نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۵، زمستان ۱۳۹۳
ص‌ص: ۲۸۳~۲۹۰

بررسی تاثیر چندشکلی ژن اوستئوپونتین (OPN) روی ارزش اصلاحی برآورد شده صفات تولیدی شیر گاو براون سوئیس

- **سونیا زکی‌زاده** (نویسنده مسئول)

استادیار، گروه علوم دامی، موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهادکشاورزی.

- **هادی غلامی**

کارشناس ارشد، گروه علوم دامی ، واحد کاشمر، دانشگاه آزاد اسلامی، کاشمر، ایران.

- **رضا وکیلی**

استادیار، گروه علوم دامی ، واحد کاشمر، دانشگاه آزاد اسلامی، کاشمر، ایران.

- **محسن قدس روحانی**

استادیار، گروه صنایع‌غذایی، موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهادکشاورزی.

تاریخ دریافت : فروردین ۹۲ تاریخ پذیرش : شهریور ۹۲

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۱۰۷۵۶۹

Email: sonia_zaki@yahoo.com

چکیده

ژن‌اوستئوپونتین (OPN) در انتهای کروموزم ٦ گاو قرار دارد و یکی از ژن‌های موثر بر درصد پروتئین شیر و تولیدمثل است. در این تحقیق، از ۱۰۰ راس گاو براون سوئیس نمونه خون گرفته شد، DNA استخراج و ژنوتیپ گاوها در جایگاه چندشکلی تک نوکلئوتیدی اینترون ٤ با استفاده از آنزیم *Bsr I* به روش PCR-RFLP تعیین شد. با استفاده از روش حداکثر درستنمایی محدود شده، ارزش اصلاحی حیوانات برای سه صفت تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین شیر به‌طور جداگانه پیش‌بینی شد. ارتباط ژنوتیپ با ارزش اصلاحی صفات مورد مطالعه، در سطح معنی‌داری ۵٪، بررسی گردید. فراوانی ژنوتیپ‌هایOPN شامل TT، TC و CC به ترتیب ۰/۳۲، ۰/٤٦ و ۰/۲۲ برآورد شد و جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی واینبرگ بود. در بررسی جایگاه چندشکلی با صفات تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین، ارتباط معنی‌داری در سطح ۵٪ بین ارزش اصلاحی صفات و انواع ژنوتیپ یافت نشد.

واژه‌های کلیدی: استئوپونتین، PCR-RFLP، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، صفات تولیدی شیر.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 105 pp: 283-290

The effect of Osteopontingene polymorphism on milk production traits in Brown Swiss cattle .

By: Zakizadeh[1], S., H. Gholami[2], R. Vakili[3], M. Ghods Rohani[4]
[1,4] Assistant professors of Animal Science and Food Science Departments, Higher Applied Science Technology Institute
[2,3] Department of Animal Science, Kashmar Branch, Islamic Azad University,Kashmar, Iran.
*Corresponding author sonia_zaki@yahoo.com, (Tel;+989153107569)

Received: April 2013 **Accepted: September 2013**

Osteopontin gene is located at the end of chromosome 6 in cattle and it is one of the most important genes influence on milk protein percentage and reproduction. In this study, blood samples were collected from100 Brown Swiss cows and DNA was extracted from whole blood by modified salting out procedure. Cows were genotyped for single nucleotide polymorphism of intron IV by PCR-RFLP and *BsrI* restriction enzyme method. Breeding values were individually predicted for milk production, fat and protein milk percent traits by restricted maximum likelihood method. Association between polymorphisms and breeding values were calculatedat a 5% significant level. Frequencies of TT, TC and CC genotypes were 0.32, 0.46 and 0.22, respectively. Studied population was inaccord with Hardy-Weinberg expectation. There was no significant association between genotypes and breeding values of milk production, fat or protein percent traits.

Key words: Osteopontin gene, PCR-RFLP, Single nucleotide polymorphism, milk production traits.

مقدمه

روند اصلاح نژاد کلاسیک آهسته است، لذا بیوتکنولوژی به کمک متخصصین اصلاح نژاد آمده تا گزینش دام‌ها سریع‌تر و هموارترشود. در این میان روی کروموزوم شماره ۶ گاو تعداد زیادی ژن کاندید وجود دارد که اکثر آنها روی صفات تولید شیر تاثیرگذار هستند (Khatib و همکاران، ۲۰۰۷). Ron و همکاران (۲۰۰۱) سه QTL روی این کروموزوم پیدا کرده‌اند که روی تولید شیر، چربی و پروتئین و درصدهای چربی و پروتئین شیر تاثیر دارند. مهمترین این جایگاه‌ها در میانه کروموزوم و فاصله ۴CM از ریزماهواره BM143 قرار دارد. همچنین Olsen و همکاران (۲۰۰۵)، با استفاده از نقشه فیزیکی و ترکیب نقشه‌های لینکاژ و عدم تعادل پیوستگی مشخص کردند که این جایگاه QTL در ناحیه ۴۲۰KB از ژن‌های ABCG2 و LAP3 قرار دارد و روی درصد پروتئین شیر موثر است. احتمال زیادی وجود دارد که حضور ژن OPN در این ناحیه، تاثیر بسیاری داشته باشد زیرا در بین ژن‌های شناخته شده موثر بر درصد پروتئین شیر بیشترین حد بیان را دارد. ژن اوستئوپونتین که قبلا به نام فعال کننده-۱ سلول-های T نامیده می‌شد، گلیکوپروتئینی اسیدی است که به عنوان واسطه اثرات متقابل ماتریس و سیگنال‌های سلولی و باند شدن با گیرنده‌های CD44، عمل می‌کند. این پروتئین فاکتور مهمی در تغییر حالت استخوان و محکم شدن استئوکلاست، چسبیدگی سلولی، تنظیم شیمیایی بدن، حفظ سلول‌ها، تغییر حالت بافت‌ها، تنظیم التهاب، تولید مثل (Killian، ۲۰۱۰)، لقاح و باروری (Khatib و همکاران، ۲۰۰۹) و رشد و نمو جنین است (Lonard، ۲۰۰۵). بیان این ژن در غدد پستانی از هنگام زایمان شروع می‌شود و در سرتاسر شیردهی افزایش پیدا می‌کند (Cohen و همکاران، ۲۰۰۵). این پروتئین توسط سلول‌های ایمنی بدن نیز تولید شده و منابع ایمنی اولیه OPN شامل ماکروفاژها و سلول‌های T و دندروتیک هستند. استئوپونتین توسط سلول‌های کشنده و فعال شده طبیعی ترشح می‌شود و یک تعدیل کننده مهم پاسخ سلول‌های واسط و یا Th-1 ها است که شیموتوکسین این سلول‌ها و تحریک تکثیر آنها را به عهده دارد. علاوه بر نقشی که این پروتئین روی سلول‌های T دارد، باعث تحریک تولید ایمنوگلوبولین M و G از سلول‌های B می‌شود (Karcher و همکاران، ۲۰۰۸).

اوستئوپونتین دارای حدود ۷۰۰۰ جفت باز و ۷ اگزون است و پروتئینی با ۲۷۸ اسیدآمینه را کد می‌کند (Leonard و همکاران، ۲۰۰۵). مشخص شده است که چندشکلی تک نوکلئوتیدی درناحیه اینترون ۴ وموقعیت 8514 برای ژن اوستئوپونتین روی تولید شیر، صفات ترکیبی و شمار سلول‌های بدنی شیر تاثیر دارد (Leonard، ۲۰۰۵؛ نصیری و همکاران،۱۳۸۹؛ Schnabel و همکاران، ۲۰۰۵). از سایر نقاط چندشکل می‌توان به اینترون ۵ (A/G) و اگزون ۷ (T/G) (Cohen و همکاران، ۲۰۰۵) و حذف/اضافه در ناحیه ۳۹۰۷ که بالادست شروع ترجمه این ژن است (ناحیه عناصر تنظیم‌کننده اوستئوپونتین بافتی)، اشاره نمود که ناحیه پروموتور آن در پستانداران جزو نواحی نسبتا حفاظت شده است (Schnabel و همکاران، ۲۰۰۵). طبق تحقیقات انجام شده آلل C بیشتر روی پروتئین و چربی شیر و آلل T روی رشد بدن تأثیرگذار است (Khatib و همکاران، ۲۰۰۷؛Leonard و همکاران،۲۰۰۵). در گاو گوشتی گزارش شده است که پلی-مورفیسم ناحیه ۳۹۰۷ با وزن زنده هنگام کشتار، میانگین افزایش وزن پس از شیرگیری و وزن یکسالگی ارتباط معنی‌دار دارد (White و همکاران، ۲۰۰۷).

لذا هدف از این تحقیق تعیین فراوانی ژنی و ژنوتیپی چندشکلی تک نوکلوتیدی جایگاه اینترون ۴ ژن استئوپونتین و بررسی تاثیر ژنوتیپ‌های مختلف این ژن روی ارزش اصلاحی صفات تولید شیر، درصد چربی، درصد پروتئین در گاو نژاد براون سوئیس بود.

مواد و روش

خونگیری و استخراج DNA

در این آزمایش از نمونه خون تعداد ۱۰۰راس گاو شیری نژاد براون سوئیس مجتمع آموزش جهاد کشاورزی خراسان رضوی که دارای ثبت مشخصات و شجره خویشاوندی، رکورد تولید شیر، چربی و پروتئین بودند، استفاده شد. به منظور جلوگیری از انعقاد خون، قبل از خونگیری محلول نیم مولار EDTA به ونوجکت‌ها تزریق شد. نمونه‌ها روی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. استخراج از خون کامل و به روش استخراج نمکی اصلاح شده (Javanrouh و همکاران، ۲۰۰۶) انجام گرفت. کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و کیفیت آن از طریق الکتروفورز بررسی شد.

اجزای واکنش و شرایط Touchdown-PCR

اجزای واکنش شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر 10XPCR، ۲ میلی مولار $Mgcl_2$، ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز، ۵ پیکومول بر میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت و مابقی حجم تا ۲۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر بود. شرایط دمایی در نظرگرفته شده شامل۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه دمای واسرشت اولیه، و در ادامه ۳۲ سیکل دمایی با شرایط ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه دمای واسرشت، دمای اتصال ۶۳ درجه سانتیگراد و با کاهش تدریجی ۲ درجه ای تا رسیدن به دمای ۵۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه دمای سنتز بود. در پایان، سنتز نهایی به وسیله دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت. پرایمرهای مورد استفاده به صورت لیوفیلیزه در اختیار قرار گرفتند که بر حسب سفارش شرکت سازنده (Generay Biotech) برای به دست آوردن غلظت ۱۰۰ پیکومول، مقادیر لازم آب دو بار تقطیر به آنها اضافه گردید.

از یک جفت پرایمر رفت و برگشت جهت تکثیر قطعه ۲۹۰ نوکلئوتیدی اینترون ۴ ژن استئوپونتین (شماره دستیابی GU143824.1) به توالی زیر استفاده گردید. قبل از شروع واکنش هضم و به منظور بررسی صحت اندازه تقریبی قطعه تکثیرشده، ۵ میکرولیتر از محصول PCR توسط ژل آگارز ۱/۵٪، الکتروفورز شد و با دستگاه عکس برداری ژل داک مشاهده گردید.

F5´- GCAAATCAGAAGTGTGATAGAC -3´
R5´- CCAAGCCAAACGTATGAGTT -3´

هضم آنزیمی

هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده اوستئوپونتین با آنزیم *Bsr I* (ساخت شرکت فرمنتاز) در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و به مدت

۱۶ ساعت انجام شد. واکنش هضم طبق پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده آنزیم در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل۳ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۵ واحد آنزیم و ۱۴/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر صورت گرفت.

تعیین ژنوتیپ و محاسبه فراوانی ژنی و ژنوتیپی

برای تعیین ژنوتیپ‌های مختلف، مقدار۵ میکرولیتر از محصول هضم روی ژل آگارز ۲٪با ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. تعیین انواع ژنوتیپ بر اساس مشاهده تعداد و اندازه باندها با استفاده از دستگاه عکسبرداری ژل داک انجام شد. سپس با استفاده نرم‌افزار آنالیز اطلاعات ژنتیک جمعیت Pop Gene ویرایش ۱/۳۱ (Yeh و همکاران، ۱۹۹۹)، فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی محاسبه شد.

برای اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده و قطعات حاصل از برش آنزیمی، از نشانگر M100 استفاده شد. فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص نئی و شانون و تعادل هاردی وینبرگ در سطح ۰/۰۵ بررسی گردید.

مطالعه ارتباط ژنوتیپ‌ها با ارزش اصلاحی صفات تولیدی

ارزش اصلاحی صفات تولید شیر، درصد چربی و پروتئین شیر دوره اول شیردهی۱۰۲۴ گاو حاصل از ۵۵ پدر و ۲۲۰ مادر، با استفاده از مدل ۱ نرم افزار DFREML پیش‌بینی شد. مدل، شامل اثرات ثابت سال- فصل زایش و متغیر کمکی تعداد روزهای شیرواری و اثرات تصادفی شامل اثر حیوان و باقیمانده بودند.

$$Y = Xb + Za + e \quad \text{(مدل ۱)}$$

Y: بردار صفات مشاهده شده؛ b: بردار عوامل اثرات ثابت (سال- فصل زایش، تعداد روزهای شیردهی)؛ X : ماتریسی که b را به Y ارتباط می دهد؛ a : بردار ارزش اصلاحی برای اثرات ژنتیک افزایشی مستقیم؛ Z : ماتریسی که اثرات ژنتیکی افزایشی مستقیم را به Y ارتباط می‌دهد.

از ارزش‌های اصلاحی تعداد ۱۰۰ گاو گله که تعیین ژنوتیپ شده بودند، برای بررسی ارتباط بین ارزش اصلاحی صفات مورد مطالعه با چندشکلی جایگاه اینترون ۴، استفاده گردید.

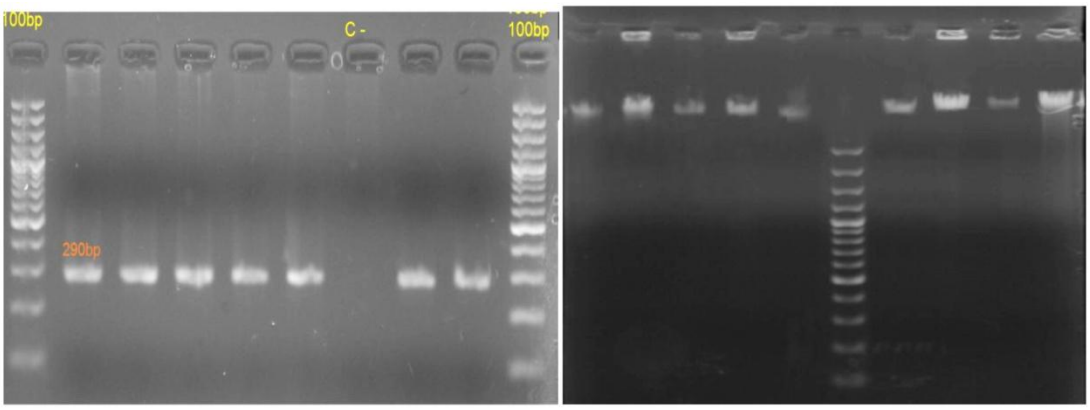
تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SAS و مدل خطی زیر، در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

$$Y_{ij} = G_i + e_{ij}$$

Y_{ijk}=ارزش اصلاحی برآورده شده برای هر کدام از صفات تولیدی؛ G_i= اثر ثابت ژنوتیپ iام در جایگاه اینترون ۴ ژن اوستئوپونتین؛ e_{ij}= اثر باقیمانده

نتایج

بررسی کیفیت DNA، حاکی از عدم وجود باندهای اضافی در نمونه‌ها بود، به طوری که مولکول‌های DNA سالم بوده و شکستگی در آنها مشاهده نشد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز صحت تکثیر قطعه ۲۹۰bp را برای ژن استئوپونتین توسط نشانگر وزنی۱۰۰M مورد تأیید قرار داد (شکل۱).



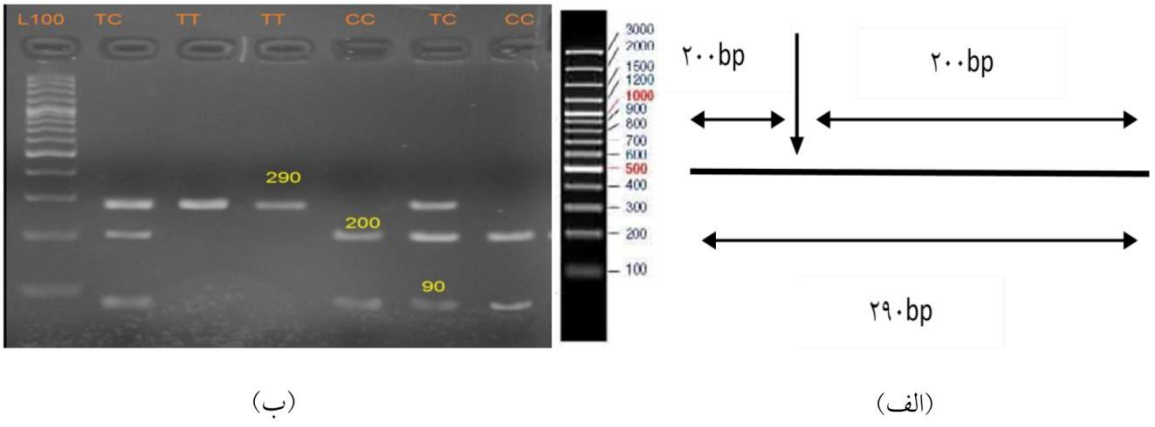
(ب) (الف)

شکل ۱: (الف) کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪. (ب) قطعه تکثیر شده PCR ژن اوستئوپونتین

فراوانی ژنی و ژنوتیپی اینترون ٤ ژن اوستئوپونتین

قطعه تکثیرشده دارای یک منطقه شناسایی برای آنزیم بود. آلل T بدون جایگاه برش آنزیمی و آلل C فقط دارای یک محل برش بود. لذا، آلل T ۲۹۰جفت باز و آلل C دارای دو قطعه ۲۰۰ و ۹۰ جفت باز بود.

بنابراین افراد با ژنوتیپ هموزیگوت TT قطعات ۲۹۰ جفت باز، هتروزیگوت CT۲۹۰، ۲۰۰ و ۹۰ جفت باز و هموزیگوت‌های CC قطعات ۲۰۰ و ۹۰جفت باز داشتند (شکل۲). پس از تعین ژنوتیپ، فراوانی ژنی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص هتروزیگوتی نئی و شانون، تعداد آلل‌های واقعی و موثر و تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از نرم افزار PopGene ویرایش ۱/۳۱ محاسبه گردید (جدول ۱). خطای معیار فراوانی آللی از فرمول $SE = \sqrt{\frac{p(1-p)}{2n}}$ برابر ۰/۰۳ محاسبه شد. نتایج حاصل از محاسبه عدد کای مربع حاکی از متعادل بودن این جمعیت در جایگاه اینترون ۴ ژن از نظر تعادل هاردی واینبرگ بود.



(ب) (الف)

شکل ۲: (الف)طرح شماتیک محل تکثیر ژن اوستئوپونتین و هضم توسط آنزیم *BsrI* (فلش جایگاه شناسایی آنزیم می‌باشد). (ب) تعیین ژنوتیپ در جایگاه اینترون ۴ ژن اوستئوپونتین

جدول ۱- نتایج تعیین ژنوتیپ استئوپونتین در جمعیت

جایگاه	فراوانی آللی		فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده			هتروزیگوسیتی		شاخص		تعداد الل		تعادل
	C	T	CC	TC	TT	Obs[1]	Exp[2]	نئی	شانون	واقعی	موثر	κ^2
اینترون۴	۰/۴۶	۰/۵۴	۰/۲۳	۰/۴۶	۰/۳۱	۰/۴۶	۰/۵۰	۰/۴۹	۰/۶۹	۲	۱/۹۹	۰/۶۳

[1]مشاهده شده، [2]مورد انتظار

پیش‌بینی ارزش اصلاحی صفات تولیدی و ارتباط آن با انواع ژنوتیپ

به منظور برآورد ارتباط بین صفات با جایگاه‌های ژنی مورد بررسی، از ارزش اصلاحی مربوط به رکوردهای صفات تولید شیر (تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین) استفاده گردید. بر اساس نتایج آنالیز آماری مشخص شد که در این مطالعه هیچ ارتباط معنی‌داری بین ارزش اصلاحی صفات تولید شیر با ژنوتیپ-های استئوپونتین وجود نداشت (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین و انحراف معیارارزش اصلاحی صفات تولید شیرانواع ژنوتیپ اوستئوپونتین

ژنوتیپ	تولید شیر (کیلوگرم)	درصد چربی	درصد پروتئین
CC	-۹۵/۷۰۱±۸۷/۹۳۴[a]	۰/۰۴۰±۰/۰۱۱[a]	۰/۰۰۲±۰/۰۰۱[a]
TC	-۵۵/۹۳۷±۴۷/۵۶۶[a]	-۰/۰۷۰±۰/۰۰۸[a]	-۰/۰۰۳±۰/۰۰۱[a]
TT	۷۸/۶۶۹ ±۷۳/۱۶۶[a]	۰/۰۸۹±۰/۰۳۷[a]	۰/۰۰۸±۰/۰۰۴[a]
ضریب تعیین	R^2=۰/۳۴	R^2=۰/۴۵	R^2=۰/۵۲

بحث

در تحقیق حاضر فراوانی آلل T و C ژن اوستئوپونتین (OPN) به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۴۶ برآورد شد. در بررسی که روی دو گروه جمعیت نرگاوهای جوان و گاو شیری هلشتاین انجام گرفت، فراوانی آلل C و T برای دو جمعیت تقریبا برابر و به ترتیب ۵۱٪ و ۴۹٪ برآورد شد (Leonard و همکاران، ۲۰۰۵). درمطالعه‌ای با هدف تعیین فراوانی آللی و چندشکلی ژن OPN در گاوهای نر نژاد هلشتاین ایرانی، فراوانی آلل‌های T و C به ترتیب ۰/۵۹ و ۰/۴۱ گزارش شد (نصیری و همکاران، ۱۳۸۹)، همچنین در گاوهای هلشتان استان تهران و اصفهان، فراوانی چند شکلی این ژن و فراوانی آلل‌های T و C به ترتیب ۰/۵۹ و ۰/۴۱ گزارش شد (پسندیده و همکاران، ۱۳۹۱). در بررسی دیگری ارتباط بین ژن-های OPN و PPAR GCLA با ترکیبات شیر در جمعیت گاو هلشتاین مورد مطالعه قرار گرفت و درصد فراوانی ژنوتیپ‌های CC و CT و TT به ترتیب ۰/۲۳، ۰/۵۱، ۰/۲۶ محاسبه شد (Khatib و همکاران، ۲۰۰۷).

Leonard و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که آلل C با افزایش درصد چربی و پروتئین شیر مرتبط است، اگرچه تاثیر این آلل روی مقدار تولید شیر، چربی، پروتئین و سلول‌های سوماتیک نژاد هلشتاین معنی‌دار نبود اما تمایل به کاهش مقدار شیر نشان داد که با توجه به همبستگی منفی بین این صفت با درصد پروتئین شیر، این تاثیر، منطقی به نظر می‌رسد. Cohen و همکاران (۲۰۰۵) تاثیر معنی‌دار چندشکلی این ژن روی درصد چربی و پروتئین نژاد هلشتاین پیدا نکردند، در حالی کهSchnabel و همکاران (۲۰۰۵) آلل C را بر درصد پروتئین شیر موثر دانستند. Khatib و همکاران (۲۰۰۷) اثر افزایشی ژن روی درصد چربی و پروتئین و مقدار تولید چربی را معنی‌دار گزارش کردند، اگرچه اثر غالبیت روی تمامی صفات مورد بررسی و اثر افزایشی روی سایر صفات تولید شیر و سلول‌های سوماتیک نژاد هلشتاین معنی‌دار نبود. Schopen و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی کل ژنوم گاو بیان کردند که نقاط عمده‌ای از کروموزوم‌های ۵، ۶، ۱۱ و ۱۴ با صفت درصد پروتئین شیر در ارتباط هستند که در این رابطه کروموزوم ۶ به طور معنی‌داری با هر ۶ نوع پروتئین مهم شیر (کازئین‌ها و پروتئین‌های آب پنیر) مرتبط بود. نتایج تحقیقی که در ترکیه روی گاوهای بومی دو منطقه مختلف انجام شد، نشان داد که گاوهای منطقه جنوب آناتولی دارای فراوانی آلل‌های T و C به ترتیب ۰/۷۴ و۰/۲۶ بود. همچنین در گاوهای منطقه شرق آناتولی فراوانی آلل‌های T و C به ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۱۶ بود که حاکی از پایین‌تر بودن فراوانی آلل C بود (Oztak و همکاران، ۲۰۰۸). این

محققین فراوانی آلل موثر بر تولید را در این دو نژاد بومی کم‌تر از حدی دانستند که بتواند روی صفات تولیدی تاثیر بگذارد. علیرغم گزارشات تاثیر مثبت آلل C روی درصد چربی و پروتئین، (Khatib و همکاران ، ۲۰۰۹) نرخ باروری افراد CC نژاد هلشتاین را کمتر از افراد TT گزارش کردند (۶۲٪ در مقابل ۷۰٪). جمعیت مورد مطالعه براون سوییس در این تحقیق از نظر این جایگاه در حالت تعادل بود که با نتایج سایر محققین(Oztak و همکاران، ۲۰۰۸؛ Khatib و همکاران، ۲۰۰۷) در مورد گاو براون سوییس همخوانی دارد. از آنجایی که در این گله، انتخاب اسپرم فقط در جهت افزایش نیافتن همخونی و نه برای افزایش تولید شیر بوده است، تعادل هاردی واینبرگ دور از انتظار نمی‌باشد. تعداد آلل موثر در این جایگاه تک نوکلئوتیدی و شاخص‌های هتروزیگوسیتی محاسبه شده برای این جایگاه، بیانگر این مطلب است که تنوع ژنتیکی مناسبی در نژاد براون سوییس وجود دارد و می‌توان از آن در جهت شناسایی افراد استفاده کرد. فراوانی‌های آللی ژن استئوپونتین در نژادهای براون سوئیس و هلشتاین در حد متوسط قرار دارد، اگرچه وجود تفاوت‌هایی در پیش زمینه ژنتیکی حیوانات مورد بررسی و همچنین نژاد مورد مطالعه بایستی در نظر گرفته شود. اکثر چندشکلی‌ها در گاوهای نژاد تائوروس وابسته به نژاد نیستند، لذا ممکن است به طور وسیعی در سایر جوامع نیز پراکنده باشند. از طرف دیگر، درگیر بودن این نشانگرها در مراحل اساسی زیست حیاتی نظیر تولید چربی و رشد، پیشنهاد می‌کند که این نشانگرها برای صفات تولید شیر و گوشت سایر نژادها نیز حائز اهمیت باشند (White و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعه حاضر بین ژنوتیپ‌ها و صفات تولیدی ارتباط معنی‌دار پیدا نشد، اگرچه گزارش شده است که بیان این ژن در بافت کبد و پستان، هنگام شیردهی و در دوران خشکی، تفاوت معنی‌داری داشته است (Cohen و همکاران، ۲۰۰۵). این امکان وجود دارد که نتوان ارتباط معنی‌دار آماری بین بررسی تک جهش برخی از ژن‌ها و صفات تولیدی (مانند اوستئوپونتین و تولید شیر) پیدا نمود، زیرا آلل‌های موثر احتمالی، در همان هاپلوتیپ‌هایی قرار دارند که سایر ژن‌های موثر بر این صفات نیز قرار گرفته‌اند.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به گزارشات متعدد نقش پروتئین استئوپونتین در فعالیت‌های سلولی و بیان بالای ژن آن در اپیتلیال غدد پستانی، این احتمال وجود دارد که یکی از ژن‌های تأثیرگذار بر صفات تولید شیر بوده و همانند سایر ژن‌های موثر بر این صفات، تحت فشار انتخاب قرار گرفته باشد، اگرچه در این تحقیق، به رغم گزارش سایر تحقیقات، ارتباط معنی‌دار بین آلل C با ارزش اصلاحی صفات تولید شیر یافت نشد. لذا، بررسی توام این ژن با سایر ژن‌های موثر بر صفات تولیدی شیر به دلیل احتمال وجود عدم تعادل پیوستگی و بررسی نواحی کنترل کننده بالادست و یا پایین دست ژن برای درک دقیق مکانیسم ملکولی نحوه عمل ژن، توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله محققین بر خود لازم می‌دانند تا از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر و مسوولان محترم مجتمع آموزش جهاد کشاورزی خراسان رضوی به ویژه آقای مهندس زرقی که در تهیه نمونه‌های خون همکاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را بنمایند.

منابع

۱. پسندیده، م.، م. ر. محمدآبادی، ع. ترنگ، ع. اسماعیلی‌زاده کشکوئیه، ر. صیقلانی، س. انصاری مهیاری، ر. پسندیده. ۱۳۹۱. بررسی چندشکلی ژن‌های PPARGC1A و OPN در گاوهای هلشتاین استان‌های تهران و اصفهان. *نشریه پژوهش‌های علوم دامی*. ج.۲۲. ش.۱. ۱۲۵-۱۳۴

۲. نصیری خ.،ع. صالحی، م. امین افشار، م. ب. صیادنژاد.، ز. نامور، ر. سبحانی. ۱۳۸۹. چندشکلی ژن OPNدرگاوهای نر هلشتاین ایران. *چهارمین کنگره علوم دامی ایران*. کرج. ۲۸۷۰-۲۸۷۴

3. Cohen-Zinder M.,E. Seroussi, D. M. Larkin, J. J. Loor, A. Everts-van der Wind, J-H Lee, J. K. Drackley, M. R. Band, A.G. Hernandez, M. Shani, H. A. Lewin, J. I. Weller, and M. Ron. 2005. ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield an

composition in Holstein cattle. *Genome Res.*2005 15: 936-944

4. Javanrouh A., M.H. Banabazi, S. Esmaeilkhanian, C. Amirinia, H.R. Seyedabadi and H. Emrani. Optimization on salting out method for DNA extraction from animal and poultry blood cells. *The 57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Antalya, Turkey 21-25 August 2006.
5. Karcher, E. L., D. O. Bayles, J. P. Bannantine, D. C. Beitz, and J. R. Stabel. 2008. Osteopontin: A novel cytokine involved in the regulation of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in periparturient dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 91:3079–3091
6. Khatib, H., W. Huang, X. Wang, A. H. Tran, A. B. Bindrim, V. Schutzkus, and R. L. Monson. 2009. Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. *J. Dairy Sci*. 92:2238–2247
7. Khatib H., I. Zaitoun, J. Wiebelhaus-Finger, Y. M. Chang, and G. J. M. Rosa. 2007. The Association of Bovine PPARGC1A and OPN Genes with Milk Composition in Two Independent Holstein Cattle Populations. *J. Dairy Sci*. 90:2966–2970
8. Killian, G. 2010. Physiology and endocrinology symposium: Evidence that oviduct secretions influence sperm function: A retrospective view for livestock. *J Anim. Sci.* 2011, 89:1315-1322.
9. Leonard S., H. Khatib, V. Schutzkus, Y. M. Chang, and C. Maltecca. 2005. Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 88:4083–4086
10. Miller S. A., D. D Dykes & H. F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells**.** *Nucleic Acids Research* 16 (3): 1215
11. Olsen, H.G., S.Lien, M.Gautier, H. Nilsen, A.Roseth, , P.R.Berg, , M.Sundsaasen, , S K.K.vendsen, , and T.H.Meuwissen, 2005.Mapping of a milk production QTL to a 420 kb region on bovine chromosome 6. *Genetics* 169: 275–283.
12. Oztak K, D Tesfaye, I Akis and A.Mengi 2008. Genetic polymorphism of osteopontin (OPN), Prolactin (PRL) and piturity specific transcript factor1(PIT1) in south Anatolian and east Anatolian red cattle. *Journal of Animal Science*, ۶۶: 109-112.
13. Ron, M., D.Kliger, E.Feldmesser, E. Seroussi, , E.Ezra, and J.I.Weller, 2001. Multiple QTL analysis of bovine chromosome 6 in the Israeli Holstein population by a daughter design. *Genetics* 159: 727–735.
14. Schnabel, R. D., J.-J. Kim, M. S. Ashwell, T. D. Sonstegard, C. P.Van Tassell et al., 2005 Fine-mapping milk production quantitativetrait loci on BTA6: analysis of the bovine osteopontingene. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 102: 6896–6901.
15. Schopen G. C. B., M. H. P. W. Visker, P. D. Koks, E. Mullaart, J. A. M. van Arendonk, and H.Bovenhuis. 2011. Whole-genome association study for milk protein composition in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94 :3148–3158
16. White, S. N., E. Casas, M. F. Allan, J. W. Keele, W. M. Snelling, T. L. Wheeler, S. D., Shackelford, M. Koohmaraie and T. P. L. Smith. 2007. Evaluation in beef cattle of six deoxyribonucleic acid markers developed for dairy traits reveals an osteopontin polymorphism associated with postweaning growth. *J Anim. Sci.*2007, 85:1-10.
17. Yeh, F.C., R. Yang, and T. Boyle. 1999. POPGENE. Version 1.31. Microsoft window–based freeware for population genetic analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada