بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی

گروه علوم دامی

(ژنتیک و اصلاح نژاد)

عنوان:

بررسی ارتباط چند شکلی ژن کاپا-کازئین با صفات اقتصادی گاوهای بومی استان گیلان

از:

فردین ناظمی تنگ

استاد راهنما:

دکتر سید ضیاءالدین میرحسینی

استاد مشاور:

دکتر نوید قوی‌حسین‌زاده

مهندس مختار مهدی‌زاده

اسفند ۱۳۹۲

تقدیم به:

معلمان، استادان و معماران باورهایم.

تقدیم به:

خطوط مبهم پیشانی پدر فداکارم،

غزل ناب هستیام، استوارترین کوه تاریخ بودنم،

به رسم بوسه‌های بر دستان با صفایش.

تقدیم به:

شانه‌های بی‌دریغ مادر مهربانم، آن شکیبه بی‌ادعا،

زیباترین حکایت زندگیام،

به شوق طنین روح انگیز دعای خیرش.

ای هستی بخش وجودم را بر نعمات بی کرانت توان شکر نیست ذره ذره وجودم برای تو و نزدیک شدن به تو می تپد. الهی مرا مدد کن تا دانش اندکم نه نردبانی باشد برای فزونی تکبر و غرور، نه حلقه ای برای اسارت و نه دست مایه ای برای تجارت بلکه گامی باشد برای تجلیل از تو و متعالی ساختن زندگی خود و دیگران.

بر خود لازم می دانم از حامیان همیشگی ام، از **خانواده** عزیزم که عشق و زندگی را از آن ها آموختم، سپاسگزاری کنم. آنان که صدایشان برایم زنگ زندگی است. خالصانه بر آستان پر مهرشان سر فرود می آورم و بر دستانشان بوسه می زنم که تمام هستی من مدیون محبت های بی ادعایشان است.

از استاد بزرگوارم، **جناب آقای دکتر سید ضیاء الدین میر حسینی** که راهنمایی ایجانب را در طول انجام پایان نامه بر عهده داشتند، و راهنمای علم و ادب بوده و هستند، تشکر می کنم. بی شک بدون وجود راهنمایی های ارزنده شان و دلگرمی های دلسوزانه شان، طی این مسیر برایم ناممکن بود. مسیری که با روشنایی علم و حمایت ایشان به انتها رسید.

مراتب تقدیر و تشکر خود را از **جناب آقای دکتر سید حسین حسینی مقدم** - و **جناب آقای دکتر فرجاد رفیعی** که زحمت بازخوانی این تحقیق را بر عهده گرفتند اعلام می دارم.

از جناب آقای **دکتر نوید قوی حسین زاده** و جناب آقای **مهندس مختار مهدی زاده** به واسطه مشاوره این پایان نامه سپاسگزاری می کنم.

از حضور جناب آقای **دکتر بخشی** بعنوان نماینده محترم تحصیلات تکمیلی در جلسه دفاع سپاسگذارم.

از کلیه دوستان و همکلاسی هایم به دلیل کمک های بی دریغشان سپاسگزارم.

در پایان، از کلیه کسانی که به نحوی در این راه یاریم نمودند و کلیه عزیزانی که در جلسه دفاع حضور داشتند تشکر می کنم.

چکیده

بررسی ارتباط چند شکلی ژن کاپا-کازئین با صفات اقتصادی گاوهای بومی استان گیلان

فردین ناظمی تنگ

استفاده از اطلاعات مولکولی باعث بهبود سرعت پیشرفت ژنتیکی به‌ویژه در حیوانات با فاصله نسل طولانی مانند گاو شده است. روش ژن کاندیدا برای استفاده در جمعیت‌های طبیعی بسیار مناسب است. ژن‌های کاندیدا ژن‌هایی هستند که اثر محصولات این ژن‌ها بر صفات تولیدی از لحاظ فیزیولوژیکی و بیوشمیایی به اثبات رسیده است. در این پژوهش به منظور ارزیابی ارتباط چند شکلی جایگاه ژن کاپاکازئین با صفات تولید شیر در گاوهای بومی گیلان از ۱۰۰ رأس گاو ماده بومی مربوط به گله‌های اقماری استان گیلان استفاده شده از هر گاو به‌صورت تصادفی حدود ۴ تا ۶ میلی‌لیتر خون از ورید وداج گردن به‌وسیله لوله خلا (ونوجکت) گرفته شد. نمونه‌ها در لوله‌های حاوی ماده EDTA تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- سانتی‌گراد ذخیره گردید. DNA به روش شستشوی نمکی بهینه شده استخراج گردید. روش PCR-RFLP برای تکثیر و هضم قطعه ۳۵۰ جفت باز جایگاه اگزون ۴ ژن کاپاکازئین به‌کار گرفته شد. هضم محصولات حاصل از PCR در کاپاکازئین با آنزیم*Hinf* I صورت گرفت. به طور کلی فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده AA و AB به‌ترتیب ۰/۴۸ و ۰/۵۲ بود و فراوانی آلل A و B به‌ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۲۶ محاسبه گردید. براساس نتایج آزمون مربع کای، جمعیت مورد بررسی در تعادل هاردی-واینبرگ قرار نداشت. ارتباط ژنوتیپ‌ها با صفات تولیدی شیر بر اساس یک مدل خطی و با استفاده از نرم‌افزار SAS بررسی شد. مقایسه میانگین حداقل مربعات در این جایگاه نشان داد که اثر چند شکلی CSN-*Hinf* I بر صفات تولید شیر، درصد چربی و پروتئین شیر معنی‌دار است (P<۰/۰۱). بر این اساس، گاوهایی با ژنوتیپ AA نسبت به گاوهایی با ژنوتیپ AB به میزان ۰/۸۱ کیلوگرم در روز تولید شیر بیشتری داشتند و ژنوتیپ AB نسبت به ژنوتیپ AA به میزان ۰/۱ و ۰/۱۴ درصد به‌ترتیب درصد چربی و پروتئین شیر بیشتری داشت (P<۰/۰۱). با توجه به اینکه مطالعات انجام شده در نژادهای مختلف بیانگر ارتباط چند شکلی جایگاه ژن کاپاکازئین با برخی صفات اقتصادی گاوهای شیری است، بررسی این ارتباط در گاوهای بومی استان گیلان می‌تواند زمینه‌ساز استفاده از این نشانگر ژنتیکی در به‌نژادی دام‌های بومی محسوب شود.

واژگان کلیدی: چند شکلی ژنی، پروتئین شیر، کاپاکازئین، گاو بومی گیلان، PCR-RFLP

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه ۱
فصل اول: مرور و منابع ۵
۱-۱- اهمیت پرورش گاو ۶
۱-۱-۱- تاریخچه و ویژگی‌های گاو بومی گیلان ۶
۱-۲- اهمیت شیر در سبد غذایی انسان ۷
۱-۳- چندشکلی DNA ۷
۱-۴- راه‌های تشخیص چندشکلی ۸
۱-۴-۱- کاریوتیپ ۸
۱-۴-۲- استفاده از نشانگر ۸
۱-۵- نشانگرهای ژنتیکی ۸
۱-۶- انواع نشانگرها ۹
۱-۶-۱- نشانگرهای مورفولوژیک ۹
۱-۶-۲- نشانگرهای مولکولی ۱۱
۱-۶-۳- نشانگرهای DNA ۱۱
۱-۶-۴- نشانگرهای غیر مبتنی بر واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) ۱۲
۱-۶-۵- نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیرهای پلیمراز ۱۲
۱-۷- ویژگی نشانگر ۱۳
۱-۸- ژن‌های کاندیدا و کاربرد آن‌ها ۱۳
۱-۹- ژن‌های موثر بر تولید شیر در گاو ۱۴
۱-۹-۱- مجموعه ژنی هورمون رشد، گیرنده هورمون رشد (GH/GHR) ۱۴
۱-۹-۲- ژن PIT1 ..... ۱۵
۱-۹-۳- ژن لپتین ۱۵
۱-۹-۴- ژن دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز ۱ (DGAT1) ۱۵
۱-۱۰- کازئین ۱۶
۱-۱۰-۱- نقش کازئین ۱۷
۱-۱۰-۲- بتالاکتوگلوبولین (BLG) ۱۸
۱-۱۰-۳- ژن $s\alpha_1$ کازئین ۱۹
۱-۱۰-۴- ژن کاپاکازئین ۱۹
۱-۱۱- اثر چند شکلی ژنتیکی کاپاکازئین بر صفات تولیدی ۲۰
فصل دوم مواد و روش ها ۲۳
۲-۱- جمعیت مورد مطالعه ۲۴
۲-۲- خونگیری ۲۴
۲-۳- استخراج DNA ۲۴
۲-۳-۱- بافرهای مورد استفاده در استخراج DNA ۲۴

۲-۳-۱-۱- بافر جداکننده ۲۴
۲-۳-۱-۲- بافر لیز کننده ۲۵
۲-۳-۲- مراحل استخراج DNA از نمونه‌های خون ۲۶
۲-۴- ذخیره DNA ۲۷
۲-۵- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۲۷
۲-۵-۱- روش اسپکتروفتومتر ۲۷
۲-۵-۲- روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲۸
۲-۶- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و اجزای آن ۲۹
۲-۶-۱- اجزای واکنش PCR ۲۹
۲-۶-۲- بهینه سازی شرایط PCR ۲۹
۲-۶-۳- مراحل آماده سازی PCR ۳۰
۲-۶-۴- کنترل آلودگی PCR ۳۱
۲-۶-۵- تنظیم چرخه حرارتی PCR ۳۱
۲-۶-۶- توالی قطعه تکثیر شده در واکنش PCR ۳۲
۲-۶-۷- مشاهده محصول PCR ۳۲
۲-۷- هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم *Hinf* I ۳۲
۲-۷-۱- الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی با ژل آگارز ۳۳
۲-۷-۲- تعیین ژنوتیپ ۳۳
۲-۸- بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه ۳۳
۲-۸-۱- تعادل هاردی-واینبرگ ۳۳
۲-۸-۲- معیارهای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی ۳۴
۲-۸-۲-۱ فراوانی‌های آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها ۳۴
۲-۸-۲-۲- هتروزیگوتی یا تنوع ژنی ۳۵
۲-۸-۳- شاخص اطلاعات شانون (I´) ۳۶
۲-۸-۴- معیارهای چند شکلی ۳۶
۲-۸-۴-۱- تعداد آلل‌های واقعی ۳۶
۲-۸-۴-۲- تعداد آلل‌های موثر ۳۷
۲-۸-۴-۳- محتوای اطلاعات چند شکلی ۳۷
۲-۹- آنالیز آماری ۳۸
۲-۱۰- نرم افزارهای مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ۳۹
فصل سوم: نتایج و بحث ۴۰
۳-۱- کیفیت استخراج DNA ۴۱
۳-۲- تکثیر ژن کاپاکائین ۴۱
۳-۳- نتیجه هضم آنزیمی و چند شکلی قطعات با طول محدودشده (RFLP) ۴۲
۳-۳-۱- تیمار آنزیمی *Hinf* I برای جایگاه ژنی کاپاکازئین (تعیین ژنوتیپ افراد) ۴۲
۳-۴- بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه ۴۳
۳-۴-۱- تعیین فراوانی (آللی) و ژنوتیپی برای جایگاه ژن کاپاکازئین ۴۳
۳-۴-۲- بررسی تعادل هاردی-واینبرگ ۴۵

۳-۴-۳- معیارهای ارزیابی تنوع ژنتیکی و چند شکلی در جایگاه ژن کاپازئین ۴۶
۳-۵- تجزیه و تحلیل اثر متغیرهای مدل آماری بر صفات تولید شیر ۴۸
۳-۵-۱- اثر سطوح مختلف مدل آماری بر صفت تولید شیر روزانه ۴۸
۳-۵-۱-۱- بررسی اثر چند شکلی ژن کاپاکازئین بر تولید شیر روزانه ۴۸
۳-۵-۱-۲- بررسی اثر عوامل محیطی (غیر ژنتیکی) مدل آماری بر میزان تولید شیر روزانه ۵۰
۳-۵-۲- اثر سطوح مختلف مدل آماری بر صفت درصد چربی شیر ۵۳
۳-۵-۲-۱- بررسی اثر چند شکلی ژن کاپاکازئین بر صفت درصد چربی شیر ۵۳
۳-۵-۲-۲- بررسی اثر عوامل محیطی (غیر ژنتیکی) مدل آماری بر درصد چربی شیر ۵۴
۳-۵-۳- اثر سطوح مختلف مدل آماری بر صفت درصد پروتئین شیر ۵۷
۳-۵-۳-۱- بررسی اثر چند شکلی ژن کاپاکازئین بر صفت درصد پروتئین شیر ۵۷
۳-۵-۳-۲- بررسی اثر عوامل محیطی (غیر ژنتیکی) مدل آماری بر درصد پروتئین شیر ۵۹
۳-۶- نتیجه گیری ۶۲
۳-۷- پیشنهادها ۶۳
منابع ۶۴

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- ترکیبات مهم تشکیل دهنده پروتئین شیر در گاو ۱۷
جدول ۲-۱- مواد تشکیل دهنده بافر جداکننده ۲۵
جدول ۲-۲- مواد تشکیل دهنده بافر لیز کننده ۲۵
جدول ۲-۳- مخلوط واکنش به‌منظور انجام PCR ۲۹
جدول ۲-۴- توالی آغازگرها و توالی قطعه ۳۵۰ جفت بازی تکثیر شده از ژن کاپاکازئین ۳۲
جدول ۳-۱- فراوانی آللی مشاهده شده در جایگاه ژن کاپاکازئین ۴۴
جدول ۳-۲- فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار ژن کاپاکازئین به همراه آزمون χ^2 ۴۵
جدول ۳-۳- شاخص‌های تنوع ژنتیکی برای جایگاه ژن کاپاکازئین در جمعیت گاو بومی استان گیلان ۴۶
جدول ۳-۴- تعداد آلل واقعی و موثر ومحتوی اطلاعات چند شکلی برای ژن کاپاکازئین ۴۷
جدول ۳-۵- توصیف آماری صفات تولید شیر، درصد چربی و پروتئین شیر در جمعیت گاو بومی گیلان ۴۸
جدول ۳-۶- مقایسه میانگین حداقل مربعات تولید شیر روزانه در گروه‌های ژنوتیپی ژن کاپاکازئین ۴۹
جدول ۳-۷- مقایسه میانگین تولید شیر روزانه گاو بومی گیلان در مناطق مورد مطالعه ۵۰
جدول ۳-۸- مقایسه میانگین تولید شیر روزانه در بین دوره‌های شیردهی مختلف ۵۱
جدول ۳-۹- مقایسه میانگین تولید شیر روزانه در بین سال‌های زایش مختلف ۵۲
جدول ۳-۱۰- مقایسه میانگین تولید شیر روزانه بین فصل‌های زایش مختلف ۵۳
جدول ۳-۱۱- مقایسه میانگین حداقل مربعات درصد چربی شیر در گروه‌های ژنوتیپی ژن کاپاکازئین ۵۴
جدول ۳-۱۲- مقایسه میانگین درصد چربی شیر گاو بومی گیلان در مناطق مورد مطالعه ۵۵
جدول ۳-۱۳- مقایسه میانگین درصد چربی شیر در بین دوره‌های شیردهی مختلف ۵۵
جدول ۳-۱۴- مقایسه میانگین درصد چربی شیر در بین سال‌های زایش مختلف ۵۶
جدول ۳-۱۵- مقایسه میانگین درصد چربی شیر بین فصل‌های زایش مختلف ۵۶
جدول ۳-۱۶- مقایسه میانگین حداقل مربعات درصد پروتئین شیر در گروه‌های ژنوتیپی ژن کاپاکازئین ۵۷
جدول ۳-۱۷- مقایسه میانگین درصد پروتئین شیر گاو بومی گیلان در مناطق مورد مطالعه ۵۹
جدول ۳-۱۸- مقایسه میانگین درصد پروتئین شیر در بین دوره‌های شیردهی مختلف ۵۹
جدول ۳-۱۹- مقایسه میانگین درصد پروتئین شیر در بین سال‌های زایش مختلف ۶۰
جدول ۳-۲۰- مقایسه میانگین درصد پروتئین شیر بین فصل‌های زایش مختلف ۶۰

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر ۳۱
شکل ۲-۳- DNA نشانگر pBR322/BsuRI ۳۳
شکل ۳-۱- نمونه‌هایی از DNA ژنومی استخراج شده ۴۱
شکل ۳-۲- نمونه‌های از محصولات تکثیر شده ژن کاپاکازئین ۴۲
شکل ۳-۳- الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده حاصل از برش (هضم) آنزیم *Hinf* I ۴۳

مقدمه

مقدمه

هدف اصلی دامپروری، دستیابی به بالاترین بازده اقتصادی است. در این راستا نقش اصلاح نژاد، بهبود مدیریت و بهبود تغذیه گاوهای شیری، اثبات شده است [Bachman et al., 2003]. در بین حیوانات اهلی از لحاظ تولید شیر مصرفی انسان، گاو از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است این اهمیت تا اندازه‌ای است که گاو به عنوان دایه‌ی افراد بشری شناخته شده است. پایه و اساس تولید زیاد و درآمد بیشتر در گاوداری، داشتن گله خوب و پرتولید است. عمدهٔ تولید گاو شیری، شیر و گوساله است که این استعداد در تمام گاوهای گله یکسان نیست بنابراین لازم است در انتخاب گاوهای شیری دقت بیشتری شود [فرهومند، ۱۳۷۶]. در دهه اخیر تولید شیر سالیانه ۳-۴ درصد افزایش داشته است که تقریبا نصف این افزایش سهم انتخاب ژنی بوده است [Pryce and Veerkamp, 1999; Botaro et al., 2009]. صنعت دامپروری نه تنها برای تولید گوشت و یا شیر بلکه برای تولید پروتئین‌های با ارزش فارماکولوژی نیز نقشِ بسیار اساسی را ایفا خواهند نمود. بنابراین گونه‌های مختلف دامی مثل گاو، گوسفند و بز می‌توانند به عنوان بیوراکتورهایی با اندازه‌های متفاوت بسته به نیاز صنعت مورد استفاده قرار گیرند. با پیشرفت‌های حاصل در تکنولوژِی نوترکیبی DNA، که در این میان ماشینی با توان ایجاد چرخه حرارتی که امکان تکثیر قطعه DNA هدف را با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) میسر می‌سازد نقش اصلی را ایفا می‌کند. ورود این تکنولوژی زمینه بکارگیری نشانگرهای مولکولی در سطح DNA را فراهم نموده که در اصلاح نژاد اهمیت فراوانی دارد. با استفاده از نشانگرهای مولکولی ردیاب می‌توان ژن‌های موثر بر میزان پروتئین شیر، حجم شیر و... را تعیین ژنوتیپ نمود [Botaro et al., 2009].

ژن‌های کاندیدا ژن‌هایی هستند که نقش آنها در عملکرد صفات مورد نظر به اثبات رسیده است. در روش ژن‌های کاندیدا، اثر ژن‌های با وظایف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شناخته شده بر صفت تولیدی، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در این روش، ارزش‌های ژنوتیپی در جایگاه‌هایی که ارتباط بین فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن جایگاه‌ها بر فنوتیپ صفت مورد نظر به اثبات رسیده است، اندازه‌گیری می‌شود. [رسولی و همکاران، ۱۳۸۴]. در گونه‌های بزرگ جثه نظیر گاوهای شیری که فاصله نسلی طولانی و تعداد فرزندان کمتری دارند، این روش کاربردی‌تر است. مزیت اصلی روش ژن کاندیدا، استفاده آسان از آن در جمعیت‌های طبیعی است. ولی انتخاب ژن‌های کاندیدا مستلزم شناخت قبلی از فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی صفت است [صادقی، ۱۳۸۶].

موفقیت برنامه‌های اصلاح نژادی بستگی به میزان تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت دارد. تنوع ژنتیکی ماده اصلی انتخاب دام است و کمبود یا فقدان این تنوع قدرت انتخاب‌های ژنتیکی را کاهش می‌دهد [Barker, 1994]. پایه و اساس

تنوع ژنتیکی در یک گونه تغییرات جهشی است که با ایجاد آلل‌های مختلف، اشکال فنوتیپی و ژنوتیپی متفاوت را بوجود آورده است [Notter, 1999]. اصلاح نژاد حیوانات اهلی نشخوارکننده و پرندگان با روش‌های آمیخته‌گری[1] و انتخاب دام انجام می‌گیرد. آمیخته‌گری سبب افزایش هتروزیگوسیتی و تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها می‌شود [Cassinello, 2005; Rabon and Waddell, 2010].

یکی از عوامل موثر در موفقیت یک پروژه اصلاحی، آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی است. کاهش تنوع ژنتیکی باعث افزایش همخونی شده و بسیاری از صفات تولیدمثلی را تحت تاثیر قرار داده و باعث کاهش عملکرد آنها می‌شود. این مسائل به دلیل کاهش مخزن ژنی مورد نیاز، امنیت غذایی جامعه را تهدید می‌کند. بنابراین ضرورت نگهداری تنوع ژنتیکی حیوانی به خصوص در کشورهای در حال توسعه روشن است [Ma et al., 1996; Glazko, 2003].

اولین گام برای رسیدن به اصلاح نژاد هدفمند، مشخص نمودن سطح تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌ها می‌باشد. پس از تعیین میزان تنوع موجود، می‌توان برای اصلاح نژاد جمعیت‌ها برنامه‌ریزی کرده و در طی برنامه‌های بلند مدت و هدفدار، صفات اقتصادی مورد نظر را در آن جمعیت متمرکز و صفات نامطلوب را حذف نمود [اسدی، ۱۳۸۴].

نژادهای بومی در هر کشور یک سرمایه ملی و محصولی استراتژیک در اقتصاد آن کشور محسوب می‌شوند که حفظ و تکثیر این نژادها از ارزش و اهمیت زیادی برخوردار است [رویان، ۱۳۸۵]. زیرا این موجودات بعد از هزاران سال انتخاب طبیعی و گذر از موانع بسیار و با غلبه بر تمامی ناملایمات و شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده‌اند و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند [قنبری، ۱۳۸۱].

دلیل عمده دیگر توجه به دام‌ها و گونه‌های بومی، حفظ ذخایر و منابع ژنتیکی در هر منطقه است. در بسیاری از موارد با گذشت زمان و پیشرفت علم و آگاهی بیشتر به اهمیت اقتصادی صفات مختلف، نیازهای جدیدی مطرح می‌شود که متخصصین امر اصلاح نژاد را بر آن می‌دارد که از ژن‌های بومی که قبلاً ارزش زیادی برای آنها متصور نبوده است استفاده نمایند. اگر در این ذخایر ژنتیکی تغییرات و دگرگونی‌های زیادی صورت گرفته باشد امکان استفاده از آنها به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش خواهد یافت. لذا در حال حاضر اکثرکشورهای پیشرفته در مراکزی مخصوص اقدام به حفظ ذخایر و

[1]. Hybridzation

منابع ژنتیکی هر منطقه می‌نمایند تا در صورت لزوم از آنها استفاده نمایند [رویان، ۱۳۸۵].

در طول دهه‌های اخیر پژوهش‌گران، ژنتیک مولکولی را به ابزار قابل اعتمادی به منظور شناسایی تفاوت بین گونه‌ها در سطح DNA تبدیل کرده‌اند. از ابزارهای ژنتیکی کارآمد که پژوهش‌گران از چندشکلی بالای آنها به منظور آنالیز ژنتیکی و تفاوت‌های موجود در بین گونه‌ها، تعیین منشا اجدادی و پیگیری روابط مورفولوژیکی و روابط در سطوح مختلف جوامع، مطالعات شجره‌ای برای شناسایی پیوستگی ژنتیکی و غیره در حیوانات و گیاهان بهره می‌گیرند، بکارگیری روش‌های مبتنی بر ژنتیک جمعیت و آمار می‌باشد. ترکیب این روش‌ها با علوم جدیدی همچون نشانگرهای DNA پیشرفت‌های شگرفی را در اصلاح نژاد پدید آورده است [Kandermir et al., 2005].

هدف از این پژوهش تعیین فراوانی ژنی و ژنوتیپی کاپاکازئین با استفاده از روش PCR-RFLP[1] و بررسی ارتباط آن با صفات اقتصادی گاو بومی گیلان بوده است تا بتوان از اطلاعات به‌دست آمده در برنامه‌های به‌نژادی استفاده نمود.

[1]. Polymeras Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱- اهمیت پرورش گاو

به موازات افزایش جمعیت کشور تأمین مواد غذایی، به ویژه تأمین پروتئین حیوانی مورد نیاز بیش از گذشته مورد توجه قرار گرفته است که در این زمینه اهمیت پرورش گاو به منظور تولید شیر و گوشت دارای جایگاه ویژه‌ای می‌باشد. سهم عمده تولید شیر جهان متعلق به گاو می‌باشد ولی گوسفند، گاومیش و بز نیز مقادیری از کل تولید شیر را به خود اختصاص می‌دهند. حدود ۱۷ درصد کل گاوهای موجود در جهان از نژادهای اصلاح شده می‌باشد. تعداد کل گاوهای موجود کشور بالغ بر ۷ میلیون راس می‌باشد، که ۷ درصد آن را گاوهای اصلاح شده نژاد هلشتاین تشکیل می‌دهد. این نسبت در استان گیلان با ۷۵۰ هزار رأس گاو بومی و ۱۵ هزار رأس گاو اصلاح شده هلشتاین و۴۰ هزار رأس گاو آمیخته به ۲ درصد می‌رسد. استان گیلان ۸ درصد از کل گاوهای کشور را دارا می باشد که پس از مازندران و آذربایجان غربی در رتبه سوم قرار دارد. علم اصلاح نژاد دام با بهره‌گیری از دانش آمار و ژنتیک، امکان شناسایی ظرفیت‌های ژنتیکی حیوانات را فراهم می‌آورد. به دلیل عدم بکارگیری چنین امکاناتی در اصلاح نژاد گاو بومی استفاده بهینه از این ذخایر ژنتیکی بین دامداران در سطح روستاها صورت نمی‌گیرد. شناخت ظرفیت‌های ژنتیکی بالقوه درگاوهای بومی برای بهره‌وری بیشتر و بهبود وضع معاش دامداران یکی ازگام‌های زیر بنایی است. ظرفیت‌های ژنتیکی گاوهای بومی گیلان چون دیگر نژادهای کشور چندان شناخته شده نیست [حسین علایی، ۱۳۹۰].

۱-۱-۱- تاریخچه و ویژگی‌های گاو بومی گیلان

در ایران گاو بومی گیلان به گاو جنگلی موسوم است و با دیگر نژادهای گاو بومی (به غیر از مازندرانی) تفاوت دارد. مثلا، هم گاو نر و هم گاو ماده شاخ دارند. در جنس نر کوهانی بر جسته روی شانه‌ها به چشم می‌خورد و اختلافی فاحش و به لحاظ وزن و قد بین نر و ماده وجود دارد [شماع، ۱۳۷۲]. ویژگی‌های بارز گاو بومی گیلان جثه کوچک و تنوع رنگ آن-ها است که معمولاً سیاه و یا قهوه‌ای است و اکثر اوقات با لکه‌های درشت و کوچک سفید همراه می‌شود. تولید شیر گاو بومی گیلان کم بوده و این خاصیت همراه با جثه کوچک (که به معنای گوشتی نبودن این حیوان است) مشخص می‌کند که دلیل قطعی انتخاب این گاو تحمل حیوان در کشیدن بار و برای استفاده در شخم زدن زمین‌های کشاورزی بوده است، به ویژه در زمین‌های شیب‌دار و شالیزار که از این لحاظ بسیار پر تحمل و کم نظیرند. متوسط تولید شیر این نژاد ۴/۵-۴ کیلوگرم در روز با طول دوره شیردهی ۱۸۰ روز و درصد چربی شیر ۶/۷ درصد است. سن تلیسه‌ها در اولین آبستنی در حدود ۱۸ الی ۲۰ ماه و وزن آن‌ها ۲۰۰-۱۸۰ کیلوگرم است و همچنین وزن نرها در اولین جفت‌گیری ۲۵۰ کیلوگرم است [توکلیان، ۱۳۷۸].

۱-۲- اهمیت شیر در سبد غذایی انسان

امروزه مصرف شیر و فراورده‌های آن به عنوان یکی از شاخص‌های توسعه جوامع انسانی بیان می‌شود. تحقیقات مستمر در مورد فراورده‌های لبنی نشان داده است که همبستگی بالایی بین این فراورده‌ها و سطح سلامتی افراد جامعه به لحاظ کارایی، ضریب هوشی، میزان ابتلا به بیماری عفونی و تنظیم فعالیت‌های متابولیکی بدن وجود دارد. امروزه توسعه همه جانبه همراه با افزایش جمیعت منجر به بروز مشکلات عدیده‌ای در بسیاری از جوامع شده است. جامعه کنونی ما نسبت به چند دهه گذشته و حتی در مقایسه با ۱۰ تا ۱۵ سال گذشته از لحاظ توسعه بهداشت، درمان، سطح تغذیه، سطح فرهنگ عمومی، پیشرفت‌های دانش پزشکی و کاهش آمار مرگ و میر بهبود یافته است. هرچند توسعه چشمگیر صنعتی هر روزه بر امکان استفاده از تجهیزات مدرن جهت تسهیل امور زندگی می‌افزاید، اما گرسنگی و فقر دغدغه اساسی آینده جهان است. گرسنگی بسته به شرایط خاص ماهیت‌های متفاوتی دارد به‌هرحال،۶۰ درصد جمعیت ایران از انواع گرسنگی زنج می‌برند ۱۱ میلیون نفر جمعیت کشور گرسنه هستند. گرسنگی رایج امروز عدم مصرف غذا نیست بلکه استفاده از هر الگوی مصرف ناصحیح غذا گرسنگی خوانده می‌شود. بدیهی است این الگوی صحیح مصرف غذا بایستی با تکیه برشناخت دقیق مواد مغذی موجود در مواد غذایی تعیین احتیاجات مواد غذایی انسان و نهایتا ارزش تغذیه‌ای آنها در تغذیه انسان تدوین و اجرا گردد [Botaro et al., 2009].

۱-۳- چندشکلی DNA

تغییرات در توالی نوکلئوتیدها سبب ایجاد تنوع در ساختمان ژنتیکی یک جمعیت می‌شود. تفاوت در ساختار ژنتیکی موجودات سبب بروز تفاوت در جمعیت‌های آنان می‌شود. حضور بیش از یک نوع آلل در یک لوکوس در ژنوم موجودات را چند شکلی گویند [رجایی‌اربابی، ۱۳۸۴].

چند شکلی‌های DNA، از اختلاف موجود در توالی‌های DNA در مکان‌های اتصال آغازگرها (به عنوان مثال جهش‌های نقطه‌ای) و یا از طریق دگرگونی‌هایی که اندازه DNA هدف را تغییر می‌دهند (مانند الحاق، حذف و واژگونی که نواحی تکثیر شونده را تحت تاثیر قرار می‌دهند) به وجود می‌آیند. جهش‌هایی که در ژنوم یک موجود رخ می‌دهد ممکن است سبب بروز نقص در عملکرد ژن شده (سنتز پروتئین) و در فنوتیپ آشکار گردد و یا اینکه تغییری در عملکرد ژن نداشته و در فنوتیپ آشکار نشود. این چند شکلی‌ها همچنین پایه‌ای برای تهیه نقشه‌های پیوستگی ژنی می‌باشند که برای تشخیص جایگاه‌های ژنی جهت تغییرات مهم اقتصادی و تسریع در سرعت اصلاح صفات تولیدی کاربرد دارند [Cushwa and

.[Medrano, 1996

۱-۴- راه‌های تشخیص چندشکلی

۱-۴-۱- کاریوتیپ

کروموزوم‌ها که در مرحله‌ای از تقسیم میتوز قابل رویت می‌گردند، به وسیله روش‌های سیتوژنتیکی بر اساس اندازه مرتب می‌گردند که به آن کاریوتیپ گویند. تعداد و اندازه کروموزوم‌ها در هر گونه مختص همان گونه می‌باشد. تغییر در ساختمان و اندازه کروموزوم‌ها همچون حذف یا الحاق کروموزومی، ممکن است در مرحله تقسیم میوز رخ دهد. این نوع از تغییرات که ممکن است در فنوتیپ بروز کند، به وسیله کاریوتیپ قابل شناسایی بوده اما جهش‌های نقطه‌ای را نمی‌توان با کاریوتیپ تشخیص داد [رجایی اربابی، ۱۳۸۴].

۱-۴-۲- استفاده از نشانگر

به وسیله نشانگرهای مولکولی همچون RAPD[1]، AFLP[2]، RFLP[3]، ریزماهوارها[4]می‌توان چند شکلی را در سطح DNA شناسایی کرد [رسولی، ۱۳۹۰].

۱-۵- نشانگرهای ژنتیکی

پیدایش نشانگرهای مولکولی برای استفاده به عنوان کاوشگرهای DNA ژنومی، انقلابی در تحلیل ژنتیکی ایجاد کرده و ابزار قدرتمندی را در ابتدا برای پژوهش‌های ژنتیکی در حشرات فراهم نمود[فتحی، ۱۳۸۴]. کاربرد نشانگرها به ده‌ها سال پیش از کشف DNA، به عنوان ماده ژنتیکی مربوط می‌شود. اصول و کاربرد نشانگرهای DNA تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای با سایر نشانگرهای ژنتیکی مانند نشانگرهای مورفولوژیک و پروتئین (مثل آیزوزایم‌ها) دارد. تحولی که در زمینه کشاورزی به نشانگرهای DNA نسبت داده می‌شود به دلایل زیر است [نقوی و همکاران، ۱۳۸۶].

---

[1]. Random amplified polymorphic DNA

[2]. Amplified fragment length polymorphism

[3]. Restriction fragment length polymorphism

[4]. Microsatellite

۱- فراوانی فوق‌العاده این دسته از نشانگرها

۲- عدم تاثیر پذیری آنها از شرایط محیط خارجی و داخلی

۳- امکان به کارگیری آنها در مراحل اولیه رشد

۴- هم‌بارز بودن نشانگرها

۵- فراهم نمودن امکان مطالعه موجود زنده در خارج فصل و محل زندگی

۶- حداقل بودن یا عدم اثر متقابل با نشانگرهای دیگری که می‌توانند به طور هم‌زمان در یک جمعیت در حال تفرق مورد استفاده قرار گیرد.

۷- امکان استفاده از آنها در مورد گونه‌های منقرض شده

۸- پیوستگی بسیار نزدیک با ژن‌های مورد نظر

۹- دقت و قابلیت بالای تفسیر نتایج

۱۰- وارثت پذیری کامل

۱۱- سهولت تعقیب نشانگر در نتایج و تعیین الگوی توارثی آنها

۱-۶- انواع نشانگرها

تقریبا از هر فنوتیپ صفت موجود که با صفت معادل خود در موجود دیگری تفاوت داشته باشد می‌توان به عنوان نشانگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در موجودات زنده استفاده کرد، می‌توان نشانگرهای ژنتیکی را در گروه‌های زیر تقسیم‌بندی کرد [بلواسی، ۱۳۸۲].

۱-۶-۱- نشانگرهای مورفولوژیک

نشانگرهای مورفولوژیک به طور سنتی در علوم زیستی مورد استفاده قرارگرفته‌اند ولی دارای محدودیت‌های اساسی می‌باشند، نشانگرهای مورفولوژیکی غالبا تحت تاثیر محیط قرار دارند. نشانگرهای مورفولوژیکی که نتیجه جهش‌های قابل

رویت در مورفولوژی گونه‌ها می‌باشند و گاهی برای مشاهده و ثبت آنها باید منتظر ظهور آنها ماند، علاوه بر این که تعداد نشانگرهای مورفولوژیک کم می‌باشند ولی اساس و توضیح ژنتیکی بسیاری از آنها هنوز مشخص نگردیده است [طهماسبی، ۱۳۷۵].

این نشانگرها علایم یا صفاتی هستند که به طور مستقیم در فنوتیپ فرد قابل تشخیص بوده و وارثت پذیرند. صفات مورفولوژیکی که عمدتا توسط یک ژن کنترل می‌شوند، می‌توانند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند، این شامل دامنه وسیعی از ژن‌های کنترل‌کننده‌ی صفات فنوتیپی هستند و جز نخستین نشانگرها به شمار می‌آیند و از زمان‌های بسیار دور یعنی زمان‌هایی که محل ژن بر روی کروموزوم مشخص شد، مورد استفاده قرار می‌گیرند. این نشانگرها دارای محدودیت‌های اساسی هستند که موجبات توجه محققین به انواع دیگر نشانگرها را فراهم آورده است، این نشانگرها دارای معایب و محاسنی به شرح زیر می‌باشند[قره‌یاضی، ۱۳۷۵؛ بنابازی، همکاران ۱۳۸۵ و عبدمیشانی و شاه نجات‌بوشهری، ۱۳۸۷]:

معایب:

۱- فراوانی و تنوع کمی دارند

۲- تحت تاثیر شرایط محیطی، مرحله رشد و سن موجود قرار می‌گیرند

۳- اساس ژنتیکی و تفسیر بسیاری از این نشانگرها نامشخص است

۴- وجود غالبیت در بروز آنها دخالت داشته و شناسایی افراد ناخالص را از افراد خالص غیر ممکن می‌سازد

۵- گاهی برای مشاهده و ثبت آنها باید منتظر ظهور ماند

محاسن:

۱- عدم نیاز به امکانات پیچیده و گران قیمت برای اندازه‌گیری‌ها

۲- ساده بودن

۳- کم هزینه بودن