



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۱۹، تابستان ۱۳۹۵

ص: ۳-۸

بررسی چند شکلی ژن چند قلوژیایی (*Fec B*) در گوسفند زندی

با استفاده از تکنیک *RFLP-PCR*

- لیدا طاهر خانی

کارشناس ارشد رشته ژنتیک و اصلاح دام، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

- علیرضا نوشری (نویسنده مسئول)

استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

- بهزاد همتی

دانشیار رشته ژنتیک و اصلاح دام دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۲۶۳۳۲۱۰۲۰۱

Email: alireza.noshary@kiaou.ac.ir

چکیده:

بالا بودن نرخ تخمک گذاری و بهره‌زایی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر افزایش تولیدمثل و به دنبال آن افزایش کارایی اقتصادی در صنعت پرورش گوسفند محسوب می‌شود. در این تحقیق، به منظور بررسی چند شکلی ناحیه‌ای از ژن بورولا از تعداد ۱۷۰ راس گوسفند زندی از محل دامداری طرح محوری اصلاح نژاد قوچ زندی واقع در استان قم استفاده شد. استخراج DNA به روش salting out از نمونه‌های خون تهیه شده از گوسفندان انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تکثیر قطعه ۱۹۰ جفت بازی از ناحیه اگزون ۸ ژن *FecB* قابل دسترسی در سایت NCBI انجام شد. برای واکنش PBR، محصول واکنش PCR به وسیله آنزیم برشی *AvaII* تحت هضم قرار گرفت. نتایج حاصل از فرآورده‌های هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز بارگیری و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها از طریق مقایسه الگوی باندها با نشانگر اندازه‌گیری مناسب انجام شد. نتایج این تحقیق نشان دهنده تنها حضور آلل A حاصل از عدم جهش ایجاد کننده سایت برش در آنزیم *AvaII* در تمامی نمونه‌ها بود. بنابراین، جایگاه مورد مطالعه از ژن *FecB* در نمونه‌های مورد مطالعه از گوسفندان زندی کشور را می‌توان فاقد چندشکلی دانست. با توجه به وجود رکوردهای فنوتیپی دوقلوژیایی در این نژاد، از نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اثرات ژنتیکی مسئول دوقلوژیایی در این نژاد به جهش گزارش شده در اگزون ۸ ژن بزرگ اثر بورولا مرتبط نبوده بلکه باید به جستجوی سایر نواحی از این ژن و یا ژن‌های دیگر در این نژاد پرداخت.

واژه‌های کلیدی: گوسفند زندی، بورولا، چند قلوژیایی، چند شکلی، PCR-RFLP

Applied Animal Science Research Journal No 19 pp: 3-8

The Study of Booroola Gene Polymorphism In Zandi Breed Sheep by PCR-RFLP

By: 1. L. Taherkhani, Animal Breeding and Genetics graduated, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, IRAN.

2*. A. Noshary (Corresponding Author), Assistant Professor of Animal Science Group, Agriculture Faculty, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, IRAN

3. B. Hemmati, Associated Professor of Animal Science Group, Agriculture Faculty, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, IRAN

The high ovulation rate and litter size were most important factors on fecundity and could be effect on more economic prolificacy in sheep breeding industries. The aim of this study was investigation of genetic polymorphism in Booroola gene region in Zandi breed sheep. For this a sample of 170 Zandi breed sheep were selected in Ram breeding farms in Ghom province. The genomic DNA was extracted by salting out method. The PCR was done for amplify of 190 bp of FecB gene in Exon 8 available in NCBI and the PBR reaction was done by *AvaII* restriction endonuclease (RE). The RFLP products were loaded on Agars and used for genotyping by comparison with suitable size marker. The results showed that there is A allele in all samples only and we can't find any mutation in *AvaII* RE site in studied sample. So, the studied locus of FecB was monomorph. Despite of twining ability of Zandi breed sheep we find there was no association between mutation in Exon 8 of Booroola gene and twining ability in Zandi breed sheep and the study of other region of FecB or other major genes can be purposed.

Key words: Zandi, Booroola, Prolificacy, Polymorphism, PCR-RFLP

مقدمه

مقایسه با سرعت رشد بدن به مراتب زیاده تر گزارش گردیده است (خالدار، ۱۳۸۴).

در گوسفند زندی همانند بسیاری از گوسفندان بومی کشور، برنامه‌های پرورش به صورت سنتی بوده و در قالب گله‌های روستایی انجام می‌شود. تنها رکوردهای قابل اخذ در چنین شرایطی نهایتاً رکوردهای فنوتیپی هستند که آن‌ها نیز هیچ گونه اطلاعاتی از ژن‌های موثر بر صفات مهم اقتصادی نظیر چند قلو زایی در اختیار قرار نمی‌دهند. در چنین شرایطی، ساختار ژنتیکی دام‌ها همانند یک جعبه سیاه باقی می‌ماند (پیروسی، ۱۳۹۲ و نصر و دیانی، ۱۳۸۹). صفات تولید مثل جزء صفات چند ژنی و دارای توارث کمی و در برخی موارد توارث آستانه‌ای است (Davis و همکاران، ۱۹۹۱). این صفات هم تحت تأثیر ژن‌های با اثر کم و هم ژن‌های با اثر عمده می‌باشند. در دهه‌های اخیر، تحقیق بر روی بعضی از ژن‌های با اثر عمده مؤثر بر تولید مثل

گوسفند زندی جزء گوسفندان دارای تیپ پوستی است که به علت تولید گوشت مرغوب می‌توان آن را گوسفند پوستی-گوشتی محسوب کرد. پشم این گوسفند کیفیت چندانی ندارد اما پوست آن دارای کیفیت بالایی است (توکلیان، ۱۳۸۰). یکی از اهداف پرورش این گوسفند تولید گوشت است که این صفت خود متأثر از صفات تولید مثل و میزان رشد است. صفات تولید مثل را می‌توان در تولید گوشت دارای اهمیت اقتصادی بالاتر و نیز موثرتر نسبت به صفات میزان رشد دانست (محمدی و صابری وند، ۱۳۸۵). نصر و دیانی (۱۳۸۹) در تحقیقات خود، درصد باروری این گوسفند را ۹۵/۹، درصد بره زایی ۱۰۳/۶ و درصد زایش را ۹۵/۱ درصد گزارش نمودند. دوقلو زایی در این گوسفند ۵ تا ۱۰ درصد گزارش شده است. همچنین فصل زایش این گوسفند زمستان می‌باشد. به طور کلی، کاهش هزینه‌های اقتصادی و بیولوژیک در تولید گوشت در اثر افزایش بازده تولید مثل، در

ناقص به اثبات رسیده است. دوقلو زایی در گوسفندان حاصل جهش نقطه‌ای در بخشی از کروموزوم شماره ۶ در ژن گیرنده پروتئین مورفوژنیک IB (BMPR-IB) می باشد (قنبری و همکاران، ۱۳۸۶). این جهش نقطه‌ای به صورت تغییر نوکلئوتید A به G در موقعیت باز ۷۴۶ در ناحیه کدکننده ژن بوده و منجر به تغییر اسید آمینه گلوتامین به آرژنین در فرایند بیان ژن می گردد (Souza و همکاران، ۲۰۰۱ و Wilson و همکاران، ۲۰۰۱). در میش‌هایی که حامل ژن بورولا هستند، مهم‌ترین مشخصه در تخمک گذاری، تخمک های کوچک نسبت به میش‌های فاقد این ژن است و در نهایت مهم‌ترین تأثیر ژن بورولا را می‌توان در افزایش هورمون FSH دانست که در میش‌های هموزیگوت از نظر این ژن، بسیار زیاده‌تر از بقیه می‌باشد. تجزیه و تحلیل گسترده فیزیولوژیکی نشان می‌دهد که ژن Fec B بر فعالیت غدد هیپوفیز و تخمدان نیز تأثیرگذار است به خصوص در فولیکول‌های تخمدانی این ژن فعالیت خود را به طور مستقیم یا غیر مستقیم با وادار کردن رشد زودرس فولیکول‌های تخمدانی که در اندازه های کوچک آزاد می‌شوند اعمال می‌نماید (Montgomery و همکاران، ۲۰۰۱). تحقیقات McNatty و همکاران (۲۰۰۱) نشان داده است حضور تنها یک آلل از ژن Fec B در افراد هتروزیگوت، میزان تخمک گذاری را در حدود ۲ تا ۳ بار افزایش داده است و این تخمک گذاری اضافی منجر به افزایش میزان بره زایی در حدود ۱/۵ برابر گردیده است. هدف از این تحقیق، مطالعه و شناسایی اولیه جهش‌های معرفی شده منجر به چندقلو زایی در ژن بورولا در نمونه‌ای از گوسفندان زندی کشور می‌باشد تا در صورت شناسایی چنین جهش‌هایی که منجر به الگوی چند شکلی می‌گردد بتوان از آن به عنوان یک ابزار در برنامه‌های اصلاح نژادی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

در پژوهش حاضر، از تعداد ۱۷۰ راس گوسفند زندی نر و ماده در یک نمونه گیری تصادفی از گله‌های دارای میانگین سنی ۱ تا ۵ سال و از محل دامداری‌های طرح محوری اصلاح قوچ نژاد زندی

گوسفند، تمرکز یافته است (Davis و همکاران، ۱۹۹۲). از جمله مهم‌ترین صفات تولید مثلی در گوسفند چند قلو زایی می‌باشد که در هر زایمان با میزان تخمک گذاری ارتباط مستقیم داشته و تحت تاثیر تعداد معینی هورمون و ژن‌های ویژه قرارداد (کثیریان و همکاران، ۱۳۸۷) و در صورتی که روش مناسبی برای تجمع این شرایط در دام‌ها به کار گرفته شود می‌توان بازده تولید مثل را به طور قابل توجهی افزایش داد (Abulyazid و همکاران، ۲۰۱۱ و Amiri و همکاران، ۲۰۰۷).

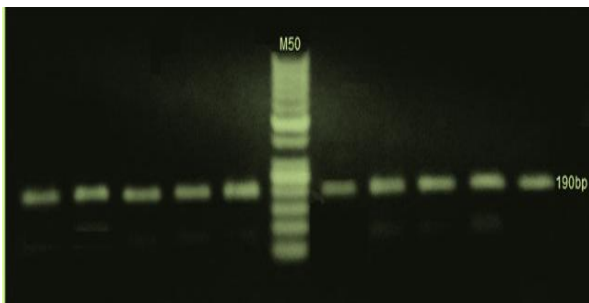
یکی از روش‌های بهبود کمیت گوشت گوسفند، اصلاح نژاد برای افزایش دوقلو زایی می‌باشد. تجربیات نشان می‌دهند هزینه‌های پرورش یک راس میش چه قصر باشد یا منجر به زایش دو قلو گردد، تقریباً یکسان است. با انتخاب میش‌هایی که از نظر ژنتیکی از بازدهی بره‌زایی بیشتری برخوردار باشند می‌توان تعداد میش‌های مولد را در شرایط مراتع کاهش داد و همان تعداد بره را در پایان فصل زایش از میش‌های مولد اخذ نمود. انتخاب بر اساس نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR یکی از روش‌های جدید در اصلاح دام است که می‌تواند سبب افزایش دقت انتخاب گردد. استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی از ابزارهای کمکی مناسبی می‌باشد که ویژگی بارز آن ایجاد اطلاعات مناسب ژنوم و امکان استفاده این اطلاعات در مدل‌های حیوانی در کنار رکورد‌های فنوتیپی می‌باشد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۴). وراثت پذیری این صفت در مطالعات مختلف کمتر از ۰/۱ گزارش شده است که نشان می‌دهد با وجود واریانس ژنتیکی در این صفت، ابزار انتخاب برای ایجاد پیشرفت ژنتیکی دارای بازخورد محدود می‌باشد.

تا کنون ژن‌های کاندیدای متعددی برای صفت چندقلو زایی در گوسفند گزارش شده است که مهم‌ترین آن‌ها ژن بورولا (Fec B) می‌باشد. این ژن از سال‌های پیش به عنوان ژن کاندیدای مسئول برای میزان بیشتر تخمک گذاری میش شناخته شده است (فروتی فر و همکاران، ۱۳۸۵) و اثر آن بر روی چند قلو زایی در گوسفندان اثبات گردیده است. ژن بورولا اتوزومی بوده و وجود یک جهش در این ژن برای صفت نرخ تخمک گذاری با اثر ژنتیکی افزایشی و برای صفت چندقلو زایی با اثر ژنتیکی غالبیت

آنزیمی بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد و در کنار نشانگر اندازه گیری ۵۰ جفت بازی شرکت ترمو بارگیری شد.

نتایج و بحث

تحقیق حاضر بر اساس مطالعات Abouheif و همکاران (۲۰۱۱)، ناحیه‌ای به طول ۱۹۰ جفت باز اگزون شماره ۸ این ژن را مورد بررسی قرار داده است. شکل ۱ نشان می‌دهد با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده می‌توان جایگاه ۱۹۰ جفت بازی را بر روی ژن FecB به خوبی در تمامی نمونه‌ها تکثیر نمود. به منظور شناسایی الگوی برقراری جهش‌های احتمالی در این ناحیه از تکنیک PCR-RFLP مطابق تحقیقات Abouheif و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. شکل ۲، الگوی باندهای حاصل از واکنش هضم آنزیمی را در تعدادی از نمونه‌های تحقیق نشان می‌دهد. وقوع جهش در این جایگاه می‌تواند منجر به تشکیل سایت تشخیص برای آنزیم *AvaII* شده و در نتیجه هضم آنزیمی قطعات ۳۰ و ۱۶۰ جفت بازی را ایجاد نماید که معرف آلل B خواهد بود، ولی چنین جهشی در هیچ‌یک از نمونه‌های این تحقیق مشاهده نگردید.



شکل ۱ - محصول PCR برای جایگاه مورد مطالعه ژن Fec B روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار سایز مارکر ۵۰ bp



شکل ۲- محصول هضم آنزیمی *AvaII* برای محصول PCR ژن Fec B روی ژل آگارز ۲/۵ درصد در کنار سایز مارکر ۵۰ bp

و دامداری‌های نیمه صنعتی واقع در استان قم استفاده گردید. تهیه نمونه‌های خون با استفاده از لوله‌های خلاءدار حاوی EDTA از محل سیاهرگ وداج انجام شد و تا زمان استخراج DNA نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. استخراج DNA به روش بهینه یافته نمکی انجام شد (پیروسی، ۱۳۹۲). DNA استخراج شده با استفاده از روش بارگیری روی ژل آگارز ۰/۷۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و PCR-RFLP

در این تحقیق با استفاده از آغازگرهای پیشنهاد شده توسط Abouheif و همکاران (۲۰۱۱) ناحیه اگزون شماره ۸ ژن FecB به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر بر اساس ۵۰-۱۰۰ نانو گرم DNA ژنومی، ۰/۴ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای رفت با توالی 5'-CCAGAGGACAATAGCAAAGCAAA-3' و برگشت با توالی

5'-CAAGATGTTTTTCAGTCCTCATCAACAGGTC-3' بافر PCR با غلظت ۱X، ۳۰۰ میکرومولار از هر MgCl₂، dNTP و ۶/۵ میلی‌مولار واحد Taq DNA Polymerase تنظیم گردید.

چرخه‌های دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل واسرشت اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، واسرشت ثانویه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، بسط آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به تعداد ۳۵ سیکل و بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بوده است. برای آزمون صحت تکثیر ناحیه مورد مطالعه ژن و هم چنین تعیین کیفیت محصول PCR از روش بارگیری بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی *safe stain* به همراه نشانگر ۵۰ جفت بازی شرکت ترمو استفاده شد. واکنش PCR-RFLP به منظور شناسایی الگوی چند شکلی احتمالی در نمونه‌های تحقیق در حجم ۱۵ میکرولیتر، بر اساس ۱۲ واحد آنزیم برشی *AvaII*، بافر آنزیم با غلظت ۱X و ۱۰ میکرولیتر محصول PCR در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. برای بررسی نتایج واکنش PCR-RFLP، محصول هضم

مطالعه از تحقیق نشان نداد و این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد.

در بررسی‌هایی که روی نژادهای خارجی انجام شده است، Davis و همکاران (۲۰۰۲) با آزمایش گوسفندان چند قلوژی هشت کشور (نیوزیلند، هند، فیلیپین، اندونزی، لهستان، ایسلند، فرانسه و ایرلند)، عدم وجود جهش در ژن *FecB* را در نژادهای توکا، وودلندز، اولکاسو، لاکان، بلکیر و کمبریج گزارش کردند و در عین حال وجود جهش را در نژادهای گارول و جاوانز تایید کردند. در تحقیق دیگر روی ۲۲ نژاد گوسفند دورگ گیری شده مصری که در مزرعه تحقیقاتی مرکز پژوهشی قاهره در خصوص شناسایی الگوی چندشکلی ژن *FecB* انجام شد، نتایج نشان دهنده عدم وجود جهش در تمامی نمونه‌ها بوده و این نتایج با یافته‌های EL. Saadani و EL. Hanafy (۲۰۰۹) نیز مطابقت دارد. طبق گزارشات Abouheif و همکاران (۲۰۱۱) نیز هیچ گزارشی از چندشکلی ژن *FecB* در نژادهای گوسفند دمبه دار نجدی و نعیمی ارائه نگردیده است.

چندقلوژی یک صفت کمی و آستانه‌ای است و اثرات پلی ژنیک برای این صفت به اثبات رسیده است. با توجه به این که تا کنون برنامه‌های اصلاح نژاد مدونی برای بهبود بازدهی تولید مثلی در گوسفند زندی به انجام نرسیده است، احتمال حضور آلل‌های برتر ژن‌های عمده نیز در این نژاد می‌تواند دور از انتظار باشد. مطابق یافته‌های این تحقیق نمی‌توان از چند شکلی‌های ژن *FecB* به عنوان یک ابزار در اصلاح نژاد گوسفند زندی استفاده نمود. به دلیل بسته بودن محیط پرورشی این نژاد، احتمال ورود این جهش از نژادهای خارجی به این نژاد نیز دور از انتظار است. همچنین پیشنهاد می‌شود، سایر ژن‌های بزرگ اثر مرتبط با چندقلوژی در تحقیقات دیگر بر روی این گوسفندان مورد بررسی قرار گیرند.

توصیه ترویجی

یکی از دلایل برتری و استقبال از نژادهای گوسفندان خارجی در ایران، بازده تولید مثلی و چندقلوژی آنها است در حالی که ممکن است الزاماً بازدهی اقتصادی آنها بیشتر از نژادهای بومی

در این تحقیق برای اطمینان از صحت واکنش هضم آنزیمی، فرایند هضم در جریان بهینه سازی واکنش، با غلظت‌های ۲۴ واحد و ۲۸ واحد آنزیم برشی به صورت شبانه نیز مورد بررسی قرار گرفت. ولی در هر صورت برای اطمینان بیشتر از فرایند هضم، تعیین توالی تعدادی از نمونه‌ها برای تحقیقات بعدی توصیه می‌گردد. شکل ۲ نشان می‌دهد در تمامی نمونه‌ها، در پایان واکنش هضم آنزیمی تنها قطعه اولیه ۱۹۰ جفت بازی باقی مانده که معرف آلل A خواهد بود و بنابراین در هیچ‌یک از نمونه‌های تحقیق، جهش در جایگاه شناسایی آنزیم *Avall* اتفاق نیفتاده است و از این رو می‌توان ژنوتیپ تمام نمونه‌های تحقیق را هموزیگوت از نوع AA دانست.

در نژادهای ایرانی مورد مطالعه، طبق نتایج به دست آمده از پژوهش‌های Asadpour و همکاران (۲۰۱۲) که بر روی تعداد ۶۸ رأس میش از گوسفندان نژاد زل در مازندران انجام شد، تنها یک راس برای ژن *FecB* دارای ژنوتیپ هموزیگوت بود. در تحقیق که Amiri و همکاران (۲۰۰۷) روی تعداد ۱۶۵ رأس از گوسفندان نژاد لری - بختیاری واقع در استان چهارمحال و بختیاری انجام دادند، ژن *FecB* بررسی شد و نتایج نشان دادند که تمام نمونه‌های تعیین ژنوتیپ شده در این مطالعه دارای آلل وحشی (+) و غیر جهش یافته بوده و آلل جهش یافته (B) در جامعه مورد مطالعه مشاهده نگردید، بنابراین، تمامی نمونه‌ها در این جایگاه دارای ژنوتیپ یک شکل (++) می‌باشند و این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد. Jamshidi و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقات خود در خصوص شناسایی چندشکلی‌های احتمالی ژن *FecB* روی تعداد ۱۵۰ رأس از گوسفندان نژاد سنگسری در شهرستان دامغان نشان دادند تمامی نمونه‌ها دارای ژنوتیپ هموزیگوت غیر جهش یافته (++) بوده و تنها وجود آلل وحشی (+) را تأیید نمودند.

همچنین طبق گزارشات Ghaffari و همکاران (۲۰۰۷) و Irajeyan و همکاران (۲۰۰۹)، مطالعه در جایگاه کاملاً مشابه با جایگاه تحقیق حاضر بر روی ژن *FecB* در نژادهای گوسفند شال و سنگسری، هیچ گونه الگوی چندشکلی در نمونه‌های مورد

