ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰
صفحه ۷۸-۷۱

شناسایی چندشکلی ژن‌های هورمون رشد، *Pit-1* و بتالاکتوگلوبولین در گاوهای هلشتاین

مریم حیدری*[۱]، مجتبی آهنی‌آذری[۲]، سعید حسنی[۳]، علیرضاخان‌احمدی[٤]، سعید زره‌داران[٥]

۱، ۲، ۳ و ۵- به‌ترتیب کارشناس ارشد، استادیاران دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
٤- کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی گنبد
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:maryam_heidari.2000@yahoo.com
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۹)

واژه‌های کلیدی
چندشکلی،
ژن *GH*،
ژن *Pit-1*،
ژن *β-LG*،
هلشتاین،
PCR-RFLP.

چکیده

این تحقیق به‌منظور شناسایی چندشکلی ژن‌های هورمون رشد (GH)، *Pit-1* و بتالاکتوگلوبولین (β-LG) در یک گله (۱۰۳ رأسی) گاو هلشتاین انجام شد. نمونه‌های DNA با روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. فراوانی آلل‌های L و V ژن هورمون رشد به‌ترتیب ۰/۸۸٤ و ۰/۱۱٦ و فراوانی آلل‌های A وB برای ژن *Pit-1* به‌ترتیب ۰/۱۷۰ و ۰/۸۳۰ و برای ژن *β-LG* به‌ترتیب ۰/۵۲۹ و ۰/٤۷۱ بدست آمد. بررسی تعادل هاردی- واینبرگ برای لوکوس‌های مورد نظر بوسیله‌ی آزمون مربع کای، نشان دهنده وجود تعادل در این جایگاه‌ها بود.

مقدمه

بیش‌تر صفات اقتصادی در حیوانات اهلی به‌عنوان صفات کمی شناخته شده‌اند که تحت تأثیر تعداد بسیار زیادی ژن قرار دارند، اما تحقیقات اخیر نشان داده است که این صفات تحت کنترل تعدادی ژن‌های اصلی می‌باشند که شناسایی آن‌ها در حیوانات مزرعه‌ای از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. در صنعت گاو شیری ژن‌های هورمون رشد، *Pit-1* و بتالاکتوگلوبولین سه نمونه از این ژن ها می‌باشند و با توجه به نقش مهم آن‌ها در بروز صفات اقتصادی، تحقیقات متعددی در زمینه‌ی تعیین چندشکلی این ژن‌ها (جدول ۱) و نیز بررسی ارتباط آن‌ها با صفات مربوط به تولید و ترکیب شیر انجام گرفته است (۸، ۲۱، ۳۵، ۳۸، ٤۲، ٤۸، ۵۲).

هورمون رشد گاوی یک هورمون هیپوفیزی ۲۲ کیلودالتونی است که از ۱۹۱ اسیدآمینه تشکیل شده است (٤٤). این هورمون بخشی از خانواده چند ژنی است که شامل پرولاکتین و لاکتوژن جفتی می‌باشد و توسط هیبریداسیون کروموزوم شماره ۱۹ گاوی تعیین نقشه شده است (۱۸). این ژن طولی تقریباً برابر با ۱۸۰۰ جفت باز دارد و شامل ٤ اینترون و ۵ اگزون است (۱۷، ٤۷). هورمون رشد نقش مرکزی در رشد، شیردهی و توسعه غده پستانی ایفا می‌کند (۱۳).

بنابراین، ژن هورمون رشد گاوی یک ژن کاندید برای استفاده به‌عنوان یک نشانگر برای تولید شیر و گوشت به خاطر نقش آن در تولید شیر و فرآیند رشد درنظر گرفته شده است (۲۷). فاکتور نسخه برداری هیپوفیز[1]، فاکتور نسخه‌برداری خاص سلول است که در فعال‌سازی بیان ژن‌های پرولاکتین، تیروتروپین و هورمون رشد در غده هیپوفیز قدامی نقش دارد (۴۳). *Pit-1* گاوی یک پروتئین ۳۳ کیلودالتونی (۴۱) است که از ۲۹۱ اسید آمینه تشکیل شده است (۲۷). ژن *Pit-1* در ناحیه سنترومیک کروموزوم شماره ۱ گاو قرار گرفته است (۴۶). ژن *Pit-1* یک ژن کاندید دیگر است که به‌خاطر نقش آن در تنظیم بیان ژن‌های هورمون رشد و پرولاکتین به عنوان نشانگر تولید شیر در نظر گرفته شده است (۲۷). بتالاکتوگلوبولین پروتئین عمده‌ی آب پنیر است که در شیر نشخوارکنندگان و بسیاری از گونه‌های دیگر یافت می‌شود (۲۳). ژن بتالاکتوگلوبولین روی کروموزوم شماره ۱۱ گاو قرار گرفته است و یک واحد نسخه‌برداری ۴/۷ کیلو بازی دارد و شامل ۷ اگزون و ۶ اینترون است و زنجیره پلی پپتیدی آن از ۱۶۲ اسیدآمینه تشکیل شده است (۷). تاکنون حداقل ۱۲ واریانت ژنتیکی β-LG شناخته شده است (۳۲) که واریانت‌های A و B فراوان‌تر از بقیه هستند (۱۴، ۲۸، ۳۲). وجود میل ترکیبی بتالاکتوگلوبولین با رتینول (۱۵) و اسیدهای چرب (۱۶) نشان دهنده نقش مهم β-LG در انتقال و متابولیسم این اجزا می‌باشد (۱۱، ۲۵). بنابراین ژن بتالاکتوگلوبولین نیز یک کاندید مهم به عنوان نشانگر تولید شیر به خاطر اثرش روی ترکیب شیر است. چندشکلی این ژن‌ها و همچنین ارتباط آن‌ها با تولید شیر در تحقیقات بسیاری بررسی شده است که خلاصه‌ای از آن در جدول ۱ ارائه شده است. در بیشتر تحقیقات ژنوتیپ LL ژن هورمون رشد با تولید شیر و چربی شیر بالاتر مرتبط معرفی شده است (۸، ۳۸، ۴۸). تعدادی از گزارشات نیز ارتباط بین ژنوتیپ AB ژن بتالاکتوگلوبولین و تولید شیر بالاتر (۲۱، ۴۲) و ارتباط آلل A ژن *Pit-1* و تولید شیر بالاتر را نشان داده‌اند (۳۵، ۵۲). هدف از این تحقیق تعیین فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی ژن‌های هورمون رشد، بتالاکتوگلوبولین و *Pit-1* در یک گله گاو هلشتاین و بررسی تعادل هاردی–واینبرگ در آن بود.

[1] Pit-1

مواد و روش‌ها

این تحقیق از اوایل تابستان سال ۱۳۸۷ تا اوایل بهار سال ۱۳۸۸ در آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. تعداد ۱۰۳ نمونه از گاوهای هلشتاین برای ژن هورمون رشد، ۱۰۰ نمونه برای ژن *Pit-1* و ۱۰۱ نمونه برای ژن بتالاکتوگلوبین تعیین ژنوتیپ شدند. لازم به ذکر است نمونه‌های مورد استفاده برای تعیین ژنوتیپ برای هر سه ژن مشترک بوده و همه از یک گله جمع‌آوری شدند. نمونه‌های خون به‌طور تصادفی از گاوهای دارای حداقل یکسال رکورد تولید شیر متعلق به شرکت بهین تلیسه واقع در کیلومتر ۵ جاده قدیم گرگان- کردکوی جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی EDTA ۰/۵ مولار ریخته شده و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش استخراج نمکی بهینه یافته (۲۹) انجام گرفت. برای تعیین کمیت وکیفیت DNA استخراج شده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد. برای تکثیر DNA در این تحقیق از دستگاه ترموسایکلر مدل Personal Cycler™ شرکت بیومترا استفاده شد و جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای هر ژن از مستر کیت شرکت سینا ژن استفاده شد. این کیت حاوی Taq DNA Polymerase با غلظت ۰/۰۴ واحد بر میکرولیتر، بافر PCR، $MgCl_2$ با غلظت ۳ میلی‌مولار، dNTPs هر کدام با غلظت ۰/۰۴ میلی‌مولار، آب دوبار تقطیر و روغن معدنی بود. در هر واکنش از ۱۲/۵ میکرولیترmaster mix، یک میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰۰-۵۰ نانوگرم در میکرولیتر، µl ۴-۲ مخلوط آغازگرها با غلظت ۵pmol/µl استفاده شد و چون حجم نهایی واکنش µl ۲۵ بود، به هر نمونه آب دوبار تقطیر تا رسیدن به حجم مورد نظر اضافه شد. به‌منظور اطمینان از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۴ میکرولیتر محصول PCR برای الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. ژنوتیپ حیوانات برای هر ژن با توجه به محل برش آنزیم و قطعات حاصل از هضم تعیین گردید. جهت مقایسه و ارزیابی، مقدار یک میکرولیتر مارکر استاندارد pBR322/*MspI* و مارکر استاندارد ۱۰۰ جفت‌بازی پس از مخلوط شدن با یک میکرولیتر بافر بارگیری استفاده شد.

جدول ۱- فراوانی‌های آللی ژن‌های هورمون رشد، *Pit-1* و بتالاکتوگلوبولین در نژادهای مختلف گاو

ژن	نژاد	فراوانی آللی L	فراوانی آللی V	منبع
هورمون رشد	هلشتاین فریزین مجارستانی	۰/۹۳	۰/۰۷	Kovacs et al.۲۰۰۶
	هلشتاین دانمارکی	۰/۹۳	۰/۰۷	Sorensen et al.۲۰۰۲
	قرمز دانمارکی	۰/۸۵	۰/۱۵	Sorensen et al.۲۰۰۲
	جرسی دانمارکی	۰/۵۱	۰/۴۹	Sorensen et al.۲۰۰۲
	نژاد جرسی	۰/۵۲	۰/۴۸	Dario et al.۲۰۰۸
	نژاد پرتغالی	۰/۷۵	۰/۲۴۱	Reis et al.۲۰۰۱
	نژاد قرمز آناتولیایی جنوبی	۰/۵۶	۰/۴۴	Yardibi et al.۲۰۰۹
	نژاد قرمز آناتولیایی شرقی	۰/۴۳	۰/۵۷	Yardibi et al.۲۰۰۹
	هلشتاین ایرانی	۰/۹۳۶	۰/۰۶۴	Sadeghi et al.۲۰۰۸
	نژاد گیر	۱	۰	Mattos et al.۲۰۰۴
	نژاد مازندرانی	۰/۹۱	۰/۰۹	Zakizade et al.۲۰۰۶
	نژاد سرابی	۰/۸۴	۰/۱۶	Zakizade et al.۲۰۰۶
	نژاد گلپایگانی	۰/۹۲	۰/۰۸	Zakizade et al.۲۰۰۶
	نژاد بومی گیلان	۰/۸۵۷۱	۰/۱۴۲۹	صیقلانی، ۱۳۸۴
	نژاد نجدی	۰/۸۳۳۳۳	۰/۱۶۶۷	Rastegari et al.۲۰۰۱۰
	نژاد بومی ایران	۰/۸۰	۰/۲	Mohammadabadi et al.۲۰۱۰
Pit-1		A	B	
	هلشتاین	۰/۱۵	۰/۸۵	Woolard et al.۱۹۹۴
		۰/۲۵۶	۰/۷۴۴	Edriss et al.۲۰۰۸
	نژاد گیر	۰/۰۵	۰/۹۵	Mattos et al. ۲۰۰۴
	گاوهای نر سیاه و سفید	۰/۲۵	۰/۷۵	Oprzadek et al. ۲۰۰۳
	گاوهای نر هلشتاین فریزین	۰/۱۸۸	۰/۸۱۲	Renaville et al.۱۹۹۷
	نژاد مازندرانی	۰/۳۷	۰/۶۳	Zakizade et al.۲۰۰۷
	نژاد سرابی	۰/۲۷	۰/۷۳	Zakizade et al.۲۰۰۷
	نژاد گلپایگانی	۰/۳۴	۰/۶۶	Zakizade et al.۲۰۰۷
	نژاد سرابی	۰/۷۶۸	۰/۲۳۲	توکلیان و همکاران، ۱۳۸۶
	نژاد گلپایگانی	۰/۷۳۷	۰/۲۶۳	توکلیان و همکاران، ۱۳۸۶
	نژاد سرابی	۰/۶۲	۰/۳۸	Javanmard et al.۲۰۱۰
	نژاد گلپایگانی	۰/۷۵	۰/۲۵	Javanmard et al.۲۰۱۰
	نژاد سیستانی	۰/۹۲	۰/۰۸	Javanmard et al.۲۰۱۰
	نژاد تالشی	۰/۷۷	۰/۲۳	Javanmard et al.۲۰۱۰
	نژاد نجدی	۰/۱۸۴۵	۰/۸۱۵۵	۲۰۱۰ Beigi Nassiri et al.
بتالاکتوگلوبولین		A	B	
	هلشتاین	۰/۲۷	۰/۷۳	Celik.۲۰۰۳
		۰/۵۱۶	۰/۴۸۴	Kaygisiz & Douan.۱۹۹۹
		۰/۴۲	۰/۵۸	Sabour et al.۱۹۹۳
		۰/۴۹۸	۰/۵۰۲	Lunden et al.۱۹۹۷
		۰/۵۲	۰/۴۸	Tsiaras et al.۲۰۰۵
		۰/۴۳	۰/۵۷	Bonvillani et al.۲۰۰۰
		۰/۵۲	۰/۴۸	Ron et al.۱۹۹۴
	براوون سوئیس	۰/۴۴	۰/۵۶	Celik.۲۰۰۳
	نژاد سیاه و سفید لهستانی	۰/۳۷	۰/۶۳	Strazalkowska et al.۲۰۰۲
	نژاد خاکستری رومانی	۰/۵۴۱	۰/۴۵۸	Balteanu et al.۲۰۰۷
	نژاد گرنزی	۰/۲۱	۰/۷۹	Eenennaam & Medrano. ۱۹۹۱
	نژاد آیرشایر	۰/۱۵۸	۰/۸۴۲	Lin &Mcallister. ۱۹۸۶
	نژاد نجدی	۰/۰۸۲۵	۰/۹۱۲۵	Karimi et al. ۲۰۰۹
	نژاد بومی ایران	۰/۲۳	۰/۷۷	Doosti et al. ۲۰۱۱

چندشکلی ژن هورمون رشد

جهت تکثیر قطعه ۲۸۲ جفت‌بازی شامل اینترون ٤ و اگزون ٥ از آغازگرهای پیشنهادی Sorensen et al. (۲۰۰۲) که شامل توالی‌های زیر بود، استفاده شد (۳۹).

آغازگر رفت: 5′ GTG GGC TTG GGG AGA CAG AT 3′

آغازگر برگشت: 5′ GTC GTC ACT GCG CAT GTT TG 3′

برنامه حرارتی برای تکثیر ناحیه ژنی مورد نظر از این ژن به این ترتیب بود: دمای ۹٤°C جهت واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل ۹٤°C جهت واسرشته شدن به مدت ٤٥ ثانیه، ٦۲°C جهت اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه، ۷۲°C جهت سنتز به مدت یک دقیقه و دمای ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه جهت تکثیر نهایی. محصولات PCR به مدت ١٦ ساعت در دمای ۳۷°C توسط آنزیم برشی AluI هضم شدند. واکنش‌گرها برای هر واکنش هضم شامل ۹ µl محصول PCR، ۱/٥ µl بافر ۱۰X، ٤ واحد (۰/٤ µl) آنزیم برشی و ٤/۱٥ µl آب فاقد یون (Deionized) بودند. قطعات حاصل از هضم توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۳ درصد جدا شدند.

چندشکلی ژن *Pit-1*

به‌منظور تکثیر قطعه ۱۳٥٥ جفت بازی شامل قسمتی از اگزون ٥، اینترون ٥ و قسمتی از اگزون ٦ از آغازگرهای پیشنهادی Oprzadek et al. (۲۰۰۳) استفاده شد (۳۱) که شامل توالی‌های زیر بود:

آغازگر رفت: 5′ CAA TGA GAA AGT TGG TGC 3′

آغازگر برگشت: 5′ TCT GCA TTC GAG ATG CTC 3′

برنامه حرارتی جهت تکثیر ناحیه ژنی مورد نظر براساس گزارش Oprzadek et al. (۲۰۰۳) عبارت بود از: دمای ۹٥°C جهت واسرشته‌سازی اولیه DNA به مدت ۲ دقیقه، دمای ٥٥°C جهت اتصال اولیه آغازگرها به مدت یک دقیقه، دمای ۷۲°C جهت سنتز اولیه به مدت ۲ دقیقه، سپس ۲۹ سیکل هر یک شامل ۹٤°C جهت واسرشته‌سازی به مدت ٤٥ ثانیه، ٥٥°C جهت اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه، ۷۲°C جهت سنتز به مدت یک دقیقه و سرانجام تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه. برای هضم این ژن از آنزیم برشی HinfI به مدت ١٦ ساعت در دمای ۳۷°C استفاده شد. واکنش‌گرها برای هر واکنش هضم شامل ۹ µl محصول PCR، ۰/٤٥ µl بافر ۱۰X، ٥ واحد (۰/٥ µl) آنزیم برشی و ۱۰/۰٥ µl آب فاقد یون (Deionized) بودند. قطعات حاصل از هضم توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۳ درصد جدا شدند.

چندشکلی ژن بتالاکتوگلوبولین

برای تکثیر قطعه ۲٤۷ جفت‌بازی شامل بخشی از اگزون و اینترون ٤ از آغازگرهای پیشنهادی Strazalkowska et al. (۲۰۰۲) که شامل توالی‌های زیر بود، استفاده شد (٤۰):

آغازگر رفت:

5′ TGT GCT GGA CAC CGA CTA CAA AAA G 3′

آغازگر برگشت:

5′ GCT CCC GGT ATA TGA CCA CCC TCT 3′

برنامه حرارتی برای تکثیر ناحیه ژنی مورد نظر عبارت بود از : دمای ۹٤°C جهت واسرشته‌سازی اولیه DNA به مدت ٥ دقیقه، ۳٥ سیکل هریک شامل ۹٤°C جهت واسرشته شدن به مدت یک دقیقه، ٦۰°C جهت اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه، ۷۲°C جهت سنتز به مدت یک دقیقه و سرانجام تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ٥ دقیقه. جهت هضم این ژن از آنزیم محدودکننده HaeIII به مدت ١٦ ساعت در دمای ۳۷°C استفاده شد. واکنش گرها برای هر واکنش هضم شامل ۱۰ µl محصول PCR، ۲µl بافر ۱۰X، ۱۰ واحد (۱ µl) آنزیم برشی و ۱۸ µl آب فاقد یون (Deionized) بودند. قطعات حاصل از هضم توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲/٥ درصد جدا شدند.

در نهایت ژل‌های آگارز در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/٥ mg/ml رنگ‌آمیزی شد و قطعات حاصل تحت اشعه UV مشاهده شدند و تعیین ژنوتیپ با توجه به قطعات حاصل انجام گرفت. محاسبه فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی، هموزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و همچنین آزمون کای مربع، برای بررسی تعادل هاردی واینبرگ، با استفاده از نرم افزار POP Gene 1.31 (٤۹) انجام شد.

نتایج

نتایج الکتروفورز ژن‌های مورد بررسی در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. ژنوتیپ‌های مربوط به هر ژن و اندازه قطعات هر ژنوتیپ در جدول ۲ ارائه شده است. محصولات هضم

آنزیمی تعدادی از نمونه‌های مربوط به هر ژن پس از الکتروفورز در شکل‌های ۳، ٤ و ٥ نشان داده شده است. تصاویر حاصله از کیفیت مطلوبی جهت تعیین ژنوتیپ حیوانات برخوردار بودند. همچنین فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی ژن‌های مورد بررسی در جدول ۳ ارائه شده است.

مقایسه فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار نشان داد که هر سه لوکوس در تعادل هاردی واینبرگ می‌باشند (P>۰/۰۵) (جدول ۳). میزان هموزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جایگاه‌های ژنی مورد بررسی در جدول ٤ ارائه شده است.

جدول ۲- اندازه قطعات DNA مربوط به ژن‌های هورمون رشد، *Pit-1* و بتالاکتوگلوبولین بعد از هضم آنزیمی

ژن	آنزیم برشی	ژنوتیپ	اندازه قطعات (جفت باز)
هورمون رشد	AluI	LL	۵۰، ۸۲، ۱۵۰
		LV	۵۰، ۸۲، ۱۳۲، ۱۵۰
		VV	۱۳۲، ۱۵۰
Pit-1	HinfI	AA	۲۷۰، ۴۲۵، ۶۶۰
		AB	۴۰، ۲۷۰، ۳۸۵، ۴۲۵، ۶۶۰
		BB	۴۰، ۲۷۰، ۳۸۵، ۶۶۰
بتالاکتوگلوبولین	HaeIII	AA	۹۹، ۱۴۸
		AB	۷۴، ۹۹، ۱۴۸
		BB	۷۴، ۹۹

جدول ۳- فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی ژن‌های هورمون رشد، *Pit-1* و بتالاکتوگلوبولین و آماره آزمون کای مربع در حیوانات مورد بررسی

ژن	ژنوتیپ	تعداد	فراوانی ژنوتیپی	فراوانی آللی	χ^2
هورمون رشد	LL	۸۲	۰/۷۹۶	۰/۸۸۴ (L)	۲/۵۷^{ns}
	LV	۱۸	۰/۱۷۴	۰/۱۱۶ (V)	
	VV	۳	۰/۰۲۹		
Pit-1	AA	۲	۰/۰۲۰	۰/۱۷۰ (A)	۰/۳۴^{ns}
	AB	۳۰	۰/۳۰۰	۰/۸۳۰ (B)	
	BB	۶۸	۰/۶۸۰		
بتالاکتوگلوبولین	AA	۲۶	۰/۲۵۷	۰/۵۲۹ (A)	۰/۷۸^{ns}
	AB	۵۵	۰/۵۴۴	۰/۴۷۱ (B)	
	BB	۲۰	۰/۱۹۸		

ns غیر معنی دار (P>۰/۰۵)

جدول ٤- میزان هموزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در جایگاه‌های ژنی مورد بررسی گله گاو هلشتاین

جایگاه ژنی	هموزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هموزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مورد انتظار به روش نی
هورمون رشد	۰/۸۲۵۲	۰/۱۷۴۸	۰/۷۹۳۱	۰/۲۰۶۹	۰/۲۰۵۹
Pit-1	۰/۷	۰/۳	۰/۷۱۶۴	۰/۲۸۳۶	۰/۲۸۲۲
بتالاکتوگلوبولین	۰/۴۵۵۴	۰/۵۴۴۶	۰/۴۹۹۳	۰/۵۰۰۷	۰/۴۹۸۲

فراوانی‌های آللی بدست آمده در سایر تحقیقات برای ژن‌های هورمون رشد، *Pit-1* و بتالاکتوگلوبولین در گاو هلشتاین و نژادهای دیگر در جدول ۱ خلاصه شده است. براساس نتایج ارائه شده، حداکثر تفاوت بین فراوانی آلل‌های A و B ژن بتالاکتوگلوبولین در بین نژادهای خارجی در نژاد آیرشایر (٢٤) و در بین نژادهای بومی ایران در نژاد نجدی (۲۰) مشاهده می‌شود. گاوهای نژاد گیر حداکثر تفاوت بین فراوانی‌های آللی را در ژن-های هورمون رشد و *Pit-1* نشان می‌دهند (۲۷). در این مطالعه، مشابه تحقیقات دیگر فراوانی آلل L ژن هورمون رشد بیشتر از فراوانی آلل V این ژن بود. در بین نژادهای بومی ایران نیز نژادهای گلپایگانی و مازندرانی بالاترین میزان فراوانی آلل L ژن هورمون رشد را داشته‌اند (۵۰). در مورد ژن *Pit-1* فراوانی آلل B این ژن بیشتر از آلل A بود، که با نتایج حاصل از تحقیقات گذشته در تمام نژادهای خارجی مطابقت دارد. در گاوهای بومی ایران فراوانی آلل B در نژادهای مازندرانی، سرابی، گلپایگانی (۵۱) و نجدی (٤) بیش‌تر از آلل A گزارش شده است. لازم به

ذکر است در نژادهای سرابی، گلپایگانی (۱، ۱۹)، سیستانی و تالشی (۱۹) فراوانی آلل A ژن *Pit-1* بیشتر از فراوانی آلل B برآورد شده است. براساس یافته‌های این بررسی فراوانی آلل A ژن بتالاکتوگلوبولین بیش‌تر از فراوانی آلل B این ژن بود. اگرچه در بیش‌تر تحقیقات انجام شده فراوانی آلل B ژن بتالاکتوگلوبولین بیش‌تر از فراوانی آلل A این ژن گزارش شده است، اما نتایج تحقیق حاضر با نتایج تعدادی از محققین بویژه با نتایج.Ron و همکاران (۱۹۹٤) (۳٦) و Tsiaras و همکاران (۲۰۰۵) (٤۲) مطابقت دارد.

لازم به ذکر است که فراوانی‌های آللی یک ژن براساس استراتژی-ها و برنامه‌های اصلاحی به کار گرفته شده در نژادها و گله‌های مختلف متفاوت است که به نوبه خود با ذائقه و عادات غذایی هر منطقه از جهان در ارتباط است و این ممکن است تحت تأثیر شرایط اقتصادی و سایر عوامل در آینده تغییر کند. با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های برتر برای تولید شیر در گله مورد بررسی فراوانی‌های بالاتری داشتند، می‌توان گفت که این نتیجه‌ی برنامه-های انتخابی بکار گرفته شده در جهت بهبود صفات تولید شیر در این گله بوده است.

میزان هتروزیگوسیتی در جایگاه ژنی بتالاکتوگلوبولین در گله مورد بررسی بیش‌تر از دو جایگاه ژنی دیگر بود. از آن‌جا که متوسط هتروزیگوسیتی محاسبه شده به عنوان معیاری از تنوع ژنتیکی یک جمعیت در نظر گرفته می‌شود، می‌توان گفت تنوع ژنتیکی گله مورد بررسی در جایگاه ژنی بتالاکتوگلوبولین بیش‌تر است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به خاطر تخصیص اعتبار و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی و از جناب آقای کبیری، مدیریت محترم شرکت بهین تلیسه، به جهت همکاری صمیمانه‌شان در تهیه نمونه‌های خون از گله گاو هلشتاین تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. توکلیان ج، زینلی س، اسدزاده ن، جوانمرد ا، بناءبازی م ح، عظیمی‌فر ب (۱۳۸٦) بررسی فراوانی شکل‌های مختلف آللی موجود در ناحیه اگزون شش از ژن PIT1 در گاو نژاد سرابی و گلپایگانی، مجله پژوهش و سازندگی (امور دام وآبزیان)، ش ۸٦ : ۱۹۵-۱۸۹.

۲. صیقلانی ر (۱۳۸٤) مطالعه چندشکلی ژن هورمون رشد در جمعیت گاو بومی گیلان با استفاده از نشانگر PBR، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان.

3. Balteanu V A, Vlaic A, Creanga A R R S, Pop F D, Odagiu A, Pantea M L, Hancu V (2007) Milk proteins polymorphisms in Romanian Grey Steppe cattle studied by isoelectric focusing technique(IEF). Identification of a new s1-Casein allele. Bulletin USAMV-CN. 63(1-2).

4. Beigi Nassiri M T, Biranvand Z, Hartatik T, Fayazi J, Tavakoli S (2010) The study of PIT1 gene polymorphism in the Najdi cattle using PCR-RFLP method. J. Anim. Vet. Adv. 9(15): 2001-2003.

5. Bonvillani A G, Di Renzo M A, Tiranti I N (2000) Genetic polymorphism of milk protein loci in Argentinean Holstein cattle. Genet. Mol. Biol. 23(4): 819-823.

6. Celik S (2003) β-lactoglobulin genetic variants in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk. Int. Dairy J. 13: 727-731.

7. Daniela I, Aurelia S, Anuta M, Claudia S, Vintila I (2008) Genetic polymorphism at the β-lactoglobulin locus in a dairy herd of Romanian Spotted and Brown of Maramures breeds. Zootehnie si Biotehnologii, 41(1): 104-107.

8. Dario C, Carnicella D, Ciotola F, Peretti V, Bufano G (2008) Polymorphism of growth hormone GH1-AluI in Jersey cows and its effect on milk yield and composition. Asian - Australasian Journal of Animal Science. Find Articles. Com.

9. http://findarticles.com/p/articles/mi_6917/is_1_21/ai_n28485564/

10. Doosti A, Arshi A, Yaraghi M, Dayani-Nia M (2011) Comparative study of β-lactoglobulin gene polymorphism in Holstein and Iranian native cattle. J. Cell. Anim. Biol. 5(3): 53-55.

11. Edriss V, Edriss M A, Rahmani H R, Sayed-Tabatabaei B E (2008.) *Pit-1* gene polymorphism of Holstein cows in Isfahan province. Biotechnology. 7(2): 209-212.

12. Eigel W N, Butler J E, Ernstrom C A, Farrell H M, Harwalker V R, Jenness R, Whitney R M (1984) Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth edition. J. Dairy Sci. 76: 1599.

13. Eenennaam A V, Medrano J F (1991) Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. J. Dairy Sci. 74: 1730-1742.

14. Etherton T D, Bauman D E (1998) Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. Physiological Reviews, 78: 745-761.

15. Farrell H M, Jimenez-Flores R, Bleck G T, Brown E M, Butler J E, Creamer L K, Hicks C L, Hollar C

M, Ng-Kwai-Hang, K F, Swaisgood H E (2004) Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. J. Dairy Sci. 87: 1641-1674.
16. Frapin D, Dufour E, Haertle T (1993) Probing the fatty acid binding site of β-lactoglobulins. J. Protein.Chem. 12: 443-449.
17. Fugate R, Song P S (1980) Spectrocopic characterization of β-lactoglobulin retinol complex. Biochem. Biophys. Acta 625: 28-42.
18. Gordon D F, Quick D P, Erwin C R, Donelson J E, Maurer R A (1983) Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. Mol. Cell. Endocrinol. 33: 81-95.
19. Hediger R, Johnoson S E, Barendse W, Drinkwater R D, Moore S S, Hetzel J (1990) Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26-qter in cattle and to 11q25-qter in sheep by in situ hybridization; Genomics 8: 171-174.
20. Javanmard A, Asadzadeh N, Sarhadi F (2010) DNA Polymorphism of Bovine Pituitary-Specific Transcription Factor and Leptin Gene Between Iranian Bos indicus and Bos taurus Cattle. Am. J. Agri. & Biol. Sci. 5 (3): 282-285.
21. Karimi K, Beigi Nasiri M T , Fayyazi J, Mirzadeh K H, Roushanfekr H (2009) Allele and genotype frequencies of β-lactoglobulin gene in Iranian Najdi cattle and buffalo populations using PCR-RFLP. Afr. J. Biotechnol. 8 (15): 3654-3657.
22. Kaygisiz A, Douan M (1999) Genetics of milk protein polymorphism and its relation to milk yield traits in Holstein cows. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences. 23 (3): 447-454.
23. Kovacs K, Volgyi-csik J, Zsolnai A, Gyorkos I, Fesus L (2006) Associations between the AluI polymorphism of growth hormone gene and production and reproduction traits in a Hungarian Holstein-Friesian bull dam population, Arch. Tierz, Dummerstorf. 49 (3): 236-249.
24. Kontopidis G, Holt C, Sawyer L (2004) Invited review: β-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. J. Dairy. Sci. 87: 785-796.
25. Lin C Y, Mcallister A J (1986) Effects of milk protein loci on first lactation production in dairy cattle. J. Dairy. Sci. 69: 704-712.
26. Lum L S, Dovc P, Medrano J F (1997) Polymorphisms of bovine β-lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. J. Dairy Sci. 80: 1389-1397.
27. Lunden A, Nilsson M, Janson L (1997) Marked effect of β-lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. J. Dairy. Sci. 80: 2996-3005.
28. Mattos K K, Del Lama S N, Martinez, M L, Freitas A F (2004) Association of bGH and *Pit-1* gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls. Pesq. Agropec. Bras, Brasilia, 39(2): 147-150.
29. Mercier J, Vilotte J L (1993) Structure and function of milk protein genes. J. Dairy Sci. 79: 3079-3098.
30. Miller S A, Dykes D D, Polesky H F (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 16(3):1215.
31. Mohammadabadi M R, 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 Kerman province of Iran using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Afr. J. Biotechnol. 9(41): 6848-6852.
32. Oprządek J, Flisikowski K, Zwierzchowski L, Dymnicki E (2003) Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black-and-White bulls. Animal Science Papers and Reports. 21 (3): 135-145.
33. Rachagani S, Dayal Gupta I, Gupta N, Gupta S C (2006) Genotyping of β-lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. BMC. Genet; 7: 31.
34. Rastegari A, Roshanfekr H, Mamouie M, Khatami S R (2010) Growth hormone genotyping of Najdi cattle breed using PCR-RFLP. Journal of Animal and Veterinary Advances 9(8): 1265-1266.
35. Reis C, Navas D, Pereira M, Cravador A (2001) Growth hormone AluI polymorphism analysis in eight Portuguese bovine breeds, Arch. Zootec. 50: 41-48.
36. Renaville R, Gengler N, Vrech E, Prandi A, Massart S, Bertozzi C, Mortiaux F, Burny A, Portetelle D (1997) *Pit-1* gene polymorphism, milk yield, and comformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. J. Dairy. Sci. 80: 3431-3438.
37. Ron M, Yoffe O, Ezra E, Medrano J F, Weller J I (1994) Determination of effects of milk protein genotype on production traits of Israeli Holsteins. J. Dairy Sci. 77: 1106-1113.
38. 37. Sabour M P, Lin C Y, Keough A, Mechanda S M, Lee A J (1993) Effects of selection practiced on the frequencies of K-casein and β-lactoglobulin genotypes in Canadian artificial insemination bulls. J. Dairy. Sci. 76: 274-280.
39. Sadeghi M, Moradi Shahr-e-Babak M, Rahimi G, Nejati Javaremi A (2008) Association between gene polymorphism of bovine growth hormone and milk traits in the Iranian Holstein bulls. Asian J. Anim. Sci. 2 (1):1-6.
40. Sorensen P, Grochowska R, Holm L, Henryon M, Lovendahl P (2002) Polymorphism in the bovine growth hormone gene affects endocrine release in dairy calves. J. Dairy Sci. 85:1887-1893.
41. Strazalkowska N, Kvzewski J, Ryniewiez Z (2002) Effect of Kappa-casein and beta- lactoglobulin polymorphism on cows' age, stage of lactation and somatic cell count on dairy milk composition in Polish Black and White cattle. Anim. Sci. Papers and Reports 20: 21-35.
42. Theill L E, Castrillo J L, Wu D, Karin M (1989) Dissection of functional domains of the pituitary-specific transcription factor GHF-1. Nature 342:945-948.
43. Tsiaras A M, Bargouli G G, Banos G, Boscos C M (2005) Effect of Kappa-casein and Beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. J. Dairy Sci. 88: 327-334.

44. Tuggle C K, Trenkle A (1996) Control of growth hormone synthesis. Domestic Animal Endocrinology 13: 1-33.
45. Wallis M (1973) The primary structure of bovine growth hormone; FEBS Lett. 35: 11-14.
46. Woolard J, Schmitz C B, Freeman A E, Tuggle C K (1994) Rapid communication: HinfI polymorphism at the bovine PIT1 locus. J. Anim. Sci. 72:3267.
47. Woollard J, Tuggle C K, Ponce de Leon FA (2000) Rapid communication: Localization of POU1F1 to bovine, ovine and caprine 1q21-22. J. Anim. Sci. 78: 242-243.
48. Woychik R P, Camper S A, Lyons R H, Horowits S, Goodwin E C, Rottman F M (1982) Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. Nucleic Acids Res. 10: 7197-7210.
49. Yardibi H, Hosturk G T, Paya I, Kaygisiz F, Ciftioglu G, Mengi A, Oztabak K (2009) Association of growth hormone gene polymorphisms with milk production traits in South Anatolian and East Anatolian Red cattle. J. Anim. Vet. Adv.8 (5): 1040- 1044.
50. Yeh F C, Yang R C, Timothy B J, Ye Z, Judy M (1997) Pop Gene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center. Univ. Alberta.
51. Zakizade S, Rahimi G, Mirae-Ashtiani S R, Nejati-Javaremi A, Moradi-Shahrbabak M, Reinecke P, Reissmann M, Masoudi A A, Amirinia C, Mirhadi S A (2006) Analysis of bovine growth hormone gene polymorphisms in three Iranian native breeds and Holstein cattle by RFLP-PCR. Biotechnology. 5(3): 385-390.
52. Zakizade S, Reissmann M, Rahimi G, Nejati-Javaremi A, Reinecke P, Mirae-Ashtiani S R, Moradi-Shahrbabak M (2007) Polymorphism of the bovine POU1F1 gene: allele frequencies and effects on milk production in three Iranian native breeds and Holstein cattle of Iran. Pak. J. Biol. Sci., 10: 2575-2578.
53. Zwierzchowski L, Krzyzewski J, Strzalkowska N, Siadkowska E, Ryniewicz Z (2002) Effects of polymorphism of growth hormone (GH), *Pit-1* and leptin (LEP) genes on cow ages lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black and White cows. Animal. Sci. papers and reports. 20(4): 213-2