مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

ارتباط بین حد آستانه‌ای و اندازه موتیف نشانگرهای ریزماهواره با صفات رشد و شاخص نسبت کلیبر دربزهای تجاری

آرش جوانمرد*[1]، لیلا علی طالش[2]، محمد حسین مرادی[3]، زهرا عزیزی[1]، علی اسماعیلی زاده کشکویه[4]

[1]استادیار و دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

فارغ التحصیل کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد، مجتمع کشاورزی و منابع طبیعی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، ایران.

[3] استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

[4]دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰٤/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۹/۱۳

چکیده

تعیین ژنوتیپ جایگاه‌های ریزماهواره‌ای همیشه با ریسک بروز خطا همراه است، که می‌تواند به‌طور معنی‌داری کلیه نتایج حاصل از آنرا تحت‌تأثیر قرار دهد. یکی از راهکارهای جدید برای حل این مشکل، استفاده از سامانه گروه‌بندی جدید ژنوتیپی براساس ماهیت توالی موتیف و دامنه آللهای مشاهده شده به جای قرائت ژنوتیپ انفرادی هر جایگاه می‌باشد. در این راستا، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی ارتباط بین سه گروه بندی جدید ژنوتیپی هموزیگوت برای آلل‌های کوتاه، هموزیگوت برای آلل‌های بلند و هتروزیگوت برای ترکیب آلل‌های کوتاه و بلند برای تعدا کل ۱۳ جایگاه ریزماهواره با صفات رشد و شاخص نسبت کلیبر در بزهای تجاری بوئر بود. پس از تصحیح اثرات ثابت، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گروه ژنوتیپی هتروزیگوت در جایگاههای TEXAN006 و CSSM32 تاثیر معنی‌داری بر روی صفت وزن تولد بزغاله‌ها دارند ($P<0.05$). همچنین افراد متعلق به گروه هموزیگوت برای آلل‌های بلند در جایگاه BMC1009 به طور معنی‌دار دارای وزن از شیرگیری بالاتری در مقایسه با دیگر گروه‌های ژنوتیپی بودند ($P<0.05$). علاوه بر این ارتباط معنی‌داری درجایگاه‌های ریزماهواره‌ای BM4307، BM4621 و UWCA46 با صفت افزایش وزن روزانه مشاهده گردید ($P<0.05$). در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد، که دیدگاه گروه‌بندی جدید آللهای مشاهده شده در جایگاه ریزماهواره بر مبنای تغییر طول موتیف می‌تواند خطاهای تعیین ژنوتیپ ناشی از وجود باندهای کاذب در سیستم تعیین ژنوتیپ انفرادی را حداقل نماید و شانس بالاتری را برای مشاهده همبستگی بین این جایگاهها و صفات اقتصادی مورد ارزیابی ایجاد کند.

کلمات کلیدی: نشانگرهای ریزماهواره، خطای تعیین ژنوتیپ، طول موتیف، صفات رشد

* نویسنده مسئول: آرش جوانمرد تلفن: ۰٤۱۳۳۳٥٦۰۰٤ Email: a.javanmard@tabrizu.ac.ir

مقدمه

بز تجاری نژاد بوئر[1] به علت رشد سریع، کیفیت عالی گوشت، مقاومت در مقابل بیماریها، توان باروری بالای غیرفصلی و درصد بزغاله‌زایی بالا به عنوان یک نژاد معروف گوشتی در دنیا شناخته می‌شود (Malan, Greyling, 2000; 2000). منشأ پیدایش این نژاد آفریقای جنوبی می‌باشد که بعدها به آمریکا، استرالیا، چین، آژانتین و مالزی آورده شده و جمعیت آن به سرعت افزایش یافته است. در این نژاد، پیشرفت ژنتیکی حاصل از انتخاب فنوتیپی برای صفات رشد به دلیل اندازه گیری آسان و وراثت‌پذیری متوسط به بالا، به میزان زیادی مؤثر بوده است (Naude and Hofmeyr, 1981).

در دهه‌های گذشته، نشانگرهای ریزماهواره به دلیل چند شکلی بالا، به عنوان یک ابزار سودمند و کارآمد در انتخاب و بررسی تنوع ژنتیکی حیوانات اهلی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Estoup and Angers, 1998). در مطالعات متعدد و گزارشات موجود، ارتباط نشانگرهای ریزماهواره با صفات رشد، در گونه‌های اهلی مختلف به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است اما از چالشهای مورد بحث و معایب ذکر شده، احتمال بروز خطای تعیین ژنوتیپ در نشانگرهای ریزماهواره می‌باشد زیرا اولاً، بنا به ماهیت این جایگاهها عملا تفاوت توالی نوکلئوتیدی در ژنوم دو فرد معمولاً بیش از چند باز نوکلئوتیدی نیست و ثانیاً وجود الگوهای باندی کاذب حتی با به کارگیری روشهای پیشرفته الکتروفورز نیز قابل اجتناب نمی‌باشد. بنابراین قرائت ژنوتیپ نادرست، امکان اجرای برنامه اصلاح مولکولی موثر و با صحت بالا را غیر محتمل می‌کند. یکی از راهکارهای اخیر برای غلبه بر این تنگنا، استفاده از سیستم گروه‌بندی جدید ژنوتیپهای مشاهده شده بر اساس ماهیت و طول موتیف ریزماهواره و انساب ژنوتیپ مشاهده شده افراد به جای ژنوتیپ انفرادی افراد می‌باشد. بطوریکه ژنوتیپ‌های هرجایگاه بر اساس اندازه آلل به صورت گروه هموزیگوت برای آلل‌های کوتاه، گروه هموزیگوت برای آلل‌های بلند و گروه هتروزیگوت برای آلل‌های کوتاه و بلند گروه‌بندی می‌شوند.

ریزماهواره‌ها اغلب، در مناطق آغازین رونویسی متمرکز هستند که خود به خود نقش بالقوه آنها را در تنظیم ژن پیشنهاد می‌کند. براساس یافته‌های اخیر در ژنتیک انسانی، ارتباط بین ریزماهواره‌ها و صفات فنوتیپی نه تنها به یک آلل ویژه بلکه به حد آستانه‌ای و اندازه موتیف تکراری نیز وابسته می‌باشد. به عنوان مثال کاهش فزاینده در نسبت‌های رونویسی یک ژن به وسیله افزایش تدریجی در تعداد تکرار از ۱٦ به ۲۰ برای یک ریزماهواره CA در اینترون ۱ از ژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی[2] در انسان گزارش شده است

[1] Boer

[2] Epidermal Growth Factor Receptor

(Gebhardt *et al.*, 1999). همچنین با افزایش تدریجی در تعداد تکرار نوکلئوتیدی از صفر به ۲۱ برای ریزماهواره CA در ناحیه آغازگر ژن متالو پروتئیناز۹ ماتریکس انسانی میزان و سرعت رونویسی افزایش می‌یابد (Shimajiri *et al.*, 1999). در تحقیقی دیگر نشان داده شد در ژن آلدوردوکتاز، تغییر درتعداد تکرار $(CA)_n$ ریزماهواره مستقر در منطقه پایین دست آغازگر با بروز بیماریهای دیابت و رتینوپاتی در ارتباط است و در ژن α گیرنده استروژن، تغییر در تعداد تکرار ریزماهواره $(TA)_n$ با تغییرات در تراکم مواد معدنی استخوانی و استخوان‌سازی مرتبط می‌باشد (Hayashi *et al*. 2007).

در تحقیقاتی مشابه در گاوهای گوشتی کوتوله،تیم تحقیقاتی Lucy *et al.* (1998) نشان دادند که تعداد تکرار نوکلئوتیدی ریزماهواره GT مستقر در ناحیه آغازگر ژن گیرنده هورمون رشد GHR در گاوهای بوس ایندیکوس[1] به صورت تکرارهای ۱۱ جفت بازی و در گاوهای بوس-تاروس[2] معمولاً یک تکرار ۲۰-۱٦ جفت بازی را شامل می‌شود. این نتایج نشان می‌داد که آلل کوتاه ریزماهواره مشاهده شده با وزن از شیرگیری پایین و وزن لاشه ارتباط معنی‌داری دارند (Hale *et al.*, 2000). این رویکرد دلیلی بر وجود ارتباط منفی صفت رشد با آلل کوتاه در ریزماهواره GT است و رشد کم در گاوهای پرواری آنگوس[3] ممکن است مستقیماً به طول کوتاه این تکرار واقع در پروموتور ژن گیرنده هورمون رشد مرتبط باشد در پژوهشی Weller (2008) با مطالعه ریزماهواره‌های موثر بر میزان رونویسی نشان دادند که چند شکلی-های طول ریز ماهواره یک ابزار مهم کنترل کننده تنوع صفات کمی است که اصلاحگران را در تدوین برنامه های اصلاحی کمک می‌کند.

در راستای بررسی این فرضیه، هدف مطالعه حاضر تعیین ژنوتیپ مجموع ۱۳ نشانگر ریزماهواره مختص ژنوم بز با استفاده از سیستم گروه‌بندی ژنوتیپی و سپس ارزیابی ارتباط آنها با صفات وزن بدن، افزایش رشد روزانه و در نهایت شاخص کلیبر[4] در بزهای تجاری نژاد بوئر بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، داده‌ها بطور تصادفی از ۱۲۲ رأس بز نژاد تجاری بوئر(نر و ماده) استرالیایی از بین گله‌های مختلف (۱۰۰۰-۳۰۰ رأسی) جمع-آوری گردید. بزهای ماده در این مطالعه، برای یک بار بزغاله‌زایی در سال، مدیریت و به طور کنترل شده با نرها جفت‌گیری می‌کردند. در شروع زمان پرورش، ماده‌ها وزن شدند و به طور تصادفی برای هر بز نر، بسته به سن، ۲۵ تا٤۰ ماده اختصاص داده شد. صفات رکوردگیری شده شامل وزن تولد، وزن از شیرگیری، وزن شش ماهگی، میانگین افزایش

[1] Bos indicus
[2] Bos taurus
[3] Angus
[4] Keliber index

وزن روزانه و نسبت کلیبر است. افزایش وزن روزانه بین تولد تا سه ماهگی (ADG_1)، بین سه ماهگی تا شش ماهگی (ADG_2) و بین تولد تا یک سالگی (ADG_3) و همچنین نسبت کلیبر بین سه ماهگی تا شش ماهگی (KBR_1) و بین شش ماهگی تا یکسالگی (KBR_2) محاسبه گردید. علاوه بر این، ویرایش‌های اساسی برای تصحیح رکوردهای اندازه‌گیری شده بر اساس عوامل ثابت تاثیرگذار بر هر حیوان انجام گرفت، رکوردهای حیواناتی که در یک دوره پرورش به خاطر بیماری و یا دلایل دیگر از بین رفته بود، از ارزیابی نهایی حذف شدند. رکوردهای خارج از سه انحراف استاندارد فنوتیپی ازمیانگین تصحیح شده نیز از محاسبات نهایی حذف شدند.

فرمول ریاضی زیر برای محاسبه صفت افزایش وزن از زمان تولد تا وزن از شیرگیری از روی رکوردهای موجود وزن تولد و وزن از شیرگیری هر حیوان استفاده شد:

$$ADG(g/day)=\frac{(WW-BW)}{Weaning\ Age}\times 100$$

که در این فرمول، ADG متوسط وزن روزانه، WW وزن از شیرگیری تصحیح شده و BW وزن تولد می‌باشد. برای تصحیح وزن از شیرگیری از فرمول ذیل استفاده گردید:

$$AWW(kg)=\frac{(ActualWW-BW)}{Weaning\ age(days)}\times 90+BW$$

که اجزا این فرمول AWW وزن از شیرگیری تصحیح شده و BW وزن تولد می‌باشد.

شاخص کلیبر طبق فرمول زیر محاسبه می شود:

$$ADG/W^{0.75}$$

که در فرمول فوق ADG متوسط افزایش وزن روزانه است که در واحد g/day بیان می‌شود، W وزن بدن در واحد کیلوگرم و $W^{0.75}$ حجم متابولیک می‌باشد.

استخراج DNA از خون کامل با استفاده از کیت تجاری QIAGEN انجام شد. خلوص DNA استخراج شده به وسیله نسبت‌های ۲٦۰/۲۸۰nm با فتوبیومتری[1] شرکت اپندورف تعیین شد. فناوری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) چندگانه با استفاده از WELLRED dye (شرکت بکمن) انجام شد و برای الکتروفورز محصولات PCR از دستگاه توالی‌یاب شرکت بکمن آمریکا CEQ8000 استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ mM $MgCl_2$، mM ۰/۲ dNTP، ۰/۰۱ mM از هرکدام از آغازگرها (Research Biolab)، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۰/۲ واحد از Taq DNA polymerase(Progma Company) انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل دمای واسرشت سازی اولیه ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه و ۳٤ سیکل واسرشت‌سازی به مدت ٤۵ ثانیه در دمای ۹٤°C، دمای اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه در دمای مخصوص هر آغازگر و ۷۲ °C به مدت ٤۵ ثانیه برای بسط و بسط نهایی به مدت

[1] Photobiometry

۱۰دقیقه در دمای ۷۲°C در نظرگرفته شد. توالی آغازگرها و دمای اتصال استفاده شده در اینجا از مطالعات قبلی گرفته شده است (Hale *et al.*, 2000). سیکل‌های Touch-down نیز به صورت واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C، پنج سیکل در دمای ۹۵°C به مدت ٤۵ ثانیه، در ٦۸°C برای ۱/۵ دقیقه (۲°C- برای هر سیکل)، ۷۲°C به مدت یک دقیقه و چهار سیکل از ۹۵°C به مدت ٤۵ ثانیه، ۵۸°C به مدت یک دقیقه(۲°C- برای هر سیکل)، ۷۲°C به مدت یک دقیقه و ۲۵ سیکل از ۹۵°C به مدت ٤۵ ثانیه، ۵۰°C به مدت یک دقیقه، ۷۲°C یک دقیقه و در نهایت پنج دقیقه در ۷۲°C انجام شد.

اندازه آلل‌ها به وسیله مقایسه باندهای مشاهده شده روی ژل با اندازه نشانگر[1] ۲۵ جفت-بازی تعیین شد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های هر جایگاه ریزماهواره‌ای چندشکل[2] بر اساس دامنه اللی مشاهده شده در کل جمعیت گروه‌بندی شد. ژنوتیپها طبق اندازه آلل‌ها در گروه‌های هموزیگوت برای آلل‌های کوتاه، هموزیگوت برای آلل‌های بلند و هتروزیگوت، در ۸ جایگاه ریزماهواره‌ای چندشکل از بین سیزده جایگاه کل بررسی شده آنالیز شدند (سایر نشانگرها الگوی یک‌شکل[3] نشان دادند). معیار گروه‌بندی ژنوتیپهای مشاهده شده بر اساس دامنه اللی گزارش شده در بانک توالیهای ژن و آلل‌های مشاهده شده در جمعیت حاضر بود. در هر گروه فاصله ده جفت باز معرف هر گروه اللی کوتاه و بلند بود و بین دو گروه نیز فاصله ده جفت باز به عنوان مرز متمایز کننده محسوب گردید که این دامنه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده بر اساس Levene (1949) و Nei (1973) و همچنین تعداد آلل‌های مؤثر و مشاهده شده طبق Crow and Kimura(1964) با استفاده از نرم افزار POPGENE v1.31 (Yeh, 1999) محاسبه گردید. روابط بین گروه‌های ژنوتیپی و نشانگرهای ژنتیکی و عملکرد رشد با آنالیز واریانس یک طرفه در نرم-افزار SAS version 9.1 تعیین شد. گروه‌های ژنوتیپی آلل‌ها به عنوان متغیر مستقل و رکوردهای صفات رشد به عنوان متغیر وابسته درنظرگرفته شد. مدل زیر در این مطالعه به کار برده شد:

$$Y_{ijklm}=\mu+ P_i+ L_j+ S_k+ X_l+ O_m+ \beta cov_{ij}+ e_{ijklm}$$

که در این مدل Y_{ijklm} رکورد فنوتیپی حیوان، μ میانگین کل، P_i اثرثابت i امین قلو (۱،۲،۳و٤)، L_j اثرثابت j امین تعداده بزغاله در هر زایش (۱،۲،۳)، S_k اثرثابت k امین جنس (۱و۲)، X_l اثر ثابت L امین سال تولد (۲۰۰۷و ۲۰۰۸)، O_m گروه mام از ژنوتیپ‌ها، β ضریب رگرسیون کوواریانس، cov_{ij} کوواریانسی بین وزن تولد و صفات اندازه گیری شده رشد است که طبق صفت

[1] Size Marker
[2] Polymorph
[3] Monomorph

آنالیز شده تغییر میکند و در نهایت e_{ijklm} خطای تصادفی در ارتباط با هر رکورد می‌باشد.

از طرفی در آنالیزها وزن تولد به عنوان کوواریت (همبسته) برای صفات افزایش وزن روزانه در نظر گرفته شد. پس از بررسی ارتباط بین هر گروه ژنوتیپی با رکوردهای رشد و در صورت معنی‌داری از طریق آزمون مقایسه میانگین بونفرونی[1] تصحیح شده، اختلاف و معنی داری بین آنها محاسبه گردید.

نتایج و بحث

وزن زنده در سنین مختلف، معیار انتخابی خوبی برای ارزیابی صفات رشد در نژادهای تیپ گوشتی بز محسوب می‌شود. صفات رشد، وراثت-پذیری بالایی دارند و پیشرفت ژنتیکی حاصل از انتخاب فنوتیپی در این صفات چشمگیر می‌باشد. مجموعه‌ای از مکانها با اثرات انفرادی کوچک به عنوان مکان صفات کمی یا QTLs نامیده می‌شوند که صفات رشد را کنترل می‌کنند و ممکن است اثرات مثبتی در تنوع وزن بدن و برنامه پیشرفت میانگین افزایش وزن روزانه داشته باشند. بعد از تعیین ژنوتیپ، ۸ جایگاه ریزماهواره‌ای شامل BM4307, BM4621, BMC1009, CSSM3, IDVGA37, TEXAN006, TGLA245, UWCA46 دارای چندشکلی بودند و ۵ جایگاه ILSTS004, INRA11, INRABEN17, MCM512, RM148 مونومورف شناخته شدند که از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شدند. معیارهای تعیین کننده چندشکلی از جمله تعداد آلل‌های واقعی(n_a)، تعداد آلل‌های مؤثر(n_e)، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و مورد انتظار، شاخص اطلاعاتی شانون (I)، میانگین تنوع ژنی Nei (1978)، و میانگین و انحراف استاندارد برای هر یک از نشانگرهای مورد مطالعه در جدول ۲ ارائه شده است.

یکی از معیارهای مورد استفاده جهت بررسی میزان تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌های مختلف تعداد آلل‌های نشانگرهای مورد استفاده می‌باشد. تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در مطالعات متعددی برای نشانگرهای ریز ماهواره‌ای گزارش شده است در پژوهشی Nanekarani *et al.* (2010)، دامنه تغییرات تعداد آلل‌ها در جایگاههای ریز ماهواره‌ای مورد مطالعه در سه نژاد گوسفند پوستی ایران را ٦ تا ۱۲ آلل و میانگین تعداد آلل به ازای هر جایگاه در سه نژاد قهوه‌ای شیراز، زندی و قره گل را به ترتیب ۸/۱، ۸، ۸/۱ گزارش نمودند. در مطالعه‌ای دیگر طی تحقیقات Muneeb *et al.* (2012) با استفاده از ۱۹ نشانگر ریزماهواره‌ای، ۱۷۳ آلل با دامنه‌ی ۲-۱٤ و میانگین ۹/۱۱ آلل مشاهده شده در هر جایگاه را در گوسفند نجدی گزارش کردند. مقایسه n_e با n_a در هر جایگاه، اطلاعاتی در مورد پیش غالبیت آلل‌های خاص در هر نژاد را فراهم می‌کند (Arranz *et al.*, 1998).

[1] Bonferroni

جدول ۱- دامنه اندازه اللی در جایگاه‌های مورد مطالعه و اندازه‌ی آللی در نظر گرفته شده برای آلل‌های کوتاه و بلند.

Table 1- The range of observed allele sizes in studied loci and the sizes which considered as short and long.

الل بلند Long allele	الل کوتاه Short allele	دامنه مشاهده شده Observed range	کروموزوم Chromosome	جایگاه Loci
220 - 210	200 - 190	221 - 189	1	BM4307
181 - 171	170 - 160	173 - 161	1	BM4621
310 - 300	290 - 280	308 - 282	5	BMC1009
234 - 224	223 - 213	221 - 213	1	CSSM32
200 - 190	126 - 116	206 - 116	2	IDVGA37
170 - 160	150 - 140	172 - 142	1	TEXAN006
150 - 140	130 - 120	151 - 131	1	TGLA245
140 - 130	120 - 110	140 - 111	1	UWCA46

جدول ۲- تنوع ژنی نئی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص شانون، تعداد آلل‌های مشاهده شده و مؤثر برای نشانگرهای مختلف در این تحقیق.

Table 2- Nei's genetic diversity, Observed and expected hetrozygosity, Shannon's index and effective and observed numbers of alleles for different markers in this research.

تعداد آلل-های واقعی Observed allele number (n_a)	تعداد آلل-های موثر Effective allele number (n_e)	شاخص شانون Shannon's index (I)	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Expected Hetrozygosity (H_{obs})	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Observed Hetrozygosity (H_{exp})	ضریب تنوع Gene diversity	جایگاه Loci
9	5.17	1.79	0.8	0.81	0.8	BM4307
6	3.73	1.42	0.61	0.73	0.73	BM4621
6	3.61	1.49	0.78	0.72	0.72	BMC1009
7	3.62	1.47	0.61	0.72	0.72	CSSM32
8	6.01	1.9	1	0.83	0.83	IDVGA37
11	4.85	1.77	0.78	0.79	0.79	TEXAN006
9	5.2	1.83	0.73	0.81	0.8	TGLA245
6	3.24	1.33	0.57	0.69	0.69	UWCA46
7.83	4.5	1.64	0.76	0.77	0.77	Mean
1.85	0.95	0.19	0.14	0.05	0.05	SD

یکی دیگر از فراسنجه‌های مهم در مقایسه و بررسی تنوع ژنتیکی نژادهای مختلف، تنوع ژنی می‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، میانگین (±انحراف معیار) تنوع ژنی در نژاد بز بوئر ۰/۰۵±۰/۷۷ می‌باشد. این میانگین بالاتر از مقادیر گزارش شده در نژادهای دیگر بز است. در چند پژوهش Moradi *et al.* (2013) میانگین تنوع ژنی را در بزهای نژاد مرخز با استفاده از نشانگرهای بین ریزماهواره‌ای ISSR، ۰/۳٤، Olivera *et al.* (2005) در جمعیت‌های مختلف نژاد موکسوتوی[1] برزیل با استفاده از نشانگرهای RAPD، ۰/۳۳ – ۰/۲۲ و Ajmone-Marsan *et al.* (2001) در بزهای ایتالیایی با استفاده از نشانگرهای AFLP، ۰/۲٤ – ۰/۲۱ گزارش کرده‌اند. بدون در نظر گرفتن تفاوت‌های نشانگری به نظر می‌رسد تنوع ژنی در بزهای بوئر در مقایسه با نژادهای بز ذکر شده بیشتر می‌باشد، هر چند در تفسیر این نتایج باید تفاوت-های نژادی و نحوه نمونه‌برداری متفاوت را نیز مد نظر قرار داد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میانگین (±انحراف معیار) شاخص اطلاعاتی شانن ۰/۱۹±۱/٦٤ می‌باشد. شاخص اطلاعاتی شانن روشی دیگر در ارزیابی تنوع ژنتیکی است که بیشتر در نشانگرهای ریزماهواره‌ای مورد استفاده قرار می-گیرد. در این نشانگرها به دلیل اینکه به طور عمده میزان هتروزیگوسیتی بیشتر از ۰/۸ است، برای رفع محدودیت موجود در مقایسه تنوع حاصل از این نشانگرها از شاخص اطلاعاتی شانن استفاده می-شود که مقدار عددی آن می‌تواند از یک بیشتر شود. به عنوان مثال طی پژوهش Gour *et al.* (2006) میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص اطلاعاتی شانن را در بزهای چاماناپاری[2] هند با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای به ترتیب ۰/۲۳±۰/۵۲ و ۰/۵۱±۱/۰٦ گزارش کرده‌اند. طی تحقیقات Muneeb et al. (2012) نیز هتروزیگوسیتی مشاهده شده، مورد انتظار و شاخص اطلاعاتی شانون را در گوسفند نجدی به ترتیب ۰/٦۷، ۰/۷۵، ۱/٦۹ گزارش کردند. به همین خاطر در این تحقیق شاخص اطلاعاتی شانن نیز برای مقایسات بعدی محاسبه گردید.

هشت نشانگر ریزماهواره به طور موفقیت-آمیزی در نژاد بز تجاری (بوئر) تکثیر شدند و طبق معیارهای استفاده شده برای تعیین چندشکلی، در تمام نشانگرها چندشکلی بالایی تشخیص داده شد. نتایج اندازه آللی در جدول ۲ ارایه شده است. بزرگترین اندازه باندی محصولات حاصل از تکثیر برای جایگاه BMC1009 مشاهده شد. تفاوت تعداد افراد مطالعه شده در هرسامانه، به دلیل مشکلات عدم تکثیر در تعدادی از نمونه‌ها می‌باشد.

[1] Moxoto

[2] Jamunapari goat

فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی جایگاه‌های مورد مطالعه در جدول ۳ ارائه شده است. ژنوتیپ‌های هرجایگاه طبق اندازه آلل به صورت گروه‌های هموزیگوس برای آلل‌های کوتاه LL، گروه هموزیگوس برای آلل‌های بلند HH و گروه هتروزیگوس برای آلل‌های کوتاه و بلند HL گروه-بندی می‌شوند. نتایج نشان داد که بیشترین فراوانی آللی بالا (H) مربوط به جایگاه IDVGA37 و بیشترین فراوانی آللی پایین (L) مربوط به جایگاه BMC1009 می‌باشد. از طرفی همان گونه که مورد انتظار بود گروه آلل‌های HH یعنی با طول بلند در اکثر موارد فراوانی بیشتری را نسبت به گروه آللی با طول کوتاه (LL) نشان دادند زیرا بروز جهش از نوع حذف کمتر از جهش از نوع اضافه شدن می-باشد (Comings, 1996).

جدول ۳- فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی جایگاه‌های مورد مطالعه.

Table 3- Genotypic and allelic frequencies of investigated loci.

فراوانی اللی		فراوانی ژنوتیپی			جایگاه
Allelic Frequency		**Genotypic Frequency**			**Loci**
H	**L**	**HH**	**HL**	**LL**	
0.87	0.13	0.74	0.26	0	BM4307
0.69	0.31	0.6	0.18	0.22	BM4621
0.44	0.56	0.12	0.63	0.25	BMC1009
0.53	0.47	0.27	0.51	0.22	CSSM32
0.99	0.01	0.99	0.01	0	IDVGA37
0.56	0.44	0.12	0.88	0	TEXAN006
0.62	0.38	0.29	0.66	0.05	TGLA245
0.4	0.6	0.12	0.57	0.31	UWCA46

LL: Homozygous for the short allele, **HL:** Heterozygous for long and short alleles, **HH:** Homozygous for the long allele.

میانگین حداقل مربعات گروه‌های ژنوتیپی بر روی وزن تولد، وزن از شیرگیری، وزن شش ماهگی و همچنین نسبت کلیبر بین سه ماهگی تا شش ماهگی (KBR_1) و بین شش ماهگی تا یکسالگی (KBR_2) در جدول ٤ ارائه شده است. نتایج نشان داد که ژنوتیپ HH در جایگاه‌های TEXAN006 و CSSM32 ژنوتیپ مطلوب برای وزن تولد می باشد ($P<0.05$). در افراد هموزیگوس برای آلل‌های بلند در جایگاه BMC1009 در مقایسه با دیگر جایگاه‌ها وزن شیرگیری بیشتری مشاهده گردید ($P<0.05$). به طوریکه گروه ژنوتیپی HH و LL در جایگاه BMC1009 با میانگین 9.80 در برابر 6.63 کیلوگرم اثر معنی‌دای بر روی وزن از شیرگیری نشان دادند

(P<0.01). وزن زنده بالا در ٦ ماهگی در افراد هتروزیگوس در جایگاه BM4621 و افراد هتروزیگوس و هموزیگوس برای آلل‌های بلند در جایگاه UWCA46 مشاهده شد. در جایگاه UWCA46 گروه آللی بلند نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها با وزن شش‌ماهگی ارتباط معنی‌دار مثبت نشان داد، درحالیکه در جایگاه‌های BM4621 این روند برعکس بود (P<0.01). همچنین هیچکدام از نشانگرهای مورد بررسی در این تحقیق ارتباط معنی‌داری با میزان کلیبر نشان ندادند.

جدول ٤- مقایسه میانگین حداقل مربعات وزن تولد (BW_0)، وزن از شیرگیری (WW) وزن ٦ ماهگی (W_6)، نسبت کلیبر بین سه ماهگی تا شش ماهگی (KBR_1) و بین شش ماهگی تا یکسالگی (KBR_2) در گروه‌های ژنوتیپی مختلف نشانگرهای ریزماهواره‌ای با اثرات معنی‌دار در سطح ۰/۰۵.

Table 4- Comparison of least square means for birth weight (BW_0), weaning weight (WW), weight in 6 months (W6), Keliber ratio among 3-6 months (KBR1) and among 6-12 months (KBR2) traits in different genotypic classes of significant microsatellite markers (α=0.05).

KBR2 نسبت کلیبر دو Keliber2	KBR1 نسبت کلیبریک Keliber1	W_6(kg) وزن شش ماهگی 6^{th} months weight	WW(kg) وزن ازشیرگیری Weaning weight	BW_0(kg) وزن تولد Birth weight	گروه Class	جایگاه مورد بررسی Loci
14.98 ± 3.83	11.75 ± 2.74	23.50 ± 2.52^{b}	7.70 ± 2.37	3.83 ± 0.59	HH(68)	BM4621
16.77 ± 3.31	9.96 ± 2.37	25.09 ± 2.36^{a}	8.65 ± 2.22	3.92 ± 0.55	HL (20)	
17.39 ± 3.46	8.27 ± 2.47	23.68 ± 2.51^{b}	7.63 ± 2.36	3.85 ± 0.58	LL(24)	
16.19 ± 3.73	11.017 ± 2.67	25.14 ± 2.72	9.80 ± 2.57^{a}	4.07 ± 0.64	HH(13)	BMC1009
16.20 ± 3.41	9.387 ± 2.44	23.86 ± 2.36	7.55 ± 2.22^{ab}	3.55 ± 0.55	HL (71)	
16.75 ± 3.36	9.587 ± 2.40	23.27 ± 2.46	6.63 ± 2.32^{b}	3.99 ± 0.57	LL(28)	
16.86 ± 3.58	10.10 ± 2.56	24.24 ± 2.50	8.18 ± 2.36	4.05 ± 0.58^{a}	HH(31)	CSSM32
16.17 ± 3.32	10.27 ± 2.38	23.78 ± 2.42	8.32 ± 2.28	3.86 ± 0.56^{ab}	HL (58)	
16.11 ± 3.68	9.60 ± 2.63	24.25 ± 2.45	7.48 ± 2.31	3.68 ± 0.57^{b}	LL(23)	
16.49 ± 3.45	10.09±2.47	23.64 ± 2.46	7.49 ± 2.32	4.17 ± 0.57^{a}	HH(13)	TEXAN006
16.27 ± 3.38	9.88 ± 2.42	24.54 ± 2.47	8.50 ± 2.33	3.57 ± 0.58^{b}	HL (99)	
--	--	--	--	--	LL(0)	
17.35 ± 3.80	9.71 ± 2.72	24.63 ± 2.50^{a}	7.74 ± 2.35	4.03 ± 0.58	HH(13)	UWCA46
15.31 ± 3.38	10.70 ± 2.42	24.46 ± 2.43^{a}	7.50 ± 2.29	3.82 ± 0.57	HL (63)	
16.49 ± 3.42	9.56 ± 2.45	23.18 ± 2.46^{b}	8.74 ± 2.32	3.75 ± 0.57	LL(36)	

*اعداد داخل پرانتز بیانگر تعداد بزهای قرار گرفته در هر گروه ژنوتیپی است.

***The numbers inside the parenthesis are showing the number of animals in each genotypic class.**

افزایش وزن روزانه بین تولد تا سه ماهگی (ADG_1) و بین سه ماهگی تا شش ماهگی (ADG_2) و بین تولد تا یک سالگی (ADG_3) محاسبه گردید. ژنوتیپ هموزیگوت و هتروزیگوت HH و HL نشانگر UWCA46، دارای اثرات معنی‌داری با افزایش وزن روزانه در سنین مختلف بود و ژنوتیپ هتروزیگوت HL نشانگرهای BM4621 و BM4307 اثر معنی‌داری روی افزایش وزن روزانه بین ٦ ماهگی تا یکسالگی داشت (جدول ٥).

تمام نشانگرهای ریزماهواره‌ای با اثرات معنی‌دار بر روی رشد و وزن بدن در این تحقیق در کروموزوم‌های ۱ و ۵ ژنوم بز قرار گرفته‌اند. BM4307 و UWCA46 از کروموزوم شماره ۱ با وزن بدن و میانگین افزایش وزن روزانه ارتباط نشان دادند. در پژوهشی Lan *et al.* (2007) گزارش کردند که یک جهش خاموش در ژن POUF1 که بر روی کروموزوم شماره ۱ قرار دارد به صورت معنی‌داری چندقلوزایی و وزن بدن را در بز تحت تأثیر قرار می‌دهد. در مطالعه‌ای، Javanmard (2012) دو QTL بین نشانگرهای BMC1009 و RM029 در کروموزوم ۵ بز گزارش کردند که با وزن تولد ارتباط معنی‌داری را نشان می‌داد. وجود ارتباط بین QTL و وزن تولد در کروموزوم ۵ برای بزهای رائینی نیز گزارش شده است (Mohammad Abadi *et al.*, 2009).

در پژوهشی Saghi *et al.* (2011) نیز QTL معنی‌داری را برای وزن تولد، وزن ۳۰ و ٦۰ روزگی در کروموزوم یک به ترتیب در نزدیکی نشانگرهای BMS 2572، BMS2321 و BM7145 گزارش کردند. همچنین طی تحقیقات Esmailizadeh (2010) QTL معنی‌داری را در کروموزوم یک نزدیک نشانگر BMS2572 در گوسفند کرمانی گزارش کرد. نتایج بدست آمده در این تحقیق مبنی بر وجود QTLهای کنترل کننده صفات رشد در کروموزوم‌های ۱ و ۵ با نتایج این تحقیقات در گونه‌های مختلف مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر با استفاده از روش گروه-بندی ژنوتیپ براساس طول توالی موتیف ریزماهواره‌ای به جای ژنوتیپ انفرادی برای تعیین ارتباط‌های معنی‌دار بین نشانگرها و صفات کمی یک مرحله ابتکاری به طرف انتخاب به کمک نشانگرها در حیوانات اهلی می‌باشد.

شیوه تشکیل گروههای آللی برای مکانهای ریزماهواره که به وسیله Comings (1998) به جای بررسی ارتباط با هر آلل پیشنهاد شده بود، گنجاندن تعداد بیشتری از افراد هر ژنوتیپ را امکان پذیر می‌سازد. بنابراین قابلیت اطمینان آزمایش‌های مرتبط افزایش می‌یابد. در مجموع، نتایج مطالعه حاضر امکان استفاده از این روش را برای تعیین ارتباطات معنی‌دار بالا با صفات کمی و بگارگیری

انتخاب به کمک نشانگرها در حیوانات اهلی نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مدیریت و کارکنان مزرعه بز تجاری بوئر برای فراهم کردن نمونه‌ها برای این مطالعه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

جدول ٥- مقایسه میانگین حداقل مربعات افزایش وزن روزانه بین تولد تا سه ماهگی (ADG1)، بین سه ماهگی تا شش ماهگی (ADG2) و بین شش ماهگی تا یک سالگی (ADG3) در گروه‌های ژنوتیپی مختلف نشانگرهای ریزماهواره‌ای با اثرات معنی‌دار.

Table 5- Comparison of least square means for Average Daily Gain among Birth to 3 months (ADG_1), 3-6 months (ADG_2) and 6-12 months (ADG_3) in different genotypic classes of significant microsatellite markers (α=0.05).

جایگاه مورد بررسی Loci	گروه Class	افزایش وزن روزانه بین تولد تا سه ماهگی Average daily gain among 0-3 months ADG_1(g/day)	افزایش وزن روزانه بین سه ماهگی تا شش ماهگی Average daily gain among 3-6 months ADG_2(g/day)	افزایش وزن روزانه شش ماهگی تا یک سالگی Average daily gain among 6-12 months ADG_3(g/day)
BM4307	HH(82)*	40.86 ± 16.35	174.84 ± 34.64	108.28 ± 13.20[b]
	HL (30)	54.19 ± 16.40	179.16 ± 34.70	117.06 ± 13.23[a]
	LL(0)	--	--	--
BM4621	HH(68)	44.63 ± 17.33	173.31 ± 35.93	109.40 ± 13.69[b]
	HL (20)	54.84 ± 15.57	180.25 ± 33.61	117.98 ± 12.81[a]
	LL(24)	43.10 ± 17.21	177.44 ± 35.77	110.64 ± 13.63[b]
UWCA46	HH(13)	57.74 ± 17.11[a]	186.40 ± 35.65[a]	114.79 ± 13.58[a]
	HL (63)	42.68 ± 16.40[b]	185.84 ± 34.71[a]	114.76 ± 13.23[a]
	LL(36)	52.15 ± 16.74[b]	158.76 ± 35.15[b]	108.47 ± 13.40[b]

*اعداد داخل پرانتز بیانگر تعداد بزهای قرار گرفته در هر گروه ژنوتیپی است.

*The numbers inside the parenthesis are showing the number of animals in each genotypic class.

منابع

Ajmone-Marsan P, Negrini R, Crepaldi P, Milanesi E, Gorni C, Valentini A, Cicogna M (2001). Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers. Animal Genetics 32: 281-288

Arranz JJ, Bayón Y, Primitivo F (1998). Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. Animal Genetics 29: 435–440.

Comings DE (1998). Polygenic inheritance and minisatellites. Molecular Psychiatry 3: 21-31.

Comings DE, Gade R, MacMurray JP, Muhleman D, Peters WR (1996) Genetic variants of the human obesity (OB) gene: Association with body mass index in young women, psychiatric symptoms, and interaction with the dopamine D-2 receptor (DRD2) gene. Molecular Psychiatry 1:325-335.

Esmailizadeh KA (2010). A partial genome scan to identify quantitative trait loci affecting birtweight in kermani sheep. Small Ruminant Research. 94: 73-78.

Estoup A, Angers B (1998). Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations, Advances in Molecular Ecology, IOS Press, Amsterdam.

Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B (1999) Modulation of epidermal growth factor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. Journal of Biological Chemistry. 274:13176−13180.

Gour DS, Malik G, Ahlawat SPS, Pandey AK, Sharma R, Gupla N, Gupta SC, Bisen PS, Kumar D (2006) Analysis of genetic structure of Jamunapari goats by microsatellite markers. Small Ruminant Research. 66:140-149.

Greyling JP (2000) Reproduction traits in the Boer goat doe. Small Ruminant Research. 36 (2):171–177

Hale CS, Herring WO, Shibuya H, Lucy MC, Lubahn DB, Keisler DH, Johnson GS (2000) Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of the growth hormone receptor gene. Journal of Animal Science. 78:2099–2104.

Hayashi, T., Iwamoto, Y., Kaku, K., Hirose, H., Maeda, S (2007) Replication study for the association of TCF7L2 with susceptibility to the type 2 diabetes in a Japanese population. Diabetologia 50, 980–984

Javanmard A (2012) Genetic Parameters and polymorphism in candidate genes for growth and conformation traits in boer goats. PH.D thesis, University of Putra, Malaysia.

Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics. 49:725-738.

Lan XY, Pan CY, Chen CL, Zhang JYL, Zhao C Z, Lei AL Zhang L (2007). ALUI PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat POUF1 locus and its association with production traits. Small Ruminant Research. 73 (3): 8-12.

Levene H (1949) On a matching problem arising in genetics. Annals of Mathematical Statistics. 20: 91-94.

Lucy MC, Johnson GS, Shibuya S, Boyd CK, Herring WO (1998) Rapid communication: Polymorphic (GT)n microsatellite in the bovine somatotrophin receptor gene promoter. Journal of Animal Science. 76:2209−2210

Malan SW (2000) The improved Boer goat. Small Ruminant Research. 36 (2): 165–170.

Mohammad Abadi MR, Askari N, Baghizadeh A, Esmailizadeh AK (2009) A directed search around caprine candidate loci provided evidence for microsatellites linkage to growth and cashmere yield in Rayini goats. Small Ruminant Research. 81 (2-3): 146-151.

Moradi MH, Rostamzadeh J, Rashidi A, Vahabi Kh, Farahmand H (2013) Analysis of genetic diversity in Iranian Mohair goat and its color types using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Journal of Agricultural Communications. 1:2.

Muneeb M, Aljummah RS, Alshaik MA (2012) Genetic diversity of Najdi sheep based on microsatellite analysis. African Journal of Biotechnology.11 (83):14868-14876.

Nanekarani S, Amirinia C, Amirmozafari N, Vaez Torshizi R, Gharahdaghi A (2010). Genetic variation among pelt sheep population using microsatellite markers. African journal of Biotechnology. 9(44): 7437-7445.

Naude RT, Hofmeyr HS (1981) Meat Production. In: C. Gall (Ed.), Goat Production. Academic Press, London, New York, pp. 285–307.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences. 70:3321-3323.

Nei M (1978) Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press, USA.

Olivera RR, Egito AA, Riberio MN, Paiva SR, Albuquerque MSM, Castro SR, Mariante AS, Adriao M (2005) Genetic characterization of the Moxoto goat breed using RAPD markers. Pesq. Agropec. Brasilia. 40:233-239.

Renaville N, Gengler E, Vrech A, Prandi S, Massart C, Corradini C, Bertozzi F, Mortiaux A, Burny, Portetelle D (1997) Pit-1 gene polymorphism, milk yield and conformation traits for Ital Holstein-Frisian bulls. Journal of Dairy Science. 80: 3431–343.

Saghi, D., Aslaminajad,A.M.Tahmoraspour,M.R.Nassiri,G.,Dashab.(2012).Identification of QTL controlling body weigh in bluchi sheep. Journal of Animal Science. 95:200-201(in persian)

Shimajiri S, Nobuyuki N, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Wang KY, Sasaguri Y (1999) Shortened microsatellite $(CA)_{21}$ sequence down-regulates promoter activity of matrix metaloproteinase 9 gene. FEBS Let. 455:70−74.

Yeh FC (1999). POPGENE, v.1.31. Distributed by the http:..www.ualberta.ca.~fyeh.fyeh.

Yu K, Park J, Poysa V, Gepts P (2000) Integration of simple sequence repeats (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (phaseolus vulgaris). Heredity 91:429-434.

Weller JI. 2008. Quantitative trait loci analysis in animals. New York: CABI Publishing;

Zhao ME, Hines HC (2004) Associations of polymorphisms in the pit-1 gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle. Journal of Animal Science 82: 2229-2233.

Association between threshold size and motif length of microsatellite markers with growth traits and Keliber ratio in commercial goats

Javanmard A.[*1], Alitalesh L.[2], Moradi M. H.[3], Azizi Z.[1], Esmailzadeh A. K.[4]

[1]Assistant Professor and Ph.D. Student, Department of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2]Ph.D. Student, Department of Animal Science, University of Tehran, Karaj, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Animal Science, Arak University, Arak, Iran.
[4]Associate Professor, Department of Animal Science, University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

Microsatellite genotyping can always be prone to genotyping errors which significantly affect the entire subsequent analysis. One of the new approaches to overcome this problem is an alternative method of using a clustering system of genotypes based on microsatellite motif length and allelic frequencies range instead of individual genotypes. The objective of the present study was to establish an association of 13 microsatellite markers, classified into three new groups based on allele size consisting homozygous for the short allele, homozygous for the long allele and the class of heterozygous for long and short alleles, with body weight and Keliber ratio in commercial Boer goats. The results after considering the fixed effects, revealed that the class of heterozygous for long and short alleles of TEXAN006 and CSSM32 loci were significantly associated with kids birth weight ($P<0.05$). The highest weaning weight was observed in individuals homozygous for long alleles at the BMC1009 locus ($P<0.05$). The BM4307, BM4621 and UWCA46 loci were also shown an association with average daily gain ($P<0.05$). In conclusion, the results showed that the use of motif length in the genotyping of microsatellite markers instead of genotype of each locus can minimize the genotyping errors and cause the higher probability to get a significant association with economically important traits.

Keywords: Microsatellite markers, Genotyping error, Motif length, Growth traits.

[*] **Corresponding Author**: Javanmard A. **Tel:**041-33356004 **Email:** a.javanmard@tabrizu.ac.ir