دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

ارتباط چندشکلی ژن POU1F1 با صفات رشد و شیر در بز مهابادی

زهرا جعفری[۱]، سید رضا میرائی آشتیانی[۲] و مصطفی صادقی[۳]

۱ و ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۲- استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، (نویسنده مسوول: ashtiani@ut.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۲

چکیده

یکی از جدیدترین روش‌هایی که می‌تواند باعث بهبود صحت پیش‌بینی و افزایش پاسخ به انتخاب شود، انتخاب بر اساس نشانگرها است. تحقیقات نشان داده است که ژن POU1F1(Pit-1) نقش مهمی در تنظیم رشد حیوانات داشته و با صفات لاشه، وزن و شیر ارتباط دارد. هدف از این تحقیق، مطالعه چندشکلی ژن POU1F1 و بررسی ارتباط آن با صفات رشد و شیر در بزهای مهابادی بوده است. برای این منظور از ۱۳۶ راس بز و بزغاله مهابادی خون‌گیری به‌عمل آمد و DNA به روش بهینه یافته نمکی استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر یک قطعه ۳۲۴ جفت بازی از اگزون شش و ناحیه 5'flanking ژن POU1F1 با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی انجام گرفت. محصولات PCR با روش RFLP و با استفاده از آنزیم برشی AluI هضم شدند. چندشکلی جایگاه POU1F1- AluI (تیمین به سیتوزین)، اثر معنی‌داری روی تعداد سلول‌های بدنی بیشتر داشت، ولی روی صفت تولید شیر، چربی و پروتئین شیر و صفات مربوط به وزن اثر معنی‌داری نداشت. بنابراین، آلل T این جایگاه ممکن است به عنوان یک آلل مناسب برای کاهش تعداد سلول‌های بدنی کمتر در انتخاب بر اساس نشانگر مولکولی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، POU1F1، بز مهابادی، RFLP

مقدمه

روش‌های نوین مولکولی بر تجزیه و تحلیل ژنوم متمرکز است، تا امکانات جدیدی را برای ارزیابی پیچیده‌ای از صفات مهم اقتصادی در حیوانات مزرعه‌ای فراهم آورد. از جمله صفات اقتصادی مهم که صفات کمی نیز هستند می‌توان به تولید گوشت و شیر اشاره کرد که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند البته تعداد محدودی از این ژن‌ها دارای اثرات اصلی می‌باشند. لذا، شناخت این ژن‌ها و تعیین توالی و جهش‌هایی که در آنها رخ داده و ممکن است عملکرد حیوانات و همچنین ارزش اصلاحی آن‌ها را تغییر دهد امری ضروری به نظر می‌رسد (۹). در بزهای صنعتی صفت رشد برای اصلاح گران و

Archive of SID

www.SID.ir

برای تعیین ارزش اقتصادی دام بسیار مورد توجه است. صفت رشد تحت کنترل دوران بارداری، تعداد بچه در هر زایش، جنس، تنوع محیطی و ژنتیک است. در طی زمان و با پیشرفت علم ژنتیک و بیوتکنولوژی، نژادهای بز در میان اصلاح‌گران توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند و انتخاب با صحت بیشتر به‌وسیله انتخاب به کمک نشانگر ممکن شده است. پیدا کردن نشانگرهای ژنتیکی صفات رشد، نخستین و قاطع‌ترین قدم، برای بنا نهادن سیستم انتخاب به کمک نشانگرها می‌باشد (۲۲). پس از مشخص شدن ضرورت ژن‌های هورمون رشد و پرولاکتین برای رشد و شیردهی، مکانیسم تنظیم آن‌ها از لحاظ مولکولی مورد بررسی قرار گرفت و منجر به کشف Pit-1 شد. تجزیه ناحیه بالادست مکان شروع نسخه‌برداری، ناحیه غنی از AT را در ژن‌های هورمون رشد و پرولاکتین نشان داد و مشخص شد که این ناحیه AT برای بیان ژن‌های هورمون رشد و پرولاکتین ضروری است (۱۳). Pit-1 در سال ۱۹۸۸ بر اساس تمایل ترکیب بالایش به مکان‌های AT همسانه سازی شد و کنترل نسخه برداری هورمون رشد و پرولاکتین توسط Pit-1 به اثبات رسید (۱۰). تحقیقات بیشتر همچنین نشان داد که Pit-1 نسخه‌برداری ژن زیر واحد بتا هورمون محرکه تیروئید[1]، ژن گیرنده آزاد کننده هورمون رشد[2] و خود ژن Pit-1 را تنظیم می‌کند (۲۴) و نقشی اساسی در تمایز و توسعه سه نوع از سلول‌های آدنوهیپوفیز[3] (سوماتوتروپیک، لاکتوتروپیک و تیروتروپیک)[4] دارد (۸) مطالعه ژن Pit-1 نشان داده است که این ژن با نرخ رشد، صفات لاشه و تولید شیر، وزن تولد، وزن از شیرگیری، چربی پشت، در حیوانات اهلی همبستگی دارد (۲۴). ژن POU1F1 دارای شش اگزون و پنج اینترون است (۶) که در بز، گوسفند و گاو روی کروموزوم یک قرار دارد (۲۱). چهار جهش در اگزون شش ژن POU1F1 بز یافت شده است (۶). لن و همکاران (۷) در نه نژاد بز چینی، یکی از این جهش‌ها را که یک جهش خاموش بود، به‌وسیله آنزیم برشی *Alu*I به روش PCR-RFLP[5] شناسایی کردند. این جهش در نوکلئوتید ۱۷۴ اگزون شش و ناحیه flanking[6] ژن POU1F1 رخ می‌دهد و باعث تبدیل T به C می‌شود. لن و همکاران (۷)، دریافتند که در این نژادها، بین افراد با ژنوتیپ هموزیگوت (TT) و هتروزیگوت (TC) و صفات تولید شیر و وزن تولد همبستگی معنی‌دار وجود دارد ($P<0/05$) و افراد با ژنوتیپ TC تولید شیر بالاتر و وزن تولد سبک‌تر نسبت به افراد با ژنوتیپ TT دارند ($P<0/05$). در این بزها همبستگی معنی‌داری بین این چندشکلی و صفات چندقلوزایی، وزن یک‌سالگی و دوسالگی یافت نشد (۷). باستوس و همکاران (۱)، تمامی شش اگزون ژن POU1F1 در گوسفند را توالی یابی نموده اند و جهش های آن شناسایی کرده‌اند. همچنین مشخص شده است که ژن POU1F1 گاوی، اثر معنی‌داری بر تولید شیر و پروتئین شیر دارد (۱۸). مطالعه ای توسط صادقی و همکاران (۱۹) روی ژن Pit-1 گاوی و ارتباط آن با صفات شیر در گاوهای هلشتاین ایران صورت گرفت که در

1- TSHβ 2- GHRH-R

۳- در برگیرنده هیپوفیز پیشین، هیپوفیز میانی و ساقه هیپوفیز پیشین می‌باشد.

4- Somatotrophs, lactotrophs, thyrotrophs

5- polymerase chain reactions (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP)

۶- ناحیه‌ای از DNA که نزدیک انتهای ژن می‌باشد

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعه آنها، این ژن روی تولید شیر و چربی شیر اثر معنی‌داری نداشته، ولی روی پروتئین شیر اثر معنی‌داری داشت. مطالعات چندشکلی این ژن در گاو (۱۵،۲) و گاو گوشتی (۲۴) بوفالو و گاو هلشتاین (۱۱)، نیز گزارش شده است. بین چندشکلی‌های ژن Pit-1 در خوک و عملکرد رشد، وزن بدن و متوسط افزایش وزن روزانه همبستگی معنی‌داری وجود دارد (۲۳).

در ژن Pit-1 مرغ‌ها نیز ۲۳ جهش پیدا شده و گزارش شده است که این چندشکلی‌ها با صفت رشد، کیفیت لاشه و وزن بدن در جوجه‌ها، همبستگی دارند (۱۷،۱۴).

با توجه به نتایج تحقیقات انجام شده، ژن POU1F1 روی رشد و صفات تولیدی موثر می‌باشد. بنابراین این ژن می‌تواند به‌عنوان ژن مهم و کاندید برای صفات تولیدی و اصلاح نژاد با انتخاب به وسیله مارکرها در حیوانات اهلی و همچنین بز، مورد توجه و بررسی قرار گیرد، با توجه به این نکات در این مطالعه، چندشکلی یک جایگاه از ژن POU1F1 در بز مهابادی و ارتباط بین این چند شکلی با تغییرات صفات مربوط به رشد، تولید شیر و ترکیبات آن مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

محقیق این مطالعه به همراه جمعی از دانشجویان، از تعداد ۱۳۶ رأس از بزها و بزغاله‌های مهابادی موجود در مزرعه آموزشی و پژوهشی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، واقع در کرج، با استفاده از ونوجکت‌های شش میلی لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ وداج خون‌گیری به عمل آوردند. جمع آوری اطلاعات فنوتیپی توسط مسئولین این امر در مزرعه صورت گرفت. در این مطالعه DNA به روش بهینه یافته نمکی[1] استخراج شد (۵). کیفیت و کمیت DNA به روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۱٪ به‌وسیله دستگاه الکتروفورز افقی بررسی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه ترموسایکلر با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی این ژن که به وسیله نرم‌افزار VectorNTI توسط مؤلفین (محقیق) طراحی شد، انجام گرفت. این آغازگرها عبارت بودند از:

آغازگر رفت[2]
5'TCATCTCCCTTCTTCTTTCCTG3'
آغازگر برگشت[3]
5'CTGATTTCTACTTTGGCTGGAG3'

اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل:
بافر PCR۱X، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۲/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۴ میلی‌مولار آغازگر رفت و ۰/۴ میلی‌مولار آغازگر برگشت، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز و ۵۰-۱۰۰ نانو گرم از DNA الگو بود.

چرخه‌های دمایی و زمانی زیر در نهایت برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در دستگاه ترموسایکلر مدل BIOER XP بهینه شد و به صورت زیر بود:

یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه

۱- در طی مراحل استخراج علاوه بر اضافه کردن نمک اشباع از کلروفورم نیز استفاده شد وکلیه شرایط استخراج (غلظت بافرها ...) بهینه گردید.
2- Forward
3- Reverse

Archive of SID

www.SID.ir

شامل: واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و بسط آغازگرها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، یک چرخه مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود.

پس از اتمام PCR برای اطمینان از تکثیر صحیح جایگاه مورد نظر ژن POU1F1، الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ انجام شد و برای رنگ آمیزی از DNA Safe stain استفاده و ژل به‌وسیله اشعه ماورای بنفش بررسی شد. سپس قطعه تکثیر یافته در معرض آنزیم محدود کننده *Alu*I[1] قرار داده شد تا تشخیص آلل‌های ژن POU1F1 امکان پذیر شود.

اجزای واکنش هضم در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ میکرولیتر محصول PCR هر نمونه، آب ۳/۱۵ میکرولیتر، آنزیم ۰/۳۵ میکرولیتر و بافر تانگو ۱/۵ میکرولیتر بود. پس از مخلوط کردن این مواد درون میکروتیوب ۰/۲، نمونه‌ها به مدت ۱۵-۱۳ ساعت درون بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا آنزیم فعالیت برشی خود را انجام دهد.

برای شناسایی ژنوتیپ‌ها الکتروفورز محصولات هضم روی ژل آگارز ۲٪ به طول چهار سانتی‌متر انجام و از ولتاژ ۸۰ به مدت ۵۰ دقیقه استفاده شد.

برای محاسبه فراوانی ژنی و ژنوتیپی و بررسی تعادل هاردی واینبرگ جایگاه مورد نظر، از نرم‌افزار GenAlEx 6.41 استفاده شد (۱۶)، برای تعیین ارتباط بین گروه‌های ژنوتیپی از آنالیز واریانس استفاده و مقایسه میانگین‌ها از طریق حداقل میانگین مربعات[2] انجام شد. تعداد بز مورد مطالعه برای صفات مربوط به شیر ۹۶ راس و برای صفات مربوط به وزن ۴۰ راس بود. پس از تعیین ژنوتیپ تک تک دام‌ها برای جایگاه مورد بررسی این اطلاعات به همراه داده‌های مربوط به تولید شیر، پروتئین، چربی و شمارش سلول‌های بدنی به‌وسیله نرم‌افزار EXCEL ویرایش شد برای آزمون نرمال بودن داده‌ها از تست شاپیرو- ویلک و برای نرمال‌سازی داده‌های غیر نرمال از روش box cox در نرم‌افزار SAS 9.1 (۲۰) استفاده و داده‌های غیرنرمال، نرمال شدند. سپس از رویه Mixed نرم‌افزار SAS 9.1 برای آنالیز داده‌های مربوط به شیر استفاده شد.

ژنوتیپ‌های مشاهده شده ژن POU1F1، سن حیوان هنگام زایش و ماه رکوردگیری به عنوان عامل ثابت تأثیرگذار بر صفات مربوط به شیر و اثر وزن حیوان هنگام زایش به عنوان متغییر همبسته[3] در مدل قرار داده شد. اطلاعات مربوط به صفات رشد بزغاله نیز از قبیل وزن مادر هنگام زایش، وزن تولد، وزن از شیر گیری، وزن شروع پروار (۸۰ روز پروار) و تعداد روز از تولد تا شیرگیری (به عنوان متغیر همبسته) و ژنوتیپ‌های مشاهده شده ژن POU1F1، سال تولد (عامل ثابت) وارد نرم‌افزار EXCEL شد و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و رویه GLM انجام شد.

۱- تهیه شده از شرکت فرمنتاز، شماره کاتالوگ ER0011

2- Lsmeans

3- Co-variate

Archive of SID

www.SID.ir

به طورکلی معادله مدل استفاده شده برای آنالیز واریانس به صورت زیر بود:

مدل آماری مربوط به صفات شیر:

$y_{ijklm} = \text{«} + A_i + G_j + M_k + b\,(W_{ijkl} - \overline{W}) + Animal_l + e_{ijklm}$

که در آن y_{ijklm}: هر یک از مشاهدات مربوط به حجم شیر، درصد چربی و پروتئین شیر و میزان سلول‌های بدنی

« : میانگین صفت در جامعه

A_i: اثر i امین سن حیوان هنگام زایش

G_j: اثر j امین ژنوتیپ

M_k: اثر k امین ماه رکوردگیری

b: ضریب تابعیت y روی W (وزن دام‌ها در هنگام زایش)

W_{ijkl}: وزن دام‌ها در هنگام زایش

$\overline{W}$: میانگین وزن دام‌ها در هنگام زایش

$Animal_l$: اثر تصادفی حیوان

e_{ijklm}: اثر عوامل باقیمانده

مدل آماری مربوط به صفات رشد:

$y_{ijkl} = \mu + G_i + S_j + b_1\,(W_{ijk} - \overline{W}) + b_2\,(D_{ijk} - \overline{D}) + Animal_k + e_{ijkl}$

y_{ijkl}: هر یک از مشاهدات مربوط به وزن تولد، وزن از شیرگیری، افزایش وزن روزانه[1] و وزن نهایی[2] میانگین صفت در جامعه

G_i: اثر i امین ژنوتیپ

S_j : اثر j امین سال تولد

b_1: ضریب تابعیت y از وزن دام‌ها در هنگام ثبت رکورد

W_{ijk}: وزن دام‌ها در هنگام ثبت رکورد

$\overline{W}$: میانگین وزن دام‌ها

b_2: ضریب تابعیت y از تعداد روز از تولد تا شیرگیری

D_{ijk}: تعداد روز از تولد تا شیرگیری

$\overline{D}$: میانگین تعداد روز از تولد تا شیرگیری

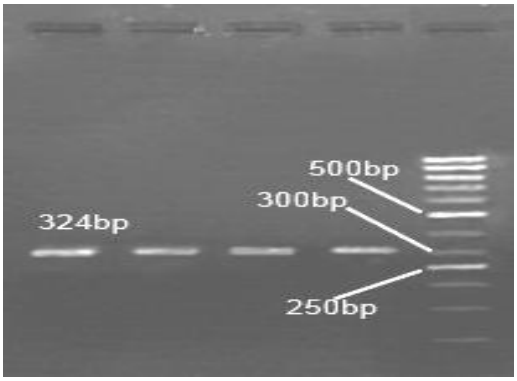
$Animal_k$: اثر تصادفی حیوان

e_{ijkl}: اثر عوامل باقیمانده

نتایج و بحث

تکثیر قطعه ۳۲۴ جفت بازی از اگزون شش و ناحیه 5'flanking ژن POU1F1

در شکل ۱ قطعه ۳۲۴ جفت بازی ژن POU1F1 روی ژل آگارز ۲٪ مشاهده می‌شود. نشانگر اندازه استفاده شده در کنار محصولات PCR صحت تکثیر، را تأیید می‌کند.



شکل ۱- الکتروفورز قطعه ۳۲۴bp حاصل از تکثیر ژن POU1F1 روی ژل آگارز ۲٪ (نشانگر اندازه ۵۰bp).

۱- افزایش وزن بزغاله از تولد تا شیرگیری آنها که بر تعداد روزها تقسیم شده است.

۲- تعداد دام بعد از ۸۰ روز پروار و در هنگام کشتار دام.

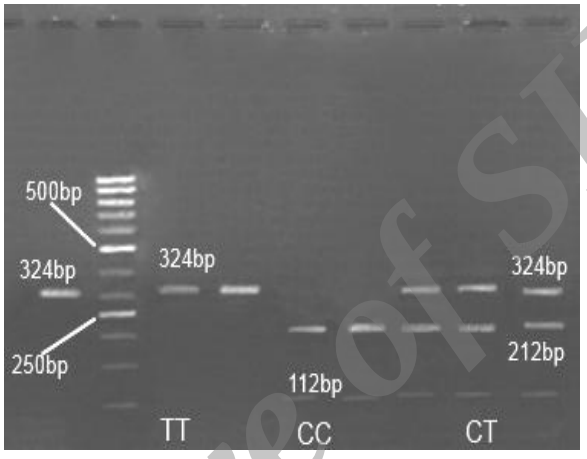
Archive of SID

www.SID.ir

بررسی چندشکلی جایگاه POU1F1-*Alu*I

هضـم قطعه ۳۲۴bp از اگزون شش و ناحـــیه flanking ژن POU1F1 توسط آنزیم برشی *Alu*I نشان می‌دهد که یک نقطه برشی در این قطعه وجود دارد.

آلل وحشی T بدون توالی شناسایی برای این آنزیم بوده درحالی‌که آلل C دارای یک ناحیه شناسایی در نوکلئوتید ۱۷۴ اگزون شش بوده و قطعات ۲۱۲bp و ۱۱۲bp را تولید می‌کند. دام هتروزیگوت (CT) دارای هر سه قطعه ۲۱۲bp، ۱۱۲bp و ۳۲۴bp می‌باشد (شکل ۲). تبدیل نوکلئوتید T به C در نوکلئوتید ۱۷۴ اگزون شش آلل جهش یافته باعث تغییر در اسید آمینه نمی‌شود AGT:(279Ser):AGC.



شکل ۲- انواع ژنوتیپ‌های جایگاه POU1F1-*Alu*I تک باند سمت چپ تصویر، محصول PCR این ژن به‌عنوان کنترل می‌باشد (نشانگر اندازه ۵۰bp).

تعیین فراوانی ژنی و ژنوتیپی در جایگاه POU1F1-*Alu*I:

در جمعیت ۱۳۶ رأسی مورد مطالعه بز مهابادی، فراوانی آلل C ۰/۱۲۱، فراوانی آلل T ۰/۸۷۹ و فراوانی ژنوتیپ TT ۰/۷۷۲، فراوانی ژنوتیپ TC ۰/۲۱۳، فراوانی ژنوتیپ CC ۰/۰۱۵ بود.

تجزیه واریانس اثر چندشکلی ژن POU1F1 بر صفات تولید شیر و وزن

توصیفات آماری داده‌های خام مربوط به رکورد شیر و صفات مربوط به وزن که با استفاده از رویه means نرم‌افزار SAS 9.1 محاسبه شده است در جدول ۱ ارائه گردیده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- میانگین، تعداد رکورد، انحراف معیار و ضریب تغییرات صفات مربوط به رکورد شیر و وزن

صفت	تعداد رکورد	ماکزیمم	مینیمم	میانگین	انحراف استاندارد	ضریب تغییرات
تولید شیر (گرم) (TD)	۸۲۴	۲۰۰۰	۵۰	۶۰۷/۷۵	۳۵۰/۴۴	۵۷/۶۶
پروتئین شیر (درصد) (TD)	۲۰۶	۶/۸۷	۲/۲۹	۴/۱۴	۰/۶۶	۱۵/۸۸
چربی شیر (درصد) (TD)	۲۰۶	۱۲/۵۶	۰/۲	۲/۲۶	۱/۹۵	۸۶/۲۶
تعداد سلول‌های بدنی ×۱۰۰۰ (به ازای هر میلی‌لیتر) (TD)	۲۰۵	۱۳۸۵۳	۵/۱۷	۹۰۸/۴۳	۲۰۱۵/۰۱	۲۲۱/۸۱
افزایش وزن روزانه (کیلوگرم)	۳۹	۰/۲۷	۰/۰۶	۰/۱۴	۰/۰۴	۳۱/۷۷
وزن تولد (کیلوگرم)	۴۰	۵	۲/۱۸	۳/۳۵	۰/۶۴	۱۸/۹۸
وزن از شیرگیری (کیلوگرم)	۳۹	۳۰/۵	۹/۲	۱۹/۷۲	۵/۱۶	۲۶/۱۵
وزن نهایی (کیلوگرم)	۳۸	۴۲/۶	۱۸/۹	۲۹/۲۵	۵/۷۵	۱۹/۶۶

TD=Test day

با توجه به‌اینکه ضریب تغییرات یک صفت، معیاری برای تعیین میزان تنوع آن صفت به شمار می‌رود، ضرایب تغییرات دیده شده در این تحقیق نشان می‌دهد که پراکندگی چشم‌گیری برای صفات تعداد سلول‌های بدنی و چربی شیر در مقایسه با دیگر صفات وجود دارد که یکی از منابع این تنوع می‌تواند نحوه اندازه گیری این صفات باشد، علت دیگر می‌تواند پایین بودن تعداد نمونه باشد.

بررسی آماری ارتباط بین صفات مربوط به شیر و وزن با همه عوامل مدل به جز ژنوتیپ‌ها

به علت همبستگی بالای دو صفت سن حیوان هنگام زایش و وزن حیوان هنگام زایش، در هر مدل فقط یکی از این دو صفت قرار داده شد. سن حیوان هنگام زایش تأثیر معنی‌داری روی صفت پروتئین (P<۰/۵) داشت. وزن حیوان هنگام زایش اثر معنی‌داری روی صفت تولید شیر (P<۰/۰۱) و چربی شیر (P<۰/۰۱) داشت. ماه رکوردگیری تأثیر معنی‌داری روی صفت تولید شیر (P<۰/۰۱) داشت، بیشترین مقدار تولید شیر مربوط به اردیبهشت ماه و کمترین مقدار تولید شیر مربوط به خرداد ماه بود.

وزن تولد، وزن از شیرگیری و تعداد روز از تولد تا شیرگیری اثر معنی‌داری روی صفت افزایش وزن روزانه (P<۰/۰۱)، سال تولد اثر معنی‌داری روی صفت وزن از شیرگیری (P<۰/۰۱)، وزن مادر هنگام زایش اثر معنی‌داری روی صفت وزن تولد (P<۰/۰۱)، و وزن شروع پروار اثر معنی‌داری روی صفت وزن نهایی (P<۰/۰۱) داشت.

بررسی آماری ارتباط بین صفات مربوط به شیر با چندشکلی ژن POU1F1

پس از تعیین ژنوتیپ همه دام‌ها، داده‌های مربوط به رکورد شیر از قبیل تولید شیر، پروتئین، چربی و شمار سلول‌های بدنی، همراه با اطلاعات سن مادرهنگام زایش، سال و ماه و روز و فصل زایش، وزن حیوان هنگام زایش، سال و ماه و روز و فصل رکوردگیری و همچنین تعداد روز بین زمان زایش و رکوردگیری پس از نرمال‌سازی، با رویه Mixed نرم‌افزار SAS 9.1

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی شدند. میانگین حداقل مربعات و انحراف استاندارد صفات مورد مطالعه بعد از نرمال کردن داده‌ها برای ژن POU1F1 در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین حداقل مربعات ژن POU1F1 برای صفات مربوط به شیر

ژنوتیپ	TT	CT	CC
مقدار شیر (گرم)^{ns}	۲۳/۸۵±۰/۴۲	۲۳/۱۴±۰/۵۹	۲۵/۴۰±۳/۱۴
پروتئین (درصد)^{ns}	۰/۵±۰/۰۰۳	۰/۴۹±۰/۰۰۶	۰/۵±۰/۰۰۸
چربی (درصد)^{ns}	۰/۶۶±۰/۲۷	۰/۴۷±۰/۳۲	۰/۱۶±۰/۶۱
تعداد سلول‌های بدنی ×۱۰۰۰ (به ازای هر میلی لیتر)*	۳/۹۴±۰/۲۶^{a}	۴/۳±۰/۲۵^{b}	۴/۵۵±۰/۴^{ab}

حروف لاتین غیر مشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار (در سطح معنی داری ۵ درصد= *) می‌باشد و ns: بیانگر عدم معنی‌داری است.

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بین میانگین حداقل مربعات صفت تولید شیر، درصد پروتئین و چربی شیر، در کلاس‌های مختلف ژنوتیپ POU1F1 اختلاف معنی‌داری وجود ندارد اما جهش جابجایی نوکلئوتید ۱۷۴ اگزون شش ژن POU1F1 (تبدیل T به C) اثر معنی‌داری بر تعداد سلول‌های بدنی بیشتر (P<۰/۰۵) داشت، به‌طوری‌که آلل جهش یافته (C) باعث افزایش تعداد سلول‌های بدنی شده و کلاس ژنتیکی CC به‌طور معنی‌داری سبب تعداد سلول بدنی بیشتر نسبت به کلاس ژنتیکی TT شده است.

این جهش یک جهش خاموش است و باعث تغییر در توالی اسیدآمینه نمی‌شود. این نتایج با نتایج لن و همکاران (۷) که اثر آلل وحشی (T) این جایگاه در بز را با تولید شیر معنی‌دار گزارش کردند، هم‌خوانی ندارد.

بررسی آماری ارتباط بین صفات مربوط به وزن با چندشکلی ژن POU1F1

پس از تعیین ژنوتیپ همه دام‌ها برای ژن POU1F1، داده‌های مربوط به وزن از قبیل وزن تولد، وزن از شیرگیری، افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری، وزن نهایی هنگام کشتار، همراه با اطلاعات افزایش وزن از تولد تا شیرگیری، تعداد روز از تولد تا شیرگیری، سال و ماه و روز تولد، سن مادر هنگام زایش، وزن مادر هنگام زایش، مقدار خوراک مصرفی و وزن شروع پروار وارد برنامه EXCEL شده و مرتب گردیده و پس از نرمال سازی، با نرم‌افزار SAS 9.1 و رویه GLM ارزیابی شدند. میانگین حداقل مربعات و انحراف استاندارد صفات مورد مطالعه بعد از نرمال کردن داده‌ها برای ژن POU1F1 در جدول ۳ آمده است. در نمونه ۴۰ تایی بزغاله‌ها ژنوتیپ CC وجود نداشت.

جدول ۳- مقایسه میانگین حداقل مربعات صفات وزن با چندشکلی ژن POU1F1

ژنوتیپ	TT	CT
وزن تولد (کیلوگرم)^{ns}	۱/۲±۰/۰۷	۱/۱۸±۰/۰۸
افزایش وزن روزانه (کیلوگرم)^{ns}	۰/۱۴±۰/۰۰۵۴	۰/۱۳۶±۰/۰۰۵۳
وزن از شیرگیری (کیلوگرم)^{ns}	۱۴/۹۶±۲/۷۷	۱۵/۹۷±۲/۷۸
وزن نهایی (کیلوگرم)^{ns}	۲۹/۲۷±۱/۴۶	۲۸/۳۶±۱/۶۷

ns: عدم معنی‌داری

Archive of SID

www.SID.ir

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود بین میانگین حداقل مربعات صفات وزن در کلاس‌های مختلف ژن Pit-1 اختلاف معنی‌دار وجود ندارد و تغییر در نوکلئوتید ۱۷۴ اگزون شش ژن POU1F1 (جهش T به C) اثر معنی‌داری بر صفات مربوط به وزن نداشت که این نتایج با نتایج لن و همکاران (۷) که اثر آلل وحشی (T) این جایگاه در بز را با وزن تولد معنی‌دار گزارش کردند، همخوانی ندارد. پن و همکاران (۱۵) یک جهش خاموش (C به T) در اگزون شش گاو مشاهده کردند که هیچ همبستگی بین این چندشکلی و صفات رشد در گاوها یافت نشد. این یافته‌ها با نتایج این مطالعه همسو است. محمد علی ادریس و همکاران (۳)، یک جهش خاموش G به A را در اگزون شش ژن Pit-1 در گاو هلشتاین را بررسی کردند که اثر معنی‌داری روی وزن تولد، درصد چربی و پروتئین شیر، داشت که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد، ولی ژن Pit-1 بر طبق مطالعات آنها، روی تولید شیر اثر معنی‌داری نداشت که این نتیجه با نتیجه این مطالعه همسو است.

در مطالعه صادقی و همکاران (۱۹) بین ژن Pit-1 و تولید شیر و چربی شیر ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد، ولی در آن مطالعه، این ژن روی تولید پروتئین شیر اثر معنی‌داری داشت.

در این مطالعه جهش مورد نظر ژن Pit-1، یک جهش خاموش بود، شاید به همین علت این ژن در این مطالعه اثری معنی‌داری روی صفات شیر و رشد مورد بررسی (به جز SCC) نداشت. همچنین به‌عنوان علت دیگر، می‌توان به پایین بودن تعداد نمونه به خصوص در مورد صفات رشد و روش آنالیز اشاره کرد، اما در مطالعات دیگر محققان، اثر معنی‌دار این جهش روی صفات تولیدی ثابت شده بود، شاید علت این امر این باشد که در نزدیکی این ژن، ژن‌های بزرگ اثر تولیدی که روی صفات رشد موثرند، همانند ژن سوماتواستاتین، قرار دارند. سوماتواستاتین روی کروموزوم یک در نزدیکی ژن Pit-1 قرار داشته و نقش مهمی در تنظیم رشد، رشد ستون مهره و ماهیچه‌ها بازی می‌کند. ژئو و همکاران (۴)، همبستگی معنی‌داری بین این ژن با صفات رشد در گاوهای چینی مشاهده کردند. به علاوه مورسکی و همکاران (۱۲) نیز همبستگی معنی‌داری بین ژن سوماتواستاتین و با صفات رشد و لاشه در گاو آنگوس یافتند.

در جامعه مورد مطالعه به نفع آلل T انتخابی انجام نشده بود زیرا فراوانی این آلل پایین بود. در نتیجه می‌توان گفت، در صورتی‌که شمار سلول‌های بدنی در بز نیز مانند گاو نشانه عفونت‌ها و ورم پستان باشد ممکن است ژن Pit1 برای انتخاب در مقاومت به ورم پستان قابل توجه باشد و با بررسی‌های بیشتر روی آلل T، از آن برای انتخاب حیوان برتر برای این صفت و اصلاح نژاد استفاده شود. به این صورت که، به نفع این آلل انتخاب انجام داده و حیوانات مورد نظر را تعیین ژنوتیپ کرده و با آمیزش‌های برنامه‌ریزی شده به نفع آلل T فراوانی این آلل را در جمعیت افزایش دهیم تا در نهایت فراوانی این صفت نیز افزایش یابد.

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات این پژوهش با تعداد دام نسبتاً پایینی انجام شده بود. با توجه به توزیع ژنوتیپ‌ها پیشنهاد می‌شود که مطالعه‌ای با تعداد دام بیشتر انجام شود تا تعداد حیوانات در هر گروه ژنوتیپی بیشتر شود و در نتیجه بررسی ارتباط ژنوتیپ‌ها با صفات تولیدی از اعتبار بیشتری برخوردار گردد. همچنین پیشنهاد می‌شود صفات تولید و ترکیبات شیر، به‌ویژه درصد چربی و تعداد سلول‌های بدنی شیر دوباره اندازه‌گیری شوند.

منابع

1. Bastos, E., I. Santos, I. Parmentier, J.L. Castrillo, A. Cravador, H. Guedes-Pinto and R. Renaville. 2006. Ovis aries POU1F1 gene: cloning, characterization and polymorphism analysis. Genetica, 126(3): 303-314.
2. Dybus, A., I. Szatkowska, E. Czerniawska-Piatkowska, W. Grzesiak, J. Wojcik, E. Rzewucka and S. Zych. 2004. PIT1-*Hinf*I gene polymorphism and its associations with milk production traits in Polish Black-and-White cattle. Archiv fur Tierzucht, 47(6): 557-564.
3. Edriss, M., V. Edriss and H. Rahmani. 2009. Association of PIT-1 gene polymorphism with birth weight, milk and reproduction traits in Isfahan Holstein cows. Arch Tierz, 52: 445.
4. Gao, L., L. Zan, H. Wang, R. Hao and X. Zhong. 2011. Polymorphism of somatostatin gene and its association with growth traits in Chinese cattle. Genetics and Molecular Research, 10(2): 703-711.
5. Iranpur, M. and A. Esmailizadeh. 2010. Rapid extraction of high quality DNA from whole blood stored at 4ºC for long period. Available from: http://www.protocol-online.org.
6. Lan, X., C. Pan, H. Chen, C. Lei, L. Hua, X. Yang, G. Qiu, R. Zhang and Y. Lun. 2007. DdeI polymorphism in coding region of goat POU1F1 gene and its association with production traits. Asian Australasian Journal Of Animal Sciences, 20(9): 1342.
7. Lan, X., C. Pan, H. Chen, C. Zhang, J. Li, M. Zhao, C. Lei, A. Zhang and L. Zhang. 2007. An *Alu*I PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat POU1F1 locus and its association with production traits. Small Ruminant Research, 73(1): 8-12.
8. Li, S., E.B. Crenshaw, E.J. Rawson, D.M. Simmons, L.W. Swanson and M.G. Rosenfeld. 1990. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. Nature, 347(6293): 528-533.
9. Madeja, Z., T. Adamowicz, A. Chmurzynska, T. Jankowski, J. Melonek, M. Switonski, and T. Strabel. 2004. Short communication: effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. Journal of Dairy Science, 87(11): 3925-3927.
10. Mangalam, H.J., V.R. Albert, H.A. Ingraham, M. Kapiloff, L.Wilson, C. Nelson, , H. Elsholtz and M.G. Rosenfeld. 1989. A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. Genes and development, 3(7): 946-958.
11. Misrianti, R., C. Sumantri and A. Farajallah. 2011. Polymorphism identification of Pit1 gene in Indonesian buffaloes (Bubalus bubalis) and holstein-friesian cows. Media

Archive of SID

www.SID.ir

Peternakan-Journal of Animal Science and Technology, Faculty of Animal Science, Bogor Agricultural University, 33(3).
12. Morsci, N., R. Schnabel and J. Taylor. 2006. Association analysis of adiponectin and somatostatin polymorphisms on BTA1 with growth and carcass traits in Angus cattle. Anim Genet, 37(6): 554-562.
13. Nelson, C., V.R. Albert, H.P. Elsholtz, L. Lu and M.G. Rosenfeld. 1988. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. Science, 239(4846): 1400-1405.
14. Nie, Q., M. Fang, L. Xie, M. Zhou, Z. Liang, Z. Luo, G. Wang, W. Bi, C. Liang and W. Zhang. 2008. The PIT1 gene polymorphisms were associated with chicken growth traits. BMC Genetics, 9(1): 20.
15. Pan, C., X. Lan, H. Chen, D. Yang, L. Hua, X. Yang, C. Lei, Y. Guo, B. Zhang and C. Zhang. 2008. A DdeI PCR-RFLP detecting a novel missense mutation of the POU1F1 gene showed no effects on growth traits in cattle. Czech Journal of Animal Science, 53: 523-527.
16. Peakall, R. and P.E.Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysi in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6: 288-295.
17. Qiu, F.F., Q.H. Nie, W. Jin, J.H. Ouyang, S.M. Lin, H. Sun and X. Zhang. 2006. Association of a 57 bp insertion/deletion in chicken PIT-1 gene with growth and carcass traits. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 28(2): 284-288.
18. Renaville, R., N. Gengler, E. Vrech, A. Prandi, S. Massart, C. Corradini, C. Bertozzi, F. Mortiaux, A. Burny and D. Portetelle. 1997. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. Journal of Dairy Science, 8: 3438-3431:(21)0.
19. Sadeghi, M. 2007. Effect of candidate genes polymorphism on breeding value for milk production traits in Iranian Holsteins. PhD thesis, Department of animal science university College of agriculture and natural resources, University of Tehran. (In Persian)
20. SAS (Statistical Analysis Systems). 2004. User's Guide. Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary.
21. Woollard, J., C.K. Tuggle and F.A. Ponce de Leon. 2000. Rapid communication: localization of POU1F1 to bovine, ovine, and caprine 1q21-22. Journal of Animal Science, 78(1): 242-243.
22. Xu, T., J. Liu, D.Yao, H. Cai, H.Chen, H. Zhou and X. Lan. 2010. The prophet of PIT1 gene variation and its effect on growth traits in chinese indigeous goat. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9(23): 2940-2946.
23. Yu, T., M. Rothschild, C. Tuggle, C. Haley, A. Archibald, L. Marklund and L. Anderson. 1996. Pit-1 genotypes are associated with birth weight in three unrelated pig resource families. Journal of Animal Science, 74(Suppl 1): 122.
24. Zhao, Q. 2002. Genetic markers for genes encoding Pit-1, GHRH-receptor, and IGF-II, and their association with growth and carcass traits in beef cattle. The Ohio State University.

Archive of SID

www.SID.ir

Association of POU1F1 Gene Polymorphism With Growth and Milk Production Traits in Mahabadi Goat Breed

Zahra jafari[1], Seyed Reza Miraei Ashtiani[2] and Mostafa Sadeghi[3]

1and 3- Former M.Sc. Student and Assistant Professor, University of Tehran
2- Professor, University of Tehran (Corresponding author: ashtiani@ut.ac.ir)
Received: February 12, 2013 Accepted: August 24, 2013

Abstract

One of the latest methods which can improve the accuracy of prediction and response to selection is the selection based on markers. Research has shown that the POU1F1 (Pit-1) gene has important role in the regulation of animal growth and associated with carcass, weight and milk traits. The purpose of this research was to study polymorphisms of POU1F1 gene and their association with growth and milk production traits in Mahabadi goat breed. For this purpose blood samples were taken from 136 doe and kids and DNA was extracted by optimized salting-out method. Polymerase chain reactions were used to amplify a 324-bp fragment from exon six of POU1F1 gene and 5'flanking regions using a specific primer pairs. POU1F1 gene is genotyped by *Alu*I PCR-RFLP method. Polymorphism POU1F1-*Alu*I locus (thymine to cytosine) had significant relationship with somatic cell count but on milk yield, milk fat, milk protein and growth traits had no significant effect. Therefore, T allele at POU1F1-*Alu*I locus may be used as a suitable allele for reducing somatic cell count in selection based on molecular marker.

Keywords: Polymorphism, POU1F1, Mahabadi goat breed, RFLP

Archive of SID

www.SID.ir