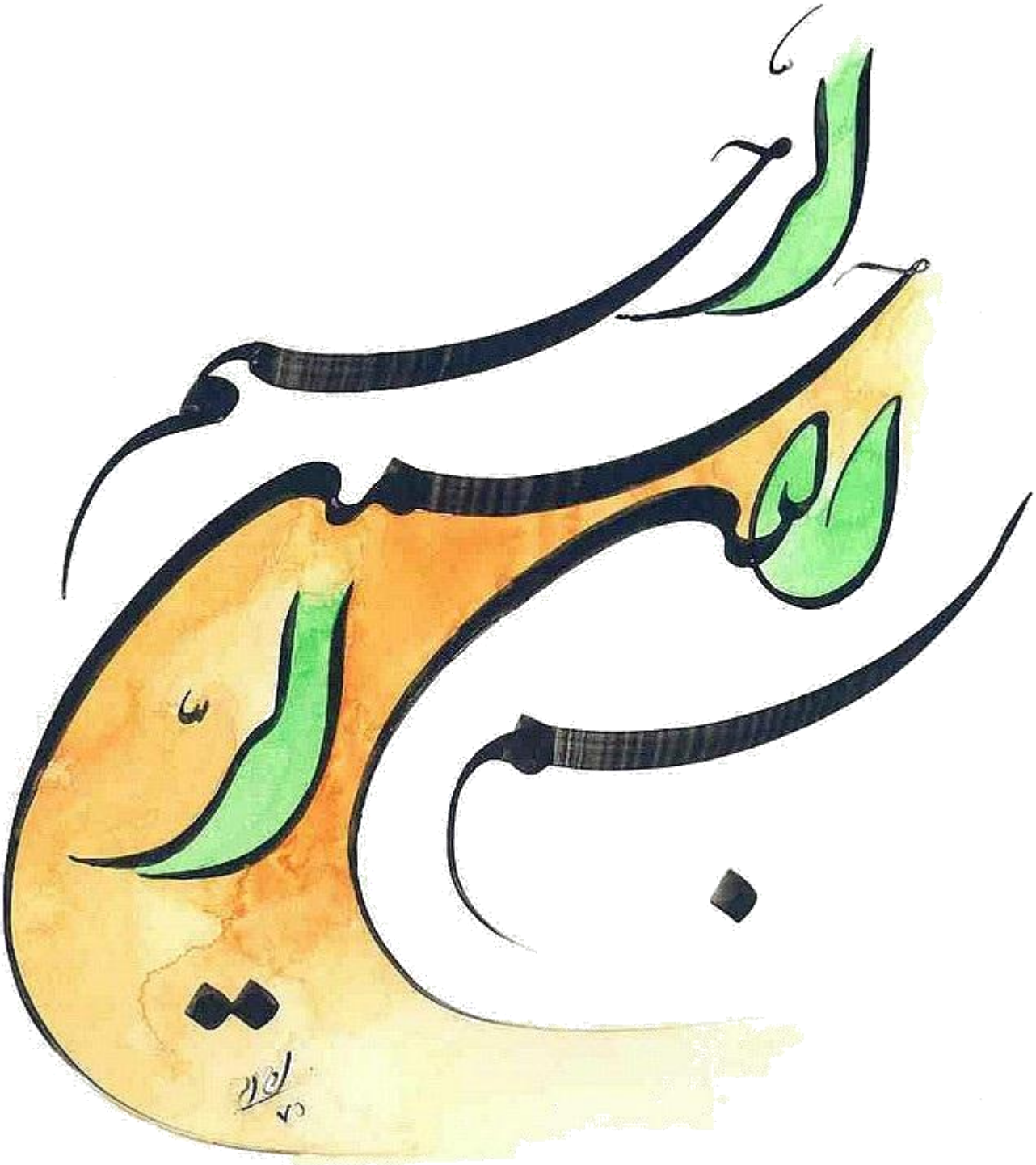

دانشکده علوم کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

ارتباط بین چند شکلی ژن لپتین با صفات اقتصادی در گاو بومی گیلان با استفاده از روش PCR-RFLP

از:

مجتبی رضایی

استاد راهنما:

دکتر سید ضیاء الدین میرحسینی

اسفند ۱۳۹۲

دانشکده علوم کشاورزی

گروه علوم دامی

(ژنتیک و اصلاح دام)

عنوان:

ارتباط بین چند شکلی ژن لپتین با صفات اقتصادی در گاو بومی گیلان با استفاده از روش PCR-RFLP

از:

مجتبی رضایی

استاد راهنما:

دکتر سید ضیاء الدین میرحسینی

استادان مشاور:

دکتر نوید قوی حسین‌زاده

مهندس محمد گلشنی

اسفند ۱۳۹۲

تقدیم به:

معلمان و **استادانم**، معماران باورهایم.

تقدیم به:

خطوط مبهم پیشانی **پدر** فداکارم،

غزل ناب هستی‌ام، استوارترین کوه تاریخ بودنم،

به رسم بوسه‌ای بر دستان با صفایش.

تقدیم به:

شانه‌های بی دریغ **مادر** مهربانم، آن شکیبه بی ادعا،

زیباترین حکایت زندگی‌ام،

به شوق طنین روح انگیز دعای خیرش.

تقدیم به:

پهناوران اقلیم عشق،

برادر و خواهر مهربانم که در عین عطوفت و آسمانی بودن،

والاترین پشتوانه زندگی‌ام هستند.

تقدیر و تشکر

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و درود بر محمّد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز...

حال که توفیق جمع آوری و تهیه این مجموعه را یافته‌ام بر خود واجب می‌دانم از تمامی عزیزانی که در طی انجام این پژوهش از راهنمایی و یاری‌شان بهره‌مند گشته‌ام تشکر و قدردانی کنم و برای ایشان از درگاه پروردگار مهربان آرزوی سعادت و پیروزی نمایم.

در ابتدا صمیمانه‌ترین تقدیرها تقدیم به **خانواده** عزیز و مهربانم که همواره حامی و مشوقم بوده‌اند و پیمودن روزهای سخت و آسان زندگی‌ام بدون دعای خیر و برکت وجودشان غیر ممکن بود.

از استاد راهنمای ارجمند و عزیزم آقای **دکتر سید ضیاء الدین میرحسینی** که با سعه صدر و صبوری مرا راهنمایی نموده و با ارائه نظرات سازنده و رهنمودهای بی‌دریغ‌شان در پیشبرد این پایان‌نامه سعی تمام مبذول داشتند، کمال تشکر را دارم.

از اساتید مشاور ارجمند آقایان **دکتر نوید قوی حسین زاده و مهندس محمد گلشنی** به جهت راهنمایی‌های علمی‌شان کمال امتنان را دارم.

از اساتید محترم آقایان **دکتر سید حسین حسینی مقدم** و **دکتر حسن درمانی** که زحمت باز خوانی و داوری این مجموعه را به عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم. ازحضور آقای **دکتر محمد حسین منهاج** بعنوان نماینده محترم تحصیلات تکمیلی در جلسه دفاع سپاسگذارم. از کلیه اساتید گرانقدر گروه علوم دامی دانشگاه گیلان که در مقطع کارشناسی‌ارشد، از محضرشان کسب فیض نمودم تشکر می‌نمایم.

ازدوستان عزیزم جناب آقایان **حسین علایی، جلال زارع، حسن هدایتی، حسن خان زاده، فردین ناظمی، محمد آیت اللهی، آرش پوررجبی، حسن ضیایی، سید مونس جلالی، عارف اسماعیل نیا** و **امید جعفریانی** به پاس تمام تلاش هایشان‌در اجرای این پروژه، تشکر و قدردانی می‌نمایم و آرزوی موفقیت وکامیابی برای ایشان دارم. در پایان یاد و خاطره تمامی دوستان عزیز و ارجمندم در دوره کارشناسی و کارشناسی ارشد را گرامی داشته و برای تمامی آن‌ها سعادت، سلامت و پیروزی را از خداوند منان خواستارم.

مجتبی رضایی

اسفند ۱۳۹۲

و صل الله علی محمد و اله اجمعین

فهرست مطالب

عنوان صفحه

مقدمه ۱
فصل اول: کلیات و مرور منابع ۵
۱-۱- اهمیت پرورش گاو ۶
۱-۱-۱- اهمیت اصلاح نژاد گاو شیری ۶
۱-۱-۲- مروری کوتاه بر گاو بومی گیلان ۷
۱-۱-۳- اهمیت حفاظت و بهبود توده‌های ذخایر ژنتیکی بومی ۸
۱-۱-۴- تنوع ژنتیکی و اصلاح نژاد دام بومی ۸
۱-۲- نشانگر ژنتیکی ۹
۱-۲-۱- انتخاب بر اساس نشانگرهای ژنتیکی ۱۰
۱-۲-۲- صفات مورد نظر در روش MAS ۱۱
۱-۲-۳- روش‌های شناسایی نشانگرها یا ژن‌های مؤثر بر صفات ۱۱
۱-۲-۳-۱- روش پویش ژنومی ۱۱
۱-۲-۳-۲- روش ژن کاندیدا ۱۲
۱-۲-۴- نشانگرهای مولکولی DNA و RNA ۱۳
۱-۲-۵- چند شکلی قطعات با طول محدود شده (RFLP) ۱۳
۱-۳- ژن‌های موثر بر صفات تولید شیر در گاو شیری ۱۴
۱-۳-۱- هورمون رشد (GH) ۱۴
۱-۳-۲- پرولاکتین (PRL) ۱۵
۱-۳-۳- فاکتور مؤثر بر نسخه برداری هیپوفیزی (Pit1) ۱۵
۱-۳-۴- بتالاکتوگلوبولین (BLG) ۱۶
۱-۳-۵- کاپاکازئین (KCN) ۱۶
۱-۳-۶- مبدل سیگنال و فعال‌کننده نسخه برداری (STAT5A) ۱۷
۱-۳-۷- دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز (DGAT1) ۱۸
۱-۳-۸- لپتین (LEP) ۱۸
۱-۴- ژن لپتین ۱۸
۱-۴-۱- کشف ژن لپتین ۱۸
۱-۴-۲- هورمون لپتین ۲۰
۱-۴-۳- فیزیولوژی لپتین در گونه‌های نشخوارکنندگان ۲۱
۱-۴-۳-۱- بیان ژن لپتین ۲۱
۱-۴-۳-۲- گیرنده‌های لپتین ۲۳

۱-۴-۳-۳- تنظیم هورمونی بیان ژن لپتین و اثرات جانبی آن ۲۵
۱-۴-۴- لپتین و محور هیپوتالاموس – هیپوفیز ۲۶
۱-۴-۵- نقش لپتین در مکانیسم‌های بدن ۲۷
۱-۴-۵-۱- لپتین و مصرف خوراک و وزن بدن ۲۷
۱-۴-۵-۲- لپتین و چاقی ۲۷
۱-۴-۵-۳- لپتین پلاسما ۲۸
۱-۴-۵-۴- لپتین و انسولین ۲۸
۱-۴-۵-۵- لپتین و شیردهی ۲۸
۱-۴-۵-۶- لپتین و غده پستان ۲۹
۱-۴-۶- چند شکلی در ژن لپتین ۲۹
۱-۴-۷- اثر چند شکلی لپتین بر صفات تولید شیر ۳۱
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۳
۲-۱- نمونه برداری ۳۴
۲-۲- استخراج DNA ۳۴
۲-۲-۱- بافرهای مورد استفاده در استخراج DNA ۳۴
۲-۲-۱-۱- بافر جداکننده ۳۴
۲-۲-۱-۲- بافر لیزکننده ۳۵
۲-۲-۲- مراحل استخراج DNA از نمونه‌های خون ۳۶
۲-۳- ذخیره DNA استخراج شده ۳۷
۲-۴- تعیین ویژگی‌های کمی و کیفی DNA ۳۷
۲-۴-۱- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر ۳۷
۲-۴-۲- جداسازی مولکول‌ها و تعیین کمیت و کیفیت DNA با ژل الکتروفورز ۳۸
۲-۵- واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) ۴۰
۲-۵-۱- اجزای واکنش PCR ۴۰
۲-۵-۲- بهینه‌سازی شرایط PCR ۴۰
۲-۵-۳- مراحل آماده سازی PCR ۴۱
۲-۵-۴- تنظیم چرخه حرارتی PCR ۴۱
۲-۵-۵- توالی قطعه تکثیر شده در واکنش PCR ۴۲
۲-۵-۶- مشاهده محصول PCR ۴۲
۲-۶- هضم آنزیمی محصولات PCR ۴۲
۲-۶-۱- انجام واکنش هضم به کمک آنزیم برشی *BsaA* I ۴۳
۲-۶-۲- الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی با ژل آگارز ۴۳
۲-۶-۳- تعیین ژنوتیپ ۴۴
۲-۷- بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه ۴۴
۲-۷-۱- تعادل هاردی- واینبرگ ۴۴

۲-۷-۲- معیارهای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی ۴۵
۲-۷-۲-۱- فراوانی‌های آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها ۴۵
۲-۷-۲-۲- هتروزیگوتی یا تنوع ژنی ۴۶
۲-۷-۲-۳- شاخص اطلاعات شانون (H´) ۴۷
۲-۷-۳- معیارهای چند شکلی ۴۷
۲-۷-۳-۱- تعداد آلل‌های واقعی ۴۷
۲-۷-۳-۲- تعداد آلل‌های موثر ۴۷
۲-۷-۳-۳- محتوای اطلاعات چند شکلی ۴۸
۲-۹- آنالیز آماری ۴۹
۲-۱۰- نرم افزارهای مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل داده‌ها..... ۴۹
فصل سوم: نتایج و بحث ۵۲
۳-۱- کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۵۱
۳-۲- تکثیر ژن لپتین..... ۵۱
۳-۳- نتیجه هضم آنزیمی و چند شکلی قطعات با طول محدودشده (RFLP) ۵۲
۳-۳-۱- تیمار آنزیمی *BsaA* I برای جایگاه ژنی لپتین (تعیین ژنوتیپ افراد) ۵۲
۳-۴- برآورد پارامترهای ژنتیکی ۵۳
۳-۴-۱- تعیین فراوانی ژنی (آللی) و ژنوتیپی برای جایگاه ژن لپتین..... ۵۳
۳-۴-۲- معیارهای ارزیابی تنوع ژنتیکی و چند شکلی در جایگاه ژن لپتین ۵۷
۳-۵- تجزیه و تحلیل اثر معنی‌داری متغیرهای مدل آماری بر صفات تولید شیر..... ۶۰
۳-۵-۱- اثر سطوح مختلف مدل آماری بر صفت تولید شیر روزانه..... ۶۱
۳-۵-۱-۱- بررسی اثر چند شکلی ژن لپتین بر تولید شیر روزانه ۶۱
۳-۵-۱-۲- بررسی اثر عوامل محیطی (غیر ژنتیکی) مدل آماری بر میزان تولید شیر روزانه ۶۳
۳-۵-۲- اثر سطوح مختلف مدل آماری بر صفت درصد چربی شیر ۶۶
۳-۵-۲-۱- بررسی اثر چند شکلی ژن لپتین بر صفت درصد چربی شیر ۶۶
۳-۵-۲-۲- بررسی اثر عوامل محیطی (غیر ژنتیکی) مدل آماری بر درصد چربی شیر ۶۷
۳-۵-۳- اثر سطوح مختلف مدل آماری بر صفت درصد پروتئین شیر ۶۹
۳-۵-۳-۱- بررسی اثر چند شکلی ژن لپتین بر صفت درصد پروتئین شیر ۶۹
۳-۵-۳-۲- بررسی اثر عوامل محیطی (غیر ژنتیکی) مدل آماری بر درصد پروتئین شیر ۷۰
۳-۶- نتیجه‌گیری کلی ۷۴
۳-۷- پیشنهادها ۷۵
منـــابع ۷۶

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- تنظیم فیزیولوژیکی سطح mRNA لپتین در بافت‌های نشخوارکنندگان، خوک و مرغ ۲۳
جدول ۱-۲- ۶ ایزوفرم گیرنده لپتین به همراه بافت‌هایی که غالباً در آن یافت می‌شوند و وظایف آن‌ها ۲۴
جدول ۱-۳- خلاصه‌ای از چند شکلی‌هایی که تا کنون در ژن لپتین و گیرنده‌اش در گاو یافت شده است ۳۰
جدول ۲-۱- مواد تشکیل دهنده بافر جداکننده ۳۴
جدول ۲-۲- مواد تشکیل دهنده بافر لیز کننده ۳۵
جدول ۲-۳- مواد تشکیل دهنده یک لیتر بافر TBE (5X) ۳۸
جدول ۲-۴- مخلوط واکنش به‌منظور انجام PCR ۴۰
جدول ۲-۵- توالی آغازگرها و توالی قطعه ۵۲۲ جفت بازی تکثیر شده از ژن لپتین ۴۲
جدول ۳-۱- فراوانی آللی مشاهده شده در جایگاه ژن لپتین ۵۴
جدول ۳-۲- برخی از فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی مشاهده شده در جایگاه مشابه ژن لپتین در مطالعات گذشته ۵۴
جدول ۳-۳- فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار ژن لپتین به همراه آزمون χ^2 ۵۵
جدول ۳-۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی برای جایگاه ژن لپتین در جمعیت گاو بومی استان گیلان ۵۸
جدول ۳-۵- شاخص‌های ارزیابی چند شکلی برای ژن لپتین در جمعیت گاو بومی گیلان ۵۹
جدول ۳-۶- توصیف آماری صفات تولید شیر، درصد چربی و پروتئین شیر در جمعیت گاو بومی گیلان ۶۰
جدول ۳-۷- مقایسه میانگین حداقل مربعات تولید شیر روزانه در گروه‌های ژنوتیپی ژن لپتین ۶۱
جدول ۳-۸- مقایسه میانگین تولید شیر روزانه گاو بومی گیلان در مناطق مورد مطالعه ۶۳
جدول ۳-۹- مقایسه میانگین تولید شیر روزانه در بین دوره‌های شیردهی مختلف ۶۴
جدول ۳-۱۰- مقایسه میانگین تولید شیر روزانه در بین سال‌های زایش مختلف ۶۴
جدول ۳-۱۱- مقایسه میانگین تولید شیر روزانه بین فصل‌های زایش مختلف ۶۵
جدول ۳-۱۲- مقایسه میانگین حداقل مربعات درصد چربی شیر در گروه‌های ژنوتیپی ژن لپتین ۶۶
جدول ۳-۱۳- مقایسه میانگین درصد چربی شیر گاو بومی گیلان در مناطق مورد مطالعه ۶۷
جدول ۳-۱۴- مقایسه میانگین درصد چربی شیر در بین دوره‌های شیردهی مختلف ۶۸
جدول ۳-۱۵- مقایسه میانگین درصد چربی شیر در بین سال‌های زایش مختلف ۶۸
جدول ۳-۱۶- مقایسه میانگین درصد چربی شیر بین فصل‌های زایش مختلف ۶۹
جدول ۳-۱۷- مقایسه میانگین حداقل مربعات درصد پروتئین شیر در گروه‌های ژنوتیپی ژن لپتین ۷۰
جدول ۳-۱۸- مقایسه میانگین درصد پروتئین شیر گاو بومی گیلان در مناطق مورد مطالعه ۷۱
جدول ۳-۱۹- مقایسه میانگین درصد پروتئین شیر در بین دوره‌های شیردهی مختلف ۷۱
جدول ۳-۲۰- مقایسه میانگین درصد پروتئین شیر در بین سال‌های زایش مختلف ۷۲
جدول ۳-۲۱- مقایسه میانگین درصد پروتئین شیر بین فصل‌های زایش مختلف ۷۲

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- ساختارمولکولی ژن لپتین ۱۹
شکل ۱-۲- ساختار سه بعدی ژن لپتین ۱۹
شکل ۱-۳- اثرات فیزیولوژیکی لپتین ترشح شده از بافت چربی در جوندگان ۲۱
شکل ۱-۴- حلقه‌های بازخورد بین اندازه سلول‌های چربی، لپتین و متابولیسم انرژی در جوندگان ۲۱
شکل ۱-۵- تنظیم لپتین در نشخوارکنندگان ۲۲
شکل ۱-۶- تصویر شماتیک از ترشح و عمل لپتین. ۲۵
شکل ۱-۷- مسیرهای متابولیکی در ترشح لپتین ۲۶
شکل ۱-۸- سازمان‌بندی ژن لپتین گاو به همراه نام و موقعیت چند شکلی‌های مورد استفاده در مطالعات ارتباط ژنتیکی ... ۳۰
شکل ۲-۱- برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر ۴۱
شکل ۲-۲- سایت برشی آنزیم محدودگر *BsaA* I ۴۳
شکل ۲-۳- DNA نشانگر pBR322/BsuRI ۴۴
شکل ۳-۱- نمونه‌هایی از DNA ژنومی استخراج شده ۵۱
شکل ۳-۲- نمونه‌ای از محصولات تکثیر شده ژن لپتین ۵۲
شکل ۳-۳- الگو های ژنوتیپی مشاهده شده حاصل از برش (هضم) آنزیم *BsaA* I (*Ppu21* I) ۵۳

چکیده

ارتباط بین چند شکلی ژن لپتین با صفات اقتصادی در گاو بومی گیلان با استفاده از روش PCR-RFLP

مجتبی رضایی

امروزه می‌توان با استفاده از ژن‌های کاندیدا حیوانات را برای صفات مورد نظر انتخاب و سبب پیشرفت ژنتیکی شد. چند شکلی‌های متعددی از ژن لپتین به عنوان یک ژن کاندیدا در گاو کشف شده‌اند که با صفات تولید شیر در گاو در ارتباط‌اند. در این پژوهش به منظور ارزیابی ارتباط چند شکلی جایگاه ژن لپتین با صفات تولید شیر در گاوهای بومی گیلان از ۱۰۰ رأس گاو ماده بومی مربوط به گله‌های اقماری استان گیلان نمونه‌های خون جمع‌آوری شد. DNA به روش نمکی بهینه یافته استخراج شد. با به کار گیری روش PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، قطعه‌ای به طول ۵۲۲ جفت باز از ناحیه اینترون ۲ و اگزون ۳ ژن لپتین تکثیر شد. محصولات PCR با آنزیم محدودگر *BsaA* I مورد هضم قرار گرفت. دو آلل A و B به ترتیب با فراوانی ۰/۴۵۵ و ۰/۵۴۵ و سه ژنوتیپ AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی ۰/۱۹، ۰/۵۳ و ۰/۲۸ برای ژن لپتین در جمعیت مورد بررسی شناسایی شد. بر اساس نتایج آزمون مربع کای، جمعیت مورد بررسی در تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشت. 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 LEP-*BsaA* I بر صفات تولید شیر، درصد چربی و پروتئین شیر معنی‌دار است ($P<0/01$). بر این اساس، گاوهایی با ژنوتیپ AB نسبت به گاوهایی با ژنوتیپ‌های AA و BB به ترتیب به میزان ۱/۱۷ و ۰/۶۹ کیلوگرم در روز تولید شیر بیشتری داشتند و ژنوتیپ AA نسبت به ژنوتیپ AB به میزان ۰/۲۸ و ۰/۱۷ درصد به ترتیب درصد چربی و پروتئین شیر بیشتری داشت ($P<0/01$). بر اساس یافته‌های این تحقیق چند شکلی در جایگاه‌های ژن لپتین می‌تواند به عنوان یک معیار انتخاب جهت بهبود صفات اقتصادی در گاو بومی گیلان استفاده شود.

کلمات کلیدی: چند شکلیDNA، ژن لپتین، تولید شیر، گاو بومی گیلان، PCR-RFLP

Abstract

Association between Leptin gene polymorphism and economic traits in Guilan native cattle using PCR-RFLP method.

Mojtaba Rezaei

To achieve genetic improvement, nowadays animals can be selected for desired traits using candidate genes. Several polymorphisms of leptin gene were discovered as a candidate gene associated with milk production traits in dairy cattle. In the current study, we studied the association between *BsaA* I restriction fragment length polymorphisms in the leptin gene with milk production traits of Guilan native cows belonging to the census herds in Guilan province in Iran. In order to test this association, blood samples were collected from 100 cows. The extraction of genomic DNA was based on modified Salting Out method. The 522 bp fragment comprising the partial intron 2 and exon 3 region of leptin gene locus was amplified using PCR-RFLP and specific primers. Digestion of amplified fragment with restriction enzyme *BsaA* I revealed two alleles of A and B with frequencies of 0.455 and 0.545 and three genotypes of AA, AB and BB with frequencies of 0.19, 0.53 and 0.28 in the studied population, respectively. The chi-square test results showed that the studied population was in Hardy-Weinberg equilibrium. Comparison of genotypes association with milk production traits was conducted based on a linear model of SAS software using least squares means methods. Statistical analysis indicated that the *LEP-BsaA* I polymorphism has a significant effect on milk yield, milk fat and protein percentage ($P<0.01$). The heterozygous animals (AB) produced 1.17 and 0.69 kg/day more milk than the homozygous AA and BB animals, respectively. Animals with the AA genotype had higher fat (0.28 %) and protein (0.17 %) percentage compared with AB genotype. Based on the current study findings, leptin gene polymorphisms can be used as a selection criterion to improve the economic traits of Guilan native cattle in Iran.

Key words: DNA polymorphism, Guilan native cows, leptin gene, milk production, PCR-RFLP

مقدمه

مقدمه

شیر و فرآورده‌های لبنی حاصل از آن مهم‌ترین منابع غذائی هستند که می‌توانند احتیاجات انرژی، پروتئین و انواع ویتامین‌ها و مواد معدنی را برآورده سازند. گاو منبع اصلی تولید شیر و گوشت قرمز در اکثر کشورها بوده و تولید شیر از صفات مهم اقتصادی در صنعت پرورش گاوهای شیری است که تحت کنترل شرایط محیطی و ژنوتیپی قرار دارد. اصلاح‌گر با انتخاب حیوانات با عملکرد فنوتیپی بهتر به عنوان مولد، فراوانی آلل‌های مطلوب تأثیرگذار بر صفات تولید شیر را افزایش می‌دهد. در سال‌های اخیر تولید شیر سالیانه افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است که تقریباً نصف این افزایش سهم انتخاب ژنتیکی بوده است [Pryce and Veerkamp, 1999].

هدف اصلاح دام، بهبود شایستگی ژنتیکی حیوانات در نسل آینده است. به گونه‌ای که محصولات مورد نظر را با بازدهی بیشتر نسبت به نسل فعلی، تحت شرایط اقتصادی و اجتماعی آینده تولید کنند. در شرایط حاضر اصلاح دام با بهره‌گیری از ژنتیک جمعیت، ژنتیک مولکولی، آمار ریاضی و کامپیوتر به‌صورت یک ابزار قدرتمند در بهبود ژنتیک حیوانات در آمده است [Ponzoni, 1980]. در گذشته عمده برنامه‌های اصلاح نژاد دام‌های شیرده بر آزمون نتاج یا انتخاب نرهای ممتاز بر اساس رکورد تولیدی دختران استوار بوده است. در جمعیت دختران این دام‌های نر نیز رکوردگیری برای صفت تولید شیر صورت می‌گرفته و نهایتاً نرهایی با ارزش ژنتیکی افزایشی مناسب برای تولید شیر انتخاب می‌شدند. چنین انتخابی به این دلیل انجام می‌شد که تنها صفت تولید شیر ارزش اقتصادی داشت. امروزه ارزش دام‌های ماده منحصراً به‌وسیله تولید شیر تعیین نمی‌شود، بلکه چربی و پروتئین شیر نیز درآمد ناشی از فروش شیر را تحت تأثیر قرار می‌دهند. درصد چربی و پروتئین شیر از نظر ارزش اقتصادی در قیمت‌گذاری شیر موثر هستند. علاوه بر این، ترکیبات شیر بر روی خصوصیات کیفی شیر، فرآورده‌های حاصل از آن و روی ارزش تغذیه‌ای شیر نیز اثر دارند. بنابراین، در کنار سایر اهداف اصلاحی، این صفات نیز از اهمیت خاصی برخوردارند. علیرغم اینکه انتخاب فنوتیپی و استفاده از مدل‌های حیوانی، همواره توانسته پیشرفت ژنتیکی مناسبی را در نسل‌های آتی به وجود آورد اما نیاز به روش‌هایی که منجر به کاهش فاصله نسلی و همچنین افزایش دقت ارزیابی‌های ژنتیکی گردد، همواره احساس شده است. یکی از راهکارهای مناسب موجود برای دستیابی به این اهداف، استفاده از نشانگرهای ژنتیکی است که به طور مستقیم و یا غیرمستقیم بر تولید شیر و خصوصیات آن تأثیرگذار است. ژن کاندیدا یکی از جدیدترین محورهای تحقیقاتی برای بهبود خصوصیات شیر تولیدی در دام‌های شیرده است که در سال‌های اخیر زمینه بسیاری از تحقیقات ژنتیک مولکولی در اصلاح نژاد گله‌های شیرده را به خود اختصاص داده است [الیاسی،۱۳۸۴; جوانمرد،۱۳۸۰]. در طی دو دهه گذشته علم ژنتیک پیشرفت زیادی داشته و در زمان حاضر امکان تشخیص تعداد زیادی نشانگر در فاصله بسیار نزدیکی بر روی کروموزوم‌ها وجود دارد. لذا امکان بررسی نشانگرها در دام و

چگونگی انتقال آنها به نسل‌های بعد وجود دارد. امروزه نشانگرهای مولکولی DNA جهت تعیین فواصل ژنتیکی و تنوع موجود در جمعیت‌ها ابزار بسیار مناسبی محسوب می‌شوند [Edvards et al., 2000]. همچنین داده‌های ژنومی می‌توانند برای انتخاب حیوانات اطلاعات با ارزشی را در اختیار قرار دهند و به طور گسترده‌ای در ارزیابی‌های ژنتیکی حیوانات و طراحی برنامه‌های بهبود ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند. در نهایت از این اطلاعات می‌توان برای پیش‌بینی دقیق تر ارزش ارثی دام‌ها و انتخاب آن‌ها به کمک نشانگر (MAS[1]) استفاده کرد [Banos et al., 2008; Dodds et al., 2007]. انتخاب به کمک نشانگرهای ژنتیکی ترکیبی از اطلاعات چند شکلی ژنتیکی و اطلاعات فنوتیپی صفت مورد نظر است، که باعث افزایش صحت انتخاب و سرعت پیشرفت ژنتیکی خواهد شد. راندمان استفاده از نشانگر ژنتیکی بستگی به این دارد که آیا تغییرات ساختاری یا چند شکلی ژنتیکی ایجاد شده، مستقیم بر عمل ژن مؤثر است و یا این که با جایگاه صفات کمی (QTL[2]) مؤثر بر صفت مورد مطالعه پیوسته است. از آنجایی که نشانگرهای ژنتیکی در هر جایی از ژنوم می‌توانند واقع شوند، پیدا کردن نشانگرهای مفید مانند پیدا کردن یک سوزن در انباری از کاه است. برای اجتناب از این، می‌توان با تجزبه ژنتیکی روی نقاطی که اصطلاحاً ژن کاندیدا[3] نامیده می‌شوند، متمرکز شد [Furu, 1999]. 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 فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن جایگاه‌ها بر فنوتیپ صفت مورد نظر به اثبات رسیده است، اندازه‌گیری می‌شود. 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 فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی صفت است [صادقی، ۱۳۸۶].

استفاده از اطلاعات ژن‌های مؤثر بر صفات کمی یا QTL از سه طریق بر پیشرفت ژنتیکی اثر مستقیم دارد:

۱) افزایش صحت انتخاب به دلیل فراهم نمودن اطلاعات بیشتر در برآورد ارزش‌های اصلاحی؛

۲) استفاده از این ژن‌ها در تعیین و تشخیص حیوانات برتر در مراحل اولیه زندگی و در نتیجه کاهش فاصله نسلی؛

۳) استفاده از QTL در انتخاب اولیه بین افراد کاندیدای انتخاب و سپس انتخاب بر اساس رکوردهای فنوتیپی و در نتیجه امکان انتخاب یک تعداد معین در بین افراد بیشتر [صادقی، ۱۳۸۶].

---

[1]. Marker assisted selection

[2]. Quantitative trait loci

[3]. Candidate gene

هدف از انجام این پژوهش:

در طی سال‌های اخیر مطالعات ژنومی در گاو شیری سبب شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با صفات مختلف و همچنین ژن‌های بزرگ اثر در این دام شده است. ژن‌های بزرگ اثر دارای موقعیت مشخصی بر روی کروموزوم‌ها بوده و عمده بیان یک صفت را در کنترل دارند. برخی از ژن‌های موثر بر صفات تولید شیر و ترکیبات شیر شناسایی شده‌اند که از جمله آنها می‌توان به ژن‌های هورمون رشد (GH[1])، پرولاکتین(PRL[2]) فاکتور مؤثر بر نسخه‌برداری هیپوفیزی (Pit1[3])، بتالاکتوگلوبولین (BLG[4])، کاپاکازئین (KCN[5])، لپتین (LEP[6])، مبدل سیگنال و فعال کننده نسخه‌برداری (STAT5A[7]) و دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز (DGAT1[8]) اشاره نمود.

مطالعه چند شکلی‌های ژن لپتین از دو دهه گذشته در انسان و موش مورد توجه محققان و پزشکان قرار گرفته است. در سال‌های اخیر بررسی چند شکلی‌های ژن لپتین و ارتباط آن با صفات اقتصادی در گونه‌های اهلی (به‌ویژه گاو) به طور گسترده‌ای انجام شده است. در این پژوهش سعی بر آن بود تا که با استفاده از روش PCR-RFLP[9] چند شکلی آللی در ژن لپتین شناسایی و فراوانی ژنی و ژنوتیپی جایگاه‌های فوق و رابطه این ژن با صفات اقتصادی گاو بومی گیلان مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان از اطلاعات به‌دست آمده، در برنامه‌های اصلاح نژادی استفاده نمود.

---

1. Growth hormone
2. Prolactin
3. Pituitary specific transcription factor 1
4. Beta-lactoglobulin
5. kappa casein
6. Leptin
7. Signal transducer and activator of transcription 5A
8. diacylglycerol O-acyltransferase 1
9. Polymeras chain reaction-restriction fragment length polymorphism

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱- اهمیت پرورش گاو

تأمین مواد غذایی، به ویژه تأمین پروتئین حیوانی مورد نیاز به موازات افزایش جمعیت کشور بیش از گذشته مورد توجه قرار گرفته است. در این زمینه پرورش گاو به منظور تولید شیر و گوشت دارای جایگاه ویژه‌ای است. سهم عمده تولید شیر در جهان متعلق به گاو است. حدود ۱۷ درصد کل گاوهای موجود در جهان را نژادهای اصلاح‌شده تشکیل می‌دهند. تعداد کل گاوهای موجود کشور بالغ بر ۷ میلیون راس است، که سهم استان گیلان از این تعداد ۷۵۰ هزار رأس گاو بومی، ۱۵ هزار رأس گاو اصلاح‌شده هلشتاین و ۴۰ هزار رأس گاو آمیخته است. استان گیلان ۸ درصد از کل گاوهای کشور را دارا است که پس از مازندران و آذربایجان غربی در رتبه سوم قرار دارد [آمار جمعیت و تولیدات دامی سازمان جهاد کشاورزی استان گیلان، ۱۳۹۱]. علم اصلاح نژاد دام با بهره‌گیری از دانش آمار و ژنتیک، امکان شناسایی ظرفیت‌های ژنتیکی حیوانات را فراهم آورده است. به دلیل عدم به کارگیری چنین امکاناتی در اصلاح نژاد گاو بومی استفاده بهینه از این ذخایر ژنتیکی بین دامداران در سطح روستاها صورت نمی‌گیرد. شناخت ظرفیت‌های ژنتیکی بالقوه در گاوهای بومی برای بهره-وری بیشتر و بهبود معیشت دامداران یکی از گام‌های زیر بنایی است. ظرفیت‌های ژنتیکی گاوهای بومی استان گیلان چون دیگر نژادهای کشور چندان شناخته‌شده نیست [حسین علایی، ۱۳۹۰].

۱-۱-۱- اهمیت اصلاح نژاد گاو شیری

قدم اول در طرح یک برنامه اصلاح نژاد گاو شیری، تعریف اهداف اصلاح نژادی به منظور افزایش سوددهی در این صنعت و بهبود سطح ژنتیکی صفاتی است که از نظر اقتصادی دارای اهمیت هستند. صفاتی که می‌توانند در اهداف اصلاح نژاد گاو شیری منظور گردند شامل صفات مختلف تولید شیر، تیپ و صفات عملکردی در بر گیرنده سلامتی، باروری، آسان‌زایی، خوراک مصرفی دام و طول عمر اقتصادی گله است. در اغلب این برنامه‌ها انتخاب برای مجموعه‌ای از صفات مربوط به تولید صورت می‌گیرد [عبدالمحمدی، ۱۳۸۷؛ Schrooten, 2000]. گونه‌های اهلی بخصوص گاو نقش مهمی را در توسعه اقتصادی در سراسر جهان ایفا می‌نمایند. لذا برای افزایش سودآوری، لازم است گاوهایی با ظرفیت بالای صفات مهم اقتصادی از جمله صفت تولید شیر انتخاب گردند. این انتخاب از نظر داشتن بالاترین شاخص انتخاب انجام می‌گیرد. شاخص انتخاب معمولاً شامل اطلاعات شجره، فنوتیپ خود فرد و خویشاوندانش و همچنین صفات همبسته است. بنابراین تکنولوژی‌های اصلاح نژاد، نرها و ماده‌هایی را که به طور کلی مفیدتر بوده و سبب بهبود فرآیند اقتصادی می‌شوند، برای تشکیل نسل بعدی انتخاب می‌نماید. صفات مهم تولیدی پلی‌ژنیک هستند و به وسیله فعالیت تعدادی از ژن‌ها کنترل می-

شوند. با وجود این که تعداد زیادی از این ژن‌ها تا کنون مکان‌یابی شده‌اند، اما هنوز هم برخی از ژن‌ها که احتمالاً بر این صفات مؤثر هستند هنوز ناشناخته مانده‌اند. علاوه بر آن فاکتورهای محیطی در فرآیند آن‌ها تأثیرگذار بوده و می‌توانند بر فنوتیپ اثر مخدوش کننده‌ای بگذارند [Wibowo and Charles, 2008]. به دنبال پیشرفت‌های جدید در زمینه زیست شناسی مولکولی و تعیین نقشه ژنتیکی گاو، مطالعات زیادی جهت نقشه‌یابی QTL آغاز گردید. این پژوهش‌ها شناسایی محل‌های خاص از ژن‌ها را در کروموزوم که مسئول صفت مورد نظر هستند فراهم آورده که ازجمله آن‌ها، اطلاعاتی در مورد موقعیت و اثر ژن‌های موثر بر تولید و ترکیبات شیر است که می‌تواند در اصلاح نژاد گاو شیری مورد استفاده قرار گیرد. در واقع با توسعه روش‌های ژنتیک مولکولی امکان شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی (QTL) فراهم خواهد شد.

۱-۱-۲- مروری کوتاه بر گاو بومی گیلان

گاو بومی گیلان (تالشی) با دیگر نژادهای گاو بومی در ایران تفاوت دارد. هم گاو نر و هم گاو ماده شاخ دارند. در جنس نر کوهانی برجسته روی شانه‌ها به چشم می‌خورد و اختلافی فاحش و غیر عادی به لحاظ وزن و قد بین حیوان نر و ماده وجود دارد. پرورش‌دهنده اصلی گاو بومی گیلان معمولاً گالش‌ها[۱] بوده‌اند. آن‌ها گله‌های گاو خود را که از نژاد خالص‌تر بوده‌اند در جنگل‌ها و ارتفاعات می‌چراندند. نژادهای گاو به دو گروه اصلی گاو بدون کوهان[۲] و گاو کوهان‌دار[۳] تقسیم می‌شوند هر دو گروه گاوهای ذکرشده در جمعیت گاوهای ایران موجود هستند و گاو بومی گیلان نیز از نوع گاوهای کوهان‌دار است. در واقع گروه اول معمولاً به گاوهای اروپایی و گروه دوم به گاوهای آسیایی شهرت دارند.

ویژگی‌های بارز گاو بومی گیلان جثه کوچک و تنوع رنگ آن‌ها 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

---

[۱]. در اصطلاح مردم گیلان: گاودار، گاوچران

[2]. *Bos taurus*

[3]. *Bos indicus*

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].

۱-۱-۳- اهمیت حفاظت و بهبود توده‌های ذخایر ژنتیکی بومی

نژادهای بومی در هر کشور به‌عنوان سرمایه ملی تلقی شده و حفظ و تکثیر آن‌ها از ارزش و اهمیت زیادی برخوردار است. سرزمین پهناور ایران به علت شرایط خاص جغرافیایی دارای اقلیم‌های متنوعی است و در چنین شرایطی انتخاب‌های طبیعی و مصنوعی موجب شده است که نژادهای حیوانات اهلی با استعداد متنوع در این کشور به وجود آید. اکنون مشخص شده است که حیوانات بومی پس از سال‌های زیاد انتخاب طبیعی به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به شرایط محیطی و تنش‌های ناشی از محدودیت‌های غذایی محل زندگی خود سازگاری و تطابق پیدا کرده‌اند. مقاومت نسبی به بیماری‌های بومی و منطقه‌ای نیز از مزیت‌های مهم این موجودات محسوب می‌شود. در اکثر موارد دام‌هایی که در شرایط نامساعد محیطی پرورش می‌یابند، علیه صفات اقتصادی آن‌ها انتخاب طبیعی صورت می‌گیرد و موجب می‌شود که این حیوانات نتوانند به اندازه نژادهایی که در شرایط مساعد محیطی انتخاب شده‌اند تولید داشته باشند. ولی ارزیابی دام‌های بومی باید بر اساس مجموع استعداد اقتصادی آن‌ها، که شامل تولید محصول به ازای هزینه‌های انجام شده برای آن تولید است، انجام گیرد [میرحسینی، ۱۳۶۹].

۱-۱-۴- تنوع ژنتیکی و اصلاح‌نژاد دام بومی

شناخت تنوع و رده‌بندی ذخایر ژنتیکی، یک کار زیر بنایی و بنیادی برای پی‌ریزی برنامه‌های به نژادی است. ذخایر ژنتیکی دست مایه‌هایی برای متخصصین اصلاح نژاد هستند که از آن‌ها برای ساختن دودمان‌های تازه بهره می‌گیرند. پیشرفت در به نژادی که بیشتر با گزینش و خالص‌سازی توده‌های ژنتیکی بومی انجام می‌گیرد، یکنواختی را افزایش داده و تنوع ژنتیکی را نسبت به آنچه که در توده نخستین بوده است کاهش می‌دهد [رحیمی، ۱۳۸۲]. اگر چه برآورد کاهش تنوع ژنتیکی دشوار می‌شود، ولی در این فرآیند بسیاری از ژن‌های سودمند از دست می‌روند و ذخایر ژنتیکی با شتاب فزاینده‌ای کاهش می‌یابند. این فرسایش به نابودی مواد با ارزشی می‌انجامد که هنوز از آنها بهره‌برداری نشده است. ادامه روند افزایش تولید و بهبود کیفیت مواد تولیدی بستگی به پاسداری از ذخایر ژنتیکی، مدیریت شایسته آن‌ها و بهره‌گیری کارآمد از این اندوخته‌ها دارد [قره‌یاضی، ۱۳۷۵]. امروزه بهره‌گیری از تنوع ژنتیکی و نگهداری از ذخایر ژنتیکی از کارهای برجسته به‌نژادی است. هدف دانش ژنتیکی و به نژادی، بهبود بخشیدن به یک توده از دیدگاه ژنتیکی است که دستاورد آن داشتن