومینیک اسید) است که از اسید واکسینیک (c18:1 trans-11) توسط به وسیله دسچوراز Δ^9 در بافت ها سنتز می‌گردد.این ژن دارای ساختاری با شش اگزون و پنج اینترون می‌باشد (Yahyaoui، ۲۰۰۳).

در جمع‌بندی نتایج تحقیق حاضر بطور کلی نتایج مطالعه حاضر به روشنی نشان داد که ژنوم دو جمعیت مورد مطالعه در پروفایل آلل‌های شناسایی شده در بیشتر موارد تفاوت معنی‌داری دارد ($p<۰/۰۱$). در جدول شماره ۴ خلاصه و جمع‌بندی مطالعات پیشین مشابه در گونه های مختلف و مقایسه آن با نتایج کلیدی در مطالعه حاضر به نمایش گذاشته شده است. در هر حال علت تفاوت در برخی نتایج مطالعه حاضر با مطالعات مشابه پیشین را می‌توان به تفاوت در ماده آزمایشی متفاوت، ساختار ژنتیکی متفاوت، ناحیه ژنی مورد بررسی متفاوت و آغازگرهای غیر یکسان با این مطالعه دانست و همچنین ممکن است آنزیم برشی مورد استفاده برای تعیین چند شکلی و تکنیک شناسایی جهش‌ها در مطالعات پیشین با مطالعه حاضر متفاوت بوده باشد.

---

[3] Mufa: Mono unsaturated fatty acid

[4] SFA: saturated fatty acid

[5] CLA: Conjugated linoleic acid

جدول ٤- جمع‌بندی مطالعات پیشین مشابه در گونه‌های مختلف و مقایسه آن با نتایج کلیدی در مطالعه حاضر

جایگاه	آلل مطلوب	گونه مطالعه شده	ارتباط با صفت	نتایج مطالعه حاضر	منبع
لپتین (۱)	T	گاو های کره جنوبی	مصرف خوراک	غیر معنی‌دار	*et al.* Lagonigro (2003)
لپتین(۲)	B	گاوهای هلشتاین	تولید شیر	در بز سانن فراوانی بالا	*et al.* Liefers (2002)
لپتین (۳)	C/T	گاو گوشتی	مصرف خوراک	در بز بوئر فراوانی بالا	Buchanan *et al.* (2003).
کالپاستاتین	B	گاو گوشتی	تردی گوشت	در بز بوئر فراوانی بالا	Chung *et al.* (2001)
میوستاتین	A/B	بز	وزن زنده	در بز بوئر فراوانی بالا	*et al.* Di Stasio (2005)
SCD	T	بز	صفات شیر	در بز سانن فراوانی بالا	Yahyaoui (2003)
فاکتور شبه انسولین (۱)	X_1	بز	چند قلوزایی	مونومورف	*et al*. Lan (2007)
فاکتورشبه انسولین (۲)	H_1	بز	چند قلوزایی	مونومورف	Lan, *et al.* (2007)
فاکتور اختصاصی نسخه برداری هیپوفیزی	T	بز	صفات رشد	در بز بوئر فراوانی بالا	*et al.* Lagonigr (2003)

از لحاظ اعتبار سنجی و اندازه و حجم نمونه‌ها با توجه به اینکه نشانگر PCR-RFLP یک نشانگر هم‌بارز با بروز دو آلل می باشد به نظر می‌رسد تعداد ۳۰ عدد نمونه از هر نژاد غیر محتمل نباشد. با این حال نگارندگان باور دارند که استفاده از روش‌های نوینی همچون پویش کل ژنوم برای استفاده از اسنیپ چیپ و توالی یابی نسل جدید در صورت تأمین هزینه های سنگین می‌تواند تکرارپذیری ادعاهای این پژوهش را به داوری مجدد بگذارد. چنین مطالعات واگرایی ژن در خصوص ژن های بزرگ اثرمرتبط با صفات تولیدی شاید بتواند بینش اصلاح‌گران را برای درک بیشتر و پرده برداری از سیمای توارث جهش‌ها و نقش آنها در واریانس فنوتیپی مشاهده شده در صفات اقتصادی را بالا ببرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از انجمن حمایت از بز نژاد بوئر جهت سازماندهی و اطلاع‌رسانی فراخوان جهت ارسال نمونه به آزمایشگاه و تأمین هزینه‌های پست تشکر و قدردانی می‌کنیم.

منابع

Buchanan, F. C and Van Kessel, A. G. (2003). Hot Topic: An Association between a Leptin Single Nucleotide Polymorphism and Milk and Protein Yield. *J. Dairy Sci.* 86(10): 3164-3166.

Buchanan, F. C., Fitzsimmons, C. J., Van Kessel, A.G., Thue, T. D., Winkelman-Sim, D.C and Schmutz. S. M. (2002). Association of a Missense Mutation in the Bovine Leptin Gene with Carcass Fat Content and Leptin mRNA Levels. *Genetic. Selec. Evol.* 34(1): 105-116.

Cano, E. M., Marrube, G. *et al.* (2007). QTL affecting fleece traits in Angora goats. *Small Rumin.* Res.71 (1-3): 158.

Casey N. H. and Van Niekerk. W. A. (1988). the Boer Goat (I). Origin, Adaptability, Performance Testing, Reproduction and Milk Production. *Small Rumin. Res.* 1:291-302.

Chung, E. R., Shin, S. C., Shin, K. H and Chun, K. Y. (2008). SNP Discovery in the Leptin Promoter Gene and Association with Meat Quality and Carcass Traits in Korean Cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21: 1689-1695.

Chung, H. Y., Davis, M. E and Hines, H. C. (2001). Genetic Variants Detected by PCR–RFLP in Intron 6 of the Bovine Calpastatin Gene. *Anim. Genet.* 32(1): 53-53.

Di Stasio, L. A. R. (2005). A PCR-RFLP Method for Genotyping the Myostatin Locus in Piemontese Cattle. *Anim Genet.* 36(6): 521-521.

Fontanesi L, Tazzoli M., Scotti, E and Russo V. (2008). Analysis Of Candidate Genes for Meat Production Traits in Domestics Rabbit Breeds. 9th World Rabbit Congress – June 10-13, 2008 – Verona – Italy.

Haegeman A., Van Zeveren A and Peelman L. J. (1999). A New Mutation in the Bovine Insulin like Growth Factor Binding Protein-3. *Anim. Genet.*, 30: 382.

Hossner, K. L., Mccusker R. H and Dodson, M. V. (1997). Insulin-Like Growth Factors and their Binding Proteins in Domestic Animals. *Anim. Sci.*, 64: 1–15.

Kapelański W., Grajewska, S.,Kurył, J., Bocian, M., Jankowiak, H and Wiśniewska, J. (2004). Calpastatin (CAST) Gene Polymorphism and Selected Meat Quality Traits in Pigs. *Animal Science Paper Report* 22(4), 435-441.

Kury J., Kapelański, W., Pierzchała, M.,Grajewska, S and Bocian, M. (2003). Preliminary Observations on the Effect of Calpastatin Gene (CAST) Polymorphism on Carcass traits in Pigs. *Animal Science Paper Report 21(2), 87-95.*

Lagonigro, R., Wiener, P., Pilla, F., Woolliams, J. A and Martin, J. L. (2003). A New Mutation in the Coding Region of the Bovine Leptin Gene Associated with Feed Intake. *Anim. Genet.*34:371-374.

Lan, X. Y. , Pan, C. Y., Chen, H., Zhao, M., Li, J. Y., Yu, J., Zhang, C. L., Lei, C. Z., Hua, L. S and Yang, X. B. (2007). The novel SNPs of the IGFBP3 Gene and their Associations with Litter Size and Weight Traits in Goat (Brief report) .Arch. Tierz. 50, 223-224.

Lan, X. Y., Pan, C. Y and *et al.* (2007). An AluI PCR-RFLP Detecting a Silent Allele at the Goat POU1F1 locus and its Association with Production Traits. *Small Rumin. Res.* 73(1-3): 8-15.

Lan, X. Y., Pan, C. Y and *et al.* (2007). The HaeIII and XspI PCR-RFLPs Detecting Polymorphisms at the Goat IGFBP-3 Locus. *Small Rumin. Res.* (1-3): 283-288.

Liefers, S.C., Veerkamp, R. F and Vander lene T. (2002) Association Between Leptin gene Polymorphism and Production, Live Weight Energy Balance, Feed intake and Fertility in Holstein Heifers. *J. Dairy Sci*. 85: 1633-1638.

Lin, C., Lin, S.C., Chang, C. P and Rosenfeld, M. G. (1992). Pit-1-dependent Releasing Factor Mediates Pituitary Cell Growth. Nature, 360:765-768.

Lusk, J. L. (2007). Association of Single Nucleotide Polymorphisms in the Leptin Gene with Body Weight and Backfat Growth Curve Parameters for Beef Cattle. *J. Anim Sci.* 85(8): 1865-1872.

Maciulla ,J.H., Zhang, H.M and DeNise, S.K. (1997) A Novel Polymorphism in the Bovine Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) gene. *Anim. Genet.*, 28, 375.

Parmentier, I., Portelle, D., Gengler, N., Prandai, A., Bertozzi, C., Vleurick, L., Gilson, R and Riller, R. (1999). Candidate Gene Markers Associated with Somatotropic axis and Milk Selection. *Dom. Anim. Endo,* 17:139-148.

Murachi, T. (1983). Calpain and calpastatin. *Trends Biochem. Sci.* 8, 167-169.

Rothschild, M,F and Soller, M. (1997). Candidate Gene Analysis to Detect Traits of Economic Importance in Domestic Livestock. *Probe*, 8, 13–22.

Sahlu, T and Goetsch, A. L. (2005). A foresight on goat research. *Small Rumin. Res* 60(1-2): 7.

Schenkel, F,s., Miller, Sp., Jiang, Z., Mandell,Bi., Ye, X., Li, H and Wilton ,Wj. (2006). Association of a Single Nucleotide Polymorphism in the Calpastatin Gene with Carcass and Meat Quality Traits of Beef cattle. *J. Anim. Sc.* 84:291–299.

Shrestha, J. N. B and Fahmy, M. H. (2005). Breeding goats for meat production: A Review: 1. Genetic Resources, Management and Breed Evaluation. *Small Rumin. Res* 58(2): 93.

Takano, J., Watanabe, M and *et al.* (2000). Four Types of Calpastatin Isoforms with Distinct Amino-Terminal Sequences Are Specified by Alternative First Exons and Differentially Expressed in Mouse Tissues. *J Biochem* 128(1): 83-92.

Van Niekerk, W.A and Casey, N. H. (1988). Growth, Nutrient Requirements, Carcass and Meat Quality. *Small Ruminant Res*. **1**: pp. 355–368.

Yahyaoui, M. H. (2003). Mapping of the Goat Stearoyl Coenzyme A Desaturase Gene to Chromosome 26. *Anim. Genet.* **34**(6): 474-475.

Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1997) *POPGENE* version 1.31, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Canada.

Zhou, H., Hickford, J. G. H and *et al.* (2007). Polymorphism of the Ovine Calpastatin Gene. *Molecular and Cellular Probes* 21(3): 242.