تحقیقات تولیدات دامی
سال چهارم/شماره دوم/تابستان ۱۳۹۴ (۹۴-۸۷)

مطالعه چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی ژن لاکتوفرین و ارتباط آن با تعداد سلول‌های سوماتیک شیر گاوهای دورگ استان گیلان

محمد آیت اللهی[۱]، سید حسین حسینی مقدم[۲*]، سید ضیاالدین میرحسینی[۳]، نوید قوی حسین زاده[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان
۲- استادیار گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان
۳- استاد گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان
۴- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۰)

چکیده

درحالی که تعداد گاوهای اصیل در استان گیلان نسبت به سایر استان‌ها کم بوده، جمعیت گاوهای دورگ در حال افزایش است. لاکتوفرین به عنوان یکی از ژن‌های مطرح در ایجاد مقاومت به ورم پستان، نقشی اساسی در مکانیسم دفاعی غدد پستان گاو دارد. لذا در این مطالعه چندشکلی یک جایگاه جهشی شناخته شده در اینترون ۶ ژن لاکتوفرین و اثر آن بر تعداد سلول‌های سوماتیک شیر۱۰۰ راس گاو دورگ نسل اول جفتگیری گاو ماده بومی استان گیلان با گاوهای نر هلشتاین بررسی شد. محصول PCR یک قطعه ۳۰۱ جفت بازی است که در اثر هضم با آنزیم EcoRI سه ژنوتیپ شامل AA (۳۰۱)، BB (۲۰۱ و ۱۰۰) و AB (۳۰۱ و ۲۰۱ و ۱۰۰) ایجاد می‌کند. هر سه ژنوتیپ در گاوهای آمیخته استان گیلان شناسایی شد. فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده برای ژنوتیپ‌های AA، BB و AB به ترتیب برابر با ۴۱، ۲ و ۵۷٪ بودند که انحراف معنی‌داری را از حالت تعادل هاردی-واینبرگ نشان داد ($P<۰/۰۱$)؛ به علاوه هتروزایگوسیته مشاهده شده از مقدار مورد انتظار نیز تفاوت زیادی داشت. فراوانی آللی A و B به ترتیب ۶۹/۵ و ۳۰/۵٪ و تعداد آلل مؤثر و شاخص شانون نیز به ترتیب ۱/۷۴ و ۰/۶۲ بودند. متوسط تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر گاوهای دورگ ۲۶۱×۱۰^{۳} در میلی‌لیتر شیر بود. تفاوت لگاریتم تعداد سلول‌های سوماتیک ژنوتیپ‌های AB، AA و BB معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). با توجه به وفور کم ژنوتیپ BB به سختی بتوان یکی از دو آلل ژن لاکتوفرین را به عنوان نشانگر مقاومت به ورم پستان معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، سلول‌های سوماتیک شیر، گاو دورگ، لاکتوفرین، ورم‌پستان

* نویسندهٔ مسئول: hosseini@guilan.ac.ir

مقدمه

با وجود مزایا و منافع سرشار در اقتصاد گاوهای اصیل شیری، مشکلات و بیماری‌هایی از جمله ورم پستان در این صنعت وجود دارد که می‌تواند تهدیدی جدی برای ادامه حیات این صنعت باشد. گاوهای دورگ با تولید حدود یک سوم گاوهای اصیل، مقاومت بیشتری نسبت به بیماری‌ها دارند. لیکن لازم است خصوصیات زنتیکی و صفات مرتبط با مقاومت آنها بررسی شود. تعداد سلول‌های سوماتیک[1](SCC) شیر شاخصی برای مقاومت و حساسیت گاوها به ورم‌پستان بوده و می‌تواند یکی از نشانه‌های ارزیابی عفونت داخل پستانی، کیفیت و بهداشت شیر تولیدی باشد (Martins *et al.*, 2011).

لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین متصل شونده به آهن از خانواده ترانسفرین است که نقش مهمی در مکانیسم دفاع طبیعی غدد پستانی دارد (Chaneton *et al.*, 2008; Kutila, 2004). در بررسی ۱۲۴ گاو شیری سیاه و سفید لهستانی با درصدهای متفاوتی از آمیخته‌گری با گاوهای هلشتاین-فریزین نیز سه ژنوتیپ AA، BB و AB به ترتیب با فراوانی‌های ۳۷/۹، ۲/۴۲ و ۵۹/۶۸ درصد و در نتیجه دو آلل A و B با فراوانی ۶۷/۷۴ و ۳۲/۵۶ درصد مشاهده شد (Wojdak-Maksymiec *et al.*, 2006). (Sender *et al.* 2006) در بررسی دیگری روی گاوهای لهستانی با استفاده از همین آغازگرها در ژن لاکتوفرین و به منظور بررسی اثر متقابل بین چندشکلی دو ژن لاکتوفرین و BoLA-DRB3، و نیز ارتباط آنها با تعداد سلول‌های سوماتیک در شیر گاوها نشان دادند که رابطه‌ی بسیار معنی‌داری بین لاکتوفرین و تعداد سلول‌های سوماتیک وجود دارد (P<۰/۰۱). آنان نشان دادند که ژنوتیپ AB دارای بالاترین تعداد سلول‌های سوماتیک و ژنوتیپ BB دارای پایین‌ترین تعداد سلول‌های سوماتیک است. (Zhao *et al.* 2008)) در مطالعات خود روی چندشکلی پروموتور لاکتوفرین نتیجه گرفتند که این چندشکلی می‌تواند با حساسیت به ورم‌پستان در ارتباط باشد. آنان با استفاده از روش PCR-RFLP و استفاده از دو گروه کنترل (گاوهای سالم) و آزمایشی (گاوهای مبتلا به ورم‌پستان تحت بالینی) نشان دادند که تفاوت آللی و ژنوتیپی قابل توجهی بین این دو گروه از نظر این جایگاه وجود دارد. اگر چه تفاوت معنی‌داری در ژنوتیپ هتروزایگوت بین دو گروه دیده نشد، ولی تفاوت‌های مشاهده شده در هر دو ژنوتیپ هموزایگوت بسیار معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). در این مطالعه نشان داده شد که گاوهای سالم فراوانی آللی A بیشتر (۷۸ درصد برای گاوهای سالم و ۱۷درصد برای گاوهای مبتلا به ورم پستان) و فراوانی آللی B کمتری (۲۲ درصد برای گاوهای سالم و ۸۳ درصد برای گاوهای مبتلا به ورم پستان) داشتند که این تفاوت نیز بسیار معنی‌دار بود (P<۰/۰۱).

هدف از این تحقیق، بررسی فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی ژن لاکتوفرین و تاثیر آن بر تعداد سلول‌های سوماتیک شیر گاوهای دورگ گیلان بود. بر اساس آمار جمعیت دامی سال ۱۳۹۲ استان گیلان، ۲۳ درصد جمعیت گاو در استان گیلان، که بالغ بر ۱۳۲ هزار رأس می‌باشد، را گاو دورگ تشکیل می‌دهد که بیش از دو برابر تعداد گاو دورگ در یک دهه قبل می‌باشد. بنابراین با توجه به استقبال دامداران می‌توان با بررسی خصوصیات مطلوب و تلاش جهت کاهش صفات نامطلوب این گاو، شیر سالم تولید و عرضه کرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش به صورت تصادفی از ۱۰۰ راس گاو آمیخته نسل اول حاصل از تلاقی گاوهای ماده بومی و گاوهای اصیل هلشتاین که دارای رکوردهای ثبتی در مدیریت امور دام سازمان جهادکشاورزی استان گیلان بودند نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های مورد استفاده بر اساس منطقه شامل رشت ۲۳، آستانه ۱۴، لاهیجان ۴۵ و صومعه‌سرا ۱۸ راس بودند. نمونه خون کامل از سیاهرگ وداج و با استفاده از لوله‌های خلاء حاوی EDTA به منظور جلوگیری از انعقاد و لخته شدن گرفته شد. DNA ژنومی با روش بهینه شده استخراج نمکی (Salting Out) استخراج (Miller *et al.*, 1988) و جهت تکثیر یک قطعه ۳۰۱ جفت نوکلئوتیدی از اینترون ۶ ژن لاکتوفرین گاو مورد استفاده قرار گرفت (Seyfert *et al.*, 1994). ژن لاکتوفرین (LTF) روی کروموزوم ۲۲ گاو مستقر بوده و دارای ۱۷ اگزون (۲۲۵-۸۲ جفت باز)، ۱۱۲۲ جفت باز در پروموتور و تقریباً ۳۴/۵ هزار باز در DNA ژنومی خود

[1] Somatic cell count

است (Seyfert and Kuhn, Schwerin *et al.*, 1994; 1994).

توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس مورد استفاده مشابه با آغازگرهای Wojdak-Maksymiec *et al.* (2006) برای گاوهای آمیخته لهستانی بود که به ترتیب عبارت است از:

Forward: 5'GCCTCATGACAACTCCCACAC3'

Reverse: 5'CAGGTTGACACATCGGTTGAC3'

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با محتوای ۵۰ نانو گرم DNA الگو، ۲ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط داکسی ریبونوکلئوتید تری فسفات‌ها (dNTPs)، ۰/۲ پیکومول بر میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز و ۱۱/۰۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل انجام شد. تکثیر قطعه در ۳۰ دور انجام شد که فاز اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتیگراد و به مدت یک دقیقه در نظر گرفته شد.

محصول تکثیر شده به وسیله آنزیم‌های محدود کننده EcoRI برای بررسی یک جایگاه جهشی (Seyfert *et al.*, 1994) و MseI(TruI) جهت بررسی قطعه از نظر وقوع جهش جدید هضم شد. برای واکنش با EcoRI، مخلوط هضمی به صورت ۲ میکروگرم از محصول PCR، ۲ میکرولیتر 10Xبافر، ۲ میکرولیتر آنزیم و به مقدار کافی آب مقطر برای رسیدن به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و نیز برای انجام واکنش با MseI(TruI)، مخلوط هضمی به صورت ۲ میکروگرم از محصول PCR، ۲ میکرولیتر 10X بافر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم و به مقدار کافی آب مقطر برای رسیدن به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. به منظور بررسی ژنوتیپ‌ها در جمعیت از الکتروفورز نمونه هضم شده روی ژل آگارز ۲٪ با ولتاژ ۹۰ و به مدت ۶۰ دقیقه و با مقایسه با شاخص pUC Mix Marker, 8 ساخت شرکت fermentas استفاده شد. سپس اطلاعات حاصل با نرم افزار Popgene تجزیه و تحلیل شدند.

از هر یک از گاوهای خون‌گیری شده، یک نمونه شیر نیز تهیه شد. نمونه‌های شیر به سرعت سرد شده و جهت تعیین تعداد سلول‌های سوماتیک موجود در آن با استفاده از دستگاه DCC شرکت DeLaval سوئد به آزمایشگاه اداره دامپزشکی استان گیلان منتقل شد. جهت نرمال‌سازی اطلاعات حاصل از شمارش سلول‌های سوماتیک شیر، از لگاریتم پایه دوم سلول‌های سوماتیک شیر (Log_2SCC) استفاده شد. سپس ارتباط لگاریتم تعداد سلول‌های سوماتیک شیر و ژنوتیپ مشاهده شده، با رویه GLM نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (SAS Institute, 2002). مدل مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل داده‌ها به شکل زیر است:

$$y_{io} = \mu + g_i + e_{io}$$

متغیرهای مورد استفاده در این فرمول عبارتند از:

y_{io}: لگاریتم تعداد سلول های سوماتیک موجود در شیر(SCS)

μ: میانگین لگاریتم تعداد سلول های سوماتیک شیر

g_i: اثر ژنوتیپ حیوان در ۳ سطح

e_{io}: اثر عوامل باقیمانده

نتایج و بحث

هضم با آنزیم برشی

بر اساس گزارش Seyfert *et al.* (1994) در شرایط طبیعی قطعه ۳۰۱ جفت نوکلئوتیدی از اینترون ۶ ژن لاکتوفرین گاو جایگاه برش برای آنزیم EcorI ندارد، ولی در صورت بروز جهش در جایگاه ۲۰۱ و تبدیل نوکلئوتید سیتوزین به تیمین، جایگاهی برشی برای عمل آنزیم فراهم شده و باعث می‌گردد که این قطعه حاوی ۳۰۱ جفت باز، به دو قطعه حاوی ۲۰۱ و ۱۰۰ جفت بازی تبدیل گردد. شکل ۱ نمونه‌ای از قطعات هضم شده توسط آنزیم EcoRI را نشان می‌دهد. از آنجا که گاوهای بومی استان گیلان موسوم به تالشی از نژاد گاوهای کوهان‌دار هندی (بوس ایندیکوس[1]) بوده، ولی گاوهای هلشتاین از نژاد گاوهای اهلی بدون کوهان اروپایی (بوس تاروس[2]) است، لذا برای بررسی جایگاه ژنی مورد نظر در گاو دورگ حاصل از آنها لازم بود شاهدی جهت اطمینان از تشابه توالی آنها و عدم وجود جهش جدید وجود داشته باشد. لذا از یک جایگاه ژنی شناخته شده که فاقد جهش بود به عنوان شاهد استفاده شد. به این منظور از آنزیم MseI(TruI) استفاده شد که دو جایگاه برشی در نوکلئوتیدهای ۱۵۲ و ۲۶۳ دارد و در

[1] *Bos indicus*

[2] *Bos taurus*

نتیجه سه قطعه حاوی ۱۵۲، ۱۱۱ و ۳۸ جفت نوکلئوتید ایجاد می‌کند. شکل ۲ نمونه‌ای از قطعات هضم شده و نیز الگوی ژنوتیپی مشابه در جمعیت مورد بررسی و عدم وجود جهش در این دو جایگاه در تمامی نمونه‌ها را نشان می‌دهد. فراوانی آللی برای دو آلل a و b به ترتیب ۶۹/۵ و ۳۰/۵٪ محاسبه شد (جدول ۱). در اولین بررسی چندشکلی این جایگاه با استفاده از گاوهای آلمانی، فراوانی دو آلل A و B برابر با ۷۵/۵ و ۲۴/۵ ٪ گزارش شد (Seyfert and Kuhn, 1994). تعداد آلل مؤثر ۱/۷۴ بود که نسبت به تعداد آلل واقعی تفاوت نشان می‌دهد. شاخص شانون جمعیت گاوهای آمیخته نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی قابل توجه در این جمعیت است.

جدول ۱- فراوانی‌های ژنی مشاهده شده لاکتوفرین، تعداد آلل مؤثر و شاخص شانون در جایگاه EcorI- LTF

Table 1. Observed allele frequencies of Lactoferrin, effective number of alleles (Ne) and Shannon's index (I) in the EcorI- LTF locus

Allele frequency (%)		Ne	I	Locus
A	B			
69.5	30.5	1.74	062	EcorI- LTF

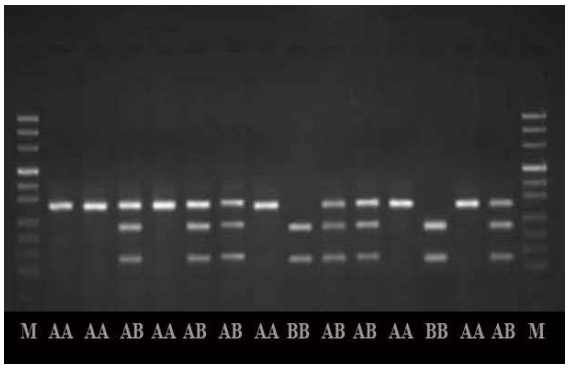

Fig. 1. Electrophoresis of digested products of EcorI restriction enzyme in LTF locus

شکل ۱- الکتروفورز قطعات هضم شده به وسیله آنزیم EcorI در جایگاه LTF

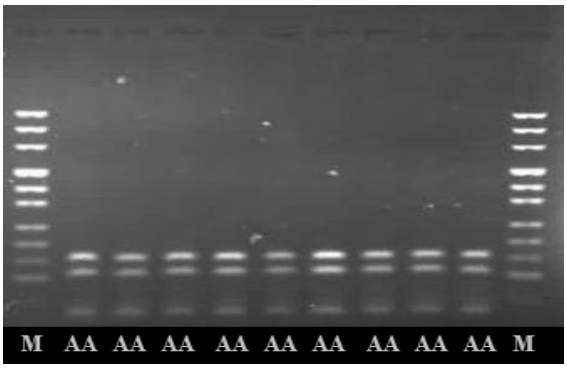

Fig. 2. Electrophoresis of digested products of MseI (TruI) restriction enzyme in LTF locus

شکل ۲- الکتروفورز محصـولات هضم شده به وسیله آنزیم MseI(TruI) در جایگاه LTF

همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود جمعیت گاوهای آمیخته فاصله بسیار زیادی از حالت تعادل نشان داد (P<۰/۰۱). با توجه به ضرورت مهاجرت در نسل قبل جهت تولید گاوهای آمیخته، از نظر تئوری این عدم تعادل قابل توجیه است. چنان که انتظار می‌رفت فراوانی ژنوتیپ هتروزایگوت در گروه آمیخته بالا است، چرا که بر اساس قانون مهاجرت هاردی-واینبرگ در اثر تلاقی دو گروه جانوری، هر چقدر که فاصله ژنی و نژادی آنان بیشتر باشد، افزایش فراوانی ژنوتیپ‌های هتروزایگوت در برابر کاهش ژنوتیپ‌های هموزایگوت بیشتر می‌شود. از آنجا که گاوهای بومی استان گیلان از نژادهای ایندیسین[1] و گاوهای هلشتاین از نژادهای تاورین[2] هستند، در نتیجه فاصله ژنتیکی زیادی با یکدیگر داشته، لذا از نظر تئوری باید فاصله ژنی بالایی با هم داشته باشند. فراوانی قابل توجه ژنوتیپ AA نسبت به ژنوتیپ BB ممکن است به علت تاثیر منفی ژنوتیپ BB و در نتیجه حذف طبیعی یا

[1] Indicine

[2] Taurine

غیرطبیعی آن در گله به دلیل انتخاب شدیدتر در گله‌های اصلاح شده، چگونگی آمیزش گاوهای بومی با گاوهای اصلاح شده هلشتاین و نیز فراوانی ژنی آنان باشد.

جدول ۲- فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار و وضعیت تعادل هاردی-واینبرگ در جایگاه EcorI- LTF

Table 2. Observed and expected genotype frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium of EcorI- LTF locus

Genotype frequency (%)			Expected Hetrozygocity	χ^2
AA	AB	BB		
41	57	2	0.426	11.56

در بررسی Wojdak-Maksymiec *et al.* (2006) روی گاوهای آمیخته لهستانی مشاهده شد که فراوانی ژنوتیپی در بررسی آنان نیز انحراف معنی‌داری از تعادل هاردی-واینبرگ داشت (P<۰/۰۰۰۲۵۲)، چرا که فراوانی ژنوتیپ هتروزایگوت AB (۵۹/۶۸ ٪) بسیار بیشتر از مقدار مورد انتظار (۴۳/۷ ٪) بود و فراوانی ژنوتیپ هموزایگوت BB (۲/۴۲ ٪) نیز بسیار کمتر از مقدار مورد انتظار (۱۰/۴۱ ٪) بود. آنان نتیجه گرفتند که عدم تعادل ژنتیکی مشاهده شده در این جمعیت ممکن است به علت عدم انتخاب برای این صفت همراه با انتخاب برای صفات افزایش بازدهی باشد. در بررسی دیگری در گاوهای لهستانی با استفاده از همین آغازگرها در ژن لاکتوفرین، نشان دادند که فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به ترتیب برابر ۶۶/۴، ۲۹/۶ و ۴٪ است و در نتیجه فراوانی دو آلل A و B مقادیر ۸۱/۲ و ۱۸/۸ ٪ محاسبه شد (Sender *et al.*, 2006).

در بررسی همین جایگاه در گاوهای هلشتاین در استان اصفهان تنها دو ژنوتیپ AA و AB با فراوانی ۶۰/۶ و ۳۹/۴٪ گزارش شد، و هیچ موردی از ژنوتیپ هموزایگوت BB مشاهده نشد (Asadallahpor Nanaei *et al.*, 2012). در بررسی ۴۰۴ گاو هلشتاین از پنج گله مختلف فراوانی آللی ۸۳/۱-۷۷/۵ و ۲۲/۵-۱۶/۹ ٪ را به ترتیب برای دو آلل A و B به دست آوردند. در این بررسی نیز عدم تعادل هاردی-واینبرگ مشاهده شد (P<۰/۰۰۰۱). در بررسی دیگر فراوانی ژنوتیپ‌ها برابر با ۳۲/۵، ۵۷/۵ و ۱۰ ٪ برای سه ژنوتیپ AA ، AB و BB و نیز فراوانی آلل‌های A و B برابر با ۶۷/۷۴ و ۳۲/۲۶ گزارش شد (Sharifzadeh and Doosti, 2011). فراوانی هموزایگوت مغلوب BB بسیار کمتر از مقدار مورد انتظار بود (۵۰ ٪)، در حالی که فراوانی دو ژنوتیپ دیگر بالاتر از مقدار مورد انتظار مشاهده شد و در نتیجه عدم تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت با احتمال بالایی گزارش شد (P<۰/۰۱). اگر چه در بررسی Asadallahpor Nanaei *et al.* (2012) ژنوتیپ BB مشاهده نشد، ولی به علت وجود ژنوتیپ AB در جمعیت، وجود جهش و آلل B تایید می‌شود. در تمامی بررسی‌های ذکر شده در بالا، وجود هر دو آلل مورد تایید قرار گرفت و فراوانی آلل B کمتر از آلل اصلی A گزارش شده است که نتایج تحقیق حاضر را تأیید می‌نماید. با وجودی که Sender *et al.* (2006) وضعیت تعادل را در جمعیت مورد بررسی خود گزارش نکردند، ولی با استفاده از فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی گزارش شده، می‌توان عدم وجود تعادل را در جمعیت آنان نیز مشخص نمود (P<۰/۰۵).

بررسی تعداد سلول‌های سوماتیک شیر

بر اساس نمونه‌های تحقیق حاضر، متوسط تعداد سلول‌های سوماتیک شیر گاوهای آمیخته برابر با ۲۶۱/۴۹×۱۰^{۳} بود. این اولین گزارش از تعداد سلول‌های سوماتیک گاوهای دورگ استان گیلان می‌باشد. در این بررسی بین لگاریتم تعداد سلول‌های سوماتیک و ژنوتیپ این جایگاه ژن لاکتوفرین در گاوهای آمیخته ارتباطی معنی‌دار مشاهده نشد (P<۰/۱). جدول ۲ نشان دهنده ارتباط ژنوتیپ جایگاه مورد بررسی و لگاریتم تعداد سلول‌های سوماتیک است.

جدول ۳- ارتباط ژنوتیپ جایگاه مورد بررسی و لگاریتم تعداد سلول‌های سوماتیک

Table 2. Association between genotypes and log2 SCC

Genotype	Number	Log2 SCC±SE
AB	57	7.66 ± 0.159 [a]
AA	41	7.49± 0.184 [a]
BB	2	7.08± 0.777 [a]

اگر چه در گاوهای آمیخته ارتباطی معنی‌دار میان ژنوتیپ و لگاریتم تعداد سلول‌های سوماتیک وجود نداشت، ولی ژنوتیپ AB بیشترین و BB کمترین لگاریتم تعداد سلول‌های سوماتیک را دارا بودند.

در آزمایش‌های مختلف تاثیر ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی بر تعداد سلول‌های سوماتیک شیر بررسی شده و نتایج نسبتاً موفقی را در پی داشته است. در بررسی گاوهای شیری سیاه و سفید لهستانی (Wojdak-Maksymiec *et al.*, 2006) نشان داده شد که رابطه آماری معنی‌داری بین لگاریتم SCC و ژنوتیپ ها وجود دارد ($P<۰/۰۲$). بیشترین لگاریتم SCC در ژنوتیپ AB و کمترین آن در ژنوتیپ AA مشاهده شد. در بررسی همین جایگاه، Sharifzadeh and Doosti (2011) نشان دادند که ژنوتیپ AA دارای تعداد سلول‌های سوماتیک پایین و AB دارای تعداد بالاتر بود ($P<۰/۰۱$). آنان بیان داشتند که آلل A می‌تواند به عنوان نشانگری مناسب برای مقاومت به ورم‌پستان و عفونت میکروبی مورد استفاده قرار گیرد.

این بررسی در راستای برنامه درازمدت اصلاح گاوهای بومی استان گیلان انجام شد تا امکان شناختی بهتر از وضعیت موجود آنان و روند اصلاحی پیش‌رو فراهم شود. بررسی رابطه ژن‌های کاندید مرتبط با سیستم ایمنی بر تعداد سلول‌های سوماتیک شیر و مقایسه آن در گاوهای بومی با نتاج حاصل از تلاقی آنان با گاوهای اصیل هلشتاین می‌تواند به درک رابطه آمیخته‌گری با ژن‌های مرتبط با مقاومت کمک نماید.

این تحقیق چندشکلی در اینترون ژن لاکتوفرین را نشان داد. ژنوتیپ BB که لگاریتم تعداد سلول‌های سوماتیک کمتری را نشان داد، فراوانی بسیار پایینی در گاوهای آمیخته داشت. در بررسی Wojdak-Maksymiec *et al.* (2006) که روی گاوهای دورگ لهستانی بود نیز وفور ژنوتیپ BB مشابه بررسی حاضر بسیار کم بود (۲/۴۲ ٪). باتوجه به وفور کم ژنوتیپ BB به سختی بتوان یکی از دو آلل ژن لاکتوفرین را به عنوان نشانگر مقاومت به ورم پستان معرفی کرد.

از طرف دیگر، آمیخته‌گری اگر چه برای بهبود تولید گاوهای بومی مناسب است، ولی باید مشخص شود که چه مقدار اختلاط خونی و به چه صورتی، بهترین بازده تولید و سلامت را در پی خواهد داشت. همان گونه که در تمامی حیوانات مزرعه‌ای مشاهده می‌شود، تاکید بر افزایش تولید و ژن‌های مرتبط با آن، موجب حساسیت به مشکلات سلامتی و کاهش ژن‌های مرتبط با سلامت می‌شود. همچنین مواردی وجود دارد که نیاز به بررسی بیشتر دارد. برای مثال تعدادی از محققین گزارش کردند که کاهش مداوم تعداد سلول‌های سوماتیک شیر می‌تواند ایمنی کلی گاو را کاهش دهد، چراکه SCC نشان‌دهنده قابلیت بسیج لکوسیت‌ها است (Kelm, 1997). همچنین گزارش شده که کوارترهای دارای تعداد سلول‌های سوماتیک ابتدایی پایین خطر بالاتری برای آلودگی با عوامل ورم پستان دارند (Elbers, 1998).

با وجودی که اصلاح برای افزایش تولید باعث کاهش مقاومت به ورم‌پستان می‌شود (Emanuelson *et al.*, 1988)، مهم است که مقاومت به ورم پستان در برنامه‌های اصلاحی مورد توجه قرار گیرد. اگر مقاومت به ورم پستان و کاهش تعداد سلول‌های سوماتیک شیر به دلیل اهمیت حیاتی آن از نظر سلامت محصولات تولیدی، هزینه‌های جانبی و رفاه دامدار و دام جزو اهداف اصلی اصلاح نژاد گاوهای منطقه باشد، لازم است در برنامه‌های اصلاحی، رکوردگیری صفات مربوطه نیز انجام و ماهانه ثبت شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری رئیس وقت سازمان دامپزشکی استان گیلان و کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های آن سازمان جهت اندازه‌گیری سلول‌های سوماتیک شیر قدردانی می‌شود.

فهرست منابع

Asadallahpor Nanaei H., Edriss M. A., Ansari Mahyari S., Rahmani H. R. and Sayed Tabatabaei B. E. 2012. Lactoferrin gene polymorphism of Holstein cows in Isfahan province. Annals of Biological Research, 3: 2365-2367.

Chaneton L., Tirante L., Maito J., Chaves J. and Bussmann L. E. 2008. Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. Journal of Dairy Science, 91: 1865-1873.

Elbers A. R. W., Miltenburg J. D., De Lange D., Crauwels A. P. P., Barkema H. W. and Schukken Y. H. 1998. Risk factors for clinical mastitis in a random sample of dairy herds from the southern part of the Netherlands. Journal of Dairy Science, 81: 420-426.

Emanuelson U., Danell B. and Philipsson J. 1988. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. Journal of Dairy Science, 71: 467–476.

Kelm S., Pelz A., Schauer R., Filbin M. T., Tang S., De Bellard M. E., Schnaar R. L., Mahoney J. A., Hartnell A., Bradfield P. and Crocker P. R. 1994. Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. Current Biology, 4: 965-972.

Kutila T. 2004. Role of lactoferrin in treatment of bovine mastitis. Ph.D. dissertation, University of Helsinki, Finland, 57.

Martins A. M., Silvestre A. M., Petim-Batista M. F. and Colaço J. A. 2011. Somatic cell score genetic parameter estimates of dairy cattle in Portugal using fractional polynomials. Journal Animal Science, 89: 1281-1285.

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

SAS: Statistical Analysis System for Windows (Release 9.1). 2002. SAS Institute Inc., Raleigh, North Carolina, USA.

Schwerin M., Solinas-Toldo S., Eggen A., Brunner R., Seyfert H. M. and Fries R. 1994. The bovine lactoferrin gene (LTF) maps to chromosome 22 and syntenic group U12. Mammalian Genome, 5: 486-9.

Sender G., Korwin-kossakowska A., Galal K. and Prusak B. 2006. Ocenawpływupolimorfizmuwybranychgenównawystępowanie mastitis u krów. MedycynaWeterynaryjna, 62: 563-565.

Seyfert H. M. and Kuhn C. 1994. Characterization of a first bovine lactoferrin gene variant, based on an EcoRI polymorphism. Animal Genetics, 25: 54.

Seyfert H. M., Tuckoricz A., Interthal H., Koczan D. and Hobom G. 1994. Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter. Gene, 143: 265-269.

Sharifzadeh A. and Doosti A. 2011. Study of lactoferrin gene polymorphism in Iranian Holstein cattle using PCR-RFLP technique. Global Veterinary, 6: 530-536.

Wojdak-Maksymiec K., Kmiec M. and Ziemak J. 2006. Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. Veterinary Medicine, 51: 14-20.

Zhao, C. H., He G. M., Wang Y. L. and Zhang Z. 2008. Polymorphism analysis of the promoter of cow Lactoferrin gene with PCR-RFLP and its correlation with subclinical mastitis. Acta Agriculturae Slovenica, 92: 185–187.

Animal Production Research
Vol. 4, No. 2, 2015 (87-94)

University of Guilan

Study of Lactoferrin gene single nucleotide polymorphism and its relation with milk somatic cells in crossbred cows of Guilan province

M. Ayatollahi[1], S. H. Hosseini Moghaddam[2*], S. Z. Mirhosseini[3], N. Ghavi Hossein-Zadeh[4]

1. M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: 9-10-2013 – Accepted: 1-12-2014)

Abstract

Although Guilan province's purebred cattle is low despite other regions, but crossbred cattle population are increasing. Lactoferrin as a major mastitis resistant gene has substantial roles in dairy cattle's udder tissue immune mechanisms. So, the effect of a known SNP on SCC of 100 crossbred cows with 50 percent father Holstein blood was studied in intron 6 of Lactoferrin gene. PCR product was a 301bp fragment that EcoR1 digestion produced three genotype including AA (301 bp), BB (201 and 100 bp) and AB (301, 201 and 100 bp). All three genotypes have been identified in the crossbred cows. Genotypes frequencies for AA, BB and AB were 41, 2 and 57%, that showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (P<0.01). Also, observed and expected heterozygosity was highly different. Frequency of A and B alleles were 69.5 and 30.5%, respectively and effective number of alleles (Ne) and Shannon's index(I) were 1.74 and 0.62. Average SCC was 261×10^3 per mL.Differences of SCS ofAB, AA and BB genotypes were not significant (P<0.05). It is difficult to introduce A or B allele as marker for mastitis resistance, due to low frequency of BB genotype.

Keywords: Polymorphism, Milk somatic cells, Crossbred cow, Lactoferrin gene, Mastitis

*Corresponding author: hosseini@guilan.ac.ir