

ارتباط چندشکلی ژن کاپاکازئین با صفات اقتصادی شیر در گاوهای بومی استان گیلان

فردین ناظمی^۱، سیدضیالالدین میرحسینی^{۲*}، نوید قوی حسین زاده^۳، هوشنگ دهقان زاده^۴، مختار

مهدی زاده^۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۴- عضو هیات علمی بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

۵- کارشناس ارشد معاونت بهبود تولیدات دامی جهاد کشاورزی استان گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۱)

چکیده

در این پژوهش رابطه ژنوتیپ‌های ژن کاپاکازئین با صفات تولیدی در گاوهای بومی استان گیلان بررسی شد. از ۱۰۰ راس گاو ماده در فومن، رشت و آستانه اشرفیه خونگیری به عمل آمد. استخراج DNA با استفاده از روش شستشوی نمکی بهینه انجام گرفت. با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی، قطعه‌ای به طول ۳۵۰ جفت باز از ژن کاپاکازئین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر شد. جهت تعیین ژنوتیپ ژن کاپاکازئین با استفاده از نشانگر PCR-RFLP، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به وسیله آنزیم *HinfI* هضم شد. فراوانی مشاهده شده ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به ترتیب ۰/۴۸، ۰/۵۲ و ۰/۰۰ و فراوانی آلل‌های A و B به ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۲۶ بود. بر اساس نتایج آزمون مربع کای، جمعیت‌های مورد بررسی در تعادل هاردی-واینبرگ قرار نداشتند. مقایسه میانگین حداقل مربعات در این جایگاه نشان داد که اثر چندشکلی بر صفات تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین معنی‌دار بود ($P < 0.01$). تولید شیر روزانه گاوهای با ژنوتیپ AA در مقایسه با گاوهای با ژنوتیپ AB بیشتر بود (به میزان ۰/۸۱ کیلوگرم). همچنین درصد چربی و پروتئین شیر گاوهای دارای ژنوتیپ AB نسبت به گاوهای با ژنوتیپ AA بیشتر بوده است (به ترتیب ۰/۱ و ۰/۱۴). در تحقیق حاضر گاوهای دارای ژنوتیپ AB نسبت به افراد با ژنوتیپ AA درصد چربی شیر بالاتری داشتند ($P < 0.01$) و ژنوتیپ AA دارای درصد چربی و درصد پروتئین کمتر بود.

واژه های کلیدی: پروتئین شیر، چندشکلی ژنی، کاپاکازئین، گاو بومی گیلان، PCR-RFLP

مقدمه

صفات اقتصادی مهم مثل تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین صفاتی تحت تاثیر مدیریت، عوامل محیطی و ژنتیک حیوان بوده و در دسته صفات پلی ژنتیک قرار می گیرند (Orita and Iwahana, 1989). در دهه های اخیر تولید شیر جمعیت های اصلاح شده گاوها سالیانه ۳-۴ درصد افزایش داشته است که تقریباً نصف این افزایش سهم انتخاب ژنتیکی بوده است (Pryce and Veerkamp, 1999; Botaro and Lima, 2009, Alinaghizadeh *et al.*, 2007). شناسایی ژنوتیپ پروتئین های شیر در دام های شیری موقعیت بی نظیری فراهم می آورد که در آن ژنتیک مولکولی می تواند روی صفات کمی حائز اهمیت اقتصادی اثر مستقیمی داشته باشد (Rasouli *et al.*, 2005). ژن های کاندیدا ژن هایی هستند که نقش آنها از نظر فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در عملکرد صفات به اثبات رسیده است. از جمله ژن های کاندیدای موثر بر صفات تولید شیر و ترکیبات آن، ژن کاپاکازئین است. کازئین ها به وسیله غده های پستانی ترشح می شوند. معمولاً شیر گاوها حاوی ۳ الی ۵ درصد پروتئین بوده که ۸۰ درصد آن کازئین ها و ۲۰ درصد آن پروتئین های آب پنیر می باشد. ترکیبات کاپاکازئین تقریباً ۱۲ درصد از کل کازئین و یکی از اجزای اصلی پروتئین های شیر گاو را تشکیل می دهند (Alinaghizadeh *et al.*, 2007 Chilliard *et al.*, 2006).

کاپاکازئین از لحاظ اندازه از بقیه کازئین های شیر کوچک تر است. این پروتئین علاوه بر نقش محافظت از میسل کازئین در شیر، در کیفیت پنیر تولید شده، سرعت دلمه بستن (Feligini *et al.*, 2005) راندمان تبدیل شیر به پنیر و محتوای کلسیم و فسفات پنیر اهمیت به سزایی دارد (Rasouli *et al.*, 2005, Mohammadi *et al.*, 2009b). دو سوم کلسیم شیر یا مستقیماً به کازئین شیر اتصال دارد و یا بخشی از ترکیب کلسیم و فسفات کلونیدی است که میسل کازئین نامیده می شود. کاپاکازئین نسبت به کلسیم غیر حساس بوده و به عنوان تثبیت کننده میسل شناخته می شود. کاپاکازئین نقش مهمی در جلوگیری از ته نشین شدن کازئین های دیگر دارد. مدت زمان ایجاد لخته و استحکام پنیر از نظر تکنیکی حائز اهمیت است. بین استحکام لخته و اندازه میسل ارتباط منفی وجود دارد. استحکام لخته های حاصل از میسل های کوچک تر بیشتر است و در نتیجه در

نژادهای بومی به دلیل شدت انتخاب پایین، تعداد زیاد پرورش دهندگان و استفاده از تلقیح مصنوعی و سایر فناوریهای تولید مثلی، از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند. از طرفی با گذشت زمان و کسب آگاهی بیشتر نسبت به اهمیت صفات مختلف، نیازهای جدیدی مطرح می شود که متخصصین اصلاح نژاد را بر آن داشته که از ژنهای بومی استفاده نمایند. این مسئله به خصوص با افزایش تولید محصولات دامی و تولید محصولات پیش بینی نشده در آینده، لزوم حفظ تنوع ژنتیکی در دامهای بومی را الزامی ساخته است (Mousavizadeh *et al.*, 2009). چرا که وجود تنوع ژنتیکی، باعث افزایش پیشرفت ژنتیکی و تطابق پذیری سریعتر خواهد شد و یک گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی قادر به سازگاری با تغییرات محیطی نیست (Askari *et al.*, 2011). حفاظت از تنوع ژنتیکی نژادهای بومی موجود به اندازه توسعه یک نژاد پرتولید، حایز اهمیت می باشد (Javanmard *et al.*, 2008). راهبردهای حفاظت پس از کسب اطلاعات جامع در خصوص منابع ژنتیکی موجود ارائه می شود، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Shojaei *et al.*, 2010) و مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از ذخایر ژنتیکی ضروری است (Mohammadi *et al.*, 2009a).

نژادهای گاو به دو گروه اصلی گاو بدون کوهان (*Bos Taurus*) و گاو کوهان دار (*Bos indicus*) تقسیم می شوند هر دو گروه گاوهای ذکر شده در جمعیت گاوهای ایران موجود هستند و گاو بومی گیلان نیز از نوع گاوهای کوهان دار است. در واقع گروه اول معمولاً به گاوهای اروپایی و گروه دوم به گاوهای آسیایی شهرت دارند (توکلیان، ۱۳۷۸). گاو بومی گیلان (تالشی) با سایر نژادهای گاو بومی در ایران تفاوت دارد. هم گاو نر و هم گاو ماده شاخ دارند. در جنس نر کوهانی برجسته روی شانها به چشم می خورد و اختلافی فاحش و غیرعادی به لحاظ وزن و قد بین حیوان نر و ماده وجود دارد. سن تلیسه ها در اولین آبستنی در حدود ۱۸ الی ۲۰ ماه و وزن آنها ۱۸۰-۲۰۰ کیلوگرم است و همچنین وزن نرها در اولین جفت گیری ۲۵۰ کیلوگرم است (توکلیان، ۱۳۷۸).

گاوهایی که شیر آن‌ها کاپاکازئین بالایی دارد، اندازه میسل‌ها کوچک‌تر و استحکام لخته بیشتر خواهد بود (Aleandari et al., 1990). ژن کاپاکازئین در گاو با وزن مولکولی ۱۹۰۰۰ دالتون روی کروموزوم ۶ واقع شده است و دارای پنج اگزون و چهار اینترون می‌باشد. پروتئین حاصل از آلل A در موقعیت ۱۳۶ و ۱۴۸ به ترتیب دارای اسیدآمین‌های ترئونین (ACC) و اسیدآسپارتیک (GAT) و در آلل B دارای اسیدآمین‌های ایزولوسین (ATC) و آلانین (GCT) می‌باشند (Lin et al., 1992; Jann and Prinzenberg, 2004, Sulimova et al., 2007). ژنوتیپ کاپاکازئین اثر معنی‌داری بر تولید شیر دارد. گاوهایی که دارای ژنوتیپ BB کاپاکازئین هستند نسبت به گاوهایی که دارای ژنوتیپ AA کاپاکازئین هستند، ۱۷۳ کیلوگرم شیر کمتر تولید می‌کنند. همچنین گاوهایی که دارای ژنوتیپ BB هستند ۰/۸ درصد پروتئین بیشتری نسبت به گاوهایی که دارای ژنوتیپ AA هستند، تولید می‌کنند (Bovenhuis et al., 1992; EO Othman., 2005; Ahani Azari et al., 2005). هر چند تغییرپذیری ژنتیکی در جایگاه کاپاکازئین برای چندین نژاد، همراه با فراوانی‌های آلی و تعیین تنوع ژنتیکی بین نژادها گزارش شده است (Aleandari et al., 1990; Alinaghizadeh et al., 2007; Mohammadi et al., 2009; Mohammadi et al., 2009a and b; Chilliard et al., 2006; Moiola and Andrea, 2007; Patel et al., 2007). ولی این ژن در گاو بومی استان گیلان مطالعه نشده است، لذا هدف از این پژوهش ارزیابی تنوع ژنتیکی کاپاکازئین به عنوان یک پروتئین شیر با استفاده از روش PCR-RFLP و ارتباط آن با صفات تولید شیر (تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین شیر) در گله‌های اقماری گاو بومی استان گیلان است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش از ۱۰۰ راس گاو بومی ماده از سه منطقه استان گیلان شامل شهرهای فومن (ایستگاه اصلاح نژاد گاو بومی حسین کوه)، رشت و آستانه اشرفیه (به ترتیب ۳۰، ۳۶ و ۳۴ راس) که رکوردهای مربوط به آنها به وسیله معاونت بهبود تولیدات دام جهاد کشاورزی استان گیلان جمع‌آوری شده بودند به صورت تصادفی و انفرادی نمونه خون اخذ شد. نمونه‌گیری خون از سیاهرگ وداج با استفاده از لوله‌های خلاء حاوی ماده ضد انعقاد

(۲٪ EDTA) به عمل آمد. استخراج DNA با استفاده از روش شستشوی نمکی بهینه انجام شد (Miller et al., 1988). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد ارزیابی شد. برای تکثیر یک قطعه به طول ۳۵۰ جفت باز که شامل قسمتی از اگزون و اینترون شماره ۴ ژن کاپاکازئین بود، یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی زیر استفاده شد (Medrano and Aguilar-Cordova, 1990):

آغازگر مستقیم:
5'-ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG-3'

آغازگر معکوس:
5'-GCCCATTTTCGCCTTCTCTGTAACAGA-3'

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از برنامه حرارتی شامل: مرحله واسرشته‌سازی ابتدایی، واسرشته‌سازی، اتصال و بسط چرخه اصلی و بسط انتهایی به ترتیب در درجه حرارت‌های ۹۴، ۹۴، ۶۰، ۷۲، ۷۲ درجه سلسیوس در مدت زمان‌های ۱، ۳۰، ۳۰، ۳۰ و ۱۸۰ ثانیه و تعداد دور چرخه اصلی ۳۲ استفاده شد.

تکثیر قطعه مورد نظر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با غلظت‌های زیر و در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد:

بافر PCR 1x، کلرید منیزیم ۱/۵ میلی‌مولار، از هر آغازگر ۰/۱۵ میکرومولار، دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات ۰/۲ میلی‌مولار، آنزیم Taq DNA پلی-مرز ۱ واحد، DNA ژنومی ۱۰۰ نانوگرم و حجم واکنش با افزودن آب دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسید. برای بررسی صحت تکثیر محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به کمک آنزیم برشی Hinf I در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت مورد هضم قرار گرفت. قطعات برش خورده روی ژل آگارز ۲/۵ درصد تفکیک شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید امتیازدهی و آلل‌ها شناسایی شدند.

فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی و آزمون مربع کای (χ^2) برای بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، با کمک نرم‌افزار Pop Gene ویرایه ۱/۳۲ صورت گرفت (Yeh et al., 1999). بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن کاپاکازئین و صفات تولید شیر بر اساس یک مدل خطی و با استفاده از

درصد پروتئین شیر) مربوط به شکم‌های زایش مختلف استفاده شد:

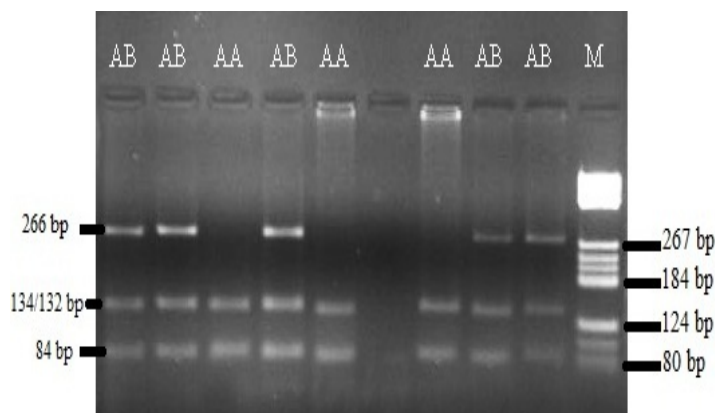
$$Y_{ijklmnop} = \mu + G_i + \text{Region}_j + \text{Parity}_k + \text{year}_l + \text{Season}_m + b_{1n}(\text{Age}_n - \text{Age}) + \text{Birth}Y_o + e_{ijklmnop}$$

در این رابطه، $Y_{ijklmnop}$ ؛ مشاهدات مربوط به صفات تولید شیر، μ ؛ اثر میانگین جامعه برای صفات مختلف، G_i ؛ اثر کلاس ژنوتیپی i أم (سه ژنوتیپ AA، AB و BB)، Region_j ؛ اثر منطقه j أم (سه منطقه فومن، رشت و آستانه اشرفیه)؛ Parity_k ؛ اثر نوبت زایش k أم (نوبت‌های زایش اول تا هفتم)، year_l ؛ اثر سال زایش l أم (سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۳۹۲)، Season_m ؛ اثر فصل زایش m أم (چهار فصل زایش)، Age_n ؛ اثر میانگین سن زایش n أم (ماه (۳۰ تا ۱۴۰ ماهگی)، b_{1n} ؛ ضریب رگرسیون خطی میانگین سن زایش، Age ؛ میانگین سن زایش در جمعیت مورد مطالعه، $\text{Birth}Y_o$ ؛ اثر سال تولد o أم (سال - های ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۸) و $e_{ijklmnop}$ ؛ اثر خطای باقیمانده است.

رویه GLM نرم‌افزار SAS ویرایه ۹/۱ (SAS Inst, 2004) انجام شد. همچنین تفاوت میانگین‌های حداقل مربعات صفات مورد مطالعه برای ژنوتیپ‌های کاپاکازین به روش توکی مقایسه شدند.

صفات مورد بررسی در گاوهای بومی گیلان در این پژوهش شامل: صفات تولید شیر، درصد چربی و پروتئین شیر بود. در این پژوهش اثر ژنوتیپ‌های ژن کاپاکازین (عامل ژنتیکی) به همراه اثرات محیطی (منطقه، تعداد شکم زایش (دوره شیردهی)، سن زایش، فصل زایش، روزهای شیردهی و سال زایش) روی این صفات مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تعداد رکوردها، میانگین، انحراف معیار، ضریب تغییرات و اشتباه معیار مربوط به هر صفت در جمعیت مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

از مدل آماری زیر جهت بررسی ارتباط چندشکلی ژن کاپاکازین و صفات تولید شیر (تولید شیر، درصد چربی و



شکل ۱: الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده حاصل از هضم آنزیمی *HinfI* بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد: ژنوتیپ AA شامل قطعات ۱۳۴، ۱۳۲ و ۸۴ جفت بازی، ژنوتیپ AB شامل قطعات ۲۶۶، ۱۳۴، ۱۳۲ و ۸۴ جفت بازی و M، نشان دهنده خط‌کش ژنی pBR322/BsuRI است.

Fig. 1. Genotypic patterns observed in the enzyme digestion of *HinfI* on gel of 2.5 percent agarose: genotype AA included fragments of 134, 132 and 84 bp, genotype AB included fragments of 266, 134, 132 and 84 bp and M was a genetic ladder of pBR322/BsuRI.

جدول ۱- توصیف آماری صفات تولید شیر (کیلوگرم)، درصد چربی و پروتئین شیر
Table1. Statistical description of milk production (Kg), fat and protein percentage.

Trait	Record Number	mean	CV (%)	SE
Milk	1225	3.05	34.15	0.032
Fat	1202	3.23	24.75	0.023
Protein	1202	3.20	20.76	0.019

نتایج و بحث

آلل A در جایگاه CSN-Hinf I شامل دو نقطه برش بود و در نتیجه سه باند با اندازه‌های ۸۴، ۱۳۲ و ۱۳۴ جفت باز تشکیل می‌شود (قطعات ۱۳۲ و ۱۳۴ جفت بازی را نمی‌توان بر روی ژل آگارز تفکیک نمود)، ولی آلل B به دلیل تبدیل نوکلئوتید آدنین به سیتوزین در موقعیت ۵۳۴۵ و تغییر توالی ناحیه برش، تنها دارای یک نقطه برش بوده و در نتیجه دو نوار ۲۶۶ و ۸۴ جفت بازی ایجاد شد لیکن در این پژوهش مشاهده نشد (شکل ۱).

فراوانی ژنوتیپی و ژنی در هر منطقه و در مجموع مناطق محاسبه شد. فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB در مجموع سه منطقه به ترتیب ۰/۴۸، ۰/۵۲ و ۰/۰۰ بود و فراوانی ژنی برای آلل‌های A و B نیز به ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۲۶ بدست آمد. در این پژوهش جایگاه مورد نظر در سطح نمونه جمع‌آوری شده دارای چندشکلی بود. فراوانی ژنوتیپی و ژنی مربوط به جایگاه ژنی کاپاکازین در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در جایگاه مورد مطالعه با کمک آزمون مربع کای بیانگر وجود عدم تعادل در سه جمعیت مورد مطالعه بوده است (P<۰/۰۱). مهاجرت‌های متعدد و آمیزش‌های غیر تصادفی و رانش ژنی و همچنین انتخاب و جهش در جمعیت‌های کوچک که اثر چشمگیری دارند، می‌تواند علت این عدم تعادل محسوب شود.

درحالی‌که ژنوتیپ BB در هیچکدام از جمعیت‌ها مشاهده نشد، اختلاف فراوانی ژنوتیپی نیز در هر سه جمعیت مورد بررسی معنی دار نبود. عدم مشاهده ژنوتیپ BB ممکن است به دلیل تعداد کم نمونه‌های مورد بررسی باشد. همچنین فراوانی آلل A بیشتر از آلل B در هر سه جمعیت مورد بررسی بوده است. نتایج حاضر با نتایج Alipanah et al. (2005) که فراوانی بالاتر آلل A نسبت به آلل B را در گاوهای قرمز و سفید^۱ و سیاه و سفید^۲ روسی گزارش کرده‌اند مطابقت دارد.

اثر ژنوتیپ‌های حاصل از چندشکلی جایگاه ژنی کاپاکازین بر صفات تولید شیر به روش میانگین حداقل مربعات آزموده شده و نتایج مقایسه آنها در جدول ۳ نشان داده شده است. تفاوت معنی‌داری بین کلاس‌های ژنتیکی

برای تولید شیر در این جایگاه مشاهده شد (P<۰/۰۱). میانگین حداقل مربعات تولید شیر در ژنوتیپ AA نسبت به ژنوتیپ AB، ۰/۸۱ کیلوگرم در روز بیشتر بود. نتایج این بررسی با گزارش (2005) Curi et al. و Tsirar et al. (2005) در خصوص شناسایی تولید شیر بالا در گاوهای با ژنوتیپ AA نسبت به ژنوتیپ AB در نژادهای مورد بررسی، مطابقت داشتند. همچنین Bovenhius et al. (1992) گزارش دادند که گاوهای با ژنوتیپ AA، ۱۷۳ کیلوگرم شیر بیشتر نسبت به گاوهای با ژنوتیپ BB تولید می‌نمایند. علت ارتباط بین تولید شیر و ژن‌های پروتئین شیر، اثر پلیوتروپی شیر و پیوستگی ژن‌های پروتئین شیر با ژن‌های تولید شیر است (صادقی و همکاران، ۱۳۸۸).

در این پژوهش با استفاده از نشانگر ژنتیکی PCR-RFLP دو آلل و دو ژنوتیپ در ژن کاپاکازین شناسایی گردید. به طور کلی فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده AA و AB به ترتیب ۰/۴۸ و ۰/۵۲ بود و فراوانی آلل A و B به ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۲۶ محاسبه گردید. مقایسه میانگین حداقل مربعات در این جایگاه نشان داد که اثر چند شکلی CSN-Hinf I بر صفات تولید شیر، درصد چربی و پروتئین شیر معنی‌دار است (P<۰/۰۱). بر این اساس، گاوهای با ژنوتیپ AA نسبت به گاوهای با ژنوتیپ AB به میزان ۰/۸۱ کیلوگرم در روز تولید شیر بیشتری داشتند و ژنوتیپ AB نسبت به ژنوتیپ AA به میزان ۰/۱ و ۰/۱۴ درصد به ترتیب درصد چربی و پروتئین شیر بیشتری داشت. همچنین اثر عوامل محیطی نیز به عنوان فاکتورهای تأثیرگذار غیر ژنتیکی بر صفات تولید شیر معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۱).

در پژوهش حاضر گاوهای دارای ژنوتیپ AB نسبت به افراد با ژنوتیپ AA درصد چربی شیر بالاتری داشتند (P<۰/۰۱). همچنین ژنوتیپ AB نسبت به AA به طور معنی‌داری با درصد پروتئین بالا نیز در ارتباط بوده و ژنوتیپ AA دارای کمترین درصد چربی و درصد پروتئین بوده است. این نتایج مشابه گزارش Hang et al. (1989) می‌باشد که ژنوتیپ AA دارای کمترین درصد چربی و پروتئین بود. در مطالعه‌ای که روی آلل‌های کاپاکازین در دو نژاد هلشتاین و جرسی روسیه انجام شد، مشخص گردید که آلل B کاپاکازین تأثیر مطلوب و معنی‌داری روی کیفیت شیر و محصولات پروتئین داشت (Alipanah et al., 2008). همچنین Heck et al. (2009)

¹ Red Pid² Black Pid

جدول ۲- فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی در جایگاه ژنی کاپاکازئین (PCR-RFLP-Hinf I)

Table 2. The frequencies of alleles and Genotypes in CSN3 (PCR-RFLP-Hinf I).

Region	Sample size	Allelic Frequency		Genotypic Frequency			χ^2
		A	B	AA	AB	BB	
Fouman	30	0.717	0.283	0.433	0.567	0.00	4.368 ^{ns}
Rasht	36	0.764	0.236	0.528	0.472	0.00	3.205 ^{ns}
Astaneh-ye Ashrafiyeh	34	0.735	0.265	0.471	0.529	0.00	4.122 ^{ns}
Total	100	0.740	0.260	0.480	0.520	0.00	12.068 ^{***}
SE	-	0.014	0.014	0.027	0.027	0.00	-

ns: non significant ($P>0.05$)***: significant ($P<0.001$)

جدول ۳- مقایسه میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌ها برای صفات اقتصادی

Table 3. Comparison of Least square means of genotypes for the economic traits.

Genotype	milk production		Fat (%)		Protein (%)	
	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
AA	3.62 ^a	0.093	3.25 ^b	0.064	3.16 ^b	0.057
AB	2.82 ^b	0.091	3.35 ^a	0.063	3.30 ^a	0.056

Means with different superscripts within each trait are significantly different at $P<0.01$

است. لازم به ذکر است که انتخاب آلل B از CSN3 می‌تواند به عنوان یک بخشی از برنامه‌های اصلاح‌نژاد گاوها برای تولید پنیر به کار گرفته شود.

سیاسگزاری

بدین‌وسیله از بخش تحقیقات علوم دامی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان و همچنین معاونت بهبود تولیدات دامی جهاد کشاورزی استان گیلان بخاطر مساعدت‌هایی که در انجام این تحقیق داشتند سپاسگزاری می‌شود.

گزارش کردند که از نظر آماری آلل B تاثیر معنی‌داری روی محتوای پروتئین در شیر گاوهای هلشتاین دارد. (Kucerova et al. (2006) پیشنهاد دادند که آلل B بر مقدار پروتئین و چربی شیر تاثیر مثبت دارد. به طور کلی گفته می‌شود که آلل A روی تولید شیر و آلل B روی درصد پروتئین و چربی شیر تاثیر مثبت دارد. آزمون آلل‌های A و B اهمیت ویژه‌ای دارد، به دلیل اینکه شیر گاوهای که آلل B ژن CSN3 را حمل می‌کنند مقاومت گرمایی بهتر، انعقاد سریع‌تر، استحکام دلمه بیشتر و اندازه میسل متمایز دارد که برای پنیر سازی مطلوب

فهرست منابع

- توکلیان ج. ۱۳۷۸. نگرشی بر ذخایر ژنتیکی دام و طیور بومی ایران. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج، صفحه: ۱۳۲-۱۳۱.
- صادقی م، مرادی شهربابک م، رحیمی میانجی ق، و نجانی جوارمی ا. ۱۳۸۸. اثر چندشکلی جایگاه‌های بتالاکتوگلوبولین و کاپاکازئین بر صفات تولیدی در گاوهای نر هلشتاین ایران. نشریه علوم دامی. شماره ۸۴. صفحه: ۳۹-۴۶.
- Ahani Azari M., Rostamzadeh J. and Sulimova G. E. 2005. Genotyping of the two common variants of k-Casein Gene (CSN3) in three Russian Cattle Breed, using PCR-RFLP. 4th National Biotechnology Congress of Iran.

- Aleandari R., Buttazoni G., Schneider J. C., Caroli A. and Davoli R. 1990. The effect of milk protein polymorphisms on milk components and cheese producing ability. *Journal Dairy Science* 73: 241-255.
- Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Moradnasab Badrabadi S. 2007. Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (*Bos indicus*) using PCR-RFLP. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 (23), 4291-4294.
- Alipanah M., Alexandrovna Kalashnikova L. and Veladimirovich Rodionov G. 2008. KAPPA-CASEIN and PRL-RSA I genotypic frequencies in two Russian Cattle breeds. *Archivos de Zootecnia*. 57 (218): 131-138.
- Alipanah M., Kalashnikova L. and Rodionov G. 2005. Kappa-casein genotypic frequencies in Russian breeds Black and Red Pied cattle. *Iranian Journal of Biotechnology*. 3(3): 191-194.
- Askari N, Abadi MM, Baghizadeh A (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. *Iranian Journal of Biotechnology* 9: 222-229.
- Botaro B. G., Lima Y. V. R. 2009. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38(12): 2447-2454.
- Bovenhuis H., Arcendo V. and Korvea S. 1992. Association between milk protein polymorphism and milk production trait. *Journal of Dairy Science*. 75: 2549-2559.
- Chilliard Y., Rouel J. and Leroux C. 2006. Goat's alpha-s1 casein genotype influences its milk fatty acid composition and delta-9 desaturation ratios. *Animal feed science and technology*. 131(3-4): 474-487.
- Curi R. A., de Oliveira H. N. Gimenes M. A. Silveira A. C. and Lopes C. R. 2005. Effects of CSN3 and LGB gene Polymorphisms on production traits in beef cattle. *Genetics and Molecular Biology*. 28(2): 262-266.
- Feligini M., Vlaco S. Curik V. C. Pama P. Greppi G. and Enne G. 2005. A single nucleotide polymorphism in the sheep k-casein coding region. *Journal of Dairy Research*. 72(3): 317-321.
- Hang K.F., Hayes J.F. Moxley J.E. and Monards H.G. 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cow. *Journal of Dairy Science*. 63:22-26.
- Heck J. M. L., Schennink A. van Valenberg H. J. F. Bovenhuis H. Visker M. H. P. W. Aredonk J. A. M. and Hooijdonk A. C. M. 2009. Effect of milk protein variants on the protein composition of bovine. *Journal of Dairy Science*. 92(3): 1192-1202.
- Jann O. C. and Prinzenberg E. M. 2004. High polymorphism in the-casein (CSN3) gene from wild and domestic caprine species revealed by DNA sequencing. *Journal of Dairy Research* 71(2): 188-195.
- Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmash A, Asadzadeh N. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (*Iranian Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics* 44 (4), 495-497
- Kucerova J., Metejickova A. Jandurova O. M. Sorenesen P. Nemcova E. Stipkova M. Kott T. Bouska J. and Frelich J. 2006. Milk protein gene CSN1S1, CSN2, CSN3, LBG and thire relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science*. 51:241-247.
- Lin C.Y., Sabour M. P. and Lee A. J. 1992. Direct typing to milk proteins as an aid for genetic improvement of dairy bulls and cows: A review. *Animal Breeding Abstracts*. 60: 1-10.
- Medrano J. F. and Aguilar-Cordova. 1990. Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. *Biotechnology*. 8: 144-146.
- Mohammadi A, Nassiry MR, Mosafer J, Mohammadabadi MR, Sulimova GE 2009a. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian journal of genetics* 45 (2), 198-202.
- Mohammadi, A; Mohammadabadi, M.R.; Mirzaei, H.; Baghizadeh, A.; Dayani, O.; Asadi Fozi, M.; Bahrampoor, V. 2009b. Study of Kappa Casein gene of local and Holstein dairy cattle in Kerman province using PCR-RFLP method. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources* 16(2), 125-132.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 16: 1215.
- Mousavizadeh Azim, Mohammad Abadi Mohammadreza, Torabi Azam, Nassiry Mohammad Reza, Ghiasi Heydar Ali, Esmailizadeh Koshkoieh Ali. 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology* 7 (1), 51-53.
- Orita M. and Iwahana H. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 86(8): 2766.
- Othman, E.O., 2005. The identification of kappa-casein genotyping in Egyptian river buffalo using PCR-RFLP. *Arab. J. Biotechnol*. 8, 265-274.
- Pryce J. E. and Veerkamp R. F. 1999. The incorporation of fertility indices in genetic improvement programmes. *British Society of Animal Science*. 26: 237-249.
- Rasouli H., Rahimi G. Sayyazadeh H. Jabbar-Pour M. and KhanAmhadi A. 2005. Characterization of kappa casein (κ -CSN) gene polymorphism in water buffalo population of North-west of Iran by PCR-RFLP. *The 4th National Biotechnology congress of Islamic Republic of Iran, Kerman*. 1-5.

- SAS Inst. SAS® User's Guide, Version 9.1. 2004. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Shojaei M, Mohammad Abadi M, Asadi Fozi M, Dayani O, Khezri A, Akhondi M (2010). Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research* 2: 67-73.
- Sulimova, G.E., Ahani Azari, M., Mohammadabadi, M.R., and Lazebny, O. 2007. k-Casein Gene (*CSN3*) Allelic polymorphism in Russian cattle breeds and its information value as a genetic marker. *Russian Journal of Genetics*. 43: 88-95.
- Tsiaras A. M., Bargouli G. G. Banos G. and Boscosl. C. M. 2005. Effect of kappa-casein and a-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 88: 327-334.
- Yeh F. C., Yang R. C. and Boyle. T. 1999. POPGENE, version 1.31. Microsoft windows-based Freeware for population genetic analysis. Molecular Biology and Technology Center, University of Alberta, Canada.



Relationship between Kappa-Casein gene polymorphism with milk economic traits in native cattle of Guilan province

F. Nazemi¹, S. Z. Mirhosseini^{2*}, N. Ghavi Hossein-Zadeh³, H. Dehghanzadeh⁴, M. Mehdizadeh⁵

1-MSc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

4- Scientific board member of Animal Science Research Department, Guilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Rasht, Iran

5- Senior expert, Animal Production Improvement Assistant, Jihad-e-Keshavarzi Organization of Guilan, Rasht, Iran

(Received: 1-20-2017 – Accepted: 4-21-2017)

Abstract

In this research, the relationship between polymorphism of CSN (Kappa-Casein) gene and production traits in Guilan native cattle was studied. Blood samples were taken from 100 cows Fouman, Rasht and Astaneh-ye-Ashrafiyeh. Genomic DNA was extracted by modified salting out method. A 350 bp fragment of the bovine kappa-CSN gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using a specific primer. The PCR products were digested by *Hinf* I to determine kappa-casein genotypes with PCR-RFLP marker. Observed frequencies for genotypes AA, AB, BB were 0.48, 0.52, 0.00 and allelic frequencies for A and B were 0.74 and 0.26, respectively. The chi-square test results showed that the studied population were not at Hardy-Weinberg equilibrium. Comparison of least square means indicated that the polymorphism has a significant effect on milk yield, fat and protein percentage ($P < 0.01$). The cows with genotype AA produced 0.81 kg more milk over the cows with genotype AB. The cows with genotype AB produced 0.1 and 0.14 percentages higher milk fat content compare to the cattle with genotypes of AA ($P < 0.01$). The results also revealed that the cattle with genotypes of AA produced milk with lowest fat and protein content.

Keywords: Milk protein, Gene polymorphism, Kappa-Casein, Guilan native cattle, PCR-RFLP

*Corresponding author: szmirhoseini@gmail.com