

ارتباط چندشکلی های تک نوکلئوتیدی T/C و A/C از ژن

PPARGC1A با ترکیب و تولید شیر در گاوهای هلشتاین ایران

مجید پسندیده^{۱*}، محمدرضا محمدآبادی^۲، علیرضا ترنگ^۳، علی اسماعیلی زاده کشکویی^۴

رامین صیقلانی^۳، سعید انصاری مهیاری^۴، رضا پسندیده^۵

۱-۲- کارشناس ارشد و دانشیار دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، منطقه شمال (رشت)

۴- استادیار، دانشگاه صنعتی اصفهان

۵- دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دانشگاه فردوسی مشهد

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Majidpasandideh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱)

چکیده

واژه‌های کلیدی

چندشکلی تک نوکلئوتیدی،
گاو هلشتاین،
PCR-RFLP
PPARGC1A

بسیاری از مطالعات، وجود QTL هایی روی کروموزوم ۶ گاو گزارش کرده‌اند که بر صفات تولیدی شیر موثر است. ژن PPARGC1A به عنوان یک ژن کاندیدا برای مقدار چربی شیر تشخیص داده شده است، زیرا این ژن نقش اساسی در متابولیسم چربی، گلوکز و انرژی ایفا می‌نماید. در این تحقیق، استخراج DNA از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از ۳۹۸ راس گاو هلشتاین از استان‌های تهران و اصفهان انجام شد. برای استخراج DNA از روش نمکی استفاده گردید. سپس SNPT>C در موقعیت ۱۸۹۲ و SNPA>C در موقعیت ۳۳۵۹ از ژن PPARGC1A به روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. فراوانی ژنوتیپ‌های TC، TT و CC در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۸۹۲ به ترتیب ۱۲، ۶۵ و ۲۳ درصد و همچنین فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AC و CC در موقعیت نوکلئوتیدی ۳۳۵۹ به ترتیب ۳۸، ۵۲ و ۱۰ درصد محاسبه شد. با استفاده از آزمون مربع کای، حالت تعادل برای جمعیت‌ها بررسی شد. ژنوتیپ‌های هر دو جایگاه از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف نشان دادند. در این مطالعه، ژنوتیپ‌های موقعیت c.1892T>C با صفات درصد چربی تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز، ارزش اصلاحی تولید شیر، ارزش اصلاحی درصد چربی شیر، تولید پروتئین شیر تصحیح شده براساس ۳۰۵ روز و تولید پروتئین شیر تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ ارتباط معنی‌دار نشان دادند. ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های موقعیت c.3359A>C با دو صفت درصد چربی تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز و ارزش اصلاحی درصد چربی شیر مشاهده شد. ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی های تک نوکلئوتیدی با صفات شیر، فرصت مناسبی برای استفاده از برنامه‌های انتخاب به کمک مارکر در گاو شیری فراهم می‌آورد.

مقدمه

نقشه یابی و تعیین خصوصیات ژن های کنترل کننده صفات مهم مانند تولید شیر، سلامتی و ورم پستان، عرصه ای مهم در تحقیقات گونه های حیوانی فراهم آورده است. در گاو شیری بیشترین تاکید بر تشخیص QTL های است که عهده دار تولید شیر و یا پروسه های فیزیولوژیکی موثر بر صفات تولیدی شیر مانند مقدار شیر، مقدار چربی و پروتئین شیر و درصد چربی و پروتئین شیر می باشد (۵). نقشه یابی ژن ها مرحله ای اساسی برای تحقیق در مورد جایگاه های صفات کمی موثر بر صفات تولیدی در دام می باشد. مرحله بعد تشخیص ژن یا آلی است که موجب ایجاد یک فنوتیپ خاص در جمعیت می شود (۲). هدف از انتخاب به کمک مارکر این است که انتخاب در سطح DNA جایگزین انتخاب بر مبنای فنوتیپ شود (۱۶). انتخاب به کمک مارکر توانایی افزایش فراوانی آلل مطلوب در جمعیت را دارد (۱۲). همچنین در گاوشیری می توان از انتخاب به کمک مارکر به عنوان انتخاب اولیه گوساله های نر (قبل از پروژنی تست) استفاده کرد و از این طریق باعث افزایش شدت انتخاب، کاهش فاصله نسل و افزایش کارایی ژنتیکی در جمعیت شد (۹). بسیاری از مطالعات روی کروموزوم های گاو شیری، QTL های موثر بر صفات تولیدی شیر را کشف کرده اند. از این میان، کروموزوم ۶ گاو، بیشترین تعداد QTL را نشان داده است (۵). در بین ژن هایی که از نقشه یابی مقایسه ای منطقه کروموزومی گاو با کروموزوم های انسان تشخیص داده شده است، ژن های *PPARGC1A*^۱ و *DGAT1* کاندیداهای اصلی QTL موثر بر سنتز چربی شیر معرفی شده اند (۱۷).

ژن *PPARGC1A* (که *PGC-1α* نیز نامیده می شود) عضوی از خانواده فعال کننده های کمکی رونویسی می باشد که نقش اساسی در تنظیم متابولیسم انرژی ایفا می نماید (۸). این ژن نقش کلیدی در فعال سازی گیرنده های مختلف هورمون های هسته ای و همچنین در رونویسی فاکتورهای تنظیمی تعادل انرژی دارد. نشان داده شده است که این ژن نقش میانجی گری در بیان ژن های دخیل در متابولیسم اکسیداسیون و گلوکونئوزنز ایفا می نماید (۱۳). ژن *PPARGC1A* در روی کروموزوم شماره ۵ موش،

کروموزوم شماره ۴ انسان و کروموزوم شماره ۶ گاو مکان یابی شده است و پروتئینی شامل ۷۹۷ اسید آمینه در موش یا ۷۹۸ اسید آمینه در انسان را کد می نماید (۸). این ژن از ۱۳ اگزون تشکیل شده است که شامل ۶۲۶۱ جفت باز می باشد. در مجموع ۱۱ جایگاه چندشکلی در طول این ژن تشخیص داده شده است. ژن *PPARGC1A* وظیفه قابل توجهی در بافت های متابولیسم چربی، گلوکز و تعادل انرژی دارد و در انسان و موش قادر به هماهنگ کردن پروسه های متابولیکی در کبد و بافت های چربی و ماهیچه می باشد (۸). نقش بالقوه *PPARGC1A* در متابولیسم غدد پستانی می باشد. با توجه به نقش اساسی ژن *PPARGC1A* در متابولیسم گلوکز، چربی و انرژی، احتمالاً این ژن پروسه های متابولیکی را در طول دوره شیردهی در گاوهای شیری تنظیم می کند و توانایی فراهم آوردن نیازهای متابولیکی حیوان را در دوره شیردهی دارد (۱۷).

در یک تحقیق، تنوع ژنتیکی لوکوس *PPARGC1A* در موقعیت های *c.1892T>C* (واقع در اینترون ۹) و *c.3359A>C* (واقع در ناحیه غیر قابل ترجمه ۳) در گاوهای هلشتاین دو جمعیت ^۲UW و ^۲CDDR مورد بررسی قرار گرفت (۵) چندشکلی تک نوکلئوتیدی T/C فقط در جمعیت UW تعیین ژنوتیپ شد. این جانشینی تک نوکلئوتیدی با هیچ یک از صفات تولیدی شیر ارتباط معنی دار نشان نداد. چندشکلی تک نوکلئوتیدی A/C در هر دو جمعیت مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس این تحقیق، جانشینی تک نوکلئوتیدی A>C اثر معنی دار بر مقدار شیر در جمعیت UW، بر درصد پروتئین در هر دو جمعیت UW و CDDR و بر سلول های سوماتیک در جمعیت CDDR نشان داد. اثرات غالبیت برای هیچ یک از صفات مورد مطالعه معنی دار گزارش نشد (۴). در تحقیقی دیگر، ارتباط معنی دار موقعیت *c.1892T>C* با مقدار چربی شیر مشخص شد اما این جانشینی با مقدار شیر و درصد چربی آن ارتباط معنی دار نشان نداد. ارتباط موقعیت *c.3359A>C* با صفات مورد بررسی، در سطح ۰/۰۵ معنی دار نبود (۱۷). مطالعه ای روی گاوهای نژاد جرسی نشان داد که تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ های موقعیت های *c.1892T>C* و *c.3359A>C*

^۲ University of Wisconsin^۳ Cooperative Dairy DNA Repository^۱ Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α

غیر قابل ترجمه ۳' (3'UTR) از این ژن (در برگرفته دو جهش مربوطه) انجام پذیرفت. توالی آغازگرهای پیشرو و پسرو برای تکثیر قطعه ۱۹۵ جفت بازی در مکان ۱۸۹۲ ژن *PPARGC1A* به صورت زیر بود (۴).

1892F 5'-CATAGCCGCGGCCAGGTAAGATGCACGTTGGC-3'
1892R 5'-CTGGTACTCCTCGTAGCTGTC-3'

همچنین توالی آغازگرهای پیشرو و پسرو برای تکثیر قطعه ۳۵۷ جفت بازی در مکان ۳۳۵۹ ژن *PPARGC1A* به صورت زیر بود (۴).

3359F 5'-GCGAGCACGGTGTACATTACTAAGGAGAGTTGGCTAG-3'
3359R 5'-GTTGTGTTGCACTCAATGGAC-3'

واکنش تکثیر در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۰/۶ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار dNTPS، ۲ میکرولیتر PCR بافر 10X، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ و ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلیمرز صورت پذیرفت. چرخه های واکنش PCR به این صورت برنامه ریزی شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال به روش تاج دان^۳ از دمای ۶۰ تا ۵۵ درجه سانتی گراد (۰/۵) درجه سانتی گراد کاهش به ازای هر سیکل) به مدت ۵۰ ثانیه، سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و سنتز نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه. با انجام این واکنش، قطعات ۱۹۵ و ۳۵۷ جفت بازی از این ژن تکثیر شد. سپس برای تعیین ژنوتیپ در مکان T>C، محصولات PCR با آنزیم برشی *HaeIII*(*BsuRI*) و برای تعیین ژنوتیپ در مکان A/C، محصولات PCR با آنزیم برشی *NheI* مورد هضم واقع شدند (۴). ترکیب واکنشگرهای هضم آنزیمی برای موقعیت T>C 1892T>C، به صورت ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، یک میکرولیتر بافر R(10X) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *HaeIII*(10U) استفاده شد که به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در دستگاه Dry Bath انجام شد. همچنین برای هضم آنزیمی در موقعیت A>C 3359A>C، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، یک میکرولیتر بافر Tango(10X) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *NheI*(10U) به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در دستگاه Dry Bath قرار داده شد. نمونه های هضم شده روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند و ژل با اتیدیوم بروماید

از ژن *PPARGC1A* با صفات ترکیب و تولید شیر وجود ندارد (۷). یک تحقیق روی گاوهای نژاد فریزین-هلشتاین لهستان، ارتباط معنی دار بین ژنوتیپ های SNPT>C در موقعیت ۱۸۹۲ با مقدار پروتئین شیر و نیز نرخ برگشت ناپذیری^۱ در تلیسه ها گزارش کرده است. در این مطالعه، SNPA>C در موقعیت ۳۳۵۹ با هیچ یک از صفات مورد بررسی ارتباط معنی دار نشان نداد (۶). با بررسی SNPT>C در موقعیت ۱۸۹۲ در گاوهای گوشتی ایالات متحده، عدم وجود ارتباط معنی دار بین این جانشینی تک نوکلئوتیدی با صفات لاشه مورد بررسی مشخص شد (۱۸). در یک تحقیق، ارتباط چندشکلی تک نوکلئوتیدی T>C در موقعیت ۱۸۹۲ از ژن *PPARGC1A* در گاوهای فریزین-هلشتاین هلند مورد بررسی قرار گرفت. ارتباط ژنوتیپ های این چندشکلی با درصد چربی شیر معنی دار گزارش شد (۱۵). به دلیل نتایج ضد و نقیضی که برای تاثیر QTL های واقع در وسط کروموزوم ۶ گزارش شده است، می بایست جمعیت های دیگر از گاو هلشتاین در سایر کشورها، مورد ارزیابی قرار گیرد (۲). با توجه به این مسئله و به دلیل اهمیت صنعت تولید شیر و نیز نقش کلیدی ژن *PPARGC1A* در متابولیسم انرژی، چربی و گلوکز، انجام چنین مطالعه ای ضروری به نظر رسید. به این منظور در این تحقیق، ارتباط چندشکلی تک نوکلئوتیدی T>C در موقعیت ۱۸۹۲ و نیز چندشکلی تک نوکلئوتیدی A>C در موقعیت ۳۳۵۹ از ژن *PPARGC1A* با صفات ترکیب و تولید شیر در گاوهای هلشتاین ایران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق روی ۳۹۸ راس گاو ماده هلشتاین گاوداری های استان های تهران و اصفهان انجام شد. نمونه گیری خون از ۱۰ گاوداری این دو استان (هر استان ۵ گاوداری) با استفاده از لوله های خونگیری حاوی EDTA انجام شد. سپس استخراج DNA از نمونه های خون به روش نمکی^۲ انجام شد (۱۰). برای بررسی کیفی DNA از ژل الکتروفورز یک درصد استفاده شد. واکنش PCR برای تکثیر قطعه ۱۹۵ جفت بازی واقع در اینترون ۹ ژن *PPARGC1A* و نیز تکثیر قطعه ۳۵۷ جفت بازی واقع در ناحیه

¹ Non-return rate

² Salting out

³ Touchdown

نتایج و بحث

در مرحله بررسی کیفی DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد، نمونه‌هایی که باند روشن با وضوح کامل ایجاد کردند مورد قبول قرار گرفتند. محصولات به‌دست آمده از واکنش PCR، جهت حصول اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر از ژن *PPARGC1A*، روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شدند. نمونه‌های تکثیر شده، باند روشن و واضحی در موقعیت‌های ۱۹۵ و ۳۵۷ جفت‌بازی ایجاد کردند که برای ادامه تحقیق انتخاب شدند (شکل ۱). با توجه به قطعات حاصل از برش آنزیم، ژنوتیپ‌های افراد در هر موقعیت تعیین شد. با استفاده از آنزیم *HaeIII* در موقعیت c.1892T>C، سه نوع ژنوتیپ TT، TC و CC مشخص شد. قطعه برش نخورده ۱۹۵ جفت‌بازی، بیانگر ژنوتیپ TT می‌باشد و دو قطعه ۱۶۳ و ۳۲ جفت‌بازی، بیانگر ژنوتیپ CC است. همچنین سه قطعه ۱۹۵، ۱۶۳ و ۳۲ جفت‌بازی، نشان‌دهنده ژنوتیپ TC می‌باشد. با تاثیر آنزیم *NheI* در موقعیت c.3359A>C، ژنوتیپ‌های AA، AC و CC تشخیص داده شد. قطعه برش نخورده ۳۵۷ جفت‌بازی، بیانگر ژنوتیپ AA می‌باشد و دو قطعه ۳۱۹ و ۳۸ جفت‌بازی، بیانگر ژنوتیپ CC است. همچنین سه قطعه ۳۵۷، ۳۱۹ و ۳۸ جفت‌بازی، نشان‌دهنده ژنوتیپ AC می‌باشد. قابل ذکر است که قطعات ۳۲ و ۳۸ جفت‌بازی، به علت کوچک و سبک بودن، در ژل آگارز مشاهده نشدند (شکل ۲). در موقعیت c.1892T>C، از بین ۳۹۸ فرد تعیین ژنوتیپ شده، ۴۶ فرد ژنوتیپ TT، ۲۵۹ فرد ژنوتیپ TC و ۹۳ فرد ژنوتیپ CC را نشان دادند. در مورد موقعیت c.3359A>C، از بین ۳۹۸ فرد تعیین ژنوتیپ شده، ۱۵۱ فرد ژنوتیپ AA، ۲۰۷ فرد ژنوتیپ AC و ۴۰ فرد ژنوتیپ CC نشان دادند. مقادیر محاسبه شده فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و نیز مربع کای در جدول ۱ آورده شده است. قابل ذکر است که عدم تعادل پیوستگی بین چندشکلی تک نوکلئوتیدی c.1892T>C و c.3359A>C با استفاده از آماره χ^2 برابر با ۰/۸۵۷۲ محاسبه شد.

رنگ‌آمیزی شد. در چندشکلی تک نوکلئوتیدی T>C، آلل T (برش نخورده) به‌وسیله باند ۱۹۵ جفت‌بازی و آلل C (برش خورده) توسط باند ۱۶۳ جفت‌بازی تشخیص داده شد. همچنین در چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی A>C، آلل A (برش نخورده) به وسیله باند ۳۵۷ جفت‌بازی و آلل C (برش خورده) توسط باند ۳۱۹ جفت‌بازی تشخیص داده شد. با توجه به ژنوتیپ‌های به دست آمده، فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار و تعادل هاردی-واینبرگ با کمک نرم افزار Pop Gene به دست آورده شد (۱۹). همچنین در این تحقیق، عدم تعادل پیوستگی (LD) بین دو جایگاه، با محاسبه آماره r^2 برآورد شد (۳).

برای بررسی ارتباط ژنوتیپ‌ها با صفات تولید و ترکیب شیر، مدل آماری زیر با استفاده از GLM^۱ در نرم افزار SAS^۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۴).

$$Y_{ijkmnr} = \mu + G_i + H(S)_{ij} + M_{ijk} + N_{ijkm} + C_{ijkmn} + e_{ijkmnr}$$

فاکتورها در این مدل عبارتند از:

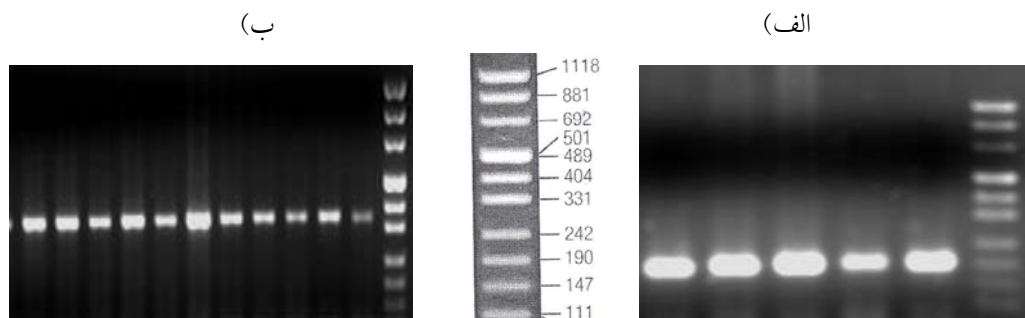
Y_{ijkmnr} : بردار مشاهدات شامل: MILK (تولید شیر تصحیح شده براساس ۳۰۵ روز)، MILK2X (تولید شیر بر اساس دوبار دوشش در روز)، MILKME (تولید شیر تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ)، FAT2X (تولید چربی تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز)، FATP2X (درصد چربی شیر تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز)، PRO305 (تولید پروتئین تصحیح شده بر اساس ۳۰۵ روز)، PROPER305 (درصد پروتئین تصحیح شده بر اساس ۳۰۵ روز) و PROME (تولید پروتئین تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ) بود.

μ : اثر میانگین، G: اثر ژنوتیپ، H: اثر گله (داخل استان نست^۳ شده است)، M: اثر سال تولد، N: اثر ماه تولد، C: اثر اولین سال زایش. ارتباط چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی ژن *PPARGC1A* و ارزش‌های اصلاحی تولید شیر (BVM)، تولید چربی شیر (BVF) و درصد چربی شیر (BVFP) نیز با استفاده از یک مدل آماری شامل اثر ژنوتیپ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

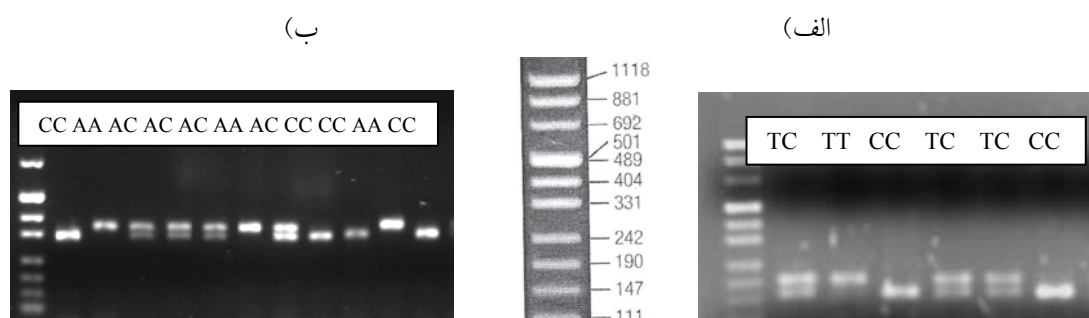
^۱ General linear model

^۲ Statistical analysis system

^۳ Nest



شکل ۱- نتایج تکثیر الف) قطعه ۱۹۵ جفت بازی و ب) قطعه ۳۵۷ جفت بازی ژن *PPARGC1A* پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز دو درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید را نشان می دهند.



شکل ۲- الف) هضم آنزیمی قطعه ۱۹۵ جفت بازی با آنزیم *HaeIII* و ب) هضم آنزیمی قطعه ۳۵۷ جفت بازی با آنزیم *NheI* را نشان می دهند.

جدول ۱- نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ جمعیت در موقعیت های *c.1892T>C* و *c.3359A>C* از ژن *PPARGC1A* را نشان می دهد.

آماره	شاخص	هتروزیگوسیتی	فراوانی ژنوتیپی	فراوانی آللی	SNP
Nei	Shannon	Obs ¹	Exp ²	Obs	Exp
۰/۴۴	۰/۵۶	۰/۱۲	۰/۶۵	۰/۲۳	۰/۴۹
۰/۴۴	۰/۳۶	۰/۳۸	۰/۵۲	۰/۱۰	۰/۴۶

۱- هتروزیگوسیتی مشاهده شده

۲- هتروزیگوسیتی مورد انتظار

می باشند. همچنین افراد دارای ژنوتیپ TT ارزش اصلاحی درصد چربی شیر بیشتری (به ترتیب ۰/۰۵۶۸ و ۰/۰۸۰۹) نسبت به ژنوتیپ های TC و CC داشتند. در مورد صفت تولید پروتئین شیر تصحیح شده براساس ۳۰۵ روز، افراد دارای ژنوتیپ TC نسبت به سایر افراد بالاتر بودند و مقدار پروتئین شیر تصحیح شده بر اساس ۳۰۵ روز بیشتری (به ترتیب ۱۵/۹۹ و ۴/۶۶ کیلوگرم) نسبت به افراد دارای ژنوتیپ TT و CC داشتند. همچنین این افراد، ۱۷/۹۲ کیلوگرم پروتئین شیر تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ بیشتری نسبت به افراد دارای ژنوتیپ TT نشان دادند. افراد دارای ژنوتیپ CC نیز به مقدار ۱۳/۰۵ کیلوگرم پروتئین شیر تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ بیشتری نسبت به افراد دارای

ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ های موقعیت *c.1892T>C* از ژن *PPARGC1A* با صفات درصد چربی تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز ($P<0/05$)، ارزش اصلاحی تولید شیر ($P<0/05$)، ارزش اصلاحی درصد چربی شیر ($P<0/01$)، تولید پروتئین شیر تصحیح شده براساس ۳۰۵ روز ($P<0/05$) و تولید پروتئین شیر تصحیح شده براساس وزن بلوغ ($P<0/05$) مشاهده شد. به طوری که افراد با ژنوتیپ TT دارای درصد چربی تصحیح شده براساس دوبار دوشش بالاتری (به ترتیب ۰/۰۸ و ۰/۰۹ درصد) نسبت به افراد دارای ژنوتیپ TC و CC می باشند. افراد با ژنوتیپ CC ارزش اصلاحی تولید شیر بیشتری (به ترتیب ۳۷/۴۸ و ۲۱۸/۰۲) نسبت به افراد دارای ژنوتیپ TC و CC

ژنوتیپ TT داشتند. ارتباط معنی دار بین ژنوتیپ های این موقعیت با سایر صفات مورد مطالعه مشاهده نشد (جدول ۲). ارتباط معنی دار بین ژنوتیپ های موقعیت $c.3359A>C$ از ژن *PPARGC1A* با دو صفت درصد چربی تصحیح شده بر اساس دو بار دوشش در روز ($P<0/01$) و ارزش اصلاحی درصد چربی شیر ($P<0/01$) مشاهده شد. به طوری که افراد با ژنوتیپ AA درصد چربی تصحیح شده براساس دوبار دوشش بالاتری (به ترتیب ۰/۱۳ و ۰/۱۴ درصد) نسبت به افراد با ژنوتیپ AC و CC نشان دادند. همچنین افراد با ژنوتیپ AA، ارزش اصلاحی

درصد چربی شیر بیشتری (به ترتیب ۰/۰۲۹۵ و ۰/۰۴۱۲) نسبت به افراد با ژنوتیپ AC و CC نشان دادند. ارتباط معنی دار بین ژنوتیپ های این موقعیت با سایر صفات مورد مطالعه مشاهده نشد (جدول ۳). پیشرفت قابل توجهی در بهبود ژنتیکی جمعیت های دامی، با استفاده از انتخاب مصنوعی برای صفات کمی ایجاد شده است. بیش تر این انتخاب ها بر مبنای فنوتیپ ظاهری حیوان و بدون در نظر گرفتن ساختار ژنتیکی انجام شده است. با این حال، پیشرفت علم ژنتیک مولکولی در جمعیت های دامی منجر به شناخت ساختار ژنتیکی صفات کمی شده است (۱).

جدول ۲- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد برای صفات شیر، در ژنوتیپ های مختلف موقعیت $c.1892T>C$ از ژن *PPARGC1A* را نشان می دهد.

	TT(n= ۴۶)	TC(n= ۲۵۹)	CC(n= ۹۳)	p value
c.1892T>C				
MILK	۶۹۰۲/۳۶±۱۱/۶۶	۷۸۰۰/۸۵±۴۷۹/۱۶	۷۳۱۸/۲۹±۵۰۷/۹۱	۰/۱۲۵۴
MILK2X	۶۸۷۶/۱۰±۲۸۵/۴۰	۷۳۴۹/۵۸±۲۲۳/۵۸	۷۲۹۱/۴۳±۲۳۶/۹۹	۰/۳۱۲۴
MILKME	۷۹۸۷/۸۰±۳۲۶/۸۰	۸۵۲۴/۶۷±۲۵۶/۰۱	۸۴۹۰/۲۷±۲۷۱/۳۶	۰/۲۵۹۹
FAT2X	۲۱۹/۵۰±۱۰/۵۶	۲۳۴/۵۵±۸/۲۷	۲۲۴/۷۴±۸/۷۳	۰/۳۸۸۱
FATP2X	^a ۳/۲۹±۰/۱۰۳۹	^b ۳/۲۱±۰/۰۸۱۳	^c ۳/۱۰±۰/۰۸۵۸	۰/۰۲۱۰ *
BVM	^c ۱۶۷/۹۴±۸۹/۷۳	^b ۱۲/۶۰±۵۸/۸۴	^a ۵۰/۰۸±۷۲/۵۲	۰/۰۲۴۷ *
BVF	۱/۳۶±۳/۰۷	۳/۶۹±۲/۰۱	۳/۴۰±۲/۴۸	۰/۸۹۲۱
BVFP	^a ۰/۰۹۱۲±۰/۰۲۲۹	^b ۰/۰۳۴۴±۰/۰۱۵۰	^b ۰/۰۱۰۳±۰/۰۱۸۵	۰/۰۰۰۱ **
PRO305	^c ۲۰۷/۲۷±۹/۱۸	^a ۲۲۳/۲۶±۶/۹۶	^b ۲۱۸/۶۰±۷/۴۴	۰/۰۳۸۲ *
PROPER305	۳/۰۹±۰/۰۴۸۶	۳/۰۶±۰/۰۳۶۸	۳/۰۴±۰/۰۳۹۴	۰/۵۱۵۰
PROME	^c ۲۴۰/۶۵±۱۰/۵۰	^a ۲۵۸/۵۷±۷/۹۶	^{ab} ۲۵۳/۷۰±۸/۵۲	۰/۰۴۰۶ *

MILK (تولید شیر تصحیح شده براساس ۳۰۵ روز)، MILK2X (تولید شیر بر اساس دوبار دوشش در روز)، MILKME (تولید شیر تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ)، BVM (ارزش اصلاحی تولید شیر)، BVF (ارزش اصلاحی تولید چربی شیر)، BVFP (ارزش اصلاحی درصد چربی شیر)، FAT2X (تولید چربی تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز)، FATP2X (درصد چربی شیر تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز)، PRO305 (تولید پروتئین تصحیح شده بر اساس ۳۰۵ روز)، PROPER305 (درصد پروتئین تصحیح شده بر اساس ۳۰۵ روز) و PROME (تولید پروتئین تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ).

جدول ۳- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد برای صفات شیر، در ژنوتیپ های مختلف موقعیت $c.3359A>C$ از ژن *PPARGC1A* را نشان می دهد.

	AA(n= ۱۵۱)	AC(n= ۲۰۷)	CC(n= ۴۰)	p value
c.3359A>C				
MILK	۷۲۹۷/۳۸±۵۰۶/۷۴	۷۶۵۶/۷۱±۴۵۷/۳۹	۷۴۹۵/۵۷±۶۴۲/۶۶	۰/۱۴۸۰
MILK2X	۷۲۱۶/۳۲±۲۶۳/۹۳	۷۳۲۵/۹۲±۲۲۲/۲۷	۷۲۵۷/۹۲±۳۰۰/۴۸	۰/۷۸۲۵
MILKME	۸۳۷۹/۱۲±۲۷۱/۲۳	۸۵۱۱/۱۴±۲۵۴/۴۵	۸۴۶۴/۳۷±۳۴۳/۹۸	۰/۷۹۲۵
FAT2X	۲۳۲/۲۹±۸/۷۳	۲۲۷/۶۷±۸/۲۰	۲۳۳/۷۶±۱۱/۱۰	۰/۶۳۶۷
FATP2X	^a ۳/۲۷±۰/۰۸۴۶	^b ۳/۱۴±۰/۰۷۹۵	^b ۳/۱۳±۰/۰۱۰۷۷	۰/۰۰۹۲ **
BVM	-۴۴/۱۲±۶۶/۰۵	۸/۷۳±۶۰/۰۸	۹۴/۰۷±۹۶/۱۱	۰/۲۲۹۳
BVF	۳/۰۳±۲/۲۴	۳/۰۹±۲/۰۴	۴/۸۷±۳/۲۷	۰/۸۷۰۷
BVFP	^a ۰/۰۵۴۵±۰/۰۱۶۹	^b ۰/۰۲۴۹±۰/۰۱۵۴	^c ۰/۰۱۳۳±۰/۰۲۴۶	۰/۰۰۴۳ **
PRO305	۲۱۸/۵۲±۷/۴۲	۲۲۱/۷۵±۶/۸۳	۲۲۹/۷۹±۹/۹۴	۰/۳۸۲۱
PROPER305	۳/۰۷±۰/۰۳۹۱	۳/۰۷±۰/۰۳۵۹	۳/۰۶±۰/۰۵۲۳	۰/۱۸۹۳
PROME	۲۵۳/۴۸±۸/۴۸	۲۵۷/۰۹±۷/۸۱	۲۶۶/۳۴±۱۱/۳۷	۰/۳۶۶۶

آوردند و Kowalewska و همکاران (۲۰۱۰) بیش‌ترین فراوانی ژنوتیپی را برای این ژنوتیپ مشاهده کردند. قابل توجه است که فراوانی‌های آللی به دست آمده در موقعیت $c.3359A>C$ در این تحقیق، با نتایج Komisarek و همکاران (۲۰۰۹) که فراوانی‌های آللی را به صورت $A=۰/۶۴$ و $C=۰/۳۶$ گزارش کردند، یکسان است. با استفاده از آزمون مربع کای (χ^2)، انحراف ژنوتیپ‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ، در هر دو موقعیت مورد بررسی مشخص شد. از دلایل احتمالی این انحراف از تعادل، می‌توان به نمونه-گیری از جمعیت که خود نوعی انتخاب است و نیز تلاقی‌های غیر تصادفی اشاره کرد که هر دو از عوامل برهم‌زننده تعادل می‌باشند.

در این مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های موقعیت $c.1892T>C$ از ژن *PPARGC1A* با صفات درصد چربی تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز ($P<۰/۰۵$)، ارزش اصلاحی تولید شیر ($P<۰/۰۵$)، ارزش اصلاحی درصد چربی شیر ($P<۰/۰۱$)، تولید پروتئین شیر تصحیح شده براساس ۳۰۵ روز ($P<۰/۰۵$) و تولید پروتئین شیر تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ ($P<۰/۰۵$) مشاهده شد. درحالی‌که Weikard و همکاران (۲۰۰۵) ارتباط معنی‌دار موقعیت $c.1892T>C$ از ژن *PPARGC1A* را با مقدار چربی شیر گزارش کردند اما این جانشینی با مقدار شیر و درصد چربی آن ارتباط معنی‌دار نشان نداد. در مطالعه Khatib و همکاران (۲۰۰۷) و Kowalewska و همکاران (۲۰۱۰) این جانشینی تک‌نوکلئوتیدی با هیچ‌یک از صفات تولیدی شیر ارتباط معنی‌دار نشان نداد. Komisarek و همکاران (۲۰۰۹) ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های $SNPT>C$ با مقدار پروتئین شیر و نیز نرخ برگشت‌ناپذیری در تلیسه‌ها مشاهده کردند و نشان دادند افراد با ژنوتیپ TT مقدار پروتئین بیش‌تری در شیر تولید می‌کنند. در تحقیق حاضر، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های موقعیت $c.3359A>C$ از ژن *PPARGC1A* با دو صفت درصد چربی تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز ($P<۰/۰۱$) و ارزش اصلاحی درصد چربی شیر ($P<۰/۰۱$) مشاهده شد. Khatib و همکاران (۲۰۰۷) ارتباط معنی‌دار اثر افزایشی $SNPA>C$ با افزایش درصد پروتئین شیر و کاهش مقدار شیر را گزارش کردند. Weikard و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که افراد دارای ژنوتیپ

در این تحقیق ژنوتیپ‌های چندشکلی تک نوکلئوتیدی $c.1892T>C$ و $c.3359A>C$ از ژن *PPARGC1A* به روش PCR-RFLP تعیین شد و سپس ارتباط آن‌ها با صفات ترکیب و تولید شیر در گاوهای هلشتاین ایران مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل نقش کلیدی ژن *PPARGC1A* در پاسخ‌های بیولوژیکی مانند گرمایابی سازشی، بیورژنر میتوکندریایی و متابولیسم چربی، گلوکز و انرژی، برای این تحقیق انتخاب شد (۷). دلیل دیگر برای انتخاب این ژن، نتایج حاصل از مطالعات QTL بود به‌طوری‌که این تحقیقات نشان داده بودند که یک QTL در نزدیکی ژن *PPARGC1A* در ناحیه سانترومر از کروموزوم ۶ گاو قرار گرفته است که بر صفات ترکیب و تولید شیر موثر می‌باشد (۴، ۵، ۱۱، ۱۷).

در تحقیق حاضر، بیش‌ترین فراوانی ژنوتیپی در موقعیت $c.1892T>C$ از ژن *PPARGC1A* برای ژنوتیپ TC و کم‌ترین فراوانی برای ژنوتیپ TT مشاهده شد. این نتایج با یافته‌های Khatib و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد. با این‌حال، نتایج این مطالعه، با نتایج Weikard و همکاران (۲۰۰۵) و Kowalewska و همکاران (۲۰۱۰) که بیش‌ترین فراوانی ژنوتیپی در این موقعیت را به‌ترتیب برای CC و TC و کم‌ترین فراوانی ژنوتیپی را به‌ترتیب برای TT و CC گزارش کردند، تفاوت نشان داد. نتایج این تحقیق با یافته‌های Komisarek و همکاران (۲۰۰۹)، White و همکاران (۲۰۰۷) و Schennink و همکاران (۲۰۰۹) که بیش‌ترین فراوانی آللی در موقعیت $c.1892T>C$ را برای آلل C به‌دست آوردند مشابهت دارد. در این مطالعه بیش‌ترین فراوانی ژنوتیپی در موقعیت $c.3359A>C$ از ژن *PPARGC1A* برای ژنوتیپ AC و کم‌ترین فراوانی برای ژنوتیپ CC محاسبه شد. Khatib و همکاران (۲۰۰۷) و Weikard و همکاران (۲۰۰۵) بیش‌ترین فراوانی ژنوتیپی را در این موقعیت، برای ژنوتیپ AC به دست آوردند و Kowalewska و همکاران (۲۰۱۰) کم‌ترین فراوانی ژنوتیپی را برای ژنوتیپ CC مشاهده کردند. از این نظر، نتایج تحقیق حاضر با مطالعات قبلی مطابقت دارد. اما تفاوت‌هایی نیز بین نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعات قبل مشاهده شد، به طوری‌که Khatib و همکاران (۲۰۰۷) و Weikard و همکاران (۲۰۰۵) کم‌ترین فراوانی ژنوتیپی را برای ژنوتیپ AA به دست

معنی دار این دو جایگاه به علت عدم تعادل پیوستگی بالا با یکدیگر می باشد. احتمال دیگر برای توجیه ارتباط تنوع $T > C$ در موقعیت ۱۸۹۲ و نیز تنوع $A > C$ در موقعیت ۳۳۵۹ با صفات ترکیب و تولید شیر، عدم تعادل پیوستگی احتمالی این جایگاه ها با چندشکلی های تک نوکلئوتیدی تشخیص داده نشده در ژن *PPARGC1A* می باشد. در این تحقیق، ارتباط آلل T در موقعیت $c.1892T > C$ با افزایش درصد چربی تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز و ارزش اصلاحی درصد چربی شیر و نیز ارتباط آلل C با افزایش ارزش اصلاحی تولید شیر و نیز افزایش تولید پروتئین شیر تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ مشخص شد. همچنین مشخص شد که آلل A در موقعیت $c.3359A > C$ باعث افزایش درصد چربی تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز و ارزش اصلاحی درصد چربی شیر می شود.

به طور خلاصه، وجود ارتباط معنی دار بین این چندشکلی های تک نوکلئوتیدی با صفات ترکیب و تولید شیر، فرصت مناسبی برای استفاده از برنامه های انتخاب به کمک مارکر (MAS)^۳ در گاوهای شیری فراهم می آورد. از دلایل تفاوت در نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعات مشابه، می توان به تفاوت پتانسیل ژنتیکی افراد مورد مطالعه و نیز اختلاف در اندازه نمونه اشاره نمود. بنابراین پیشنهاد می شود که چندشکلی های تک نوکلئوتیدی در این ژن، در نژادهای دیگر گاو شیری با تعداد نمونه بیش تر نیز بررسی شود.

³ Marker Assisted Selection

منابع

1. Dekkers JCM and Hospital F, 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nat. Rev. Genet.* 3: 22-32.
2. De Koning DJ, 2006. Conflicting candidates for cattle QTLs. *Trends Genet.* 22: 301-305.
3. Hill WG and Robertson A, 1968. Linkage Disequilibrium in Finite Populations. *Theor. Appl. Genet.* 38: 226-231.
4. Khatib H, Zaitoun I, Wiebelhaus-Finger J, Chang YM and Rosa GJM, 2007. The association of bovine *PPARGC1A* and *OPN* genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. *J. Dairy Sci.* 90: 2966-2970.

CC در موقعیت $c.3359A > C$ در مقایسه با افراد دارای ژنوتیپ AA و AC مقدار چربی شیر کمتری دارند اما نتایج به سطح معنی داری ۵ درصد نرسید. بنابراین Weikard و همکاران (۲۰۰۷) پیشنهاد کردند که ارتباط بین $SNPA > C$ در موقعیت ۳۳۵۹ با مقدار چربی شیر ممکن است به علت عدم تعادل پیوستگی (LD) بین جایگاه های $c.1892T > C$ و $c.3359A > C$ باشد. Kowalewska و همکاران (۲۰۱۰) ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ های موقعیت $c.3359A > C$ با صفات ترکیب و تولید شیر مشاهده نکردند.

بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق و نیز نقش کلیدی ژن *PPARGC1A* در متابولیسم چربی، گلوکز و انرژی و پروسه های متابولیکی در کبد و بافت های چربی و ماهیچه، به نظر می رسد تنوع در منطقه غیرکدکننده این ژن، با تاثیر بالقوه روی پردازش mRNA اولیه^۱ و کارایی ویرایش^۲ و یا تاثیر بر روی سطح mRNA، ممکن است باعث افزایش نیاز غدد پستانی به گلوکز در پیک دوره شیردهی شود. خصوصاً در گاوهای شیری پرتولید، تنظیم تولید گلوکز و استفاده از آن در کبد، بافت چربی و ماهیچه اسکلتی و دیگر بافت ها مسئله ای مهم به شمار می رود. همچنین این تحقیق، با محاسبه فراوانی هاپلوتیپ ها بین جفت جایگاه ها، آماره r^2 و در نتیجه مقدار عدم تعادل پیوستگی (LD) بین چندشکلی های تک نوکلئوتیدی برآورد شد. از آن جا که عدم تعادل پیوستگی بین دو موقعیت $c.1892T > C$ و $c.3359A > C$ برابر با ۸۵۷۲ درصد محاسبه شد می توان نتیجه گرفت که تاثیر

¹ Pre-mRNA

² Splicing

5. Khatkar MS, Thomson PC, Tammen I and Raadsma HW, 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: Review and meta-analysis. *Genet. Sel. Evol.* 36: 163-190.
6. Komisarek J and Dorynek Z, 2009. Effect of *ABCG2*, *PPARGC1A*, *OLR1* and *SCD1* gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *J. Appl. Genet.* 50: 125-132.
7. Kowalewska I, Kulig H and Kmiec M, 2010. Associations between the bovine *PPARGC1A* gene and milk production traits. *Czech J. Anim. Sci.* 55: 195-199.
8. Liang H and Ward w, 2006. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv. Physiol. Educ.* 30: 145-151.

9. Mackinnon MJ and Georges MAJ, 1998. Marker-assisted preselection of young dairy sires prior to progeny-testing. *Livest. Prod. Sci.* 54: 229-250.
10. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF, 1988. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215-1220.
11. Olsen HG, Lien S, Gautier M, Nilsen H, Roseth A, Berg PR, Sundsaasen KK, Svendsen M and Meuwissen TH, 2005. Mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6. *Genetics* 169: 275-283.
12. Pollak EJ, 2005. Application and impact of new genetic technologies on beef cattle breeding: a 'real world' perspective. *Aust. J. Exp. Agric.* 45: 739-748.
13. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M and Spiegelman BM, 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839.
14. SAS Institute. 1999. SAS OnlineDoc, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC.
15. Schennink A, Bovenhuis H, Leon-Kloosterziel KM, Arendonk AM and Visker MHP, 2009. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Anim. Genet.* 40: 909-916.
16. Soller M, 1994. Marker assisted selection-An overview. *Anim. Biotechnol.* 3: 193-201.
17. Weikard R, Kuhn C, Goldammer T, Freyer G and Schwerin M, 2005. The bovine PPARGC1A gene: Molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiol. Genomics* 21: 1-13.
18. White SN, Casas E, Allan MF, Keele JW, Snelling WM, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M and Smith TPL, 2007. Evaluation in beef cattle of six deoxyribonucleic acid markers developed for dairy traits reveals an osteopontin polymorphism associated with postweaning growth. *J. Anim. Sci.* 85: 1-10.
19. Yeh FC, Yang R and Boyle T, 1999. Pop Gene version 1.31, Microsoft windows-based free ware for population genetic analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.