مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی ارتباط بین چند شکلیهای موجود در چهار ژن کاندیدا با صفات تولید شیر و عملکرد تولید مثلی گاوهای سرابی با استفاده از نشانگر PCR-RFLP

آرش جوانمرد[1]، محمد حسین مرادی*[2]، مریم صفدری شاهرودی[3]

[1] استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

[2] استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشگاه اراک، اراک، ایران

[3] دانشجوی دکتری پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: 1391/07/16، تاریخ پذیرش: 1392/01/20

چکیده

انتخاب برای بهبود صفات تولید و تولید مثل در دام‌ها، امری زمان‌بر بوده و فقط در سنین بلوغ دام‌ها امکان‌پذیر است. گاو سرابی یکی از نژادهای بومی شیری در ایران است که به طور عمده در شمالغرب کشور پرورش می‌یابد. شناسایی ژن‌های کاندیدای مؤثر بر صفات تولید شیر و عملکرد تولید مثلی در این نژاد دارای اهمیت بوده و می‌تواند بازده برنامه‌های اصلاح نژادی را بهبود دهد. هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط بین چندشکلی موجود در چهار ژن کاندیدا (لپتین، هورمون رشد (GH)، گیرنده‌ی هورمون رشد (GHR) و ژن Pit-1) با صفات تولید شیر و برخی صفات تولید مثلی گاو سرابی با استفاده از نشانگر PCR-RFLP بود. نتایج نشان داد که بیشترین فراوانی‌های آللی برای هر یک از ژن‌های لپتین، GH، GHR و Pit-1 به ترتیب برای آلل‌های A (0/72)، V (0/51)، + (0/65) و B (0/55) بود. ژنوتیپ‌های LL، -/-، AB-BB مربوط به ژن‌های GH، GHR و Pit-1 نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها به طور معنی‌داری تولید شیر بیشتری داشتند ($p< 0.01$). همچنین ژنوتیپ‌های LL و AB شناسایی شده در ژن‌های GH و Pit-1 نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها روزهای باز کمتری را نشان دادند ($p< 0.01$). در مطالعه حاضر هیچ رابطه معنی‌داری بین ژنوتیپ این ژن‌ها و سایر صفات بررسی شده مشاهده نشد. در ژنهای کاندید مذکور مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به مقادیر مورد انتظار کمتر بودند و نتایج تجزیه و تحلیل کای‌مربع نشان دهنده‌ی عدم وجود تعادل هاردی- واینبرگ در این جایگاه‌ها بود. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان‌دهنده وجود ارتباط بین جهش‌های موجود شناسائی شده در برخی از این ژن‌ها با صفات تولید شیر و روزهای باز در گاوهای سرابی است و امکان استفاده از این اطلاعات در برنامه‌ی انتخاب به کمک نشانگرها باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ژن‌های کاندیدا، صفات تولید و تولید مثل، گاو سرابی، نشانگر PCR-RFLP.

* نویسنده مسئول: محمدحسین مرادی تلفن: 09183659133 Email: Moradi.hosein@gmail.com

مقدمه

همراه با پیشرفت‌های ژنتیکی حاصل در زمینه بهبود صفات تولید شیر، عملکرد تولید مثلی گاوهای پر تولید کاهش یافته است (Van Raden, 2004). مطالعات مختلف در زمینه بررسی رابطه بین صفات مذکور نشان داده است که صفات تولید شیر دارای همبستگی منفی با صفات تولید مثل می‌باشند (Caraviello *et al.*, 2006). به عنوان مثال، زمانی‌که تولید شیر شروع به افزایش می‌کند، بازدهی نرخ آبستنی کاهش می یابد. بنابراین در برنامه‌های مدرن اصلاحی برای گاوهای شیرده، راهکارهایی که قادر به بهبود نرخ آبستنی بوده و بطور همزمان باعث حفظ سطح بالای تولید شیر شود، حائز اهمیت است (Pryce *et al.*, 2010).

انتخاب ژنتیکی دام‌ها به منظور بهبود عملکرد تولید و تولید مثل یک فرآیند زمان‌بر بوده و فقط برای دام‌های در سن تولید امکان‌پذیر است. بنابراین یک راهکار مناسب برای بهبود این صفات، جستجوی نشانگرهای مولکولی در داخل و یا اطراف ژن‌هایی است که به طور مستقیم و یا غیر مستقیم در تولید شیر و یا عملکرد تولید مثل دخالت دارند تا بتوان از اطلاعات ژنومی در کنار رکوردهای فنوتیپی برای برآورد دقیق ارزش‌های اصلاحی استفاده نمود (Pimentel *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2011). با توجه به پایین بودن وراثت‌پذیری صفات تولید مثلی استفاده از اطلاعات مستقیم فنوتیپی، به دلیل سهم بالای اثرات محیطی نمی‌تواند پیشرفت ژنتیکی زیادی را در پی داشته باشد، لذا استفاده همزمان از فنوتیپ و اطلاعات مربوط به ژن‌های کاندیدا و نشانگرهای DNA می‌تواند به طور معنی‌داری صفات تولید مثلی را از نظر ژنتیکی بهبود دهد (Veerkamp and Beerda, 2007).

تاکنون بررسی چندشکلی در ژن‌های کاندیدا به طور موفقیت‌آمیزی برای شناسایی چندین نشانگر DNA مرتبط با صفات تولیدی در دام‌های مختلف گزارش شده است (Mullen *et al.*, 2012; Pimentel *et al.*, 2011; Rothschild and Soller, 1997). در تحقیق حاضر، با مطالعه‌ی سازوکارهای فیزیولوژیکی کلیدی و مسیرهای متابولیکی که به طور مستقیم بر تولید شیر و عملکرد تولید مثل دام‌ها تاثیر دارند، چهار ژن لپتین، هورمون رشد (GH)، گیرنده‌ی هورمون رشد (GHR) و ژن Pit-1 به عنوان ژن‌های کاندید موثر بر این صفات بررسی می‌شوند (Mitko *et al.*, 2008).

لپتین یک پروتئین با وزن ملکولی 16 کیلو دالتون است که توسط بافت چربی سنتز می‌شود (Itossner, 1998) و در تنظیم مصرف خوراک (Lagonigro *et al.*, 2003)، تعادل انرژی، باروری و عملکرد ایمنی (Lieferes *et al.*, 2002) نقش دارد. ژن لپتین بر روی کروموزوم شماره چهار گاو قرار دارد و دارای سه اگزون و دو اینترون است (Clempson *et al.*, 2011).

هورمون رشد (GH) متعلق به خانواده‌ای از هورمون‌های سوماتولاکتوژنیک است که از غده‌ی هیپوفیزپیشین ترشح می‌شود. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که GH بر فرآیند تولید گامت و سنتز استروئید موثر است. این هورمون بر بلوغ فولیکول و گامت تاثیر دارد و از این طریق دارای نقش کمک کننده در باروری می‌باشد (Kerry and Harvey, 2000). همچنین GH تحریک کننده‌ی رشد بوده و از تحلیل فولیکول‌های کوچک جلوگیری می‌کند (Harvey *et al.*, 1995). گیرنده‌ی هورمون رشد (GHR) یک پروتئین ناقل غشایی می‌باشد که دارای ویژگی-های کشش بالا و اختصاصی بودن برای متصل شدن با GH است. GHR در بسیاری از بافت های بدن نظیر کبد، ماهیچه، چربی و کلیه یافت می‌شود. این ژن از 10 اگزون تشکیل شده است (Harvey *et al.*, 1995).

ژن Pit-1 که با نام POU1FI[1] نیز شناخته می‌شود، به عنوان فاکتور نسخه‌برداری خاص هیپوفیز محسوب می‌شود که بیان ژن‌های هورمون رشد (GH) و پرولاکتین (PRL) را در هیپوفیز پیشین تنظیم می‌کند (Tuggle *et al.*, 1993). این ژن در گاو با صفات اقتصادی و عملکرد تولیدی در ارتباط بوده و بر روی کروموزوم شماره یک قرار گرفته است و دارای 6 اگزون می باشد (Woollard *et al.*, 2000). به علت اینکه PRL و GH برای توسعه‌ی غده‌های پستانی و تولید شیر ضروری است، ژن Pit-1 می‌تواند به عنوان یک ژن کاندیدای موثر بر صفات تولیدی در نظر گرفته شود (Renaville *et al.*, 1997a).

گاو سرابی یکی از نژادهای بومی کشور است که به طور عمده در شمال غربی ایران پرورش داده می‌شوند و با متوسط تولید شیر روزانه‌ی 7/5 کیلوگرم (4/5 درصد چربی) در مقایسه با دیگر نژادهای بومی تولید بیشتری دارد (Tavakolian, 2000). در سال‌های گذشته تحقیقات مختلفی در زمینه بررسی چندشکلی در ژن‌های مختلف گاوهای سرابی انجام شده است (همچون Aslaminejad *et al.*, 2010; Aslaminejad *et al.*, 2011)، اما در این تحقیقات ارتباط چندشکلی‌های مشاهده شده با صفات فنوتیپی به طور محدودی بررسی شده است. با توجه به این‌که اطلاعات شجره‌ای و رکوردهای تولید و تولید مثل این نژاد در ایستگاه‌های اصلاح نژاد کشور موجود می‌باشد، به نظر می‌رسد که تعیین ژنوتیپ ژن‌های کاندید مؤثر بر عملکرد صفات تولیدی و تولید مثلی برای دام‌های دارای رکورد، می‌تواند امکان طراحی برنامه اصلاح نژاد مناسبتری را فراهم سازد. هدف از تحقیق حاضر بررسی ارتباط بین این چهار ژن کاندیدا با صفات تولید شیر (تصحیح شده برای 250 روز شیردهی)، طول دوره‌ی شیردهی، فاصله‌ی زایش و روزهای باز در گاوهای سرابی با استفاده از نشانگر PCR-RFLP است.

[1]. Pou Domain, Class 1, Transcription Factor 1

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این تحقیق از 94 گاو ماده تحت پوشش مرکز اصلاح نژاد واقع در شهرستانهای شبستر و سراب که به طور معمول با گاوهای نر به شیوه‌ی طبیعی (پس از تشخیص فحلی) آمیزش داده می‌شدند، خونگیری شد. نمونه‌های خون از سیاهرگ وداجی دام‌ها تهیه و پس از اضافه کردن EDTA، به فریزر با دمای 20- درجه‌ی سانتیگراد انتقال داده شدند.

بررسی مولکولی: استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری استخراج از خون شرکت پرومگا[1] انجام شد و کمیت DNA های استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. در روش PCR-RFLP، ابتدا قطعه حاوی جایگاه چند شکلی با واکنش زنجیره‌ایِ پلی‌مراز (PCR) و استفاده از دو آغازگر مخصوص تکثیر و پس از هضم‌آنزیمی، الکتروفوز گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های کاندیدا در جدول شماره‌ی یک ارائه شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل T-Personal Thermo-cycler (ساخت آلمان) و در حجم 25 میکرولیتر با استفاده از کیت‌های شرکت Biometra (ساخت آلمان) انجام شد. اجزای واکنش PCR شامل 50 تا 100 نانوگرم DNAی استخراج شده، 2/5 میکرولیتر بافر 10X (200 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 mM Tween 20%, 750 mM Tris-HCl, pH 8.8)، 2/5 میلی مول $MgCl_2$، 200 میکرومول dNTPs، 3 میکرولیتر مخلوط الیگونوکلئوتید (10 پیکومول از هر آغازگر)، یک واحد آنزیم *Taq*پلی‌مراز DNA و 11 میکرولیتر ddH_2O بود. چرخه‌های PCR با برنامه حرارتی یک مرحله‌ی ابتدایی واسرشت‌سازی به مدت 3 دقیقه در 94 درجه‌ی سانتیگراد و سپس 34 چرخه‌ی تکراری شامل سه مرحله: واسرشت‌سازی برای 45 ثانیه در 94 درجه‌ی سانتیگراد، اتصال به مدت یک دقیقه (که دمای آن برای هر جفت آغازگر متفاوت بود) و مرحله‌ی بسط در 72 درجه‌ی سانتیگراد برای 45 ثانیه و در نهایت مرحله‌ی بسط نهایی در 72 درجه‌ی سانتیگراد برای 10 دقیقه در نظر گرفته شد. پس از انجام این مرحله، محصولات PCR روی ژل آگارز 2/5 درصد به مدت 45 دقیقه و در ولتاژ 85 ولت الکتروفورز شدند. باندهای حاصل پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، تحت نور UV توسط دستگاه فتوگرافی مدل UVstar 30 (شرکت بیومترا، ساخت آلمان) مشاهده شدند. اندازه‌ی آل‌ها نسبت به یک سایز مارکر استاندارد 100 کیلو بازی (شرکت فرمنتاز، روسیه) با استفاده از نرم افزار BIO $1D^{++}$ تعیین شد. محصول PCR هر نمونه با استفاده از 10 واحد آنزیم (جدول 1) برای هر ژن در دمای 37 درجه‌ی سانتیگراد برای حداقل 12 ساعت هضم شدند. محصولات هضم نیز بر روی ژل آگارز 2 درصد به مدت 1 ساعت در ولتاژ 73 ولت جداسازی شدند. ژل حاصل با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و باندها مشاهده شدند.

[1]. Promega

جدول 1- توالی آغازگرها، منطقه تکثیرشده، آنزیم‌های برشی، دمای اتصال، طول محصولات PCR، اندازه آللی و مرجع مورد استفاده برای ژن‌های کاندیدا.

Table 1- Primer sequences, Amplified region, Restriction enzymes, Annealing temperature, Length of PCR productions, Allelic sizes and the references used for investigating of candidate genes.

Gene name نام ژن	**Primers** آغازگرها	Amplified region منطقه ی تکثیر شده	Restriction Enzyme آنزیم برشی	Annealing temperature دمای اتصال	PCR productions lengths (bp) طول محصول PCR (جفت باز)	Allelic sizes (bp) اندازه‌ی آالل (جفت باز)
Leptin	F: 5`-TGG AGT GGC TTG TTA TTT TCT TCT-3` R: 5`-GTC CCC GCT TCT GGC TAC CTA AC-3` Liefers *et al.*, (2002)	Intron 2	Sau3AI	59	423	AA 390,32 BB 303, 88 and 32
GH	F: 5`-GCT GCT CCT GAG GGC CCT TC-3` R: 5`-CAT GAC CCT CAG GTA CGT CTC CG-3` Gordon *et al.*,(1983)	49bp of the fourth intron and 162bp from the fifth exon	ALuI	61	211	LL 211 VV 159,52
GHR	F: 5`-TGG CAA CTC GTT CCT ACA TG-3` R: 5`-AGC AAC CCC ACT GCT GGG CAT-3` (Aggrey *et al.*,(1999)	Promoter region and exon 1	AluI	58	458	AluI(-/-)458 AluI(+/+)296, 162
Pit-1	F: 5`-AAA CCA TCA TCT CCC TTC TT-3` R: 5`-AAT GTA CAA TGT GCC TTC TGA G-3` Woolard *et al.*, (1994)	Intron 5 and exon 6	HinIII	60	451	AA451 BB 207,244

تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق برای محاسبه فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی از نرم افزار *POPGEN V 1.31* استفاده شد. رکوردهای مربوط به صفت فاصله‌ی زایش دارای توزیع نرمال نبودند و قبل از آنالیز به منظور نرمال‌کردن، لگاریتم طبیعی این داده‌ها گرفته شد و رکورد-هایی که خارج از سه انحراف استاندارد فنوتیپی از میانگین تصحیح نشده قرار داشتند، از آنالیز - های بعدی حذف شدند. آنالیز واریانس برای مقایسه‌ی عملکرد صفات تولید شیر (تصحیح شده برای 250 روز شیردهی)، طول دوره‌ی شیردهی، فاصله‌ی زایش و روزهای باز در دسته-های مختلف ژنوتیپی با استفاده از مدل آماری زیر در رویه‌ی GLM نرم‌افزار SAS آنالیز شدند و در مواردی که ارتباط معنی‌داری مشاهده شد، آزمون دانکن برای مقایسه سطوح مختلف یک فاکتور و

آزمون معنی‌داری آنها، استفاده شد. مدل آماری مورد استفاده به صورت زیر بود:

$$Y_{ijklm}=\mu+YS_i+S_j+L_k+G_l+b_1(X_1)+b_2(X_2)+e_{ijklm}$$

در این رابطه Y_{ijklm}: رکورد مربوط به صفت مورد بررسی، YS_i: اثر ثابت i امین سال- فصل زایش، S_j: اثر ثابت j امین گاو نر، L_k: اثر ثابت k امین شکم زایش، G_l: اثر ثابت l امین ژنوتیپ، $b_1(X_1)$: تابعیت صفت (تولید شیر) از روزهای شیردهی به صورت تصحیح شده برای میانگین، $b_2(X_2)$: تابعیت صفت از سن مادر به صورت تصحیح شده برای میانگین و e_{ijklm}: اثر تصادفی باقیمانده می‌باشد.

نتایج و بحث

فراوانی‌های آللی، ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی-های مشاهده شده و مورد انتظار و شاخص تنوع ژنی Nei برای ژن‌های مورد مطالعه در جدول 2 ارائه شده است. نتایج حاصل برای فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی در گاوهای سرابی نشان داد که این فراوانی‌ها در بین ژن‌های کاندیدای مختلف، متغیر است. بالاترین فراوانی‌های آللی A(0/72)، V(0/51)، (+)(0/65) و B(0/55) به ترتیب برای ژن های لپتین، GH، GHR و Pit-1 حاصل شد. این نتایج با مطالعات محققین دیگر همچون Woolard *et al.*, 1994; Aggrey *et al.*, 1999; Gordon *et al.*, 1983; Liefers *et al.*, 2002 مطابقت دارد.

برای کلیه ژن‌های کاندید مورد مطالعه کاهش هتروزیگوسیتی مشاهده شد، به‌طوری‌که مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده از مقدار مورد انتظار کمتر بود. علاوه بر انتخاب، پدیده‌هایی نظیر اثر جمعیت پایه[1] و همچنین گردنه بطری[2] می‌توانند در کاهش میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار در این جایگاه‌ها مؤثر باشد. در چنین مواردی تعداد کم و محدودی از حیوانات نقش مولد در تولید نسل‌های آینده را بر عهده دارند. همچنین عوامل محیطی یا ژنتیکی (نظیر همخونی که حاصل آمیزش خویشاوندان نزدیک در خانواده می‌باشد) نیز می‌تواند میزان هتروزیگوسیتی را به طور معنی‌داری کاهش دهند (Zhang *et al.*, 2002).

نتایج تجزیه و تحلیل کای مربع نشان داد که کلیه ژن‌های کاندایدای مورد بررسی در عدم تعادل هاردی-واینبرگ بودند. در مطالعه‌ای بر روی گاوهای بومی و هلشتاین استان کرمان نیز نشان داده شد که فراوانی آلل‌های مربوط به ژن GH در جامعه‌ی مورد مطالعه دارای انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی واینبرگ بود (Mohammadabadi *et al.*, 2010). از جمله عواملی که می‌توانند باعث انحراف معنی‌دار ژن-های مورد مطالعه از تعادل هاردی واینبرگ شوند، اندازه کم جمعیت و محدود ماندن گاوهای مولد در ایستگاه، عدم تلاقی تصادفی و آمیزش چند نر محدود در ایستگاه و در نتیجه افزایش میزان همخونی می‌باشد. شاخص تنوع ژنی Nei نیز در این تحقیق محاسبه شد که نتایج حاصل مجدداً کاهش محسوس هتروزیگوسیتی را در جمعیت نشان داد.

[1] Founder effect
[2] Bottleneck

جدول 2- فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی‌های مشاهده شده و مورد انتظار برای ژن‌های کاندیدای مورد مطالعه.

Table 2- Genotypic and allelic frequencies, expected and observed hetrozygosity and Nei's genetic diversity of different candidate genes investigated in this research.

Gene name نام ژن	Allele آلل	Total number تعداد	Frequency فراوانی		Hetrozygotsity هتروزیگوسیتی		Nei's genetic diversity شاخص تنوع ژنی (Nei)
			Genotypic ژنوتیپی	Allelic اللی	Observed مشاهده شده	Expected مورد انتظار	
Leptin	AA	54	0.57	0.72 (A)	0.30	0.40	0.40
	AB	29	0.30				
	BB	11	0.13	0.28 (B)			
GH	LL	32	0.34	0.49 (L)	0.30	0.50	0.49
	LV	29	0.30				
	VV	33	0.36	0.51 (V)			
GHR	(+/+)	46	0.48	0.65 (+)	0.34	0.45	0.44
	(+/-)	32	0.34				
	(-/-)	16	0.18	0.35 (-)			
Pit-1	AA	30	0.31	0.45 (A)	0.28	0.49	0.49
	AB	27	0.28				
	BB	37	0.41	0.55 (B)			

میانگین حداقل مربعات و خطای معیار صفات مورد بررسی در کلاس‌های ژنوتیپی مختلف در جدول 3 نمایش داده شده است. در این تحقیق تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف ژن لپتین برای صفات مورد مطالعه مشاهده نشد که با نتایج برخی از مطالعات مطابقت ندارد. در مطالعات قبلی گزارش شده است که تلیسه‌هایی با ژنوتیپ AB در مقایسه با ژنوتیپ AA به میزان 1/32 کیلوگرم در روز شیر بیشتری تولید و دارای مصرف خوراک بیشتری معادل 0/73 کیلوگرم در روز می‌باشند. همچنین این گزارش نشان می‌دهد که آلل B ممکن است در بهبود تولید شیر بدون ایجاد تعادل منفی انرژی و کاهش باروری نقش داشته باشد (Liefers *et al.*, 2002).

جدول 3- میانگین حداقل مربعات و خطای معیار صفات مورد بررسی در کلاسهای ژنوتیپی مختلف ژن‌های کاندیدا.

Table 3- least square means and comparison of traits mean in different genotypic classes of four candidate genes.

Gene name نام ژن	Genotype ژنوتیپ	Total Number تعداد	Lactation period (Day) طول دوره ی شیردهی (روز)	Open days (Day) روزهای باز (روز)	Calving interval (Day) فاصله ی زایش (روز)	Milking yield corrected for 250 days (Kg) تولید شیر تصحیح شده برای 250 روز شیردهی (کیلوگرم)
Leptin	AA	54	280.97±0.78	113.02±1.5	392.27±1.71	1493.50±8.16
	AB	29	281.29±1.03	117.42±2.04	394.14±2.25	1478.14±10.77
	BB	11	280.07±1.62	117.66±3.21	395.89±3.54	1468.72±16.93
GH	LL	32	250.47±6.07	109.23±5.71^{b}	392.59±6.30	1434.48±30.09^{a}
	LV	29	234.90±6.22	122.69±5.85^{a}	400.20±6.46	1421.122±30.83^{b}
	VV	33	246.31±4.36	116.17±4.10^{ab}	389.51±4.52	1424.76±21.61^{b}
GHR	(+/+)	46	278.93±1.43	113.74±1.73	392.83±1.91	1445.75±13.06^{b}
	(+/-)	32	280.62±1.04	116.89±1.98	391.68±2.18	1443.78±10.44^{b}
	(-/-)	16	282.78±0.87	117.47±2.83	397.80±3.13	1508.57±14.93^{a}
Pit-1	AA	30	281.61±3.05	122.67±3.013^{a}	393.60±6.63	1486.90±31.66^{b}
	AB	27	279.59±3.05	113.19±6.02^{b}	391.58±6.65	1509.36±31.73^{a}
	BB	37	281.12±1.88	116.24±3.71^{ab}	397.12±4.09	1504.09±19.56^{a}

در مطالعه دیگری نیز گزارش شده است که آلل T ژن لپتین گاو منجر به تولید شیر بیشتر و تعداد سلول‌های بدنی بیشتر می‌شود ولی بر روی میزان چربی و پروتئین شیر طی دوره‌ی شیردهی تاثیر معنی‌داری ندارد (Buchanan *et al.*, 2003). دو آلل مسئول افزایش فاصله‌ی زایش نیز در یک بررسی مشاهده شد و نتیجه گرفته شد که انتخاب علیه این حامل‌ها می‌تواند فاصله‌ی زایش را به کمتر از 2 ماه کاهش دهد (Almeida *et al.*, 2003). همچنین Heravi Moussavi و همکاران (2006) ارتباط بین چندشکلی موجود در اینترون 2 ژن لپتین را با صفات تولید شیر و باروری در گاوهای هلشتاین ایران با استفاده از نشانگر PCR-RFLP مورد بررسی قرار دادند که نتایج آنها نشان دهنده ارتباط این ژن با میزان تولید شیر در این نژاد بود. از جمله دلایلی که می‌تواند علت تفاوت موجود در نتایج حاصل در تحقیق حاضر با نتایج مطالعات مشابه باشد، تفاوت نژادی نمونه‌های مورد بررسی، انتخاب طبیعی، تاریخچه و توزیع متفاوت جغرافیایی و تفاوت در اندازه جمعیت‌های مورد بررسی باشد (Zhang *et al.*, 2002).

نتایج حاصل از بررسی ژن GH نشان دهنده تأثیر معنی‌دار این ژن بر صفات تولید شیر و

روزهای باز بود ($P< 0.01$)، به طوری‌که ژنوتیپ LL نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها تولید شیر بیشتر و روزهای باز کمتری را نشان داد. تاثیر این ژن بر روی دیگر صفات مورد بررسی معنی‌دار نبود. Falaki و همکاران (1996) نیز رابطه‌ی ژن GH و تولید شیر را با استفاده از نشانگر RFLP مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که بین چندشکلی در این ژن و صفت تولید شیر ارتباط معنی‌داری وجود دارد. شریفلو و همکاران (2000) گزارش نمودند که آلل L ژن GH باعث تولید شیر، چربی و پروتئین بیشتری می‌شود و این آلل بر آلل V غالب است. عباسی و همکاران (1378) نیز با بررسی چندشکلی موجود در اگزون 5 ژن هورمون رشد در گاوهای هلشتاین ایران با استفاده از نشانگر PCR-RFLP گزارش کردند که این جایگاه با میزان تولید شیر در این نژاد در ارتباط است.

از میان صفات مورد بررسی در این مطالعه، ژن GHR فقط بر روی صفت تولید شیر تاثیر معنی‌داری داشت. میانگین تولید شیر در کلاس ژنوتیپی (-/-) بیشتر از سایر کلاس‌ها بود. Falaki و همکاران (1996) با بررسی تنوع آللی موجود در توالی‌های ساختاری و تنظیمی ژن هورمون رشد و گیرنده‌ی آن گزارش کردند که این ژن‌ها به طور مستقیم یا غیر مستقیم بر روی تولید شیر مؤثر بوده‌اند که این نتایج با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارند.Aggrey و همکاران (1999) نیز گزارش کردند که گاوهای نر دارای ژنوتیپ (+/+) دارای ارزش‌های اصلاحی برآوردی بیشتری نسبت به دیگر ژنوتیپ هموزیگوت در این جایگاه برای تولید چربی شیر بودند. حسنی و همکاران (1997) نیز در تحقیقی بر روی چندشکلی‌های موجود در بخش پروموتور ژن گیرنده هورمون رشد در گاوهای هلشتاین ایران گزارش کردند که این جایگاه با خصوصیات تولید شیر همانند درصد چربی مرتبط است.

ژن Pit-1 به طور معنی‌داری بر روی صفات تولید شیر و روزهای باز مؤثر بود. تولید شیر ژنوتیپ‌های AB و BB بیشتر از ژنوتیپ AA بود. همچنین ژنوتیپ AB با روزهای باز کمتری همراه بود که البته تفاوت آن با ژنوتیپ BB معنی‌دار نبود. نقشه‌یابی فاصله‌ای[1] برای شناسایی جایگاه‌های صفات کمی (QTL[2]) نشان دادند که این ژن دارای اثرات معنی‌داری بر تولید شیر و پروتئین است (Georges *et al.*, 1995). Renaville وهمکاران (1997) نیز گزارش نموده‌اند که الل A در اگزون شماره‌ی 6 بر افزایش تولید شیر و پروتئین و نیز کاهش درصد چربی مؤثر است. در این مطالعه اثر افزایشی آلل A برای تولید شیر (44/6± 73/6+ کیلوگرم) و تولید پروتئین (1/45±2/93+ کیلوگرم) و اثر کاهشی برای درصد چربی (0/018±0/038-) گزارش شده است.Parmentier و همکاران (2001) نیز نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند. در این تحقیق مقدار اثر جایگزینی یک آلل B توسط یک آلل A برای تولید شیر، چربی و پروتئین به

[1] Interval Mapping
[2] Quantitative Trait Loci

ترتیب برابر با 46/3+، 1/9+ و 1/5+ کیلوگرم بوده است. صادقی و همکاران (1387) نیز اثر چندشکلی اگزون 3 ژن Pit-1 را بر ارزش اصلاحی صفات تولید شیر در گاوهای نر هلشتاین ایران با استفاده از نشانگر PCR-RFLP مورد بررسی قرار دادند که نتایج آنها نشان دهنده ارتباط این ژن ها با میزان تولید شیر بود که این نتایج با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت دارند.

نتیجه‌گیری

روش‌های آماری با خصوصیت BLUP[1]، امکان جداسازی اثرات محیطی از ژنتیکی را فراهم و در برنامه‌های اصلاحی بطور گسترده‌ای استفاده می شود ولی در این روش‌ها، ژنوتیپ یک فرد ناشناخته بوده و معایبی نظیر کاهش واریانس ژنتیکی، تثبیت آلل‌های کشنده و همخونی را باعث می‌شود. زیرا در روش‌های ژنتیک کمی اطلاعات ژنوتیپی افراد بطور دقیق قابل ارزیابی نمی‌باشد بلکه برآوردی از آن از طریق فنوتیپ فرد و خویشاوندانش حاصل می-شود. امروزه با پیشرفت‌های حاصل در زمینه ژنتیک مولکولی این امیدواری وجود دارد که شناسایی ژن‌ها و نشانگرهای مرتبط با صفات مختلف به خصوص صفات اقتصادی و تولید مثلی در دام‌ها، بتواند گام اساسی در دستیابی به پیشرفت ژنتیکی با استفاده از اطلاعات مولکولی در ترکیب با اطلاعات فنوتیپی فراهم آورد. در تحقیق حاضر بررسی ارتباط چهار ژن کاندیدا مرتبط با صفات تولید شیر و عمکرد تولید مثلی یکی از گاوهای بومی مهم کشور فراهم شد که نتایج حاصل ارتباط معنی‌دار ژنوتیپ‌های مختلف با صفات تولید شیر و تعداد روزهای باز را نشان داد که البته امکان استفاده از این اطلاعات در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر ابوالقاسم محمدی شوطی استاد عالیقدر دانشگاه تبریز به جهت همکاری صمیمانه در جریان انجام طرح سپاسگزاری می کنیم. این مطالعه تحت حمایت سازمان برنامه‌ریزی و مدیریت استان آذربایجان شرقی انجام شده است.

[1] Best Linear Unbiased Prediction

منابع

1. Abbasi A (1999). Study of growth hormone (GH) gene polymorphism in Iranian Holstein cattle and its association with milk yield characteristics. MSc. Thesis.University of Zabol, Zabol, Iran.
2. Aslaminejad AA, Nassiry MR, Farajollahi H, Mahdavi M, Abbasi H, Javadmanesh A (2010). Polymorphism in Exon 3 of leptin gene in Iranian native cattle breeds. Journal of Applied Animal Research 37: 159-162.
3. Aslaminejad AA, Tahmorespour M, Alshawkani A (2011). Study of the polemorpyism in the exon 20 leptin receptor in native cow breeds of Sistani, Golpayegani, Najdi andSarabi. Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 91: 44-50.
4. Aggrey SE, Yao J, Sabour MP, Lin CY, Zadworny D, Hayes JF, Kuhnlein U (1999) .Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holsteins. American Genetic Assocciation 90: 148-151.
5. Almeida SEM, Almeida EA, Moraes JCF, Weimer TA (2003). Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. Journal of Animal Breeding Genetics 120: 106–113.
6. Buchanan FC, Vans Kessel AG, Waldner C, Christensen DA, et al. (2003). An Association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. Journal of Dairy Science 86: 3164-3166.
7. Caraviello DZ, Weigel KA, Craven M, Gianola D, Cook NB, Nordlund KV, Fricke PM, Wiltbank MC (2006) Analysis of reproductive performance of lactating cows on large dairy farms using machine learning algorithms. Journal of Dairy Science 89: 4703-4722.
8. Clempson AM, Pollott GE, Brickell JS, Bourne NE, Munce N, Wathes DC (2011). Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. Journal of Dairy Science 94: 3618-3628.
9. Falaki M, Gengler N, Sneyers M, Prandi A, Massart S, Formigoni A, Burny A, Portetelle D, Renaville R (1996) Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. Journal of Dairy Science 79: 1446 53.
10. Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasquino AT, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X, Womack JE, Hoeschele I (1995). Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. Genetics 139: 907-920.
11. Gordon DG, Quick DP, Erwin CR, Donelson JE, Maurer RA (1983).Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. Molecular Cell Endocrinology 33: 81-95.
12. Harvey S, Scanes CG, Daughaday WH (1995). Growth Hormone. CRC London.
13. Hassani A (1997) Identification of polymorphism in growth hormone receptor (GHR) gene and its association with production traits in Iranian Holstein cattle. MSc. Thesis. University of Sistan and Baluchestan, Iran.
14. HeraviMoussavi A, Ahouei M, Nassiry MR, Javadmanesh A (2006). Association of leptin polymorphism with production, reproduction and plasma glucose level in Iranian Holstein Cows. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 19: 627–631.
15. Itossner KL (1998). Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: Potential application in animal production. Canadian Journal of Animal Science 26: 463-480.
16. Kerry LH, Harvey S (2000) Growth hormone roles in male reproduction. Endocrinelogy 13: 243-250.

17. Lagonigro R, Wiener P, Pilla F, Woolliams JA, William J (2003). A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. Animal Genetics 34: 371-374.
18. Liefers SC, Veerkamp RF, Vanderlene T. (2002). Association between leptin gene polymorphism and production, live weight, energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. Journal of Dairy Science 85: 1633-1638.
19. Mitko K, Ulbrich SE, Wenigerkind H, Sinowatz F, Blum H, Wolf E, Bauersachs S (2008) Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. Reproduction 135: 225-240.
20. Mohammadabadi MR, Torabi A, Tahmourespoor M, Baghizadeh A, Esmailizadeh Koshkoieh A, Mohammadi A (2010). Analysis of bovine growth hormone gene polymorphism of local and Holstein cattle breeds in Kerman province of Iran using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). African Journal of Biotechnology 9: 6848-6852.
21. Mullen MP, Creevey CJ, Berry DP, McCabe MS, Magee DA, Howard DJ, *et al.* (2012) Polymorphism discovery and allele frequency estimation using high-throughput DNA sequencing of target-enriched pooled DNA samples. BMC Genomics. 13: 16.
22. Parmentier I, Gengler N, Fontaine S, Auvray B, Burnside T, Portelle D, Renaville R (2001) PIT-1, a candidate gene for mass assisted selection in dairy bulls. Journal of Dairy Science 84: 1-340.
23. Pimentel G, Bauersachs S, Tietze M, Simianer H, Tetens J, Thaller G, Reinhardt F, Wolf E, König S (2011). Exploration of relationships between production and fertility traits in dairy cattle via association studies of SNPs within candidate genes derived by expression profiling. Animal Genetics 42(3): 251–262.
24. Pryce JE, Bolormaa S, Chamberlain AJ, Bowman PJ, Savin K, Goddard ME, Hayes BJ (2010). A validated genome-wide association study in 2 dairy cattle breeds for milk production and fertility traits using variable length haplotypes. Journal of Dairy Science 93: 3331-3345.
25. Renaville R, Gengler N, Vrech E, Prandi A, Massart S, *et al.* (1997a) PIT-1 gene polymorphism, milk yield and conformation traits for Italian Holstein-Friesian Bulls. Journal of Dairy Science 80: 3431-3438.
26. Renaville R, Gengler N, Parmentier I, Mriaux F, Massat S, Bertozzi C, Burny A, Portetelle D (1997b). Pit-1 gene HinfI RFLP and growth traits in double-muscled Belgian Blue cattle. Journal of Animal Science 75: 148-148.
27. Rothschild MF, Soller M (1997) Candidate gene analysis to detect traits of economic importance in domestic livestock. Probe 8: 13–22.
28. Sadeghi M (2007). The effect of candidate genes polymorphism on breeding value of milk yield production traits in Iranian Holestain bulls. PhD. Thesis. University of Tehran, Tehran, Iran.
29. Shariflou MR, Moran C, Nicholas FW (2000) Association of the Leu(127) variant of the bovine growth hormone (bGH) gene with increased yield of milk, fat, and protein in Australian Holstein-Friesians. Australian Journal of Agricultural Research 51(4): 515-522.
30. Tavakolian J, (2000). An introduction to genetic resources of native farm animals in Iran, Animal Science Genetic Research Institute Press, Tehran, Iran (in Persian).
31. Tuggle CK, Yu TP, Helm J, Rothschild MF (1993). Cloning and restriction fragment length polymorphism analysis of a cDNA for swine Pit-1 gene controlling growth hormone expression. Journal of Animal Genetics 24: 17-21.
32. Van Raden PM (2004). Selection on net merit to improve lifetime profit. Journal of Dairy Science 87: 3125–3131.

33. Veerkamp RF, Beerda B (2007) Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. Theriogenology 68: S266-S273.
34. Woolard, J, Tuggle CK, Ponce de Leon FA (1999). Localization of POU1F1 to bovine, ovine and caprine 1q21-22. Journal of Animal Science 78: 242-243.
35. Woollard J, Schmitz CB, Freeman AE, Tuggle CK (1994) Rapid communication: HinfI polymorphism at the bovine Pit-1 locus. Journal of Animal Science 72:3267.
36. Zhang Y, Wang X, Ryder O, *et al.* (2002). Genetic diversity and conservation of endangered animal species. Pure and Applied Chemistry. 74(4):575-584.

Analysis of association among four candidate genes polymorphisms with milk yield and reproductive performance traits in Sarabi cow using PCR-RFLP marker

Javanmard A.[1], Moradi M.H.*[2], Safdari M.[3]

[1] Assistant Professor, Departement of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2]Assistant professor, Department of Animal Science, University of Arak, Arak, Iran.
[3]Ph.D. student, University of Tehran, Department of Animal Science, University of Tehran, Iran.

Abstract

Selection for improving of production and reproductive performance traits in livestock is a time-consuming process and can only be applied to adult animals. Sarabi cow is one of the local Iranian dairy breeds with dominate geographical distribution on NorthWest of Iran. Characterization of candidate genes associated with milk yield and reproductive performance traits is important and can help to improve the efficiency of breeding programs in this breed. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the association among four candidate genes (Leptin, Growth Hormone (GH), Growth Hormone Receptor (GHR) and Pit-1) with milk yield and some reproductive performance traits in Sarabi cattle breed using PCR-RFLP marker. The obtained results revealed that the highest allele frequencies were observed for A (0.72), V (0.51), + (0.65) and B (0.55) for Leptin, GH, GHR and Pit-1 genes respectively. The respective LL, -/- and AB-BB genotypes of GH, GHR and Pit-1 genes showed higher milk yield production compare to other genotypes of these genes *(P< 0.01).* Also, LL and AB genotypes of GH and Pit-1 genes were related to shorter open days *(P< 0.01).* No evidence showing the association between other genotypes of these genes and the other investigated traits were observed in the present study. Overall, candidate genes showed deficiency of observed heterozygosity value compare to the expected heterozygosity value. In addition, the results of chi-square analysis showed that all candidate genes were in Hardy-Weinberg disequilibrium. As a conclusion, the finding of the present study revealed the association of investigated candidate genes with milk yield and open days in Sarabi cattle breed and the application of these polymorphisms for marker assisted selection (MAS) should be further evaluated.

Key Words: Candidate genes, Production and reproduction performance traits, Sarabi cattle, PCR-RFLP marker.

* Corresponding Author: Moradi M.H. Tel: 09183659133 Email: moradi.hosein@gmail.com