تحقیقات دام و طیور (فصلنامه)
جلد پنجم، شماره سوم و چهارم، زمستان ۱۳۹۵
شماره صفحه: ۴۸-۳۹

ارزیابی اثر چندشکلی جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2* بر ویژگی‌های بیوشیمیایی سرم خون و وزن بدن در گاوهای بومی سیستان

محمد دهمرده[۱]، غلامرضا داشاب*[۲] و مهدی وفای واله[۲]
۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام دانشگاه زابل
۲- استادیار ژنتیک و اصلاح دام دانشگاه زابل
نویسنده مسؤول: *dashab@uoz.ac.ir*

تاریخ دریافت:۹۵/۱۱/۳۰ **تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۲۹**

چکیده

هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان چندشکلی جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2* در گاوهای بومی سیستان و ارتباط آن‌ها با صفات وزنی شامل وزن تولد، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی و ویژگی‌های بیوشیمی سرم خون شامل پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین بود. بدین منظور از ۱۴۳ راس گاو سیستانی واقع در ایستگاه تحقیقات گاو سیستانی زهک به طور تصادفی خونگیری انجام شد. استخراج *DNA* از نمونه-های خون کامل با روش نمکی بهینه یافته اجرا گردید. واکنش زنجیره پلیمراز، جهت تکثیر قطعه ۲۸۴ جفت بازی از اگزون ۲ جایگاه ژنی *BOLA-DBR3.2* در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول از دو پرایمر *HLO30* و *HLO31* و در مرحله دوم از *HLO30* و *HLO32* استفاده گردید. سپس محصولات تکثیر با آنزیم برشی *HaeIII* هضم شدند. محصولات هضم با الکتروفورز ژل آگارز ۳ درصد نمایان سازی شدند. محاسبه شاخص‌های ژنتیکی و جمعیتی با نرم‌افزار *POPGENE3.2* و ارتباط ژنوتیپ‌های محتمل با صفات وزنی و ویژگی‌های بیوشیمیایی خون از مدل‌های خطی ثابت اجرا گردید. نتایج این مطالعه منجر به شناسایی سه الگوی ژنوتیپی *aa*، *bb* و *ab* و دو آلل در جایگاه ژن *BOLA-DRB3.2* در گاوهای سیستانی شد. فراوانی الگوهای ژنوتیپی *aa*، *bb* و *ab* به ترتیب برابر با ۳۰، ۴۱ و ۲۸ درصد بودند. فراوانی آلل‌های *a* و *b* به ترتیب ۴۴ و ۵۶ درصد بودند. در این تحقیق شاخص شانون (*I*)، شاخص نئی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار به ترتیب ۶۹، ۴۹، ۲۸ و ۵۰ درصد محاسبه شدند. جمعیت گاوهای سیستانی مورد مطالعه در این تحقیق برای جایگاه ژنی مذکور خارج از تعادل هاردی-واینبرگ بودند. همچنین، ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف با صفات وزن بدن شامل تولد، ۳ ، ۶ ، ۹ و ۱۲ ماهگی و ویژگی‌های بیوشیمیایی سرم خون معنی‌دار نبود.

کلمات کلیدی: گاو سیستانی، ژن سازگار بافتی، چندشکلی، *PCR-RFLP*

مقدمه

مکان ژنی مجموعه سازگاری بافتی[1]، کدکننده آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌های سطح لوکوسیت‌ها هستند که در واکنش‌های دفاعی بدن و شناسایی پروتئین‌های خارجی نقش دارند. در گاو این مکان ژنی به نام *BOLA* نامگذاری گردیده است، که دارای کلاس‌های متعددی از جمله *classI*، *classII* و *classIII* هستند و روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲۳ گاو واقع شده‌اند. جایگاه *MHC* حاوی ژن‌های متعددی هستند که نقش کنترلی در مقاومت و پاسخ ایمنی میزبان به بیماری‌ها دارند. پاسخ اختصاصی به پادگن‌ها وابستگی زیادی به ژن‌های *MHC* داشته و کشف این ارتباط می‌تواند برای درک واکنش‌های متقابل میزبان و عامل بیماری‌زا ارزشمند باشد. جایگاه ژنی *DRB3* در گاو مرتبط با مقاومت به بیماری‌های عفونی گزارش شده است، به ویژه کلاس *II* این جایگاه که منجر به تولید آنتی بادی‌ها در لنفوسیت‌ها می‌شود. ناحیه کلاس *II* خود به دو زیر کلاس تقسیم می‌شود، که توسط یک سوم بازوی کوتاه کروموزوم از یکدیگر جدا شده‌اند. کلاس *IIa* شامل مکانهای *DRB*، *DRB1* ، *DRB2*، *DRB3*، *DQA*، *DQA2*، *DQB1* و *DQB2* می‌باشند و در زیر کلاس‌های *IIb* نیز لوکوس‌های *DYA*، *DYB* ، *DIB* و *DOB* قرار دارند که از بین جایگاه‌های مذکور، جایگاه ژنی *DRB3* چندشکلی بالایی نشان داده است و مورد توجه محققین مختلف قرار گرفته است. به طوری که در اگزون شماره ۲ این جایگاه تاکنون بیش از ۸۸ آلل مختلف شناسایی شده‌اند (وان ایجک و همکاران، ۱۹۹۲). ممکن است یکی از علل چندشکلی زیاد در این ناحیه، حفاظت جمعیت در برابر بیماری باشد. وقتی بیماری واگیر جدیدی در اجتماع بروز می‌کند، لااقل تعدادی از افراد آن جمعیت واجد *MHC* ویژه برای اتصال به اپی‌توپ‌های میکروارگانیسم جدید می‌باشند و در برابر آن واکنش ایمنی بروز می‌دهند و مقاومت می‌کنند. بسیاری از پژوهشگران گزارش کرده‌اند که چندشکلی در کلاس دو جایگاه *BOLA-DRB3.2* به طور ویژه مسؤول پاسخ ایمنی هستند و نقش بسزایی در مقاومت به اختلال در خود ایمنی مزمن مانند رماتیسم مفاصل و دیابت وابسته به انسولین را دارند (اسکاسچل و سانچنترانک، ۲۰۰۴). نتایج توالی‌یابی جایگاه ژن *BOLA-DRB3.2* منجر به شناسایی ۳۰ آلل گردید (بوزکایا و همکاران، ۲۰۰۶).

مطالعات متعددی جهت بررسی میزان تنوع ژنتیکی جایگاه *BOLA* در توده‌های بومی و اصیل صورت گرفته که بیانگر سطح تنوع بالا تا ۳۰ آلل است. مطالعه روی نژاد جیر[2] بومی کشور برزیل تعداد ۱۷ آلل در این مکان ژنی شناسایی گردید که آلل‌های شماره ۶ و ۲۰ دارای بیشترین فراوانی بودند (دا موتا و کوتینهو، ۲۰۰۲). در نژادهای مونگولین[3] و سیاه روسیه به ترتیب ۱۷ و ۲۱ آلل در مکان ژنی مذکور با بیشترین فراوانی در آلل‌های ۷ و ۲۲ گزارش شده است (اودینا و سویموا، ۱۹۹۸). نتایج تحقیقات در نژادهای شورت هورن[4] و جرسی ژاپنی نیز به ترتیب آلل‌های شماره ۶، ۷، ۸، ۱۷ و ۴۹ بیشترین فراوانی را داشتند (تاکاشیما و آیدا، ۱۹۹۸). همچنین، در نژادهای بومی هندوستان تعداد ۲۲ الی ۲۴ آلل شناسایی گردید که متمایز از آلل‌های شناسایی شده در نژادهای اروپایی و آفریقایی بودند (دی و همکاران، ۲۰۰۲؛ بهل و همکاران، ۲۰۰۷). مطالعات متعددی نیز روی شماری از توده‌های بومی ایران انجام گرفته است. نصیری و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه روی هلشتاین ایرانی در مکان ژنی *BOLA* تعداد ۲۷ آلل گزارش نمودند که آلل‌های شماره ۸ و ۲۴ به ترتیب با ۲۶/۶ و ۱۹/۶ درصد بیشترین فراوانی را داشتند. منتظر تربتی و همکاران (۲۰۰۴) با مطالعه روی گاوهای سرابی و نجدی به ترتیب ۵۲ و ۲۴ آلل گزارش کردند. همچنین، مسافر و همکاران (۲۰۰۵) در توده بومی گلپایگانی تعداد ۱۹ آلل را گزارش نمودند که فراوانی آلل‌های آنها در محدوده ۱۱ تا ۱۴ بودند. بنابراین، نتایج محققین مختلف نشان می‌دهد که جایگاه مورد بحث در گاوهای بومی ایران نیز از تنوع و چندشکلی ژنتیکی بالایی برخوردار هستند. با توجه به اینکه نژاد گاو سیستانی یک نژاد با ارزش از نظر خصوصیات لاشه و مقاومت

[1] *Major Histocompatibility Complex*

[2] *Gyr*

[3] *Mongolian*

[4] *Shorthorn*

به شرایط و عوامل بیماریزا می‌باشد، بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی چندشکلی ژن *BOLA-DRB3.2* و ارتباط آنها با صفات رشد و ایمنی در گاوهای سیستانی ایستگاه تحقیقات زهک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جهت انجام تحقیق حاضر ۱۴۳ رأس گاو سیستانی واقع در ایستگاه تحقیقات گاو سیستانی زهک به طور تصادفی انتخاب و خونگیری از سیاهرگ گردنی انجام گرفت. جهت جلوگیری از انعقاد خون از لوله‌های حاوی محلول *EDTA* (۱ درصد) استفاده شد و تا هنگام استخراج *DNA* در دمای۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج *DNA* از خون کامل به روش نمکی بهینه یافته با دترجت استفاده شد. برای اطمینان از کیفیت *DNA* استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

واکنش تکثیر قطعه ۲۸۴ جفت بازی از جایگاه ژن *BOLA-DRB3.2* در دو مرحله با استفاده از سه الیگونوکلئوتیدی (بهل و همکاران، ۲۰۰۷) (جدول ۱) با روش *Nested-PCR* با استفاده از کیت تکثیر لئوفیلیزه شرکت تکاپو زیست تهران (حاوی *Master mix*، بافر *PCR*، *Mgcl2*، *dNTPs*) انجام شد. واکنش تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵میکرولیتر *Master mix*، ۲ میکرولیتر پرایمرهای رفت و برگشت، ۳ میکرولیتر *DNA* هدف و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه انجام گرفت. مرحله اول واکنش تکثیر با استفاده از دو آغازگر *HLO30* و *HLO31* و در مرحله دوم از دو آغازگر *HLO30* و *HLO32* استفاده شد. واکنش تکثیر با دستگاه ترموسیکلر (مدل اپندورف امریکا) انجام شد. چرخه دمایی در مرحله اول تکثیر، شامل واسرشته کردن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و در ادامه طی ده چرخه بیست و پنج ثانیه‌ای در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سی ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، سی ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ادامه پیدا کرد و سرانجام مرحله تکثیر انتهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه یافت.

در مرحله دوم چهار میکرولیتر از محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصل از مرحله اول در طی بیست و پنج سیکل چهل ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سی ثانیه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد و مرحله تکثیر انتهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در روش *Nested-PCR* قطعه ۲۸۴ جفت بازی جایگاه ژن *BOLA-DRB3.2*

آغازگرها	توالی آغازگرها
HLO30	*5-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3*
HLO31	*5-TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3*
HLO32	*5-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC-3*

هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده از جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2* با آنزیم برشی *HaeIII* در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۶ میکرولیتر از محصول *PCR*، ۲ میکرولیتر بافر هضم *10X*، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *HaeIII* (۲ واحد) و ۱۱/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل بن ماری انجام شد. در نهایت، جهت وضوح آلل‌ها از الکتروفورز ژل آگارز ۳ درصد استفاده شد.

صفات مورد مطالعه: در مطالعه حاضر علاوه بر صفات وزنی شامل تولد، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی که به صورت مداوم در مرکز اصلاح نژاد گاوهای سیستانی رکوردبرداری انجام می‌گیرد، در جمعیت مورد مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی سرم خون شامل میزان آلبومین[1]، پروتئین کل[2] و گلوبولین به عنوان شاخص‌های غیرمستقیم ایمنی اکتسابی اندازه‌گیری شدند.

در تحقیق حاضر تجزیه پیوستگی الگوهای ژنوتیپی جایگاه ژنی *BOLA–DRB3.2* با صفات وزنی و ویژگی‌های بیوشیمیایی سرم خون در گاو سیستانی از مدل خطی ثابت با رویه *GLM* نرم افزار *SAS* نسخه ۹,۱ استفاده گردید:

$$Y_{ijk}= \mu+ S_i+ BY_j+ G_k+e_{ijk}$$

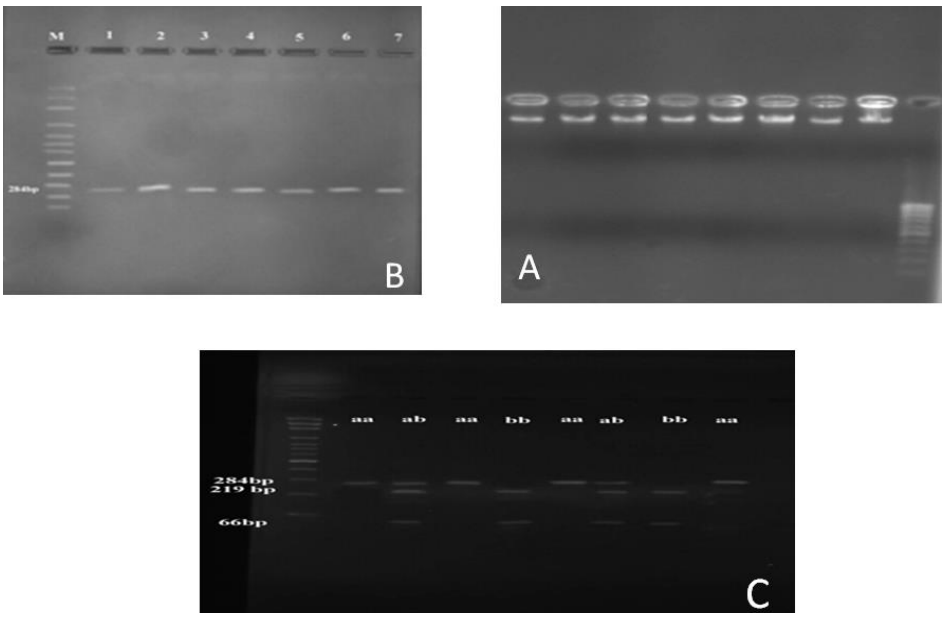
که در آن، Y_{ijk} رکورد فنوتیپی صفات مورد مطالعه شامل وزن های تولد، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی و ویژگی‌های بیوشیمیایی سرم خون شامل آلبومین، گلوبولین و پروتئین کل، μ میانگین کل، S_i اثرات ثابت جنس حیوان (۲ سطح)، BY_j اثرات ثابت سال تولد حیوان (۹ سطح)، G_k اثر ثابت الگوهای ژنوتیپی حیوان در جایگاه ژنی مورد مطالعه (۳ سطح) و e_{ijk} خطای باقی‌مانده

[1] *Albumin*
[2] *Total protein*

هستند. در تجزیه و تحلیل صفات وزنی، صفات قبلی به عنوان عامل همبسته در مدل وارد شد. مقایسه میانگین گروه‌ها با آزمون توکی کرامر در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. پیش فرض تجزیه داده‌ها با روش میانگین حداقل مربعات یا تجزیه واریانس توزیع نرمال داده‌ها و یکنواختی واریانس‌ها برای اثرات ثابت جنس و سال تولد می‌باشد که توزیع نرمال داده‌ها با رویه *Univariate* و یکنواختی واریانس‌ها با روش *Bonferoni* نرم افزار *SAS* انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج استخراج *DNA* از نمونه خون از لحاظ کمیت و کیفیت *DNA* و صرف زمان لازم در استحصال *DNA* برتری خوبی را نشان داد (شکل ۱ *A*). تکثیر قطعه ۲۸۴ جفت بازی از ژن *BOLA-DRB3.2* به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز *(Nested-PCR)* به خوبی صورت گرفت (شکل ۱*B*). سپس هضم محصولات تکثیر ژن *BOLA-DRB3.2* با آنزیم محدودالاثر *HaeIII* انجام شد که نتیجه آن سه الگوی باندی (۲۸۴، ۲۱۹ و ۶۶ جفت بازی) و سه ژنوتیپ مختلف *aa*، *ab* و *bb* در این جایگاه ژنی بر روی ژل آگارز بود (شکل ۱*C*). مطابق شکل ۱ در نمونه‌هایی که مکان برشی آنزیم وجود دارد، محصول تکثیر به دو قطعه ۶۶ و ۲۱۹ جفت بازی برش خورده و قطعات بدون جایگاه برشی به طول ۲۸۴ جفت باز یافت گردید. بنابراین، نمونه‌هایی که محصولات هضم آن دارای یک قطعه ۲۸۴*bp* بودند، با الگوی ژنوتیپی هموزیگوت *aa* و نمونه-هایی که دارای قطعات ۶۶*bp* و ۲۱۹*bp* بودند با الگوی ژنوتیپی *bb* و در نهایتنمونه‌هایی که دارای قطعات ۶۶*bp*، ۲۱۹*bp* و۲۸۴*bp* بودند با الگوی ژنوتیپی هتروزیگوت *ab* نامگذاری شدند.



شکل ۱- *A*- الکتروفورز ژل آگارز ۱درصد *DNA* استخراج شده از نمونه‌های مختلف گاو سیستانی. *B*-الکتروفورز محصولات تکثیر قطعه ۲۸۴ جفت بازی اگزون دوم جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2*. *C*- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم آنزیم برشی *HaeIII* و الگوهای مختلف ژنوتیپی حیوانات (چاهک اول نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی و سایر چاهک ها الگوهای مختلف ژنوتیپی گاوهای سیستانی هستند).

فراوانی ژنوتیپی و ژنی الگوهای مشاهده شده در جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2* در جمعیت گاوهای سیستانی در جدول ۱ آورده شده است. فراوانی ژنوتیپ‌های *aa*، *bb* و *ab* به ترتیب ۳۰، ۴۱ و ۲۸ درصد در جمعیت گاوهای سیستانی مشاهده

شدند که بیشترین فراوانی مربوط به الگوی ژنوتیپی *bb* با ۴۱ درصد بود و فراوانی آلل‌های *a* و *b* به ترتیب ۴۴ و ۵۶ درصد محاسبه شدند. فراوانی الگوی ژنوتیپ‌های *bb*، *aa* و *ab* در جایگاه ژن *BOLA-DRB3.2* در نژاد مونگولین به ترتیب ۵۹ و ۲۷ و ۱۴ درصد گزارش شده است که بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ *bb* بود (سان، ۲۰۰۴). مطالعه چندشکلی جایگاه ژن *BOLA-DRB3.2* در بزهای ندوشن سه الگوی ژنوتیپی *bb*، *ab* و *aa* به ترتیب با فراوانی ۳۰ و ۵۵ و ۱۵ درصد و فراوانی آلل‌های *a* و *b* به ترتیب ۴۲/۵ و ۵۷/۵ درصد گزارش شده است (عباس زاده و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین، در مطالعه دیگر در بزهای نژاد رائینی در جایگاه ژنی مذکور فراوانی ژنوتیپ‌های *bb*، *ab* و *aa* به ترتیب ۴۶، ۴۴ و ۱۰ درصد و فراوانی آلل‌های *b* و *a* به ترتیب ۶۸ و ۳۲ درصد گزارش گردید (بهالدینی، ۱۳۸۷).

مطالعه چندشکلی جایگاه ژن *BOLA-DRB3.2* در جمعیت گاوهای هلشتاین و سیستانی، فراوانی آللی متفاوت در جایگاه مذکور را نشان داد به نحوی که فراوانی آللی در گاوهای سیستانی مشابه با فراوانی های گزارش شده در گاوهای نژاد بوس ایندکوس بودند (نصیری و همکاران، ۲۰۰۸). فراوانی هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جایگاه ژن *BOLA-DRB3.2* در مطالعه حاضر به ترتیب ۲۸ و ۵۰ درصد محاسبه شد. از آن جای که یک جایگاه ژنی با فراوانی حداقل ۱۰ درصد هتروزیگوسیتی، چندشکل محسوب می‌گردد (جوتی، ۲۰۰۸)، لذا جایگاه مورد مطالعه چندشکلی متوسط دارد. در تحقیق دیگری (فیروزآمندی و همکاران، ۱۳۸۴) روی نژاد گاو سرابی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۴۸ درصد و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۷۳ درصد گزارش گردید که نشان دهنده افزایش هموزیگوسیتی و متعاقب آن کاهش هتروزیگوسیتی است.

نتایج آزمون بررسی تعادل هاردی –واینبرگ در جایگاه ژنی *BOLA – DRB3.2* در گاوهای سیستانی ایستگاه تحقیقات زهک با آزمون‌های مربع کای و نسبت درستنمایی عدم تعادل را نشان داد ($P<۰/۰۰۱$). با توجه به این که ایستگاه تحقیقاتی زهک سالیان متمادی راهبردهای اصلاح نژادی اعمال گردیده است و انتخاب مهمترین عامل انحراف از تعادل هاردی واینبرگ می‌باشد کاملا منطقی است. در مطالعه گاوهای نژاد سرابی با آزمون مربع کای و نسبت درستنمایی در جایگاه ژنی مذکور انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان دادند که علت این انحراف را می‌توان به اعمال انتخاب در گله نسبت داد. همچنین، مطالعه جایگاه ژن *BOLA-DRB3.2* در دو جمعیت بز چینی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان داد (سان، ۲۰۰۴). در تحقیقی که روی جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2* در گاومیش های بومی استان خوزستان انجام گرفت مشخص شد که جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارند که نتایج با تحقیق حاضر مطابقت نداشت (محمدی و سولیموا، ۲۰۰۴).

یکی دیگر از شاخص‌های بررسی تنوع ژنتیکی در جایگاه‌ها تفاوت طول قطعات هضم شده ژن *BOLA-DRB3.2* شاخص اطلاعاتی شانون می‌باشد. شاخص شانون (*I*) بیانگر میزان تنوع ژنتیکی در هر جمعیت بر حسب درصد است، یعنی هرچه مقدار این شاخص به صفر نزدیکتر باشد تنوع کم خواهد بود که در این تحقیق میزان شاخص شانون ۶۹ درصد محاسبه گردید.

تجزیه پیوستگی ژن *BOLA-DRB3.2* با صفت وزن تولد و ویژگی‌های بیوشیمیایی سرم خون در گاوهای سیستانی

نتایج بررسی توزیع نرمال داده‌ها و یکنواختی واریانس‌ها برای صفات وزن بدن و ویژگی‌های بیوشیمیایی سرم خون در زیر گروه‌های اثرات ثابت حکایت از انطباق داده‌ها با فرضیات روش تجزیه واریانس بود. نتایج تجزیه واریانس الگوهای ژنوتیپی جایگاه ژن *BOLA-DRB3.2* اثر معنی‌داری بر صفات وزنی از تولد تا یکسالگی در گاوهای سیستانی نداشت ($P>۰/۰۵$) (جدول ۳).

نتایج مقایسات میانگین حداقل مربعات اثرات الگوهای ژنوتیپی مختلف بر ویژگی‌های بیوشیمیایی سرم خون تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (جدول ۴). لذا ژنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت شایستگی یکسانی بر صفات بیوشیمیایی سرم خون دارند. در مطالعه بزهای ندوشن در جایگاه *BOLA-*

DRB3.2 برتری الگوی هتروزیگوسیتی بر هموزیگوسیتی در صفت ایمنی گزارش گردید (عباس زاده و همکاران، ۱۳۹۰).

جدول ۲- فراوانی الگوهای ژنوتیپی و ژنی محصولات هضم آنزیمی *HaeIII* در جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2* گاوهای سیستانی

الگوی ژنوتیپی	تعداد حیوانات	فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده (درصد)	فراوانی ژنوتیپی مورد انتظار (درصد)
aa	۴۶	۳۰	۱۹
ab	۴۵	۲۸	۵۰
bb	۵۲	۴۱	۳۱
آلل‌ها		فراوانی ژنی (درصد)	
a		۴۴	
b		۵۶	

جدول ۳- میانگین حداقل مربعات اثرات ثابت و الگوهای ژنوتیپی جایگاه *BOLA-DRB3.2* بر صفات وزنی در جمعیت گاو سیستانی

منابع تغییرات	میانگین حداقل مربعات (کیلوگرم)			
	وزن تولد	وزن ۳ ماهگی	وزن ۶ ماهگی	وزن ۹ ماهگی
جنس				
نر	۲۷/۰۴ ^{a}	۴۹/۵۶^{a}	۸۱/۶۱^{a}	۱۰۵/۷۸^{a}
ماده	۲۴/۷۱ ^{a}	۵۰/۱۴^{a}	۷۶/۳۵^{a}	۹۶/۲۵^{a}
ژنوتیپ				
Aa	۲۷/۲۶ ^{a}	۴۹/۰۹^{a}	۷۷/۷۵^{a}	۸۹/۰۶^{a}
Ab	۲۳/۳۶ ^{a}	۴۹/۲۳^{a}	۸۲/۹۹^{a}	۱۰۴/۹۱^{a}
Bb	۲۴/۸۱ ^{a}	۵۱/۲۲^{a}	۷۶/۱۹^{a}	۱۰۰/۰۷^{a}
سال تولد				
۸۲	۴/۸۵ ^{a}	۳۹/۶۶^{a}	۵۵/۱۰^{a}	۹۸/۱۲^{a}
۸۳	۳/۹۵ ^{a}	۴۹/۸۱^{a}	۷۶/۹۲^{a}	۹۸/۵۲^{a}
۸۴	۶/۱۹ ^{a}	۴۶/۸۶^{a}	۷۹/۷۵^{a}	۱۲۰/۱۱^{a}
۸۵	۴/۲۴ ^{a}	۵۰/۶۰^{a}	۸۶/۸۱^{a}	۹۶/۵۱^{a}
۸۸	۴/۱۹ ^{a}	۵۰/۶۹^{a}	۵۸/۶۹^{a}	۱۰۹/۵۸^{a}
۸۹	۴/۹۱ ^{a}	۵۰/۲۸^{a}	۷۲/۶۱^{a}	۹۰/۳۷^{a}
۹۰	۴/۲۹ ^{a}	۵۲/۷۵^{a}	۸۰/۳۰^{a}	۱۰۲/۵۹^{a}
۹۱	۴/۶۸ ^{a}	۵۶/۹۵^{a}	۸/۸۴^{a}	۱۰۸/۳۶^{a}
۹۲	۴/۴۱ ^{a}	۵۱/۰۳^{a}	۸۶/۸۱^{a}	۹۶/۹۹^{a}

حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P>$۰/۰۵)

جدول ۴- میانگین حداقل مربعات اثرات ثابت و الگوهای ژنوتیپی جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2* برای صفات بیوشیمیایی خون در جمعیت گاو سیستانی

منابع تغییرات		میانگین حداقل مربعات (گرم بر دسی لیتر)		
		پروتئین کل	آلبومین	گلوبولین
جنس				
	نر	۷/۷۹^{a}	۲/۹۹^{a}	۴/۸^{a}
	ماده	۷/۵۵^{a}	۳/۰۸^{a}	۴/۴۷^{a}
ژنوتیپ				
	aa	۷/۵۴^{a}	۲/۹۷^{a}	۴/۵۷^{a}
	ab	۷/۷۵^{a}	۳/۱۰^{a}	۴/۴۴^{a}
	bb	۷/۷۳^{a}	۳/۰۵^{a}	۴/۶۸^{a}
سال تولد				
	۸۲	۸/۲۱^{a}	۵۳/۳۶^{a}	۴/۸۵^{a}
	۸۳	۶/۹۳^{a}	۲/۹۸^{a}	۳/۹۵^{a}
	۸۴	۸/۹۴^{a}	۷/۷۶^{a}	۱/۱۸^{a}
	۸۵	۷/۱۰^{a}	۲/۸۵^{a}	۴/۲۵^{a}
	۸۸	۷/۲۷^{a}	۳/۰۷^{a}	۴/۲^{a}
	۸۹	۷/۹۴^{a}	۳/۰۳^{a}	۴/۹۱^{a}
	۹۰	۷/۵۴^{a}	۳/۲۵^{a}	۴/۲۹^{a}
	۹۱	۷/۵۶^{a}	۳/۰۸^{a}	۴/۴۸^{a}
	۹۲	۷/۳۷^{a}	۲/۹۷^{a}	۴/۴^{a}
اثر متقابل جنس با صفات ایمنی				
جنس نر				
	aa	۷/۴۰^{a}	۲/۸۳^{a}	۴/۵۷^{a}
	ab	۸/۲۶^{a}	۳/۱۵^{a}	۵/۱۱^{a}
	bb	۷/۷۳^{a}	۳/۰۰^{a}	۷/۷۳^{a}
جنس ماده				
	aa	۷/۷۰^{a}	۳/۱۰^{a}	۴/۶۰^{a}
	ab	۷/۲۴^{a}	۳/۰۴^{a}	۴/۲^{a}
	bb	۷/۷۳^{a}	۳/۱۰^{a}	۴/۶۳^{a}

حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P>۰/۰۵)

جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2* از کمپلکس ژنی سازگار بافتی *MHC* بر روی اگزون دوم ناحیه کلاس *IIa* کروموزوم ۲۳ گاوی واقع شده است و بیش از ۳۶ آلل متفاوت در این جایگاه در بین نژادهای مختلف گزارش شده است که هر یک از آلل‌ها اثرات متفاوت بر صفات تولیدی و مرتبط با ایمنی در گاوهای شیری دارند (اوپرزادک و همکاران، ۲۰۱۲؛ پاشمی و همکاران، ۲۰۰۹). در مطالعه چندشکلی جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2* در جمعیت‌های مختلف بز ارتباط معنی‌داری بین الگوهای ژنوتیپی با صفات تولیدی و ایمنی گزارش گردید (شیخ و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین، در مطالعه جایگاه مذکور در گاومیش‌های بومی هندوستان ارتباط معنی‌دار بین الگوهای ژنوتیپی با صفت وزن تولد گزارش گردید (دی و همکاران، ۲۰۰۲). در پژوهشی که بر روی گاومیش‌های خوزستان در جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2* انجام گرفت، ۱۹ الگوی ژنوتیپی گزارش شد (محمدی و سولیموا، ۲۰۰۴). شریف و همکاران (۲۰۰۰) ارتباط معنی داری بین حضور گلوتامیک اسید در موقعیت ۷۴β جایگاه *BOLA-DRB3.2* و وقوع بیماری ورم پستان با عامل استافیلوکوکوس گزارش کردند. بعضی از آلل‌های جایگاه مذکور ارتباط معنی‌داری با تولید چربی در جمعیت جرسی داشت. همچنین، منجر به کاهش تولید شیر و

چربی آن در گاوهای کانادایی گزارش شده است (شریف و همکاران، ۱۹۹۸). در مطالعه گاوهای هندی *Sahiwal* سه آلل *a*، *b* و *e* به ترتیب با فراوانی ۷۱، ۲۷ و ۲ درصد گزارش شد که آلل *a* مرتبط با بیماری ورم پستان گزارش گردید (چاکرابورتی و همکاران، ۲۰۱۵). آلل *a* در آمیخته‌های دو نژاد هلشتاین و زبو با ورم پستان کلینیکی گزارش شده است (دوانگجی ایندا و همکاران، ۲۰۰۹).

نتیجه‌گیری

ناحیه اگزون ۲ جایگاه ژنی *BOLA-DRB3.2* در گاوهای سیستانی چندشکلی مطلوبی داشت و می‌تواند به عنوان نشانگر در مطالعات پیوستگی ژنی و مکان‌یابی ژن‌ها مورد استفاده قرار گیرد، اما الگوهای ژنوتیپی مرتبط با تغییرات صفات وزنی بدن و ویژگی‌های بیوشیمیایی سرم خون شامل پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین نبودند. لذا پیشنهاد می‌گردد تا در مطالعات آینده نواحی وسیع‌تری از جایگاه ژنی مذکور و ارتباط آنها با صفات مستقیم ایمنی ذاتی و اکتسابی مورد استفاده قرار گیرد تا اگر روابطی در بین آن‌ها یافت شد در انتخاب‌های مستقیم برای بهبود ایمنی دامها استفاده گردد.

منابع

بهالدینی، م.، ۱۳۸۷. بررسی پلی موفیسم ژن *GOLA-DRB3.2* در بز رائینی با استفاده از *PCR-RFLP*. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه زابل.

عباس زاده، ا.، محمدآبادی، م.، اسمعیلی‌زاده کشکوئیه، ع. و علی نقی زاده، ر.، ۱۳۹۰. مطالعه چندشکلی اگزون ۲ ژن *GOLA-DRB3* در بز ندوشن با استفاده از روش *PCR-RFLP -PCR*. نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران. جلد۳، شماره ۳، ص ۲۷۹-۲۷۴.

فیروزآمندی، م.، شجاع، خ.، جبارپوربنیادی، م.، لقاییان، ن. و قربانی، ا.، ۱۳۸۴. بررسی چندشکلی ریزماهواره‌های ژن *BoLA-DRB* در گاوهای نژاد هلشتاین و سرابی و ارتباط آن با بیماری ورم پستان. دانش کشاورزی. ۱۷(۲)، ص ۱۴۳-۱۳۵.

Behl, J.D., Verma, N.k., Behl, R., Mukesh, M. and Ahlawat, S.P.S., 2007. Characterization of genetic polymorphism of the bovine lymphocyte antigen DRB3.2 locus in Kankrej cattle (Bos indicus). Journal of Dairy Science. 90: 2997–3001.

Bozkaya, F., Kuss, A. and Geldermann, H., 2006. DNA variants of the MHC show location-specific convergence between sheep, goat and cattle. Small Ruminant Research. 70: 174-182.

Chakraborty, D., Singh, A., Tantia, M. S., Verma, A. And Chakravarty, A.K., 2015. Genetic polymorphism of BOLA-DRB3.2 locus in Sahiwal cattle. Animal Science Reporter. 9(1): 33-40.

Da Mota, A.F. and Coutinho, L., 2002. Distribution of BOLA-DRB3 alleles in Brazilian dairy Gir cattle. European Journal of Immunogenetics. 29: 223-227.

De, S., Singh, R.K. and Butchaiah G., 2002. MHC-DRB3.2 Allele polymorphism in Indian river buffalo. Animal Genetics. 33: 215-219.

Duangjinda, M., Buayai, D., Pattarajinda, V., Phasuk, Y., Katawatin, S., Vongpralub, T. and Chaiyotvittayakul, A., 2009. Detection of bovine leukocyte antign DRB3 alleles as candidate markers for clinical mastitis resistance in Holstein × Zebu. Journal of Animal Science. 87(2); 468-476.

Jothi, M.P., 2008. Genetic distance and phylogenic inference, Course notes. University of Putra, Malaysia.

Mohammadi, A., and Solimova, G.E., 2004. Distribution of BOLA-DRB3.2 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian Cattle Breed Sistani. Russian Journal of Genetics. 45: 198-202.

Montazer torbati, F., Eftekhari, S.F., Nassiry, M.R., Safarnezhad, A. and Montazer torbati, M.B., 2004. Frequency of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Sarabi cows. Iranian Journal of Biotechnology. 2: 101-105.

Mosafer, J. and Nassiry, M.R., 2005. Identification of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Iranian Golpayegani cattle by DNA test. Asian Australian Journal of Animal Science. 18: 1691-1695.

Nassiry, M.R. and Eftekhari, F., 2005. Analysis and frequency of BOLA-DRB3 alleles in Iranian Holstein cattle. Journal of Animal Genetic. 41: 817-822.

Nassiry, M.R., Shahroudi, F.E. Moussavi, A.H. Sadeghi, B. and A. Javadmanesh, A., 2008. The diversity of leptin gene in Iranian native, Holstein and Brown Swiss cattle. African J. Biotechnology. 7(15): 2685-2687.

Oprzadek, J., Urtnowski, P., Sender, G. and Lukaszewicz, M., 2012. Frequency of BOLA-DRB3 alleles in Polish Holstein-Friesian cattle. Animal Science Papers and Reports, 30(2): 91-101.

Pashmi, M., Qanbari, S., Ghorashi, S.A., Sharifi, A.R. and Simianer, H., 2009. Analysis of relationship between bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles, somatic cell count and milk traits in Iranian Holstein population. Journal of Animal breeding and Genetics. 126(4): 296-303.

San, D., 2004. Polymorphism analysis of the GOLA-DRB3.2 gene digested with HaeIII in Mongolian goat and Kazakh goat. College of Animals Science and Technology. China Agricultural University. 42: 385-390.

Schaschl, H.S. and Suchentrunk, F., 2004. Sequence analysis of the MHC class II DRB alleles in Alpine chamois (Rupicapra r. rupicapra). Dev. Comp. 12: 125-129.

Sharif, S., Mallard, B.A. and Sargeant, J.M., 2000. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by Staphylococcus species. Veternary Immunology Immunopathology. 76: 231-238.

Sharif, S., Mallard, B.A., Wilkie, B.N., Sargeant, J.M., Scott, H.M., Dekkers, J.C.M. and Leslie, K.E., 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 with production traits in Canadian dairy cattle. Animal Genetics. 30: 157-160.

Sheikh, F.D., Bhattacharya, T.K. Kumar, P. and Sharma, A., 2006. DRB3.2 gene polymorphism and its association with pashmina production in changthangi goat. Journal of Compilation. 271-276.

Takeshima, S. and Aida, Y., 1998. Identification of new cattle BOLA-DRB3 alleles by sequence based typing, Immunogenetics. 53: 74-81.

Udina, I.G. and Suimova, T., 1998. Comparative analysis of Ayrshire and black pied cattle breed by Histocompatibility markers. Russian journal of genetics. 34: 1421-1427.

Van Eijk, M.J.T., Stewart-Hayanes, J.A. and Lewin, H.A., 1992. Extensive polymorphism of the BOLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. Animal Genetics. 38: 141-146.

Livestock Research (Quarterly)
Vol.5, No.3&4, Fall & Winter, 2016-2017
p. 39-48

Birjand University

Evaluation of the effect of BOLA-DRB3.2 locus polymorphism on blood serum biochemical characteristics and body weight of Sistani cattle

M. dehmardeh[1], Gh. R. Dashab[2*], M. Vafaye Valleh[3]
1- MS.C of Animal breeding, University of Zabol
2- Assistant Professor of Animal Breeding and Genetic, University of Zabol
3- Assistant Professor of Animal Breeding and Genetic, University of Zabol
**Corresponding Author Email: dashab@uoz.ac.ir*

Submitted: 18 February 2017 ***Accepted: 20 December 2017***

Abstract
The objective of the present study was to determine the extent of BOLA-DRB3 locus polymorphism in a herd of Sistani Cattle and their associations with body weight traits including birth weight, 3, 6, 9 and 12 months, and blood serum biochemical such as total protein, albumin and globulin. For this, blood samples collected randomly from 143 Sistani Cattle in a research herd at the Sistani Cattle Research Centre. DNA extraction from complete blood samples was performed with optimized saline method. The amplification of the 284-bp fragment of the BoLA-DRB3 gene was performed in two steps. In the first step, the HLO30 and HLO31 primers were used and in the second step the HLO30 and HLO32 primers were used. Then, the amplified fragment was digested by HaeIII enzyme. The digestion products were resolved on electrophoresis of 3% gel agarose. Population and genetic structure was calculated with POPGENE software and probable genotype patterns association with body weight traits and blood biochemistry traits were implemented by fixed linear model. The results of this study revealed two alleles and three genotypes as aa, bb and ab in locus of BOLA-DRB3.2 in Sistani cattle. Genotype frequencies of aa, bb and ab were 30, 41 and 28%, respectively, and alleles frequencies of a and b were calculated 44 and 56%, respectively. In this experiment, the Shannon index (I), Nei's index, heterozygosity was observed and the expected heterozygosity were calculated 69, 49, 28 and 50 respectively. The analysis of likelihood ratio test and X^2 in BOLA-DRB3.2 showed that the population of Sistani cattle studied in this study was beyond the Hardy-Weinberg equilibrium. Also, the correlation of different genotypes with body weight traits including birth, 3, 6, 9 and 12 months, and biochemical characteristics of serum were not significant.

Keyword*: Sistani cattle, MHC, Polymorphism, PCR-RFLP*