بررسی چندشکلی ناحیه اگزون ژن MHC-DRB3 با استفاده از روش PCR-RFLP در برخی نژادهای اسب کشور

محمد توکلی[۱]، علیرضا نوشری[۱*]، بهزاد همتی[۱]

تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۰۳/۳۰

تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۰۴/۱۶

چکیده

ژن‌های کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC) به‌واسطه ارتباط با پاسخ‌های ایمنی و مقاومت و یا حساسیت به بیماری‌ها اهمیت ویژه‌ای در پرورش اسب دارند. هدف از این تحقیق شناسایی چندشکلی‌های موجود در ناحیه‌ای ازاگزون این ژن و مطالعه‌ی جمعیتی در این جایگاه می‌باشد. برای این منظور تعداد ۱۲۰ رأس اسب به‌طور تصادفی از ۴ نژاد تروبرد، الدنبرگ، اسبچه خزر و عرب مطالعه گردید. استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خون انجام و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه ۳۰۹ جفت بازی ژن MHC انجام شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای انجام واکنش PCR-RFLP و تعیین ژنوتیپ به‌وسیله آنزیم برشی RsaI تحت هضم قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده وجود سه آلل A ،B وC و شش نوع ژنوتیپ AA،AB، AC، BB ، BCو CC به ترتیب با فراوانی‌های آللی ۰/۳۲۰۸، ۰/۳۲۰۸و ۰/۳۵۸۴ و فراوانی‌های ژنوتیپی۰/۰۵، ۰/۲۵، ۰/۲۹۱۷، ۰/۱۳۳۳، ۰/۱۲۵ و ۰/۱۵ درمجموع نژادهای مورد مطالعه بوده است. بیشترین و کمترین فراوانی آللی در نژادهای تروبرد، الدنبرگ، اسبچه خزر و عرب به ترتیب متعلق به آلل های B، A، C و A، B، B، A بوده است. نتایج بررسی برقراری تعادل هاردی واینبرگ در این تحقیق با استفاده از آزمون‌های G^2 وX^2 نشان‌دهنده برقراری تعادل هاردی واینبرگ در نژادهای الدنبرگ و اسبچه خزر و عدم تعادل در نژادهای تروبرد و عرب بوده است. با استفاده از یافته‌های این تحقیق می‌توان از تنوع ژنتیکی موجود در نژادهای مورد مطالعه به‌عنوان یک منبع قابل‌استفاده در برنامه‌های اصلاح نژادی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، تروبرد، الدنبرگ، اسبچه خزر، عرب، کمپلکس اصلی سازگاری بافتی

۱. گروه علوم دامی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی ، کرج، ایران.

*عهده دار مکاتبات: alireza.noshary@kiau.ac.ir

مقدمه

اسب‌ها برای اهداف مختلفی پرورش می‌یابند و توانایی هرکدام از آن‌ها در انجام وظیفه‌ای خاص است (لازلی،۱۳۸۴). امروزه بیش از ۱۷ رشته مربوط به صنعت اسب و سوارکاری وجود دارد که در هر یک از این رشته‌ها به اسب مخصوص آن رشته نیاز وجود دارد، از این رو اصلاح نژاد در صنعت پرورش اسب امری ضروری است(خلیلی،۱۳۸۸). با پیشرفت سریع برنامه‌های اصلاح نژاد اسب طی دو دهه گذشته، مسیر جدیدی جهت یافتن اصول علمی اصلاح و بیولوژی این حیوان پیش روی قرار گرفت و منجر به ایجاد روش‌های نوین تولیدی برای نائل شدن به افزایش ماندگاری عملکرد دام‌ها و پیشرفت طولانی مدت بازده تولیدی اسب شده است. عصر جدید "ژنومیک" نویددهنده‌ی توانایی پیش‌بینی اهداف اصلاحی بر اساس تعیین توالی DNA افراد بوده و بنابراین ارزش ژنتیکی حیوانات محدود به تنها تعداد محدودی صفات نخواهد بود. امروزه تمرکز اصلی جامعه پژوهشی ژنومیک اسب بر روی توسعه ابزارهای پژوهشی به‌ویژه تحقیقات بر روی ژن‌های کاندیدای مسئول بیماری‌ها و صفات عملکردی می‌باشد (Chowdhary، ۲۰۱۳).

کنترل بیماری‌ها و کیفیت پاسخ دفاعی برعلیه عوامل آسیب رسان از جمله صفاتی است که به کدهای ژنتیکی به ارث رسیده بستگی دارد. از این رو یافتن نشانگرهایی برای شناسایی مکآن‌های ژنی موثر براین صفات، مطالعه‌ی ساختار سیستم توارثی وتنوع ژنتیکی در جمعیت ها و تصحیح کدهای ژنتیکی جهت انتخاب میزبآن‌های مقاوم، ابزار قدرتمندی برای مبارزه با عوامل عفونی و بیماری‌ها است. به عبارت دیگر، در کنار انتخاب برای صفات تولیدی، انتخاب ژنتیکی مقاومت نسبت به بیماریها می‌تواند به طور همزمان به‌عنوان نوعی از کنترل بیولوژیک در یک استراتژی یکپارچه به کار گرفته شود. اصلاح ترکیب ژنتیکی جمعیت برای صفات مقاومت باید همزمان با اقدامات کنترل و پیشگیری بوده و بویژه در کنار صفات تولیدی به صورت جدی لحاظ شود(بروجنی و همکاران، ۱۳۹۱).

کمپلکس اصلی سازگاری بافتی(MHC)[1]، از جالب ترین و از نظر بیولوژیکی یکی از مناطق مهم ژنوم مهره داران می‌باشد. MHC شامل تعداد زیادی ژن‌های چندشکل در ژنوم مهره داران است و تفاوت های آللی در این ژن ها قبل از گونه زایی منبعی برای ایجاد تنوع ژنتیکی بین گونه ها بوده است(Klein، ۱۹۸۷، Hedrick و همکاران،۱۹۹۹). اما برخی جمعیت ها ظاهرا بر اساس MHC با ساختار تک شکلی پایدار می مانند(Chowdhary، ۲۰۱۳). در حال حاضر حجم زیادی اطلاعات توالی یابی برای گونه های مختلف مهره داران در دسترس می‌باشد که چشم انداز تکاملی دقیقی را در رابطه با تنوع MHC و نگرش هایی را در مورد اهمیت عملکردی چنین تنوعی فراهم می کند. کمپلکس اصلی سازگاری بافتی گروه بزرگی از ژن‌های به هم پیوسته است که نقش تنظیمی را در سیستم ایمنی ایفا می کند. جایگاه ژن MHC در اسب اهلی در کرومزوم شماره ۲۰ می‌باشد (Bowling و Ruvinsky، ۲۰۰۴). این جایگاه شامل بیش از ۲۳۰ ژن قابل ترجمه توزیع شده در تقریبا ۳Mb از DNA می‌باشد. بسیاری از ژن‌های ترجمه شده درMHC، پروتئین هایی با عملکرد ایمنی را کد می کنند. ژن‌های خاصی هم گیرنده های سطح سلولی را کد می‌کنند که در نهایت پلی پپتیدهای آنتی ژنی را به لنفوسیت های T گیرنده های کلاس MHC I و کلاس MHCIIتبدیل می‌نمایند.

[1] Major Histocompatibility Complex

پروتئین های کد شده در جایگاه ژنی کلاس I وکلاس II، در مراحل اولیه پاسخ ایمنی اکتسابی شرکت می کنند و نقش حیاتی را در تمایز پلی‌پپتیدهای خودی و غیر خودی ایفا می کنند. تنوع ژنتیکی در MHC، مرتبط با قابلیت ابتلا به بیماری‌های متعدد و حساسیت های انگلی، اختلالات خود ایمنی و دیگر فنوتیپ های ایمنی میباشد(Sharma و همکاران،۲۰۰۹). ساختار معمول MHC شامل دو منطقه ژن‌های ارائه دهنده آنتی ژن می‌باشد که به صورت کلاس I وکلاس II مشخص می‌شوند و در طرفین یک منطقه تشخیص سوم حاوی ژن‌های بسیار حفاظت شده تحت عنوان منطقه کلاس III قرار می گیرند. برخی آزمایش ها ارتباط بین کمپلکس اصلی سازگاری بافتی حیوان و مقاومت نسبت به بیماری‌هایی نظیر حساسیت در برابر بیماری تورم مفصل همراه با آنسفالیت را در برخی نژادهای بز نشان میدهد (محمد آبادی و دست افکن،۱۳۹۱).

تکمیل پروژه ژنوم اسب به طور قابل توجهی به شناخت ژنومیکس جایگاه MHC کمک می کند چرا که اسب تنها نماینده رده پرسیوداکتیل است که توالی کل ژنوم (WGS)[1] آن در حال حاضر در دسترس می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر مطالعه چندشکلی در جایگاه اگزون ژن MHC در چهار نژاد اسب شامل تروبرد، الدنبرگ، عرب و اسبچه خزر و مقایسه شاخص های تنوع ژنتیکی جمعیت در این نژادها می‌باشد.

مواد و روش ها

دراین تحقیق از تعداد ۱۲۰ راس از اسب‌های نر ، ماده و اخته از نژاد های تروبرد ، الدنبرگ ، اسبچه ی خزر و عرب (از هر نژاد ۳۰ راس) بطور تصادفی استفاده شد. نمونه گیری بر اساس جمع آوری نمونه‌های خون بصورت انفرادی به میزان ۱۰- ۵ میلی لیتر از سیاهرگ وداج با استفاده از ونوجکت حاوی ماده ضد انعقاد خون K_2EDTA انجام شد. سپس نمونه ها بلافاصله در کنار یخ در دمای ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد واحد کرج منتقل وتا زمان استخراج ژنوم، در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت شرکتRBC انجام شد. DNA استخراج شده با بارگیری روی ژل آگارز ۰/۷۵درصد و روش ژل داکیومنت مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول۱- توالی آغاز گرهای واکنش

5'- GTGGGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT-3'	آغازگر رفت
5'- CTTGAATTCGCGCTCACCTCGCCGCTG -3'	آغارگر برگشت

واکنش زنجیره ای پلی مراز

[1] Whole genomic sequence

در این تحقیق از آغازگرهای پیشنهاد شده توسط Sharma و همکاران(۲۰۰۹) برای تکثیر جایگاه ژن مورد نظر در واکنش زنجیره ای پلی مراز استفاده گردید. توالی این آغازگرها مطابق جدول شماره ۱ می‌باشد. واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم واکنش۴۰ میکرولیتر شامل ۸۰ نانو گرم DNA،۱۰ پیکومول در میکرولیتر از هر آغازگر، بافر PCR با غلظت 1X، ۲۰۰میکرومولار از هر dNTP، $MgCl_2$ ۱/۵ میلی مولار و ۱ واحد Taq DNA Polymerase انجام شد. چرخه های دمایی واکنش زنجیره ای پلی‌مراز شامل۹۵ درجه سلسیوس جهت واسرشت اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه و در ادامه تعداد ۴۰ سیکل شامل واسرشت ثانویه در دمای ۹۵درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱دقیقه وبسط آغازگرها در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در خاتمه بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲درجه سلسیوس انجام شد. برای آزمون تکثیر جایگاه مورد مطالعه و هم چنین تعیین کیفیت محصول PCR از ژل آگارز ۱/۵درصد و رنگ آمیزی Safe stain به همراه نشانگر۱۰۰جفت بازی شرکت ترمو استفاده شد.

هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برشی RsaI

به منظور بررسی چندشکلی در قطعه ی مورد مطالعه و آزمون PCR- RFLP، از آنزیم برشی RsaI با شماره دسترسی ER1121 از شرکت Thermo به میزان ۱۰۰۰ واحد استفاده شد. واکنش هضم آنزیمی محصولات PCR در حجم ۱۲ میکرو لیتر ، حاوی ۰/۸ میکرو لیتر آنزیم RsaI ،۱/۲ میکرولیتر بافر Tango، ۸ میکرولیتر محصول PCR و ۲ میکرو لیتر آب دوبار تقطیر بود. هضم آنزیمی نمونه ها در بن ماری 37^{o} C و به صورت شبانه انجام گرفت. محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۲ درصد بار گیری شد. برای شناسایی طول قطعات مورد نظر، از نشانگر ۵۰ جفت بازی استفاده گردید.

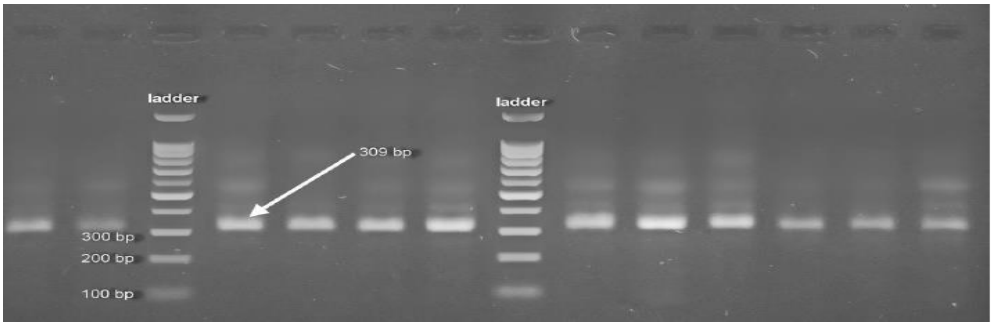
فراوانی آللی و ژنوتیپی و تعادل هاردی واینبرگ

در این تحقیق، مطالعات ژنتیک جمعیت جامعه مورد مطالعه شامل فروانی ژنی و ژنوتیپی، همچنین محاسبه تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون‌های کای مربع (x^2_t) و نسبت درست نمایی (G^2_T) با استفاده از نرم افزار POPGENE 32 مورد بررسی قرار گرفت(Yeh و همکاران،۱۹۹۹).

نتایج و بحث

در این تحقیق نمونه‌های DNA ژنومی در تمامی اسبها با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز، برای تکثیر جایگاهی به طول ۳۰۹ جفت باز، مورد استفاده قرار گرفت. تصویر شماره ۱ نتایج واکنش زنجیره ای پلیمراز را در تعداد ۱۲ نمونه، نشان می دهد. مطابق این تصویر پرایمرهای مورد استفاده توانستند جایگاه مورد مطالعه را به خوبی و بدون هیچ باند اضافه، تکثیر نمایند.

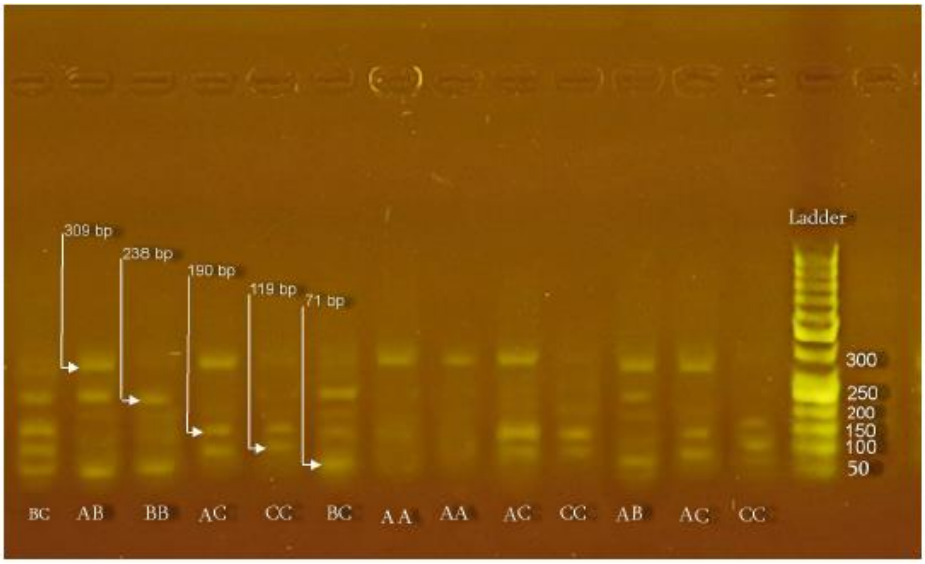
شکل۱- محصول PCR درکنار نشانگر اندازه گیری ۱۰۰bp



نتایج تعیین ژنوتیپ نمونه ها و آنالیز PCR-RFLP

در این تحقیق محصول واکنش هضم آنزیمی RsaI برای شناسایی ژنوتیپ ها در تمام نمونه‌های تحقیق روی ژل آگارز ۲ ٪ بارگیری شد. قطعهbp ۳۰۹ حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز در صورت وقوع جهش، بطور کامل توسط آنزیم RsaI برش خورده و قطعات bp ۲۳۸ و bp۷۱ ویا bp۱۹۰ وbp۱۱۹ را حاصل می کند که به ترتیب نشان‌دهنده آلل های B وC است. در صورت عدم وقوع جهش تنها یک قطعه bp ۳۰۹روی ژل ظاهر خواهد گردید که نشان‌دهنده آلل A خواهد بود. بامشاهده تعداد باندها در هر ستون از ژل آگارز، ژنوتیپ افراد قابل تشخیص است. بدین گونه که اگر تنها یک قطعه ۳۰۹bp مشاهده شود ژنوتیپ به صورت AA خواهد بود.اگر قطعات bp ۲۳۸ ، bp۷۱ و bp ۳۰۹ مشاهده گردید ژنوتیپ AB است.اگر تنها قطعات bp ۲۳۸ و bp۷۱ مشاهده گردید، ژنوتیپ BB می‌باشد.اگر قطعاتی با اندازه های قطعات bp ۲۳۸ و bp۷۱ ،bp۱۹۰ وbp۱۱۹ مشاهده شود، ژنوتیپ به صورت BC می‌باشد و اگر قطعه هایbp ۱۹۰ وbp۱۱۹ مشاهده شود، ژنوتیپ CC است. از۱۲۰ راس اسب مورد بررسی در این تحقیق ، در ۶ نمونه ژنوتیپAA ، در ۳۰ نمونه ژنوتیپ AB، در ۳۵ نمونه ژنوتیپ AC ،در ۱۶ نمونه ژنوتیپ BB، ،در ۱۵ نمونه ژنوتیپ BC ودر ۱۸ نمونه ژنوتیپ CC شناسایی گردید.شکل۲ ژنوتیپ های مختلف شناسایی شده را در تعدادی از نمونه‌های تحقیق نشان می دهد.

شکل۲- ژنوتیپ های مختلف شناسایی شده در واکنش PCR-RFLP



مطالعه‌ی جمعیتی نمونه‌های تحقیق

جدول شـــماره ۲ فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی را برای جایگاه مورد مطالعه در ۱۲۰راس اســـب از نژادهای الدنبرگ، تروبرد، عرب و اسبچه خزر نشان می‌دهد. مطابق این جدول بیشترین فراوانی آللی و ژنوتیپی بین ۱۲۰ نمونه مطالعه شده به ترتیب متعلق به آلل C و ژنوتیپ AC می‌باشـــد. مجموع تعداد ژنوتیپ های AA، AB، AC، BB، BC و CC به ترتیب برابر ۶، ۳۰ ، ۳۵، ۱۶ ،۱۵ و۱۸ نمونه بوده است.

جدول ۲ همچنین فراوانی‌های آللی وژنوتیپی را در هریک از چهار نژاد مورد مطالعه به تفکیک نشـــان می دهد. مطابق این جدول، بیشـــترین فراوانی آلل‌های A، B و C به ترتیب متعلق به نژادهای اســـبچه خزر، تروبرد و عرب می‌باشـــد. در نژاد تروبرد بی شترین فراوانی ژنوتیبی مربوط به ژنوتیب AB و بی شترین فراوانی آللی مربوط به آلل B می‌با شد. نژادهای الدنبرگ و ا سبچه خزر، از نظر بیشـــترین فراوانی ژنوتیپی و آللی مشـــابه بوده و به ترتیب متعلق به ژنوتیب AC و آلل A بوده اســـت. در نژاد عرب بیشترین فراوانی ژنوتیبی مشاهده شده مربوط به ژنوتیب AC می‌باشد و بیشترین فراوانی آللی مربوط به آلل C می‌باشد.

جدول۲- فراوانی آللی و ژنوتیپی در جایگاه ژن MHC

	فراوانی ژنوتیپی						فراوانی آللی		
ژنوتیپ وآلل	AA	AB	AC	BB	BC	CC	A	B	C
نژاد عرب(٪)	۰	۶/۶۶	۴۰	۲۰	۱۶/۶۶	۱۶/۶۶	۲۳/۳۳	۳۱/۶۷	۴۵
نژاد اسبچه خزر(٪)	۱۳/۳۳	۳۰	۲۶/۶۶	۶/۶۶	۱۳/۳۳	۱۰	۴۱/۶۷	۲۸/۳۳	۳۰
نژاد الدنبرگ(٪)	۶/۶۶	۲۶/۶۶	۳۶/۶۶	۶/۶۶	۱۶/۶۶	۶/۶۶	۳۸/۳۳	۲۸/۳۳	۳۳/۳۳

نژاد تروبرد(٪)	۰	۳۶/۶۶	۱۳/۳۳	۲۰	۳/۳۳	۲۶/۶۶	۲۵	۴۰	۳۵
کلیه نژاد ها(٪)	۵	۲۵	۲۹/۱۶	۱۳/۳۳	۱۲/۵	۱۵	۳۲/۰۸	۳۲/۰۸	۳۵/۸۳

جدول ۳ نتایج مربوط به آزمون برقراری تعادل هاردی واینبرگ را در هر یک از نژادهای مورد مطالعه و با دو آزمون آزمون

کای اسکور و جی اسکور به تفکیک نشان می دهد. مطابق این جدول، در نژادهای اسبچه خزر و الدنبرگ، تعادل هاردی واینبرگ از نظر لوکوس مورد مطالعه برقرار است. در حالی که نتایج این بررسی در دو نژاد عرب و تروبرد متفاوت بوده و این دو در عدم تعادل هاردی واینبرگ میباشند. با توجه به عدم مشاهده آلل A در این دو نژاد و در نتیجه صفر بودن فراوانی ژنوتیپی افراد AA، این نژادها با تعادل اختلاف معنی داری داشته اند. علت این امر می‌تواند تعداد کم نمونه ها باشد. وجود تنوع ژنتیکی لازم در نژادهای اسب موجود در کشور و برقراری تعادل در بسیاری از نژادها، نشان میدهد نژادهای موجود از امتیاز ژنتیکی لازم برخوردارند و در صورت اجرای صحیح برنامه‌های انتخاب، می‌توان برای صفات اقتصادی لازم، آنها را بهبود بخشید.

جدول ۳- تعداد افراد مشاهده شده (مورد انتظار)، آماره های آزمون کای مربع و جی مربع و سطح احتمال مربوط به آزمون برقراری تعادل هاردی واینبرگ

نژاد	AA	AB	BB	AC	BC	CC	X^2(prob)	G^2(prob)
عرب	۰ (۱/۵۴)	۲ (۴/۵۱)	۶ (۲/۹۰)	۱۲ (۶/۴۱)	۵ (۸/۶۹)	۵ (۵/۹۴)	۱۲/۸۶ (۰/۰۰۴۹۴)	۱۳/۲۷ (۰/۰۰۴۰۸)
اسبچه خزر	۴ (۵/۰۸)	۹ (۷/۲۰)	۲ (۲/۳۱)	۸ (۷/۶۳)	۴ (۵/۱۸)	۳ (۲/۵۹)	۱/۰۷ (۰/۷۸۳۵۱)	۱/۰۸ (۰/۷۸۱۷۶)
الدنبرگ	۲ (۴/۲۹)	۸ (۶/۱۰)	۲ (۲/۳۱)	۱۱ (۷/۸۰)	۵ (۵/۷۶)	۲ (۳/۲۲)	۳/۴۲ (۰/۳۳۰۵۸)	۳/۶۴ (۰/۳۰۲۹۱)
تروبرد	۰ (۱/۷۸)	۱۱ (۶/۱۰)	۶ (۴/۶۸)	۴ (۵/۳۴)	۱ (۸/۵۴)	۸ (۳/۵۶)	۱۸/۶۲(۰/۰۰۰۳۲)	۲۲/۳۱(۰/۰۰۰۰۵)

در این تحقیق، معیارهای تنوع ژنتیکی با استفاده از نرم افزار POPGEN-32 برای کل جمعیت و به تفکیک نژادها محاسبه شد و نتایج مطابق جدول ۴ می‌باشد. **مقادیر هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص نی، تعداد آلل موثر و شاخص شانون، همگی در نژاد الدنبرگ بیشترین می‌باشد. همچنین نژاد عرب از نظر تمامی شاخص های شانون، تعداد آلل موثر و نی پایین ترین میزان تنوع ژنتیکی را به خود اختصاص داده است.**

جدول ۴- مقادیر هموزیگوتی و هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار نمونه‌های تحقیق و معیارهای تنوع ژنتیکی

نژاد	Obs-Hom	Obs-Het	Exp-Hom	Exp-Het	Nei	Ave-Het	Na	Ne	I
عرب	۰/۳۶	۰/۶۳	۰/۳۴	۰/۶۵	۰/۶۴	۰/۶۴	۳	۲/۷۹	۱/۰۶
اسبچه خزر	۰/۳	۰/۷	۰/۳۳	۰/۶۶	۰/۶۵	۰/۶۵	۳	۲/۹۰	۱/۰۸
الدنبرگ	۰/۲	۰/۸	۰/۳۲	۰/۶۷	۰/۶۶	۰/۶۶	۳	۲/۹۵	۱/۰۹
تروبرد	۰/۴۶	۰/۵۳	۰/۳۳	۰/۶۶	۰/۶۵	۰/۶۵	۳	۲/۸۹	۱/۰۸
کل	۰/۳۳	۰/۶۶	۰/۳۳	۰/۶۶	۰/۶۶	۰/۶۵	۳	۲/۹۹	۱/۰۹

Obs-Hom: هموزیگوتی م شاهده شده، Obs-Het: هتروزیگوتی م شاهده شده، Exp-Hom: همزیگوتی مورد انتظار، Exp-Het: هتروزیگوتی مورد انتظار، Nei: شاخص نی، Na: تعداد آلل مشاهده شده، Ne: تعداد آلل موثر، I: شاخص شانون

با توجه به یافته‌های محمدآبادی و همکاران (۱۳۹۱) چون آلل های ژن MHC هم بارز می باشند هر چه میزان هتروزیگوتی در یک جامعه بیشتر باشد بهتر است. بر اساس شاخص نی، نژاد الدنبرگ به دلیل هتروزیگوتی بیشتر نسبت به بقیه نژاد ها می‌تواند امکانات بیشـــتری به منظور انتخاب در برنامه‌های اصـــلاح نژادی در اختیار قرار دهد و در از نظر مقاومت به بیماری‌ها مقاومت بیشتری را تامین نماید.

ژن‌های MHC نقش مهمی در پاســخ های ایمنی و مبارزه با بیماری‌های عفونی دارد و وجود چندشــکلی این ســیســتم ژنتیکی یک ابزار بسـیار ارزشـمند بوده و در تحقیق حاضـر نیز مشـاهده گردیده اسـت. میزان تنوع ژنتیکی در داخل یک جمعیت همبســتگی مســتقیمی با صــفات مربوط به ســازگاری با محیط دارد. در تحقیقی که توســط Luis و همکاران (۲۰۰۵) بر روی ژنMHC II-DRA در نژاد اسب در معرض خطر انقراض سورایا[1] انجام شد، نشان داد که تنوع ژنتیکی در جایگاه MHC II-DRA کم می‌باشد و نشان داده شد وجود چندشکلی درژن MHC II-DRA می‌تواند باعث مقاومت بیشتری در برابر بیماری‌ها شود. انتخاب برای افزایش تنوع ژنتیکی در ژن MHC، منجر به سازگاری بیشتر می شود. در تحقیقی دیگر توسط Hedrick و همکاران(۱۹۹۹) بر روی اسب نژاد پرژوالسکی[2] که تنها گونه باقی مانده از اسب‌های وحشی است، انجام شد ۶ الگوی ژنوتیپی متفاوت مشابه تحقیق حاضردر جایگاه های متفاوت شناسایی شد که این الگو های ژنوتیپی در اثر جهش های نامحسوس متنوعی به وجود آمده بودند و این جهش ها در جایگاه‌های اتصال آنتی ژن موثر بودند.

Arbanasic و همکاران (۲۰۰۹) در تحقیقات خود بر روی اگزون ۲ ژن MHC II-DRA در نژاد پوساوینا [3]و اسب‌های خون سرد کروواسی ۴ آلل متفاوت شناسایی نمود که یکی از آنها آلل جدید بوده ونشان‌دهنده یک جهش نامحسوس در جایگاه ۶۵ (T→A) و عامل تبدیل اسید آمینه فنیل آلانین به تایروزین در سایت اتصال آنتی ژن می‌باشد. همچنین یک جهش نامحسوس دیگر در جایگاه ۱۰۵ (C→T) مشاهده شد. هیچ یک نژاد های پوساوینا و اسب‌های خون سرد کروواسی در تعادل هاردی‌وایتبرگ قرار نداشت و هتروزیگوتی محاسبه شده برای نژاد پوساوینا و اسب‌های خون سرد کروواسی به ترتیب برابر ۰/۲۹ و ۰/۳۴ بود که در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر از هتروزیگوتی پایین تری برخوردار می باشند و این امر می‌تواند مقاومت کمتر این نژادها را نسبت به بیماری‌ها، تحت تاثیر قرار دهد.

نتیجه‌گیری کلی

تحقیق حاضر اولین تحقیق در زمینه مطالعه چندشکلی جایگاه ژنی MHC در اسب‌های موجود در کشور میباشد. نتایج این تحقیق وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای را در این نژادها نشان میدهد. با توجه به این که کیفیت پاسخ دفاعی برعلیه عوامل آسیب رسان از جمله صفاتی است که به آللهای ژنهای به ارث رسیده بستگی دارد از این رو یافتن نشانگرهایی برای شناسایی ساختار سیستم توارثی وتنوع ژنتیکی در جمعیت ها و مطالعه مکآن‌های ژنی و انتخاب جهت معرفی میزبان‌های مقاوم، ابزار قدرتمندی برای مبارزه با عوامل عفونی و بیماری‌ها است. انتخاب ژنتیکی مقاومت نسبت به بیماریها می تواند به طور همزمان به‌عنوان نوعی از کنترل بیولوژیک در یک استراتژی یکپارچه به کار گرفته شود. استفاده از روش انتخاب به کمک نشانگرها می‌تواند

[1] .sorraia
[2] Przewalski
[3] Posavina

راه را برای سایر محققین و اصلاح گران در استفاده از انتخاب بر اساس نشانگر باز نماید. بدین ترتیب که از ظرفیت چندشکلی نواحی مختلف ژنوم که مرتبط با صفات اقتصادی هستند در برنامه ای اصلاحی استفاده نمود و با استفاده از این نشانگرها، اسب‌هایی که مولدین بهتری می باشند را شناسایی و انتخاب نمود.

منابع:

۱- بروجنی ،غ، م. رنجبر، ف. قاسمیان، ف. اسدیان، ۱۳۹۱. شناسایی چندشکلی آلل های اگزون دو از ژن BoLA-DRB3 در جمعیت گاو های هلشتاین ایران.مجله تحقیقات تولیدات دامی.سال اول، شماره دوم، ص ۳۴

۲- خلیلی،م.۱۳۸۸. اسب و آنچه من می دانم، نشر ذره.

۳- لازلی، ف.۱۳۸۴. ژنتیک اصلاح دام. مترجم حمید امانلو، انتشارات دانشگاه زنجان،ص۵۸۴

۴- محمد آبادی،م، ک. دست افکن،۱۳۹۱. چندشکلی اگزون ۲ ژن MHC-DRB 3 در بز سرخ جبال بارز. مجله تحقیقات تولیدات دامی، سال اول، شماره دوم.ص ۱

5- Arbanasic, H., A. Galov, K. Salajpal, I. Curik. 2009. Diversity of equine major Histocompatiblity complex class II DRA locus in Posavina and Croatian Coldblood horse:a new polymorphism detected. Italian. J. Anim. Sci. vol. 8, 77-79.

6- Chowdhary, B. 2013. Equine genomics. wiley-blackwell. 272-275.

7- Bowling, A.T., A. Ruvinsky. 2004. The Genetics of the Horse. CABI publishing.253.

8- Hedrick, P.W. 1999. Balancing selection and MHC. Genetica. 104 (3): 207-214.

9- Hedrick,P,W., K.M.Parker, E.L. Miller, P.S. .Miller. 1999. Major Histocompatibility Complex Variation in the Endangered Przewalski’s Horse. The Genetics Society of America.1701

10- Klein, J. 1987. Origin of major histocompatibility complex polymorphism, The trans-species hypothesis. Human immunology, 19, 155-162.

11- Luis, C., E.G. Cothran, M.M. Oom1, E. Bailey, 2005. Major histocompatibility complex locus DRA polymorphism in the endangered Sorraia horse and related breeds. J. Anim. Breed. Genet. 122: 69–72

12- Sharma, R,C., S.C. Mehta, R.S. Bansal, K. Pathak. 2009. PCR-RFLP profile of MHC-DRB 3 class II genes in Marwari horses. Indian Journal of Animal Sciences.1036.

13- Yeh, F.C, R.yang, T. Buybe.1999. POPGENE. Version1.32. Microsoft windows, freeware for population genetic analysis, Quiche user Guide, University of U. S. A. 234.

The study of MHC-DRB3 gene Exon region polymorphisms by PCR-RFLP in some breeds of horses in Iran

M. Tavakoli[1], A. Noshary*[1], B. Hemmati[1]

Received: 20/06/2018

Accepted: 07/07/2018

Abstract

The major histocompatibility complex (MHC) genes are very important in horse breeding according to relationship with immunity response and resistance or susceptibility to disease. The aim of this research is study of polymorphism possible in exon gene region and population genetics. To do this, 120 horses were selected randomly from Thoroughbred, Oldenburg, Caspian pony and Arab breeds. Genomic DNA was extracted via blood samples and polymerase chain reaction was done for a 309 bp MHC gene region. The PCR products were digested by RsaI restriction endonuclease for genotyping determination. Results show that there were three allele of A, B and C and six types of genotype of AA, AB, AC, BB, BC and CC with 0.3208, 0.3208 and 0.3584 allele frequency and 0.05, 0.25, 0.2917, 0.1333, 0.125 and 0.15 genotype frequency in all studied samples respectively. The most and least allele frequency in Thoroughbred, Oldenburg, Caspian pony and Arab are related to B, A, A, C and A, B, B, A alleles respectively. The Hardy-Weinberg equilibrium study by X2 and G2 tests shows the equilibrium situation in Oldenburg and Caspian pony breeds and non-equilibrium situation in Thoroughbred and Arab breeds. The overall results shows that the genetic diversity in studied samples can be used as a resource for horse breeding programs.

Keywords: genetic diversity, Thoroughbred, Oldenburg, Caspian pony, Arab, MHC

[1] Deprtment of Animal Science, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

* Corresponding author: (alireza.noshary@kiau.ac.ir)