

## مطالعه چند شکلی در ژن *ATPIAI* و ارتباط آن با صفت نرخ باروری در گاوهای هلستاین و سرابی

### Study of polymorphism in the *ATPIAI* gene and its association with conception rate in Holstein and Sarabi breeds

مختار غفاری<sup>۱\*</sup>، اردشیر نجاتی جوارمی<sup>۲</sup>، مصطفی صادقی<sup>۱</sup>، محمد مرادی شهر بابک<sup>۲</sup>

۱- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- به ترتیب استاد، دانشیار، استاد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

Ghaffari M<sup>\*1</sup>, Nejati-Javaremi A<sup>2</sup>, Sadeghi M<sup>2</sup>, Moradi-Shahrbabak M<sup>2</sup>

1. Assistant Professor, Department of Animal Science, Urmia University, Urmia,  
Iran

2. Professor, Associate Professor, Assistant Professor, Department of Animal  
Science, University of Tehran, Karaj, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.ghaffari@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۲۳)

#### چکیده

هدف از این تحقیق، مطالعه چندشکلی در ژن *ATPIAI* و ارتباط آن با صفت نرخ باروری در گاوهای هلستاین و سرابی بود. به این منظور از ۱۲۴ راس گاو شیرده شامل ۷۲ راس هلستاین و ۵۲ راس گاو سرابی خون گیری انجام شد. استخراج DNA با استفاده از روش بهینه یافته نمکی انجام پذیرفت. کمیت و کیفیت DNAهای استخراجی با استفاده از الکتروفورز و اسپکتروفتومتری صورت پذیرفت. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر قطعه ۳۳۰ جفت بازی از ناحیه مذکور انجام گرفت و برای شناسایی چندشکلی در ناحیه مذکور از روش تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) استفاده شد. در نهایت جهت شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) از هر الگوی بانندی متفاوت چند نمونه جهت توالی‌یابی ارسال شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی و هم‌ردیف‌سازی با توالی ثبت شده در NCBI نشان داد که در این ناحیه دو SNP وجود دارد که یکی از این جهش‌ها در ناحیه اینترون و دیگری در ناحیه اگزون اتفاق افتاده است و جهش اتفاق افتاده در ناحیه اگزون تغییری در اسیدآمین و پروتئین حاصل از این ژن ایجاد نمی‌کند. برای بررسی ارتباط بین این جایگاه‌ها با صفت نرخ باروری الگوهای بانندی (هاپلوتایپ) در مدل قرار گرفت که نشان داد بین هاپلوتایپ‌های مشاهده شده و صفت نرخ باروری ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

#### واژه‌های کلیدی

استرس حرارتی

هاپلوتایپ

SNP

PCR-SSCP

صفات مختلف تولیدی و تولید مثلی را نشان داده‌اند (Collier et al. 2015; Ghaffari et al. 2013; Das et al. 2008). در تابستان دمای بالا باعث تولید تنش گرمایی و در پی آن باعث تنش اکسیداتیو در گاوهای شیری می‌شود (Bernabucci et al. 2002) و تنش گرمایی عامل مهمی در کاهش سودآوری مزارع پرورش گاو شیری است (Ravagnolo and Misztal 2002)، از طرفی تنش گرمایی اثر منفی بر برخی نشانگرهای پلازما می‌گذارد. مطالعات دیگر اثر تنش گرمایی را بر سطوح سدیم و پتاسیم پلازما در گاوهای هلشتاین نشان داده‌اند (El-Nouty et al. 2004; Srikandakumar and Johnson, 1980). ژن  $Na^+,K^+-ATPase$  به علت این‌که در مقابل استرس اکسیداتیو حساسیت نشان می‌دهد، می‌تواند به‌عنوان ژن کاندیدا برای استرس گرمایی باشد. پروتئین  $Na^+,K^+-ATPase$  گاو دارای دو زیرواحد آلفا و بتا می‌باشد، که زیر واحد آلفا به‌وسیله ژن *ATPIAI* بیان می‌شود. همچنین زیر واحد آلفا در غشای سلولی گلبول‌های قرمز خونی توسط ژن *ATPIAI* کد می‌شود (Herrera et al. 1987; Swadner et al. 2000). با استفاده از روش PCR-SSCP (Liu et al. 2010) دو SNP را در ناحیه اگزون ۱۴ و اینترون ۱۴ ژن *ATPIAI* گزارش کردند که این چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی با ضریب تحمل گرمایی و نرخ تنفس در گاوهای هلشتاین چینی مرتبط می‌باشد (Neeraj Kashyap 2015). نشان دادند که جهش‌های صورت گرفته در ژن *ATPIAI* ارتباط معنی‌داری با صفات نرخ تنفسی و دمای رحم در گاوهای هلشتاین، جرسی و گاو بومی هندی دارد. بنابراین ژن *ATPIAI* را که باعث بیان زیر واحد آلفا از پروتئین  $Na^+,K^+-ATPase$  می‌شود، را به‌عنوان ژن کاندید برای تنش گرمایی و اکسیداتیو معرفی کردند. از طرف دیگر، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه‌ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهم‌تر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد (Mohammadabadi et al. 2017). بنابراین، هدف از اجرای این تحقیق شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) موجود در ژن *ATPIAI* و ارزیابی ارتباط بین این چندشکلی با نرخ باروری در گاوهای نژاد سراسی و هلشتاین بود.

طبق آخرین آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی، تعداد ۱۸۸۳۰ واحد صنعتی گاو داری با ظرفیت ۲۰۴۸۵۶۳ راس گاو شیرده در کشور مشغول فعالیت هستند. طی سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۷ تولید شیر دارای یک روند رو به رشد بوده است (Kharrazi Koopaei, et al. 2011). با وجود روند افزایشی تولید شیر در کشور اما هنوز سرانه مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین‌تر است. سرانه مصرف شیر در کشور برای هرنفر برابر با ۹۵ کیلوگرم می‌باشد، در حالی که سرانه مصرف شیر در جهان برابر با ۱۶۹ کیلوگرم و در اروپا برابر با ۳۵۰ کیلوگرم در سال است (Kharrazi Koopaei et al. 2011). با توجه به نتایج پژوهش‌های مختلف انجام شده بر روی گاوهای هلشتاین ایران (Ghasemi et al. 2010; Mohammad Abadi and Mohammadi, 2010; Kharrazi Koopaei, et al. 2012; Ebrahimi et al. 2015a and 2015b; Barazandeh et al. 2016) و آمار و اطلاعات موجود می‌توان دریافت که این دام‌ها باید از جنبه‌های گوناگون مورد مطالعه قرار گیرند. در این راستا، از مهم‌ترین صفات اقتصادی مورد نظر در اصلاح گاوهای شیری می‌توان صفات تولیدمثلی، تولید شیر، چربی، پروتئین، تیپ و طول عمر اقتصادی آن‌ها را نام برد (Forabosco 2005). سودآوری در واحدهای پرورش گاو شیری بستگی به باروری دارد، علی‌رغم پیشرفت سریع ژنتیکی و مدیریتی در تولید شیر گاوهای شیری، بازده باروری از اواسط دهه ۱۹۸۰ کم شده‌است. دلیل این کاهش در باروری را نمی‌توان فقط به افزایش شیر نسبت داد. تنش گرمایی می‌تواند به‌عنوان یکی از فاکتورهای اصلی مرتبط با کاهش باروری به‌ویژه در مناطق گرمسیری در مزارع پرورش گاوهای پرتولید باشد. وجود تنش گرمایی قبل از عمل تلقیح مصنوعی، با کاهش نرخ باروری در ارتباط است (García-Ispuerto et al. 2007). دمای محیطی، تابش، رطوبت نسبی و سرعت باد در بوجود آمدن درجات متفاوتی از تنش گرمایی تاثیر دارند (Rensis and Scaramuzzi, 2003). تنش گرمایی یک عامل مهم در کاهش سودآوری مزارع پرورش گاو شیری است (Ravagnolo and Misztal 2002)، تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش گرما، سالانه میلیاردها دلار سودآوری تولیدات دامی را کاهش می‌دهند (St-Pierre et al. 2003). اخیراً چندین مطالعه ارتباط بین چند شکلی در ژن‌های مختلف شامل پروتئین‌های شوک حرارتی و  $Na^+,K^+-ATPase$  با

حاصل از PCR و تعیین توالی قطعه مورد نظر توسط شرکت BioNeer کشور کره جنوبی انجام گرفت. برای مقایسه و مطابقت توالی‌ها با یکدیگر و با توالی مرجع در سایت NCBI (با شماره دسترسی NC-007301.3) از نرم‌افزار Vector NTI استفاده شد (Vector NTI Advance 9.0., 2003).

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS(9.1) انجام شد و معادله مدل آماری به صورت زیر بود:

$$CR_{ijklmn} = \mu + Y_i + M_j + Lac_k + B_l + P_m + \epsilon_{ijklmn}$$

که در این مدل،  $CR_{ijklmn}$ : هر یک از مشاهدات مربوط به نرخ آبستنی،  $\mu$ : میانگین جامعه،  $Y_i$ : اثر  $i$  امین سال هنگام تلقیح،  $M_j$ : اثر  $j$  امین ماه تلقیح،  $Lac_k$ : اثر  $k$  امین شکم زایش،  $B_l$ : اثر  $l$  امین نژاد،  $P_m$ : اثر  $m$  امین الگوی بانندی مشاهده شده و  $\epsilon_{ijklmn}$ : اثر باقی مانده می‌باشد،

ابتدا آنالیز برای هر دو نژاد به صورت توأم انجام گرفت. سپس به صورت جداگانه برای هر نژاد آنالیز انجام شد که در این حالت اثر نژاد از معادله مدل حذف شد. بعد از تعیین اثرات ثابت از آزمون توکی برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

نتایج طیف سنجی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری بر روی ژل آگارز یک درصد نشان داد که DNAهای استخراج شده دارای کیفیت مناسبی برای انجام PCR می‌باشند. DNAهای استخراج شده با غلظت ۲۰۰-۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر برای انجام PCR انتخاب شدند. نتایج بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان داد که الگوی بانندی مربوط به تکثیر قطعه ۳۳۰ جفت‌بازی از ناحیه آگرون ۱۴ و بخشی از ایترون ۱۴ مربوط به ژن *ATPIAI* به خوبی و بدون تکثیر قطعات اضافی و فاقد اسمیر و دایمر بود که موید اختصاصی بودن جفت آغازگرها می‌باشد. و سائز نشانگر استفاده شده در کنار محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشان می‌دهد که قطعه تکثیر شده ۳۳۰ جفت‌باز طول دارد. صحت این مطلب با حضور نشانگر اندازه در کنار نمونه‌های الکتروفورز شده تأیید شدند.

نتایج حاصل از بررسی الگوی تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) روی ژل اکریلامید ۱۲٪، نشان داد که ۴ نوع الگوی بانندی متفاوت در جمعیت مورد مطالعه وجود دارد. توالی‌یابی محصولات PCR برای این ناحیه وجود ۴ هاپلوتا‌یپ متفاوت را

برای این منظور از ۱۲۴ راس گاو شیری شامل ۵۲ راس گاو سرابی از ایستگاه تحقیقاتی سراب و تعداد ۷۲ راس گاو هلشتاین از گاوداری فکا واقع در استان اصفهان خون‌گیری انجام شد. از هر گاو حدود ۵ میلی‌لیتر خون در لوله‌های آزمایش استریل، حاوی EDTA، گرفته شد. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA در یخچال نگهداری شدند. اطلاعات صفات تولیدمثلی شامل تنها نرخ آبستنی، برای نژادهای سرابی و هلشتاین بود. جزئیات اطلاعات فنوتیپی شامل اثرات ثابت سال هنگام تلقیح، ماه تلقیح و اثر شکم‌زایش بود. در این پژوهش برای استخراج DNA از روش بهینه یافته نمکی (Miller et al. 1988) استفاده شد. برای تکثیر قطعه‌ی ۳۳۰ جفت‌بازی جایگاه آگرون ۱۴ و بخشی از ایترون ۱۴ ژن *ATPIAI* از تکنیک PCR-SSCP استفاده شد. توالی آغازگرها (Liu et al. 2010) عبارت بودند از:

Forward پرایمر رفت:

(5'-TGGAACTGCAATCACTGAGGTC-3')

Reverse پرایمر برگشت:

(5'-TGAGCAACCAACGCAACT-3')

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و شامل ۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA، بافر PCR (IX)، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، dNTPs (0.2 mM)، MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM) و نیم واحد آنزیم تک پلی‌مرز در ۳۵ سیکل اجرا شد. برنامه حرارتی شامل واسرشت شدن اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال پرایمرها، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه برای تکثیر قطعه مورد نظر و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. به منظور تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵٪ با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. از روش PCR - SSCP با استفاده از الکتروفورز عمودی توسط دستگاه (Bio-Rad) بر روی ژل اکریل آمید و رنگ‌آمیزی با نیترا ت نقره، برای شناسایی جهش در جایگاه آگرون ۱۴ و بخشی از ایترون ۱۴ ژن *ATPIAI* استفاده شد.

چون هدف تعیین چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی با استفاده از روش توالی‌یابی بود، لذا از هر الگوی بانندی متفاوت تعداد ۲ یا ۳ نمونه برای انجام توالی‌یابی انتخاب شد. خالص کردن کلیه نمونه‌های

در جدول ۱ مقادیر میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های مختلف (الگوهای بانندی) برای شکم زایش‌های مختلف در دو نژاد سرابی و هلشتاین ذکر شده‌است. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد ارتباط بین هاپلوتایپ‌ها با صفت نرخ باروری در این ناحیه معنی دار نیست. همچنین در آنالیز جداگانه برای هر نژاد ارتباط معنی داری بین هاپلوتایپ‌های مشاهده شده با صفت نرخ باروری در هیچ‌کدام از نژادهای سرابی و هلشتاین مشاهده نشد (جدول ۲). که یکی از دلایل این امر، می‌تواند جهش خنثی (عدم تغییر در اسید آمینه) در توالی ژن مورد مطالعه و به طبع آن پروتئین حاصل باشد.

تائید کرد. در این مطالعه دو SNP مشاهده شد که شامل تبدیل آدنین به گوانین در ناحیه آگزون ۱۴ و سیتوزین به جای تیمین در ناحیه اینترون ۱۴ این ژن بود. تبدیل آدنین به جای گوانین، در آگزون ۱۴ باعث تغییر اسید آمینه نشد و در هر دو حالت اسید آمینه والین باقی‌ماند (شکل ۱). در مطالعه (Liu et al. (2010 نیز دو SNP در این جایگاه مشاهده شده بود. نتیجه این دو تغییر در نوکلئوتیدهای این جایگاه که باعث ایجاد ۴ نوع الگوی بانندی (ژنوتیپ) متفاوت در جمعیت گاوهای مورد مطالعه هلشتاین و سرابی شده است. و فراوانی این ژنوتیپ‌ها (الگوهای بانندی) در شکل ۲ ارائه شده‌است.

جدول ۱- ارتباط هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در ژن *ATPIA1* با صفت نرخ باروری در شکم زایش‌های مختلف در دو نژاد سرابی و هلشتاین.

شکم زایش		هاپلوتایپ	
شماره ۱	شماره ۲	شماره ۳	شماره ۴
۰/۸۵	۰/۶۰	۰/۸۳	۰/۶۳
شکم زایش یک <sup>ns</sup>	۰/۲۲	۰/۵۱	۰/۶۱
شکم زایش دو <sup>ns</sup>	۰/۵۲	۰/۳۰	۰/۶۱

جدول ۲- ارتباط هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در ژن *ATPIA1* با صفت نرخ باروری در دو نژاد سرابی و هلشتاین.

نژاد		هاپلوتایپ	
شماره ۱	شماره ۲	شماره ۳	شماره ۴
۰/۴۵	۰/۴۲	۰/۳۸	۰/۴۰
هلشتاین <sup>ns</sup>	۰/۴۹	۰/۶۸	۰/۸۲
سرابی <sup>ns</sup>			

به تنهایی برای هر نوع نتیجه‌گیری جامع کافی نیست و تعیین توام چندین ژن عمده تاثیرگذار بر تولید مثل و نرخ باروری مورد نیاز است. در نهایت شاید بتوان از نتایج حاصل از چنین پژوهش‌هایی در برنامه‌های انتخاب بر اساس نشانگر در برنامه‌های اصلاح نژاد صفات تولیدمثلی استفاده کرد.

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که در نژادهای مورد مطالعه هلشتاین و سرابی ارتباط معنی‌داری بین صفت نرخ باروری با SNP‌های ناحیه مورد مطالعه وجود ندارد. با توجه به اینکه صفت نرخ باروری توسط برآیند اثر چندین جایگاه ژن کنترل می‌شود، بررسی وضعیت یک ناحیه از ژن و ارتباط آن با صفت مورد نظر،

### منابع

Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi M, Nezamabadipour H (2016) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. Iranian Journal of Applied Animal Science 6:571-579.  
Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A (2002) Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. Journal of Dairy Science 85: 2173-2179.

Collier RJ, Collier JL, Rhoads RP, Baumgard LH (2008). Invited Review: Genes involved in the bovine heat stress response. Journal of Dairy Science 91: 445-454.  
Das R, Gupta ID, Verma A, Singh A, Chaudhari MV, Sailo L, Upadhyay RC and Goswami J (2015) Genetic polymorphisms of *ATPIA1* gene and their association with heat tolerance in Jersey crossbred cows. Indian Journal of Dairy Science 68: 50-54.

- Ebrahimi Z, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Khezri A (2015b) Association of PIT1 gene and milk protein percentage in Holstein cattle. *Journal of Livestock Science and Technologies* 3:41-49.
- Ebrahimi Z, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Khezri A, Najmi Noori A (2015a) Association of PIT1 gene with milk fat percentage in Holstein cattle. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 5: 575-582.
- El-Nouty F, Elbanna I, Davis T, Johnson H (1980) Aldosterone and ADH response to heat and dehydration in cattle. *Journal of Applied Physiology* 48:249-255.
- Forabosco F (2005) Breeding for longevity in Italian Chianina cattle. Ph.D Thesis. University of Wageningen
- García-Ispuerto I, López-Gatius F, Bech-Sabat G, Santolaria P, Yániz J, Nogareda C, De Rensis F and López-Béjar M (2007) Climate factors affecting conception rate of high producing dairy cows in northeastern Spain. *Theriogenology* 67:1379-1385.
- Ghaffari M, Sadeghi M, Nejati-Javaremi A, Moradi-Shahrbabak M, Faraji R (2014). Study of polymorphism in the bovine HSP70 gene promote and its association with conception rate in Holstein and Sarabi breeds. *Journal of Agricultural Biotechnology* 5:83-95.
- Ghasemi M, A. Baghizadeh MR, Abadi M (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4:5758-5760.
- Herrera VL, Emanuel JR, Ruiz-Opazo N, Levenson R, et al (1987) Three differentially expressed Na,K-ATPase alpha subunit isoforms: structural and functional implications. *The Journal of Cell Biology* 105: 1855-1865.
- Kearney F (2007) Improving Dairy Herd Fertility through Genetic Selection. *Irish Veterinary Journal* 40:377-380.
- Kharrati Koopaei H, Mohammad Abadi MR, Ansari Mahyari S, Tarang AR, Potki P, Esmailizadeh AK (2012) Effect of DGAT1 variants on milk composition traits in Iranian Holstein cattle population. *Animal Science Papers and Reports* 30: 231-240.
- Kharrati Koopaei H, Mohammadabadi MR, Ansari Mahyari S, Esmailizadeh AK, Tarang A, Nikbakhti M (2011) Genetic Variation of DGAT1 Gene and its Association with Milk Production in Iranian Holstein Cattle Breed Population. *Iranian Journal of Animal Science Research* 3:185-192. (In Farsi).
- Liu Y, Zhou X, Li D, Cui Q and Wang G (2010). Association of ATP 1 A 1 gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. *Genetics and Molecular Research* 9: 891-896.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky GF (1988) A simple procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:1215.
- Mohammad Abadi MR, Mohammadi A (2010) Study of beta-lactoglobulin genotypes in native and Holstein cattle of Kerman province. *Journal of Animal Productions* 12: 61-67.
- Mohammadabadi MR (2017). Role of clostridium perfringens in pathogenicity of some domestic animals. *Journal of Advances in Agriculture* 7: 1117-1121.
- Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017). Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. *Journal of Research and Development* 5: 154-157
- Neeraj K, Pushpendra K, Bharti D, Sandip B, Amit K, Anuj C, Bharat B, Gyanendra S and Deepak S (2015). Association of *ATPIA1* gene polymorphism with thermotolerance in Tharparkar and Vrindavani cattle. *Veterinary World* 8: 892-897
- Ravagnolo O, Misztal I (2002) Effect of heat stress on nonreturn rate in Holstein cows: Genetic analyses. *Journal of Dairy Science* 85: 3092-3100.
- Ravagnolo O, Misztal I (2002). Effect of Heat Stress on Nonreturn Rate in Holsteins: Fixed-Model Analyses. *Journal of Dairy Science* 85:3101-3106.
- Rensis FD, Scaramuzzi RJ (2003) Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow-a review. *Theriogenology* 60:1139-1151.
- SAS (Statistical Analysis Systems) (2004). User's Guide. Version 9.1. SAS Institute Inc, Cary.
- Srikandakumar A and Johnson E (2004) Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian Milking Zebu cows. *Tropical Animal Health and Production* 36:685-692.
- St-Pierre NR, Cobanov B and Schnitkey G (2003). Economic losses from heat Stress by US livestock industries. *Journal of Dairy Science* 86: 52-77
- Sweadner KJ, Wetzel RK and Arystarkhova E (2000) Genomic organization of the human FXVD2 gene encoding the gamma subunit of the Na,K-ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279: 196-201.