مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

مطالعه چندشکلی در ناحیه پروموتور ژن پروتئین شوک حرارتی (Hsp70) و ارتباط آن با صفت نرخ باروری درگاوهای هلشتاین و سرابی

مختار غفاری*[1]، مصطفی صادقی[2]، اردشیر نجاتی جوارمی[3]، محمد مرادی شهر بابک[4]، رضا فرجی[5]

[1]دانشجوی دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه علوم دامی، کرج، ایران

[2، 3، 4]استادیار، دانشیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه علوم دامی، کرج، ایران

[5]دانشجوی کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه علوم دامی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: 1391/08/16، تاریخ پذیرش: 1391/12/25

چکیده

هدف از این تحقیق، مطالعه چندشکلی در ناحیه پروموتور ژن پروتئین شوک حرارتی و ارتباط آن با صفت نرخ باروری در گاوهای هلشتاین و سرابی می‌باشد. به این منظور از 124 راس گاو شیرده شامل هلشتاین و سرابی استخراج DNA انجام پذیرفت و برای شناسایی چندشکلی از روش تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد (SSCP) استفاده گردید. نتایج حاصل از توالی‌یابی و هم‌ردیف‌سازی با توالی ثبت شده در NCBI نشان داد که در این ناحیه هفت SNP وجود دارد که شامل: یک حذف در نوکلئوتید شماره 895، چهار نوع جایگزینی هم-جنس و همچنین دو نوع جایگزینی غیرهم‌جنس مشاهده گردید. ترکیب این SNPها شامل چهار نوع هاپلوتایپ شماره یک (CAAAGCC)، شماره دو (DGGCTTC)، شماره سه (CDGGCTTT) و شماره چهار (CGGAGTT) بود. در نژاد سرابی هاپلوتیپ شماره سه و در نژاد هلشتاین هاپلوتیپ شماره یک مشاهده نشد. اثرات ثابت موثر بر صفت نرخ آبستنی، با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS آنالیز گردید. نتایج بیانگر ارتباط معنی‌دار هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در این ناحیه با نرخ باروری است ($p<0.0001$). به‌طوری که در نژاد هلشتاین هاپلوتیپ شماره چهار و در نژاد سرابی هاپلوتیپ‌های شماره یک و چهار از نظر آماری اختلاف معنی-داری با بقیه هاپلوتیپ‌ها داشتند ($p<0.01$) و کمترین نرخ باروری در هر دو نژاد مربوط به هاپلوتیپ شماره دو بود. این نتایج نشان می‌دهد که ناحیه پروموتور ژن پروتئین شوک حرارتی از چند شکلی بالایی برخوردار است، لذا می‌تواند در انتخاب برای صفت باروری مورد استفاده واقع شود.

کلمات کلیدی: *استرس حرارتی ، هاپلوتایپ، SNP و PCR-SSCP*

*نویسنده مسئول: مختار غفاری تلفن: 09354642179 Email: arazghaffari@ut.ac.ir

مقدمه

ایران از لحاظ آب و هوایی یکی از منحصر به فردترین کشورهاست. و دارای تنوع اقلیمی مختلفی است. در منطقه آذربایجان آب و هوای نسبتا معتدل ولی بطور همزمان در منطقه جنوب کشور شاهد آب و هوای گرم و خشک هستیم. بطوریکه اختلاف دمای هوا در زمستان میان گرمترین و سردترین نقطه گاهی به بیش از 50 درجه سانتی‌گراد می‌رسد(Alizadeh *et al.*, 2005). نژاد هلشتاین با توجه به انتخاب طولانی مدت که برای صفات تولیدی در این نژاد اصلاح شده است، نسبت به شرایط محیطی و به خصوص گرما حساس بوده و تولید و تولیدمثل آن با تنش محیطی به شدت کاهش می یابد. تنش های محیطی بویژه تنش گرما، سالانه بیلیون‌ها دلار سودآوری تولیدات دامی را کاهش می‌دهند(St-Pierre *et al.*, 2003) . به نظر می رسد با شناسایی نژادهای بومی کشور که نسبت به اقلیم منطقه سازگاری پیدا کرده‌اند و با اصلاح نژاد آنها، و یا با ایجاد تلاقی گری صحیح بین نژادهای بومی که دارای تحمل بالایی به شرایط سخت محیطی و بیماریها می باشند با نژادهای پر تولید خارجی، گامی موثر در جهت تولید اقتصادی تولیدات حیوانی در مناطق گرمسیری کشور بر داشت. از جمله توده‌های ژنتیکی بومی ایران، گاوهای بومی کشور می‌باشند. گاو نژاد سرابی به عنوان دام دو منظوره (شیری و گوشتی) شناخته شده است، و در منطقه آذربایجان یافت می‌شود و نسبت به آب و هوای سرد سازگار شده است و دارای قدرت تحمل زیاد نسبت به بیماریها و تغییرات محیطی است(Ferdowsi *et al.*, 2008).

سودآوری در واحدهای پرورش گاو شیری بستگی به باروری دارد، علی‌رغم پیشرفت سریع ژنتیکی و مدیریتی در تولید شیر گاوهای شیرده، بازده باروری از اواسط دهه 1980 کم شده است. دلیل این کاهش در باروری را نمی‌توان فقط به افزایش شیر نسبت داد. تنش گرمایی می‌تواند به عنوان یکی از فاکتورهای اصلی مرتبط با کاهش باروری به ویژه در مناطق گرمسیری در مزارع پرورش گاوهای پرتولید باشد (Garcı´a-Ispierto *et al.* 2007). دمای محیطی که در آن گاوها راحت بوده و بیشترین تولید را دارند بین 25-5 درجه سانتی‌گراد می‌باشد که به این محدوده دمایی منطقه آسایش گاو می‌گویند. هنگامی که دمای محیط از 26 درجه سانتیگراد بالاتر می‌رود، تولید شیر کاهش می‌یابد(Kadzere *et al.*, 2002). وجود تنش گرمایی قبل از عمل تلقیح مصنوعی، با کاهش نرخ باروری مرتبط است (Garcı´a-Ispierto *et al.*, 2007)، و نرخ آبستنی از حدود 40 تا 60 درصد در فصل‌های خنک سال به 10 تا 20 درصد در فصول گرم سال کاهش می یابد (Cavestany *et al.*, 1985). تنش گرمایی عامل مهمی در کاهش سودآوری مزارع پرورش گاو شیری است (Ravagnolo & Misztal, 2002)، با توجه به

وراثت پذیری کم صفات تولیدمثلی، استفاده از روشهای ژنتیک مولکولی و کشف ژنهای بزرگ اثر یا جایگاههای ژنی مرتبط با صفات تولیدمثلی و مقاومت به استرس گرمایی و در نتیجه افزایش نرخ باروری و مقاوم نمودن نژادهای پرتولید ولی حساس به اقلیم گرم، از اهمیت بیشتری برای متخصصین اصلاح نژاد دام برخوردار است. اخیرا مطالعه‌ای در زمینه مکانیسم‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی درگیر در پاسخ به تنش گرمایی توسط Collier *et al.* (2008) انجام شده است. زمانیکه موجود با تنش گرمایی مواجه می شود، سلولهای آسیب دیده پروتئینهایی تولید می‌کنند که از آنها در مقابل آسیب محافظت می‌کند. یکی از پاسخ‌های حمایتی تولید پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat shock protein; HSP) می باشد.

پروتئین‌های شوک حرارتی بر اساس وزن مولکولی طبقه‌بندی می‌شوند که مهمترین آنها عبارتند از: HSP60 ، HSP70 و HSP90. پروتئین شوک حرارتی 70 ، در بیشتر موجودات زنده از آرکئی‌باکتریها تا یوکاریوتها دیده می شود (Boorstein *et al.*, 1994) و دارای چندین عملکرد می‌باشد. که یکی از این عملکردها محافظت موجود زنده بعد از تحت تاثیر قرار گرفتن در مقابل تنش-های محیطی از جمله تنش گرمایی می‌باشد. کنترل بیان ژن Hsp70 ، توسط عناصر بالادست ناحیه پروموتور انجام می‌شود. Huang *et al* (2002) گزارش کردند که، ناحیه `5 این ژن مرتبط با درصد آبستنی و کیفیت اسپرم در خوک است، ارتباط چندشکلی در ناحیه پروموتور این ژن با صفات باروری در گاو توسط Rosenkrans *et al* (2010) مورد تایید قرار گرفته است. با توجه به اینکه مطالعه‌ای در زمینه شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتور ژن Hsp70 در گاوهای شیری کشور انجام نشده است و همچنین به دلیل وجود اقلیم‌های متنوع در کشور و نژادهای بومی سازگار با هر منطقه آب و هوایی، مطالعه اثر تنش گرمایی بر صفات تولید مثلی از جمله نرخ باروری می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. بنابراین، هدف از اجرای این تحقیق: 1) شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) موجود در ناحیه پروموتور ژن پروتئین شوک حرارتی (Hsp70) در گاوهای سرابی و هلشتاین و 2) ارزیابی ارتباط بین چندشکلی تک نوکلئوتیدی با نرخ باروری در نژادهای سرابی و هلشتاین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: برای این منظور از 124 راس گاو شیری شامل 52 راس گاو سرابی از ایستگاه تحقیقاتی سراب و تعداد 72 راس گاو هلشتاین از گاوداری فکا واقع در استان اصفهان خونگیری انجام شد. برای خون‌گیری از لوله های آزمایش استریل، حاوی ماده ضد انعقاد EDTA، استفاده گردید. از هر گاو حدود 5 میلی‌لیتر خون گرفته شد. بر روی نمونه‌های خون شماره بدن حیوان یاداشت گردید. بعد از اتمام خونگیری لوله‌های حاوی خون

تا زمان انتقال به آزمایشگاه در فلاسک حاوی یخ نگهداری شدند. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA در یخچال نگهداری شدند. اطلاعات صفات تولیدمثلی شامل تنها نرخ آبستنی ،برای نژادهای سرابی و هلشتاین بود. جزئیات اطلاعات فنوتیپی شامل اثرات ثابت سال هنگام تلقیح، ماه تلقیح ، اثر شکم‌زایش می باشد.

استخراج DNA و اندازه گیری کمیت و کیفیت DNA : در این پژوهش برای استخراج DNA از روش بهینه یافته نمکی(Miller *et al.*, 1988) استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA های استخراج شده بوسیله روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1% و اسپکتوفتومتری (دستگاه نانودراپ) (Thermo, NanoDrop 1000) تعیین گردید.

PCR-SSCP: واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر قطعه‌ی 539 جفت بازی ناحیه پروموتور ژن پروتئین شوک حرارتی (Hsp70) انجام شد. توالی آغازگرها، از مطالعه (Rosenkrans *et al.*, 2010) اقتباس گردید که توالی آنها عبارتند از:

Forward (5’ - GCCAGGAAACCAGAGACAGA-3’)
Reverse (5’ - CCTACGCAGGAGTAGGTGGT-3’)

واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر و شامل 50-100 نانوگرم DNA، بافر PCR (1X)، 10 پیکومول از هر آغازگر، dNTPs (0.2 mM)، $MgCl_2$ (1.5 mM) و نیم واحد آنزیم تک پلی مراز که با استفاده از برنامه حرارتی زیر و در 35 سیکل تکثیر شدند.

واسرشت شدن اولیه 95 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه، دمای واسرشت 95 درجه سانتیگراد برای 30 ثانیه، 60 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه برای اتصال پرایمرها،72 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه برای تکثیر قطعه مورد نظر و دمای تکثیر نهایی 72 درجه سانتیگرادبه مدت5 دقیقه بود. به منظور تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز 1/5% با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده گردید. از روش PCR – SSCP با استفاده از الکتروفورز عمودی توسط دستگاه (Bio-Rad) بر روی ژل اکریل آمید و رنگ آمیزی با نیترات نقره، برای شناسایی جهش در ناحیه تکثیر شده پروموتور ژن Hsp70 استفاده شد.

برای انجام SSCP مقدار 7 میکرولیتر از محصول PCR با 15میکرولیتر از بافر بارگذاری فرمامید (فرمامید 96%، هیدروکسد سدیم 100 میلی مولار، برموفنل بلو0/5% و گزیلن سیانول0/05%) مخلوط شد. به منظور واسرشته سازی محصول PCR، نمونه ها به‌مدت 10 دقیقه در دمای 95 درجه سانتیگراد حرارت داده شده و بلافاصله بر روی یخ قرار گرفتند. نمونه‌ها بمدت 10 دقیقه در فریزر قرار داده شدند سپس نمونه‌ها در داخل ژل پلی‌آکریل امید 10 % (آکریلامید به بیس آکریلامید 38/5 : 1) بارگذاری شده و نمونه ها بمدت 22 ساعت با ولتاژ 250 ولت و دمای 4 درجه سانتیگراد

در بافر 0/5 مولار TBE الکتروفورز عمودی شدند. برای مشاهده الگوهای باندی SSCP از رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

چون هدف تعیین چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی با استفاده از روش توالی یابی بود، لذا از هر الگوی باندی متفاوت تعداد 2 یا 3 نمونه برای انجام توالی‌یابی انتخاب شد. خالص کردن کلیه نمونه‌های حاصل از PCR و تعیین توالی قطعه مورد نظر توسط شرکت BioNeer کشور کره‌جنوبی انجام گرفت. برای مقایسه و مطابقت توالی‌ها با یکدیگر و با توالی مرجع در سایت NCBI (با شماره دسترسی M98823) از نرم افزار Vector NTI استفاده شد(Vector NTI Advance 9.0., 2003).

تجزیه آماری

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از رویه‌های Means و GLM نرم افزار SAS(9.1) و معادله مدل آماری بصورت زیر می‌باشد. ابتدا آنالیز برای هر دو نژاد بصورت توام انجام گرفت. سپس بصورت جداگانه برای هر نژاد آنالیز انجام شد که در این حالت اثر نژاد از معادله مدل زیر حذف گردید.

$$CR_{ijklmn}=\mu+Y_i+M_j+Lac_k+B_l+P_m+e_{ijklmn}$$

که در این مدل، CR_{ijklmn} : هر یک از مشاهدات مربوط به نرخ آبستنی، μ : میانگین جامعه، Y_i : اثر i امین سال هنگام تلقیح، M_j: اثر j امین ماه تلقیح ، Lac_k: اثر k امین شکم زایش، B_l: اثر l امین نژاد، P_m : اثر m امین الگوی باندی مشاهده شده و e_{ijklmn} : اثر باقیمانده می باشد، بعد از تعیین اثرات ثابت از آزمون توکی برای مقایسه میانگین ها استفاده گردید.

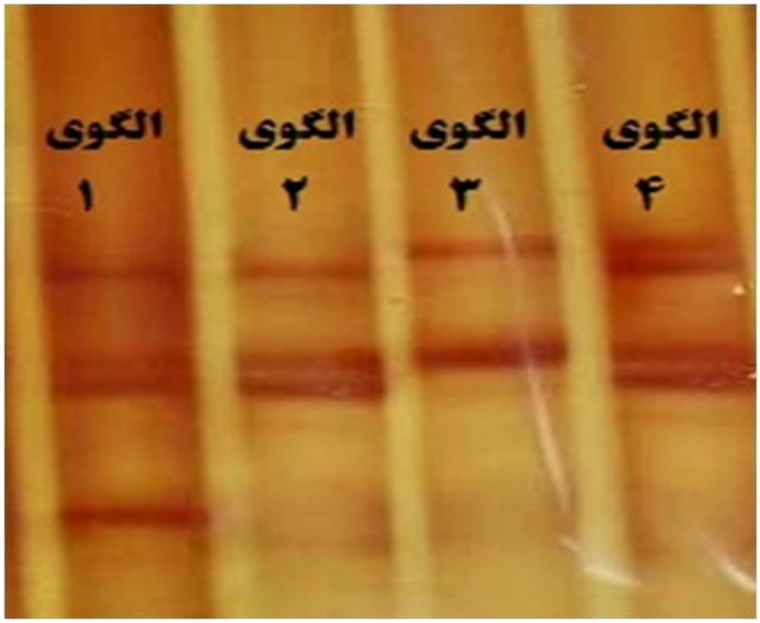
نتایج و بحث

نتایج بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز نشان داد که تکثیر قطعه 539 جفت بازی مربوط به پرموتور ژن Hsp70 به‌خوبی و بدون تکثیر قطعات اضافی و فاقد اسمیر و دایمر انجام شد که موید اختصاصی بودن جفت آغازگرها می باشد. و نتایج حاصل از بررسی الگوی تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد (SSCP) روی ژل اکریلامید 12% ، نشان داد که دارای 4 نوع الگوی باندی متفاوت در جمعیت‌های مورد مطالعه مشاهده شد(شکل 1). نتایج حاصل از توالی‌یابی 4 نوع مختلف هاپلوتایپ را تایید کرد، که توالی هاپلوتایپ‌ها عبارتند از: هاپلوتایپ شماره یک (CAAAGCC)،هاپلوتایپ شماره دو (DGGCTTC)، هاپلوتایپ شماره سه (CDGGCTTT) و توالی هاپلوتایپ شماره چهار (CGGAGTT)،در این توالی‌ها D به معنی حذف (Deletion) در جایگاه مورد نظر است. در این مطالعه هفت نوع متفاوت SNP مشاهده شد که حذف نوکلئوتید C در جایگاه شماره 895 اتفاق افتاده است ، چهار نوع جایگزینی‌هم-جنس (Transition) و دو نوع جایگزینی غیرهم-جنس (Transversion) مشاهده گردید که خلاصه

اطلاعات SNP ها و فراوانی آنها در بین دو نژاد سرابی و هلشتاین در جدول 1 ذکر گردیده است. فراوانی هاپلوتایپ‌ها در بین دو نژاد سرابی و هلشتاین در شکل 2 نمایش داده شده است. همانطور که از نتایج مندرج در شکل 2 مشخص است، الگوی باندی شماره 1 فقط در نژاد سرابی مشاهده گردیده است. در نژاد هلشتاین هاپلوتایپ شماره 1 و در نژاد سرابی هاپلوتایپ شماره 3 مشاهده نشد.

ارتباط هاپلوتایپ‌ها با صفت نرخ باروری

مقادیر تعداد، میانگین و انحراف‌معیار هر هاپلوتایپ بر صفت نرخ باروری در جدول 2 نشان داده شده است. در جدول 3 نیز مقادیر میانگین حداقل مربعات هاپلوتایپ‌های مختلف به همراه انحراف معیار آنها برای شکم زایش‌های مختلف در دو نژاد سرابی و هلشتاین ذکر گردیده است. نتایج تجزیه واریانس نشان می دهد ارتباط بین هاپلوتایپ‌ها با صفت نرخ باروری در ناحیه پروموتور ژن Hsp70 معنی دار است ($p<0.0001$). بیشترین نرخ باروری مربوط به هاپلوتایپ شماره یک بدست آمد، در تلیسه‌ها اختلاف معنی‌داری بین هاپلوتایپ‌ها مشاهده نشد. در شکم زایش اول بین هاپلوتایپ‌های شماره یک و چهار نسبت به هاپلوتایپ‌های شماره دو و سه تفاوت معنی‌داری در صفت نرخ باروری مشاهده گردید ($p<0.01$). ولی تفاوت معنی داری بین هاپلوتایپ‌های شماره یک و چهار و همچنین بین هاپلوتایپ شماره دو و سه با صفت نرخ باروری مشاهده نشده است. در شکم زایش دو و بالا اختلاف معنی‌داری بین هاپلوتایپ‌های شماره یک با بقیه هاپلوتایپ‌ها مشاهده شد($p<0.01$). دلیل این امر می‌تواند مرتبط با فیزیولوژی و عملکرد متفاوت در تلیسه‌ها و گاوها باشد. تلیسه‌ها به دلیل این که تولید شیر ندارند، به راحتی می‌توانند در مقابل استرس گرمایی مقاومت کنند و نرخ باروری بالاتری داشته باشند، در حالی‌که گاوها که همزمان تولید شیر و آبستنی را دارند، بخش بیشتر انرژی خود را صرف تولید شیر می‌کنند. بنابراین گاوهای چند شکم زایش در مقایسه با تلیسه‌ها در مقابل استرس گرمایی حساسیت بیشتری دارند و به دنبال آن نرخ باروری کمتری خواهند داشت.



شکل 1- الکتروفورز اکریل‌آمید محصولات PCR ناحیه پروموتور ژن، پروتئین شوک حرارتی.

Figure 1 - The bovine heat shock protein 70 promoter gene PCR products on polyacrylamid gel electrophoresis for detecting of SSCP patterns.

جدول 1- موقعیت و درصد چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتور ژن، پروتئین شوک حرارتی در نژادهای هلشتاین و سرابی.

Table 1 - Distribution of SNP in the bovine heat shock protein 70 promoter (percent) In Holstein and Sarabi dairy cattle.

موقعیت تک نوکلئوتیدی Position of SNP	تغییرات بازی Base change[1]	نژاد Breed[2]	
		H	S
1) 895	Deletion of	66	48
C		0	33
2) 1045	G to A	0	33
3) 1117	G to A	66	48
4) 1125	A to C	66	48
5) 1128	G to T	0	33
6) 1134	T to C	51	81
7) 1204	T to C		

1) G-Guanine; A-Adenine; C-Cytosine; T-Thymine
2) H- Holstein, S- Sarabi,

جدول 2- توزیع، میانگین و انحراف استاندارد هاپلوتایپ ها برای صفت نرخ باروری در نژاد سرابی و هلشتاین.

Table 2- Distribution, mean and standard deviation of conception rate for haplotypes classes in Holstein and Sarabi dairy cattle.

Haplotaype هاپلوتیپ	Conception Rate نرخ باروری		
	Observation تعداد	Mean میانگین	Std.dev انحراف استاندارد
1	62	0.72	0.44
2	167	0.28	0.45
3	42	0.30	0.46
4	116	0.59	0.49

جدول 3- ارتباط هاپلوتایپ‌های مختلف ناحیه پروموتور ژن (Hsp70) با نرخ باروری در گاوهای نژاد هلشتاین و سرابی.

Table 3 - Association of heat shock protein 70 promoter haplotypes with conception rate in Holstein and Sarabi dairy cattle.

صفت Trait	هاپلوتایپ Haplotaype			
نرخ باروری Conception Rate	CGGAGTT	C(D)GGCTTT	DGGCTTC	CAAAGCC
تلیسه Heifer	$0.84\pm 0.11^{a}(42)$	$0.62 \pm 0.2^{a}(10)$	$0.71 \pm 0.11^{a}(49)$	$0.89 \pm 0.15^{a}(18)$
شکم زایش اول First parity	$0.64\pm0.14^{a}(33)$	$0.32\pm0.2^{b}(10)$	$0.2\pm0.12^{b}(44)$	$0.88\pm0.16^{a}(14)$
شکم زایش دوم به بالا Second and more parity	$0.53\pm0.1^{b}(41)$	$0.23\pm0.13^{c}(22)$	$0.24\pm0.1^{c}(74)$	$0.67\pm0.1^{a}(30)$

اعداد داخل پرانتز تعداد رکورد تلقیح‌های انجام شده در داخل هر هاپلوتایپ برای هر شکم زایش می‌باشد.

در جدول 4 مقادیر میانگین حداقل مربعات هاپلوتایپ‌های مختلف به همراه انحراف معیار آنها برای نژادهای سرابی و هلشتاین بصورت جداگانه ذکر گردیده است. نتایج تجزیه واریانس برای نژادها بصورت جداگانه نتایج حاصل از آنالیز بصورت در نظر گرفتن دو نژاد با هم را تایید می-

کند. همانطوری‌که از نتایج جدول 4 مشخص است بیشترین نرخ باروری در نژاد هلشتاین مربوط به هاپلوتایپ شماره 4 است که اختلاف معنی‌داری با هاپلوتایپ‌های 2 و 3 دارد. لازم به ذکر است که هاپلوتایپ شماره 1 در این نژاد مشاهده نشد. همچنین در نژاد سرابی بیشترین باروری مربوط به هاپلوتایپ 1 و 4 است که اختلاف معنی داری با هاپلوتایپ 2 دارند. در این نژاد هاپلوتایپ شماره 3 مشاهده نشد. در هر دو نژاد هاپلوتایپ شماره 4 از نظر نرخ باروری بهتر بود و هاپلوتایپ شماره 2 در هر دو نژاد کمترین نرخ باروری را داشت. در مطالعه‌ای که توسط Rosenkrans *et al.* (2010) انجام شده بود. آنها در آنالیز آماری بجای الگوهای باندی (هاپلوتایپ) از نوع ژنوتیپ ها استفاده کرده بودند و اثر آن را بر درصد گوساله زایی گزارش کرده بودند که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت دارد. همچنین آنها تعداد 11، SNP پیدا کرده بودند ولی در این مطالعه ما تعداد هفت، SNP مشاهده شد.

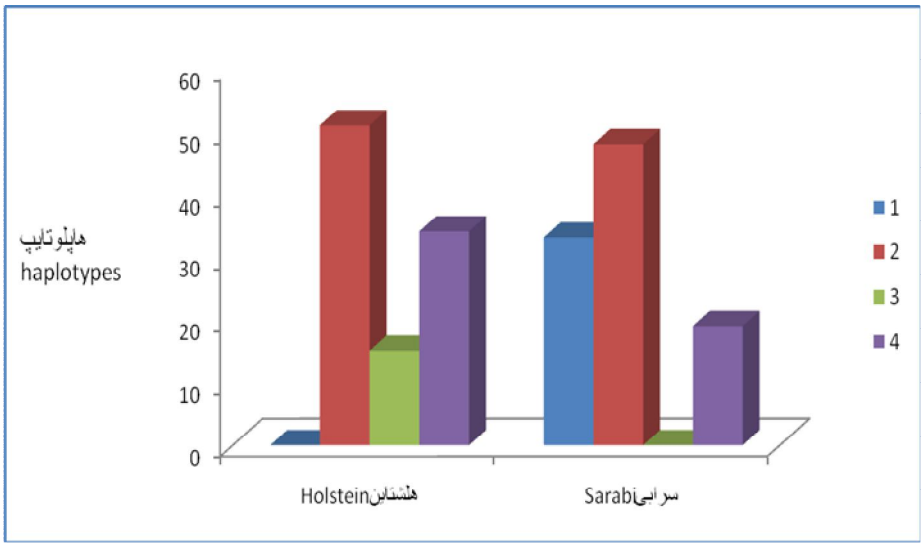


Figure 2 - The promoter region distribution of the bovine heat shock protein 70 gene, haplotypes in Holstein and Sarabi dairy cattle.

شکل 2- فراوانی هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در ناحیه پروموتور ژن، پروتئین شوک حرارتی در بین دو نژاد هلشتاین و سرابی.

جدول 4- ارتباط هاپلوتایپ‌های مختلف ناحیه پروموتور ژن (Hsp70) با نرخ باروری در گاوهای نژاد هلشتاین و سرابی.

Table 4 - Association of heat shock protein 70 promoter haplotypes with conception rate in Holstein and Sarabi dairy cattle.

نژاد Breed	هاپلوتایپ Haplotaype			
	CGGAGTT	C(D)GGCTTT	DGGCTTC	CAAAGCC
هلشتاین Holstein	0.59 ± 0.08^{b}(79)	0.34 ± 0.09^{a}(42)	0.33 ± 0.07^{a}(134)	-
سرابی Sarabi	0.61 ± 0.12^{a}(37)	-	0.32 ± 0.12^{b}(32)	0.72 ± 0.08^{a}(62)

اعداد داخل پرانتز تعداد رکورد تلقیح‌های انجام شده در داخل هر هاپلوتایپ است.

نتیجه‌گیری

بطور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نخست روش PCR-SSCP برای مطالعه چندشکلی تک نوکلئوتیدی موجود در ناحیه پروموتور ژن Hsp70 و بررسی ارتباط آنها با صفت نرخ باروری مناسب است و دوم اینکه در نژادهای مورد مطالعه ارتباط معنی داری بین صفت مورد بررسی با هاپلوتایپ‌های ناحیه مورد مطالعه وجود دارد. با توجه به اینکه صفت نرخ باروری توسط برایند اثر چندین جایگاه ژن کنترل می‌شود، بررسی وضعیت یک ناحیه از ژن و ارتباط آن با صفت مورد نظر ، به تنهایی برای هر نوع نتیجه‌گیری جامع کافی نیست و تعیین توام چندین ژن عمده تاثیرگذار بر تولید مثل و نرخ‌باروری مورد نیاز است. در نهایت شاید بتوان از نتایج حاصل از چنین پژوهش‌هایی در برنامه‌های انتخاب بر اساس نشانگر در برنامه-های اصلاح نژاد صفات تولیدمثلی استفاده کرد.

بطور کلی دو راه‌کار مجزا در مناطق گرمسیری جهت افزایش تولید گاوهای شیرده وجود دارد. یکی از این راه‌کارها، استفاده از نژادهای سازگار به شرایط تنش گرمائی و راهکار دوم تغییر شرایط پرورش گاوهای شیرده به منظور کاهش اثر تنش حرارتی و امکان رسیدن گاوها به حداکثر پتانسیل ژنتیکی از نظر تولید شیر می‌باشد. استفاده از نژادهای سازگار با شرایط محیطی یا استفاده از آمیخته‌گری بین نژادهای اروپائی و بومی تنها در مناطقی از جهان مفید است که کیفیت خوراک در این مناطق پائین بوده و قیمت شیر نیز چندان بالا نمی‌باشد و امکان استفاده از گاوهای نژاد اروپائی در این مناطق وجود ندارد(Hansen and Aréchiga, 1999).

با توجه به اهمیت حفظ نژادهای بومی می-توان با یک برنامه ریزی دقیق و مدون اصلاح نژادی و با وجود زیرساختهای لازم (مطالعه و

شناسایی) به صورت حساب شده‌ای به اصلاح گاوهای نژاد سرابی برای صفات مد نظر اصلاحگر اقدام نمود. و همچنین می‌توان با تعیین یک برنامه دقیق به تلاقی‌گری بین این نژاد و نژادهای پر تولید خارجی اقدام کرد. به نحوی که علاوه بر حفظ توده اصیل نژادهای بومی به منظور استفاده از پتانسیل-های این نژادها در آینده ، حیوانات آمیخته‌ای تولید نمود که با حفظ خصوصیات مطلوب نژادهای بومی تولید شیر بالاتری داشته باشند به گونه ای که پرورش آنها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد.

در این میان محدود بودن نیازهای نژادهای بومی به غذا، مقاومت نسبی این دام‌ها نسبت به برخی بیماریهای بومی منطقه و سازگاری آنها با شرایط اقلیمی و محیطی منطقه، موجب شده تا پرورش این حیوانات به عنوان یک گزینه مناسب، مد نظر قرار گیرد. در مرحله بعد برای اصلاح این دام‌ها باید برنامه ریزی دقیقی صورت پذیرد تا در آینده این دامها از نظر سطوح تولیدی بتوانند با دام-های خارجی رقابت کنند در غیر این صورت آینده-ی دام‌های بومی چیزی غیر از نابودی یا محدود شدن جمعیت آنها نخواهد بود.

در اصلاح نژاد دام‌های بومی و افزایش تولیدات دامی استفاده از مارهای ژنتیکی و توالی کل ژنوم می‌تواند مفید واقع شود. نتیجه این مطالعه نشان داد که ناحیه بالادست ژن Hsp70 چندشکلی بالایی دارد و علاوه بر آن ارتباط معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های مشاهده شده در این ناحیه با داده های نرخ آبستنی، و اختلاف معنی داری که بین هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در صفت نرخ باروری داشت، نشان می‌دهد که می‌تواند در استراتژیهای اصلاح نژادی برای صفت مقاومت به استرس گرمایی مورد استفاده واقع شود.

سپاسگزاری

از مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور و مرکز اصلاح نژاد دام سرابی جهت فراهم نمودن امکانات لازم برای نمونه برداری از نژاد سرابی و گاوداری فکا اصفهان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

Alizadeh A, Kamali GH, Mousavi F, Mousavi-Bygi M (2005). weather & climate, Ferdowsi University of Mashhad, publication No, 182. Iran.

Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA (1994). Molecular evolution of the HSP70 multigene family. Journal of Molecular Evolution 38: 1-17.

Cavestany D, El-Wishy AB, Foote RH (1985) Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein Cattle. Journal of Dairy Science 68: 1471-1478.

Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP, Baumgard LH (2008). Invited Review: Genes involved in the bovine heat stress response. Journal of Dairy Science 91: 445-454.

Ferdowsi HR, Adibmoradi M , Asadi MR, Rezakhani AH, Hasani Bafarani AR (2008). Histological Study of the Teat of Sarabi Cattle. Proc. The 15th Congress of FAVA. Pp. 289-290

Garcı´a-Ispierto, Lo´pez-Gatius F, Bech-Sabat G, Santolaria P, Ya´niz JL, Nogareda C, DeRensis F, Lo´pez-Bejar M (2007). Climate factors affecting conception rate of high producing dairy cows in northeastern Spain. Theriogenology 67: 1379-1385

Huang SY, Chen MY, Lin EC, Tsou HL, Kuo YH. Ju CC, Lee WC (2002). Effects of single nucleotide polymorphisms in the 5-flanking region of heat shock protein 70.2 gene on semen quality in boars. Animal Reproduction Science 70: 99-109

Hansen PJ, Aréchiga CF (1999). Strategies for Managing Reproduction in the Heat-Stressed Dairy Cow. Journal of Animal Science 77:36-50

Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E (2002). Heat stress in lactating dairy cows: a review. Livestock Production Science 77 : 59–91

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleotide Acids Research 16: 1215

Rosenkrans Ch Jr, Banks A, Reiter S, Looper M (2010). Calving traits of crossbred Brahman cows are associated with Heat Shock Protein 70 genetic polymorphisms. Animal Reproduction Science 119: 178-182

SAS (Statistical Analysis Systems) (2004). User's Guide. Version 9.1. SAS Institute Inc, Cary.

St-Pierre NR, Cobanov B, Schnitkey G (2003). Economic losses from heat Stress by US livestock industries. Journal of Dairy Science 86: 52-77

Ravagnolo O, Misztal I (2002). Effect of Heat Stress on Nonreturn Rate in Holsteins: Fixed-Model Analyses. Journal of Dairy Science 85:3101-3106

Vector NTI Advance 9.0 (2003). User's Manual. InforMax Technical Support. USA

Study of polymorphism in the bovine HSP70 gene promote and its association with conception rate in Holstein and Sarabi breeds

Ghaffari M[*1]., Sadeghi M[2]., Nejati-Javaremi A[3]., Moradi-Shahrbabak M[4]., Faraji R[5].

[1]Ph.D. student, Department of Animal Science, University of Tehran, Karaj, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Tehran, Karaj, Iran.
[3]Associate Professor, Department of Animal Science, University of Tehran, Karaj, Iran.
[4]Professor, Department of Animal Science, University of Tehran, Karaj, Iran.
[5]M.Sc. student, Department of Animal Science, University of Tehran, Karaj, Iran.

Abstract

The objective of the present study was to determine single nucleotide polymorphisms (SNP) located in the promoter region of the bovine heat shock protein 70 (Hsp70) gene. And evaluate associations between Hsp70 SNP with conception rates in Holstein and Sarabi cows. Blood samples were collected from 124 cows. The Cows were Holstein (n=72) and Sarabi (n=52). Genomic DNA was extracted using modified salting-out method. The quantity and quality of extracted DNA were examined with spectrophotometery and gel electrophoresis. Specific primers were designed for PCR amplification of a 539 base segment of the bovine Hsp70 promoter. The polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) method was used to scan for mutations within the amplified regions. The polymorphisms were confirmed by direct sequencing. Seven single nucleotide polymorphisms were detected; one deletion at base position 895 four transitions (G1045A, G1117A, T1134C and T1204C), and two transversions (A1125C, G1128T). And also four haplotypes were detected (CAAAGCC, DGGCTTC, CDGGCTTT, CGGAGTT). Statistical analysis showed polymorphism in the promoter region of the bovine heat shock protein 70 region significantly correlated with conception rate ($P < 0.0001$). Interestingly in Holstein breed the haplotype (CGGAGTT) of the significant mean conception rate heavier than had haplotypes (DGGCTTC, CDGGCTTT) and in Sarabi breed the haplotypes (CGGAGTT,CAAAGCC) of the significant mean conception rate heavier than had haplotype (DGGCTTC) ($P < 0.01$). The result of present study verified candidate SNPs within the promoter region of the bovine Hsp70 gene may be useful in selecting cows with a greater fertility.

KEY WORDS: *Heat stress, Haplotypes, SNP, PCR-SSCP.*

[*] Corresponding Author: Ghaffari M. Tel: 09354642179 Email: arazghaffari@ut.ac.ir

غفاری و همکاران، 1392