[DOI: 10.29252/rap.8.16.152]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:58 +0330 on Tuesday October 15th 2019

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

بررسی رابطه‌ی چندشکلی ژن DRB2 با تعداد تخم انگل مارشالاژیا مارشالی در دستگاه گوارشی گوسفند نژاد قزل

شهرام حسین‌زاده[۱] و سید عباس رأفت[۲]

۱- دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
(نویسنده مسوول: shahram.91@ms.tabrizu.ac.ir)
۲- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۳۰

چکیده

انگل‌ها و کرم‌های گوارشی یکی از دلایل اصلی کاهش تولید اقتصادی گوسفندان می‌باشند. پژوهش حاضر به‌منظور بررسی چندشکلی‌های ریز ماهواره‌های اینترون ۵ ژن DRB2 و ارتباط آن با تعداد تخم انگل مارشالاژیا مارشالی در گوسفند نژاد قزل انجام گرفت.از ۸۰ رأس بره نر ٤ تا ٦ ماهه خون‌گیری صورت گرفت و نمونه‌های مدفوع از رکتوم بره‌ها جمع‌آوری و شمارش تعداد تخم انگل به روش کلیتون لین انجام شد. استخراج DNA به روش کلروفرم-ایزوآمیل الکل انجام و ناحیه ریز ماهواره‌ای اینترون ۵ ژن DRB2 تکثیر گردید. محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز شدند و اندازه آلل‌ها با نشانگر اندازه M25 و نرم‌افزار UVidoc مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از رویه‌ی مختلط، اثر ژنوتیپ روی صفت مورد نظر توسط نرم‌افزار SAS بررسی گردید. آنالیز آماری ارتباط معنی‌داری را بین صفت تعداد تخم انگل مارشالاژیا مارشالی با چندشکلی ژن DRB2 نشان داد، به‌طوری‌که بره‌های دارای ژنوتیپ‌های ۲۸۸-۲۷۸ و ۲۸۸-۲۸۸ در ناحیه اینترون ۵ ژن DRB2 به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) تعداد تخم انگل کمتری نسبت به بره‌های دیگر داشتند. به‌عنوان نتیجه، چندشکلی ژنتیکی در این جایگاه می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مفید در برنامه‌های انتخاب بر اساس نشانگرها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: انگل مارشالاژیا مارشالی، نژاد قزل، ریز ماهواره، DRB2

مقدمه

گوسفند قزل یکی از نژادهای دنبه‌دار است که منطقه زیست آن در آذربایجان شرقی و مناطق کوهستانی تبریز می‌باشد. رنگ بدن معمولاً بین قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره متغیر است. شکل دنبه که یکی از وجوه تمایز خاص این نژاد می‌باشد، کاملاً گرد و دارای دنبالچه مناسب به شکل گلابی بوده و از نیمرخ به‌صورت S دیده می‌شود. هرچه دنبه از حالت فوق خارج‌شده باشد، به همان اندازه از مطلوبیت گوسفند کاسته می‌شود. رنگ دنبه و سینه و چهار قلم تیره‌تر از سایر نقاط بدن می‌باشد. اکثر گوسفندان در زیر گردن منگوله دارند. بعضی از گله‌داران معتقدند که اصیل‌ترین میش‌ها آن‌هایی هستند که به رنگ قرمز، حنائی و فاقد شاخ بوده و دارای لکه سفیدروی پیشانی باشند. خصوصیات تولیدی: میانگین وزن تولد بره‌ها 5/4 کیلوگرم، میانگین وزن ۶ ماهگی ۳۵ کیلوگرم، میانگین وزن بلوغ ۵۰ کیلوگرم، دوقلوزائی ۲۰ درصد. (http://blog.iran-carpet.comt) انگل و کرم‌های گوارشی یکی از منابع اصلی کاهش تولید اقتصادی گوسفندان در سراسر جهان می‌باشد (۱۰و۲۶). طبق مطالعات انجام‌گرفته توسط اطمینان راد و همکاران در سال ۱۳۸۶ میزان آلودگی به مارشالاژیا مارشالی در دام‌های کوچک شهرستان یزد ۶۹/۶ درصد بوده است (۷). طبق مطالعات انجام‌گرفته توسط عبدالعلی چاله چاله در سال ۱۳۹۰ روی دستگاه گوارش گوسفندان کرمانشاه میزان آلودگی به انگل‌های مارشالاژیا مارشالی (۴۶ درصد)، آسترتاژیا سیرکومسینکتا (۱۰ درصد) و همونکوس کونتورتوس (۲ درصد) گزارش گردید (۴). در تحقیقات انجام‌گرفته در سال ۱۳۸۴ بر روی گوسفندان و بزهای شهر کاشان توسط طالاری و همکاران، آلودگی به مارشالاژیا مارشالی ۸۰ درصد در گوسفند و ۳ درصد در بز گزارش گردید (۳۱). با وجود تأثیر بیماری‌های ناشی از نماتد و کشف عوامل درمانی جدید، پیشرفت نسبتاً محدودی در توسعه ابزارهای مولکولی کاربردی برای مطالعه اپیدیمیولوژی نماتد وجود دارد. در حال حاضر تشخیص اختصاصی، کنترل انگل و نظارت بر مقاومت دارویی انگل‌های دامی، یک نگرانی عمده در سراسر جهان می‌باشد (۲۷). متأسفانه صنعت پرورش گوسفند متکی برافزایش استفاده از مواد ضد انگل برای کنترل انگل است. با این حال، افزایش مقاومت شیمیایی موجب شده تا محققان به دنبال کشف روش‌های جایگزین باشند (۱۵) نتایج یک مطالعه نشان داد که کاهش مؤثر FEC[۱] نماتدهای گوارشی با فرمولاسیون خوراکی موکسیدین ۹۹ تا ۱۰۰ درصد و ایورمکسین ۹۸ تا ۱۰۰ درصد به‌جز یک مزرعه، در تمامی مزارع یونان صورت گرفت. البته در این مزرعه، مقاومت به چند دارو شناسایی شد (که شامل اثر موکسیدین ۹۱ درصد و ایورمکسین صفر درصد، بنزیمادوزل ۵۸ درصد و لوامیزول ۸۷ درصد بود). بر اساس مطالعات، اثربخشی بالای درمان خوراکی با موکسیدین و ایورمکسین، نسبت به بنزیمادوزل و لوامیزول در مزارع ایتالیا، فرانسه و یونان تائید گردیده است (۹). از سویی دیگر در اکثر مراتع اصلی پرورش گوسفند در اروپا، نسبت به بنزیمادوزل مقاومت دارویی مشاهده‌شده است. علی‌الخصوص در یونان (۲۳) شمال ایرلند (۲۰) و نروژ (۶) و اسپانیا (۱۹). همچنین علاوه بر مقاومت به بنزیمیدازول،

1- Faecal worm Egg Count

[DOI: 10.29252/rap.8.16.152]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:58 +0330 on Tuesday October 15th 2019

مقاومت به ایورمکتین و لوامیزول نیز گزارش‌شده است. بر اساس این تحقیقات، انگل‌های تریشوریس و نماتدیروس نسبت به اثر دارویی بنزیمادوزل، لوامیزول و لاکتون مقاومت پیدا کردند (۲۱). بر طبق یافته‌ها، مهم‌ترین نماتدهای گوسفندی که به درمان دارویی مقاوم بوده، سیرکومسینکتا و همونکوس کنتورتوس و تریشوریس و به میزان کمتر نماتدیروس می‌باشند (۲۳). انگل مارشالاژیا مارشالی جزء شایع‌ترین نماتدهای شیردان نشخوارکنندگان کوچک می‌باشد و مطالعات نشان داده که رشد انگل مارشالاژیا مارشالی در غدد شیردان باعث ایجاد تغییرات پاتوفیزیولوژیک و هیستولوژیکی مختلف و افت تولید در گوسفند می‌شود (۲۲). در حال حاضر صنعت پرورش گوسفند برای کنترل ضرر و زیان ناشی از عفونت کرم روده به دنبال بررسی استراتژی‌های جایگزین است (۱۶). برخی از این استراتژی‌های جایگزین شامل تغذیه پیشرفته، مدیریت مرتع، توسعه واکسن و انتخاب ژنتیکی برای مقاومت در برابر نماتدها می‌باشند. گرچه بسیاری از این استراتژی‌ها نیاز به یک برنامه کنترل بیماری پایدار خواهد داشت، لیکن ریشه‌کن کردن کامل این بیماری به دلیل سابقه تکاملی طولانی انگل‌های گوارشی با گوسفند بسیار دشوار است (۱). شواهدی توجیه می‌کند که برخی از ژن‌ها، ازجمله دو منبع MHC[1] و IFNγ[2] در مقاومت به انگل روده در نژادهای مختلف گوسفند دست داشته است (۳). چندشکلی در MHC با افزایش توانایی مقاومت در برابر نماتد در گوسفند همراه است (۱۷). پایگاه داده QTL[3] حیوانات نشان داد که در مجموع ۷۵۳ QTL برای صفات مختلف اقتصادی در گوسفند گزارش‌شده که در این میان، ۸۱ از این QTLها مربوط به ویژگی مقاومت به انگل و دارای توزیع در تمام کروموزوم‌های گوسفند هست. بااین‌حال، QTLهای مربوط به مقاومت انگل در کروموزوم ۳ بیشتر بوده است. در میان انگل‌های مختلف، ۴۴ از ۸۱ QTL کنترل‌کننده مقاومت در برابر گونه‌های همونکوس گزارش‌شده است. همچنین ۲۰ تا در گونه تریشوسترونژیلوس، ۱۱ گونه در نماتدیروس و شش گونه در استرونژیلا گزارش‌شده است (۱۲). در مجموع از ۲۴۳ توالی ژن انتخاب‌شده، در میان ۴۱ SNP شناسایی‌شده، ۲۷ عدد در کروموزوم ۳ با حداکثر تعداد QTLهای مربوط به ویژگی مقاومت انگل در گوسفند واقع‌شده‌اند. از ۱۴ SNPها باقی‌مانده، سه عدد در هر یک از کروموزوم ۱ و ۱۲، دو عدد در هر یک از کروموزوم‌های ۱۱، ۱۶ و ۲۷ و یکی در کروموزوم ۸ و ۱۳ قرار دارند (۲۵). به‌طور قابل‌توجهی کروموزوم ۳ گوسفند دارای بیشترین تعداد QTL با مقاومت در برابر نماتد دستگاه گوارش است (۲۵). ریز ماهواره‌ها کوتاه‌ترین توالی‌های تکراری (۱ تا ۶ جفت بازی) بوده که تعداد واحد تکرارشونده در هر محل، تنها چند باز تا حدود ۳۰ باز متفاوت است. ریز ماهواره‌ها بسیار فراوان بوده و در سرتاسر ژنوم منتشر می‌باشند. چندشکلی بالا و آسانی نسبی در اسکوربندی و تجزیه‌ی راحت داده‌های حاصل، از ویژگی‌های مهم نشانگرهای ریز ماهواره است که موجب توسعه مطالعات آن شده است (۳۲). گذشته از این، ریز ماهواره‌ها درجه بالایی از انتقال‌پذیری میان گونه‌ها را نشان داده‌اند. هم بارز بودن و پراکنش ریز ماهواره‌ها در تمام ژنوم از دیگر مزایای مهم این نشانگرها می‌باشد. ازآنجاکه برای یک جایگاه که آغازگر ریز ماهواره بر اساس آن طراحی‌شده، آلل‌های متعددی یافت می‌شوند، این نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی قابلیت بالایی دارد (۱۴). کمپلکس اصلی سازگاری بافتی روی کروموزوم شماره‌ی ۲۰ گوسفند قرار دارد. جایگاه MHC دو نوع ژن چندشکلی MHC دارد، ژن‌های MHC کلاس I و ژن‌های MHC کلاسII که دو نوع پروتئین را کد می‌کنند که ازنظر ساختمانی متفاوت اما پروتئین‌های مشابهی هستند. ژن Ovar-DRB2 شبه ژن است و فاقد اگزون ۱ و ۲ و نیز دارای دو کدون پایان نابجا و سایر جهش‌هایی که در قسمت‌های غیرکاربردی ترجمه می‌شوند (۴). هدف از مبارزه جهت نابودی انگل‌ها نه‌تنها به خاطر ضرر اقتصادی آن‌ها بلکه به خاطر انتقال آلودگی‌های انگلی به انسان نیز می‌باشد. آلودگی‌های کرمی یکی از شایع‌ترین امراض دامی بوده و علاوه بر مشکلات مستقیمی که در دام‌ها ایجاد می‌کنند، زمینه را برای امراض باکتریایی و ویروسی مساعد کرده و حتی در بسیاری از موارد منجر به مرگ دام‌ها می‌شود. برخی از این انگل‌ها نیز بخشی از سیر تکاملی خود را در بدن انسان طی می‌کنند و این مسئله مؤید این مطلب است که بهداشت انسان و دام ارتباط مستقیمی با هم داشته و تحت چنین شرایطی آنچه بیش از همه آزاردهنده است، اهمال در استفاده‌ی بهینه از توان فعلی کشور در زمینه کنترل بیماری‌های انگلی است. از آنجایی‌که هزاره جدید به‌عنوان هزاره‌ی رهایی از گرسنگی و امنیت غذایی نامیده شده، باید شاهد تلاش‌ها و تحقیقاتی در زمینه یافتن منابع جدید تأمین مواد غذایی باشیم. ازاین‌رو، شرط شناخت کافی در زمینه منابع جدید، انجام مطالعات و تحقیقات پایه و کاربردی وسیع می‌باشد. در این راستا نباید بیماری‌های انگلی و خسارات ناشی از آن‌ها را در کاهش تولید پروتئین به منشأ حیوانی و انتقال بیماری‌های انگلی نادیده گرفت. هدف از این پژوهش بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن DRB2 و تعداد تخم انگل مارشالاژیا مارشالی در گوسفند نژاد قزل بود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۸۰ بره نر و تقریباً هم‌سن (۴ تا ۶ ماهه) نژاد قزل که از ۴ گله (۲۰ رأس از هر گله) مردمی استان آذربایجان شرقی (که همکاری نزدیکی با جهاد کشاورزی استان آذربایجان شرقی دارند) به‌طور تصادفی انتخاب و نمونه‌گیری در دو نوبت به فاصله یک هفته از هم انجام شد. نمونه‌های مدفوع نیز از رکتوم گوسفند جمع‌آوری شده و در آزمایشگاه شمارش تعداد تخم انگل به روش کلیتون لین انجام گردید. سپس بر طبق فرمول زیر تعداد تخم انگل در گرم (EPG) حساب شد:

$$EPG= [n+ (n/6)] \times m$$

n=تعداد تخم انگل شمارش‌شده

m =امتیاز مدفوعی

صفت اصلی برای ارزیابی وضعیت مقاومت در حیوانات تحت چالش انگل‌های مشابه FEC است (۲۲). برای گوسفند، تعداد تخم در مدفوع (FEC) به‌طورکلی به‌عنوان یک ابزار برای

[DOI: 10.29252/rap.8.16.152]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:58 +0330 on Tuesday October 15th 2019

تعیین کمیت انگل استفاده می‌شود. درحالی‌که ممکن است این روش ایده آل باشد، اما تعداد تخم در مدفوع می‌تواند بسته به فصل و مرحله تولید متفاوت باشد (۳۰). تعداد ۸۰ نمونه خونی با استفاده از لوله‌های و نوجکت حاوی ماده‌ی ضد انعقاد K3 EDTA از ورید وداج جمع‌آوری گردیده و در همان روز در داخل یخچال یونولیتی به آزمایشگاه منتقل و استخراج DNA به روش کلروفرم–ایزوآمیل الکل از نمونه‌های خونی انجام گردید (۲۹). DNA استخراج‌شده بعد از تعیین کمیت و کیفیت به روش اسپکتروفوتومتر، با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از دو پرایمر اختصاصی و با توالی‌های زیر جهت تکثیر اینترون شماره‌ی۵ ژن Ovar-DRB2 معرفی شده بودند، انجام شد (۸).

OLADRB2F5‘CTGCCATGCAGAGACACAAG A3‘
OLADRB2R5‘GTCTGTCTCCTGTCTTGTCTC A T 3‘

چرخه‌های حرارتی PCR نیز به‌قرار زیر صورت پذیرفت، ۱– واسرشته سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۲– واسرشته سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳– اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه با دمای ۵۹ درجه، ۴– مرحله بسط به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۵– تکرار مراحل ۴–۲ به تعداد ۳۵ دور، ۶– مرحله بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. پس از انجام مراحل PCR قطعات DNA تکثیرشده طی انجام الکتروفورز با ژل آگارز ۳ درصد از یکدیگر تفکیک شده و سپس به‌وسیله رنگ‌آمیزی به روش اتیدیوم بروماید نمایان شدند. سپس به‌وسیله دستگاه Geldoc از ژل‌ها تصویربرداری شد. همچنین توسط نرم‌افزار UVIDOC باندهای به‌دست‌آمده مورد سنجش قرارگرفته (۸) و ارتباط آن‌ها با صفت مقاومت به انگل‌های داخلی که یک صفت آستانه‌ای بوده، بررسی گردید. برای انجام آنالیزهای آماری داده‌های نتایج به‌دست‌آمده به خاطر ماهیت اندازه‌گیری مکرر از رویه‌ی مدل مختلط در نرم‌افزار SAS استفاده شد. در این مدل اثر ژنوتیپ و گله را ثابت در نظر گرفته شد (۱۸).

$Y_{ijk} = \mu + H_i + G_j + LAMB\ (H\times G)_{ij} + e_{ijk}$

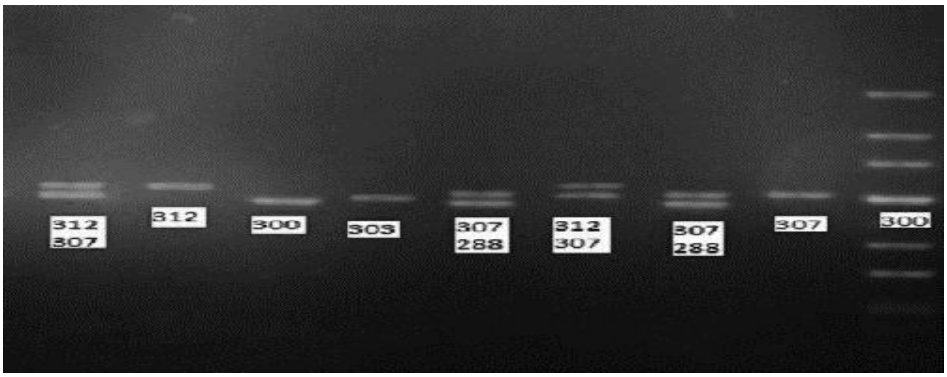
H_i = اثر ثابت گله، G_j = اثر ثابت ژنوتیپ

$LAMB(H\times G)_{ij}$= اثرتصادفی حیوان داخل ژنوتیپ ×گله،

e_{ijk}= عوامل باقی‌مانده

نتایج و بحث

نتایج حاصل از چرخه‌های حرارتی PCR نشان داد که این جایگاه به‌خوبی تکثیر شد. دامنه آللی به‌دست آمده بین ۲۷۴bp تا ۳۱۸ تعیین گردید، که آلل ۳۰۰ دارای بیشترین فراوانی بود، که نتایج مربوطه برای جایگاه اینترون ۵ ژن DRB2 در جدول ۱ و ۲ و شکل ۱ آمده است.



شکل ۱– الل‌های مربوط به ناحیه اینترون ۵ ژن DRB2 در گوسفند نژاد قزل
Figure 1. The alleles of introns 5 region belonging to DRB2 gene in Ghezel sheep breed

جدول ۱– فراوانی ژنوتیپ‌های ژن DRB2 در گوسفند نژاد قزل
Table 1. The frequency of DRB2 genotypes in Ghezel sheep breed

ژنوتیپ	۳۰۷ –۳۰۷	۳۰۰ –۳۰۰	۲۸۸ –۲۸۸	۲۸۳–۲۸۳	۲۸۱–۲۸۱	۲۷۸–۲۷۸	۲۷۴–۲۷۴
فراوانی	۰/۰۷	۰/۱۸	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۶	۰/۰۵
ژنوتیپ	۳۰۰–۲۸۳	۳۰۷– ۲۸۸	۳۰۷– ۳۱۲	۳۱۸– ۳۱۸	۳۱۲– ۳۱۲	۳۱۸– ۳۱۲	
فراوانی	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۱۲	۰/۰۷	۰/۰۹	

جدول ۲– فراوانی ژن DRB2 در گوسفند نژاد قزل
Table 2. The frequency of DRB2 alleles in Ghezel sheep breed

آلل	۲۷۴	۲۷۸	۲۸۱	۲۸۳	۲۸۸	۳۰۰	۳۰۷	۳۱۲	۳۱۸
فراوانی	۰/۰۴	۰/۰۵	۰/۰۹	۰/۱۳	۰/۰۴	۰/۱۹	۰/۱۳	۰/۱۲	۰/۲۱

[DOI: 10.29252/rap.8.16.152]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:58 +0330 on Tuesday October 15th 2019

در این تحقیق، تعداد آلل در ناحیه اینترون ۵ ژن DRB2 در نژاد قزل برابر با ۹ آلل با دامنه بین ۲۷۴ تا ۳۱۸ جفت باز به دست آمد که با تعداد آلل به‌دست‌آمده با نژادهای Merino Corriedale Polworth, Southdown Suffolk, Border Leicester (۲) با ۱۳ آلل و در نژاد A German Rhonschaf با ۸ (۱۳) و در نژاد A Soay برابر با ۶ آلل (۲۴) و در گوسفندان پلیبوئی با ۱۵ آلل (۶) مطابقت ندارند. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت بین نژادهای مختلف باشد. در یک آزمایش، چندشکلی ریز ماهواره DRB2 در ناحیه اینترون ۵ را در دو نژاد Heatherhead و Zelaznienska در لهستان بررسی و تعداد آلل را به ترتیب ۱۱ و ۸ گزارش کردند (۴). تعدادی از صفات فنوتیپی مانند تعداد تخم مدفوع (FEC)، آنتی‌بادی‌های سرم، ائوزینوفیل محیطی، وزن زنده، پروتئین سرم و غلظت آلبومین برای شناسایی در هر دو عفونت‌های طبیعی و مصنوعی استفاده می‌شوند. حیوانات نسبتاً مقاومی نیز یافت شده‌اند که دارای ماستوسیتوز، سطوح بالایی از هیستامین و غلظت ایمنوگلوبولین E (IgE) بالایی نشان دادند (۲۸). بااین‌حال صفت فنوتیپی اصلی برای ارزیابی وضعیت مقاومت در حیوانات تحت چالش انگل‌های مشابه اندازه‌گیری FEC می‌باشد (۲۰)؛ بنابراین تعداد تخم در مدفوع (FEC) به‌طورکلی به‌عنوان یک ابزار برای تعیین کمیت انگل گوسفند استفاده می‌گردد. باوجود کارآیی بالای این روش، تعداد تخم در مدفوع بسته به فصل و مرحله تولید می‌تواند متفاوت باشد (۳۰). تفاوت بین میانگین EPG در گله‌های مختلف در جدول ۴ ارائه‌شده است. تفاوت بین EPG بین گله‌های ۱ با ۲ و ۳ با ۴ معنی‌دار نبود اما بین گله‌های در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود.

جدول ۳- تفاوت بین میانگین تعداد تخم انگل در گله‌های مختلف

Table 3. The difference between the average number of parasite eggs in different herds

	گله ۲	گله ۳	گله ۴
گله ۱	۱۴/۰۳ ns	۷۳/۳۷ **	۸۶/۴ **
گله ۲		۷۰/۲۳ **	۸۳/۲۷ **
گله ۳	۷۰/۲۳ **		۱۳/۰۳ ns

ns: غیر معنی‌دار، **: معنی‌دار در سطح ۱ درصد، واحدها بر اساس EPG می‌باشد.

در تحقیقی با استفاده از توالی‌یابی توسط Ovine 50k SNP Chip، رابطه‌ی معنی‌داری بین ناحیه‌های ژنی OAR۲۰،۱۴،۱۹ با تعداد تخم انگل شمارش‌شده پیدا گردید و نشان داد که ناحیه‌ی ژنی OAR۲۰ نزدیک به جایگاه کمپلکس سازگاری بافتی (MHC) قرار دارد (۲۶). در پژوهش‌های انجام شده در مکزیک بررسی ارتباط بین ریز ماهواره‌های ژن‌های MHC زیر کلاسI (OMHC1) و زیر کلاسII (OLA DRB1 و OLA DRB2) انجام و تعداد تخم انگل در مدفوع گوسفندان پلیبوئی که به‌صورت مصنوعی به انگل همونکوس کنتورتوس آلوده‌شده بودند، شمارش گردید. نتایج نشان دادند که چندشکلی ژن‌های MHC نقش مهمی را در ایجاد مقاومت نسبت به انگل همونکوس کنتورتوس بازی کرده و می‌توانند به‌عنوان یک نشانگر در برنامه‌های انتخاب بر اساس نشانگر و اصلاح نژاد برای ایجاد مقاومت نسبت به انگل همونکوس کنتورتوس، مورد استفاده قرار گیرند (۶). در پژوهش حاضر نیز ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی اینترون ۵ ژن DRB2 و تعداد تخم انگل مارشالاژیا مارشالی در سطح یک در صد به دست آمد که نشان‌دهنده‌ی میزان تخم انگل کمتر در بره‌های دارای ژنوتیپ‌های ۲۸۸–۲۷۸ و ۲۸۸–۲۸۸ در ناحیه اینترون ۵ ژن DRB2 نسبت به بقیه ژنوتیپ ها می‌باشد. با توجه به ارتباط معنی‌دار چندشکلی در ژن DRB2 با تعداد تخم انگل می‌توان انتظار داشت که از این چندشکلی به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژاد استفاده گردد.

به نظر می‌رسد چندشکلی اینترون ۵ ژن DRB2 ارتباط معنی‌داری با تعداد تخم انگل مارشالاژیا مارشالی در گوسفند داشته و همچنین تنوع قابل‌ملاحظه‌ی تعداد تخم انگل امکان تغییر ژنتیکی میزان تخم انگل را از طریق انتخاب فراهم می‌سازد. اگرچه صفت مربوط توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود ولی بعضی از این ژن‌ها دارای اثرات بیشتری بوده و نقش آن‌ها در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. در پژوهشی که اخیراً روی گوسفند قزل صورت گرفت که ارتباط ژن DRB1 از کلاسII کمپلکس MHC با تعداد تخم انگل های گوارشی نشان داده شد (۱۱).

منابع

1. Bishop, S. 2012. Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in small ruminants in tropical production systems. animal, 6: 741-747.
2. Blattman, A. and K. Beh. 1992. Dinucleotide repeat polymorphism within the ovine major histocompatibility complex. Animal Genetics, 23: 392-392.
3. Brown, E., J. Pilkington, D. Nussey, K. Watt, A. Hayward, R. Tucker and J. Pemberton. 2013. Detecting genes for variation in parasite burden and immunological traits in a wild population: testing the candidate gene approach. Molecular Ecology, 22: 757-773.
4. Chaleh Chaleh, A. and E. Karimi. 2011. Gastrointestinal helminthes infection of sheep slaughtered in the city of Kermanshah. Journal of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Sanandaj, 4: 17-22 (In Persian).
5. Charon, K., D. Cieslak, J. Gruszczynska, J. Kuryl, M. Pierzchala and W. Swiderek. 2002. Microsatellite polymorphism of pseudo-gene OLA-DRB2 in intron 5 in two Polish sheep breeds. Animal Science Papers and Reports, 20: 67-72.

[DOI: 10.29252/rap.8.16.152]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:58 +0330 on Tuesday October 15th 2019

6. Domke, A., V.M. Chartier, C. Gjerde, B. Höglund, J. Leine, N. Vatn and S. Stuen. 2012. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Norway. Parasitology research, 111: 185-193.
7. Etminan Rad, S. and I. Mobadi. 2005. Frequencyof species superfamily of Tricho Strongiloidea in the small animal Slaughtered in Yazd, Research and development in livestock and aquaculture, 75: 197-199 (In Persian).
8. Figueroa Castillo, J.A., R.D.M. Medina, J.M.B. Villalobos, A. Gayosso-Vázquez, R. Ulloa-Arvízu, R.A. Rodríguez and R.A. Alonso Morales. 2011. Association between major histocompatibility complex microsatellites, fecal egg count, blood packed cell volume and blood eosinophilia in Pelibuey sheep infected with Haemonchus contortus. Veterinary parasitology, 177: 339-344.
9. Geurden, T., H. Hoste, P. Jacquiet, D. Traversa, S. Sotiraki, A. Frangipanedi Regalbono and S. Privat. 2014. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. Veterinary parasitology, 201: 59-66.
10. Halliday, A.M., F. LAINSON, R. Yaga, N.F. Inglis, S. Bridgett, M. Nath and D.P. Knox. 2012. Transcriptional changes in Teladorsagia circumcincta upon encountering host tissue of differing immune status. Parasitology, 139: 387-405.
11. hajializadeh, R., A. Rafat, D. Notter, J. shoja, G. Moghaddam and A. Nematollahi. 2015. Fecal egg counts for gastro intestinalnem atodes are associated with a polymorphism in the MHC-DRB1 1gene in the I ranian Ghezel sheep breed. Frontiers in Genetics, 10: 33-89.
12. Hu, Z.L., C.A. Park, X.L. Wu and J.M. Reecy. 2013. Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. Nucleic acids research, 41: 871-879.
13. Janssen, M., C. Weimann, M. Gauly and G. Erhardt. 2002. Associations between infections with Haemonchus contortus and genetic markers on ovine chromosome 20. Paper presented at the Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, August, 13 pp.
14. Jewell, E., A. Robinson, D. Savage, T. Erwin, C.G. Love, G.A. Lim and D. Edwards. 2006. SSRPrimer and SSR taxonomy tree: Biome SSR discovery. Nucleic acids research, 34: 656-659.
15. Kaplan, R.M. and A.N. Vidyashankar. 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. Veterinary parasitology, 186: 70-78.
16. Karrow, N.A. K. Goliboski, N. Stonos, F. Schenkel and A. Peregrine. 2014. Review: Genetics of helminth resistance in sheep. Canadian Journal of Animal Science, 94: 1-9.
17. Lee, C., K. Munyard, K. Gregg, J. Wetherall, M. Stear and D. Groth. 2011. The influence of MHC and immunoglobulins A and E on host resistance to gastrointestinal nematodes in sheep. Journal of parasitology research, volume, 2001: 1-11.
18. Littell, R., P. Henry and C. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. Journal of Animal Science, 76: 1216-1231.
19. Martínez-Valladares, M., J.M. Martínez-Pérez, D. Robles-Pérez, C. Cordero-Perez, M. Famularo, N. Fernandez-Pato and F.A. Rojo-Vázquez. 2013. The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. Veterinary Parasitology, 191: 177-181.
20. McMahon, C., D. Bartley, H. Edgar, S. Ellison, J. Barley, F. Malone and I. Fairweather. 2013. Anthelmintic resistance in Northern Ireland (I): prevalence of resistance in ovine gastrointestinal nematodes, as determined through faecal egg count reduction testing. Veterinary Parasitology, 195: 122-130.
21. Mitchell, E., K. Hunt, R. Wood and B. McLea. 2010. Anthelmintic resistance on sheep farms in Wales. Veterinary Record, 166: 650-652.
22. Moradpour, N., H. Borji, G. Razmi, M. Maleki and H. Kazemi. 2013. Pathophysiology of Marshallagia marshalli in experimentally infected lambs. Parasitology, 140: 1762-1767.
23. Papadopoulos, E., E. Gallidis and S. Ptochos. 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. Veterinary Parasitology, 189: 85-88.
24. Paterson, S. 1998. Evidence for balancing selection at the major histocompatibility complex in a free-living ruminant. Journal of Heredity, 89: 289-294.
25. Periasamy, K., R. Pichler, M. Poli, S. Cristel, B. Cetrá, D. Medus and M.B. Ellahi. 2014. Candidate gene approach for parasite resistance in sheep-variation in immune pathway genes and association with fecal egg count. plos one, 9: 37-88.
26. Riggio, V., R. Pong-Wong, G. Sallé, M. Usai, S. Casu, C. Moreno and S. Bishop. 2014. A joint analysis to identify loci underlying variation in nematode resistance in three European sheep populations. Journal of Animal Breeding and Genetics, 426-436
27. Roeber, F., A.R. Jex and R.B. Gasser. 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance-an Australian perspective. Parasites and Vectors, 6: 153.
28. Saddiqi, H., M. Sarwar, Z. Iqbal, M. Nisa and M. Shahzad. 2012. Markers/parameters for the evaluation of natural resistance status of small ruminants against gastrointestinal nematodes. Animal, 6: 994-1004.
29. Shams, S.S., S.Z. Vahed, F. Soltanzad, V. Kafil, A. Barzegari, S. Atashpaz and J. Barar. 2011. Highly effective dna extraction method from fresh, frozen, dried and clotted blood samples. bioimpacts, 1: 183 pp.
30. Singleton, D., M. Stear and L. Matthews. 2011. A mechanistic model of developing immunity to Teladorsagia circumcincta infection in lambs. Parasitology, 138: 322-332.
31. Talari, S.A. and M. Arbabi. 2005. Frequency ofTrichostrongilus in sheep and goats gastrointestinal tube slaughtered in Kashan, Journal of Scientifi Research, 35: 34-38 (In Persian).
32. Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular ecology, 11: 1-16.

[DOI: 10.29252/rap.8.16.152]
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:58 +0330 on Tuesday October 15th 2019

Investigation of Relationship between DRB2 Gene Polymorphism and egg number of Marshallagia Marshalli Parasites in Gastrointestinal of Ghezel Sheep Breed

Shahram Hosseinzadeh[1] and Sayyed Abbas Rafat[2]

1- Ph.D. Student, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University
(Corresponding author: E mail: shahram.91@ms.tabrizu.ac.ir)
2- Professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
Received: February 2, 2015 Accepted: June 20, 2015

Abstract

Parasites and intestinal worms are one of the main causes of the economic decline in the sheep industry. This research carried out for consideration of microsatellite polymorphism in the intron 5 of DRB2 gene and its association with the egg numbers of Marshallagia Marshalli parasite in Ghezel sheep breed. Blood and fecal samples were obtained from 80 male lambs at the age of 4-6 months. Fecal samples were collected from the lambs' rectum and the number of fecal eggs was calculated by the Clayton Lane technique. The DNA was extracted using Chloroform- Isoamyl Alcohol and Microsatellite regions of intron 5 of the DRB2 gene were amplified. PCR products were electrophoresed on 3% Agarose gel. Allele sizes were determined by 25 bp ladder and UVidoc software. The PROC MIXED was considered for evaluation of genotypes effects on the traits. Statistical analysis showed there was significant correlation between the numbers of Marshallagia Marshalli parasite eggs and the polymorphism of DRB2 gene. Therefore, lambs that had the genotypes of 288-278 and 288-288 in intron 5 of DRB2 gene had significantly ($P<0.01$) lower number of eggs compared with the others. In conclusion, the polymorphism at this locus can be utilized as a useful tool in the selection programs based on markers.

Keywords: DRB2, Ghezel Breed, Marshallagia marshalli parasites, Microsatellite