

بررسی تنوع ژنتیکی جایگاه ژن DGAT1 و میزان ارتباط آن با تولید شیر در جمعیت گاو های هلشتاین ایران

حامد خراتی کوپایی^{۱*} - محمد رضا محمد آبادی^۲ - سعید انصاری مهیاری^۳ - علی اسماعیلی زاده کشکونیه^۴ - علیرضا ترنگ^۵ -

مهدی نیکبختی^۶

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۹

تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۲۵

چکیده

در سال های اخیر در طرح های نقشه یابی QTL مشخص شده است که یک ژن کاندید بالقوه (DGAT1) در انتهای سانترومری کروموزوم شماره ۱۴ برای درصد چربی و تولید شیر وجود دارد. ژن DGAT1 با کد کردن آنزیم دی آسیل گلیسرول اسیل ترانسفراز (DGAT) نقش اصلی را در سنتز تری گلیسرید و چربی شیر دارد. ایجاد یک جهش تک نوکلئوتیدی باعث تبدیل گوانین به آدنین در مولکول DNA، و منجر به جایگزینی آلانین به جای لیزین در آنزیم DGAT می گردد. وجود این جهش اثر زیادی روی تولید و ترکیب شیر دارد. در این پژوهش ۳۹۸ نمونه خون از گاوهای هلشتاین استانهای تهران و اصفهان جمع آوری گردید، سپس استخراج DNA با استفاده از روش نمکی انجام پذیرفت. با انجام واکنش PCR یک قطعه ۴۱۱ جفت بازی از اگزون شماره ۸ این ژن تکثیر گردید. تعیین ژنوتیپ جمعیت با استفاده از تکنیک PCR-RFLP انجام شد. بر اساس نحوه برش آنزیم *CfrI* سه نوع ژنوتیپ AA، KA، KK مورد انتظار بود که، افراد KK تیپ وحشی هستند. افراد KA دارای یک آلل جهش یافته (A) و افراد AA دارای دو آلل جهش یافته هستند. نتایج این تحقیق نشان داد که ۳۶ فرد دارای ژنوتیپ KK، ۲۲۶ فرد دارای ژنوتیپ KA و ۱۳۶ فرد دارای ژنوتیپ AA می باشند. بنابراین فراوانی آلل K برابر ۰/۳۷ و فراوانی آلل A برابر با ۰/۶۳ برآورد گردید. همچنین میزان اثر این ژن روی تولید شیر ۳۰۵ روز در سطح ۰/۱ درصد معنی دار بدست آمد.

واژه های کلیدی: ژن DGAT1، PCR-RFLP، تولید شیر، گاو هلشتاین

مقدمه

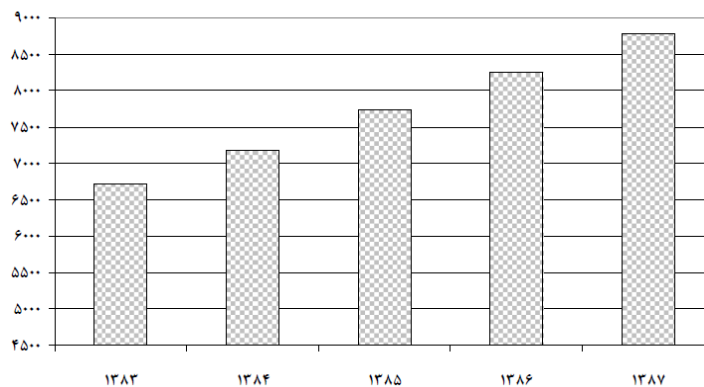
برای هر نفر برابر با ۹۵ کیلوگرم می باشد در حالی که سرانه مصرف شیر در جهان برابر با ۱۶۹ کیلوگرم و در اروپا برابر با ۳۵۰ کیلوگرم در سال می باشد (۱). با توجه به آمار و اطلاعات موجود می توان دریافت که اهداف اصلاح نژادی در ایران بایستی برای افزایش تولید شیر در کشور برنامه ریزی گردد. لذا مطالعه و بررسی ژن هایی که روی تولید و ترکیب شیر نقش موثری دارند اهمیتی دو چندان می یابد. نظر به اینکه آنزیم هایی مانند دی آسیل گلیسرول اسیل ترانسفراز نقش موثری در سنتز چربی شیر دارد. بررسی خصوصیات ژن های کنترل کننده این آنزیم و مطالعه ارتباط آنها با خصوصیات شیر و میزان تولید آن، گامی مهم در جهت شناسایی و توسعه انتخاب به کمک نشانگر جهت بهبود صفات شیر در صنعت تولید شیر است و در صورت مشاهده رابطه معنی دار بین ژن DGAT1 با میزان تولید و ترکیب شیر، می توان از این ژن جهت انتخاب و تدوین برنامه های اصلاح نژادی در گاو های هلشتاین بهره برد.

طبق آخرین آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی، تعداد ۱۸۸۳۰ واحد صنعتی گاو داری با ظرفیت ۲۰۴۸۵۶۳ راس گاو شیرده در کشور مشغول فعالیت هستند. با توجه به شکل ۱ می توان دریافت که طی سال های ۸۳ تا ۸۷ تولید شیر دارای یک روند رو به رشد بوده است. با وجود روند افزایشی تولید شیر در کشور اما هنوز سرانه مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین تر است. سرانه مصرف شیر در کشور

۴ و ۱ - به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

(*) نویسنده مسئول: Email: hmd_kh_ko@yahoo.com

۳ - استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۵ و ۶ - استادیار و مربی بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال کشور (رشت)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی



شکل ۱- میزان تولید شیر از سال ۱۳۸۳ تا سال ۱۳۸۷ (واحد هزار تن)

نژاد هلشتاین و جرسی معنی دار گزارش گردید. همچنین اثر ژنوتیپ روی تولید شیر در نژاد ایر شایر معنی دار تشخیص داده شد (۲۴). نقدی و همکاران (۲)، فراوانی آلل های $DGAT^A$ و $DGAT^K$ را به ترتیب برابر با ۰/۷۷ و ۰/۲۳ در جمعیت ماده گاو های هلشتاین استان اصفهان گزارش کردند، همچنین فراوانی ژنوتیپی AA، KA و AA به ترتیب برابر ۰/۶۰، ۰/۳۴ و ۰/۰۶ تخمین زده شد. در این پژوهش اثر چند شکلی ژن $DGAT1$ روی صفت تولید شیر بر اساس دو بار دوشش در روز بی معنی گزارش گردید. حسین پور و همکاران (۱۱)، در پژوهشی که روی گاو های نر استان خراسان انجام دادند، فراوانی آلل های $DGAT^K$ و $DGAT^A$ برابر با ۰/۲۱ و ۰/۷۹ تخمین زدند. همچنین ارتباط بین چند شکلی جایگاه $DGAT1$ و ارزش اصلاحی تولید شیر را در سطح ۰/۰۱ معنی دار گزارش کردند. علاوه بر نقش موثر ژن $DGAT1$ روی صفات تولید و ترکیب شیر، این ژن دارای اثرات معنی داری روی صفات تولید مثل (۱۴)، ذخیره چربی ماهیچه (ماربلینگ) (۲۳)، و تردی گوشت (۱۷)، دارد. بنابراین با تعیین ژنوتیپ جایگاه مورد نظر می توان ژنوتیپ های مورد نظر با توجه به اهداف اصلاحی انتخاب نمود و فراوانی آلل مطلوب را در جمعیت افزایش داد.

مواد و روش ها

در این پژوهش ۳۹۸ نمونه خون از گله های فکا، امداد، نامفر، دهیران، رضایی، زرین هیو، لبن، تکنوشیر، تلیسه نمونه و گل شهر از استان های اصفهان و تهران جمع آوری گردید. استخراج DNA با استفاده از روش نمکی انجام گرفت (۱۵ و ۱۸). نمونه های استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بر اساس ۵۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر با استفاده از آب دوبار تقطیر رقیق شدند. برای انجام واکنش PCR از آغازگرهای رفت و برگشت زیر استفاده گردید (۱۳):

5'-GCACCATCCTCTTCTCAAG-3'
5'-GGAAGCGCTTTCGGATG-3'

در برنامه های اصلاح نژاد گاو شیری تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین در گذشته با کمک روش های مبتنی بر ژنتیک کمی بهبود یافته اند (۷). برای آشکار سازی نواحی کروموزومی مسئول تغییرات در صفات مهم اقتصادی با جزئیات بیشتر، نقشه های پیوستگی در گاو بوجود آمده اند (۱۲)، و آنها را برای پوشش ژنومی جمعیت ها به کار برده اند تا جایگاه های صفات کمی (QTL) را شناسایی کنند. در پروژه های نقشه یابی، QTL هایی برای درصد چربی و تولید شیر روی کروموزوم ۱۴، به ویژه در جمعیت های هلشتاین شناسایی شده است (۴ و ۲۲). در مطالعات نقشه یابی مشخص شد که ژن دی آسپیل گلیسرول آسپیل ترانسفراز ($DGAT1$)، که در انتهای سانترومری کروموزوم ۱۴ واقع است یک ژن کاندید بالقوه می باشد (۱۰). موتاسیون تک نوکلئوتیدی که منتج به جایگزینی غیر محافظت شده لیزین به وسیله آلانین (K232A) می شود اثر قابل توجهی را روی تولید شیر و ترکیبات آن ایجاد می کند. آلل $DGAT^K$ (آلل جهش نیافته) نسبت به آلل $DGAT^A$ (جهش یافته) حدود ۰/۳۴ درصد چربی، ۰/۰۸ درصد پروتئین و ۴۶/۱۰ کیلوگرم چربی بیشتری تولید می کند، در حالیکه تولید شیر و پروتئین به ترتیب ۳۱۶ و ۵/۶۴ کیلوگرم کاهش می یابد (۱۰). از آنجا که تولید شیر همراه با اجزای شیر پارامترهای غالبی در برنامه های اصلاح نژاد گاو شیری در گذشته بوده اند، لذا بررسی و تعیین خصوصیات بروز جایگزینی K232A در ژن $DGAT1$ در گاوهای هلشتاین ایران امری ضروری به نظر می رسد. باتوجه به ارزان و آسان بودن تکنیک PCR-RFLP، می توان از این تکنیک جهت بررسی چند شکلی های ژنی در جمعیت استفاده کرد تا تصویری از تنوع موجود در جمعیت به دست آید (۳). ریپولی و همکاران (۲۱)، نشان دادند که در نژاد هلشتاین ژنوتیپ های تیپ وحشی باعث افزایش چربی شیر و ژنوتیپ های جهش یافته، منجر به کاهش چربی شیر می گردد. در پژوهشی که روی گاوهای شیری نژاد هلشتاین، جرسی و ایرشایر نیوزیلند انجام شد، اثر ژنوتیپ در این مکان ژنی روی چربی و پروتئین شیر برای

مطالعه در دوره اول شیر دهی بوده اند اثر دوره شیر دهی در مدل وارد نشده است. مقایسات میانگین ژنوتیپ ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد.

برآورد اثرات افزایشی و غالبیت

میزان اثرات افزایشی و غالبیت با استفاده از نرم افزار AsReml برآورد گردیدند (۹). در این قسمت ژنوتیپ ها امتیازی بندی می شود، و ضریب رگرسیون امتیاز بر رکوردها به عنوان اثر افزایشی و غالبیت در نظر گرفته می شود. برای برآورد اثرات افزایشی، امتیاز آلل K برابر یک و آلل A برابر صفر در نظر گرفته شد، بنابراین امتیاز ژنوتیپ KK برابر ۲، ژنوتیپ KA برابر ۱ و ژنوتیپ AA برابر با صفر در نظر گرفته می شود. برای برآورد اثرات غالبیت امتیاز ژنوتیپ های KK، KA و AA به ترتیب برابر با صفر، یک و صفر در نظر گرفته شد (۵).

نشان دادن اثر ژن به شکل واریانس با استفاده از مدل کامل^۲ و کاهش^۳

در این روش یک بار اثر ژنوتیپ ها را در مدل وارد می کنیم و در بار دوم اثر ژنوتیپ ها از مدل حذف می کنیم از تفاوت اختلاف میانگین مربعات باقیمانده مدل کامل و کاهش می توان واریانس ناشی از ژن را از رابطه زیر محاسبه کرد (۶).

$$\sigma^2 = MS_{Reduce Model} - MS_{Full Model} / MS_{Reduce Model}$$

نتایج و بحث

تکنیک PCR-RFLP روشی مناسب برای شناسایی جهش تک نوکلئوتیدی شناخته شده در مولکول DNA می باشد. در این روش باید جایگاه جهش و نوع آن کاملاً شناخته شده باشد، تا آنزیم برشی مناسب برای شناسایی جهش ایجاد شده مورد استفاده قرار گیرد. با استفاده از این روش می توان افراد جمعیت را برای جایگاه ژن مورد نظر تعیین ژنوتیپ نمود و تصویری از تنوع موجود در جمعیت را بدست آورد (۳). با توجه به ساده بودن انجام روش PCR-RFLP و هزینه نسبتاً پائین آن می توان در هر آزمایشگاهی بهره برد. یکی از بارزترین معایب این تکنیک وقت ببری آن در هنگام هضم آنزیمی است. برخی از آنزیم های برشی مورد استفاده در این تکنیک برای هضم قطعه مورد نظر و شناسایی جهش، نیاز به دما و زمان زیادی دارند.

قابل ذکر است که جایگاه DGAT1 با شماره EU077528^۱ در بانک اطلاعاتی NCBI به ثبت رسیده است (۲۶). سیکل های حرارتی PCR به صورت زیر انجام گرفت:

واسرشته سازی اولیه: دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتیگراد و به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و به مدت ۶۰ ثانیه. سنتز نهایی: به مدت ۷ دقیقه و در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد (۱۳). واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرو لیتر و با استفاده از ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۱/۵ میکرو لیتر از PCR بافر 10X، ۱/۵ میلی مولار MgCl₂، ۰/۴ میلی مولار dNTP، ۰/۶ پیکو مول از هر آغازگر، ۵ درصد DMSO و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز انجام شد. افزودن ۵ درصد DMSO به واکنش اجازه تکثیر برابر برای هر دو آلل را می دهد. با انجام واکنش PCR قطعه ۴۱۱ جفت بازی از ژن DGAT1، که دربرگیرنده جایگزینی K232A است تکثیر می شود. برای شناسایی تغییرات آلل در مکان های نوکلئوتیدی ۱۰۴۳۳ و ۱۰۴۳۴ ژن DGAT1، ۵ میکرو لیتر از DNA تکثیر شده با ۲ واحد از آنزیم برشی CfrI به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد هضم شد. محصولات برش داده شده در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند و در نهایت ژل آگارز با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. آلل K با آنزیم برشی بریده نمی شود و آلل A بریده خواهد شد. محاسبه فراوانی های آللی، ژنوتیپی، آلل های واقعی و موثر، بررسی تعادل هاردی-وینبرگ، میزان هتروزیگوسیتی، شاخص های شانون و نئی با استفاده از نرم افزار Pop Gene انجام شد (۱۹ و ۲۰).

آنالیز آماری

با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS 9.2 اثر ژنوتیپ ها در قالب یک مدل ثابت روی رکورد های فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۲۷۳ رکورد برای صفات تولید شیر بر اساس ۳۰۵ روز (Milk₃₀₅)، تولید شیر بر اساس وزن بلوغ (MilkME) و تولید شیر بر اساس دوبار دوشش در روز (Milk_{2x}) از مرکز اصلاح و بهبود شیر جمع آوری گردید.

مدل استفاده شده در این پژوهش شامل پارامترهای زیر بود:

$$Y = \mu + G_i + S_{ij} + M_{ijk} + N_{ijkl} + C_{ijklmn} + e_{ijklmnr}$$

Y: بردار مشاهدات شامل تولید شیر بر اساس تولید در ۳۰۵ روز (Milk₃₀₅)، تولید شیر بر اساس دو بار دوشش در روز (Milk_{2x})، تولید شیر بر اساس وزن بلوغ (Milk ME)، μ : اثر میانگین، G: اثر ژنوتیپ ها، S: اثر گله، M: اثر سال تولد، N: اثر ماه تولد، C: اثر اولین سال زایش و e اثر خطا. قابل ذکر است که چون تمامی افراد مورد

2 - Full model

3 - Reduce model

1 - Accession Number

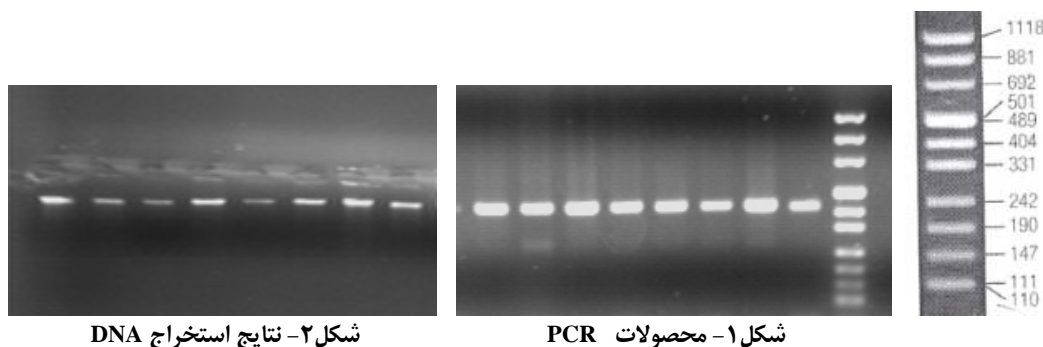
نتایج استخراج DNA و واکنش PCR

محصولات به دست آمده از استخراج، جهت ارزیابی DNA با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفتند. وجود باند های شارپ و بدون اسمیر مشخص کرد که عمل استخراج DNA به خوبی انجام شده است. نبود هیچ کشیدگی در فاصله بین چاهک و باند نشان از عدم آلودگی پروتئین ها در نمونه ها و عدم وجود باند اضافی در پائین ژل، نشان دهنده عدم وجود ناخالصی مربوط به اسید های نوکلئیک دیگر در نمونه ها بود (۱۵). به منظور تأیید تکثیر قطعه مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز بروی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفتند. مشاهده تنها یک باند ۴۱۱ جفت بازی یا کمک استفاده از لدر PUC Mix 8، نشان دهنده تکثیر درست قطعه انتخاب شده از آگزون شماره ۸ ژن DGAT1 و صحت انجام PCR بود.

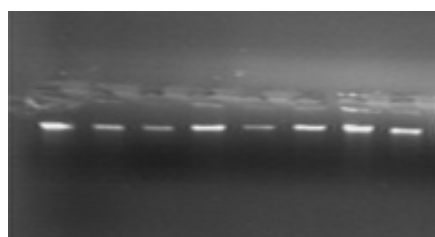
نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه های هضم شده با آنزیم

همان طور که بیان شد نمونه های PCR شده با استفاده از آنزیم

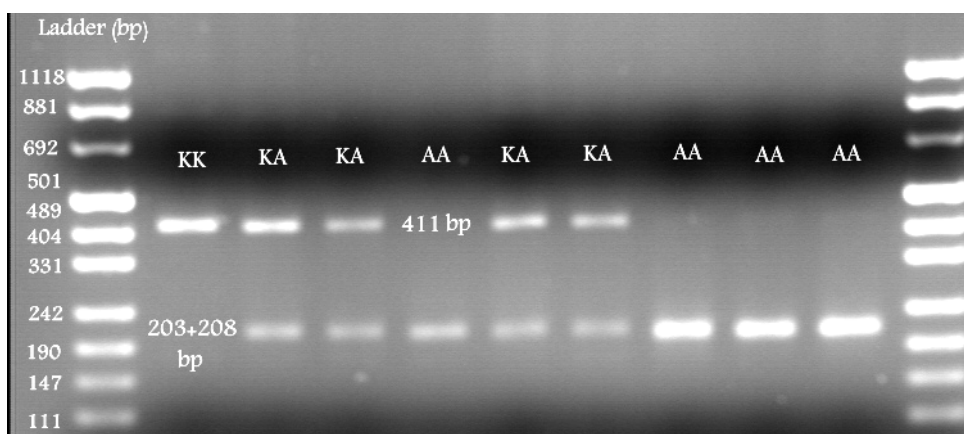
CfrI به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه مورد هضم قرار گرفتند، که بر اساس نحوه برش آنزیم سه نوع ژنوتیپ KK، KA، AA قابل مشاهده بودند. افراد KK، بدون جهش افراد KA دارای یک آلل جهش یافته و افراد AA در هر دو آلل آنها جهش صورت گرفته است. افرادی که تنها در ناحیه ۴۱۱ جفت بازی دارای باند هستند، جهش در آنها رخ نداده است و به شکل وحشی باقی مانده اند. افرادی که در دو ناحیه ۴۱۱ جفت بازی و ۲۰۳ یا ۲۰۸ جفت بازی دارای باند هستند، هتروزیگوت می باشند و تنها در یک آلل آنها جهش رخ داده است و در نهایت افرادی که دارای دو باند در ناحیه ۲۰۳ و ۲۰۸ جفت بازی هستند، هموزیگوت جهش یافته می باشند به این معنا که در هر دو آلل آنها جهش روی داده است. به علت نزدیک بودن دو قطعه ۲۰۳ و ۲۰۸ جفت بازی افراد AA به شکل یک باند ضخیم روی ژل آگارز قابل تشخیص هستند (شکل ۳).



شکل ۱- محصولات PCR



شکل ۲- نتایج استخراج DNA



شکل ۳- نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه های هضم شده با آنزیم

جدول ۱- تعداد ژنوتیپ ها در گله ها

گله ژنوتیپ	کمیت امداد	گل شهر	زرین هیو	نامفر	تلیسه نمونه	رضایی	دهیران	لبن	فکا	تکنوشیر	جمع
KK	۵	۶	۲	۲	۲	۱	۹	۴	۴	۱	۳۶
KA	۲۰	۱۴	۱۵	۲۰	۱۹	۳۵	۲۷	۲۱	۴۴	۱۱	۲۲۶
AA	۲۰	۱۴	۱۷	۲۶	۸	۳	۱۳	۶	۲۲	۷	۱۳۶
جمع	۴۵	۳۴	۳۴	۴۸	۲۹	۳۹	۴۹	۳۱	۷۰	۱۹	۳۹۸

در DGATI جدول ۳ نشان داده شده است.

کارایی یک نشانگر برای تجزیه و تحلیل های پیوستگی به میزان محتوای چند شکلی (PIC) آن بستگی دارد، که توسط این آماره اندازه گیری می شود. در این پژوهش مقدار PIC برابر با ۰/۴۹ برآورد گردید اما به دلیل اینکه SNP ها دارای سیستم ۲ آللی می باشند اندازه گیری این آماره برای این نشانگر ها دارای اهمیت چندانی نمی باشد. اندازه گیری این آماره بیشتر برای نشانگر های ریزماهوره که در هر جایگاه دارای تعداد زیادی آلل (تا ۱۱ آلل) می باشند حائز اهمیت است. با توجه به تعداد آلل های مشاهده شده و موثر در جایگاه مورد بررسی برای جمعیت، استنباط می گردد که کارایی آغازگرهای مورد استفاده خوب بوده و می توان از این آغازگرها در مطالعات بعدی استفاده نمود.

آزمون تعادل هاردی-وینبرگ

به منظور بررسی تعادل هاردی-وینبرگ در جایگاه مورد مطالعه در این جمعیت از دو آزمون کای اسکور و نسبت درست نمایی استفاده گردید. که از هر دو آزمون نتایج مشابهی حاصل شد. جایگاه مورد بررسی در این مطالعه از تعادل هاردی-وینبرگ خارج بود. این مطلب به این معنا است که شرایط لازم برای جمعیت در حال تعادل مانند عدم مهاجرت، جهش و ... در جمعیت مورد نظر وجود ندارد که دلایل احتمالی آن را می توان به علت نمونه گیری از جمعیت دانست که خود یک نوعی انتخاب و عامل بر هم زنده تعادل است و همچنین عدم تلاقی های تصادفی و عدم تبادل ژنتیکی بین زیرجمعیت ها نیز می تواند سبب بروز عدم تعادل در این جمعیت باشد. قابل ذکر است چون جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش از گله های صنعتی انتخاب شده بود و در این گله ها بنا بر نیاز خود از پایوت اسپرم و تلقیح مصنوعی استفاده می کنند، بنابراین نوعی مهاجرت در این جمعیت ها رخ می دهد. ضمناً آمیزش ها در گله های صنعتی به صورت تصادفی نیست بلکه آمیزش ها به شکل انتخابی انجام می پذیرد. بنابراین انحراف جمعیت از تعادل هاردی-وینبرگ در پژوهش حاضر دور از انتظار نبود. مقادیر کای اسکوار و نسبت درست نمایی به ترتیب ۱۷/۷۱ و ۱۸/۳ برآورد گردیدند. همچنین ارزش P برای هر کدام به ترتیب برابر با ۰/۰۰۰۰۲۶ و ۰/۰۰۰۰۱۹ بدست آمد.

تفکیک ژنوتیپی گله ها

محاسبه ی فراوانی های آللی، ژنوتیپی، میزان هتروزیگوسیتی و شاخص های شانون^۱ و نی^۲

از بین ۳۹۸ فرد تعیین ژنوتیپ شده ۳۶ فرد دارای ژنوتیپ KK، ۲۲۶ فرد دارای ژنوتیپ KA و ۱۳۶ فرد دارای ژنوتیپ AA بوده اند. جدول ۲ جزئیات بیشتری از تعیین ژنوتیپ افراد را نشان می دهد. در پژوهش انجام شده، جایگاه مورد مطالعه در ۳۹۸ نمونه، ۱۰۰ درصد چند شکلی نشان دادند. میزان فراوانی آللی محاسبه شده با فراوانی آللی محاسبه شده توسط گوتیر و همکاران (۸)، که فراوانی های آلل K و A برابر با ۰/۳۶ و ۰/۶۴ محاسبه کرده بودند تقریباً مطابقت داشت. همچنین فراوانی های آللی بدست آمده، با نتایج حاصل از پژوهش نقدی و همکاران (۲)، که فراوانی های آللی K و A را برابر با ۰/۲۳ و ۰/۷۷ گزارش کردند، تقریباً همخوانی دارد. در پژوهشی که توسط لاکورت و همکاران (۱۶)، انجام گرفت میزان هتروزیگوسیتی مشاهده و مورد انتظار ۰/۲۶ و ۰/۳۹ محاسبه گردید. بیشتر بودن مقدار هتروزیگوسیت مشاهده در این پژوهش (۰/۵۶) به دلیل تفاوت در تعداد نمونه های دو تحقیق و ترکیب ژنتیکی متفاوت جمعیت ها می باشد. نتایج بدست آمده به گونه ای بود که اکثر ژنوتیپ ها به صورت هتروزیگوت بودند و بیشترین فراوانی ژنوتیپی را به مقدار ۰/۵۶ به خود اختصاص دادند که با نتایج تالر و همکاران (۲۵)، مطابقت داشت. مقادیر نسبتاً بالای شاخص های شانون و نی، نشان از میزان تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت مورد مطالعه می باشد.

معیار های چند شکلی

معیارهایی که برای تعیین میزان چند شکلی جایگاه ها استفاده می شود تعداد آلل واقعی و تعداد آلل موثر می باشد. نتایج مربوط به این دو معیار همراه با مقادیر محتوای چندشکلی^۳ مربوط به جایگاه

1 -Shannon

2 -Nei

3 - Polymorphism Information Content

جدول ۲- بررسی تنوع ژنتیکی ژن DGAT1

ژن DGAT1	فراوانی آللی		فراوانی ژنوتیپ‌ها			هتروزیگوسیتی		شاخص	
	K	A	KA	AA	KK	'Obs	'Exp	شانون	نئی
	۰/۳۷	۰/۶۳	۰/۳۴	۰/۵۶	۰/۰۹	۰/۵۶	۰/۴۶	۰/۴۶۸۴	۰/۶۶۱۲

Exp-1: هتروزیگوسیتی مورد انتظار

Obs-2: هتروزیگوسیتی مشاهده شده

با تولید شیر، همان طور که انتظار می‌رود افراد که دارای ژنوتیپ AA هستند نسبت به افرادی که دارای ژنوتیپ KK هستند دارای تولید شیر بیشتری می‌باشند، بدین ترتیب که افراد AA دارای تولید ۷۱۱۹/۲۲±۶۷۵/۳۹ و افراد KK دارای تولید ۷۲۶۰/۱۳±۴۹۷/۸۰ می‌باشند که نتایج بدست آمده با نتایج ریپولی و همکاران (۲۰۰۶)، همخوانی دارد. اما نکته قابل توجه این است که افراد هتروزیگوت دارای بیشترین میزان تولید ۷۸۶۰/۰۵±۴۸۷/۸۸ می‌باشند، که بیشتر بودن میزان تولید هتروزیگوت‌ها را می‌توان با معنی دار شدن اثر غلبه (در قسمت ۳-۷) برای صفت تولید شیر توجیه کرد. نتایج حاصل از آزمون مقایسات میانگین نشان می‌دهد که تفاوت‌های بین ژنوتیپ‌های KK و KA باعث ایجاد اثر معنی دار برای تولید شیر ۳۰۵ روز گردیده است.

نتایج حاصل از برآورد اثرات افزایشی و غالبیتی

جدول ۶- برآورد اثرات افزایشی (آلل K در مقابل آلل A)

آزمون T	خطای استاندارد	اثر افزایشی	صفات
-۰/۵۱	۳۰۱/۶	-۱۵۴/۰۳	Milk ₃₀₅
-۱/۵۲	۱۳۴/۴	-۲۰۲/۸	Milk _{2X}
-۱/۵۰	۱۵۴/۱۹	-۲۳۱/۲۵	Milk _{ME}

جدول ۷- برآورد اثرات غالبیتی: ژنوتیپ KA در مقابل ژنوتیپ‌های AA

و KK		آزمون T	
خطای استاندارد	اثر غالبیتی	خطای استاندارد	صفات
۳۶۹/۸۷	+۹۴۶/۸۸	+۲/۵۶	Milk ₃₀₅
۱۶۴/۸۵	+۱۱۹/۸۴	+۰/۷۳	Milk _{2X}
۱۸۹/۰۹	+۱۴۵/۱۳	+۰/۷۷	Milk _{ME}

با بررسی مقادیر T در جدول‌های ۶ و ۷ می‌توان دریافت که اثرات افزایشی برای هیچکدام از صفات معنی دار نمی‌باشد (مقادیر بالای ۲ برای آزمون T معنی دار می‌باشد). اثر غلبه تنها برای تولید شیر بر اساس ۳۰۵ روز معنی دار شده است. با توجه به همین مطلب می‌توان بیشتر بودن مقدار تولید شیر در هتروزیگوت‌ها با توجه به برآورد LSM‌ها توجیه کرد.

جدول ۳- معیارهای چند شکلی

جایگاه	آلل موثر	محتوای چندشکلی
DGAT1	۲	۰/۴۹

نتایج حاصل از آنالیز آماری

جدول ۴- نتایج حاصل از آنالیز آماری

صفات	ارزش P	ارزش F	اثر ژنوتیپ
Milk ₃₀₅	۰/۰۰۰۱	۹/۱۸	S***
Milk _{2X}	۰/۱۲۳۰	۲/۱۱	N.S
Milk _{ME}	۰/۱۴۴۳	۱/۹۵	N.S

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که اثر ژنوتیپ روی تولید شیر بر اساس ۳۰۵ روز معنی دار می‌باشد که با نتایج گریسارت و همکاران (۱۰)، و اسپلمن و همکاران (۲۴)، مطابقت دارد. نقدی و همکاران (۲)، نیز اثر ژن DGAT1 را روی صفت تولید شیر دو بار دوشش بی معنی گزارش کردند که تایید کننده نتایج بدست آمده است. قابل ذکر است که حسین پور و همکاران (۱۱)، نیز ارتباط ژن DGAT1 را روی صفت ارزش اصلاحی تولید شیر در سطح ۱ درصد معنی دار گزارش کردند که حاکی از تاثیر این جایگاه در تولید شیر می‌باشد.

جدول ۵- برآورد میانگین حداقل مربعات (LSM) و آزمون مقایسات

میانگین برای صفت تولید شیر

ژنوتیپ / صفات	KK	KA	AA
Milk ₃₀₅ ***	۷۱۱۹/۲۲±۶۷۵/۳۹ ^a	۷۸۶۰/۰۵±۴۸۷/۸۸ ^b	۷۲۶۰/۱۳±۴۹۷/۸۰ ^{ab}
Milk _{ME}	۸۱۱۹/۰۸±۳۶۲/۵۸	۸۴۷/۰۵۰±۲۶۱/۹۱	۸۵۴۷/۸۶±۲۶۶/۸۸
Milk _{2X}	۶۹۷۷/۸۵±۳۱۶/۵۷	۷۲۸۰/۳۷±۲۲۸/۶۸	۷۳۷۰/۲۳±۲۳۳/۰۲

مطالعه برآورد LSM^۱ در ارتباط با صفتی که معنی دار شده است نیز قابل توجیه می‌باشد. پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهند که آلل K باعث افزایش تولید چربی و پروتئین و آلل A باعث افزایش تولید شیر می‌گردد (۱۰). در بررسی LSM‌های بدست آمده در ارتباط

1 -Least square means

برآورد واریانس ناشی از ژن در جمعیت

نتایج حاصل از واریانس ناشی از ژن بیان کننده این مطلب است که بخش اعظم واریانس صفت (Milk₃₀₅) در جمعیت به وسیله جایگاه ژن DGAT1 کنترل می‌شود. با توجه به این که صفت مورد مطالعه جز صفات پلی ژنیک می‌باشد و توسط جایگاه های زیادی کنترل می‌شود (به این معنا که هر کدام از این جایگاه ها بخشی از واریانس مربوط به صفت را در جمعیت کنترل می‌کنند) اما با این حال نتایج حاصل از این بخش، نشان دهنده اثر قابل توجه این ژن در جمعیت می‌باشد. برای درک بهتر میزان اثر جایگاه ژن DGAT1 می‌توان صفاتی را که اثر ژنوتیپ برای آنها معنی دار و بی معنی تشخیص داده شده است را مورد مقایسه قرار داد. به عنوان مثال، برای صفت تولید شیر بر اساس ۳۰۵ روز، میزان واریانس ناشی از ژن برابر با ۰/۸۲ درصد برآورد گردید در حالی که برای صفت تولید شیر بر اساس دو بار دوشش در روز واریانس ناشی از ژن فقط برابر با ۰/۰۱ درصد تخمین زده شد. قابل ذکر است که نتایج بدست آمده در ارتباط با واریانس ناشی از ژن تنها برای صفتی حائز اهمیت است که اثر ژنوتیپ روی آنها معنی دار تشخیص داده شده است و برای سایر صفات صرفا جهت گزارش دارد و دارای ارزش نمی‌باشند.

جدول ۸- میانگین حداقل مربعات صفات برای مدل های کاهشی و کامل

صفات	MS Reduce Model	MS Full Model
MILK ₃₀₅	۵۰۵۹۱۰۸	۵۰۱۷۶۰۷
MILK _{2X}	۱۱۰۲۵۸۷	۱۱۰۲۳۸۴
MILK _{ME}	۱۴۴۶۰۶۹/۸	۱۴۴۵۲۰۸/۵

$$\sigma^2 = MS_{Reduce Model} - MS_{Full Model} / MS_{Reduce Model}$$

اگر در این رابطه MS_{Reduce Model} برابر با A و MS_{Full Model} برابر با B باشد، جدول شماره ۹ بیانگر میزان واریانس ناشی از ژن به شکل درصد می‌باشد.

جدول ۹- محاسبه واریانس ناشی از ژن به شکل درصد

صفات	A-B	(A-B)/A	[(A-B)/A]×100
Milk ₃₀₅ ***	۴۱۵۰۱	۰/۰۰۸۲۰۳	۰/۸۲۰۳۳۲
MILK _{2X}	۲۰۲/۸	۰/۰۰۰۱۸۴	۰/۰۱۸۳۹۳
MILK _{ME}	۸۶۱/۳	۰/۰۰۰۰۶	۰/۰۵۹۶

منابع

- ۱- دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی. ۱۳۸۷. آمار نامه کشاورزی. جلد دوم. ص: ۹۳-۹۱.
- ۲- نقدی، ن.، م. ع. ادریس، ح. ر. رحمانی، و م. م. خوروش. ۱۳۸۹. اثر پلی مورفیزم ژن DGAT1 و تاثیر آن بر صفات تولیدی و تولید مثلی گاو های ماده هلشتاین. چهارمین کنگره علوم دامی ایران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج. ص: ۲۹۱۱-۲۹۱۴.
- 3- Beuzen, N. D., M. J. Stear, and K. C. Chang. 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. *Vet. J.* 160:42-52.
- 4- Coppieters, W., J. Riquet, J. J. Arranz, P. Berzi, N. Cambisano, B. Grisart, L. Karim, F. Marcq, L. Moreau, C. Nezer, P. Simon, P. Vanmanshoven, D. Wagenaar, and M. Georges. 1998. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine Chromosome 14. *Mamm. Genome.* 9: 540-544.
- 5- Esmailzadeh, K. A., C. D. K. Bottema, G.S. Sellick, A. P. Verbyla, C. A. Morris, N. G. Cullen, and W. S. Pitchford. 2008. Effects of the myostatin F94L substitution on beef traits. *J. Anim. Sci.*, 86: 1038-1046.
- 6- Esmailzadeh, A. K. 2010. A partial genome scan to identify quantitative trait loci affecting birthweight in Kermani sheep. *Small ruminant research.* 94(1): 73-78.
- 7- Geldermann, H. 1975. Investigation on inheritance of quantitative characters in animal by gene markers. *Theor and Appl Genet.* 46: 319-330.
- 8- Gautier, M., A. Capitan, S. Fritz, A. Eggen, D. Biochard, and T. Druet. 2007. Characterization of DGAT1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 90:2980-2988.
- 9- Gilmour, A. R. Gogel, B. J. Cullis, B. R. Thomson, R. 2006. ASReml user guide release 2. Hemel Hempstead, UK.
- 10- Grisart, B., W. Coppieters, F. Farnir, L. Karim, C. Ford, P. Berzi, N. Cambisano, M. Mni, S. Reid, P. Simon, R. Spelman, M. Georges, and R. Snell. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* 12: 222-231.
- 11- Hosseinpour Mashhadi, M., M. R. Nassiry, M. Mahmoudi, M. Rastin, N. E. J. Kashan, R. Vaez Torshizi, N. Tabasi, S. E. Noorae. 2011. Polymorphism and Sequencing of DGAT1 Gene in Iranian Holstein Bulls. *Iranian. J. Anim. Sci.* In press. Corrected proof.
- 12- Kappes, S.M., J. W. Keele, R. T. Stone, R. A. McGraw, T. S. Sonstegard, T. P. L. Smith, N. L. Lopez-Corrales,

- and C. W. Beattie. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 7: 235–249.
- 13- Kaupe, B., A. Winter, R. Fries, and G. Erhardt. 2004. DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *J. Dairy Res.* 71: 182-187.
- 14- Komisarek, J., and A. Michalak. 2008. A relationship between DGAT1 K232A polymorphism and selected reproductive traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Anim. Sci. Pap and Rep.* 26:89-95.
- 15- Lien, S., S. Rogne, M. J. Brovold, and P. Alestrom. 1990. A method for isolation of DNA from frozen (A.I.) bulls semen. *J. Anim. Breed and Genet.* 107: 74–78.
- 16- Lacorte, G. A., M. A. Machado, M. L. Martinez, A. L. Campos, R. P. Maciel, R. S. Verneque, R. L. Teodoro, M. G. C. D. Peixoto, M. R. S. Carvalho, and C. G. Fonseca. 2006. DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. *Genet and Mol. Res.* 5 (3): 475- 482.
- 17- Marina, R. S. F., A. C. Rogerio, A. L. C. Luis, C. S. Antonio, E. O. D. Mayra, A. V. Jose, and N. O. Henrique. 2009. Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness. *Genet. Mol. Biol.* 32(1):75-82.
- 18- Miller, S. A., D. D. Dykes, and H. F. Polesky. 1988. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 16: 1215.
- 19- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet. London.* 41: 225–233.
- 20- Raymond M., and Rousset, F. 1995. GENEPOP Version 1.2: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity.* 86:248–249.
- 21- Ripoli, M. V., P. Corva, G. Giovambattita. 2006. Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. *Res. vet. Sci.* 80:287-290.
- 22- Riquet, J., W. Coppieters, N. Cambisano, J. J. Arranz, P. Berzi, S. K. Davis, B. Grisart, F. Farnir, L. Karim, M. Mni, P. Simon, J.F. Taylor, P. Vanmanshoven, D. Wagenaar, J. E. Womack, and M. Georges. 1999. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbreed populations: application to milk production in dairy cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 16: 9252–9257.
- 23- Sorensen, B., C. Kuhn, F. Teuscher, F. Schneider, R. Weselake, and J. Wegner. 2006. Diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity in relation to muscle fat content and DGAT1 genotype in two different breeds of *Bos Taurus*. *Dummerstorf.* 49: 351-356.
- 24- Spelman, R. J., C. A. Ford, P. McElhinney, G. C. Gregory, and R. G. Snell. 2002. Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. *J. Dairy Sci.* 85:3514-3517.
- 25- Thaller, G., W. Kramer, A. Winter, B. Kaupe, G. Erhardt, and R. Fries. 2003. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *Am. Soc. Anim. Sci.* 81:1911-1918.
- 26- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/eu077528>.