DOI: 10.22055/IVJ.2020.206223.2193
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.2.10.3

ارتباط چندشکلی جایگاه ژنی بتاکازئین شیر با صفات بازدهی تولید مثلی در گاوهای شیری هلشتاین

فریده نروژ[۱]، عبداله میرزایی[۲*]، حسن شریفی‌یزدی[۳] و ابوالفضل حاجی‌بمانی[۴]

[۱] دانش‌آموخته‌ی دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۲] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۳] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۴] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۱۳۹۸/۸/۱ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۳

چکیده

هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، شناسایی گاوهای شیری هلشتاین در دو گروه ژن‌های کدکننده‌ی پروتئین‌های A1 و A2 بتاکازئین شیر با استفاده از روش PCR- RFLP و ارتباط آن‌ها با شاخص‌های تولیدمثلی بود. بدین منظور از ۴۱ رأس گاو هلشتاین چندشکم‌زا (فاقد هرگونه بیماری‌های بالینی پیرامون زایمان)، از یک گاوداری صنعتی شیری در اطراف شهرستان شیراز نمونه خون گرفته شد. پس از استخراج DNA کل از خون کامل، تکثیر ناحیه دارای چندشکلی (با جایگزینی اسید آمینه پرولین با هیستیدین در جایگاه ۶۷ اسید آمینه پرتئین بتاکازئین در A1)، از هضم آنزیمی BstDE I (Dde I) جهت تعیین ژنوتیپ ژن بتا کازئین استفاده گردید. جهت اطمینان از روش کار و هضم آنزیمی از محصولات PCR تعیین ترادف شده به عنوان کنترل استفاده شد. مقایسه‌ی شاخص‌های تولیدمثلی (فاصله‌ی زایمان تا اولین تلقیح، روزهای باز و تعداد تلقیح به ازای آبستنی) بین گاوهای با ژنوتیپ‌های مختلف با استفاده از آزمون کروسکال والیس انجام شد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تعداد ۱۳ (۳۱/۷ درصد)، ۲۱ (۵۱/۲ درصد) و هفت (۱۷/۱ درصد) رأس از گاوها به ترتیب دارای ژنوتیپ A1A1، A1A2 و A2A2 بودند. مقایسه میانگین فاصله‌ی زایمان تا اولین تلقیح، روزهای باز و تعداد تلقیح به ازای آبستنی بیان‌گر عدم تفاوت معنی‌دار بین گاوهای مورد مطالعه دارای ژنوتیپ‌های مختلف بتاکازئین بود. بر اساس نتایج، چنین به نظر می‌رسد که شناسایی و تکثیر گاوهای دارای ژن بتاکازئین A2 (A1A2 یا A2A2) بدون نگرانی از تأثیر منفی آن بر باروری گاوهای شیری، می‌تواند مدنظر قرار گیرد. با این وجود جهت بررسی ارتباط این ژنوتیپ و میزان تولید شیر در گله‌های گاو شیری نیاز به مطالعات گسترده‌تری در این زمینه وجود دارد.

کلمات کلیدی: باروری، بتاکازئین، ژنوتیپ، گاو شیری

مقدمه

با توجه به افزایش جمعیت و تأمین تغذیه‌ی جوامع انسانی و به دلیل ارزش اقتصادی شیر، برنامه‌های مربوط به انتخاب گاوهای شیری در دهه‌های گذشته با تمرکز بر افزایش میزان تولید شیر انجام شده است. افزایش تولید

*نویسنده مسئول : عبداله میرزایی، دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
E-mail: mirzaei@shirazu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

شیر منجر به کاهش باروری در گاوهای شیری شده است که نگرانی‌هایی را در صنعت گاو شیری و همچنین صنایع وابسته به آن ایجاد کرده است (Pryce et al. 2004; Berry et al. 2016). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که دلیل این کاهش در راندمان تولید مثل می‌تواند ناشی از تغییرات در فیزیولوژی، مدیریت، تغذیه و ژنتیک گاوهای شیری باشد (Veerkamp and Beerda, 2007; Crowe et al. 2018). مکانیسم‌های ژنتیکی متعددی ممکن است وجود داشته باشد که در ارتباط منفی بین افزایش تولید شیر و کاهش باروری در گاوهای شیری دخیل باشد (Veerkamp et al. 2003).

امروزه از جمله ژن‌هایی که در ارتباط با تولید شیر می‌باشد، ترکیب شیر از جمله مقدار و ترکیب پروتئین شیر را تحت تأثیر قرار می‌دهد، که در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود معطوف کرده است که به دلیل ارتباطات احتمالی بین ژنوتیپ‌های جایگاه ژنی پروتئین شیر و صفات اقتصادی مهم در گاوهای شیری می‌باشد. پروتئین‌های شیر گاو شامل کازئین، پروتئین آب پنیر و آنزیم‌ها هستند. کازئین اصلی‌ترین پروتئین شیر محسوب می‌شود که حدود ۸۰ درصد از پروتئین کل شیر گاو را تشکیل می‌دهد (Groenen and Van der Poel, 1994; Niki et al. 1994; Swinburn, 2004). پروتئین‌های دیگر شیر که شامل پروتئین آب پنیر و آنزیم‌ها هستند، ۲۰ درصد پروتئین‌های شیر را شامل می‌شوند (Groenen and Van der Poel, 1994; Niki et al. 1994; Roginski et al. 2003).

کازئین که مهم‌ترین پروتئین شیر است شامل ۳۶ درصد آلفا کازئین، ۲۷ درصد بتا کازئین، نه درصد کاپا کازئین و هفت درصد پپتیدها و اسیدآمینه می‌باشد. بتا کازئین حدود ۲۷ درصد پروتئین کازئین شیر را شامل می‌شود و در انتقال یون‌های ضروری و مواد معدنی مثل کلسیم و فسفر نقش مهمی دارد (German et al. 2002; Shah, 2000). تحقیقات نشان می‌دهد که منشاء اصلی بتا کازئین‌ها از جایگاه ژنی بتا کازئین A2 می‌باشد که در نتیجه یک جهش ژنتیکی است و باعث تبدیل اسیدآمینه‌ی پرولین به هیستیدین در موقعیت ۶۷ جایگاه ژنی کازئین می‌شود و تولید فرم موتاسیون یافته بتا کازئین A1 می‌گردد (Formaggioni et al. 1999; Kaminski et al. 2007). از نظر ژنتیکی نوع شیر تولید شده که حاوی A1 و A2 بتا کازئین می‌باشد به وسیله‌ی یک ژن مستقر در کروموزوم ششم کد می‌شود. دو آلل اصلی ژن بتا کازئین A1 و A2 نامیده می‌شوند، در نتیجه یک گاو ممکن است از نظر ژنتیکی دارای ژنوتیپ‌های A1A1، A1A2 یا A2A2 باشد؛ هیچ کدام از آلل‌های A1 و A2 بر دیگری غالب نمی‌باشد و بین آن‌ها رابطه‌ی Co-dominant برقرار است. بنابراین گاو دارای ژنوتیپ A1A2 به مقدار مساوی شیر A1 و A2 تولید می‌کند، گاو A1A1 فقط شیر A1 و گاو A2A2 فقط شیر A2 تولید می‌کند (De Noni, 2009; Woodford, 2007).

برخی مطالعات نشان دادند که بین بازدهی شیر و پروتئین‌ها ارتباط ژنتیکی بسیار زیادی وجود دارد (Welper and Freeman, 1992). علاوه بر آن، ارتباط بین تولید شیر و چندشکلی در ناحیه‌ی کازئین گزارش شده است (Martin et al. 2002; Nilsen et al. 2009). از آن جایی که شش ژن اصلی پروتئین شیر (CSN1S1، CSN1S2، CSN2، CSN3، LALBA و LGB) به طور مستقیم در تولید شیر نیز دخالت دارند از این رو برنامه‌ی اصلاح‌نژاد با تمرکز بر این ژن‌ها برای افزایش تولید شیر در گاوهای شیری انجام شده است. با توجه به تمرکز بر این ژن‌ها برای افزایش تولید شیر، در نتیجه این ژن‌ها در ارتباط با راندمان تولیدمثلی در گاوهای شیری می‌باشند. ارتباط غلظت پروتئین و همچنین ژنوتیپ مربوطه با باروری در گاوهای شیری مورد بررسی قرار گرفته است (Dematawewa and Berger, 1998). به هر حال ارتباط بین انواع ژنوتیپ پروتئین شیر و باروری محدود به چند مورد است و نتایج مطالعات باهم متناقض می‌باشد. به طوری که، برخی پژوهشگران گزارش کردند که بین انواع پروتئین‌های شیر شامل بتا کازئین، کاپا کازئین، بتا-کاپا کازئین و بتالاکتوگلوبولین با بازدهی تولیدمثل گاوهای

شیری هلشتاین ارتباط آماری معنی‌داری وجود ندارد (Demeter et al. 2010)، ولی مطالعات دیگر نتایج متفاوتی را گزارش کردند که بیان‌گر ارتباط آماری معنی‌داری بین بتاکازئین و احتمال آبستنی می‌باشند (Hargrove et al. 1980) و همچنین نشان داده شد که بین بتالاکتوگلوبولین و سن گاوها در اولین تلقیح و زمان اولین زایمان ارتباط معنی‌داری وجود دارد (Lin et al. 1987). علاوه بر این، بین ژنوتیپ‌های بتا-کاپا کازئین و فاصله‌ی زایمان تا اولین تلقیح ارتباط معنی‌داری گزارش شده است (Ruottinen et al. 2004).

هدف مطالعه‌ی حاضر شناسایی گاوهای با ژنوتیپ مختلف (A1A1، A1A2 و A2A2) بر اساس چندشکلی رخ داده در ژن بتا کازئین و مقایسه‌ی برخی شاخص‌های تولیدمثلی آن‌ها بود. در نتیجه، مطالعه‌ی حاضر با دو هدف زیر انجام شد. هدف اول: شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف گاوهای شیری هلشتاین ایرانی بر اساس چندشکلی ناحیه‌ی ۶۷ ژن کدکننده بتا کازئین. هدف دوم: مقایسه‌ی شاخص-های تولیدمثلی بین گاوهای دارای ژنوتیپ‌های مختلف بتا کازئین بود.

مواد و روش کار

تعداد ۴۱ رأس گاو نژاد هلشتاین در یک گاوداری (مجتمع شیر و گوشت فرزیس، اطراف شیراز) با تاریخچه-ی مشخص ثبت شده در دوره‌های شیردهی قبلی انتخاب شدند. میانگین و انحراف معیار دوره‌های شیردهی دام‌های مورد مطالعه ۱/۶±۴/۴ بود. با توجه به تأثیر مستقیم و غیرمستقیم بیماری‌های پیرامون زایمان بر باروری همه‌ی گاوهای انتخاب شده قبل و پس از زایمان‌های متعدد خود در دوره‌های شیردهی قبلی فاقد بیماری‌های بالینی پیرامون زایمان (از قبیل سخت‌زایی، جفت ماندگی، جابجایی شیردان، کتوز و هیپوکلسمی بالینی) بودند. از تمامی گاوها به میزان دو میلی‌لیتر خون از سیاهرگ دمی در لوله‌های حاوی ماده‌ی ضدانعقاد EDTA[1] گرفته شد. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه ارسال گردید و تا مرحله‌ی استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌ها از فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد خارج و پس از ذوب شدن به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس گردیدند. پس از آن ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه به میکروتیوب‌های استریل یک و نیم میلی‌لیتری منتقل شد. مراحل استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت MBST (Rapid Genomic DNA Isolation Kit) و مطابق با توصیه‌ی شرکت سازنده انجام شد.

از پرایمرهای اختصاصی جایگاه ژن بتا کازئین گاو، طراحی شده توسط پژوهشگران استفاده شد (Mclachlan, 2006). در این روش جهت القای محل برش آنزیمی BstDE I (Dde I) با توجه به این که سایت برش آنزیم فوق ترادف C/TAAG می‌باشد، با قرار دادن یک نوکلئوتید جایگزین در هنگام سنتز پرایمر معکوس B.Cas R به صورت mismatch اقدام به ایجاد محل برش در محصول PCR (۱۲۱ جفت بازی) در صورت وجود آلل A2 شد (Fig 1; Table 1). کلیه‌ی پرایمرهای به کار رفته در این تحقیق توسط شرکت تولیدی تحقیقاتی سیناژن ساخته شد.

1 - Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

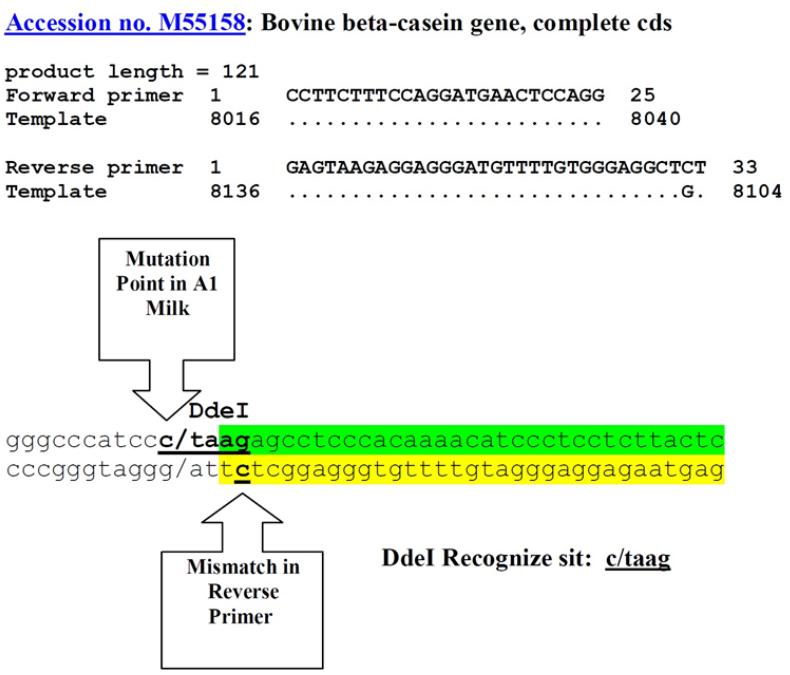

Figure 1. Primer annealing position based on bovine beta-casein gene sequence in the GenBank (NCBI) (Upper section), position of the mismatch nucleotide integrated during B.Cas R reverse primer synthesis to create *Dde I* restriction site for mutation detection (Lower section)

Table 1. Characteristics of specific primers used in PCR

Primer	Sequence (5'-3')	Primer length (bp)	Annealing temperature (ºC)	PCR Products (bp)
B.Cas F Forward	5'-CCTTCTTTCCAGGATGAACTCCAGG-3'	25	55	121
B.Cas R Reverse	5'-GAGTAAGAGGAGGGATGTTTTGTGGGAGGCTCT-3'	33	55	

* The nucleotide, which is underlined in the reverse primer, is the nucleotide change that is designed to create an enzymatic restriction site.

بازی که در پرایمر معکوس زیر آن خط کشیده شده است، محل تغییربازی است که به منظور ایجاد جایگاه برش آنزیمی طراحی شده است.

جهت بررسی صحت نتایج حاصل از هضم آنزیمی و اطمینان بیش‌تر از روش تعیین ژنوتیپ گاوها به روش فوق در این مرحله از PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی شده (Bet.Cas.Seq-R و Bet.Cas.Seq-F) و بر اساس پژوهش‌های دیگر اقدام به تکثیر قطعه ۷۳۰ جفت بازی از ژن بتا کازئین جهت انجام توالی گردید (Keating et al. 2008). تعداد گاوهای مورد بررسی با این روش شامل هفت گاو بود که هر سه ژنوتیپ (A1A1, A1A2, A2A2) در آنها وجود داشت. در Table 2 خصوصیات اصلی پرایمرها آمده است.

Table 2. Characteristics of specific primers used in PCR to determine the sequence and polymorphism in the beta-casein gene

Primer name	Annealing temperature (ºC	Sequences (5'-3') of primers for beta-casein gene sequencing	PCR Products (bp)
Bet.Cas.Seq-F	55	GGCCATTGTTAAGGAACTCC	73
Bet.Cas.Seq-R		AAGGTGCAGATTTTCAACAT	

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط PCR حاوی dNTPs (با غلظت نهایی ۰/۲mM)، MgCl2 (با غلظت نهایی ۱/۵mM)، بافر PCR (با غلظت نهایی ۱X)، آنزیم Taq (۲/۵ واحد به ازای هر واکنش)، پرایمرها (با غلظت نهایی ۰/۸ µM)، DNA الگو (۴۰pg به ازای هر واکنش) بود که با ۱۲/۷۵ میکرولیتر آب مقطر استریل به حجم نهایی (۲۵ میکرولیتر) می‌رسید. برای هر نوبت PCR یک کنترل منفی در نظر گرفته شد. از آن جا که مواد مشترک اولیه PCR شامل: بافر 10x PCR، آنزیم Taq، dNTP، MgCl2 در تمامی واکنش‌های زنجیره‌ای یکسان بود. به منظور سهولت کار و کاهش آلودگی مواد اولیه، اقدام به تهیه Master mix از کلیه مواد مشترک گردید. آماده‌سازی مخلوط اصلی در کنار یخ و در شرایط استریل انجام شد. واکنش تکثیر PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient Eppendorf) طبق برنامه‌ی چرخه‌ی حرارتی مشخصی انجام گرفت. برنامه‌ی چرخه‌ی حرارتی PCR نیز شامل واسرشت‌سازی اولیه (دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه)، واسرشت‌سازی (دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه)، الحاق (دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه)، گسترش (دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه)، گسترش نهایی (دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی-گراد به مدت ۵ دقیقه) بود. تعداد سیکل‌های اصلی واکنش نیز ۳۵ بار در نظر گرفته شد.

بر اساس توالی چندشکلی موجود در ژن بتاکازئین و مشخص بودن محل جهش در توالی هدف، آنزیم محدودکننده‌ی *BstDE I* (*Dde I*) جهت هضم ناحیه‌ی دارای چندشکلی ژن بتاکازئین توسط پژوهشگران دیگر پیشنهاد گردیده است (Mclachlan, 2006; Parashar and Saini, 2015). این آنزیم قادر است توالی C/TAAG را در محل موتاسیون ژن بتاکازئین برش دهد. بنابراین تبدیل و موتاسیون باز سیتوزین (C) به آدنوزین (A) در این توالی نوکلئوتیدی در ناحیه‌ی مربوطه از ژن بتا کازئین (مجاور پرایمر معکوس) موجب از دست رفتن محل برش آنزیم *BstDE I* (*Dde I*) در محصول PCR می‌شود (Fig 1). مشخصات توالی برش آنزیم BstDE I (Dde I) و اندازه‌ی قطعات ایجاد شده در Table 3 خلاصه شده است.

Table 3. Characteristics of *BstDE I* (*Dde I*) cutting site and size of fragments produced after enzymatic digestion

Size of fragments produced after enzymatic digestion in PCR step 2 (bp)			Restriction Enzyme and cutting site
(A2A2)	(A1A1)	(A1A2)	
35 86	121	35 86 121	(*Dde I*) *BstDE I* Enzyme 5' C/TAAG 3' 3' GAAT/C 5'

محلول واکنش هضم آنزیمی (با حجم نهایی ۲۴ میکرولیتر) شامل: ۱۸ میکرولیتر محصول PCR ۱۲۱ جفت بازی، دو و نیم میکرولیتر آنزیم *BstDE I* (شامل هشت واحد آنزیم)، دو و چهاردهم میکرولیتر بافر V2 و یک و یک دهم میکرولیتر آب مقطر استریل بوده مخلوط حاصل به مدت پنج ساعت در حمام آب گرم ۶۰ درجه‌ی سانتی-

گراد انکوبه گردید. سپس محلول واکنش هضم آنزیمی برای هر نمونه به صورت جداگانه بر روی ژل آگارز سه درصد جهت رویت الگوی باندهای حاصله الکتروفورز گردید.

اطمینان از روش کار و هضم آنزیمی محصولات از هر گروه ژنوتیپ (A1A1, A1A2, A2A2) تعدادی محصول PCR با وزن ملکولی ۷۳۰ جفت باز حاصله بر اساس پژوهشگران دیگر (Keating et al. 2008) جهت انجام سکانس و تعیین ترادف به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. نتایج حاصل از تعیین ترادف هر نمونه جهت انجام آنالیز-های بعدی، وارد نرم افزار MEGA.4 گردید. در پایان، توالی‌های نهایی شده با یکدیگر و همچنین با ترادف‌های استاندارد و شناخته شده موجود در بانک ژنی NCBI در مورد هر ژنوتیپ به طور جداگانه مورد مقایسه قرار گرفت. انجام تطابق چندگانه بین تمامی ترادف‌ها به کمک دستور Clustal W از برنامه‌ی نرم‌افزاری MEGA.4 صورت پذیرفت تا محل چندشکلی با دقت بیش‌تری مورد بررسی و آنالیز قرار گیرد.

بررسی آماری داده‌های مطالعه‌ی حاضر با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. با استفاده از سوابق ثبت شده، اطلاعات مربوط به شاخص‌های تولیدمثلی در دوره-های شیردهی قبلی گاوهای مورد مطالعه استخراج گردید و در هر شاخص میانگین آن برای هر گاو محاسبه گردید. جهت به دست آوردن میانگین در مورد هر شاخص برای هر گاو ابتدا مجموع آن شاخص را در دورهای شیردهی (شکم زایمان‌های مختلف) محاسبه گردید و به تعداد شکم زایمان گاو تقسیم شد. شاخص‌های تولیدمثلی مورد بررسی در گاوهای مورد مطالعه شامل تعداد تلقیح به ازای آبستنی، روزهای باز و فاصله‌ی زایمان تا اولین تلقیح آن‌ها بود که مقایسه‌ی آن‌ها بین گاوهای با ژنوتیپ‌های مختلف بر اساس ژن بتاکازئین با استفاده از آزمون کروسکال والیس (Kruskal–Wallis test) انجام شد. نتایج در مورد شاخص‌های تولیدمثل به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شدند. اختلاف آماری با دقت P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از تکثیر ژن بتاکازئین در نمونه‌های مورد آزمایش طی PCR که با پرایمرهای اختصاصی Bet.Cas F و Bet.Cas R تکثیر پیدا کرده‌اند در Fig 2 نشان داده شده است. نمونه‌های کنترل مثبت DNA مصرفی برای هر ژنوتیپ در PCR اختصاصی جهت تعیین ترادف، محصول ۷۳۰ جفت بازی با کیفیت مناسب تولید کردند (Fig 3). مقایسه‌ی نتایج حاصل از تعیین ترادف و هضم آنزیمی محصولات نمونه‌های کنترل مثبت با یکدیگر و همچنین با ترادف‌های استاندارد و مرجع موجود در بانک ژنی NCBI بیان‌گر تایید صحت روش RFLP-PCR جهت تفکیک صحیح هر سه ژنوتیپ A1A1، A1A2 و A2A2 در میان نمونه‌های مورد بررسی بود (Fig 4). ژنوتایپینگ نمونه‌ای مختلف بر اساس چندشکلی ناحیه‌ی ۶۷ ژن کد کننده‌ی پروتئین بتاکازئین نشان داد که تعداد ۱۳ (۳۱/۷ درصد)، ۲۱ (۵۱/۲ درصد) و هفت (۱۷/۱ درصد) رأس از گاوها به ترتیب دارای ژنوتیپ A1A1، A1A2 و A2A2 بودند (Fig 5).

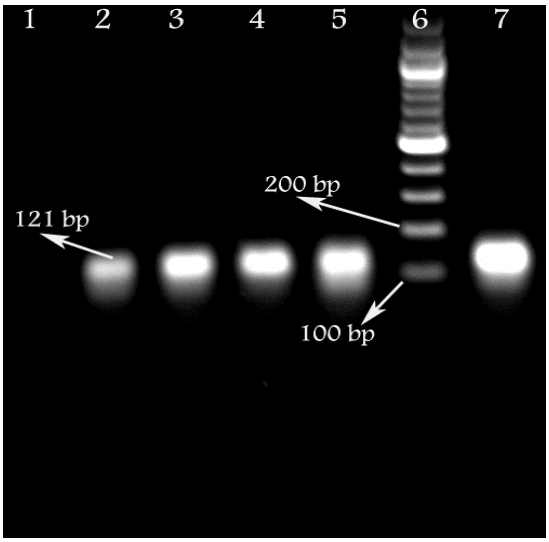

Figure 2. Electrophoresis of primary PCR reaction products before enzymatic digestion (121 bp) and ladder 100 bp.

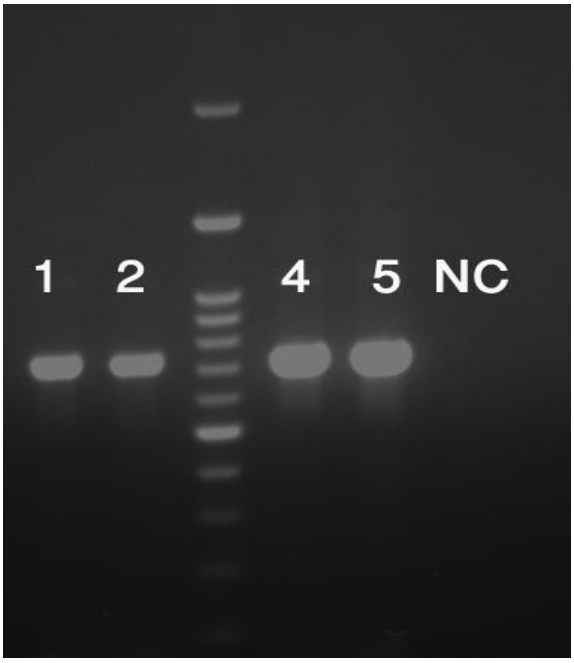

Figure 3. Electrophoresis of PCR products for the sequencing (730 bp), control samples from each genotype (lanes; 1, 2, 4 and 5) compared with ladder 100 bp and negative control (lane NC)

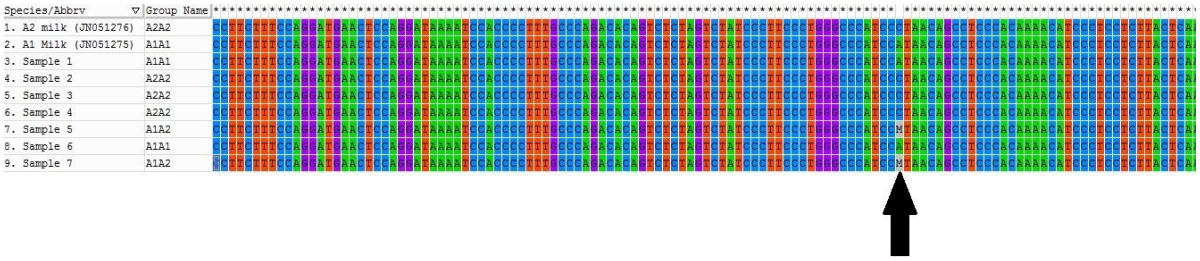

Figure 4. Multiple alignments of Polymorphism (A/C) sequences in the *Beta-Casein* Gene in the different genotypes A1A1, A1A2 and A2A2 provided in this study (7 Cases) compared with the reference sequences for A1 and A2 in the GenBank (accession numbers for gene is available in parentheses). Mutation site is showed with a black arrow. The letter M indicates a heterozygous state (A/C).

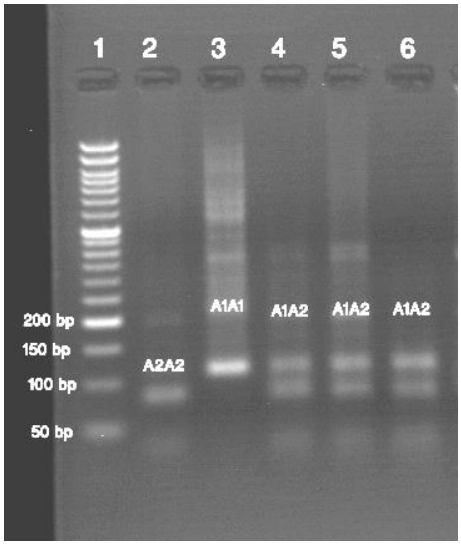

Figure 5. Electrophoresis (3% agarose) of a number of samples provided from enzymatic digestion by *BstDE I* (*Dde I*). Lane 1: ladder 50 bp, lane 2: A2A2, lane 3: A1A1, lanes 4, 5, 6: A1A2.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که فاکتورهای تولیدمثلی شامل تعداد تلقیح به ازای آبستنی، روزهای باز و فاصله‌ی زایمان تا اولین تلقیح بین گاوهای دارای ژنوتیپ‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری وجود ندارد (Table 4).

Table 4. Comparison of the reproductive parameters (Mean ± SD) between different beta-casein genotypes of dairy cows

	Genotype (polymorphism in the beta-casein gen)		
Reproductive parameters	A1A1	A1A2	A2A2
Service per conception	1.96± 0.75	2.13± 0.95	2.46± 1.11
Days open	107.10 ± 43.20	105.80 ± 38.10	119.55 ± 36.50
Calving to first service	73.54 ± 17.33	76.44 ± 14.10	73.77 ± 17.60

بحث

در مطالعه‌ی حاضر چندشکلی ژن بتاکازئین شیر (بر اساس جایگاه ۶۷ ژن با جایگزینی اسید آمینه پرولین با هیستیدین در شیر A1) در گاوهای شیری هلشتاین با استفاده از سیستم RFLP-PCR شناسایی و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تکنیک RFLP-PCR یک روش سریع و دقیق جهت شناسایی موتاسیون‌های نقطه‌ای رخ داده در ژنوم می‌باشد. این روش در مقایسه با روش تعیین ترادف که وقت گیر بوده و پرهزینه‌تر می‌باشد، انجام ژنوتایپینگ نمونه‌ها با تعداد زیاد را آسان و ارزان می‌نماید (Abdel-Rahman et al. 2007; Gouda et al. 2013). ژنوتایپینگ نمونه‌های مختلف بر اساس چندشکلی ناحیه‌ی ۶۷ ژن کد کننده‌ی پروتئین بتاکازئین نشان داد که تعداد ۱۳ (۳۱/۷ درصد)، ۲۱ (۵۱/۲ درصد) و هفت (۱۷/۱ درصد) رأس از گاوها به ترتیب دارای ژنوتیپ A1A1، A1A2 و A2A2 بودند. این نتایج نشان می‌دهد که بیش‌تر گاوها دارای ژنوتیپ هتروزیگوت می‌باشند و تعداد کم‌تری از گاوها دارای ژنوتیپ هموزیگوت A2A2 (تولیدکننده‌ی شیر با بتا کازئین A2) بودند.

در برنامه‌های اصلاح نژاد دام صفات تولیدمثلی دارای اهمیت بوده (Hamza, 2010) و باید قبل از این که ژن‌های پروتئین‌های شیر به عنوان یک معیار انتخاب در تولید مورد استفاده قرار گیرند، باید اثرات آن‌ها بر روی همه‌ی صفات مهم گاو شیری به خصوص باروری بررسی شده باشد (Demeter et al. 2010; Ruottinen et al. 2004).

علی‌رغم انجام مطالعات گسترده در مورد ارتباط چندشکلی پروتئین شیر با صفات عملکرد تولیدی، فقط تعداد اندکی گزارشات در ارتباط با عملکرد تولیدمثلی وجود دارد (Jairam and Nair 1901; Hargrove et al. 1980; Lin, 1992; Tsiaras et al. 2005; Felenczak et al. 2008; Hamza, 2010). علاوه بر این، با توجه به این که اثر ژنوتیپ‌های مختلف پروتئین‌های شیر روی صفات باروری با استفاده از تعداد نسبتاً کم داده‌ها و از روش‌های آماری و مدل تخمین زده شده‌اند، نتایج به دست آمده از اثر ژنوتیپ پروتئین‌های شیر روی این صفات متناقض می‌باشد (Ruottinen et al. 2004). هر چند که مطالعات مربوط به باروری شامل خصوصیات تولیدمثلی مختلف مانند روزهای باز، فاصله‌ی زایمان تا اولین تلقیح و تعداد تلقیح به ازای آبستنی می‌باشد، اما این صفات تحت تأثیر عوامل مختلف زیست محیطی نیز قرار می‌گیرند (Hodel et al. 1995; Ruottinen et al. 2004). و وراثت‌پذیری این صفات نیز محدود (حدود ۰/۰۱ تا ۰/۰۶) است (Hayes et al. 1992; Weigel and Rekaya, 2000). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که فاکتورهای تولیدمثلی شامل تعداد تلقیح به ازای آبستنی، روزهای باز و فاصله‌ی زایمان تا اولین تلقیح بین گاوهای دارای ژنوتیپ‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری وجود ندارد.

برخی از مطالعات انجام شده در مورد تلیسه‌ها، گاوهای شکم اول و چند شکم زاییده نشان می‌دهدکه ژنوتیپ‌های

بتا-کاپا-کازئین و بتالاکتوگلوبولین تأثیر آماری قابل توجهی روی صفات تولیدمثلی تلیسه‌ها ندارند، هر چند که تلیسه‌های دارای ژنوتیپ بتالاکتوگلوبولین AB نسبت به تلیسه‌ها با ژنوتیپ بتالاکتوگلوبولین BB و AA در سن پایین‌تری آبستن شده و فاصله‌ی بین اولین تلقیح تا آبستنی آن‌ها نیز کوتاهتر است (Lin et al. 1987). در دیگر پژوهش‌ها نشان دادند که تلیسه‌های دارای ژنوتیپ بتالاکتوگلوبولین AB وزن، اندازه و طول مدت آبستنی بیشتری نسبت به تلیسه‌های با ژنوتیپ بتالاکتوگلوبولین BB و AA دارند و دام‌های دارای ژنوتیپ بتالاکتوگلوبولین AA به طور قابل ملاحظه‌ای طول دوره‌ی آبستنی کوتاهتری نسبت به ژنوتیپ‌های BB و AB دارند (Tsiaras et al. 2005). اثرات قابل توجهی نیز بین ژنوتیپ‌های بتا-کاپا-کازئین و فاصله‌ی زایمان تا اولین تلقیح در گاوهای شکم اول نژاد فنیش-آیرشایر در فنلاند گزارش شد، در حالی که بین این ژنوتیپ‌ها و فاصله‌ی اولین تلقیح تا آبستنی ارتباطی دیده نشد. همچنین اثر معنی‌داری بین ژنوتیپ بتالاکتوگلوبولین و فاصله‌ی زایمان تا اولین تلقیح و فاصله-ی اولین تلقیح تا آبستنی دیده نشد (Ruottinen et al. 2004).

Hargrove و همکاران در سال ۱۹۸۰ گزارش کردند که ژنوتیپ‌های بتا کازئین تأثیری بر روزهای باز گاوهای هلشتاین ندارند (Hargrove et al. 1980). که در مطالعه‌ی حاضر هم بین روزهای باز گروه‌های با ژنوتیپ متفاوت ژن بتا کازئین تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نگردید و بدون تأثیر می‌باشد. بر اساس مطالعه‌ی انجام شده به وسیله‌ی Lin و همکاران در سال ۱۹۸۷ ژنوتیپ‌های بتا و کاپا-کازئین تأثیر آماری معنی‌داری بر روی صفات تولیدمثلی تلیسه‌ها ندارند (Lin et al. 1987). با توجه به این که گاوهای پرتولید به بیماری‌های مختلف حساس‌ترند در نتیجه میزان یا کمیت تولید شیر بر باروری و به دنبال آن بر روزهای باز تأثیر خواهد داشت، در حالی که ژن بتا کازئین کیفیت شیر را تحت تأثیر قرار می‌دهد و این موضوع می-تواند از دلایل مهم احتمالی این عدم تأثیرگذاری باشد. در مطالعات دلیل کوتاه بودن فاصله‌ی زایمان تا اولین تلقیح در ژنوتیپ‌های بتا-کاپا کازئین A1A1BB و A1A2BB را کم بودن میزان تولید شیر گاوهای دارای این دو نوع ژنوتیپ گزارش کردند (Ruottinen et al. 2004). Tsiaras و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که بین چندشکلی‌های ژن کاپاکازئین و کارآیی تولیدمثل گاوهای هلشتاین ارتباط معنی‌داری وجود ندارد و گاوهای دارای ژنوتیپ کاپاکازئین AB در اولین و دومین زایش سن بیش-تری داشتند (Tsiaras et al. 2005).

در مطالعه‌ای با استفاده از تکنیک لقاح داخل آزمایشگاهی (IVF)، ارتباط ژنتیکی بین چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) در ۴ ژن کازئین و ۲ ژن پروتئین آب پنیر با درصد لقاح و رشد و نمو جنین در مراحل اولیه در نژاد هلشتاین بررسی شد. نتایج نشان داد که چندشکلی در ژن‌های پروتئین آب پنیر با موفقیت لقاح و میزان بلاستوسیست ارتباط قابل توجهی دارد، ولی هیچ ارتباطی بین این چندشکلی تک نوکلئوتیدی واقع در ژن کازئین و صفات باروری لقاح داخل آزمایشگاهی مشاهده نشد (Peñagaricano and Khatib, 2012). تحقیقات صورت گرفته در نقاط مختلف جهان، نشان دهنده‌ی عدم تأثیر مهم ژنوتیپ‌های بتا-کاپا-کازئین و بتالاکتوگلوبولین بر صفات تولیدمثلی گاوها هستند؛ در نتیجه انتخاب بر اساس چندشکلی‌های بتا-کاپا-کازئین و بتالاکتوگلوبولین هیچ تأثیر قابل توجهی روی باروری گاوها ندارد (Ruottinen et al. 2004). همچنین، انتخاب گاوها بر اساس ترکیب پروتئین شیر یا انواع مختلف پروتئین‌های شیر به منظور بهبود ترکیبات شیر هیچ گونه تأثیر منفی بر عملکرد تولیدمثلی آن‌ها ندارد (Demeter et al. 2010). بررسی آماری در مطالعه‌ی حاضر بیان‌گر عدم وجود هر گونه ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف بتاکازئین و صفات باروری و تولیدمثلی در گاوهای نژاد هلشتاین ایرانی در این مطالعه بود.

بر اساس نتایج این پژوهش فراوانی ژنوتیپ A2A2 در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها کم‌تر و نسبت گاوهای

تولیدکننده‌ی بتا کازئین A2 پایین‌تر است و با توجه به ویژگی‌های مطلوب شیر حاوی بتاکازئین A2 چنین به نظر می‌رسد که شناسایی و تکثیر گاوهای حاوی ژن بتاکازئین A2 در جهت بهبود کیفی شیر و سلامت جامعه می‌تواند بدون نگرانی از اثرات منفی آن بر میزان باروری در برنامه‌های اصلاح نژاد مد نظر قرار گیرد. با این وجود جهت بررسی ارتباط این ژنوتیپ و میزان تولید شیر گاو به منظور افزایش درآمدزایی واحدهای شیری نیاز به مطالعات بیش‌تری در این زمینه وجود دارد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شیراز به جهت پشتیبانی مالی برای انجام تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری صمیمانه‌ی آقای دکتر روشن در زمینه‌ی جمع‌آوری نمونه‌ها، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌کنند که در زمینه‌ی این پژوهش تعارض منافع وجود ندارد.

منابع مالی

این پژوهش با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز و با استفاده از امکانات فنی و آزمایشگاهی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شیراز به انجام رسیده است.

منابع

Abdel-Rahman, S. M., & Ahmed, M. M. M. (2007). Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR–RFLP techniques. *Food Control*, 18(10), 1246-1249.

Berry, D. P., Friggens, N. C., Lucy, M., & Roche, J. R. (2016). Milk production and fertility in cattle. *Annual review of animal biosciences*, 4, 269-290.

Crowe, M. A., Hostens, M., & Opsomer, G. (2018). Reproductive management in dairy cows-the future. *Irish veterinary journal*, 71(1), 1-13.

De Noni, I. (2009). Scientific report of efsa review of the potential health impact of β-casomorphins and related peptides 1 Report of the DATEX Working Group on β-casomorphins.

Dematawewa, C. & Berger, P. (1998). Genetic and Phenotypic Parameters for 305-Day Yield, Fertility, and Survival in Holsteins. *Journal of dairy science*, 81(10), 2700-2709.

Demeter, R., Markiewicz, K., Van Arendonk, J. & Bovenhuis, H. (2010). Relationships between milk protein composition, milk protein variants, and cow fertility traits in Dutch Holstein-Friesian cattle. *Journal of dairy science*, 93(11), 5495-5502.

Felenczak, A., Gil, Z., Adamczyk, K., Zapletal, P. & Frelich, J. (2008). Polymorphism of milk κ-casein with regard to milk yield and reproductive traits of Simmental cows. *Journal of Agrobiology*, 25(2), 201-207.

Formaggioni, P., Summer, A., Malacarne, M., & Mariani, P. (1999). Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in Bos genus. *Annalli della Facolta di Medicina Veterinaria Universiti de Parma*, 19, 127-165.

German, J.B., Dillard, C.J. & Ward, R.E. (2002). Bioactive components in milk. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 5(6), 653-658.

Gouda, E. M., Galal, M. K., & Abdelaziz, S. A. (2013). Genetic variants and allele frequencies of kappa casein in Egyptian cattle and buffalo using PCR-RFLP. *Journal of Agricultural Science*, 5(2), 197.

Groenen, M.A. & Van der Poel, J.J. (1994). Regulation of expression of milk protein genes: a review. *Livestock Production Science*, 38(2), 61-78.

Hamza, A. (2010). Kappa Casein Gene Polymorphism and its Impact on Milk Yield and Reproductive Performance Traits of Chinese Holstein Cattle** AE Hamza," ZP Yang, XL Wang," RJ Chen," HT Wu and" AI Ibrahim" College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China "Department of Animal Production, College of Veterinary Science, Nyala University, Nyala, Sudan. *Agricultural Journal*, 5(5), 283-285.

Hargrove, G., Kiddy, C., Young, C., Hunter ,A., Trimberger, G. & Mather, R. (1980). Genetic Polymorphisms of Blood and Milk and Reproduction in Holstein Cattle1, 2. *Journal of dairy science*, 63(7), 1154-1166.

Hayes, J.; Cue, R. & Monardes, H. (1992). Estimates of repeatability of reproductive measures in Canadian Holsteins. *Journal of dairy science*, 75(6), 1701-1706.

Hodel, F., Moll, J. & Kuenzi, N. (1995). Analysis of fertility in Swiss Simmental cattle—Genetic and environmental effects on female fertility. *Livestock Production Science*, 41 (2), 95-103.

Jairam, B. & Nair, P. (1901). Genetic polymorphism of milk proteins and economic characters in dairy animals.

Kamiński, S., Cieślińska, A. & Kostyra, E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of applied genetics*, 48(3), 189-198.

Keating, A.F., Smith, T.J., Ross, R.P. & Cairns, M. (2008). A note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to β-casomorphin. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 99-104.

Lin, C. (1992). Direct typing of milk proteins as an aid for genetic improvement of dairy bulls and cows: a review. *In: Animal Breeding Abstracts*, 1-10.

Lin, C.Y., McAllister, A.J., Ng-Kwai-Hang, K.F., Hayes, J.F., Batra, T.R., Lee, A.J., Roy, G.L., Vesely, J.A., Wauthy, J.M. & Winter, K.A. (1987). Association of Milk Protein Types with Growth and Reproductive Performance of Dairy Heifers. *Journal of Dairy Science*, 70(1), 29-39.

Martin, P., Szymanowska, M., Zwierzchowski, L. & Leroux, C. (2002). The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reproduction Nutrition Development*, 42(5), 433-459.

Mclachlan, C.N.S. (2006). Breeding and milking cows for milk free of β-casein A1. Google Patents.

Niki, R., Kim, G., Kimura, T., Takahashi, K., Kohyama, K. & Nishinari, K. (1994). Physical properties and microstructure of rennet gels from casein micelles of different sizes. Milchwissenschaft (Germany).

Nilsen, H., Olsen, H.G., Hayes, B., Sehested, E., Svendsen, M., Nome, T., Meuwissen, T. and Lien, S. (2009). Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle. *Genetics Selection Evolution*, 41(1), 1-12.

Parashar, A., & Saini, R. K. (2015). A1 milk and its controversy-a review. *International Journal of Bioassays*, 4(12), 4611-4619.

Peñagaricano, F. & Khatib, H. (2012). Association of milk protein genes with fertilization rate and early embryonic development in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Research*, 79(1), 47-52.

Pryce, J., Royal, M., Garnsworthy, P. & Mao, I.L. (2004). Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock production science*, 86(1-3), 125-135.

Roginski, H., Fuquay, J.W. & Fox, P.F. (2003). Encyclopedia of dairy sciences. Volumes 1-4, Academic press.

Ruottinen, O., Ikonen, T. & Ojala, M. (2004). Associations between milk protein genotypes and fertility traits in Finnish Ayrshire heifers and first lactation cows. *Livestock production science*, 85(1), 27-34.

Shah, N.P. (2000). Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*, 84, 3-10.

Swinburn, B. (2004). Beta casein A1 and A2 in milk and human health. Report to New Zealand Food Safety Authority.

Tsiaras, A., Bargouli, G., Banos, G. & Boscos, C. (2005). Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. *Journal of dairy science*, 88(1), 327-334.

Veerkamp, R. & Beerda, B. (2007). Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology*, 68, S266-S273.

Veerkamp, R., Beerda, B. & Van der Lende, T. (2003). Effects of genetic selection for milk yield on energy balance, levels of hormones, and metabolites in lactating cattle, and possible links to reduced fertility. *Livestock Production Science*, 83(2-3), 257-275.

Weigel, K. & Rekaya, R. (2000). Genetic parameters for reproductive traits of Holstein cattle in California and Minnesota. *Journal of Dairy science*, 83(5), 1072-1080.

Welper, R. & Freeman, A. (1992). Genetic Parameters for Yield Traits of Holsteins, Including Lactose and Somatic Cell Score1. *Journal of Dairy Science*, 75(5), 1342-1348.

Woodford, K.B. (2007). A2 milk, farmer decisions, and risk management. *In: Proceedings of the 16th International Farm Management Congress: Peer reviewed papers*, 641-648.

Received: 23.10.2019
Accepted: 13.01.2020

Vol. 17, No. 2, Summer, 2021 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2020.206223.2193
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.2.10.3

Association between milk β-casein protein polymorphism and reproductive indices in Holstein dairy cows

Farideh Norvej[1], Abdolah Mirzaei[2*], Hassan Sharifiyazdi[3] and Abolfazl Hajibemani[4]

[1] DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
[2] Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
[3] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received:23.10.2019 Accepted: 13.01.2020

Abstract

The aim of the present study was to detect Holstein dairy cows with two allelic forms of A1 and A2 of milk β-casein gene and compare their reproductive indices. The blood samples were collected from 41 multiparous (without pre and postpartum clinical diseases) Holstein cows in a modern dairy herd. DNA was extracted from whole blood and the β-casein genotype was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis using *BstDE I* (*Dde I*) enzyme based on the replacement of the proline by histidine at position 67 β-casein protein in A1 milk. The PCR products sequenced for each genotype which used as control samples to validate the RFLP findings. The reproductive indices between cows with different genotypes were compared by Kruskal–Wallis test. The results of the present study indicated that A1A1, A1A2 and A2A2 genotype had a frequency of 13 (31.7%), 21 (51.2%) and 7 (17.1%). No significant difference was found in calving to first service interval, days open and service per conception indices between studied cows with different β-casein genotypes ($P > 0.05$). As results, it seems that the identification and proliferation of cows with the allelic form of A2 of β-casein gene can be considered without adverse effects on the fertility of dairy cows. However, further studies are needed to investigate the relationship between this genotype and milk yield of cows in the dairy herds.

Key words: Fertility, β-casein, Genotype, Dairy cow

* **Corresponding Author**: Abdolah Mirzaei, Associate Professor, Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
E-mail: mirzaei@shirazu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).