

ارزیابی ارتباط بین چند شکلی پنج جایگاه‌های ریزماهواره‌ای واقع بر کروموزم شماره شش با صفت چندقلوزایی در بز نژاد کشمیر

- رحمان حاجی عزیزاده ویلیو
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- آرش جوانمرد
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- نادر اسدزاده (نویسنده مسئول)
استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۲۳۱۶۷۸

Email: naderasadzadeh4@gmail.com

چکیده

برای ارزیابی ارتباط بین چندشکلی پنج جایگاه ریزماهواره واقع بر کروموزم شماره شش با صفت چندقلوزایی بز نژاد کشمیر، تعداد ۶۵ رأس بز ماده به‌طور تصادفی از گله ۶۰۰ رأسی انتخاب و عواملی همچون اطلاعات شجره، اثرات ثابت رکوردبرداری شده همچون سن مادر، تعداد شکم زایش به همراه تعداد فرزند در هر زایش، اطلاعات تغذیه‌ای و اطلاعات آزمایشات فیزیولوژی تولیدمثل مانند سابقه استفاده از هورمون، به‌همراه صفت هدف چندقلوزایی ثبت شد. خون‌گیری از ورید وداجی و استخراج DNA انجام شد. برنامه تکثیر انفرادی جایگاه‌ها در روی ژل اکریلامید الکتروفورز و تجزیه و تحلیل شد. نتایج وجود چند شکلی را تایید کرد و جایگاه BM4621 الگوی مونومورف را نشان داد. رابطه‌ی آماری چند شکلی جایگاه‌های مورد مطالعه با صفت تعداد نتاج در اولین سال زایش معنی‌دار بود ($p < 0.01$). میانگین تعداد بزغاله‌ی متولد شده از بزهای حاوی ژنوتیپ‌های ۱۸۰/۱۸۰ و ۱۸۸/۱۸۰ برای جایگاه BM1329، ژنوتیپ‌های ۱۱۰/۱۱۲ و ۱۱۲/۱۱۲ برای جایگاه OarAE101، ژنوتیپ‌های ۱۰۶/۱۰۸ و ۱۰۸/۱۰۸ برای جایگاه BMP143 و در نهایت ژنوتیپ ۲۰۰/۲۰۰ برای جایگاه BMP143 بالاتر از سایر ژنوتیپ‌های بود ($p < 0.01$). روابط آماری معنی‌دار شناسایی شده در این مطالعه می‌تواند به منظور بهبود راندمان تولیدمثلی بر مبنای انتخاب به کمک نشانگر و همچنین در فرایند غربال‌گری برای شناسایی بزهای ماده چندقلوزا به کار گرفته شود.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 303-316

Association between Microsatellite Markers of Chromosome 6 and Litter size of Cashmere Goats

By: Rahman Hajializadeh Valilou¹, Arash Javanmard and Nader Asadzadeh^{*2},

1: Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.

2: Assistant professor of Animal Science Research Institute of Iran;

Received: October 2016

Accepted: November 2016

Five microsatellite markers BM1329, OarAE101, BM143, BM4621 and BM415 which were closely linked to the fecundity gene FecB in Booroola sheep were chosen based on their high conservatism in the closest species and were analyzed for polymorphisms and also their correlation with the litter size of a goat. Observed results four microsatellite loci polymorphism in the present study. However, BM4621 locus was monomorphic. The range of allele size of BM1329, OarAE101, BM143 and BM415 were 180 to 216 to 112, 102 to 112 and 198 to 200 in goat respectively. The alleles of the greatest frequency for of BM1329, OarAE101, BM143 and BM415 were 212, 99, 108 and 200bp respectively. Polymorphism information content (Nei Index) for BM1329, OarAE101, BM143 and BM415 were 0.82, 0.82, 0.72 and 0.49 respectively. Mean number of allele, Observed Heterozygosity, PIC and Shannon information index were 4.75 ± 2.2 , 0.36 ± 0.12 , 0.71 ± 0.15 and 1.41 ± 0.52 respectively. The litter size for first lambing for investigated loci were significantly different ($p < 0.01$). The total mean of litter size of genotype BM1329 180/180, 180/188, oarAE101 110/112, 112/112, BM 143 106/108, 108/108 and BMP143 200/200bp were significantly higher than of other genotypes. This association could be further evaluated for marker-assisted selection and developed PCR methodology would expedite screening for large number of goats required for such studies.

Key words: Goat, Litter Size, Microsatellite, Chromosome 6

مقدمه

تشخیص دقیق آبستنی، کنترل بزغاله‌زایی، تلقیح مصنوعی، افزایش تعداد دفعات زایش و در نهایت تحریک چندقلوزایی و یا استفاده از بزهایی با نژاد خاص و معروف از نظر چندقلوزایی می‌باشد (Stephan, ۱۹۹۸). اکثر نژادهای اهلی بز بر خلاف گوسفند، در هر بار زایش، دو یا سه بزغاله بدنیا می‌آورند، اما تعداد اندکی از نژادهای بز هم وجود دارند که در هر زایش به تعداد چهار و یا بیشتر بزغاله بدنیا می‌آورند، که این نژادها عبارتند از بزهای اسپانیایی و بز نژاد بوئر (Luginbuhl, ۲۰۰۲).

جمع‌بندی مطالعات پیشین نشان می‌دهد که تلاش‌ها برای افزایش چندقلوزایی از طریق روش‌های فنوتیپی و رکوردگیری و انتخاب

عملکرد تولیدمثلی، یکی از ویژگی‌های بارز اقتصادی در پرورش بز می‌باشد و در برنامه‌های اصلاح نژادی با هدف تولید گوشت، بهبود این صفت به طور غیر مستقیم نقش کلیدی دارد (Chemineaup و همکاران، ۱۹۹۸). طوری که نرخ بزغاله‌زایی بالا در مزارع، برای افزایش سودآوری مزرعه ضروری بوده و این شاخص از طریق تعداد نتاج بدنیا آمده در یک دوره زمانی معین، تعیین می‌شود. در گونه‌ی بز، تنوع در چندقلوزایی، توسط هردو عامل محیط و ژنتیک کنترل می‌شود (Hagger, ۲۰۰۰). برخی از راهکارهای مورد استفاده در بهبود عملکرد تولیدمثلی در بز عبارتند از همزمان‌سازی فحلی، فلاشینگ، سوپراوولاسیون،

ژنتیک اکولوژیکی و ساختار جمعیت ساخته است (Fitz Simmons و همکاران، ۲۰۰۰). اطلاعات کاربردی و یافته‌های حاصل از ریزماهوره‌ها می‌تواند در توصیف ساختار ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها و نیز بین زیرگونه‌ها و گونه‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Bruford و Beaumont، ۱۹۹۹). نقشه ژنتیکی بز، پراکنده‌تر از نقشه ژنتیکی گوسفند بوده و تقریباً با نیمی از نشانگرهای شناخته شده در گوسفند، مشترک می‌باشد، به گونه‌ای که، ۷۳۱ جایگاه نشانگر با ۲۷۱ ژن کد کننده پروتئین و ۴۲۳ ریزماهوره در ژنوم بز شناسایی شده است (Schibler و همکاران، ۲۰۰۲).

آخرین نقشه‌ی پیوستگی چاپ شده برای گونه بز در برگیرنده‌ی ۶۲۲ نشانگر نقشه‌یابی شده با طیف پوششی از کل ژنوم بز بوده است. اگرچه تنوع مختص و متفاوت نقشه‌ی بز، توسعه‌ی یک همولوژی ژنتیکی آن را با گونه‌های حیوانی نزدیک را دشوار می‌سازد، اما حدود دو سوم از نشانگرهای نقشه‌یابی شده‌ی بز نیز می‌تواند با نقشه‌ی گوسفند پیوستگی داشته باشد (Maddox و همکاران، ۲۰۰۱). پیوستگی ریزماهوره‌ها با جایگاه FecB برای اولین بار با دو نشانگر تصادفی (OarHH55 و OarAE101) در گوسفند شناسایی شد و بعدها نیز یکی دیگر (BM1329) به جمع این دو نشانگر اضافه شد.

جایگاه FecB موجود در کروموزوم ۶ گوسفند به ریزماهوره‌ی OarAE101 پیوسته بوده (Montgomery و همکاران، ۱۹۹۴، ۱۹۹۳) و همچنین ریزماهوره‌ی BM1329 نیز در مطالعات بعدی در فاصله‌ی ۷/۲ سانتی‌مورگان از محل ریزماهوره‌ی OarAE101 نقشه‌یابی شد (Lord و همکاران، ۱۹۹۶). محتمل‌ترین کاربرد نشانگر OarAE101 در شناسایی زود هنگام گوسفندان مولد حامل آلل مطلوب B در گوسفندان آمیخته‌ی بورولا آواسی مطرح شده است (Gootwine و همکاران، ۲۰۰۷).

در طی پنج سال اخیر نیز مطالعات مختلفی در این باره بر روی نژادهای بز دنیا و ایران صورت گرفته است، از تحقیقات مشابه در ایران می‌توان به پژوهش نژادگشتی و همکاران (۲۰۰۴)، بررسی

درون نژادی در یک نژاد، پیشرفت و بازدهی کندی داشته است، چراکه وراثت‌پذیری این صفت پایین است. بنابراین، شناسایی نشانگرهای DNA (ویا جهش‌های در سطح ژنوم) با تأثیرات زیاد بر نرخ تخمک‌گذاری و در نتیجه چندقلوزایی، افق جدیدی را در میان اهداف پرورش‌دهندگان بز و پژوهشگران ایجاد می‌کند.

ژن عمده و بزرگ اثر مسئول باروری یا همان ژن FecB¹ یک ژن منفرد اتوزومی است که منجر به افزایش نرخ تخمک‌گذاری و چندقلوزایی در گوسفند بورولا مرینوس می‌شود. این ژن دارای مکانیزم توارث از نوع هم‌بارزی برای نرخ تخمک‌گذاری و الگوی توارثی غالبیت جزئی یا غلبه ناقص برای چندقلوزایی می‌باشد (Montgomery و همکاران، ۱۹۹۳ و Piperet و همکاران، ۱۹۸۵). جایگاه ژنی ژن FecB در گوسفند بر روی کروموزوم ۶ مستقر می‌باشد که در انسان نیز محل ژنی با اثر مشابه نیز بر روی کروموزوم ۴ است (Montgomery و همکاران، ۱۹۹۳a). Piper و همکاران (۱۹۸۵) و همچنین Bindon و Piper (۱۹۸۶)، در مطالعات خود دریافتند که جهش در ژن FecB موجب افزایش نرخ تخمک‌گذاری شده و وجود هر نسخه از ژن جهش یافته نرخ تخمک‌گذاری را به میزان ۱/۶ درصد افزایش داده و منجر به تولید تقریباً حدود یک تا دو بره اضافی در هر زایش گوسفندان بورولا مرینوس می‌شود. Davis و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که وجود یک نسخه از ژن FecB در گوسفند بورولا مرینوس، نرخ تخمک‌گذاری را تا ۱/۵ برابر و وجود دو نسخه از این ژن نیز تا ۳ برابر افزایش می‌دهد. افزایش نرخ این تخمک‌گذاری‌ها نیز به نوبه‌ی خود به ترتیب موجب افزایش چندقلوزایی ۱ تا ۱/۵ درصد در این گوسفندان می‌شود.

نشانگرهای مولکولی ریزماهوره، نشانگرهایی با الگوی توارثی هم‌بارز بوده و از هر دو والد به ارث رسیده و دارای توزیع گسترده‌ای در تمام ژنوم اکثر موجودات یوکاریوتی هستند. از خصوصیات دیگر ریزماهوره‌ها می‌توان به نرخ جهش بالا، تنوع آلیلی، هتروزیگوتی بالا، وجود تنوع زیاد حتی در میان افراد یک جمعیت مشابه اشاره کرد. این ویژگی‌ها آنها را تبدیل به یکی از نشانگرهای ژنتیکی مفید و ایده‌آل برای مطالعات جریان ژن در

¹ Fecundity Booroola

جایگاه‌ها تأثیر مثبتی بر روی صفت چندقلوزایی در بزهای شیری سانن زینانگ چینی دارند (Zhu و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین Wang و همکاران در سال ۲۰۱۳ چندشکلی‌های موجود در جایگاه‌های ریزماهوره‌ای OarAE101، BM1329، BM143 و LSCV043 را در بزهای نژاد بوئر تجزیه و تحلیل و ارتباط چندشکلی‌های حاصل را با صفت چندقلوزایی در این نژاد مورد مطالعه قرار داده و دریافتند که چندشکلی‌های موجود در هر یک از این ۴ جایگاه مورد مطالعه به‌طور قابل توجهی میزان چندقلوزایی را تحت تأثیر قرار داده و ژنوتیپ‌های E5E10، H6H11 و G1G5، F2F6، G1G5 و F5F7، E3E8، G1G5 و H3H9 نیز پایین‌ترین میزان چندقلوزایی را بروز می‌دهند. در سال ۲۰۱۴ نیز Hou و همکاران با بررسی چندشکلی‌های موجود در چهار جایگاه ریزماهوره‌ای (OarAE101، BM1329، BM143 و LSCV043)، ارتباط این جایگاه‌ها را با صفت چندقلوزایی در بزهای شیری سانن زینانگ چینی را تأیید کرد. صفت چند قلوزایی در بز نژاد کشمیر، از جمله صفات آستانه‌ای و اقتصادی در اصلاح نژاد آن می‌باشد که درک ارتباط بین واریانس فنوتیپی این صفت با اطلاعات ژنوم و نشانگرهای مولکولی، احتمالاً می‌تواند بهبود ژنتیکی این صفت را امکان‌پذیر نماید. بنابراین در راستای اهداف تبیین شده فوق، مطالعه حاضر برای بررسی تنوع ژنتیکی در پنج نشانگر ریزماهوره و ارتباط آنها با صفت چندقلوزایی در بز نژاد کشمیر طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های انتخاب شده و شرایط نمونه‌گیری:

در مطالعه حاضر، بزهای کشمیر در یک سیستم بهداشتی متعارف، شامل، برنامه‌ی انگل‌زدایی منظم و استفاده از حمام ضد کنه، پرورش داده شدند و همچنین از طریق جفت‌گیری طبیعی کنترل شده و پس از تشخیص فحلی، بزهای ماده با بزهای نر به‌طور معمول جفت‌گیری می‌کردند. بعد از زایمان تعداد بزغاله و جنس بزغاله‌های متولد شده ثبت شدند. تعداد ۶۵ رأس بز ماده به‌طور تصادفی از گله ۶۰۰ رأسی انتخاب و عواملی همچون اطلاعات

تنوع ژنتیکی بزها با استفاده از نشانگر میکروساتلایت اشاره نمود که ایشان ارزیابی پلی مورفیسم در شش نژاد بز بومی، مرخز، لری، نجدی، تالی، رائینی و کردی را گزارش نمود. بنابراین و همکاران (۲۰۰۶) از نشانگر همباز میکروساتلایت برای بررسی ساختار ژنتیکی داخل و بین جمعیتی پنج نژاد گوسفند بومی ایران استفاده نمودند. قنبری و همکاران (۲۰۰۴) با روش اینروگراسیون به وارد کردن ژن برولا به گله گوسفندان افشاری دانشگاه زنجان پرداختند و در فنوتیپ میش‌ها و در ژنوم آنها پیامدهای این روش را مورد بحث و بررسی قرار دادند.

Wang و همکاران در سال ۲۰۱۰ چندشکلی هشت جایگاه ریزماهوره‌ای OarAE101، BM1329، OarHH55، BM143، LSCV043، TGLA68، GC101 و OarHH35 و ارتباط آنها را با صفت چندقلوزایی در بزهای سفید فونی‌یو چینی^۲ بررسی کرده و به این نتیجه رسیدند که آلل ۱۱۰ در ژنوتیپ ۱۱۰/۱۱۰ جفت‌بازی در جایگاه OarAE101، ژنوتیپ ۱۴۷/۱۶۰ در جایگاه BM1329، آلل ۱۰۸ و ژنوتیپ ۱۰۸/۱۱۸ در جایگاه BM143، آلل ۱۶۰ و ژنوتیپ ۱۲۳/۱۶۰ در جایگاه OarHH35، آلل ۱۱۵ و ژنوتیپ ۱۱۵/۱۱۵ در جایگاه TGLA68، ژنوتیپ‌های ۱۲۳/۱۲۳ و ۱۴۵/۱۵۰ در جایگاه OarHH55، ژنوتیپ ۹۵/۱۶۰ در جایگاه LSCV043 تأثیر مثبتی بر روی صفت چندقلوزایی دارند و از سویی دیگر آلل ۱۵۵ در جایگاه BM1329 و ژنوتیپ ۱۰۰/۱۲۳ در جایگاه BM143 نیز تأثیر منفی بر روی صفت چندقلوزایی در دومین شکم زایش داشته و ژنوتیپ‌های ۱۱۹/۱۳۵ در جایگاه OarHH55 و ژنوتیپ ۱۱۵/۱۶۰ در جایگاه LSCV043 نیز تأثیر منفی بر روی صفت چندقلوزایی در هر شکم زایش بزهای سفید فونی‌یو چینی دارند. در تحقیق مشابه دیگر در چین هفت جایگاه ریزماهوره‌ای OarAE101، BM1329، OarHH55، BM143، BMS2508 و OarAE129 و OarFCB11 در بزهای شیری سانن زینانگ^۳ بررسی و ارتباط آنها با صفت چند قلوزایی در این بزها مورد مطالعه قرار گرفت. از نتایج کلیدی به دست آمده آنها این بود که چندشکلی‌های موجود در این

² Funiu White Goat

³ Xinong Saanen

تجزیه و تحلیل آماری:

داده‌های مربوط به بررسی چندشکلی‌ها توسط نرم افزار pop gene (نسخه ۱/۳۱) آنالیز شدند (Yeh و همکاران، ۱۹۹۹).

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Genotype}_j + e_{ijk}$$

در این مدل، Y_{ijk} ارزش اصلاحی صفت مورد بررسی، μ : میانگین حداقل مربعات صفت، j (Genotype) ژنوتیپ جایگاه‌ها و نیز اثر ژنوتیپ بدست آمده برای جایگاه‌ها مورد مطالعه e_{ijk} اثر باقیمانده می‌باشد.

نتایج

نتایج بدست آمده نشان داد که، در مجموع ۱۹ آلل در کل جایگاه‌های مورد مطالعه در ۶۵ رأس دام شناسایی شد. اندازه‌ی باندی آلل‌های BM1329، OarAE101، BM143 و BM415 در بز به ترتیب در محدوده‌ای از ۱۸۰-۲۱۶، ۹۹-۲۱۲، ۱۰۲-۱۱۲ و ۱۹۸-۲۰۰ جفت‌باز بود. آلل‌های غالب در هر جایگاه دارای بیشترین فراوانی برای جایگاه‌های BM1329، OarAE101، BM143 و BM415 نیز به ترتیب در اندازه‌ی های ۲۱۲، ۹۹، ۱۰۸ و ۲۰۰ جفت‌باز بودند. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC^۴) برای جایگاه‌های BM1329، OarAE101، BM143 و BM415 نیز به ترتیب ۰/۸۲، ۰/۸۲، ۰/۷۲ و ۰/۴۹ بودند. متوسط تعداد آلل‌ها، هتروزیس مشاهده شده، شاخص PIC و شاخص اطلاعاتی شان نیز به ترتیب دارای مقادیر $2/21 \pm$ ، $4/75$ ، $0/12 \pm$ ، $0/36$ ، $0/15 \pm$ و $0/71$ و $0/52 \pm$ ، $1/41$ بودند. ارتباط جایگاه‌های مورد مطالعه با صفت چندقلوزایی در اولین سال زایش، به‌طور قابل توجهی معنی‌دار بود ($p < 0/01$). میانگین تعداد بزغاله‌ی متولد شده از بزهایی که حاوی ژنوتیپ‌هایی BM1329 (ژنوتیپ: ۱۸۰/۱۸۰ و ۱۸۸/۱۸۰ جفت‌باز)، OarAE101 (۱۱۲/۱۱۲ و ۱۱۲/۱۱۲)، BMP143 (۱۰۸/۱۰۸ و ۱۰۸/۱۰۶) و BMP143 (۲۰۰/۲۰۰) بودند، به‌طور قابل توجهی بالاتر از سایر ژنوتیپ‌های شناسایی شده برای این جایگاه‌ها بود ($p < 0/01$).

⁴ Polymorphic information content

شجره، اثرات ثابت رکوردبرداری شده همچون سن مادر، تعداد شکم زایش به همراه تعداد فرزند در هر زایش، اطلاعات تغذیه‌ای و اطلاعات آزمایشات فیزیولوژی تولیدمثل مانند سابقه استفاده از هورمون، به‌همراه صفت هدف چندقلوزایی ثبت شد.

استخراج DNA از خون کامل:

نمونه‌های خون با استفاده از ونوجکت‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد K₂EDTA از ورید و داج جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری شرکت Quigen، انجام شد.

انجام تکنیک واکنش زنجیره پلی‌مراز:

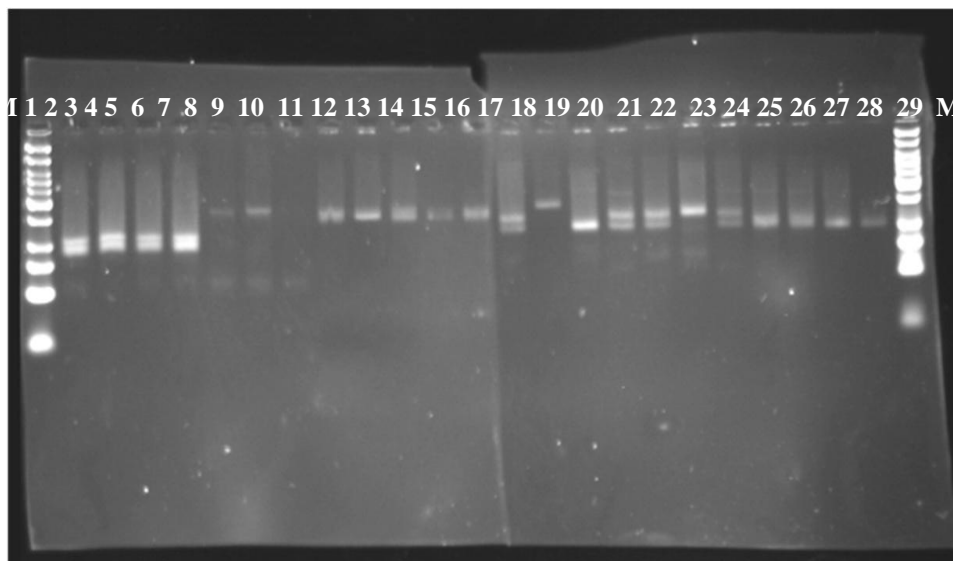
چندشکلی در پهنج نشانگر ریزماهوره BM1329، OarAE101، BM143، BM4621 و BM415 با استفاده از واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. که حاوی ۱/۵ میلی‌مول MgCl₂، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۰/۳ میکرومول از هر دو آغازگر آغازین و انتهایی، بافر 1X PCR، واحد آنزیم DNA Taq polymerase (محصول شرکت Promega) و ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط دستگاه ترموسایکلر (مدل DNA Engine Thermal Cycler ساخت شرکت BIO RAD آمریکا) و اجرای برنامه‌ی Touchdown PCR انجام شد و شرایط و مدت زمان و دماهای واکنش Touchdown PCR نیز عبارتند بودند از: واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴ دقیقه، اجرای ۱۰ چرخه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اعمال دمای ۶۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در ازای تکرار هر چرخه ۱ درجه سانتی‌گراد از این دما کاسته می‌شد، اعمال دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و پس از آن نیز اجرای ۲۵ سیکل از دماهای ۹۴، ۵۶ و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و به ترتیب به مدت ۶۰، ۱۲۰ و ۶۰ ثانیه برای هر کدام و در نهایت اجرای یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. توالی‌های پرایمری برای هر پنج جایگاه نیز در جدول ۱ آورده شده است.



شکل ۱- خصوصیات فنوتیپی نژاد بز کشمیر

جدول ۱: توالی آغازگرها و خصوصیات آنها

توالی تکرار شده	طول توالی تکثیر شده ی مورد انتظار (جفت باز)	توالی پرایمرها	جایگاه	فاصله جایگاه (سانتی مورگان)
۱۲(CA)	۱۶۱-۱۳۷ ۱۷۰-۱۵۶	F: 5'-TTGTTTAGGCAAGTCCAAAGTC-3' R: 5'-AACACCGCAGCTTCATCC-3'	BM1329	۰
۲۲(TG)	۱۲۳-۹۹	F: 5'-TAAGAAATATATTTGAAAAAACTGTATCTCCC-3' R: 5'-TTCTTATAGATGCACTCAAGCTAGG-3'	OarAE101	۱۱
۲۰(CA)	۱۱۶-۹۰ ۱۲۸-۱۰۲	F: 5'-ACCTGGGAAGCCTCCATATC-3' R: 5'-CTGCAGGCAGATTCTTTATCG-3'	BM143	۳۰
۱۴(CA)	۱۵۷-۱۳۷	F: 5'-CAAATTGACTTATCCTTGGCTG-3' R: 5'-TGTAACATCTGGGCTGCATC-3'	BM4621	۴۸
۱۸(TG)	۱۵۷-۱۳۷	F: 5'-CAAATTGACTTATCCTTGGCTG-3' R: 5'-TGTAACATCTGGGCTGCATC-3'	BM415	۶۹



شکل ۲: الگوی بانندی، تنوع اللی و سایز ژنوتیپ‌های مشاهده شده در جایگاه OarAE101

جدول ۲: آمار توصیفی ژنوتیپ‌های مشاهده شده برای جایگاه OarAE101 و ارتباط آن‌ها با صفت چند قلو زایی

ژنوتیپ‌های جایگاه BM1329	میانگین	خطای استاندارد (SE)	سطح احتمال (P)
۱۸۰/۱۸۰	۳	۰/۵۲	۰/۰۰۱
۱۸۰/۱۸۴	۲	۰/۳۷	۰/۰۰۱
۱۸۰/۱۸۸	۳	۰/۵۲	۰/۰۰۱
۱۸۰/۲۱۲	۲	۰/۵۲	۰/۰۰۱
۱۸۴/۱۸۴	۲/۲	۰/۲۳	۰/۰۰۱
۱۸۴/۲۱۲	۲	۰/۵۲	۰/۰۰۱
۱۸۴/۲۱۶	۱	۰/۲۶	۰/۰۰۱
۱۸۸/۱۸۸	۲/۵	۰/۲۶	۰/۰۰۱
۱۸۸/۱۹۴	۲	۰/۳۰	۰/۰۰۱
۱۸۸/۲۱۲	۲/۳	۰/۳۰	۰/۰۰۱
۱۸۸/۲۱۶	۱	۰/۳۷	۰/۰۰۱
۱۹۴/۱۹۴	۲	۰/۲۳	۰/۰۰۱
۱۹۴/۲۱۶	۱/۳۳	۰/۳۰	۰/۰۰۱
۲۱۲/۲۱۲	۲/۲۸	۰/۱۹	۰/۰۰۱
۲۱۶/۲۱۶	۱	۰/۲۶	۰/۰۰۱

جدول ۳: آمار توصیفی ژنوتیپ‌های مشاهده شده برای جایگاه BM1329 و ارتباط آن‌ها با صفت چند قلوزایی

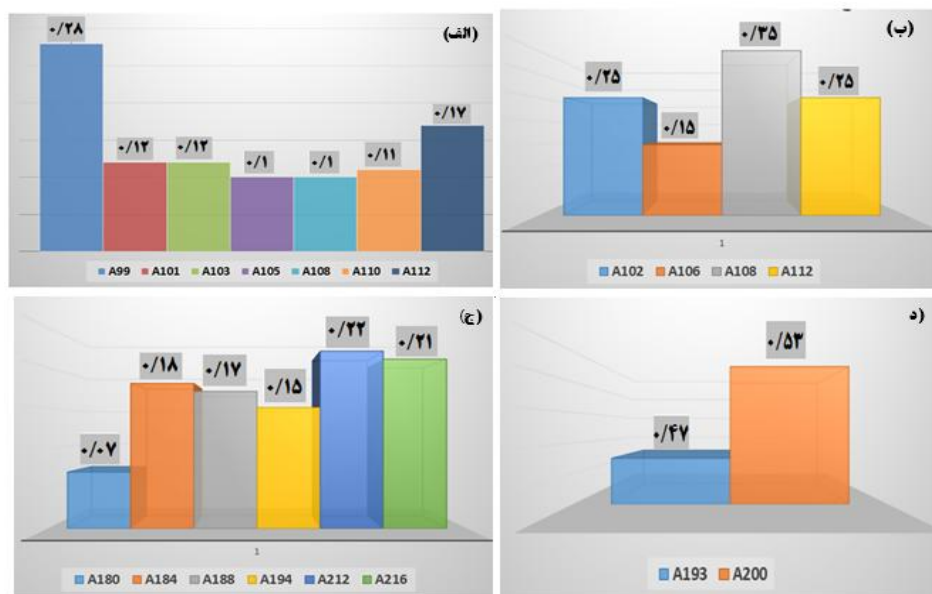
ژنوتیپ‌های جایگاه OarAE101	میانگین	خطای استاندارد (SE)	سطح احتمال (P)
۹۹/۹۹	۱/۳	۰/۱۸	۰/۰۰۱
۹۹/۱۰۱	۱/۵	۰/۲۴	۰/۰۰۱
۱۰۱/۱۰۱	۱/۵	۰/۴۲	۰/۰۰۱
۱۰۳/۱۰۳	۱/۸	۰/۲۶	۰/۰۰۱
۱۰۵/۱۰۵	۲/۴	۰/۲۶	۰/۰۰۱
۱۰۸/۱۰۸	۲	۰/۲۶	۰/۰۰۱
۱۰۸/۱۱۲	۲	۰/۶۰	۰/۰۰۱
۱۱۰/۱۱۰	۲/۵	۰/۴۲	۰/۰۰۱
۱۱۰/۱۱۲	۲/۶	۰/۳۴	۰/۰۰۱
۱۱۲/۱۱۲	۲/۴	۰/۲۲	۰/۰۰۱

جدول ۴: آمار توصیفی ژنوتیپ‌های مشاهده شده برای جایگاه BM143 و ارتباط آن‌ها با صفت چند قلوزایی

ژنوتیپ‌های جایگاه OarAE101	میانگین	خطای استاندارد (SE)	سطح احتمال (P)
۱۹۸/۱۹۸	۱/۵۷	۰/۱۶	۰/۰۰۱
۱۹۸/۲۰۰	۱/۸	۰/۱۰	۰/۰۰۱
۲۰۰/۲۰۰	۲/۴۱	۰/۱۵	۰/۰۰۱

جدول ۵: آمار توصیفی ژنوتیپ‌های مشاهده شده برای جایگاه BM145 و ارتباط آن‌ها با صفت چند قلوزایی

ژنوتیپ‌های جایگاه OarAE101	میانگین	خطای استاندارد (SE)	سطح احتمال (P)
۱۰۲/۱۰۲	۲/۲	۰/۳۳	۰/۰۰۱
۱۰۲/۱۰۶	۱/۰	۰/۷۴	۰/۱۸
۱۰۲/۱۰۸	۱/۶	۰/۴۲	۰/۰۰۱
۱۰۲/۱۱۲	۱/۷۵	۰/۳۷	۰/۰۰۱
۱۰۶/۱۰۶	۱/۷۵	۰/۳۷	۰/۰۰۱
۱۰۶/۱۰۸	۲/۱۱	۰/۲۴	۰/۰۰۱
۱۰۶/۱۱۲	۱/۰	۰/۷۴	۰/۱۸
۱۰۸/۱۰۸	۲/۰۹	۰/۲۲	۰/۰۰۱
۱۱۲/۱۱۲	۱/۷۵	۰/۲۶	۰/۰۰۱



شکل ۸: توزیع تعداد آلل به ازای ریزماهوره‌های مورد استفاده در این مطالعه (a). دامنه‌ی اندازه‌ی آلل‌های شناسایی شده و فراوانی آنها برای جایگاه ریزماهوره‌ای OarAE101 در مطالعه حاضر (b). دامنه‌ی اندازه‌ی آلل‌های شناسایی شده و فراوانی آنها برای جایگاه ریزماهوره‌ای BM143 در مطالعه حاضر (c). دامنه‌ی اندازه‌ی آلل‌های شناسایی شده و فراوانی آنها برای جایگاه ریزماهوره‌ای BM415 در مطالعه حاضر (d)

بحث

شکلی‌های مشاهده شده در جایگاه‌های مورد مطالعه و صفت تعداد بزغاله‌ی متولد شده در اولین شکم زایش دارای روابط معنی داری هستند ($p < 0.01$). میانگین کل تعداد بزغاله‌ی متولد شده از ژنوتیپ‌های جایگاه‌های BM1329 (ژنوتیپ: ۱۸۰/۱۸۰ و ۱۱۲/۱۱۲)، OarAE101 (۱۸۸/۱۸۸ جفت‌باز)، BM143 (۱۰۸/۱۰۸ و ۱۰۸/۱۰۶) و BMP143 (۲۰۰/۲۰۰)، به‌طور قابل توجهی بالاتر از سایر ژنوتیپ‌های شناسایی شده برای این جایگاه‌ها بود ($p < 0.01$).

در راستای مقایسه مشاهدات این مطالعه با تحقیقات مشابه Xu و همکاران در سال ۲۰۰۷ ارتباط معنی‌داری بین دوازده آلل جایگاه‌های مختلف ریزماهوره‌ای و صفت چندقلوزایی در بز یافتند و در این مطالعه محققان دریافتند که آلل‌هایی با طول ۱۲۰ و ۱۰۸ جفت‌باز در جایگاه BM143 و آللی به طول ۱۸۳ جفت‌باز در جایگاه ETH225 ارتباطی مثبت با تعداد برابری از بزغاله‌های متولد شده در اولین زایش بزهای ماده را دارا هستند. همچنین ۸

شاخص بازده عملکرد تولیدمثلی در یک مزرعه پرورش بز از روی تعداد نتاج متولد شده به‌ازای هر ماده داشته تعیین می‌شود. طبق مطالعات پیشین، میانگین تعداد بزغاله‌ی زنده متولد شده در یک زایش حدود ۱/۸۳ بزغاله بود. ضریب وراثت‌پذیری صفت چند قلوزایی در پستانداران به‌طور میانگین پایین بوده (۱۰ تا ۱۵ درصد) و بنابراین استفاده از روش‌های انتخاب بر اساس فنوتیپ مثل انتخاب بزهای ماده، بر اساس رکورد تعداد بره‌ی متولد شده در هر شکم زایش آن‌ها در گذشته، نیز چندان مفید واقع نمی‌شود. بنابراین همواره نیاز به رویکردی جدید در راستای انتخاب برای بهبود تولیدمثل در سطح سلولی و یا DNA همواره احساس شده است. کاربرد نشانگرهای ژنتیک مولکولی در انتخاب بر اساس نشانگرها (MAS) بصورت بالقوه می‌تواند در ترکیب با روش‌های انتخاب سنتی به کار گرفته شوند تا نرخ پیشرفت ژنتیکی و پاسخ به انتخاب در صفات مهم اقتصادی، تسریع شود. نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر، نشان داد که ارتباط بین چند

این گوسفندان دارای تفاوت معنی داری بوده و آلل ۱۴۶ دارای همبستگی مثبت و آلل ۱۴۸ نیز دارای همبستگی منفی معنی داری با صفت چندقلوزایی در این گوسفندان بوده اند ($p < 0.05$).

Hua و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که وجود جهش غیر چند شکل Q249R در ژن BMPR/IB (ژن FecB) و جایگاه های FecX(I)، FecX(H)، FecX(G) و FecX(B) در ژن BMP15 با استفاده از تکنیک Forced PCR/RFLP در جمعیت بزهای بوئر، های من^{۱۰}، نسل دوم از آمیخته های بز بوئر و بز هوآنقوآی^{۱۱}، نوبی، هوآنقوآی و بزهای ماتو^{۱۲} آنالیز شده و قادر به شناسایی هیچ جهشی در ژن مورد مطالعه در این بزها و آمیخته های آنها نشدند. نتایج این محققان نشان داد که ژن FecB در بز همانند گوسفند دارای پیوستگی با جایگاه های BMPR/IB و BMP15 نیست. بنابراین، جستجو برای شناسایی ژن ها و یا جایگاه های دیگر به منظور توسعه روش انتخاب به کمک نشانگر و مطالعه مکانیسم مرتبط و قوی در بز نیز لازم به نظر می رسد.

Zuzanna و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی چندشکلی ریزماهواره ای در جایگاه های OarAE101 و BM1329 در گوسفندان نژاد خالص بورولا مرینوس، کاریدال، اولکوسکا^{۱۳} و آمیخته هایی از گوسفندان بورولا، موفق به شناسایی ۶ آلل به طول هایی از ۹۷ تا ۱۱۹ جفت باز در جایگاه OarAE101 و ۵ آلل نیز به طول هایی از ۱۶۲ تا ۱۷۴ جفت باز شدند. در این مطالعه به نظر می رسد که آلل ۹۷ جفت بازی در نشانگر ریزماهواره ای OarAE101 و آلل ۱۶۲ جفت بازی نیز در نشانگر ریزماهواره ای BM1329، به عنوان نشانگرهایی برای حضور ژن FecB باشند.

Ouyang و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که در جایگاه OarHH35، میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ های هموزیگوتی به طول ۱۳۵/۱۳۵ جفت باز برای صفت چندقلوزایی (میانگین تعداد بزغاله های متولد شده در هر زایش = ۳/۶۷) بیشتر از سایر ژنوتیپ ها بوده است. همچنین میانگین حداقل مربعات

آلل دیگر همچون آلل ۲۱۶ جفت بازی در جایگاه BM1329، آلل ۱۱۰ جفت بازی در جایگاه BM143، آلل های ۲۵۵ و ۲۳۹ جفت بازی جایگاه BM1225، آلل های ۱۷۵، ۱۷۷ و ۱۸۹ جفت بازی در جایگاه INRA063 و آلل ۱۶۳ جفت بازی در جایگاه ETH225 نیز دارای رابطه ی منفی با تعداد برابری از بزغاله های متولد شده در اولین زایش بزهای ماده بودند. در این تحقیق آلل ۱۱۵ جفت بازی در جایگاه TGLA68 نیز دارای ارتباطی مثبت با تعداد برابری از بزغاله های متولد شده در دومین زایش بزهای ماده بود. این نتایج کم و بیش با نتایج مطالعه ما همخوانی داشت است.

Chu و همکاران در سال ۲۰۰۷ با مطالعه ی دو نشانگر ریزماهواره ای OarAE101 و BM1329 که ثابت شده که این نشانگرها در گوسفندان بورولا پیوستگی خیلی نزدیکی به ژن FecB دارند، این محققان همچنین چندشکلی موجود در این جایگاه ها را نیز در گوسفندان هان دم کوتاه^۵، هو^۶، شاروللایس^۷، اوجومقین^۸ و دورست^۹ و ارتباط آنها با صفت چندقلوزایی بررسی کردند و متوجه شدند میانگین حداقل مربعات صفت چندقلوزایی در ژنوتیپ های (۱۱۳/۱۰۷ جفت باز) شناسایی شده برای جایگاه OarAE101 به طور قابل توجهی بالاتر از میانگین این صفت در سایر ژنوتیپ های (۱۰۹/۱۰۹ و ۱۱۱/۱۰۷ جفت باز) شناسایی شده برای همین جایگاه (OarAE101) در گوسفندان هان دم کوتاه است ($p < 0.05$). در این مطالعه همچنین Chu و همکاران (۲۰۰۷) دریافتند که آللی به طول ۱۰۷ جفت باز در جایگاه OarAE101 دارای همبستگی مثبتی با تعداد بره ی متولد شده در هر شکم زایش گوسفندان هان دم کوتاه بوده و همچنین دو آلل دیگر به طول ۱۰۹ و ۱۱۱ جفت باز در همین جایگاه دارای همبستگی منفی با همین صفت در این گوسفندان بوده است، طبق مطالعات این محققان علاوه بر جایگاه OarAE101 میانگین حداقل مربعات صفت مورد بررسی و ارتباط آن با ژنوتیپ هتروزیگوت دارای دو آلل به طول ۱۵۸/۱۴۶ جفت بازی در جایگاه BM1329 نیز در

⁵ Small Tail Han

⁶ Hu

⁷ Charollais

⁸ Ujumqin

⁹ Dorset

¹⁰ Haimen

¹¹ Huanghuai

¹² Matou

¹³ Olkuska

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کلیه افرادی که امکان رکوردبرداری و اخذ نمونه خون بز و اجرای این تحقیق را میسر نمودند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

ژنوتیپ‌های با طول ۱۳۵/۱۲۳ (هتروزایگوت) و ۱۲۵/۱۲۵ (هموزایگوت) جفت باز نیز تقریباً به ۳ بزغاله متولد شده در هر زایش رسیده بود و نشان می‌دهد که آلل‌های به طول ۱۳۵ و ۱۲۵ جفت‌باز تأثیر مثبت و قابل توجهی را بر روی چند قلوژی در بزهای زیانگ‌دانگ سیاه^{۱۴}، اعمال می‌کنند. در این مطالعه همچنین ژنوتیپ‌های ۱۴۵/۱۳۲ و ۱۳۲/۹۲ جفت‌بازی در جایگاه BMS2508 به ترتیب دارای میانگین حداقل مربعات ۴ و ۳/۲۵ برای صفت چندقلوژی بودند و این در حالی است که ژنوتیپ ۱۲۲/۱۲۲ در همین جایگاه نیز دارای میانگین فقط یک بزغاله در هر زایش بوده و همچنین آلل‌هایی به طول ۱۴۵ و ۹۳ جفت‌باز دارای اثر مثبت قابل توجهی را بر این صفت اعمال کرده و آلل ۱۲۲ نیز تأثیر منفی و قابل توجهی را بر روی صفت تعداد بزغاله‌ی متولد شده در هر زایش بزهای زیانگ‌دانگ سیاه، اعمال می‌کنند. روابط شناسایی شده در این مطالعه، می‌تواند در برنامه‌های انتخاب براساس نشانگر و با استفاده از روش‌های پیشرفته‌ای مانند اسنپ چیپ و توالی‌یابی کل ژنوم بیشتر مورد ارزیابی قرار گرفته و همچنین می‌تواند در سطح وسیعی از فرایند غربالگری اولیه برای شناسایی بزهای نر حاوی ژنوتیپ مطلوب با باروری بالا استفاده شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهوره‌ای مورد مطالعه بر روی کروموزوم ۶ از ژنوم بز ممکن است نقش مهمی در بروز تنوع در صفت چند قلوژی در جمعیت بزها داشته باشد. احتمال دارد انتخاب براساس نشانگر، به ایجاد پیشرفت ژنتیکی قابل توجهی در نتیجه‌ی انتخاب برای چنین صفاتی با وراثت‌پذیری پایین کمک کند. استفاده از روش انتخاب براساس نشانگر برای انتخاب و حذف دام‌ها در سنین پایین در هر دو جنس نر و ماده با ارزش بوده و صرفه‌ی اقتصادی دارد.

¹⁴ Xiangdong black

منابع

- Banabazi, M. H., Mirai Ashtiani, S. R., Moradi Shahrabak, M. & Esmailkhanian, S. (2006). Study of genetic diversity within and between five Iranian sheep populations using microsatellite markers. *Journal of Science and Technology Agriculture and Natural Resources*, 10(4), 481-488. (In Farsi).
- Beaumont, M. A., and Bruford, M. W. (1999). Microsatellites in conservation genetics. In D. B. Goldstein and C. Schlotterer (Eds.), *Microsatellites: Evolution and applications* (pp. 165/180). Oxford: Oxford University Press.
- Bindon, B.M. and Piper, L.R. (1986). The reproductive biology of prolific sheep breeds. *Oxford Rev. Reprod. Biol.*, 18: 414
- Chemineaup., G. Barila, B. Leboeufb, M.C. Maurela and Y. Cogniea.(1998).Recent advances in the control of Goat reproduction. *ressources.ciheam.org*
- Chu, M. X., Jiao, C. L., He, Y. Q., Wang, J. Y., Liu Z. H. and Chen, G. H. (2007). Association between PCR/SSCP of bone morphogenetic protein 15 gene and prolificacy in Jining Grey goats. *Anim Biotechnol.*18(4): 263/74.
- Davis, G. H., Balakrishnan, L., Ross, I. K., Wilson, T., Galloway, S. M., Lumsden, B. M., Hanrahan, J. P., Mullen, M., Mao, X. Z., Wang, G. L., Zhao, Z. S., Zeng, Y. Q., Robinson, J. J., Mavrogenis, A. P., Papachristoforou, C., Peter, C., Baumung, R., Cardyn, P., Boujenane, I., Cockett, N. E., Eythorsdottir, E., Arranz, J. J. and Notter, D. R. (2006). Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecX(I)) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Anim Reprod Sci.*92(1/2): 87/96.
- Fitz Simmons, N. N., Tanksley, S., Forstner, R.J., Louis, E.E., Daghli, R., Gratten, J. and Davis, S. (2000). Microsatellite markers for *Crocodylus*: New genetic tools for population genetics, mating system studies and forensics. In G. C. Grigg, F. Seebacher, and C. E. Franklin (Eds.). *Crocodylian biology and evolution* (pp. 51/57). Chipping Norton: Surrey Beatty and Sons.
- Gootwine, E., Reicher, S. and Rozov, A. (2007). Prolificacy and lamb survival at birth in Awassi and Assaf sheep carrying the FecB (Booroola) mutation. *Anim Reprod Sci.*
- Hagger, By C. (2000).Genetic and environmental influences on size of first litter in sheep, estimated by the REML method. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, Volume 117, Number 1, Febuary 2000, pp. 57/64(8)
- Hou, J.X., Wang, J.G., An, X.P., Zhu, G.Q. and Cao, B.Y. (2014). Polymerisation effects of four microsatellites on litter size in Xinong Saanen goats. *Animal Production Science.* 55: 1051-1055
- Hua, G. H., Chen, S. L., Ai, J. T. and Yang, L. G. (2007). None of polymorphism of ovine fecundity major genes FecB and FecX was tested in goat. *Anim Reprod Sci.*
- Jean/Marie Luginbuhl. (2002). Breeds and Production traits of meat goats. North Carolina State University, College of Agriculture and Life Sciences. www.cals.ncsu.edu/an_sci/extensio

- Lord, E.A., Lumsden, J.M., Dodds, K.G., Henry, H.M., Crawford, A.M., Ansari, H.A., PEARCE, P.D., Maher, D.W., Stone, R.T., Kappes, S.M., Beattie, C.W. and Montgomery, G.W. (1996). The linkage map of sheep chromosome 6 compared with orthologous regions in other species. *Mammalian Genome* 7, 373-376
- Maddox, J.F., Davies, K.P., Crawford, A.M., Hulme, D.J., Vaiman, D., Cribiu, E.P., Freking, B.A., Beh, K.J., Cockett, N.E., Kang, N., Riffkin, C.D., Drinkwater, R., Moore, S.S., Dodds, K.G., Lumsden, J.M., van Stijn, T.C., Phua, S.H., Adelson, D.L., Burkin, H.R., Broom, J.E., Buitkamp, J., Cambridge, L., Cushwa, W.T., Gerard, E., Galloway, S.M., Harrison, B., Hawken, R.J., Hiendleder, S., Henry, H.M., Medrano, J.F., Paterson, K.A., Schibler, L., Stone, R.T. and van Hest, B. (2001). An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res.* 11 pp. 1275-1289.
- Montgomery, G.W., Crawford, A.M., Penty, J.M., Dodds, K.G., Henry, H.M., Pierson, A.J., Lord, E.A., Galloway, C.A., Schmack, A.E., Sise, J.A., Swarbrick, P.A., Hanrahan, V., Buchanan, F.C. and Hill, D.F. (1993). The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nat. Genet.*, 4: 410-414.
- Montgomery, G.W., Lord, E.A., Penty, J.M., Dodds, K.G., Broad, T.E., Cambridge, L., Sunden, S.L., Stone, R.T. and Crawford, A.M. (1994). The Booroola fecundity (FecB) gene maps to sheep chromosome 6. *Genomics*. Jul 1;22(1):148-153.
- Nejadgashti, M. (2004). Molecular study of some microsatellite markers in six Iranian native goat populations (Markhaz, Lori, Najdi, Tali, Raeini and Kordi). M.Sc. Thesis. Faculty of Agriculture. Islamic Azad University-Karaj Branch. (In Farsi). 19. Ott, J. (1988-2001). Program Het version 1.8.
- Ouyang Xu/Xiang, Si Qi/Shun, Huang Sheng/Qiang, Deng Zao/Fu, Liu He /Xiang, He De/Shi, Tan Sheng/Guo and Hu Shu/Guang. (2006). Analysis of microsatellite DNA markers of OarHH35 and BMS2508 in four goat breeds. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* (2006), 3: 217/222 Cambridge University Press.
- PIPER, L. R., Bindon, B. M. and Davis, G. H. (1985). The single gene inheritance of the high litter size of the Booroola Merino. In: Land, R.B., Robinson, D.W. (Eds.), *Genetics of Reproduction in Sheep. Butterworths, London*, p. 115-125.
- Qanbari, S., R. Osfoori, M. P. Eskandari Nasab. (2007) Introgression of major genes into elite breeding flock of afshari sheep: a preliminary evaluation of polymorphism content and applicability of marker data. *Biotechnology*. 6: 513-519
- Schibler, S. L., Cribiu, E.P., Oustry/Vaiman, A., Furet, J.P. and Vaiman, D. (2002). Fine mapping suggests that the goat Polled Intersex Syndrome and the human Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Syndrome map to a 100/kb homologous region. *Genome Res.* 10 (2000), pp. 311-318
- Stephan, W. (1998). Reproductive management of the meat goat. www.goatworld.com/articles/pregnancy

