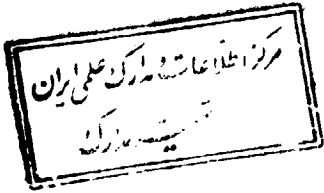


۲۳۵۷۰

۱۳۸۰ / ۴ / ۳۰



**دانشگاه سیستان و بلوچستان**  
**تحصیلات تکمیلی**

پایان نامه کارشناسی ارشد  
ژنتیک و اصلاح نژاد دام

**موضوع:**

**بررسی واریانتهای آللی در محدوده اگزون ۵ ژن هورمون رشد  
در دو نژاد گاو سیستانی و دشتیاری**

**استاد راهنما:**

دکتر آدم ترکمن زهی

013390

**استاد مشاور:**

دکتر عبدالحسین طاهری

**تحقیق و نگارش:**

حسین عمرانی

خرداد ۱۳۸۰

۳۹۵۷۵

بسمه تعالی

«فرم ارزشیابی پایان نامه دوره کارشناسی ارشد»

این پایان نامه با عنوان بررسی واریانتهای آلی در محدوده آگزون ۵ ژن هورمون رشد در دونژاد گاو سیستانی و دشتیاری قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد علوم دامی توسط دانشجو حسین عمرانی تحت راهنمایی استاد پایان نامه آقای دکتر آدم ترکمن زهی تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه سیستان و بلوچستان مجاز می باشد %

امضاء دانشجو

این پایان نامه شش واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ ۱۳۸۰/۳/۱۰ توسط هیئت داوران بررسی و نمره ۱۹/۵۰ با درجه عالی به آن تعلق گرفت %

«اعضاء هیئت داوران»

تاریخ  
۱۳۸۰/۳/۱۰

اعضاء

نام و نام خانوادگی

دکتر آدم ترکمن زهی  
دکتر عبدالمحسن قاضی  
دکتر محمد جاباباش  
دکتر مرصین سندی  
دکتر محسنی صحرایی

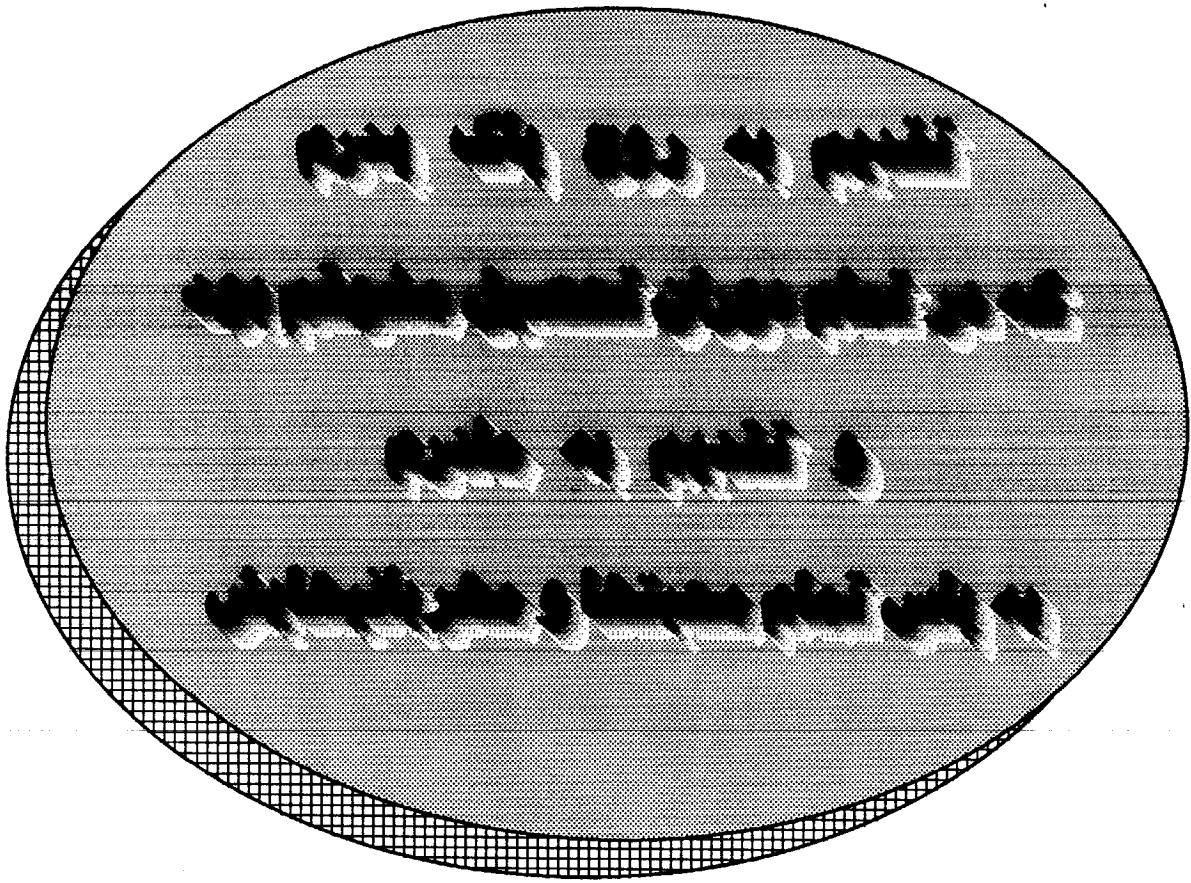
۱- استاد راهنما

۲- استاد مشاور

۳- داور ۱

۴- داور ۲

۵- تحصیلات تکمیلی



## تشکر و قدردانی

بنام خداوند جان آفرین

حکیم سخن در زبان آفرین

حمد و سپاس خدایی را که به این حقیر عنایت فرمودند تادر راه علم و دانش گام بردارم. حال که این پایان نامه به لطف پروردگار و کمک ویاری اساتید بزرگوارم به پایان رسیده است بر خود واجب می دانم تا مراتب امتنان و سپاسگزاری خود را از یکایک ایشان ابراز دارم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر ترکمن زهی که در سمت استاد راهنمایی این پایان نامه در تمام مراحل تحقیق، اجرا و نگارش مرا راهنمایی و مساعدت نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم. از زحمات استاد ارجمند جناب آقای دکتر طاهری که به عنوان مشاور اینجانب بودند سپاسگذارم. از استاد ارجمند و گرانمایه جناب آقای دکتر سلوکی که در تأمین هزینه های جاری این پایان نامه مرا یاری نمودند و همچنین از اساتید بزرگوار آقایان دکتر طباطبایی، دکتر سنگتراش و دکتر جرجانی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از آقایان مهندس بیرجندی، مهندس خمر (اعضای محترم معاونت امور دام استان سیستان و بلوچستان) و از دوستان کارشناسی ارشد مهندس آخشی، هاشم زهی، عباسی، مسعودی، زارعی، و دانشجویان کارشناسی آقایان بهادر، روانبد و تمام عزیزانی که در کارهای اجرایی این تحقیق مرا یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از خانواده ام که با تشویق ها و کمک های بی شائبه خود موجبات دلگرمی بنده در طول تحصیلم بوده اند بی نهایت سپاسگزارم سعادت دنیوی و اخروی همه این عزیزان را از درگاه خداوند متعال خواهانم.

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول
۱.....	مقدمه
	فصل دوم
	بررسی منابع
۶.....	۱-۲ پلی مورفیسم .....
۷.....	۲-۲ نشانگرها.....
۸.....	۱-۲-۲ مزیت نشانگرهای ژنتیکی.....
۹.....	۳-۲ کاربرد نشانگرها در اصلاح دام.....
۹.....	۱-۳-۲ تداخل ژنی به کمک نشانگرها.....
۹.....	۲-۳-۲ انتخاب به کمک نشانگرها.....
۱۳.....	۴-۲ RFLPها.....
۱۶.....	۵-۲ واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR).....
۱۷.....	۱-۵-۲ اساس واکنش زنجیره ای پلی مرز.....
۲۲.....	۶-۲ هورمون رشد.....
۲۳.....	۱-۶-۲ عوامل مؤثر بر ترشح هورمون رشد.....
۲۴.....	۲-۶-۲ اثرات متابولیکی هورمون رشد.....

- ۲۸ ..... ۷-۲ زن هورمون رشد
- ۳۱ ..... ۸-۲ پلی مورفیسیم در زن هورمون رشد گاو
- ۳۲ ..... ۱-۸-۲ پلی مورفیسیم در اگزون پنج
- ۳۷ ..... ۲-۸-۲ سایر پلی مورفیسیم های زن هورمون رشد

### فصل سوم

#### مواد و روشها

- ۳۹ ..... ۱-۳ نمونه گیری
- ۳۹ ..... ۲-۳ استخراج DNA
- ۴۱ ..... ۳-۳ تعیین غلظت و ارزیابی DNA استخراج شده
- ۴۱ ..... ۱-۳-۳ روش استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر
- ۴۲ ..... ۲-۳-۳ روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز
- ۴۲ ..... ۴-۳ تکثیر DNA به وسیله واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)
- ۴۲ ..... ۱-۴-۳ توالی و مشخصات پرایمرها
- ۴۳ ..... ۲-۴-۳ محاسبه غلظت پرایمرهای مورد استفاده در واکنش
- ۴۴ ..... ۳-۴-۳ تعیین کیفیت پرایمرها
- ۴۵ ..... ۴-۴-۳ غلظت مواد مورد استفاده در واکنش PCR
- ۴۶ ..... ۵-۴-۳ سیکل حرارتی
- ۴۷ ..... ۵-۳ هضم آنزیمی محصولات PCR و تعیین RFLP ها

۴۸ ..... ۱-۵-۳ الکتروفورز محصولات هضم آنزیم

## فصل چهارم

### نتیجه و بحث

۴۹ ..... ۱-۴ نتایج استخراج DNA

۵۰ ..... ۲-۴ محصولات PCR

۵۲ ..... ۳-۴ نتیجه هضم آنزیمی و RFLP های حاصله

۵۳ ..... ۴-۴ تعیین فراوانی های ژنی و ژنوتیپی

۵۹ ..... ۵-۴ نتیجه و بحث

۶۴ ..... فهرست منابع

۷۶ ..... ضمیمه



## چکیده

تنوع ژنتیکی ماده اصلی در برنامه های اصلاحی بر اساس انتخاب است و پیشرفت ژنتیکی بستگی مستقیم به میزان تنوع مطلوب از حیث صفت مورد بررسی دارد. بخشی از تفاوت های قابل مشاهده داخل و یا بین جمعیتها به پلی مورفیسم ژنتیکی در جایگاه های مختلف مربوط است. تفاوت های ژنتیکی بین نژادهای گاو کوهان دار (*Bos indicus*) و نژادهای گاو اروپایی (*Bos taurus*) اساس بسیاری از تفاوتها در خصوصیات تولیدی، تولید مثلی، مقاومت به امراض و انگلها، قابلیت سازگاری و تطابق بین این نژادها است. بررسی تفاوت های ژنتیکی و رابطه آنها با خصوصیات متفاوت در سطح DNA، در این نژادها می تواند در آشکار نمودن اساس ژنتیکی این اختلافات موثر باشد.

ژن هورمون رشد با توجه به اثرات فیزیولوژیک وسیعی که محصول آن بر بسیاری از صفات تولیدی از جمله شیردهی، تولید مثل، رشد و پاسخ به ایمنی دارد به عنوان یک ژن کاندید برای بسیاری از این صفات مورد توجه قرار گرفته است.

در این تحقیق پلی مورفیسم در اگزون پنج ژن هورمون رشد در دو نژاد گاو سیستانی و دشتیاری مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های DNA از ۵۱ راس گاو سیستانی و ۵۵ راس گاو دشتیاری از خون استخراج گردید و قطعه ای به طول ۴۰۴ bp از اگزون ۵ ژن هورمون رشد با استفاده از تکنیک PCR تکثیر و پلی مورفیسم در دو نقطه از این قطعه به روش PB-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. هضم قطعه مورد نظر با آنزیم AluI نشان داد که کلیه نمونه های مورد مطالعه از هر دو نژاد دارای ژنوتیپ AluI(+/+) می باشند. این آلل اسید آمینه لوسین را در موقعیت ۱۲۷ کد می نماید. هضم قطعه توسط آنزیم DdeI دو آلل را آشکار نمود. فراوانی آلل معمول تر، یعنی DdeI(-) در نمونه های دشتیاری و سیستانی، به ترتیب ۰/۸۳ و ۰/۸۸ بدست آمد.

با توجه به این که پلی مورفیسم در جایگاه DdeI، در نژادهای زیبوی مورد مطالعه با نژادهای اروپایی تفاوت دارد این پلی مورفیسم می تواند از نظر بررسی تفاوت های ژنتیکی در این دو گروه و ارتباط آن با تفاوت های فنوتیپی برای صفات تولیدی قابل اهمیت باشد.

## فصل اول

### مقدمه

بی گمان، در زمان حال و آینده، مواد غذایی به ویژه نوع حیوانی آن نقش سرنوشت سازی در استقلال، سلامت و سازندگی ملت‌ها داشته و خواهد داشت. ملت‌هایی که دچار کمبود و فقر مواد غذایی باشند توانمندی فکری، سیاسی و اقتصادی خود را از دست داده بیش از حد تصور، سلطه‌پذیر خواهند شد زیرا چه بسا بتوان بدون وسایل و تجهیزات مورد نیاز جوامع امروزی زندگی کرد ولی بدون غذا هرگز.

کشور عزیزمان ایران با تمامی امکانات بالقوه‌ای که از لحاظ شرایط اقلیمی و تنوع آب و هوایی دارد هنوز نیازمند واردات انواع مواد غذایی اعم از حیوانی و گیاهی می‌باشد. با توجه به

محدود بودن منابع غذایی دام و عدم امکان افزایش تعداد دام در کشور برای افزایش تولیدات دامی و خود کفائی، بهره‌مندی از علم ژنتیک و اصلاح نژاد دام برای بالا بردن راندمان در هر واحد تولید، نقش مهمی را بر عهده خواهد داشت.

روش‌های اصلاحی معمول در حیوانات مبتنی بر معیارهای فنوتیپی می باشد که با توجه به اطلاعات دقیق از ژنتیک مندلی، ژنتیک جمعیت و ژنتیک کمی همراه با تکنیکهای پیچیده تجزیه و تحلیل آماری گسترش یافته اند. این روش‌ها هر چند در ایجاد پیشرفت ژنتیکی برای صفات گوناگون موفق بوده اند ولی معایبی را در دراز مدت به دنبال دارند که از آن جمله میتوان کاهش عمومی واریانس ژنتیکی، تثبیت آللهای معیوب و همچنین فشار همخونی را ذکر کرد. انتخاب بر اساس اطلاعات ژنوتیپی میزان این خطرات را کاهش می دهد. پیشرفت‌های تحسین برانگیزی اخیراً در ژنتیک مولکولی و تکنولوژی زیستی صورت گرفته است ابزاری قدرتمند جدیدی را برای اصلاح ژنتیکی حیوانات فراهم کرده است. یکی از مفیدترین این ابزارها نشانگرهای DNA می باشد که وراثت پذیر بوده و نشاندهنده تفاوت‌های اطلاعات ژنتیکی (ردیف‌های بازی DNA) موجود بین افراد در داخل و بین جمعیت‌ها می باشند. اطلاعات بدست آمده از نشانگرهای DNA امروزه علاوه بر اصلاح دام و نبات در سایر زمینه‌ها نیز استفاده‌های گسترده‌ای یافته‌اند که عمده‌ترین آن‌ها استفاده در پزشکی، پزشکی قانونی، تشخیص والدین، تشخیص بیمارهای گیاهی، مطالعات ژنتیک تکاملی و طبقه‌بندی موجودات زنده می‌باشد (قره‌یاضی، ۱۳۷۵).

استفاده از نشانگرها در اصلاح دام جایگاه خاصی را به خود اختصاص داده است و کاربرد مناسب از آنها باعث افزایش دقت و سرعت در میزان بهبود ژنتیکی دام می‌شود. انتخاب بر اساس نشانگرها<sup>۱</sup> در مورد صفات دارای وراثت پذیری پایین، صفات مشکل از نظر اندازه‌گیری، صفات محدود به جنس<sup>۲</sup> و همچنین صفاتی که در ابتدای زندگی بروز نمی‌کنند موفق بوده است (Lande و Thompson، ۱۹۹۰).

گاوهای نژاد سیستانی و دشتیاری دارای پتانسیل‌های ژنتیکی با ارزشی هستند که بر اساس انتخاب طبیعی و مصنوعی طی نسلها در شرایط سخت و نامساعد آب و هوایی حاصل گردیده است. حفظ و حراست از این نژادها بعنوان منبع و ذخیره ژنی، شناسائی دقیق و تعیین ویژگیهای نژادی و پتانسیلهای تولیدی در این نژادها حائز اهمیت است.

نژادهای گاو بومی ایران، همانند اکثر نژادهای بومی در سایر کشورهای آسیائی، افریقا، آمریکای جنوبی، از نظر تولید، در مقایسه با نژادهای گاو اروپای و آمریکائی در سطح پاینتری واقع اند. علیرغم پتانسیل تولیدی پائین، نژادهای بومی این مناطق بدلیل انتخاب طبیعی و مصنوعی اعمال شده برای سالیان طولانی با شرایط معمولاً نامساعد آب و هوای محیط زیستشان بخوبی تطابق داشته و نسبت به تشهای محیطی مختلف و بیماریهای محلی کاملاً مقاومت دارند از طرف دیگر پرورش نژادهای اروپائی در مناطق گرمسیری با کاهش رشد، افزایش تلفات و کاهش باروری روبرو بوده است. چنین شرایطی حداکثر توجه و بهره‌وری از استعدادهای ژنتیکی گاوهای بومی را در برنامه‌های اصلاح نژادی ایجاب می‌کند (ترکمن زهی و بیرجندی، ۱۳۷۴).

---

۱. Marker Assisted Selection

۲. Sex limited trait.

گاوهای سیستانی و دشتیاری دارای کوهان بوده و به گاوهای زبو یا باوس اندیکوس متعلق هستند. کوهان در این نژادها بزرگ و گوشتی بوده و اندازه آن در گاوهای نر بزرگتر است. مشخصات ظاهری دیگر در این نژادها وجود غبغب بلند و پرچین است که از زیر گردن گاو تا زیر قفسه سینه و حد فاصل بین دستها ادامه میابد که در گاوهای نر غبغب بلند تر و پرچینتر است (شماخ، ۱۳۷۲) و (ترکمن زهی و بیرجندی، ۱۳۷۴).

رنگ بدن گاوهای دشتیاری بسیار متنوع و طیف وسیعی از کاملاً روشن تا کاملاً سیاه، و نیز مخلوطهای دو رنگی، را شامل میشود. رنگهای غالب در جمعیت قهوه ای روشن با سر و گردن قهوه ای سوخته و نیز طوسی روشن با سر و گردن تیره میباشد. اکثریت گاوهای نر و ماده نیز واجد شاخند گوشها پهن و آویزان و جثه بطور کلی، تحت شرایط پرورش سنتی، کوچک و کوتاه است وزن تقریبی گاوهای ماده ۲۸۱ کیلوگرم و گاوهای نر ۳۵۲ کیلوگرم، ارتفاع جدوگاه در گاوهای ماده ۱۱۸ سانتیمتر و در گاوهای نر ۱۳۰ سانتی متر. سن اولین زایش ۳/۱ سال می باشد و فاصله زایش ۱۵/۱ ماه میباشد سن اولین جفتگیری در گاوهای نر ۲/۴ سال و تولید شیر روزانه (تحت شرایط سنتی منطقه) ۴/۳ کیلوگرم و طول دوره شیردهی ۲۴۴ روز است.

گاوهای نژاد سیستانی دارای هیکل متوسط، سمهای قوی و محکم، پشت صاف و مستقیم تا کمی فرورفته، کپل متوسط و موها تا اندازه ای خشن می باشد. صفت بی شاخی در این نژاد غالب بوده و اغلب گاوهای نر و ماده فاقد شاخ یا دارای شاخهای کوتاه و لقی هستند رنگ غالب در این نژاد سیاه بوده اما رنگهای ابلق (سیاه و سفید) خاکستری، خرمائی و... نیز در بین این نژاد دیده میشود. متوسط وزن گوساله ها در هنگام تولد ۲۲-۱۸ کیلوگرم بوده و دوره

شیردهی ۷ ماه می باشد. وزن متوسط گاو ماده ۴۰۰-۲۵۰ کیلو گرم و متوسط ارتفاع بدن ۱۳۲ سانتیمتر می باشد در مورد گاوهای نر وزن متوسط ۴۵۰-۳۵۰ کیلوگرم، و متوسط ارتفاع ۱۴۶ سانتی متر میباشند. متوسط تولید شیر روزانه ۷ کیلو گرم می باشد. میانگین افزایش وزن روزانه گوساله های پرواری در سنین ۱۲ الی ۱۴ ماهگی ۱۱۳۸ گرم می باشد که بهترین سن پرواری محسوب می گردد. ضریب تبدیل مواد غذایی (F.C) به گوشت به طور متوسط هشت به یک است (شماغ، ۱۳۷۲).

بررسی تنوع ژنتیکی در این نژادها به منظور کسب اطلاعات دقیق جهت تدوین برنامه های اصلاحی دراز مدت لازم و ضروری است. بررسی پلی مورفیسم ژن هورمون رشد با توجه به نقش گستردهای که هورمون رشد بر روی صفات تولیدی و اقتصادی دارد حائز اهمیت است. مطالعات انجام شده بر روی گاوهای سیستانی بوسیله هاشم زهی (۱۳۷۸) بر روی جایگاه پلی مورف MspI در اینترون ۳ فراوانی آلل MspI(-) و MspI(+) بترتیب ۰/۹۲ و ۰/۰۸ مشخص گردید که تفاوت فاحشی با نژادهای اروپائی دارد در نژادهای اروپائی فراوانی آللی MspI(+) بیشتر از MspI(-) است. تحقیقات کیخا سالار (۱۳۷۸) بر روی نژاد سیستانی، در محل برش آنزیمهای محدودالانثر<sup>۱</sup> AluI در اگزون<sup>۲</sup> ۵ ژن هورمون رشد هیچ واریانت والینی یافت نگردید. در تحقیق حاضر پلی مورفیسم در محدوده اگزون ۵ ژن هورمون رشد که محل برش آنزیمهای محدود آلانثر AluI و DdeI است بررسی شد تا ضمن مقایسه با نژادهای اروپایی اطلاعات حاصله پایه گذار برنامه های اصلاح نژادی در آینده برای این نژادها باشد.

---

۱. Restriction enzyme

۲. Exson

## فصل دوم

### بررسی منابع

#### ۱-۲ پلی مورفیسم<sup>۱</sup>

تنوع ژنتیکی<sup>۲</sup> رکن اصلی در هر برنامه اصلاحی است، و موفقیت انتخاب منوط به وجود تنوع مطلوب از حیث صفت هدف مورد بررسی می باشد. بخشی از تفاوت های قابل مشاهده درون یک جمعیت یا بین جمعیت ها به پلی مورفیسم یا چند شکلی ژنتیکی در جایگاه های مختلف نسبت دارد بهمین دلیل تلاش های فراوانی جهت شناسایی و تعیین ژنوتیپ افراد در جمعیت ها و بررسی ارتباط آن با صفات مهم با استفاده از مدل های آماری مختلف صورت پذیرفته است (Schmidtke و Krawezak ، ۱۹۹۸).

فراوانی ژنی بینابینی، که در تعریف جایگاه های پلی مورف بکار می رود، معمولاً در محدوده ۹۹٪ - ۱٪ قرار می گیرد. فرکانس فرد هموزیگوت موتانت نیز از ۱٪ و هتروزیگوتها از

---

۱. polymorphism

۲. Genetic Variation