نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۳ شماره ۴/ سال۱۳۹۲

اثر جایگاه ژنتیکی عامل نکروز تومور آلفا بر صفات بیومتری در گوسفندان ماکویی

پریسا بیابانی*[۱]، میثم بیابانی[۲]، علی هاشمی[۳]، کریم مردانی[۴] و محمد قادرزاده[۱]

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۸

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران

[۳] دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

[۴] دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

*مسئول مکاتبه Email: parisabiabani@yahoo.com

چکیده

عامل نکروز تومور آلفا (TNFα) یک سیتوکین پیش التهابی است که در تنظیم پاسخ ایمنی از جمله فعالیت ماکروفاژها و مرگ سلولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مطالعه حاضر، جهت ارزیابی چندشکلی ژن TNFα گوسفند ماکویی و ارتباط آن با صفات بیومتری انجام شد. DNA ژنومی از خون ۹۰ رأس گوسفند استخراج شد. یک قطعه ۲۷۳ جفت بازی از ناحیه اگزون ٤ و ناحیه غیر کد شونده ´۳ (3´ UTR)، توسط PCR استاندارد و با استفاده از آغازگرهای مخصوص این جایگاه ژنی، تکثیر شد. سپس بررسی چندشکلی فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) محصولات PCR توسط ژل پلی‌آکریلامید ۸ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام شد. در نهایت سه ژنوتیپ EE، OE و RE به ترتیب با فراوانی‌های ۰/٤٦٦٧، ۰/۳۵۵٦ و ۰/۱۷۷۷ مشاهده شدند. فراوانی آلل‌های E، O و R به ترتیب۰/۷۳۳۳، ۰/۱۷۷۸ و ۰/۰۸۸۹ محاسبه شد. آزمون مربع کای، انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی- واینبرگ را برای این جایگاه ژنی در جمعیت مورد مطالعه نشان داد (P< ۰/۰۵). ارزیابی ارتباط بین ژنوتیپ‌ها با طول بدن، دور سینه، ارتفاع از جدوگاه، ارتفاع از پشت و دور ران توسط رویه GLM نرم افزار SAS، ارتباط معنی‌داری را بین ژنوتیپ‌های TNFα با دور ران نشان دادند (P< ۰/۰۵). دام‌های دارای ژنوتیپ EE دور ران بالاتری (۰/٦ ± ۳۵/۷٦ سانتی‌متر) در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر داشتند. نتایج نشان می‌دهد که چندشکلی در ژن TNFα دارای این پتانسیل است که به عنوان نشانگر ژنتیکی برای بهبود صفات مرتبط با رشد در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند باشد. مطالعات بیشتری با نشانگرها و نژادهای مختلف جهت آشکار کردن ماهیت ژنتیکی تأثیرات ایمنی روی صفات رشد، مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، صفات بیومتری، گوسفند ماکویی، PCR-SSCP، TNFα

مقدمه

استان آذربایجان غربی زیستگاه چهار نژاد از گوسفندان ایرانی شامل نژاد ماکویی، نژاد قزل، نژاد هرکی و نژاد کردی می‌باشد. گوسفند ماکویی دارای رنگ بدن سفید با لکه‌های اختصاصی سیاه یا قهوه‌ای در صورت، پوزه، گوش، اطراف چشم و زانو می‌باشد و زیر شکم و زیر گردن پوشیده از پشم است. اکوتیپ ماکویی، گوسفندی با اندازه متوسط، قوچ آن شاخدار و میش بدون شاخ

است و دنبه‌ای پهن و نسبتاً کوتاه همراه با دنبالچه دارد (صفری ۱۳۷۱). صفات بیومتری یا اندازه‌گیری‌های بدنی برای تخمین وزن بدن در گوسفند استفاده می‌شوند (تاریک و همکاران ۲۰۱۲). این روش، به خصوص در مناطقی که شرایط محیطی و مدیریتی، اجازه اندازه‌گیری آسان وزن را در گوسفندان نمی‌دهد، می‌تواند مناسب باشد. وزن بدن، صفت اقتصادی مهمی در انتخاب حیوانات و از اهداف اصلی برنامه‌های اصلاح نژادی در کشور می‌باشد. این امر بویژه در نژادهای گوشتی حائز اهمیت است که در آنها سرعت رشد و تیپ بدن به عنوان شاخص‌های مهم انتخاب درنظر گرفته می‌شوند (مندل و همکاران ۲۰۰۸). ضرایب وراثت‌پذیری صفات طول بدن، دور سینه، ارتفاع از جدوگاه و ارتفاع از پشت در گوسفند ماکویی به ترتیب ۰/۱۱، ۰/۲۱، ۰/۱۷ و ۰/۱۷ گزارش شده است (عباسی و غفوری کسبی ۲۰۱۰). چنانچه روش‌های بهنژادی مناسبی برای بهبود این صفات بکار گرفته شود، عملکرد حیوانات و به خصوص نژادهای گوشتی بطور قابل توجهی افزایش می‌یابد. ترکیب اطلاعات فنوتیپی با روش‌های مولکولی در اصلاح نژاد، جهت شناسایی ژن‌های مؤثر بر صفات تولیدی، می‌تواند باعث افزایش صحت انتخاب و پیشرفت ژنتیکی حیوانات شود (ایسرائل و ولر ۲۰۰۲). ژن عامل نکروز تومور آلفا (TNFα[1])، پروتئینی تولید می‌کند که در ایجاد التهاب نقش دارد. این پروتئین، جزء سیتوکین‌هایی است که واکنش‌های مرحله حاد را فعال می‌کنند. TNFα دارای فعالیت‌های زیستی بسیاری از جمله تنظیم سلول‌های سیستم ایمنی، القاء مرگ سلولی، القاء التهاب و ممانعت از ایجاد تومور و تکثیر ویروس است (پنیکا و همکاران ۱۹۸٤ و لوکسلی و همکاران ۲۰۰۱). مشخص شده که TNFαمی‌تواند تعدادی از سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد و گیرنده‌های آنها را تحریک کند (اشمیگل و همکاران ۱۹۹۳). TNFα، اولین بار در سال ۱۹۷۵ توسط کارسول کشف شد (کارسول و همکاران ۱۹۷۵) و منبع اصلی آن، ماکروفاژهای فعال شده هستند (رولز و سجویک ۱۹۹۹). ژن کد کننده پروتئین TNFα دارای ٤ اگزون و ۳ اینترون است (دارلی و همکاران ۲۰۱۱). ژن TNFα گوسفند در ناحیه کلاس III در مکان ژنی مجموعه اصلی سازگاری بافتی (MHC[2]) روی کروموزوم ۲۰ قرار گرفته است (دوکیپاتی و همکاران ۲۰۰٦ ب). در چندین مطالعه ارتباط بین MHC و مقاومت یا حساسیت به بیماری در گوسفند نشان داده شده است (دوکیپاتی و همکاران ۲۰۰٦ الف). علاوه بر نقش اصلی MHC در سیستم ایمنی میزبان، ارتباط ژنوتیپ‌های MHC با صفات رشد و تولیدمثل نیز در گوسفند شناسایی شده است (گلدرمن و همکاران ۲۰۰٦). از آنجا که TNFα یکی از سیتوکین‌هایی است که همانند فاکتور رشد عمل می‌کند (ویلسک و پالومبلا ۱۹۹۲)، بنابراین ژن TNFα می‌تواند یکی از ژن‌های انتخابی جهت بررسی صفات مرتبط با رشد باشد. ارتباط چندشکلی ژن TNFα با صفات وابسته به رشد و افزایش وزن در خوک، موش، میمون و انسان نشان داده شده است (یوسا و همکاران ۱۹۹۷ و پیهلاجاماکی و همکاران ۲۰۰۳ و سیدلوسکی و همکاران ۲۰۱۱ و گری و همکاران ۲۰۱۱). بنابراین فرضیه پژوهش حاضر این است که چندشکلی ژن TNFα با صفات وابسته به رشد و بیومتری در گوسفند نیز مرتبط باشد. در گوسفند، تاکنون ارتباط چندشکلی ژن TNFα با صفات بیومتری بررسی نشده است ولی ارتباط چندشکلی ژن‌های دیگر با صفات بیومتری در گوسفندان ایرانی ثابت شده است (فیل کوش مقدم و همکاران ۱۳۹۰ و اسدی و همکاران ۱۳۹۱ و عزیزی و همکاران ۱۳۹۱).

در نژادهای مختلف گوسفند اطلاعات کمی در مورد چندشکلی ژن TNFα وجود دارد. ناش و همکاران (۱۹۹۱) نشان دادند که کپی واحدی از ژن TNFα در ژنوم گوسفند وجود دارد. در دهه ۱۹۹۰، ژن TNFα گوسفند توسط سه گروه مختلف تکثیر و توالی‌یابی شد. این توالی‌ها در دو مطالعه کاملاً مشابه بودند که در آنها

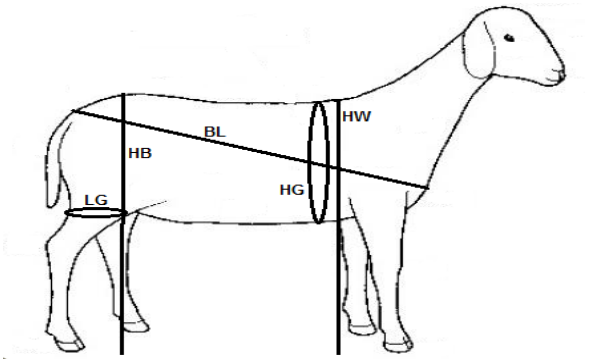
[1] Tumor Necrosis Factor alpha

[2] Major Histocompatibility Complex

ژن TNFα گوسفند، کد کننده یک توالی هدایتگر ۷۶ آمینواسیدی و یک پروتئین بالغ ۱۵۷ آمینواسیدی بود (گرین و سارگان ۱۹۹۱ و یانگ و همکاران ۱۹۹۰). توالی که در سومین مطالعه بدست آمد مشابه دو بررسی قبلی بود، به استثنای اینکه فاقد یک اسیدآمینه در توالی هدایتگر بود (ناش و همکاران ۱۹۹۱). در یک مطالعه، چندشکلی ژن TNFα گوسفندان نژادهای لاتخا[1] و راسا[2] با استفاده از روش PCR-SSCP[3] بررسی شد و سه جهش در ناحیه غیر کد شونده ۳□ (3' UTR[4]) این ژن گزارش شد. این جهش‌ها در یک حذف و یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) با هم اختلاف داشتند و هیچ تفاوتی در توالی آنها در دو نژاد پیدا نشد. این جهش‌ها با TNF*01 (حذف نوکلئوتید ٦٤)، TNF*02 (حذف نوکلئوتیدهای۲۰۲-۲۰۰) و TNF*03 (SNP در نوکلئوتید ۲٤۸) توصیف شده‌اند (الوارزبوستو و همکاران ۲۰۰٤). طبق مطالعات انجام شده، تکنیک PCR-SSCP برای شناسایی چندشکلی در گوسفندان بومی کشور نیز مناسب ارزیابی شده است. مهدوی ممقانی و همکاران (۱۳۸۸) چندشکلی ژن کالپاستین را در گوسفند قزل با روش PCR-SSCP بررسی کردند و ٤ ژنوتیپ شناسایی کردند. در پژوهشی دیگر بر روی گوسفند کرمانی، با مطالعه چندشکلی ژن لپتین با استفاده از تکنیک PCR-SSCP، ۱۰ الگوی ژنوتیپی مختلف آشکار شد (شجاعی و همکاران ۱۳۸۹). تا بحال، هیچ گزارشی مبنی بر وجود چندشکلی در ژن TNFα در بین گوسفندان ایران ارائه نشده است. لذا این تحقیق به منظور شناسایی چندشکلی نواحی اگزون ٤ و 3' UTR ژن TNFα با استفاده از روش PCR-SSCP در گوسفند ماکویی و ارتباط آن با صفات بیومتری انجام شد.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این تحقیق، از اطلاعات موجود در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند ماکویی واقع در شهرستان ماکو، جهت ارتباط چندشکلی‌های ژن TNFα با صفات بیومتری استفاده شد. صفات مورد استفاده شامل اندازه‌گیری‌های طول بدن (BL[5])، دور سینه (HG[6]) ، ارتفاع از جدوگاه (HW[7])، ارتفاع از پشت (HB[8]) و دور ران (LG[9]) بودند. اندازه‌گیری‌های بدنی در سن یک سالگی گوسفندان انجام شدند (شکل ۱).



شکل۱- نمایش محل‌های مورد اندازه‌گیری روی بدن دام.
BL= طول بدن، HG= دور سینه، HW= ارتفاع از جدوگاه، HB= ارتفاع از پشت و LG= دور ران

نمونه‌های خون از ۹۰ رأس گوسفند نژاد ماکویی، گرفته شدند. سپس این نمونه‌ها همراه یخ به آزمایشگاه ژنتیک گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. استخراج DNA از ۰/۲ میلی‌لیتر خون کامل با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی *(Fermentas, EU)* و مطابق دستورالعمل کیت صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید، ارزیابی شد. برای تکثیر یک قطعه ۲۷۳ جفت بازی شامل قسمتی از ناحیه اگزون ٤ و ناحیه 3□ UTR ژن TNFα با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)، از یک جفت آغازگر اختصاصی پیشنهاد شده توسط

[1] Latxa
[2] Rasa
[3] Polymerase Chain Reaction- Single Strand Conformation Polymorphism
[4] Untranslated Region
[5] Body Length
[6] Heart Girth
[7] Height at Withers
[8] Height at Back
[9] Leg Girth

الوارزبوستو و همکاران (۲۰۰٤) استفاده شد که توالی آغازگرها به صورت زیر بود:

5′-CTGCCGGAATACCTGGACTA-3′ :ovTNF-C1
5′ -TCCAGTCCTTGGTGATGGTT-3′ :ovTNF-C2

این آغازگرها طبق دستورالعمل کارخانه سازنده با آب دو بار تقطیر رقیق شدند. لازم به ذکر است که صحت توالی آغازگرهای مورد استفاده، با استفاده از نرم افزار *Amplifx* مورد تأیید قرار گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۰/۲ میلی‌مولار *dNTP*، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۱۰ میکرومولار از هر یک از آغازگر-ها، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلی‌مراز و حدود ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی انجام شد. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله واسرشته سازی اولیه در ۹٤°C به مدت ٥ دقیقه و سپس مرحله اصلی تکثیر به تعداد ۳٥ چرخه (واسرشته سازی در ۹٤°C به مدت ٤٥ ثانیه، اتصال آغازگرها در ٥٦°C به مدت ٤٥ ثانیه و تکثیر در ۷۲°C به مدت ٤٥ ثانیه) و تکثیر نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Master cycler *(اپندروف- آلمان)* انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز دو درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند. قطعه تکثیر شده با استفاده از دستگاه ترانس‌لومیناتور عکسبرداری شد. برای تشخیص اندازه قطعات تکثیر شده از نشانگر ۱۰۰ جفت بازی *(سیناژن- ایران)* استفاده شد. برای تجزیه محصولات PCR به روش SSCP، ابتدا محصولات PCR، تک رشته‌ای شدند. برای این منظور، ۲ میکرولیتر از محصول PCR با ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP (شامل فرمامید ۹٥ درصد، *EDTA* (pH=8) ۰/۰۲ مولار، بروموفنل‌بلو ۰/۰٥درصد و گزیلن سیانول ۰/۰٥درصد) مخلوط شد و به مدت ٥ دقیقه با دمای ۹٥ درجه سانتی-گراد حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها به سرعت روی یخ منتقل شدند تا از به هم چسبیدن دوباره رشته‌های مکمل ممانعت به عمل آید (پیپالیا و همکاران ۲۰۰٤). برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از دستگاه الکتروفورز عمودی به ابعاد ۰/۱×۱۸×۲۰ سانتی‌متر و از ژل آکریلامید غیرواسرشته‌ساز ۸ درصد استفاده شد (هرینگ و همکاران ۱۹۸۲). نمونه‌ها در ژل آکریلامید با ولتاژ ۲۰۰ ولت و مدت ۳ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد و با بافر TBE (0.5 X) جهت مشاهده تفاوت موجود در نمونه‌ها الکتروفورز شدند. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد (هرینگ و همکاران ۱۹۸۲). برای برآورد فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، شاخص هتروزیگوسیتی، تعداد آلل‌های مؤثر و آزمون مربع کای از نرم افزار PopGene32 نسخه ۱/۳۱ استفاده شد (یه و همکاران ۱۹۹۹). تعداد آلل‌های مؤثر بر اساس رابطه کیمورا و کراو (کیمورا و کراو ۱۹۷۹) و شاخص هتروزیگوسیتی بر اساس رابطه تنوع ژنی نئی (نئی ۱۹۷۳) برآورد گردید. شاخص اطلاعاتی شانون بر اساس منبع (لونتین و هابی ۱۹٦٦) بدست آمدند. برای ارزیابی اثر ژنوتیپ‌های ژن TNFα بر صفات رشد از مدل آماری زیر استفاده شد:

$$y_{ijkl} = \mu + g_i + s_j + a_k + e_{ijkl}$$

y_{ijkl}: فنوتیپ مشاهده شده مربوط به l امین حیوان، k امین سن رکوردگیری (٥ و ٤، ۳، ۲، ۱= k)، j امین جنس (۲ و ۱=j) و i امین ژنوتیپ (۳ و ۲، ۱=i)، μ: میانگین فنوتیپی صفت مورد مطالعه در جمعیت مورد نظر، g_i: اثر ثابت i امین ژنوتیپ، s_j: اثر ثابت j امین جنس، a_k: اثر k امین سن رکوردگیری، e_{ijkl}: اثرات باقیمانده (خطای آزمایش).

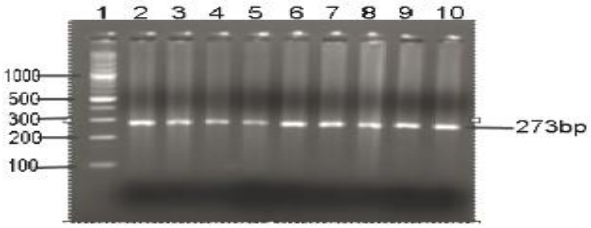
نرمال‌سازی توزیع باقیمانده‌های مربوط به هر صفت در جمعیت مورد بررسی با روش *Boxcox* که در این روش با کمک نرم‌افزار SAS 9.1 (۲۰۰٤) و رویه *Transreg* ابتدا یک مقدار به نام لامبدا (λ=۰/٤) بدست آورده شد، سپس با کمک فرمول زیر داده‌ها نرمال گردید که در آن X(n) داده نرمال شده، X داده غیر نرمال و λ مقدار لامبدا است که معمولاً از ٥- تا ٥+ است و می‌توان این دامنه را تغییر داد.

$$X(n)=(x^{\lambda} -1) /\lambda$$

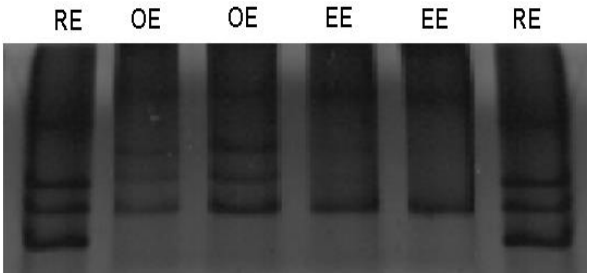
صفات مورد بررسی، توسط رویه GLM نرم افزار SAS 9.1 مورد آنالیز قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتیجه الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد، صحت قطعه ۲۷۳ جفت بازی تکثیر شده از ژن TNFα گوسفند ماکویی را توسط نشانگر ۱۰۰ جفت بازی *(سیناژن- ایران)* تأیید کرد (شکل۲).



شکل۲- محصولات PCR بارگذاری شده بر روی ژل آگارز دو درصد. چاهک ۱ نشانگر مولکولی bp ۱۰۰ (سیناژن، ایران)، چاهک‌های ۱۰-۲ محصولات PCR (قطعه ۲۷۳ جفت بازی) ژن TNFα



شکل۳- الگو های مختلف SSCP مشاهده شده ژن TNFα در گوسفندان ماکویی بر روی ژل آکریلامید ۸ درصد.

تجزیه و تحلیل نوارهای حاصل از الکتروفورز با ژل آکریلامید غیرواسرشته ساز ۸ درصد و رنگ آمیزی با نیترات نقره با استفاده از روش SSCP، منجر به شناسایی سه الگوی باندی متفاوت در جمعیت مورد مطالعه شد (شکل۳).

ملاک تشخیص و نحوه نامگذاری و تعیین ژنوتیپ‌ها با استفاده از نتایج مطالعه الوارزبوستو و همکاران (۲۰۰٤) انجام شد. در این تحقیق، با استفاده از الکتروفورز محصولات PCR تک‌رشته‌ای شده بر اساس روش SSCP، ۳ ژنوتیپ و ۳ آلل شناسایی شدند. فراوانی ژنوتیپ‌های EE، OE و RE به ترتیب ۰/٤٦٦٧، ۰/۳۵۵٦ و ۰/۱۷۷۷ و فراوانی آلل‌های E، O و R به ترتیب ۰/۷۳۳۳، ۰/۱۷۷۸ و ۰/۰۸۸۹ محاسبه شد (جدول۱). نتایج بدست آمده نشان داد که آلل E و ژنوتیپ EE به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۷۳۳۳ و ۰/٤٦٦٧ دارای بیشترین فراوانی بودند. به منظور بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در جایگاه مورد مطالعه در جمعیت گوسفند ماکویی از آزمون مربع کای استفاده شد. تفاوت بین فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار برای بررسی تعادل هاردی- واینبرگ با استفاده از آزمون مربع کای (χ^2=۱۱/٦۱) در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود که نشان می‌دهد جمعیت در تعادل هاردی- واینبرگ نیست (جدول۱) که مخالف نتیجه الوارزبوستو و همکاران (۲۰۰٤) بود. عدم تعادل مشاهده شده در گله گوسفند ماکویی می‌تواند به دلیل بزرگ نبودن نمونه مورد بررسی و وجود عوامل برهم زننده تعادل، نظیر جهش و انتخاب به دلیل اجرای برنامه‌های اصلاحی در جمعیت مورد بررسی باشد.

جدول ۱- فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی و آزمون مربع‌کای مشاهده شده جهت بررسی تعادل هاردی- واینبرگ، برای ژن TNFαدر گوسفندان ماکویی. خطای استاندارد فراوانی‌ها: ۰/۰۲۸

مربع کای	فراوانی آللها			فراوانی ژنوتیپ‌ها		
	R	O	E	RE	OE	EE
۱۱/٦۱*	۰/۰۸۸۹	۰/۱۷۷۸	۰/۷۳۳۳	۰/۱۷۷۷	۰/۳۵۵٦	۰/٤٦٦٧

* : معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد.

یکی از خصوصیات نشانگر مولکولی، تعداد آلل مؤثر است. در گوسفند ماکویی در جایگاه مورد مطالعه از ژن TNFα، تعداد آلل واقعی (Na) برابر ۳ و تعداد آلل مؤثر (Ne) برابر ۱/۷۳ محاسبه شد که نزدیکی مقادیر این دو عدد به همدیگر می‌تواند نشان دهنده کارایی خوب آلل‌ها در ایجاد چندشکلی و تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا باشد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار در این تحقیق ۰/۴۲۵۱ محاسبه شد (جدول ۲) که پایین‌تر از نتایج گزارش شده توسط آلوارز و همکاران (۲۰۰۴) بود. این مقدار در مطالعه آنها برای گوسفندان لاتخا و راسا به ترتیب ۰/۴۸۰ و ۰/۵۱۹ بود. شاخص نئی، متوسط هتروزیگوسیتی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و شاخص شانون به ترتیب برابر ۰/۴۲۲۷، ۰/۴۲۲۷، ۰/۵۳۳۳ و ۰/۷۴۹۷ برآورد شد که حاکی از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالای ژن TNFα در این جمعیت می‌باشد. توجه به این نکته ضروری است که در صورت کاهش تنوع ژنتیکی، قدرت انتخاب‌های ژنتیکی کاهش می‌یابد (بارکر و همکاران ۱۹۹۴).

جدول ۲- پارامترهای تنوع ژنتیکی ژن TNFα در گوسفندان ماکویی

هموزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هموزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی نئی	متوسط هتروزیگوسیتی	شاخص شانون
۰/۴۶۶۷	۰/۵۳۳۳	۰/۵۷۴۹	۰/۴۲۵۱	۰/۴۲۲۷	۰/۴۲۲۷	۰/۷۴۹۷

الوارزبوستو و همکاران (۲۰۰۴) سه جهش در ناحیه اگزون ٤ و 3□ UTR ژن TNFα در گوسفندان نژادهای لاتخا و راسا گزارش کردند که منجر به شناسایی ٥ نوع ژنوتیپ OO، RR، OR، OE و RE و ۳ آلل O، R و E برای این ناحیه شد. نتایجی که از مطالعه حاضر به دست آمد تقریباً مشابه نتایجی بود که الوارزبوستو و همکاران (۲۰۰٤) ارائه داده بودند به طوریکه در این مطالعه نیز ۳ آلل O، R و E شناسایی شد ولی ۳ ژنوتیپ بدست آمد که دو ژنوتیپ RE و OE مشابه نتایج آنها ولی ژنوتیپ EE متفاوت از نتایج آنها بود. این تفاوت در نوع و تعداد ژنوتیپ‌ها ممکن است اولاً مربوط به تفاوت در پتانسیل ژنتیکی نژادهای مورد مطالعه باشد و ثانیاً مربوط به کوچک بودن تعداد نمونه گرفته‌شده از جمعیت ماکویی در مطالعه حاضر باشد. البته از آنجایی که هیچ گونه تحقیقی غیر از مطالعه الوارزبوستو و همکاران (۲۰۰٤) در گوسفند به شکل فوق گزارش نشده است، نمی‌توان مقایسات کافی در این مورد انجام داد و نظر قطعی صادر کرد. تلاش‌های دیگر در گوسفند با استفاده از روش‌های دیگر مانند روش PCR-RFLP در تحقیق انجوردا و همکاران (۱۹۹٦) و روش dHPLC در مطالعه دارلی و همکاران (۲۰۱۱) برای شناسایی چندشکلی در ژن TNFα ناموفق بوده است، ولی همان‌طور که نتایج مطالعه حاضر و مطالعه الوارزبوستو و همکاران (۲۰۰٤) نشان داد، روش PCR-SSCP می‌تواند برای شناسایی چندشکلی ژن TNFα در گوسفند مناسب باشد. روش PCR-SSCP، همچنین جهت شناسایی چندشکلی در مطالعات دیگر روی گوسفند ماکویی و سایر گوسفندان بومی کشور نیز مفید گزارش شده است. فیل کوش مقدم و همکاران (۱۳۹۰) چندشکلی ژن POU1F1 را در گوسفند ماکویی با روش PCR-SSCP بررسی کردند و ٤ ژنوتیپ مختلف (AA، AB، CC و CD) بدست آوردند. اسدی و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی چندشکلی ژن هورمون رشد با روشPCR-SSCP در گوسفند کرمانی موفق شدند ۳ ژنوتیپ، مشابه پژوهش حاضر بدست آورند. عزیزی و همکاران (۱۳۹۱) در پژوهشی با بررسی چندشکلی ژن لپتین به روش PCR-SSCP موفق به شناسایی ٦ الگوی ژنوتیپی مختلف در گوسفند لری-بختیاری و ۳ الگوی ژنوتیپی، مشابه مطالعه حاضر، در

گوسفند زل شدند. بنابراین می‌توان روش PCR-SSCP را به عنوان یکی از تکنیک‌های مناسب و کم هزینه در شناسایی چندشکلی ژنوتیپی در گوسفندان بومی کشور توصیه نمود.

تجزیه و تحلیل داده‌های فنوتیپی نشان داد که ژنوتیپ-های حاصل از ژن TNFα تأثیر معنی‌داری روی صفات طول بدن، دور سینه، ارتفاع از جدوگاه و ارتفاع از پشت نداشت، اما روی صفت دور ران اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد داشت (جدول ۳). با توجه به نقش اصلی این جایگاه ژنی بر سیستم ایمنی، اثر معنی‌دار مشاهده شده در تحقیق حاضر، ممکن است به علت تفاوت در مقاومت به بیماری بین حامل‌های ژنوتیپ‌های مختلف TNFα باشد که می‌تواند بر عملکرد رشد افراد مؤثر باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های مختلف ژن TNFα برای صفات بیومتری (میانگین ± خطای معیار) در گوسفند ماکویی

صفت (سانتی‌متر)	ژنوتیپ		
	EE	OE	RE
طول بدن	۵۶/۱۲ ± ۱/۱[a]	۵۶/۳۷ ± ۱/۸[a]	۵۵/۴۵ ± ۱/۱[a]
دور سینه	۸۴/۲۹ ± ۰/۹[a]	۸۴/۰۵ ± ۱/۱[a]	۸۳/۱ ± ۲/۰۱[a]
ارتفاع از جدوگاه	۶۶/۱ ± ۲/۱[a]	۶۵/۱ ± ۱/۶[a]	۶۵/۸ ± ۱/۷[a]
ارتفاع از پشت	۶۸/۱۲ ± ۱/۱[a]	۶۹/۹ ± ۰/۹[a]	۶۸ ± ۱/۴[a]
دور ران	۳۵/۷۶ ± ۰/۶[a]	۳۴/۷۸ ± ۰/۵[ab]	۳۳/۱۸ ± ۱/۲[bc]

در هر ردیف هر دو میانگین با حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ژنوتیپ EE اختلاف معنی‌داری با ژنوتیپ OE نداشته اما با ژنوتیپ RE اختلاف معنی‌دار دارد طوریکه ژنوتیپ EE بالاترین میانگین (۳۵/۷۶) و ژنوتیپ RE پایین‌ترین میانگین (۳۳/۱۸) را در صفت دور ران در بین ژنوتیپ‌های دیگر داشت. با توجه به عملکرد بالای ژنوتیپ EE در این صفت نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها، به‌نظر می‌رسد ژنوتیپ EE می‌تواند در بهبود این صفت در گوسفند مؤثر باشد. چندشکلی‌های ژن TNFα و ارتباط آنها با صفات مرتبط با رشد و چاقی یا افزایش وزن در سایر حیوانات نیز بررسی شده است. در یک مطالعه، اثر تنوع ژنوتیپی ژن TNFα بر صفات چاقی از جمله افزایش وزن روزانه، میزان تولید گوشت بدون چربی و ضریب تبدیل غذایی در نژادهای مختلف خوک بررسی شد و ارتباط معنی-داری بین صفات چاقی و SNP در ناحیه پروموتور ژن TNFα (g.6464 C>T) بدست آمد (سیدلوسکی و همکاران ۲۰۱۱). گری و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که ۸ SNP (-809G, -756A, -352C, -322A, +1285T, +2133T, +2362A, +2405) در ژن TNFα، ارتباط معنی‌داری با صفات وابسته به چاقی از جمله شاخص توده بدنی (BMI)، دور کمر و کلسترول پلاسما در سطح احتمال ۵ درصد در میمون‌های *Vervet* دارند. در انسان نیز چندین مطالعه، ارتباط افزایش وزن را با یک نوع SNP در ناحیه پروموتور ژن TNFα (G-308A) بررسی کردند و تفاوت معنی‌داری را بین این SNP با افزایش وزن نشان دادند (هرمان و همکاران ۱۹۹۸ و برند و همکاران ۲۰۰۱ و دالزیل و همکاران ۲۰۰۲ و پیهلاجاماکی و همکاران ۲۰۰۳). نتایج تحقیق حاضر بر روی گوسفند ماکویی تا حدودی مشابه با تحقیقات قبلی بوده بطوریکه در تحقیق حاضر نیز اثر چندشکلی ژن TNFα روی صفات مربوط به رشد و بیومتری معنی‌دار بود. اثر چندشکلی این ژن روی صفاتی از قبیل طول بدن، دور سینه، ارتفاع از جدوگاه، ارتفاع از پشت و دور ران در

مطالعات قبلی بررسی نشده است با این حال ارتباط چندشکلی ژن‌های دیگر با این صفات در گوسفندان ایرانی ثابت شده است. فیل کوش مقدم و همکاران (۱۳۹۰) مشاهده کردند که ژنوتیپ‌های ژن POU1F1، ارتباط معنی‌داری با صفات ارتفاع از جدوگاه و ارتفاع از پشت در گوسفندان ماکویی دارند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت ندارد. عزیزی و همکاران (۱۳۹۱) دریافتند که ژنوتیپ‌های ژن لپتین، ارتباط معنی‌داری با طول بدن و دور سینه در گوسفندان زل دارند که در تطابق با نتایج پژوهش حاضر نبود. اسدی و همکاران (۱۳۹۱) مشاهده کردند که ژنوتیپ‌های ژن هورمون رشد در گوسفند نژاد کرمانی با طول بدن رابطه معنی‌داری دارند که نتایج این پژوهش نیز مخالف با مطالعه حاضر بود. البته از آنجا که این پژوهش‌ها روی جایگاه‌های ژنتیکی متفاوت با نوع و میزان جهشی متفاوت با مطالعه حاضر انجام شده است، عدم تطابق نتایج این پژوهش‌ها با نتایج مطالعه حاضر منطقی به نظر می‌رسد. چندشکلی ژن TNFα و ارتباط آن با برخی بیماری‌ها بر روی گاو نیز بررسی شده است. در مطالعه‌ای یودین و همکاران (۲۰۰۶) چندشکلی ژن TNFα را در گاو بررسی کردند و ۲ آلل (A و G) و ۳ ژنوتیپ بدست آوردند که آلل A با بیماری لوکوز ارتباط معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد داشت. خو و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی چندشکلی ژن TNFα در گاوهای هلشتاین چینی، ۲ آلل (A و B) و ۳ ژنوتیپ مختلف شناسایی کردند که این ژنوتیپ‌ها ارتباط معنی‌داری با بیماری ورم پستان داشتند. در پژوهشی دیگر بر روی گاوهای هلشتاین، با مطالعه چندشکلی ژن TNFα، ۲ آلل (C و T) و ۳ ژنوتیپ آشکار شد و مشخص شد که ژنوتیپ CC با وقوع اولین تخمک گذاری پس از زایمان ارتباط معنی‌داری دارد (شیراسونا و همکاران ۲۰۱۱).

در مجموع، انجام مطالعاتی از این دست با تعداد نمونه-های بیشتر می‌تواند به یک نتیجه‌گیری قاطع و قابل اتکایی در زمینه ارتباط چندشکلی‌های ژن TNFα و صفات مرتبط با رشد و بیومتری منجر شود و در کنار عاملهای رشد دیگر به معرفی یک نشانگر ژنتیکی جدید مؤثر بر صفات رشد کمک نماید.

منابع مورد استفاده

اسدی ا، مرادی شهر بابک ح، صادقی م، عزیزی پ و عباسی س، ۱۳۹۱. مطالعه چندشکلی اگزون چهار ژن هورمون رشد (E4-GH) و ارتباط آن با صفات بیومتری و فراسنجه‌های خونی در گوسفند نژاد کرمانی با روش PCR-SSCP. صفحه‌های ٤٥٨ تا ٤٦٣. پنجمین کنگره علوم دامی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

شجاعی م، محمد آبادی م ر، اسدی فوزی م، اسمعیلی‌زاده کشکوئیه ع، فردوسی م ح، ترابی ا، طیارزاده م و میرزاخانی ح، ۱۳۸۹. چگونگی استفاده از روشPCR-SSCP برای بررسی چندشکلی ژن لپتین گوسفند کرمانی. مجله پژوهش‌های علوم دامی، جلد بیستم، شماره دوم. صفحه‌های ۱۱۵ تا ۱۲۲.

صفری الف، ۱۳۷۱. گزارش شناسایی گوسفند اکوتیپ ماکویی. اداره دامپروری، جهاد سازندگی استان آذربایجان‌غربی.

عزیزی پ، مرادی شهر بابک م، مرادی شهر بابک ح و طالبی م ع، ۱۳۹۱. مطالعه چندشکلی‌های اگزون سه ژن لپتین و ارتباط آنها با ویژگی‌های بیومتری و فراسنجه‌های خونی در گوسفند دنبه‌دار (لری- بختیاری) و بی‌دنبه (زل) ایرانی با روش PCR-SSCP . صفحه‌های ٤٠٧ تا ٤١٢. پنجمین کنگره علوم دامی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

فیل کوش مقدم ف، پیرانی ن، شجاع ج، الیاسی ق، تقی‌زاده ا و حاجی حسینلو ع، ۱۳۹۰. بررسی چندشکلی ژن POU1F1 و ارتباط آن با صفات بیومتریک در گوسفندان ماکویی به روش PCR-SSCP. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، جلد سوم، شماره دوم. صفحه‌های ٥٩ تا ٦٩.

مهدوی ممقانی آ، شجاع ج، پیرانی ن و الیاسی ق، ۱۳۸۸. مقایسه چندشکلی ژن کالپاستین به روش PCR-SSCP در گوسفندان قزل و گاوهای سرابی. مجله پژوهش‌های علوم دامی، جلد نوزدهم، شماره اول. صفحه‌های ۱ تا ۸.

Abbasi MA and Ghafouri-Kesbi F, 2011. Genetic co (variance) components for body weight and body measurements in Makooei sheep. Asian-Aust J Anim Sci 24: 739-743.

Alvarez-Busto J, Ruiz-Nunez A, Mazon LI and Jugo BM, 2004. Detection of polymorphisms in tumour necrosis factor alpha candidate gene in sheep. Eur J Immunogenetic 31: 155-158.

Barker JSF, 1994. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. Proceeding of the 5the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. University of Guelph, Guelph Canada 21: 501-508.

Brand E, Schorr U, Kunz I, Kertmen E, Ringel J, Distler A and Sharma AM, 2001. Tumor Necrosis Factor-308 G/A polymorphism in obese Caucasians. Int J Obes Relat Metab Disord 25: 581-585.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N and Williamson B, 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. . Proc Natl Acad Sci USA 72: 3666-3670.

Dalziel B, Gosby AK, Richman RM, Bryson JM and Caterson ID, 2002. Association of the TNF-α -308 G/A promoter polymorphism with insulin resistance in obesity. Obes Res 10: 401-407.

Darlay RJ, McCarthy AJ, Illot NE, Smith JE and Shaw MA, 2011. Novel polymorphisms in ovine immune response genes and their association with abortion. Anim Genet 42: 535-543.

Dukkipati VSR, Blair HT, Garrick DJ and Murray A, 2006a. 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: Role in genetic resistance to diseases. N Z Vet J 54: 153- 160.

Dukkipati VSR, Blair HT, Garrick DJ and Murray A, 2006b. 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: Structure and gene polymorphisms. Genet Mol Res 5: 581-608.

Engwerda CR, Dale CJ and Sandeman RM, 1996. IgE, TNFα, IL1β, IL4 and IFNγ gene polymorphisms in sheep selected for resistance to fleece rot and flystrike. Int J Parasitol 26: 787-791.

Geldermann H, Mir MR, Kuss AW and Bartenschlager H, 2006. OLA-DRB1 microsatellite variants are associated with ovine growth and reproduction traits. Genet Sel Evol 38: 431–444.

Gray SB, Langefeld CD, Ziegler JT, Hawkins GA, Wagner JD and Howard TD, 2011. Single-nucleotide polymorphisms in the TNF gene are associated with obesity-related phenotypes in Vervet monkeys. Obesity 19: 1427–1432.

Green IR and Sargan DR, 1991. Sequence of the cDNA encoding ovine tumor necrosis factor-alpha: problems with cloning by inverse PCR. Gene 19: 203-210.

Hermann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O and Cambien F, 1998. Polymorphisms of the Tumor Necrosis Factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. Eur J Clin Invest 28: 59-66.

Herring AJ, Inglis NF, Ojeh C, Snodgrass DR and Menzies JD, 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. J Clin Microbiol 16: 473-477.

Israel C and Weller JI, 2002. Estimation of quantitative trait loci effects in dairy cattle populations. J Dairy Sci 85:1285–1297.

Kimura M and Crow J, 1979. The number of alleles that can be maintained in a finite Population. Genetics 49: 725-738.

Lewontin RC and Hubby JL, 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations of Drosophila pseudoobscura. Genetics 54: 595-609.

Locksley RM, Killeen N and Lenardo MJ, 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell 104: 487–501.

Mandal A, Roy R and Rout PK, 2008. Direct and maternal effects for body measurements at birth and weaning in Muzaffarnagari sheep of India. Small Rum Res 75: 123-127.

Nash AD, Barcham GJ, Brandon MR and Andrews AE, 1991. Molecular cloning, expression and characterization of ovine TNFα. Immunol Cell Biol 69: 273-283.

Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA 70: 3321-3323.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohe WJ, Aggarwal BB and Goeddel DV, 1984. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature 312: 724–729.

Pihlajamaki J, Ylinen M, Karhapaa P, Vauhkonen I and Laakso M, 2003. The effect of the -308A allele of the TNF-α gene on insulin action is dependent on obesity. Obes Res 11: 912 – 917.

Pipalia DL, Joshi CG, Brahmkshtri BP and Sonlanki JV, 2004. PCR-SSCP typing of MHC in cattle and buffaloes. Indian J Anim Sci 74: 637-639.

Ruuls SR and Sedgwick JD, 1999. Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models. Indian J Anim Sci 65: 294-301.

SAS Institute Inc, 2004. SAS/STAT User's Guide, Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Schmiegel W, Roeder C, Schmielau J and Rodeck U, 1993. Tumor necrosis factor induces the expression of transforming growth factor α and the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 90: 863-867.

Shirasuna K, Kawashima C, Murayama C, Aoki Y, Masuda Y and Kida K, 2011. Relationships between the first ovulation postpartum and polymorphism in genes relating to function of immunity, metabolism and reproduction in high-producing dairy cows. J Reprod Develop 57: 135-142.

Szydlowski M, Buszka A, Mackowski M, Lechniak D and Switonski M, 2011. Polymorphism of genes encoding cytokines IL6 and TNF is associated with pig fatness. Livest Sci 136: 150–156.

Tariq MM, Eyduran E, Bajwa MA, Waheed A Iqbal F and Javed Y, 2012. Prediction of body weight from testicular and morphological characteristics in indigenous mengali sheep of Pakistan using factor analysis scores in multiple linear regression analysis. Int J Agr Biol 14: 590- 594.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW and Hotamisligil GS, 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-a function. Nature 389: 610-614.

Vilcek J and Palombella VJ, 1992. TNF as a growth factor. In: Aggarwal BB and Vileck J (eds). Tumor necrosis factors: structure function and mechanism of action. Dekker, New York, 269-287.

Xu AJ, Liu XL, Guo JZ and Xia Z, 2010. Polymorphism of bovine TNF-a gene and its association with mastitis in Chinese Holstein cows. Hereditas 32: 929-934.

Yeh FC, Boyle T and Yang R, 1999. POPGENE version 1.31. Microsoft window based freeware for population genetic analysis. University of Alberta. Canada.

Young AJ, Hay JB and Chan JY, 1990. Primary structure of ovine tumor necrosis factor alpha cDNA. Nucleic Acids Res 18: 6723.

Yudin NS, Vasil'eva LA, Kobzev VF, Kuznetsova TN, Ignatieva EV and Oshchepkov DY, 2006. Association study of SNP of the TNF-alpha gene with bovine leukosis and evaluation of its functional significance. Proc 5th Int conf on BGRS, Novosibirsky, Russia 3:245-248.

Effect of tumor necrosis factor alpha locus on biometric traits of Makoei sheep

P Biabani[1*], M Biyabani[2], A Hashemi[3], K Mardani[4] and M Ghaderzadeh[1]

Received: November 28, 2012 Accepted: September 09, 2013
[1]MSc Graduated Students, Department of Animal Sciences, University of Urmia, Urmia, Iran
[2]MSc Student, Faculty of Physical Education and Sports Science, University of Tehran, Tehran, Iran
[3]Associate Professor, Department of Animal Sciences, University of Urmia, Urmia, Iran
[4]Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, University of Urmia, Urmia, Iran
[*]Corresponding author: Email: parisabiabani@yahoo.com

Abstract
Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFα) is a proinflammatory cytokine that plays critical roles in the regulation of immune responses including macrophages activity and apoptosis. In the present study, polymorphism of TNFα gene in Makoei sheep was investigated and its association with biometric traits was analyzed. Genomic DNA of 90 sheep was extracted from blood. A 273bp fragment in the regions of the exon 4 and 3´ un-translated region (3´ UTR) was amplified by standard PCR, using locus-specific primer. The single stranded conformation polymorphism (SSCP) of PCR products were studied using 8% Polyacrilamid gel and silver staining method. Finally, three genotypes EE, OE and RE were obtained with frequencies of 0.4667, 0.3556 and 0.1777, respectively. The frequencies of E, O and R alleles were calculated as 0.7333, 0.1778 and 0.0889, respectively. The chi-square test showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for this locus in studied population ($P<0.05$). The evaluation of association between genotypes with body length, heart girth, height at withers, height at back and leg girth using a GLM procedure of SAS program, showed a significant association between TNFα genotypes with leg girth ($P<0.05$). The genotype of EE had a superior leg girth (35.76±0.6 cm) than the other genotypes. These results suggest that polymorphism at TNFα gene may be as a potential genetic marker to improve growth related traits in sheep breeding programs. Further studies with various markers and breeds will be needed in order to clarify the genetic background for immunological influences on growth traits.

Keywords: Biometric traits, Makoei sheep, PCR-SSCP, Polymorphism, TNFα