

Research Paper

Bioinformatic Analysis of the FEZL Gene sequence in Sistani, Holstein, and their Crossbreds

Kosar Moradgholi¹, Gholam Reza Dashab², Mohammad Rokouei³ and Hadi Faraji Arough⁴

- 1- M.Sc. of Animal Breeding and Genetics, Animal Science Department, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2- Associate Professor of Animal Breeding and Genetics, Animal Science Department, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran, (Corresponding Author: dashab@uoz.ac.ir)
3- Professor of Animal Breeding and Genetics, Animal Science Department, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
4- Assistant Professor of Animal Breeding and Genetics, Department of Ostrich, Special Domestic Animals Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran

Received: 8 February, 2025

Revised: 5 April, 2025

Accepted: 3 May, 2025

Extended Abstract

Background: FEZL is one of the candidate genes related to performance, quality traits of milk, and resistance to mastitis disease in dairy cows. Mastitis is one of the common diseases in the dairy cattle population, which imposes a lot of economic losses on the farmer. Studies on genetic variation in the FEZL gene locus and their relationship with the milk somatic cell count (SCC) showed a significant relationship between genetic variants in the mentioned locus and the SCC, which is indicative of mastitis. Moreover, conflicting results have been reported about the mentioned gene variants' effects on milk's quantitative and qualitative traits. Therefore, this research aims to investigate the amount of different deletion, addition, and mutation polymorphisms in the FEZL locus, to identify important variants related to milk composition, and to investigate the difference between pure breeds and their crossbreds in Sistani and Holstein cows.

Methods: This research was conducted on 20 pure breeds of Sistani and Holstein cows (10 cows from each group) and their crossbreds of Sistani and Holstein (7 heads) from the Research Center for Sistani Cattle and Native Herds of the Sistan region. Blood was randomly selected and taken from the jugular vein. Quantitative and qualitative traits of milk were measured from morning and evening milking within three months. Total DNA from blood samples was extracted by the salt-optimized method. Then, the extracted DNA was electrophoresed on a 0.5% agarose gel, and samples of good quality were used for the PCR amplification reaction. A 229 bp fragment from the FEZL gene locus was amplified using a specific primer pair with temperature cycling in a thermocycler. Sequencing was done with Chromas software in FASTA format, followed by removing low-quality sequences. In the next step, the production areas of a single thread were removed from the back-and-forth sequence, and cantig production was done using CAP3 software. Alignment of 27 samples was performed with MEGA software in pairs and multiples. Four samples were removed due to unfavorable alignment, and 23 samples were saved for further analysis. The polymorphic regions caused by mutations, deletions, and additions, as well as haplotyping, were analyzed with MEGA6 and DNASP5 software. Finally, the effect of each marker on milk quality traits was estimated using the single marker model and the GLM procedure of SAS9 software. The type 1 error in multiple tests was reduced using the Benferroni test at the 5% probability level. Finally, the means of the groups were compared with the Tukey-Kramer method at the probability level of 5%.

Results: A total of 86 polymorphic regions were identified in exon 1 of the FEZL gene among pure and crossbred populations. In all samples, the percentages of transitional and transversal substitutions were 32.56% and 67.44%, respectively. The percentages of transitional and transversal substitutions were estimated at 50.6 and 49.4% in the Holstein breed, 28.08 and 71.92% in the Sistani breed, and 33.55 and 66.45% in crossbreds. By comparison, the lowest and the highest percentages of transitional substitution were observed in Sistani and Holstein breeds, respectively, but Holstein and Sistani breeds showed the lowest and the highest percentages of transversal substitution, respectively. The highest and the lowest coefficients of transition substitution ratio to transversal, which is an indicator of evolution during the past periods, belonged to Holstein (0.75) and Sistani (0.30) breeds, respectively. In all populations, thymine and Cytosine were respectively the most and least frequent bases in the nucleotide sequence of



the exon 1 region of the FEZL gene. The highest diversity within breeds belonged to Holstein and Sistani crossbreds (0.15), and the lowest diversity was recorded for the Sistani breed (0.044). Among different breeds, the highest degree of divergence was between crossbreds with Holstein (0.126) and the lowest between Sistani and crossbreds (0.012). Of the 77 polymorphic loci (SNPs), 33 cases were two-variant, 9 cases were three-variant, and two were four-variant. In the milk composition, the Sistani and Holstein breeds contained the lowest and the highest percentages of fat, protein, lactose, and fat-free dry matter, respectively, while middle percentages were found in the crossbreds. The effect of breeds was significant on all milk traits, except for protein percentage ($P < 0.01$). Among the identified markers, the marker at the position of 97 bp of the exon 1 of the FEZL gene had the highest effect on the fat, lactose, protein, and milk dry matter percentage traits ($P < 0.01$).

Conclusion: Despite the existence of different polymorphisms in the exon 1 of the FEZL gene and the amount of genetic diversity existing between and within the Holstein and Sistani breeds, it can be considered a useful marker in the breeding of native livestock, and the combinability strength of variants in crossbreds can be used to improve the economic traits of milk. Furthermore, polymorphism in the mentioned area was still used as an indicator to improve somatic cell counts in milk as an indicator of mastitis control in dairy cows, which was not possible to measure in this research and is recommended in future studies.

Keywords: FEZL gene, Genetic variant, QTN mapping, Sistani cattle, SNP polymorphism

How to Cite This Article: Moradgholi, K., Dashab, G. H., Rokouei M., & Faraji Arough, H. (2025). Bioinformatic Analysis of the FEZL Gene sequence in Sistani, Holstein, and their Crossbreds. *Res Anim Prod*, 16(3), 24-44. DOI: 10.61882/rap.2025.1485

مقاله پژوهشی

تجزیه بیوانفورماتیکی توالی ژن FEZL در جمعیت گاوهای خالص سیستانی،
هلستاین و آمیخته‌های آنهاکوثر مرادقلی^۱، غلامرضا داشاب^۲ ID، محمد رکوعی^۳ و هادی فرجی آروق^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، (نویسنده مسوول: dashab@uoz.ac.ir)
۳- استاد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۴- استادیار ژنتیک و اصلاح دام، گروه شترمرغ، پژوهشکده دام‌های خاص، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۱/۱۶
صفحه ۲۴ تا ۴۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۰

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: FEZL یکی از ژن‌های کاندیدا مرتبط با عملکرد، صفات کیفی شیر و مقاومت به بیماری ورم پستان در گاوهای شیری است. ورم پستان یکی از بیماری‌های شایع در جمعیت گاوهای شیری است که ضرر و زیان‌های اقتصادی زیادی را بر دامدار تحمیل می‌کند. مطالعاتی که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در جایگاه ژن FEZL و ارتباط آنها با شمار سلول‌های سوماتیکی شیر (SCC) انجام گرفته‌اند بیانگر وجود ارتباط معنی‌دار بین واریانت‌های ژنتیکی در جایگاه مذکور و شمار سلول‌های سوماتیکی شیر به عنوان شاخصی از ورم پستان هستند. همچنین، نتایج ضد و نقیض از اثرات واریانت‌های ژن مذکور بر صفات کمی و کیفی شیر گزارش شده‌اند. لذا، هدف از این تحقیق بررسی میزان چندشکلی‌های مختلف حذف، اضافه و جهش‌ها در جایگاه FEZL، شناسایی واریانت مهم مرتبط با ترکیبات شیر و بررسی میزان تفرق بین نژادهای خالص و آمیخته گاو سیستانی و هلستاین است.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر، تعداد ۲۷ رأس گاو خالص سیستانی و هلستاین (از هر گروه ۱۰ رأس) و آمیخته‌های سیستانی با هلستاین (۷ رأس) از مرکز تحقیقات گاو سیستانی و گله‌های بومی منطقه سیستان به‌طور تصادفی انتخاب و خون به‌روش نمکی-بهنه‌یافته استخراج شد. سپس DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۵ درصد الکتروفورز شد و نمونه‌هایی که کیفیت مناسبی داشتند، برای واکنش تکثیر PCR استفاده شدند. برای تکثیر قطعه ۲۲۹ جفت بازی از جایگاه ژن FEZL از یک جفت آغازگر اختصاصی با چرخه دمایی در دستگاه ترموسیکلر استفاده شد. توالی‌یابی با نرم‌افزار (Chromas) با فرمت FASTA انجام و توالی‌های بی کیفیت حذف شدند. بعد از مرحله حذف نواحی، یک رشته منفرد از توالی رفت و برگشت تولید شد، و تولید کانتیگ با استفاده از نرم‌افزار CAP3 انجام شد. همترازی ۲۷ نمونه با نرم‌افزار MEGA به‌صورت دوتایی و چندتایی انجام شد. تعداد چهار نمونه به‌دلیل همترازی نامطلوب حذف و ۲۳ نمونه برای آنالیز بعدی ذخیره شدند. تجزیه نواحی چندشکلی ناشی از جهش‌ها، حذف و اضافه و هاپلوتیپی با نرم‌افزارهای MEGA6 و DNASP5 انجام شد. در نهایت، میزان اثر هر نشانگر بر صفات کیفی شیر با مدل تک‌نشانگری و رویه GLM نرم‌افزار SAS9 برآورد شد. برای کاهش خطای نوع اول در تست‌های چندگانه از تست بنفرونی در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. در نهایت، میانگین‌های گروه‌ها با روش توکی-کرامر در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

یافته‌ها: در مجموع، ۸۶ ناحیه چندشکل در اگزون ۱ ژن FEZL در بین جمعیت‌های خالص و آمیخته شناسایی شدند. در کل نمونه‌ها، درصد جایگزینی انتقالی ۳۲/۵۶ درصد و تقاطعی ۶۷/۴۴ درصد بودند. درصد‌های جایگزینی انتقالی و تقاطعی به‌ترتیب در نژاد هلستاین ۵۰/۶ و ۴۹/۴ درصد، در نژاد سیستانی ۲۸/۰۸ و ۷۱/۹۲ درصد و در آمیخته‌ها ۳۳/۵۵ و ۶۶/۴۵ درصد برآورد شدند. در مقایسه، درصد جایگزینی انتقالی در نژاد سیستانی کمترین و در هلستاین بیشترین بود، اما درصد جایگزینی تقاطعی در هلستاین کمترین و سیستانی بیشترین بود. ضریب نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی به‌عنوان شاخصی از تکامل در طی دوره‌های گذشته (مقادیر ۰/۵ حد خنثی، بیش از ۰/۵ نشانگر دخالت انتخاب و کمتر از ۰/۵ بیانگر عدم دخالت انتخاب و تأثیر سایر عوامل تکاملی شامل جهش و مهاجرت هستند)، در هلستاین بالاترین (۰/۷۵) و در سیستانی کمترین (۰/۳۰) بود. در تمامی جمعیت‌ها، درصد فراوانی بازها در توالی نوکلئوتیدی ناحیه اگزون ۱ ژن FEZL، باز تیمین کمترین و باز سیتوزین بالاترین فراوانی را داشتند. بالاترین واگرایی در درون نژادها، مربوط به آمیخته‌های هلستاین و سیستانی (۰/۱۵) و کمترین میزان واگرایی متعلق به نژاد سیستانی (۰/۰۴۴) بود. از میزان واگرایی در بین نژادهای مختلف، بالاترین میزان واگرایی بین آمیخته‌ها با هلستاین (۰/۱۲۶) و کمترین بین سیستانی با آمیخته‌ها (۰/۰۱۲) بود. از تعداد ۷۷ جایگاه چندشکل (SNP) ۳۳ مورد دوواریانی، ۹ مورد سه‌واریانی و دو مورد چهارواریانی بودند. از نظر ترکیبات شیر، در نژاد سیستانی درصد‌های چربی، پروتئین، لاکتوز و ماده خشک بدون چربی بالاترین و در نژاد هلستاین کمترین بودند و در آمیخته‌ها در حد واسط قرار داشتند. اثر نژاد بر تمام صفات شیر به‌جز درصد پروتئین معنی‌دار بود ($P < 0.01$). از بین نشانگرهای چندشکلی (SNP)، نشانگر در موقعیت ۹۷ جفت‌بازی اگزون ۱ ژن FEZL بالاترین میزان اثر بر صفات درصد‌های چربی، لاکتوز، پروتئین و ماده خشک بدون چربی شیر را داشت ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: چندشکلی‌های مختلف در اگزون ۱ ژن FEZL و میزان فاصله ژنتیکی موجود در بین و درون نژادهای هلستاین و سیستانی را می‌توان به‌عنوان نشانگرهای مفید در اصلاح دام‌های بومی در نظر گرفت و از قدرت ترکیب‌پذیری واریانت‌ها در آمیخته‌ها جهت بهبود صفات اقتصادی شیر استفاده نمود. همچنین، چندشکلی در ناحیه مذکور را می‌توان همچنان به‌عنوان یک نشانگر در بهبود شمار سلول‌های سوماتیکی شیر به‌عنوان شاخصی از کنترل ورم پستان در گاوهای شیری استفاده نمود که در این تحقیق امکان اندازه‌گیری آن فراهم نگردید و در مطالعات بعدی توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی SNP، ژن FEZL، گاو سیستانی، مکان‌یابی QTN، واریانت ژنتیکی

مقدمه

(al., 2023). موضوع غذا و تغذیه یکی از اصلی‌ترین مسائلی است که اندیشه بشر را به‌خود مشغول کرده است و با وجود اینکه بشر در عصر جدید توانسته است در مراحل مختلف زندگی خود پیشرفت چشمگیری داشته باشد، همچنان مسئله غذا و تغذیه در جوامع انسانی از نظر اقتصادی و اجتماعی اولویت ویژه‌ای دارد (Barazandeh et al., 2016).

دامپروری در اقتصاد یک کشور یکی از مهم‌ترین شاخه‌های اقتصادی محسوب می‌شود، شغل بسیار سودآوری است و وسیله‌ای برای رونق بخشیدن به اقتصاد کشورها محسوب می‌شود (Norouzy et al., 2005; Ahsani et al., 2022; Alinaghizadeh et al., 2007; Jafari Ahmadabadi et

و تولید لاشه بسیار مطلوب برای گوشت استفاده می‌شود. گوساله این نژاد دارای بالاترین وزن در هنگام تولد در بین نژادهای شیری است. گاو هلشتاین بیشترین تولید شیر با کمترین درصد چربی را دارد.

گاوهای شیری از جمله گاوهای هلشتاین به‌جهت تولید شیر بالا دائماً در معرض بیماری ورم پستان قرار دارند و هر ساله صدمات اقتصادی متعددی را متوجه دامدار می‌نمایند، اما گاوهای بومی به‌جهت تولید شیر پایین حساسیت کمتری نسبت به بیماری ورم پستان دارند، اما تنوع در بین دام‌ها مشاهده می‌شود و بیانگر نقش و کنترل ژنتیکی این خصوصیت در بین دام‌ها است.

آمیخته‌گری روشی است برای افزایش بهره‌وری و اصلاح نژاد حیوانات که تأثیر به‌سزایی در بهبود گونه‌ها دارد (Gorbani & Behpai, 2020). این رویکرد روش متداولی برای بهره‌مندی از تفاوت‌های ژنتیکی و قابلیت ترکیب‌پذیری عام و خاص ژن‌ها در نژادهای مختلف با هدف بهبود ظرفیت‌های موجود با ترکیب ساختار ژنوم نژادهای غیر بومی است (Kamalzadeh *et al.*, 2008). آمیخته‌گری بین گاوهای بوس ایندیکوس با بوس تائوروس در منطقه سیستان ایران طی سال‌های اخیر و از طریق استفاده از اسپرم مایع، اسپرم منجمد و یا گاو نر خارجی انجام شده است. آمیخته‌گری نژادهای بومی با نژادهای خارجی با هدف افزایش تولید انجام می‌گیرد (Ehsaninia, 2011). تغییر اقلیم در منطقه و خشکسالی متمادی ایران باعث خشک شدن دریاچه هامون و متوقف شدن رشد نی گردیده است و منابع تغذیه با خوراک رایگان گاوهای سیستانی از بین رفته‌اند. در نتیجه، پرورش این دام با تأمین خوراک کنسانتره برای دامدار اقتصادی نیست. لذا در چند سال اخیر، تعداد زیادی از دامداران منطقه سیستان انگیزه‌ای برای نگهداری و پرورش نژاد خالص سیستانی ندارند و گرایش به آمیخته‌گری با اسپرم گاوهای هلشتاین، سیمنتال و مونت‌بیلیارد به‌منظور افزایش بهره‌وری در منطقه وجود داشته است (Asghari *et al.*, 2021).

انتخاب ژنتیکی برای مقاومت به ورم پستان به‌طور بالقوه می‌تواند نه‌تنها برای کاهش هزینه‌های تولید شیر بلکه برای بهبود سلامت و رفاه گاوهای شیری انجام شود. با تحریک سلول‌های غده پستانی برای ترشح یک پروتئین ضد باکتریایی، گاوهای تراریخته‌ای را تولید کردند که در برابر عفونت مقاوم بودند (Wall *et al.*, 2005). با این حال، مردم ممکن است به‌سرعت شیر حیوانات تراریخته را با وجود بهبود سلامت گله‌های شیری نپذیرند. از سوی دیگر، چندین گروه نقشه‌برداری مکان صفت کمی (QTL) را با استفاده از طرح نوه دختری برای شناسایی ژن‌های مؤثر بر مقاومت به ورم پستان آغاز کرده‌اند.

(Mohammadabadi *et al.*, 2023). امروزه اهمیت تغذیه به‌حدی است که یکی از معیارهای مهم سطح تمدن و پیشرفت هر جامعه تلقی می‌شود (Bordbar *et al.*, 2022; Shokri *et al.*, 2023). زیرا در توسعه همه جانبه یک جامعه، سطح سلامت روحی و جسمی افراد آن جامعه عامل تعیین کننده پرورش دام است (Badakhshan and Mohammadabadi 2015; Nejad *et al.*, 2024).

گاو سیستانی برترین نژاد گاو گوشتی ایران است که در برابر عوامل میکروبی مقاومت بالایی دارد و می‌تواند آب و هوای گرم را تحمل کند. گاو سیستانی یک نژاد کوهان‌دار زبو (بوس ایندیکوس) است که زیستگاه آن در جنوب شرق ایران است و در شرایط بد تغذیه عملکرد بسیار خوبی دارد. گاو سیستانی به‌عنوان یکی از پتانسیل‌ها و سرمایه‌های دامی کشور است که استعدادها و قابلیت‌های ژنتیکی بالایی از نظر تولید گوشت دارد. همچنین، خصوصیتی مانند مقاومت به بیماری‌ها، تغییرات جوی و نیز کم‌توقعی این نژاد در کنار استعداد رشد و پرورش‌شدن جبرانی گوساله‌های نر سیستانی در دوران پرواربندی، قابلیت تولید گوشت، کمیت و کیفیت لاشه و بازده غذایی و قابلیت پرواربندی مناسب در این نژاد قابل توجه است (Birjandi, 1997).

گاو سیستانی صدها سال در منطقه سیستان دارای حیات بوده است به‌گونه‌ای که آثار به‌دست آمده از حفاری‌ها و اکتشافات باستانی در شهر سوخته نشان می‌دهند که ۲۵۰۰ سال پیش از میلاد مسیح در این منطقه گاو سیستانی زندگی می‌کرده است. گاو سیستانی از حدود ۵۰۰۰ سال پیش در منطقه اطراف دریاچه هامون می‌زیسته است و همواره از آن برای کار کشاورزی، تولید شیر و گوشت استفاده شده است. جمعیت این نژاد گاو اکنون در معرض خطر انقراض قرار دارد (Mehmarian, 2006; Naderi, 2004).

گاو سیستانی در شرایط پرورش سنتی روزی ۵ الی ۷ کیلوگرم تولید شیر دارد که البته تغییرات میزان شیر به چگونگی تغذیه و انتخاب دام بستگی دارد. شیر گاو سیستانی از لحاظ مقدار چربی و پروتئین، غنی‌تر از بسیاری از نژادهای گاو است. متوسط چربی شیر گاوهای سیستانی ۴/۶ درصد است که پس از گاو تالشی بیشترین درصد چربی را در میان گاوهای ایرانی دارد.

هلشتاین از اجداد وحشی بوس تاروس منشاء گرفته است و در هلند حداقل برای ۲۰۰۰ سال پرورش داده شده است (Nafez *et al.*, 2012). گاو هلشتاین به‌علت بالا بودن ظرفیت ژنتیکی یکی از بهترین نژادهای شیری در سطح جهان شناخته می‌شود، ولی عملکرد متفاوتی را در شرایط محیطی مختلف نشان داده است (Razavi *et al.*, 2006). ظرفیت ژنتیکی حیوانات بیشتر مربوط به نژاد و کارهای اصلاح نژادی انجام یافته در ارائه الگوهای کارآمدی و تخصصی آنها به‌خصوص بر اساس نیاز جمعیت امروز جهان طراحی شده است. گاو هلشتاین به‌علت کیفیت تولید و تولید بالا و همچنین امکان پرورش در شرایط و اقلیم‌های مختلف توانسته است درصد مهمی از آمار دامی کشورها را در برگیرد. از هلشتاین به‌علت رشد نسبتاً سریع

FEZL یکی از ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات کمی و کیفی شیر و مقاومت به بیماری ورم پستان در گاوهای شیری است. در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در جایگاه ژن FEZL و ارتباط آنها با شمار سلول‌های سوماتیکی شیر (SCC) انجام شد، همبستگی ژنتیکی بسیار قوی بین واریانت‌های ژنتیکی در ژن FEZL با بیماری ورم پستان در دامنه بین ۵۰ تا ۸۰ درصد و میانگین ۷۸ درصد گزارش گردید (Urioste *et al.*, 2012). فاکتور سنتز شده از جایگاه FEZL در تنظیم رونویسی رشد عصبی نقش دارد (Hirata *et al.*, 2004). هفت QTL برای شمار تعداد سلول‌های سوماتیکی شیر شناسایی و گزارش شده‌اند که دو مورد از QTL‌های گزارش شده روی کروموزوم ۲۲ گاو قرار دارند که منطقه پوشش دهنده ژن FEZL است. گزارش شده است که بین توسعه عصبی و ایمنی از طریق بیان سیتوکین‌ها تداخلی وجود دارد (Wu *et al.*, 2001). قرار گرفتن تک آمینواسید گلیسین در بخش گلیسین FEZL تأثیر زیادی بر مستعد شدن گاوها در ابتلا به ورم پستان دارد (Sugimoto *et al.*, 2013). پروتئین FEZL در کنترل و توسعه نورون‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند (Matsuo-Takasaka *et al.*, 2000). گزارش شده است که چندشکلی در ناحیه کدکننده ژن FEZL گاو با امتیاز سلول‌های سوماتیک شیر در گاو ارتباط معنی‌داری دارد (Ali *et al.*, 2019; Sugimoto *et al.*, 2006, Sugimoto *et al.*, 2011).

مطالعات محدودی در ارتباط با بررسی ساختار ژنتیکی جایگاه ژن مذکور با صفات کمی و کیفی شیر در گذشته انجام شده‌اند که منجر به شناسایی چندین مکان کنترل کننده صفت کمی (QTL) در گاوهای شیری شده‌اند. فراتر از نقشه‌برداری دقیق، هدف نهایی تجزیه و تحلیل QTL، شناسایی ژن‌های پیوسته با QTN است که تشخیص ژن‌ها و ال‌های مقاوم را تسهیل می‌کند. لذا هدف از مطالعه حاضر، بررسی ساختار ژنتیکی جایگاه ژن FEZL و ارتباط آن با صفات مهم اقتصادی شیر در گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته‌های آنها است که در صورت شناسایی واریانت‌های تأثیرگذار بتوان در برنامه‌های اصلاحی منجر به بهبود مطلوب در شیر و ترکیبات آن گردید و همچنین امکان ترکیب‌پذیری چنین واریانت‌هایی را در آمیخته‌ها مورد بررسی قرار داد. بررسی ارتباط واریانت‌های جایگاه ژنی FEZL در گاوهای خالص هلشتاین و سیستانی و آمیخته‌های آنها با صفات کیفی شیر در این مطالعه برای اولین بار انجام می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر، تعداد ۲۷ رأس گاوهای خالص سیستانی و هلشتاین (از هر گروه ۱۰ رأس) و آمیخته‌های سیستانی با هلشتاین (۷ رأس) از مرکز تحقیقات گاو سیستانی و گله‌های بومی منطقه سیستان به‌طور تصادفی انتخاب شدند و خونگیری

از صفت شمار سلول‌های سوماتیکی شیر (SCC)^۱ به‌عنوان شاخصی غیر مستقیم که قابلیت اندازه‌گیری کمی در سطح دامداری‌ها را دارد، جهت محدود کردن و یا از بین بردن عفونت‌های ورم پستان استفاده می‌گردد. سطح مقاومت/حساسیت به بیماری ورم پستان یک صفت کمی است که تحت تأثیر چندین جایگاه ژنی قرار دارد و در مطالعات مختلف، جایگاه‌های ژنی متعددی (QTL) برای بیماری ورم پستان و صفت شمار سلول‌های سوماتیکی شیر که شاخص غیرمستقیم سطح مقاومت یا حساسیت به بیماری ورم پستان است، بر روی تمام کروموزوم‌های گاو شناسایی شده است. علاوه بر این، چندین جایگاه ژنی دخیل در سیستم ایمنی بدن از جمله عملکرد نوتروفیل‌ها و پاسخ ایمنی سازگار بافتی گزارش شده‌اند که نقش مهمی در شدت بیماری ورم پستان دارند (Malik *et al.*, 2018).

پروتئین FEZL^۲ از خانواده کروپل است و شش دامین از نوع C2H2 و یک آمینواسید ساده به نام گلیسین دارد. پروتئین مذکور به‌عنوان عامل رونویسی سرکوب کننده عمل می‌کند که به دنباله توالی 3'GCAG5' در ژن‌های هدف متصل می‌شود. یکی از ژن‌های هدف سماغورین 5A است. هنگامی که گاو به ورم پستان مبتلا می‌شود، به‌عنوان فاکتور رونویسی قادر است نکروز تومور را القا و اینترلوکین را از طریق افزایش سماغورین تحریک کند. اینترلوکین ۸ (IL8) مسئول کنترل تعداد نوتروفیل‌های در حال مهاجرت به محل عفونت است که برای رفع عفونت ورم پستان ضروری است. نتایج مطالعات نشان داده‌اند که تنوع و تغییرات در ساختار ژن FEZL به‌عنوان یک فاکتور رونویسی با عملکرد ایمنی مرتبط است و بر روی سلول‌های سوماتیک شیر (SCC) تأثیر می‌گذارد، منجر به افزایش مهاجرت نوتروفیل‌ها به محل عفونت غدد پستانی می‌شود و نقش ضد میکروبی مهمی ایفا می‌کند. بنابراین، انتخاب برای کاهش حساسیت و افزایش مقاومت به ورم پستان یک راه‌حل بالقوه بلندمدت برای کاهش این بیماری خواهد بود. هرچند که پیشرفت ژنتیکی با وراثت‌پذیری تخمین پایین که در دامنه ۰/۰۴۸ تا ۰/۱۳۴ گزارش شده در برنامه‌های مرسوم اصلاح نژاد مانعی بر سر راه است، ولی انتخاب ژنومیک و مهندسی ژنتیک با کشف، شناسایی و انتخاب مستقیم واریانت‌های ژنتیکی مسیر را هموار نموده‌اند (Chegini *et al.*, 2016).

در پایگاه داده Animal QTL، تعداد ۳۴۴ QTL مرتبط با صفات شیر در گاو از جمله درصد چربی، پروتئین، درصد ماده خشک بدون چربی، درصد لاکتوز و عملکرد تولید شیر و ۷۱ QTL مرتبط با صفات ورم پستان (SCS، CM، SCC) گزارش شده‌اند. QTL‌ها بر روی همه کروموزوم‌ها به‌جز در BTA16، BTA24 و BTAX وجود دارند (Carlen *et al.*, 2004).

¹ Somatic cell count

²- Forebrain Embryonic Zink Finger-Like

نمایش خودکار نقاط دارای ابهام برای ویرایش و حذف داده‌های با کیفیت پایین است (Lopez & Bonasora, 2017). تولید کانتینگ از توالی رفت و برگشت هر نمونه: بعد از مرحله حذف نواحی با کیفیت پایین، یک رشته منفرد از همترازی رشته توالی‌های رفت و برگشت هر نمونه تولید شد. تولید کانتینگ با استفاده از نرم‌افزار CAP3 انجام شد (Huang & Madan, 1999).

همترازی توالی‌های نوکلئوتیدی: همتراز کردن توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustal w2 و BioEdit صورت گرفت. بعد از هم‌ردیف کردن توالی‌ها، مقایسه توالی‌ها و اطلاع از فرآیندهای ژنتیکی از قبیل تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تعداد جایگاه‌هایی که در آنها جایگزینی مشابه اتفاق افتاده بود و همچنین تنوع آنها با استفاده از نرم‌افزار Dnasp v5 (Librado & Rozas, 2009) انجام شد.

فیلوژنی و تعیین مسیر تکاملی: به منظور ترسیم درخت فیلوژنتیک، توالی نوکلئوتیدی ژن FEZL برای جمعیت‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 (Tamura et al., 2013) پیش‌بینی گردید. پس از ویرایش توالی‌ها و حذف نواحی غیر کدکننده، درخت فیلوژنی با استفاده از روش NJ¹ رسم گردید. در این روش، از ماتریسی (Q) استفاده می‌شود که در این ماتریس کل شاخه‌ها به کار می‌روند و کمترین مقدار که بیان کننده شباهت بالای دو شاخه باشد انتخاب می‌شود و در یک انشعاب از درخت فیلوژنی به کار می‌رود. مقادیر Bootstrap به وسیله ۱۰۰۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد به دست آمدند. درخت فیلوژنی به وسیله روش NJ با استفاده از رابطه ۱ ترسیم شد.

$$\text{رابطه ۱} \quad (i, j) = (r - 2)d(i, j) - \sum d(i, k) - \sum d(j, k)$$

در رابطه بالا، $d(i, j)$: فاصله بین شاخه i و j ; k : شاخه k ام درخت، r : تعداد کل شاخه‌ها و $Q(i, j)$: مقدار عددی شاخه‌های i و j هستند.

همچنین، از روش حداکثر درستنمایی^۲ برای به دست آوردن میزان جانشینی به جایگزینی نوکلئوتیدها در بازهای پورینی و پیریمیدینی استفاده شد.

تعیین میزان اثر جایگاه‌های چندشکل و تعیین محل QTNها: اثرات چندشکلی بر ترکیبات شیر در قالب مدل تک‌نشاندگی با مدل‌های خطی و رویه GLM نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ مطابق با مدل ریاضی زیر برآورد شدند:

$$\text{رابطه ۲} \quad Y_{ijk} = M + \text{Breedi} + \text{SNPj} + e_{ijk}$$

در معادله بالا، Y_{ij} رکوردی مربوط به صفات شیر شامل درصد چربی، درصد پروتئین، لاکتوز و درصد ماده خشک بدون چربی است، M میانگین هر صفت، Breedi اثر نژاد شامل سیستانی، هلستاین و آمیخته‌های آنها و SNPj اثر واریانت‌های هر جایگاه نشانگر تک‌نوکلئوتیدی و e_{ijk} خطای باقیمانده هستند. برای تصحیح خطای نوع اول در تست‌های چندگانه از تست بنفرونی استفاده شد. در نهایت، میانگین‌های گروه‌های مختلف در سطح احتمال ۵ درصد و روش توکی کرامر مقایسه شدند.

از ورید گردنی انجام گرفت. تمام دام‌ها در شکم اول زایش و در سن ۲۷ تا ۳۰ ماهگی بودند. اندازه‌گیری میزان تولید شیر روزانه گاوها و صفات کیفی شیر از دو نوبت شیردوشی صبح و عصر و در طی یک دوره سه‌ماهه انجام گرفت. تجزیه صفات شیر یا میلواسکن آزمایشگاه علوم دامی انجام شد و خصوصیات درصد چربی، پروتئین، ماده خشک بدون چربی و درصد لاکتوز شیر اندازه‌گیری شدند.

خونگیری از ورید گردنی در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون (حاوی EDTA ۱ درصد) انجام گرفت. نمونه‌های خون بر روی یخ به آزمایشگاه گروه علوم دامی منتقل و تا زمان استخراج DNA در فریزر نگهداری شدند. استخراج DNA کل از نمونه‌های خون به روش نمکی-بهبهینه‌یافته شرکت زیست‌فناوری زند (زیست‌فناوری زند، دانشگاه زابل) انجام گرفت. سپس DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۵ درصد الکتروفورز شد و نمونه‌هایی که کیفیت مناسبی داشتند، برای واکنش تکثیر PCR استفاده شدند.

برای تکثیر قطعه ۲۲۹ جفت بازی از جایگاه ژن FEZL در گاوهای خالص سیستانی، هلستاین و آمیخته‌های آنها از یک جفت آغازگر اختصاصی رفت 5'-TCCAAGACGCTGCTCAGTTA-3' و برگشت 5'-CCACAGCCTGGTTGATGAC-3' (Ali et al., 2019) در دمای بهینه اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از کیت مسترمیکس شرکت زیست‌فناوری زند (شرکت زیست‌فناوری زند- دانشگاه زابل) استفاده شد.

واکنش تکثیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA نمونه (۸۴/۵ نانوگرم در میکرولیتر)، ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر، یک میکرولیتر از هر پرایمر رفت و برگشت (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر) و در نهایت ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (2X) به میکروتیوپ اضافه شدند. مخلوط همگن مذکور به دستگاه ترموسایکلر منتقل گردید. برنامه گرمایی واکنش زنجیره پلی‌مرز شامل دناتوره کردن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۵ سیکل شامل دناتوره کردن ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمر به ژن هدف در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و بسط اولیه زنجیره در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در طی یک چرخه انجام گرفت. محصولات PCR برای تعیین توالی برآساس آغازگر رفت و برگشت به شرکت توپاز ژن کاوش (توپاز ژن کاوش، تهران) ارسال و با استفاده از روش سانگر تعیین توالی شدند.

بازنگری کیفیت توالی‌ها: ویرایش داده‌های توالی‌یابی با نرم‌افزار Chromas انجام شد. توالی‌های بی‌کیفیت به‌ویژه در ابتدا و انتهای نمونه‌ها حذف شدند و مابقی توالی‌های باقی‌مانده با فرمت FASTA برای انجام آنالیزهای بعدی ذخیره شدند. کروماس یکی از نرم‌افزارهای پایه در زمینه پژوهش‌های ژنتیکی است که کار آن بررسی کیفیت توالی‌های مورد بررسی و تشخیص هم‌پوشانی‌های هتروپلاسمی و هموپلاسمی و

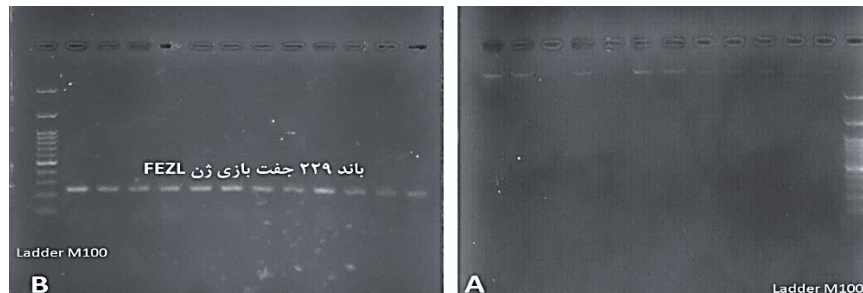
1- Neighbor-Joining

2- Maximum Composite Likelihood

نتایج و بحث

DNA به‌روش نمکی بهینه‌یافته با موفقیت استخراج شد و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۵ درصد (شکل ۱- A) بیانگر کمیت و کیفیت مناسب DNA برای انجام آزمایشات بعدی بود. میانگین غلظت DNA هر نمونه ۸۴/۵ نانوگرم در میکرولیتر با استفاده از نانودراپ محاسبه گردید. سپس، قطعه ۲۲۹ جفت

بازی از جایگاه ژن FEZL با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و دامای بهینه اتصال ۶۰ درجه سانتیگراد با دستگاه ترموسیکلر مدل اپندرف (اپندرف، امریکا) تکثیر شد و محصولات تکثیر بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. نتایج بیانگر تکثیر اختصاصی ناحیه هدف و بدون باند غیراختصاصی بودند (شکل ۲-B).



شکل ۱- الکتروفورز ۰/۵ درصد DNA استخراج شده به‌روش نمکی بهینه یافته (A) و الکتروفورز یک درصد محصولات تکثیر ناحیه ۲۲۹ جفت بازی از جایگاه ژن FEZL (B) در نمونه‌های مختلف گاوهای هلستاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها

Figure 1. Electrophoresis of 0.5% of DNA extracted by the optimized salt method (A) and electrophoresis of 1% of amplification products of the 229 bp region of the FEZL gene locus (B) in different samples of Holstein, Sistani, and their crossbreds

همترازی توالی‌ها (Alignment): هم‌ترازی یا هم‌ردیف کردن به روش‌های مرتب کردن توالی‌های دی‌ان‌ای و پروتئین گفته می‌شود، به‌طوری‌که مکان‌های مشابهت بین توالی‌ها را مشخص کند. این مکان‌های مشابهت بین دو یا چند توالی می‌توانند نشانگر ارتباط عملکردی، ساختاری یا تکاملی مابین توالی‌ها باشند.

همترازی تعداد ۲۷ نمونه مربوط به توالی ژن FEZL در نژادهای سیستانی و هلستاین و آمیخته آنها با نرم‌افزار MEGA با روش Clustal W به‌صورت دوتایی و چندگانه انجام شد (شکل ۳). تعداد چهار نمونه (۱۰، ۲۴، ۲۵ و ۲۷) به‌دلیل نتایج هم‌ترازی نامطلوب حذف و تعداد ۲۳ نمونه برای آنالیزهای بعدی ذخیره شدند. با حذف نواحی نامطلوب، یک قطعه به طول ۲۲۳ جفت باز برای بررسی ساختارهای ژنتیکی با فرمت mas ذخیره شد.

شناسایی نواحی چندشکلی: نواحی چندشکلی کل توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی FEZL در گاوهای خالص هلستاین و سیستانی و آمیخته‌های آنها در شکل ۴ نمایش داده شده‌اند. جهش‌ها از قبیل جهش‌های نقطه‌ای (تغییر تنها در یک نوکلئوتید) به‌صورت تفاوت در کاراکترهای یک ستون، یا جهش‌ای حذفی به‌صورت خط تیره در یک یا چند توالی ظاهر شده‌اند و قابل ذکر است که در هر ستون تقریباً نوکلئوتیدهای یکسانی قرار گرفته‌اند و ستون‌های دارای نوکلئوتیدهای یکسان با رنگ مشابه و ستون‌های دارای نوکلئوتیدهای متفاوت با رنگ‌های متفاوت نمایش داده می‌شوند. اختلاف نوکلئوتیدی که در هر ستون دیده می‌شود به‌دلیل چندشکلی در بین نمونه‌ها است. در ۸۶ جفت باز در ۲۳ نمونه که متعلق به گاوهای سیستانی، هلستاین و آمیخته‌های آنها بودند نواحی چندشکلی نمایان گردیدند. در بین کل نمونه‌ها به جهت مقایسه با آمیخته‌ها که میزان هتروزیگوسیتی حداکثر است، احتمال دارد.

ویرایش و آماده‌سازی داده‌های توالی سانگر: قطعه‌ی ۲۲۹ جفت بازی از ژن FEZL به‌کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به‌خوبی تکثیر شد. با استفاده از برنامه حرارتی مناسب، آغازگرهای اختصاصی و شرایط آزمایشگاهی، قطعه ۲۲۹ جفت بازی بدون قطعات غیراختصاصی به‌دست آمد. محصولات PCR جهت توالی‌یابی به شرکت توپاز ژن کاوش تهران (توپاز ژن کاوش، تهران) ارسال گردیدند و نمونه‌ها با روش سانگر تعیین توالی شدند. در توالی‌یابی سانگر، آداپتورهایی به هر کدام از نوکلئوتیدها متصل می‌شوند که در هنگام نمایان‌سازی حساس به پرتونگاری هستند و نتایج نهایی در گراف‌ها به رنگ‌های مشخصی نمایان می‌گردند. از چهار رنگ قرمز، مشکی، آبی و سبز به‌ترتیب برای تفکیک نوکلئوتیدهای تیمین، گوانین، سیتوزین و آدنین استفاده شده‌اند.

داده‌های توالی‌یابی با نرم‌افزار (Chromas) ویرایش و توالی‌های بی‌کیفیت به‌ویژه در ابتدا و انتهای نمونه‌ها حذف شدند. نواحی که دارای پیک نامشخص و روی هم افتاده هستند به‌عنوان نواحی بدون کیفیت در نظر گرفته می‌شوند و مابقی توالی‌های باقیمانده با فرمت FASTA برای انجام آنالیزهای بعدی ذخیره شدند.

تولید کانتیگ از توالی رفت و برگشت هر نمونه: بعد از مرحله حذف نواحی با کیفیت پایین، یک رشته منفرد از هم‌ترازی رشته توالی‌های رفت و برگشت هر نمونه تولید شد. تولید کانتیگ با استفاده از نرم‌افزار CAP3 (Huang & Madan, 1999) انجام شد که صفحه ورودی اطلاعات توالی‌های رفت و برگشت نمونه و در پایان بعد از اتمام تجزیه با هم‌ترازی و همسان‌سازی دو رشته تولید می‌گردد و به این ترتیب خطاهای توالی‌یابی و بخش‌های ناقص رشته ترمیم شدند (شکل ۲).

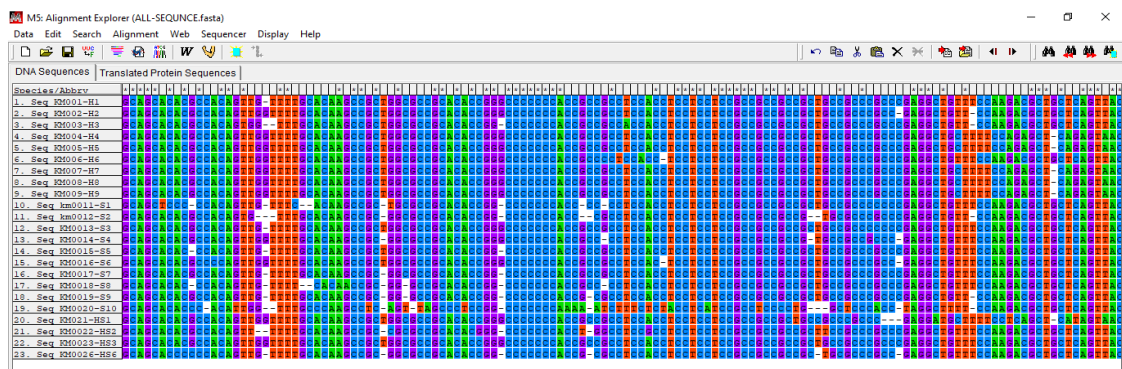
```

***** Contig 1 *****
KM005-F-F-      CCACAGCCTGGTTGATAACATGCGGTTGATGACCTTGCCCGCGGCAGCGCAGGGTACCA
consensus      CCACAGCCTGGTTGATAACATGCGGTTGATGACCTTGCCCGCGGCAGCGCAGGGTACCA
KM005-F-F-      GGCCCAAGTTGGCTTGACAGCACACGCCACAGTTGGTTTGACAACCGTGCGCGCCGACACACC
consensus      GGCCCAAGTTGGCTTGACAGCACACGCCACAGTTGGTTTGACAACCGTGCGCGCGCCGCGCCGAGG
KM005-F-F-      GGGCCCCCCCCACACCGCTCCACCTCCTCCTCCGCCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGAGG
consensus      GGGCCCCCCCCACACCGCTCCACCTCCTCCTCCGCCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGAGG
KM005-F-F-      GTTCCACAGCCTGGTTGATGACCTGCGGCTTGATGACCCTGCCCGCGGGCAGCGCCGACG
KM005-F-R+      GGCAGCGCCGACG
consensus      GTTCCACAGCCTGGTTGATGACCTGCGGCTTGATGACCCTGCCCGCGGGCAGCGCCGACG
KM005-F-F-      GTACCAGGCCAGCTCGGCCTTGACAGCACACGCCACAGTTGGTTTGCACAAGCCGCTGG
KM005-F-R+      GTACCAGGCCAGCTCGGCCTTGACAGCACACGCCACAGTTGGTTTGCACAAGCCGCTGG
consensus      GTACCAGGCCAGCTCGGCCTTGACAGCACACGCCACAGTTGGTTTGCACAAGCCGCTGG
KM005-F-F-      CGCCGCACACCGGGGCCCCCCCCACCGCCGCTCCACCTCCTCCTCCGCCCGCCGCCGCTGC
KM005-F-R+      CGCCGCACACCGGGGCCCCCCCCACCGCCGCTCCACCTCCTCCTCCGCCCGCCGCCGCTGC
consensus      CGCCGCACACCGGGGCCCCCCCCACCGCCGCTCCACCTCCTCCTCCGCCCGCCGCCGCTGC
KM005-F-F-      CGCCCGCCG
KM005-F-R+      CGCCCGCCG
consensus      CGCCCGCCG
CGCCCGCCGAGGCTGCTTTCCAGAGCTCAGAGTAAGTGAAGCAGCTCTTGAAACAG
consensus      CGCCCGCCGAGGCTGCTTTCCAGAGCTCAGAGTAAGTGAAGCAGCTCTTGAAACAG
KM005-F-R+      CGCCCGCCGAGGCTGCTTTCCAGAGCTCAGAGTAAGTGAAGCAGCTCTTGAAACAG
CCTCGGGCGGGCGGCAGCGCGCGCGGAGGAGGTGGAGCGGCGGTGGGGGGGCC
consensus      CCTCGGGCGGGCGGCAGCGCGCGCGGAGGAGGTGGAGCGGCGGTGGGGGGGCC
KM005-F-R+      CGGTGTGCGGCGCCAGCGGCTTGTCAAACTGTGGGTGTGCTGCAAGGCCAGCTGGG
consensus      CGGTGTGCGGCGCCAGCGGCTTGTCAAACTGTGGGTGTGCTGCAAGGCCAGCTGGG
KM005-F-R+      CCTGTGACGTCGCTGCCCGGGGAGGGTCATCAAGCCGAGGTCATCACCAGGTGTGGA
consensus      CCTGTGACGTCGCTGCCCGGGGAGGGTCATCAAGCCGAGGTCATCACCAGGTGTGGA

```

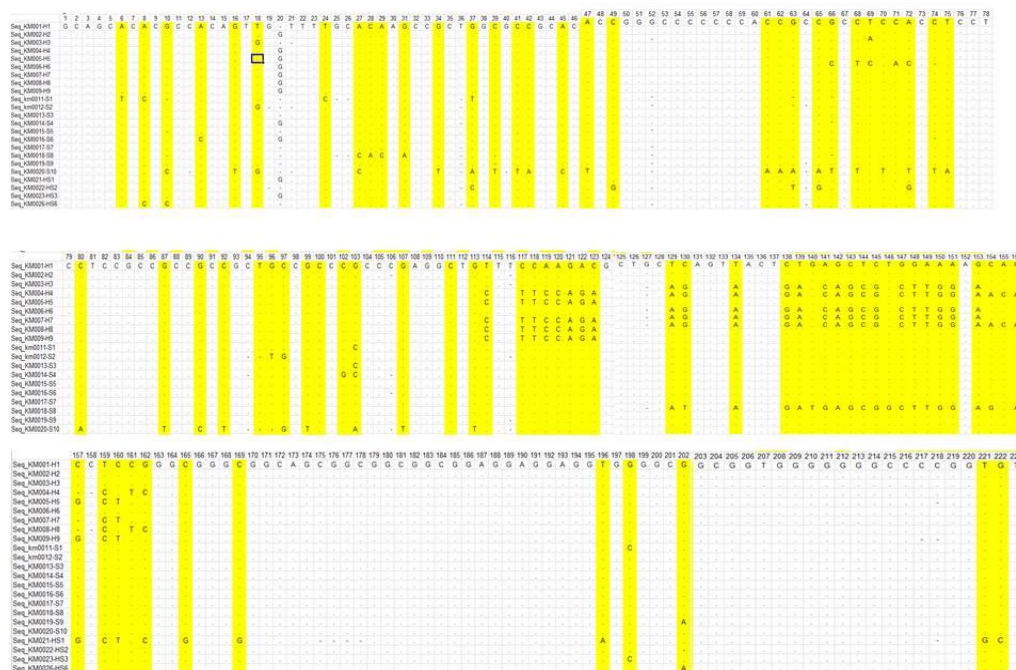
شکل ۲- تولید کانینگ از توالی‌های رفت و برگشت هر نمونه با نرم‌افزار CAP3 برای ژن FEZL در گاوهای خالص سیستانی، هلستاین و آمیخته‌های آنها

Figure 2. Contig generation from the forward and reverse sequences of each sample with CAP3 software for the FEZL gene in Sistani, Holstein, and their crossbreds



شکل ۳- نتایج همترازی (Alignment) دوتایی و چندگانه با روش Clustal W نرم‌افزار MEGA برای ژن FEZL در گاوهای هلستاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها

Figure 3. Pairwise and multiple alignment results with the Clustal W method of MEGA software for the FEZL gene in Holstein, Sistani, and their crossbreds



شکل ۴- نواحی چندشکلی در توالی ژن FEZL در گاوهای سیستمی، هلستاین و آمیخته‌های آنها
Figure 4. Polymorphic regions in the sequence of the FEZL gene in Sistani and Holstein cows and their crossbreds

گلیسین ناحیه اگزون ۱ ژن FEZL اثرات زیادی بر مسیر سیتوکین و حساس کردن گاوها به بیماری ورم پستان دارد (Sugimoto *et al.*, 2011). همچنین، یک مورد جایگزینی در تبدیل آمینواسید سرین به پرولین در ناحیه اگزون ۱ ژن FEZL گزارش شده است.

در بررسی چندشکلی ناحیه اگزون ۱ ژن FEZL در گاوهای سالم و مبتلا به بیماری ورم پستان کلینیکی گاوهای هلستاین ژاپنی با نشانگر SSCP، سه الگوی A، B و C گزارش شدند که فراوانی‌های واریانت‌ها در گاوهای شیری سالم به ترتیب ۰/۹۱۷، ۰/۰۶۹ و ۰/۰۱۴ و در گاوهای مبتلا به ورم پستان به ترتیب ۰/۰۸۵، ۰/۰۲۵ و ۰/۱۲۵ گزارش شده بودند (Ghada & Behpai, 2019).

یک جهش درج شدن در نتیجه اضافه شدن یک کدون در ناحیه اگزون ۱ ژن FEZL در گاوها منجر به افزایش طول زنجیره بسط پروتئین از ۱۲ به ۱۳ گلیسین پشت سر هم شد که با تولید دو واریانت 12G و 13G همراه بود (Sugimoto *et al.*, 2006). گزارش شده است که زنجیره بسط 13G با شمار سلول‌های سوماتیکی بالاتر در گاوهای هلستاین مرتبط بود و بیان نسی ژن سیمافورین 5A را کاهش داد که منجر به افزایش حساسیت گاوها به بیماری ورم پستان شد (Sugimoto *et al.*, 2013).

درصد شباهت ژن FEZL در بین گاوهای هندی و اروپایی ۹۹ درصد گزارش شده است. البته در ناحیه 5' به طول حدود ۰/۷ کیلو جفت‌باز ناحیه بسیار محافظت کننده گزارش شده است (Sugimoto *et al.*, 2013).

ژن FEZL یکی از ژن‌های کاندیدای مرتبط با مقاومت به بیماری ورم پستان در گاوهای شیری است. نتایج مطالعه‌ای که

پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های توالی‌یابی ژنوم در دام‌ها می‌توانند منجر به شناسایی تغییرات تعداد کپی (CNV) و میلیون‌ها SNP گردند و محققین را قادر ساخته‌اند تا با استفاده از ترکیب اطلاعات نشانگرهای ژنومی و اطلاعات فنوتیپی پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی خوبی داشته باشند. مطالعات پیوستگی فنوتیپ-ژنوتیپ به‌منظور شناسایی تنوع‌های مرتبط با صفات مختلف انجام می‌شوند (Sanchez *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2017).

توالی‌یابی محصولات تکثیر ناحیه اگزون یک ژن FEZL در گاوهای هلستاین و براون سوئیس بیانگر تنوع در توالی نوکلئوتیدها است. در مقایسه گاوهای مبتلا و مقاوم به ورم پستان، سه ناحیه چندشکلی در نواحی ۲۶۲، ۲۶۳ و ۲۶۰ جفت بازی اگزون یک گزارش شدند که به ترتیب با تغییر بازهای تیمین به آدنین، گوانین به آدنین و تیمین به سیتوزین همراه بودند. جهش ناحیه ۲۶۲ در هر دو نژاد در گاوهای مقاوم یافت شد و در گاوهای مبتلا مشاهده نشد، جهش ناحیه ۲۶۳ فقط در گاوهای مقاوم براون سوئیس یافت شد و جهش ۲۶۰ فقط در گاوهای مقاوم هلستاین مشاهده شد (Ateya *et al.*, 2022). در مطالعه اگزون یک جایگاه ژن FEZL در گاوهای خالص هندی Sahiwal و آمیخته‌های Karan Fries، هشت ناحیه چندشکلی شامل سه جایگاه حذف و اضافه (Indel) و پنج مورد جهش جایگزینی گزارش گردیدند. تغییرات مذکور منجر به تغییر توالی آمینواسید در ناحیه اگزون ۱ شده‌اند و واریانت ۱۲ گلیسین را به واریانت ۱۳ گلیسین و برعکس تبدیل نموده‌اند که واریانت ۱۳ گلیسین در گاوهای هندی مشاهده نشد و با مقاومت با بیماری ورم پستان در گاوهای هندی مرتبط است. نتایج نشان داده‌اند که اضافه شدن یک گلیسین در بسط زنجیره

تخمین مقادیر حداکثر درستنمایی، یک توپولوژی درختی به‌طور خودکار محاسبه می‌گردد. لگاریتم حداکثر احتمال درستنمایی ۷۳۲/۴۸- بود و تجزیه و تحلیل شامل ۲۳ توالی نوکلئوتیدی بود. تمام موقعیت‌های حاوی شکاف‌ها و داده‌های از دست رفته حذف شدند. در مجموع، ۱۹۱ موقعیت در مجموعه داده نهایی وجود داشتند. نرخ جایگزینی شامل جایگزینی‌های انتقالی و تقاطعی هستند. جایگزینی انتقالی شامل تبدیل یک باز پورین به پیریمیدین و برعکس بود و جایگزینی تقاطعی تبدیل یا جانشینی بازهای پورین به پورین و پیریمیدین به پیریمیدین بودند. در بین نمونه‌ها، درصد جانشینی انتقالی ۳۲/۵۶ درصد و ۶۷/۴۴ درصد جانشینی تقاطعی در بین نمونه‌ها رخ داد. جانشینی انتقالی به‌دلیل وجود پیوندهای قوی‌تر فراوانی کمتر و جانشینی تقاطعی به‌دلیل پیوندهای سست‌تر فراوانی بیشتری داشتند.

به‌منظور بررسی تنوع در اگزون ۱ ژن FEZL در گاوهای هندی و آمیخته‌های آنها با ۵۴ رأس گاو شیری انجام گرفت نشان دادند که آلل 13G در جمعیت گاوهای هندی آلل غالب بود و فراوانی ۹۸/۲ درصد داشت. همچنین، در جمعیت مذکور ۹۶/۵ درصد ژنوتیپ 13G/13G و ۳/۵ درصد هتروزیگوت بودند. واریانت 12G که با مقاومت به ورم پستان گزارش شد، در گاوهای هندی یافت نشد (Somasundaram *et al.*, 2020). ماتریس جایگزینی توالی‌ها: ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی در جایگاه ژن FEZL در بین نمونه‌های مختلف در جدول ۱ ارائه شده است. هر ورودی احتمال جایگزینی (r) از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. الگوی جانشینی و نرخ‌ها تحت مدل تامورا-نئی (۱۹۹۳) برآورد شدند. نرخ جانشینی‌های انتقالی مختلف به‌صورت پررنگ و نرخ جانشینی‌های متقاطع به‌صورت مورب نشان داده شده‌اند. برای

جدول ۱- ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی FEZL در بین کل نمونه‌ها با روش حداکثر درستنمایی
Table 1. The substitution matrix of the FEZL gene locus nucleotide sequences among all samples by the maximum likelihood method

G	C	T	A	
9.26	<i>12.48</i>	<i>4.44</i>	—	A
<i>11.83</i>	14.32	—	4.97	T
<i>11.83</i>	—	5.09	4.97	C
—	<i>12.48</i>	<i>4.44</i>	3.89	G

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. الگو و نرخ جایگزینی تحت مدل تامورا-نئی (۱۹۹۳) برآورد شده‌اند. در جدول، نرخ جهش انتقالی به‌صورت **ضخیم** و جهش تقاطعی به‌صورت *یتالیک* نشان داده شده‌اند.

Each entry is the probability of substitution (r) from one base (row) to another (column). Substitution pattern and rates were estimated under the Tamura-Nei (1993) model. Rates of different transitional substitutions are shown in **bold**, and those of transversionsal substitutions are shown in *italics*.

برآورد گردیدند. در بین توالی‌ها، بالاترین درصد جانشینی تبدیل سیتوزین به تیمین و کمترین درصد جانشینی مربوط به آدنین به تیمین و گوانین به تیمین بودند.

ماتریس جانشینی انتقالی و تقاطعی توالی‌های ژن FEZL در بین گاوهای هلشتاین در جدول ۲ ارائه شده است. اعداد در قطر و پررنگ جانشینی‌های انتقالی و اعداد خارج قطر و مورب جانشینی‌های تقاطعی را نشان می‌دهند. درصد جانشینی انتقالی برابر با ۵۰/۶ درصد و درصد جانشینی تقاطعی ۴۹/۴ درصد

جدول ۲- ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی FEZL در بین گاوهای هلشتاین با روش حداکثر درستنمایی
Table 2. The substitution matrix of nucleotide sequences of the FEZL gene locus among Holstein cows by the maximum likelihood method

G	C	T	A	
15.36	<i>9.30</i>	<i>3.06</i>	—	A
<i>9.05</i>	22.31	—	3.30	T
<i>9.05</i>	—	7.33	3.30	C
—	<i>9.30</i>	<i>3.06</i>	5.60	G

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. الگو و نرخ جایگزینی تحت مدل تامورا-نئی (۱۹۹۳) برآورد شده‌اند. در جدول، نرخ‌های جهش انتقالی به‌صورت **ضخیم** و جهش تقاطعی به‌صورت *یتالیک* نشان داده شده‌اند.

Each entry is the probability of substitution (r) from one base (row) to another (column). Substitution pattern and rates were estimated under the Tamura-Nei (1993) model. Rates of different transitional substitutions are shown in **bold**, and those of transversionsal substitutions are shown in *italics*.

برابر با ۲۸/۰۸ درصد و درصد جانشینی تقاطعی ۷۱/۹۲ درصد برآورد گردیدند. در بین توالی‌ها، بالاترین درصد جانشینی تبدیل آدنین به سیتوزین و کمترین درصد جانشینی مربوط به آدنین به تیمین و گوانین به تیمین بودند.

ماتریس جانشینی انتقالی و تقاطعی توالی‌های ژن FEZL در بین گاوهای سیستانی در جدول ۳ ارائه شده است. اعداد در قطر و پررنگ جانشینی‌های انتقالی و اعداد خارج قطر و مورب جانشینی‌ای تقاطعی را نشان می‌دهند. درصد جانشینی انتقالی

جدول ۳- ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی FEZL در بین گاوهای سیستانی با روش حداکثر درستمایی
Table 3. The substitution matrix of nucleotide sequences of the FEZL gene locus among Sistani cows by the maximum likelihood method

G	C	T	A	
8.85	<i>13.98</i>	<i>4.61</i>	—	A
<i>12.38</i>	11.78	—	<i>5.00</i>	T
<i>12.38</i>	—	3.88	<i>5.00</i>	C
—	<i>13.98</i>	<i>4.61</i>	3.57	G

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. الگو و نرخ جایگزینی تحت مدل تامورا-نی (۱۹۹۳) برآورد شده‌اند. در جدول، نرخ‌های جهش انتقالی به صورت **ضخیم** و جهش تقاطعی به صورت *یتالیک* نشان داده شده‌اند.

Each entry is the probability of substitution (r) from one base (row) to another (column). Substitution pattern and rates were estimated under the Tamura-Nei (1993) model. Rates of different transitional substitutions are shown in **bold**, and those of transversional substitutions are shown in *italics*.

ماتریس جانشینی انتقالی و تقاطعی توالی‌های ژن FEZL در بین گاوهای آمیخته در جدول ۴ ارائه شده است. اعداد در قطر و پررنگ جانشینی‌های انتقالی و اعداد خارج قطر و مورب جانشینی‌های تقاطعی را نشان می‌دهند. درصد جانشینی انتقالی برابر با ۳۳/۵۵ درصد و درصد جانشینی تقاطعی ۶۶/۴۵ درصد برآورد گردیدند. در بین توالی‌ها، بالاترین درصد جانشینی تبدیل سیتوزین به تیمین و کمترین درصد جانشینی مربوط به آدنین به تیمین و گوانین به تیمین بودند.

جدول ۴- ماتریس جایگزینی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی FEZL در بین گاوهای آمیخته با روش حداکثر درستمایی
Table 4. The substitution matrix of nucleotide sequences of the FEZL gene locus among crossbred cows by the maximum likelihood method

G	C	T	A	
11.10	<i>12.56</i>	<i>4.45</i>	—	A
<i>11.72</i>	13.43	—	<i>4.49</i>	T
<i>11.72</i>	—	4.76	<i>4.49</i>	C
—	<i>12.56</i>	<i>4.45</i>	4.26	G

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. الگو و نرخ جایگزینی تحت مدل تامورا-نی (۱۹۹۳) برآورد شده‌اند. در جدول، نرخ جهش انتقالی به صورت **ضخیم** و جهش تقاطعی به صورت *یتالیک* نشان داده شده‌اند.

Each entry is the probability of substitution (r) from one base (row) to another (column). Substitution patterns and rates were estimated under the Tamura-Nei (1993) model. Rates of different transitional substitutions are shown in **bold**, and those of transversional substitutions are shown in *italics*.

جدول ۵ درصد جایگزینی بین جمعیت‌های هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌ها را نشان می‌دهد. بالاترین و کمترین درصد جانشینی انتقالی به ترتیب مربوط به جمعیت هلشتاین و سیستانی بودند. همچنین در جانشینی‌های تقاطعی، بالاترین و کمترین درصد جانشینی به ترتیب متعلق به جمعیت‌های سیستانی و هلشتاین بودند.

جدول ۵- درصد انواع جایگزینی انتقالی و تقاطعی در بین جمعیت‌های هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌ها در جایگاه ژن FEZL
Table 5. The percentages of transitional and transversional substitution types among Holstein, Sistani, and crossbred populations in the FEZL gene

جمعیت (Population)	درصد جانشینی انتقالی Transitional substitution %	درصد جانشینی تقاطعی Transversional substitution %
هلشتاین (Holstein)	50.6	49.4
سیستانی (Sistani)	28.08	71.92
آمیخته (Crossbred)	33.55	66.45
کل جمعیت (Total population)	32.56	67.44

درصد توالی‌های مختلف جایگاه ژن FEZL در بین جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها در جدول ۶ آورده شده است. در بین تمام جمعیت‌ها، باز تیمین

جدول ۶- درصد فراوانی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژنی FEZL در داخل و بین گاوهای خالص و آمیخته سیستانی با روش حداکثر درستمایی
Table 6. Percentage frequencies of nucleotide sequences of the FEZL gene locus within and between purebred and crossbred cows by the maximum likelihood method

جمعیت (Population)	G	C	T	A
گاوهای هلشتاین (Holstein)	36.64	37.63	12.37	13.36
گاوهای سیستانی (Sistani)	34.4	38.87	12.81	13.89
آمیخته‌ها (Crossbred)	35.27	37.8	13.41	13.53
کل جمعیت (Total population)	35.08	37.01	13.16	14.75

ضریب نسبت جانشینی انتقالی به تقاطعی (r) بیانگر میزان تغییرات ژنتیکی و تکامل در طی دوره‌ای گذشته است. حد خنثی کیمورا برابر با ۰/۵ است و مقادیر بالاتر از ۰/۵ بیانگر نقش انتخاب در تکامل و کمتر از ۰/۵ عدم دخالت انتخاب و تأثیر سایر عوامل تکاملی مانند مهاجرت و جهش هستند. در مطالعه حاضر، بالاترین ضریب مربوط به نژاد هلشتاین است که در طی دهه‌های گذشته تحت تأثیر بالاترین انتخاب‌ها قرار داشتند و کمترین مربوط به نژاد سیستانی بود که بیانگر نقش کمتر انتخاب در تکامل این نژاد است (جدول ۷).

ضریب نسبت جانشینی انتقالی به تقاطعی (r) بیانگر میزان تغییرات ژنتیکی و تکامل در طی دوره‌ای گذشته است. حد خنثی کیمورا برابر با ۰/۵ است و مقادیر بالاتر از ۰/۵ بیانگر نقش انتخاب در تکامل و کمتر از ۰/۵ عدم دخالت انتخاب و تأثیر سایر عوامل تکاملی مانند مهاجرت و جهش هستند. در مطالعه حاضر، بالاترین ضریب مربوط به نژاد هلشتاین است که در طی دهه‌های گذشته تحت تأثیر بالاترین انتخاب‌ها قرار داشتند و کمترین مربوط به نژاد سیستانی بود که بیانگر نقش کمتر انتخاب در تکامل این نژاد است (جدول ۷).

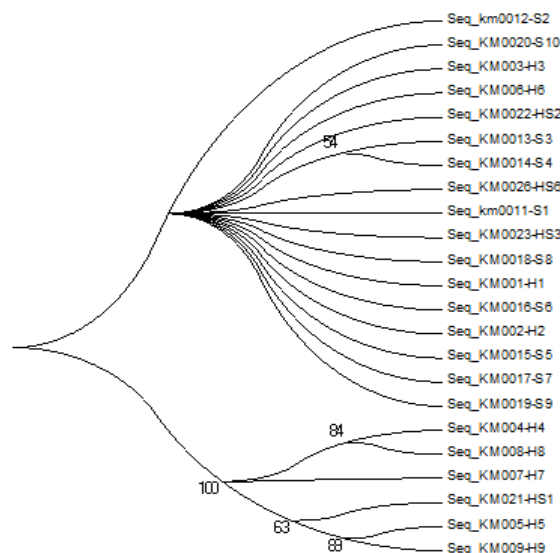
جدول ۷- ضریب جایگزینی انتقالی به تقاطعی در جایگاه ژن FEZL در جمعیت‌های هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها
Table 7. Transitional and transversional substitution coefficients at the FEZL gene locus in Holstein, Sistani, and their crossbred populations

نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی (r) Ratio of transition to transversional substitution	جمعیت (Population)
0.75	هلشتاین (Holstein)
0.3	سیستانی (Sistani)
0.37	آمیخته (Crossbred)
0.38	کل (Total)

متعدد از داده‌های اولیه است و برای آزمون درخت‌های ترسیم شده با روش‌های فاصله‌ای و درستمایی به کار گرفته می‌شود. نتایج حاصل از این درخت به صورت عدد در کنار درخت نمایان می‌گردند و در واقع درصد دفعاتی است که هر شاخه مشخص در نمونه‌برداری مختلف توسط این آزمون و درخت‌های حاصل از آن تشکیل می‌شود (Zhang *et al.*, 2009).

نتایج تجزیه فیلوژنتیکی گاوهای سیستانی، هلشتاین و آمیخته آنها در شکل ۵ نمایش داده شده‌اند. درخت فیلوژنی با روش اتصال همسایگی و تعداد ۱۰۰۰۰ تکرار آزمون انجام گرفت. اعداد روی شاخه میزان همپوشانی توالی‌ها در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهند.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی: تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی تخمینی هستند از این که چگونه اعضای یک خانواده می‌توانند در طی علم تکامل از هم اشتقاق پیدا کرده باشند. این روابط به وسیله مطالعه جهش‌های جایگزینی، حذف، ازدیاد و جهش با آرایش مجدد تعیین می‌شوند که در معرض انتخاب طبیعی قرار می‌گیرند (Petersen & Seberg, 2003). روابط تکاملی بین توالی‌ها با استفاده از نمودارهایی به نام درخت فیلوژنتیکی نشان داده می‌شوند. هدف از آنالیزهای فیلوژنتیکی، کشف ترتیبی از شاخه‌ها به صورت درخت‌هایی است که نشان دهنده بهترین روابط توالی‌ها باشند. Bootstrap نیز یک آزمون آماری درخت‌های فیلوژنی با استفاده از روش نمونه‌برداری‌های



شکل ۵- نتایج تجزیه فیلوژنی توالی‌های نوکلئوتیدی جایگاه ژن FEZL در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها با روش اتصال همسایگی (NJ).

Figure 5. The results of the phylogeny analysis of the nucleotide sequences of the FEZL gene locus in Holstein, Sistani, and their crossbreds by the neighbor joining (NJ) method

اجرا گردیده‌اند. از میزان واگرایی در بین نژادهای مختلف، بالاترین میزان واگرایی بین آمیخته‌ها با هلشتاین (۰/۱۲۶) و کمترین بین سیستانی با آمیخته‌ها (۰/۰۱۲) بود. نتایج واگرایی در بین هر جفت از دام‌ها در جدول ۸ نمایش داده شده‌اند که میزان واگرایی در دامنه بین صفر تا ۰/۴۳۴ متغیر است. اعداد پایین قطر میانگین واگرایی بر حسب میانگین هر سایت و اعداد بالای قطر خطای استاندارد برآورد را را نشان می‌دهند. میانگین واگرایی کل جمعیت برابر با ۰/۱۰۲ با خطای استاندارد ۰/۰۱۴ محاسبه شد.

میانگین فاصله (واگرایی) ژنتیکی (Distance): میانگین واگرایی در بین و درون نژادهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها در جدول ۸ ارائه شده است. تجزیه و تحلیل تعداد جایگزینی‌های پایه در هر جفت باز از میانگین‌گیری در تمام جفت‌های دنباله در هر گروه با استفاده از مدل تامورا-ئی محاسبه می‌گردد. بالاترین میزان واگرایی در درون نژادها و جمعیت‌ها مربوط به آمیخته‌های هلشتاین و سیستانی (۰/۱۵) بود و کمترین میزان واگرایی درون‌نژادی به نژاد سیستانی (۰/۰۴۴) تعلق داشت که در ۵۰ سال اخیر تحت برنامه‌های حفاظت نژادی قرار داشته است، اما کمتر برنامه‌های انتخاب

جدول ۸- برآورد میانگین واگرایی تکاملی بر روی جفت‌های توالی جایگاه ژن FEZL بین و داخل نژادهای هلستاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها (اعداد داخل پرانتز خطای برآورد را نشان می‌دهند)

Table 8. Estimation of the average evolutionary divergence on the sequence pairs of the FEZL gene locus between and within the Holstein, Sistani, and their crossbreds (the numbers in the parentheses show the standard errors)

جمعیت (Population)	هلستاین (Holstein)	سیستانی (Sistani)	آمیخته‌ها (Crossbreds)
هلستاین (Holstein)	0.104 (0.018)	0.018	0.019
سیستانی (Sistani)	0.12	0.044 (0.008)	0.012
آمیخته‌ها (crossbreds)	0.126	0.096	0.15 (0.023)

اعداد روی قطر میانگین واگرایی بر حسب جفت باز درون نژادها و اعداد خارج از قطر میانگین واگرایی در بین نژادها و جمعیت‌ها را نشان می‌دهند. تعداد جایگزینی‌های پایه در هر سایت از میانگین‌گیری در تمام جفت‌های دنباله در هر گروه نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از مدل تامورا-نی (Tamura & Nei, 1993) انجام شدند.

The numbers on the diameter show the average divergence in base pairs within breeds, and those outside the diameter show the average divergence between breeds and populations. The number of base substitutions per site is shown by averaging across all sequence pairs in each group. Analyses were performed using the Tamura-Nei model (Tamura & Nei, 1993).

تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از مدل حداکثر درستمایی ترکیبی و با روش بوت استراپ (۱۰۰۰ تکرار) انجام شدند. میانگین تفرق در بین نژادها و جمعیت‌ها ۰/۱ با خطای استاندارد ۰/۰۱ محاسبه شد.

میزان تفرق ژنتیکی (Diversity): نتایج میزان تفرق ژنتیکی در جایگاه ژن FEZL در بین نژادهای مختلف هلستاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها و کل جمعیت‌ها در جدول ۹ ارائه شده‌اند. تعداد جایگزین‌های پایه در هر سایت از محاسبات میانگین تنوع در زیرجمعیت‌ها محاسبه گردیده است.

جدول ۹- میانگین تفرق ژنتیکی یا تکامل بین جمعیت‌های مختلف هلستاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها در جایگاه ژن FEZL
Table 9. Average genetic diversity or evolution between different populations of Holstein, Sistani, and their crossbreds at the FEZL gene locus

خطای استاندارد Standard error	میانگین تفرق ژنتیکی Mean of genetic diversity	
0.01	0.1	میانگین تفرق بین جمعیت‌ها (Mean diversity of within populations)
0.01	0.1	میانگین تفرق کل جمعیت‌ها (Mean diversity of total populations)
0.03	0.01	ضریب تمایز تکاملی (Coefficient of evolution diversity)

جایگاه در توالی ژن FEZL در نژادهای هلستاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها سه‌واریانته بودند که از این بین سه مورد تنها در یک نمونه مشاهده شد و مابقی در بین نمونه‌های مختلف توزیع شده‌اند (شکل ۸). در نهایت، تعداد دو جایگاه از توالی ژن FEZL در بین جمعیت‌های مختلف چهارواریانته یا چهار آللی بودند که آلل‌های منحصربه‌فرد بودند (شکل ۹).

تجزیه نواحی چندشکلی: تجزیه و برهم‌گذاری جایگاه ژن FEZL به طول ۲۲۳ جفت باز در گاوهای هلستاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها تعداد ۷۷ جایگاه چندشکلی را نشان دادند که ۳۳ جفت‌باز دوواریانته بودند (شکل ۶). اعداد در بالا ترتیب نواحی چندشکلی در طول ۲۲۳ جفت بازی ژن FEZL را نشان می‌دهند. تعداد ۳۳ جایگاه دوواریانته هم مشاهده شدند که توزیع در بین نمونه‌های مختلف داشتند (شکل ۷). تعداد نه

	6	13	16	24	28	29	31	34	41	42	45	47	49	61	62	70	71	75	80	87	90	100	102	107	111	113	140	146	165	169	196	221	222
Seq_KM001-H1	A	A	G	T	C	A	G	G	C	C	A	A	C	C	C	C	C	T	C	G	G	C	C	G	C	G	G	T	C	C	T	T	G
Seq_KM002-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM003-H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM004-H4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM005-H5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM006-H6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM007-H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM008-H8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM009-H9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM011-S1	T	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM012-S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM013-S3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM014-S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM015-S5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM016-S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM017-S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM018-S8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM019-S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM020-S10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM021-HS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM022-HS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM023-HS3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM026-HS6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

شکل ۶- نواحی دوواریانته منحصربه‌فرد توالی‌های جایگاه ژنی FEZL در جمعیت‌های مختلف هلستاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها
Figure 6. Unique two-variant regions of FEZL gene locus sequences in different populations of Holstein, Sistani, and their crossbreds.

	8	18	27	68	92	97	114	117	118	119	120	123	129	134	138	139	142	143	144	145	147	148	149	150	151	153	155	156	159	160	161	162	198
Seq_KM001-H1	A	T	A	C	C	C	T	C	C	A	A	C	T	T	C	T	G	C	T	C	G	G	A	A	A	G	A	G	T	C	C	G	G
Seq_KM002-H2																																	
Seq_KM003-H3		G																															
Seq_KM004-H4							C	T	T	C	C	A	A	A	A	G	A	A	G	C	G	C	T	T	G	G	A	C	A	C	T	T	C
Seq_KM005-H5							C	T	T	C	C	A	A	A	A	G	A	A	G	C	G	C	T	T	G	G	A	C	A	C	T	T	C
Seq_KM006-H6				T																													
Seq_KM007-H7							C	T	T	C	C	A	A	A	A	G	A	A	G	C	G	C	T	T	G	G	A			C	T	T	C
Seq_KM008-H8							C	T	T	C	C	A	A	A	A	G	A	A	G	C	G	C	T	T	G	G	A			C	T	T	C
Seq_KM009-H9							C	T	T	C	C	A	A	A	A	G	A	A	G	C	G	C	T	T	G	G	A	C	A	C	T	T	C
Seq_KM011-S1	C																																C
Seq_KM012-S2		G				G																											
Seq_KM013-S3																																	
Seq_KM014-S4																																	
Seq_KM015-S5																																	
Seq_KM016-S6																																	
Seq_KM017-S7																																	
Seq_KM018-S8			C																														
Seq_KM019-S9																																	
Seq_KM020-S10		G	C	T	T	G																											
Seq_KM021-HS1						T		C	T	T	C	C	A	A	A	G	A	A	G	C	G	C	T	T	G	G	A		A	C	T		C
Seq_KM022-HS2																																	
Seq_KM023-HS3																																	
Seq_KM026-HS6	C					G																											C

شکل ۷- نواحی دوواریانی غیر منحصر توالی‌های جایگاه ژنی FEZL در جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها
Figure 7. Two non-unique variant regions of FEZL gene locus sequences in different populations of Holstein, Sistani, and their crossbreds.

	65	69	99	103	121	122	130	141	154
Seq_KM001-H1	C	T	G	-	G	A	C	A	C
Seq_KM002-H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM003-H3	-	A	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM004-H4	-	-	-	-	A	G	G	C	-
Seq_KM005-H5	-	-	-	-	A	G	G	C	A
Seq_KM006-H6	-	C	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM007-H7	-	-	-	-	A	G	G	C	-
Seq_KM008-H8	-	-	-	-	A	G	G	C	-
Seq_KM009-H9	-	-	-	-	A	G	G	C	A
Seq_KM011-S1	-	-	-	C	-	-	-	-	-
Seq_KM012-S2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM013-S3	-	-	-	C	-	-	-	-	-
Seq_KM014-S4	-	-	-	C	-	-	-	-	-
Seq_KM015-S5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM016-S6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM017-S7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM018-S8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM019-S9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM020-S10	A	-	T	A	-	-	-	-	-
Seq_KM021-HS1	-	-	C	C	T	C	T	G	G
Seq_KM022-HS2	G	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM023-HS3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seq_KM026-HS6	-	-	-	-	-	-	-	-	-

شکل ۸- نواحی سهواریانی توالی‌های جایگاه ژنی FEZL در جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها
Figure 8. Three-variant regions of FEZL gene locus sequences in different populations of Holstein, Sistani, and their crossbreds.

	37	72
Seq_KM001-H1	G	A
Seq_KM002-H2	-	-
Seq_KM003-H3	-	-
Seq_KM004-H4	-	-
Seq_KM005-H5	-	-
Seq_KM006-H6	-	C
Seq_KM007-H7	-	-
Seq_KM008-H8	-	-
Seq_KM009-H9	-	-
Seq_KM011-S1	T	-
Seq_KM012-S2	-	-
Seq_KM013-S3	-	-
Seq_KM014-S4	-	-
Seq_KM015-S5	-	-
Seq_KM016-S6	-	-
Seq_KM017-S7	-	-
Seq_KM018-S8	-	-
Seq_KM019-S9	-	-
Seq_KM020-S10	A	T
Seq_KM021-HS1	-	-
Seq_KM022-HS2	C	G
Seq_KM023-HS3	-	-
Seq_KM026-HS6	-	-

شکل ۹- نواحی چهارواریانی توالی‌های جایگاه ژنی FEZL در جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها
Figure 9. Four-variant regions of FEZL gene locus sequences in different populations of Holstein, Sistani, and their crossbreds

هابلوتیپی به واسطه حذف و اضافه در کل جمعیت‌ها شامل هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها به ترتیب ۲۱ و ۰/۹۹ بودند. همچنین، ضریب تفرق حذف و اضافه و تفرق حذف و اضافه به‌ازای هر سایت به ترتیب ۵/۶۷ و ۰/۰۲۵ محاسبه شدند. در نهایت، ضریب تاجیما (D) ۱/۱۴۷- محاسبه شد که در سطح احتمال ۵ درصد غیرمعنی‌دار بود.

تجزیه نواحی حذف و اضافه در طول ۲۲۳ جفت باز از ژن FEZL در بین نژادهای مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها بیانگر ۳۰ ناحیه حذف و اضافه بود که ویژگی‌های آنها در جدول ۱۰ ارائه شده‌اند. متوسط طول رویداد حذف و اضافه ۱/۵۳ جفت باز و متوسط طول ناحیه حذف و اضافه ۱/۲۴ جفت باز بودند. تعداد هابلوتیپ‌ها و میزان تفرق

جدول ۱۰- تجزیه نواحی حذف و اضافه توالی‌های جایگاه ژن FEZL در جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها
Table 10. Analysis of deletion and addition regions of the FEZL gene locus in different populations of Holstein, Sistani, and their crossbreds

	تغییرات به واسطه حذف و اضافه
30	تعداد کل وقوع حذف و اضافه (Total number of InDel events)
1.53	متوسط طول رویداد هر حذف و اضافه (Average InDel length event)
1.24	متوسط طول ناحیه حذف و اضافه (Average InDel length)
21	تعداد هابلوتیپ ناشی از حذف و اضافه (Number of InDel Haplotypes)
0.99	تفرق هابلوتیپی ناحیه حذف و اضافه (InDel Haplotype Diversity)
5.67	تفرق حذف و اضافه (InDel Diversity)
0.025	تفرق حذف و اضافه به‌ازای هر سایت (InDel Diversity per site)
-1.147	تاجیما (Tajima's D)

جهش‌های چندشکلی در نژاد هلشتاین نشان دادند، اما در آمیخته‌ها هم‌شکل بودند. همچنین، تعداد ۲۷ سایت در آمیخته‌ها جهش چندشکلی نشان دادند که در نژاد هلشتاین هم‌شکل و هموزیگوت بودند. تعداد ۲۸ جهش چندشکلی در بین هر دو نژاد مشترک بودند.

در جمعیت نژاد سیستانی و آمیخته‌ها به ترتیب ۳۴ و ۴۹ جایگاه چندشکلی در نتیجه به ترتیب ۳۶ و ۴۹ جهش مشاهده گردیدند. متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت در دو نژاد سیستانی و آمیخته‌ها به ترتیب ۷/۸۴ و ۲۴/۵ و میزان تفرق نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۰۴ و ۰/۱۳ محاسبه گردید. تعداد ۳۱ سایت جهش‌های چندشکلی در نژاد سیستانی نشان دادند، اما در آمیخته‌ها هم‌شکل بودند. همچنین، تعداد ۴۴ سایت در آمیخته‌ها جهش چندشکلی نشان دادند که در نژاد سیستانی هم‌شکل و هموزیگوت بودند. تعداد ۱۰ جهش چندشکلی در بین هر دو نژاد مشترک بودند.

نتایج تجزیه دوبه‌دو جمعیت‌ها شامل هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها در جدول ۱۱ ارائه شده‌اند. در دو نژاد هلشتاین و سیستانی به ترتیب ۳۶ و ۳۵ جایگاه چندشکلی در نتیجه ۳۷ جهش مشاهده گردید. متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت در دو نژاد هلشتاین و سیستانی به ترتیب ۱۷/۶۴ و ۸/۰۴۴ و میزان تفرق نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۰۸۹ و ۰/۰۴ محاسبه گردیدند. تعداد ۳۵ سایت جهش‌های چندشکلی در نژاد هلشتاین نشان دادند، اما در نژاد سیستانی هموزیگوت بودند و همچنین تعداد ۳۵ سایت در نژاد سیستانی چندشکلی نشان دادند که در نژاد هلشتاین هم‌شکل و هموزیگوت بودند. تعداد دو جهش هم در بین هر دو نژاد مشترک بودند.

در جمعیت نژاد هلشتاین و آمیخته‌ها به ترتیب ۳۷ و ۵۱ جایگاه چندشکلی در نتیجه به ترتیب ۳۸ و ۵۱ جهش مشاهده گردیدند. متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت در دو نژاد هلشتاین و آمیخته‌ها به ترتیب ۱۷/۸۶ و ۲۵/۶۷ و میزان تفرق نوکلئوتیدی به ترتیب ۰/۰۹ و ۰/۱۳ محاسبه گردید. تعداد ۱۴ سایت

جدول ۱۱- تجزیه نواحی چندشکلی توالی‌های جایگاه ژن FEZL در مقایسات دوبه‌دوی جمعیت‌های مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها

Table 11. Analysis of polymorphic regions of FEZL gene locus sequences in pairwise comparisons of different populations of Holstein, Sistani, and their crossbreds.

تعداد کل ناحیه چندشکل Total number of polymorphic sites	تعداد کل جهش‌ها Total number of mutations	متوسط تعداد نوکلئوتید متفاوت Mean of different nucleotides	تفرق نوکلئوتیدی Nucleotide diversity	جمعیت Population	تعداد نمونه Sample
36	37	17.64	0.089	هلشتاین (Holstein)	9
35	37	8.04	0.04	سیستانی (Sistani)	10
68	72	16.42	0.08	کل (Total)	19
37	38	17.86	0.09	هلشتاین (Holstein)	9
51	51	25.67	0.13	آمیخته‌ها (Crossbreds)	4
58	65	20.49	0.1	کل (Total)	13
34	36	7.84	0.04	سیستانی (Sistani)	10
49	49	24.5	0.13	آمیخته‌ها (Crossbreds)	4
74	80	12.44	0.06	کل (Total)	14

متعددی با تعداد نمونه کم و در شرایط مشابه انجام و گزارش شده‌اند، اما آنچه که مهم‌تر از اثر نژاد در مطالعه حاضر است، بررسی تأثیر اثرات انفرادی آلل‌ها در دام‌ها و توان ترکیب‌پذیری آنها است که به‌نظر شاخص مناسبی برای بررسی اثرات چندشکلی در ژن‌های تأثیرگذار بر ترکیبات شیر باشد. انتخاب ژنتیکی برای افزایش و تغییر خواص کمی شیر و ترکیبات آن موفقیت‌آمیز بوده است و هیچ دلیلی برای رد اثرات انتخاب و تغییرات ژنتیکی در نژادها نیست. در حال حاضر، تنها هدف کاهش هزینه‌های فنوتیپی بر اساس تکنولوژی‌های جدید و استفاده از مهندسی ژنتیک است (Cole et al., 2023).

نتایج تجزیه واریانس اثر نژاد بر ترکیبات شیر در جدول ۱۳ ارائه شده‌اند. اثر نژاد برای تمام اجزای شیر به جز درصد پروتئین بسیار معنی‌دار بود. در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی اثر نژاد بر ترکیبات شیر در روش نگهداری و مدیریت سنتی با ۱۲ رأس از سه نژاد گاو بومی نیجریه انجام گرفت، اثر نژاد بر صفات درصد چربی و مقدار ماده خشک کل شیر معنی‌دار گزارش شد ($P < 0.01$)، اما تأثیری بر ترکیب آمینواسیدها و مواد معدنی شیر نداشت ($P > 0.05$) که مطابق با نتایج مطالعه حاضر است (Adesina, 2012). مطالعه‌ای دیگر در بین نژادهای خالص و

ویژگی‌های توصیفی ترکیبات شیر در نژادهای مختلف هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها در جدول ۱۲ آورده شده‌اند. بالاترین و کمترین درصدهای چربی به ترتیب مربوط به نژاد سیستانی (۵/۲۸) و آمیخته‌ها (۲/۸) بودند. میانگین‌های درصد لاکتوز و درصد ماده خشک بدون چربی در نژاد هلشتاین به ترتیب ۳/۰۵ و ۵/۵ درصد و در نژاد سیستانی به ترتیب ۴/۳۷ و ۸/۰۱ درصد بودند. درصدهای پروتئین شیر در نژادهای هلشتاین و سیستانی به ترتیب ۲/۵ و ۳/۱۶ درصد محاسبه شدند. میزان درصد ترکیبات شیر در آمیخته‌ها اعم از چربی، پروتئین، لاکتوز و میزان ماده خشک بدون چربی کمتر از هر دو نژاد خالص بود.

ضریب تغییرات میزان تنوع در درون جمعیت‌ها را نشان می‌دهد. ضریب تغییرات در تمام صفات شیر نژاد هلشتاین بالاتر از دو جمعیت سیستانی و آمیخته‌ها بود. در نژاد هلشتاین بالاترین میزان تنوع مربوط به درصد چربی و پروتئین بود. در سایر جمعیت‌ها هم میزان تنوع درصد چربی در درون جمعیت‌ها بالاترین مقدار بود. البته محدودیت تعداد رکورد برای توصیف صفات شیر در نژادهای مذکور در مطالعه حاضر ممکن است معیار مناسبی برای جمعیت‌ها نباشد. هرچند که مطالعات

هلستاین، بومی اتیوپی، آمیخته جرسی-بومی و آمیخته هلستاین-جرسی-بومی در دوره اول شیردهی و به مدت ۶۰ روز انجام گرفت، اثر نژاد بر عملکرد، درصد لاکتوز، درصد چربی و مقدار ماده خشک شیر معنی دار ($P < 0.01$) گزارش شد (Kebede, 2018).

آمیخته هلستاین با نژادهای بومی چینی انجام گرفت، و اثر نژاد بر درصد پروتئین، چربی، و مواد جامد کل معنی دار ($P < 0.01$) گزارش شد، اما تأثیر آن بر وزن مولکولی پروتئین کازئین کم بود (Yang et al., 2013). همچنین، در مطالعه دیگر که در تحت شرایط محیطی مشابه با ۳۲ رأس گاو شیری در چهار گروه و از هر گروه هشت رأس شامل نژاد خالص

جدول ۱۲- خصوصیات توصیفی ترکیبات شیر در نژادهای هلستاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها

Table 12. Descriptive properties of milk compounds in Holstein, Sistani, and their crossbreds

هلستاین (Holstein)				تعداد نمونه Sample	ترکیبات شیر Milk Components
ضریب تغییرات Coefficient of variation	انحراف معیار Standard deviation	حداکثر Maximum	حداقل Minimum	میانگین Mean	
51	1.66	6.03	0.87	3.26	درصد چربی (Fat %)
57	1.43	6.11	1.19	2.5	درصد پروتئین (Protein %)
46	1.41	6.33	1.4	3.05	درصد لاکتوز (Lactose %)
22	1.24	6.5	3.29	5.5	درصد ماده خشک بدون چربی (Dry matter %)
سیستانی (Sistani)					
25.5	1.35	7.38	3.13	5.28	درصد چربی (Fat %)
14.78	0.47	3.78	2.4	3.16	درصد پروتئین (Protein %)
15.78	0.69	5.25	3.2	4.37	درصد لاکتوز (Lactose %)
16.31	1.31	9.77	6.31	8.01	درصد ماده خشک بدون چربی (Dry matter %)
آمیخته‌ها (Crossbreds)					
16.42	0.46	3.46	2.37	2.8	درصد چربی (Fat %)
11.89	0.22	2.18	1.74	1.85	درصد پروتئین (Protein %)
14.22	0.34	2.89	2.2	2.39	درصد لاکتوز (Lactose %)
11.33	0.56	5.78	4.64	4.94	درصد ماده خشک بدون چربی (Dry matter %)
کل جمعیت (Total population)					
40.49	1.66	7.38	1.21	4.1	درصد چربی (Fat %)
38.8	1.04	6.1	1.19	2.68	درصد پروتئین (Protein %)
35.89	1.26	6.3	1.4	3.51	درصد لاکتوز (Lactose %)
27.82	1.82	9.77	3.29	6.54	درصد ماده خشک بدون چربی (Dry matter %)

جدول ۱۳- نتایج تجزیه واریانس اثرات نژاد دام بر ترکیبات شیر در گاوهای هلستاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها

Table 13. The results of analysis of variance for the effects of breed on milk composition in Holstein, Sistani, and their crossbred cows.

منابع تغییرات (Source of variation)	صفت Traits	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	ضریب F	سطح احتمال P-value
اثر نژاد Breed effect	درصد چربی شیر (Fat percentage)	2	27.03	13.52	6.89	***0.005
	درصد پروتئین شیر (Protein percentage)	2	5.35	2.68	2.88	ns 0.08
	درصد لاکتوز شیر (Lactose percentage)	2	14.37	7.18	6.91	***0.005
	درصد ماده خشک بدون چربی (Dry matter percentage)	2	44.48	22.24	15.52	***0.0001

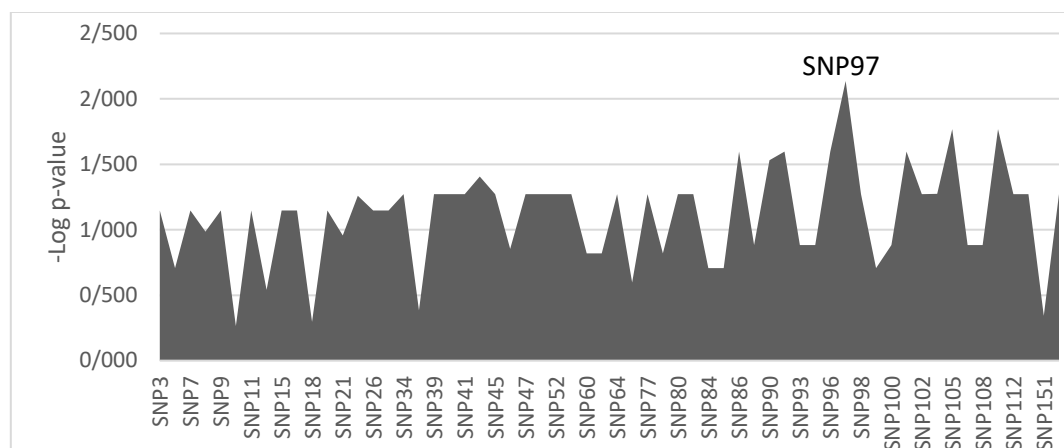
*** بیانگر معنی‌داری میانگین‌ها در سطح کمتر از ۰/۰۱ و ns بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار هستند ($P > 0.05$)

***Means are significant at the level of < 0.01 , and ns means no significant difference ($P > 0.01$)

تنوع درصد چربی شیر داشتند. از بین تمام نشانگرهای معنی‌دار، جایگاه SNP در موقعیت ۹۷ بالاترین تأثیر را داشت. یکی از مشکلات در تست‌های چندگانه در جایگاه چندشکلی، بالابودن میزان خطای نوع اول است و یکی از آزمون‌های پیشنهادی برای کاهش خطای نوع اول استفاده از تست بنفرونی است. اگر در مطالعه حاضر از تست بنفرونی استفاده گردد، فقط یک نشانگر تأثیر معنی‌دار بر ترکیب شیر دارد که تقریباً در انتهای ناحیه ژنی مورد مطالعه قرار داشت.

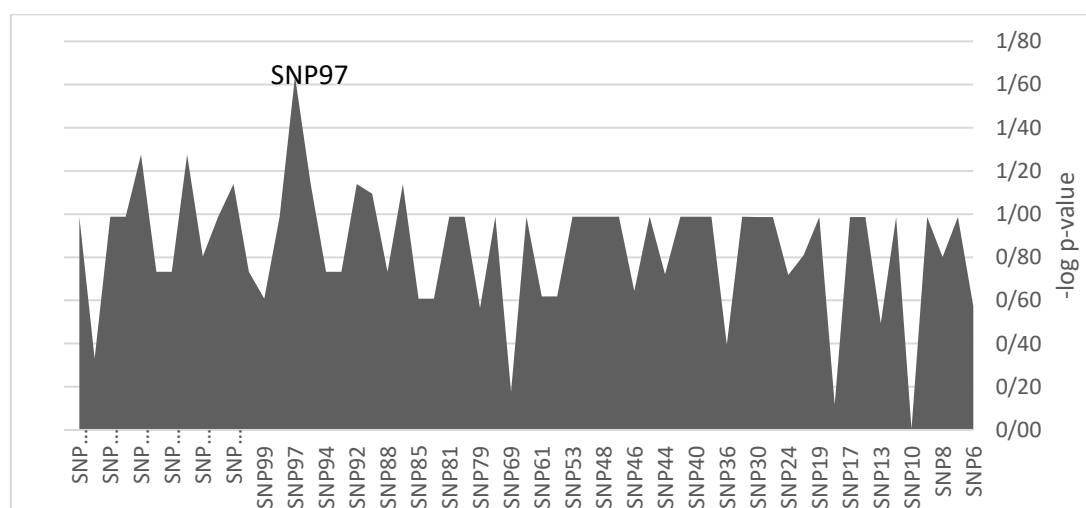
اثرات چندشکلی بر ترکیبات شیر در قالب مدل‌های تک‌نشانگری و رویه GLM نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ برآورد و در قالب شکل‌های ۱۰ تا ۱۴ برای صفات مختلف ارائه شده‌اند. برای توصیف نموداری اثرات و شناسایی SNP‌های بالاترین اثر از منفی لگاریتم سطح احتمال معنی‌داری ($-\log p\text{-value}$) استفاده شد.

اثرات چندشکلی نشانگرها بر صفت درصد چربی شیر در شکل ۱۰ ارائه شده‌اند. تعداد ۶۶ نشانگر چندشکلی در توالی ژن FEZL شناسایی گردید که ۲۷ نشانگر اثرات معنی‌دار در ایجاد



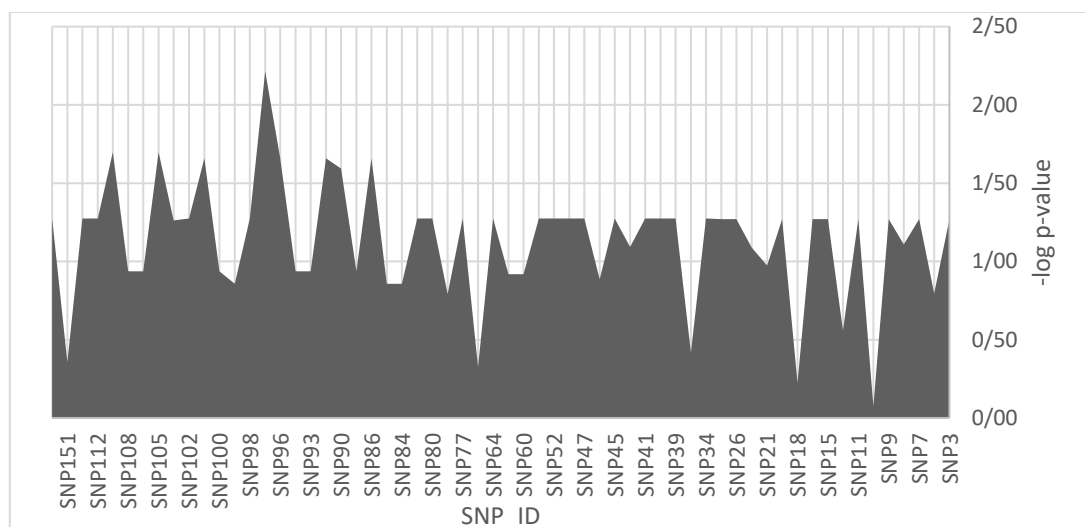
شکل ۱۰- برآورد اثرات نواحی چندشکلی بر صفات درصد چربی شیر در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها
Figure 10. Evaluation of the effects of polymorphic regions on the milk fat percentage trait in Holstein, Sistani, and their crossbred cows

اثرات چندشکلی نشانگرها بر صفت درصد پروتئین شیر در
شکل ۱۱ ارائه شده‌اند. تعداد سه چندشکلی SNP در توالی ژن
FEZL شناسایی گردیدند که اثرات معنی‌دار در تنوع درصد
پروتئین شیر داشتند. نشانگر SNP97 همانند صفت درصد
چربی نقش مهمی در ایجاد تنوع در بین دام‌های در درصد
پروتئین شیر داشت.



شکل ۱۱- برآورد اثرات نواحی چندشکلی بر صفت درصد پروتئین شیر در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها
Figure 11. Estimation of the effects of polymorphic regions on the milk protein percentage trait in Holstein, Sistani, and their crossbred cows

اثرات چندشکلی نشانگرها بر صفت درصد لاکتوز شیر در
شکل ۱۲ ارائه شده‌اند. تعداد ۶۶ نشانگر چندشکلی در توالی ژن
FEZL شناسایی گردیدند که ۳۳ نشانگر اثرات معنی‌دار در
ایجاد تنوع درصد لاکتوز شیر داشتند. از بین تمام نشانگرهای
معنی‌دار، جایگاه SNP در موقعیت ۹۷ بالاترین تأثیر را داشت.

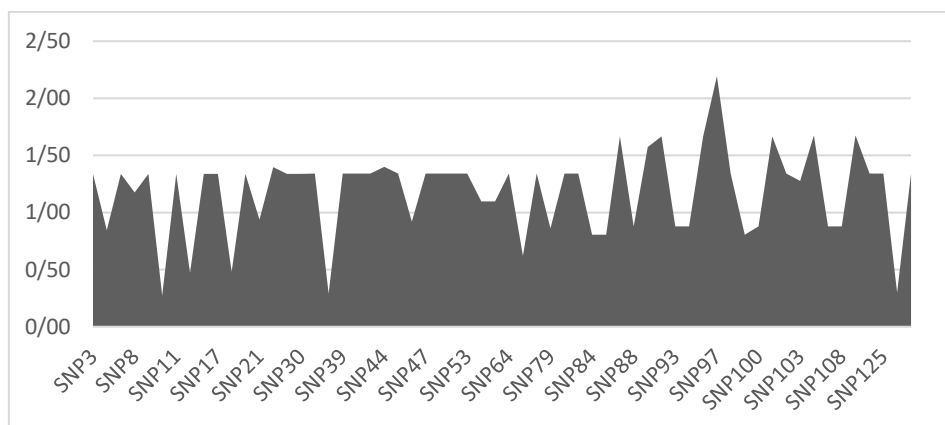


شکل ۱۲- برآورد اثرات نواحی چندشکلی بر صفت درصد لاکتوز شیر در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها

Figure 12. Estimation of the effects of polymorphic regions on the milk lactose percentage trait in Holstein, Sistani, and their crossbreds

اثرات چندشکلی نشانگرها بر صفت درصد ماده خشک بدون چربی شیر در شکل ۱۳ ارائه شده‌اند. تعداد ۶۶ نشانگر چندشکلی در توالی ژن FEZL شناسایی گردیدند که ۳۸

نشانگر اثرات معنی‌دار در ایجاد تنوع درصد ماده خشک بدون چربی شیر داشتند. از بین تمام نشانگرهای معنی‌دار، جایگاه SNP در موقعیت ۹۷ بالاترین تأثیر را داشت.



شکل ۱۳- برآورد اثرات نواحی چندشکلی بر صفت درصد ماده خشک بدون چربی شیر در گاوهای هلشتاین، سیستانی و آمیخته‌های آنها

Figure 13. Estimation of the effects of polymorphism regions on the milk fat-free dry matter percentage trait in Holstein, Sistani, and their crossbred cows

شیری شده‌اند. جایگاه ژن FEZL یکی از ژن‌های کاندیدای بالقوه مرتبط با مقاومت به بیماری ورم پستان و صفات شیر در گاوهای شیری گزارش شده است (Ogorevc *et al.*, 2000). هفت QTL برای شمار سلول‌های سوماتیکی شیر گزارش گردیده‌اند که دو مورد از آنها بر روی کروموزوم ۲۲ و در منطقه ژن FEZL قرار دارند (Heyen *et al.*, 1999).

ژن FEZL از شش دامین C2H2 و یک بسط گلیسین تشکیل شده است که یک درج سه نوکلئوتیدی باعث تبدیل بسط ۱۲ گلیسین به ۱۳ گلیسین می‌گردد و گزارش شده است که این چندشکلی در ناحیه اگزون ۱ با شمار سلول‌های سوماتیکی شیر در گاوهای شیری ژاپنی مرتبط است (Ghada & Abdalla, 2019).

در بررسی نواحی چندشکلی اگزون ۱ ژن FEZL در گاوهای هلشتاین که با تغییر کد ژنتیکی ۱۰۹ که کدکننده

یکی از مهمترین چالش‌ها در صنعت گاو شیری بیماری ورم پستان است و شناسایی ژن‌های کاندیدا و بررسی چندشکلی در بین و درون نژادها به منظور شناسایی واریانت‌ها مهم و مفید در افزایش مقاومت به بیماری ورم پستان در گله‌ها انجام می‌شوند. وراثت‌پذیری صفات مرتبط با بیماری ورم پستان در دامنه بین ۰/۰۴۸ تا ۰/۱۲۴ قرار دارد که مقدار پایینی است و انتخاب با روش‌های مرسوم هر چند که با تغییرات اندکی همراه است، اما کارایی بالایی ندارد و انتخاب غیر مستقیم از طریق صفات وابسته مانند شمار سلول‌های سوماتیکی شیر و انتخاب به کمک نشانگرهای ژنتیکی (MAS) به افزایش کارایی برنامه‌های اصلاحی کمک کرده است (Chegini *et al.*, 2016).

مطالعات گذشته منجر به شناسایی چندین مکان ژنی در ژنوم مرتبط با مقاومت به ورم پستان و صفات شیر در گاوهای

گزارش شده است که واریانتهای بسط زنجیره ۱۲ و ۱۳ گلیسین اثرات متفاوتی بر بیان ژن سمافورین 5A دارند. همچنین، نتایج برهم‌گذاری بر روی ژنوم مرجع گاوه‌های شیری نشان دادند که در فاصله ۲ تا ۱۰ سانتی‌مورگانی کروموزوم ۲۱ یازده ژن وجود داشتند که واریانتهای ۱۲ و ۱۳ گلیسین ژن FEZL تنها بر ژن IGF1R تأثیر داشتند و تنها در صورتی که ژن مذکور دارای واریانت مختلف یا نواحی چندشکلی بین حساس تا مقاوم متغیر باشد. افزایش بیان ژن IGF1R توسط واریانت 13G گزارش گردید (Sugimoto & Fujikawa, 2006).

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر، در ناحیه اگزون ۱ ژن FEZL انواع جهش‌های مختلف حذف و اضافه و چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی در بین گاوه‌های خالص و آمیخته هلستاین و سیستمی مشاهده شدند که برخی از آنها با تنوع در صفات کیفی شیر همراه بودند. به ویژه، چندشکلی جهش در ناحیه ۹۷ ژن اثرات بسیار معنی‌داری بر ترکیبات شیر داشت و با توجه به مشاهده واریانتهای مختلف در ناحیه مذکور می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی در مطالعات پیوستگی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از همکاران مرکز تحقیقات گاو سیستمی و مزرعه دامداری آقای بارانی به‌جهت همکاری در طرح تقدیر می‌گردد. هزینه طرح مذکور از محل گرنت IR-UOZ-4398 تأمین شده است. همچنین، از همکاران مرکز زیست‌فناوری پژوهشگاه زابل در استفاده از امکانات آزمایشگاهی تقدیر می‌گردد.

References

- Adesina, K. (2012). Effect of breed on the composition of cow milk under traditional management practices in Ado-Ekiti, Nigeria. *Journal of Applied Science and Environmental Management*, 16(1), 55–59.
- Ahsani, M. R., Mohammadabadi, M., Buchkovska, V. and Ievstafieva, Y. M. (2022). Association of Stearoyl-CoA Desaturase Expression with Cattle Milk Characteristics. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 12(2), 271-279.
- Ali, G. E., Ibrahim, M. A. & Zaki, S. M. (2019). Association assessment of single nucleotide polymorphism in Forebrain Embryonic Zinc Finger-Like (FEZL) gene with mastitis susceptibility in Holstein cattle (Bos Taurus). *Large Animal Review*, 25, 163–171.
- Alinaghizadeh, R., Mohammad Abadi, M. R., & Moradnasab Badrabadi, S. (2007). Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (Bos indicus) using PCR-RFLP. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(23), 4291-4294.
- Asghari, E. B., Dashab, G. R., Banabazi, M. H., & Rokouei, M. (2021). Analysis of genetic differences in genes associated with immune response among purebred and crossbreed Sistani and Montebeliarde cow population using RNA-Seq data. *Research on Animal Production*, 12(31), 134-145. DOI:10.52547/rap.12.31.134 [In Persian]
- Ateya, A., Ibrahim, S., & Al-Sharif, M. (2022). Single nucleotide polymorphisms, gene expression and economic evaluation of parameters associated with mastitis susceptibility in European cattle breeds. *Veterinary Science*, 9(6), 294. DOI: 10.3390/vetsci9060294
- Badakhshan, Y., & Mohammadabadi, M. R. (2015). Thermoregulatory mechanisms of jersey adult cattle and calves based on different body sites temperature. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5(4), 793-798.
- Barazandeh, A., Mohammadabadi, M. R., & Ghaderi-Zefrehei, M. (2016). Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 6(3), 571-579.

آمینواسید گلیسین است، با کاهش قابل‌توجه بروز ورم پستان بالینی همراه بوده است، در حالی که هیچ اثر نامطلوبی این چندشکلی بر تولید شیر، چربی، مواد جامد بودن چربی و پروتئین نداشتند. نسبت گاوه‌های شیری با بیماری ورم پستان حاصل از گاوه‌های نر هتروزیگوت (12/13G) به‌طور معنی‌داری کمتر از دختران حاصل از گاوه‌های نر هموزیگوت (13/13G) بود. لذا انتخاب گاوه‌های نر هتروزیگوت مفیدتر است و می‌تواند احتمال وقوع بیماری ورم پستان را در دختران کاهش دهد (Sugimoto *et al.*, 2011).

چندشکلی در ژن FEZL گزارش شده است که مرتبط با شمار سلول‌های سوماتیکی شیر است. در کل، هشت ناحیه جهش شناسایی گردید که چهار مورد شامل حذف و اضافه و یک جهش نقطه‌ای در ناحیه اگزون یک و سه جهش در نواحی اینترون یک و سه بودند (Ali *et al.*, 2019).

در مطالعه‌ای دیگر، تنوع اگزون یک ژن FEZL در گاوه‌های هندی و دورگه هندی-اروپایی جهت بررسی چندشکلی ۱۲/۱۳ گلیسین که مرتبط با بیماری ورم پستان گزارش شده است، مورد ارزیابی قرار گرفت. فراوانی‌های واریانت 13G در گاوه‌های هندی ۱۰۰ درصد و در گاوه‌های دورگه ۹۸/۲ درصد گزارش شدند. بنا بر این، فراوانی ژنوتیپ 13/13G در گاوه‌های هندی ۱۰۰ درصد بود و در دورگه‌ها فراوانی ژنوتیپ‌های 13/13G، 12/13G و 12/12G به‌ترتیب ۹۶/۵، ۳/۵ و صفر درصد بودند. واریانت 12G در گاوه‌های هندی مشاهده نشد. فقدان واریانت 12G در گاوه‌های جرسی هم گزارش شده است (Chegini *et al.*, 2016).

در مطالعه دیگر بر روی گاوه‌های هلستاین، QTL‌هایی در ناحیه چهار سانتی‌مورگان کروموزوم ۲۱ گزارش شدند که با واریانتهای ژن FEZL بر روی کروموزوم ۲۲ در ارتباط بودند.

- Birjandi, M. R. (1997). Investigating the status of breeding and determining milk production capacity and milking characteristics of Sistani cattle in Sistan region. Abstract Research projects of the Ministry of Jihad (Volume II), pp. 368-370. [In Persian]
- Bordbar, F., Mohammadabadi, M., Jensen, J., Xu, L., Li, J., & Zhang, L. (2022). Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing. *Animals*, 12 (9), 1103.
- Carlén, E., Strandberg, E., & Roth, A. (2004). Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, and production in the first three lactations of Swedish Holstein cows. *Journal Dairy Science*, 87, 3062–3070. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73439-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73439-6)
- Chegini, A., Hossein-Zadeh, N. G., Hosseini-Moghadam, H., & Shadparvar, A. A. (2016). Estimation of genetic and environmental relationships between milk yield and different measures of mastitis and hyperkeratosis in Holstein cows. *Acta Scientiarum*, 38, 191-196. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v38i2.29207>
- Cole, J. B., Makanjuola, B. O., Rochus, C. M., van Staaveren, N., & Baes, C. (2023). The effects of breeding and selection on lactation in dairy cattle. *Animal Frontiers*, 13(3), 62-70. <https://doi.org/10.1093/af/vfad044>.
- Ehsaninia, J., Moradi, M., Haffezian, S. S. H., & Sayad, M. B. (2011). Crossbreeding effects on milk fat/yields performance of Iran population local cattle. *Animal Sciences Journal*, 91, 27-33. [In Persian]
- Ghada, G. G., & Abdalla, E. A. (2019). Physiological study on nano particle to improve immune response and performance of broiler chicken. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 22(3), 635–646. Doi: 10.21608/ejnf.2019.79502.
- Gorbani, A., & Behpai, M. (2020). Association of GDF9 gene polymorphism with sperm quality and quantity traits in Iranian Holstein bulls. *Research Animal Production*, 11(27), 95-100. Doi: 10.29252/rap.11.27.95. [In Persian]
- Heyen, D. W., Weller, J. I., Ron, M., Band, M., Beever, J. E., Feldmesser, E., Da, Y., Wiggans, G. R., VanRaden, P. M., & Lewin, H. A. (1999). A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiological Genomics*, 1, 165-175. DOI: 10.1152/physiolgenomics.1999.1.3.165.
- Hirata, T., Suda, Y., Nakao, K., Narimatsu, M., Hirano, T., & Hibi, M. (2004). Zinc finger gene fez-like functions in the formation of subplate neurons and thalamocortical axons. *Develop-Mental Dynamics*, 230, 546-556. DOI: 10.1002/dvdy.20068.
- Huang, X., & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9, 868-877. DOI: 10.1101/gr.9.9.868.
- Jafari Ahmadabadi, S. A. A., Askari-Hemmat, H., Mohammadabadi, M., Asadi Fouzi, M., & Mansouri, M. (2023). The effect of Cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(1), 217-234.
- Kamalzadeh, A., Rajabbaigy, M., & Kiasat, A. (2008). Livestock production systems and trends in livestock industry in Iran. *Journal of Agriculture and Social Sciences*, 4, 183-188.
- Kebede, E. (2018). Effect of cattle breeds on milk composition in the same management conditions. *Ethiopia Journal of Agricultural Science*, 28(2), 53-63.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*, 25, 1451-1452. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp187.
- Lopez, A., & Bonasora, M. G. (2017). Phylogeography, genetic diversity and population structure in a Patagonian endemic plant. *AoB Plants*, 16(4), 275. DOI: 10.1093/aobpla/plx017.
- Malik, T. A., Mohini, M., Mir, S. H., Ganaie, B. A., Singh, D., Varun, T. K., Howal, S., & Thakur, S. (2018). Somatic cells in relation to udder health and milk quality-a review. *Journal Animal Health Production*, 6(1), 18-26. DOI: 10.17582/journal.jahp/2018/6.1.18.26.
- Matsuo-Takasaki, M., Lim, J. H., Beanan, M. J., Sato, S. M., & Sargent, T. D. (2000). Cloning and expression of a novel zinc finger gene, Fez, transcribed in the forebrain of Xenopus and mouse embryos. *Mechanisms of Development*, 93, 201-204. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00264-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00264-1).
- Mehmarian, M. (2006). Cattle and buffalo fattening. First Edition, Research and Construction Publications, Mashhad, 113-123. [In Persian]
- Mohammadabadi, M., Golkar, A., & Askari Hesni, M. (2023). The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(4), 239-256.
- Naderi Y. (2004). The effect of maternal factors on growth traits in Moghani breed sheep, master's thesis. Higher Education Complex of Agricultural Sciences and Agricultural Natural Resources, Sari University of Mazandaran, pp. 98. [In Persian]
- Nafez, M., Zerehdaran, S., Hassani, S., & Samiei, R. (2012). Genetic Evaluation of Productive and Reproductive Traits of Holstein Dairy Cows in the North of Iran. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 4(1), 69-77. DOI: 10.22067/ijasr.v4i1.13914. [In Persian]

- Nejad, F. M., Mohammadabadi, M., Roudbari, Z., Gorji, A. E., & Sadkowski, T. (2024). Network visualization of genes involved in skeletal muscle myogenesis in livestock animals. *BMC Genomics*, 25 (1), 294.
- Norouzy, A., Nassiry, M. R., Shahrody, F. E., Javadmanesh, A., Abadi, M. R. M., & Sulimova, G. E. (2005). Identification of bovine leucocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Holstein and Brown Swiss AI bulls in Iran. *Russian Journal of Genetics*, 41(12), 1409-1413.
- Ogorevc, J., Prpar, S., & Dovc, P. (2000). Establishment and characterization of a caprine mammary epithelial cell line. *In vitro Cell Development Biology Science*, 36(1), 26-37. DOI: 10.1290/1071-2690(2000)036<0026: EACOAC>2.0.CO;2.
- Petersen, G., & Seberg, O. (2003). Phylogenetic analyses of the diploid species of *Hordeum* (Poaceae) and a revised classification of the genus. *Systematic Botany*, 28, 293-306. DOI: 10.1043/0363-6445-28.2.293.
- Razavi, M., Vatankhah, M., Mirzaei, H., & Rokouei, M. (2006). Estimation of genetic trend of productive traits in Holstein cows of Central Province. *Research and Construction*, 77, 63-55. [In Persian]
- Sanchez, M. P., Govignon-Gion, A., Ferrand, M., Gelé, M., Pourchet, D., Amigues, Y., Fritz, S., Boussaha, M., Capitan, A., & Rocha, D. (2016). Whole-genome scan to detect quantitative trait loci associated with milk protein composition in 3 French dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 99, 8203–8215. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11437>.
- Sanchez, M. P., Govignon-Gion, A., Croiseau, P., Fritz, S., Hozé, C., Miranda, G., Martin, P., Barbat-Leterrier, A., Letaïef, R., & Rocha, D. (2017). Within-breed and multi-breed GWAS on imputed whole-genome sequence variants reveal candidate mutations affecting milk protein composition in dairy cattle. *Genetic Selection Evolution*, 49, 68. DOI: 10.1186/s12711-017-0344-z.
- Shokri, S., Khezri, A., Mohammadabadi, M., & Kheyroodin, H. (2023). The expression of MYH7 gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani breed. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15(2), 217-236.
- Somasundaram, R. K., Gupta, I. D., Raja, K. N., Periasamy, K., & Ramasamy, S. (2020). Polymorphism of Bovine Forebrain Embryonic Zinc Finger Like (FEZL) gene associated with resistance to mastitis in Indian cattle. *International Journal of Livestock Research*, 10(8), 144–149. <https://doi.org/10.5455/ijlr.20200425120435>.
- Sugimoto, M., & Sugimoto, Y. (2012). Variant in the 5'untranslated region of insulin-like growth factor 1 receptor is associated with susceptibility to mastitis in cattle. *G3*, 2, 1077-1084. DOI: 10.1534/g3.112.003095.
- Sugimoto, M., Fujikawa, A., Womack, J. E., & Sugimoto, Y. (2006). Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 103(17), 6454–6459. DOI: 10.1073/pnas.0601015103.
- Sugimoto, M., Itoh, T., Gotoh, Y., Kawahara, T., Moriya, H., Uchimura, Y., & Sugimoto, Y. (2011). Enhanced clinical mastitis resistance in Holsteins with a FEZL p.Gly105(12/13) polymorphism. *Journal of Dairy Science*, 94, 2103-2107. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3362>.
- Sugimoto, M., Uchiza, M., & Kuniyuki, M. (2013). Effects of a Forebrain embryonic zinc finger-like p.Gly105 (12:13) polymorphism on mastitis resistance: an embryo-transfer study. *Molecular Biology and Genetic Engineering*, 1(1), 2053-5767. DOI:10.7243/2053-5767-1-1.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.
- Urioste, J. I., Franzén, J., Windig, J. J., & Strandberg, E. (2012). Genetic relationships among mastitis and alternative somatic cell count traits in the first 3 lactations of Swedish Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 3428-3434. DOI: 10.3168/jds.2011-4739.
- Wall, R. J., Powell, A. M., Paape, M. J., Kerr, D. E., Bannerman, D. D., Pursel, V. G., Wells, K. D., Talbot, N., & Hawk, H. W. (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Biotechnology*, 23, 445–451. DOI: 10.1038/nbt1078.
- Wu, J. Y., Feng, L., Park, H. T., Havlioglu, N., Wen, L., Tang, H., Bacon, K. B., Jiang, Z., Zhang, X. C., & Rao, Y. (2001). The neuronal repellent slit, a molecule known to guide axon projection and neuronal migration, inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. *Nature*, 410, 948-952. DOI: 10.1038/35073616.
- Yang, T. X., Li, H., Wang, F., Liu, X. L., & Li, Q. Y. (2013). Effect of cattle breeds on milk composition and technological characteristics in China. *Asian-Australasia Journal Animal Science*, 26(6), 896-904. DOI: 10.5713/ajas.2012.12677.
- Zhang, C., Fan, X., Yu, H. Q., Zhang, H. Q., Wang, X. L., & Zhou, Y. H., (2009). Phylogenetic analysis of questionable tetraploid species in *Roegneria* and *Pseudoroegneria* (Poaceae: Triticeae) inferred from a gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 412-420. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.04.011>.