تحقیقات تولیدات دامی
سال اول/ شماره دوم/ تابستان ۱۳۹۱ (۷۲ -۶۵)

بررسی چندشکلی در اینترون سوم ژن هورمون رشد گاو بومی گیلان با استفاده از روش PCR-RFLP

رامین صیقلانی[۱]، سید ضیاءالدین میرحسینی[۲*]، بابک ربیعی[۳] و علی اکبر عبادی[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان ۲- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، ۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان و ۴- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات برنج کشور- رشت

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۷/۲۸- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۶)

چکیده

ژن هورمون رشد گاوی (*bGH*)، بخشی از خانواده ژن‌های پرولاکتین و لاکتوژن‌های جفتی است. تنوع موجود در اینترون‌های این ژن، پتانسیل ویژه‌ای برای استفاده به‌عنوان مارکرهای ژنتیکی از خود نشان داده و می‌تواند به بهبود ژنتیکی جمعیت‌ها کمک کند. به‌منظور بررسی فراوانی آللی *MspI* در اینترون سوم ژن هورمون رشد گاوهای بومی گیلان، به‌طور تصادفی ۷۰ رأس گاو از این جمعیت تعیین و از آنها نمونهٔ خون تهیه شد. با استفاده از روش تغییر یافته استخراج نمکی، *DNA* نمونه‌ها استخراج شد. سپس با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (*PCR*) قطعهٔ ۳۴۵ جفت بازی در این ناحیه تکثیر و محصول *PCR* با استفاده از آنزیم *MspI* هضم شد. سپس به‌منظور تعیین ژنوتیپ، نمونه‌های هضم شده به ژل اکریل آمید ۸٪ منتقل شدند. این آنزیم دارای ۲ مکان برش روی قطعه مورد نظر بوده و در اثر هضم با آنزیم *MspI* سه ژنوتیپ مشاهده شده و فراوانی آللی *MspI*(+) ۰/۴۶۴۳ محاسبه شد. آزمون کای مربع بیانگر وجود حالت تعادل در فراوانی محاسبه شده برای آلل *MspI* بود.

واژه‌های کلیدی: اینترون سوم، چندشکلی *DNA*، فراوانی آللی *MspI*، گاو بومی گیلان، هورمون رشد گاوی

*نویسنده مسئول: mirhosin@guilan.ac.ir یا szmirhoseini@gmail.com

مقدمه

پیشرفت‌های ژنتیک مولکولی باعث شناسایی تعداد زیادی از نشانگرهای ژنتیکی شده است. این نشانگرها به ما توانایی بررسی نواحی ژنومی مرتبط با نشانگر را داده و در نهایت به ما امکان شناسایی *QTL*های مؤثر بر انحرافات صفات کمی مهم اقتصادی را می‌دهند. می‌توان از نشانگرهای مرتبط با *QTL* در انتخاب استفاده کرد و این اطلاعات باعث افزایش معیار صحت انتخاب و به‌دنبال آن افزایش پاسخ به انتخاب می‌شوند (Beuzen *et al*., 2000).

هر روزه، در نتیجه مطالعات پویش ژنومی گاو، تعداد جدیدی از جایگاه‌های صفات کمی (QTL)، که بر صفات تولید شیر مؤثرند شناسایی می‌شوند. هدف از برنامه‌های اصلاح نژادی در گاو، ابتدا شناسایی ژن‌هایی است که به‌طور مؤثری صفات تولیدی را تحت تأثیر قرار می‌دهند.گام بعدی انتقال این دسته از ژن‌ها به نسل‌های آینده است (Lucy *et al*., 1993, Yardibi, 2009). ژن هورمون رشد به‌دلیل اثر بر رشد، ترکیب بدن و رشد سلول‌های پستانی، به‌طور گسترده در دام‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. این ژن روی کروموزوم شماره ۱۹ واقع شده است. طول این ژن حدود bp ۱۸۰۰ بوده و دارای ۵ اگزون و ۴ اینترون است و یک *mRNA* به اندازه *bp* ۷۸۶ را کد می‌کند (Cornicella *et al*., 2003; Yardibi *et al*., 2009).

تنوع آللی در توالی بخش ساختاری و تنظیم کننده ژن از جنبه‌های مختلفی مورد توجه است، زیرا چندشکلی‌های ژنتیکی از خواص ژنتیکی هر جامعه بوده و احتمالاً به شناسائی روند هیبریداسیون جوامع در گذشته کمک می کند. همچنین این احتمال وجود دارد که این چندشکلی‌ها به‌طور مستقیم و غیرمستقیم بر عملکرد تولید شیر و یا رشد تأثیر داشته باشد. تنوع در نواحی اینترون و بالا دست و پایین دست ژن می‌تواند به‌عنوان نشانگر برای کمک به بهبود ژنتیکی جوامع مطرح باشد (Mitra *et al*., 1999).

هورمون رشد گاوی یک پروتئین با وزن مولکولی حدود *KDa* ۲۲ و متشکل از ۱۹۰ یا ۱۹۱ اسید آمینه است. چند شکلی‌های متعددی در ژن هورمون رشد گاو شناسایی شده است. چند شکلی موجود در اینترون ۳ و اگزون ۵ ژن هورمون رشد ارتباط معنی‌داری با پارامترهای تولید شیر، پروتئین شیر و تولید گوشت نشان داده‌اند (Mattos *et al*., 2004; Hojet *et al*.,1993). گرچه مطالعات ارزشمندی بر روی چندشکلی مربوط به *GH-MspI* و اثرات آن بر روی صفات تولیدی در گاو انجام گرفته، اما نتایج به‌دست آمده از محققین مختلف مشابه نبوده است. جایگاه برش آنزیم *MspI* توالی *CCGG* بوده و محل برش توسط این آنزیم بعد از اولین باز (C) قرار دارد که قطعاتی با انتهای چسبنده ایجاد می‌کند. نتایج بررسی در نژادهای مختلف نشان داده است که آلل *MspI*(-) در گاوهای دارای شیر با چربی بالا، فراوانی بیشتری دارد (lee *et al*., 1993; Hojet *et al*., 1993). نتایج مشابهی توسط Falaki *et al.* (1996) گزارش شده و اعلام کردند این آلل با افزایش چربی شیر درگاوهای هلشتاین – فریزین مرتبط بوده است. همچنین در بررسی صورت گرفته توسط Lagziel *et al.* (2000) گزارش شده که گاوهای هتروزیگوت پروتئین شیر بالاتری دارند. نتایج متفاوتی توسط Yao *et al.* (1996) گزارش شد که نشان می‌دهد آلل *Msp*I(+) بر روی عملکرد تولید شیر، چربی و پروتئین اثر خواهد داشت. هدف از این مطالعه برآورد فراوانی آللی در جایگاه *GH- MspI* و میزان چندشکلی در اینترون سوم ژن هورمون رشد گاو بومی گیلان است.

مواد و روش‌ها

از ۷۰ رأس گاو بومی (تالشی) از مناطق مختلف استان گیلان به‌طور تصادفی نمونه‌گیری انجام شد. بدین منظور خون‌گیری از سیاهرگ وداج و در گوساله‌ها از سیاهرگ دمی با استفاده از لوله‌های تحت خلاء حاوی مادهٔ ضد انعقاد EDTA (EDTA ۰/۵ مولار به میزان ۱۰ درصد حجم خون تازه) انجام شد. DNA نمونه‌ها به روش استخراج نمکی تغییر یافتهٔ Miller *et al.* (1988) انجام شد و سپس جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA حاصله مورد بررسی قرار گرفت. با بهره‌گیری از یک جفت آغازگر اختصاصی، قطعهٔ ۳۴۵ جفت بازی در اینترون سوم ژن هورمون رشد (در موقعیت ۱۷۲۴-۱۳۸۰) با استفاده از روش *PCR* تکثیر شد. توالی آغازگر مورد استفاده به صورت زیر بود (Yao *et al*., 1996).

5` GGA CAG AGA TAC TCC ATC CAG 3`
5` AGA TGC GAA GCA GCT CCA AGT 3

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر با محتوای ۵۰ نانوگرم *DNA* ژنومی، ۰/۵ میکرومول از هر آغازگر، ۲۰۰ میکرومول از هر یک از چهار نوع دزاکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها (*dNTPs*)، ۲/۵ میکرولیتر بافر (*X* 10)*PCR*، ۲ میلی مولار کلرید منیزیم و یک واحد آنزیم *Taq DNA* پلیمراز به روش استاندارد انجام شد. تکثیر قطعه مورد نظر در ۳۵ دور انجام شد و دوره‌های حرارتی بهینه شده شامل مرحله واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشته‌سازی در $^{\circ}C$ ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در $^{\circ}C$ ۵۹ به مدت یک دقیقه، بسط آغازگر در $^{\circ}C$۷۲ به مدت ۲ دقیقه، و دمای بسط نهایی در $^{\circ}C$ ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. سپس محصولات تکثیر شده توسط آنزیم *MspI* هضم شدند. برای این منظور ۸ میکرولیتر از هر محصول تکثیر شده به‌همراه ۳ واحد آنزیم و ۲/۵ میکرولیتر بافر (*X*10) *PCR* مخلوط و در دستگاه ترموسایکلر به مدت ۳ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا هضم صورت گیرد. فرآورده‌های حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد بارگذاری و الکتروفورز با توان ۷۵ وات و به مدت یک ساعت انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با نیترات نقره انجام شد. امتیازبندی باندها به صورت صفر و یک به ترتیب برای عـــدم وجود و وجود باند مورد نظر انجام شد. تجزیه و تحلیل نهایی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار *POPGENE* (*Version 1.3*) انجام شد. تنوع ژنتیکی جمعیت مـورد مطالعه بر اســاس شــاخص‌های (به صورت شـاخص هتروزیگوتی مـورد انتظار) محاسبه شد (MacHugh *et al*., 1996):

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 \qquad [۱]$$

در این فرمول H_e شاخص هتروزیگوتی مورد انتظار، p_i نشان دهندهٔ فراوانی آلل *i* ام و عدد یک نشان دهنـدهٔ کـل فراوانی ژنوتیپی در جمعیت است. نئی در سـال ۱۹۷۸ ایـن فرمول را معیار اندازه‌گیری تنوع ژنی نامید و بیان کـرد کـه این فرمول برای جانداران دیپلوئید و نیز برای جانـداران بـا سیستم تولیدمثلی خاص و متفاوت از پستانداران مـی‌توانـد معرف میزان هتروزیگوتی باشد (MacHugh *et al*., 1996). همچنین می‌تـوان تنـوع را بـه‌صـورت زیـر و تحـت عنـوان شاخص اطلاعات شانون به‌دست آورد:

$$H' = -\sum_{i} p_i Lnp_i \qquad [۲]$$

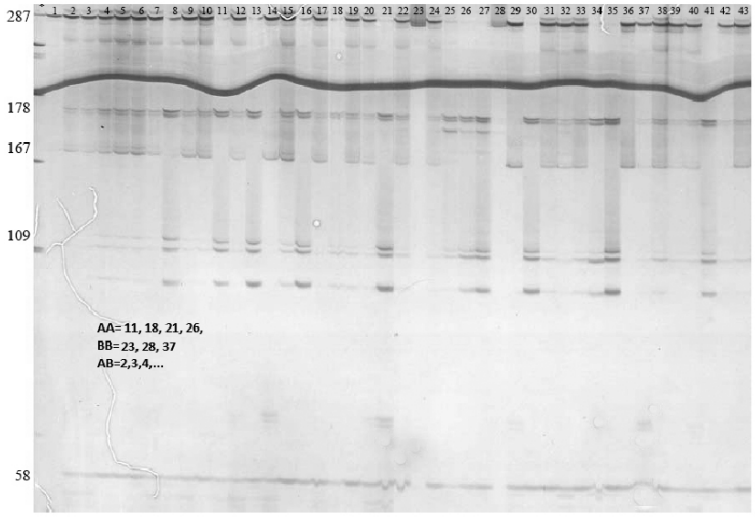
برخلاف هتروزیگوتی، که برای هر تعداد آلل حد نهایی یک دارد، حداکثر مقدار 'H برابر بـا *Ln(n)* اسـت. بـا وجـود آنکه تفسیر بیولوژیکی این معیـار مشـخص نیسـت، ممکـن است برای اندازه‌گیری تنوع جایگاه‌های بسیار متغیـر مفیـد باشد (Machugh *et al*., 1996). تعداد مؤثر آلـل‌هـا نیـز بـا استفاده از نرم‌افزار *POPGENE* و از فرمـول زیـر محاسـبه شد:

$$n_e = 1/ \sum_{i=1}^{n} p_i^2 \qquad [۳]$$

در این رابطه p_i فراوانی آلل *i*ام است. این پارامتر اطلاعاتی در مورد تأثیر نسبی آلل‌ها و نحوه توزیع و میزان مشارکت آلل‌ها در تنوع مشاهده شده خواهد داد به‌طوری که هرچه آلل‌ها به‌طور یکنواخت در سطح جمعیت پخش شده باشند (فراوانی آلل‌ها به هم نزدیک باشد) این معیار مقدار عددی بیشتری داشته و تأثیر آلل‌ها در تنوع مشاهده شده حداکثر است.

نتایج و بحث:

آنزیم *MspI* دارای دو مکان برش برروی قطعه ۳۴۵ جفت بازی تکثیر شده است. قطعات حاصل از نمونه‌های هضم شده با این آنزیم در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- ژنوتیپ‌های حاصل از هضم آنزیم *MspI* بر روی ژل اکریل آمید ۸٪ AA = نمونه‌های(ستون‌های) فاقد باندهای ۲۸۷ و ۱۶۷ (ژنوتیپ (+/+) *MspI*) BB = نمونه‌های(ستون‌های) فاقد باندهای ۱۷۸ و ۱۰۹ (ژنوتیپ (-/-)*MspI*)

Fig. 1. Different genotypes resulted from *MspI* endonuclease on the acrylamid gel 8%.
AA: Samples (columns) missed 287 and 167 bands (*MspI* (+/+) genotypes)
BB: Samples (columns) missed 178 and 109 bands (*MspI* (-/-) genotypes)

جدول ۱- قطعات مشاهده شده و مورد انتظار حاصل از هضم آنزیم *MSPI*

Table 1. Expected and observed fragments after digestion by *MSPI* enzyme

Expected fragments	Observed fragments
58, 109, 178	58, 109, 178
58, (109, 178)	58, 287
178, (58, 109), 178	167, 178

قطعات مشاهده شده و مورد انتظار پس از هضم توسط آنزیم *MspI* در جدول۱ آورده شده است. همانگونه که در این جدول نشان داده شده است به جز قطعات مورد انتظار، قطعات دیگری نیز مشاهده شدند. احتمالاً تشکیل این قطعات به‌دلیل تغییر در نوکلئوتیدهای توالی محل برش قابل تشخیص توسط آنزیم بوده که طبیعتاً با این تغییر آنزیم *MspI* قادر به شناسایی محل برش نخواهد بود.

به‌عنوان مثال قطعه ۱۶۷ جفت بازی احتمالاً در اثرجهش به‌وجود آمده در نوکلئوتیدهای ۵۷ تا ۶۰ ایجاد شده و در نتیجه، به‌جای اینکه دو قطعهٔ ۱۰۹ و ۵۸ جفت بازی داشته باشیم، قطعه‌ای به‌اندازه مجموع آن دو یعنی ۱۶۷ جفت باز تولید شده است. به‌همین ترتیب قطعهٔ ۲۸۷ جفت بازی نیز احتمالاً در اثر جهش در محدوده نوکلئوتیدهای ۱۰۹ تا ۱۱۲ بوجود آمده است. بنابراین وجود یا عدم وجود جهش در منطقه برش، ژنوتیپ‌های متفاوتی ایجاد می‌کند. در صورت عدم وقوع جهش، ژنوتیپ هموزیگوت به صورت (+/+) و در صورت وقوع جهش (-/-) خواهد بود.

گزارش‌های مختلفی مبنی بر ارتباط بین آلل‌های *MspI* و صفات تولیدی وجود دارد. بررسی صورت گرفته در نژاد هلشتاین نشان داد که ارتباط معنی‌دار بین آلل (-) *MspI* و بازدهٔ چربی بالاتر در این نژاد وجود دارد (Sabour *et al*., 1997, Dybus, 2002). در حالی‌که Yao و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که آلل (-)*MspI* باعث کاهش تولید شیر، چربی و پروتئین شیر می‌شود. با توجه به اینکه در تحقیق حاضر رکوردی از نمونه‌های مورد آزمایش ثبت نشده است، نمی‌توان در مورد اثرات آلل‌های *MspI*برصفات تولیدی در این جمعیت قضاوت کرد و جهت پیش‌بینی عملکرد آلل‌ها نیازمند ثبت رکورد و مشخصات جمعیت مورد مطالعه هستیم.

فراوانی‌های آللی جایگاه *MspI* و فراوانی‌های ژنوتیپی در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

جدول۲- فراوانی ژنی و ژنوتیپی حاصل از هضم قطعه تکثیر شده بوسیله آنزیم برشی *MSPI*

Table 2. Gene and genotype frequencies by result of *MSPI* enzyme on amplification fragment

X^2	(٪)Allele frequency		GH genotype			locus
	(+)	(−)	(−/−)	(+/−)	(+/+)	
0.24788	0.4643	0.5357	0.3	0.4714	0.2286	*Msp1*-GH

با استفاده از تست کای مربع (X^2)، مشخص شد که فراوانی آللی این جایگاه ژنی در جامعه مورد بررسی در حالت تعادل هاردی-واینبرگ قرار دارد.

فراوانی آلل (-)*MspI*، ۰/۵۳۵۷ به‌دست آمد. ارتباط بین منشأ جغرافیایی نژادها و فراوانی آلل (-)*MspI* قبلا گزارش شده است. فراوانی پایین آلل (-)*MspI* در نژادهای با منشأ اروپای شمالی، فراوانی متوسط در نژادهای اروپای شرقی و اطراف مدیترانه و فراوانی آللی بسیار بالا برای نژادهای با منشأ شبه قاره هند گزارش شده است (Lagziel *et al*., 2000). فراوانی این آلل در نژادهای مختلف بسیار متفاوت بوده و از ۰/۰ در نژاد هرفورد تا ۰/۸۹–۰/۸۱ در نژاد Gyr گزارش شده است. فراوانی آلل (-)*MspI* در سایر نژادهای ایرانی نیزعموماً بالا گزارش شده است. این فراوانی به میزان ۰/۴۵ در گاو مازندرانی، ۰/۴۹ در گاو سرابی، ۰/۵۶ در گاو گلپایگانی گزارش شده است (Zakizadeh *et al*., 2006). فراوانی کم تا متوسط این آلل برای نژادهای بی‌کوهان و فراوانی بالا برای نژادهای کوهان‌دار ذکر شده و عنوان کرده‌اند که احتمالاً آلل (-)*MspI* از نژادهای *Bos tauruse* اروپای شرقی حوزه مدیترانه وارد شده و سرانجام با فراوانی پایین به اروپای شمالی و غربی و آفریقای غربی رسیده است (Lagziel *et al*., 2000). با توجه به این‌که گاوهای بومی گیلان (جمعیت مورد مطالعه) نیز جزء نژادهای کوهان‌دار *Bosindicine indicine* هستند، این فراوانی آللی منطقی به نظر می‌رسد.

تعداد آلل مؤثر و کارآمد (n_e) در این جایگاه برابر ۱/۹۸۹۸ بود (جدول ۳) که فاصله کم آن با تعداد آلل واقعی نشان دهنده کارایی بالای آلل‌ها در بوجود آوردن چندشکلی و تنوع ژنتیکی در این جایگاه ژنی است.

شاخص شانون در این جمعیت برابر ۰/۶۹۰۶ دارای حد بالایی بود و با مقدار به دست آمده در گاوهای بومی استان کرمان که ۰/۶۵۸ گزارش شده است مطابقت دارد (Mohammadabadi *et al*., 2010).

جدول ۳- خلاصه ای از آمار تنوع ژنی برای جایگاه GH - *MspI*

Table 3. Summary of genic variation statistics for loci *Msp1*-GH

locus	n_a	n_e	Shannon Index(I)
Msp1-GH	2	1.9898	0.6906

n_a= number of observed allels, n_e = number of expected allels

میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این جایگاه نزدیک به حد متوسط(بیشترین مقدار هتروزگوسیتی در یک جمعیت در حال تعادل) است(جدول ۴). مقدار هتروزیگوسیتی یک جمعیت یکی از شاخصه‌های تنوع ژنتیکی آن جمعیت محسوب می‌شود. همچنین این مقدار نزدیک به مقدار مورد انتظار آن در جمعیت مورد مطالعه گاو بومی گیلان است. این ممکن است نشان‌دهنده آن باشد که این جمعیت در یک ساختار با جفت‌گیری تقریباً تصادفی حفظ شده و هیچ برنامه انتخابی سازمان یافته‌ای در این جمعیت صورت نگرفته است.

شاخص نئی و شانون برآورد شده مقدار نسبتاً بالایی از تنوع ژنتیکی را در این جمعیت نشان می‌دهد (جدول ۴). وجود تنوع ژنتیکی از شاخصه‌های بسیار مهم در حفظ ذخایر ژنتیکی محسوب می‌شود.

جدول ۴- شاخص هتروزیگوسیتی در جایگاه ژن جمعیت مورد مطالعه

Table 4. Heterozygosity index for loci in the studied samples

Locues	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom	Exp_Het	Nei Index
GH-*MspI*	0.5286	0.4714	0.4990	0.5010	0.4974

Exp_ Hom and Exp_Het= expected homozygosity and heterozygosity respectively
Obs_Hom and Obs_Het= observed homozygosity and heterozygosity respectively

دام‌های بومی به‌عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک ژنتیکی در هر کشور محسوب می‌شوند و حفظ و تکثیر آنها ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. این حیوانات پس از سالیان متمادی انتخاب طبیعی و مصنوعی و نیز گذر از موانع بسیار و با غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند و نسبت به بسیاری از محدودیت‌های محیطی سازگاری پیدا کرده‌اند. وجود این سطح از تنوع در گاو بومی گیلان که ماده ژنتیکی پایه برای برنامه‌های اصلاح نژاد در زیستگاه خویش محسوب می‌شود، می‌تواند نسبت به استفاده از این ذخیره ژنتیکی برای برنامه‌های اصلاح نژادی در آینده اطمینان بخش باشد.

فهرست منابع

Beuzen N., Stear M. and Chang K. 2000 Molecular markers and their use in animal breeding. The Veterinary Journal, 160: 42-52.

Cornicella D., Dario C. and Bufano B. 2003 Polymorphism del gene performances. Large Animal Review, 3: 3-7.

Dybus A. 2002 Association of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black-and-White cattle. Animal Science Papers and Reports, 4: 203-212.

Falaki M., Gengler N., Sneyers M., Prandi A., Massart S., Fromigoni A., Burny A., Portetelle D. and Renaville R. 1996 Relationships of polymorphisms of growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Frisian Bulls. Journal of Dairy Science, 79: 1446-1453.

Hoej S., Fredholm M., Larsen N.J. and Nielsen V.H. 1993 Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. Animal Genetic, 24: 91-96.

Lagziel A., Denise S., Hanotte O., Dhara S., Glazko V., Broadhead A., Davoli R., Russo V. and M. Soller. 2000 Geographic and breed distribution of an *MspI* PCR-RFLP in the bovine growth hormone (bGH) gene. Animal Genetic, 31: 210-213.

Lee B.K., Lin G.F., Crooker B.A., Uvtaugh M.P., Hansen L.B. and Jones C. 1993 Association of somatotropin gene polymorphism with selection for milk yields in Holstein Cows. Journal of Dairy Science, 13: 373–381

Lucy M.C., Hauser S.D., Eppard P.J., Kivi G.G., Clark J.H., Bauman D.E. and Krivi G.G. 1993 Variation of somatotropin in cattle: gene frequency in major diary breeds and association with milk production. Domestic Animal Endocrinology, 4: 325-333.

Machugh D.E. 1996. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. Ph.D. dissertation Dublin University.

Mattos K.K., Del Lama S. N., Martinez M.L. and. Freitas A.F. 2004 Association of bGH and Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr Bulls. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 39: 147-150

Mitra A., Yadav B., Ganai N. and Balakrishnan C. 1999 Molecular markers and their applications in livestock improvement. Current Science, 77: 1045-1053.

Miller S.A., Dykes D.D. and Polesky H.F. 1988 A simple salting out precedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16: 1215.

Mohammad abadi M.R., Torabi A., Tahmourespoor M., Baghizadeh A., Esmailizadeh Koshkoieh A. and Mohammadi A. 2010 Analysis of bovine growth hormone gene polymorphism of local and Holstein cattle breeds in Kerman province of Iran using polymerase chainreaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). African Journal of Biotechnology, 41: 6848-6852.

Sabour M.P., Lin C.Y. and Smith C. 1997 Association of genetic variants of bovine growth hormone with milk production traits in Holstein cattle. Journal of Animal Breeding and Genetics, 114: 435-442

Yao J., Aggrey S.E., Zadworny D., Hayes J.F. and Kuhnlein V. 1996 Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. Genetics, 144: 1809-1816.

Yardibi H., Hosturk G.T., Paya I., Kaygisiz F., Ciftioglu G., Mengi A. and Oztabak K. 2009 Associations of growth hormone gene polymorphisms with milk production traits in South Anatolian and East Anatolian Red cattle. Journal of Animal and Veterinary Advances, 8: 1040-1044.

Zakizadeh S., Rahimi G., Mirae-Ashtiani S.R., Nejati-Javaremi A., Moradi-Shahrbabak M., Reinecke P., Reissiann M., Masoudi A.A., Amirinia C. and Mirhadi S.A. 2006 Analysis of bovine growth hormone gene polymorphisms in three Iranian native breeds and Holstein cattle by RFLP-PCR. Biotechnology, 5: 385-390. (In Farsi)

Polymorphisms in third intron of growth hormone of Guilan native cows using PCR-RFLP markers

R. Seighalani[1], S. Z. Mirhosseini[2*], B. Rabiei[3], A. A. Ebadi[4]

1- Graduated MS student, Animal Science Department, University of Guilan. 2- Associate Professor, Animal Science Department, University of Guilan. 3- Associate Professor, Plant Breeding Department, University of Guilan. 4- Researcher, Rice Research Institute of Iran

(Received:20-10-2011- Accepted: 27-11-2012)

Abstract

Bovine growth hormone(bGH) gene, is a part of the multiple gene family that contains prolactin and placental lactogens. The variations in the introns of this gene, have potential usefulness as genetic markers and could help in the genetic improvement of populations. In ordre to investigate allele frequency of *MspI* in introne 3 of growth hormone gene of Guilan native cattle breed, blood samples were collected from seventy heads of randomaly choosen cattles (cows). Genomic DNA was extracted from these samples, using modified salting out method. Polymerase chain-reaction (PCR) procedure was used to amplify a 345 bp segment in this region and then digested with *MspI* restriction enzymes. Digested samples were run on the acrylamid gel 8% to recognize their genotype. This enzyme had two restriction sites and after digestion with *MspI* enzyme on that fragment and 2 allels and 3 genotypes have been observed. Frequency of *MspI*(+) allele was estimated to 0.4643. X^2 test has showed the equilibrium of frequency *MspI* in samples.

Key words: Bovin growth hormone, DNA polymorphism, Guilan native cow, *MspI* allelic frequency, Third intron

*Corresponding author: mirhosin@guilan.ac.ir or szmirhoseini@gmail.com