دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

" مقاله پژوهشی"

بررسی چند شکلی اگزون ۲ ژن MHC-DRB1 با روش PCR-RFLP و ارتباط آن با صفات رشد در بز عدنی

سکینه هزارسی بوری[۱]، محمدتقی بیگی نصیری[۲]، هدایت اله روشنفکر[۲] و محمود نظری[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان،
(نویسنده مسوول: sakinehhezarsi@gmail.com)
۲ و ۳- استاد و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران
تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۸ تاریخ پذیرش: ۹۹/۳/۲۴
صفحه: ۱۰۷ تا ۱۱۵

چکیده

در مطالعه حاضر برای شناسایی چند شکلی ناحیه اگزون ۲ ژن MHC (مجتمع اصلی سازگاری بافتی) و ارتباط آن با صفات رشد (وزن تولد و سه ماهگی) در جمعیت بز عدنی، از تعداد ۹۷ راس بزعدنی استان بوشهر خون‌گیری انجام گرفت. DNA ژنومی از نمونه‌های خون استخراج و قطعه‌ای به اندازه ۲۷۹ جفت باز از ناحیه اگزون ۲ ژن MHC با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تکثیر و محصولات PCR به دست آمده به وسیله آنزیم برشی Ras I هضم شدند. نتایج بدست آمده حاکی از وجود ٤ نوع آلل A، B، C و D در این جایگاه بود که فراوانی آن‌ها در کل جمعیت به ترتیب ۵۱، ۲٦/۸، ۱۳/٤ و ۸/۸ درصد محاسبه شد. تعداد ۵ ژنوتیپ AA، AB، BB، AC و AD شناسایی شدند که فراوانی ژنوتیپی محاسبه شده آن‌ها در جمعیت به ترتیب برابر ۱٤/٤۳۲، ۲۸/۸٦٦، ۱۲/۳۷۱، ۲٦/۸۰ و ۱۷/۵۲ درصد بود. نتایج نشان‌دهنده‌ی وجود چند شکلی و میزان هتروزیگوسیتی بالا در جمعیت مورد مطالعه ابود. تعداد آلل موثر، شاخص شانون، هتروزیگوسیتی موردانتظار و مشاهده شده برای این جایگاه به ترتیب ۲/۷۹٤، ۱/۱۷۹، ۰/٦٤۲ و۰/۷۳۲ محاسبه شد. بعلاوه، آزمون کای مربع نشان داد که جمعیت در جایگاه MHC-DRB1 در تعادل هاردی-وینبرگ قرار ندارد. نتایج نشان داد که تاثیر ژنوتیپ‌های مختلف بر وزن تولد معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) اما بر وزن سه ماهگی معنی‌دار نبود (p >۰/۰۵). بعلاوه، سایر صفات مثل سن مادر، جنسیت، فصل و تیپ تولد روی هیچ کدام از صفات رشد بدن معنی‌دار نشد (p>۰/۰۵). بیشترین وزن تولد مربوط به ژنوتیپ‌های هتروزیگوت AC و AD (۳/۰۵ و ۳/۰۲ کیلوگرم) و کمترین وزن تولد مربوط به ژنوتیپ خالص AA (۱/۷۵ کیلوگرم) بود. به نظر می‌رسد با انتخاب ژنوتیپ AC و AD بتوان افزایش وزن تولد را در بز عدنی انتظار داشت. همچنین می توان از این ژن به عنوان یک ژن کاندیدا برای بهبود ژنتیکی برخی از صفات رشد در برنامه‌های اصلاح نژادی بز مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: چند شکلی، ژنMHC، بز عدنی، PCR-RFLP

مقدمه

کشور ایران به دلیل داشتن تنوع آب و هوایی و نیز وسعت زیاد دارای تنوع نژادی خوبی از بز است (۶). بز عدنی که در اصطلاح محلی به آن عیونی و عیانی هم گفته می‌شود، یکی از نژادهای بز مهم در جنوب ایران است. این نژاد در ناحیه ساحلی خلیج فارس در استان بوشهر پرورش داده می‌شود. از نظر پراکندگی، بز عدنی بومی استان بوشهر و از دسته بزهای شیری می‌باشد. این حیوان دارای رنگ بدن غالبا آهویی[۱] و به ندرت به رنگ‌های حنایی، ابلق سفید و قهوه ای، سفید، سیاه و دارای میانگین وزن بز نر ۳۶ کیلوگرم و بز ماده ۲۵ کیلوگرم می‌باشد (۱۶). از جمله مهمترین صفات اقتصادی در بز عدنی قدرت سازگاری بالا به شرایط نامساعد محیطی، بازده مصرف خوراک، نیاز کم به جایگاه و تجهیزات، زایش هر ۸ ماه یکبار، بدون میزان دوقلوزایی و بازار فروش مناسب در کشورهای حاشیه خلیج فارس است (۲۴).

ژن‌های کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC) به واسطه ارتباط با پاسخ‌های ایمنی (۲۷) و مقاومت و یا حساسیت به بیماری‌ها اهمیت ویژه‌ای در دامپزشکی و دامپروری دارند. MHC در واقع مکان ژنی کدکننده آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌های سطحی لنفوسیت‌هایی است که در واکنش‌های دفاعی بدن و شناسایی پروتئین‌های خارجی دخالت دارند. وجود این مکان ژنی با توجه به نقشی که مولکول‌های آن در شناسایی آنتی‌ژن‌های خودی از انواع بیگانه ایفا می‌کنند یک نیاز اساسی برای بقای موجود زنده است (۱۳). کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC) کلاستر بزرگی از ژن‌های به‌هم پیوسته است که نقش تنظیمی را در سیستم ایمنی بازی می‌کند. تاکنون ۳ کلاس عمده MHC[۱] (کلاس I، II و III) در پستانداران مشخص شده است که مولکول‌های MHC کلاس I و II، در اتصال به پپتیدهای ایمونوژن و عرضه آنها به لنفوسیت T دخالت دارند. MHC کلاس II، به صورت هتروداِیمر آلفا بتا بوده و به‌طور گسترده در سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن بیان می‌شود (۲۷). ژن‌های کلاس II مولکول‌های پروتئینی را کد می‌کنند که در سطح سلوهای ارائه کننده پادگن (ماکروفاژ و سلول‌های B) قرار دارند. ژن‌های کلاس II شامل DRA، DRB، DQA و DQB هستند. ژن‌های DR و DQ بیشترین نقش را برای مقاومت به بیماری دارند. هر دو جایگاه در گوسفند و بز چند شکلی بالایی از خود نشان داده اند (۲۹). از میان این دو جایگاه، جایگاه DRB بیشترین چند شکلی را داشته است و به همین دلیل توجه ویژه ای در مطالعات مخصوصا در گوسفند به آن شده است (۵). سه ژن DRB به نام‌های DRB1، DRB2 و DRB3 گزارش شده است. جایگاه DRB1 بیشترین چندشکلی را نشان داده است و این چند شکلی روی اگزون ۲ بیشتر مشاهده است. این اگزون کدکننده دمین خارجی MHC بخصوص رشته بتا است که محل اتصال برای یک

1- Deer color

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-06]
[DOI: 10.52547/rap.11.29.107]

آنتی‌ژن است (۱۱،۱). تا کنون بیش از ۱۶۰ آلل برای اگزون ۲ ژن DRB1 در گوسفند شناسایی شده است (۱۰).

مطالعات بسیاری ارتباط بین DRB و مقاومت نسبت به بیماریها را نشان داده‌اند، مثلا در گاو مقاومت در برابر لیکوز گاوی، ورم پستان، کارسینومای چشمی گاو، درگوسفند مقاومت نسبت به بیماری اسکرپی وتورم عقده های لنفاوی پنیری و مقاومت به نماتودهای روده‌ای و هیداتیک، در بز حساسیت در برابر بیماری تورم مفصل همراه با آنسفالیت گزارش شده است (۹،۴،۲۲،۱۴)

گزارشات نشان داده اند که آللهای DRB بر صفات تولیدی مثل تولید شیر، چربی و پروتئین در گاو (۲۸،۱۹) تولید کرک در بز (۲۵) موثرند.

مطالعات بسیاری ارتباط بین آلل‌های DRB1 و مقاومت به برخی بیماری‌ها (۱۵،۱۴) و صفات وزن در گوسفند را نشان داده‌اند (۲). اشرفی و همکاران (۲) با بررسی چندشکلی ژن DRB1 گوسفند ماکویی با استفاده از تکنیک RFLP نشان داده که بین آلل های مشاهده شده و متوسط افزایش وزن روزانه در سن ۹ و ۱۲ ماهگی ارتباط وجو دارد (۲).

با وجود اینکه چند شکلی در ژن DRB1 در گوسفند و ارتباط آن با صفات تولیدی و بیماری‌ها به فراوانی انجام شده است (۹، ۲ ، ۲۰ ، ۷ و ۳) اما تعداد مطالعات در مورد این ژن در بز بسیار اندک است (۲۶) به گونه ای حتی یک گزارش در مورد بزهای ایران وجود ندارد. با توجه به اینکه مطالعات ملکولی کمی در مورد بز عدنی انجام گرفته و نبود اطلاعات در مورد ژن DRB1 و عدم اطلاع کافی در مورد چگونگی ارتباط آن با صفت وزن در بز عدنی، این آزمایش جهت تعیین چند شکلی در اگزون ۲ ژن MHC-DBR1 بز عدنی و ارتباط آن با صفات رشد اجرا شد.

مواد و روش‌ها

در این طرح، از ۹۷ راس بز عدنی از چندین منطقه استان بوشهر به صورت تصادفی در لوله‌های ونوجکت حاوی EDTA خونگیری شد. سپس نمونه‌های خون روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید و در دمای ۲۰- فریز شدند. DNA نمونه‌های خون دام‌ها با استفاده از کیت DIAtom DNA prep استخراج گردید. برای تعیین کمیت DNA از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. سپس ناحیه اگزون ۲ ژن MHC-DRB1 به طول ۲۷۹ جفت باز به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر گردید. توالی پرایمرهای (۲) مورد استفاده عبارت بودند از:

پرایمر رفت

5´-TCTCTGCAGCACATTTCCTGG-3´

پرایمر برگشت

5´-CTCGCCGCTGCACAGTGAAAC-3´

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس، ۸/۵ میکرولیتر آب استریل و پرایمر رفت به مقدار ۱میکرولیتر، پرایمر برگشت ۱ میکرولیتر و ۲ میکرولیتر از نمونه DNA ژنومی انجام گرفت. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله ابتدایی واسرشت سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ سیکل شامل (واسرشت‌سازی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه) و دمای یک تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جهت گسترش زنجیره انجام گرفت. محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد با استفاده از دستگاه الکتروفورز افقی مشاهده و به کمک دستگاه UV عکس‌برداری از آن انجام شد.

قطعات تکثیرشده‌ی ناحیه‌ی اگزون ۲ ژن MHC-DRB3 بوسیله آنزیم RasI (SINACLON, Iran) هضم شدند. واکنش هضم آنزیمی در حجم کلی ۱۵ میکرولیتر حاوی ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر بافر هضمی، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم RasI و ۵ میکرولیتر محصول PCR آماده شد، ابتدا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباسیون و سپس با قراردادن نمونه در بن‌ماری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. بعد از هضم، محصولات برش داده شده با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردیدند. در نهایت ۴ نمونه جهت تعیین توالی و اطمینان بیشتر برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. اطلاعات جمع‌آوری شده شامل سن مادر، ژنوتیپ، جنسیت، فصل، تاریخ تولد، تیپ تولد و وزن می‌باشد. جهت بررسی ارتباط الگوهای ژنوتیپی جایگاه ژن MHC-DRB3 با صفات مرتبط با رشد شامل وزن تولد، سه ماهگی و شش ماهگی از مدل ثابت خطی با رویه GLM (مدل ثابت خطی تعمیم یافته) و از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) و مقایسه آماری میانگین‌ها با آزمون توکی-کرامر از مدل آماری زیر استفاده شد:

$$y_{ijklm}= \mu+SX_i+Bt_j+AD_k+S_l+G_m+e_{ijklm}$$

در رابطه بالا، y: مقدار فنوتیپی هریک از صفات مورد بررسی (وزن تولد، ۳ ماهگی و ۶ ماهگی)، μ: میانگین کل، SX_i: اثر جنسیت، Bt_j: اثرات ثابت تیپ تولد، AD_k: اثر ثابت سن مادر، S_l: اثر فصل، G_m: اثر ثابت ژنوتیپ حیوان و e_{ijklm}: خطای باقیمانده می‌باشد. فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی و همچنین تنوع درون‌جمعیتی با تعیین معیارهایی همچون هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و شاخص شانون مورد بررسی قرار گرفت. تعیین این مقادیر برای هر جایگاه در این جمعیت با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.3 انجام پذیرفت.

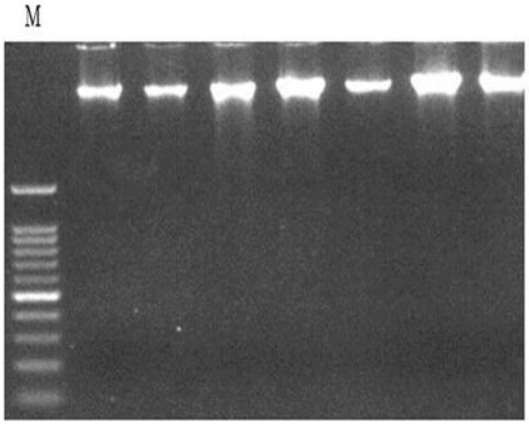
نتایج و بحث

کیفیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد و با مشاهده شکل باندها مورد بررسی قرار گرفت. وجود باندهای کاملا شارپ و بدون کمترین کشیدگی حاکی از بهترین کیفیت بود (شکل ۱). الکتروفورز محصولات تکثیر شده ژن MHC-DRB3 روی ژل آگارز ۲ درصد نشان داد که قطعه ۲۷۹ جفت‌بازی در نظر گرفته شده برای تکثیر، به خوبی و بدون هیچ‌گونه باند غیراختصاصی و محصولات ناخواسته تکثیر شد (شکل ۲).

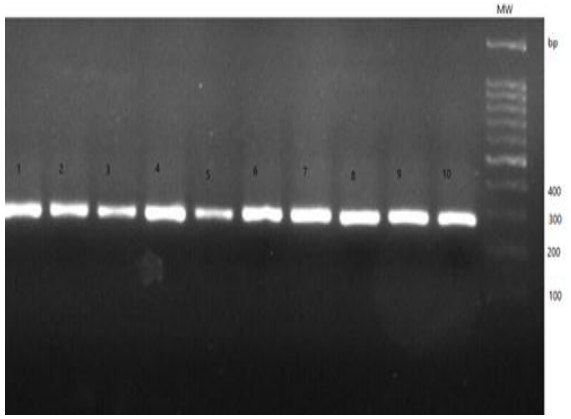
[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-06]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.107]

وجود تنها یک نوار روی ژل آگارز نشان می‌دهد که پرایمرهای بکار رفته دارای یک قطعه هدف روی DNA بودند.



شکل ۱- DNA استخراج شده از تعدادی نمونه خون بز عدنی
Figure 1. DNA extracted from 7 blood samples of Adani goat

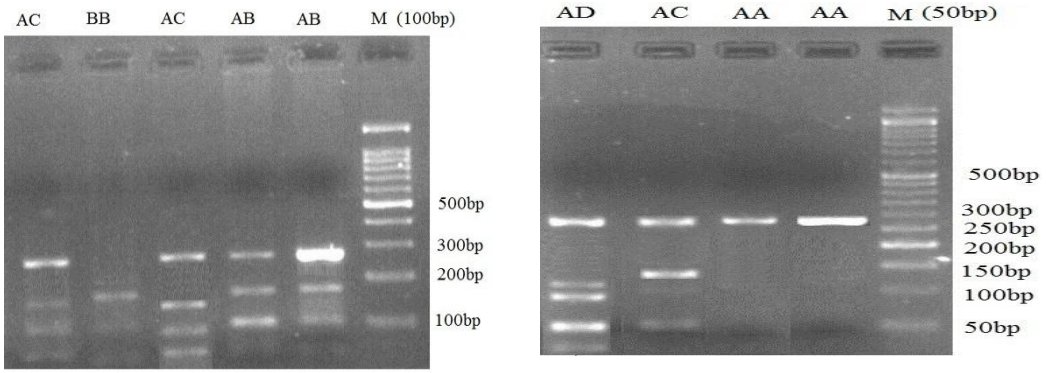


شکل ۲- محصولات PCR تکثیر شده ۲۷۹ جفت بازی ناحیه اگزون ۲ ژن MHC-DRB3 بارگذاری شده روی ژل آگارز ۲ درصد. M: نشانگر مولکولی 100bp،
Figure 2. Amplified product of 279 bp of major histocompatibility complex class II DRB1 gene in Adani goat loaded on 2% agarose gel. M: Molecular marker 100 bp

نمونه ای از تصاویر الگوهای حاصل از برش آنزیمی Ras I در شکل ۳ ارائه شده است. در شکل ۴- توالی نوکلئوتیدی اگزون ۲ ژن MHC-DRB1 یکی از نمونه‌ها، محل اتصال پرایمرها و جایگاه برش RsaI ارائه شده است.
از مهم‌ترین خصوصیات یک نشانگر مولکولی تعداد آلل‌ها، فراوانی آللی، تعداد آلل‌های موثر و هتروزیگوسیتی آن نشانگر می‌باشد. پس از بررسی و مقایسه الگوهای به دست آمده از مجموع نمونه‌ها در بز عدنی، در نهایت ۴ آلل A، B، C و D و ۵ الگوی ژنوتیپی (AA، AB، BB، AC و AD) در ژن MHC-DRB3 بز عدنی مشاهده شد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-06]

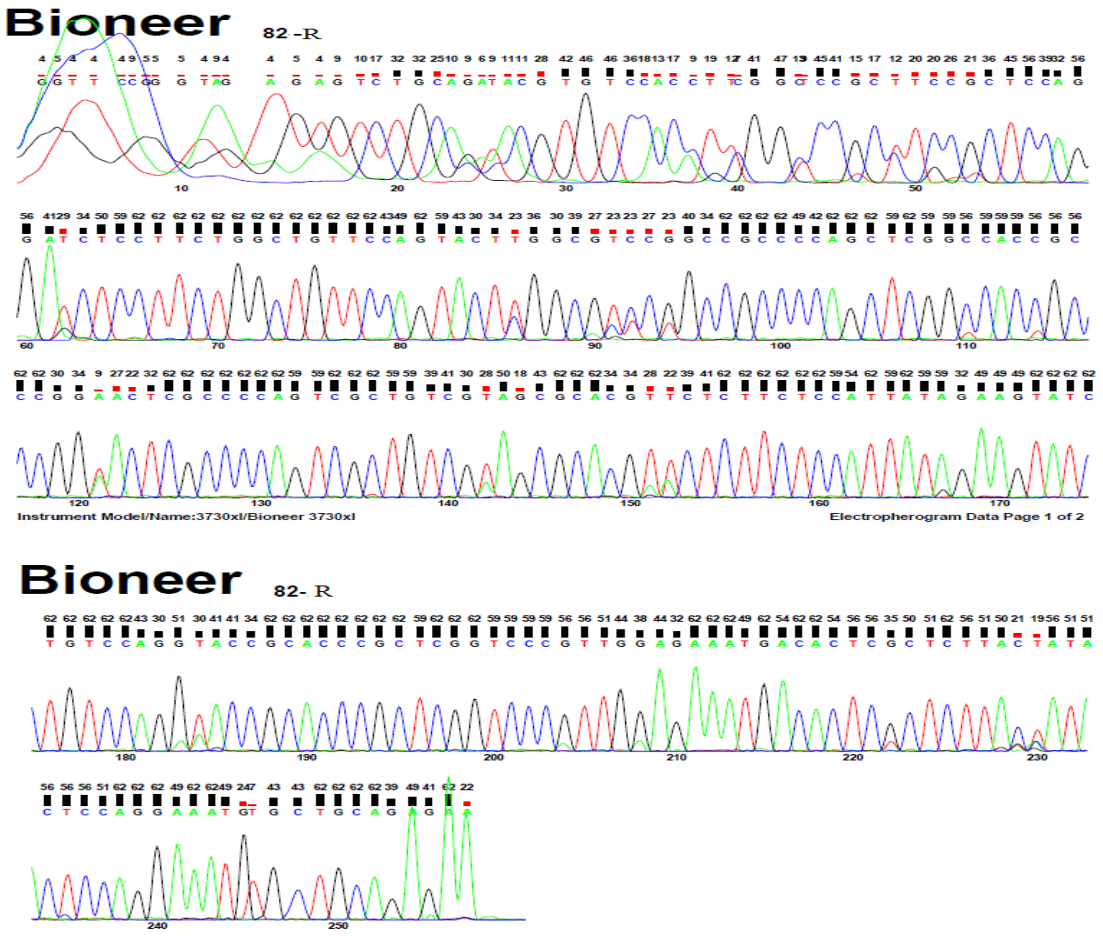
[DOI: 10.52547/rap.11.29.107]



شکل ۳- الگوهای RFLP حاصل از هضم محصولات PCR ژن MHC- DRB1 (۲۷۹ جفت باز) بز عدنی توسط آنزیم برشی Ras I.
Figure 3. PCR-RFLP patterns of exon 2 of the MHC-DRB1 gene (279bp) of Adani goat digested by RasI enzyme

Forward Primer
TCTCTGCAGCACATTTCCTGGAGTATCATAAGAGCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACCGAGCGGGTG
TGGTACCTGGACAGATACTTCTATAATGGAGAAGAGTACGTGCGCTTCGACAACGACTGGGGCGAGTA
CCGGGCGGTGGCCGAGCTGGGGCGGCCGGACGCCAAGTACTGGAACAGCCAGAAGGAGATCCTGGAG
CGGAAGCGGGCCAATGTGGACACGTACTGCAGACACAACTACGGGGTCGGTGAGA**GTTTCAGTGTGC
AGCGGCGA**

Reverse Primer



شکل ۴- توالی نوکلئوتیدی اگزون ۲ ژن MHC-DRB1 یکی از نمونه‌ها. محل اتصال پرایمرها و جایگاه برش RsaI بر روی شکل مشخص شده است.
Figure 4. Nucleotide sequence of exon 2 of the MHC-DRB1 gene in one of the samples. Primer complementary regions are indicated in bold type while the RasI sites are underlined

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-06]
[DOI: 10.52547/rap.11.29.107]

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که آلل A با فراوانی ۵۱٪ و آلل D کمترین فراوانی ۰/۰۸۸ و ژنوتیپ AB با فراوانی ۲۸/۸۶۶٪ دارای بیشترین فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی بودند (جدول ۱). تست کای اسکور انجام شده بر روی گله عدم برقراری تعادل هاردی–وینبرگ را نشان داد. مقدار کای مربع ۴۵/۲۲ بدست آمد که در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. دلیل این امر می تواند احتمالا آمیزش غیرتصادفی و انتخاب به نفع هتروزیگوت‌ها باشد.

آمار توصیفی صفات مورد مطالعه در این تحقیق در جدول ۲ ارائه شده است. پس از بررسی ارتباط الگوهای ژنوتیپی جایگاه ژن MHC- DRB3 با صفات مرتبط با رشد شامل وزن تولد، سه ماهگی و شش ماهگی نتایج زیر حاصل شد.

جدول ۱– فراوانی آللی و ژنوتیپی مشاهده شده برای اگزون ۲ ژن MHC-DRB3 در بز عدنی

Table 1. The allele frequency and genotype observed at the exon 2 of the MHC-DRB3 gene in Adani goat

گوناگونی ژنتیکی	ارزش	آلل‌ها	طول باند (جفت باز)	فراوانی (٪)	ترکیب ژنوتیپی	طول باند (جفت باز)	فراوانی (٪)	تعداد
تعداد آلل	۴	A	۲۷۹	۰/۵۱	AA	۲۷۹	۱۴/۴۳۲	۱۴
تعداد آلل های موثر	۲/۷۹۴	B	۱۷۴–۱۰۵	۲۶/۸	AB	۲۷۹–۱۷۴–۱۰۵	۲۸/۸۸۶	۲۸
شاخص شانون	۱/۱۷۹	C	۱۳۵–۸۳–۵۲	۱۳/۴	BB	۱۷۴–۱۰۵	۱۲/۳۷۱	۱۲
هتروزیگوسیتی مشاهده شده	۰/۷۳۲	D	۱۰۵–۸۳–۵۲–۳۹	۸/۸	AC	۲۷۹–۱۳۵–۸۳–۵۲	۲۶/۸۰	۲۶
هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۶۴۲				AD	۲۷۹–۱۰۵–۸۳–۵۲–۳۹	۱۷/۵۲۵	۱۷

جدول ۲– آمار توصیفی صفات رشد در بز عدنی

Table 2. Descriptive statistics of growth traits in Adani goat

صفت	تعداد دام	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف معیار
وزن‌تولد (kg)	۸۰	۱/۵	۴/۳	۲/۹	۰/۶
وزن ۳ ماهگی(kg)	۸۰	۷/۳	۲۰/۵	۱۳/۰۷	۳/۳
وزن ۶ ماهگی(kg)	۸۰	۹/۴۲۵	۲۸/۲۳۵	۱۷/۶۸	۴/۰۱

اثرات ثابت بر وزن تولد:

تاثیر جنس، تیپ تولد، سن مادر و فصل که به عنوان اثرات ثابت در مدل استفاده شدند، بر وزن تولد معنی‌دار نبودند ($p>۰/۰۵$). اما اثر ژنوتیپ بر وزن تولد معنی‌دار بود (جدول ۳). بیشترین وزن تولد مربوط به ژنوتیپ‌های هتروزیگوت AC و AD (۳/۰۵ و ۳/۰۲ کیلوگرم) و کمترین وزن تولد مربوط به ژنوتیپ خالص AA (۱/۷۵ کیلوگرم) بود (جدول ۴).

اثرات ثابت بر وزن ۳ ماهگی:

پس از ارزیابی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۰/۱۶) این نتیجه حاصل شد که داده‌های وزن ۳ ماهگی دارای توزیع نرمال بودند. نتایج ارائه شده در جدول ۵ نشان داد که اثرات ثابت مثل ژنوتیپ، سن مادر، جنسیت، تیپ تولد و فصل بر وزن ۳ ماهگی اثر معنی‌داری نداشتند ($p>۰/۰۵$).

جدول۳– جدول تجزیه واریانس برای اثرات ثابت موثر بر صفت وزن تولد

Table 3. Analysis of variance for effective fix effects on birth weight trait

تیمارها	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین‌مربعات	F value	Pr > F
سن مادر	۲	۰/۷	۰/۳	۱/۲۰	۰/۳
ژنوتیپ	۴	۳/۹	۰/۹	۳/۰۷	۰/۰۲
جنسیت	۱	۱/۱	۱/۱	۳/۴۷	۰/۰۶
فصل	۱	۰/۱	۰/۱	۰/۳۳	۰/۵
تیپ تولد	۱	۰/۵	۰/۵	۱/۶۹	۰/۱

جدول ۴– میانگین حداقل مربعات وزن تولد ژنوتیپ‌های مختلف ژن MHC-DRB3

Table 4. Mean least squares birth weight of different genotypes for MHC-DRB3 gene

ژنوتیپ	میانگین حداقل مربعات وزن تولد
AD	$۳/۰۵^{a}$ ± ۰/۲۳
AC	$۳/۰۲^{a}$ ± ۰/۱۵
AB	$۲/۷۴^{b}$ ± ۰/۱۸
BB	$۲/۶۸^{b}$ ±۰/۱۹
AA	$۱/۷۵^{c}$ ±۰/۴۴

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-06]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.107]

جدول ۵- جدول تجزیه واریانس برای اثرات ثابت موثر بر صفت وزن ۳ ماهگی
Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for 3 months weight

تیمارها	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین‌مربعات	F value	Pr > F
سن مادر	۲	۲۷/۶۸	۱۳/۸۴	۱/۳۰	۰/۲۷
ژنوتیپ	۴	۹/۶۷	۲/۴۱	۰/۲۳	۰/۹۲
جنسیت	۱	۹/۵۲	۹/۵۲	۰/۹۰	۰/۳۴
فصل	۱	۵۶/۳۸	۵۶/۳۸	۵/۳۰	۰/۲۴
تیپ تولد	۱	۳/۸۲	۳/۸۲	۰/۳۶	۰/۵۵

اثرات ثابت بر وزن ٦ ماهگی:

پس از ارزیابی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۰/۱۶) این نتیجه حاصل شد که داده‌های وزن ۶ ماهگی دارای توزیع نرمال نیستند لذا تجزیه واریانس برای این صفت انجام نشد.

این تحقیق وجود چند شکلی اگزون ۲ ژن MHC-DRB1 را در گله بز عدنی با استفاده از آنزیم برشی Ras I به خوبی نشان داد. ۴ آلل شناسایی شده در جمعیت بز عدنی ۵ ژنوتیپ مختلف ایجاد کرده است. این تحقیق اولین تحقیقی است که چند شکلی اگزون ۲ ژن DRB1 در بز را با استفاده از آنزیم برشی Ras I گزارش می‌کند. تا به حال گزارشی که نشان‌دهنده استفاده از آنزیم برشی RasI جهت تشخیص چند شکلی در اگزون ۲ ژن DRB1 بز باشد ارائه نشده است. اما چند شکلی برای این ژن در بز قبلا با استفاده از آنزیم‌های TaqI و BsaI انجام شده است (۲۶) و گزارشات بسیاری در مورد برش این ژن با آنزیم‌های مختلف از جمله TaqI، PstI، SacI، BsaI، SacII و RsaI در گوسفند وجود دارد (۹،۲۰،۲، ۷،۳، ۱۴).

استفاده از آنزیم‌های TaqI و BsaI جهت برش اگزون ۲ ژن DRB1 بز در نهایت سبب ظهور دو آلل (A و B) با سه ژنوتیپ (AA، AB و BB) گردیده است (۲۶). استفاده از آنزیم RsaI جهت برش اگزون ۲ ژن DRB1 در گوسفند، همانند نتایج این تحقیق، سبب بروز آلل‌ها و ژنوتیپ‌های فراوان شده است. در گوسفند ماکویی ۱۰ آلل و ۱۸ ژنوتیپ (۲) در نژاد روسی و فنلاندی ۱۹ آلل (۱۲)، در نژاد Laxta ۹ آلل (۸) و در نژاد قزاق ۱۴ آلل با ۲۸ ژنوتیپ (۱۵) شناسایی شده است. همچنین مطابق با نتایج این تحقیق، استفاده از آنزیم Ras I جهت برش اگزون ۲ ژن DRB3 در گاومیش سبب شناسایی چند شکلی فراوان و ایجاد ۹ آلل شده است (۲۳).

تنوع درون جمعیتی با تعیین معیارهایی همچون هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و شاخص شانون مورد بررسی قرار گرفت. شاخص‌های محاسبه شده (جدول ۱) حاکی از تنوع ژنتیکی بالای این جمعیت از نظر ژن MHC-DRB1 می‌باشد. هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۷۳۲) بیشتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۶۴۲) بود که نشان دهنده تنوع بالا در این جایگاه است (جدول ۱). مطابق با نتایج این تحقیق اشرفی و همکاران (۲) هتروزیگوسیتی مشاهده شده را برای ژن DRB1 گوسفند ماکویی ۰/۵۶ گزارش نمودند. یانگجو و همکاران (۳۰)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده در بز بومی چین را ۰/۶۳ برآورد کردند. مهرآبادی و همکاران (۱۷)، پلی‌مورفیسم ژن DRB بر روی بز ندوشن را موردبررسی قرار دادند. هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در این تحقیق به ترتیب ۰/۵۵ و ۰/۴۹ محاسبه شد. مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده بیشتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار بود که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد.

از آنجایی که جایگاه‌های RFLP دارای چند شکلی بالائی هستند و شاخص شانون بیانگر میزان تنوع ژنتیکی در هر جمعیت است، بنابراین در این مطالعه اقدام به محاسبه شاخص شانون (I) شد. شاخص شانون محاسبه شده (۱/۱۷۹) در این تحقیق نشان‌دهنده این است که این جایگاه می‌تواند برای بررسی تنوع مورد استفاده قرار گیرد (جدول ۱). هرچه شاخص شانون به صفر نزدیک شود تنوع کمتر و هرچه یک جایگاه ژنی شاخص شانون بیشتری نشان دهد تنوع بالاتر و استفاده از نشانگری که شاخص شانون بالاتری دارد جهت تعیین تنوع مناسبتر است. (۲۱). مطابق با نتایج این تحقیق، اشرفی و همکاران (۲) شاخص شانون برای ژن DRB1 گوسفند ماکویی را ۱/۷۳ گزارش نمودند.

نتایج این تحقیق نشان داد که چند شکلی در اگزون ۲ ژن MHC-DRB1 بر صفت وزن تولد موثر است و ژنوتیپ های هتروزیگوت بیشترین وزن را داشتند و هموزیگوت‌ها کمترین وزن تولد را دارند (جدول ۴). هموزیگوت AA و BB دارای وزن تولد ۱/۷۵ و ۲/۶۸ هستند در حالی که تلاقی این دو ژنوتیپ AB دارای وزن تولد ۲/۷۴ است و هتروزیگوت‌های AC و AD دارای وزن تولد ۳/۰۲ و ۳/۰۵ هستند. بنظر می‌رسد تلاقی‌گری و ایجاد هتروزیگوسیتی توانسته است سبب افزایش سیستم ایمنی بره ها شود که نتیجه این ایمنی در افزایش وزن بیشتر خود را نشان داده است. بنظر می‌رسد اثر این هتروزیگوسیتی در دوران بارداری مادر و دورانی که جنین در رحم قرار دارد خود را بروز می دهد چون بین وزن ۳ ماهگی ژنوتیپ‌های مختلف تفاوتی وجود ندارد (جدول ۵).

تحقیقات زیادی نشان داده که بین چندشکلی در DRB و صفات مختلف ارتباط وجود دا رد. اشرفی و همکاران (۲) ارتباط چند شکلی اگزون ۲ ژن DRB1 با صفات وزن در نژاد گوسفند ماکویی را بررسی نمودند. آنها نشان دادند که بین آلل‌های DRB1 و متوسط افزایش وزن روزانه در ۹ و ۱۲ ماهگی ارتباط وجود دارد و بیان نمودند که این ژن می تواند به عنوان یک ژن کاندیدا در برنامه های اصلاح نژادی گوسفند مورد توجه قرار گیرد. همچنین محمدآبادی و سولیموا (۱۸)، با بررسی چند شکلی جایگاه ژنی DRB3 روی نژاد گاو یاروسلاول روس و ارتباط آن با بیماری سرطان خون، تعداد ۹ آلل را شناسایی کردند و این ژن را در این دام جهت انتخاب و انجام کارهای اصلاح نژادی بسیار مناسب

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-06]
[DOI: 10.52547/rap.11.29.107]

گزارش کردند. وجاک و همکاران (۲۸)، به بررسی همبستگی بین جندشکلی ژن DRB و سلول‌های سوماتیک شیر، تولید شیر روزانه، چربی شیر و درصد پروتئین شیر پرداختند. آن‌ها در نتایج خود DRB را به عنوان یک نشانگر کاندید برای SCC و گاوهای شیری مستعد و مقاوم در برابر ورم پستان معرفی کردند.

شیخ و همکاران (۲۵) به بررسی جند شکلی در اگزون ۲ ژن DBR در بز چانگتانگی با استفاده از دو آنزیم محدود کننده Pst I و Taq I به روش RFLP و ارتباط آن با تولید کرک پرداختند و ارتباط معنی‌داری را بین چندشکلی در این ژن و اولین و دومین سال تولید کرک گزارش نمودند.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که تکنیک PCR-RFLP برای مطالعه ژن DRB1 مناسب است. این تحقیق اولین تحقیقی است که چند شکلی اگزون ۲ ژن DRB1 بز را با استفاده از آنزیم برشی Ras I ارائه می‌کند. شاخص‌های محاسبه شده در این مطالعه نشان‌دهنده تنوع بالا در این نژاد است. هتروزیگوسیتی بالا نشان‌دهنده این است که جمعیت بز عدنی استان بوشهر در شرایط خوبی است و برای کارهای اصلاح‌نژادی مناسب می‌باشد. با توجه به اینکه ژنوتیپ AC و AD دارای بیش‌ترین وزن تولد هستند، می‌توان انتظار داشت با برنامه مناسب تلاقی گری و انجام تلاقی دو نژاد خالص A و (C و D) و ایجاد هتروزیگوسیتی وزن تولد بالاتری برای گله داشته باشیم. همچنین می‌توان انتظار داشت که این ژن به عنوان یک ژن کاندیدا برای بهبود ژنتیکی برخی صفات رشد در برنامه‌های اصلاح نژادی بز مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از مسوولین پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که هزینه این تحقیق را تامین نمودند تشکر به‌عمل می‌آید. همچنین از مسئولین محترم امور دام معاونت بهبود تولیدات دامی سازمان جهاد کشاورزی استان بوشهر مخصوصا اقای دکتر صادق یزدان‌شناس که در نمونه‌برداری همکاری نمودند قدردانی می شود.

منابع

1. Andersson, L. 1996. Major histocompatibility complex evolution. In: School LB, Lamont SJ, editors. The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1-15 pp.
2. Ashrafi, F., K. Mardani, A. Hashemi, R. Darvishzadeh and M. Farhadian. 2014. Association of molecular polymorphism in exon 2 of Ovar-DRB1 gene with weight traits in Iranian Makuie sheep breed. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 38: 126-132.
3. Brujeni, G.H.N., M. Emam, H. Mahmoudzadeh, E. Hamedmonfared, R. Talebnia Jahromi and H. Rezaei. 2009. Typing of ovar-DRB1 second exon with PCR-RFLP technique in Iranian Shaul Sheep. *Iran. J. Vet. Res.*, 10(3:28): 250-254 (In Persian).
4. Dietz, A.B., N.D. Cohen, L. Timms and M.E. Kehrli. 1997. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactation. Dairy Cows. Journal of Dairy Science, 80: 406-412.
5. Dukkipati, V.S.R., H.T. Blair, D.J. Garrick and A. Murray. 2006. Ovar-Mhc'- Ovine major histocompatibility complex: Role in genetic resistance to diseases. New Zealand Veterinary Journal, 54(4): 153-160.
6. Eghbalsaied, S., K. Ghaedi, M. Forouzanfar, M. Hajian, S.M. Hosseini and M.H. Nasr-e-Esfahan. 2009. Science and technology of farm animal Transgenesis. Yakhteh Medical Journal, 11(2): 78-87.
7. Jamshidi, R., G.H.N. Brujeni, A. Derakhshandeh and R. Talebnia. 2011. Exon 2 Ovar-DRB1 gene polymorphism in the Iranian Sangsari sheep. *Int. J. Vet. Res*., 5(1): 59-62.
8. Jugo, B.M. and A. Vicario. 2000. Single-strand conformational polymorphism and sequence polymorphism of MHC-DRB in Latxa and Karrantzar sheep: implications for Caprinae phylogeny. Immunogenetics. 51: 887-897.
9. Hajializadeh, R., A. Seyed, D. Rafat, R. Notter, G. Moghaddam and A. Nematollahi. 2015. Fecal egg counts for gastrointestinal nematodes are associated with a polymorphism in the MHC-DRB1 gene in the Iranian Ghezel sheep breed. Frontiers in Genetics, 6(105): 1-11.
10. Konnai, S., Y. Nagaoka, S. Takeshima, M. Onuma and Y. Aida. 2003. Sequences and diversity of 17 new Ovar-DRB1 alleles from three breeds of sheep. Eur J Immunogenet, 30: 275-282.
11. Konnai, S., Y. Nagaoka, S. Takesima, M. Onuma and Y. Aida. 2003b. Technical Note: DNA typing for Ovine MHC DRB1 using polymerase chain reaction-restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP). Journal of Dairy Sciense, 86: 3362-3365.
12. Kostia, S., J. Kantanen, M. Kolkkals and S.L. Varvio. 1998. Applicability of SSCP analysis for MHC genotyping: fingerprinting of *Ovar-DRB1* exon 2 alleles from Finnish and Russian breeds. Animal Genetic, 29: 453-455.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-06]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.107]

13. Lewin, H.A., G.C. Russell and E.J. Glass. 1999. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. Immunological Reviews, 167: 145-58.
14. Li, R.Y., W.Q. Hui, B. Jia, G. Shi, Q. Zhao, H. Shen, Q. Peng, L.M. Lv, Q.W. Zhou and H.T. Li. 2011 The relationship between MHC-DRB1 gene second exon polymorphism and hydatidosis resistance of Chinese merino (Sinkiang Junken type), Kazakh and Duolang sheep. Parasite. 18: 163-169.
15. Li, R.Y., B. Jia, W.J. Zhang, Z.S. Zhao, G.Q. Shi, H. Shen, Q. Peng, L.M. Lv, Q.W. Zhou and Y.C. Du. 2010. Analysis of the relationship between MHC-DRB1 gene polymorphism and hydatidosis in Kazakh sheep. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 23: 1145-1151.
16. Maramazi, S. 2014. Study of expression and polymorphism of important candidate genes and their relationship with milk production in Iranian Adani goat. Master's Thesis. Tarbiat Modares University (In Persian).
17. Mehrabadi, E., M.R. Mohammadabadi, A. Esmaeilizadeh Kashkeieh, and R.A. Ali Neghizadeh. 2011. Polymorphism of exon 2 of GoLA-DRB3 gene in Nadoshan goat using PCR-RFLP method. Journal of Animal Science Research, 3: 274-279 (In Persian).
18. Mohammadabadi, M.R. and G.E. Sulimova. 2004. Diversity of BoLA-DRB3 alleles in Russian Yaroslavl cattle (Bos taurus) by PCR-RFLP. The first congress on Animal science and Aquatic Science. Iran, Tehran (In Persian).
19. Mohammadi, A., M.R. Nassiry, J. Mosafer, M.R. Mohammadabadi and G.E. Sulimova. 2009. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of a New Allele in the Iranian Cattle Breed Sistani (Bos indicus). Russian Journal of Genetics, 45(2): 198-202.
20. Nikbakht, G., R. Hossein, M. Stear and M.A. Talebi. 2012. Allelic polymorphism in the second exon of *Ovar-DRB1* in fat-tailed sheep. Veterinary Journal. 192: 547-549 (In Persian).
21. Orians, G.H. 1990. The Preservation and valuation of biological resources. University of Washington Press.
22. Ruff, G., U. Sattler, D. Martinez, J. Maillard, C. Chartier, N. Saitbekova, M. Glowatzki and C. Gaillard. 2003. Association studies using random and candidate microsatellite loci in two infectious goat diseases. Genetics Selection, 35:113-119.
23. Rahimnahal, S., J. Fayazi, Kh. Mirzadeh, M.T. Beigi Nasiri and H.A. Roshanfekr. 2013. Investigation of polymorphism BoLA-DRB3 exon 2 gene in populations of buffaloes in Khuzestan using PCR-RFLP method. Genetic Engineering and Biotechnology, 1(2): 128-121 (In Persian).
24. Sadeghi, S.A.T., M. Rokouei, M. Vafay Valleh, M.A. Abbasi and H. Faraji Arogh. 2018. Determination of breeding goals and economic values of Adani goat in pasture system. J. of Ruminant Research, 5(4): 21-34.
25. Sheikh, F.D., T.K. Bhattacharya, P. Kumar and A. Sharma. 2006. DRB3.2 gene polymorphism and its association with pashmina production in Changthangi goat. Journal compilation, 271-276.
26. Shrivastava, K., P. Kumar, N.R. Sahoo, A. Kumar, M.F. Khan, A. Kumar, A. Prasad, B. Patel, A. Nasir, B. Bhushan and D. Sharma. 2015. Genotyping of major histocompatibility complex Class II DRB gene in Rohilkhandi goats by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing. Veterinary World, 8(10): 1183-1188.
27. Soumya, G., R. Massimo Andreatta, G. Ying, T. Kaever, M. Nielsen, C. McMurtrey, W. Hildebrand, B. Peters and D.M. Zajonc. 2017. Unconventional Peptide Presentation by Major Histocompatibility (MHC) Class I allele. J. Biol. Chem. 10.1074/jbc.M117.776542
28. Wojdak, K., I. Kmiec, I. Kowalewska-Luczak and M. Warliniski. 2007. DRB3 Gene Polymorphism and Somatic Cell Count in Milk of Jersey Cows. Journal of Animal and Veterinary Advances, 6(8): 1006-1011.
29. Yakubu, A., A. Salako, M. De Donato, M. Takeet, S. Peters, M. Adefenwa, M. Okpeku and M. Wheto, et al. 2013. Genetic diversity in exon 2 of the major histocompatibility complex class II DQB1 locus in Nigerian goats. Biochemistry Genetic, 51(11-12): 954-966.
30. Yongju, Z., X. Huizhong, S. Lixiang and Z. Jiahua. 2011. Polymorphisms in Exon 2 of MHC Class II DRB3 Gene of 10 Domestic Goats in Southwest China. Journal of Animal Science, 6: 752-756.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-06]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.107]

Investigation of Polymorphism in Exon II of MHC-DRB1 Gene Using PCR-RFLP Technique and Its Association with Growth Traits in Adani Goat

Sakine Hezarsi Bori[1], Mohammad Taghi Beigi Nassiri[2], Hedayatollah Roshanfekr[2] and Mahmood Nazari[3]

1- M.Sc. Graduate of Animal genetic and Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran,
(Corresponding Author: Email: sakinehhezarsi@gmail.com)
2 and 3- Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran
Received: February 27, 2019 Accepted: June 13, 2020

Abstract

In the present study, blood samples were collected from 97 Adani goat from Bushehr province in order to identify the polymorphism in the exon II region of MHC-DRB1 gene (Major Histocompatibility Complex) and also, its association with growth traits (birth weight and 3 months weight). Genomic DNA was extracted from blood samples. A 279-bp fragment was amplified using polymerase chain reaction (PCR). Eventually, the PCR products were digested by RasI enzyme. The results showed that there were 4 types of alleles A, B, C and D in this locus with the frequencies of %51, %26.8, %13.4 and %8.8, respectively. Five genotypes including AA, AB, BB, AC and AD were identified with the frequency of %14.432, %28.866, %12.371, %26.80 and %17.525, respectively. The results indicated polymorphism and high heterozygosity in the population under study. Also, the number of effective alleles, Shannon index, expected and observed heterozygosity for this site was calculated at 2.794, 1.179, 0.642 and 0.732, respectively. Moreover, the chi-square (χ^2) test showed that population was not in Hardy-Weinberg equilibrium. The ANOVA results showed that the effect of different genotypes on birth weight was significant ($p<0.05$), but it was not significant on 3 MW ($p<0.05$). Furthermore, other traits such as dam age, sex, season and birth type effects were not significant on the growth traits ($p<0.05$). The highest birth weight was found for heterozygous AC and AD genotypes (3.05 and 3.02 Kg, respectively), and the lowest birth weight was related to pure AA genotype (1.75 Kg). It seems that selecting AC and AD genotypes can be expected to increase birth weight in Adani goat. Also, we expect that this gene can act as a candidate gene for genetic improvement of some growth traits in goat breeding programs.

Keywords: Polymorphism, MHC Gene, RFLP, Adani Goat

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-06]

[DOI: 10.52547/rap.11.29.107]